

MİKRODALGA FIRIN İLE DOKU TAKİBİ

Yrd. Doç. Zeynep Kahveci*, Arş. Grv. Dr. F. Zehra Minbay*, Uzm. Dr. İlkin Çavuşoğlu*, Dt., Doktora öğrencisi Adnan Oya*, Yrd. Doç. Dr. Semiha Noyan*, Prof. Dr. Şahin A. Sırmalı*

ÖZET: Mikrodalga ışınlı fırınların histopatolojik laboratuvarlarında kullanımı giderek artmaktadır. Bu çalışmada, mikrodalga ışınlı fırın altında yapılan doku takibi sonuçları ile konvensiyonel doku takibi sonuçları karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunda bulunan doku parçaları laboratuvarımızda kullanılan rutin doku takibi işlemine alınmıştır. Deney grubunda bulunan farklı iki büyüklükteki doku parçalarına mikrodalga ışınlı fırın altında takip işlemi uygulanmıştır. Dehidrasyon, saydamlaştırma ve parafin banyosu aşamaları mutfak tipi mikrodalga fırında gerçekleştirilmiştir. Mikrodalga ışınlı fırın ile doku takibi süresi kısalmış, preparat kalitesi yönünden de doyurucu sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlarla mikrodalga ışınlı fırının histopatolojik laboratuvarlarında doku takibinde kullanılabileceğini söylemek mümkündür.

ANAHTAR KELİMELEER: Mikrodalga fırın, doku takibi, ışık mikroskopisi.

SUMMARY: TISSUE PROCESSING WITH THE MICROWAVE OVEN: The use of microwave ovens in histopathology laboratories is increasing day by day. In this study, the results of tissue processing performed by microwave irradiation and conventional method were compared. The tissue pieces in the control group were processed according to the routine method used in our laboratory. The tissue pieces of different size in the experimental group were processed under microwave irradiation. Dehydration, clearing and paraffin impregnation steps were performed in a domestic microwave oven. By microwave irradiation tissue processing time was reduced. Also, quality of slides was satisfactory. It's possible to conclude with these results that microwave irradiation can be used in tissue processing in histopathology laboratories.

KEY WORDS: Microwave oven, histoprocessing, light microscopy.

GİRİŞ

Mikrodalga teknolojisinin günlük hayatta kullanımının yanı sıra rutin histoteknik işlemlerde de uygulanabileceği (fiksasyon, doku takibi, boyama v.b.), yapılan değişik çalışmalarla gösterilmiştir (1-10,12-17). Sıcaklığın tüm kimyasal reaksiyonları artırması özelliğinden yola çıkılarak günümüze kadar histotekniğin bir çok aşamasında-özellikle sürenin kısaltılması gereken durumlarda - klasik fırınlar, etüvler ve mikrodalga fırınlar kullanılmıştır. sıcaklık artışının kontrol edilebildiği ve içten dışa doğru yönlendirilebildiği mikrodalga fırınlar, klasik fırınlara göre bazı avantajlara sahiptir. Özellikle fiksasyon ve doku takibi aşamalarında, sıcaklık artışını içten dışa doğru gerçekleştirmesi nedeni ile, kullanılan solüsyonun dokunun her noktasına difüzyonunu kolaylaştırarak, kısa sürede kaliteli sonuç alınmasını sağlamaktadır (1,2,4,7,10). Kullanılan mikrodalga fırının zaman ve sıcaklık göstergelerine sahip olması ve kontrol edilebilir sıcaklık artışı sağlayabilmesi, yöntemin güvenilirliğini ve başarısını arttırmaktadır. Bu nedenle, bu özellikleri taşıyan laboratuvar tipi mikrodalga fırın kullanımı tercih edilmektedir. Ancak mutfak tipi mikrodalga fırınlar da, sıcaklık/zaman eğrileri çizilerek kontrollü sıcaklık artışı sağlanabilen koşullarda kullanılabilmektedir (7, 10).

Mikrodalga ışınlı fırın altında doku takibi ilk kez 1986 yılında Boon ve arkadaşları tarafından uygulanmış ve iyi sonuçlar alındığı, mikrodalga ışınlı fırının yarattığı bir artefakta rastlanılmadığı bildirilmiştir (15). Benzer çalışmalar değişik araştırmacılar tarafından da yapılarak, doyurucu sonuçlar alınmıştır (14,16). Ülkemizde bu konu ile ilgili ilk çalışma, 1989 yılında Umar ve arkadaşları tarafından özel bir patoloji labo-

ratuvarında yapılmıştır. Bu araştırmacılar da mikrodalga tekniğinin klasik histotekniğe kıyasla daha üstün olduğunu belirtmişlerdir (17). Boon ve Kok tarafından Hollanda'da başlatılan mikrodalga fırınların histopatolojide kullanımı, alınan sonuçların iyi olması nedeni ile bu ülkede giderek yaygınlaşmaya başlamıştır. 1992 yılında Hollanda'daki laboratuvarların %50'sinde mikrodalga fırınların bu amaçla kullanıldığı bilinmektedir (18).

Bu çalışmada, dokuların ışık mikroskopik inceleme öncesi gerekli basamaklardan biri olan doku takibi aşaması, mikrodalga ışınlı fırın kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar konvensiyonel takip sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

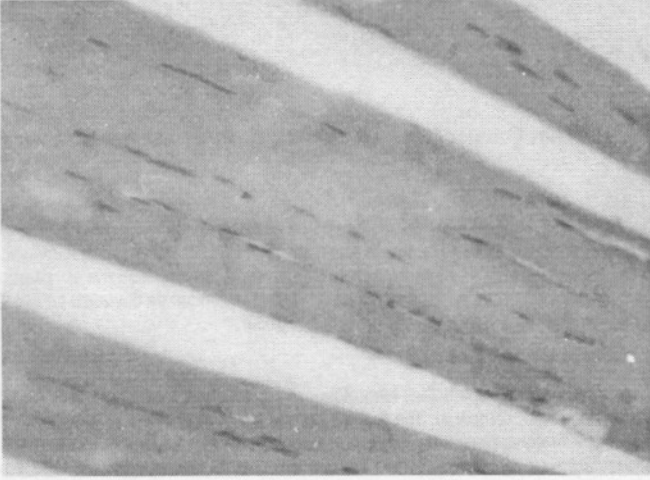
Wistar Albino türü erişkin erkek sıçanlardan alınan çizgili kas, karaciğer ve dalak doku örnekleri her birinden 6'şar adet içeren üç gruba ayrıldı ve nötral formalin içinde oda ısısında (18°C'de) fikse edildi. Fiksasyon sonrası örnekler 5 dk çeşme suyu altında yıkandı. Kontrol grubu olan I. grup Ia ve Ib olarak ikiye ayrıldı. Ia grubunda yer alan 2-5 mm kalınlığındaki 3'er adet çizgili kas, karaciğer ve dalak doku örneklerine laboratuvarımızda kullanılan doku takibi işlemi uygulandı (11). Ib grubunda yer alan 1-2 mm kalınlığındaki 3'er adet çizgili kas, karaciğer ve dalak doku örneklerine Ia grubuna uygulanan doku takibi işleminin aynısı uygulandı.

Mikrodalga aşaması Er 535 MT Vestel/GoldStar marka mutfak tipi fırında gerçekleştirildi. II. grupta yer alan 2-5 mm kalınlığındaki doku örneklerine (çizgili kas, karaciğer, dalak) uzun süreli mikrodalga ışınlı fırın doku takibi işlemi uygulandı (Tablo I). Dokular 200 ml absolü etil alkol içeren cam kap içinde mikrodalga fırına yerleştirildi. Dokular önce %70 güç ile 1 dk sonra %10 güç ile 60 dk ışınlı maruz bırakıldı. Işınım sonrası absolü etil alkolden çıkarılan dokular 200 ml isopropil alkol içeren cam kapta %70 güç ile 1 dk ve %10 güç ile 40 dk mikrodalga ışınlı maruz bırakıldı. Bu işlem sonrası, dokulara önce 200 ml parafin I içinde %100 güç ile 1 dk

Çalışma Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma "III. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde (3-7 Eylül 1996, Eskişehir) poster olarak sunulmuştur.

* Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi

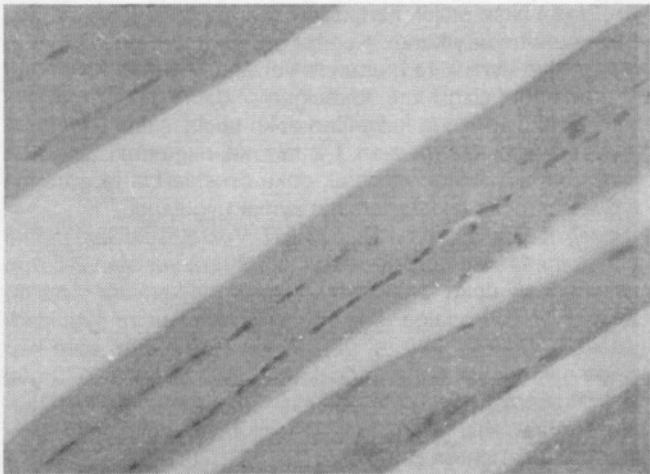


Resim 1: Oda sıcaklığında doku takibi uygulanan çizgili kas. HE X160.

%10 güç ile 30 dk sonra 200 ml parafin II içinde %100 güçle 1.5 dk %10 güç ile 60 dk ışınım uygulandı.

III. grupta yer alan 1-2 mm kalınlığındaki doku örneklerine (çizgili kas, karaciğer, dalak) kısa süreli mikrodalga ışınlı doku takibi işlemi uygulandı (Tablo I). Dokular 200 ml absolü etil alkol içinde %70 güç ile 1 dk ve %10 güç ile 15 dk mikrodalga ışınlıma maruz bırakıldı. Işınım sonrası 200 ml isopropil alkol içine alınan dokulara %70 güç ile 15 dk mikrodalga ışınlıma uygulandı. Bu işlem sonrası dokulara önce 200 ml parafin I içinde %100 güç ile 1 dk %10 güç ile 10 dk; daha sonra 200 ml parafin II içinde %100 güç ile 1.5 dk ve %10 güç ile 20 dk mikrodalga ışınlıma uygulandı.

Yöntem sırasında kullanılan sıvılarda oluşan sıcaklık, termometre yardımı ile ısınlama sürelerinin hemen sonunda ölçüldü. Bulunan değerlerin aritmetik ortalamaları absolü etil alkol ile isopropil alkolde $75 \pm 5^\circ\text{C}$, parafin I'de $60 \pm 5^\circ\text{C}$, parafin II'de $80 \pm 5^\circ\text{C}$ bulundu (Tablo I). Parafin bloklar haline getirilen doku örneklerinden alınan $5\mu\text{m}$ 'lik kesitler, Hematoksilin-Eosin (HE) ile boyanarak ışık mikroskopik olarak değerlendirildi.



Resim 2: Kısa süreli mikrodalga ışınlı doku takibi uygulanan çizgili kas. HEX160.

BULGULAR

Örneklerin doku takibi işlemi bloklaşma aşamasına kadar; I. grupta 27 saat (Resim 1, 4, 7), II grupta 3 saat 14 dakika (Resim 2, 5, 8), III. grupta ise 1 saat 4 dakikada tamamlandı (Resim 3,6,9). İncelemeler sonucu mikrodalga ışınlı ile doku takibi uygulanan gruplarda süreye bağımlı eosinofili artışı belirgin olarak gözlemlendi. Doku takibi işlemi sırasında mikrodalga ışınlı uygulanan dokularda, büyüklük ve ısınlama süresine göre değişen farklılıklar olmasına karşın her doku örneğinin en az bir grubunda (Resim 1 ve 3, 4 ve 5, 7 ve 9), konvensiyonel yöntemle karşılaştırıldığında eş kalitede preparat elde edildiği görüldü.

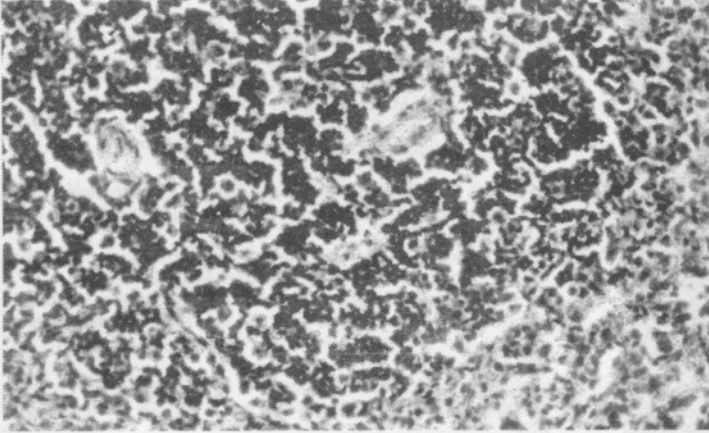
TARTIŞMA VE SONUÇ

Doku takibi aşaması öncesi, kullanılan fiksatifin doku örneklerinden uzaklaştırılması gereklidir. Konvensiyonel metodlarda bu işlem, akar su altında yıkanarak ve dereceli al-



Resim 3: Uzun süreli mikrodalga ışınlı doku takibi uygulanan çizgili kas. HEX160.

kollerden geçirilerek sağlanır. Mikrodalga ışınlı yönteminde ise, örneklerin çeşme suyu altında 5 dk süre ile yıkanması ve Kryofix'de 15 dk süre ile ısıtılması, 55°C 'de 3 dk mikrodalga ışınlı uygulanması önerilmektedir (12,14). Kryofit ile işlem sonrası dokular, direkt olarak absolü alkole alınarak takip işlemi sürdürülebilir. Ancak fiksasyon formaldehit içeren sıvılarla yapılmış ise, takip işleminin akar su altında yıkanma sonrası mikrodalga ışınlı uygulanan %50 etanol içinde sürdürülmesi önerilmektedir. Mikrodalga fırınlarda dehidre edici ajanlar olarak etil alkol, metil alkol, isopropanol, aseton; saydamlaştırıcı ajan olarak isopropanol, ksilen, Histo-Clear ve kloroform kullanılmaktadır. Dehidre edici ajan olarak çalışırken terah edilen etil alkol, mikrodalga ışınlı doku takibinde uzmanlar tarafından önerilmekte ve çok iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir (12,14). Bu aşamada etil alkol kullanıldığında saydamlaştırıcı ajan olarak isopropanolün seçilmesi uygundur. Çünkü etil alkol ile dehidrasyon tam olarak gerçekleşmemiş ise isopropanol dehidrasyonu tamamlamaktadır. Böylece yetersiz dehidrasyonun parafin aşamasın-

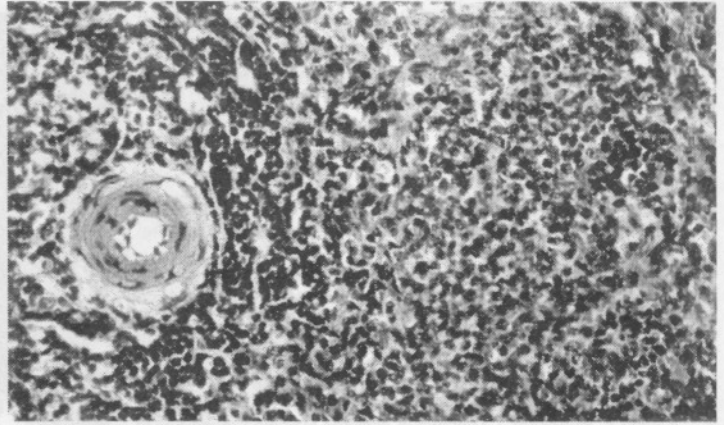


Resim 4: Oda sıcaklığında doku takibi uygulanan dalak. HEX160.

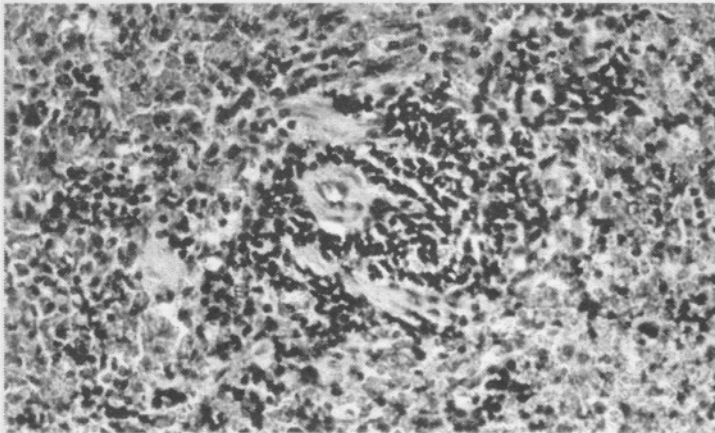
da dokularda oluşturacağı şişme ve bunun sonucunda doku bloklarının kesilemez hale gelmesi önlenerek, kalite arttırılmaktadır (12,14). Ayrıca isopropanol, diğer ajanlara (ksilen, Histo-Clear) göre mikrodalga enerjisi- ni daha iyi absorbe eder. Kaynama noktası 82°C'dir ve parafin aşamasında kolaylıkla kaynatılıp yok edilebilir. Ksilenden daha az toksiktir ve oldukça ucuzdur (14). Buna karşın ksilen elektromanyetik dalgalara karşı an- ten görevi yapmakta ve enerjiyi absorbe etmektedir. Bu nedenle, üretilen enerji fırın içinde, gözle görülebi- len ve ısıtılabilen kıvılcımlar oluşmasına neden olmak- tadır (13,14). Çalışmamızda yukarıda sözü edilen özel- likler dikkate alınarak, formalin fiksasyonu sonrası do- kular akar su altında yıkanmıştır. Ancak dehidrasyon işle- mi direkt absolü alkol basamağından başlatılarak, Kryofix ile fikse edilmiş doku örneklerinde izlenen yol uygulanmıştır. Mikrodalga ışınlı doku takibinde göm- me materyali olarak, parafin ve Paramat önerilmekte- dir. Bu işlem sırasında tek parafin banyosu kullanılabi- lir. Ancak ideal olanı iki banyo olmasıdır. Konvensiy- nel yöntemlerde parafin banyolarının her birinin sıcak- lığı aynıdır ve erime noktasının biraz üzerindedir. Oysa mik- rodalga fırın yönteminde parafin banyolarının sıcaklığı birbir-

lerinden farklıdır ve erime noktasının üzerindedir. İki farklı sıcaklıkta ve erime noktasının üzerinde parafin kullanımının impregnasyonu arttırdığı ve iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir (12). Bu bilgilerden yararlanıla- rak çalışmamızda etil alkol, isopropanol ve ikili parafin banyosu tercih edilmiştir.

Boon ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada, Leiden fiksativ ve tamponlu formalin kullanılarak fikse edilen parçalara mikrodalga takip işlemi benzer olarak uygulanmıştır. Konvensiyonel doku takibi ile morfometrik yönden karşılaştırıldığında her iki grupta da büzüşmeye rastlanılmamıştır (15). Aynı çalışmada epitel dokusunda mikrodalga ile yapılan takip işleminin çok daha iyi sonuç verdiği de belirtilmiştir. Leong, 2 cm'den büyük olan ve yağ içeren dokularda, takip sırasında problem olduğu ve bu dokuların iyi saydamlaşmadığını bildirmektedir (16). Çalışmamızda morfometrik ölçüm yapılmamıştır. Say- damlaşma ile ilgili olarak Leong'un belirttiği duruma rast-



Resim 5: Kısa süreli mikrodalga ışınlı doku takibi uygulanan dalak. HEX160.

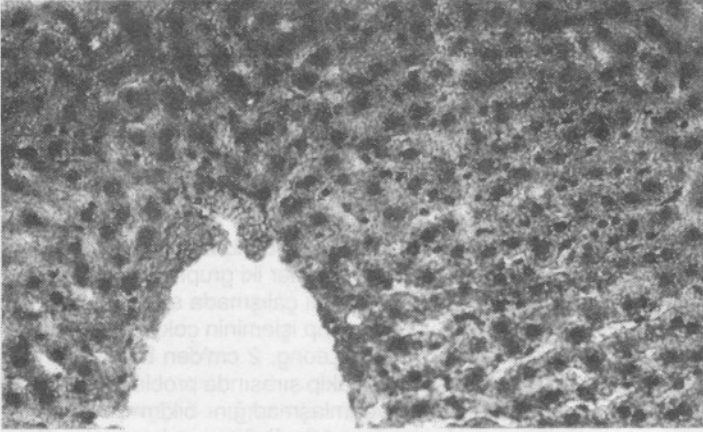


Resim 6: Uzun süreli mikrodalga ışınlı doku takibi uygulanan dalak. HEX160

lanılmamış olması, seçilen doku örneklerinin ve büyüklükleri- nin yapılan doku takibi işlemine uygun olduğu kanısını doğur- muştur. Umar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile fiksasyon aşamasının mikrodalga ışınlı altında ya- pılması, doku takibi aşamalarından ksilol ve parafin ba- samaklarının fırın içinde kıvılcım oluştuğu için oda sıcak- lığında yapılmış olması gibi nedenlerden dolayı tam bir karşılaştırma yapma olanağı olmamıştı (17). Ancak bu çalışmanın sonucunda mikrodalga tekniğinin bir yöntem olarak önerilmesi tarafımızdan da paylaşılmaktadır. Bu düşünceye ek olarak değişik dokuların takibi sırasında uygulanacak yöntemin konvensiyonel yöntemlerde oldu- ğu gibi sabit süreler, güçler ve kullanılacak ajanların önerilmesi için daha bir çok denemeye gereksinim oldu- ğu açıktır.

Mikrodalga ışınlı uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre eosinofiliye görülen artış, literatür bulgu- su ile uyumludur (1).

Sonuç olarak, doku takibi aşamasında ışınlı kul- lanılması ile laboratuvarımızda uygulanan konvensiy- nel doku takibi yöntemi arasında kalite yönünden fark- lılık olmadığı; ancak doku takibi süresinin çok kısaldığı

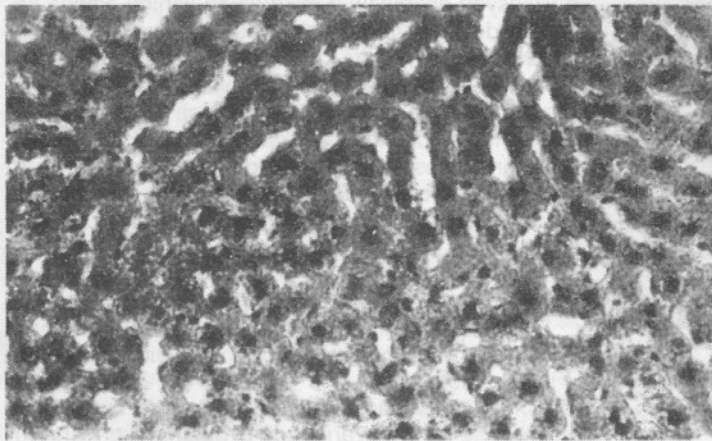


Resim 7: Oda sıcaklığında doku takibi uygulanan karaciğer. HEX160

görülmüştür. Dokuların büyüklüğüne ve cinsine bağlı olarak kısa ya da uzun süreli mikrodalga ışınlı doku takibinin, belirtilen dokular ve doku büyüklükleri için uygulanabileceği kanısına varılmıştır.

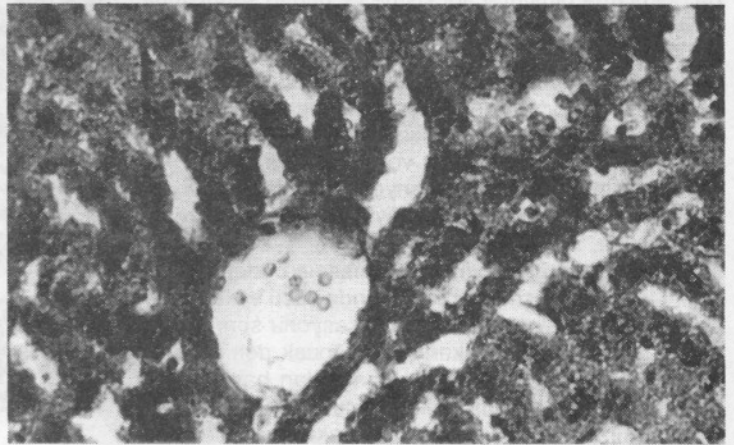
KAYNAKLAR

- 1- Kok LP, Boon ME. Microwaves for microscopy 1990; 158:291-322.
- 2- Kok LP, Boon ME. Physics of microwave technology in histochemistry. Histochem J 1990; 22: 381-388.
- 3- Leong AS-Y, Daymon ME, Million J. Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy. J Pathol 1985 146: 313-321.
- 4- Leong AS-Y. microwave irradiation in histopathology. Pathol Annu 1988; 2 (23): 213-233.
- 5- Umar MH, Pabuçcuoğlu HU, Öcal ŞD. histoteknikte modifiye mikrodalga metodu. Türk Patoloji Derg 1990; 6 (2): 67-70.
- 6- Kayser K, Bubenzer J. Microwave-assisted staining procedures in routine histopathology. histochem J 1990; 22:365-370.
- 7- Kahveci Z. Değişik dokuların fiksasyonunda mikrodalga kullanımı. (Doktora tezi), Bursa; Uludağ Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 1993.
- 8- Leong AS-Y. Microwave techniques for diagnostic laboratories. Scanning 1993; 15:88-98.
- 9- Kahveci Z, Çavuşoğlu İ, Minbay Z, Badakov S, Sırmalı Ş A. The application of microwave irradiation in fixation of liver tissue for TEM. Tr J Medical Sciences Suppl 1995; 31.



Resim 9: Uzun süreli mikrodalga ışınlı doku takibi uygulanan karaciğer. HEX160.

- 10- Kahveci Z, Sırmalı ŞA. İnce bağırsağın fiksasyonunda mikrodalga ışınının kullanımı. Uludağ Üniv Tıp Fak Derg 1995; 1-3:1-4.
- 11- Smith A, Bruton J. A colour atlas of Histological Staining Techniques. London: Wolfe Medical Publications Ltd, 1977:184
- 12- Suurmeijer AJH. Microwaves and staining. In: Boon ME, Kok LP, editors. Microwave Cookbook of Pathology. The Art of Microscopic Visualization, 2nd ed. Leiden: Coulomb Press, 1988:119-121.
- 13- Umar MH, Pabuçcuoğlu HU, İnce Ü, Falakalı S. Mikroelektromanyetik dalgaların histotekniğe uygulanması. Ege Üniv Tıp Fak derg 1989; 28 (4): 1773-1780.
- 14- Kok LP, Visser PE, Boon ME. Histoprocessing with the microwave oven: an update. Histochemical Journal 1988; 20:323-328.
- 15- Boon ME, Kok LP, Qewerkerk-Noordam E. Microwave-stimulated diffusion for fast processing of tissue: reduced dehydrating, clearing and impregnating times. Histopathology 1986; 10 (3): 303-309.
- 16- Leong AS-Y. Microwave fixation and rapid processing in a large throughput histopathology laboratory. Pathology 1991; 23:271-273.
- 17- Boon ME, Kok LP. Microwaves for immunohistochemistry. micron 1994; 25(2): 151-170.



Resim 8: Kısa süreli mikrodalga ışınlı doku takibi uygulanan karaciğer. HEX160.

TABLO 1. MİKRODALGA IŞINIMLI DOKU TAKİBİ YÖNTEMLERİ*

	II. GRUP	III. GRUP
Absolü etil alkol 200 ml	%70 güçle 1 dk %10 güçle 60 dk 75±5°C	%70 güçle 1 dk %10 güçle 15 dk 75±5°C
İsopropil alkol 200 ml	%70 güçle 1 dk %10 güçle 40 dk 75±5°C	%70 güçle 1 dk %10 güçle 15 dk 75±5°C
Parafin I 200 ml	%100 güçle 1 dk %10 güçle 30 dk 60±5°C	%100 güçle 1 dk %10 güçle 10 dk 60±5°C
Parafin II 200 ml	%100 güçle 1.5 dk %10 güçle 60 dk 80±5°C	%100 güçle 1.5 dk %10 güçle 20 dk 80±5°C

*Mikrodalga ışınlı doku takibi aşamaları; Boon ve Kok'un "Microwave Cookbook of Pathology" kitabındaki method modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (12).