

Shorr Metodunun Parafin Kesitlere Uygulanması

Semiha Noyan*, Şahin A. Sırmalı**

ÖZET. Shorr metodu, histoloji ve patolojide vajinal smear boyamalarında kullanılmaktadır. Bu çalışmada insan otopsisinden alınan dil parçalarının parafin kesitleri, Shorr metodu ile boyandı. Dilin yapısında bulunan çeşitli dokulardan özellikle bazılarının bu metodla oldukça demonstratif boyandığı görüldü.

Boyama sonuçlarının iyi olmasının yanısıra, olumlu bazı özelliklere de sahip oluşu nedeniyle vajinal smear boyamasında kullanılan Shorr metodunun, parafin kesitlerde de kullanılabilceği sonucuna varıldı. Ancak başka dokuların da bu metodla boyanarak çalışmanın genişletilmesi gerektiği kanısındayız.

Anahtar Kelimeler .Shorr metodu .boyama .parafin kesitler.

The Application of the Shorr's Method to Paraffin Sections

SUMMARY. Shorr's method is used in vaginal smear staining in histology and pathology. In this study, the paraffin sections of tongue taken from human body at autopsy were stained by Shorr's method. From the several tissues found in tongue structure, especially some were found to be stained rather demonstrative by this method.

In addition to the favourable effects of staining, by its some positive properties, the Shorr method is found to be usable in paraffin sections, too. However, we have the opinion that the study should be enlarged by staining various tissues using this method.

Key Words .Shorr's method .staining .paraffin sections.

Klasik histoloji teknikleri kitaplarında histolojik olarak gösterilmesi istenen hemen hemen her yapı için, bir ya da daha çok sayıda boyama metodu bulunmaktadır. Ancak; boyama sürelerini kısaltmak, rutin fiksatif olan % 10'luk formalinde ya da nötral formalinde fikse edilen dokuları boyayabilmek, boyamayı tek bir solüsyon ile gerçekleştirmek ve maliyeti düşürmek gibi gerekçelerle sürekli olarak yeni metodlar araştırılmaktadır. Yapılan literatür taramasında da bu nedenlere bağlı olarak şimdiki kadar mevcut olan metodları modifiye etme, ya da bunların yerine geçecek daha kullanışlı metodlar bulmaya yönelik çalışmalara rastlandı.

Biz de çalışmamızda klasik histoloji teknikleri kitaplarında ve atlaslarda vajinal smear boyamaları için önerilen Shorr metodunu¹⁻³, nötral formalinde fikse ettiğimiz dil parçalarının parafin kesitlerine

uyguladık. Sonuçları değerlendirerek, metodun avantaj ve dezavantajlarını tartıştık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Bilim Dalı aracılığıyla temin edilen insan otopsi dil parçaları kullanıldı. Alınan 10 dil parçası nötral formalinde fikse edildi. Doku takibi işleminden sonra parafine gömülen parçalardan her bloktan 20'şer tane olmak üzere 5 mikronluk seri kesitler alındı. Bu kesitler Shorr metodu ile boyandı¹.

Metod:

- 1- Ksilolde deparafinize edilen kesitler, derecesi azalan alkol serilerinden geçirilerek suya getirildi.
- 2- Harris hematoksileninde 8 dakika boyandı.
- 3- Musluk suyunda 5 dakika yıkanarak mavileştirildi.

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

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

Geliş Tarihi: 20.06.1995

Kabul Tarihi: 29.11.1995

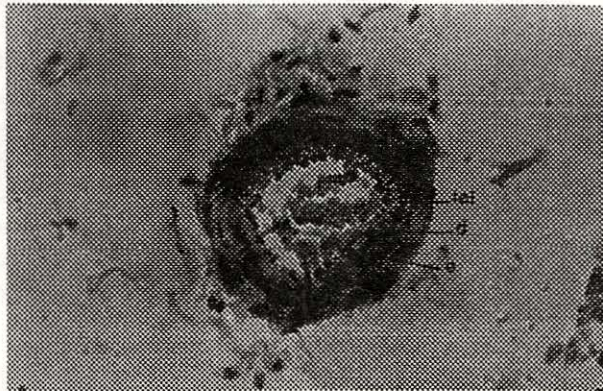
- 4- % 1'lik asit alkolde 5 saniye tutularak, hematoksilenin fazlası kesitlerden uzaklaştırıldı.
- 5- Musluk suyunda tekrar 5 dakika yıkanarak mavileştirildi.
- 6- Shorr boya solüsyonunda 2 dakika boyandı.
- 7- İki ayrı % 70'lik alkolde yıkanan kesitler, ksilolde şeffaflandırıldı ve permount ile kapatıldı.

Orijinal metod, 6. evreden başlamaktadır. Ancak nukleusların boyanması isteniyorsa Shorr solüsyonundan önce hematoksilen ile boyama yapılması önerilmektedir. Çalışmamızda hematoksilen boyaması da yapıldığından, 2-5. evreler orijinal metoda eklendi. Yine orijinal metodda kullanılan materyalin smear olması nedeniyle uygulanmayan 1. evre, kesitlerimizin parafin olması nedeniyle çalışmamızda uygulandı. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, daha sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Bulgular

Hematoksilen + Shorr ile boyadığımız preparatların ışık mikroskopunda incelenmesi sırasında ilk göze çarpan özelliklerden birisi, bağ dokusu liflerine bağlı olarak tüm bağ dokusu alanların yeşil renkte, diğer yapıların ise kahverengi tonlarında boyanmış olmasıydı. Böylece bağ dokusu alanlar, diğer yapılardan kontrast oluşturacak şekilde kolaylıkla ayırd edilebiliyordu.

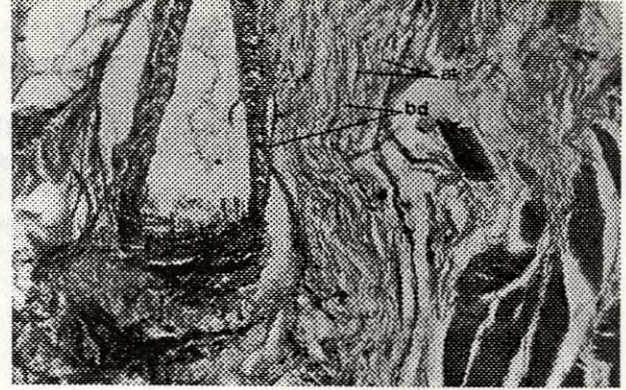
Müsküler arter yapısında bulunan internal elastik lamina, parlak açık yeşil bir şerit şeklindeydi. Tunika media'da bulunan düz kasların kahverengi boyanması nedeniyle, internal elastik lamina kolaylıkla görülebilmekteydi. Arter lümeninde bulunan eritrositler ise turuncu renkteydi (Şekil: 1).



Şekil: 1

Müsküler arter. Hematoksilen + Shorr, x 512
(iel: internal elastik lamina,
d: düz kas, e: eritrositler)

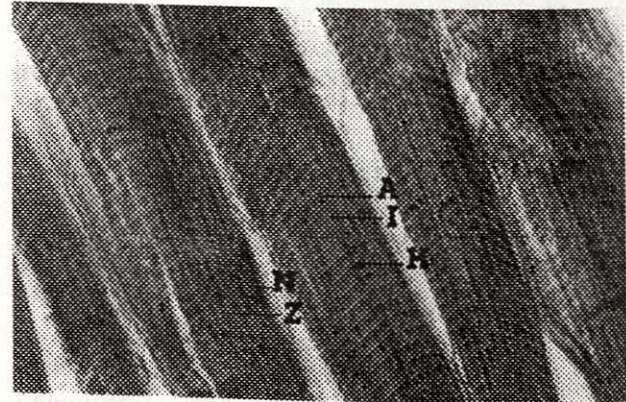
Preparatlarda rastlanan periferik sinir kesitlerinde aksonlar açık kahverengi, bağ dokusu kılıflar yeşil boyandığı için aksonların identifikasyonu kolaylıkla yapılabiliyordu (Şekil: 2).



Şekil: 2

Periferik sinir kesitinde aksonlar (ak) ve bağ dokusu kılıflar (bd). Hematoksilen + Shorr, x 320.

Dile ait çizgili kas lifleri genel olarak açık kahverengi boyanmıştı ve yeşil boyalı bağ dokusu ile kontrast oluşturuyordu. Kas çizgilenmesi küçük büyültmelerde bile belirgindi. İmmersiyon uygulanarak yapılan incelemelerde A bantları sarımsı-kahverengi alanlar şeklinde görüldü. A bantlarının orta bölgesinde birbirine paralel iki kırmızı çizginin sınırladığı H bantları belirgindi. I bantları açık mavi (buz beyazı) boyanmıştı. I bantlarının orta alanlarında bulunan Z çizgileri ise koyu mavi (lacivert) çizgiler şeklindeydi. Hematoksilen boyamasına bağlı olarak nukleuslar mor renkte görüldü (Şekil: 3).



Şekil: 3

Çizgili kas hücrelerinde A bandı (A), I bandı (I), H bandı (H), Z çizgisi (Z) ve nukleus (N).
Hematoksilen + Shorr, x 800.

Tartışma

Histoloji ve patoloji laboratuvarlarında genel amaçlı olarak en yaygın kullanılan boyama yöntemi Hematoksilin-Eosin (H&E)'dir. Bu yöntem ile boyama sonrasında nükleuslar koyu mavi-mor, diğer yapılar ise pembeden kırmızıya değişen tonlarda boyanmaktadır. Tüm doku tiplerinde pembe-kırmızı tonlarında boyanma olduğundan, H&E boyama yöntemi yenilik isteyen araştırmacılar tarafından siyah-beyaz film şeklinde nitelendirilmektedir. Shoobridge, H&E'nin işe yaramayan bir yöntem olmadığını, ancak eksikliklerinin olduğunu vurgulamaktadır⁴. Araştırmacı yaptığı çalışmadaki amacını; bu açığı kapatacak, tüm renklerin zenginliğini ve yapıların inceliklerini gösterebilecek yeni bir yöntem geliştirmek olduğunu belirtmektedir. Araştırmacının geliştirdiği yöntem bir polikrom boyaması olup, pek çok yapının değişik renklerde boyanmasını sağlamıştır. Boyama sonuçlarının H&E'den üstün olduğu ifade edilen yöntem, çok sayıda boya solüsyonu ve ayraçlar kullanılmasını gerektirmekte ve uzun bir zaman periyodunda gerçekleşmektedir. Çalışmamızda ise, hematoksilin ve Shorr boyama solüsyonları olmak üzere sadece iki solüsyon kullanılmakta ve oldukça kısa bir sürede boyama tamamlanmaktadır.

Nükleus boyamasında kullanılan hematoksilinin yerine geçebilecek başka boyaların geliştirilmesi ile ilgili çalışmalara da rastlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde, şaplı hematoksilin yerine demir alumcelestine blue B kombinasyonu kullanılmıştır. Değerlendirmelerde nükleer ayrıntıların belirgin bir şekilde seçilebildiği belirtilmektedir⁵.

Trikrom tekniklerinden olan Van Gieson yönteminde çekirdek boyası olarak kullanılan demirli hematoksilin yerine demir gallein'in kullanıldığı çalışmada iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir. Ancak araştırmacılar demir gallein'in Van Gieson dışında eosin ile ya da Papanicolaou smear tekniğinde kullanıldığında, renklerin birbirine karıştığını ve intranükleer detayların görülemediğini de ifade etmektedirler⁶. Bir başka çalışmada da yine hematoksilin yerine, çeşitli metal sabitleştiriciler ile kombine edilen gallein kullanılmış ve pek çok yapının iyi bir şekilde boyandığı gözlenmiştir⁷.

Klasik metodları iyileştirmek ve/veya geliştirmek amacıyla yapılan modifikasyon çalışmalarına sıklıkla rastlanmaktadır. Örneğin; Van Gieson tekniği ile boyama sonrasında bazı yapıların soluk boyanması ve teknikte kullanılan asit fuksin'in renginin kısa sürede solması nedeniyle, bu tekniği modifiye etmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda asit fuksin yerine Sirius red F3BA kullanıldığı ve başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmektedir^{8,9}. Yine bağ dokusu elemanlarından

ince retiküler liflerin ve bazal membranların soluk boyanması nedeniyle Gomori'nin bir evreli trikrom yöntemi de modifiye edilmiştir¹⁰. Bir başka modifikasyon çalışmasında ise, Verhoeff'in modifiye elastik doku boyası ile Masson'un trikrom boyası kombine edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda elastik lifler ile kollajen lif ayrımının daha kolay yapılabildiği belirtilmektedir¹¹.

Boyama süresini kısaltmaya yönelik olarak yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. İskelet kası çizgilenmesinin gösterilmesinde kullanılan fosfotungstik asit-hematoksilin (PTAH) metodunda boyama süresi 12-24 saattir. Yapılan çalışmalarda bu sürenin 60'lik etüvde 1 saate indirildiği ve aynı sonuçların elde edildiği ifade edilmektedir^{12,13}.

Bazı araştırmacılar ise yeni boyama metodları geliştirmeye çalışmışlardır. Menzies, yaptığı çalışmada iskelet kasında çizgilenmeyi göstermek amacıyla klasik metodlardan değişik olarak bromfenol mavisi kullanmış ve çizgilenmeyi göstermiştir. Ancak çizgilenmenin ayrıntılı bir şekilde incelenebilmesi için immersiyona gerek olduğu, araştırmacı tarafından belirtilmektedir¹⁴. Yine kas çizgilenmesini göstermek amacıyla Welsh, thionin kullanmış ve boyamanın 1 dakika gibi kısa bir sürede iyi sonuç verdiğini gözlemiştir¹⁵. Monroe ve arkadaşları ise H&E yerine, nötral red-fast green FCF karışımından oluşan tek bir boya solüsyonunu çeşitli memeli dokularının boyamasında denemişlerdir. Pek çok yapının üstün bir şekilde boyandığı, araştırmacılar tarafından belirtilmektedir¹⁶.

Yapılan çalışmalarda araştırmacılar mevcut boyama metodlarının bazı eksikliklerinin giderilmesi ya da daha iyileştirilmesi, uzun olan boyama sürelerinin kısaltılması, solüsyon sayılarının azaltılması gibi çeşitli nedenlerle bu metodları modifiye etme ya da yeni metodlar geliştirme yoluna gitmişlerdir. Biz de çalışmamızda Biebrich scarlet, orange G ve fast green FCF'nin aynı solüsyonda kullanıldığı Shorr metodunu, orijinalinde önerilen vajinal smear boyamak yerine parafin kesitlerin boyamasında kullanmayı denedik. Yapılan literatür taramasında bu yöntemin smear boyaması dışında kullanıldığına rastlanmadı. Tek bir solüsyonun kullanılması, sürenin kısa olması ve boyama sonuçlarının olumlu bulunması nedeniyle bu metodun parafin kesitlerin boyanmasında kullanılabileceği düşünüldü. Ancak çalışmada kullanılan dil dışında, değişik doku ve organların da aynı metodla boyanarak çalışmanın genişletilmesi ve metodun daha iyi değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Arş. Grv. Dr. Semiha NOYAN
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji ABD
Tel: 442 82 00 / 21136
16059 Görükle / BURSA

Kaynaklar

1. Drury RAB, Wallington EA: Carleton's Histological Technique. Oxford University Press, New York, 1967, 376-382.
2. Bourne LD: Exfoliative cytology, Theory and Practice of Histological Techniques. Ed: Bancroft JD, Stevens A. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982, 428-430.
3. Di Fiore MSH: Atlas of Human Histology. Lea&Febiger, Philadelphia, 1974, 226-227.
4. Shoobridge MPK: A new principle in polichrome staining: A system of automated staining, complementary to hematoxylin and eosin, and usable as a research tool. Stain Technol. 58: 245-258, 1983.
5. Lillie RD, Pizzolato P, Welsh RA, Holmquist ND, Donaldson PT, Berger C: A consideration of substitutes for alum hematoxylin in routine histologic and cytologic diagnostic procedures. Am J Clin Pathol. 60: 817-819, 1973.
6. Lillie RD, Pizzolato P, Donaldson PT: Iron gallein in Van Gieson technics, replacing iron hematoxylin. Stain Technol. 48: 348-349, 1973.
7. Lillie RD, Pizzolato P, Donaldson PT: Hematoxylin substitutes: Gallein as a biological stain. Stain Technol. 49: 339-346, 1974.
8. Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI: Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. Arch Pathol. 78: 69-72, 1964.
9. Dodds HM, Clark G: An improved Van Gieson. Stain Technol. 60: 55, 1985.
10. Sweat F, Meloan SN, Puchtler H: A modified one-step trichrome stain for demonstration of connective tissue fibers. Stain Technol. 43: 227-231, 1968.
11. Garvey W: Modified elastic tissue-Masson trichrome stain. Stain Technol. 59: 213-216, 1984.
12. Puchtler H, Sweat F, Doss NO: A one-hour phosphotungstic acid-hematoxylin stain. Am J Clin Pathol. 40: 334-337, 1963.
13. Bohacek LG: Acceleration of Mallory's phosphotungstic acid-hematoxylin staining for skeletal muscle fixed in formalin. Stain Technol. 41: 101-103, 1966.
14. Menzies DW: Bromphenol blue as a stain for muscle striations. Stain Technol. 36: 285-287, 1961.
15. Welsh R: A rapid method to demonstrate muscle cross-striations with thionin. Stain Technol. 49: 309-310, 1974.
16. Monroe CW, Frommer J: Neutral red-fast green FCF, a single-solution stain for mammalian tissues. Stain Technol. 42: 262-264, 1967.