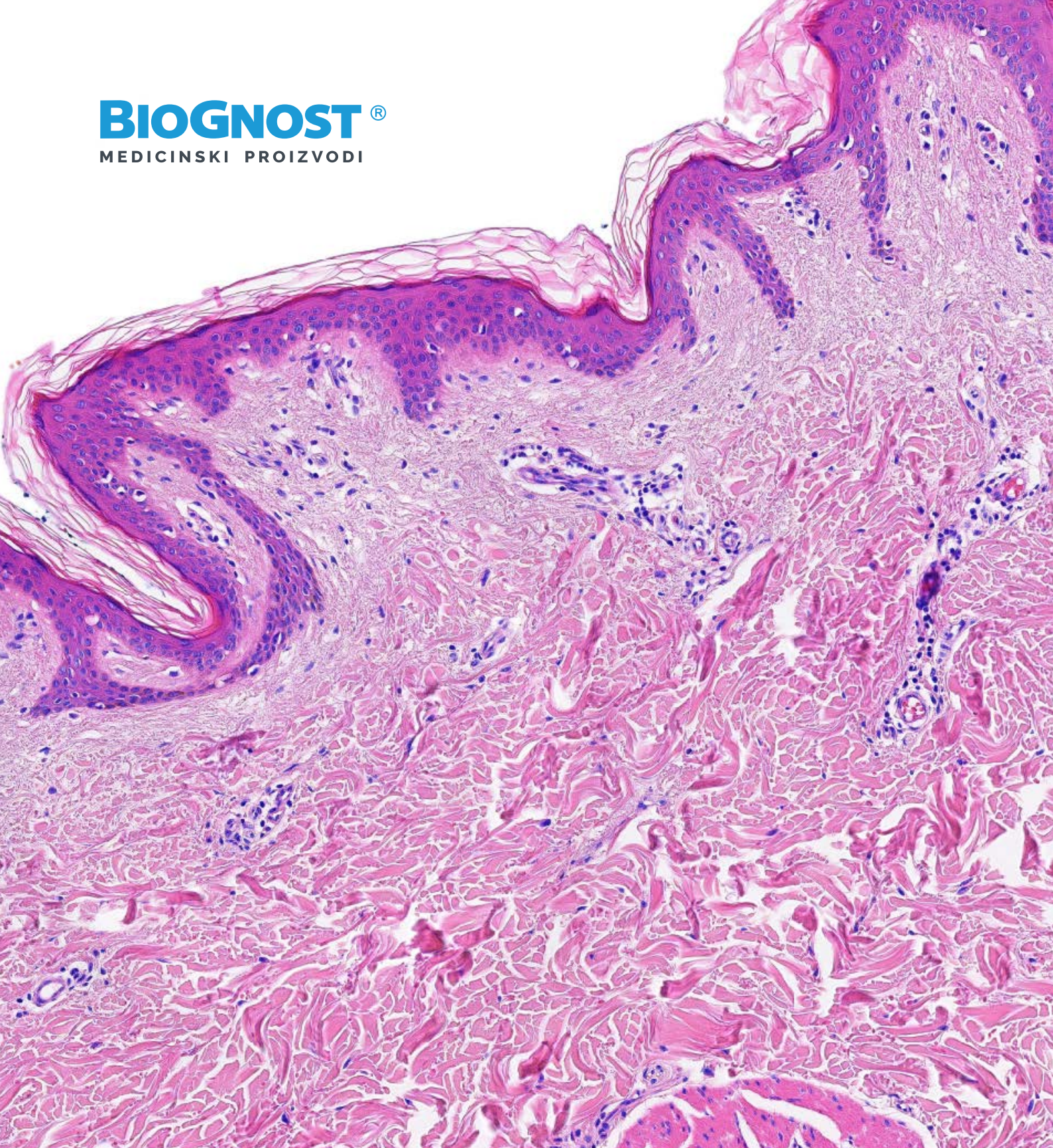




H&E

Hematoksilin i eozin
bojenje

Hematoksilin i eozin bojenje

Hematoksilin i eozin (H&E) bojenje najstarija je i najčešće korištena tehnika bojenja u rutinskoj patologiji za medicinsku dijagnostiku. I danas je od ključne važnosti za postavljanje različitih dijagnoza. Iako su razvijene druge boje i protokoli za bojenje stanica i tkiva, izvorna metoda koja je razvijena prije gotovo 150 godina ostaje relativno nepromijenjena. Hematoksilin se čak ne proizvodi sintetski, već se dobiva iz kore drveta. Ipak, H&E bojenje je i dalje najčešće korišten protokol za bojenje u histologiji.

Međutim, H&E bojenje nije standardizirano. Kvaliteta H&E bojenja i dosljednost bojenja ovise o vrsti hematoksilina, protokolu koji se koristi u određenom laboratoriju i o starosti reagensa. Patolozi imaju individualne preferencije za debljinu preparata, intenzitet obojenja i kontrasta boja. Kod odabira reagensa treba uzeti u obzir: metodu bojenja (ručna ili automatska), sigurnost rada s određenim reagensom, troškove, praktičnost, dostupnost, kvalitetu kao i osobne preferencije. Iz tog razloga, BioGnost nudi niz reagensa i protokola za bojenje, razvijenih prema referentnoj literaturi i optimiziranih s ciljem stalnog poboljšanja proizvoda i protokola bojenja. Uz pravi protokol, svaki laboratorij može postići odlične rezultate, poboljšati detalje obojenja jezgre i naglasiti gradacije intenziteta obojenja citoplazme.

Kombinacija boja hematoksilina i eozina prvi puta je korištena za bojenje tkiva 1876. godine od strane kemičara Wissowzkyja. Hematoksilin, ili točnije njegova oksidirana forma hematein, veže se s mordantom (najčešće Al^{3+}) kako bi obojio molekulu DNA u stanici. Hematein se veže za negativno nabijene fosfatne skupine u molekuli DNA. Zajedno s Al^{3+} mordantom, boja proizvodi plavu nijansu u neutralnim do bazičnim uvjetima. S druge strane, anionski eozin Y veže se za pozitivno nabijene skupine na proteinima, poput aminokiselinskih skupina.

Hematoksilin je prirodno bezbojan, ali postaje boja tek nakon oksidacije u hematein. Intenzivne boje hematoksilina rezultat su kompleksa hemateina s metalnim ionima. Specifična svojstva bojenja variraju ovisno o metalu, pH vrijednosti otopine i sastavu reagensa. U hemalum bojama (od njemačkog hemalaun), metal je aluminij, točnije kalijev aluminij, KAl). Drugi najčešće korišteni metalni ion u kombinaciji s hematoksilinom je željezo (III), koje uzrokuje oksidaciju u hematein i formira kompleksne boje s metalom koje su gotovo crne. Ostali metalni ioni koji se kompleksiraju s hemateinom uključuju bizmut, krom i volfram.

BioGnost u ponudi ima 6 različitih vrsta hematoksilina (G1, G2, G3, H, M i ML) i 2 različite vrste eozina (alkoholni i vodeni), što omogućava jasno i dosljedno bojenje u svakom laboratoriju. Ispravi protokol za svaki hematoksilin i eozin daje jasne, brzo obojene preparate koji olakšavaju točno postavljanje dijagnoze. Jedna litra BioGnostovog hematoksilina može obojiti do 10 000 preparata s istim intenzitetom obojenja. Svi reagensi korišteni u H&E bojenju su stabilizirani i spremni za upotrebu.

PREDNOSTI BIOGNOSTOVIH H&E REAGENSA SU:

- **kvaliteta** – različit intenzitet reagensa pruža visoku kvalitetu obojenja
- **optimizirani protokoli** – svaki protokol posebno optimiziran za različite hematoksiline i eozine
- **poboljšane formulacije** – optimizirane i stabilizirane otopine
- **raznolikost otopina i reagensa** – mogućnost odabira kombinacija koje najbolje odgovaraju specifičnim potrebama
- **reagensi spremni za upotrebu**

Postoje tri vrste H&E bojenja: regresivna, modificirana regresivna i progresivna metoda. Regresivna metoda bojenja prekomjerno oboji tkivo, a zatim uklanja višak boje kiselinom (Hem Diff Strong). Modificirana regresivna metoda koristi slabu kiselinu (Hem Diff) za diferencijaciju hematoksilina. Progresivna metoda bojenja oboji do željenog intenziteta bez prvotnog prekomjernog bojenja. U regresivnoj metodi koristi se **jak** hematoksin (Hematoksin H). U modificiranoj regresivnoj metodi koriste se **umjereno jaki** hematoksilini: Hematoksin G2, G3 i ML. U progresivnoj metodi bojenja koriste se **slabiji** hematoksilini kao što su Hematoksin G1 i M.

Ove formulacije i protokoli omogućavaju razna obojenja. Neki boje vrčaste stanice (Gill), drugi ne (Harris). Gill hematoksilini imaju tri formulacije (1, 2 i 3). Gill 1 ima jačinu koja boji osjetljive uzorke kromatina u citološkim preparatima, ali se može koristiti i za histološke uzorke. Gill 2 i 3 koriste se za bojenje tkivnih preparata.

Eozin se u H&E postupku bojenja naziva kontrastnom bojom. On boji gotovo sve što hematoksin ne oboji. Kada se pravilno koristi, eozin daje tri različite boje koje se mogu koristiti za razlikovanje različitih elemenata tkiva: crvene krvne stanice boje se tamno crvenkasto, kolagen svjetlije ružičasto, a glatki mišić jarko ružičasto. Pola litre BioGnostovog eozina može obojiti do 5 000 preparata s istim intenzitetom boje.

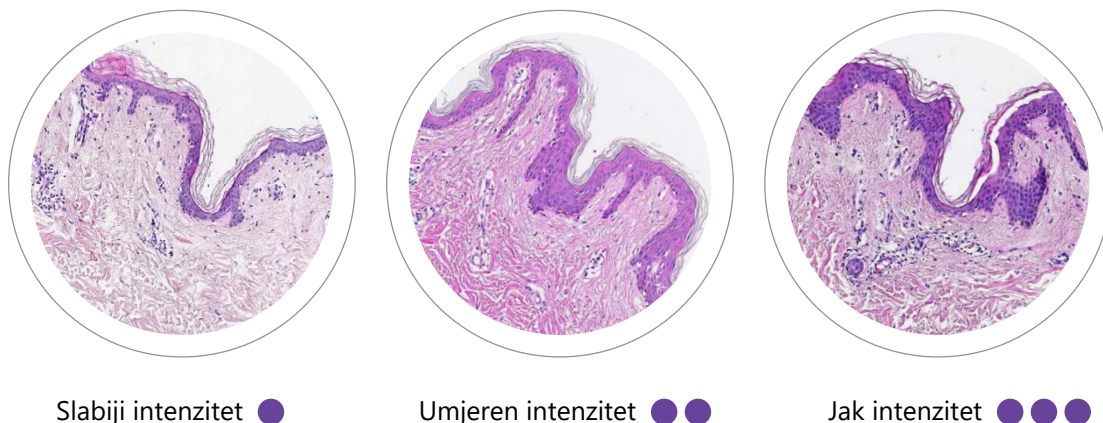
PRINCIP H&E BOJENJA:

1. **Deparafinacija** preparata pomoću reagensa BioClear ili BioClear New
2. **Rehidracija** sa alkoholima Histanol 100, Histanol 95 i Histanol 70
3. **Bojenje** hematoksinom (G1, G2, G3, H, M ili ML)
4. **Diferencijacija** pomoću Hem Diff (za hematoksin G2, G3 i ML) ili Hem Diff Strong (za hematoksin H)
5. **Plavljenje** sa Scottovom otopinom, Bluing reagensom ili BioBluing puferom
6. **Ispiranje** s tekućom vodovodnom vodom
7. **Bojenje** eozinom (alkoholnim ili vodenim)
8. **Dehidracija** sa alkoholima Histanol 95 i Histanol 100
9. **Bistrenje** pomoću reagensa BioClear ili BioClear New

Rezultati bojenja

Svaki patolog ima vlastite preferencije intenziteta obojenja staničnih struktura. Neki preferiraju jači intenzitet i kontrast dok drugi vole nježnije nijanse. Zbog toga BioGnost u svom portfelju nudi širok izbor reagensa, nekoliko vrsta hematoksilina i eozina, kao i dodatne reagense poput diferencijatora, pufera/reagensa za plavljenje, alkohola i ksilena/supstituta za ksilen.

Moguće je postići mnogo različitih rezultata bojenja, ovisno o preferencijama patologa/laboratorija.



Na rezultat bojenja utječe mnogo različitih čimbenika. Osim kvalitete reagensa, vrlo je važno definirati postupak bojenja. Bojenje hematoksilinom i eozinom samo je središnji dio postupka bojenja; deparafinacija, diferencijacija, ispiranje, plavljenje, dehidracija i bistrenje također su vrlo važni dijelovi protokola bojenja. Naravno, metoda bojenja (progresivna, regresivna ili modificirana regresivna metoda) ključna je za dobivanje jasnih i konzistentnih rezultata bojenja. Vrijeme inkubacije svakog reagensa također je vrlo važno. Zanimljivo je kako se s različitim vrstama hematoksilina ili eozina mogu postići isti ili različiti rezultati, ovisno o vremenu inkubacije. Ova naizgled jednostavna i najčešće korištena tehnika bojenja zapravo je vrlo zahtjevna i kompleksna pa je potrebno puno vještine kako bi se napravio ispravan protokol.

BioGnostovi H&E reagensi i protokoli, razvijeni u BioGnostovom Odjelu za istraživanje i razvoj, univerzalni su, jednostavni i optimizirani za automatsko i ručno bojenje. Protokoli se mogu prilagoditi za svaki automatski uređaj za bojenje preparata, bez obzira na broj kadica za bojenje ili druge karakteristike bojača. Postoje i drugi protokoli koji se mogu kreirati, ali su vezani za različite bojače i laboratorije. Na primjer, na BioGnostovim uređajima nisu uključene mogućnosti uranjanja u kadice ili zagrijavanja reagensa pa su BioGnostovi protokoli univerzalni i primjenjivi na svaki H&E bojač (sa ili bez tih funkcija). Sa BioGnostovim formulacijama moguće je dobiti nekoliko stotina protokola, ovisno o vrsti hematoksilina/eozina koji se koriste za bojenje, vrsti uređaja za bojenje (s različitim opcijama) i, naravno, preferencijama patologa. Vrlo je važno da svaki laboratorij ima najbolji protokol bojenja kako bi se smanjili netočni rezultati, čime se omogućava pouzdano postavljanje dijagnoze.

Hematoksilini

Svaki BioGnostov hematoksiniln pravilno je oksidiran i posebno stabiliziran kako bi se očuvala reaktivnost reagensa kroz dulje vremensko razdoblje kao i zadržala njegova kvaliteta. Svako bojenje omogućuje kristalno jasnu i detaljnu sliku jezgre stanice, što olakšava detekciju abnormalnih ili patoloških promjena.

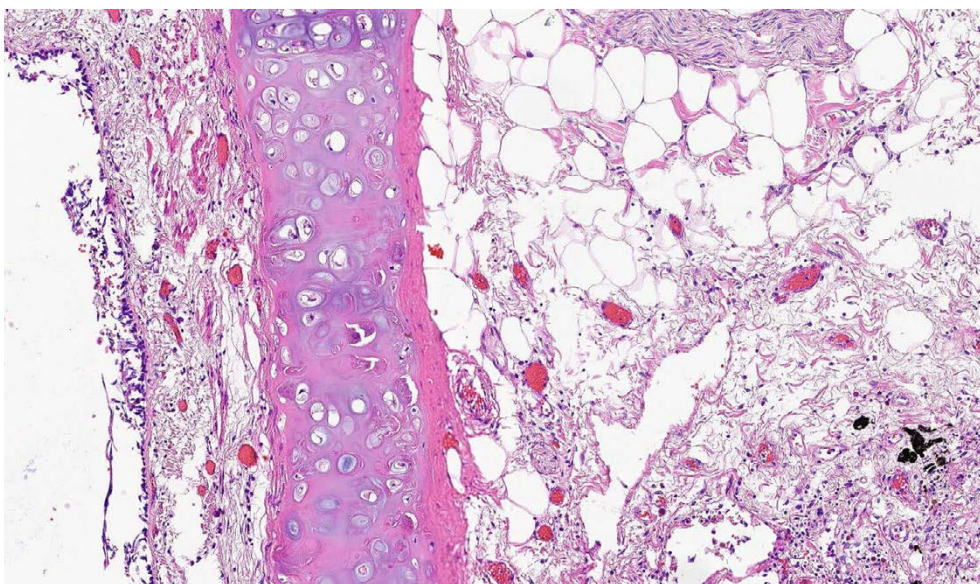
Vrsta hematoksilina	Vrsta protokola bojenja		
	<i>Progresivna metoda</i>	<i>Regresivna metoda</i>	<i>Modificirana regresivna metoda</i>
Hematoksiniln G1 ●	√	-	-
Hematoksiniln G2 ● ●	√	-	√
Hematoksiniln G3 ● ● ●	√	-	√
Hematoksiniln H ● ● ●	√	√	√
Hematoksiniln M ●	√	-	-
Hematoksiniln ML ● ●	√	-	√

Legenda: ● ● ● Jak ● ● Umjeren ● Nježan

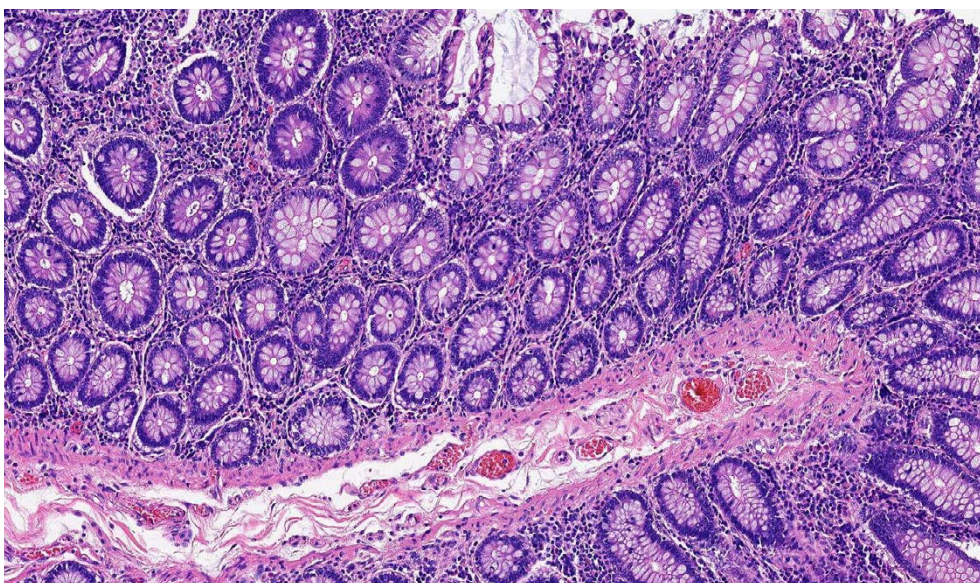
Hematoksin G1

Hematoksin G1, prema Gillu, idealan je za bojenje vrčastih stanica. Ovo je reagens nove generacije za nježno **progresivno** bojenje u histopatologiji i citologiji.

Pogledajte naše
rezultate bojenja!



*Ljudska pluća obojena sa Hematoksinom G1 i Eozinom 0,5% alkoholnim
(progresivna metoda bojenja).*

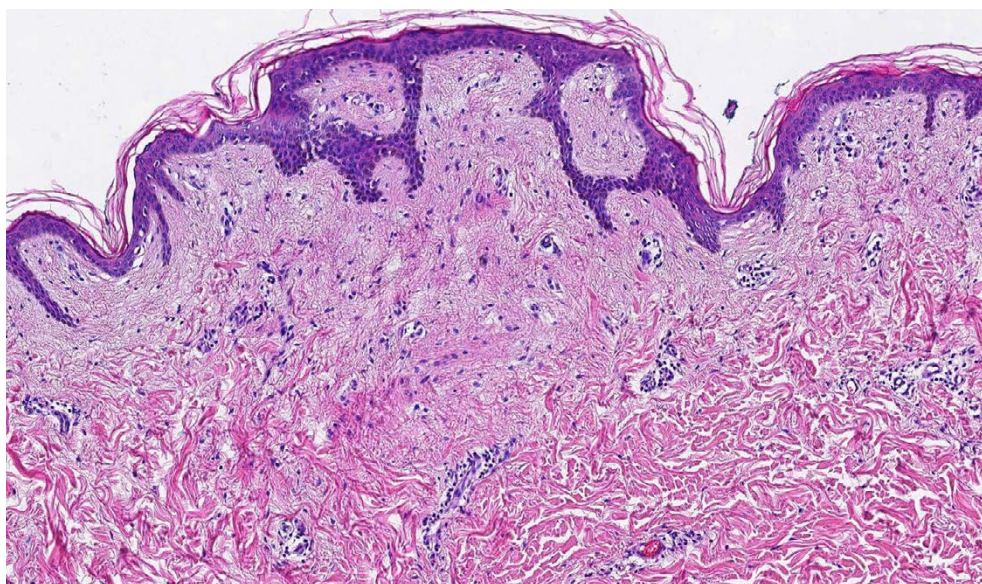


*Ljudsko crijevo obojeno sa Hematoksinom G1 i Eozinom 0,5% alkoholnim
(progresivna metoda bojenja).*

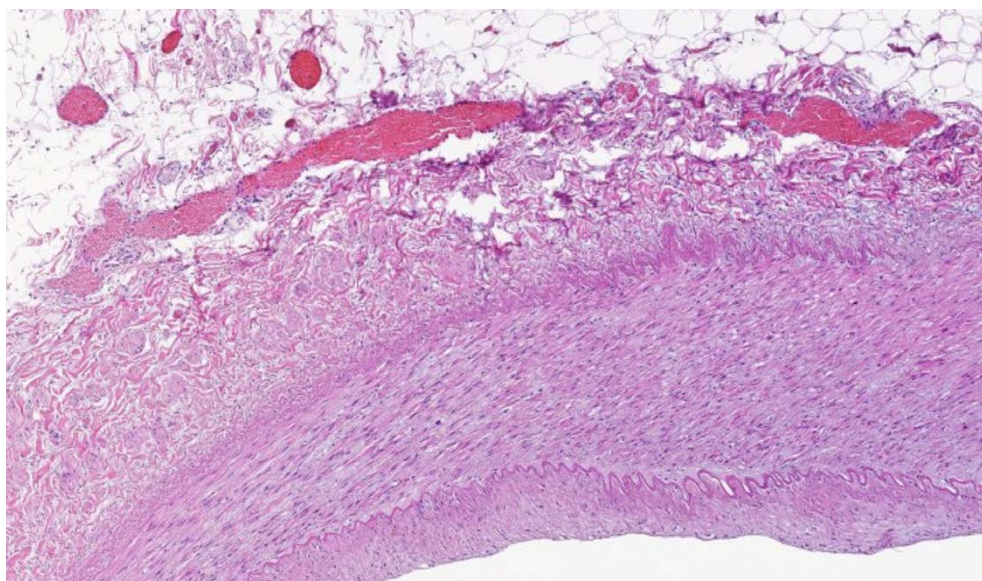
Hematoksilin G2

Hematoksilin G2, prema Gillu, sadrži dvostruku koncentraciju hematoksilina u usporedbi s Hematoksilinom G1. Ovo je reagens nove generacije **srednjeg** intenziteta, namijenjen za **progresivno** i **modificirano regresivno** bojenje u histopatologiji, citologiji te za kontrastno bojenje u imunohistokemiji.

Pogledajte naše
rezultate bojenja!



*Ljudska koža obojena sa Hematoksilinom G2 i Eozinom 1% alkoholnim
(modificirana regresivna metoda bojenja).*

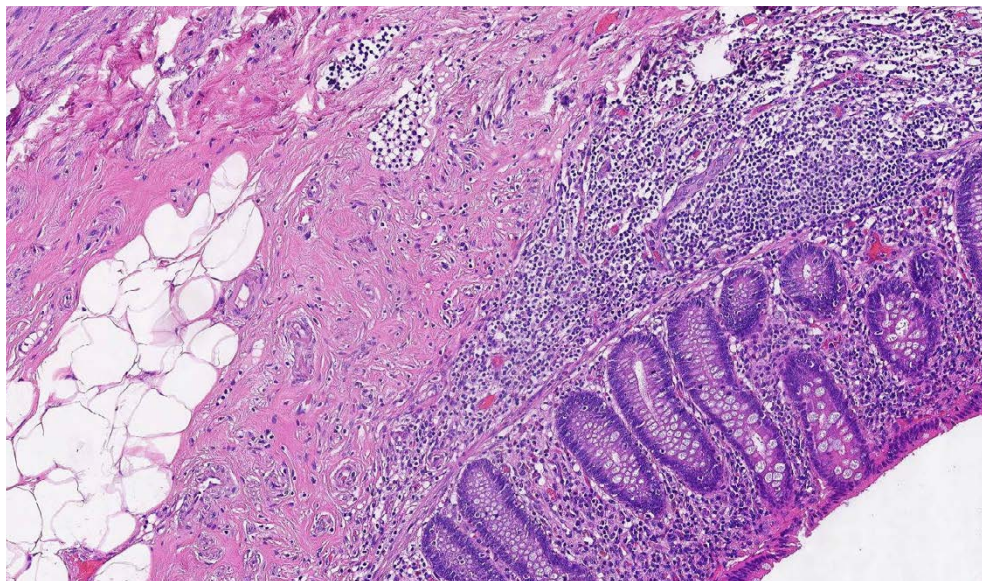


*Ljudska arterija obojena sa Hematoksilinom G2 i Eozinom 1% alkoholnim
(modificirana regresivna metoda bojenja).*

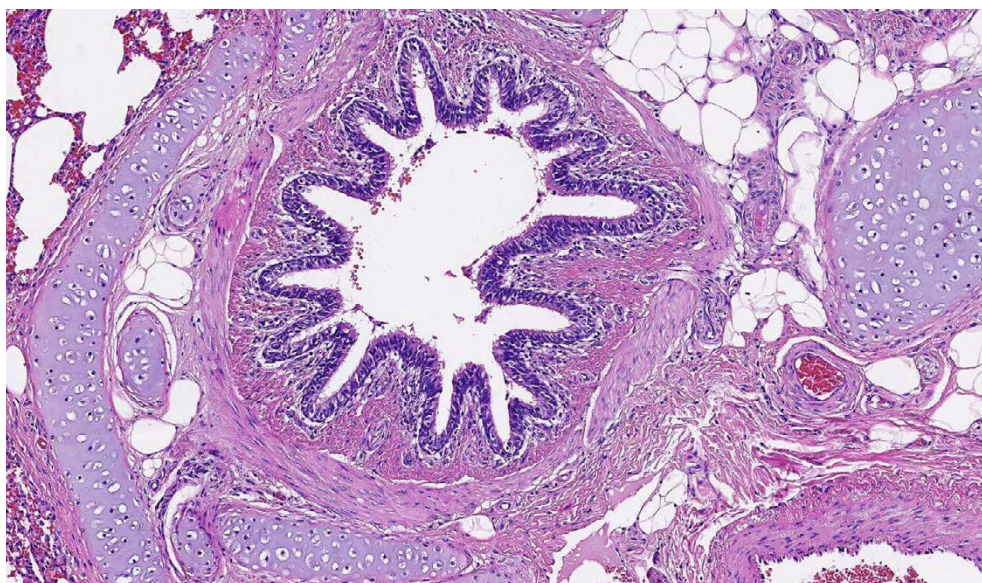
Hematoksilin G3

Hematoksilin G3 sadrži trostruko veću koncentraciju hematoksilina u usporedbi s Hematoksilinom G1. Ovo je reagens nove generacije snažnog intenziteta za **progresivno** i **modificirano regresivno** bojenje u histopatologiji i citologiji.

Pogledajte naše
rezultate bojenja!



*Ljudski crvuljak obojen sa Hematoksilinom G3 i Eozinom 2% vodenim
(modificirana regresivna metoda bojenja).*

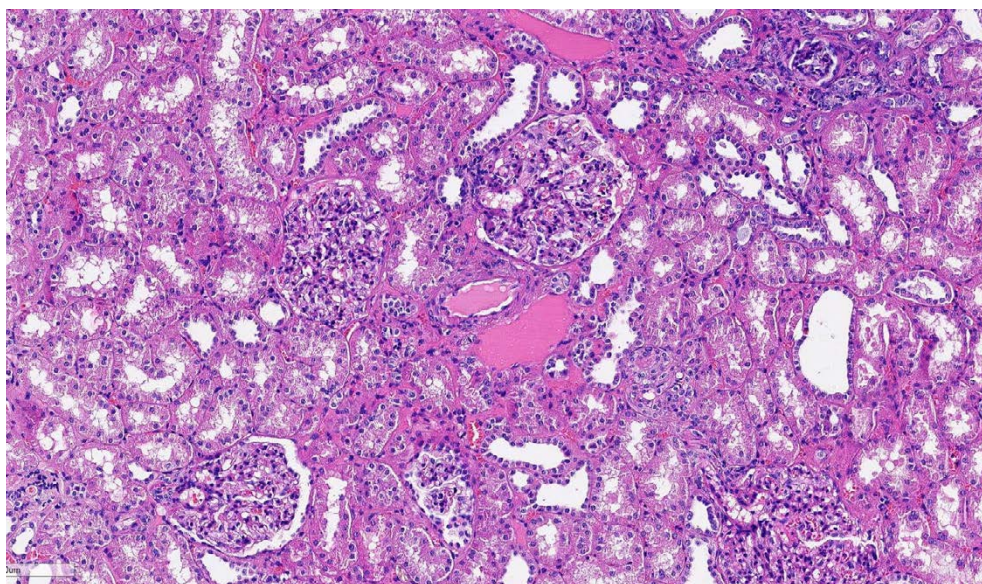


*Svinjska pluća obojena sa Hematoksilinom G3 i Eozinom 2% vodenim
(modificirana regresivna metoda bojenja).*

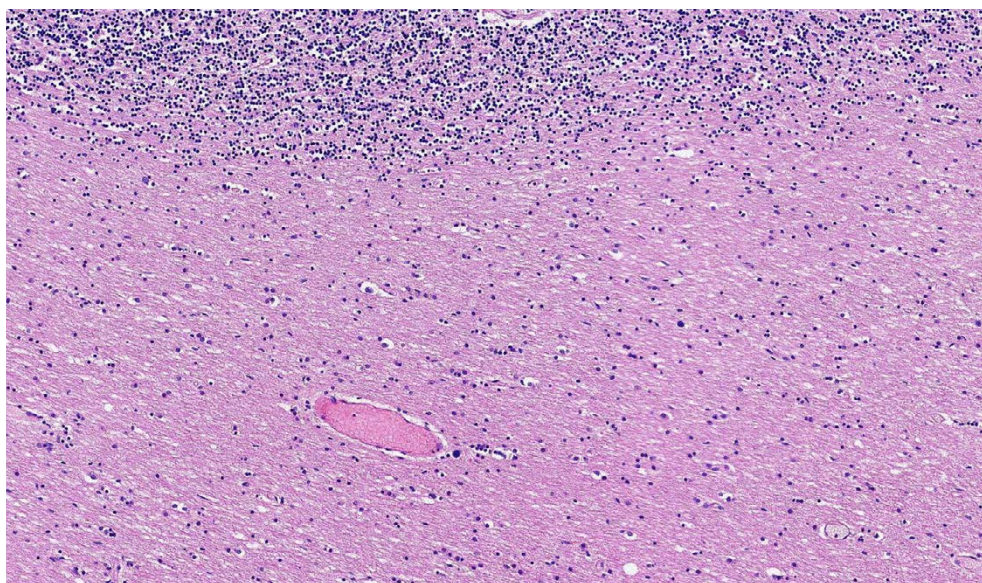
Hematoksin H

Hematoksin H, modificiran prema Harrisu, najčešće je korištena formulacija za H&E bojenje. Ovo je reagens **snažnog** intenziteta za **progresivno**, **regresivno** i **modificirano regresivno** bojenje u histopatologiji.

Pogledajte naše
rezultate bojenja!



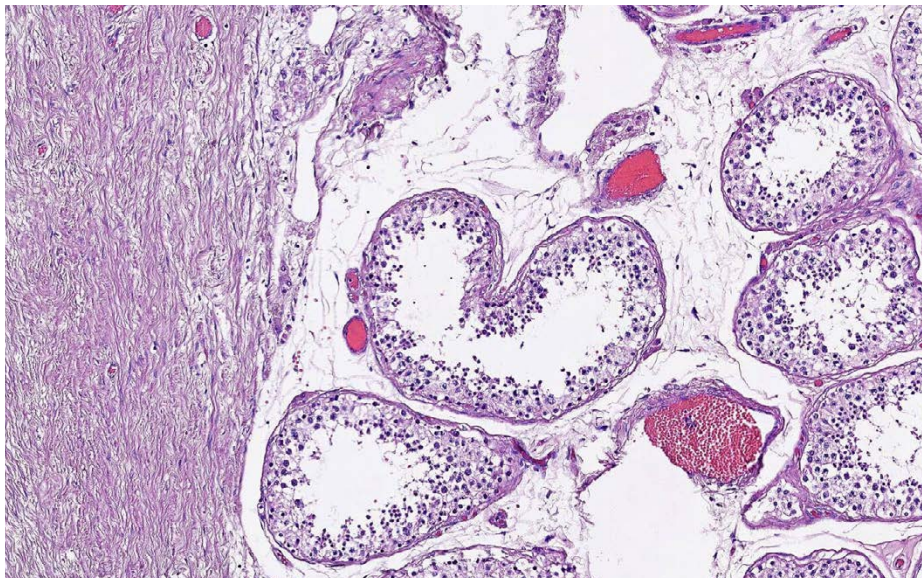
*Ljudski bubreg obojen sa Hematoksinom H i Eozinom 1% vodenim
(regresivna metoda bojenja).*



*Ljudski mozak obojen sa Hematoksinom H i Eozinom 1% vodenim
(regresivna metoda bojenja).*

Hematoksilin M

Hematoksilin M, modificiran prema Mayeru, reagens je slabijeg intenziteta za **progresivno** bojenje u histopatologiji.



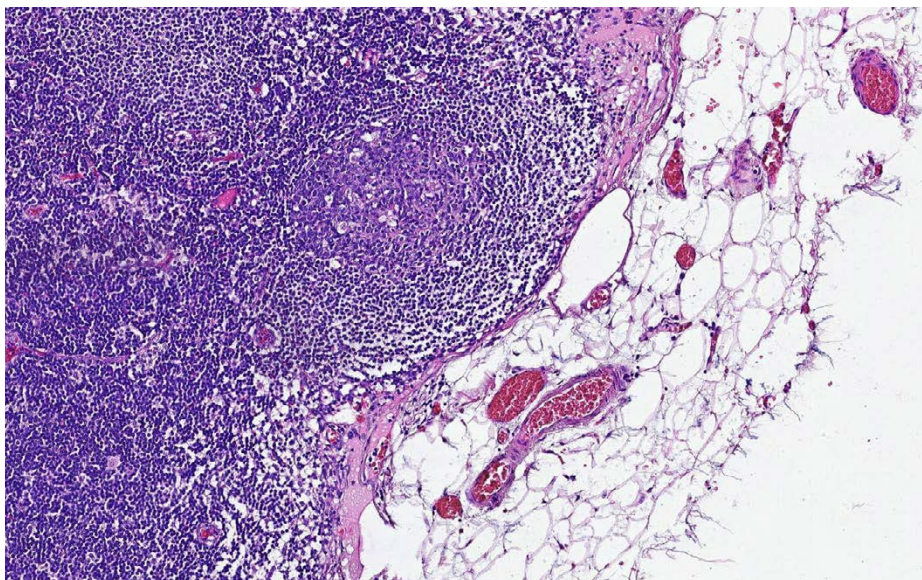
Ljudski testis obojen sa Hematoksilinom M i Eozinom 1% alkoholnim (progresivna metoda bojenja).

Pogledajte naše rezultate bojenja!



Hematoksilin ML

Hematoksilin ML, modificiran prema Mayer-Lillie, reagens je snažnog intenziteta nove generacije za **progresivno** i **modificirano regresivno** bojenje u histopatologiji.



Ljudski limfni čvor obojen sa Hematoksilinom ML i Eozinom 1% alkoholnim (modificirana regresivna metoda bojenja).

Pogledajte naše rezultate bojenja!



Puferi za diferencijaciju i plavljenje

NOVO

Diferencijacija jezgre omogućuje jasnu vizualizaciju nuklearnih struktura u regresivnim i modificiranim regresivnim protokolima dok se upotrebom pufera za plavljenje postiže plava boja hematoksilina odnosno jezgri.

HEM Diff

Reagens za diferencijaciju na bazi slabe kiseline, idealan za modificiranu regresivnu metodu bojenja. Osigurava jasne detalje kromatina u jezgri i smanjuje neželjeno pozadinsko bojenje. Reagens spreman za upotrebu. Nije opasan. Koristi se za diferencijaciju Hematoksilina G2, G3 i ML.

HEM Diff Strong

Snažan reagens za diferencijaciju na bazi kiselog alkohola, idealan za regresivnu metodu bojenja. Omogućava izvrsnu diferencijaciju između nuklearnih i nenuklearnih struktura. Koristi se za diferencijaciju Hematoksilina H.

BioBluing pufer

Puferirani alkalni reagens za plavljenje hematoksilina s blagim pH (8,5). Osigurava optimalno bojenje i pravilnu obojenost stanica. Zbog alkalnog pH, hematoksilin prelazi iz crvene boje u plavu. BioBluing pufer unaprijed je pripremljen, spreman za upotrebu i otopina je plave boje radi lakše identifikacije. Sadrži puferski sustav koji sprječava fluktuaciju pH vrijednosti.

Eozini

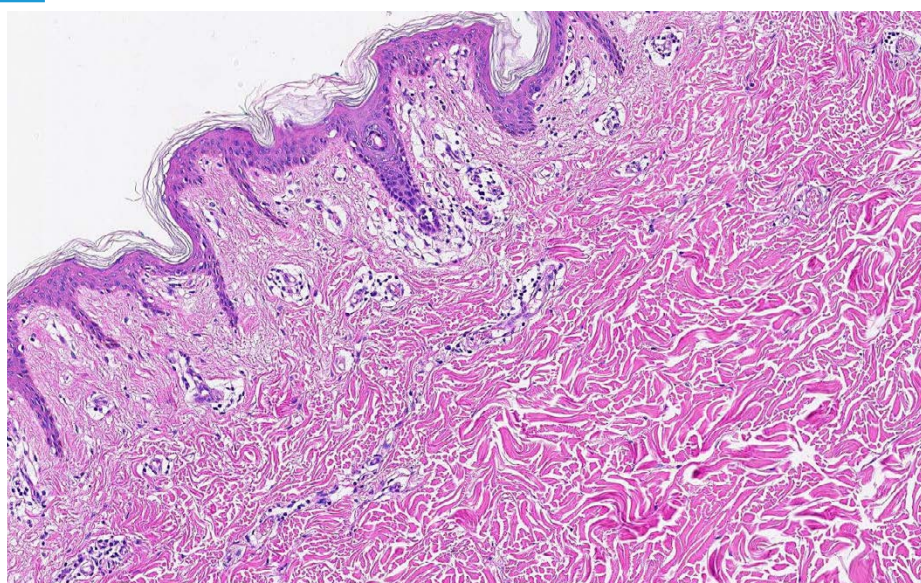
Otopine eozina Y koriste se kao kontrastna boja hematoksilinu u standardnoj H&E metodi bojenja. Eozin Y je anionska boja koja jarkocrveno boji osnovne stanične komponente kao što su citoplazma, kolagen, mišićna vlakna i eritrociti.

Vrsta eozina	Koncentracija eozina Y u otopini			
	0.2%	0.5%	1%	2%
Vodeni				
Alkoholni	/			

Dodatne vrste alkoholnog eozina:

Eozin Kontrast

Modificirana alkoholna otopina za kontrastno bojenje citoplazme. Reagens sadrži eozin Y i floksin B za pojačani učinak kontrastnog bojenja.



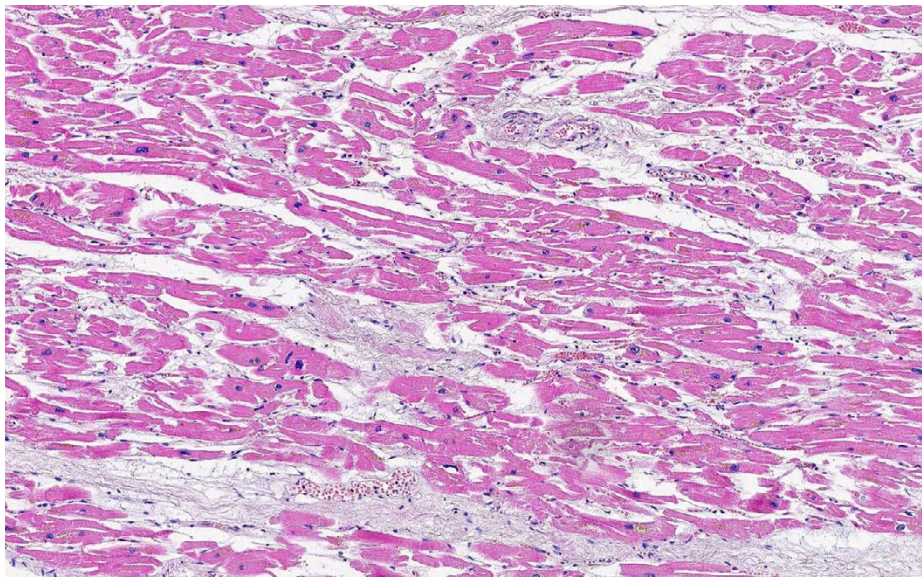
Ljudska koža obojena sa Hematoksilinom G2 i Eozin Kontrastom (modificirana regresivna metoda bojenja).

Pogledajte naše rezultate bojenja!



Eozin Kontrast PLUS

Modificirana alkoholna otopina za intenzivno kontrastno bojenje citoplazme. Reagens sadrži boje Eozin Y, floksin B i Biebrich Scarlet za dodatni učinak kontrastnog bojenja.



Pogledajte naše
rezultate bojenja!



*Ljudski srčani mišić obojen sa Hematoksilinom G1 i Eozin Kontrast Plusom
(progresivna metoda bojenja).*



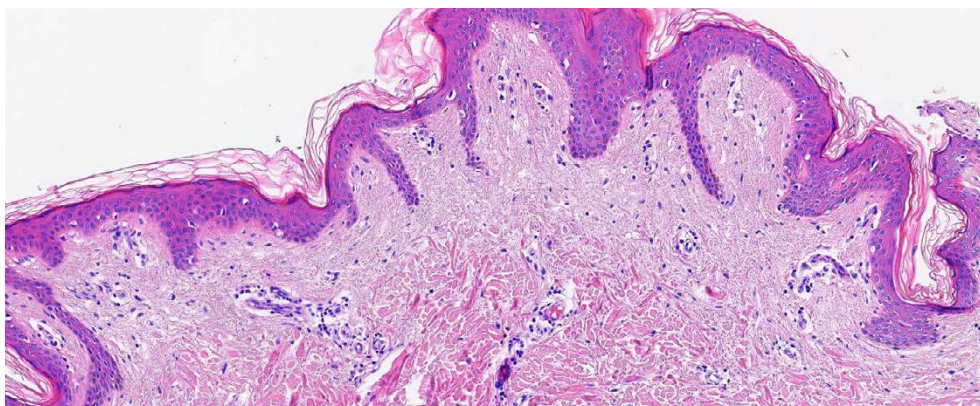
Supstitut hematoksilina

ErioGnost reagens

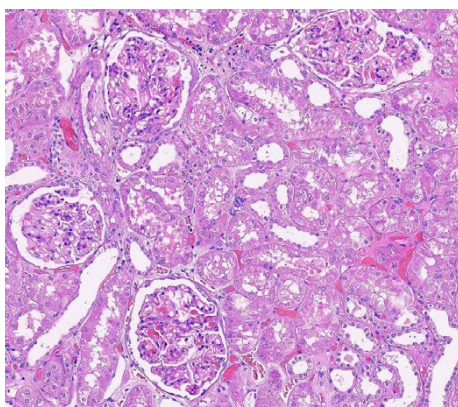
ErioGnost reagens je kiseli reagens za brzo bojenje jezgara, usporediv s bojenjem hematoksilinom. To je ekološki prihvatljiva sintetska zamjena za hematoksilinske reagense. Eriokrom Cijanin R pripada anionskim sulfonftaleinskim mordant bojama. Može se koristiti samostalno kao pH indikator ili kao crvena anionska boja; međutim, stvara intenzivno obojene komplekse s ionima prijelaznih metala (poput iona željeza), zbog čega se najčešće koristi u histologiji kao zamjena za hematoksilin. Eriokrom predstavlja ekonomičnu i ekološki prihvatljivu sintetsku zamjenu za hematoksilin, a njegove radne otopine pokazuju bolju stabilnost u usporedbi s radnim otopinama hematoksilina.

Zbog tehničkih i komercijalnih složenosti u proizvodnji i distribuciji hematoksilina dolazi do nestašica hematoksilina budući da je hematoksilin prirodna boja koja se dobiva iz srži stabla *Haematoxylum campechianum* L. Stoga je BioGnost razvio sintetsku zamjenu za hematoksilin, koja predstavlja standardiziranu tehniku bojenja jezgara, ima dulji vijek trajanja od prirodnog hematoksilina i može se koristiti u automatskim bojačima.

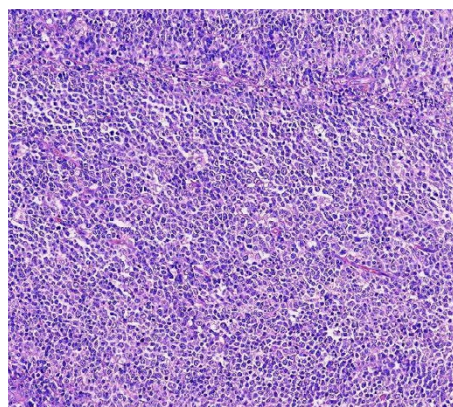
ErioGnost je pouzdana zamjena za hematoksilin u rutinskim i specijalnim bojenjima. Može se koristiti za monokromatsko selektivno bojenje jezgara ili dikromatsko bojenje u dva koraka koje može zamijeniti H&E bojenje. Glavne prednosti ErioGnosta uključuju stabilnost i pouzdanu opskrbu osnovne boje.



Ljudska koža obojena sa ErioGnost reagensom.



Ljudski bubreg obojen
sa ErioGnost reagensom.



Ljudska tonzila obojena
sa ErioGnost reagensom.

NEW

Pogledajte naše
rezultate bojenja!

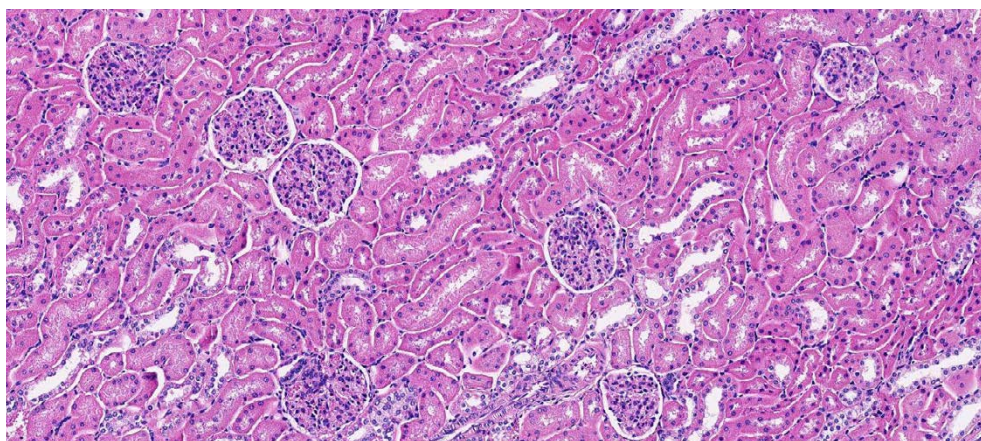


Supstitut formalina

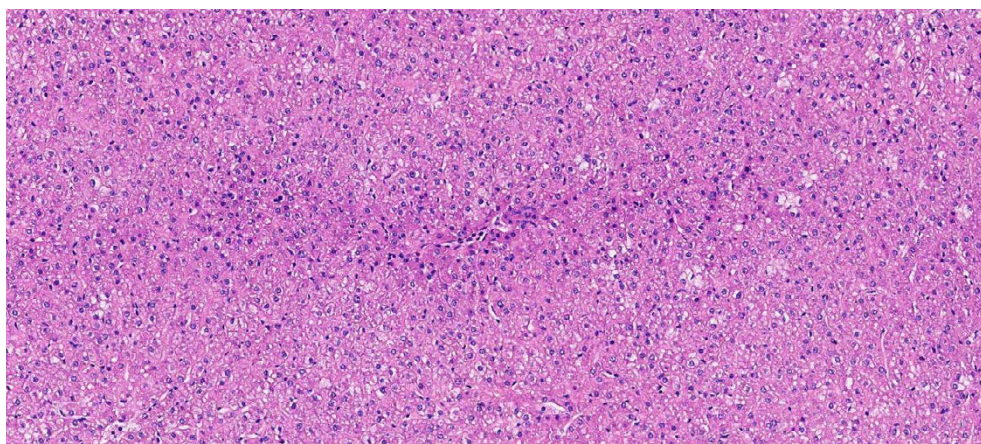
BioFix GL

BioFix GL, otopina fiksativa bez formalina, inovativni je reagens koji omogućuje optimalnu fiksaciju tkiva na strukturnoj i molekularnoj razini, bez toksičnosti i kancerogenog djelovanja. Izvrstan je za konvencionalnu histologiju, specijalna bojenja i imunohistokemiju. Glavna komponenta BioFix GL-a je glioksal, glavna zamjena za neutralno-puferirani formalin u histopatološkoj obradi tkiva. Njegova jedinstvena struktura omogućava brzo prodiranje u tkivo i pruža veću sigurnost u usporedbi s formalinom.

Glioksal je veća molekula od formaldehida, brzo prodire u stanice/tkiva, fiksira proteine i omogućava očuvanje stanične morfologije slične formaldehidu. Rutinsko H&E bojenje pokazuje jasnoću i detalje staničnih struktura. Sva tkiva fiksirana u BioFix GL-u mogu se bojiti BioGnost-ovim H&E reagensima uz optimizirane protokole.



Ovčji bubreg; bojenje: H&E, fiksativ: BioFix GL.



Ovčja jetra; bojenje: H&E, fiksativ: BioFix GL.

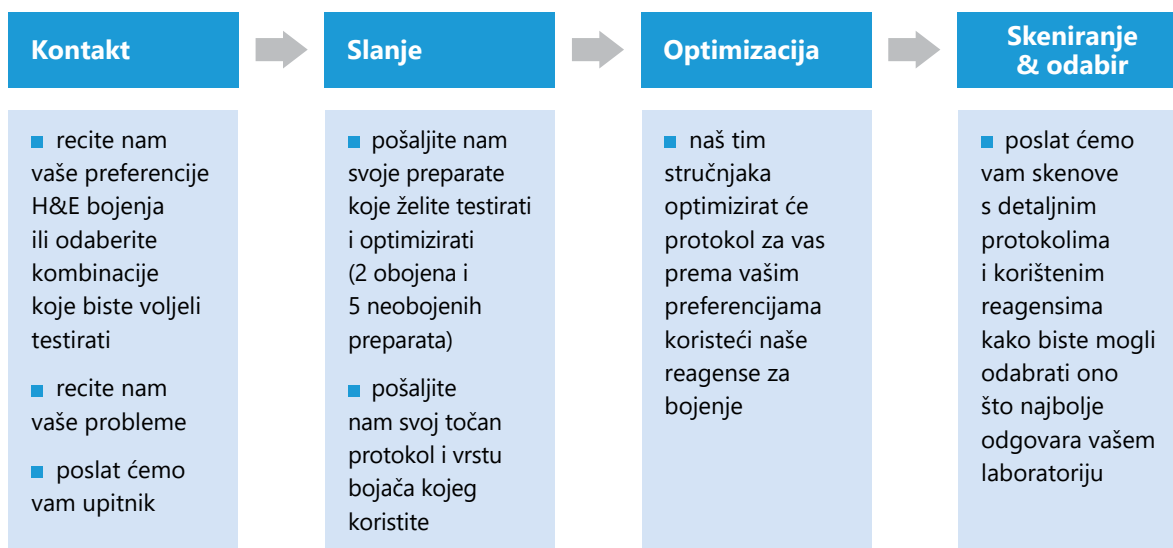
Zašto je H&E bojenje toliko važno?

Većina svakodnevnog rada patologa temelji se na rezultatima H&E bojenja. Izuzetno je važno imati dobre protokole bojenja jer je H&E bojenje osnova svakog histopatološkog laboratorija. Iako je razvijeno mnogo različitih boja, nijedna od njih ne može zamijeniti H&E. Izvorna H&E metoda razvijena je prije gotovo 150 godina i ostala je nepromijenjena. Međutim, procjenjuje se da 50% histopatoloških laboratorija u svijetu ima ozbiljne probleme sa kvalitetom H&E bojenja i sa postavljanjem pouzdane dijagnoze. Kvalitetni rezultati H&E bojenja vrlo su rijetki zbog manjka znanja u histotehnologiji. Zato je BioGnost ovdje da vam pomogne i ponudi pravo rješenje za vaš svakodnevni problem.

H&E boje za sve potrebe

BioGnostov program za optimizaciju H&E bojenja

BioGnostov stručni tim je tu za vas. Dostupni smo u svakom trenutku kako bismo vam pomogli odabrati pravu boju, optimizirati protokol koji odgovara vašim potrebama i pružiti vašim histotehničarima i patolozima kvalitetu i rezultate kakve očekuju. S našim znanjem i iskustvom možemo vam pomoći u poboljšanju vašeg protokola bojenja. Samo nam pošaljite svoje preparate i odaberite željene H&E kombinacije za testiranje. Vaši preparati bit će obojeni BioGnostovim reagensima za bojenje prema potrebama vašeg laboratorija. Također ćemo vam i skenirati preparate kako biste brzo dobili željene rezultate.



Preferiramo održavati redovitu komunikaciju s vašim laboratorijem i nakon završetka procesa optimizacije stoga se slobodno obratite za bilo kakva daljnja pitanja. BioGnostov tim stručnjaka tu je da vas savjetuje i vodi do boljih rezultata bojenja i točnih dijagnoza. Naše iskustvo u kliničkom radu, razvoju reagensa za bojenje i rješavanju problema osigurava odgovarajuće preporuke za vaš laboratorij. Ne gubite vrijeme pokušavajući pronaći najbolji protokol, jednostavno nas kontaktirajte i mi ćemo vam pomoći!

Literatura

1. Bancroft JD, Gamble M: Theory and Practice of Histological Techniques. 6th Ed., Churchill-Livingstone Elsevier, Nottingham, UK, 2008.
2. Carson FL, Hladik C: Histotechnology A Self-Instructional Text. 3rd Ed., ASCP Press, Dallas, TX, 2009.
3. Guidelines for hematoxylin & eosin staining: National Society for Histotechnology
4. Kiernan JA, Horobin RW. A special issue devoted to hematoxylin, hematein, and hemalum. *Biotech Histochem.* 2010;85:5-6. doi: 10.3109/10520290903048368.
5. Stefanović D, Stefanović M, Lalošević D. Use of eriochrome cyanine R in routine histology and histopathology: is it time to say goodbye to hematoxylin? *Biotech Histochem.* 2015;90:461-469. doi: 10.3109/10520295.2015.1057765.
6. DeJarnatt V, Criswell SL. Glyoxal: a proposed substitute for formalin in H&E and special stains. *J Histotechnol.* 2021;44:37-45. doi: 10.1080/01478885.2020.1830664.

BIOGNOST®
MEDICINSKI PROIZVODI

BioGnost d.o.o.
Međugorska 59
10040 Zagreb, Hrvatska
tel.: +385 1 2409 997
prodaja@biognost.hr
www.biognost.com