

## Mikrodalga Işınımının Elektron Mikroskopide Uygulanımı

Zeynep Kahveci\*

**ÖZET.** Mikrodalgalar frekansı sıklıkla 2.45 GHz olan elektromanyetik dalgalardır. Su, protein ve diğer bazı moleküller gibi elektrik alan dağılımı düzensiz olan dipolar moleküllere noniyonize radyasyon olan mikrodalga ışınımı verildiğinde bu moleküller saniyede 2450 milyon kez 180 derece rotasyona uğrarlar. Bu hızlı kinetik hareket sonucunda ani ısı üretilir ve kimyasal reaksiyonlar hızlanır. Mikrodalgalar son zamanlarda elektron mikroskopik prosedürlerin büyük bir kısmında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrodalgalar fiksasyon, doku takibi, dekalsifikasyon, kontrastlama resin polimerizasyonu ve immünboyama prosedürlerinin hızlandırılmasında kullanılmaktadır. Bu derleme, elektron mikroskopide kullanılan mikrodalga tekniği ile ilgili bilgiler içermektedir.

**Anahtar Kelimeler .Mikrodalga ışınımı .Elektron Mikroskopi.**

### Applications of Microwave Irradiation in Electron Microscopy

**SUMMARY.** Microwaves (MW) are electromagnetic waves which are commonly generated at a frequency of 2.45 GHz. When dipolar molecules such as water, polar side chains of proteins and other molecules with an uneven distribution of electrical charge are exposed to such non-ionizing radiation, they oscillate through 180° at a rate of 2,450 million cycles/s. This rapid kinetic movement results in accelerated chemical reactions and produces instantaneous heat. MWs have recently been applied to wide range of procedures for electron microscopy. It has been applied for fixation, tissue processing, staining ultrathin sections, acceleration of immunostaining procedures, decalcification and polymerization of epoxy resin. This review includes; the microwave techniques which is used in electron microscopy.

**Key Words .Microwave irradiation .Electron microscopy.**

Doğada bir çok radyasyon tipi vardır. Radyasyon sözcüğü, genellikle biyolojik dokulara ve komponentlerine zarar veren iyonize radyasyonu ifade eder. Elektromanyetik dalgalar bir tip radyasyondur. Mikrodalgalar, elektromanyetik dalgalardır. Ancak ışık, infrared enerji ya da radyo dalgaları gibi non-iyonize radyasyondur ve gerçekte oldukça iyi huyludur<sup>1-6</sup>. Elektromanyetik enerjilerin tümü elektrik yüklerinin akselasyonu (hızlandırılması) ile ortaya çıkarlar. Hareket eden elektrik yükler, uzayda manyetik enerji ve elektrik dalgaları oluştururlar. Bu dalgalar karakteristik frekans ve dalga boylarına sahiptirler. Elektromanyetik dalgaların bilinen spektrumu içerisinde frekansların geniş bir dağılımı yer alır. Mikrodalga ve radyo ışınlarının, elektromanyetik radyasyon olarak görünen ışıkla aynı özelliklere sahip olduğunun 1988 yılında Hertz tarafından bulunduğu bildirilmektedir<sup>7</sup>. Mikrodalgalar ışık dalgaları gibi

düz çizgi üzerinde hareket eder, seyri boyunca kırılır, yansır ve polarize olurlar. Mikrodalgalar, dalga boyu ve frekansı ile diğer elektromanyetik enerji formlarından farklıdır. Radyo dalgalarından daha kısa dalga boyuna ve daha yüksek frekansa sahiptir. Mikrodalgaların frekansı 300 MHz-300 GHz arasında değişmektedir. Bu değerler arasındaki frekansların dalga boyu 1mm-1m arasındadır. Örneğin 2.45 GHz frekansındaki mikrodalgaın dalga boyu 12.2 cm'dir<sup>1,3,4,8-10</sup>. Mikrodalgalar, fırında kullanılan frekanslarda molekülleri iyonize edemez ve en zayıf kimyasal bağları bile kıramaz<sup>6,11</sup>. Mikrodalga ışınımı ile elektrik alanın osilasyonu (salınımı) su ve proteinlerin polar zincirleri gibi dipolar molekülleri ve iyonları saniyede 2.450 milyon kez hızla 180 derece rotasyona zorlar. Kazanılan rotasyonel enerjinin bir kısmı hareket etmeyen moleküller ile çarpışma üzerinden rastgele hareketlere transfer

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



edilir. Böylece, indüklenmiş kinetik enerji ani ısınma oluşturur. Bu, enerji akışıyla orantılıdır ve ışınım kesilinceye kadar devam eder. Bu yüzden mikrodalgalar ile ısıtma, normal olarak zayıf ısı iletkenliğine sahip biyolojik dokuların neden olduğu sınırlamaları ortadan kaldıran bir metod sağlar<sup>1-4,9,12-15</sup>. Mikrodalga ışınımının başlıca etkisi termaldir<sup>2,5,12,13,16</sup>. Isınma etkisi elektrik alan komponentine bağlıdır. Manyetik alan komponenti ile ilişkili değildir. Bu yüzden, tam bir solüsyon ve parça ısınması elde etmek için elektrik alan dağılımının uniform olması gerekir<sup>17,18</sup>. Uniform olmayan elektrik alan dağılımı sonucu, fırın kabini içinde mikrodalgaların yoğun olarak bulunduğu 'hot spot' ve daha az yoğunlukta bulunduğu 'cold spot' oluşur<sup>2,17-19</sup>. Araştırmacılar<sup>5,18</sup>, patolojide mikrodalga ile yapılan bazı işlemlerde, uniform olmayan elektrik alan kullanımının işlemler üzerinde kötü etkileri olabileceğini bildirmişlerdir. Bu nedenle mikrodalga ışınımı ile çalışmaya başlanılmadan önce mutlaka fırının elektrik alan dağılım haritasının çıkarılması gerekir. Bu amaç için değişik yöntemler kullanılabilir. Bunlardan bazıları ısıya duyarlı kağıtlar, ısıya duyarlı boyalar, neon lambalar, agar giemsa blokları, likit kristal termometrelerdir<sup>6,18</sup>. Son yıllarda mikrodalga ışınımı, ışık ve elektron mikroskopik tekniklerde başarı ile uygulanmaktadır<sup>1,2,4,5,20-24</sup>.

Mikrodalga ışınımının elektron mikroskopide kullanıldığı basamaklardan biri fiksasyondur. Mikrodalga ışınımı fiksasyon işlemi sırasında fiksatiflerin dokulara difüzyon süresini azaltıp, kimyasal işlevleri hızlandırmaktadır. Hopwood ve arkadaşları mikrodalga ışınımı ile aldehitlerle fiksasyonda, intermoleküler çapraz bağlanmalar olduğunu göstermişlerdir<sup>25</sup>. Son yıllarda mikrodalga ışınımı, biyolojik materyallerin, transmision (TEM) ve scanning (SEM) elektron mikroskopi için fiksasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu konu ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır<sup>26-29</sup>. 1988 yılında Login ve Dvorak<sup>26</sup> 45°C'de 7 saniye primer aldehit fiksasyonu aşamasında mikrodalga ışınımı uyguladığı sıçan peritoneal mast hücrelerini ince yapı düzeyinde kayıp olmaksızın başarılı bir şekilde göstermiştir. Mikrodalga ışınımı Login, Dwyer, Dvorak<sup>30</sup> tarafından 1990 yılında sıçan karaciğer dokusunun primer osmium fiksasyonu sırasında 46°C'de 6 saniye uygulanması ile membranlı yapıların tümünün başarılı bir biçimde gösterilmesi sağlanmıştır. Bu çalışmaların yanısıra tümör hücrelerinde nükleer matriksin fiksasyonunda<sup>31</sup> ve hücre kültürlerinin SEM için incelenmek üzere hazırlanmasında<sup>32</sup> fiksasyon aşamasında mikrodalga ışınımının kullanıldığına da rastlanmaktadır. Tüm bu araştırmacılar ince yapı düzeyinde mükemmel korunma elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Mikrodalga ışınımı elektron mikroskopik çalışmalarda kontrastlama aşamasında da kullanılmaktadır<sup>33</sup>. Bu amaçla yaptığımız bir çalışmada<sup>34</sup>, ikili fiksasyon sonrası hazırlanan epon bloklardan alınan ince kesitlere uranil asetat ve Reynold'in

lead sitratı ile kontrastlama değişik güç ve sürelerde mikrodalga ışınımı ile yapılmış ve konvensiyonel yöntemle yapılan kontrastlamaya benzer görüntüler elde edilmiştir. Konvensiyonel yöntemde bir gridin kontrastlanması yaklaşık 45 dakika zaman alırken, mikrodalga ışınımı ile bu süre birkaç dakikada tamamlanabilmektedir. Ayrıca; Esterada, Brinn ve Bossen<sup>33</sup> tarafından bildirildiği gibi mikrodalga ışınımı ile kontrastlama yapılan preparatlarda daha uniform bir boyanma elde edildiği, artefakt ve presipitasyonda azalma olduğu görüşüne varılmıştır.

Mikrodalga ışınımı ışık mikroskopide<sup>35</sup> olduğu gibi elektron mikroskopide konvensiyonel ya da mikrodalga ışınımı ile aldehit ile fikse edilmiş kemik içeren dokuların dakalsifikasyonunda da kullanılmaktadır<sup>36</sup>. Bu amaç için 1-2 cm derinliğinde bir kap içine dekalsifiye edici ajan (EDTA) doldurulur. Sıcaklığın 42-45°C'de sabit olması sağlanarak 30 dakika süre ile % 100 güç uygulanarak kısa sürede doku dekalsifiye edilebilir. Ancak bu işlem sırasında ısı probunun dekalsifiye edici ajandan etkilenmemesi için teflon kaplı prob kullanılması önerilmektedir.

Mikrodalga ışınımı immün boyamanın inkübasyon ve enzim blokaması aşamalarında kullanılabilir<sup>5,37</sup>. Mikrodalga ışınımının immün boyamada uygulanması çok kolay değildir. Antijen-Antikor bağlanması çok nazik bir işlemdir. Bu işlem sırasında ısının çok yükselmesi ya da mikrodalga ışınımının çok yoğun olması gibi durumlarda işlem başarısızlıkla sonuçlanabilir<sup>5</sup>.

50°C'nin üzerindeki ısılarla her şey haraplanabilir. Genel olarak ısı 40°C civarında tutulur. Yöntem sırasında kullanılan damla halindeki solüsyonun ısısının ölçümü kullanılan ısı problemleri ile mümkün değildir. Ancak küçük boyutta olan fiberoptik problemler ya da termopaint indirekt metodu bu amaç için kullanılabilir. Damla şeklinde uygulama yapılıyorsa mikrodalga fırınlarda küçük damlaların ısısının kontrol edilmesinde "water load" (suyun yüklenmesi) olarak adlandırılan bir yöntem kullanılmalıdır. Bu mikrodalga ışınımının ilk kullanıldığı yıllardan beri geçerliliğini korumaktadır. İlk kez 1970 yılında Mayers<sup>38</sup> tarafından kullanılan bu sistem, daha sonra Smith ve Feirabend adlı araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir<sup>5</sup>. Temelde çeşme suyunun tüpler içinde fırında dolaştırılması prensibine dayanır. Genellikle 200 ml çeşme suyu bu amaç için kullanılmaktadır. Suyun miktarı dışında suyun konulduğu yerin şekli de önemlidir. Tüp içinde ya da uygun bir behere konulmuş suyun etkileri farklıdır. Behere kullanılacak ise aynı büyüklükteki behere, her zaman aynı yere kullanılmalıdır. Aynı hacimde ve aynı ısıda su ile işleme başlamak gerekir. Su ısındığında değiştirilmelidir. Çalışmada dielektrik özellikleri ısı ile değişmeyen sıvılar seçilmelidir. Yapılan araştırmalar, çeşme suyunun distile sudan daha iyi olduğunu göstermiştir<sup>5</sup>. Login ve Dvorak tarafından<sup>39</sup> 1993



yılında kobay parotis bezi asinus hücrelerindeki granüllerdeki  $\alpha$ -amilazın, post embejing ultrastrüktürel immünogold yöntemi ile demonstrasyonunda, primer aldehit fiksasyonunda 5 sn süre ile ısı 45°C sabit tutularak yapılan çalışmada, altınla işaretlenmiş granüllerde amilazın özel lokalizasyonu gösterilmiştir. Bunun yanısıra insan plasenta ve ovaryumunda aromataz'ın immün-elektron mikroskopik lokalizasyonu için mikro-dalga ışınımının kullanıldığını<sup>40</sup>, sıçan renal medullasında endotelin reseptörlerinin yüksek rezolüsyonda lokalizasyonu amacı ile<sup>41</sup> ve normal ya da neoplastik hepatositlerde cytokeratin no:18'in demonstrasyonunda<sup>42</sup> immünoelektron-mikroskopi için antijen retrieval metodunda mikrodalga ışınımının kullanıldığını ve başarılı sonuçlar alındığını görürüz.

Mikrodalga ışınımı ile resin polimerizasyonu da yapılmaktadır<sup>43-45</sup>. Bu konuda ilk çalışma Mclay, Anderson ve Mcmeekin<sup>43</sup> tarafından yapılmıştır. Bizim yaptığımız benzer bir çalışmada<sup>46</sup> mikrodalga ışınımı ile Epon 812 nin polimerizasyonu yaklaşık 2 saatte tamamlanmış ve elde edilen bloklar konvansiyonel yöntemle elde edilen bloklardan renk, sertlik, kesit alma kolaylığı ve elde edilen preparatlar ince yapı düzeyinde farklı bulunmamıştır. Bazı laboratuvarlarda mikrodalga ışınımı rutin polimerizasyonda kullanıldığı görülmektedir<sup>47</sup>.

Elektron mikroskopi'de değişik aşamalarda mikrodalga ışınımı kullanıldığı gibi tüm aşamalarda mikrodalga ışınımının kullanıldığı hızlı takip protokolleri de bulunmaktadır. Bunlardan biri Giberson, Demaree ve Nordhausen tarafından<sup>48</sup> 1997 yılında verilen protokoldür. Bu protokole göre tüm aşamalar için yaklaşık 3 saat yeterli olmaktadır. Oysa konvansiyonel takip protokolü yaklaşık 5 gün sürmektedir.

Özellikle tanıya çabuk ulaşılması istenilen durumlarda mikrodalga ışınımı prosedürün kısa zaman alması ile daha uygun olduğu, bunun yanısıra elde edilen sonuçların konvansiyonel yöntemlerden farklı olmadığı, hatta daha iyi sonuçlar elde edildiği bildirildiğinden elektron mikroskopik çalışmalarda da mikrodalga ışınım kullanmanın avantajlı olabileceği düşünülmektedir.

Doç. Dr. Zeynep KAHVECI  
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji ABD  
Tel: (0.224) 442 92 23  
e-mail: zeynep2@uludag.edu.tr  
16384 Görükle / BURSA

### Kaynaklar

1. Leong AS-Y: Microwave irradiation in histopathology. *Pathol Annu.* 23: 211-234, 1988.
2. Boon ME, Kok LP: Microwaves for immunohistochemistry. *Micron.* 25(2): 151-170, 1994.

3. Leong AS-Y: Microwave techniques for diagnostic laboratories. *Scanning.* 15(2): 88-98, 1993.
4. Leong AS-Y: Microwave techniques for tissue fixation, processing and staining. *EMSA Bulletin.* 20(2): 61-65, 1990.
5. Boon ME, Kok LP: *Microwave Cookbook of Pathology.* 2<sup>nd</sup> edition. Leiden:Coulomb Press, 1988, pp 15-27, 42-72, 175-195.
6. Login GR, Dvorak AM: *The Microwave Tool Book.* Boston: Beth Israel Hospital, 1994,pp10-135.
7. Kok LP, Boon ME: Physics of Microwave Technology in Histochemistry. *Histochem J.* 22, 381-8, 1990.
8. Mayers CP: Histological fixation by microwave heating. *J Clin Pathol.* 23: 273-275, 1970.
9. Leong AS-Y: A review of microwave techniques for diagnostic pathology. *MSA Bulletin.* 23(4): 253-263, 1993.
10. Umar MH, Papuçcuoğlu HU, Ince Ü, Falakalı S: Mikroeletromagnetik dalgaların histotekniğe uygulanması. *Ege Üniversitesi Tıp Fak Derg.* 28(4): 1773-1780, 1989.
11. Marani E: Acceleration of chemical reactions by microwave irradiation (editorial). *Eur J Morphol.* 31(4): 285-286, 1993.
12. Kok LK, Visser PE, Boon ME: Histoprocessing with the microwave oven: an update. *Histochem J.* 20: 323-328, 1988.
13. Feirabend HKP, Ploeger S, Kok P, Choufoer H: Does microwave irradiation have other than thermal effects on histological staining of the mammalian CNS? *Eur J Morphol.* 30: 312-327, 1992.
14. Feirabend HKP, Ploeger S: Microwave applications in classical staining methods in formalin-fixed human brain tissue: a comparison between heating with microwave and conventional ovens. *Eur J Morphol.* 29(3): 185-197, 1991.
15. Suurmeijer AJH, Boon ME, Kok LP: Notes on the application of microwaves in histopathology. *Histochem J.* 22: 341-346, 1990.
16. 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.
17. Boon ME, Marani E: The major importance of temperature data in publications concerning microwave techniques. *Eur J Morphol.* 29: 181-183, 1991.
18. Ng KH: Microwave Ovens: mapping the electric field distribution. *Med Lab Sci.* 48: 189-192, 1991.
19. Kok LP, Boon ME: Microwaves for microscopy. *J Microscopy.* 158(3): 291-322, 1990.
20. Kahveci Z, Sırmalı ŞA: Mikrodalga teknolojisi ve doku fiksasyonunda kullanımı. *S.B.Bursa Devlet Hastanesi Tıp Bülteni.* 11(1-2): 39-44, 1995.
21. Kahveci Z, Sırmalı ŞA: İnce bağırsağın fiksasyonunda mikrodalga ışınımının kullanımı. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 1-2-3: 1-4, 1995.
22. Kahveci Z, Minbay FZ, Çavuşoğlu İ, Noyan S, Sırmalı ŞA: Mast hücrelerinin boyanmasında mikrodalga ışınımının uygulanması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 24 (1-2-3): 29-33, 1977.
23. Kahveci Z, Minbay FZ, Çavuşoğlu İ, Oya A, Noyan S, Sırmalı ŞA: Mikrodalga fırın ile doku takibi. *Türk Patoloji Dergisi.* 13(1): 23-26, 1997.
24. Kahveci Z, Çavuşoğlu İ, Sırmalı ŞA: Microwave fixation of whole fetal specimens. *Biotechnic & Histochemistry.* 72(3): 144-147, 1997.
25. Hopwood D, Coghill G, Ramsay G, Milne G, Kerr M: *Microwave Fixation: its Potential for Routine Techniques, Histochemistry, Immunocytochemistry and Electron Microscopy.* *Histochem J.* 16, 1171-91, 1984.



26. Login GR, Dvorak AM: Microwave Fixation Provides Excellent Preservation of Tissue, Cells and Antigens for Light and Electron Microscopy. *Histochem J.* 20, 373-87, 1988.
27. Avcı B, Kahveci Z, Avcı R, Çavuşoğlu İ, Sırmalı ŞA: Mikrodalga Işınımı ile Göz Fiksasyonu. Uluslararası Katılımlı 14. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi Özet Kitabı. 57, 1999.
28. Minbay FZ, Çavuşoğlu İ, Kahveci Z, Sırmalı ŞA: Mikrodalga Işınımı ile Hızlı İkili Fiksasyon, Uluslararası Katılımlı 14. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi Özet Kitabı. 148, 1999.
29. Kanter M, Kahveci Z, Karaöz E, Sırmalı ŞA: Mikrodalga kullanımı ile tespit edilmiş sıçan paratiroid dokularının ışık ve elektron mikroskopta incelenmesi. *Veteriner Bilimleri Dergisi.* 12(2): 133-140, 1996.
30. Login GR, Dwyer BK, Dvorak AM: Rapid primary microwave-osmium fixation. I. preservation of structure for electron microscopy in seconds. *J Histochem Cytochem.* 38: 755-762, 1990.
31. Chew EC, Yang L, Cheng-Chew SB, Leung PY, Jiao RJ, Zhai ZH: Microwave fixation of nuclear matrix in tumor cells. *Anticancer Res.* 13: 2277-80, 1993.
32. Argall K, Armati P: Use of microwave fixation in the preparation of cell cultures for observation with the scanning electron microscope. *J Electron Microscop Tech.* 16(4): 347-50, 1990.
33. Estrada JC, Brinn NT, Bossen EH: A rapid method of TEM with the use of microwave oven. *Am J Clin Pathol.* 83: 639-641, 1985.
34. Çavuşoğlu İ, Kahveci Z, Sırmalı ŞA: Rapid staining of ultrathin sections with the use of microwave oven. *J Microsc.* 192(2): 212-216, 1998.
35. Minbay FZ, Kahveci Z, Noyan S, Çavuşoğlu İ, Sırmalı ŞA: Mikrodalga tekniği ile kemik dokusunun dekalsifikasyonu. 4. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Özet Kitabı. 4, 1998.
36. Madden VJ, Henson MM: Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. *Hear Res.* 111(1-2): 76-84, 1997.
37. Ohtani H: Microwave-Stimulated fixation for preembedding immunoelectronmicroscopy. *Eur J Morphol.* 29(1): 64-67, 1991.
38. Mayers CP: Histological Fixation by Microwave Heating. *J Clin Pathol.* 23, 273-5, 1970.
39. Login GR, Dvorak AM: A review of rapid microwave fixation technology: its expanding niche in morphologic studies. *Scanning.* 15: 58-66, 1993.
40. Naganuma H, Ohtani H, Harada N, Nagura H: Immunoelectron microscopic localization of aromatase in human placenta and ovary using microwave fixation. *J Histochem Cytochem.* 38(10): 1427-32, 1990.
41. Yukimura T, Notoya M, Mizojiri K, Mizuhira V, Matsuura T, Ebara T, Miura K, Kiru S, Iwao H, Song K: High resolution localization of endothelin receptors in rat medulla. *Kidney Int.* 50(1): 135-47, 1996.
42. Xiao JC, Adam A, Ruck P, Kaiserling E: A comparison of methods for heat-mediated antigen retrieval for immunoelectron microscopy: demonstration of cytokeratin No.18 in normal and neoplastic hepatocytes. *Biotech Histochem.* 71(6): 278-85, 1996.
43. McIay ALC, Anderson JD, Mcmeekin W: Microwave polymerization of epoxyresin: Rapid processing technique in ultrastructural pathology. *J Clin Pathol.* 148: 350-352, 1987.
44. Gimmara BL: Microwave embedding methods. *Scanning.* 14, Supplement II, 60, 1992.
45. Gimmara BL: Microwave embedment for light and electron microscopy using epoxy resins, LR white and other polymers. *Scanning.* 15: 82-87, 1993.
46. Çavuşoğlu İ, Minbay FZ, Kahveci Z, Temel ŞG, Sırmalı ŞA: Mikrodalga Işınımı ile Hızlı Polimerizasyon, Uluslararası Katılımlı 14. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi Özet Kitabı, 58, 1999.
47. Demaree Jr RS, Giberson RT, Smith RL: Routine microwave polymerization of resins for transmission electron microscopy. *Scanning.* 17, Supp 5, 25-26, 1995.
48. Giberson RT, Demaree Jr RS, Nordhausen RW: Four-hour processing of clinical diagnostic specimens for electron microscopy using microwave technique. *J Vet Diag Invest.* 9:61-67, 1997.