

Metakromazi

METACHROMASIA

Osman ÖZCAN *, M.Kemal IRMAK", Hakkı DALCIK'

Doç.Dr.GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji ABD,

Yard.Doç.Dr.GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji ABD,

*** Uzm.Dr.Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji ABD, ANKARA

ÖZET

Bu derleme histoloji hazırlık laboratuvarlarında sıkça izlenen, metakromazi olarak adlandırılan olayın, fiziksel ve kimyasal temellerinin açıklamaları ile bu olayı etkileyen faktörleri okuyucuya sunmayı amaçlamaktadır. Bu bilgiler ışığında, metakromatik boyanmanın her basamağın çok titiz bir şekilde uygulanması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metakromazi

T Klin Tıp Bilimleri 1995, 15: 316-318

Metakromazi, Histoloji ve Embriyoloji eğitimi alan kişilerin kısa zamanda tanıştığı ancak ayrıntılarına yeterli düzeyde eğilmediği bir olaydır. Metakromazinin fiziksel ve kimyasal esaslarının ve metakromatik boyanmayı etkileyen faktörlerin daha yakından bilinmesinin yararlı olacağı düşüncesiyle bu makaleyi hazırladık. Metakromazinin incelenmesi sırasında, boya, doku yapısı ve boya-doku ilişkilerini anlatan terimleri de açıklayarak metakromaziye daha anlaşılır hale getirmeyi amaçladık.

Metakromazi, 1875 yılında Cornil, Jurfies ve Ranvier gibi birkaç araştırmacı tarafından "cyanine" ve "dahia" içeren birkaç farklı boyanın kullanılmasıyla keşfedilmiştir. Metakromazi (Yunancada, meta-değişmiş, chroma-renk) terimi ilk kez 1876 yılında Ackroyal tarafından kullanılmıştır (1).

Bir boya molekülünün iki karakteristik kısmı vardır. Bunlardan esas renkli kısma kromojen boya molekülünün substrata bağlanan kısmına ise okzokrom denir. Okzokrom iyonize olabilen bir bölümdür. Bir katyonik (bazik) boya, boyanan objeye kendi rengini verdiğinde, bu boyama ortokromatik olarak isimlendirilir. Bazı boya

Geliş Tarihi: 18.03.1995

Yazıma Adresi: Osman ÖZCAN

GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji ABD

06018 Etlik-ANKARA

SUMMARY

In the present review, the aim was examine the physical and chemical properties and the factors that may affect a staining charecteristic so-called the metachromasia, which is laroratories. Therefore, "care" is suggested in every step for a good metachromatic staining.

Key Words: Metachromasia

T Klin J Med Sci 1995, 15: 316-318

iyonları, bir substrata bağlandığında, absorbe olan ışığın dalga boyunu değiştirerek objenin rengini boyanınkinden farklı hale getirir. Bu olaya metakromazi adı verilmektedir. Katyonik boyalarla metakromatik etki, sadece bazofilik doku komponentlerinde görülür. Metakromatik olarak boyanan yapı, kromotropik olarak isimlendirilir. Komşu negatif yüklü asidik grupların 0.5 mm'den daha az aralıklı yerleşim gösterdiği proteoglikan gibi bazı doku ya. lan ve maddeler kromotrop olarak bilinir. Bu nedenle, daha geniş aralıklarla dokuya bağlanan boya molekülleri metakromatik reaksiyon meydana getirmeyiz, sadece ortokromatik bazofili oluştururlar (1,2).

Boyaların normal bir monomerik (ortokromatik) şekilleri, ayrıca potansiyel bir polimerik (metakromatik) biçimleri mevcuttur. Metakromatik (polimerik) şekil kromotroplardaki negatif yüklerin boya üzerindeki pozitif yüklü polar grupları kendisine çekip yığın ya da küme oluşturması ile ortaya çıkar (3). Boya polimerleri genellikle hiposkromik bir etki gösterirler. Bunun anlamı, emilen ışığı daha kısa dalga boyunda ışınlar olarak yaymaktır. Örneğin toluidin mavisi normal olarak mavi monomerik formdadır ve bundan dolayı nonkromotropları mavi renkte boyar. Kromotroplar ise boya polimerizasyonu oluştururlar ve mor boyanırlar (1,3). Ayrıca ışığın kromotrop sistemdeki elektronların dağılımını kendi dalga boyunu azaltacak şekilde değiştirebilmesi için birikmiş boya iyonları arasında su moleküllerinin bulunması gerektiği bildirilmiştir (4).

Buraya kadar anlatılanlardan farklı olarak, bazen başlangıçta polianyonik gruplara sahip olmayan maddelerde de metakromaziyi sağlamak mümkündür. Örneğin Brunner bezlerinin mukus salgısı nötral karbonhidrat yapısındadır. Bu yapıda negatif yüklü boya bağlayıcı gruplar haline dönüştürülebilirler. Bunun için aldehit-bisulfit-toluidin mavisi (ABT) reaksiyonu uygulanır. İşlem sonunda mukus salgısı, pH: 1 de toluidin mavisi ile metakromatik olarak boyanır (5). Buna benzer diğer bir örnek de sodium bisülfitin glikojen metakromazisine neden olmasıdır. Bu teknikte de polianyon oluşturularak, glikojen kromotrop haline dönüştürülür ve bilinen katyonik boyalarla metakromatik olarak izlenir (1).

METAKROMATİK BOYANAN YAPILAR

Dokularda katyonik boyaların bağlanabileceği üç tip anyonik yapı vardır. Bunlar nükleik asit fosfatları, sülfatlı ve karboksilli karbonhidratlar ile proteinlerdir.

Katyonik boyaların boyama özellikleri solüsyonların pH'ından belirgin bir şekilde etkilenir. Eğer boya solüsyonu çok asidik ise sadece sülfalo karbonhidratlardan zengin yapılar (mast hücre granülleri, kıkırdak doku matriksi gibi) metakromatik boyanır. Eğer boya solüsyonları nötral ya da alkali ise diğer anyonik yapılar da metakromatik boyanır (4).

METAKROMATİK ETKİ GÖSTEREN BOYALAR

1. Thiazinler
2. Oksazinler
3. Azinler
4. Ksantinler (1)

METAKROMAZİ TİPLERİ

Belirli mavi katyonik boyalar kullanıldığında; beta, gama ve yeşil olmak üzere üç tip metakromazi görülür. Bunlar sırasıyla mor, kırmızı ve yeşil renk oluştururlar (6,7).

METAKROMAZİYİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

1. Fiksatif tipi: Fiksatifler genellikle sülfat, fosfat ve karboksil gruplarını direkt olarak etkilemezler. Fakat fiksatifin amin grupları ile birleşmesi pH'yı düşürücü bir etkiye sahiptir. "Acrolein" de tespit edilen ve poliesterde gömülen doku kesitleri, RNA ise metakromatik olarak gözelenir. RNA'da izlenen bu metakromatik etki formol fiksasyonunda orta düzeyde oluşurken, Carnoy da ise gözlenmez (8).

Nükleik asitler, asit fiksatif ya da alkolde uzun süre kaldıklarında bezik boyalara olan affinitelerini kaybederler (9).

Sülfatlı asit mukopolisakkaritlerin metakromatik boyanmaları üzerine ise formüllü fiksasyonlar iyi sonuç-

lar vermiştir. Fakat Zenker ve Bouin sıvılarında metakromazi ya yok olmakta ya da azalmaktadır (10).

Mutlak alkol veya asetonunda tespit, pankreas beta hücrelerinde metakromaziyi tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (11).

2. Dehidratasyon: Çoğu katyonik boyalar %70 alkolde kesitlerden kolaylıkla çıkarılabilirler. Mutlak alkol, butanol ve aseton genellikle buna göre daha az aktiftir. Katyonik boyalarla herhangi bir hassas çalışmada yıkama ve dehidratasyon dikkatle yapılmalıdır (4).

3. Boya solüsyonunun pH'sı: Thiazin grubu boyalarla yapılan çalışmalarda; pH 1.0'de sadece sülfatlı karbonhidrat molekülleri boyanmıştır. pH 2,5-3'de yukarıda belirtilen gruplara ek olarak nükleik asitlerin fosfatları da boyanır. pH 4.0-5.0'da önceliklere ek olarak karboksil grupları içeren karbonhidratlar ve daha asidik yapıdaki proteinler boyanır (4).

Yukarıda da görüldüğü gibi sülfatlı polisakkarit içeren yapılar (kıkırdak matreksi ve mast hücre granülleri gibi) boyanın pH'sına bakılmaksızın metakromazi gösterirler (10).

pH'yı etkileyen faktörler metakromatik boyanmayı etkiler. Örneğin yüksek konsantrasyondaki kalsiyum, metakromaziyi engeller (12). Solüsyondaki tuzlar, metakromazinin ortokromaziye geri, dönmesine neden olur (13).

4. Boya konsantrasyonu: Doku/Boya (D/B): Verilen herhangi bir doku-boya sisteminde, boya bağlayan yer sayısının, boya molekülleri sayısına oranıdır. D/B:1 olduğunda herbir boya molekülü en yakın komşu boya molekülü ile etkileşim içindedir. Bundan dolayı da, bütün boya molekülleri kümelenmiş, birikmiş bir yapı oluşturur. Birikmiş, kümelenmiş boya, metakromatik bir etkiye sahiptir. D/B oranı büyüdükçe, boya molekülleri çok sayıdaki boya bağlama yerlerine dağılırlar, ve böylece komşu boya molekülleri arasında etkileşim oluşmaz. Bu boyalar birikim, kümelenme yapımlarından ortokromatik bir renk oluştururlar. Doku bağlama yerleri veya boya konsantrasyonları değiştirilerek D/B oranında kolaylıkla değişiklik yapılabilirliği bildirilmiştir (8).

5. Kapatıcı medyum tipi: Metakromatik doku, kesitlerin boyama sonrası potasyum ferrisiyanik ile muamele edilmesi ve lamellerin arap sakızı ile kapatılmasıyla, zamanla oluşan solma önlenir (14). DPX "di-butyl phtolate-xylene" tipi bir, kapatıcı medyum ile kapatma da, solmayı geciktirir (4). Etanol içeren kapatma işlemlerinin beta hücre metakromazisini soluk ortokromatik maviye dönüştürdüğü saptanmıştır (13).

6. Gömme materyali: Yukarıda belirtildiği gibi, RNA metakromazisi en iyi olarak, akroleinde tespit edilen ve poliesterde gömülen dokularda izlenmiştir (8).

7. Kesitin saklanma süresi: Yukarıda sözü edilen özel işlemler yapıldığında zamanla metakromazi, soluk bir ortokromaziye dönüşmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, metakromaziyi etkileyen bir çok faktör olduğu göz önünde tutularak, yapılan çalışmaların her aşamasının titizlikle seçilip, takip edilmesi gerekmektedir. Metakromatik boyamanın başarısı da bunlarla yakından ilgili olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bancroft JD, Stevens A, Turner DR. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3rd Ed. The Bath Press, Avon, 1990:198-9.
2. Sylven, B. Metachromatic dye-substrate interactions. *Quart J Microsc Sci*. 1954;95:327-38.
3. Saran Y. *Histokimya ve Sitokimya*. 1988;38-40.
4. Kleman JA. *Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice*. 2nd Ed. Pergamon Press. 1990;91-92;177-8.
5. Fischer J, Romhányi G. Optical studies on the molecular mechanism of metachromasia. *Acta Histochem*, 1977;59:29-39.
6. Ramalingam K, Ravandranath MH. Histochemical significance of green metachromasia to toluidine blue. *Histochemie*, 1970;24:322-27.
7. Azarlah J. Studies on metachromasia. I. The nonspecificity of green metachromasia to toluidine blue. *Acta Histochem*, 1972;43:254-59.
8. Feeder N, Wolf MK. Studies on nucleic acid metachromasy. II. Metachromatic and orthochromatic staining by toluidine blue of nucleic acids in tissue sections. *J Cell Biol*, 1965;27:327-36.
9. Brächet J. The use of basic dyes and ribonuclease for the cytochemical detection of ribonucleic acid. *Quart J Micr Sci* 1953;94; MO.
10. Lüsberg MF. Induced metachromasia an histochemical and histological method. *Acta Anat*, 1966;63:309-18.
11. Fujita T, Kakaya K. Metachromatic reaction of pancreatic beta cells to toluidine blue. Influence of pH on staining. *Stain Tech*, 1968;43: 329-32.
12. Simkiss K, Tyler C. A histochemical study of the organic matrix of hen eggshell. *Quart J Microscop Sci*. 1957;98; 19-28.
13. Curran RC. The formation of collagen in quartz lesions. *J Pathol Bacteriol*, 1953;66:271-82.
14. Romhányi G. Über die submikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatischen Reaktion. *Acta Histochem*, 1963:201-33.