

T.C.
KAYSERİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA
PROJELERİ KOORDİNASYON
BİRİMİ



Çeşitli Bitkilerden Elde Edilen Özütlerin Kimyasal Karakterizasyonu ve Bunların Farklı
Parametreler ile Rat Dokularını Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Proje No: FHD-2020-1002

Hızlı Destek Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Nilgün KUŞÇULU

Mustafa Çıkrıçioğlu MYO / Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü

Araştırmacılar

Doç. Dr. Hüseyin BENLİ

Doç. Dr. Sedat PER

Dr. Öğr. Üyesi Fatma KILIÇ

DOKAN

Mustafa Çıkrıçioğlu MYO / Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümü

OCAK-2021

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Farklı birimlerde, dallarda yürüttüğüm toplamda 9 yıl süren yüksek lisans ve doktora çalışmalarında aldığım bilgileri uygulama imkanlarım pek olmadı. Tıpkı susuz, ışıksız kalan bir çiçek gibi olmuştum. Ama Kayseri Üniversitesi kurulduktan sonra bana ışık, su oldu. FHD-2020-1002 nolu Hızlı Destek projesi Kayseri Üniversitesi Bap birimi tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı BAP birimine teşekkür ediyorum.

Saygılarımla....

Dr. Öğr. Üyesi Nilgün KUŞÇULU

22 OCAK 2021

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	
ABSTRACT	
1. GİRİŞ.....	1
2.Bitkilerin Yapısındaki Pigmentler.....	1
3.Doğal Boya Türleri.....	2
4. Çeşitli Hücrelerde Doğal Boyalar	2
5. Doku Boyamanın Değerlendirilmesi.....	3
GEREÇ VE YÖNTEM	4
BULGULAR	7
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	9
KAYNAKLAR.....	10

ÖZET

Doğal boyaların bitkisel, hayvansal ve mineral olmak üzere üç kaynaktan elde edilebileceği uzun zamandır bilinmektedir. Tekstil, gıda, ilaç gibi pek çok alanda bitkisel kaynaklı doğal boyalar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Histolojide doğal boyaların kullanımı son birkaç yıldır çalışılan bir konudur. Bu konuda çalışılmamış pek çok boya bitkisi, mordanları (metal tuzları) bulunduğundan başarı odaklı bir proje yapmak mümkün olacaktır. Boyarmadde oranı yüksek ve mavi, pembe, siyah, lacivert gibi koyu renkli özütler elde edebileceğimiz narçiçeği, havacıva, kırmızılahana, reyhan bitkilerinin su, kloroform ve etil alkol çözücülerini ile ayrı ayrı ekstraksiyonları yapılacaktır. Özütlerdeki biyoaktif kimyasal bileşenlerin tespiti için standart prosedüre göre kalitatif fitokimyasal ve GC-MS analizleri yapılacaktır. Döner buharlaştırıcıda çözücülerini uzaklaştırılıp konsantre hale getirilen ekstraktlar ile rattan alınan çeşitli doku kesitlerine histolojik takip sonrası boyama işlemleri uygulanacaktır. Bu projede hazırlanan boyasız lamdaki doku kesitleri farklı bitki özütleri ile muamele edildikten sonra yıkanıp kapatılan doku kesitlerinin ışık mikroskobu görüntüleri alınacaktır. Şaledeki her bir özüte aynı anda böbrek, karaciğer, beyin, kalp, akciğer doku kesitleri (preparatlar) konularak boyama gerçekleştirilecektir. Boyanma durumuna göre özütleri FeSO_4 , Şap, SnCl_2 mordanları ilave edilecektir. Dokuların bir kısmı önce oda sıcaklığında 15-30 dakika arası sürelerde şalelerde bekletilecek, daha sonra yıkanıp ışık mikroskop fotoları alınır. Dokuların diğer kısmı 50 derecedeki etüvde 15-30 dakika arası bekletildikten sonra yıkanan doku kesitlerinin ışık mikroskop görüntüleri alınacaktır. Sonuçları kıyaslamak için herbir doku preparatına hematoksilin-eozin boyama işlemi uygulanacaktır. Bu şekilde boyalı dokular standart olarak kullanılıp bitkisel boyalı preparatların görüntüleri ile kıyaslanarak, değerlendirmeler yapılacaktır. Böylece Hematoksilin de bitkisel kaynaklı ilk ve tek doku boyası olduğundan, proje sonucunda bitkisel özütlerden boyama sonucu iyi olan ile hematoksilin-eosin muadili bir bitki boya kombinasyonunda oluşturulacaktır.

Anahtar Kelimeler: Bitkisel boya, Histolojik teknikler, Mordanlar, Narçiçeği

ABSTRACT

It has long been known that natural dyes can be obtained from three sources: vegetable, animal, and mineral. Natural dyes of plant origin are widely used in many fields such as textile, food, and medicine. The use of natural dyes in histology has been studied for the last few years. Since there are many dye plants and mordants (metal salts) that have not been studied on this subject, it will be possible to make a success-oriented project. Separate extractions will be made with water, chloroform, and ethyl alcohol solvents of hibiscus, aviator, red cabbage, basil plants, from which we can obtain dark-colored extracts such as blue, pink, purple, and dark blue. Qualitative phytochemical and GC-MS analyzes will be made according to the standard procedure to determine the bioactive chemical components in the extracts. After histological follow-up, staining will be applied to various tissue sections from Wistar rat with extracts whose solvents are removed and concentrated in a rotary evaporator. In this project, light microscopy images of tissue sections that are washed and closed after treating the tissue sections on the unpainted slide prepared with different plant extracts will be taken. Staining will be performed by placing kidney, liver, testis, uterus, heart, lung tissue sections (preparations) on each extract in the shawl beaker at the same time. FeSO_4 , Alum, SnCl_2 mordants will be added to the extracts according to the staining condition. Some of the tissues will first be kept in shawls for 15-30 minutes at room temperature, then washed and light microscope photos are taken. Light microscope images of the washed tissue sections will be taken after the other part of the tissues are kept in the oven at 50 degrees for 15-30 minutes. A hematoxylin-eosin staining procedure will be applied to each tissue preparation to compare the results. In this way, the dyed tissue will be used as a standard and will be compared with the images of the plant dyed preparates. Thus, since Hematoxylin is also the first and only tissue dye of plant origin, couple of a plant dyes equivalent to hematoxylin-eosin will be produced with a good dyeing result from plant extracts.

Key Words: Plant dye, histological techniques, mordants, roselle

GİRİŞ

AMAÇ VE KAPSAM

Histoloji laboratuvarlarında yaygın bir şekilde kullanılan hematoksilin- eozin boyaları dokulardaki çekirdek ve sitoplazma boyası olarak bilinmektedir. Hematoksilin İsviçre'deki bir ağaçtan elde edilen doğal boyadır. Hazırladığımız özütler ile bunun yerini tutacak başka boyaların olmamasından dolayı bunun muadili olacak başka bitkisel kaynakların keşfi için bir proje çalışmasına gerek duymaktayız. Keşfedilecek boyanın milli olması için boya kaynağı bitkiler ülkemiz topraklarında yetişen bitkilerden seçilecektir. Hematoksilin mor renkte çekirdeği, eosin ise sentetik kaynaklı ve pembe renkte sitoplazmayı boyamaktadır. Buna uygun renkte boyama olması açısından boya bitkisi seçerken özütü pembe, kırmızı, mor renkte olacak, antosiyanin boya grubunu içerecek bitkiler bu çalışma için seçilmiştir. Hematoksilin-eozin muadili olacak bitkilerin keşfi bu projedeki temel amacımızdır. Keşfedilen bitkilerden özütünde daha fazla antosiyanin boyarmadde içerdiği HPLC-MS ya da GC-MS ile tespit edilen bitkiler ticari amaçlı kullanıma sunulabilir. Bu bitkilerden reyhan ve kırmızılahana her yerde yetişen market ve pazarlarda bol ve uygun fiyatlı bitkiler olduğundan bunlardan alınacak olumlu sonuçlar daha çok önem arz etmektedir. Sonrasında boyaların üretimi, depolanması ve pazarlamasının nasıl yapılacağı üzerine çalışmalara yer verilecektir.

GENEL BİLGİLER

Bitkilerin yapısındaki pigmentler

Bitkilerin farklı kısımlarında (kök, gövde, yaprak ve çiçek) çeşitli boyar maddeler yani organik yapılar mevcuttur. Bunlar arasında antosiyaninler ve kuersetin bitkilerin yapısında yer alan ortak yapılarıdır. Neredeyse her renkli, çiçekli bitkide mutlaka bulunmaktadır (Saxena and Raja, 2014). Antosiyaninler suda çözünen flavonoid pigmentlerdir. 1913 yılında mavi çiçekli *Centaurea cyanus*'ta ilk antosiyanin yapısal olarak tanımlanmış olup, yapısı belirlenmiş antosiyanin sayısı günümüzde 600'ü aşmıştır. Antosiyaninler en uzun dalga boylu ışığı absorbe ederler ve turuncu, pembe, kırmızı, magenta, mor, mavi, mavi-siyah çiçek renklerini oluştururlar. Bu renk çeşitliliğini sağlayabilmeleri, antosiyanidinlerin (antosiyaninlerin merkezi kromatoforudur, aglikon da denir) oksijenasyon derecelerine ve bu kromatoforlara eklenen maddelerin (şekerler gibi) çeşitlerine ve sayılarına bağlıdır (Sing and Srivastava, 2015; Cardon, 2007). Antosiyaninler primer, sekonder ve tersiyer yapılara sahiptirler. Antosiyaninler, çiçekli bitkilerin renklenmesindeki önemli rolleri dışında, mikroorganizmalar için sinyal olması, patojenlere karşı koruma, biyotik ve abiyotik streslerin etkilerini azaltma işlevlerine de sahiptirler (Batta and Rangaswami, 1973). Aşağıda temel formülü verilen antosiyanin yapısındaki R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 grupları OH ya da H yapıları olabilmektedir. Böylece oluşan yapılar pelargonidin, delfinidin ve siyanidin adlarını almaktadırlar (Chigurupati et al., 2002).

Bitkilerde ortak pigment olarak bulunan diğer yapı ise kuersetindir. Kuersetin birçok bitkide, meyve ve sebze kabuk yapısında bulunan flavonoid yapıdaki moleküldür (Davulcu et al., 2014). Üzümsü meyvelerde bulunan fenolik Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir bileşiklerden antosiyanin, kuersetin, kamferol, mirisetin ve ellagik asit antikanserojenik, antibakteriyal, antiviral ve antioksidan aktiviteye sahiptirler. Kuersetin'in de dahil olduğu flavonoidler difenil propan iskeletine sahip polifenollerdendir. Brokoli, karnıbahar, kırmızı biber, dolmalık biber, kuş biber, soğan yaprakları ve siyah çay gibi bitkilerin yapısındaki kuersetin miktarları HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir (Llewellyn, 2003; Uddin, 2014).

Doğal boya çeşitleri

Bitkilerdeki bu renkli pigmentler doğal boyar maddeler olarak bilinmektedirler. Doğada sadece bazı bitkilerden değil, hayvanlar, likenler ve mantarlar tarafından sentezlenen maddelerdir. En yaygın olarak kullanılmış sarı doğal boyarmadde içeren bitkiler muhabbet çiçeği (*Reseda luteola* L.), boyacı sumacı (*Cotinus coggyria* Scop.), boyacı katırtırnağı (*Genista tinctoria* L.), *Serratula tinctoria* L. Gaud ve bazı cehri (*Rhamnus*) türleridir. Eski çağlarda özellikle kırmızı renk elde etmek için dünyanın çeşitli bölgelerinde bazı böceklerden yararlanılmıştır. Kırmızı boyarmaddeler içeren pek çok böcek türü arasında önem kazanmış olanlar, lak böceği (*Kerria lacca* Kerr), Amerikan koşinili (*Dactylopius coccus* Costa), kermes (*Kermes vermilio* Planchon), ekin koşinil (*Porphyrophora tritici* Bod.), Polonya kermesi (*Porphyrophora Polonica* L.) dir. Kırmızı renk elde edilen en önemli bitkisel doğal boyarmadde kaynağı ise kökboya (*Rubia tinctorum*) bitkisinin kökleridir. Doğada yeşil renk boyar madde veren bir bitki veya böcek bulunmamaktadır (Zeliha et al., 2016; Cücer et al., 2005; Rodriguez et al., 2001). Bitkilerin yapısındaki boyarmaddeler ile boyanan dokular ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur. Avwioro ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada curcumin (zerdeçal) kullanılarak DNA ve kromatine floresan işaretleme, histolojik boyamalar yapılmıştır. Rosemarry ve arkadaşları, Thounaojam ve ark. tarafından yapılan başka çalışmalarda ise, *Hibiscus* bitkisinin alkoldeki özütü ile farklı sıcaklık ve konsantrasyonda rat testis ve fare dokusundaki farklı kısımları boyamışlardır. Daha önce yapılan yayın çalışmasında, narçiçeği, kırmızılahana bitki özütleri ile kan şekilli elemanları ve anemili kan hücrelerinde boyama çalışmaları yapılmıştır.

Çeşitli hücrelerde doğal boyalar

Hücre çekirdeğinde bir leke sağlamak için kullanılan birkaç histolojik tekniğin yapısal olarak antosiyaninlerle ilişkili doğal fenolik bileşiklerden oluştuğu bilinmektedir [1]. Bunlar, boya kaynakları olarak karminik asit (karmin boyamada kullanılır) ve hematoksilini içerir [2]. Kırmızı lahana ve yıldız çiçeği, *hibiscus sabdariffa*, *Curcuma longa*'daki antosiyaninler histolojik boyamada da kullanılmıştır [3, 4]. Aynı zamanda kırmızı lahana boyası, esas olarak

gıda boyası olarak kullanılan doğal bir kaynaktır. Çoğu doğal olarak, oluşan antosiyaninler bir glikozit olarak ortaya çıkar ve birkaç aglikon çekirdekten birini içerir [5]. Anemi, normalin altında olan hemoglobin konsantrasyonu olarak tanımlanır. Günlük hayatımızdaki aneminin sınıflandırılması, eritrositlerin morfolojik yapısına veya retikülosit sayısına dayanmaktadır [6]. Kemik iliği yanıtının değerlendirilmesinde retikülosit sayısı çok önemli olduğu için boyanması da önemlidir. Retikülosit sayısı, dolaşımdaki eritrositlerin bir yüzdesi olarak rapor edilir [7, 8]. İyot, safran ve amonyak karmin dokuları ve hücreleri boyamak için uygundur, morfoloji hakkındaki bilgilerimizde pratikte hiçbir ilerleme kaydedilmemiştir. kan hücrelerinin [9]. Son zamanlarda kırmızı kan hücreleri seçici bir boyama yöntemi ile incelenmiş ve Giemsa [10, 11] gibi sentetik boyalarla boyanmıştır.

Doku boyamanın değerlendirilmesi

Bu çalışmada kullanılmak üzere, Narçiçeği, havaciva, kırmızılahana ve reyhan bitkileri yerel marketlerden temin edilecektir. Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 16/144 nolu kararı ile daha önce alınan doku örnekleri boya materyali olarak kullanılacaktır. Farklı dokuların, çeşitli bitki özütleri ile farklı sıcaklık, pH ve kimyasal gradientleri ile boyama çalışmaları temel konudur. Dokularda boyamanın gerçekleşmesi için, dokularda ortak olan ve olmayan yapıları bilmek ve ona göre boyama teknikleri uygulamak gerekmektedir. İnsan vücudu 4 temel dokudan meydana gelir. Bunlar, epitel, bağ, kas, sinir dokularıdır. Epitel dokuları, sıkıca biraraya gelmiş çok yüzeyli hücreler ve çok az miktarda hücreler arası maddeden oluştuğu için epitel dokunun boyarmadde ile etkileşimi daha kolay gerçekleşecektir. Böylece bu dokular daha koyu renkte boyanabilecektir. Bağ dokusu ise kendi hücreleri tarafından üretilen hücreler arası maddede bol içerdiğinden epitele göre aynı özüt ile daha açık renkte boyanacaktır. Sinir dokusu, hücre gövdesinden çıkan, sinir uyarılarını taşımak, yaymak, iletmek ile görevli uzantılara sahip hücrelerden oluşur. Yani organların çoğunda ortak olarak bulunur ve bir özütün, farklı dokularda verdiği aynı renkler sinir hücrelerine ait olabilir. Kas dokusu özelleşmiş kasılma işlevine sahip olan özelleşmiş, uzamış hücrelerden oluşur. Organlar kendisine özgü ana işlevleri yürütmekten sorumlu hücrelerin oluşturduğu parenkim ve destek dokusu olan stroma bölümlerine ayrılır. Dokular hakkında ki böyle bilgileri temel alarak yola çıkılacak ve boyama amacına ulaşacağını düşünmekteyiz. Dokular boyandıktan sonra bölümleri ve şekilli elemanlarının mikroskop gözlemleri ile hangi renkte boyanıp boyanmadığı hakkında bilgi sahibi olunacaktır. Bu yüzden çözünürlüğü yüksek ışık mikroskobu kullanılarak dokudaki şekilli elemanların diğerlerinden ayırt edilmesi ve boyanın hangi eleman ile etkileştiğini işaretlemek mümkün olacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Boya kaynağı olarak seçilen bitkiler:

Kuru Narçiçeği, havaciva, taze olarak kırmızı lahana ve reyhan gibi bitki örnekleri Kayseri ili, Talas Bölgesi yerel marketlerinden ve aktarlardan temin edilecektir.

Mordan maddesi olarak kullanılacak metal tuzları ve diğer kimyasallar: $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (şap), $FeSO_4$, $SnCl_2$, üre, amonyak, xylene, salisilaldehit yada formaldehit, asetik asit, HCl, Mutlak Etil alkol, damıtık su.

Boyanacak dokunun temini: Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 150-250 gr ağırlığında 2 adet Wistar albino türü dişi ve erkek rat kullanılmıştır. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21 °C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlanmıştır. Ketamin+ xylazin anestezisi altında uyutulan sıçanların doku örnekleri alındıktan sonra hayatlarına son verilmiştir.

Dokulara uygulanmış olan histolojik prosedür: Wistar ratlardan alınan doku örnekleri %4'lük formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işlemini takiben rutin histolojik doku takibi uygulandı. Doku örnekleri önce artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldı, daha sonra ksilol ile şeffaflandırıldı ve parafine gömülerek bloklandı. Boyama yapmak amacıyla belirlenen dokuyu içeren parafin bloklarından alınan 5µm'lik kesitlerden boyasız preparatlar hazırlandı.

Boya özütlerinin hazırlanması:Yaş olan bitkiler 80 derecedeki etüvde kurutulduktan sonra kuru olanlar direk mikserde toz haline getirilecektir. Toz halindeki bitki; su, etil alkol, hekzan ve kloroform ile ayrı ayrı %20 oranında karışım yapılarak ekstraksiyon işlemi uygulanacaktır. 250 ml erlene alınan 20 gr bitkiye 100ml çözücü ilave edildikten sonra aliminyum folyo ile erlen ağzı kapatılarak oda sıcaklığında üç gün bekletilecektir. 3 günlük bekletme esnasında karışım 75 rpm de çalışan çalkalayıcı üzerinde bırakılacaktır. Daha sonra karışım 50 ml tüplerde 15 dakika 4000rpm 25 derecede santrifüj edilecektir. Santrifüj sonrası özüt ependorf tüplere alınıp daha sonraki işlemler için +4 derecedeki buzdolabında saklanacaktır. Burada bitkisel boyaların daha saf eldesi için 3 günlük bekletme sonrası özütlerdeki çözücüler döner buharlaştırıcı yardımı ile uzaklaştırılacak katı boya eldesi yapılacaktır. Elde edilen katı boyanın saflığı yapılacak flavonoid varlığı fitokimyasal analizi ile test edilecektir. Yukardaki işlemler boya kaynağı olarak seçilen dört bitki için ayrı ayrı uygulanacaktır.

Bitki Özütlerindeki Fitokimyasalların Kalitatif Analizi

1- Saponin Varlığı Testi: Dolaptan alınan 2ml extract tüpe alınacak, kuvvetli bir çalkalamaya maruz bırakılması için vortexlenecek. Eğer köpük oluşumu gözlenirse özütte saponin var demektir.

- 2- Fenol ve Tanin Varlığı Testi: 2 ml ekstrakta %2'lik FeCl₃ çözeltisinden 2ml konulacak karıştırılacaktır. Karışımındaki mavi-yeşil yada siyah renk oluşumu özütte fenol ve tanin varlığını gösterir.
- 3- Terpenoid Varlığı Testi: 2ml özüt, 2ml kloroform ile karıştırılacak, daha sonra 2ml konsantre sülfirik asit ilave edilecek dikkatli bir şekilde karıştırılacaktır. Kırmızı renkte ara faz oluşumu özütte terpenoid varlığını gösterir.
- 4- Flavonoid Varlığı Testi: 2ml özüt, bir miktar çinko tozu ile karıştırılacak üzerine damla damla konsantre hidroklorik asit ilave edilecektir. Birkaç dakika sonra kırmızı renk gözlenirse özütte flavonoid var demektir.
- 5- Glikozid Varlığı Testi: 2ml özüte, 2 damla %2'lik FeCl₃ içeren glasiyal asetik asitten 2ml ilave edilecek ve karıştırılacaktır. Karışım 2ml konsantre sülfirik asit içeren tüpe aktarılacaktır. Ara fazda kahverengi halka oluşumu özütte glikozid varlığını gösterir (12).

- Fitokimyasal analiz sonuçları +/- şeklinde bir tablo haline getirilecek.

GC-MS Analizi: Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) analizi GC-MS analizi Hewlett-Packard 6890 serisi GC-MS analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirilecektir. Cihazın kolonu HP-5MS fused silica column (5% phenyl methyl polysiloxane 30 m 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm) ve dedektörü Hewlett-Packard mass selective detector 6890'dır. GC-MS analizi literatürde belirtilen prosedüre göre gerçekleştirilecektir. Fırın 60 °C'ye ısıtılıp bu sıcaklıkta 1 dakika beklenicek. Daha sonra sıcaklık dakikada 5 derece arttırılarak 200 °C'ye yükseltilecek 1 dakika bekletilecektir. Son olarak sıcaklık dakikada 20 derece arttırılarak 280 °C'ye yükseltilecek ve 21 dakika beklenicektir. Helyum (%99.9999) taşıyıcı gaz olarak ve 1 mL/dakika akış hızında kullanılacaktır. Enjektör sıcaklığı 200°C'de Yazım alanları gerektiği kadar uzatılabilir tutulacaktır. Ayrılma oranı 1:5'dir (13).

Dokulardan parafin uzaklaştırması (Deparafinizasyon): Boyama öncesinde parafin içeren doku preparatları 50°C etüvde 1 gece bekletilecektir. Sonra Xylol çözeltisine aktarılacak. Doku preparatlarındaki parafin uzaklaşması gözlemlenecektir.

Preparatlardaki dokuların boyanması

Boyamada değişken olacak parametreler; sıcaklık, pH, dehidratasyon ve mordan maddeleridir. Bir bitkiden hazırlanan boya çözeltisine farklı dokuları içeren preparatlar daldırılıp önce oda sıcaklığında 25°C, 50°C sıcaklıklarda etüvde (NÜVE 500) 1'er saat bekletilecek. Bu işlem diğer bitkilerden hazırlanan özütlere de ayrı ayrı uygulanacaktır. Boya çözeltisinden çıkartılan preparatlar bol saf su ile yıkandıktan sonra ksilene daldırılıp entellan ile kapatılacaktır. Preparatların ışık mikroskop görüntüleri değerlendirilerek kayıt altına alınacaktır. Dokular ön mordanlama yapılarak ve yapılmadan boyamalar gerçekleştirilecektir. Destaining olmaması (boya sökölmemesi) için boyamadan çıkan preparatların

farklı derecedeki alkollerde bekletilmesi yapılmayacaktır. Boyama sonrası bol su ile durulama sonrası ksilene daldırılıp kapatma işlemi yapılacaktır. Bu durum kullanılan boyarmaddelerin çözücülerinin alkol olması durumunda geçerli olacaktır. Bunun gibi birçok aplikasyon boyama işlemi esnasında ve sonrasında karşılaştığımız duruma göre uygulanacaktır.

Doku Boyamada Farklı Parametreler

- 1- Boyama öncesi işlemlerde yapılacak çözücü değişimleri polar, apolar çözücü kullanımı
- 2- Boya çözeltisinde yapılacak mordan değişimi ile pH değişimleri
- 3- Boya ekstraksiyonunda farklı çözücülerin kullanımı
- 4- Dokulara boyama öncesi metal tuzları uygulayarak metal takılması sonrasında boyanması (kompleks oluşumu)
- 5- Doku boyama esnasında boya çözeltisine farklı metal tuzları ilave edilmesi
- 6- İkili boyama reçetesinin uygulanması

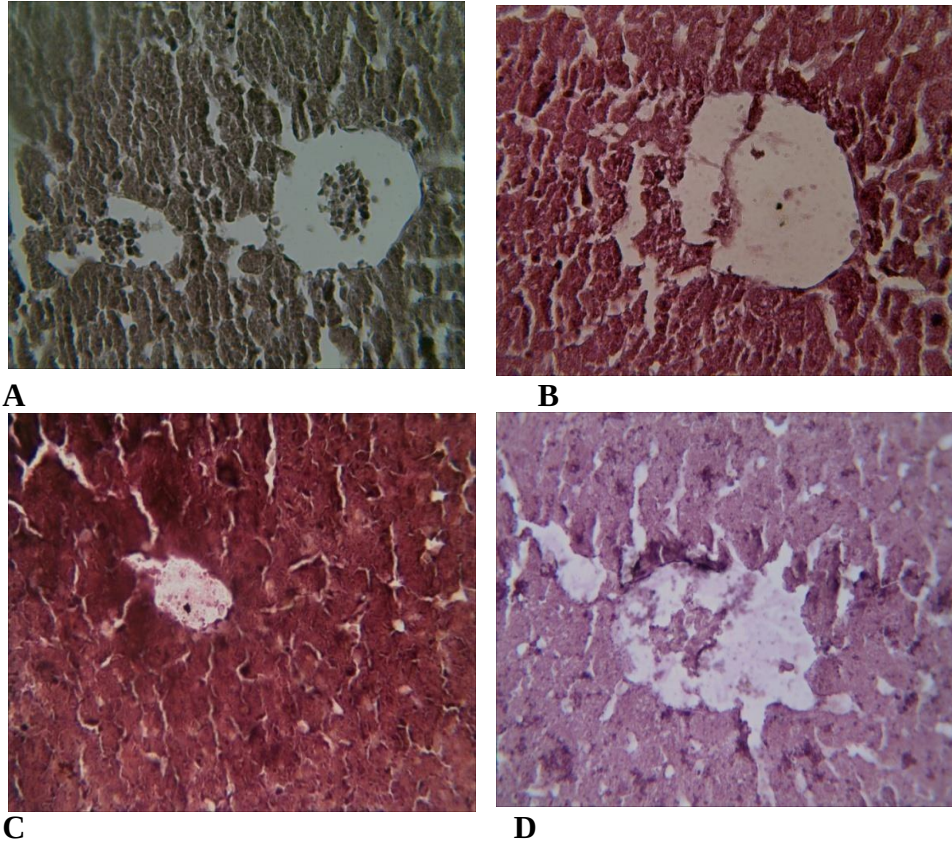
Dokuların Hematoksilen-Eosin ile Boyanması

Rutin olarak kullanılan boya hematoksilen (mavi) ve eosindir (kırmızı). Kısaca “HE” veya “H&E” denilir. Otomatik boyama aygıtlarında yaygın olarak uygulanmakta olan program şöyledir: Projede bu prosedür manuel olarak boyasız rat böbrek, karaciğer, akciğer, over, testis doku kesitlerine uygulanacaktır.

- Ksiloller (6 dakika),
- alkoller (3 dakika), • su (2 dakika),
- hematoksilen (6 dakika), • su (1 dakika),
- asit-alkol (10 saniye),
- su (1 dakika),
- amonyak (5 saniye),
- su (1 dakika),
- eozin (45 saniye),
- su (1 dakika),
- alkoller (1 dakika),
- ksiloller (5 dakika)

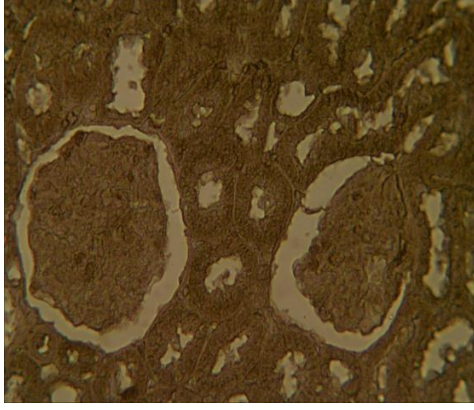
BULGULAR

Havaciva (*Alkanna tinctoria*) bitkisinden elde edilen özütler boyanmış karaciğer dokusunun ışık mikroskobu altında çekilmiş fotoğrafları incelendi. Ekstrakta mordan ilave edilmeden yapılan boyamada, sitoplazmada soluk kahverengi boyama Şekil 1A'da gösterilmiştir. CuSO₄ eklendiğinde açık pembe renk boyama Şekil 1B'de gösterilmektedir. Alum ilavesiyle boyama yapıldığında koyu pembe-kırmızı renklendirme görülmektedir. Şekil 1C ve ayrıca NiSO₄ eklenmiş açık mor boyama Şekil 1D'de gösterilmiştir.

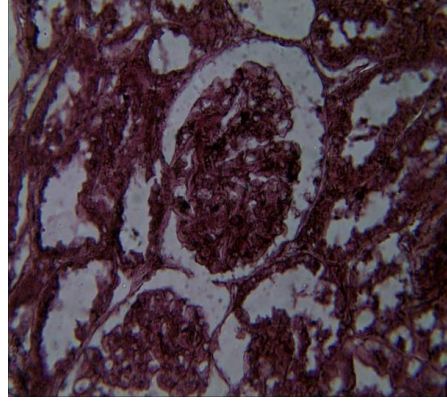


Şekil 1. Havaciva özütünde farklı mordanlarla boyalı karaciğer dokusunun fotoğrafı x40
A) Mordansız B)CuSO₄ ile C)Şaplı D)NiSO₄ ile

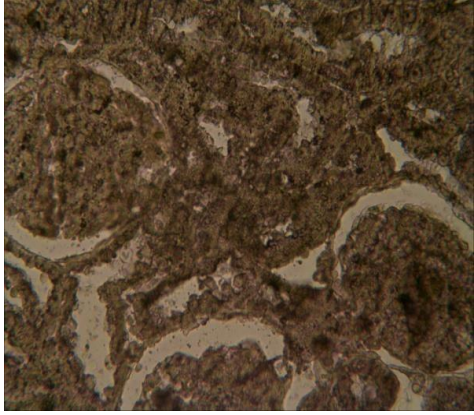
Havaciva (*Alkanna tinctoria*) bitkisinden elde edilen özütler boyanmış böbrek dokusunun ışık mikroskobu altında çekilmiş fotoğrafları incelendi. Özüte mordan ilave edilmeden yapılan boyamada, sitoplazmada soluk kahverengi boyama Şekil 2A'da gösterilmiştir. CuSO₄ eklendiğinde açık pembe renk boyama Şekil 2B'de gösterilmektedir. Alum ilavesiyle boyama yapıldığında koyu pembe-kırmızı renklendirme görülmektedir. Şekil 2C ve ayrıca NiSO₄ eklenmiş açık mor boyama Şekil 2D'de gösterilmiştir.



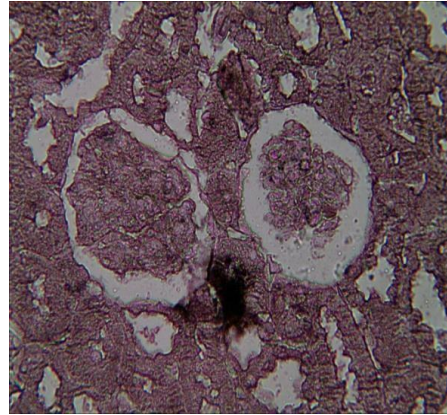
A



B



C



D

Şekil 2. Havaciva özütünde farklı mordanlarla boyalı böbrek dokusunun fotoğrafı x40 A) Mordansız B)CuSO4 ile C)Şaplı D)NiSO4 ile

TARTIŞMA VE SONUÇ

Daha önce yaptığım çalışmalarda, yayınlarda narçiçeği bitkisinin sulu özütü Wistar rattan alınan karaciğer, böbrek, kalp, akciğer dokularına uygulandı (14). Bu çalışmada mordan maddesi kullanılmadan sadece sulu özüt ile boyama yapıldı ve dokuda soluk renklerde çok belirgin olmayan boyamalar elde edildi. Kırmızı lahana özütü ile de rat dokuları değil sadece kan hücreleri boyaması üzerine çalışmalar yapıldı (15). Ayrıca nar çiçeğinin etanol özütü ile wistar ratın ovary ve testis dokularında farklı pH ortamlarında boyama çalışması da yapıldı (16). Fakat bu çalışmalarda kullanılan özütlerin GC-MASS analizleri için imkan olmamıştı. Bu devam eden NAP projemde 2 bitki için yapılmaktadır. Bu projede doku boyama çalışması hiç yapılmamış Havaciva özütü kullanıldı. Wistar rat'ın karaciğer ve böbrek dokularında farklı mordanları havaciva özütünde kullanarak hücre çekirdek ve sitoplazmasında daha canlı boyamalar yapılmıştır. Bu çalışmalar uluslararası yayın çalışmaları için yeterli gelmektedir. Fakat diğer projeden GC-MASS analizleri ile boyamalar desteklenince SCI yayınlar yapmak mümkün olacaktır. Bu projeden alınan santrifüj aleti NAP projesinde gereken DNA izolasyonu ve daha analitik boya çözeltisi hazırlamakta, biyokimya ve tıbbi lab derslerinde kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Suebkhampet, A., Sotthibandhu, P. Effect of Using Aqueous Crude Extract from Butterfly Pea Flowers (*Clitoria Ternatea* L.) As a Dye on Animal Blood Smear Staining. Suranaree Journal of Science & Technology. 19 (1), 15-19 (2012).
2. Lillie, R.D., Pizzolato, P., Donaldson, P.T. Hematoxylin substitutes: a survey of mordant dyes tested and consideration of the relation of their structure and performance as nuclear Stain Technology. 51, 25-41 (1975).
3. Rosemary, B.B., Abraham, A.O., Ademola, A.O. Staining effect of Hibiscus sabdariffa extract on sperm cell morphology of Sprague-Dawley rats, Journal of Histotechnology, 35 (3), 110-113 (2012).
4. Avwioro, O.G., Onwuka, S.K., Moody, J.O., Agbedahunsi, J.M., Oduola, T., Ekpo, O.E., Oladele, A.A. Curcuma longa extract as a histological dye for collagen fibres and red blood cells. J. Anat. 210, 600-603 (2007).
5. Chigurupati, N., Saiki, L., Gayser, C . J., Dash, A. K. Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. International Journal of Pharmaceutics. 241, 293-299 (2002).
6. Nalbant, S., Karan, M.A. İç Hastalıkları Uzmanının Anemiye Yaklaşımı Rehberi, İç Hastalıkları Dergisi.17, 7-15 (2010).
7. Antonio, J., Chulilla, M., Soledad, M., Colas, R., Gutierrez, M. Classification of anemia for gastroenterologists. World Journal Gastroenterol. 15, 4627-37 (2009).
8. Desai, S.P., Isa-Pratt, S. Anemili hastaya yaklaşım, Klinisyenler için Laboratuvar Tıbbi Rehberi. Nobel and Güneş Press.Istanbul, 2004, pp.19-67.
9. Hajdu, S.I. A Note from History: The Discovery of Blood Cells, Annals of Clinical & Laboratory Science. 33 (2), 237-38 (2003).
10. Crossmon, G. The Selective Staining of Red Blood Cells. Journal Stain Technology. 15 (4), 155-158 (2009).
11. Beale, L.S. The Microscope in Medicine. J.&A.Churchill. London (1877).
12. Tell MD, Pandit P, Multifunctionalised Silk Using *Delonix Regia* Stem Shell Waste, Fibers and Polymers, 2017;18(9): 1679-1690.
13. Göktürk E, and Asil H. Hatay/Kırıkhan'da Yetiştirilen Safran (*Crocus sativus* L.) Stigmasının Ekstraktının GC-MS analizi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 2018;5(3):317-321.

14. Güler Kuşçulu N, Aslan HG, Evaluation of an extract of the *Punica granatum* flower as a biological stain of rat tissues: a preliminary study, *Molecular Biology Reports* 2019; 46: 581–585.
15. Güler Kuşçulu N, Benli H, Staining Effect of Pomegranate Flower Extract on Human Blood Cells: First Results, *Journal of Environmental Science and Engineering A* 2017; 6(2): 249-251.
16. Kuşçulu NG. Evaluation and comporison of staining effect of *Punica granatum* flower extract on testis and ovary of Wistar rats: First results. *African Journal of Biotechnology*. 2018; 17(32): 989-993.