

## Mast Hücrelerinin Boyanmasında Mikrodalga Işınımının Uygulanması\*

Zeynep Kahveci\*\*, F. Zehra Minbay\*\*\*, İlkin Çavuşoğlu\*\*\*\*, Semiha Noyan\*\*, Şahin A. Sırmalı\*\*\*\*\*

**ÖZET.** Mikrodalga ışınımı ile doku kesitlerinin boyanması ya damlatma yöntemi ya da şale içinde yapılabilir. Bu çalışmada mast hücrelerinin boyanmasında kullanılan Thionin, Toluidine blue ve Aldehit fuksin boyama yöntemlerinde mikrodalga ışınımı uygulandı. Kullanılan yöntemlerde mikrodalga ışınımı ile boyama süresi kısalmıştır. Bunun yanısıra konvensiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında boyama kalitelerinde farklılık görülmemiştir.

**Anahtar Kelimeler .Mikrodalga ışınımı .Mast hücresi.**

### The Application of Microwave Irradiation for Staining of Mast Cells

**SUMMARY.** Staining of tissue sections using the microwave irradiation can be performed by immersing the sections in a staining dish or covering the tissue by a few drops of the staining solution. In this study, we investigated the effects of microwave irradiation on the staining of mast cells by Thionin, Toluidine blue and Aldehyde fuchsin, those are routinely used in pathology laboratories. Due to microwave irradiation, it is found that the staining time was reduced. In addition, the staining quality of the sections, those were stained by the microwave irradiation was not different when compared to the conventionally stained sections.

**Key Words .Microwave irradiation .Mast cell.**

Mast hücreleri, sitoplazmaları bazofilik granüller içeren oval ya da yuvarlak biçimli bağ dokusu hücreleridir. Merkezi yerleşimli küçük yuvarlak nükleusları, sıklıkla, içerdiği sitoplazmik granüller tarafından maskelenir. Granülleri glikozamino-glikan içeriği nedeni ile Toluidine blue, Azur A, Bismark brown ve Thionin ile metakromatik boyanırlar. Birçok Alcian blue metodu ile de kolaylıkla görülebilirler. Heparin, histamin içeren granüllerinin hematoksilin-eosin ile gösterilmesi zordur. Bağ dokusunda en az iki tip mast hücresi (bağ dokusu mast hücreleri ve mukozal mast hücreleri) bulunmaktadır<sup>1</sup>.

Günümüzde mikrodalga ışınımının histoteknik aşamalarda kullanımı giderek artmaktadır<sup>2-14</sup>. Mikrodalga ışınımı fırınların sağladığı kontrol edilebilir ısının; difüzyonu ve kimyasal reaksi-

yonlar hızlandırma, kimyasal reaktiviteyi artırma etkileri vardır<sup>2,3,11,14</sup>. Mikrodalga ışınımı fırınlar, alınan sonuçlarda kalite farklılığı olmaması, sürelerde belirgin azalmalar olması ve kullanım kolaylığı nedeni ile fiksasyon, doku takibi ve boyama aşamalarında konvensiyonel yöntemlere tercih edilmektedir<sup>2,14,16-19</sup>.

Doku kesitlerinin boyanması iki faktöre bağlıdır: Boyanın hücre içine difüzyonu ve substrata bağlanması. Mikrodalga ışınımı bu iki faktöre de etki ederek boyanma sürecini hızlandırır. Difüzyon, fiziksel bir işlemdir ve mikrodalga ışınımı ile artırılabilir. Boyanın substrata bağlanması ise, hem fiziksel hem kimyasal bir işlemdir ve burada mikrodalga ışınımının rolü değişik faktörlere bağlıdır. Boyama işleminde affinite çok önemlidir. Affinite; boyanın boyama

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

\*\* Doç. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

\*\*\* Araş. Gör. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

\*\*\*\* Uzm. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

\*\*\*\*\* Prof. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

solüsyonunda hücreye doğru hareketidir. Boyama sistemindeki herhangi bir faktör (boya, çözücü vb.) boyanın hücreye olan affinitesini etkiler. Boya hücre ilişkisini etkileyen en basit güç Colomb güçleridir. Colomb gücü, zıt elektrik yüklü hücrel subtratlara iyonik boyaların bağlanmasında rol oynayan güç olarak tanımlanabilir. Giemsa metodundaki Azur A'nın DNA'ya etkisi buna iyi bir örnektir. Bu reaksiyonlar ısıya bağımlıdır. Yüksek sıcaklıklarda bağlanma işlemi daha kısa sürelerde gerçekleştirilir. Boya iyonlarının işlem yapılan dokuya girmesi yalnızca yükleri ile değil, büyüklükleri ile de ilişkilidir. Aynı zamanlarda boya banyosunda bulunan boya dışındaki elektrolitlerin miktarı da dokunun şişmesine ya da büzülmesine neden olarak boyama işlemi etkiler. Mikrodalga ışınımı başladığında boya solüsyonu ve dokunun sıcaklığı hızla yükselir. Ek olarak yüklü moleküller mikrodalga ışınımı ile uyarılır. Bu da moleküllerin birbirine çarpmasını artırarak kimyasal reaksiyonları gerçekleştirir ve dengeyi sağlar<sup>2,3,5,7,8</sup>. Bu görüşten yola çıkılarak son zamanlarda smear, parafin ve plastik kesitlerin boyanmasında mikrodalga ışınımı uygulanmaktadır. Brinn<sup>5,7,9</sup>, 1983 yılında mikrodalga ışınımı kullanarak, böbrek kesitlerine Methenamine silver boyama tekniği uygulamış ve normalde 90-180 dk süren boyama işlemini mikrodalga fırında 20 dk'da gerçekleştirmiştir. Buna ek olarak değişik araştırmacılar tarafından kullanılan bazı boyama metodları, mikrodalga ışınımı altında denenmiş ve doyurucu sonuçlar elde edilmiştir<sup>5-7,9</sup>. Mikrodalga ışınımı ile boyama, şale içerisinde yapılabildiği gibi, kesit üzerine damlatma metodu ile de uygulanabilir. Yöntemin seçimi; kullanılan mikrodalga fırının ısı probu olup olmamasına, boyanın tipine ve araştırmacının deneyim sahibi olup olmamasına bağlıdır. Damlatma metodu, yayma preparatlar için kullanılan ideal bir yöntemdir<sup>6,9</sup>.

Bu çalışmada, mast hücrelerinin gösterilmesinde kullanılan Aldehit fuksin, Toluidine blue ve Thionin boyama metodları mikrodalga ışınımı altında uygulanmış ve elde edilen preparatlar ışık mikroskopik olarak değerlendirilmiştir.

### Gereç ve Yöntem

Wistar Albino türü erişkin erkek sıçanlar deserebre edildikten sonra, interscapular bölge deri altından alınan doku örnekleri yayma preparat haline getirildi. Bu preparatlar 20 dk absölu alkol içinde fikse edildi. Preparatlara 3

farklı boyama yöntemi oda sıcaklığında ve mikrodalga ışınımı altında uygulandı. Kullanılan metodlarda boya solüsyonları klasik formüllere göre hazırlandı<sup>16</sup>. Klasik boyama yöntemlerinde mikrodalga ışınımı uygulanan basamaklar Tablo I, II ve III'de gösterilmektedir. Deneyde ER 535 MT Vestel/GoldStar marka mutfak tipi mikrodalga fırın kullanıldı. Boyamalar damlatma yöntemi ile gerçekleştirildi. Fazla ısının soğurulması amacı ile platform üzerine 200 ml oda sıcaklığında bekletilmiş su içeren kap konuldu. Bu suyun sıcaklığı mikrodalga ışınımı sonrası ölçülmek sureti ile boyama sıcaklığı belirlendi.

**Tablo: I-** Schmorl'un thionin metodunda oda sıcaklığı ve mikrodalga ışınımı altında uygulanan sıcaklık ve süreler

	ODA SICAKLIĞI		MİKRODALGA	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
Thionin	18°C	10 dk.	55°C ± 5	1 dk

**Tablo: II-** Toluidine blue metodunda oda sıcaklığı ve mikrodalga ışınımı altında uygulanan sıcaklık ve süreler

	ODA SICAKLIĞI		MİKRODALGA	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
% 1 Toluidine blue	18°C	1 dk.	25°C ± 5	5 sn

**Tablo: II-** Aldehit fuksin metodunda oda sıcaklığı ve mikrodalga ışınımı altında uygulanan sıcaklık ve süreler

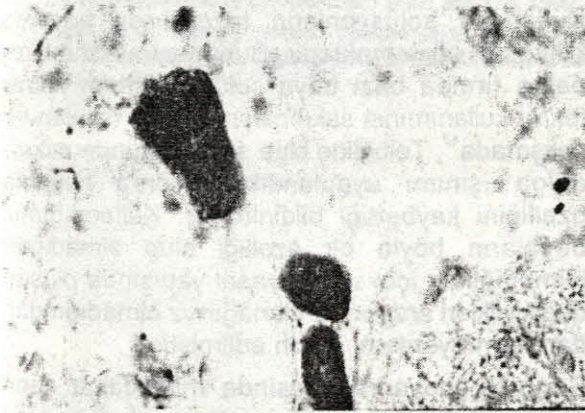
	ODA SICAKLIĞI		MİKRODALGA	
	Sıcaklık	Süre	Sıcaklık	Süre
% 0.5 lyot	18°C	30 dk	55°C ± 5	2 dk
Aldehit fuksin	18°C	60 dk	55°C ± 5	2 dk
Ehrlich hematoksileni	18°C	5 dk	55°C ± 5	1 dk

Mikrodalga ışınımı altında uygulanan boyama yöntemlerinde elde edilen boyama sürelerindeki azalmalar Tablo IV'de gösterilmiştir. Elde edilen en fazla süre kazancı, 90 dakika ile aldehit fuksin boyamasında elde edilmiştir. Resim 1, 2 ve 3'de konvensiyonel yöntemler ile yapılan; Thionin (Resim: 1), Toluidine blue (Resim: 2) ve Aldehit fuksin (Resim: 3) boyamaları; resim 4, 5 ve 6'da

mikrodalga ışıını altında uygulanan; Thionin (Resim: 4), Toluidine blue (Resim: 5) ve Aldehit fuksin (Resim: 6) boyamaları ile elde edilen preparatların sonuçları görülmektedir. Deri altı bağ dokusundan elde edilen yayma preparatlarıdaki mast hücreleri ve granüllerinin her üç yöntemle boyanmasında, konvensiyonel yöntem ile mikrodalga yöntemi arasında bir farklılık görülmemiştir.

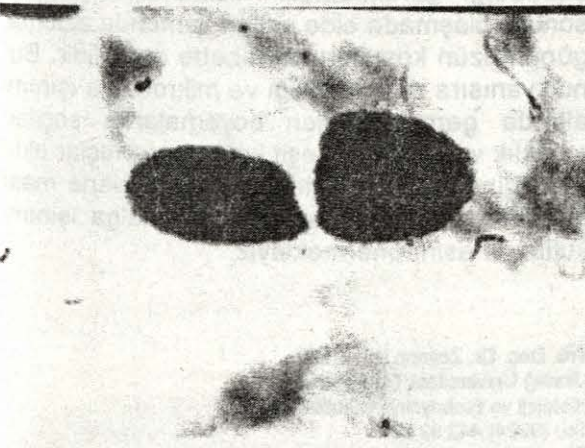
**Tablo: IV-** Oda sıcaklığı ve mikrodalga ışıını altında boyama metodlarının sürelerinin karşılaştırılması

	Oda Sıcaklığı	Mikrodalga	Kazanılan Süre
Aldehit fuksin Metodu	02:38:30 saat	01:08:30 saat	90 dk
Thionin Metodu	00:13:30 saat	00:04:30 saat	9 dk
Toluidine blue metodu	00:51:00 saat	00:50:00 saat	1 dk



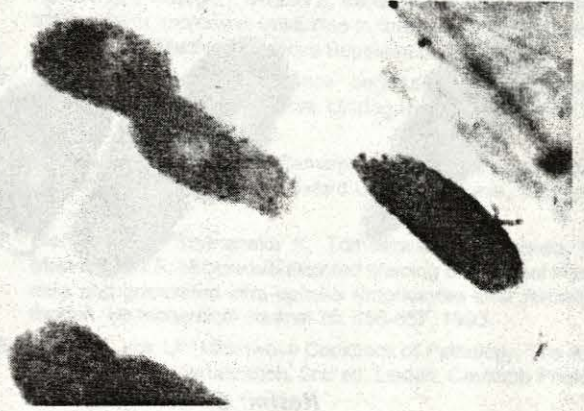
Resim: 1

Oda sıcaklığında yapılan Thionin boyaması X 400



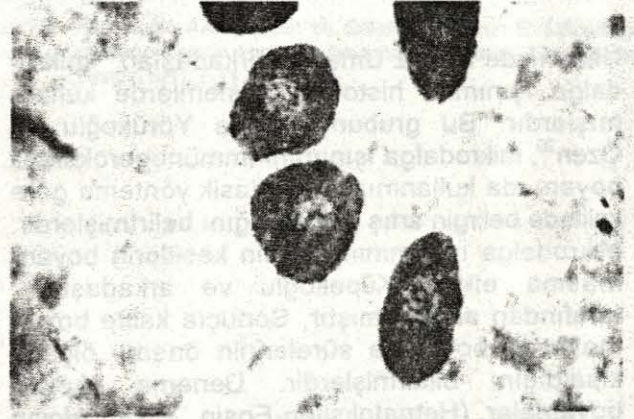
Resim: 2

Oda sıcaklığında yapılan Toluidine blue boyaması X 400



Resim: 3

Oda sıcaklığında yapılan Aldehit fuksin boyaması X 400



Resim: 4

Mikrodalga ışıını ile yapılan Thionin boyaması X 400



Resim: 5

Mikrodalga ışıını ile yapılan Toluidine blue boyaması X 400



Resim: 6

Mikrodalga ışıınımlı ile yapılan Aldehit fuksin boyaması X 400

### Tartışma ve Sonuç

Ülkemizde ilk kez Umar ve arkadaşları<sup>10</sup> mikrodalga ışıınımlı histoteknik işlemlerde kullanmışlardır. Bu grubun dışında Yörükoğlu ve Özen<sup>20</sup>, mikrodalga ışıınımlı immünoperoksidaz boyamada kullanmışlar ve klasik yöntemle göre kalitede belirgin artış sağlandığını belirtmişlerdir. Mikrodalga ışıınımlı parafin kesitlerin boyanmasına etkisi, Küpeliöğlu ve arkadaşları<sup>21</sup> tarafından araştırılmıştır. Sonuçta kalite bozulmaksızın boyanma sürelerinin önemli ölçüde kısaldığını bildirmişlerdir. Deneme yapılan boyamalar (Hematoksilen-Eosin, PAS, Alcian blue, Masson'un trikromu, PTAH) bizim kullandığımız boyamalardan farklıdır. Çalışmamıza benzer bir araştırma da<sup>17</sup>, mukozal mast hücreleri, oda sıcaklığı ve mikrodalga ışıınımlı altında Astra blue ve Alcian blue solüsyonları ile boyanmıştır. Çalışma sonucunda hangi yöntemle daha fazla mast hücresi gösterildiği araştırılmış ve mikrodalga ışıınımlı ile boyama yapıldığında görülen mast hücre sayısı, istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla bulunmuştur. Çalışmamızda kullandığımız deri altı bağ dokusunun damar içeriği değiştiğinden sayısal karşılaştırma yapma olanağı olmamıştır.

Mikrodalga ışıınımlı ile yapılan boyama işleminde difüzyonun ve kimyasal reaksiyonların hızlanması sonucu artefaktlar ortaya çıkabilmektedir. Artefaktlar, kimyasal ajanların bozulması ya da çökmesi şeklinde olabilir. Bu durumda ışıının miktarı ve ışıınlama süresi önem kazanır<sup>18</sup>. Sıcaklık göstergesi bulunmayan mutfak tipi mikrodalga fırın kullanılacak çalışmalarda, deneye başlamadan önce sıcaklık/zaman eğri-

sinin çizilmesi gerekmektedir<sup>12</sup>. Yeterli deneyim kazanılmadan ve mikrodalga fırının sıcaklık/zaman eğrisi çizilmeden çalışmaya başlanması halinde, kontrol edilemeyen sıcaklık artışının neden olduğu doku ya da kesitlerin bozulması, boyama sırasında preparat üzerine damlatılan solüsyonların buharlaşması gibi istenilmeyen sonuçlar ortaya çıkabilir. Bu nedenle ışıınlama süresi iyi ayarlanmalı ve sıcaklık kontrolü yapılmalıdır. Şale içinde yapılan boyamalarda sıcaklık kontrolü daha kolay olmasına karşın; damlatma yönteminde, damlanın sıcaklığını ölçme olanağı olmadığından, preparat üzerine damlatılan boya solüsyonunun buharlaşma olasılığına karşı dikkatli olmak gerekmektedir. Çalışmamızda sıcaklık kontrolü yapabilmek ve fazla ısıyı soğurabilmek için, boyama sırasında 200 ml su dolu bir kap mikrodalga fırın içine konulmuş, boyama sıcaklığı ölçümleri, bu suyun sıcaklığı ölçülerek elde edilmiştir. İdeal olanı, şale içindeki boyama solüsyonunun sıcaklığının ölçülmesidir. Bu ölçüm, laboratuvar tipi mikrodalga fırınlarda yapılabilmektedir.

Kullanılan solüsyonların tazeliği de boyama kalitesini etkilemektedir. Bunun yanısıra mikrodalga fırında bazı boya solüsyonlarının tekrar tekrar kullanımının sakıncaları vardır. Yapılan bir çalışmada<sup>17</sup>, Toluidine blue solüsyonunun mikrodalga ışıınımlı uygulandıktan sonra boyama özelliğini kaybettiği bildirilmiştir. Kullandığımız boyaların böyle bir özelliği olup olmadığını bilmediğimiz için ve kimyasal yapısında oluşan değişiklikleri araştırma olanağımız olmadığından damlatma yöntemi tercih edilmiştir.

Sonuçta, boyama sırasında mikrodalga ışıınımlı uygulanması, reaksiyonların çok daha kısa bir sürede oluşmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu yöntemle boyanan preparatlarda kalitenin bozulmadığı görülmektedir. Kazanılan sürelerle sonuca ulaşmada elde edilen zamanda azalma, günümüzün koşullarında elbette önemlidir. Bunun yanısıra oda sıcaklığı ve mikrodalga ışıınımlı altında gerçekleştirilen boyamalarda seçilen sıcaklık ve sürelerde eşit kalitede sonuçlar elde edildiğinden, denediğimiz bu yöntemlerle mast hücrelerinin boyanmasında mikrodalga ışıınımlı kullanımını önermekteyiz.

Yrd. Doç. Dr. Zeynep KAHVECİ  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Tel: (0224) 442 92 23  
Fax: (0224) 442 87 23  
16059 Görükle / BURSA

## Kaynaklar

1. Junquera LC, Carneiro J, Kelley OR: Basic Histology, 8th ed. New Jersey: Appleton & Lange, 1995, pp 106-107.
2. Kok LP, Boon ME: Microwaves for microscopy. Microscopy. 158: 291-322, 1990.
3. Kok LP, Boon ME: Physics of microwave technology in histochemistry. Histochem J. 22: 381-388, 1990.
4. 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.
5. Leong AS - Y: Microwave irradiation in histopatoloji. Pathol Annu. 2(23): 213-233, 1988.
6. Leong AS-Y: Microwave technology for morphological analysis. Cell Vision. 1(4): 278-288, 1994.
7. Leong AS-Y: A review of microwave techniques for diagnostic pathology. MSA Bulletin 23(4): 253-263, 1993.
8. Leong AS-Y: Microwave techniques for diagnostic laboratories. Scanning 15, 88-98, 1993.
9. Leong AS - Y, Gove DW: Microwave techniques for tissue fixation, processing and staining. EMSA Bulletin 20(2): 61-66, 1990.
10. Umar MH, Pabuççoğlu HU, Öcal ŞD: Histoteknikte modifiye mikrodalga metodu. Türk Patoloji Derg. 6(2): 67-70, 1990.
11. Kayser K, Bubbenzer J: Microwave-assisted staining procedures in routine histopathology. Histochem J. 22: 365-370, 1990.
12. Kahveci Z: Değişik dokuların fiksasyonunda mikrodalganın kullanımı. Uludağ Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa 1993.
13. Leong AS-Y: Microwave techniques for diagnostic laboratories. Scanning 15: 88-98, 1993.
14. Kahveci Z, Çavuşoğlu İ, Minbay Z, Badakov S, Sırmalı ŞA: The application of microwave irradiation in fixation of liver tissue for TEM. Tr J of Medical Sciences Supplement. 31, 1995.
15. Kahveci Z, Sırmalı ŞA: İnce bağırsağın fiksasyonunda mikrodalga ışınımının kullanımı. Uludağ Üniv Tıp Fak Derg. 1-2-3: 1-4, 1995.
16. Drury RAB, Wallington EA, Cameron R: Carleton's Histological Technique. 4th ed. Newyork: Oxford University Press, 1967, pp 215-216.
17. Biernacka D, Szymanska K, Tomaszewska A, Grzela T, Moskalewski S: Microwave-assisted staining of mucosal mast cells and granulated intra-epitelial lymphocytes after formalin fixation. Histochemical Journal 25: 856-857, 1993.
18. Boon ME, Kok LP: Microwave Cookbook of Pathology. The Art of Microscopic Visualization. 2nd ed. Leiden: Coulomb Press, 1988, pp. 119-121.
19. Login GR, Galli SJ, Morgan E, Arizono N, Schwartz LB, Dvorak MA: Rapid microwave fixation of rat mast cells. Laboratory Investigation 57(5): 592-599, 1987.
20. Yörükoğlu K, Özen E: Mikro elektromagnetik dalgaların immünoperoksidaz boyamada kullanımı. Türk Patoloji Dergisi 6(2): 71-72, 1990.
21. Küpelioglu AA, Gökden N, Gökden M, Özen E: Mikrodalga ışınların parafin kesitlerin boyanmasına etkisi. Türk Patoloji Dergisi 5(1): 7-11, 1989.