

# Hematoksilen-eozin ile boyalı preparatların immünohistokimyasal olarak tekrar boyanması: Histoteknik bir çalışma

## Immunohistochemical restaining of hematoxylin and eosin stained slides: a histotechnical study

Türker Çavuşoğlu,<sup>1,2</sup> Kubilay Doğan Kılıç,<sup>1</sup> Aylin Buhur,<sup>1</sup> Yasemin Adalı,<sup>1</sup>  
Gürkan Yiğittürk,<sup>1</sup> Oytun Erbaş,<sup>3</sup> Yiğit Uyanıkgil<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup>Ege Üniversitesi Kordon Kanı, Hücre-Doku Uygulama ve Araştırma Merkezi, İzmir, Türkiye

<sup>3</sup>İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmada hematoksilen-eozin boyalı bir preparatta boyanın kaldırılması ve bu preparatın farklı histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar için uygun hale getirilmesi için bir protokol oluşturulması amaçlandı.

**Gereç ve yöntemler:** Sıçan karaciğer ve böbrek preparatları kullanılarak yapılan bu teknik çalışmada hematoksilen-eozin boyasının, geliştirilen protokolle uzaklaştırılması sağlandı ve ardından anti-iNOS boyası uygulandı.

**Bulgular:** Hematoksilen-eozin ile boyalı preparatlara, geliştirilen protokol uygulandığında preparat üzerinde histolojik boyaya ait hiçbir kalıntının kalmadığı saptandı. Sıçan karaciğer ve böbrek preparatlarında, hematoksilen-eozin boyası ile boyama yapılan preparatlarda bu dokulara ait temel yapılar protokol sürecinin neden olduğu bir bozulmaya maruz kalmadan görüntülendi.

**Sonuç:** Bu çalışmada oluşturulan protokol ile boyasız hale getirilen preparatların ekonomik ve etkin bir şekilde hem histokimyasal hem de immünohistokimyasal olarak tekrar boyanması sağlanabilmiş ve histoloji laboratuvarlarının arşivlerindeki preparatların etkin şekilde yeniden değerlendirilebileceği gösterilmiştir.

**Anahtar sözcükler:** Hematoksilen-eozin boyama; histokimyasal boyama; immünohistokimyasal boyama; tekrar boyama.

### ABSTRACT

**Objectives:** This study aims to set up a protocol that makes the removal of the stain possible and that it is suitable for different histochemical and immunohistochemical stains in a hematoxylin and eosin stained slide.

**Materials and methods:** Hematoxylin and eosin staining was removed with the developed protocol, followed by anti-iNOS staining, in this technical study done by using rat liver and kidney slides.

**Results:** We detected no residual of histological stains on the hematoxylin and eosin stained slides when the developed protocol was applied. The basic structures of rat liver and kidney tissues were displayed in the slides stained with hematoxylin and eosin without any exposure to degradation caused by the protocol process.

**Conclusion:** In this study, we showed that it was possible to economically and effectively restain the unstained slides with the developed protocol, both histochemically and immunohistochemically, and to effectively re-evaluate the slides in the archives of histology laboratories.

**Keywords:** Hematoxylin and eosin staining; histochemical staining; immunohistochemical staining; restraining.

Hematoksilen, Meksika'da yetişen *Haematoxylum campechianum* L. isimli ağacın kabuklarından kaynatılarak, ekstraksiyon yöntemi ve rekristalizasyonla elde edilen doğal bir

boyadır. Hematoksilen-eozin (H-E), çekirdek ve sitoplazma ayırımında kullanılan, histopatolojik boyalar içinde en geniş kullanım alanı olan boyadır.<sup>[1-4]</sup> Hematoksilen genellikle; çekirdeği

mavi-siyah renkte boyayarak intranükleer detayı iyi gösterir. Eozin ise; hücre sitoplazmasını ve bağ dokusu elemanlarını çeşitli varyasyonlarda pembe, turuncu ve kırmızı renkte boyar.<sup>[2]</sup>

Eozin, katrandan elde edilen turuncu-pembe renkli bir boyadır. Eozin boyamada, çekirdeğe yaptığı kontrastla beraber parlaklık önemlidir. Normalde sarı-yeşil çözeltilisi olan eozine %1 oranında asetik asit ilavesiyle, çözelti pembe-kırmızı renge dönüşür. Bu işlem hematoksilenle mavi renge boyanan çekirdeğe kontrast veren parlak bir zemin oluşturur. Sitoplazmanın yanı sıra bağ dokusu elemanları da eozinle boyanır.<sup>[2]</sup>

Bu çalışmada amaç H-E ile boyanan bir preparatta boyayı kaldırmak ve bu preparatı farklı bir histokimyasal ve immunohistokimyasal işaretleyiciler ile boyanmasına olanak sağlayacak bir protokol oluşturmaktır. Ayrıca, parafin bloğu olmayan eski preparatların yeni tekniklerle değerlendirilmesine olanak sağlamaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı preparat arşivine kayıtlı preparasyonu yapılmış sıçan karaciğer ve böbrek preparatları kullanıldı. Beş mikronluk kesitlere işlem yapabilmek için öncelikle kanada balzamu adı verilen bir yapıştırıcı madde ile kapatılan preparatlar ksilol (Merck 1.08681.2500) içinde bir gece bekletildi ve lam ve lamelin birbirinden ayrılması sağlandı. Bu işlem sonrası lam üzerine yapışmış haldeki doku kesitine ulaşıldı. Hematoksilen-eozin boyasının uzaklaştırılması için aşağıdaki protokol uygulandı;

1. %100 Alkol 2 dakika
2. %95 Alkol 2 dakika
3. %80 Alkol 2 dakika
4. Distile su 5 dakika  
(preparatlar iyice süzülecek)
5. Asit alkol 3-5 defa batırıp çıkarma
6. Akarsu Daldır çıkar
7. Amonyaklı su 3-5 defa batırıp çıkarma
8. Akarsu Daldır çıkar
9. Distile su 5 dakika  
(preparatlar kurutulur)

Yukarıdaki protokol seti uygulanırken sürekli mikroskop altında gözle takip edilmesi gerek-

tedir. Bu protokol seti 15-20 kez uygulama sonrası sonuç vermektedir ve boyasız bir doku görünümü sağlandığında işlem kesilmelidir. Daha uzun süreli uygulamada doku bütünlüğü açısından kimyasal maddelerin doku üzerinde dejenerasyona yol açması söz konusudur. Daha sonra bu preparatlar anti-İNOS (Santa Cruz, SC-651; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) boyası ile boyandı.

Anti-İNOS boyama için uygulanan protokol aşağıdaki gibidir;

1. %100 Alkol 2 dakika
2. %95 Alkol 2 dakika
3. %80 Alkol 2 dakika
4. Distile su 2 dakika  
(preparatlar iyice süzülecek)
5. Tris-EDTA tampon 90 °C 30 dakika
6. Soğuk su 15 dakika  
banyosu
7. Distile su 5 dakika
8. PBS 5 dakika
9. %0.1 Triton X 5 dakika
10. %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 dakika
11. PBS 6 dakika
12. Serum bloklama (A solüsyonu) 30 dakika
13. Primer antikor +4 °C Geceboyu (1/100 dilue)
14. PBS 6 dakika
15. Sekonder antikor (B solüsyonu) 10 dakika
16. PBS 6 dakika
17. HRP streptoavidin (C solüsyonu) 30 dakika
18. PBS 6 dakika
19. DAB Kahverengi renk alana kadar
20. Distile su 3 dakika
21. Mayer's hematoksilen 1 dakika
22. Akar su Daldır çıkar
23. Distile su Daldır çıkar
24. %80 Alkol Daldır çıkar

25. %90 Alkol	Daldır çıkar
26. %95 Alkol	Daldır çıkar
27. %100 Alkol	Daldır çıkar
28. Kurutma	
29. Ksilol	15 dakika

EDTA: Etilenediamintetraasetik asit; PBS: Fostat tamponlu tuz çözeltisi; HRP: Yabanturpu peroksidaz enzimi; DAB: 3,3'-Diaminobenzidin.

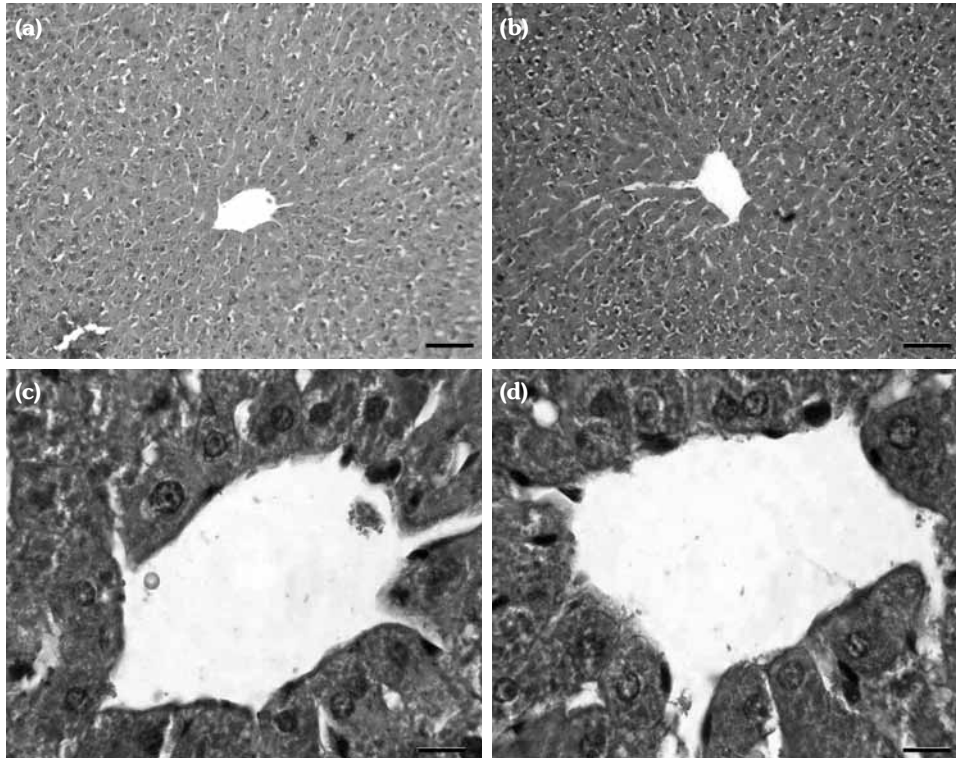
## BULGULAR

Yukarıdaki protokolün uygulanması ile H-E ile boyalı preparatlar üzerinde boya materyali ve boyanın etkisine dair hiçbir kalıntının kalmadığı saptandı (Şekil 1). Daha önce boyama yapılmamış preparatlardakine benzer şekilde boya kaldırma işlemine maruz bırakılan preparatlarda da anti-İ NOS boyasının dokuda uygun ve özgün olarak işaretleme yaptığı saptandı (Şekil 2).

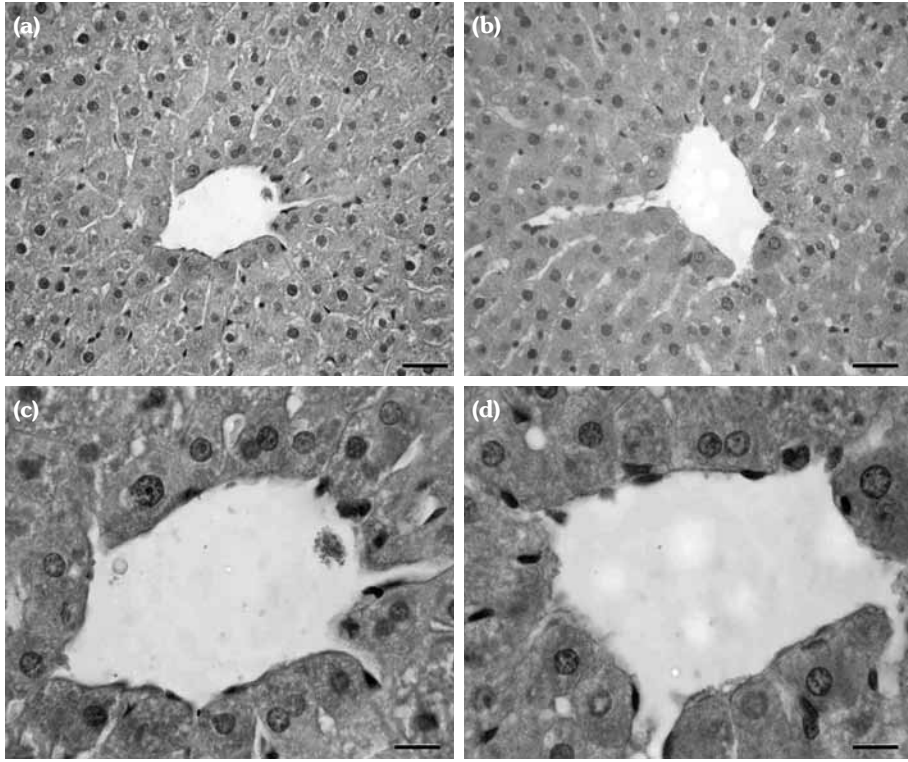
Hematoksilen-eozin ile boyanmış karaciğer preparatlarında x20 ve x100 büyütmede çekilen fotoğraflarda karaciğer dokusunun normal

histolojik yapısında görülen vena centralis, radyal yerleşimli hepatositlerden oluşan Remark kordonları saptandı. Hepatositlerin aralarında karaciğerlere ait sinüzoidal yapılar görünmektedir. Hematoksilen-eozin ile boyanmış bu preparasyonda boya kaldırılma işleminden sonra anti-İ NOS boyaması yapıldı. Hematoksilen-eozin ile boyalı haldeki aynı alanlar bire bir fotoğraflandı. Bu yapılarda da yukarıda bahsedilen histolojik görünüm birebir saptandı. Anti-İ NOS ile boyanmış kesitlerde vena centralis çevresinde hepatositler, makrofajlar ve endotel hücrelerinde özgün boyanma saptandı.

Böbrek preparatlarında, H-E boyası ile boyanması yapılan preparatlarda normal histolojik görünüm arz etmektedir. Korteks ve medulla ayırımı yapılan boyalı kesitlerde, kortekse ait kısımda glomerül, distal ve proksimal tübüllerin varlığı saptandı. Medulla'da Henle kulbu, böbreğe ait toplayıcı kanalların varlığı saptandı (Şekil 3a, b). Aynı preparatın H-E boyası kaldırılma işleminden sonra anti-İ NOS boyaması



Şekil 1. Karaciğer dokuları (H-E x 20 ve H-E x 100 büyütme).



**Şekil 2.** Anti-iNOS boyasıyla uygun ve özgün olarak işaretlenmiş karaciğer dokuları (x20 ve x100 büyütme).

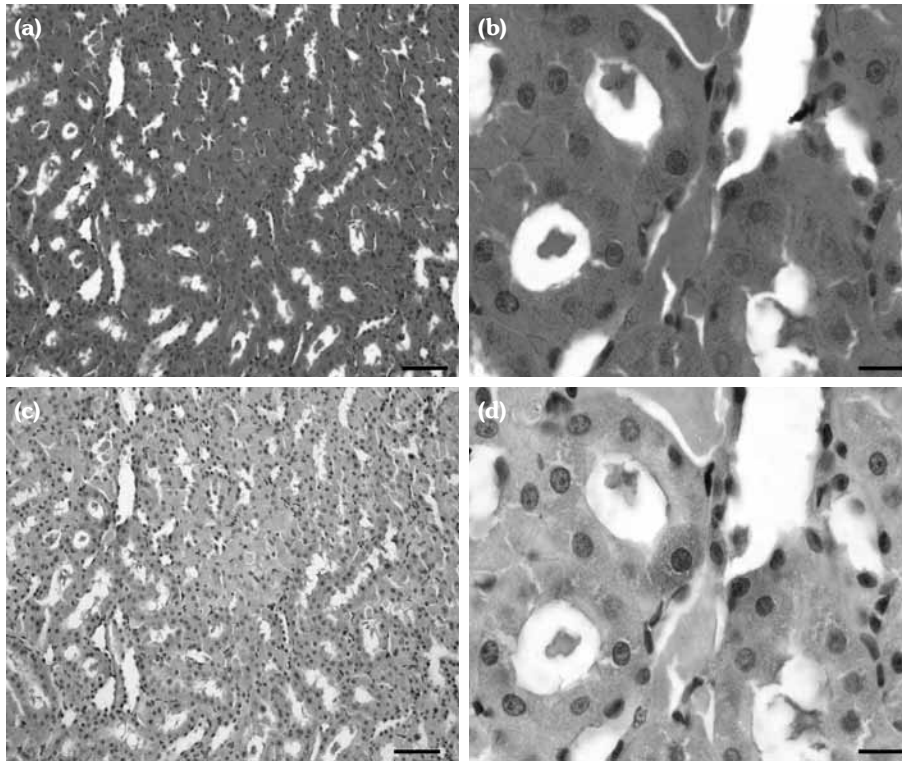
yapıldı ve aynı alan fotoğraflandı. Bu yapılar da yukarıda bahsedilen histolojik görünüm birebir saptandı. Bunun dışında anti-iNOS için özgün olan hücreler de de boyama elde edildi (Şekil 3c, d).

## TARTIŞMA

Hematoksilen'in kökenleri 17. yüzyıla kadar dayanır. Ekstrakte edildiği, Meksika ile Orta Amerika kökenli *Haematoxylum campechianum* L. ağacından adını alır. Kumaş boyama amacıyla Avrupa'ya ithal edilmesi bu bitkinin bilimsel serüvenin de başlangıcı olmuştur. 1863 yılında alman anatomist Heinrich Wilhelm Gottfried von Waldeyer-Hartz (Waldeyer) hematoksileni histokimyasal amaçlı kullandığı ilk deneyi içeren yayını yapmıştır.<sup>[5]</sup> 1865 yılında Böhmer'in bu boyanın bir mordant ile kombine edilmesini anlamasına kadar geçen sürede hematoksilen boyası temel yayınlar seviyesinde kalmıştır.<sup>[6]</sup> Mordant, boyanın dokuya tutunmasına yardımcı olan metal tuzu olarak tanımlanır. En sık kullanılanları alüminyum ve demir tuzlarıdır.

Böhmer'den bağımsız olarak; Polonyalı kimyager Heinrich Caro, floresan üzerinde çalışırken Eosin adını verdiği sarı-kırmızı boyayı sentezlemiştir.<sup>[7]</sup> Aynı alanda çalışan başka bir kimyager olan Emil Fischer 1875 yılında eosin Y (Y, sarımsı anlamında "yellowish" kelimesinin baş harfidir) üzerine ilk çalışmayı yayınlamıştır.<sup>[8]</sup> Bir yıl aradan sonra da histoloji alanında günümüze kadar halen en popüler boyası olan aynı anda H-E kullanarak yapılan ilk çalışma Wissowzky tarafından yayınlanmıştır.<sup>[9]</sup>

İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aracılığıyla üretilen NO'nun iskemik akut renal yetmezlikteki sitotoksik etkisinin gösterildiği önemli bir çalışmada iNOS ve H-E boyaları kullanılmıştır. İndirekt immünofloresan tekniklerin uygulandığı bu çalışmada; 8 µm'lik frozen kesitlere %0.1 triton x100, 20 dakika uygulanmış ve özgün olmayan bağlanma bölgeleri %0.1 bovine serum albümin (BSA) ile bloke edilmiştir. Ardından kesitler 60 dakika iNOS ve eNOS için monoklonal antikolarla (0.5 mg/mL) muamele edilmiştir. Rodamin-konjuge anti-fare immünooglobulin G'de eklenip



**Şekil 3.** (a, b) x20 ve x100 büyütmede, H-E boyanmış böbrek dokuları. (c, d) x20 ve x100 büyütmede, anti-iNOS boyasıyla uygun ve özgün olarak işaretlenmiş böbrek dokuları.

ışık mikroskopunda incelenmiştir. Morfolojik değerlendirmeler için de formalin ile fikse edilen örnekler H-E ile boyanıp akut renal yetmezlik için skora girilmiştir.<sup>[10]</sup>

Karaciğer tümörleriyle ilgili başka bir önemli çalışmada ise makroskopik inceleme yapmak üzere nekroz ve kanama olmayan tümör örnekleri histolojik değerlendirme için seçilip örnekler rutin olarak %10 formalin ile fikse edilip parafine gömülmüştür.<sup>[11]</sup> 4 µm kalınlığında kesitler deparafinize edilip ksilen ve dereceli alkol serilerinde hidrate edilmiştir. %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 30 dakika inkübe edilen örnekler iNOS boyaması öncesi hazır hale getirilmiştir. iNOS boyaması için kesitler %2 yağsız sütle 10 dk inkübe edilmiş, ikinci antikor olarak spesifik olmayan boyamayı engellemek için 30 dakika aynı türden elde edilen normal serum ile muamele edilmiştir. Ardından örnekler 1: 500 konsantrasyonda oda sıcaklığında 60 dakika primer antikor ile muamele edilmiştir. Son olarak kesitler hematoksilin ile karşı boyanmıştır. iNOS immünreaktivitesi esas

olarak hepatositlerde gözlenip sitoplazmik boyama gözlenmiştir. Tümör dokusu ve çevresindeki dokuyu beraber boyamıştır. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonu karaciğere nüfuz eden mononükleer hücreler, vasküler endotel hücrelerinde gözlenmiştir.<sup>[11]</sup>

Yapılan literatür taramasında daha önce preparasyonu yapılmış bir preparatta rutin bir boya olan H-E ile boyanmış bir dokunun boyasız hale getirilip tekrar farklı histokimyasal ve immünohistokimyasal boyalar ile tekrar boyanması ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma literatür taraması sonucunda, histolojik boya kaldırmanın etkin olarak gösterildiği ilk çalışmadır. Histoloji laboratuvarlarında arşive girmiş preparatların tekrar değerlendirilebilmesi için laboratuvarında rutin kullanılan malzemelerle preparatın boyasız bir hale getirilip histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak boyanmasını sağlayan bu teknik modifikasyon, hem görüntü kalitesi yüksekliği hem de maliyetinin düşük olması ile oldukça efektif bir

tekniktir. Arşiv preparatlarının yeni tanımlanan belirteçlerle tekrar işaretlenmesi yeni gelişmelere ışık tutacaktır.

#### **Çıkar çakışması beyanı**

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

#### **Finansman**

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

### **KAYNAKLAR**

1. AFIP Laboratory Methods in Histotechnology. Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology; 1992.
2. Sheehan DC, Hrapchak BB, editors. Theory and practice of histotechnology. 2nd ed. Columbus: Battelle Memorial Institute; 1987.
3. Bancroft JD, editors. Theory and practice of histological techniques. 3rd ed. London: Churchill Livingstone; 1990.
4. Carson FL, editors. Histotechnology-Aself-Instructional text. 2nd ed. Chicago: ASCP; 1997.
5. Pinhasi R, Mays S, editors. Advances in human palaeopathology. Chichester: John Wiley & Sons; 2008.
6. Böhmer F. Zur pathologischen Anatomie der Meningitis cerebromedularis epidemica. Aertzl Intelligenzb. (Munich) 1865;12:539-50.
7. Kay AB. The early history of the eosinophil. Clin Exp Allergy 2015;45:575-82.
8. Fischer E. Eosin als Tinctionsmittel für mikroskopische Präparate. Arch Mikrosk Anat 1875;12:349-52.
9. Wissowzky A. Ueber das Eosin als reagenz auf Hämoglobin und die Bildung von Blutgefäßen und Blutkörperchen bei Säugetier und Hühnerembryonen. Arch Mikrosk Anat 1876;13:479-496.
10. Noiri E, Peresleni T, Miller F, Goligorsky MS. In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. J Clin Invest 1996;97:2377-83.
11. Rahman MA, Dhar DK, Yamaguchi E, Maruyama S, Sato T, Hayashi H, et al. Coexpression of inducible nitric oxide synthase and COX-2 in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of COX-2 in the angiogenesis of hepatitis C virus-positive cases. Clin Cancer Res 2001;7:1325-32.