

**T.C.
MILLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

LABORATUVAR HİZMETLERİ

DOKU PREPARATINI BOYAMA

Ankara, 2013

-
- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
 - Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.
 - **PARA İLE SATILMAZ.**

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR	ii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. GENEL AMAÇLI BOYAMA	3
1.1. Doku Preparatından Parafinin Uzaklaştırılması.....	5
1.2. Preparatın Boyanması	6
1.3. Genel Amaçlı Boyama Yöntemleri.....	7
1.3.1. Harris Hematoksilen-Eozin Boyama.....	7
1.3.2. Mayer Hematoksilen Boyama (Mayer'in Musikarmin Boyası)	10
1.3.3. Delafield Hamatoksilen Boyama	11
1.3.4. Erlich Hamatoksilen Boyama.....	12
1.3.5. Böhmer Hematoksilen Boyama	13
1.4. Preparatın Kapatılması.....	13
UYGULAMA FAALİYETİ	15
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	17
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	18
2. ÖZEL AMAÇLI BOYAMA	18
1.1. Verhoeff'in Elastik Doku Boyama	19
1.1.1. Boya ve Çözeltilerin Hazırlanması	19
1.1.2. Yapılışı	19
1.2. Fosfomolibdikasit-Hematoksilen Boyama (Fosfotungustikasit Hematoksilen Boyama)	20
1.3. Masson'un Trikrom Boyama	21
1.4. Papanicoloau Boyama.....	22
UYGULAMA FAALİYETİ	25
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	27
MODÜL DEĞERLENDİRME	28
CEVAP ANAHTARLARI.....	30
KAYNAKÇA	31

AÇIKLAMALAR

ALAN	Laboratuvar Hizmetleri
DAL/MESLEK	Tarım Laboratuvarı / Tarım Laboratuvar Teknisyeni
MODÜLÜN ADI	Doku Preparatını Boyama
MODÜLÜN TANIMI	Doku preparatlarını boyamada, boya solüsyonlarını hazırlama ve boyama teknikleri hakkında bilgi ve becerilerin kazandırıldığı bir öğrenme materyalidir.
SÜRE	40/32
YETERLİK	Doku preparatını boyamak
MODÜLÜN AMACI	Genel Amaç Uygun laboratuvar ortamı sağlandığında tekniğine uygun olarak doku preparatlarını boyayabileceksiniz. Amaçlar <ol style="list-style-type: none">1. Doku preparatında genel amaçlı boyama yapabileceksiniz.2. Doku preparatında özel amaçlı boyama yapabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Ortam: Histoloji laboratuvarı Donanım: Laboratuvar ortamı, lam, lamel, şale, pens, lam boyama sepetleri, ksilol serileri, alkol serileri, hematoksilen boyası, asit-alkol karışımı, amonyum hidroksit çözeltisi, eozin boyası, entellan / Kanada balsamı, şale, pens, lam boyama sepetleri, Van Gieson boyası, FeCl ₃ solüsyonu, ksilol, etil alkol vb.
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	Modülün içinde yer alan her faaliyetten sonra verilen ölçme araçları ile kazandığınız bilgileri ölçerek kendi kendinizi değerlendireceksiniz. Öğretmen, modülün sonunda, ölçme aracı (test, çoktan seçmeli, doğru-yanlış, vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığınız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Patoloji, anatomi ve fizyolojide öğrenilen bilgilere, hastalıklı organların çıplak gözle veya mikroskop altındaki anormal görünüşlerini ekleyerek hastalıkların daha kolay anlaşılmasını sağlar. Görünüşlerin karar vermeye çok yardımcı olduğu alanlarda, patolojik incelemenin tanıya ve uygun tedavi yönteminin belirlenmesine katkısı da çok büyüktür. Günümüzde, tümörlerin tanısı başta olmak üzere pek çok hastalığın kesin tanısı için patolojik inceleme gereklidir.

Bu modülde kazandığınız yeterlikle boya solüsyonlarını hazırlayıp boyama teknik ve becerilerini kazanacaksınız. Elde edeceğiniz sonuçlar tedavi ve tanıda sizlere büyük katkı sağlayacaktır.



ÖĞRENME FAALİYETİ-1

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle doku preparatında genel amaçlı boyama yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Patoloji laboratuvarlarında yapılan histolojik çalışmalar konusunda araştırma yapınız.
- Kesitlerden elde edilen preparatları boyama tekniklerini inceleyiniz.

1. GENEL AMAÇLI BOYAMA

Veteriner histoloji; memeli ve kanatlı hayvanlarda öncelikle organizmanın en küçük canlı birimi olan hücrenin temel yapısal özelliklerini, fonksiyonlarını, doku, organ ve sistemlerini mikroskopik düzeyde inceler. Histoloji bilimi, öncelikle ışık mikroskopi tekniğini, daha detaylı incelemeler için de elektron mikroskop tekniğini, immünohistokimya, histokimya gibi teknikleri kullanır.

Genel amaçlı boyama tekniğinin esası; ışığı geçiremeyecek kadar kalın olan dokulardan ışığı geçirebilecek incelikte kesitler almak ve canlıda renksiz olan doku unsurlarını boyayarak mikroskop altında görülebilir hâle getirmektir.

Materyal, canlıdan anestezi altında ya da biyopsi ile elde edilir. Doku örnekleri doku türüne göre değişmekle 1 cm³ ebatlarından büyük olmamalıdır.

Organizmadan ayrılan doku ve organ parçalarının mikroskopla incelenebilecek duruma getirilmesi için uygulanan işlemlerin tümü **histoloji tekniği** olarak adlandırılır. Histoloji tekniğinde izlenen sürece de **doku takibi** adı verilir. Doku takibinin amacı, dokuyu desteklemek için yeterince sert bir katı ortama gömmek ve kesitlerin alınması için gerekli sertliği vermektir.

Histoloji tekniği uygulanan dokular genel olarak cansız, bazı dokular ise vital boyalarla canlı olarak incelenir. Mezenteriyum, kurbağa yavrusunun kuyruğu, hamsterin yanak kesesi ve spermatozoon canlı olarak incelenir.

Doku takibinin ilk aşaması tespit işlemidir. Dokularda canlılığın sona erdiği andaki özelliklere en yakın olarak korunmasını sağlayan tespit işlemi çok önemlidir ve itina ile

yapılması gerekir. Tespitten sonra dokulardaki suyun kademeli olarak alınmasını sağlayan dereceli alkoller, dokuları şeffaflaştırmak için ksilol gibi bazı maddeler kullanılır. Suyu giderilen ve şeffaflaştırılan örneklere parafin ile vakumlu ortamda emdirme ve bloklama yapılır. Bloklama sonrası kesitler alınır (İncelenecek doku parçalarından elde edilen bu ince dilimlere kesit (coupe) adı verilir.). İçerisinde doku bulunan parafinli bloktan mikrotom ile kesilen kesitler parlak tarafları alta gelecek (suya temas edecek) şekilde 35-40 °C'lik su havuzuna konur ve yüzdürülür. Kesit sırasında şekillenen kırışma ve katlanma hataları varsa fırça veya ince iğneler yardımıyla düzeltilir. Doku lam yardımıyla sudan alınır. Blok numarası ve kodu yazılmış lam, dik şekilde su havuzuna daldırılır. Lam, su üzerinde yüzen doku şeridine yaklaştırılır. Doku şeridi lamla temas ettirilerek lam üzerine alınır ve lam yatay pozisyonda olmak üzere bir tablaya konarak 37 °C'lik etüvde kurumaya bırakılır.



Resim 1.1: Preparatların etüvde kurumaya bırakılması

Bu şekilde elde edilen preparata deparafinizasyon, özel kaplarda boyama ve lam kapatma işlemleri yapılır. Bu işlemler sonunda boyalı histolojik preparat hazırlanmış olur.

Dokularda gerçekte var olmayan ancak histoloji tekniğinde kullanılan temel aşamalar ya da doku takibi sırasında oluşan ve boyanmış preparatlarda istenmeyen oluşumlar meydana gelebilir. Bu oluşumlar kesit yüzeyinde boşluklar, dalgalanmalar, farklı tonlarda boyanmalar, boya kristallerinin çökmesi, hava kabarcığı gibi birtakım görüntülerdir. Bu gibi preparasyon hatalarının önlemek için bazı noktalara dikkat etmek gerekir. Bunlar;

- Tespit aşamasında, yetersiz ya da uzun süreli tespit yapılmamalıdır. Aksi hâlde dokuda büzüşme, sertleşme buna bağlı olarak dokulardan kesit alınamaması, kesitlerin dağılması gibi durumlar ortaya çıkar.
- Dehidrasyon aşamasında aşırı dehidrasyon ya da yetersiz dehidrasyon, hücreler içinde vakuoller oluşmasına neden olabilir.

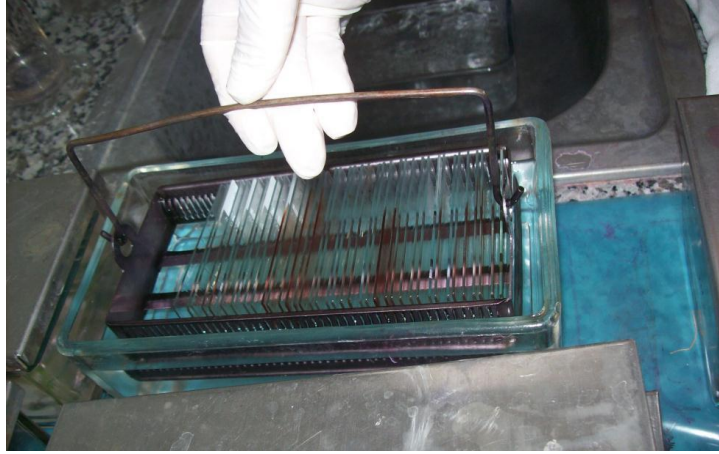
- Uzun süre saydamlaşma da örneklerin aşırı sertleşmesine ve kesitlerin kırılmasına yol açar. Doku örnekleri denatüre olabilir. Bu durum da kesitlerde farklı renklerde boyamaya neden olur.
- Dokulara parafin emdirme sürecindeki yetersizlik, kesitlerin lama alınmasında, süratle ve kesitlerin lam üzerinde tam anlamıyla açılmaması ile sonuçlanabilir. Parafine gömülen doku örneklerinde, çevrede yeterli parafin olması, dokuya destek olarak kesitlerin daha düzgün olmasını sağlayacaktır.

1.1. Doku Preparatından Parafinin Uzaklaştırılması

Dondurma mikrotomu ya da kriyostat ile elde edilen kesitler direkt olarak boya eriyiğine konabilir. Fakat özellikle parafin kesitleri, kurumuş şekilleriyle boyanamaz. Bunların öncelikle suyla uyusabilir duruma gelmeleri gerekir. Bunun için de önce parafin giderilir.

Lam üzerine alınan doku kesitinin boyanabilmesi için öncelikle parafinden kurtarılması işlemine deparafinizasyon denir. Parafin giderme işlemi için;

- Doku taşıma sepetine yerleştirilmiş lamalar-doku kesitleri 35-40 °C'lik etüvde 15 dakika bekletilir. Bu işlemle doku kesitlerinin kurumması ve lama daha iyi tutunmaları sağlanır. Ayrıca ısı, doku çevresindeki blok parafininin ve dokuya infiltre olmuş parafinin de eriyerek uzaklaşmasını sağlar ve ksilolde daha kolay uzaklaştırılmasında kolaylık sağlar.
- Doku kesitleri ısı işleminden sonra iki ayrı kaptaki ksilolde (10'ar) onar dakika bekletilir. Bu işlem sonunda lamdaki ve dokulardaki parafinler uzaklaştırılır, dokular aynı zamanda şeffaflandırılmış olur.
- Ksilolün giderilmesi amacıyla da dokular; sırasıyla dereceli alkollerde (%96, 90, 80, 70 etil alkolde) her birinde (3'er) üçer dakika bekletilir.
- Doku kesitleri distile suda 10 dakika bekletilerek dokuların kaybettiği su tekrar kazandırılır. Böylece deparafinizasyon işlemi tamamlanır.



Resim 1.2: Doku taşıma sepetine yerleştirilmiş lamaların deparafinizasyonu

1.2. Preparatın Boyanması

Boyanmamış parafin kesitlerde çoğu doku elemanı renksizdir. Işık mikroskobu ile histolojik yapıyı ayırt etmek oldukça güçtür. Bu nedenle doku kesitlerinin boyanması gerekir.

Boyama, çeşitli hücre ve doku kısımlarının boyaları farklı şekilde tutmaları esasına dayanır. Boya, doku elemanlarının tümünü boyuyorsa **genel boya**; boya, doku elemanlarının özel yapılarını boyuyorsa **seçici (özel) boya** olarak ifade edilir. Ayrıca bazik boyalarla farklı boyuyorsa (Bazı doku bileşenleri boyalarla birleştiğinde boyanın orijinal renginden ve dokunun diğer bölümlerinde oluşan renkten farklı bir renk oluşturur.) **metakromatik boya** olarak adlandırılır.

Genellikle dokular **asit** ve **bazik boya** ile boyanır. Bazik boya ile boyanan doku elemanları **bazofilik**, asit boya ile boyananlar ise **asidofilik** olarak adlandırılır. Genel olarak bazik boyalar dokuları mavi-mor, asit boyalar ise pembe-kırmızı renklerde boyar. Örneğin, eozin asit boyadır ve stoplazmayı pembe-kırmızı boyar. Hematoksilen bazik boyadır ve nükleusu mavi-mor boyar.

Boyaların çoğu suda, bazıları ise alkol veya asetonda eritilerek hazırlanır. Tek bir boyama yöntemi ya da çoğu zaman birkaç boyama yöntemi bir arada kullanılarak boyama gerçekleştirilir. Histoloji ve patoloji laboratuvarlarında rutin incelemeler için genellikle hematoksilen-eozin birleşik boyama yöntemi kullanılır. Ama dokunun özelliğine bağlı olarak da farklı boyamalar yapılabilir. Genel yapısal özelliklerin belirlenmesi için de çoğunlukla Masson'nun trikrom boyama yöntemleri kullanılır.

Boyanan örnekler daha sonra ksilol ile uyum sağlayan, entellan (Kanada balsamı) adı verilen sentetik bir madde ile kapatılarak kurumaya bırakılır. Dokulardan alınan kesitler

üzerinde uygulanan bu işlemler dizisi sonucunda hazırlanan preparatlar mikroskop altında incelenmeye hazır hâle gelmiş olur.

Manuel (elle) boyama dışında, “istasyon süresi sabit lineer boyama cihazı, carousel tipi boyama cihazları, istasyon süreleri değiştirilebilen kapalı sistem tam otomatik boyama cihazı” gibi otomatize boyama cihazları da geliştirilmiştir.

1.3. Genel Amaçlı Boyama Yöntemleri

Hayvansal dokuların histolojik incelemesinde kullanılan tekniklerin sınıflandırılmasında, genel doku boyama yöntemleri temel alınır. Bağ ve destek dokuları ile elastiki dokuları göstermek veya sinir dokuları göstermek için düzenlenmiş boyama yöntemlerinin bir kısım ortak parametreleri kullanılır.

Sinir dokuları söz konusu olduğunda, nörolojik teknikler, genel doku tekniklerinden oldukça farklı olduğu için bu ayırımı yapmak kolaydır. Fakat bağ veya elastik dokular söz konusu olduğunda burada ele alınan gruplandırma daha genel olmak zorundadır. Çünkü bağ dokusu elemanlarını veya elastliğini ortaya çıkaran bazı teknikler, aynı zamanda iyi ortak doku boyalarıdır. Bu iki grup hâlinde kaba bir sınıflandırılmaya gidilmesi mümkün olabilir. Bu bağlamda genel boya teknikleri, amaca uygun kullanıldığı gibi genel anlamda da kullanılabilir.

1.3.1. Harris Hematoksilen-Eozin Boyama

Hematoksilen, histopatoloji laboratuvarında kullanılan rutin boyadır. Rutin inceleme örneklerinin tümü hematoxylin-eozin (HE) boyası ile boyanır. İnceleme sonunda gerek duyulursa ek olarak özel boyalar (histokimyasal, immünohistokimyasal) uygulanır. Genel doku boyası olarak nukleus ve stoplazma ayırımında histolojik boyalar içinde en geniş kullanımı olan ve dokunun farklı bölgelerini farklı olarak boyayan hematoxylin-eozin boyası kullanılır.

Hematoksilen, Meksika'da yetişen haematoxylen campechianum türü küçük bir ağacın kabuklarından kaynatılarak elde edilir. Hematoksilen bir boyanın kaynağı olarak kullanılır, kendisi bir boya değildir. Boya olarak tesir etmesi için sodyum iyodat (NaIO_3) veya cıva oksit (HgO) gibi oksidasyon ajanı ile okside edilmesi ve bir mordant ile renklerinin sabitleştirilmesi gerekir (En çok kullanılan mordantlar aluminyum, demir ve tungsten tuzlarıdır.). Böylece hematoksilen boya çözeltisi elde edilir.

Hematoksilen + Oksidasyon ajanı + Mordant = Hematoksilen Boya Çözeltisi

Eozin, rutin histolojik boyamada aluminyum hematoxylinlere zıt boya olarak stoplazma boyanmasında kullanılır. Günümüzde eozin Y (eosine yellowish) şekli kullanılır. Eozin S ve eozin B kullanımı sınırlıdır. Normalde sarı-yeşil renkte olan eozine, %1'lik asetik

asit ilavesiyle çözelti kırmızı renge dönüşür. Bu işlem hematoksilenle mavi renge boyanan nukleusa kontrast veren parlak bir zemin oluşturur.

➤ **Hematoksilen-eozin boyama**

Hematoksilen solüsyonları, asit hematoksilenler ve alüminyum hematoksilenler olarak iki sınıfa ayrılır. Rutinlerde kullanılanlar alüminyum hematoksilenler olup bunların başlıca örnekleri; Ehrlich's haematoxylin, Harris's haematoxylin, ve Mayer's haematoxylin'dir.

Hematoksilen genellikle nukleusu mavi-siyah renkte boyanarak intra-nukleer detayı iyi gösterir. Eozin ise hücre stoplazmasını ve bağ dokusu elemanlarını çeşitli varyasyonlarda pembe, turuncu ve kırmızı renkte boyar.

Hematoksilen-eozin boyası ile hücre ve doku elemanları çekirdek mavi; stoplazma, pembe; eritrosit, kiremit kırmızı; kas, kırmızı; fibröz, doku açık pembe; kıkırdak, açıktan koyu maviye kadar renk tonlarında; mikoz, mavimtrak; kalsifiye doku, koyu mavi; protein çökelekleri pembe; bakteri toplulukları koyu mavi boyanır.

- **Araç gereçler**
 - Laboratuvar saati
 - Lam taşıyıcı sepet
 - Boya kapları (Boya solüsyonlarının bulunduğu çeşitli ebatlarda metal veya cam kaplardır. Genelde lam sepetleriyle uyumlu yatık cam kaplar kullanılır.)



Resim 1.3: Boyama kapları (yatık şale) ve lam taşıma sepetleri

- Hematoksilen-eozin boya seti (HE boyamada bulunan boya ve solüsyonlar basamaktaki sıralarına göre boyama kaplarına “yatık şale” konularak boyama seti oluşturulur. Çoklu boyamalarda, birçok preparatın aynı anda boyanması durumunda iş yüküyle orantılı olarak 1000 cc'lik veya 500 cc'lik boyama kapları ve bunlara uygun lam taşıyıcı sepetleri kullanılır.)



Resim 1.4: Hematoksilen-eozin boya seti

- HE boya setinin başlangıcına deparafinizasyon solüsyonları ve dehidre solüsyonları eklenmesi çalışma kolaylığı sağlar.
- Yapılışı
 - Distile sudan çıkarılan lam sepetinin suyu iyice süzdürülür ve hematoksilen boya kabına daldırılır ve 4 dakika bekletilir. Dokuların daha iyi boya alması için lam sepeti, aralıklarla boya solüsyonuna daldırılıp çıkarılır. Dokuların hematoksilen boyasıyla iyi boyanabilmesi için sepetteki ve lamdaki suyun iyi süzülerek suyun boya solüsyonuna taşınmasının azaltılması gerekir (Bu durum boyanın dilüe olmamasını ve kalitesini korumasını sağlar.). Hemotoksilen boyası oksidasyona bağlı olarak çökelti oluşturur. Boya solüsyonu süzülerek çökelti giderildikten sonra kullanılmalıdır.
 - Lam sepeti akan çeşme suyu altında 2 dakika bekletilerek fazla boya giderilir.



Resim 1.5: Doku kesitlerinin akan su altında yıkanması

- Lam sepeti asit alkol solüsyonuna daldırılıp çıkarılarak dokular diferansiye edilir. Hızlı bir şekilde çeşme suyuna sokularak diferansiyasyon durdurulur.
- Lam sepeti, dilüe amonyaklı suda bekletilerek dokuların mavileşmesi sağlanır. Akan su altında doku rengi berrak mavi renk kazanıncaya kadar bekletilir.
- Hemotoksilenle boyanan lam sepeti eozin boyasına daldırılır, 1 dakika bekletilir. Süre bitiminde lamlar çeşme suyunda yıkanarak boya işlemi bitirilir.
- Boyanan lamlar düşük konsantrasyonlu %70, %95 ve %100'lük alkolden başlanarak dokular dehidre edilir ve etüvde kurumaya bırakılır.

➤ **Harris hematoksilen boya**

• **Araç gereçler**

- Harris's alum hematoksilen 5 g
- Absolu alkol 50 cc
- Alüminyum amonyum sülfat 100 g
- Distile su 1000 cc
- Cıva oksit 2,5 g

• **Yapılışı**

- Hematoksilen alkol içinde hafif ısıda eritilir.
- Alüminyum amonyum sülfat ısı yardımıyla distile su içinde eritilir.
- İkişi geniş bir erlenmayerde karıştırılır.
- Hızla kaynatılır, ısıdan alınır.
- Kabarcıklar çıkarken cıva oksit azar azar ilave edilir.
- Çözelti koyu mor renk alınca cam kap dıştan soğuk suya tutularak soğutulur.
- Böylece boyamaya hazır hâle gelir. Fakat 2-3 gün bekletilirse daha olgunlaşır. Olgunlaşmış çözelti koyu renkli şişelere alınıp ağzı sıkıca kapatılarak karanlık yerde saklanır. Boya kullanılacağı zaman %4 oranında glasiyal asetik asit eklenir.

1.3.2. Mayer Hematoksilen Boyama (Mayer'in Musikarmin Boyası)

Genellikle karmen olarak bilinir. Temelde Mayer'in boyama solüsyonuyla aynıdır. Gulandular dokular, özellikle epitelyal kökenli musinler uygulanır. Absol alkol ile 5-8 saat veya %5'lik biklorit solüsyonu ile 5 saat tespit edilir. Parafin veya selloidin içinde saklanır.

➤ **Boya ve çözeltilerin hazırlanması**

- 1 g karmin 0,5 g susuz alüminyum klorür ($AlCl_3$), 2 ml distile su içinde çözülür.
- Bu karışım koyulaşmaya kadar karıştırılır.
- Karışım içinde dereceli olarak 100 ml %50 alkol eklenerek karıştırılmaya devam edilir.
- 24 saat bekletilir, sonra süzülür.
- Hazırlanan bu karışım stok solüsyon olarak saklanır.
- Kullanılmadan önce 10 hacim distile suyla dilue edilir.

➤ **Yapılışı**

- Kesitler tekniğine uygun şekilde parafinden uzaklaştırılır.
- Stok boyama solüsyonuyla 10-15 dakikayla boyanır.
- Distile suyla yıkanır.
- %95'lik absol alkolde tutularak dehidrate edilir.
- Preparat ksilolde şeffaflaştırılır ve balsam ile kapatılır.

1.3.3. Delafield Hamatoksilen Boyama

Eozin Y'li delafield hematoksileni boyamada gösterilmek istenen oluşumlar, embriyolar ve böbreklerdir.

Fiksasyonda; bouin veya %10'luk formalin ya da zenker kullanılır.

Bloklamada parafin kullanılır.

➤ **Boya ve çözeltilerin hazırlanması**

- 4 g hematoksilin, 25 ml %95'lik etil alkol içinde çözünür.
- 400 ml doymuş sulu alüminyum amonyum sülfat eklenir.
- Karışım 7 gün süreyle açık havada ve ışıktaki bekletilir.
- Süzülür ve üzerine 100 ml gliserin, 100 ml metil alkol eklenir.
- Solüsyon koyulaşmaya yani 6-8 hafta kadar koyu bir şişede bekletilir.

- Solüsyon kullanılmadan hemen önce eşit oranda distile su ile dilüe edilir.

➤ **Yapılışı**

- Kesitler suya indirilir.
- Dilüe edilmiş delafield hematoksileni ile 15 dakika boyanır.
- Çeşme suyunda yıkanır.
- Akan suda 10 dakika bekletilir.
- Eğer kesit hâlâ mavi ise kesitin üzerine 2 damla asit alkol konur (asit alkol, 50 ml %50'lik alkole 3 damla HCl eklenerek hazırlanır.).
- Sonra tekrar çeşme suyunda yıkanır.
- Akar sudan alınan kesit üzerine birkaç damla eozin Y (eozin Y, %25'lik alkol ile %0,1-0,5?) konur ve 2-5 dakika boyanır.
- Distile suda hızlıca yıkanır.
- %95'lik ve %100'lük alkollerden geçirilir
- Ksilol ile şeffaflaştırılır, balsam ile kapatılır.
- Nükleuslar mavi, stoplazmik yapılar pembe boyanır.

1.3.4. Erlich Hamatoksilen Boyama

Uygulamada gösterilmek istenen oluşumlar nükleuslardır. Fiksasyonda zenker kullanılır. Bloklamada parafin kullanılır.

➤ **Boya ve çözeltilerin hazırlanması**

- 2 g hematoksilen, 100 ml %95'lik alkol içinde çözülür,
- 100 ml distile su, 100 ml gliserin, 3 g amonyum veya potasyum alum (amonyum / potasyum aliminyum sülfat) ve 10 ml glasial asetik asit eklenir.
- Karışıma 2 g sodyum iodat ilave edilir ve karıştırılır.

➤ **Yapılışı**

- Dokular ksilol ile parafinden uzaklaştırılır.
- Hazırlanan boya solüsyonu içinde 2-5 dakika boyanır
- Çeşme suyundan geçirilerek mavileştirilir.
- %0,5'lik sulu eozin Y'de 1 dakika boyanır.

- Distile suda yıkanır.
- %95 ve %100'lük alkollerden geçirilerek suyu alınır.
- Ksilolde şeffaflaştırılır ve kapatılır.
- Nukleuslar mor, stoplazmik yapılar pembe boyanır.

1.3.5. Böhmer Hematoksilen Boyama

Böhmer tarafından tanımlanmıştır. İlk kullanılan boyalardan olup yeni boyaların geliştirilmesi ile günümüzde kullanılmamaktadır.

1.4. Preparatın Kapatılması

Boyanmış preparatın uzun süre saklanması ve rengini koruyabilmesi için kapatılması gerekir. Kanada balsamı ve entellan, kapatıcı maddeler olarak kullanılır.

- Boyamadan sonra preparatlar, 5–10 dakika etüvde ya da daha uzun süre oda ısısında kurumaları için bekletilir.
- Preparatlar, kuruduktan sonra en az 15 dakika ksilolde tutulur.
- Sonra ksilolden alınarak kurumaları için bekletilir.
- Boyanan kesitlerin üzerine 1 damla Kanada balsamı damlatılır ve balsam üzerine lamel kapatarak kurumaya bırakılır. Hava kabarcığı çıkartılır.
- Kapatıcı maddeler hem mikroskopta kolay incelenmeyi sağlar hem de boyanmış kesitlerin yıllarca korunmasını sağlar. Balsam kullanırken açık kaptaki katılaşacağı için farklı bir kaba azar azar ilave ederek kullanılmalı, işlem bittikten sonra kabın ağzı kapatılarak yerine bırakılmalıdır.



Resim 1.6: Kanada balsamının damlatılması

- Bu işlemlerden sonra artık preparatımız mikroskopta incelenmeye hazır hâle gelmiştir.
- İnceleme işlemi bittikten sonra tüm lam ve bloklar protokol sıralarına göre arşivlenir (blok arşivi, lam arşivi, rapor arşivi gibi). Kırılmış lam varsa yapıştırılır ve iyice kuruduktan sonra arşivleme yapılır.



Resim 1.7: Çekmeceli lam arşiv dolabı

UYGULAMA FAALİYETİ

Hematoksilen-eozin boyama yöntemi ile boyama yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
Hematoksilen–eozin boyama yöntemi ile boyama ➤ Doku preparatını ksilol serilerinden geçiriniz.	➤ Forma, eldiven ve maske vb. giysilerle kişisel güvenlik önlemlerini almayı unutmayınız.
➤ Doku preparatını alkol serilerinden geçiriniz.	➤ Verilen sürelerle uyunuz. ➤ Seri hareket ediniz.
➤ Akan çeşme suyu altında preparatı yıkayınız.	➤ Çeşme suyunda lamaların 1-2 dakika iyi yıkanmasını sağlayınız.
➤ Preparatı hematoksilin boyası ile boyayınız.	➤ Tortulaşmış hematoksilin boyasını süzdükten sonra kullanınız. ➤ Suyu iyi süzülmemiş lam sepetlerini boya solüsyonuna sokmayınız. ➤ Hematoksilinin boyama kalitesine göre yeni hazırlanmış ise 15 saniye, eski ise 5 dakika tutunuz.
➤ Preparatı çeşme suyunda yıkayınız.	➤ Çeşme suyunda lamaların 1-2 dakika iyi yıkanmasını sağlayınız.
➤ Preparatı asit alkolden geçiriniz.	➤ Asit alkolü, 10 cc HCL + 1000 cc %70'lik alkol karışımı ile hazırlayınız. ➤ Asit–alkole 1-2 kez daldırıp çıkarınız.
➤ Preparatı akan çeşme suyunda yıkayınız.	➤ Preparatların düzgün bir şekilde yıkandığından emin olunuz.
➤ Preparatı amonyum hidroksit solüsyonundan geçiriniz.	➤ Preparatı amonyum hidroksit solüsyonunu 10 cc amonyak + 1000 cc distile suda hazırlayınız. ➤ Preparatı amonyum hidroksit solüsyonuna 2-3 kez daldırıp çıkarınız.
➤ Preparatı akan çeşme suyunda yıkayınız.	➤ Preparatların düzgün bir şekilde yıkandığından emin olunuz.
➤ Preparatı eozin boyası ile boyayınız.	➤ Eozinin boyama kalitesine göre yeni hazırlanmış ise 15 saniye, eski ise 5 dakika tutunuz.
➤ Preparatı artan konsantrasyonlardaki alkol	➤ Son alkol solüsyonunun çok fazla eozin boyasıyla kirli olmamasına

serilerinden geçiriniz.	dikkat ediniz.
➤ Preparatı ksilol serilerinden geçiriniz.	➤ Ksilol serilerinden geçirme işlemlerine dikkat ediniz.
➤ Doku üzerine 1 damla Kanada balsamı / entellan damlatınız.	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ksilole alınan lamaların tam kurduğundan emin olunuz. ➤ Doku üzerine yeterli miktarda Kanada balsamı / entellan damlatınız. ➤ Lamel seçiminde dokuya uygun boyutlu olan lamel seçiniz. ➤ Hava kabarcığı oluşturmadan lameli kapatınız.
➤ Lameli ksilole daldırınız.	
➤ Lamel üzerindeki ksilölü damlatmadan lameli entellan üzerine kapatınız.	
➤ Bir süre bekledikten sonra lamel etrafındaki fazlalığı alınız ve preparatı kurutunuz.	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi deparafinizasyon işleminde kullanılmaz?
A) Ksilol
B) Alkol
C) Distile su
D) Boya
2. Aşağıdakilerden hangisi, preparatın Kanada balsamı ve entellan ile kapatılmasının amacıdır?
A) Boyaların preparata nüfus etmesini sağlar.
B) Boyanmış kesitlerin mikroskopta kolay incelenmesini ve yıllarca korunmasını sağlar.
C) Preparattaki fazla boyanın akıtılmasını sağlar.
D) Preparattaki boyayı tespit etmeyi sağlar.
3. Aşağıdakilerden hangisinin amacı, dokuyu desteklemek için yeterince sert bir katı ortama gömmek ve kesitlerin alınması için gerekli sertliği vermektir?
A) Genel amaçlı boyama tekniği
B) Özel amaçlı boyama tekniği
C) Doku takibi
D) Histoloji tekniği
4. Aşağıdaki tanımlardan yanlış olanı bulunuz?
A) Bazik boya ile boyanan doku elemanları asidofilik olarak ifade edilir.
B) Boya doku elemanlarının tümünü boyuyorsa genel boya olarak ifade edilir.
C) Boya doku elemanlarının özel yapılarını boyuyorsa seçici (özel) boya olarak ifade edilir.
D) Bazik boya doku elemanlarını farklı boyuyorsa metakromatik boya olarak ifade edilir.

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgilerle doku preparatında özel amaçlı boyama yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Patoloji laboratuvarlarına giderek preparatları özel boyalarla boyama işlemlerini gözlemleyiniz.
- Gözlemlerinizi arkadaşlarınızla paylaşınız.

2. ÖZEL AMAÇLI BOYAMA

Patoloji laboratuvarında rutin HE boyası dışında, dokulara uygulanan histokimya ve immünhistokimya gibi boyama yöntemleri özel boya olarak isimlendirilir.

➤ **Histokimyasal boyama**

Çeşitli organik ve inorganik maddelerin doku içindeki varlığını, miktarını ve yerleşme özelliklerini ortaya koyan bir çalışma yöntemidir. Bu yöntem aradığımız madde üzerine bu madde ile reaksiyona giren renkli bir maddenin çöktürülmesi esasına dayanır. Başka bir ifadeyle sadece aradığımız maddenin bulunduğu yerlerin bu boya ile boyanır olmasıdır. Örneğin, Prusya mavisi ile doku içindeki demirin, PAS ile polisakkaritlerin varlığını hatta miktarını ortaya koymak mümkündür.

En sık kullanılan histokimyasal boyalar PAS, alcian-blue, retikülin, masson trichrom, van-gieson, mason fontana, oil red, toluidin blue, MGP vb.dir.

➤ **İmmünhistokimyasal boyama**

Tüm doku sıvıları, vücut sıvıları ve iğne aspirasyon materyellerinde uygulanır. Bu materyellerdeki hücrelerin özellikle stoplasmalarındaki intermedier filamentler, mikrotübüller, mikroflamanlar, nöroflamanlar ve hücre zarı reseptör proteinleri incelenir. Bu yapılar antijen kabul edilerek dışarıda özel olarak üretilen antikorlar; anahtar kilit, koenzim-substrat örneğinde olduğu gibi oluşturulan antijen-antikor kompleksi özel boyalar ile boyanır. Yani bu kompleks görülür hâle getirilir.

En sık kullanılan immünohistokimyasal boyalar; peroksidaz-antiperoksidaz, avidin-biotin peroksidaz, alkali fosfataz ve immungold enzim teknikleridir.

İmmünohistokimyasal boyamanın patolojideki kullanım alanları şunlardır:

- Farklı tümör tiplerinin ayırıcı tanısı, immüno patolojik hastalıkların tanınması (böbrek ve deri)
- Östrojen ve progesteron reseptörlerinin tespiti
- Enfeksiyonlara yol açan mikroorganizmaların tanınması (CMV, hepatit B virüsü)

1.1. Verhoeff'in Elastik Doku Boyama

Gösterilmek istenen oluşumlar; elastik fibriller, nükleus ve kollajendir.

Fiksasyonda, %10'luk formalin ya da zenker kullanılır.

Bloklamada parafin kullanılır.

1.1.1. Boya ve Çözeltilerin Hazırlanması

- Sıcaklığın yardımıyla 1g hematoksinin, 20 ml absol alkol içinde çözülür.
- Karışım süzülür.
- Süzüntüye, 8 ml %2'lik sulu demir klorür ($FeCl_3$) karışımı ve 8 ml iyot karışımı (2 g iyot ve 4 g **KI** 100 ml distile suda çözülür.) eklenir.
- Bu karışım 24 saat içinde kullanılmalıdır. Boyamadan önce dokuların veya kesitlerin iyotla muhafaza edilmesi gereksizdir. Cıva artığı oluşumlar boyama solüsyonlarıyla uzaklaştırılır.

1.1.2. Yapılışı

- Parafin tekniğine uygun bir şekilde parçadan uzaklaştırılır.
- Parça, hazırlanan boya solüsyonunun içine batırılır, tamamen siyahlaşana kadar 15 dakikadan 60 dakikaya kadar tutulur.
- % 2'lik sulu $FeCl_3$ solüsyonunda diferansiye edilir. Diferensiyasyon sadece birkaç dakika gerektirir. Ayırışımın basamaklarını incelemek için kesit kurumadan, düşük büyütmede incelenmelidir. Ayırışım uzun sürerse ve alkol ile muhafaza edilmezse kesit tekrar boyanabilir.
- Çeşme suyunda yıkanır.
- İyot solüsyonunun boyasını uzaklaştırmak için %95'lik alkol içine yerleştirilir ve kesit 5 dakika ve daha fazla çeşme suyu içine bırakılır.
- %0,5'lik sulu floksin solüsyonunda ya da van gieson boyasında 3-5 dakika zıt boyama yapılır.
- Diferansiye edilir ve absol alkol ile takip edilen %95'lik alkol içinde dehidre edilir.

- Ksilol ile şeffaflştırılır ve balsam ile kapatılır.
- Elastik fibriller yoğun maviden siyaha, nukleus maviden siyaha, kollajen kırmızı, diğer doku elementleri sarı boyanır.

1.2. Fosfomolibdikasit-Hematoksilen Boyama (Fosfotungustikasit Hematoksilen Boyama)

Fiksasyonda, %10'luk formalin kullanılır.

Bloklamada parafin kullanılır. (Masson'un trikrom boyama tekniğinde de kullanılan bir boyadır.)

- **Boya ve çözeltilerin hazırlanması**
 - %5'lik sulu $KMNO_4$
 - %2'lik sulu oksalik asit
 - %4'lük sulu ferric ammonium sulphate
 - Phosphotungustic asit hematoksilin
 - Hematoksilin 0,5 g
 - Phosphotungustic asit 10 g
 - Distile su 500 cc
 - %0,25 sulu potassium permanganate ($KMNO_4$) 25 cc
 - Hematoksilin 100 cc suda hafif ateşte çözülür. Geri kalan 400 cc'de ateşte phosphotungustic asit çözülür. Soğuduğu zaman iki karışım karıştırılır ve üzerine $KMNO_4$ eklenir.
 - Regaud'un hematoksilini; 1g hematoksilin, 10 ml %95'lik alkol, 10 ml gliserin 80 ml distile su karıştırılır.
 - Pikrik asit; 2 hacim %95'lik alkol yaklaşık %7'lik doymuş pikrik asit, 1 hacim %95'lik alkol karıştırılır.
 - Ponceau-asit fuksin; 3 g asit fuksin, 0,7 g ponceau de xylidine, 100 ml distile su, 1 ml glasial asetik asit karıştırılır.
 - Asetik anilin mavisi; %2'lik sulu asetik asit içinde doymuş anilin mavisi solüsyonu hazırlanır.
- **Yapılışı**
 - Suya indirme işlemi yapılır.
 - Preparat, %5'lik permanganatta 5 dakika bekletilir.
 - Distile suda yıkanır.
 - Oksalik asitte 5 dakika bekletilir.
 - Distile suda yıkanır.
 - Ferric ammonium'da 1 saat tutulur.
 - Distile suda yıkanır.

- Phosphotungstic asit hematoksilende 3-4 saat tutulur.
- Distile suda yıkanır.
- Alkol serilerinden geçirilir. Ksilende 1 gece bekletilir.
- Entellan ile kapatılır.
- Neuroglia hücreleri, miyelin, bazı fibriller, nükleus, kas mavi boyanır.

1.3. Masson'un Trikrom Boyama

Masson tarafından tanımlandığı için bir yöntemdir ve Masson'un adı ile anılır. Gösterilmek istenen oluşumlar; kollajen fibriller, endokrin bezler, epitelyum, troid bezi, sinir (normal ve tümör) dukusudur.

Fiksasyonda; bouin, regaud, hely ya da zenker kullanılır.

Bloklamada parafin kullanılır.

➤ **Boya ve çözeltilerin hazırlanması**

- Regaud'un hematoksileni; 1g hematoksilin, 10 ml %95'lik alkol, 10 ml gliserin 80 ml distile su karıştırılır.
- Pikrik asit; 2 hacim %95'lik alkol yaklaşık %7'lik doymuş pikrik asit, 1 hacim %95'lik alkol karıştırılır.
- Ponceau-asit fuksin; 3 g asit fuksin, 0,7 g ponceau de xylydine, 100 ml distile su, 1 ml glacial asetik asit karıştırılır.
- Asetik anilin mavisi; %2'lik sulu asetik asit içinde doymuş anilin mavisi solüsyonu hazırlanır.

➤ **Yapılışı**

- Dokular ksilol, alkol ve su ile parafinden uzaklaştırılır.
- Önceden 45 °C'ye kadar ısıtılmış %5'lik (ferric ammonium sulphate) $FeNH_4(SO_4) \cdot 2.12H_2O$ içinde 5 dakika mordantlanır (renk sabitleştirici).
- Çeşme suyunda yıkanır.
- Regaud'un hematoksilin solüsyonu içinde 5 dakika boyanır.
- %95'lik alkolde yıkanır.
- Pikrik alkolde diferansiye edilir.
- Çeşme suyunda yıkanır.
- Ponceau-asit fuksin solüsyonunda 5 dakika boyanır.
- Distile suda yıkanır.
- Preparat 5 dakika %1'lik sulu fosfomolibdik asitte diferansiye edilir.

- Asetik anilin mavisi solüsyonunu dökülür, 5 dakika beklenir.
- Distile suda yıkanır.
- Preparat 5 dakika %1'lik sulu fosfomolibdik asitte tekrar bırakılır.
- %1'lik sulu asetik asitte 5 dakika bırakılır.
- Absol alkolü takip eden %95'lik alkolde dehidrate edilir, yıkanır.
- Ksilol ile şeffaflştırılır, balsam ile kapatılır.
- Nukleus siyah, stoplazma, intersellüler fibriller ve keratin vermilion kırmızı, kollejen koyu mavi, golgi aygıtı boyanmamış, kas mavi boyanır.

1.4. Papanicolaou Boyama

Jinekolojik ve nonjinekolojik sitolojik yaymalarda en fazla kullanılan boyama yöntemi papanicolaou boyasıdır (PAP). PAP, SVS için temel boyama yöntemi olup diğer tüm sitolojik materyal tiplerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. George Papanicolaou tarafından geliştirilmiştir. Papanicolaou boyama yöntemi, Pap-smear ya da pap-test adlarıyla da anılır. Papanicolaou boyama yöntemi, hücrelerdeki kötü huylu değişimlerin erken evrede saptanmasını sağlar.

PAP boyası, belirtilen sitolojik materyallerden hazırlanan ve alkolle fiksasyonu yapılan yaymaların boyanmasında kullanılır. Sitolojik materyaller; jinekolojik smear, BOS, balgam, bronşial yıkama / fırçalama, plevra, periton ve perikard sıvıları, idrar ve İİAS'dir.

➤ **Boya ve çözeltilerin hazırlanması**

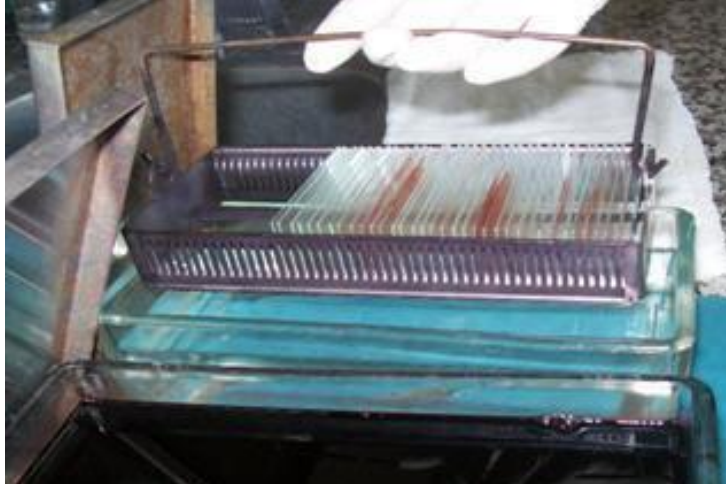
- PAP boyası; Papanicolaou'nun geliştirdiği multikromatik boyama tekniğidir ve harris hematoksilin, orange G ve EA (eozin, azure) boyalarından oluşur.
- Hematoksilin; nükleus boyası olup kromatin ile nükleer membranları mavi-mora, nükleolü kırmızı, pembe ya da oranj renge boyar.
- Orange G; stoplazmaya kolay penetre olan bir boyadır. Keratin mevcutiyyetinde stoplazmayı sarı ya da portakal rengi boyar.
- AE; eozin Y, light green ve bismark browndan oluşan polikrom bir karışımdır. İçeriğini oluşturan boyaların kombinasyonlarına göre AE-36, AE-50 ve AE -65 olarak üç çeşidi vardır.

➤ **Yapılışı**

- %95'lik etil alkolde tespit edilmiş yaymalar, azalan konsantrasyonlu alkollerden geçirilir. Hematoksilin çözeltisi

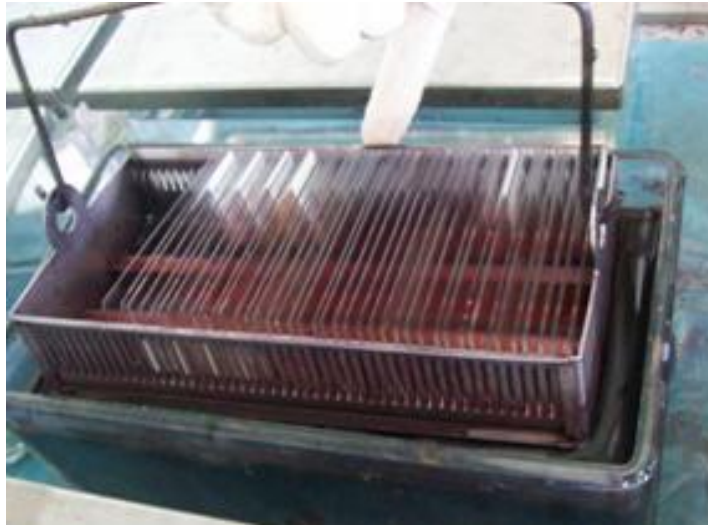
hazırlamada çözücü madde olarak su kullanılır ve su oranı yüksek bir boyadır. Alkole fikse edilmiş hücre öncelikle boyayla uyum sağlaması için kademeli olarak su seviyesine getirilmelidir (rehidre). Bu amaçla %95'lik etil alkolden çıkarılan preparatlar sırayla;

- %85'lik alkol,
- %75'lik alkol,
- %50'lik alkollerden geçirilir.



Resim 2.1: Yaymaların alkolden çıkarılması

- Yaymalar çeşme suyunda 3-5 dakika yıkanır.
- Harris hemotoksilende 45 saniye-2 dakika bekletilir.



Resim 2.2: Harris hemotoksilen boyama

- Lamlar, çeşme suyunda yıkanarak fazla boya giderilir.
- Lamlar, asit alkolde 10 saniye çalkalanır. Diferansiyasyonla hücrelerin almış olduğu fazla boya uzaklaştırılır.



Resim 2.3: Yaymaları asit alkolden çıkarma

- Lamlar, hızlıca çeşme suyuna sokularak diferansiyasyon durdurulur.
- Yaymalar artan konsantrasyonlu alkollerden sırayla geçirilir.
 - %50'lik alkol,
 - %75'lik alkol,
 - %85'lik alkol,
 - %95'lik etil alkol içine 10 -12 kez daldırılıp çıkarılır. Hücrelerin almış olduğu hematoksilen tespit edilir.
- Lamlar iyice süzülerek orange G boyasında 3 dakika bekletilir.
- Lamlar boyasından süzülerek orange G boyasından çıkarılır.
- Üç ayrı kaptaki %95'lik etil alkol içinde 10-12 kez daldırılıp çıkarılır. Preparattaki fazla boya çıkarılarak orange G tespit edilir.
- İyice süzülen preparatlar EA-50 boyasında 3 dakika bekletilir. Smearlar 5 dakika bekletilir.
- Üç ayrı kaptaki %95'lik etil alkol içinde 10-12 kez daldırılıp çıkarılır. Preparattaki fazla boya çıkarılarak EA-50 boyası tespit ve hücreler dehidre edilir.
- Lamlar üç ayrı ksilol kabından geçirilir. Hücreler saydamlaştırılır.
- Prepatların yayma / smear olmayan yüzü gazlı bezle silinir. Yayma üzerine 1-2 damla Kanada balsamı / entellan damlatılarak hava kabarcığı oluşturmadan lamelle kapatılır. Lamlar mapeye dizilir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Doku preparatında özel amaçlı boyama yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
Verhoeff'in elastik doku boyama yöntemi ile boyama ➤ Kişisel güvenlik önlemleri alınız.	➤ Forma, eldiven ve maske vb. giysilerle kişisel güvenlik önlemlerini almayı unutmayınız.
➤ Doku preparatını ksilol serilerinden geçiriniz.	➤ Ksilol serilerini konsantrasyonlarına göre sıraya diziniz.
➤ Dokuları azalan konsantrasyonlardaki alkol serilerinden geçiriniz.	➤ Seri hareket ediniz.
➤ Akan çeşme suyu altında preparatı yıkayınız.	➤ Preparatta kimyasal kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.
➤ Preparatı hematoksilin boyası ile boyayınız.	➤ Hemotoksilen boyası tortulaşmış ise süzdükten sonra kullanınız. ➤ Preparatı boya çözeltisinde yeterli süre bekletiniz.
➤ Preparatı distile suyla yıkayınız.	➤ Preparatta boya kalıntısı kalmayacak şekilde yıkayınız.
➤ Preparatı elastik doku boyası ile boyayınız.	➤ Preparatı boya çözeltisinde yeterli süre bekletiniz.
➤ Preparatı $FeCl_3$ solüsyonundan geçiriniz.	➤ Preparatı solüsyonda bekletiniz.
➤ Preparatı distile suyla yıkayınız.	➤ Preparattan kimyasallar tamamen uzaklaşmaya kadar yıkayınız.
➤ İyot kalmayınca kadar etil alkolde bekletiniz.	➤ Preparatı alkolde yeterli süre bekletiniz.
➤ Preparatı van gieson boyası ile boyayınız.	➤ Preparatı boya çözeltisinde yeterli süre bekletiniz.
➤ Preparatı artan konsantrasyonlardaki alkol serilerinden geçiriniz.	➤ Alkol serilerini konsantrasyon oranlarına göre yerleştirdiğinizden emin olunuz.
➤ Preparatı ksilol serilerinden geçiriniz.	➤ Ksilol serilerini konsantrasyonlarına göre sıraya diziniz.
➤ Doku üzerine 1 damla entellan damlatınız.	➤ Entellanı doku dışında başka yerlere buluşturmayınız.
➤ Lameli ksilole daldırınız.	➤ Lamelin ksilole tamamen ısladığından emin olunuz.

➤ Lamel üzerindeki ksilolü damlatmadan lameli entellan üzerine kapatınız.	➤ Arada hava boşluğu kalmamasına dikkat ediniz.
➤ Bir süre bekledikten sonra lamel etrafındaki fazlalığı alınız ve preparatı kurutunuz.	➤ Entellanın fazlalığını almada kürdan kullanabilirsiniz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi, histokimyasal boya grubundan değildir?
A) Periyodik asit–schiff (PAS) reaksiyonu
B) Masson trichrom
C) Van gieson
D) Giemsa
2. Aşağıdakilerden hangisi, immünohistokimyasal boyamanın patolojideki kullanım alanlarından değildir?
A) Bağırsak enfeksiyonlarına yol açan parazitlerin tanınması
B) Farklı tümör tiplerinin ayırıcı tanısı, immünoopatolojik hastalıkların tanınması
C) Östrojen ve progesteron reseptörlerinin tespiti
D) Enfeksiyonlara yol açan mikroorganizmaların tanınması
3. Aşağıdakilerden hangisi, jinekolojik ve nonjinekolojik sitolojik yaymalarda en fazla kullanılan boyama yöntemidir?
A) Delafield hamatoksilen boyama
B) Masson'un trikrom boyama
C) Papanicolaou boyama
D) Verhoeff'in elastik doku boyama
4. Aşağıdakilerden hangisi, Masson'un trikrom boyama tekniği sonucunda, hücre organellerinin normalde boyanması gereken renkten farklıdır?
A) Nükleus siyah
B) İntersellüler fibriller sarı
C) Stoplazma kırmızı
D) Kas mavi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise “Modül Değerlendirme” ye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi, hematoksilen-eozin boyamada kullanılan kimyasal maddelerden biri değildir?
A) Glasiyal asetik asit
B) Ksilol
C) Amonyum hidroksit
D) Asit alkol
2. Aşağıdakilerden hangisi, preparatın Kanada balsamı ve entellan ile kapatılmasının amacıdır?
A) Boyaların preparata nüfus etmesini sağlar.
B) Boyanmış kesitlerin mikroskopta kolay incelenmesini ve yıllarca korunmasını sağlar.
C) Preparattaki fazla boyanın akıtılmasını sağlar.
D) Preparattaki boyayı tespit etmeyi sağlar.
3. Doku kesitlerinde parafinin uzaklaştırılması hangi işlemle yapılır?
A) Isı uygulaması
B) Alkolleme
C) Sudan geçirme
D) Deparafinizasyon
4. Aşağıdaki boyama yöntemlerinden hangisinde, gösterilmek istenen oluşumlar embriyolar ve böbreklerdir?
A) Harris hematoksilen-eozin boyama
B) Mayer hematoksilen boyama
C) Delafield hematoksilen boyama
D) Erlich hamatoksilen boyama
5. Doku takibi yapılmış kesitlere histolojik boyalardan önce yapılması gereken işlem aşağıdakilerden hangisidir?
A) Vakum
B) Deparafinizasyon
C) Şeffaflaştırma
D) Isı uygulaması

6. Lam üzerine alınan doku kesitinin parafinden kurtarılması işleminde yanlış olanı bulunuz
- A) Doku taşıma sepetine yerleştirilmiş lamlar-doku kesitleri 35-40 °C'lik etüvde 15 dakika bekletilir.
- B) Doku kesitleri ısı işleminden sonra iki ayrı kaptaki ksilolde 10'ar (onar) dakika bekletilir.
- C) Ksilolün giderilmesi amacıyla da dokular; sırasıyla dereceli alkollerde (%70 80, 90, 96 etil alkolde) her birinde 15'er (on beşer) dakika bekletilir.
- D) Doku kesitleri distile suda 10 dakika bekletilerek dokuların kaybettiği su tekrar kazandırılır.
7. Deparafinizasyon işlemi hangi basamakla sonlandırılır?
- A) Distile suyla
- B) Sıcak parafin
- C) Etüvde bekleterek
- D) Ksilolle
8. Aşağıdakilerden hangisi, vital boyalar kullanılarak canlı olarak incelenir?
- A) Mezenteriyum
- B) Kurbağa yavrusunun kuyruğu
- C) Hamsterin yanak kesesi
- D) Hepsi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmeninize başvurunuz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ-1'İN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	B
3	C
4	A

ÖĞRENME FAALİYETİ-2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	A
3	C
4	B

MODÜL DEĞERLENDİRME'NİN CEVAP ANAHTARI

1	A
2	B
3	D
4	C
5	B
6	C
7	A
8	D

KAYNAKÇA

- DEMİR Ramazan, Selma YILMAZER, Melek ÖZTÜRK, İsmail ÜSTÜNEL, Necdet DEMİR, Emin Türkay KORGUN, Gökhan AKKOYUNLU, **Histolojik Boyama Teknikleri**, Palme Yayıncılık, Ankara, 2001.
- AKAY M. Turan, **Genel Histoloji Atlası**, Palme Yayıncılık, Ankara, 2004.
- ARSLAN Nuğran, **Histoloji ve Histopatoloji**, Çare Tek Bilim Eğitim Ltd. Ş, Ankara, 2001.
- ADAM Bahattin, Muhlise ALVUR, Abdulkerim BEDİR, Sevgi ESKİOCAK, H. Kemal ERDEMLİ, **Laboratuvar Aletleri**, Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Ş, Ankara, 2000.
- TULUNAY Özden, **Genel Patoloji**, Antıp AŞ, Ankara, 1998.
- AKAY M. Turan, **Genel Histoloji**, Yücel Ofset, Ankara, 1997.
- AÇIKALIN Ergin, Cengiz BAYÇU, Firdevs GÜRER, Erinç ARAL, **Histoloji**, T.C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No.: 894, Eskişehir, 1995.
- CANDA Şerafettin, Tülay CANDA, Dilek Basımevi, **Temel Patoloji I**, Sivas, 1988.
- TEL Nilüfer, Ülkü ÖNER, Özgül PAŞAOĞLU, **Patoloji**, T. C. Anadolu Üniversitesi Yayınları No.: 495, Eskişehir, 1993.
- ÜZMEZ Önal Binnur, **Kanserin Tanı ve Takibinde Sitopatolojinin Rolü ve İnce İğne Aspirasyon Ünitesinin Fonksiyonu**, T.C. Sağlık Bakanlığı (Yayın No.: 616), Ankara, 2001.