

**SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK
YÜKSEKOKULU**



**PATOLOJİ LABORATUVAR
TEKNİKLERİ PROGRAMI**

PLT104-Histoteknoloji 2

Öğretim Görevlisi Dr. Nurhan ÇON

**OTOMATİK BOYAMA,
H&E BOYAMADA
KARŞILAŞILABİLECEK
PROBLEMLER VE SORUN
GİDERME**

PLT104-Histoteknoloji 2

Hafta-7



OTOMATİK BOYAMA



- Dokunun mikroskopik preparat haline gelmesine kadar ki tüm süreçlerin elde gerçekleştirilmesi mümkün olmakla beraber, işlemleri daha hızlı gerçekleştirebilmek ve standardizasyon amaçlı otomatize yöntemler (mikrotomda kesit alma basamağı dışında) tercih edilmektedir.



- Ülkemizdeki patoloji laboratuvarlarının verimlilik değerlendirmesini konu alan bir makalede, yıllık biyopsi sayısı 20.000`den fazla olan merkezlerin, boyama ve kapama cihazı tercih etmesi gerektiğini bildirmiştir.
- Bir kaç preperatin olduğu durumlarda otomatik boyama kullanılamaz.



- Günümüzde lineer boyama makineleri ve bilgisayarlı robotik boyama makineleri kullanılabilir.
- Lineer makinelerde lam sepetleri birinden diğerine taşınmakta ve ayarlanmış gerekli sürelerde solüsyonlarda tutularak progresif boyama uygulanmaktadır.



Lineer otomatik boyama cihazı



Lineer boyama makinası için kullanılacak, lamaların her çözeltide 30 saniye kaldığı, örnek yöntem basamakları aşağıda sıralanmıştır.

Lineer boyama makinası için örnek yöntem

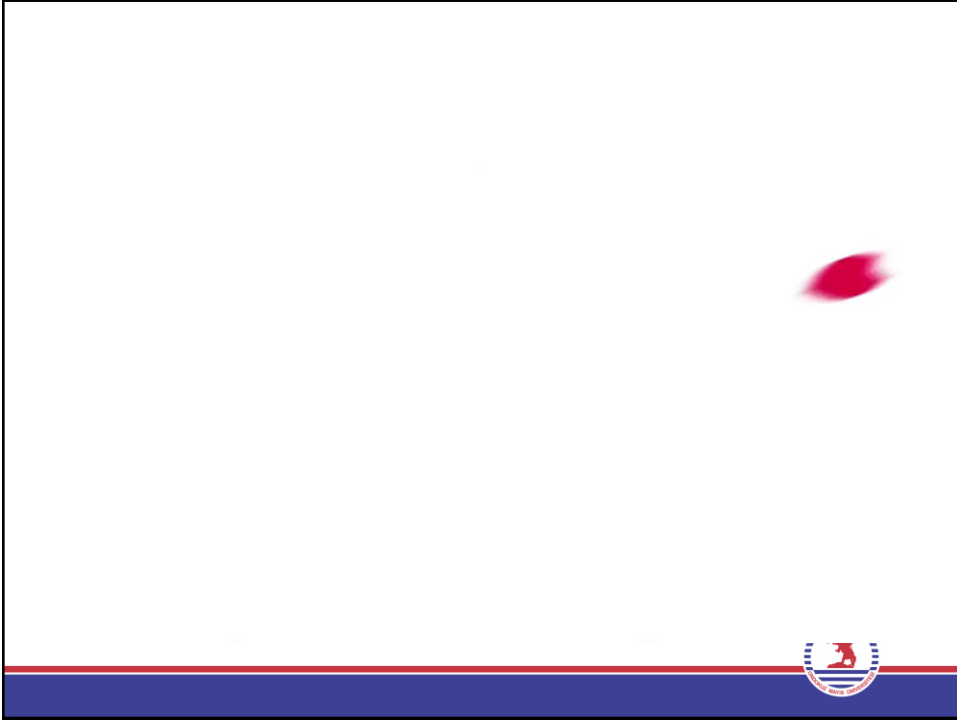
1- Ksilen	6 kap
2- Absolu alkol	2 kap
3- %95'lik alkol	1 kap
4- Musluk suyu	2 kap
5- Harris hematoksisen, asetik asitli	2 kap
6- Musluk suyu	3 kap
7- %80'lik alkol	1 kap
8- Eozin	1 kap
9- %70'lik alkol	1 kap
10- %95'lik alkol	1kap
11- Absolü alkol	3 kap
12- Ksilen	2 kap ve tutma tankı

**Kaplar mümkün olduğu kadar dolu olmalı ve kullanılmadan önce seviyeleri kontrol edilmelidir. Hematoksilen günlük olarak süzülmeli ve boyanan lam satısına göre kapların yerleri 2-3 günde değiştirilmelidir. Hematoksilen ve eozin dışındaki tüm solüsyonlar günlük değiştirilmelidir.*



- Gelişen teknolojiyle beraber, bilgisayar programları aracılığıyla çalışan robotik boyama makineleri ise esnektir. Lamlar prosedürün önceki adımlarında kullanılan kap veya çözeltiye geri döndürülebilir. Dolayısıyla hem progresif hem de retrogresif yöntemde kullanılabilirler.





HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYAMADA YAŞANABİLECEK OLASI PROBLEMLER

- Patoloji tanılarının çoğu, otomatik bir boyama makinesinde toplu boyanan H-E kesitlerle konulur. Boyanın optimizasyonu, doğru histolojik yorumlama için hayati öneme sahiptir.
- Genel olarak, otomatik boyama makineleri her adımın zamanını ayarlayarak doğru ve tutarlı boyama, farklılaşma ve dehidrasyon sağlar. Bununla birlikte, kullanılan boyama çözeltilerindeki değişkenlik, boyama zamanlarının ayarlanmasını gerektirebilir.



Genellikle problemler eozinden ziyade hematoksilen ile ilişkilidir!

- Ticari olarak üretilen hematoksilenlerdeki ortak değişkenler;
- parti sayısı,
- tedarikçi değişkenliği ve
- pH farklılıklarıdır.



- Laboratuvarda üretilen hematoksilen, aynı hazırlama talimatlarının kullanılmasına rağmen, her hazırlanışında farklı boyama özelliklerine sahip olabilir.
- Kişisel tercihler ve aynı tarifi uygulayan farklı personeller, boyanın yaşı ve kullanım derecesi de boyama özelliklerini etkileyecektir.
- Rutin boyamada istikrarı sağlayabilmek için mevcut ve önceki boyama sürelerinin etkinliği değerlendirilerek, yeni boya hazırlıklarında süreler optimize edilmelidir.



- Rutin hematoksilen-eozin boyamaya başlamadan önce, kesitlerden birinde boya kontrolü yapılması önerilmektedir. Otomatik boyama makinaları için boyama öncesi kontrol kesiti kullanılabilir.
- Özellikle otomatik makinalarda, aşamaların herhangi birinde kapların havada asılı kalarak kesitlerin kurummasına izin verilmemelidir. Aynı zamanda kesitlerin istasyonlardan birinde takılı kalarak, o solüsyonun içinde duraklamasına da engel olunmalıdır.



- Kullanılmadığı zamanlarda boya setinin tüm kapakları kapalı olmalıdır. Özellikle uçucu olmaları sebebiyle alkol derişimleri değişebilir ya da solunan ksilen iş sağlığı açısından tehlikeli olabilir.
- Hematoksilen yüzeyinde çökelti izleniyorsa mutlaka süzölmeli, temiz ve kuru bir kaba alınmalıdır.
- Amonyaklı su kullanımından sonra kesit musluk suyuyla iyice yıkanmalıdır. Çünkü eozinle optimum boyanmada pH'nın rolü çok önemlidir. Amonyak eozinin içine transfer olursa, sitoplazmik boyanma zayıflayacaktır.



- Aynı zamanda farklılaşmayı da sağlayan dehidrasyon solüsyonları hızlıca geçilmemelidir. Alkol derişimlerine dikkat edilmelidir. Çünkü seyreltik alkol serilerinde, eozinin fazlası uzaklaştırılmayacaktır.
- Tespit solüsyonlarında normalden fazla bekletilmiş olan dokular için boyama süreleri uzatılmalıdır. Örneğin otopsi örneklerinde, hematoksilen ve eozin boyama sürelerinin üçte bir kadar artırılması gerekebilir.
- Boyama süreleri aynı zamanda kullanılan tespit solüsyonu ile de ilişkilidir. Helly, Zenker veya B-5 gibi sabitleyicilerde hematoksilen süresi arttırılmalı, eozin süresi ise genellikle kısaltılmalıdır.
- Eğer ksilen muadili kullanılıyorsa, üretici tavsiyelerine tümüyle uyulmalıdır.



- Hematoksilenden önce ya da sonra kullanılan musluk suyundaki demir, sülfür ve klor zayıf çekirdek boyanması elde edilmesine sebep olabilir. Musluk suyunda fark edilebilir renk ve koku varsa, deiyonize veya distile su kullanılmalıdır. Mevsimsel olarak değişen klor içeriği de boyanma değişkenliklerinde neden olabilir. Yüksek alkali ya da sert su, mükemmel bir mavileştirici madde olarak işlev görebilir ancak koyu çekirdek veya zemin boyanması oluşturabilir.
- Boyama problemi gibi gözüken sonuçların, her zaman bir boyama sorunu olmadığı unutulmamalıdır. Özellikle bir önceki günün kesit ve boyaları optimum özelliklerdeyse, sorunun kaynağını diğer hazırlık aşamalarında(formalin özellikleri, tespit süresi, takip kusuru, deparafinizasyon sırasında kullanılan ısı, kesit kalınlıkları vb.) arayabiliriz.



SORUN GİDERME

Deparfinizasyon kusuru:

Mikroskopik olarak kesit üstünde boya almamış, beyaz noktalar görülür. Dokunun içinde su kalmış ve dehidrasyon tam gerçekleşmemiştir. Tüm deparfinizasyon için kesit yeterli süre ksilene maruz kalmamıştır.

***Çözüm için;**

* Deparfinizasyona başlamadan önce kesit tamamen kurutulur. Eğer sebep yetersiz kuruma ise kesitler suyun uzaklaştırılması için önce absolü alkole konur, daha sonra parafini uzaklaştırmak için ksilene alınır. Yetersiz kurutma ağırsa, kesit lamdan dökülebilir.

*Yeterli deparfinizasyon için kesit, ksilende yeterli süre bekletilmelidir.

*Kontamine ksilenden kaçınılmalı, gerekli ise değiştirilmelidir.

*Eğer lamlar boyanmışsa, soldurulup, tekrar boyanmalıdır.



Net olmayan nükleer

boyanma: Farklı kromatin paternlerinin izlenememesi durumudur. En önemli sebebi yetersiz tespittir. Yüksek ısı, yetersiz takip ve kesitlerin kuruması hallerinde de görülebilir.

• Çözüm için;

*Materyaller iyi tespit edilmelidir.

*Parafin infiltrasyonundan önce dokular tamamen dehidrate edilmeli ve saydamlaştırılmalıdır.

*Parafinler dışında ısı kullanılmalıdır.

*Dokular uzun süre erimiş parafin içinde bırakılmamalıdır.

*Kesitler doğru ısıda ($\leq 70^{\circ}$ C) ve mümkün olan en kısa sürede kurutulmalıdır.



Soluk nükleer boyanma:

Hematoksilende yeterince uzun süre tutulmamış kesitlerde, aşırı okside olmuş hematoksilen kullanımı yada hematoksilenin fazla farklılaşması durumlarında karşılaşılabılır. Ayrıca uzun süre dekalsifikasyon solüsyonlarına maruz kalmış dokularda da soluk nükleer boyanma görülebilir.

• **Çözüm için;**

- *Kesitler hematoksilende yeterli süre tutulmalıdır.
- *Aşırı okside olmuş olmuş hematoksilenler kullanılmamalıdır, taze çözeltilerle değiştirilmelidir.
- *Doğru nükleer detay için, farklılaşma aşamasına dikkat edilmelidir.
- *Sorunun kaynağı tanımlandıktan sonra kesit tekrar boyanmalıdır.
- *Kesit Zenker solüsyonu gibi fazla asidik bir tespit solüsyonunda sabitlenmiş, tespit solüsyonunda uzun süre beklemiş yada dekalsifikasyona maruz kalmışsa, boyanın çekirdek boyama özelliği zayıflayabilir. Bu durumda hematoksilen boyama süresi uzatılabilir ya da yukarıda bahsedildiği gibi farklı hematoksilen türleri ve boyama prosedürleri kullanılabilir.



• **Koyu çekirdek boyanması:**

- Kesit çok kalın, hematoksilende fazla uzun kalmış ya da farklılaşma basamağı çok kısa tutulmuş olabilir.

• **Çözüm için;**

- *İnce kesit alınmalıdır.
- *Kesit çok kalın değilse soldurulup, boyama ve/veya farklılaşma için uygun zaman ayarlamaları yaparak tekrar boyanmalıdır.
- *Kesitlerin hematoksilen içinde kaldığı süre kısaltılmalıdır.
- *Farklılaşma zamanı kısaltılabilir.



**Kırmızı veya kırmızı-
kahverengi
çekirdekler;**

Hematoksilen bozulmuş olabilir ya da mavileştirme basamağı uygun yapılmamıştır.

• **Çözüm için;**

- *Kesitin uygun şekilde mavileşmesi sağlanmalıdır.
- *Hematoksilenin oksidasyon durumu kontrol edilmelidir. İyi hematoksilen koyu mor-kırmızı renklidir ve şarap gibi kokar. Musluk suyu dolu bir kaba, bir kaç damla hematoksilen solüsyonu damlatıldığında, mavimsi-siyah renk oluşmalıdır. Aşırı ya da az okside olmuş çözeltilerde ise su, kırmızı-kahverengi olur.



**Soluk sitoplazmik
boyanma;**

Eozin pH'nın 5'in üzerine çıktığı durumlarda bu sorun ile karşılaşabiliriz. Mavileştirici etkenin eozine bulaşması ile pH'da yükselme görülebilir. Kesitler çok ince ya da dehidratasyon solüsyonunda çok uzun kalmış olabilir.

• **Çözüm için;**

- *Eozinin pH'sı kontrol edilmeli, gerekirse asetik asit ile ayarlanmalıdır.
- *Lamların eozine transferinden önce, mavileştirici materyal tümüyle uzaklaştırılmalıdır.
- *Eozinden sonraki alkol konsantrasyonları düşük olmalıdır. Daha sulu alkol çözeltilerinde daha fazla alkol uzaklaştırılır.
- *Kesitler çok ince olmamalıdır.



Koyu sitoplazmik boyanma:

Özellikle eozin-floksin kullanımında sitoplazma koyu boyanır ve farklılaşma azdır.

• **Çözüm için;**

*Floksin ilavelerinde fazla konsantre eozin çözeltilerinden kaçınılmalıdır. Gerekirse seyreltilmelidir.

*Kesitler eozinde çok uzun tutulmamalıdır.

*Uygun eozin farklılaşması için kesitler, %70'lik alkol başta olmak üzere, dehidrasyon solüsyonlarında yeterli süre bekletilmelidir.

*Kesitlerin kalınlığı kontrol edilmelidir.



Uygun şekilde farklılaşmayan eozin:

Eozinin uygun farklılaşma gösterdiği kesitlerde boyanın 3 ayrı rengi seçilmelidir. Eritrositler ve eozonofil granülleri en yoğun boyanırken kollajen, kas ve epitelyal hücre sitoplazmaları farklı boyanma yoğunlukları göstermelidir.

• **Çözüm için;**

*Doku hızlıca ve uygun koşullarda tespit edilmelidir.

*Uygun dehidrasyon ve şeffaflaştırma uygulanmalıdır.

*Eozin uygun farklılaşması için, %70'lik alkolde yeterli süre beklemesine özen gösterilmelidir.

*Eozinin pH'sı uygun olmalıdır.



Kesit yüzeyinde mavi-siyah çökeltiler:

Çoğu hematoksilende metalik çökeltiler oluşabilir.

• **Çözüm için;**

*Günlük kullanımdan önce boyanın süzülmesi sorunu çözecektir.



Suyun ve lamların bulanıklaşması:

Deparafinizasyon aşamasında kesit alkol sonrası suya transfer edildiğinde bulanıklaşma görülmesi kesitte ksilen varlığını işaret eder.

• **Çözüm için;**

*alkoller değiştirilmelidir.



**Şeffaflaştırma amaçlı
kapatma öncesi son
ksilende bulanıklaşma
görülmesi**

dehidrasyonun tam olmadığını, kesitte hala su var olduğunu gösterir.

• **Çözüm için;**

*alkol ve ksilen çözeltileri değiştirilmelidir.



Tutarsız H-E boyanması:

Lam üzerinde küçük ve büyük yamalar halinde yaygın olarak, çekirdeklerde kromatin detayının da kötü olduğu tekrarlayan H-E boyanma alanları gözlenebilir.

*İnfiltrasyon parafinine su veya tespit solüsyonu bulaşmasında,
*kapalı doku takip cihazlarında reaktiflerin kontaminasyonu,
*açık takip cihazlarında dehidrasyon alkollerinin dilüsyonu,
*kapağı açık bırakılan kaplarda, solüsyonların seviyelerinin azalması, tüm lamı kapatabilecek yeterli seviyede olmamalarıdır.

• **Çözüm için;**

*yüksek nemli alanlarda açık işlemciler kullanılıyorsa, ksilen yerine suya daha fazla toleranslı toluen kullanılabilir.

*Doku takibi cihazı olası arızalar açısından kontrol edilmelidir.



**Çekirdek ve sitoplazma
arasında zayıf kontrast:**

Çekirdek yada sitoplazmadan birinin zayıf boyaması söz konusudur.

Çekirdek çok soluk boyanmış, sitoplazma çok boyanmış ve çekirdeği maskeliyor olabilir veya sitoplazmik boya için çekirdek çok koyu olabilir.

• **Çözüm için;**

*Çekirdek yada sitoplazmadan hangisinin boyanmasında sorun olduğu tespit edilmeli ve süreleri yeniden ayarlanmalıdır.

*Boya solüsyonlarının pH'ları kontrol edilmelidir.

*Kontaminasyon sonucu bozulan su kalitesi, boyama kalitesini de bozabileceğinden, suyun günlük pH ölçümleri yapılmamıştır.

*Koyu/soluk çekirdek yada koyu/soluk sitoplazma için yukarıda önerilen çözüm yolları uygulanabilir.

