

Hematoksilen-Eozin (hematoxylin-eosin) (H&E)*

Gülsün Ekicioğlu, Naziye Özkan, Emine Şalvaazar

Pathology Laboratory, Vocational School of Health Services, Marmara University and Department of Pathology, Medical Faculty, Marmara University, Istanbul, Turkey

Accepted for publication on 20 December 2004

** Bu çalışma XVII. Ulusal Patoloji Sempozyumu Patoloji Teknik Elemanları Uydu Toplantısı 2-3 Ekim 2004/Gaziantep Grand Hotel'de sunulmuştur.*

Hematoxylin, the most widely used nuclear stain was extracted from logwood. Hematoxylin was not a dye. Hematein, the oxidation product of hematoxylin, was a weak anionic dye. Oxidized hematoxylin (hematein) has little affinity for tissue, but becomes a strong dye with a particular affinity for nuclei when combined with a metallic mordant. In some solutions of hematoxylin, the oxidizer also serves as the mordant; these solutions, most commonly the iron hematoxylin, are not stable. To achieve stability, the mordant should not oxidize the solution. Ammonium or potassium aluminum sulfate, phosphotungstic acid and phosphomolybdic acid were in this category of nonoxidizing mordants. More selective nuclear staining can be achieved by adding either an excess of acid or an excess of aluminum. Eosin was the most widely used counterstain in the routine staining of sections. The best staining with eosin will occur at a pH of approximately 4,6 to 5. Used properly, at least three shades of pink can be obtained with eosin alone; erythrocytes, collagen, and the cytoplasm of muscle or epithelial cells should be stained with different shades or intensities of pink.

Key Words: Hematoxylin, eosin, nucleus, cytoplasm

Nükleer boya olarak en fazla kullanılan Hematoksilen, ağaç kabuğundan elde edilir. Hematoksilen kendi başına bir boya değildir, aslında oksidasyon ürünü olan hematein zayıf anyonik boyadır. Hemateinin dokuya afinitesi azdır, fakat metalik mordantlar eklendiğinde özellikle nükleuslara afinitesi artar ve kuvvetli boyar. Bazı hematoksilen solüsyonlarında oksidasyon ajanları mordant görevi yapar, bu solüsyonlar, ki bunlar çoğunlukla demirli hematoksilenlerdir, kalıcı değildir. Kalıcılığı arttırmak için mordantın, oksidasyon ajanı olarak görev yapmaması gereklidir. Amonyum veya potasyum alüminyum sülfat, fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asit non-oksidan mordantlardır. Daha seçici nükleer boyanma asit veya alüminyumun artırılması ile sağlanabilir. Eosin, kesitlerin rutin boyanmasında en fazla kullanılan zıt boyadır. Eosin ile en iyi boyanma yaklaşık pH 4-6' da meydana gelir. Bu boya ile eritrositler, kollajen, kas veya epitelyal hücre sitoplazmalarının boyanmasında pembeden farklı tonları seçilmelidir.

Anahtar sözcükler: Hematoksilen, eosin, nükleus, sitoplazma:

Giriş

Genel doku boyası olarak; nükleus ve sitoplazma ayırımında kullanılan, histolojik boyalar içinde en

geniş kullanımı olan, dokunun farklı bölgelerini farklı olarak boyayan Hematoksilen-Eosin boyasıdır.¹⁻⁴

Hematoksilen genellikle; nükleusu mavi-siyah renkte boyayarak intranükleer detayı iyi gösterir. Eosin

ise; hücre sitoplazmasını ve bağ dokusu elemanlarını çeşitli varyasyonlarda pembe, turuncu ve kırmızı renkte boyar.²

Hematoksilen

Hematoksilen, Yunanca Haimato (kan) ve Xylon (odun) kelimelerinden köken alır. Meksika’da yetişen Haematoxylon campechianum L. isimli ağacın kabuklarından kaynatılarak, ekstraksiyon yöntemi ve rekristalizasyonla elde edilen doğal bir boyadır. Görünümü kahverengi-kızıl, C.I. adı “Natural Black 1” (C.I. 75290) ve molekül ağırlığı 302,288 gr/mol’dür. Çözünürlük 1 gr/100 ml su, ve 30-40 gr/100 ml etil alkoldür.

Hematoksilene bir boyanın kaynağı olarak kullanılır, kendisi bir boya değildir. Hematoksilen boya çözeltilerinin hazırlanması esnasında, oksidasyonla hemateine dönüşür.³⁻⁵

Bu dönüşüm genellikle kimyasal ajanlarla sağlanırken (kimyasal oksidasyon), bazen de atmosferik oksijen ile (doğal oksidasyon) gerçekleşir. Kimyasal oksidasyon ajanı olarak; NaIO₃ (sodyum iyodat) ve HgO (civa oksit) en sık kullanılanlardır.² Doğal oksidasyonla hazırlanan boya çözeltilerinin raf ömrü, kimyasal oksidasyonla hazırlananlara göre daha uzundur.

Olgunlaşma (“ripening”), hematoksilenin kimyasal ya da doğal oksidasyonla hemateine dönüşüm sürecini tanımlar. Oksidasyon aşaması süreklilik gösterebilir ve aşırı oksidasyon (“over oxidation”) gerçekleşir. Bu da boya çözeltilerinde istenmeyen çökmelere neden olur. Bazı hematoksilen formülasyonlarında aşırı oksidasyonu engellemek için boya çözeltilerine gliserin ilave edilmesi önerilmektedir. Gliserin ilavesinin aynı zamanda çözeltilerde mantar üremesini geciktirdiği de bildirilmektedir.⁴

Hematein yalnız başına doku kesitlerini çok zayıf boyar. Hemateinle iyi bir boyama için; boya çözeltilerine mordant ilavesi veya boyadan sonra mordantla diferansiyasyon gereklidir. Sıklıkla kullanılan mordantlar alüminyum, demir ve tungsten tuzlarıdır. Molibden ve kurşun tuzlarının kullanımı sınırlıdır (Tablo 1). Alüminyumlu hematoksilenlerle nükleusun boyanmasında; boya çözeltilerine ilave edilen asetik asit nükleer kromatin ile reaksiyona girer ve detayların incelenmesine olanak sağlar.¹⁻⁴ İlk olarak

1865’te Boehmer tarafından bildirilen alüminyumlu hematoksilen formülasyonundan günümüze dek, çok sayıda nükleer boyamada kullanılan alüminyumlu hematoksilen formülasyonu geliştirilmiştir (Tablo 2). Alüminyumlu hematoksilenlerin tüm formülasyonları progresiv ve regresiv boyama yapar (Tablo 3).

Progresiv boyamada; boyanmanın yeterli olduğu noktaya dek doku kesiti boya çözeltisi içinde tutulur. Belirli aralıklarla boyanma şiddeti mikroskop altında kontrol edilir. Boyanma yeterli koyuluğa ulaşıldığında boyama işlemi sonlandırılır.³ Regresiv boyamada ise; doku kesiti belirlenen bir sürede boya çözeltisi içinde tutulur, aşırı boyanma (“over staining”) oluşur. Doku kesitinden boyanın fazlası diferansiyasyon ile uzaklaştırılır. İstenen koyuluğa ulaşılır, boyama işlemi sonlandırılır.

Progresiv hematoksilenlerin genellikle konsantrasyonları düşüktür, yavaş boyama yaparlar, Regresiv hematoksilenlerde ise; konsantrasyon yüksektir, buna bağlı olarak hızlı boyama gerçekleşir. Boyanın fazlasının alınması diferansiyasyonla birkaç saniyelik bir işlemdir. Regresiv boyamada; doku kesitinin 5 veya 15 dakika boya çözeltilerinde kalması çok önemli değildir, her iki şekilde de aşırı boyanma gerçekleşecek ve diferansiyasyon işlemi sonucunda her iki süreçte de boyanma aynı şiddette olacaktır.³

Regresiv boyama; progresive göre daha hızlı ve daha iyi sonuç veren bir yöntemdir. Bununla beraber, doku kesitinden ve lam yüzeyinden fazla hematoksilen diferansiyasyonla uzaklaştırıldığından temiz, berrak bir zemin görüntüsü oluşur.^{3,4}

Diferansiyasyon dilue asitle sağlanır. Hematoksilenin alkolde yüksek çözünürlüğü göz önüne alınarak, dilue asitin alkolde hazırlanması uygundur. Diferansiyasyon işlemi basit olarak suyla yıkanarak durdurulur. Diferansiyasyonda hematoksilenin tamamen kaybedilmesi durumunda boyama işleminin tekrarlanması problemi çözecektir. Alüminyumlu hematoksilenlerin formülasyonu genellikle hafif asit pH’da olduğundan, nükleus koyu kırmızıdan mora dönen bir renkte boyanır. Bu rengin mavime dönmesi ve sonradan uygulanacak kırmızı renkli zemin boyası (eosin) ile kontrast vermesi için hafif bazik bir ortamla mavileştirme (“blueing”) yapılır. Progresiv veya regresiv boyamada

Tablo 1. Hematoksilen mordantları.

Metal	Mordant	Örnek Boya	Boyama Alanı
Aluminyum*	Al-amonyum sülfat (amonyum alum) Al-potasyum sülfat (potasyum alum) Aluminyum sülfat	◆ Harris ◆ Mayer ◆ Gill ◆ Delafield ◆ Cole ◆ Carazzi ◆ Gill	◆ Nukleus
Demir *	Demir (III) klorür Feri amonyum sülfat	◆ Weigert ◆ Verhoeff ◆ Loyez ◆ Heidenhein	◆ Nukleus ◆ Elastik lif ◆ Myelin ◆ Mitokondri,kas çizgilenmeleri, nukleer kromatin, myelin
Tungsten *	Fosfotungstik asit	PTAH	Çizgili kas, nöroglial lifler, fibrin
Molibden	Fosfomolibdik asit	Fosfomolibdik asit- Hematoksilen	Kollagen, arjentaffin hücreler ve Paneth hücreleri
Kurşun	Kurşun sülfat	Kurşun-Hematoksilen	Endokrin hücre granülleri

* Sık kullanılan metaller

Tablo 2. Aluminyumlu hematoksilenler

▪ Anderson	▪ Friedländer	▪ Horneyold	▪ Masson
▪ Apathy	▪ Gadsdon	▪ Krutsay	▪ Mayer
▪ Bennett	▪ Gage	▪ Kleinenberg	▪ Mayer-HCl
▪ Böhmer	▪ Galigher	▪ Langeron	▪ Mitchell
▪ Bullard	▪ Garvey	▪ Launoy	▪ Papamiltiades
▪ Carazzi*	▪ Gill*	▪ Lillie	▪ Psey
▪ Cole*	▪ Graham	▪ Lee	▪ Rawitz
▪ Debiden	▪ Hamilton	▪ McLachlan	▪ Sass
▪ de Groot	▪ Harris*	▪ Martinotti	▪ Schmorl
▪ Delafield*	▪ Harris & Power	▪ Mallory	▪ Unna
▪ Duval	▪ Haug	▪ Mann	▪ Watson
▪ Ehrlich*	▪ Hine	▪ Masson	▪ Weigert & Wright

* Sık kullanılan hematoxylinler

Tablo 3. Aluminyumlu hematoksilenlerde boyama süreleri

Cole Hematoxylin	20-45 dakika	Harris Hematoxylin (R)	5-15 dakika
Delafield Hematoxy.	15-20 dakika	Carazzi Hematoxylin (P)	1-2 dakika
Ehrlich Hematoxylin	20-45 dakika	Carazzi Hematoxylin (R)	10 dakika
Mayer Hematoxylin (P)	5-10 dakika	Gill Hematoxylin I	2 dakika
Mayer Hematoxylin (R)	10-20 dakika	Gill Hematoxylin II	3dakika
Harris Hematoxylin (P)	4-30 saniye	Gill Hematoxylin III	1,5 dakika

mavileştirme dilue amonyaklı su, dilue lityum karbonatlı su veya bazik karakterli musluk suyu ile gerçekleştirilir. Mavileştirme aşaması bazik olmayan bir su ile durdurulur. Hematoksilen çözeltilerinde

çalışma esnasında veya çözeltilerini saklama sürecinde, gerek kimyasal gerekse fiziksel etkenlerle değişiklikler olabilir. Boyama esnasında hematoksilin çözeltilisine lamlarla su karışması ile boya konsantrasyonu düşer, boyama zayıf olur, boya çözeltilisi yenilenmelidir. Çözeltide oksidasyon yavaş ve günden güne düzensiz olarak devam eder, çökelti oluşur, boya çözeltilisi süzülmalıdır. Otomatik makinelerde bu çökmeler tıkanmalara neden olabilir.¹⁻⁴

9. <http://home.primus.com.au/royellis/haem.html> (çevrim içi)

Eosin

Rutin histolojik boyamada alüminyum hematoxylinlere zıt boya olarak, sitoplazma boyamasında kullanılır.^{5,6} Günümüzde Eosin Y şekli (Eosine Yellowish) kullanılmaktadır. Eosin S (C.I.45386) ve Eosin B (C.I.454300) kullanımı sınırlıdır. Eosin Y (Bromoeosine, D&C Red No 22, Tetrabromofluorescein) görünümü yeşil-turuncu toz şeklinde, C.I. adı "Acid Red 87", C.I. 45380, molekül ağırlığı 691.914 gr/mol ve çözünürlük: 40 gr/100 ml su, 2 gr/100 ml etil alkoldür.

Eosinle boyamada, nükleusa yaptığı kontrastla beraber parlaklık önemlidir. Normalde sarı-yeşil çözeltilisi olan eosine %1 oranında asetik asit ilavesiyle, çözelti kırmızı renge dönüşür. Bu işlem hematoksilinle mavi renge boyanan nükleusa kontrast veren parlak bir zemin oluşturur. Sitoplazmanın yanı sıra bağ dokusu elemanları da eosinle boyanırlar. Eosinin boyama süresi için internal kontrol kullanılır. Doku kesitlerinde eritrositlerin kiremit kırmızısı renkte olması önerilmektedir.⁷⁻⁹

Kaynaklar

1. AFIP Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, March 1992.
2. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. 2nd ed., September 1987,
3. Bancroft JD. Theory and practice of histological techniques. 3rd ed., London:Churchill Livingstone, 1990.
4. Carson FL. Histotechnology-Aself –Instructional text. 2nd ed., ASCP Chicago, 1997.
5. <http://members.pgoline.com/~bryand/StainsFile/index.html> (çevrim içi)
6. http://www.lumen.luc.edu/lumen/MedEd/Histo/frames/histo_frames.html (çevrim içi)
7. <http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/HISTOTCH/HISTOTCH.html> (çevrim içi)
8. <http://www.bris.ac.uk/Depts/PathAndMicro/CPL/he.html> (çevrim içi)