

MİKRODALGA IŞINLARIN PARAFİN KESİTLERİN BOYANMASINA ETKİSİ

Doç. Dr. A. Ali Küpeliolu(*) • Dr. Neriman Gökden(**)
Dr. Murat Gökden(**) • Prof. Dr. Emek Özen(***)

ÖZET: Uzun histoteknolojik yöntemlerin aldığı zaman, çoğu kez bir sorun olarak patoloğun karşısına çıkmaktadır. Önce Hollanda'da patoloji laboratuvarına giren mikrodalga uygulaması ile büyük ölçüde kısalan işlemler sayesinde zaman problemi hemen ortadan kalkmıştır. Bu çalışmamızda değişik dokulardan rutin yöntemlerle hazırlanan parafin kesitler H-E ve özel boyalar ile hem klasik yöntem, hem de mikrodalga kullanılarak boyanmış, sonuçta kalite bozulmaksızın boyanma sürelerinin önemli ölçüde kısaldığı gözlenmiştir.

SUMMARY: Time devoted histotechnologic methods often become a problem for the pathologist. As the methods are shortened by the usage of microwaves which were first applied to pathology in Netherlands, time has almost entirely ceased to be a problem. In this study, paraffin sections prepared from various tissues by classical methods, stained with H-E and special stains both by routine methods and microwave application, are compared. As a result, the staining times are found out to be shortened considerably with the preservation of the quality.

GİRİŞ

Patoloji alanında histoteknolojik yöntemlerin önemi bilinmektedir. Doğru histopatolojik tanıya kaliteli bir kesit olmaksızın ulaşabilmek oldukça zordur. Bu arada zaman faktörü de bir engel olarak patoloğun karşısına çıkmaktadır. Zaten fazlasıyla zaman alan doku işleme ve mikroskopik kesitlerin hazırlanması aşamalarına, bu kesitlere rutin ve çoğu zaman özel boyaların uygulanması zorunluluğu da eklenmektedir. Böyle olunca bir olgu için patoloğun mikroskop başında geçirdiği zamanın defalarca fazlası laboratuvarında geçmektedir. Ayrıca, düşünülen olası tanılara göre istenen özel boyaların beklenmesi, yoğun bir ortamda, çalışmalarını da aksatabilmektedir.

Boon ve Kok'un çalışmaları sonucu histoteknoloji alanına giren mikrodalga (MW) kullanımı, yukarıdaki sorunların çözümünü yolunda büyük kolaylıklar sağlamıştır. 1984 yılında Hollanda'da başlatılan uygulama (3), giderek yaygınlaşmıştır. Önceleri mutfak tipi MW fırınlar kullanılırken, daha sonraları bu iş için özel havalandırma donanımlı ve termostatlı fırınlar üretilmiştir (2). Ayrıca Avrupa'da bu konuyla ilgili periodikler de yayınlanmaktadır (7).

Türkiye'de ilk uygulama Umar ve ark. tarafından başlatılmıştır. Araştırmacılar kendi laboratuvarlarındaki materyalle öncelikle doku işlemi üzerinde, Boon'un uyguladığı yöntemin modifiye edilmiş ve daha pratik bir şekli ile çalışmışlardır (8).

Bu çalışmada Umar ve ark.'nın deneyimlerinden de yararlanarak, MW ışınımının parafin ve frozen kesitlerin boyanması üzerindeki etkisini inceledik. Hematoksilin-eozin (H-E) yanısıra PAS, alcian blue, Masson trikrom, Masson-Fontana, Retikülün, Verhoeff elastik boyası ve PTAH boyaları uyguladık.

(*) Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Doçenti.

(**) Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Asistanı.

(***) Dokuz Eylül Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Profesörü.

MATERYAL-METOD

Anabilim Dalımız'a gelen çeşitli materyalden rutin yöntemlerle hazırlanan parafin kesitler, H-E yanısıra alcian blue, Masson Trikrom, Masson-Fontana, PAS, retikülin, Verhoeff elastik boyası ve PTAH özel boyaları ile hem rutin yöntemle, hem de MW ışınım kullanılarak boyanmış, daha sonra her iki yöntem, preparatlar çift kör değerlendirilerek kalite yönünden karşılaştırılmıştır. Ek olarak frozen kesitlere de H-E boyası uygulanmıştır. Ayrıca iki yöntemin uygulama süreleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada maksimum gücü 980 W olan Vestel Goldstar MW mutfak fırını kullanılmıştır (Model No: ER-5054 T). Boya solüsyonları ise klasik formüllere göre hazırlanmıştır (1).

Boyama sırasında MW ışınımın hangi aşamada ne şekilde uygulandığı Tablo 1'de gösterilmiştir. Her iki yöntemde de boya solüsyonlarının bazıları şalelerde 80 ml. olarak kullanılırken, bazıları preparat üzerine 2 ml. damlatılarak uygulanmıştır. Ayrıca preparatlar şaledeki 80 ml. son absölv alkolde % 100 güç ile 1' ve son ksilolde % 100 güç ile 2' ışınlanmıştır. Diğer aşamalar ise klasik yöntemle uygun olarak gerçekleştirilmiştir (1). Termometre ile sıvıların ısı kontrolü yapılarak ve ek olarak koyulan su kapları ile fazla ısı soğurularak ısının 50°C'tan fazla olmamasına dikkat edilmiştir.

TABLO 1: MW ışınımın boyamanın hangi aşamasında ne şekilde uygulandığı.

Boya	Aşama	Güç (%)	Süre (Toplam)
H-E	Hematoksilen*	100	1'
Retikülin	Potasyum permanganat	75	30"
	Iron-alum	75	1'
	Gümüş solüsyonu*	75	30"
	Sodyum tiosulfat	75	30"
PAS	Periodik asit	40	1'
	Schiff*	100	3'
Alcian blue	Alcian blue	100	15"
	Nuclear fast red	80	10"
Masson trikrom	Demir hematoksilen	80	30"
	Asit fuksin	80	1'
	Fosfotungstik asit	80	1'
	Light green	80	30"
Masson-Fontana	Gümüt nitrat*	100	3'
	Altın klorür*	100	1'
	Sodyum Tiosulfat	50	1'
	Nuclear fast red	80	10"
Verhoeff elastik	Çalışma solüsyonu	50	1'
PTAH	Sodyum Tiosulfat	50	30"
	Çeşme suyu*	100	2'
	PTAH* (:)	100	4'

*- Preparatlar şaledeki 80 ml. solüsyonun içine koyularak ışınlanmıştır.

(:)- Solüsyonların ısılarının istenen düzeyde tutulmaları için soğumaları beklenmiş, böylece solüsyonda geçen toplam süre gümüş nitrat için 5', PTAH için 15' olmuştur.

TABLO 2: Klasik ve MW kullanılan yöntemlerin boya serisindeki distilesudan sonraki sürelerinin karşılaştırılması.

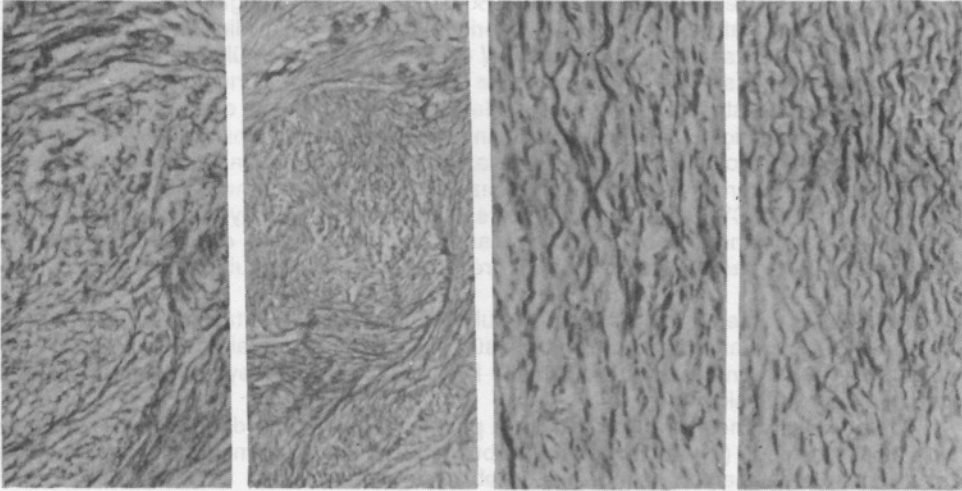
Boya	Klasik Yöntem	Mikrodalga
H-E	40'	17'
Retikülin	55'	13'
PAS	42'	22'
Alcian blue	55'	8'
Masson trikrom	60'	13'
Mason-Fontana	100'	16'
Verhoeff elastik	45'	17'
PTAH	24 saat	26'

SONUÇLAR

Klasik ve MW kullanılan yöntemlerin boya serisindeki distile sudan sonraki süreleri Tablo 2'de karşılaştırılmıştır. Daha önceki basamaklar standard kabul edilmiştir.

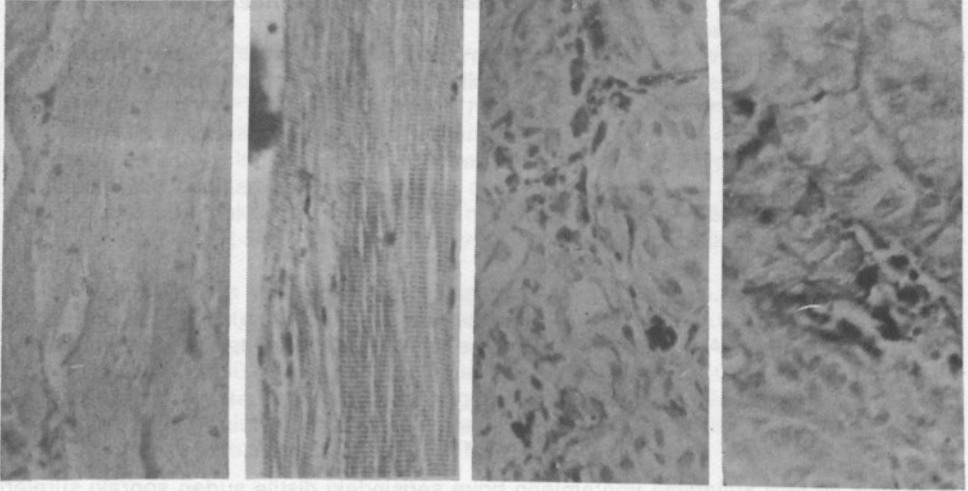
Görüldüğü gibi belirli aşamalarda MW ışınım uygulanması, histokimyasal reaksiyonların çok daha kısa bir sürede oluşmasını sağlamaktadır. Değişik boyama yöntemlerinde boyanma süresinin ileri derecede kısaldığı ve 1/2 saatin çok altına indiği görülmektedir. Örnek olarak, H-E'de 40'dan 17'ye, PTAH'de 24 saatten 26'ya, Mason-Fontana'da 100'dan 16'ya, alcian blue'da 55'dan 8'ya inmiştir.

Ayrıca, MW kullanılarak hazırlanan preparatlarda kalitenin bozulmadığı, hatta çoğu zaman daha kaliteli preparatlar elde edildiği gözlenmiştir (Resim 1,2,3,4). yine frozen kesitlerin H-E boyanmasında kalitenin önemli ölçüde arttığı saptanmıştır.



Resim 1: Myometrium retikülin boyası, a. MW, b. Klasik yöntem (200X).

Resim 2: Aorta Verhoeff elastik boyası, a. MW, b. Klasik yöntem (200X).



Resim 3: Çizgili kas PTAH boyası, a. MW, b. Klasik yöntem (400X).

Resim 4: Malign melanom Masson-Fontana boyası, a. MW, b. Klasik yöntem (400X).

TARTIŞMA

Teknik yönden patoloji laboratuvarına çok büyük kolaylıklar getiren MW ışınım, frozen kesitleri boyama (3) doku işlemi (3,8), Ziehl-Neelsen boyama (5), parafin kesitlere immun-peroksidaz yöntemin uygulanması (4), ışık ve elektron mikroskopu için fiksasyon (6) ile pekçok özel boya ve kemik dekalsifikasyonunda (3) kullanım alanı bulmaktadır.

Mikroskopik kesitlerin boyanmasında iki faktör rol oynamaktadır. Bunlar boyanın hücreleri difüzyonu ve substratlarına bağlanmalarıdır. Fiziksel bir olay olan difüzyon, MW uygulanması ile aşırı şekilde hızlanmaktadır. Boyanın substratına bağlanması ise fizikokimyasal bir olay olup, afinite, Kolomb kuvvetleri gibi faktörler ile ilgilidir. Bu reaksiyonlar ısıya bağımlıdır; ısı yükseldikçe hızlanırlar. MW ışınım ise ısıyı hızla yükseltmektedir (3).

Uygulamalar sırasındaki deneyimlerimize göre, kullandığımız fırının mutfak fırını olması, özel termostat sistemi bulunmaması nedeniyle, yeterli deneyim olmadan kullanıldığında ısının kümülatif biçimde artması, kesitlerin bozulmasına yol açabilmekte ya da preparat üzerine damlatılan solüsyonları hızla buharlaştırmaktadır. Bu nedenlerle ışınlama süresini çok iyi ayarlamak gerekmektedir. Çalışmamızda bu amaçla termometre ile ısı kontrolü yapılmış ve ısının 50°C'in üzerine çıkmaması sağlanmıştır. Ancak boyanın preparat üzerine damlatılarak uygulandığı aşamalarda bu olanak bulunmadığından çok dikkatli olmak gerekmektedir. Bu amaçla içi su dolu kaplar preparatlarla birlikte koyularak fazla ısı soğurulmuştur.

Yine, klasik yöntemlerde olduğu gibi, kullanılan solüsyonların tazeliği başarıyı etkilemektedir. Solüsyonların durumu, ışınlama süresi ve gücü arasındaki dengenin iyi ayarlanabilmesi, başarı için gereklidir. Aksi halde kesitler bozulmakta veya boyalar ya yetersiz ya da çok koyu olmaktadır.

Yöntemler glikometakrilat, plastik ya da parafin kesitlere göre değişiklik ve karmaşıklıklar göstermektedir (3). Ancak kanımızca bunlar kesin kurallar olmayıp eldeki olanaklara göre deneme-yanılma yoluyla modifiye edilebilecek yöntemlerdir.

Sonuç olarak patoloji laboratuvarındaki pekçok işlemde kullanılan MW ışınımın özel boyalara uygulanması özellikle zaman bakımından ve kaliteyi bozmaksızın büyük kolaylıklar sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bancroft JD, Stevens A: Theory and Practice of Histological Techniques. 1st. Ed., Churchill, Livingstone, New York, 1977.
2. BioRad microscience Division, Watford, Hertfordshire, England.
3. Boon ME, Kok LP: Microwave Cookbook of Pathology, The Art of Microscopic Visualization. Colomb press, Leyden, 1987.
4. Chiu KY: Use of microwaves for rapid immunoperoxidase staining of paraffin sections. Med Lab Sci, 44: 3-5, 1987.
5. Hafiz S, Spencer RC, Lee M, Gooch H, Duerden B: Use of microwaves for acid and alcohol fast staining. J Clin Pathol, 38: 1073-1084, 1985.
6. Leong ASY, Daymon ME, Milios J: Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy. J Pathol, 146: 313-321, 1986.
7. Microwave Newsletter: Edited by Marani E, Jan. 1, 1989.
8. Umar MH, Pabuccoğlu HU, İnce Ü, Falakalı S: Mikroelektromagnetik dalgaların histotekniğe uygulanması. EÜTF Dergisi, 1989 (Baskıda).