

# Farklı Epon Solventlerinin Yarı İnce Kesitlerde Boyanma Üzerine Etkisi

Ayşe AKBAŞ, Senem Esin YAVAŞ, Semiha ERSOY, Çiğdem USTA

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

## ÖZET

Yarı ince kesitlerin kullanımı histolojik ve klinik tanı çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Fakat bu amaçla kullanılan plastik gömme ortamları hidrofobik oldukları için boyaların dokulara girişini sınırlandırmaktadırlar. Bu çalışmada; yarı ince epon kesitlerin boyanmasında daha çok detay sağlamak üzere bilinen epon solventleri ile asetonun karşılaştırılması ve daha önce denenmemiş toluidine blue-eozin ikili boyamasının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada sıçan beyin, ince bağırsak ve pankreas doku örneklerine ait epon bloklardan ultramikrotom ile 1µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Boyama öncesi epon kesitlere boyaların penetrasyonunu kolaylaştırmak amacı ile sodyum hidroksit, periyodik asit ve aseton ile üç ayrı etching uygulandı. Bir grup kesitte epon uzaklaştırılmadı. Toluidine blue ve toluidine blue-eozin ikili boyaması uygulanan kesitler ışık mikroskopunda değerlendirildi. Aseton ile etching sonrası üç dokuya ait toluidine blue boyama sonuçları, alkali ve asit etchingi sonrası boyamalara ve etching uygulanmadan yapılan boyamalara göre çok daha başarılı olarak değerlendirildi. Özellikle pankreasta daha berrak görüntüler sayesinde daha iyi detay sağladığı görüldü. Toluidine blue-eozin boyaması ile beyin ve pankreas dokularında olumlu sonuçlar elde edildi. Eponun uzaklaştırılması amacıyla ilk kez denenen aseton ile başarılı sonuçlar elde edildiği için diğer solventlere alternatif olarak asetonun rutinde kullanılabilmesi düşünüldü. Yine ilk kez denenen toluidine blue-eozin ikili boyamasından epon kesitlerin değerlendirilmesinde yararlanılabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Epon. Solventler. Aseton.

## The Effect of Different Epon Solvents on Staining of Semithin Sections

### ABSTRACT

The use of semithin sections is important in histological and clinical diagnostic studies. However, since the plastic embedding media used for this purpose are hydrophobic, they limit the penetration of dyes into the tissues. In this study, it was aimed to compare the known epon solvents and acetone to provide more detail in the staining of semithin epon sections and to evaluate the toluidine blue-eosin double staining to be tried for the first time. For this purpose, 1µm thick semithin sections were taken from epon blocks of rat brain, small intestine and pancreatic tissue samples with an ultramicrotome. Before staining, three different etchings were applied to the epon sections with sodium hydroxide, periodic acid and acetone in order to facilitate the penetration of the dyes. Epon was not removed in one set of sections. Sections with staining of toluidine blue and toluidine blue-eosin were evaluated under the light microscope. The toluidine blue staining results of three tissues after etching with acetone were evaluated as much more successful than the stainings after alkali and acid etching and staining without etching. It was observed that it provided clearer images, especially in the pancreas. Positive results were obtained in brain and pancreatic tissues with toluidine blue-eosin staining. Since successful results were obtained, it was concluded that acetone can be used routinely as an alternative to other solvents in the removal of epon, and toluidine blue-eosin double staining can be used in the evaluation of epon sections.

**Keywords:** Epon. Solvents. Acetone.

**Geliş Tarihi:** 01.Mart.2023  
**Kabul Tarihi:** 29.Mayıs.2023

Dr. Semiha ERSOY  
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,  
Bursa.  
Tel: 0 224 295 40 63  
E-posta: [semihaersoy@uludag.edu.tr](mailto:semihaersoy@uludag.edu.tr)

### Yazarların ORCID Bilgileri:

Ayşe AKBAŞ: 0000-0002-0091-9012  
Senem Esin YAVAŞ: 0000-0002-6949-1210  
Semiha ERSOY: 0000-0002-6419-0304  
Çiğdem USTA: 0000-0002-3923-2875

Yarı ince kesitlerin kullanımı histolojik ve klinik tanı çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Yarı ince kesitler, parafin kesitlerin ışık mikroskopik görüntüleri ile transmisyon elektron mikroskopik (TEM) ince kesitlerin görüntüleri arasında bir köprü görevi görür. Yarı ince kesitler (0.5-1µm) parafin kesitlerden (5µm) daha ince; ince kesitlerden (60-80 nm) ise daha kalındır. Reçineye gömülen dokulardaki hücresel bileşenlerin parafine gömülenlere nazaran daha iyi korunması ve dokularda daha az büzülme olması yarı ince kesitlerin en büyük avantajıdır. Numune boyutunun küçüklüğü, kesit eldesinin oldukça zor olması ise parafin kesitlere kıyasla dezavantajlarıdır. Yarı ince kesitler boyandıktan sonra standart bir ışık

mikroskobu altında incelenir. Hücresel detaylar yarı ince kesitte açıkça görülebildiğinden, blok tam olarak istenilen alanı görmek amacıyla trimlenerek elektron mikroskobu ile incelenmek üzere ince kesit düzeyine ilerletilir. Bu iki evreli işlem, korelatif çalışmalara izin vermesi açısından oldukça önemlidir. Yarı ince kesit kalınlığı, öncelikle uygulanacak boyama da dahil olmak üzere çalışmanın amacına ve gömme ortamının türüne göre belirlenir. Genel olarak 0.2µm'den daha ince kesitlerin alınması oldukça zordur. Bu incelekte bir kesitte boya ile reaksiyona girecek kısım da az olduğundan boyanma yeterli olmaz ve zayıf boyanır. 0.5-1.0µm'lik kesit kalınlığı aralığı çoğu amaç için uygundur<sup>1</sup>.

TEM çalışmalarında; 1- epoksi reçineler (rezin), 2- polyester reçineler ve 3- akrilik reçineler olmak üzere başlıca üç grup gömme materyali kullanılmaktadır. Rutin elektron mikroskopide sahip oldukları avantajlar nedeniyle en yaygın olarak epoksi reçineler tercih edilmektedir. Araldit ve epon, en çok kullanılan epoksi reçinelerdir. TEM'de kullanılan plastik gömme ortamlarının en büyük dezavantajı; hidrofobik yapılarından dolayı hidrofilik boyama ajanlarının dokuya penetre olmasını sınırlayarak, boyama kalitesini düşürmeleri ve boyanın dokulara ulaşmasını engellemeleridir. Bu karakterde olan epon da, yarı ince kesitlerde ışık mikroskobik değerlendirme amaçlı boya ajanlarının dokulara geçişini sınırlandırmaktadır<sup>1-3</sup>. Plastik gömme ortamlarının yarattığı boyanma problemlerinin çözüm önerilerinden birisi; boyama işleminden önce dokulardaki boyamayı zorlaştıran gömme ortamını uzaklaştırmaktır. Kesitlerden gömme ortamının uygun çözücü ile uzaklaştırılması işlemine "etching" denir. Reçinenin uzaklaştırıldığı kesitlerin daha parlak boyandığı ve hücresel ayrıntıların daha iyi ortaya çıktığı bilinmektedir. Polimerize epoksi reçineler standart organik çözücüler içinde çözülemediğinden, epoksi reçineleri çözebilen özel çözücülere ihtiyaç vardır. Bu amaçla genellikle sodyum metoksit, benzen ve metil alkol karışımı kullanılır. Bu tür çözücülerin saptanabilir sitolojik bozulmaya neden olmaksızın reçineyi etkili bir şekilde çıkardığı kanıtlanmıştır. Ayrıca asit veya alkali hidrolizi, halojen veya perasidler ile oksidasyon gibi çeşitli yöntemler önerilmektedir. Genellikle alkalik solüsyonlar olarak mutlak etanol içinde doymuş potasyum hidroksit veya sodyum hidroksit solüsyonu, epoksi kesitlerde reçineyi uzaklaştırmada kullanılan güvenilir çözücülerdir. Sodyum metilat da birçok reçineyi ortamdan uzaklaştırmak için kullanılan bir başka güvenilir çözücüdür ve metil alkol içinde çözdürülerek hazırlanır. Epoksi reçineleri kesitlerden uzaklaştırmak için iyot veya brom da kullanılabilir. Ancak etching işlemlerinin aşındırıcı etkisinden dolayı reçine ile doku arasındaki bağları kopartabileceği ve boyanma kalitesini olumsuz yönde etkileyebileceği de unutulmamalıdır.

Asit karakterdeki boyalar, plastik kesitlerin boyanmasında iyi sonuç vermemektedir. Bu nedenle bazik karakterdeki toluidine blue, metilen blue, bazik fuksin, azur B, kristal viyole, safranin O ve thionin hidrofobik plastik kesitlerin boyanmasında etching uygulanmadan kullanılan ve boyanma sağlayabilen en yaygın boyalardır. Asit ve alkali epon uzaklaştırıcılar rutin toluidine blue boyamasından ziyade, epon kesitlerin anyonik boyalar ile boyanmasında veya çoklu boyamalar uygulanmak istendiği durumlarda önerilmektedir<sup>1-4</sup>.

Bu çalışmada; rutin TEM takibi ile elde edilecek epon kesitlerin boyanması; bir grup kesitte epon uzaklaştırılmadan, diğer kesit gruplarında da etching amaçlı üç farklı ajan sonrası denenecektir. Sodyum hidroksit (alkali) ve periyodik asit, klasik kitaplarda önerilen etching ajanlarıdır. Asetonun epon ve benzeri rezinleri çözücü etkisi bilinmekle birlikte, literatürde yarı ince epon kesitlerde boyama öncesi etching amaçlı kullanıldığına ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Aseton, TEM laboratuvarlarında takip süreci sonrası epon bulaşıklarının temizliği amacıyla kullanılmaktadır. Yine, bazı yarı ince epon kesit boyamalarının son aşamasında şeffaflandırma amacı ile önerilmektedir. Çalışmamızda boyama öncesi kesitlerdeki eponu uzaklaştırabileceği düşüncesinden yola çıkılarak, üçüncü etching ajanı olarak aseton seçilmiştir. Sonuçların başarılı olması durumunda; ayrımı sağlanan hücre ve doku bileşenlerinin lokalizasyon ve kuantifikasyonunun ışık mikroskobik düzeyde kolaylıkla yapılabilmesi, bu sayede ultrastrüktürel korelasyon için çalışmanın ince kesit düzeyine ilerletilmesi amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Bu çalışma; Bursa Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden eğitim amaçlı kullanım için temin edilen Wistar albino türü erişkin erkek ve dişi sıçan dokuları kullanılarak, Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Transmisyon Elektron Mikroskopisi Laboratuvarında gerçekleştirildi. Eter anestezisi uygulan sıçanlardan beyin, ince bağırsak ve pankreas doku örnekleri 1x1x1 mm boyutlarında alındı.

### TEM Doku Takibi, Bloklama ve Kesit Alımı

Alınan doku örnekleri 0.13M Sörensen'in fosfat tamponu (pH 7.2) ile hazırlanmış %5 glutraldehit ile 1 gece +4°C'de fikse edildi. Süre sonunda fosfat tamponu ile yıkanan örnekler daha sonra 1 saat %1 osmiyum tetroksit ile postfiksasyon işlemi uygulandı. Sonrasında tampon solüsyonu ile yıkanan dokular elektron mikroskobik incelemeler için takibe alındı. Öncelikle dehidrasyon için 10'ar dakika %50, %70, %90, %96'lık alkollerde ve iki kez 15'er dakika absölu alkolde tutuldu. Daha sonra dokular 2 kez 30'ar dakika propilen oksit solüsyonunda bekletildi.

## Yeni Bir Solvent Olarak Aseton

Bir sonraki gömme ortamına hazırlık aşaması için dokular 1:1 oranında karıştırılmış Propilen oksit:Epon karışımında 5-6 saat bekletildi. Bu işlemin ardından saf epona alınan dokular, gece boyu bekletildikten sonra Epon 812 ile bloklandı. Polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi için bloklar 60°C'lik etüvde 48 saat bekletildi. Süre sonunda elde edilen epon bloklar Ultratrim (Reichert) cihazı ile trimlenerek, yarı ince kesit alınımına hazır hale getirildi. Trimlenen dokulardan ultramikrotom (Reichert Supernova) ile cam bıçaklar kullanılarak 1µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Tüm kesitler dökülme riskini en aza indirmek için jelatin kaplı lamlara toplandı.

Yarı ince epon kesitler 4 gruba ayrıldı:

- 1. Grup:** Etching uygulanmadan boyanan (konvansiyonel) grup
- 2. Grup:** Alkali karakterde satüre sodyum hidroksit solüsyonu (Solvent-I) ile etching uygulandıktan sonra boyanan grup
- 3. Grup:** Asit karakterde periyodik asit solüsyonu (Solvent-II) ile etching uygulandıktan sonra boyanan grup
- 4. Grup:** Aseton (Solvent-III) ile etching uygulandıktan sonra boyanan grup

Kesitlerin dökülmesini en aza indirmek için etching işlemi öncesinde lamalar 60°C'de hotplate üzerinde 1 dk. ısıtılıp kesitlerin lama tutunması sağlandıktan sonra kesitler yeniden oda ısısına getirildi. Tüm gruplara ait kesitler toluidine blue (bazik boya) ile, eozin (asit boya) ile ve toluidine blue-eozin ikili kombinasyonu ile boyandı. Etching ve boyama işlemlerinde orijinal metotlarda önerilen süre, sıcaklık gibi bazı kriterlerde yaşanan sorunlar, minör değişiklikler yapılarak optimize edildi.

### Etching İşlemleri

#### Solvent-I: Sodyum Hidroksit ile Etching<sup>1</sup>

1- Solvent-I (absolü alkolde satüre sodyum hidroksit solüsyonu)'de oda sıcaklığında 2-10 dk. muamele ve filtre kağıdına emdirme

2- %70 alkolde 3 dk. ve filtre kağıdına emdirme

3- Akarsuda 3 dk. yıkama, kurutma

4- Boyama.

#### Solvent-II: %2.5 Periyodik Asit ile Etching<sup>1</sup>

1- Solvent-II'de 80°C'de 2 dk. muamele ve filtre kağıdına emdirme

2- Akarsuda 2dk. yıkama, kurutma

3- Boyama.

#### Solvent-III: Aseton ile Etching

1- Asetonda 60°C'de 5dk. muamele, kurutma

2- Distile suda 2dk. yıkama, kurutma

3- Boyama.

### Boyama Yöntemleri

#### Toluidine blue Boyaması<sup>2</sup>:

1- Toluidine blue (borakslı) solüsyonunda 80°C'de 1dk. boyama, akarsuda 1dk. yıkama

2- %50 alkolden geçirme, kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma

#### Eozin Boyaması:

1- Alkolik eozin Y solüsyonunda oda sıcaklığında 2dk. boyama, akarsuda yıkama (2dk.)

2- Absolü alkolden geçirme, kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma.

#### Toluidine blue-Eozin İkili Boyaması:

1- Toluidine blue (borakslı) solüsyonunda 80°C'de 1dk. boyama, distile suda 1dk. yıkama

2- Alkolik eozin Y solüsyonunda oda sıcaklığında 1dk. boyama, akarsuda yıkama

3- %50 alkolden geçirme, kurutma, ksilende şeffaflandırma, DPX ve lamel ile kapatma.

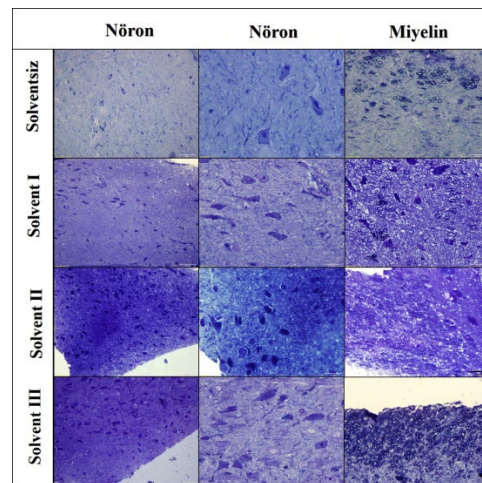
Boyanan kesitler ışık mikroskobu (Zeiss-Primostar) ile değerlendirildi ve fotomikroskop (Olympus BX50) kullanılarak fotoğraflandı.

## Bulgular

### Toluidine blue boyama sonuçları

#### Beyin kesitlerinde:

Gri cevher alanlarında genel morfoloji ve özellikle nöronal detaylar yönünden etching uygulanmayan 1. Grup, alkali etchingi uygulanan 2. Grup ile aseton etchingi uygulanan 4. Grup birbirine eşdeğer ve başarılı olarak değerlendirildi. Asit etchingi uygulanan 3. Grubun kesitlerinde detaylar yeterince izlenemedi. Aksonlardaki miyelin boyanma kalitesi açısından da yine; 1. ve 4. Grupların kesitlerinde diğer iki gruba göre daha iyi kontrast izlendiği için, demiyelinizasyon ve remiyelinizasyon çalışmalarında stereolojik değerlendirmelerde aseton etching uygulamasından yararlanılabileceği düşünüldü. Alkali ve asit etchingi uygulanan 2. ve 3. Grupların kesitlerinde dokularda invazyona bağlı güve yeniği görünümünde vakuolizasyonlar izlendi (Şekil 1).

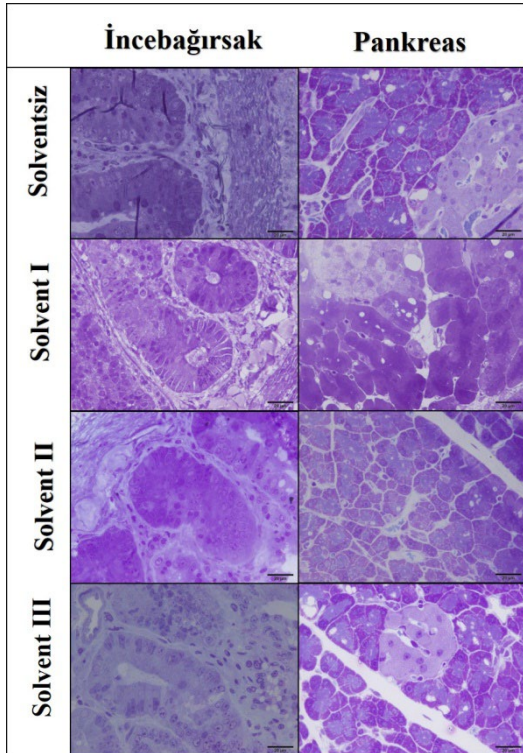


Şekil 1.

Beyin yarı ince epon kesitlerinde toluidine blue boyaması.

İnce bağırsak kesitlerinde:

Etching uygulanmayan 1. Grup, alkali etchingi uygulanan 2. Grup ve aseton etchingi uygulanan 4. Grup kesitlerinde; genel morfoloji, sitoplazma/nukleus ayrımları, Paneth ve goblet hücrelerinin identifikasyonu kolaylıkla yapılabilir. Asit etchingi uygulanan 3. Grupta yetersiz kontrast, litik dejenerasyon ve bulanıklaşma şeklindeki görüntüler nedeniyle hücrel ve nuklear detaylar net olarak seçilemedi. Goblet hücreleri ayırt edilebilmekle birlikte Paneth hücreleri net olarak seçilemedi (Şekil 2).

**Şekil 2.**

*İnce bağırsak ve pankreas yarı ince epon kesitlerinde toluidine blue boyaması.*

Pankreas kesitlerinde:

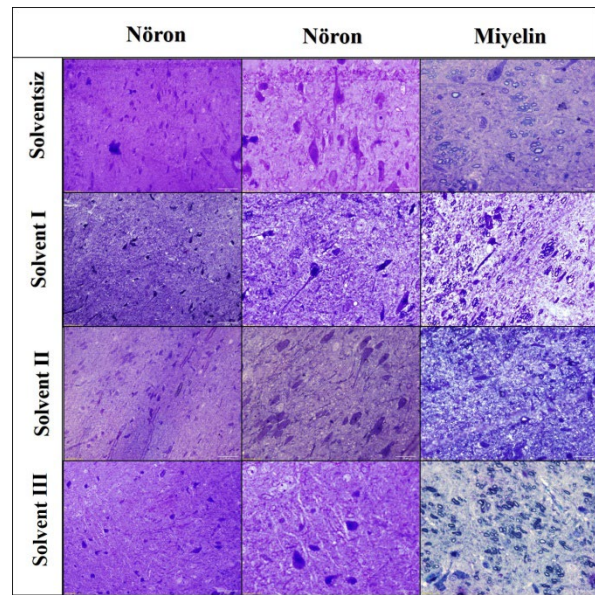
Genel morfoloji, boyanma kontrastı, sitoplazma/nukleus ayrımları, ekzokrin pankreastaki seröz asinar hücrelerin bazal bazofilisi ile apikal zimojenik granüllerinin ayrımı, endokrin bölümler ile ekzokrin komponentlerin ayrımı; etching uygulanmayan 1. Grup ile aseton etchingi uygulanan 4. Grupta oldukça başarılı bulundu. Alkali ve asit etchingi uygulanan 2. ve 3. Grupların kesitlerinde litik dejenerasyon, hücrelerde şişme ve bulanıklaşma şeklindeki görüntüler nedeniyle bu iki grup değerlendirilen kriterler açısından yetersiz bulundu (Şekil 2).

*Toluidine blue-Eozin boyama sonuçları*

Beyin kesitlerinde:

Asidofilik ve bazofilik doku bileşenlerinin oluşturduğu kontrast sayesinde, sadece toluidine blue

ile boyanan kesitlere göre daha ileri identifikasyon sağlandı. Gri cevher alanlarında genel morfoloji ve özellikle nöronal detaylar yönünden yapılan değerlendirmede etching uygulanmayan 1. Grup, asit etchingi uygulanan 3. Grup ve aseton etchingi uygulanan 4. Grup kesitleri olumlu, alkali etchingi uygulanan 2. Grup olumsuz olarak değerlendirildi. Aksonlardaki miyelin boyanma kalitesi yönünden değerlendirilen kesitlerde etching uygulanmayan 1. Grup ile aseton etchingi uygulanan 4. Grup kesitleri olumlu bulundu. Alkali ve asit etchingi uygulanan 2. ve 3. Grupların kesitlerinin görünümü ve miyelinli akson identifikasyonu olumsuz bulundu (Şekil 3).

**Şekil 3.**

*Beyin yarı ince epon kesitlerinde toluidine blue-eozin ikili boyaması.*

Beyin dokusu kesitlerinde etching işlemi sonrasında ikili kombinasyon boyamasında en iyi sonucun aseton ile alındığı konusunda karar verilerek, ince bağırsak ve pankreas kesitlerine toluidine blue-eozin boyaması öncesinde sadece aseton etchingi uygulandı ve sonuçları değerlendirildi.

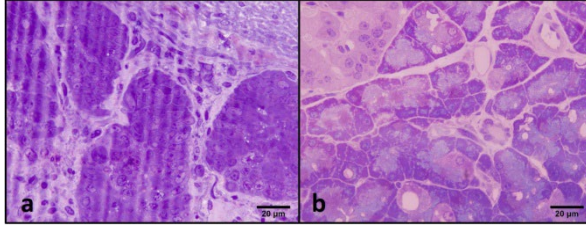
İnce bağırsak kesitlerinde:

Beklenen renk kontrastı izlenmemekle birlikte, mavi-viyole tonlarında sitoplazmik boyanmalar ile mor-lacivert nukleuslar ve detayları gözlemlendi (Şekil 4a).

Pankreas kesitlerinde:

Soluk pembe boyanan alanlar şeklinde pankreastaki endokrin bölümler kolaylıkla belirlendi. Ekzokrin asinar hücrelerde bazofilik bazal sitoplazmik alan, burada lokalize lacivert nukleuslar ve mavimsi-pembe refle veren zimojenik granüllerin yerleştiği apikal sitoplazma birbirinden çok net olarak ayırt edildi (Şekil 4b).

## Yeni Bir Solvent Olarak Aseton



**Şekil 4.**

*İnce bağırsak (a) ve pankreas dokusunun (b) yarı ince epon kesitlerinde aseton etchingi sonrası toluidine blue-eozin ikili boyaması.*

### Eozin boyama sonuçları

Eozin ile boyanan tüm gruplarda histolojik detaylar ayırt edilemediği için fotoğraflar kullanılmadı.

## Tartışma ve Sonuç

1960'lı yıllarda başlayan plastik kesitlerin boyanması alanında; klasik olarak kullanılmakta olan bazik boyaların tek olarak daha pratik kullanılabilmelerine yönelik pH, ısı, mikrodalga ışınımı gibi etkenlerin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Mevcut metotların veya yeni geliştirilecek metotların daha hızlı, kolay, pratik ve güvenilir özellikte olması, en üstün histolojik detayların elde edilmesine olanak vermesinin hedeflendiği bu alandaki araştırmalara günümüzde halen devam edilmektedir. Plastik kesitlerde monokromatik boyama alanında; toluidine blue ilk olarak bir grup araştırmacı tarafından osmiyum tetroksit fiksasyonu sonrası yarı ince epon kesitlerin boyanmasında denenmiştir<sup>5</sup>. Toluidine blue'nun yüksek alkali solüsyonu ile yaptıkları boyama ve aldıkları olumlu sonuçlar, protokolün ve boyanın günümüzde de tüm laboratuvarlarda bu alanda yaygın olarak kullanılmasının miladı olmuştur. Bu boya plastiğe gömülü tüm dokularda genel olarak mavi tonlarında boyanma sağlarken, bazı hücrelerde ve doku komponentlerinde kırmızımsı-mor renkte metakromatik boyanmaya neden olur.

Değişik boya ve kombinasyonlarının epon kesitlerde kolaylıkla uygulanmasına imkan vermek üzere alkali hidrolizi, halojenizasyon, asit-aracılı oksidasyon ile etching ve deosmikasyon mekanizmaları gibi çeşitli ajanlar ve protokollerin önerildiği ve pek çok araştırmanın yapıldığı görülmüştür. Yarı ince epon kesitlerde farklı boyamaların çalışıldığı bir araştırmada; Azan boyaması için öncesinde potasyum dikromat muamelesinin gerekliliği, H&E boyaması için deosmikasyon gerekliliği, PAS-methenamin silver boyaması için herhangi bir modifikasyona gerek olmadığı bildirilmiştir<sup>6</sup>. Bir başka çalışmada, yarı ince epon kesitler tek aşamalı Mallory-Heidenhain boyası ile boyanmıştır. Osmiyumun uzaklaştırılması için kısa bir hidrojen peroksit muamelesi, celestine blue ile nuklear boyama ve son olarak modifiye Cason

solüsyonu (sodyum bikarbonat) uygulanan kesitlerde; birçok yapının farklı renklerde boyandığı bildirilmiştir<sup>7</sup>. Bir diğer boyama çalışmasında; gluteraldehit-paraformaldehit ile fikse ve osmiyum tetroksit ile postfikse dokuların üç farklı epon tipine gömülmesi ile elde edilen yarı ince kesitlere boyama öncesi oksidasyon ve ağartma işlemi uygulanmıştır. Sonrasında karbol metilen blue-karbol gentian violet solüsyonu ile boyama ve pararosanilin ile kontur boyaması yapılmıştır. Farklı epon tiplerinde standart boyanma sağlayan bir metot geliştirildiği rapor edilmiştir<sup>8</sup>. Çalışmamızda gluteraldehit-osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu yapılan dokularda deosmikasyon yapılmadan boyamalar uygulandı. Bu nedenle çalışma sonuçlarımızın bu araştırmaların sonuçları ile karşılaştırılması yapılamadı.

Alkalik ajanlarla yapılan çalışmalar arasında; insan periferik sinir dokularının gluteraldehit ve osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu sonrası yarı ince kesitlerine potasyum hidroksit ile epon uzaklaştırma işlemi uygulanmıştır. Sonrasında hidrojen peroksit ile deosmikasyon uygulanan kesitler, mikrodalga-aracılı antijen retrieval'a tabi tutulmuş ve immünohistokimyasal uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Zemin boyanmasının olmadığı ifade edilen çalışmada, immün boyamalar son derece başarılı bulunmuştur<sup>9</sup>. Gluteraldehit ile fikse fare ve sıçan böbrek dokularında yapılan bir araştırmada, osmiyum tetroksit postfiksasyonu uygulanan ve uygulanmayan yarı ince epon kesitlerde bazı membran proteinlerinin immünohistokimyası çalışılmıştır. Potasyum hidroksit ile epon uzaklaştırma işleminin ardından mikrodalgada antijen retrieval uygulaması sonrası gerçekleştirilen immünooperoksidaz ve immünofloresan işaretlemelerde olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir<sup>10</sup>. Sıçanlara ait sinir dokularında miyelinli liflerin gösterilmesi amaçlanan bir çalışmada, gluteraldehit ve osmiyum tetroksit ikili fiksasyonu sonrası yarı ince kesitlere alkali etching ajanlarından sodyum etoksit uygulanmıştır. Sonrasında diaminobenzidin (DAB) solüsyonu ile muamele edilen kesitlerde miyelinli lifler kolaylıkla izlenebilmiştir. Metot, osmiyum ile DAB'ın reaksiyona girme mekanizmasına dayandığı için, osmiyum fiksasyonunun şart olduğu belirtilmiştir<sup>11</sup>. Yine bir araştırma çalışmasında gluteraldehit ile fiksasyon sonrası osmikasyon uygulanmadan epona gömülen sıçan böbrek ve karaciğer dokularından 100-1000nm arasında yarı ince kesitlere immünofloresan teknik uygulanmıştır. Araştırmacılar sodyum etoksit ile epon etching işlemi sonrası yapılan immün boyamalarda en net floresan görüntünün 100-250nm kalınlıktaki kesitlerde elde edildiğini bildirmişlerdir<sup>12</sup>. Loeffler'in metilen blue metodu, peryodik asit-methenamine silver boyaması, Giemsa, PAS ve hematoksilen kontur boyamalarının böbrek biyopsisi yarı ince epon kesitlerine uygulanmasının denendiği bir çalışmada; boyama öncesi düşük alkali solüsyon

amaçlı dimetil sülfoksit içinde eritilen crown eter ile epon uzaklaştırması ve sonrasında boyamalar uygulanmış, tanısal anlamda oldukça tatminkar sonuçlar elde edildiği ifade edilmiştir<sup>13</sup>. Çalışmamızda da yukarıdaki araştırmalara benzer olarak; alkali ajan olarak sodyum hidroksit ile etching uygulanan beyin, ince bağırsak ve pankreas dokularına ait yarı ince epon kesitlerin toluidine blue boyamasında pankreas dokusu dışında diğer dokularda başarılı sonuçlar elde edildi. Bu sonuç, her ajanın her doku tipinde aynı etkiyi göstermediği şeklinde yorumlandı. Toluidine blue-eozin ikili kombinasyonu ile boyanan beyin kesitlerinde ise alkali etchingi başarılı bulunmadı. Bunun, sodyum hidroksitin invaziv etkisi ile olabileceği düşünüldü.

Asit ajanların etching amacı ile kullanıldığı araştırmalardan birinde, yarı ince epon kesitlerin toluidine boyaması öncesi HCl ile muamele edildiğinde çok daha iyi kontrast olduğu bildirilmiştir<sup>14</sup>. Bir başka çalışmada elektron mikroskopi için hazırlanan epon bloklardan alınan yarı ince kesitler, lamel üzerine toplanarak seri kesitler şeklinde boyanmıştır. Hot plate üzerinde kurutulan kesitler periyodik asit muamelesi sonrası bazik fuksin ve alkalik metilen blue ile boyanmıştır. Kesit almaya ara vermeksizin seri kesit eldesi ve boyanması başarılı bir şekilde sağlanmıştır<sup>15</sup>. Boyama öncesi asit etchingi yapılan ve olumlu sonuçların alındığı bu çalışmaların aksine, çalışmamızda periyodik asit ile etching sonrası toluidine blue ile boyanan üç farklı dokuya ait kesitlerde şişme, bulanıklaşma etkisi nedeniyle yeterli detay izlenemedi. Toluidine blue-eozin ikili kombinasyonu ile boyanan beyin kesitlerinde ise gri cevher alanlarında iyi sonuç verdiği halde, miyelinli beyaz cevher alanlarında başarılı bulunmadı. Bu olumsuzlukların nedeni, periyodik asitin doku bileşenleri üzerindeki eraziv etkisi ve geçirgenlikteki artış sonucu hidropik dejenerasyon gelişmiş olabileceği şeklinde yorumlandı.

İyot/brom buharına maruz bırakıldıktan sonra asetonla yıkanarak eponun kesitlerden uzaklaştırılmasının önerildiği temel bilgi haricinde literatür taramasında sadece bir çalışmada, yarı ince epon kesitlere boyama öncesinde aseton uygulandığı görülmüştür. Oil red O boyaması sonrası thionin ve azur B ile kontur boyama uygulanan kesitlerde, intrasellüler lipidler kırmızı renkte çok belirgin olarak izlenmiştir. Ancak renklerin kalıcı olmadığı ifade edilmiştir<sup>16</sup>. Çalışmamız kapsamında üçüncü etching ajanı olarak uyguladığımız aseton sonrası yapılan üç dokuya ait toluidine blue boyama sonuçları, alkali ve asit etchingi sonrası boyamalara ve etching uygulanmadan yapılan boyamalara göre çok daha başarılı olarak değerlendirildi. Özellikle pankreasta etching uygulanmayan konvansiyonel boyamalara eşdeğer hatta daha berrak görüntüler sayesinde daha iyi detay sağladığı görüldü. Taranan literatürde aseton ile

etching uygulamasının, toluidine blue boyamasında denendiğine rastlanmamıştır. Bu anlamda bulduğumuz sonuçlar hem ilk, hem de olumludur. Beyin dokusu kesitlerinde etching işlemi sonrasında yapılan toluidine blue-eozin ikili boyamasında en iyi sonuç, aseton etchingi ile elde edildi. Bu nedenle ince bağırsak ve pankreas kesitlerine toluidine blue-eozin boyaması öncesinde sadece aseton etchingi uygulandı. İnce bağırsak boyanması çok tatmin edici olmamakla birlikte, pankreasta son derece olumlu sonuçlar elde edildi.

Çalıştığımız dokuların epon kesitlerinde aseton etchingini izleyen boyama sonuçlarının alkali ve asitlere göre daha başarılı olduğu görüldüğünden, kullandığımız dokular ve boyama metodlarında eponu uzaklaştırarak daha detay veren kaliteli boyamalar elde etmek amacıyla asetondan yararlanılabileceği sonucuna varıldı. Elde edilen olumlu sonuçlar sayesinde çalışmamızın amaçları olan; hücre ve doku bileşenlerinin lokalizasyon ve kuantifikasyonunun ışık mikroskopik düzeyde kolaylıkla yapılabilmesi, bu sayede ultrastrüktürel korelasyon için çalışmanın ince kesit düzeyine ilerletilmesine imkan sağlandığı kanısına varıldı. Çalışmada kullanılan etching uygulamaları ve boyama metodlarının farklı doku tiplerinde de denenmesi ve değerlendirilmesinin yararlı olacağı düşünüldü.

#### **Etik Kurul Onay Bilgisi:**

Çalışmada eğitim amaçlı elde edilen doku kesitleri kullanıldığından etik kurul onayına gerek yoktur.

#### **Araştırmacı Katkı Beyanı:**

Fikir ve tasarım: A.A., S.E.; Veri toplama ve işleme: A.A., S.E.Y., Ç.U.; Analiz ve verilerin yorumlanması: A.A., S.E.Y., S.E., Ç.U.; Makalenin önemli bölümlerinin yazılması: A.A., Ç.U.

#### **Destek ve Teşekkür Beyanı:**

Çalışma için destek alınmamıştır.

#### **Çıkar Çatışması Beyanı:**

Makale yazarlarının çıkar çatışması beyanı yoktur.

## **Kaynaklar**

1. Hayat M.A. Staining of semithin sections. In: Hayat MA (ed). Principles and Techniques of Electron Microscopy. 4th edition. Cambridge: Cambridge University Press; 2000. 360-6.
2. Robinson G, Gray T. Electron microscopy: Practical procedures. In: Bancroft JD, Stevens A (eds). Theory and Practice of Histological Techniques. 4th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. 585-626.
3. Woods AE, Stirling JW. Transmission electron microscopy. In: Suvama K, Layton C, Bancroft JD (eds). Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th edition. China: Churchill Livingstone; 2013. 493-538.
4. Horobin RW. Staining plastic sections: a review of problems, explanations and possible solutions. J Microsc 1983;131(2):173-86.
5. Trump BF, Smuckler EA, Benditt EP. A method for staining epoxy sections for light microscopy. J Ultrastruct Res 1961;5:343-48.
6. Iwadare T, Arai T. Staining etched epoxy resin sections for light microscopy. Biotech Histochem 1995;70(2):53-6.

## Yeni Bir Solvent Olarak Aseton

7. Van Reempts J, Borgers M. A simple polychrome stain for conventionally fixed epon-embedded tissues. *Stain Technol* 1975;50(1):19-23.
8. Tolivia J, Navarro A, Tolivia D. Polychromatic staining of epoxy semithin sections: a new and simple method. *Histochemistry* 1994;101(1):51-5.
9. Cai Z, Manavis J, Cash K, Thompson PD, Blumbergs PC. Immunohistochemical staining of epoxy resin sections of peripheral nerve. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005;13(3): 292-4.
10. Zhai XY, Kristoffersen IB, Christensen EI. Immunocytochemistry of renal membrane proteins on epoxy sections. *Kidney Int* 2007;72(6):731-5.
11. Krueger SK, Phillips DE, Frederick MM, Johnson RK. Diaminobenzidine as a myelin stain in semithin plastic sections. *Biotech Histochem* 1999;74(2):105-9.
12. Haraguchi CM, Yokota S. Immunofluorescence technique for 100-nm-thick semithin sections of epon-embedded tissues. *Histochem Cell Biol* 2002;117(1):81-5.
13. Iwadare T, Harada E, Yoshino S, Arai T. A solution for removal of resin from epoxy sections. *Stain Technol* 1990;65(4):205-9.
14. Erenpreia EA, Enkuzens AK. Improved method of staining semithin sections with toluidine blue. *Arkh Patol* 1980;42(8):82-3.
15. Roberts IM, Hutcheson AM. Handling and staining epoxy resin sections for light microscopy. *J Microsc* 1975;103(1):121-6.
16. Tzitsikas H, Rdzok EJ, Vatter AE. Staining residual lipids in ultrathin sections of tissues embedded in polyester resin. *Stain Technol* 1962;37(5):299-301.

