

KEMİK DEKALSİFİKASYONUNDA MİKRO-DALGA IŞINLAMA YÖNTEMİ*

Ö. DOĞAN (*) • L. BİLGİÇ (**) • M. DEMİRYONT (***) • G. ACUNAŞ (****)

ÖZET: Bu çalışmada kemik içeren 20 çift doku parçası klasik koşullar altında ve mikrodalga ışınlama altında dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon işlemi radyografik kontroller ile izlendi. Sonuç olarak mikrodalga ışınlamanın dekalsifikasyon süresini % 34.9-% 61.8 oranında kısalttığı belirlendi.

SUMMARY: Microwave irradiation in decalcification of human tissues, with bony or heavily mineralised, were decalcified in the acidic decalcifiers by microwave heating or conventional heating. The degree of the decalcification was monitored with standard radiographs. We determined that microwave irradiation reduced the decalcification time in between 34.9 and 61.8 percent depending on the tissue and decalcifying solution.

GİRİŞ

Kemik içeren dokuların histopatolojik olarak incelenmesi normal dokulara göre bazı farklılıklar gösterir. Patoloji laboratuvarlarının büyük bir çoğunluğunda kemik dokusu dekalsifikasyon işleminden geçirilir. Dekalsifikasyon işlemi dokunun içerdiği kemik yoğunluğuna bağlı olarak belirli bir zamana ihtiyaç göstermektedir. Dekalsifikasyon süresini kısaltmak amacıyla bugüne kadar değişik yöntemler önerilmiştir (30).

Çalışmamız, mikrodalga ışınlama yönteminin dekalsifikasyon süresi ve kesit kalitesi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla bir ön çalışma olarak planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Normal ve değişik patolojik lezyonlar içeren 40 adet otopsi veya biyopsi parçası çalışmaya alındı. Doku parçaları 1.5x1.5x0.5 cm'den büyük olmayacak şekilde Lipshow kemik kesici aleti ile kesilerek hazırlandı. Dokular normal histopatolojik takibi olanaksız kılan ve dekalsifikasyon işlemi gerektiren tamamen veya kısmen kemik ve benzeri sert yapılardan oluşmaktaydı. Tüm doku parçaları CGR DAF 550 marka ve tip mamografi aletinden sağlanan 100 KV ve 20 mAs'lık X ışını altında tutularak elde edilen radyografiler kullanılarak gruplandı ve izlendi. 40 adet doku parçası patolojik lezyon içerip içermedikleri, içerdikleri patolojik lezyonun tipi ve radyografide gösterdikleri kalsiyum yoğunluğu göz önüne alınarak ikiye ayrılmış gruplar halinde eşleştirildi, 20 çift çalışma grubu oluşturuldu. Çiftleri oluşturan parçalardan biri klasik şartlarda diğeri mikrodalga ışınlama altında dekalsifiye edilmek üzere programa alındı. Tüm doku parçaları dekalsifikasyon işleminden önce % 10'luk formaldehit solüsyonunda en az 24 saat bekletilerek tesbit edildi.

İki farklı dekalsifikasyon solüsyonu kullanıldı:

1- Formalin-nitrik asit (10 ml formalin, 10 ml derişik nitrik asit, 80 ml distile su)

2- Formalin-formik asit (10 ml formalin, 10 ml derişik formik asit 80 ml distile su).

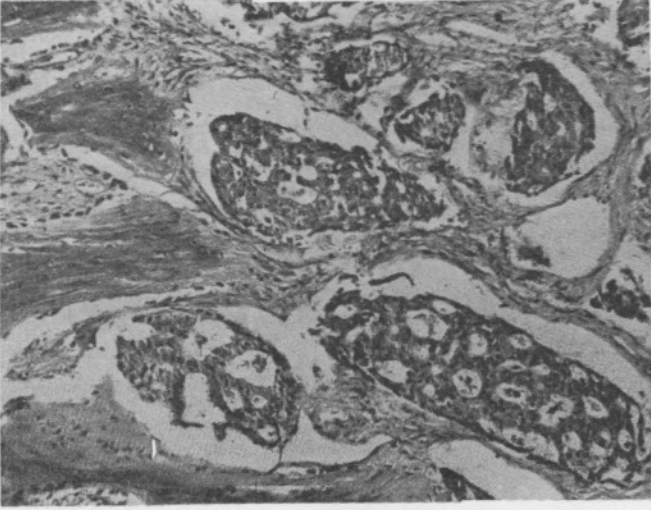
* IX Ulusal Patoloji Kongresinde bildirilmiştir (Çeşme-Izmir 1990)

* Araş. Gör. Dr. Öner Doğan: İstanbul Tıp Fak. Patoloji ABD. Çapa-İstanbul

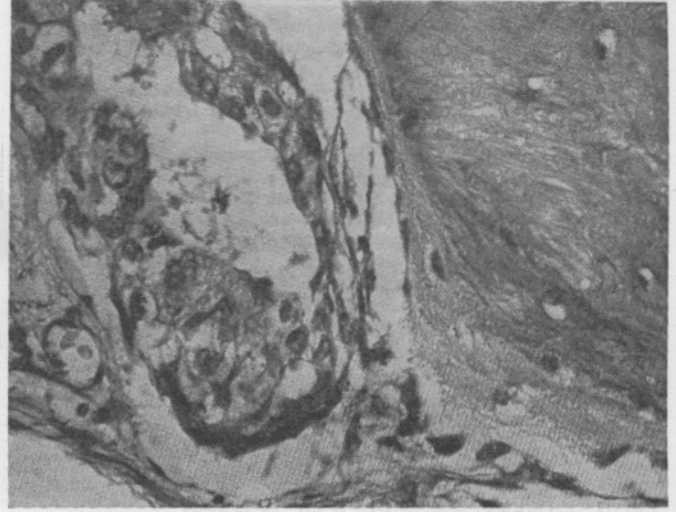
** Araş. Gör. Dr. Levent Bilgiç: İstanbul Tıp Fak. Patoloji ABD Çapa-İstanbul

*** Prof. Dr. Misten Demiryont: İstanbul Tıp Fak. Patoloji ABD. Çapa-İstanbul

**** Prof. Dr. Gülden Acunaş: İstanbul Tıp Fak. Radyoloji ABD. Çapa-İstanbul



Resim 1: Mikrodalga ısınlama altında 60°C'de formik asit dekalsifikasyonu uygulanmış kemik dokusunda meme karsinom metastazı. (X 125 HE)



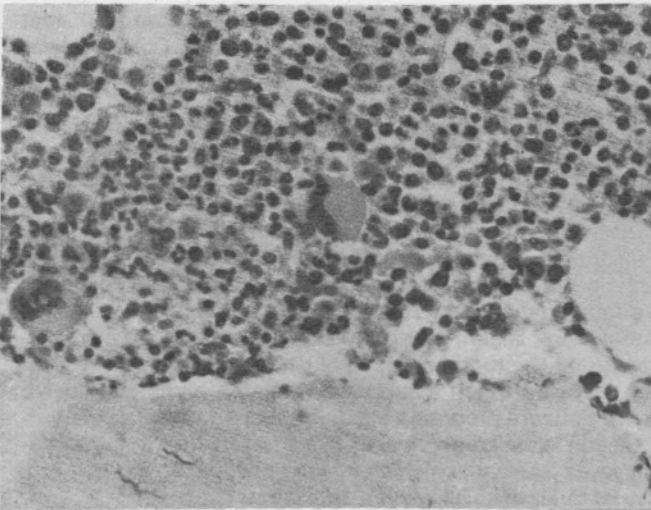
Resim 2: Mikrodalga ısınlama altında 60°C'de formik asit dekalsifikasyonu uygulanmış kemik dokusunda meme karsinom metastazı. (X 500 HE)

Mikrodalga ısınlama için klasik mutfak tipi mikrodalga fırın kullanıldı (Bosch 2010 Gourment mikrodalga fırın, sanayi dijital programlama, periodik rotatuar ısınlama özelliği).

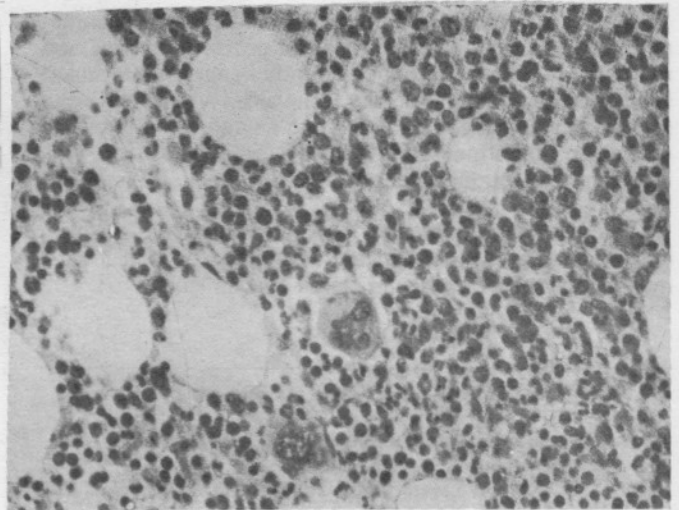
Isınlama işleminde 2450 Hz'lik mikrodalga ısınlama tam güç (600 W) kullanılarak uygulandı. Isınlama için doku parçalarının içinde hareket etmeksizin durabilecekleri 1 cm derinliğinde yuvalar içeren plastik kap kullanıldı. Her seferinde plastik kabın ortasında yer alan yaklaşık 25 cm²'lik alana konan 6 doku parçası ısınladı. Plastik kap, doku parçalarının fırının en yoğun ısınlama alanı işaretli alanı içinde kalmaları sağlanacak şekilde fırının taban kısmına yerleştirildi. Plastik kap, 2 cm sıvı derinliği oluşturacak şekilde yaklaşık 300 ml hacminde dekalsifikasyon solusyonu ile dolduruldu. Fırının her iki arka köşesi içine 300'er ml su içeren iki cam kap

konularak sıcaklığın aşırı yükselmesi önlenmeye çalışıldı. Isınlama kabı içinde ısınlanan dokuların ortasına zeminle temas edecek şekilde, renklendirilmiş alkol ile çalışan termometre konarak ısınlama sırasında dekalsifikasyon solusyonunun sıcaklık artışı izlendi. Mikrodalga ısınlama, dekalsifikasyon solusyonunun sıcaklığı 10°C'den istenilen düzeye (37°C veya 60°C) erişinceye kadar tam güç ile uygulandı. Solusyon sıcaklığı istenilen düzeye eriştiğinde ısınlama durdurulup solusyon değiştirilerek ısınlamalara devam edildi. Sıcaklığın aşırı artışı engellemek amacıyla fırının arka köşelerine konan su da sıcaklık yükseldikçe sık sık değiştirildi. Her ısınlamanın süresi kaydedilerek toplam ısınlama süreleri belirlendi.

Isınlama işleminde iki farklı dekalsifikasyon sıvısı ve iki farklı maksimum sıcaklık düzeyi kullanılarak 4 ayrı grup



Resim 3: Mikrodalga ısınlama altında 37°C'de formik asit dekalsifikasyonu uygulanmış dokuda kemik iliği hücreleri ve kemik lameli. (X 500 HE)



Resim 4: Mikrodalga ısınlama altında 37°C'de formik asit dekalsifikasyonu uygulanmış dokuda kemik iliği hücreleri (X 500 HE).

Tablo : Dekalsifikasyon Gruplarına Ait Süreleri Gösteren Tablo

		MICROWAVE	NORMAL	SÜREDE AZALMA ORANI
BİRİNCİ GRUP	37 derece C Nitrik asit (14 çift)	1020 dakika	1570 dakika	% 35.1
İKİNCİ GRUP	60 derece C Nitrik asit (2 çift)	65 dakika	170 dakika	% 61.8
ÜÇÜNCÜ GRUP	37 derece C Formik asit (2 çift)	140 dakika	215 dakika	% 34.9
DÖRDÜNCÜ GRUP	60 derece C Formik asit (2 çift)	110 dakika	175 dakika	% 37.2

koşullarda hem de mikrodalga ışınlama altında sıcaklığın 60°C'ye çıktığı gruplarda nükleus boyanmasında azalma dikkati çekti. Bu özellik nitrik asitli grupta formik asitli gruba göre daha da belirgin olup yer yer nükleus yapıları tam olarak seçilemedi.

Işınlama işlemi sırasında mikrodalga fırın çıkışından dışarı atılan asit buharları laboratuvarında çalışanları zaman zaman rahatsız edecek yoğunluğa ulaştı. Ancak asit buharı yoğunlukları kantitatif olarak ölçülmedi. Sıcak asidik dekalsifikasyon sıvılarının yenilenmesi

sırasında eldiven kullanma gereği duyuldu.

TARTIŞMA

Mikrodalgalar (mikroelektromagnetik dalgalar) 10⁹-10¹² Hertz'lik frekans 0.3 mm-30 cm'lik dalga boyuna sahip non ionizan elektromagnetik dalgalardır. Mikrodalga su ve benzeri dielektrik potansiyeli olan moleküllerin kendi frekanslarına uygun frekansta ve 180°'lik eksen üzerinde titreşim hareketleri yapmasına yol açar. Günümüzde mutfaklarda kullanılan mikrodalga fırınlar 2450 Hertzlik mikrodalga ile çalışmaktadır. Bu frekanstaki mikrodalga'nın dalga boyu vakum ortamında 12.2 cm, suda ise 1-2 cm'dir. İnsan organizması su ve diğer dielektrik potansiyeli yüksek moleküllerden oldukça zengindir. Patoloji laboratuvarlarında takip edilen doku parçalarının boyutları da genellikle 1-2 cm arasında değişmektedir. Bu iki nedenden dolayı patoloji laboratuvarlarında işlem gören doku parçaları ile mutfak tipi fırınlarda kullanılan mikrodalga arasında iyi bir anten-dalga uyumu bulunmaktadır. Bu frekanstaki mikrodalga'nın foton enerjisi 10⁻⁵ elektronvolt gibi çok düşük düzeydedir. Bu enerji kovalen bağları etkilemez, ancak hidrojen, VanderWaals ve sterik bağlar gibi non kovalen bağları etkileyebilir. Asıl etkisini dielektrik potansiyelli molekülleri saniyede 2.45 billion kez osilasyona uğratarak gösterir. Bu kadar yüksek frekanslı bir moleküler titreşim, etki altındaki tüm dokuda ani ve homojen sıcaklık artışına yol açar. Bu sıcaklık artışı sonucunda ani ve homojen olmak üzere;

1- Kimyasal-biokimyasal reaksiyonlarda aktivasyon enerji eşiğinin aşılması sağlanır, reaksiyonlar hızlanır.

2- Sıvıların viskozitesi azalır, diffüzyon ve penetrasyon hızları artar

Tüm bunların dışında mikrodalgaların direkt etki ile bazı değişiklikler yapabileceği düşünülmektedir. Ancak bu konu açıklık kazanmamıştır.

II. Dünya savaşı sırasında ve sonrasında önem kazanıp gelişen mikrodalga teknolojisi 1970'li yıllardan itibaren mutfak tipi fırınlar aracılığı ile histoteknoloji alanına da girmeye başlamıştır (2-28). 1980'li yıllarda özellikle Boon ve Leong'un çalışmaları ile Patoloji alanına girmeye başlamış, 1988 yılından itibaren Umar ve arkadaşları tarafından Türkiye'de de uygulanmaya ve yayılmaya başlamıştır (3,18,31). Patolojide mikrodalga kullanımının en çok araştırıldığı alan fiksasyondur. Klasik ışık mikroskopik (5,11,17,18,19,27,28) elektronmikroskopik (1,10,11,17,18,24,34) incelemeler için mikrodalga ışınlama ile fiksasyonun üstünlükleri belirtilmiştir. Mikrodalga ışınlama ile fiksasyonun immünohistokim-

oluşturuldu.

1- Nitrik asit çözeltisinde 37°C'ye kadar ışınlananlar (14 doku)

2- Nitrik asit çözeltisinde 60°C'ye kadar ışınlananlar (2 doku)

3- Formik asit çözeltisinde 37°C'ye kadar ışınlananlar (2 doku)

4- Formik asit çözeltisinde 60°C'ye kadar ışınlananlar (2 doku)

Bu şekilde toplam 20 doku parçası mikrodalga ışınlama altında dekalsifiye edildi.

Bu doku parçalarının eşleri de aynı solusyonlar içinde aynı sıcaklıkta (37°C veya 60°C) ancak etüvde bekletilerek dekalsifiye edildiler.

Dekalsifikasyon derecesi 5-30 dakikalık dekalsifikasyon periodları sonrası çekilen standart radyografiler ile izlendi. Kontrol radyografilerinde tamamen dekalsifiye olmuş doku parçaları geçirdikleri dekalsifikasyon süreleri hesaplanarak yıkama işlemi sonrası rutin parafin takibine alındılar. Parafin bloklardan elde edilen kesitler H.E ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendiler. İşlem tüm dokular radyolojik olarak dekalsifiye oluncaya kadar sürdürüldü. Her bir dokunun dekalsifiye olması için gerekli süre hesaplandı. Her bir dekalsifikasyon grubunda yer alan dokuların dekalsifikasyon süreleri toplanarak o gruba ait toplam dekalsifikasyon süresi bulundu.

SONUÇLAR

Birim miktardaki formik asitli dekalsifikasyon solusyonu 600 W'lık ışınlama altında 120 sn de 37°C'ye, 240 sn de 60°C'ye ulaştı. Bu süreler nitrik asit solusyonlarında 60 sn ile 120 sn idi.

1. grupta yer alan ve mikrodalga ışınlama uygulanan 14 dokunun dekalsifikasyon sürelerinin toplamı 1020 dakika idi. Bu dokuların klasik dekalsifikasyon uygulanan eşlerine ait dekalsifikasyon sürelerinin toplamı ise 1570 dakika idi. Dekalsifikasyon süresindeki azalma % 35.1 olarak bulundu.

2. grupta yer alan 2 doku çifti için bu rakamlar sırası ile 65 dak, 170 dak ve % 61.8 idi. 3. grupta 140 dak, 215 dak ve % 34.9 olarak bulundu. 4. grupta ise 110 dak, 175 dak ve % 37.2 olarak saptandı.

Sonuçların dökümü tablo I'de özetlenmiştir. H.E ile boyanmış preparatların incelenmesinde mikrodalga ışınlamanın kesit ve boya kalitesini etkilemediği görüldü. Hem klasik

yasal (1,11,21,25) ve İmmünfluoresans (17) çalışmalardaki değeri vurgulanmıştır. Bazı çalışmalarda rutin parafin takip işlemlerinin tamamı mikrodalga ışınlama altında başarı ile uygulanmıştır (3,31,32). Histokimyasal (7,10,16,26,29) İmmünhistokimyasal (6,9,20,23,33) enzim histokimyasal (12), immünfluoresans (8) boyama işlemlerinde mikrodalga ışınlama ile başarılı sonuçlar alınmıştır. Ayrıca frozen kesitlerinin kalitesini arttırmak (13,15,27) ve sitolojik materyelden hücre bloğu hazırlamak (14) amacıyla da kullanılmıştır. Mikrodalga ışınlama yöntemlerinin patoloji alanındaki uygulamaları ayrıntılı çalışmalara konu olmuştur (4,22). Patolojide mikrodalga kullanımının Türkiye'deki uygulamaları ile ilgili yayınlar bulunmaktadır (16,31,32,33).

Çalışmamızda, mikrodalga ışınlamanın asidik solusyonlar içinde yapılan dekalsifikasyon işlemini kısalttığı görülmüştür. Süredeki bu kısalmanın dekalsifikasyon sıvısının penetrasyonundaki artışa ve dekalsifikasyon sıvısı ile doku molekülleri arasındaki reaksiyonların hızlanmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Ancak çalışmamızda etki mekanizmalarını belirlemek mümkün değildir.

Yöntemimiz kesit kalitesinde bozulma olmaksızın dekalsifikasyon süresinde azalmaya yol açmakla beraber bazı olumsuz yanları ile dikkat çekmiştir. Hızlı sıcaklık artışı gösteren dekalsifikasyon sıvılarını sık sık değiştirmek gerekmiştir. Bu nedenle, devamlı gözlem ve işlem yapmayı gerektiren, otomasyondan uzak işleyiş şekli, fırının havalandırma sisteminden çıkan sıcak asit buharları ile çalışanın sempatisini kazanmaktan ve pratik olmaktan uzaktır. Programlanabilir termostat ve soğutma sistemi içeren otomatik solusyon değiştirme işlemi yapabilen, çalışma ortamına zarar veremeyen bir havalandırma sistemine sahip laboratuvar tipi özel fırınların kullanıma girmesi ile sorunlar giderilebilecektir.

KAYNAKLAR

- Armati PJ, Pollard JD, VanReyk D, et al: Neuroimmunological electron microscopy with microwave-accelerated fixation. *J. Immunological Methods* 110: 267-269 (1988).
- Bernard GR: Microwave irradiation as a generator of heat for histological fixation. *Stain Technol* 49: 215-224 (1974).
- Boon ME, Kok LP, Quwerkerk-Noodman E: Microwave stimulated diffusion for fast processing of tissue: reduced dehydrating, clearing and impregnating times. *Histopathology* 10: 303-309 (1986).
- Boon ME, Kok LP: Microwave cookbook of Pathology. Leiden: Coulomb Press Leyden (1987).
- Boon ME, Marani E, Adriolo PJM, et al: Microwave irradiation of human brain tissue: production of microscopic slides within one day *J Clin Path* 41: 590-593 (1988).
- Boon ME, Kok LP, Moorlag HE, et al: Accelerated immunogold silver and immunoperoxidase staining of paraffin sections with the use of microwave irradiation. *Am J Clin Pathol* 91: 137-143 (1989).
- Brinn NT: Rapid metallic histologic staining using the microwave oven. *J Histotechnol* 6: 125-129 (1983).
- Chiu KY, Chan KW: Rapid immunofluorescence staining of human renal biopsy specimens using microwave irradiation. *J Clin Pathol* 40: 689-692 (1987).
- Chiu KY: Use of microwaves for rapid immunoperoxidase staining of paraffin sections. *Medical Lab. Sciences* 44: 3-5 (1987).
- Hafiz S, Spencer RC, Lee M, et al: Use of microwaves for acid and alcohol fast staining. *J Clin Pathol* 38: 1073-1076 (1985).
- Hopwood D, Coghill G, Ramsay J et al: Microwave fixation: its potential for routine techniques, histochemistry, immunocytochemistry and electronmicroscopy. *Histochem J* 16: 1171-1191 (1984).
- Kalicharan D, Hulstaert CE: Light microscopical visualization of phosphatase activities demonstrated with cerium method in resin sections of the kidney with the microwave oven. *Histochemistry* 90: 485-487 (1989).
- Kennedy A, Foulis AK: Use of microwave oven improves morphology and staining of cryostat sections *J Clin Pathol* 42: 101-105 (1989).
- Kok LP, Boon ME, et al: The application of a microwave technique for the preparation of cell blocks from sputum. *J Microsc* 144: 193-199 (1986).
- Kok LP, Boon ME, Suurmeijer AJH: Major improvement in microscopic-image Quality of cryostat sections. *Am J Clin Pathol* 88: 620-623 (1987).
- Küpelioğlu AA, Gökden N, Gökden M, Özden M: Mikrodalga ışınlamaları parafin kesitlerin boyanmasına etkisi. *Türk Patoloji Dergisi* 5: 7-11 (1989).
- Lai Fmm, Lai KN, Chew EC, et al: Microwave fixation in diagnostic renal pathology. *Pathology* 19: 17-21 (1987).
- Leong AS-Y, Daymon ME, Milios J: Microwave fixation as a form of fixation for light and electron microscopy. *J Pathology* 146: 313-321 (1985).
- Leong AS-Y, Duncis CG: A method of rapid fixation of large biopsy specimens using microwave irradiation. *Pathology* 18: 222-225 (1986).
- Leong AS-Y, Milios J. Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation. *J Pathology* 148: 183-187 (1986).
- Leong AS-Y, Milios J, Duncis CG: Antigen preservation in microwave irradiated tissues: A comparison with formaldehyde fixation *J Pathol* 156: 275-282 (1988).
- Leong AS-Y: Microwave irradiation in histopathology. *Pathol Annu* 23 (part 2): 213-234 (1988).
- Leong AS-Y, Milios J. Accelerated immunohistochemical staining by microwaves. *J Pathology* 161: 327-334 (1990).
- Login GR, Dvoak Am: Microwave energy fixation for electron microscopy. *Am J Pathol* 120: 230-243 (1985).
- Login GR, Schnitt Sd, Dvork Am: Rapid microwave fixation of human tissues for light microscopic immunoperoxidase identification of diagnostically useful antigens. *Lab Investigation* 57: 585-591 (1987).
- Loughman NT: Pneumocystis carinii: Rapid diagnosis with the microwave oven. *Acta Cytologica* 33: 416-417 (1989).
- Marani E, Boon ME, Adriolo PJM, et al: Microwave-cryostat technique for neuroanatomical studies. *J Neuroscience Methods* 22: 97-101 (1987).
- Mayers CP: Histological fixation by microwave heating. *J Clin Pathol* 23: 272-275 (1970).
- Moorlag H, Boon ME, Kok LP: Microwave methods for reducing staining time to seconds. *Stain Technology* 62: 357-360 (1987).
- Page KM: Bone and preparation of bone section In: Theory and practice of histological techniques. Ed: Bancroft, J. Stevens A. 2nd ed. Edinburgh. London Melbourne New York (1982) 297-331.
- Umar HM, Papuçcuoğlu U. Ince Ü, Falakalı S: Mikro elektromagnetik dalgaların histotekniğe uygulanması. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 28: 1773-1780 (1989).
- Umar H, Papuçcuoğlu U, Öcal D: Histoteknikte modifiye mikrodalga metodu. *Türk Patoloji Dergisi* 6: 67-70 (1990).
- Yörükoğlu K, Ozan E: Mikro elektromagnetik dalgaların immunoperoxidaz boyamada kullanımı. *Türk Patoloji Dergisi* 6: 71-72 (1990).
- Wild P, Krahenbühl M, Schraner AM: Potency of microwave irradiation during fixation for electron microscopy. *Histochemistry* 91: 213-220 (1989).

TEŞEKKÜR: Mikrodalga fırın alımını sağlayan Karaköy Lioness klübe teşekkür ederiz.