

**Patoloji laboratuvarını  
kurduk: (Daha) İyi bir kesit  
ve yayma için ne yapmalıyız?**

**epc**

**8-9 Mayıs 2010, İZMİR**

**Ege Patoloji Derneği**

**Bu sunumda yer alan resimler yazarın izni  
olmadan kullanılamaz.**

# HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA VE KAPAMA YÖNTEMİ

Zeki KARABULUT

A.Ü.TIP Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

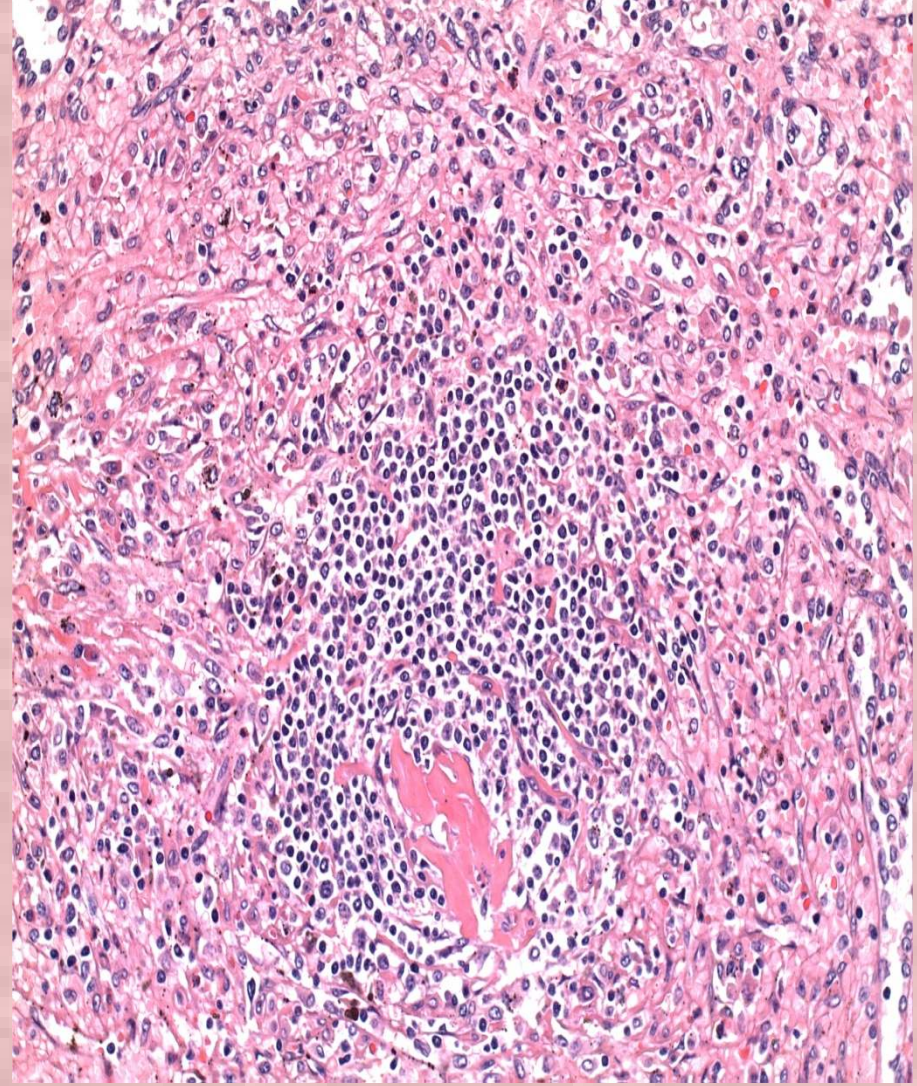
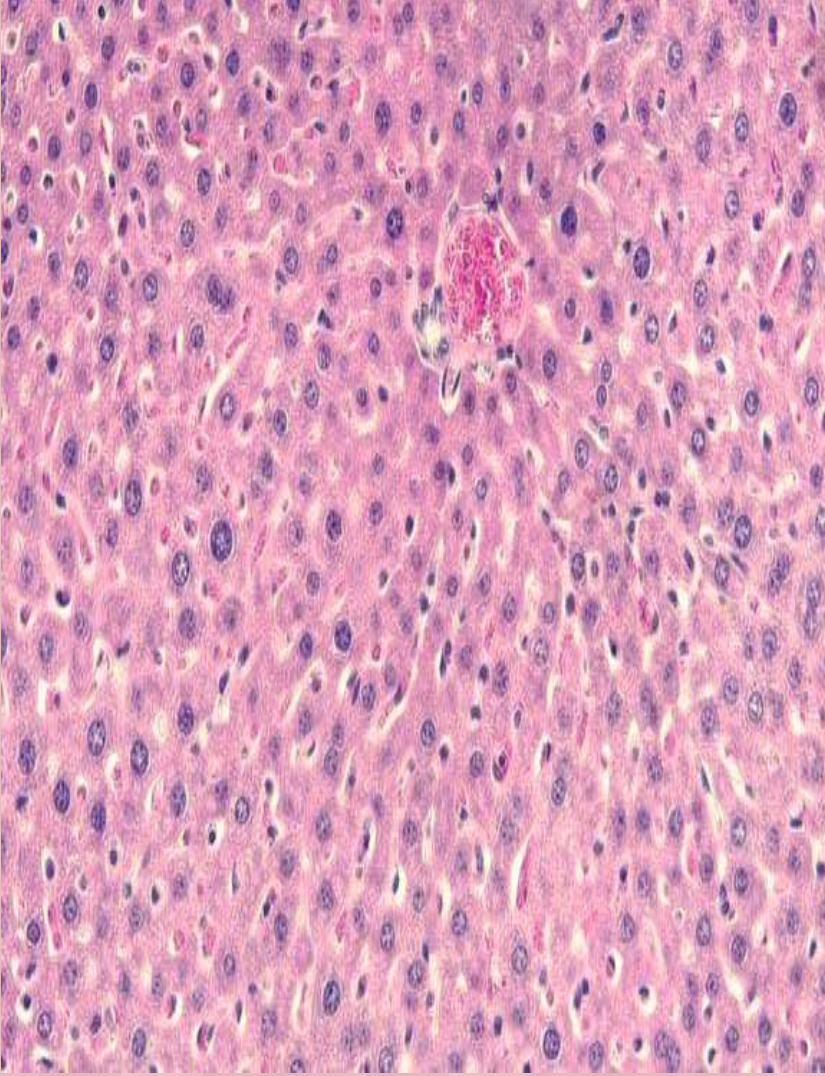


# HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYASI

Histopatolojik tanı için en çok kullanılan boya kombinasyonu Hemotoksilen ve eozin (H.E.) dir.

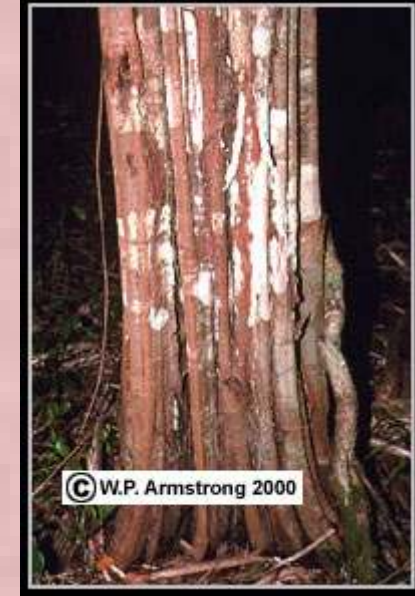
Tercih edilmesinin en önemli sebebi çok çeşitli hücreleri ortaya koyabilmesidir.

Çekirdek ve kromatin ayrıntısını çok iyi ortaya koymaktadır.



Çekirdek ve Sitoplazma detayı örnek preparatlar

# Haematoxylum campechianum



## log ağacı

Hematoksilen “log ağacı” (*Haematoxylum campechianum*) veya “kalp ağacı” adı verilen meksika kaynaklı bir bitkinin kabuklarının sıcak su ile işlenmesi ve üre ile karıştırılarak suda çözünür hale getirilmesiyle hazırlanır.

<http://waynesword.palomar.edu/ecoph4.htm>

Hemotoksilen bazik bir boya olarak kullanılsa da aslında bir boya değildir.

Boya olarak etki etmesi için zincirlerinden birinde bulunan guioid' in hematein' e okside olması gerekir.

Ana oksidasyon ürünü olan Hematein asıl reklendirme işinden sorumlu maddedir.

## OKSİDASYON

### **1-Doğal oksidasyon (ripening):**

Işık ve havayla maruz bırakılarak yapılır. Aylar süren uzun bir süreçtir. Bu şekilde okside olan boyalarda dayanıklılık da daha fazladır. (Ehrlich ve Delafield)

### **2- Kimyasal oksidasyon:**

Sodium iodat (Mayer's) veya civa chloride ( Harris) kullanılarak çok hızlı gerçekleşir. Bunların hazırlandıktan sonra kısa süre içinde kullanılması gereklidir. Ömürleri doğal okside hematoksilene göre daha kısadır.

Kimyasal okside hematoksilenlerde hava ve ışıkla temas nedeniyle oksidasyon devam eder ve zaman içinde hematein parçalanarak boyanma yeteneğini kaybeder.

Hematein zayıf, anyon yüklü, kırmızımtırak - sarı bir boyadır.

PH sı nötrale yakın 6,5' tur. Dokulara bağlanma kapasitesi düşüktür.

Boyanın dokulara bağlanmasında kovalen bağların bulunması boyanmasının etkinliğini arttırmaktadır. Burada metal iyonlarıyla mordantlamanın rolü olduğu kabul edilmektedir.

Mordant kullanılmadığı takdirde çekirdek boyaması başarılı değildir. Metal kompleks boyalar genellikle hidrofildir. Bu nedenle alkolik dehidratasyonlara dirençlidir.

**En sık Mordant olarak :**

alüminyum tuzları,

Demir,

Tungsten

Molybdenum

Kurşun (seyrek argyrophil çekirdeklerin gösterilmesinde )

Kullanılan mordantın özelliği de dokunun çekirdeğin boyanma özelliğini etkiler.

Günümüzde artık çoğu laboratuvarın tercihi olarak kullanılan hazır solüsyon şeklindeki boyalarda hemateinle mordant olarak kullanılan maddeler genellikle Alüminyum ve demir tuzları, Alüminyum ve demir şaplar ( alum) dır.

En çok kullanılan şaplar

Potasyum alum:  $K_2SO_4Al_2 (SO_4)_3 24 H_2O$

Ammonium alum :  $(NH_4)_2 SO_4'Al_2 (SO_4)_3 24 H_2O$

Demir alum :  $(NH_4)_2SO_4 Fe_2(SO_4)_3 24 H_2O$  dur.

Aliminyum ile demirin verdiği renk morluğu birbirinden farklıdır. Aliminyum mavi-mor bir renk verir. Suda erir, dokuya temas ettikten sonra ne su ne de etil alkol onu tekrar çıkartabilir.

Aliminyum hematein, bazik boya gibi etki eder (yani katyonik bir boya vazifesi görür).

Demirli hematein ise siyah veya lacivert renk verir , fakat etkisi birincisi kadar bazik değildir.

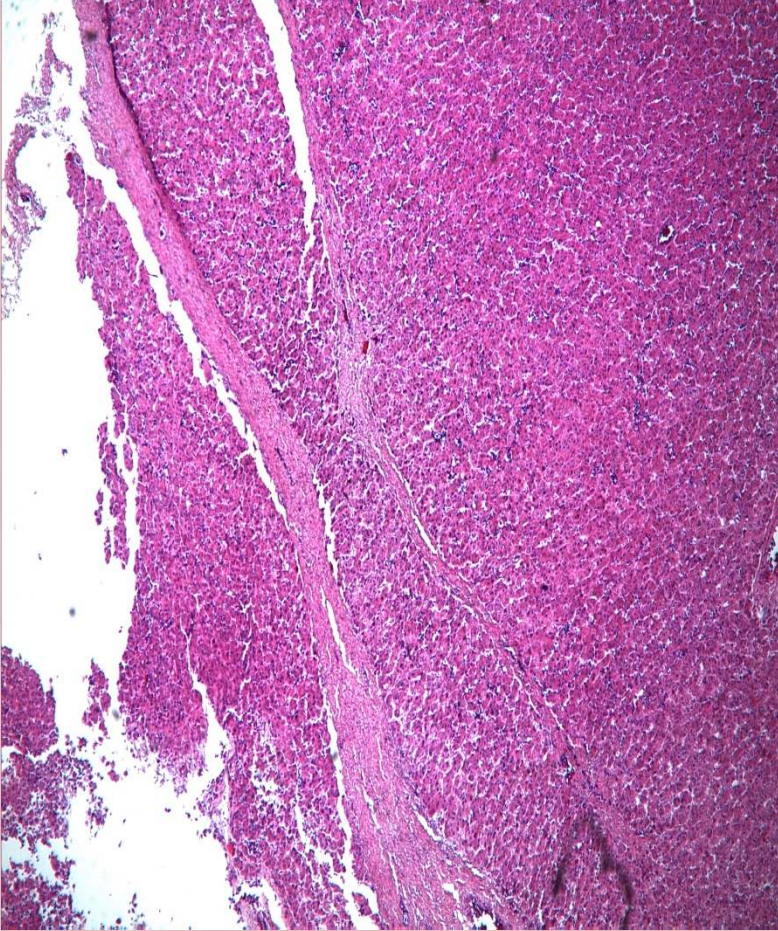


Rutin teknikte, kesitler önce mordantlardır sonra boya ile hematein muamele edilir, fazla mordant solüsyonda differansiye edilir.

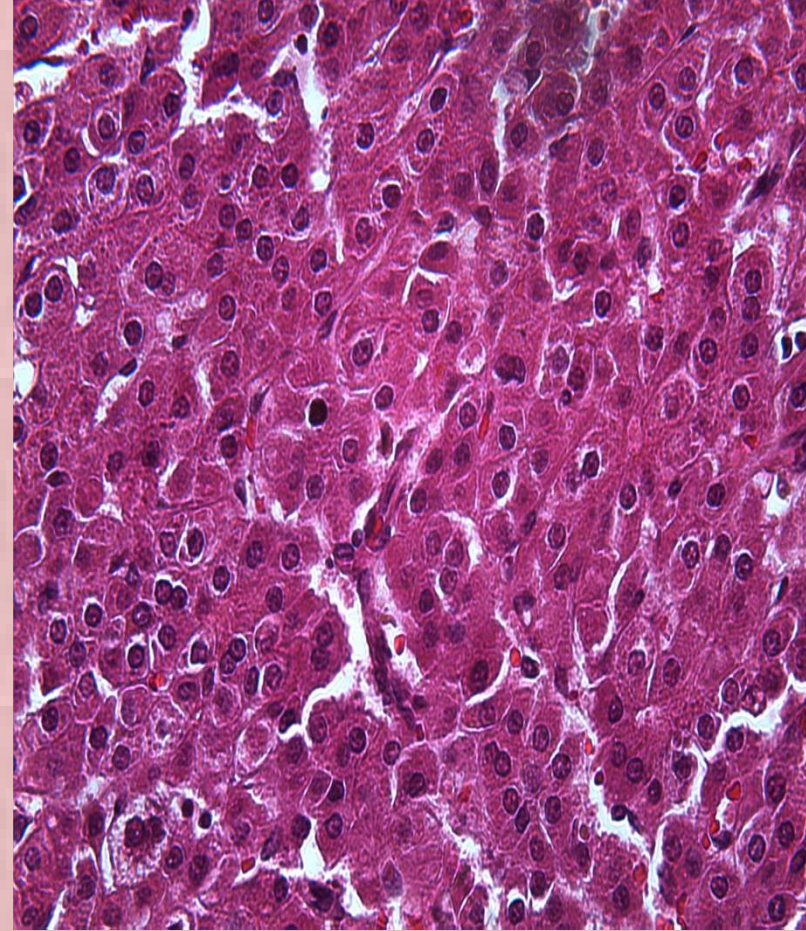
Bu şartlar altında hematin bazik boya olarak tesir eder.

Differansiyasyon işlemi genellikle % 1 lik HCL solüsyonu ile beraber çeşme suyu ya da amonyaklı su ile sağlanır.

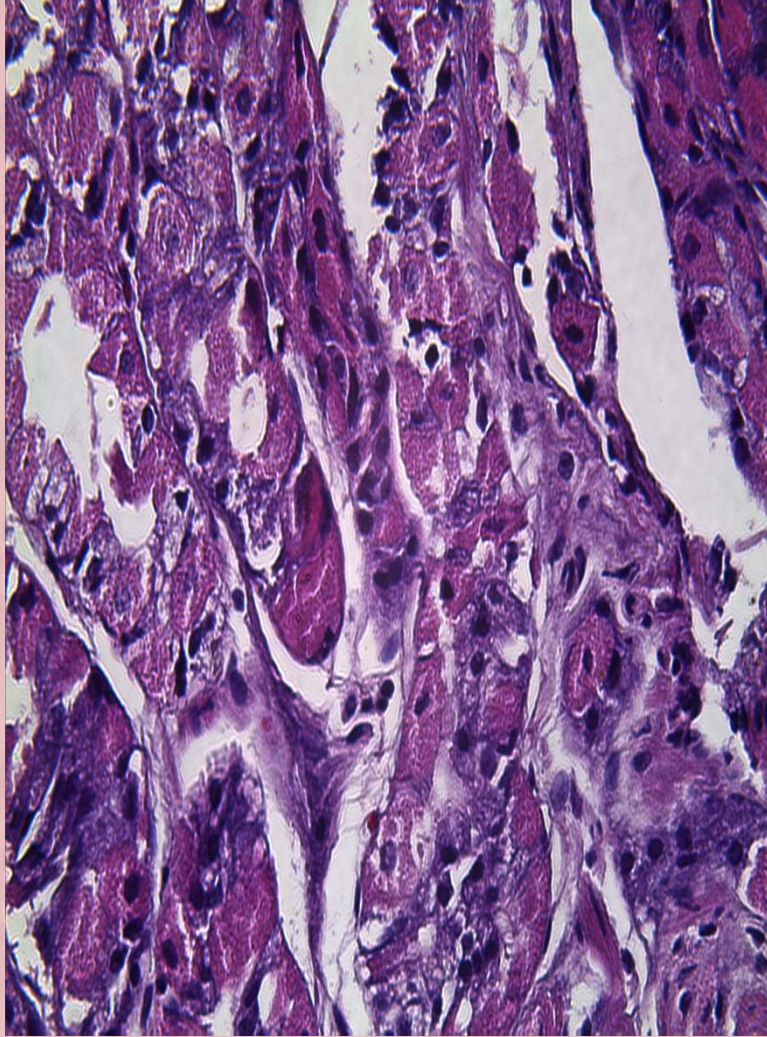
# Differansiyasyon işleminin uygulandığı ve uygulanmadığı preparat örnekleri



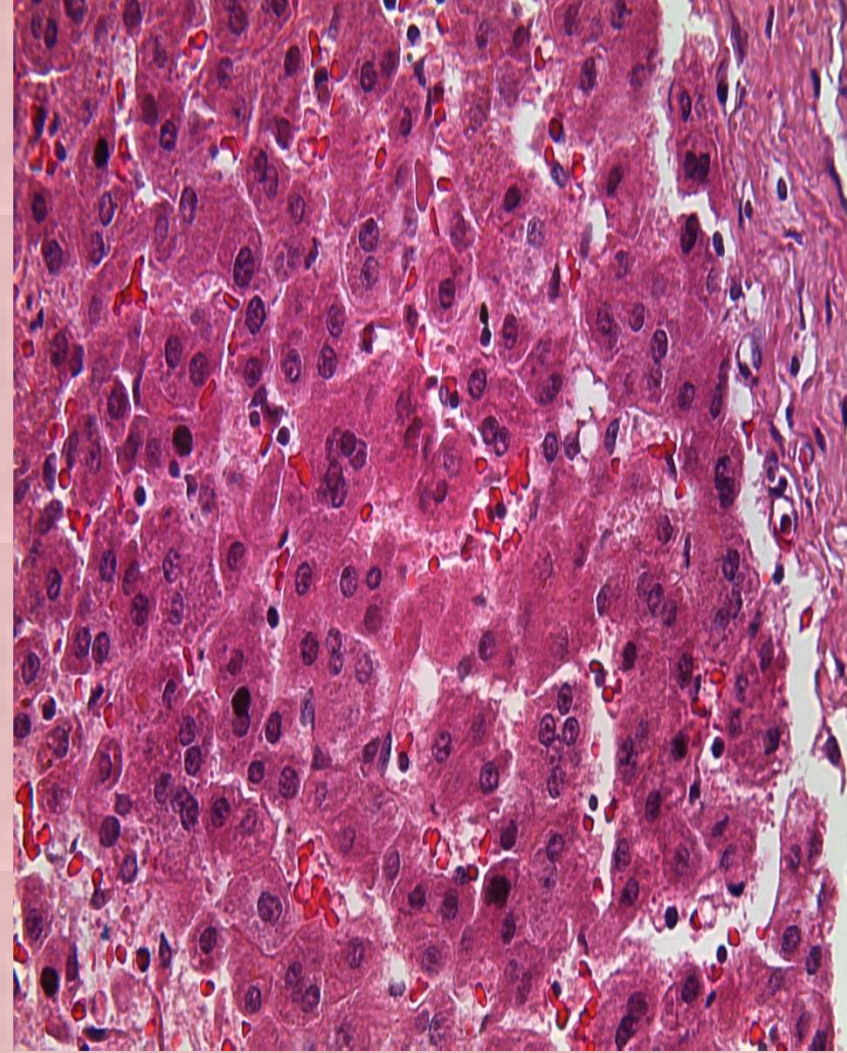
Differansiyon uygulanan preparat



Differansiyon uygulanmayan preparat



Differasiyon sorunlu preparat



Normal preparat

Günümüzde histopatoloji laboratuvarlarında en sık iki tip hematoksilen kullanılmaktadır:

Mayer ve Harris metodları. Ortopedik örnekler çalışan laboratuvarlarda regressif bir metod olan Harris metodu kullanılır.

Dekalsifikasyon genellikle çekirdeğin bazofilik boyanmasını azalttığı için bu metod tüm hücre kısımlarını boyar örneğin çekirdek sitoplazma bağ doku vs. ve bu boyamayı optimum çekirdek boyanması için kontrollü renk çıkarma ve “bluing” işlemi takip eder.

Diğer laboratuvarlar Mayer hematoksilen kullanırlar bu sadece çekirdeği boyayan progresif bir yöntemdir. Mavi rengi arttırmanın yolu lamelleri akan su altında tutmaktır.



# **HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA YÖNTEMİ VE BİLİMSEL KONTROLÜ**

Histolojik olarak H-E boyamanın kesin kimyasal reaksiyonlarla ve metotlarla başarılabilirdiği gösterilmiştir,

Fakat daha az kesinlik kazanmış kimyasal ve fiziksel yöntemlerle de başarılmaktadır.

Bu boyama yöntemlerinin çok sayıdaki farklı faktörlere göre oldukça deęiőeceđi anlamına gelmektedir.

Bu aynı zamanda geliştirilen boyama tekniklerinin çokluğunun nedenini ortaya koymaktadır.

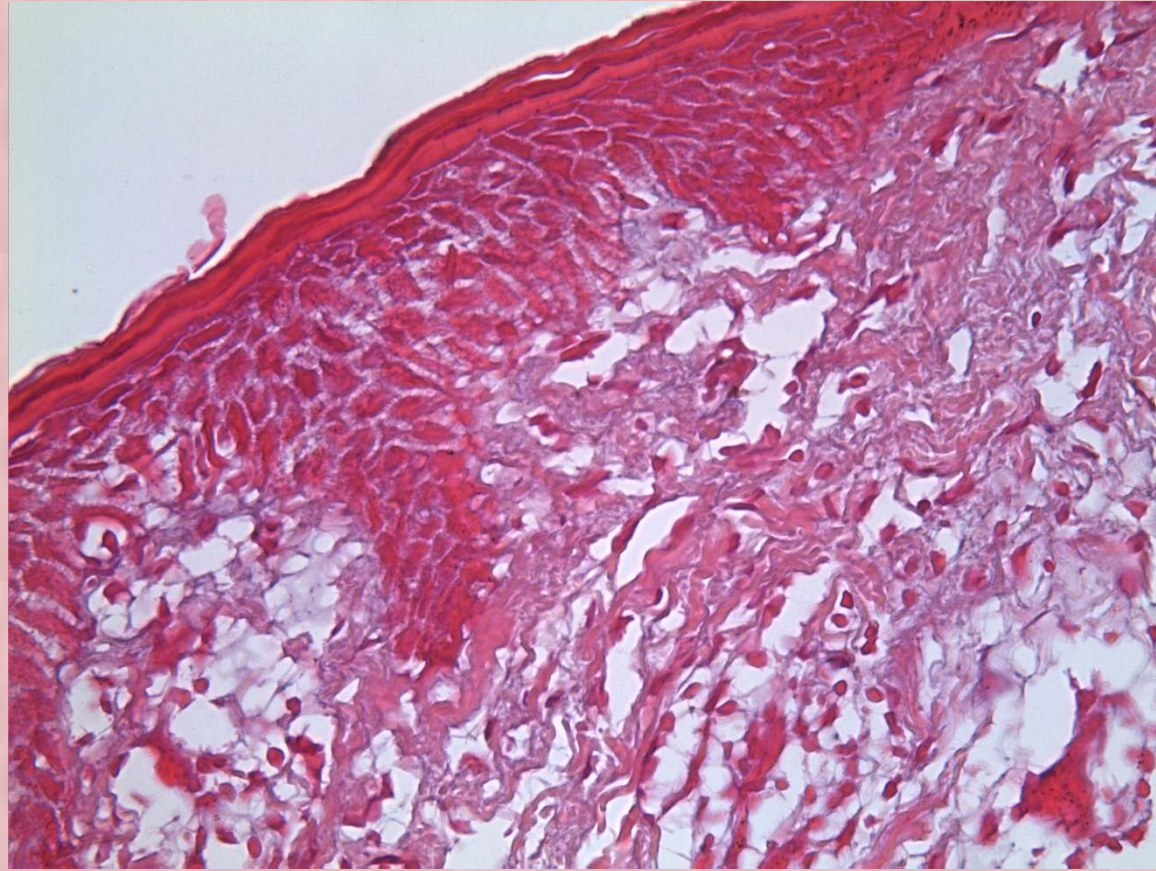
Fakat her patoloji teknisyeninin bu yöntemlerde başarısızlığa uğradığı olmuştur.

Bunun nedenleri Őunlar olabilir:

# BOYANMA SORUNLARI

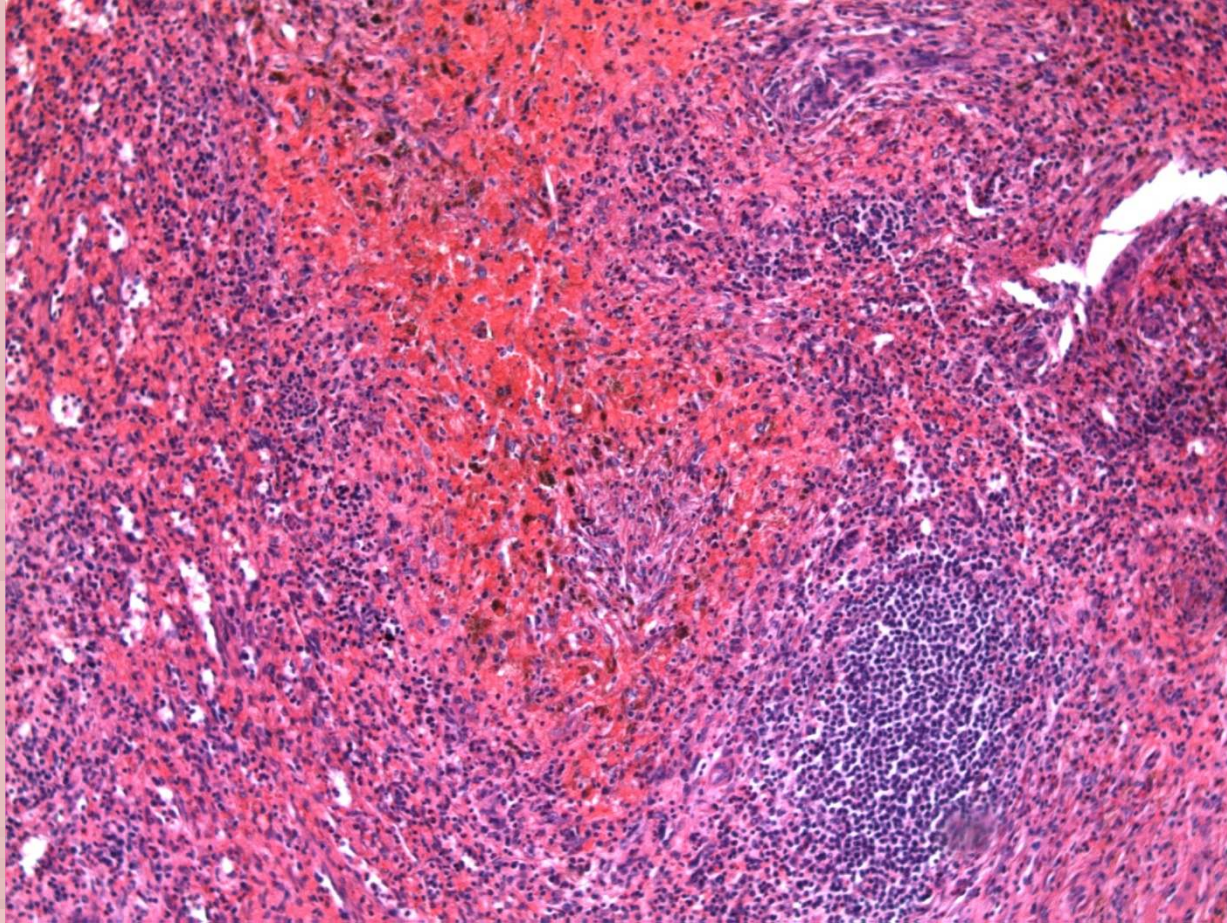
- 1-Dokuların kendine ait boyanma yetersizliği (boya için dokunun yeterli miktarda reaktif olmaması)
- 2-Uygun olmayan fiksasyon,
- 3-Boyaların kompozisyonundaki ve çözünürlüğündeki farklılıklar,
- 4-Boya solüsyonunun yetersiz olgunlaşma veya bozulması,
- 5-Boyanın ve çeşme suyunun PH' sındaki veya ısısındaki değişmeler,
- 6-Kalın kesit.
- 7-Dekalsifikasyon yetersizliđi
- 8-Deparafinizasyon yetersizliđi
- 9-Diğer faktörler

# BOYAMA SORUNLARI İLE İLGİLİ ÖRNEK PREPARATLAR

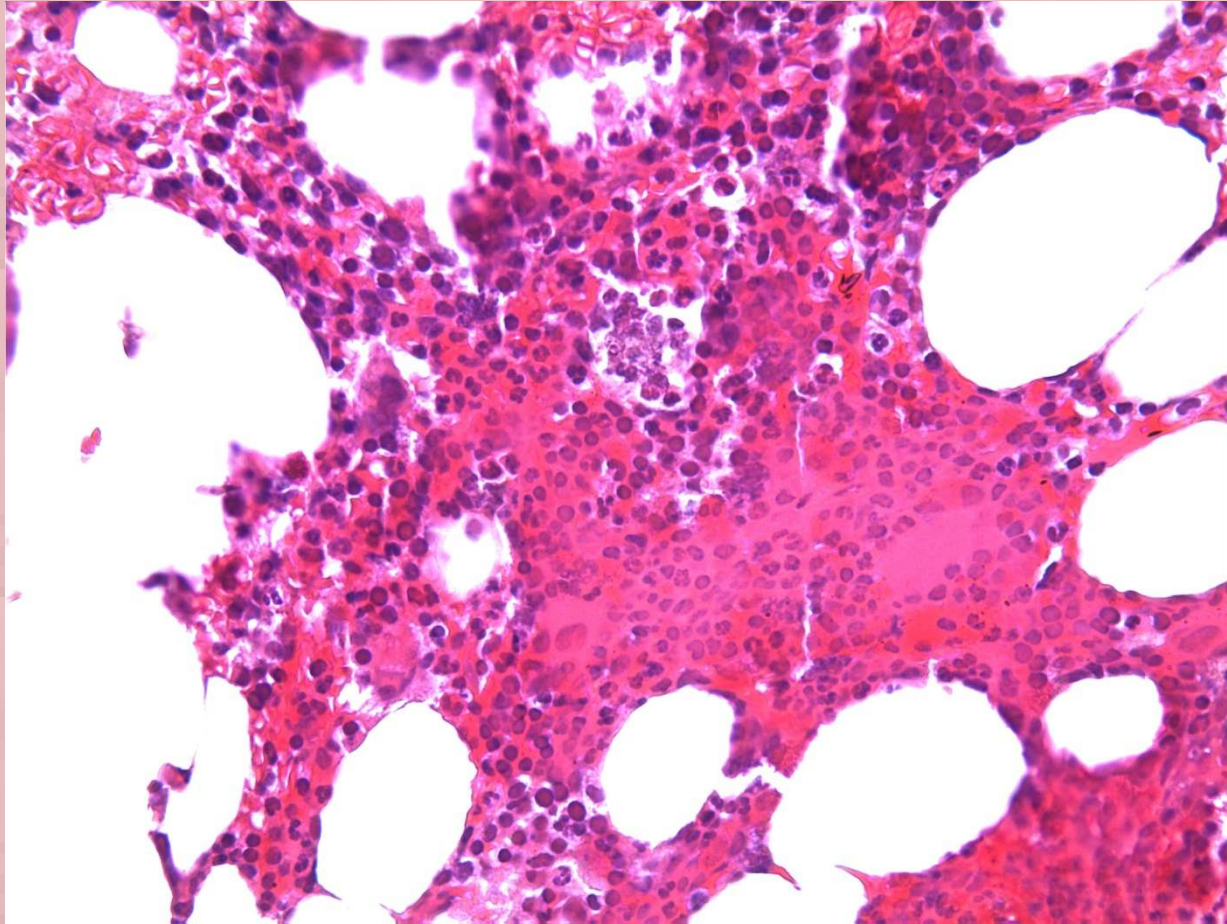


Doku takip sorunlu preparat

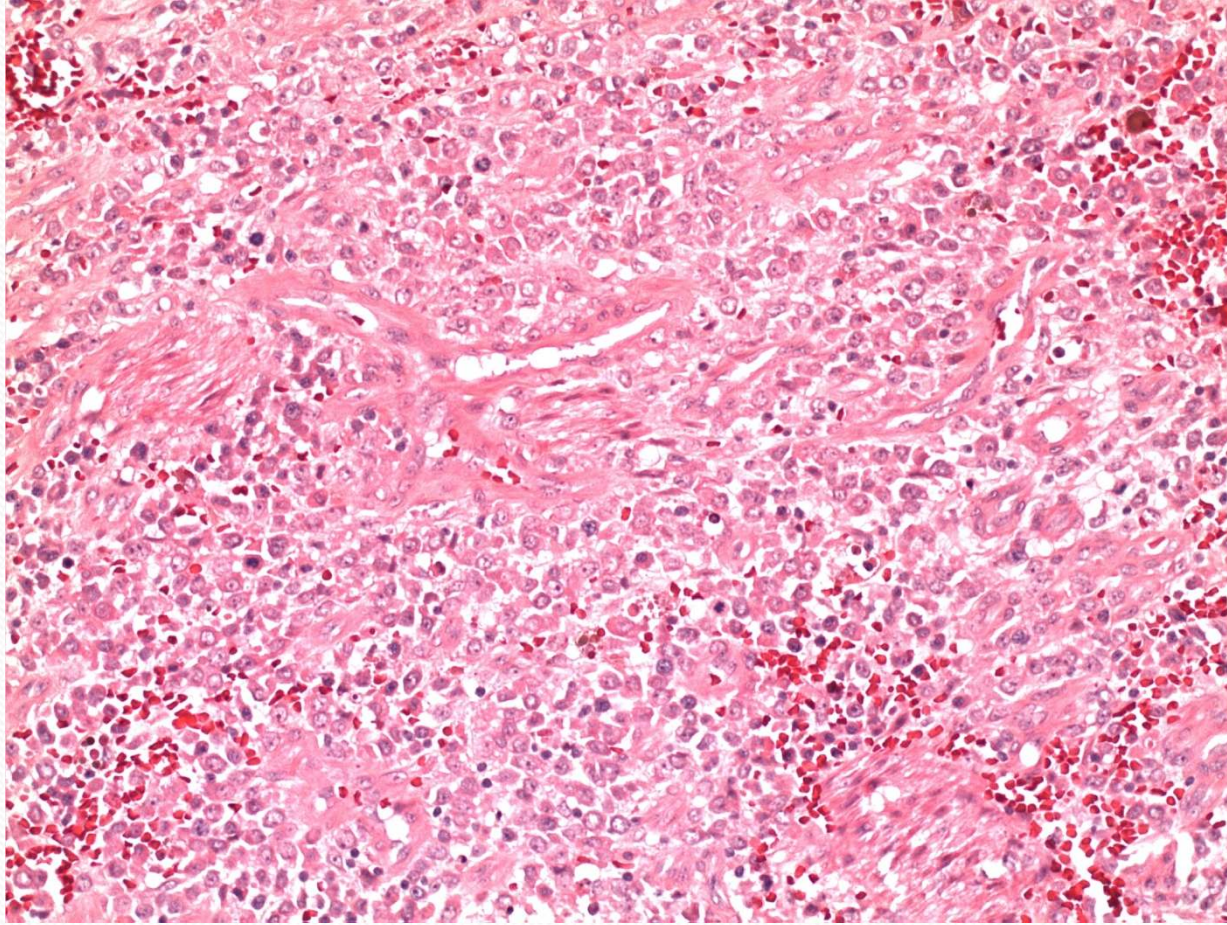




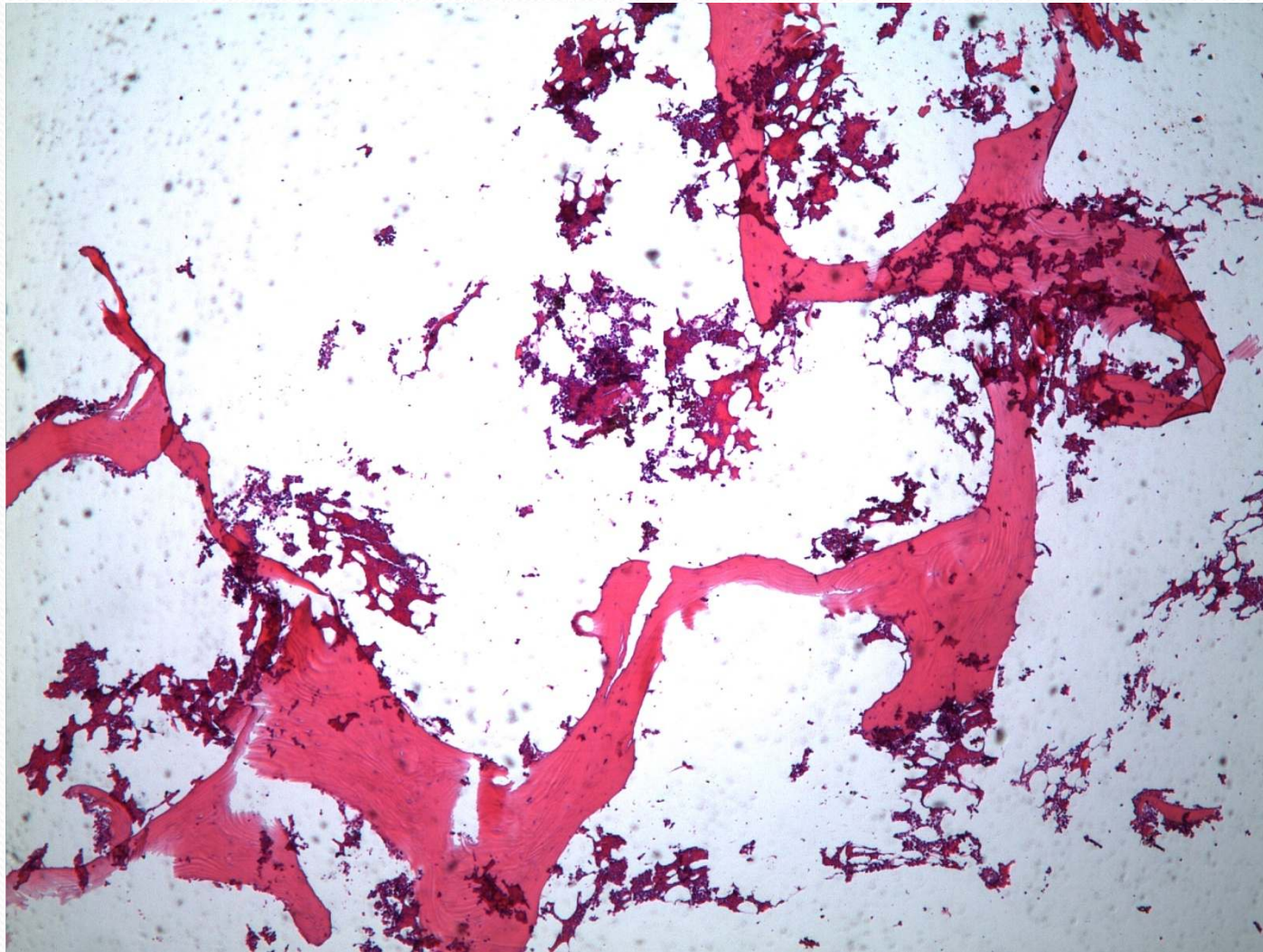
Kalın kesit sorunlu preparat



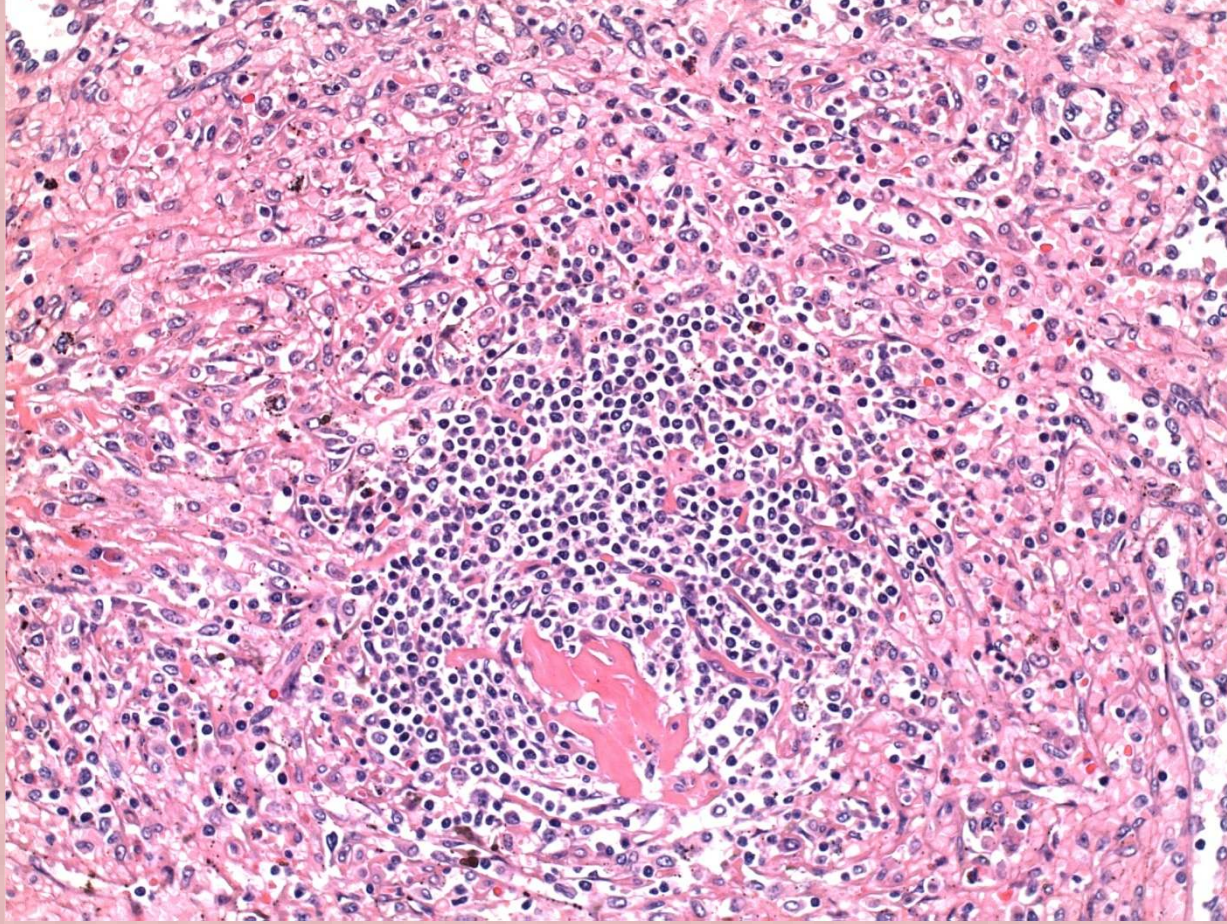
Deparafinizasyon sorunlu preparat



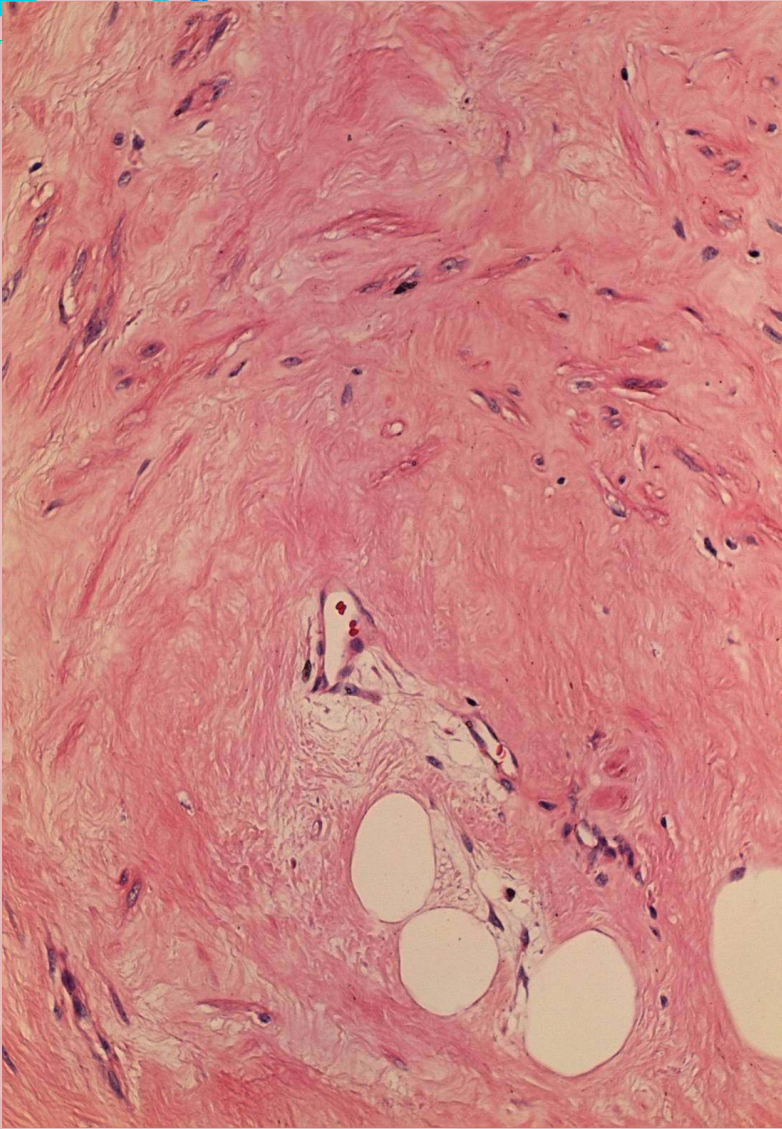
Hematoksilen boyasını iyi almamış preparat



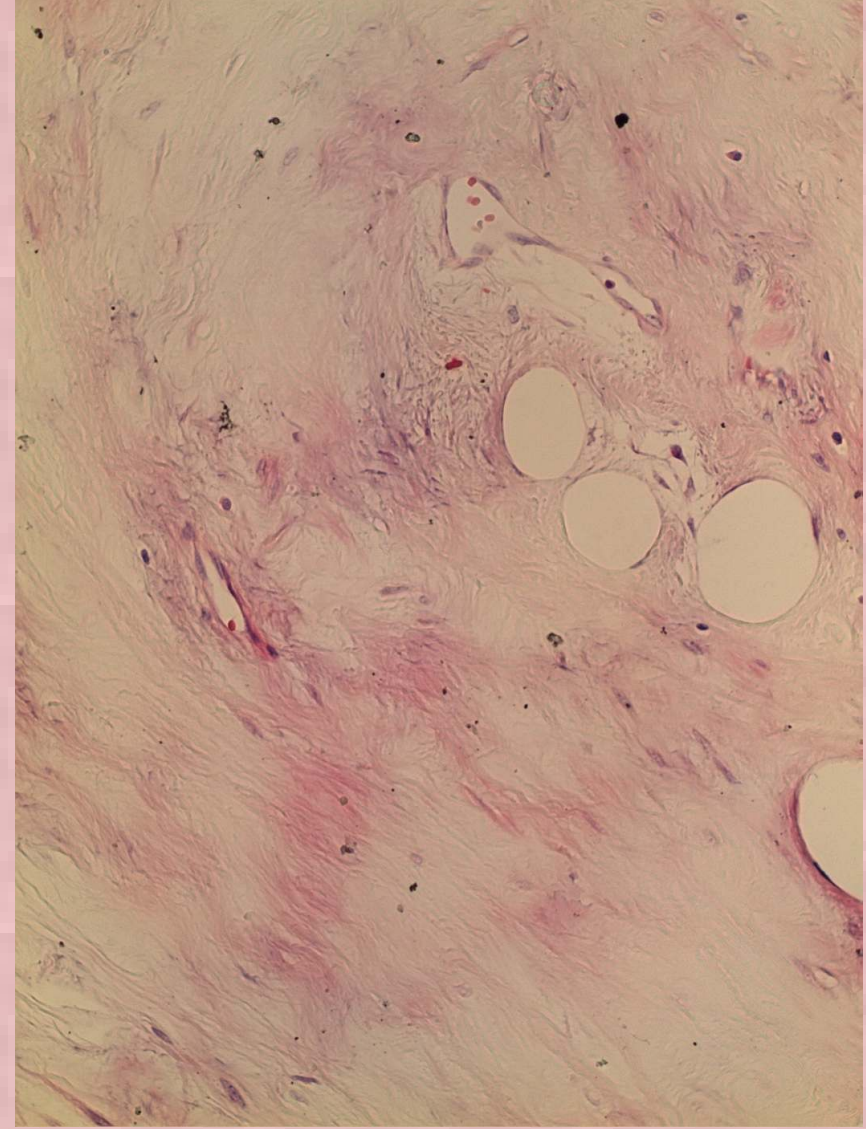
Doku takip sorunlu preparat



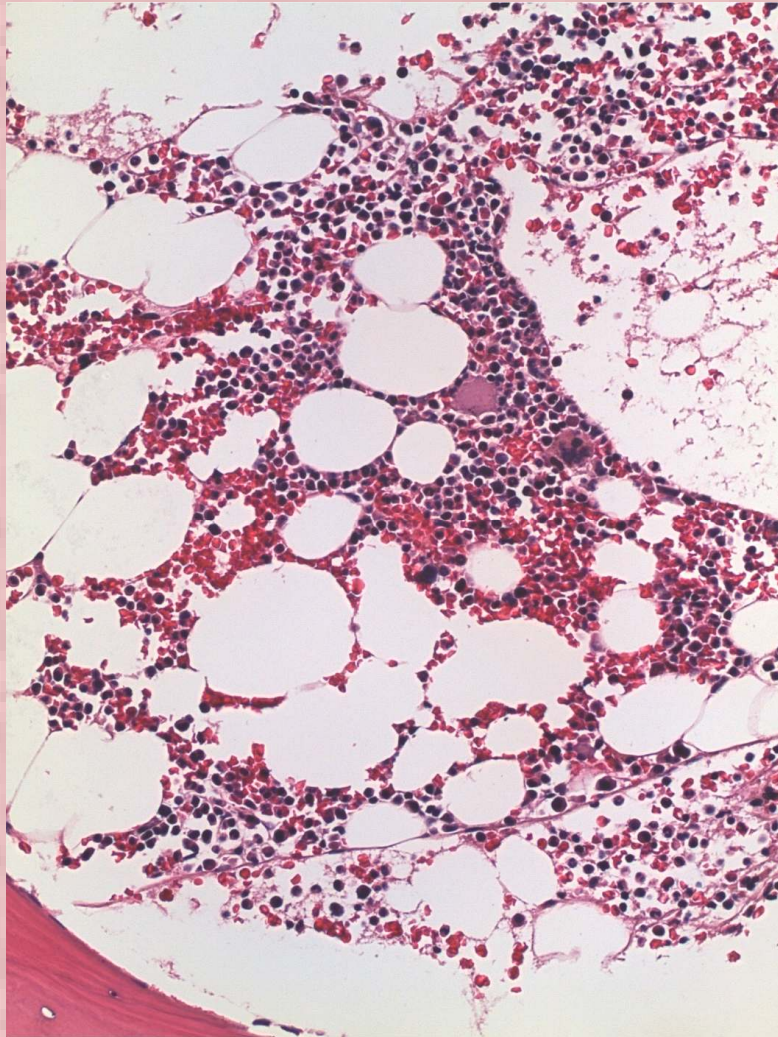
İnce ve güzel kesilmiş bir preparat



Normal doku



Deparafinizasyon sorunu



Boyamadaki kesinliğin veya yorumlanabilir bir preparat eksikliğinin nedeni teknisyenin en iyi sonuçları elde etmek için kendi yöntemlerini kontrol etmesi gerektiği anlamına gelmektedir.

Eğer çeşme suyunun PH' sı veya yapısı değişirse veya iklimsel durumlar farklıysa, ya da farklı markalı bir boya alındı ve içeriğine bakılmadan boyama yapıldı ise boyamızdaki oksidasyon süresi farklılık gösterebileceği için bir ülkede iyi çalışan bir yöntem diğer bir ülkede hatta aynı ülkenin bir başka bölümünde tatminkâr olmayabilir.

Bir boyama yönteminde verilen direktifler dikkatli olarak takip edilmelidir ancak değiştirilemez diye de düşünülmemelidir.



Laboratuarda, patolojik değişiklikler, bakteriler, metaller gibi maddeler içerdiği bilinen dokulara ait kapatılmış boyanmamış parafin kesitlerin stoku bulundurmalıdır.


Bunlar kontrol kesitler olarak kullanılmalıdır. İncelenecek kesitle aynı anda ve aynı yolla boyanmalıdır.

Her laboratuvar çalışanı boyama tekniğinin kontrol edilmiş varyasyonlarını yapma becerisinde olmalıdır.

Bir boyama yönteminin rastlantılara dayanan çok sayıdaki farklı şekilleri, şans eseri mükemmel sonuçlar verebilir, fakat sonradan genellikle tekrar aynı sonucu almak mümkün değildir.

Aynı doku bloğundan çok sayıda kesit alınmalı ve yöntemin her basamağındaki değişikliklerin bir serisi, teker teker ve her kesitte sadece bir değişiklik yapılarak yapılmalıdır.

Tekniğin geri kalan bölümünü sabit tutarak, bu kesitlerle yöntemin hangi kısmının kusurlu olduğu ve nasıl düzeltilebileceği daha kolay görülecektir.



# H-E BOYAMA VE KAPAMA İŞLEMİ SIRASINDA TEKNİSYENİN YAPMASI GEREKENLER

Hematoksilen pH'ı düzenli olarak kontrol edilmelidir.

Mavileştirme solüsyonundan (amonyaklı su gibi) çıktığında kesitler mikroskopta kontrol edilmeli, hematoksileni aldığı ve fazlalığının uzaklaştırıldığından emin olunmalıdır.

Boyama sonrası ise H-E boyası tam olarak kontrol edilmelidir.

Nükleus ve sitoplazma doğru ve yeterli boyanmış mı?

Şeffaflanma tam mı?

Kabarcık, kir, parmak izi, boya çökeltisi var mı?

Doğru etiketlenmiş mi?

Hafta içerisinde boyanan preparat sayısına göre solüsyonlar değiştirildi mi?

- **BOYAMA YÖNTEMİ**

- Lamları parafinden arındır (deparafinizasyon) ve su ile muamele et

1-Xylen		3dk	}	deparafinizasyon
2-Xylen		3dk		
3-Xylen		3 dk		
4-Alkol %70	2dk			
5-Alkol%80		2dk		
6-Alkol%90	2dk			
7-Alkol%100	2 dk			

- Harris hematoksilen ile 6 ila 15 dakika boyayın.
- Akan musluk suyunda 2 ila 5 dakika yıkayın.

- %1'lik asit alkolle 1-2 kez batırarak ayırın
- Musluk suyunda yıkayın.
- Zayıf amonyak solüsyonu ya da doymuş lityum karbonat solüsyonu ile preparatlar parlak mavi bir renge boyanıncaya kadar bekletin.
- Akan musluk suyunda 5dakika süreyle yıkayın.
- %80 etil alkolde 1-2 dakika bekletin.
- Eozin-phloxine solüsyonunda 2 dakika zemin boyama (counterstain) yapın.

1-%95 lik Alkol	3dk	} şeffaflanma
2-%95 lik Alkol	3dk	
3-Absolü Alkol	3 dk	
4-Absolü Alkol	3 dk	
5-Xylen	2dk	
6-Xylen	2dk	
7-Xylen	2 dk	

- Kapama işlemi

- A.Ü.Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarında Kullanılan H-E Boyama Yöntemi

Xylen 2dk	Xylen 2dk	Xylen 2dk	Xylen 2dk	Alkol 2dk	Alkol 2dk	Alkol 2dk	Yıkama 2dk
--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	---------------



Amonyaklı su 1 dk	Yıkama 2 dk	%1 lik asit Alkol 1 dk	Yıkama 5 dk	Hematoksile n 7 dk
----------------------	-------------	---------------------------	-------------	-----------------------



Yıkama 2 dk	Alkol 1 dk	Eozin 11 dk	Alko 1 2dk	Alko 1 2dk	Alkol 2 dk	Xylen 2dk	Xylen 2dk	Xylen 2dk	Kurutma 5 dk
----------------	---------------	----------------	---------------	---------------	---------------	--------------	--------------	--------------	-----------------

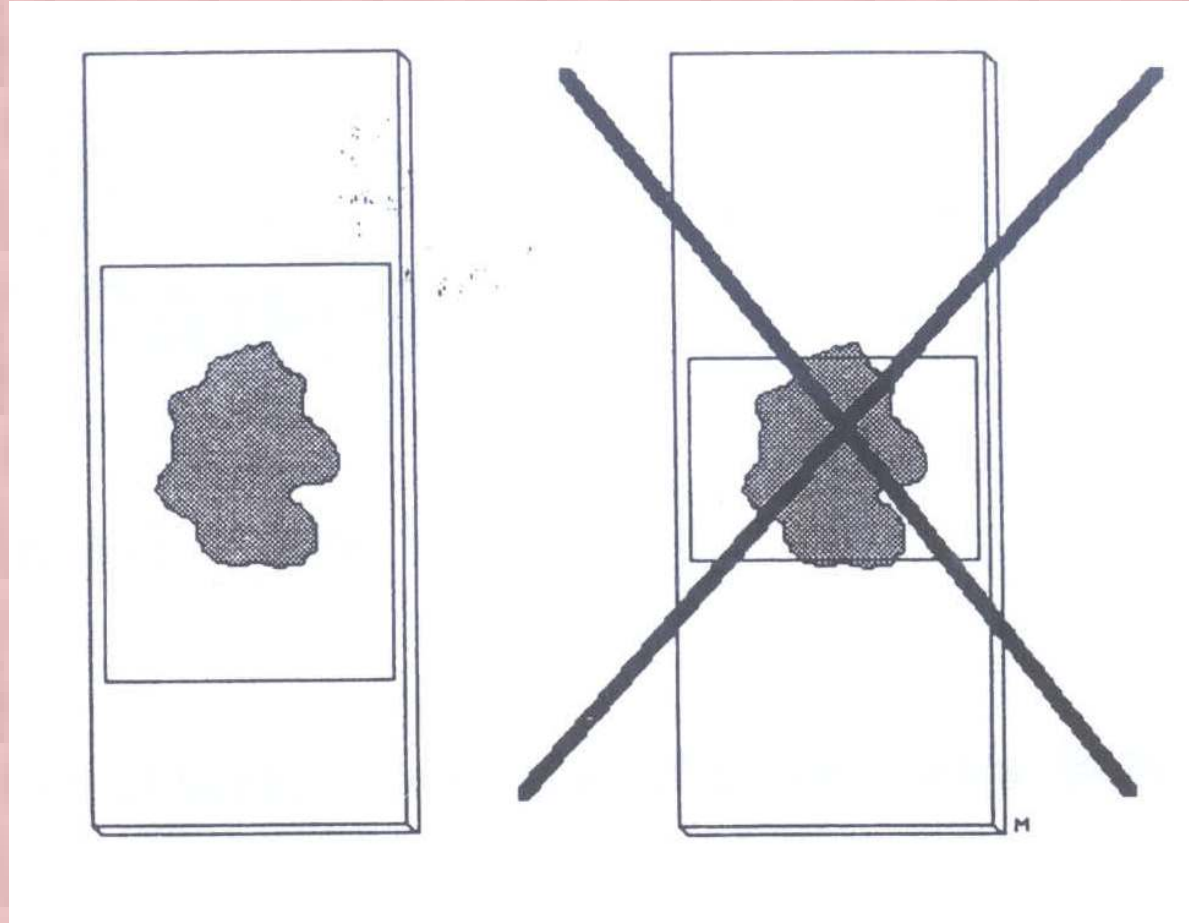


# KAPAMA İŞLEMİ

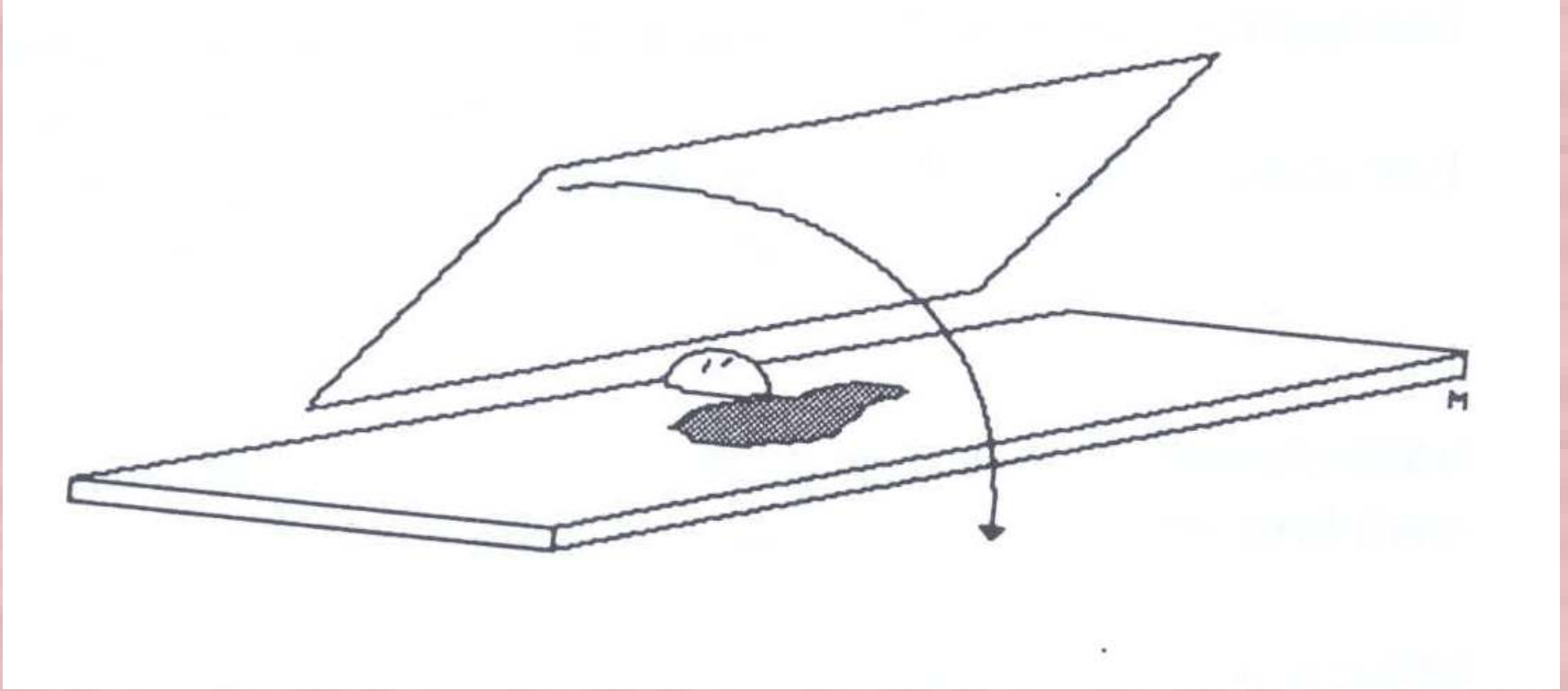
- Preparasyondaki son aşama lam üzerindeki dokuyu üzerine lamel kapatarak yapılan kapama işlemidir.
- Bu işlem lamın kalıcı olarak kapatılmasına ve mikroskopik olarak incelenmesine izin verir.
- Lameli sabitlemek için üç tip kapama maddesi kullanılabilir: doğal reçine, sentetik reçine ve su içerikli media.

- Doğal reçineler arasında uzun kuruma süresi yüzünden rutin kullanımda pratik olmayan “Kanada Balzamu” geçmişte standart olmuştur.
- Kanada balzamu ile kapatılan kesitlerde eozin birkaç yılda solar ve basit anilin boyalarının korunmasında yetersizdir. Ayrıca “Prusya mavisi” reaksiyonlarının erken solmasına sebep olur.
- Bu sebeplerden dolayı günümüzde laboratuvarlarda hematoksilen eozin boyama ve özel diğer boyamalardan sonra sentetik reçineler kullanılır.(Entellan veya Balzam)

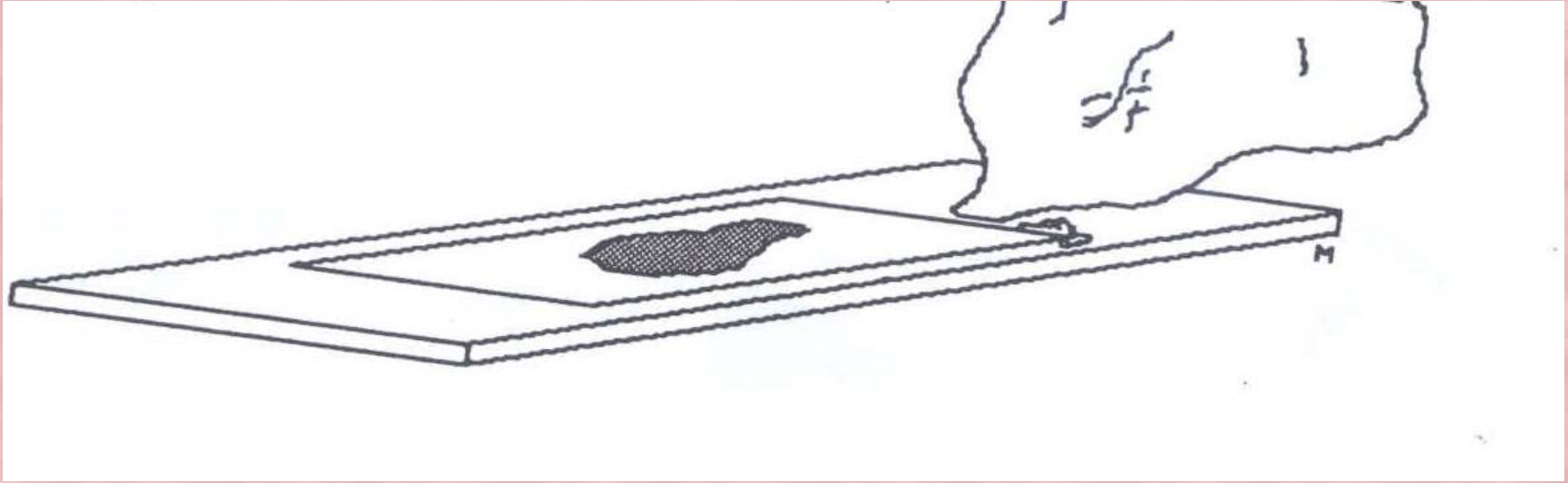
# 1. Örnek için uygun boyutta lamel seçin



2. lameli lama doğru yatırarak hava kabarcığı oluşmasını engelleyin.



3. Tiftik içermeyen bir peçete ya da uygun solvent ile nemlendirilmiş gazlı bez ile lamelin kenarlarından taşan kapama maddesini temizleyin.



**LABORATUVARDA H-E BOYAMA VE  
KAPAMA İŞLEMİNDE RUTİN  
OLARAK YAPILMASI GEREKEN  
İŞLEMLER**

- Boyama işlemine başlamadan önce farklı dokulardan preparatlar alıp deneme boyası yapalım ve mikroskopta Çekirdek ve sitoplazma boyamasının tam olup olmadığına bakalım
- Şeffalendirme yeterlimi ve artefak varmı kontrol edelim.
- Boyama cihazlarımızı kaplarını her hafta mutlaka temizleyelim ve kapları uygun solüsyonda beklettikten sonra durulama işlemini tam yapalım
- Boyama işlemi yaparken kapların hacmine göre kendimize alkol ve ksilen değiştirme aralığı belirleyelim bir tablo hazırlayarak alkol ve ksilenleri değiştirip tablomuza işleyelim



- Laboratuvarımız da her teknisyenin görebileceği bir yerde tablo bulduralım ve tabloya Hematoksilen Eozin değiştirme bilgilerini girelim.
- Kullandığımız boya solüsyonlarının içeriğini bilerek boyama prosedürümüzü belirleyelim.
- Hematoksilen çözeltisinde oksidasyon yavaş ve günden güne düzensiz olarak devam eder, çökelti oluşur boya çözeltisi süzölmelidir.
- Otomatik makinalarda bu çökelmeler tıkanıklıklara neden olabilir.

- Kapama işlemi yaparken otomatik makineler için kuru kapamayı tercih edelim.
- Lamel seçimini iyi yapalım lamellerin et kalınlıklarının bile mikroskopta görüntüyü etkilediğini bilelim.
- Kapattığımız preparatları rutin olarak mikroskopta incelemeye parmak izi olup olmadığına mutlaka bakalım.

- Sonuç olarak boyama işlemine otomatik makine yapıyor benim bir şey yapmam gerekmiyor diye düşünmeyip yukarıda benim yaşayarak gördüğüm ve sıraladığım maddeleri bütün teknisyenlerin uygulaması gerektiğini düşünüyorum .
- Kalitenin sadece kaliteli malzemeyle yakalanamayacağını kaliteli ve iyi bir boya için kaliteli ve yetişmiş teknisyenler olması gerektiğini düşünüyorum.

Sunuma katkılarından dolayı  
Sn Prof.Dr.Işinsu Kuzu  
Sn Doç.Dr Aylin OKÇU HEPER  
Sn Kaplan Firması  
çalışanlarına teşekkür ederim.