

## Standardization in the process of histopathological diagnosis – Histopatolojik tanı sürecinde standardizasyon

Öner Doğan

*Department of Pathology, Istanbul University, Faculty of Medicine, Istanbul, Turkey*

*Accepted for publication on 15 December 2004*

Histologic diagnosis of most diseases and achieving the best information for clinicopathological parameters require a maximum success in the interpretation of the biopsies. The responsibility of this procedure mostly belong to the pathologists. But, this responsibility is not only limited to routine morphological analysis. A team work approach is needed, and therefore, the pathologists' performance is based on higher quality in their own departments.

To standardize the quality of histopathological diagnoses in Turkey, the communications between clinicians and pathologists should reach to a significant level. The second step is strengthening the pathologists' consciousness on their responsibilities, and developing the essential constructions. In this article, some issues of this construction, particularly concerning the fixation are detailed.

Hastalıkların önemli bir bölümünde tanı koymanın ve klinikopatolojik parametreler konusunda yeterli düzeyde bilgi edinmenin yolu, biyopsi örneklerinin en iyi şekilde değerlendirilmesinden geçer. Bu sürecin sorumluluğunu büyük ölçüde patoloğlar yüklenmiştir. Ancak, patoloğ sorumluluğunun sadece morfolojik özelliklerin belirlenmesi ile sınırlı olduğu dönem artık kapanmıştır. Multidisipliner çalışmayı gerektiren bu süreçte patoloğların başarılı olabilmesi için sadece kendi laboratuvar dünyalarında verimli çalışıyor olması yeterli değildir.

Ülkemizde hastalıkların histopatolojik tanısında bir standarda ulaşılması isteniyorsa, öncelikle klinisyen ile patoloğ arasındaki ilişkilerin yeterli düzeye getirilmesi gerekir. İkinci aşama, patoloğların biyopsi materyalinin değerlendirilmesi konusunda ne derece önemli bir kavşakta sorumluluk yüklendiklerinin bilincine varmaları ve bu pozisyona en uygun yapılanmaya gitmeleridir. Bu makalede bu yapılanma ile ilgili bazı özellikler ve özellikle dokuların tespiti gözden geçirilmektedir.

### Giriş

Hastalıkların önemli bir bölümüne tanı koymanın ve klinikopatolojik parametreler konusunda yeterli düzeyde bilgi edinmenin yolu, biyopsi örneklerinin en iyi şekilde değerlendirilmesinden geçer. Bu sürecin sorumluluğunu büyük ölçüde patoloğlar yüklenmiştir. Ancak, patoloğ sorumluluğunun sadece morfolojik özelliklerin belirlenmesi ile sınırlı olduğu dönem artık kapanmıştır. Günümüzde patoloğlar, teknolojik

gelişmelerin yarattığı inceleme ve değerlendirme yöntemlerinin biyopsi örneklerine uygulanmasında, programlayıcı-örgütleyici uygulayıcı ve yorumlayıcı roller de üstlenmek durumundadır. Patoloğlardan lezyonların sadece morfolojik özelliklerini belirlemesi değil, lezyonu morfolojik-antijenik-genetik özellikleri ile klinikopatolojik bir antite halinde tanımlaması istenmektedir. Multidisipliner çalışmayı gerektiren bu süreçte patoloğların başarılı olabilmesi için sadece

kendi laboratuvar dünyalarında verimli çalışıyor olması yeterli değildir.

Günümüz tıbbında tanıya gidiş sürecini, bir yap-boz resmine ait parçaların doğru olarak birleştirilmesi ve meydana gelen resmin tanınmasına (daha önce tanımlanmış resimlerden yani klinikopatolojik antitelerden hangisine uyduğunun belirlenmesine) benzetmekteyim. Resim parçacıklarının (puzzle'ların) her biri değişik kaynaklardan elde edilir. Hastanın yaşı, cinsiyeti, yaşadığı yer, yaptığı iş vb. kimlik bilgileri; öz geçmiş özellikleri, başvuru şikayetleri, hastalık semptomları, fizik muayene bulguları, radyolojik-hematolojik-biyokimyasal incelemelere ait sonuçlar, hastalığın seyri ve nihayet biyopsi örneğinin incelenmesi ile ulaşılan bilgilerin her biri resmin yani tanının bir parçasını oluşturur. Patolojinin temel olarak sağladığı resim parçası “patolojik lezyonun morfolojik özellikleri” dir. Günümüzde buna immünohistokimyasal ve genotipik özellikleri de eklemek mümkündür. Patoloğun görevi, biyopsi örneğinin morfolojik, antijenik, genotipik özelliklerini içeren resim parçalarını klinisyene iletmekle sınırlı olabilir. Tanı için hangi parçaların gerekli olduğunun belirlenmesi, bu parçaların değişik disiplinlerden talep edilmesi, elde edilen parçaların birleştirilerek bir resim oluşturulması ve sonuçta bu resmin tanımlanması görevi klinisyene bırakılmalıdır. Ancak günümüzde tanının konmasında “resmi tanımlama” işlemi büyük ölçüde patoloğdan istenmektedir. Bazı durumlarda alınan biyopsi örneğinin morfolojik incelemesi sonucunda elde edilen resim parçası, bütün resmin en tipik en belirleyici parçası olabilir. Böyle bir durumda patolog sadece bu parçacığa bakarak resmin bütününün ne olduğunu doğru bir şekilde tahmin edebilir. Ancak yine de diğer parçalardan da haberdar olarak tahmini tanısını doğrulamak ister. Bazı durumlarda ise patolojinin sağladığı resim parçası ana resmin tipik-tanımlayıcı parçası değildir. Bu parça tek başına hiçbir anlam taşımaz. Ancak diğer parçalar ile birleştirilirse tanı koydurucu olabilir veya tanıya gidişte hangi parçaların gerekli olduğuna dair ipuçları verebilir. Bu aşamada klinisyen ile patolog arasında mutlaka bir bilgi alışverişi olmalıdır. Briç oyunundaki deklarasyona benzetilebilecek bir bilgi alışverişi düşünülebilir. Her iki taraf da ellerindeki “kart veya puzzle”ların özelliklerini birbirlerine ne derecede doğru, yeterli ve

ekonomik şekilde iletirse o derecede kısa yoldan “resmi tamamlayabilir”, en uygun oyun programını birlikte oluşturabilir, grand şleme gidebilirler.

Sonuç olarak

- 1- Klinisyen, biyopsi gönderirken elindeki klinik bilgileri mutlaka patolog ile paylaşmalıdır.
- 2- Patolog, temel görevi olan morfolojik incelemeyi en iyi şekilde yapmalı, ayrıca elde ettiği sonuçlar ile kendine iletilen bilgileri birleştirerek tanıya gidişte hangi ek incelemelere ihtiyaç duyulduğuna karar vermeli, bu incelemeleri yapmalı veya yapılmasını sağlayacak hareket planını oluşturabilmelidir. Elde ettiği bilgileri, karşılıklı bilgi akışının devamını sağlamak için en kısa süre içinde klinisyene iletmelidir.
- 3- Klinisyen ile patolog arasındaki bilgi paylaşımı, briç oyunundaki deklarasyona benzer şekilde birbirini indükleyerek sürmelidir

Ülkemizde hastalıkların histopatolojik tanısında bir standarda ulaşılması isteniyorsa, öncelikle klinisyen ile patolog arasındaki ilişkilerin yukarıda tanımlanan çizgiye getirilmesi gerekir. İkinci aşama, patoloğların biopsi materyalinin değerlendirilmesi konusunda ne derece önemli bir kavşakta sorumluluk yüklendiklerinin bilincine varmaları ve bu pozisyona en uygun yapılanmaya gitmeleridir. Öncelikle bu yapılanma ile ilgili bazı özellikleri gözden geçirmekte yarar vardır.

### **Biopsinin alınışı ile ilgili özellikler, sorunlar ve öneriler**

- 1- Ülkemizdeki biopsi indikasyonları belirsizdir. Biopsi öncesi yapılması gereken incelemeler yapılmadan biopsi yapılabilmektedir. Bazı biopsilerin objektif gerekçelere dayanmadan yapıldığı söylenebilir. “Biyopsi yapılması gerekli midir, hangi sorulara yanıt aramak için yapılacaktır, ayırıcı tanı listesindeki tabloların hangilerinin ayırımında yararlı olabilecektir. Morfolojik inceleme dışında hangi ek incelemelere ihtiyaç duyulabilecektir. Bu incelemelerin yapılması mümkün müdür, nerede yapılabilir, biyopsi materyali nereye gönderilmelidir, gönderme koşulları ne olmalıdır” gibi pek çok önemli soru, biyopsi alınmadan önce üzerinde düşünülecek konulardır. Bu soruların

cevabı aranmalı gerekirse biyopsiden önce patoloğ ile bağlantı kurulmalıdır.

- 2- Ne tür bir biyopsi alınacaktır (eksizyonel, insizyonel, tru-cut, ince iğne aspirasyonu)? Bu tür bir biyopsi tanıya gidişte yeterli ve gerçekçi midir? Bu konuda patoloğ ne düşünmektedir, patoloğün tecrübesi ve imkanları yeterli midir? Son yıllarda radyolojik görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi ile tru-cut ve ince iğne aspirasyon biyopsileri giderek yaygınlık kazanmaktadır. Ancak materyal miktarının az oluşu nedeniyle zaman zaman morfolojik bulguların güvenilir şekilde yorumlanması ve ek inceleme tekniklerinin geniş şekilde kullanılması mümkün olmamaktadır. Materyalin tanı için yeterli miktarda doku içerip içermediği ve verimlilik düzeyi patoloğ tarafından en kısa süre içinde klinisyene bildirilmeli ve duruma göre yeni bir biyopsi programı gecikilmeden devreye sokulmalıdır. Yeterlilik konusundaki ön inceleme bazen intraoperatif değerlendirme ile yapıp sonuç en hızlı şekilde verilebilir. İnce iğne aspirasyon incelemeleri de bu açıdan değer kazanmış ve yaygınlaşmıştır.
- 3- Biyopsi nereden alınacaktır? Hangi doku patolojiktir ve hastalığı en iyi şekilde yansıtabilecektir. Bu konuya dikkat edilmeksizin rasgele biyopsi alınması veya sadece cerrahın inisiyatifine bırakılması doğru değildir. Bazen tanı koydurucu dokuya ulaşmak için çok sayıda biyopsi yapılması gerekmektedir. Bu gerçek, klinisyen ve hasta tarafından hoşgörü ile karşılanmalıdır.
- 4- Çok iyi bir cerrahi tekniğin uygulanması şarttır. Biyopsi, mutlaka tecrübeli bir cerrah tarafından yapılmalı, dokuya mümkün olduğunca az hasar verilmeli ve öncelikle eksizyonel biyopsi yapılmaya gayret edilmelidir. Ülkemizde patoloğların yaşadığı önemli güçlüklerden biri de gönderilen materyalin uygun olmayan koşullarda tecrübesiz kişilerce alınmış, çoğu kez miktar olarak yetersiz, mekanik-termal etkilerle hasara uğramış insizyonel doku parçaları olmasıdır. Patoloğlar, kalite ve kantite bakımından yeterli olmayan materyalde aşırı bir zorlama ile ve yüksek risk alarak tanı koyma gayreti içine girmektedir. Bu çabanın doğru olmadığını hem klinisyen hem de patoloğ tarafından kabul edilmesi, klinisyenin

tanı koyma konusunda patoloğ baskı altına almaması, patoloğün da tanı ve yorumda aşırı zorlamalardan kaçınıp gerçekçi davranması gerekir.

### Doku örneğinin değerlendirilmesi

Alınan doku örneği, doğrudan doğruya patoloji laboratuvarına gönderilebilir veya patoloğdan intraoperatif ön değerlendirme yapması istenebilir. Ülkemizde intraoperatif değerlendirme geleneği genellikle bulunmamaktadır. Doğru olan taraf bu yöntemden mutlaka doğru tanı ve doğru sınıflamanın beklenmemesi gerektiğidir. Ancak yöntem tamamen gereksiz ve yararsız da değildir. Tanıya gidişte materyalin yeterli olup olmayacağı ve elde edilen materyalin en uygun şekilde nasıl değerlendirileceğine dair bir plan yapılmasını sağlayabilir. Asıl yararlı tarafı, materyalin yeterli olup olmayacağı konusundaki kararın, henüz operasyon yapabilmeye şansının olduğu bir ortamda cerraha bildirilebilmesidir. Dokundurma, kazıma-yayma preparatlar veya cryostat kesitler incelenerek yorum yapılır. Cryostat kesit yapmak üzere dondurulan parçaların daha sonra rutin parafin blok takibi ve klasik morfolojik inceleme için kullanılmasında bazı sakıncalar vardır (donma-çözünme artefakları). Bu dokuların diğer amaçlar ve yöntemler için kullanılması daha uygundur. Tablo 1’de hangi yöntemler için hangi dokuların uygun olduğu özetlenmektedir.

### Doku örneğinin gönderilmesi

- 1- Doku, kısa bir süre içinde laboratuvara ulaştırılacak bile olsa, mutlaka kurumasına imkan tanımayacak bir ortamda gönderilmelidir. Ülkemizde oldukça sık yapılan önemli hatalardan biri, dokunun gazlı bez içine sarılarak gönderilmesidir. Gazlı bez içine sarılmış, düzensiz-parçalı eksizyonlar, insizyonel parçalar ve tru-cut materyallerinde geri dönüşümsüz hasarlar oluşmaktadır. Mecbur kalınırsa, dokunun sarıldığı gazlı bez mutlaka serum fizyolojik ile önceden ıslatılmış olmalıdır.
- 2- Kısa bir süre içinde ulaştırılabilecek dokular serum fizyolojik içinde, diğerleri ise otolizin önlenmesi için fiksatif içinde gönderilmelidir. Soğuk ortam otolizi geciktirir. +4°C’de, serum fizyolojik içinde 24 saat beklemiş dokularda bile morfolojik olarak

yeterli sonuçlar alınabilmekte, umulmadık şekilde bazı antiijenlerin varlığı saptanabilmektedir.

- 3- Kısa süre içinde laboratuara ulaştırılamayacak dokular mutlaka fiksatif içine konulmalıdır. Fiksatif seçimi patoloğun tercihinine ve yapılacak ek inceleme yöntemlerinin özelliklerine bağlı olarak değişebilir. Bu seçim, patolog ile konuşularak yapılmalıdır. Materyal değişik amaçlar için bölünerek değişik fiksatifler içine konulabilir. Ancak nötral tamponlanmış %10'luk formalin çözeltisi pek çok amaç için uygun bir fiksatifdir.
- 4- Materyal, aynı amaç için birden fazla sayıda laboratuara bölünerek gönderilmemelidir. Materyalin tamamı tek bir laboratuara gönderilmelidir. Ülkemizde bu konuda zaman zaman yanlış uygulamalara rastlamaktayız.
- 5- Materyalin konulacağı fiksatifin (nötral tamponlu %10 luk formalin) her hafta taze olarak hazırlanması, bekletilmiş fiksatiflerin kullanılmaması, fiksatif çözeltisinin hazırlanması işinin mutlaka bu konuda eğitim görmüş güvenilir bir personele yaptırılması gerekir. Yeterli kalitede güvenilir fiksatifin bulunmadığı durumlarda fiksatif ihtiyacı patoloji laboratuvarından istenilerek karşılanmalıdır. Bu konularda da ülkemizde yanlış uygulamalara oldukça sık olarak rastlamaktayız.
- 6- Formalin çözeltilerinin bulunmadığı ortamlarda, hastanelerde en kolay bulunan fiksatif alkollerdir. Ancak özellikle yüksek gradlı veya absolu alkoller, hücrelerde büzülme artefaktına, dokularda kuruma ve sertleşmeye yol açtıkları için morfolojik incelemelerde tercih edilmezler. Genotipik incelemeler için uygun fiksatiflerdir. Mecbur kalınırsa absolu alkol yerine %70–80 lik alkoller kullanılabilir. Ülkemizde bu konuda dahatalı uygulamalara rastlamaktayız.
- 7- Bu başlık altında, bir kez daha belirtilmekte yarar görüyorum, **“biyopsi materyali, klinik bilgilerin ve ayırıcı tanı listesinin bulunduğu bir gönderme formu eşliğinde gönderilmelidir”**. Ne yazık ki, ülkemizde bu konuya en ileri merkezlerde bile yeterince dikkat edilmemektedir. Patologların klinisyenlerden ortak ve öncelikli isteği; tanıya gidiş sürecine “pas” diyerek değil “iki sanzatu” ile başlamaları, yani “biyopsi

indikasyonu koyduran klinik tablo bilgilerini patoloğa bildirmeleridir.”

- 8- Materyalin konulacağı kapların alışılmış amatöerce seçeneklerden kurtarılıp profesyonelce düşünüldüğü planlanmış ve üretilmiş ürünlerden seçilmesinin zamanı gelmiştir. Artık ülkemiz ticari piyasasında bu ürünleri kolayca temin etmek mümkündür. Gazlı bezde kurumuş dokular, bir türlü açılmayan flasterler, dar boyunlu şişeye tıkıştırılmış ve ancak şişe kırılarak çıkarılabilen biyopsi parçaları, neredeyse koklatırcasına sanki esirgenerek konulmuş az miktardaki fiksatifli tamamen içmesine rağmen tespit olamayıp kokuşan küretaj materyalleri, altından kan sızan naylon poşetler, sızan kan ile okunmaz duruma gelmiş “gönderme kağıtları”. Daha sıralamamı ister misiniz? İsterseniz biraz da siz anlatın, belki açılırsınız. Bu sıkıntıların giderilmesi için birazcık para, daha çok inatçı bir isteğe ihtiyaç var. Kolay gelsin.

### Doku örneğinin kabulü

Materyalin patoloji kurumuna kayıt işlemleri bilgisayar ortamında eskiye göre daha sağlıklı bir şekilde yapılabilmektedir. Ancak kayıt- materyal kabul bürosundaki elemanların materyallerin tanımlanması, numaralandırılması, tasnif edilmesi, fiyatlandırılması gibi teknik- terminolojik konularda eğitilmiş olması, çok büyük sorunlara yol açabilecek kayıt karışıklığına meydan vermeyecek derecede dikkatli olması, özellikle kamu kurumlarında çalışan elemanların ise bürokrasi çarkı içinde oradan oraya savrulmuş patlamaya hazır bir bombaya benzeyen hasta yakınları karşısında derviş sabrına sahip birer halkla ilişkiler uzmanı olması beklenmektedir. Böyle bir elemanın varsa değerini bilin, onu hoş tutun, ödüllendirin. Bana da haber verin. Elimde Sovyet Rusya döneminden kalma çok sayıda nişan- madalya vs. var. İşe yararsa size verebilirim.

### Doku örneğinin makroskopik incelenmesi

Materyalin makroskopik özelliklerinin kaydedilmesi ve doku örneklerinin alınması işlemi, belki de çalışma koşullarının en kötü olduğu ortamlarda yapılmaktadır. Sorarım size, hanginiz makroskopi saatinin gelmesini sabırsızlıkla bekliyorsunuz. Ayaklarınız geri geri gitmiyor mu? “Yo, hiç bile, ben makroskopi saatini

iple çekerim” mi dediniz. O zaman bir madalya da siz hak ettiniz. Artık çıplak ellerin tuttuğu kör bıçaklarla, alkolde beklemekten taşlaşmış uterusları kesme dönemi bitmiştir. Tıkanmış lavabolar içinde kendi pisliğinde boğulmuş kolonları açarken iç bulantımı bastırmak için her seferinde nefes tutma rekorumu biraz daha geliştirdiğim günler benim için çok geride kaldı. Ancak pek çok meslektaşım için bu koşulların devam ettiğini biliyorum. Formalin kokusunu az daha unuttuyordum. Herhalde artık alıştım, bu koku sanki yaşadığımızın bir parçası oldu. “Bu kokuya nasıl dayanıyorsunuz oğlum” diye soran anneme boş gözlerle “ne kokusu” diye sorduğumu hatırlıyorum. Artık doku öğütücüsü takılmış tıkanmayan lavaboları, tezgah üzerine çöküp gözlerimi ve genzimi duyarsızlaştırırcasına yakan formalin buharını çekip alan set üstü aspiratörleri ve sele boğup götüren su fiskiyeleri ile donatılmış modern makroskopi üniteleri, ülkemizde de başarı ile üretilip kullanılmaya başlamıştır. Nasıl modern bir mutfak tezgahı, yemek yapma işini bir zevk, bir sanat haline getirme fırsatı yaratırsa, modern bir makroskopi ünitesi de patolojinin bu çok önemli işini bir işkence olmaktan çıkarıp keyifli bir hale getirebilir. Bu tür ünitelere eklenen ses kayıt ve dijital görüntü kayıt sistemleri ile materyalinizin makroskopik özelliklerini görüntülemek ve bu görüntüleri en etkileyici ses tonunuzu ve edebiyat yeteneğinizi kullanarak anlatmak mümkün olmaktadır. Sanat gücünüzü gösterebilir belki de bir video klip yapar televizyondaki “bilim damlaları” programında yayınlatabilirsiniz. “Böyle mi olacaktı? diş gebeliğin sonu”.

Biyopsi materyallerinin nasıl inceleneceği, nasıl tanımlanacağı ve nasıl örnekleneceği konusunda artık klasikleşmeye başlayan uygulama kalıpları bulunmaktadır. Bu kalıpları beğenmiyorsanız kendi materyalinize kendi kalıbınızı basabilirsiniz. Bu yazıda kalıbınıza itiraz etmeye niyetim yok. Ancak genellikle ihmal edilen bazı özellikleri kaydetmekte yarar var.

Biyopsi tarihi, biyopsiyi takibe alış tarihi ve bu süreç içinde dokunun hangi ortamda (gazlı bez) ve hangi fiksatifte kaldığı not edilmelidir.

Ayrıca doku örneklerinin mümkün olduğunca ince alınması konusunda ısrarcıyım. Takibe alınan doku örneklerinin 3–5 mm den daha kalın olmamasına özen gösterilmelidir. Sevgili teknisyen arkadaşlar,

birlikte çalıştığımız sevgili patologunuz 5 mm den kalın “pabuç gibi” parçalar alıp bunları takip kasetlerine gizli gizli tıkıştırılmaya kalkarsa, ki yaparlar, şiddetle karşı çıkın. Yaratıcı gücünüzü kullanın, isterseniz büyü yapın ama ne yapın ne edin bu girişimi engelleyin. Sakın ola ki kendinizi kendinize ve millete kanıtlamak için “inceltmenize gerek yok doktor hanım, isterseniz pabucun 44 numaralısını da verebilirsiniz ben kesebilirim demeyin”, pabucu ters giymeyin. Çünkü iyi bir doku takibi yapabilmek için ilk ve temel adım tespit ve takip sıvılarının “penetrasyon derinliği” konusunu göz önüne alıp dokuları ince dilimler halinde takibe almaktır. Dikkat ederseniz modern takip kasetleri eski çelik takip kasetlerine göre çok daha incedir. Bu değişiklik “kasetler daha az yer kaplasın”, “takip makinelerine daha çok kaset daha çok doku yükleyelim” diye yapılmamıştır. Amaç dokuların zorla ince dilimler halinde örneklenebilmesini sağlamaktır. Doku örneğinin kaset duvarları ile arasında boşluk kalacak düzeyde ince olması için gayret gösterin, dokuları kasetlere “sıkış tepiş” tıkıştırarak kadar kalın almayın. “Dokuyu ince kesemiyorum, sanki doku şişiyor, bıçağın altından kaçıyor, yetti be! Ancak bu kadar ince kesebiliyorum, ne yani Migros şarküteri salam reyonundan Öner Kılıkırkyarandoğan’ı mı çağıralım” demeyin. Taze, yumuşak, ödemli dokuların ince dilimlenmesi zordur, ısrar ederseniz dokuyu hırpalar, perişan ederseniz. Dokuyu tespit çözültisi içine alın. İnce homojen-düzgün bir şekilde kesebilecek kıvama gelinceye kadar dokunun dış tabakasının sertleşmesini bekleyin (5–15 dakika). Bekleme süresi koagülatif fiksatiflerde oldukça kısa formalin çözültülerinde ise nispeten uzundur. Bu işlem mikrodalga fırın içinde ışınlanarak da yapılabilmektedir. Bunun için özel üretilmiş doku taşıyıcısı ile donatılmış laboratuvar tipi mikrodalga fırınlar bulunmaktadır. Sefil asistanlık dönemimde yağlı aksiller küretaj materyallerini yağlı mezenter dokularını mikrodalga fırında bir güzel pişirir, sonra da sertleşmiş ve bembeyaz olmuş lenf nodüllerini yumuşak sarı renkteki yağ dokusu içinden armut toplar gibi kolayca ayıklar ve ince ince doğurdum. Su ve benzeri bipolar molekül miktarı yağ dokusunda az, buna karşı lenf nodüllerinde nispeten fazla olduğundan lenf nodülleri mikrodalga enerjisini ısı enerjisine çevirerek absorblar. Hızla ısınırlar ve pişerler. Yani ısı

enerjisi ile "koagülatif fiksasyona maruz kalırlar". Bu işlem dokunun büyüklüğüne göre 1–5 dakika içinde tamamlanabilmektedir. Denemenizi tavsiye ederim. Sıcaklığı 50–60 derecenin üstüne çıkarmayın, yemeği yakıp lezzetini kaçırmayın.

Kullanılan bıçakların uygun yapıda olması dokunun hırpalanmadan dilimlenmesi açısından önem taşır. Bıçağın profili mümkün olduğunca ince ancak buna karşılık stabilitesi yeterli düzeyde olmalıdır. Bıçak uzunluğu ve bıçağın eni kesilecek dokunun boyutlarına göre ayarlanmalıdır. Ancak pratik uygulamalarda 8–24 cm uzunluğundaki "low" profil mikrotom bıçakları, uygun birtutucu sap modülüne monte edildiğinde biyopsi örneklerinin çoğunun dilimlenmesinde yeterli olmaktadır. Bu bıçakların fiyatları oldukça yüksektir. Bazı kurumlar bu bıçakları bırakın makroskopide kullanmayı mikrotom kesit işleminde kullanmak için bile zor buluyorlar. Bu durumda makroskopi sırasında hiç kullanılmamış bıçak kullanmak yerine mikrotom kesit sırasında kullanılmış, atılacak bıçakları kullanmak bir çözüm olabilir. Bistüri kullanımı her zaman iyi sonuç vermeyebilir. Bistürilerin bıçak uzunluğu bazı büyük dokuların homojen olarak dilimlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Traş bıçağı kullanımı, bıçağın stabilitesinin yetersiz olması nedeniyle bazı durumlarda uygun değildir. Bu işlemde en önemli özellik bıçağın keskin olması ve kesim hareketlerinin doğru yapılmasıdır. Bıçak hiçbir şekilde doku içine doğru bastırılarak-itererek ilerletilmemelidir. Bıçak öne-arkaya homojen olarak hareket ettirilmeli, bu sırada bıçak mümkün olduğunca bizim itme kuvvetimizle ve hızla değil, yavaş yavaş ve neredeyse kendiliğinden ilerliyormuş gibi doku içine doğru yol almalıdır. Bu sırada dokunun geniş yüzeyi kesim tahtası üzerinde olmalı, diğer elimiz dokunun dış yüzeyini mümkün olan en az basınç kullanarak ve ezip sıkıştırmadan sabitlemelidir (Bu işlemin kolayca yapılabilmesi için basit kesim makineleri üretilmiştir.). Bu işlem sırasında doku hiçbir zaman kuru bir kesim tahtası ile temas ettirilmemelidir. Kesim tahtası serum fizyolojik veya fiksatif çözeltisi ile ıslatılmış olmalıdır.

### **Dokundurma preparatlarının hazırlanması**

Doku dilimleri, taze kesit yüzeyleri üstte bakacak şekilde kesim tahtasına dizilir. En geniş yüzeye sahip

olan ve patolojik değişiklikler gösteren dilimlerin yüzeyindeki serum ve kan gibi fazla sıvı bir lam kenarı veya kurutma kağıdı ile nazikçe silinir. Lam, kesit yüzeyine dokundurularak yüzeydeki hücre tabakasının lam yüzeyine alınması sağlanır. Lam aşırı bir kuvvetle bastırılmamalı ve yanal hareketler yapılmamalıdır. Dokundurma süresi, az hücre veren dokularda uzun, çok hücre veren dokularda kısa tutulmalıdır. İlk dokundurma preparatına alınan hücre miktarına göre daha sonraki lamaların dokundurma süreleri ayarlanabilir. Bol hücre taşıyan nispeten kalın tabakalı preparatlar yaş fiksasyon ile fikse edilmelidir. Genellikle ilk dokundurmalar hücreden zengindir, yaş fiksasyona alınır. Son dokundurmalarda ise hücre tabakası incedir, havada kurutularak fikse edilirler. Yaş fiksasyon, preparatlar derhal %96 lık etanol içine alınarak yapılır. Bu preparatlar PAP ve/veya HE yöntemi ile boyanarak incelenirler. Havada kurutulan preparatların bir kısmı absolu metanol içine alınarak tespit edilir. Metanolün mutlaka taze, saf ve kaliteli olmasına dikkat edilmelidir. Bu preparatlar Romanowsky boyaları ile (MGG vb) boyanarak incelenirler. Havada kurutulmuş preparatlardan bir kısmı ise kapaklı lam kutuları içinde, -20°C veya -86°C'de antijenik-genotipik incelemeler için saklanabilirler. Preparat sayısı vakanın özelliklerine ve incelemeyi yapan birimin imkanlarına göre ayarlanır.

### **Özel incelemeler için örnek alınması**

Yukarıda rutin histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için gerekli dokuların parafin doku takibine ne şekilde hazırlanacağı anlatılmıştır. Bu incelemeler dışında duruma göre özel incelemeler için de doku örneklerinin bir kısmı özel şekilde ayrıca takibe alınırlar. Bu incelemelerden başlıcaları şunlardır. Hücre süspansiyonunda flow cytometric immunfenotipleme ve konvansiyonel sitogenetik çalışmalar için doku-hücre kazıntısı alınması; moleküler genotipik çalışmalar ve cryostat kesit işlemleri için taze dokunun dondurularak saklanması ve mikrobiyolojik incelemeler için steril ortamda özel besiyerlerine doku örneği alınmasıdır. Mikrobiyolojik inceleme örneklerinin steril ameliyathane şartlarında alınmasında yarar vardır. Tablo 1'de çalışma modeli ve uygun doku örnekleri tablo halinde verilmektedir.

**Tablo 1.** Uygulama yöntemlerine göre uygun doku örneği tipleri.

Çalışma tipi	Taze, steril doku	Taze doku	Havada kurumuş imprint	Cryostat kesit	Parafin kesit
İmmünohistokimya <sup>a</sup> (sitoplazmik ve bazı yüzey antijenleri)			X	X	X
İmmünohistokimya (yüzey immünglobulinleri)			X <sup>b</sup>	X	
Flow sitometrik fenotip		X			
Moleküler genotip				X	X <sup>c</sup>
Sitogenetik analiz	X				
Mikrobiyolojik analiz	X				

a Antijen tipi ve fiksatifte göre değişik

b Yüzey Ig için sitosantrifüj preparatları tercih edilir

c Sadece alkol fikse dokular uygun olur

### Doku örneklerinin kasetlenmesi

Dilimlerin çevresini tam olarak saran sağlam bir kapsül varsa bu kapsül bir veya iki noktadan makas ucu ile çentik yapacak şekilde kesilir (Aksi takdirde, kapsül ve parenkimin dehidratasyon işlemine farklı derecede yanıt vermesi nedeniyle doku dilimi kıvrılacak ve dilimin parafine düzgün şekilde gömülmesi mümkün olmayacaktır). Elde edilen dilimler mümkünse bütün halinde takip işlemine alınmalıdır. Dilim çapı, teknisyenin tecrübesine, mikrotomda kesit yapma kapasitesine, kullanılan mikrotomun cinsine göre ayarlanabilir. Kapasiteyi aşan büyük çaplı dilimler iki veya daha fazla parçaya ayrılıp küçültülebilir. Genel olarak alınan parçaların en büyük çapının 1 cm'den daha büyük olmaması, mikrotomda kesit yapma işleminin kolay yapılması açısından tercih edilmektedir. Ancak dilimin bir bütün halinde mikroskopta incelenmesi, bazı vakalarda patoloğa önemli avantajlar sağlayabilir. Eğer kompartmanlar arası ilişkisinin incelenmesi önem taşıyorsa, 1 cm'nin üzerinde çapa sahip olsa bile en az bir adet doku dilimi, bütün halinde takip edilmelidir.

Elde edilen dilimler standart doku kasetlerine konularak takip işlemine alınırlar. Günümüzde kullanılan standart plastik doku takip kasetlerinin derinliği, eskiden kullanılan çelik doku takip kasetleri ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür (5 mm). Bu nedenle kasete alınan doku kalınlığının 3 mm'nin üzerinde olmaması gerekir. Daha kalın dokular, kasetlerin iç yüzeyine yapışır ve takip çözeltilerinin serbestçe dolaşımını engelleyerek doku takip kalitesinin bozulmasına yol açar. Dokunun özellikle santral bölgelerinde takip yetersizlikleri ve tüm dokuda birbirinden farklı takip zonları oluşur. Bu durum ise mikrotom kesim işleminde sorunlar çıkarır, ince homojen kesit alınmaz, kesitlerde morfolojik ve antijenik açıdan farklı özellikler taşıyan zonlar oluşur, tanı ve yorum hatalarına yol açar. Bu vesile ile bir kez daha vurgulamak gerekirse **“alınan doku örneklerinin 3 mm'den daha kalın olmaması için azami dikkat sarf edilmelidir”**. Kandan zengin dokularda kanın mümkün olduğunca uzaklaştırılması önerilir. Alınan doku dilimleri tamponlanmış nötral formalin çözeltilisi içinde çalkalanarak yıkanır, faza kan giderilir. Bu işlem fiksatif çözeltilisi değiştirilip

yenilenerek birkaç kez tekrarlanır ve daha sonra doku dilimleri nihai fiksatif içine alınırlar.

### Doku örneklerinin fiksasyonu

Fiksasyon, klasik doku takip işleminin ilk aşamasıdır. Dokunun canlı organizmadaki durumuna en yakın şekilde sabitlenip dış etkenlere dirençli hale getirilmesidir. Başlıca amaçları şunlardır:

- 1- Otolizin ve bakteriyel hasarın önlenmesi
- 2- Daha sonra uygulanacak takip ve inceleme işlemlerine dayanıklı hale getirmek, şekil ve hacim açısından sabitleştirmek
- 3- Canlıdaki yapısına olabildiğince benzer şekilde korunmasını sağlamak
- 4- Daha sonra uygulanacak boyama ve inceleme yöntemlerine elverişli hale getirmek

Tüm bu amaçlara uygun fiksasyon yöntemi hangisidir? Bu sorunun en kısa cevabı “Böyle bir fiksasyon yönteminin bulunmadığı”dır. Her bir inceleme yöntemi için ayrı bir fiksasyon yöntemi gerekir. Ancak pratik olarak bu tür bir uygulama mümkün değildir. Günümüzde rutin teknikler kullanılarak histopatolojik tanıya gidiş için nötral- tamponlu formaldehid çözeltileri pek çok durumda yeterli olmaktadır. Ucuz ve kolay bulunabilir olması, sağlık ve çevre açısından toksik etkilerinin nispeten az oluşu nedeniyle yaygın olarak kullanılabilir. Fiksasyon ve fiksatiflerin tarihçesi gözden geçirildiğinde 19. yüzyılın ikinci yarısına kadar bu konuda fazla bir araştırma bulunmamaktadır. Virchow ile başlayan hücresel patoloji ve sentetik boya endüstrisinin gelişmesi ile konu canlılık kazanmıştır. Çok sayıda madde ve yöntem denendi. Hiç birinin ideal olmadığı görülünce karışık fiksatifler denendi. Sonuçta bu konuda bir karmaşa oluştu. 1960 da Baker bu karmaşaya değinerek fiksatifleri koagülatif ve non koagülatif olarak iki grupta sadeleştirdi. Karma fiksatiflerin ilk tarif eden kişiyi adı ile anılmasını, modifikasyonların ihmal edilmesini önerdi. Bu görüş kısmen de olsa kabul gördü. Bu görüşte yapılan bazı değişikliklerle fiksatiflerin aşağıdaki şekilde sınıflanması önerildi.

- 1- Aldehidler (formaldehid, glutaraldehid, acrolein, glyoxal)
- 2- Oksitleyiciler (osmium tetroxide, potassium permanganate, potassium dichromate)

- 3- Protein denatüre ediciler veya koagülanlar: (Asetik asit, metil alkol, etil alkol.)
- 4- Çapraz bağ yapan diğer ajanlar (Carbodiiminler)
- 5- Fiziksel ajanlar (Isı, mikrodalga)
- 6- Diğerleri (civa klorür, pikrik asit, boya maddeleri)

Kaos dönemini takiben uzunca bir süredir rutin histopatolojik doku takip işlemlerinde ağırlıklı ve yaygın bir şekilde formaldehid çözeltileri kullanılmaktadır. Ancak teknolojik gelişmelere bağlı olarak bu konuda yeni arayışlar ve değişiklikler de dikkati çekmektedir.

- İmmünohistokimyasal yöntemlerin yaygın olarak kullanıma girmesi ve antijen korunumunun gündeme gelmesi.
- Moleküler biyoloji yöntemlerinin kullanıma girmesi ve nükleik asit korunumunun gündeme gelmesi
- Toksik etkilere bağlı sağlık sorunlarının gündeme gelmesi
- Endoskopi aletlerinin sterilizasyonunda kullanılan glutaraldehidin yarattığı sorunların patolojide tartışılmaya başlanması
- İnfeksiyöz ajanların yarattığı sorunlar
- Kimyasal olmayan bir yöntem olarak mikrodalga ışınlanmanın gündeme gelmesi
- Patoloji laboratuvarlarında dokuların saklanması, arşivlenmesi ile ilgili yasal ve hukuksal sorunların tartışılmaya başlaması

### Fiksasyonun teorik yönleri

#### Proteinler ve fiksasyon

Rutin histopatolojik incelemelerde doku- hücre morfolojisinin korunumunda en önemli reaksiyon proteinlerin stabilizasyonu- fiksasyonudur. Ancak bunun nasıl gerçekleştirildiği ile ilgili ayrıntılar tam olarak bilinmemektedir. Bazı temel prensipler anlaşılabilmiştir. Fiksatiflerin proteinler ile çapraz bağlar oluşturarak veya onları koagüle ederek bir jel haline getirdiği düşünülmektedir. Solubl proteinler insolubl hale getirilir. Insolubl hale getirilen solubl proteinler ile yapısal proteinler konum ve birbirleri ile ilişkiler açısından in vivo şartlardakine en yakın vaziyette sabitlenmeye ve dokudaki yapısal organizasyonun mekanik etkenlere karşı direnci arttırılmaya çalışılır. Bu çabalar ne derece başarılı ise mikroskoptaki morfolojik ayrıntı düzeyi de o derecede



üst düzeyde olacak, bu ise temel histomorfolojik incelemeler için uygun bir zemin oluşturacaktır (morfolojik fenotip). Ancak günümüzde iyi bir histomorfolojik inceleme tek başına yeterli olmamaktadır. Büyük ölçüde proteinlerden oluşan antijenlerin immünolojik yöntemlerle incelenmesi de gerekmektedir (immünolojik fenotip- immünfenotip). Bu yüzden, uygulayacağımız fiksasyon yönteminin proteinlerin antijenik özelliklerini değiştirmeden koruması ve halen kullanılmakta olan immünfenotipik inceleme yöntemlerine elverişli hale getirmesi beklenmektedir. Hem morfolojik hem de antijenik özelliklerin istenilen düzeyde korunmasını sağlayacak mükemmel bir fiksatif bulunmamaktadır. Bu nedenle zaman zaman morfolojik kalite düzeyinden zaman zaman da antijenik inceleme spektrumumuzdan ödün vermek durumundayız. Kısıtlamalardan kısmen de olsa kurtulmak için, materyalin uygun olduğu durumlarda, doku örnekleri birden fazla sayıda ve farklı özellikleri olan fiksatiflerin içine alınabilir.

### Nükleik Asitler ve Fiksasyon

Tanıya yönelik incelemelerin (morfolojik-immünfenotipik) zeminini oluşturan başlıca hedef molekül “protein”lerin yanı sıra son yıllardaki teknolojik gelişmelerin etkisi ile ikinci bir hedef molekül daha ortaya çıkmıştır. Bu molekül “nükleik asitlerdir” (DNA, RNA). Artık bundan sonra fiksasyon sistemlerini tartışırken sadece proteinleri değil nükleik asitleri de göz önünde bulundurmalıyız. Moleküler genotipik incelemeler genellikle taze ve dondurulmuş dokularda çalışmak üzere geliştirilmişlerdir. Proteinlerle karşılaştırıldığında nükleik asitlerin fiksasyonu konusunda çok daha az şey bilinmektedir. Rutin histopatolojik inceleme amaçlı takiplerde nükleik asitlerin fiksasyonu dokunun genel fiksasyonu çerçevesinde gerçekleşmektedir. DNA ve RNA oda sıcaklığında formaldehid ile reaksiyona girmemektedir. Sıcaklık arttırıldığında nükleik asit zincirlerinin sarmal yapısı çözülmeye başlar ve 45°C den sonra RNA, 65°C den sonra DNA ile formaldehid arasında etkileşme gündeme gelir. Normal takip işlemlerinin uygulandığı oda sıcaklığında (20–25°C) formaldehid ile nükleik asitlerin denatürasyonu gerçekleşmez (Virüsler veya prionun infeksiyon potansiyeli üzerine formalinin etkisi sorgulanmalıdır). Ancak takibe işleminin ileri aşamalarında

(parafinizasyon) sıcaklık yükseldiği için doku içinde kalıntı halinde az miktarda bulunabilen formaldehidin etkisi söz konusu olabilir. Özetle formaldehid fikse parafin takipli dokuda, başka zarar verici etkenler söz konusu değilse, daha çok DNA olmak üzere nükleik asitler korunmuş durumdadır. Bu çok büyük moleküllerin %30 kadarı fiksasyon sırasında kaybedilir. Büyük ölçüde korunabilmelerinin nedeni çok büyük olan bu moleküllerin protein matrisi tarafından sarılıp tutulmasıdır. Nükleik asit çalışmaları için genellikle tercih edilen fiksatifler etanol ve metanoldür (Carnoy fiksatif). Alkoller belirgin bir kimyasal değişiklik meydana getirmezler. DNA, alkoller içinde kollabe olur. Kollapsa yol açan etanol konsantrasyonu %65 v/v dır. Alkolde denatüre olmuş DNA rehidratasyon sonucunda orijinal şekline kısmen geri döner. Alkolde fikse nükleik asitlerin çöktürülerek elde edilmesinde tuzların varlığı ve konsantrasyonu belirleyici rol oynarlar. İn situ hibridasyon çalışmalarında nötral tamponlu formaldehid çözeltileri ile B5, Hollande ve zinc formaldehid arasında belirgin bir fark görülmemiştir.

PCR ve moleküler düzeyde çalışmalar söz konusu olduğunda en elverişli DNA parçaları etanol tespitli dokulardan elde edilmektedir. Formalin tespitli dokulardan elde edilebilen parça uzuntuları kısıtlıdır. Bouin gibi asidik fiksatiflerle tespitli dokularda PCR’ın kullanımı, bazı yıkama teknikleri geliştirilmişse de, oldukça sınırlıdır. Benzer şekilde inorganik asitlerde (nitrik asit, hidroklorik asit vb) dekalsifikasyon uygulanan dokularda bu çalışmalar mümkün olmamaktadır. Zayıf asitlerde kısa süreli dekalsifikasyon bazen başarılı olmaktadır. RNA presipitasyonunda kantitatif açıdan en başarılı sonuçlar etanol ve aseton ile alınmıştır. Methacarn da iyi sonuç verir. Formaldehid ile sonuçlar kötüdür. Ticari piyasadaki özel formüllü bazı fiksatifler ile sonuçlar orta düzeydedir.

Sonuç olarak patolojide nükleik asitleri konu alan çalışmalara en uygun doku, taze veya dondurulmuş dokudur. İkinci seçenek alkolde fikse dokulardır. Düşük sıcaklıklarda uygulanan formaldehid fiksasyonu da kabul edilebilir bir fiksasyon türüdür. Diğer fiksatiflerle tespitli dokularda başarı, hedef molekülün özelliğine bağlı olarak değişkendir.

### Lipitler ve Fiksasyon

Bu konuda çok az şey bilinmektedir. Klasik fiksasyon ve doku takip işlemleri sonunda lipidik maddeler büyük ölçüde kaybedilmektedir. Bu maddelerin incelenmesi amaçlanıyorsa dondurulmuş taze doku kesitlerinin kullanılması gerekmektedir. Bu konuda fiksatiflerin yeri sadece dokunun boyama işlemlerine karşı mekanik direncinin artırılmasına yöneliktir. Bu amaç için %10'luk formalin, %10 luk formol saline veya tamponlu nötral formalinler uygun değildir (formaldehid lipitlerin kimyasal yapısını değiştirir, beklemiş asidik formalin içindeki formik asit lipidleri hidrolize uğratar, sodyum iyonu myelindeki lipitlerin çözünerek kaybına yol açar). Önerilen fiksatif formol-kalsiyumdur. %10 formalin içine %2 oranına ulaşacak kadar calcium acetate veya %1 oranına ulaşacak kadar calcium chlorid katılması önerilmektedir. Bu işlem aynı zamanda formalinin zamanla formik aside dönüşmesini, çözeltinin asidik hal almasını engeller. Calcium acetate bir nevi fosfat buffer yerine geçerek formalini tamponlamış olur.

### Glikojen-mukopolisakkaritler ve Fiksasyon

Nişasta, kitin, selüloz gibi maddelerin gösterilmesinde fiksasyon şeklinin herhangi bir önemi yoktur. Ancak glikojen ve bazı musin tiplerinde fiksasyon şekli önem taşımaktadır.

Glikojen suda eriyen ve difüzyon ile dağılabilen bir madde olduğu için dokular mümkün olduğunca kısa süre içinde, derhal fiksatif içine alınmalıdır. (Post mortem biopsilerde bu konuya dikkat edilmelidir). Fiksasyon mümkünse +4 °C de yapılmalıdır. %10 luk formalin uygun değildir. %80 lik alkol veya Rossman çözeltisi (pikrik asit ile doymuş alkol ile hazırlanmış %10 luk formalin) içine konan doku +4 °C' de 1–2 gün bekletilerek tespit edilmelidir.

Musinler çok çeşitli türleri olan moleküllerdir. Proteinlerle birliktelikleri nedeniyle glikojen gibi belirgin fiksasyon modelleri gerektirmezler. Çoğu kez formalin çözeltileri kullanılabilir. Ancak mast hücrelerinin gösterilmesinde su bazlı fiksatiflerin kullanılması uygun değildir.

%10 formol- alkol %10 formol- kalsiyum önerilen çözeltilerdir. Bu maddelerin korunumu için sadece fiksasyona dikkat etmek yeterli olmayabilir. Kesit alma ve boyama işlemleri sırasında dokunun su

bazlı ortamlarda uzun süre kalması veya agresif yıkamalara tabi tutulması bu maddelerin kaybına yol açabilir.

Asit dekalsifikasyon işlemi uygulanan dokularda güçlük çekilebilir. (Ewing sarkomu- glikojen varlığı). %5'lik triklorasetik asit, formik asit veya EDTA çözeltileri, dekalsifikasyon için tercih edilmelidir. İnorganik agresif asitlerle dekalsifikasyondan kaçınılmalıdır.

### Fiksasyon kalitesini etkileyen faktörler

#### Hidrojen ion konsantrasyonu ve tamponlar

Ön planda proteinler olmak üzere pek çok molekülün yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin orijinaline en yakın durumda tespit edilebilmesi için tespit işlemi tamamlanana kadar dokuların hidrojen ion konsantrasyonu açısından uygun bir ortamda bulundurulması önerilir. Genellikle pH'nın 6–8 arasında tutulması tercih edilir. Bu değerlerin dışındaki pH değerlerinde özellikle ultrastrüktürel özelliklerde bozulmalar görülür. Bazı enzim aktiviteleri bloke olur. Bu durum göz önüne alınarak rutinde en çok kullanılan fiksatif olan formaldehit çözeltilerinin tamponlanması önerilir. %10 luk formalin zamanla değişime uğrayan bir kimyasal yapıya sahiptir. Aldehit monomerleri azalırken formik asit miktarı giderek artar. Sonuçta fiksasyon yeteneği azalmış asidik bir su çözeltisi haline dönüşür. Bu değişimi yavaşlatmak ve durdurmak için hidrojen fosfatın sodyum tuzları tampon çözelti olarak kullanılarak fiksatif pH'ı 7 civarında tutulur. Formik asit oluşumunu engellemenin diğer bir yolu formalin çözeltisine kalsiyum tuzlarının eklenmesidir (%2 oranında kalsiyum asetat veya %1 oranında kalsiyum klorür eklenmiş %10'luk formalin çözeltisi kullanılabilir). Asidik formalin kullanıldığı zaman görülen formalin pigmentinden kurtulmanın en etkili yöntemi de tamponlanmış formalin çözeltileri veya formol- kalsiyum (Baker fiksativi) çözeltileri kullanılmaktadır.

Diğer taraftan bazı özel amaçlar için farklı pH düzeyleri tercih edilmektedir. Örneğin mide mukozasının optimal fiksasyonu için pH'ın 5,5 olması tercih edilir. Kartekolaminlerin kromafin reaksiyonunun araştırılmasında, adrenalin-noradrenalin depo granüllerinin gösterilmesinde de en uygun formalin pH'ı 6,5'dir.

Bazı istisnalar dışında proteinlerin çoğu ancak nötral pH'da 3 cül ve 4 cül yapılarını koruyabilir ve solubl halde kalabilirler. Eğer fiksatif çözeltilerinin içine asidik maddeler katılacak olursa proteinlerin 3 cül ve 4 cül yapıları bozulur ve çökelmeleri sağlanır (Glasial asetik asit; Hollande, Bouin, Zenker fiksatifleri). Böylece zayıf asitler dokunun dış etkenlere daha dayanıklı olmasını sağlayan "koagülatif" fiksasyon modelinin gerçekleşmesine katkıda bulunurlar. Ancak buradan yola çıkarak tek başına asidik bir sıvı içinde uygun ve yeterli bir fiksasyon sağlanabileceği asla düşünülmemelidir.

### Sıcaklık

Geleneksel anlamda cerrahi patoloji materyallerinin fiksasyonu oda sıcaklığında yapılmaktadır. Daha düşük sıcaklıklarda otoliz yavaşlar, difüzyon yolu ile moleküllerin yer değiştirme hızı azalır. Bu özellikler dikkate alındığında fiksasyonun düşük sıcaklıklarda yapılması düşünülebilir. Nitekim elektron mikroskopik incelemelerde ve bazı enzim aktivitelerinin araştırılmasında fiksasyon sıcaklığının düşük tutulması tercih edilmektedir (+4 ° C). Buna karşı mast hücrelerinin incelenmesinde tespitinin oda sıcaklığında yapılması daha iyi sonuç vermektedir. Ayrıca sıcaklık arttıkça fiksatifin doku içine penetrasyon hızının arttığı, fiksatif molekülleri ile doku molekülleri arasındaki kimyasal reaksiyonların hızlandığı görüşünden hareketle yüksek sıcaklıkta fiksasyonun daha iyi sonuç vereceği iddia edilebilir. Ancak çalışmalar göstermiştir ki

- 1- Rutin konvansiyonel histopatolojik takip ve incelemelerde düşük fiksasyon sıcaklığı pratikte kullanılabilecek belirgin bir üstünlük sağlamamaktadır.
- 2- Sıcaklığın artırılması da fiksasyon süresini anlamlı bir şekilde kısaltmadığı gibi otolitik değişiklikleri arttırmış, PCNA gibi bazı antijenlerin hasar görmesine yol açmıştır.
- 3- Bu nedenle aşırı sıcaklık değişikliklerinin pratikte anlamlı bir yarar sağlamadığı aksine zararlı olabileceği göz önüne alınmalı, fiksasyon oda sıcaklığında yapılmalıdır. Sıcaklık arttırımı mutlaka düşünülüyorsa 40 °C'nin üzerine çıkılmamalı, fiksasyonun ilk yarısı mutlaka oda sıcaklığında olmalıdır.

- 4- Mikrodalga kullanılarak yapılan fiksasyon, oldukça farklı bir mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bu nedenle yukarıdaki genellemeler tam olarak geçerli değildir. Bu konu ayrıca ele alınacaktır.

### Fiksatiflerin dokuya penetrasyon hızı

Fiksatif çözeltilerinin doku içine penetrasyon hızları birbirinden farklıdır. Bu özellik, fiksasyon süresini belirleyen önemli parametrelerden biridir.

$$d = k \sqrt{t}$$

t: Dokunun fiksatif içinde geçirdiği süre, fiksasyon için gerekli minimum süre

d: Fiksatifin doku içine penetre olabildiği derinlik.

k: Her fiksatif için ayrı ayrı hesaplanmış penetrasyon katsayısı (mm cinsinden)

k değerleri her bir fiksatif için dalak dokusunda ve jelatinden yapılmış bir doku modelinde çalışılarak hesaplanmıştır (Tablo 2).

Bence yukarıdaki formülün tüm dokular için genellenmesi mümkün değildir. Ayrıca, fikse edilen dokunun cinsine göre de bir penetre edilebilme sabitinin de (k doku) hesaplanması ve formüle eklenmesi gerekir.

Pratik olarak k değeri, fiksatifin 1 saat içinde doku içine girebildiği derinliği ifade eder. Ancak zaman uzadıkça penetrasyon hızı giderek düştüğü için penetrasyon derinliğinin hesaplanmasında zamanın mutlak değeri değil de karakökü değişken olarak alınmaktadır. Değişik fiksatiflerin k sabitleri tablo da verilmiştir. Şimdi bu tabloya bakarak herkes kendi laboratuvarında kullandığı fiksatif cinsini ve fiksasyon süresini göz önüne alarak fiksatifin ulaşabildiği derinliği hesap etsin. Benim hesabım şöyle (İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji, rutin takip makinaları)

$$t = 4 \text{ saat } k = 0,78 \text{ (%10 luk formalin)}$$

$$d = 0,78 \cdot \sqrt{4} = 0,78 \times 2 = 1,56 \text{ mm}$$

Bu ne anlama gelir? Takibe aldığım doku örneğinin dış yüzünden itibaren 1,5 mm kalınlığında kabuk şeklindeki doku bölgesine formalin ulaşmıştır (dikkat edin ulaşmış dedim, fikse olmuş demedim). Eğer ben doku örneğimi 3 mm kalınlığında almışsam, aldığım dokunun her tarafına formalin ulaşmıştır. Eğer 6 mm kalınlığında bir doku alsaydım dokunun ortasında (içinde, merkezinde) 6- (2x1,5)= 3 mm kalınlığında formalinin hiç ulaşmadığı bir bölge kalacaktı. Eğer fiksasyonu 40 ° C lik etüvde yapsaydım dokunun orta

**Tablo 2. Fiksatiflerin penetrasyon katsayıları (k değerleri).**

Fiksatif	Fiksatif konsantrasyonu (%)	k (Dalak)	K (Jel)
Formaldehid	4	0,78	3,6
Etanol	100	1,0	-
Metanol	100	-	1,45
Glutaraldehid	6	0,25	-
	4	0,34	-
	1,2- 4,0 (+4 °C)	0,33-0,5	-
	1,2- 4,0 (oda)	0,5-1	-
Civa klorür	0,78 -0,84	2,2	-
Pikrik asit	Satüre	0,5	0,8
Asetik asit	5	1,2	2,75
Osmium tetroxide	0,5-2	0,29-0,58	0,85
Potasyum dichromate	3	1,33	-
Chromium trioxide	0,5	0,25	1

bölgesi 4 saat boyunca yüksek sıcaklıkta fiksatsiz olarak otolize gidecek, morfolojik ve antijenik özellikleri bozulacaktı. (Yaz sıcaklığında tavuk etini güneş gören mutfak tezgahında 4 saat süre ile unutulmuş, sonra pişirip yiyin, afiyet olsun)

Bu hesaplamalarımız gerçek fiksasyon süresini değil sadece fiksatif molekülünün doku molekülüne ulaşması için geçen süreyi yansıtmaktadır. Gerçek bir aldehid fiksasyonu için (yani aldehid moleküllerinin başta lizin olmak üzere bazik aminoasitlerin tümüne çapraz bağlar ile bağlanması için) ayrıca 12 saatin geçmesi gerekmektedir. Kısaca 3 mm kalınlığındaki bir doku diliminin gerçek bir aldehid fiksasyonu ile tamamen fikse olması için gerekli fiksasyon süresi, %10 luk formalin için,  $4+12=16$  saattir. Hatırlıyor musunuz sevimli teknisyen arkadaşımız, pabuç gibi kalın parçaları kasete çaktırmadan tıktırmaya çalışan doktor hanımı görünce ne demişti “Alın doktor hanım, inceltmenize gerek yok, ben kesebilirim merak etmeyin”. İşte bu hesaplardan sonra, yukarıdaki tavuk etini bu sevimli ikiliye ikram etmeyi düşünüyorum. Afiyetle yesinler. Ne de olsa kendi elleriyle pişirdiler.

Şimdi de dokularımızı formalinden çıkarıp dehidratasyon için alkollere alalım. 6 saat alkolde kalsın.  $d=1 \times 6=2,3$  mm. Dış yüzeyden itibaren 2,3 mm’lik derinliğe alkol ulaşmıştır.

Şimdi toparlarsak; En dıştan itibaren 1,5 mm’lik 1. zonda (dış zon) hem formalin hem alkol etkisi vardır. 1,5 mm ile 2,3 mm arasında yer alan 0,8 mm kalınlıktaki 2. zonda (orta zon) sadece alkol etkisi bulunmaktadır. 2,3 mm ile 3 mm derinlik (dokunun tam orta hattı) arasındaki 0,7 mm’lik 3. zona (iç zon) henüz hiçbir kimyasal madde ulaşmamıştır. Bizim tavuk eti de  $4+6=10$  saattir güneşin altında otolizedir. Belki de bakteriler azmıştır. İlk yemeğimizin belki tadı biraz bozuktur. Buyrun şimdi 10 saatlik tavuğumuzdan yiyin. Bu daha lezzetli değil mi? Karnınız mı ağrımaya başladı?, tuvalet ne tarafta mı dediniz. Hay aksi...! Tam da hafta sonu tatili öncesi, olacak şey mi şimdi.

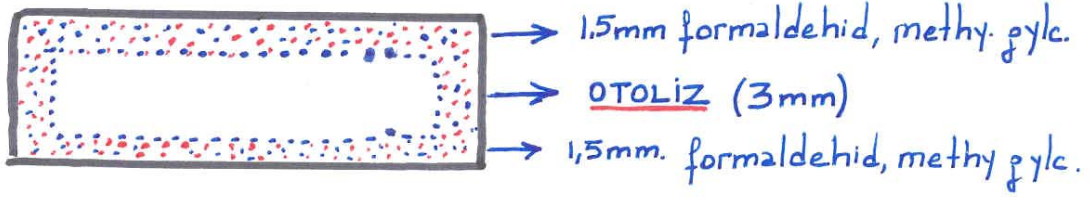
“– Gülşen hanım bu kesitlerin orta kısmı niye böyle garip olmuş, bu immünboyalar da çalışmamış. Bugün işler neden böyle ters gidiyor.

– Tuvaletteyim doktor hanım ne dediğinizi duyamıyorum.

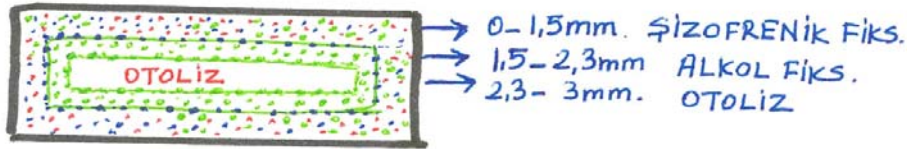
– Hiç, hiç!! çabuk çık ben de gireceğim.”

Sonuç olarak laboratuvarımızda

- 1- Takibe alınan dokuların kalınlığı 3 mm’yi geçemez.
- 2- Yüksek sıcaklıklarda takip yapılmaz.
- 3- Kokmuş tavuk eti yenilmez
- 4- Makroskopi sırasında çay- kahve- sigara içilmez, kraker yenmez.
- 5- Çimenlere basılmaz- ağaca çikılmaz vs vs vs.



### 4 SAATLIK FORMALİN FİKSASYONU.



#### ŞİZOFRENİK FİKS. ZONU (DIŞ ZON)

- 0-1,5mm (1,5mm)
- Formald + methy glyc. + alkol

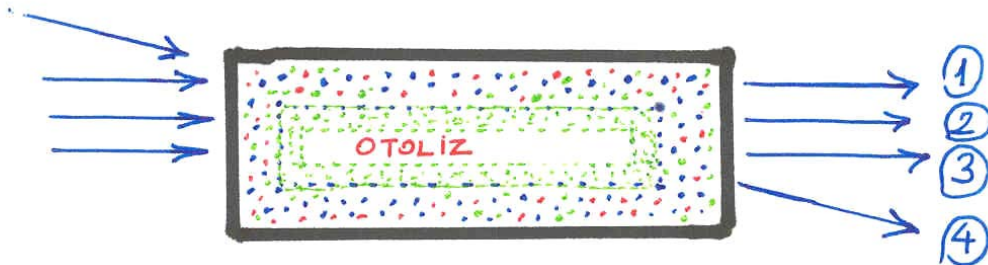
#### ALKOL FİKS.(ORTA)

- 1,5-2,3mm (0,8mm)
- Alkol.

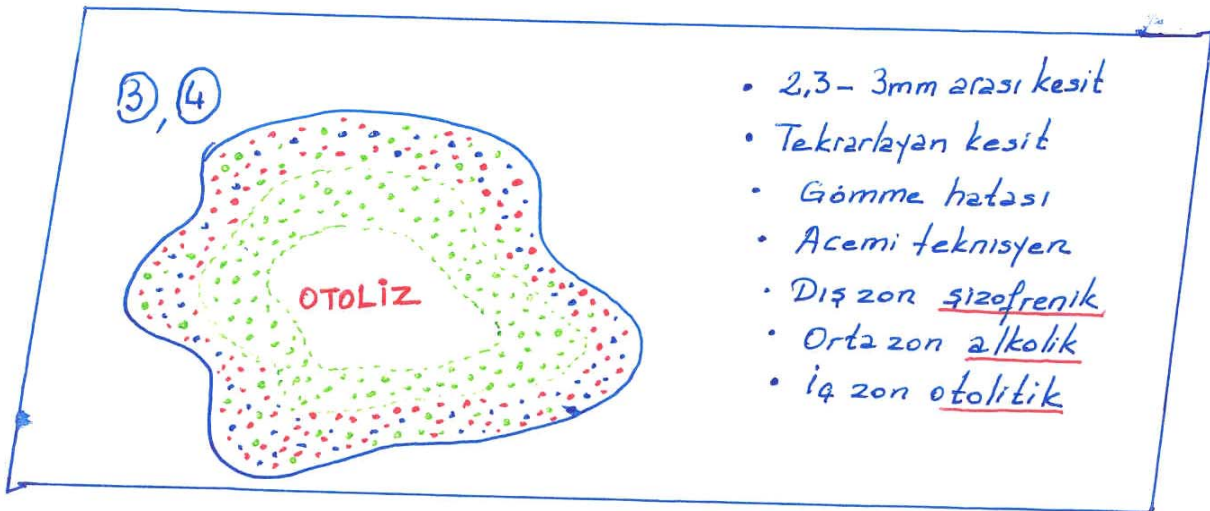
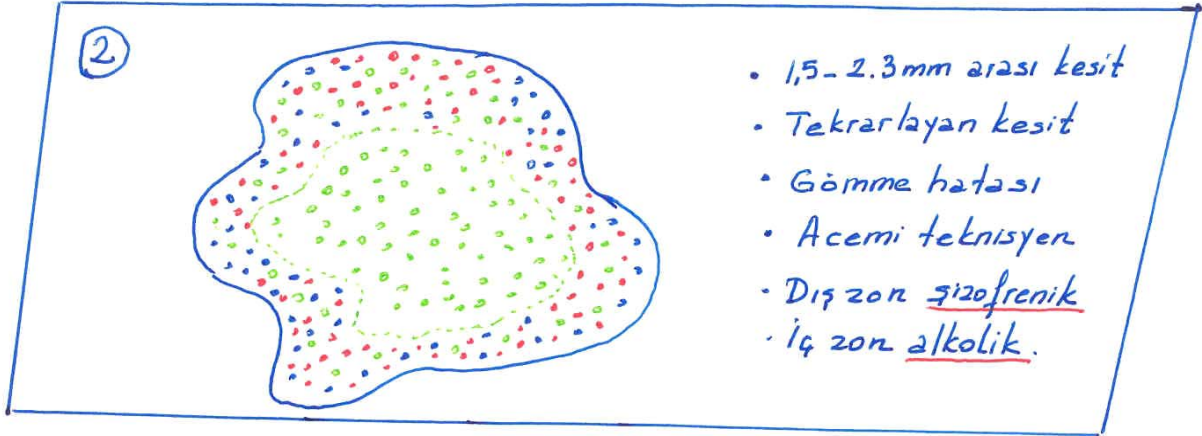
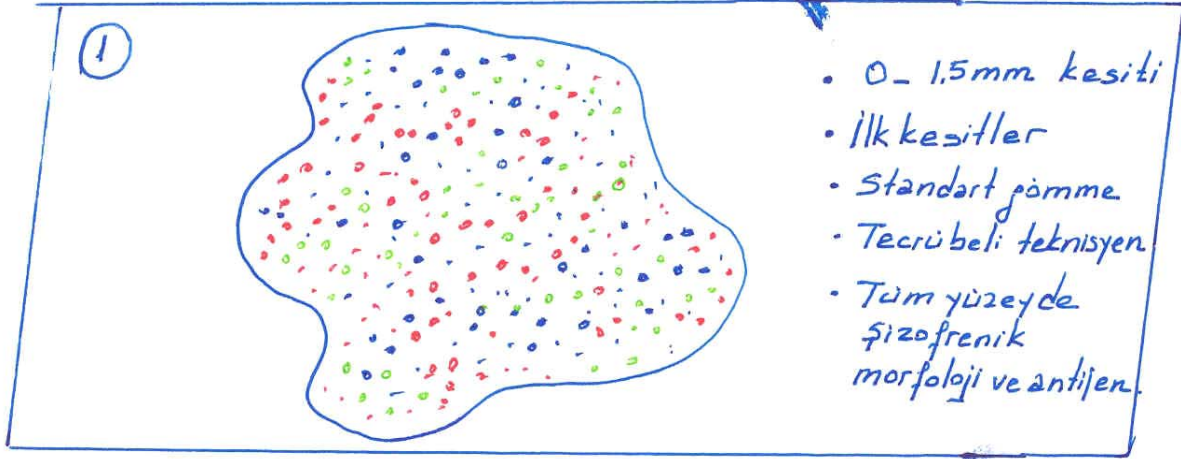
#### OTOLİZ (İÇ)

- 2,3-3mm (1,4mm)
- (-)

### 4 SAAT FORMALİN + 6 SAAT ALKOL



Değişik düzlemlerden geçen kesitler



### Fiksatif Çözeltisinin Osmolalitesi

Bu konu ayrıntılı olarak incelenmiştir. Hipertonik çözeltiler hücrede büzölmeye, hipotonik ve kısmen de izotonik çözeltiler ise şişmeye ve fiksasyon yetersizliğine yol açarlar. Ultrastruktural bulgular göz önüne alındığında en iyi morfolojik sonuç hafif hipertonik çözeltiler kullanılarak alınır. (Isotonik çözelti 340 m Os, hafif hipertonik çözelti 400–450 mOs.). Fiksatifin osmolalitesi ile oynanarak değişik hücrelerde ve interstisyel kompartmanda oynanabilir. Bazı ek maddeler (dextran veya polivinyl pyrrolidone) katılarak ekstrasellüler alan belirgin şekilde küçültülebilmektedir. NaCl katılan fiksatiflerde büzölme artefaktları izlenmiştir. Hipotonik fiksatiflerde asit fosfataz lizozomlardan dışarı sızar, nukleoluslarda bubbling artefaktları oluşur. Fiksatiflerin total osmolalitesinden ziyade komponentlerin tek tek osmolalitesinin daha belirleyici olabileceği bildirilmiştir.

### Fiksatiflerin konsantrasyonu

Bu konudaki belirleyici faktörler; gelenekler, maliyet, etkinlik, çözünürlük derecesidir. Glutaraldehid normalde %3'lük konsantrasyonda kullanılır. Ancak % 0,05'lik çözeltinin de başarılı olduğu görölmüştür. Bu çalışmada çözeltiye eklenen buffer sistemi ile pH ayarlaması yapılmıştır. Glutaraldehid konsantrasyonunun yüksek olduğu çözeltilerde buffer sistemi uygun değil ise aldehid molekülleri polimerize olarak aktif madde konsantrasyonu azalabilmektedir. Benzer durum formalin çözeltileri için de geçerlidir. Formik asit düzeyi artıp pH düştükçe aldehid molekülleri polimerize olmakta aktif aldehid monomerlerinin sayısı azalmaktadır. Bu ise çözeltinin fiksasyon yeteneğini düşürür.

### Fiksasyon Süresi

Dokunun türü, fiksatifin penetrasyon hızı, fiksatifin hedef molekölü fikse etme hızı, fiksatifteki aktif madde konsantrasyonu, ortam pH'ı, sıcaklık, osmolalite gibi pek çok faktör etkilidir. İncelemede söz konusu edilecek hedef molekölün özellikleri de sürenin belirlenmesinde etkilidir (aldehidlerle bloke olan bir proteinin veya enzimin varlığı araştırılacaksa

aldehid fiksasyon süresinin mümkün olan en alt düzeyde tutulması).

Genel pratikte kullanılan %10 formalin ile tam bir aldehid fiksasyonu için gerekli süre 12 saate kadar uzatılabilmektedir. Bu süreye penetrasyon için gerekli süreyi de eklemek gerekir. Ancak tanı amaçlı uygulamalarda ve ülkemiz koşullarında bu kadar uzun süre beklemeye sabrımız yoktur. Acelemiz vardır. Arkamızdan hasta yakınları ve doktorundan oluşan bir atlılar ordusu kovalıyor. Hadi diyelim o orduyu atlattık bu sefer “benim laboratuvarım daha hızlı sonuç çıkarır, parçanızı bana gönderin, bugün biyopsi yarın sonuç” “Hayır hayır ben daha çabuk sonuç veririm, bugün biyopsi, bugün sonuç, hatta bugün biyopsi, dün sonuç” slogan savaşlarının gereği olarak neredeyse fiksasyon yapmadan dehidratasyonla işe başlayacağız. Belki de, bu koşullarda doğrusu da bu. Ancak yine de, hiç olmazsa dokunun yüzeyindeki 1–2 mm'lik segmenti kısmen de olsa fikse edip alkollerin büzölmeye yol açan etkilerini dengelemeye çalışmakta yarar var. Bu nedenle en azından 4–6 saatlik aldehid fiksasyon periyodunu ihmal etmemek gerekir.

Bu koşullarda önerdiğim fiksasyon süreleri

- %10 formalin ve türevleri: 6–12 saat
- Hollande: Endoskopik biyopsi, punch, tru-cut vb. küçük biyopsiler 4 saat büyük dokular 12 saat
- B5: 2-4 saat

Fiksasyon süresinin gereğinden fazla uzun tutulması da zaman zaman sorun oluşturabilir. Uzun formalin fiksasyonu bazı enzim aktivitelerini azaltır veya ortadan kaldırır. Pek çok antijenin blokajına yol açar. (Bu antijenlerin tekrar kazanımını sağlayan yöntemler sayesinde bu sorundan kısmen kurtulmuş durumdayız). Dokuda sertleşme ve büzölme olur. Amiloid gibi bazı maddelerin saptanması güçleşir. Pigmen oluşumu artar. B5'de 4 saati aşan fiksasyonlarda dokuda sertleşme ve kırılabilirlik artar. Kesim zorlaşır, morfoloji bozulur. Bu nedenle 4 saatlik sürenin kesinlikle geçilmemesi gerekir. Hollande çözeltisinde dokular 2–3 gün süre ile önemli bir soruna yol açmaksızın kalabilirler. Daha uzun süre kalan dokularda sertleşme, kırılma, kesim güçlükleri oluşur.

### Fiksatifler ve bazı katkı maddeleri

Fiksatif çözeltileri genel olarak fiksatif maddeler, su ve buffer çözeltilerinden oluşur. Değişik amaçlara yönelik olarak bazen fiksatiflerin içine ek maddelerin

konduğunu görmekteyiz. Bu eklentiler genellikle elektron mikroskopik incelemelerde kullanılmaktadır. Burada konu edilmeyecektir.

Bazı tuzlar proteinleri denatüre ederken bazı tuzlar proteinleri kuvvetle stabilize eder (amonyum sülfat, potasyum dihidrojen fosfat). Sodyum klorür ve sodyum sülfat, cıva içeren bazı fiksatiflere eklenmiştir. Bunlar cıva klorunun proteinlerin amino gruplarına bağlanmasını arttırmaktadır. Enzim histokimyasal veya immünohistokimyasal çalışmalarda hedefe ulaşması istenen bazı makromoleküllerin (antikor vb) hücre membranlarından kolayca geçmesini sağlamak için (hücre membran geçirgenliğini arttırmak için) bazen fiksatif içine non ionik deterjanlar veya saponin katılabilmektedir. Bunlara benzer şekilde, amaca yönelik bazı değişiklikleri gerçekleştirmek için fiksasyon sisteminde çok çeşitli değişiklikler yapılabilir.

#### **Şizofrenik Fiksasyon (Zonal Fiksasyon)**

Ülkemizde çok yaygın olarak görülen fiksasyon özelliğidir. Fiksasyon ve takip sırasında kullanılan çözeltiler farklı penetrasyon hızlarına sahiptir. Ayrıca dokular, bu çözeltiler içinde dokunun tüm katmanlarına çözeltilinin ulaşması için geçmesi gerekli zamandan daha kısa süre bekletilmektedir (arkamızdan athılar kovalıyor ya). Sonuçta farklı çözeltilerin etkisinde kalmış birbirinden farklı şekilde takip olmuş doku zonları meydana gelmektedir. Bu konu ile ilgili ülkemizdeki durum şu şekilde özetlenebilir. Dokunun en dış zonu %10 luk formalin + alkollerin etkisindedir. Ara zonda formalin bulunmaz sadece alkol Eticisi bulunur. En derindeki çekirdek zona ise genellikle kimyasal madde ulaşmamıştır veya burada hafif bir alkol etkisi bulunur.

Türkiye’de kullanılan formalin çözeltileri kaliteli bir aldehid fiksasyonu sağlayacak düzeyde serbest aldehid monomerleri içermemektedir. Ayrıca aldehid fiksasyonu kimyasal bir fiksasyondur, koagülasyon yaratmaz. Yani hücrenin iskeletini rijit bir şekilde tespit etmez. Daha sonra uygulanan alkollerin etkisi ile formalinde yetersiz fikse bu en dış zonda dehidratasyon gerçekleştirilir. Hücre çatısı rijit bir şekilde tespit edilmediğinden hücrelerde bir miktar büzülme meydana gelir. 2. zondaki durum ise şöyledir. Bu zona formalin hiç ulaşmadığı için doku fikse olmadan direk olarak alkollere alınmaktadır. Bu

nedenle bu zonda büzülme artefaktı daha da belirgindir. Hücreler birbirinden ayrılır. Kompartmanlar arasında geniş ayrışmalar olur. Nüveler küçülür, sitoplazmalar büzülür, berrakmış gibi görülür. En iç zona hiçbir şey ulaşmadığı için anlatmaya değmez. Morfolojik farklılıkların yanı sıra bu zonlarda antijenik korunumlar da farklı olacağı için immünohistokimyasal boyamalarda da zonlar arasında farklılıklar oluşmakta, yonteme olan güven sarsılmaktadır. Böyle bir dokuyu mikrotoma takip seri olarak kestiginizi düşünün. Dokuyu düzgün gömmüş, mikrotoma düzgün pozisyonda takmış iseniz ilk alacağımız kesitlerde dokunun tümü 1. zonu temsil eder (formalin + alkol). Eğer daha derinlerden kesit alırsanız (takar kes, açarak kes, immünboya için kes, amuda kaldırarak kes vb) preparat üstündeki doku kesitinde iki zon bulunur. Dışta 1. zon (formalin + alkol) ortada 2. zon (sadece alkol). Eğer bloğunuz konsültasyona başka bir laboratuara gider defalarca kesilirse bu iki zonun ortasında bir zon daha çıkar. Otolitik zon. Bu zon aslında çıkmaz, çıkamaz, çünkü kesilmesi zordur. Bütün kesiti berbat eder.

Buradan çıkarılacak sonuçlar:

- 1- Doku örneklerini ince alın
- 2- Dokunun penetrasyon süresini hesaba katıp her bir çözeltide yeterli süre beklemesi için sabredin.
- 3- Dokuyu parafine düzgün gömün
- 4- Mümkün olduğu kadar ilk zona ait kesitlerde tanıya gidin. Eğer gidememişseniz ve preparatta şizofrenik zonlar oluşmuşsa morfolojik ve antijenik incelemelerinizde sonuçları yorumlarken bu özelliğe dikkat edin.
- 5- Dokuyu konsültasyona gönderdiğinizde konsültasyonu yapacak bölümün işinin daha zor olduğunu bilin.

#### **Sekonder fiksasyon (post-fiksasyon), geri takip**

Bazı laboratuarlarda formalin çözeltileri ile tesbit edilmiş dokular, ikinci bir fiksatif içine konularak ikincil bir fiksasyona tabi tutulurlar. Sekonder fiksatif olarak genellikle cıva içeren fiksatifler (B5 vb) tercih edilmektedir. Bu dokularda mikrotom kesit yapmak daha kolaydır. Dokular suda daha iyi açılırlar. Daha parlak ve canlı boyanırlar. Nükleus ayrıntıları daha net olarak incelenebilir. Bu tür post fiksasyon



uygulamalarına genellikle hematopatolojide rastlamaktayız.

Diğer bir post fiksasyon uygulaması, katekolaminlerin saptanması ve kromafin dokuların incelenmesi gereken durumlarda kullanılır (kromasyon işlemi). Potasyum dikromat içeren fiksatifler kullanılır. Bazen kötü- yetersiz fiksasyon ve takip nedeniyle yeterli kalitede kesit alınamayan, morfolojik ayrıntıları incelenemeyen dokulara “geri takip” denilen işlem uygulanır. Burada takip işlemindeki aşamalar bire bir olarak geriye doğru gerçekleştirilir. Doku tekrar suya getirilir. Yeterli süre ile ve tercihen koagülatif fiksatifler ile ikinci kez tespit edilir. Kurallara uygun şekilde sırası ile takip işlemleri bu kez normal yönde uygulanarak doku tekrar parafine gömülür. Bu yöntemle kötü takipli pekçok dokudan yeterli kalitede kesit almak mümkün olmaktadır. Ancak rutin iş yükü içinde ters yönde ilerleyen bir takip işlemi yapmayı pek kimse sevmez.

#### **Fiksasyon artefakları**

**Volüm değişiklikleri:** Fiksatifin osmolalitesine ve fiksasyon sonrası uygulanan dehidratasyonun şiddetine bağlı olarak intrasellüler ve ekstrasellüler kompartmanlarda volüm değişiklikleri olur. Ülkemizde en çok görülen tablo tam olarak tespit olmamış dokuların yüksek konsantrasyonlu alkoller ile başlayan şiddetli dehidratasyona tabi tutulmasıdır. Belirgin büzülme artefakları oluşur. Bu tür büzülmeler koagülatif fiksatiflerle fikse olan dokularda pek görülmemektedir.

**Formalin pigmenti (Formen):** Asidik formalinde tespitli dokuların kesitlerinde görülür. Dalakda, hemorajik dokularda, konjestif karakterde damarlardan zengin dokularda sık görülür. Fiksasyon süresi uzadıkça yoğunluğu artar. Pigmentin oluşmaması için asidik formalinler yerine nötral tamponlu formalin, fenol formalin veya formol- kalsiyum çözeltileri fiksatif olarak kullanılmalıdır. Eğer kesitlerde pigment oluşmuşsa bunun giderilmesi için de satüre alkolik pikrik asit yöntemi kullanılır. Deparafinize edilip absolu alkole getirilen kesitler satüre alkolik pikrik asit (50 ml) + absolu etanol (50 ml) çözeltilinde 1–24 saat süre ile bekletilir. Alkollerden geçirilip suya alınır ve boyama işlemlerine başlanır.

#### **Mikrodalga Işınlama ile Fiksasyon**

Mikrodalga ışınlama yöntemi; fiksasyon, takip, dekalsifikasyon, çeşitli boyama işlemleri ve antigen retrieval işlemlerinde kullanılmaktadır. Su ve benzeri bipolar moleküllerin 2450 MHz frekans ile osilasyonuna yol açar. Oluşan kinetik enerjinin ısıya dönüşümü sonucu sıcaklık homojen bir şekilde ve çok kısa bir süre içinde yükselir. Sıcaklık artışı sonucu dokuda koagülatif tarzda bir fiksasyon gerçekleşir. Aslında dokuların ve kesitlerin ısıtma yolu ile fiksasyonu uzun yıllardan beri bilinen bir yöntemdir. Ancak bazı sakıncaları nedeni ile kullanım alanı bulamamıştır. Mutfak tipi mikrodalga fırınların kullanımı ile bu konuda yeni bir dönem başlamıştır. Daha sonra patoloji laboratuvarları için özel olarak geliştirilmiş fırınların kullanıma girmesi ile giderek yaygınlaşmaya başlamıştır.

Mikrodalga ışınlama yönteminin fiksasyon aşamasında kullanımı iki şekilde olabilir.

- 1- Ön fiksasyon: Bilindiği gibi yumuşak veya büyük eksizyon materyallerinden standart doku dilimlerinin kolayca alınabilmesi için doku fiksatif içinde bir süre (bir gece) bekletilerek sertleştirilmektedir. İşte bu aşamada mikrodalga ile ışınlanan materyalin dış kabuğu 3–5 dakika gibi kısa süre içinde fikse olarak dilimlenebilir kıvama getirilebilmektedir. Benzer bir uygulama kürataj materyallerinden lenf nodüllerini disseke etmede de kullanılabilir. mikrodalga ile ışınlanan kürataj materyalinde lenf nodülleri fikse olarak beyaz- sert nodüller halini almakta kolayca saptanıp disseke edilebilmektedir.
- 2- Standart doku örneklerinin fiksasyon işlemi mikrodalga ışınlama ile kısa süre de (5–0 dakika) tamamlanabilmektedir.

Fiksasyon sıcaklığı kritiktir (45–55 °C). Düşük sıcaklıklarda kesit kalitesi iyi değildir. 65 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda ise sitoplazmada vakuolizasyon, aşırı boyanma, nukleusta piknotik değişiklikler ve diğer termal artefaktlar oluşur. Bu nedenle hassas bir temperatur probu gerekmektedir.

Işınlama işlemi serum fizyolojik, izotonik buffer çözeltileri veya formaldehid içeren fiksatifler içinde yapılabilir. Işınlamanın homojen olması, dokuların tümüne aynı şekilde ulaşması ve sıcaklığın homojen

şekilde yükselmesi amaçlanır. Bu amacı gerçekleştirmeye çalışan özel tip fırınlar geliştirilmektedir.

### **Fiksatifler üzerine bir karşılaştırma- Ülkemizdeki durum**

Fiksatifler; doku ve hücresel elemanları denatüre hale getirip otolizi durdurur, dokuyu daha sonra uygulanacak takip işlemlerine uygun ve çevre etkenlere karşı dayanıklı hale getirir. Tüm amaçlar için uygun “en iyi” fiksatif yoktur. Amaca en uygun fiksatif veya fiksatifler veya fiksatif kombinasyonları kullanılarak sonuca ulaşılmaya çalışılır. Cerrahi patolojide en yaygın olarak kullanılan fiksatif %10 formalin (%3.7’lik formaldehid) çözeltilisidir. Nispeten zararsız ve ucuzdur, çevre için önemli bir toksik atık sorunu oluşturmaz. Ancak formaldehid çözeltileri stabil çözeltiler değildir. Piyasada çok çeşitli ve kalitesiz çözeltiler bulunmaktadır. Mutlaka sertifikalı çözeltiler kullanılmalıdır. Beklemekle metilen glikol polimerleri oluşur, formik asit oranı artar, pH düşer. Asidik formalin çözeltilerinde formene adı verilen insolubl, siyah renkli pigment oluşur. Bu pigment dokulara çöker. Formene pigmentinin oluşumunu engellemek için stok çözeltilerinin alkali çözeltiler katılarak stabilize edilmesinde yarar vardır (kalsiyum karbonat). Tüm bu sorunların giderilmesi için paraformaldehidten taze olarak %4’lük formaldehid çözeltilisi hazırlayıp aynı gün kullanmak gerekir. Ancak günlük pratikte bu yöntem kullanılamamaktadır. Bunun yerine sertifikalı (güvenilir üretici firma, stabilizator olarak belirli miktarda metanol içeren, son kullanım tarihi belirli) formalin çözeltilisinden hazırlanan tamponlanmış nötralize %10’luk formalin çözeltilisi kullanılabilir. Bu çözeltili tercihan günlük-taze olarak hazırlanıp kullanılmalı, hazırlanan çözeltili en çok bir hafta süre içinde tüketilmelidir. Dokulara gerçek bir aldehid fiksasyonu uygulamak için formaldehitin dokuya ulaşmasından itibaren 10–12 saat kadar bir sürenin geçmesi gerekir. Ayrıca formaldehitin dokuya penetrasyonu için geçecek sürenin de bu süreye eklenmesi gerekir. Kısaca, 3–4 mm kalınlığında bir doku diliminin tamamının gerçek bir aldehid fiksasyonu ile fikse olması için geçecek zaman, yaklaşık 16 saat kadardır. Ancak pratik uygulamalarda bu süre oldukça uzundur ve klinik

baskılar sonucu günlük uygulamalarda bu süre 3–4 saate kadar kısaltılmıştır. Bu sürenin en az 6 saat olması “şizofrenik fiksasyon zonlarının” minimumuna indirilmesi için önerilir. Süre kısaltıldıkça aldehid fiksasyonundan ziyade dehidratasyon aşamasında kullanılan alkollerin etkisi belirginleşecek ve doku alkol tipi bir fiksasyon morfolojisi sergileyecektir. Ülkemizdeki takiplerde genellikle alkolün baskın olduğu şizofrenik tespit paterni görülmektedir. Aldehid fiksatifler proteinlerin amino grupları ile metilen köprüleri veya karbon bağları oluşturur, nazik bir kimyasal fiksasyon sağlar. Bu özellik elektron mikroskopik çalışmalar için istenen bir özelliktir. Ancak parafin doku takip aşamaları ve parafin kesit işlemleri sırasında kromatini ve sitoplazmik yapıları dış etkenlere karşı yeterince dirençli bir hale getirmez, rijit bir fiksasyon sağlamaz. Bu nedenle, parafin blok kesitlerinde, özellikle ince veziküler kromatinli nüvelerin kromatini parçalanıp dağılabilir, öbekler halinde toplanabilir, arada berrak bölgeler kalır. Buna “nuclear bubbling” artefaktı denir. Diğer taraftan sitoplazma elemanları sağlam-rijit bir şekilde tespit olmadığı için daha sonra uygulanan alkol dehidratasyonunda büzülür, sitoplazma olduğundan küçük görülür, birbirine komşu hücreler birbirinden uzaklaşır. Benzer büzülme nukleuslarda da görülür. Bu tür morfolojik değişimlerin dışında kimyasal bir fiksasyon olması nedeniyle proteinlerin yapısını kimyasal olarak değiştirdiği için proteinlerin antijenik özelliklerini de değiştirmiş olur. Gerçek aldehid fiksasyonu ile tespit olmuş dokuda bazı antijenlerin saptanabilmesi için aldehid gruplarının proteinlere bağlandığı yerden koparılıp uzaklaştırılması yani proteinlerin yeniden açığa çıkarılması gereklidir. Bu işleme “antijen retrieval” veya “antijen unmasking”, “antijen recovery” adı verilmektedir. Hematopatoloji gibi sitomorfolojik ayrıntılara ve antijenik özelliklere çok daha fazla dayanmak zorunda olan çalışma alanlarında bazı sorunlar oluşmaktadır. Bu nedenle, aldehid fiksasyonunun dezavantajları göz önüne alındığında, farklı fiksatif kullanımları gündeme gelmiştir. Bu fiksatiflerin çoğu proteinleri koagüle ederek daha sağlam, rijid bir yapı oluştururlar. Bu maddelerin bazıları asidik çözeltilerdir. Proteinlerin kendi isoelektrik pH larından uzaklaşarak koagüle olmalarını sağlar (glasial asetik asit, pikrik asit içeren

Bouin çözeltisi gibi). Diğer bazıları ise metalik katyonlar içerir. Proteinlerin aminoasit zincirlerinin meydana getirdiği organik gruplar ile büyük, insoluble koordinasyon kompleksleri oluştururlar (civa klorür içeren B5 ve Zenker; çinko klorür içeren formalin zinc). Bu özelliklerden de yararlanmak için formalin ile protein presipitan çözeltileri bir arada içeren karma fiksatifler de kullanılmaktadır. (B5, bouin, formalin zinc, Hollande). Protein presipitan ajanlar; HE kesitlerinde daha keskin bir nükleer ayrımı sağlar, immunreaktiviteyi artırır. Ayrıca, daha önce formalin ile tesbit edilmiş ve parafin takibi uygulanmış dokular, geri takip ile suya getirilip protein presipitan fiksatiflerle fikse edildiğinde, sitomorfolojik ve antijenik özelliklerin kısmen düzeldiği görülmektedir. Diğer bir fiksatif grubu ise alkol içeren fiksatiflerdir. Alkol, protein presipitan ve dehidratat özelliklere sahiptir. Bu nedenle antijen korunumu iyidir. Ağır metaller gibi kromatide kırıklara yol açmadığı için moleküler genotipik çalışmalar için de uygun bir fiksatifdir. Ancak dehidratasyona yol açtığı için doku ve hücrelerde büzülme artefaklarına neden olur. Bu özellik küçük dokularda çok belirgindir ve “kuruma artefaktı” oluşturacak düzeye ulaşır. Bu nedenle alkol, tek başına konvansiyonel HE histolojisi için kullanıma uygun değildir. Bunun yerine alkolün de yer aldığı karma fiksatifler tercih edilir (AFA çözeltisi: metanol, formalin, glasiyal asetik asit). Tablo 4’te bazı fiksatiflerin olumlu ve olumsuz yönleri karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Universal bir fiksatif olması nedeniyle nötral tamponlu %10 formalin, tercih edilebilecek bir fiksatifdir. Ancak, özellikle yanlış uygulamaların da katkısı ile (yetersiz fiksasyon süresi, standart dışı çözelti kullanımı, agresif dehidratasyon uygulamaları) morfolojik incelemelerde standart kalite düzeyine her zaman tam olarak ulaşmak mümkün olmamaktadır. Özellikle hematopatologların önemli bir bölümü, morfolojik ayrımı konusundaki üstünlüğü nedeniyle koagülatif fiksatifleri (B5, Zinc formalin, Hollande, AFA, Bouin vb) tercih etmektedir. Çevre için toksik atık olmaları nedeni ile B5 ve benzeri civa içeren fiksatifler son yıllarda giderek daha az kullanılmaktadır. Bouin çözeltisi antijenik incelemelerde zaman zaman sorun oluşturmaktadır. Zinc formalin ve Hollande çözeltisi hem morfolojik hem de antijenik incelemelerde başarılı sonuçlar

vermektedir. Özellikle küçük dokularda (tru-cut, kemik iliği trephine, küçük insizyonlar, endoskopik biyopsiler, deri punch biyopsileri, tüm doku ve organlardan alınan tru-cut biyopsileri, lenf nodülleri ) Hollande fiksatifli ile mükemmel morfolojik ayrımı elde edilmektedir. Ancak tüm bu ağır metalli koagülatif fiksatifler nükleik asit zincirlerinde kırılmaya yol açmaktadır. Bu nedenle moleküler genotipik ve sitogenetik çalışmalarda bazı sorunlara yol açabilirler. AFA fiksatifli, nükleik asit korunumu konusundaki üstünlüğü nedeni ile önümüzdeki yıllarda yaygın kullanıma aday fiksatiflerden biridir. Nükleer morfolojik detay mükemmeldir. Sitoplazmik büzülme ve küçük parçalarda kurumaya yol açabilir. Antijenik incelemelerin bazılarında optimal şartların araştırılması gerekmektedir.

İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında, taze gelen lenf nodülleri ayrı parçalar halinde, Hollande, AFA ve formalin zinc ile fikse edilerek morfolojik, antijenik ve genotipik incelemeler için kullanıma uygun geniş bir doku yelpazesi oluşturulmaya çalışılmaktadır. Fiksasyon süresi Hollande ve formalin zinc için 12 saattir. Küçük dokular (tru-cut, 1–2 mm lik insizyonlar, punch biopsiler ve endoskopik biopsiler) için 3–4 saat yeterlidir. Daha önce formalin fiksasyonu uygulanmış dokularda formalin zinc ve AFA ile post fiksasyon uygulaması, kaliteyi arttırmaktadır. Kötü takip edilmiş dokularda ise geri takip işlemi sonrası B5 ile post fiksasyon iyi sonuç vermektedir. AFA ile fiksasyonda 4–6 saat yeterlidir. Küçük dokular çok daha kısa sürede fikse olurlar. AFA hariç diğer tüm fiksatiflerde fiksasyon sonrasında 20–30 dakikalık bir yıkama işlemi uygulanmalıdır. AFA’da ise direk olarak alkollere geçilebilir. Tablo 3’te bazı fiksatiflerin formülleri verilmektedir. Karşılarında bu fiksatiflerin yerli ve yabancı kimyasal malzemeler ile hazırlanmasının maliyetleri, son sütunda ise kullanıma hazır olarak alınmaları halindeki litre başı maliyetleri TL olarak verilmiştir.

**Tablo 3.** Bazı fiksatiflerin içerikleri ve fiyatları

	Fiyatlar		
	Yerli	Yabancı	Hazır çözelti
<b>%10 Formalin (%4 formaldehid)</b>	300.000	683.000	5.000.000
%37-40'lık formaldehid	100 ml		
Distile su	900 ml		
<b>Nötral Tamponlu %10 Formalin</b>	707.920	788.000	20.000.000
%37-40'lık formaldehid	100 ml		
Distile su	900 ml		
Sodyum fosfat monobazik monohidrat	4 gr		
Sodyum fosfat dibazik anhidroz	6,5 gr		
<b>Zink Formalin</b>	350.000	1.000.000	66.000.000
%37-40'lık formaldehid	100 ml		
Distile su	900 ml		
ZnCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 gr		
<b>AFA Fiksatif</b>	7.553.000	8.372.150	66.000.000
Absolu etanol veya metanol	750 ml		
%37-40'lık formaldehid	200 ml		
Glasiyal asetik asit	50 ml		
<b>B5 Fiksatif</b>	–	1.500.000	200.000.000
<b>B5 stok solüsyonu</b>			
Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	12 gr		
Sodyum asetat	2,5 gr		
Distile su	200 ml (ısıtılarak karıştırılır, pH 5.8'e ayarlanır)		
<b>B5 Çalışma Çözeltisi</b>			
Stok B5 çözeltisi	20 ml		
%37-40'lık formaldehid	2 ml (kullanımdan hemen önce karıştırılarak hazırlanır)		
<b>Hollande Fiksatif</b>	27.660.000	28.079.000	91.000.000
Bakır asetat	25 gr		
Pikrik asit	40 gr		
%37-40'lık formaldehid	100 ml		
Glasiyal asetik asit	5 ml		
Distile su	1000 ml'ye tamamlanır		

**Tablo 4.** Fiksatiflerin karşılaştırmalı özellikleri.

Özellikler	Tamponlu formalin	Hollande	B5	Formalin Zinc	Bouin	Alkol	AFA
Nükleus Detayı	Bubling artefakt	Keskin, net	Keskin, net	Formalinden iyi	Keskin, net	Keskin büzülme	Keskin büzülme
Sitoplazma Detayı	Büzülme	İyi	İyi	Büzülme	İyi	Büzülme	Büzülme
Antijen korunumu	Orta	İyi	İyi	İyi	Orta	İyi	İyi
Takip makinesine uyum	Evet	Hayır	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
Stabilite	Kısa (günler)	İyi	Çok kısa	Kısa (günler)	Kısa (günler)	İyi	İyi
Maliyet	Düşük	Orta	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Orta
Çalışana toksite	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Çevreye toksisite	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Elektron mikroskopi.	İyi	Kötü	Kötü	Yeterli	Kötü	Kötü	Kötü
Nükleik asit korunumu	İyi	Kötü	Kötü	?	Kötü	İyi	İyi