

İnce Bağırsağın Fiksasyonunda Mikrodalga Işınımının Kullanımı*

Zeynep Kahveci**, Şahin A. Sırmalı***

ÖZET. Işık mikroskopisi için dokuların fiksasyonunda formalin veya diğer kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Bu çalışmada sıçan ince bağırsağının fiksasyonu için mikrodalga ışınımı kullanılmış ve sonuçlar klasik fiksasyon yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Işık mikroskopik olarak; mikrodalga fiksasyonunun sonuçları, klasik fiksasyon sonuçlarından ayırt edilemeyecek kadar iyi bulunmuştur. Çalışmalarımıza göre; ince bağırsak fiksasyonunda mikrodalga kullanımı basit, etkili ve hızlı bir yöntem olarak görülmüş ve günlük histolojik işlemlerde uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler .Mikrodalga ışınımı .hızlı fiksasyon .ince bağırsak.

The Use of Microwave Irradiation For Small Intestine Fixation

SUMMARY. Current methods of fixation employ formalin or other chemical agents for light microscopy. This report describes the use of microwave irradiation for the fixation of small intestine of rat and the results are compared with those of obtained by current methods of fixation. In light microscopy, microwave fixation leads to excellent results that can not be distinguished from optimum conventional fixation. According to our studies; microwave fixation appears to be a simple, efficient and rapid method of small intestine fixation which can be applied to routine histological procedures.

Key Words .Microwave irradiation .rapid fixation .small intestine.

Mikroskopi için ideal bir preparat hazırlaması, artefaksız görüntü elde etmeyi amaçlar. Bunu gerçekleştirmek için uygulanan ilk basamak "fiksasyon"dur ve bu basamak sonraki aşamalar için temeldir. Fiksasyon olayını gerçekleştiren maddelere fiksatif adı verilir¹⁻⁴. Fiksasyonu etkileyen en önemli faktörlerden biri zamandır. Fiksasyon zamanı; dokunun büyüklüğü, fiksatifin difüzyon gücü, dokunun cinsi, ortamın ısı gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Geleneksel olarak materyallerin fiksasyonu oda ısısında yapılır. Fiksasyon işlemi dahil tüm kimyasal reaksiyonlar yüksek ısılarda daha hızlı olur. Peracchia ve arkadaşları 1972 yılında fiksasyonu yavaş yavaş artan ısılarda yapılması gerektiği fikrini ileri sürmüşlerdir. Formalinin 60°C'ye kadar ısıtılması acil biyopsilerin

fiksasyonunda doku bozulma riskinin yüksek olmasına karşın kullanılmaktadır³.

Isı kaynağı olarak klasik yöntemler yanında mikrodalga ışınımı da kullanılmaktadır. Kapalı bir dalga üreticisi olan mikrodalga fırınlarda enerji, ya tek kaynaktan ya da birbirine zıt yerleşimli iki kaynaktan salınır. Bütün klasik mutfak fırınları ve laboratuvar fırınları 2425 - 2475 Hz'e göre ayarlanmıştır⁵.

Mikrodalga ışınımının doku fiksasyonunda ilk kez kullanımı 1970'li yıllarda başlamıştır. Doku fiksasyonunda mikrodalga ışınımını kullanan ilk araştırmacının Mayer olduğu bilinmektedir⁶⁻⁸. Bu yolla postmortem materyallerin fiksasyonunun doyurucu sonuçlar verdiğini bildiren yayınlar vardır⁸⁻¹⁶.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada 250-450 g ağırlığında 10 adet dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar disseksiyon tekniğine uygun şekilde açıldı.

* U.Ü. Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji ABD'da gerçekleştirilmiştir.

** Dr. Ph D.; U.Ü. Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji ABD.

*** Prof. Dr.; U.Ü. Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji ABD.

Geliş Tarihi: 01.03.1995

Kabul Tarihi: 29.11.1995

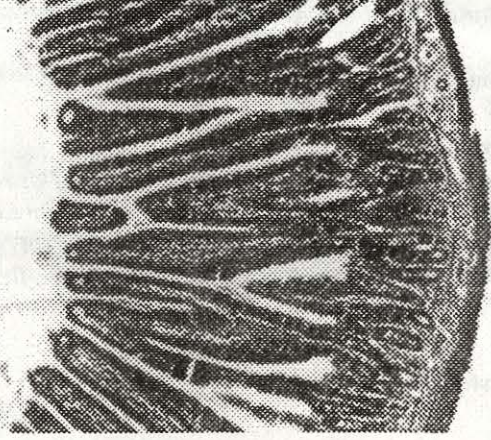
Özel bir düzenek yardımıyla ince bağırsaktan 10 mm uzunluğunda parçalar alındı. Kontrol grubundaki parçalar oda sıcaklığında (18°C) 210 cc nötral formalin içinde fikse edildi. Fiksasyon süresini saptamada Madevar'ın $d=k\sqrt{t}$ formülünden yararlanıldı³. Kontrol grubu için bu süre 1 saat 38 dakika olarak bulundu. Deney grubundaki parçalar mikrodalga fırında 210 cc nötral formalin içeren özel bir kapta fiksasyona tabi tutuldu. Dokuların disseke edilip, nötral formaline atılması ile mikrodalga fırında fiksasyon işleminin gerçekleştirilmesine kadar geçen süre (=ıslatma aşaması) 15 dakikadır. Deneyde ER 535 MT modelinde, 550 watt çıkış güçlü, mikrodalga salınımı 2450 MHZ olan Vestel/Goldstar marka mutfak tipi mikrodalga fırın kullanıldı. Fiksasyonun 55°C'de gerçekleştirilmesi için mikrodalga fırın ilk 1 dakika tam güç seviyesinde (PL=10) çalıştırılarak 55°C dakika çalıştırılarak sıcaklığın sabit kalması sağlandı ve fiksasyon gerçekleştirildi. Fikse edilen dokulardan

alınan kesitler Hematoksilen ve Eosin (HE) ve Masson trikrom teknikleri ile boyandı. Kontrol ve deney grubu ışık mikroskopik olarak incelendi; doku yapısı, eritrositlerin sağlamlığı, kromatin yapısı incelenerek karşılaştırıldı, 3 puan üzerinden değerlendirildi. Bu değerlendirmelerin aritmetik ortalamaları alındı. Alınan sonuçlara Mann-Whitney U testi uygulandı.

Bulgular ve Sonuç

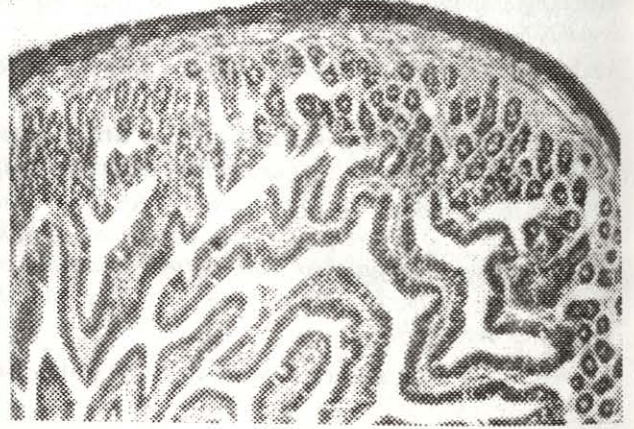
Oda sıcaklığında fikse edilen grupta; ince bağırsak yapısı tümüyle korunmuştu (Şekil: 1a; Şekil: 2a).

Mikrodalga fırında fikse edilen grupta; ince bağırsakta yer alan tüm tabakalar normal yapıda gözlemlendi (Şekil: 1b; Şekil: 2b). Sadece villusların uç kısımlarıyla lamina propria'da yer alan damarlar içinde eritrolizis gözlenirken, submukozadaki damarlarda bulunan eritrositler sağlamdı. HE boyamasında eosinofilide artış görüldü.



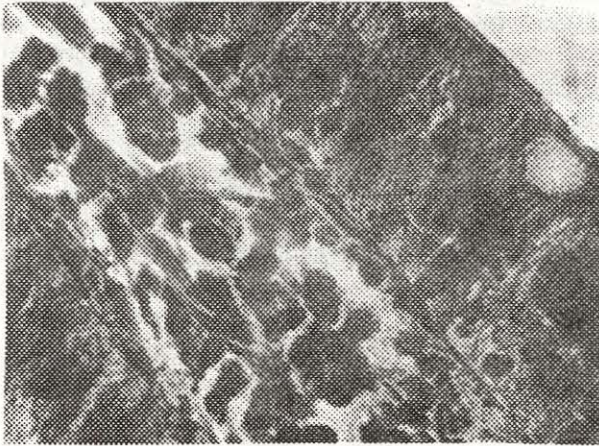
Şekil: 1a

İnce bağırsak genel yapısı. Oda sıcaklığında fikse edilen grup. HE x 25.2



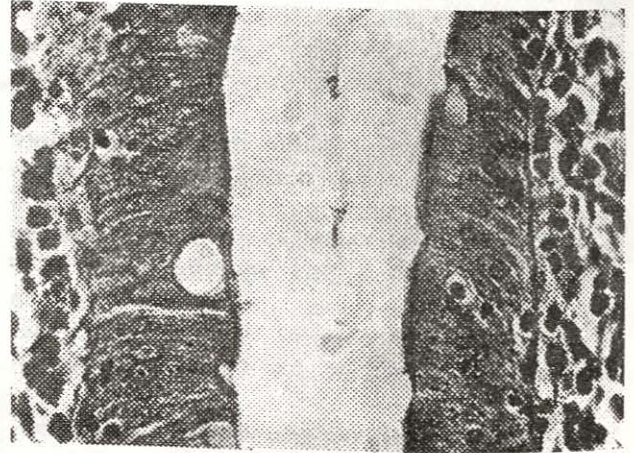
Şekil: 1b

İnce bağırsak genel yapısı. Mikrodalga ışınımı ile fikse edilen grup. HE x 25.2



Şekil: 2a

İnce bağırsakta silindirik epitel, goblet hücreleri. Oda sıcaklığında fikse edilen grup. Masson trikrom x 1280



Şekil: 2b

İnce bağırsakta silindirik epitel, goblet hücreleri. Mikrodalga ışınımı ile fikse edilen grup. Masson trikrom x 800

İnce bağırsağa ait bulguların değerlendirilmesi tabloda görülmektedir. İstatistiksel olarak deney grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Tartışma

Bir organ parçası bir fiksatif içine konulduğunda, fiksatifin difüzyonu genellikle fiksatifin dokularla reaksiyona girmesinden daha hızlı olur. Bunun sonucunda fiksasyon ilerledikçe materyalde konsantrik tabakalar oluşmaya başlar^{1,3}. Konvansiyonel bir fırın ısı kaynağı olarak kullanıldığında, parça dıştan içe doğru ısınır (dıştan ısınım)^{5,6,17,18}. Öncelikle ısınan dış bölümde gerçekleşen fiksasyon, fiksatifin derine penetrasyonuna engel olan bir bariyer oluşturur ve sonuçta, fiksasyon oranı paradoksal olarak yavaşlar. Bu olay formaldehit ve daha az olarak da alkol fiksasyonunda olabilir¹⁷. Mikrodalga fırında ışınlama, fiksatifin doku içine difüzyonunu artırır. Bunun yanısıra ısının yardımıyla fikse olmamış merkezi bölüm mikrodalga fırında ışınlamanın içten dışa doğru olması (içten ısınım) ile fikse edilebilir^{5,6,18}. Bu olaya "mikrodalga stabilizasyonu" denir ve mikrodalğanın herhangi bir kimyasal ayıraç kullanılmadan yalnızca ışınlama etkisiyle gerçekleştirdiği fiksasyonu tanımlar^{9,15,16,19}. Mikrodalga stabilizasyonu, mikrodalga fırında kimyasal ayıraç kullanılarak (formaldehit gibi) yapılan ve "mikrodalga stimüle edilen kimyasal madde fiksasyonu" olarak bilinen fiksasyondan farklıdır^{6,10,20,21,22,23}. Sonuçta, dışta mikrodalga fırında stimüle edilen kimyasal madde fiksasyonu ile içte mikrodalga stabilizasyonu ile gerçekleşen fiksasyon arasında konsantrik bir tabakalanma oluşur¹⁷. Böyle bir etkiyi azaltmak için önce fiksatif ajanının oda ısısında dokuya girmesi sağlanır. Buna "ıslatma aşaması" denir⁶. Bundan sonra mikrodalgalama ile reaksiyon hızlandırılır. Böylece kısmen fikse olmuş dokunun içersine daha fazla fiksatifin girmesi kolaylaştırılır. Mikrodalga fırında stimüle edilen kimyasal madde fiksasyonundaki bu özellik dikkate alınarak, çalışmamızda, ıslatma aşaması literatürde önerildiği gibi²³ 15 dakika uygulandı.

Konvansiyonel bir fırında formalinin ısısını 60°C'ye kadar artırarak fiksasyon gerçekleştirildiğinde dokularda bozukluk olduğu belirtilmektedir³. Oysa buna benzer çalışmalar mikrodalga fırında yapıldığında sonuçların çok iyi olduğunu bildiren yayınlar vardır^{8,10,12,24,15}. Aradaki farklılığın, ısınım yönlerinin (içten ya da dıştan ısınım) etkisiyle mi, yoksa mikrodalga ışınlamanın etkisiyle mi olduğu tartışılmaktadır.

Mikrodalga fiksasyon için 50-70°C'nin uygun ısı olduğunu, 50°C'nin altında fiksasyonun yetersiz, 70°C üzerinde ise histolojik sonucun kötü olduğunu

bildiren yayınlar vardır^{8,25}. Dokuların fiksasyonu için gerekli ısının 55°C civarında olduğu bildirildiğinden, çalışmamızda ısının 55°C'de sabit tutulması uygun bulundu⁶.

Ülkemizde bu konuyla ilgili çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bunların çoğunda patolojik materyaller kullanılmıştır. Bu çalışmalarda materyallerin laboratuvara ulaşana kadar geçen ıslatma aşaması süresi belirsizdir. Ayrıca bu çalışmalardaki dokuların histopatolojik değerlendirilmesinin ayrıntılı bir şekilde belirtilmemesi ve yöntemin dokuların boyanma aşamasında kullanılmış olması gibi nedenler bizim çalışmamız ile yeterli karşılaştırma yapabilmemizi engellemiştir²⁶⁻²⁸.

Leong ve arkadaşları¹⁶, 1986 yılında 67-74°C arasında 4-9 dakika serum fizyolojik içinde mikrodalgalama uyguladıkları parçalardan ince bağırsakta, 12-18 saat formalinde oda sıcaklığında fikse edilen gruba göre sitomorfolojinin çok iyi korunduğunu bildirmişlerdir. 1988 yılında Leong¹⁹ serum fizyolojik içinde 58°C'de 120 saniye mikrodalgalama uyguladığı ince bağırsakta yapının çok iyi korunduğunu bildirmiştir. Ancak, sonuçlarla ilgili ayrıntılar verilmemiştir. Bulgularımızda mikrodalga fırında fikse edilen grupta eritrositlerin, yalnızca villusların uç kısmında yer alan kapillerlerde lizise uğramış olması, diğer bölümlerde sağlam olarak bulunmasının bu iki çalışmada da görülüp görülmediğini bilemiyoruz. Bunun dışında yapının korunmuş olduğu sonucu bizim bulgularımızla uyumludur. Yine literatür bulgularıyla desteklenen bir bulgumuz da, mikrodalga ile fikse edilen ve HE ile boyanan preparatlarda eosinofilide görülen artıştır^{6,8,19}. Mikrodalga fırının dezavantajlarından olan eritrolizis daha önce de bildirilmiştir^{8,16,29}. Eritrolizis mikrodalgalama başladığında metilen glikolün olmadığı doku bölgelerinde olmaktadır²⁹. Eritrolizisin nedeni yüksek ısı değildir. 37°C'de mikrodalga kullanıldığında oluşan eritrolizisin 50-60°C'de olandan farksız olduğunu, ısı olmadan eritrolizis olduğunu bildirir yayın vardır¹⁴. Mikrodalga fırının, dokuda fikse olmamış eritrositleri zedelediği, bunun da lizis ile sonuçlandığı düşünülmektedir ve mekanizması henüz çözülememiştir. Ancak dokular formaldehitte tutulup "ıslatma aşaması"ndan sonra mikrodalga fırına serum fizyolojik içinde konursa eritrolizis görülmemiştir. Bu nedenle ıslatma aşamasıyla birlikte formaldehit fiksasyonunun mikrodalga ile olan zedelenmeyi nötralize edeceği düşünülmüştür. Ancak ıslatma aşamasının 4 saat gibi uzun bir süre olması önerilmektedir. Fiksatif, formaldehit içermese bile eritrolizisin yine de olduğu görülmüştür^{18,29}.

Bu çalışma sonunda bulgularımız bize göstermektedir ki, mikrodalga fırında fiksasyon ile oda sıcaklığındaki fiksasyona eşit kalitede histolojik kesitler elde edilebilmektedir. Literatür bilgileri

mikrodalga tekniğinin değişik bir çok dokunun fiksasyonunda bir yöntem olarak kullanılması gerektiğini önerecek kadar iyi preparat elde edildiğini göstermektedir.^{6,30,31} Değişik dokularda (akciğer, beyin, karaciğer, dil, böbrek) uyguladığımız bu teknik ve sonuçlar ince bağırsağın fiksasyonu örnek alınarak bu çalışmada açıklanmaktadır. Mikrodalga fırında fiksasyonun süresinin azaltılması doku bilimcileri doğrudan ilgilendirmemektedir. Bizler için önemli olan kaliteli preparat elde etmektir. Mikrodalga fırın ile elde edilen sonuçların kalitesi ve zaman kazancı, mikrodalga tekniğinin amaca uygun ise kullanılmasını önermemize neden olmuştur.

Tablo: İnce bağırsağa ait bulguların istatistik değerleri

	Preparat Sayısı	Puanların Aritmetik Ortalaması	Standart Sapma	Standart Hata
Doku yapısı				
Mikrodalga fırın	10	2.8	0.4	0.1
Oda sıcaklığı	10	2.8	0.4	0.1
Eritrositler				
Mikrodalga fırın	10	2.7	0	0
Oda sıcaklığı	10	2.7	0.5	0.1
Kromatin yapısı				
Mikrodalga fırın	10	2.9	0.3	0.1
Oda sıcaklığı	10	2.8	0.4	0

Dr. Zeynep KAHVECİ
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji ABD
Tel: 442 82 00 / 21160
16059 Görükle / BURSA

Kaynaklar

1. Drury Rab, Wallington EA: Carleton's Histological Technique. 4. edition. Oxford University Press, New York: 1967, pp. 33-46.
2. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley OR: Basic Histology. 6. edition. Appleton & Lange, New Jersey: 1989, pp. 1-496.
3. Hopwood D: Fixation and fixatives, in Bancroft JD, Steven A(ed): Theory and Practice of Histological Techniques. 2. Edition. Churchill Livingstone, New York: 1982, pp. 20-39.
4. Bloom W, Fawcett W: A Textbook of Histology. 9. edition. WB Saunders Co, Philadelphia: 1968, pp. 9-10.
5. Kok LP, Boon ME: Physics of microwave technology in histochemistry. Histochem J. 22: 381-388, 1990.
6. Kok LP, Boon ME: Microwaves for microscopy. Microscopy. 158: 291-322, 1990.
7. Turner CR, Zuczek S, Knudsen DJ, Wheeldon EB: Microwave fixation of the lung. Stain Techn. 65: 95-101, 1990.
8. Hopwood D, Coghill G, Ramsay J, Milne G, Kerr M: Microwave fixation: its potential for routine techniques, histochemistry, immuno-cytochemistry and electron microscopy. Histochem J. 16: 1171-1191, 1984.
9. Bernard GR: Microwave irradiation as a generator of heat

- for histological fixation. Stain Technol. 49: 215-224, 1974.
10. Login GR: Microwave fixation versus formalin fixation of surgical and autopsy tissue. Am J Med Technol. 44: 435-437, 1978.
11. Patterson MK, Bulard R: Microwave fixation of cells in tissue culture. Stain Technol. 55: 71-75, 1980.
12. Daymon ME, Leong ASY: Microwave fixation for surgical and autopsy tissues. Pathology. 16: 481, 1984.
13. Van Valkenburg CFM, Marani E, Boon ME, Visser P: The use of microwave irradiation with low formalin concentrations to enhance the conversion of dopamine into norsalsolinol in rat brain. A pilot study. Histochem J. 22: 353-357, 1990.
14. Cleary SF, Liu L-M, Garber F: Erythrocyte hemolysis by radiofrequency fields. Bioelectromagnetics. 6: 313-322, 1985.
15. Leong AS-Y, Daymon ME, Million J: Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy. J Pathol. 146: 313-321, 1985.
16. Leong AS-Y, Duncis CG: A method of rapid fixation of large biopsy specimens using microwave irradiation. Pathology. 18: 222-225, 1986.
17. Horobin RW, Flemming L: 'Trouble-shooting' microwave accelerated procedures in histology and histochemistry: Understanding and dealing with artefacts, errors and hazards. Histochem J, 22: 371-376, 1990.
18. Kok LP, Boon ME, Ouwerkerk-Noordam E, Gerrits PO: The application of a microwave technique for the preparation of cell blocks from sputum. J Microsc. 144: 193-199, 1986.
19. Leong AS-Y: Microwave irradiation in histopathology. Pathol Annu. 2(23): 213-233, 1988.
20. Boon ME, Gerrits PO, Moorlag HE, Nieuwenhuis P, Kok LP: Formaldehyde fixation and microwave irradiation. Histochem J. 20: 313-322, 1988.
21. Marani E, Guldmond JM, Adriolo PJM, Boon ME, Kok LP: The microwave Rio-Hortega technique: A 24 hour method. Histochem J. 19: 658-664, 1987.
22. Hopwood D, Yeaman G, Milne G: Differentiating the effects of microwave and heat on tissue proteins and their crosslinking by formaldehyde. Histochem J. 20: 341-346, 1988.
23. Login GR, Dvorak AM: Microwave fixation provides excellent preservation of tissue, cells and antigens for light and electron microscopy. Histochem J. 20: 373-387, 1988.
24. Login GR, Dvorak AM: Microwave energy fixation for electron microscopy. Am J Pathol. 120: 230-243, 1985.
25. Reed W, Erichsen A: Rapid supplementary fixation in frozen sections: Microwave versus conventional fixation. Path Res Pract, 187: 824-827, 1991.
26. Hopwood D, Milne G, Penston J: A comparison of microwaves and heat alone in the preparation of tissue for electron microscopy. Histochem J. 22: 358-364, 1990.
27. Umar MH, Pabuççuoğlu HU, İnce Ü, Falakalı S: Mikro elektromagnetik dalgaların histotekniğe uygulanması. Ege Üniversitesi Tıp Fak. Derg. 28(4): 1773-1780, 1989.
28. Yörükoğlu K, Özen E: Mikro elektromagnetik dalgaların immünperoksidaz boyamada kullanımı. Türk Patoloji Derg. 6(2): 71-72, 1990.
29. Küpeliöğlu AA, Gökden N, Gökden M, Özen E: Mikrodalga ışınların parafin kesitlerin boyanmasına etkisi. Türk Patoloji Derg. 5(1): 7-11, 1989.
30. Kayser K, Stute H, Lübcke J, Wazinski U: Rapid microwave fixation-a comparative morphometric study. Histochem J. 20: 347-352, 1988.
31. Kok LP, Visser PE, Boon ME: Histoprocessing with the microwave oven: an update. Histochem J, 20: 323-328, 1988.