

Lenfoma Tanısında Doku Tesbiti ve Takibinde Standardizasyon

Öner DOĞAN

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

NHL olgularında tanı koymanın ve klinikopatolojik parametreler konusunda yeterli düzeyde bilgi edinmenin yolu, biopsi örneklerinin en iyi şekilde değerlendirilmesinden geçer. Bu sürecin sorumluluğunu büyük ölçüde patologlar yüklenmiştir. Ancak, patolog sorumluluğunun sadece morfolojik özelliklerin belirlenmesi ile sınırlı olduğu dönem artık kapanmıştır. Günümüzde patologlar, teknolojik gelişmelerin yarattığı inceleme ve değerlendirme yöntemlerinin biopsi örneklerine uygulanmasında, programlayıcı-örgütleyici uygulayıcı ve yorumlayıcı roller de üstlenmek durumundadır. Patologlardan neoplastik olayın sadece morfolojik özelliklerini belirlemesi değil, lezyonu morfolojik-antijenik-genetik özellikleri ile klinikopatolojik bir antite halinde tanımlaması istenmektedir. Multidisipliner çalışmayı gerektiren bu süreçte patologların başarılı olabilmesi için sadece kendi laboratuvar dünyalarında verimli çalışıyor olması yeterli değildir.

Günümüz tıbbında tanıya gidiş sürecini, bir yap-boz resmine ait parçaların doğru olarak birleştirilmesi ve meydana gelen resmin tanınmasına (daha önce tanımlanmış resimlerden-klinikopatolojik antitelere hangisine uyduğunun belirlenmesine) benzetmekteyim. Resim parçacıklarının ("puzzle"ların) her biri değişik kaynaklardan elde edilir. Hastanın yaşı, cinsiyeti, yaşadığı yer, yaptığı iş vb. kimlik bilgileri; öz geçmiş özellikleri, başvuru şikayetleri, hastalık semptomları, fizik muayene bulguları, radyolojik-hematolojik-biyokimyasal incelemelere ait sonuçlar, hastalığın seyri ve nihayet biopsi örneğinin incelenmesi ile ulaşılan bilgilerin her biri resmin (tanının) bir parçasını oluşturur. Patolojinin temel olarak sağladığı resim par-

çası "neoplastik lezyonun morfolojik özellikleri" dir. Günümüzde buna immünohistokimyasal ve genotipik özellikleri de eklemek mümkündür. Patoloğun görevi, biopsi örneğinin morfolojik, antijenik, genotipik özelliklerini içeren resim parçalarını klinisyene iletmekle sınırlı olabilir. Tanı için hangi parçaların gerekli olduğunun belirlenmesi, bu parçaların değişik disiplinlerden talep edilmesi, elde edilen parçaların birleştirilerek bir resim oluşturulması ve sonuçta bu resmin tanımlanması görevi klinisyene bırakılmalıdır. Ancak günümüzde NHL tanısının konmasında "resmi tanımlama" işlemi büyük ölçüde patologdan istenmektedir. Bazı durumlarda alınan biopsi örneğinin morfolojik incelemesi sonucunda elde edilen resim parçacığı, bütün resmin en tipik en belirleyici parçası olabilir. Böyle bir durumda patolog sadece bu parçacığa bakarak resmin bütününe ne olduğunu doğru bir şekilde tahmin edebilir. Ancak yine de diğer parçalardan da haberdar olarak tahmini tanısını doğrulamak ister. Bazı durumlarda ise patolojinin sağladığı resim parçası ana resmin tipik-tanımlayıcı parçası değildir. Bu parça tek başına hiçbir anlam taşımaz. Ancak diğer parçalar ile birleştirilirse tanı koydurucu olabilir veya tanıya gidişte hangi parçaların gerekli olduğuna dair ipuçları verebilir. Bu aşamada klinisyen ile patolog arasında mutlaka bir bilgi alışverişi olmalıdır. Briç oyunundaki deklerasyona benzetilebilecek bir bilgi alışverişi düşünülebilir. Her iki taraf da ellerindeki "kart veya puzzle" ların özelliklerini birbirlerine ne derecede doğru, yeterli ve ekonomik şekilde iletirse o derecede kısa yoldan "resmi tamamlayabilir", en uygun oyun programını birlikte oluşturabilir, grand şleme gidebilirler.

Sonuç olarak

1- Klinisyen, biopsi gönderirken elindeki klinik bilgileri mutlaka patoloj ile paylaşmalıdır.

2- Patoloj, temel görevi olan morfolojik incelemeyi en iyi şekilde yapmalı, ayrıca elde ettiği sonuçlar ile kendine iletilen bilgileri birleştirerek tanıya gidişte hangi ek incelemelere ihtiyaç duyulduğuna karar vermeli, bu incelemeleri yapmalı veya yapılmasını sağlayacak hareket planını oluşturabilmelidir. Elde ettiği bilgileri, karşılıklı bilgi akışının devamını sağlamak için en kısa süre içinde klinisyene iletmelidir.

3- Klinisyen ile patoloj arasındaki bilgi paylaşımı, brıç oyunundaki deklerasyona benzer şekilde birbirini indükleyerek sürmelidir

Ülkemizde NHL lar konusunda bir tanı standardına ulaşılması isteniyorsa ,öncelikle klinisyen ile patoloj arasındaki ilişkilerin yukarıda tanımlanan çizgiye getirilmesi gerekir. İkinci aşama, patolojların biopsi materyalinin değerlendirilmesi konusunda ne derece önemli bir kavşakta sorumluluk yüklediklerinin bilincine varmaları ve bu pozisyona en uygun yapılanmaya gitmeleridir. Bu yazı, ikinci aşamanın temel parametreleri üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Biopsinin Alınışı İle İlgili Özellikler, Sorunlar Ve Öneriler

1- Ülkemizde lenf nodülü biopsi indikasyonları belirsizdir. Biopsi öncesi yapılması gereken incelemeler yapılmadan biopsi yapılabilmektedir. Bazı biopsilerin objektif gerekçelere dayanmadan yapıldığı söylenebilir. "Biopsi yapılması gerekli midir, hangi sorulara yanıt aramak için yapılacaktır, ayrıca tanı listesindeki tabloların hangilerinin ayırımında yararlı olabilecektir. Morfolojik inceleme dışında hangi ek incelemelere ihtiyaç duyulabilecektir, bu incelemelerin yapılması mümkün müdür, nerede yapılabilir, biopsi materyali nereye gönderilmelidir, gönderme koşulları ne olmalıdır" gibi pek çok önemli soru, biopsi alınmadan önce üzerinde düşünülecek konulardır. Bu soruların cevabı aranmalı gerekirse biopsiden önce patoloj ile bağlantı kurulmalıdır.

2- Ne tür bir biopsi alınacaktır (eksizyonel, insizyonel, tru-cut, ince iğne aspirasyonu)? Bu tür bir biopsi tanıya gidişte yeterli ve gerçekçi midir? Bu konuda patoloj ne düşünmektedir, patoloğun tecrübesi ve imkanları yeterli midir? Son yıllarda radyolojik görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi ile tru-cut ve ince iğne aspirasyon biopsileri giderek yaygınlık kazanmaktadır. Ancak materyal miktarının az oluşu nedeniyle zaman zaman morfolojik

bulguların güvenilir şekilde yorumlanması ve ek inceleme tekniklerinin geniş şekilde kullanılması mümkün olmamaktadır. Materyalin tanı için yeterli miktarda doku içerip içermediği ve verimlilik düzeyi patoloj tarafından en kısa süre içinde klinisyene bildirilmeli ve duruma göre yeni bir biopsi programı gecikilmeden devreye sokulmalıdır. Yeterlilik konusundaki ön inceleme bazen intraoperatif değerlendirme ile yapıp sonuç en hızlı şekilde verilebilir.

3- Biopsi nereden alınacaktır? Hangi lenf nodülü patolojiktir ve hastalığı en iyi şekilde yansıtabilecektir. Bu konuya dikkat edilmeksizin rastgele biopsi alınması veya sadece cerrahın insiyatifine bırakılması doğru değildir. Bazen tanı koydurucu dokuya ulaşmak için çok sayıda biopsi yapılması gerekmektedir. Bu gerçek, klinisyen ve hasta tarafından hoşgörü ile karşılanmalıdır.

4- Çok iyi bir cerrahi tekniğin uygulanması şarttır. Biopsi, mutlaka tecrübeli bir cerrah tarafından yapılmalı, dokuya mümkün olduğunca az hasar verilmeli ve öncelikle eksizyonel biopsi yapılmaya gayret edilmelidir. Ülkemizde patolojların yaşadığı önemli güçlüklerden biri de gönderilen materyalin uygun olmayan koşullarda tecrübesiz kişilerce alınmış, çoğu kez miktar olarak yetersiz, mekanik-termal etkilerle hasara uğramış insizyonel doku parçaları olmasıdır. Patolojlar, kalite ve kantite bakımından yeterli olmayan materyalde aşırı bir zorlama ile ve yüksek risk alarak tanı koyma gayreti içine girmektedir. Bu çabanın doğru olmadığını hem klinisyen hem de patoloj tarafından kabul edilmesi, klinisyenin tanı koyma konusunda patoloğu baskı altına almaması, patoloğun da tanı ve yorumda aşırı zorlamalardan kaçınıp gerçekçi davranması gerekir.

Doku Örneğinin Değerlendirilmesi

Alınan doku örneği, doğrudan doğruya patoloji laboratuvarına gönderilebilir veya patolojdan intraoperatif ön değerlendirme yapması istenebilir. Ülkemizde intraoperatif değerlendirme geleneği genellikle bulunmamaktadır. Patolojlar ile cerrahlar arasında tam olarak doğru olmayan bir inanış vardır. "Lenfoma kuşkusu olan vakalarda intraoperatif mikroskopik değerlendirme yapmaya gayret göstermemek gerekir." Bu görüşün kısmen doğru tarafları da vardır. Doğru olan taraf bu yöntemden doğru tanı ve doğru sınıflamanın beklenmemesi gerektiğidir. Ancak yöntem tamamen gereksiz ve yararsız da değildir. Tanıya gidişte materyalin yeterli olup olmayacağı ve elde edilen materyalin en uygun şekilde nasıl değerlendirileceğine dair bir

plan yapılmasını sağlayabilir. Asıl yararlı tarafı, materyalin yeterli olup olmayacağı konusundaki kararın, henüz operasyon yapabilmeye şansının olduğu bir ortamda cerraha bildirilebilmesidir. Dokümantasyon, kazıma-yayma preparatlar veya cryostat kesitler incelenerek yorum yapılır. Cryostat kesit yapmak üzere dondurulan parçaların daha sonra rutin parafin blok takibi ve klasik morfolojik inceleme için kullanılmasında bazı sakıncalar vardır (donma-çözünme artefaktları). Bu dokuların diğer amaçlar ve yöntemler için kullanılması daha uygundur. Tablo I de hangi yöntemler için hangi dokuların uygun olduğu özetlenmektedir.

Doku Örneğinin Gönderilmesi

1- Doku, kısa bir süre içinde laboratuvara ulaştırılacak bile olsa, mutlaka kurumasına imkan tanımayacak bir ortamda gönderilmelidir. Ülkemizde oldukça sık yapılan önemli hatalardan biri, dokunun gazlı bez içine sarılarak gönderilmesidir. Gazlı bez içine sarılmış, düzensiz-parçalı eksizyonlar, insizyonel parçalar ve tru-cut materyallerinde geri dönüşümsüz hasarlar oluşmaktadır. Mecbur kalırsa, dokunun sarıldığı gazlı bez mutlaka serum fizyolojik ile önceden ıslatılmış olmalıdır.

2- Kısa bir süre içinde ulaştırılabilecek dokular serum fizyolojik içinde, diğerleri ise otolizin önlenmesi için fiksatif içinde gönderilmelidir. Soğuk ortam otolizi geciktirir. +4°C de, serum fizyolojik içinde 24 saat beklemiş dokularda bile morfolojik olarak yeterli sonuçlar alınabilmekte, umulmadık şekilde bazı antijenlerin varlığı saptanabilmektedir.

3- Kısa süre içinde laboratuvara ulaştırılmayacak dokular mutlaka fiksatif içine konulmalıdır. Fiksatif seçimi patoloğun tercihinine ve yapılacak ek inceleme yöntemlerinin özelliklerine bağlı olarak değişebilir. Bu seçim, patolog ile konuşularak yapılmalıdır. Materyal değişik amaçlar için bölünerek değişik fiksatifler içine konulabilir. Ancak nötral tamponlanmış %10 luk formalin çözeltisi pek çok amaç için uygun bir fiksatifdir.

4- Materyal, aynı amaç için birden fazla sayıda laboratuvara bölünerek gönderilmemelidir. Materyalin tamamı tek bir laboratuvara gönderilmelidir. Ülkemizde bu konuda zaman zaman yanlış uygulamalara rastlamaktayız.

5- Materyalin konulacağı fiksatifin (nötral tamponlu %10 luk formalin) her hafta taze olarak hazırlanması, bekletilmiş fiksatiflerin kullanılmaması, fiksatif çözeltisinin hazırlanması işinin mutlaka bu konuda eğitim görmüş güvenilir bir personele yaptırılması gerekir. Yeterli kalitede güvenilir fiksatifin bulunmadığı durumlarda fiksatif ihtiyacı pa-

toloji laboratuvarından istenilerek karşılanmalıdır. Bu konularda da ülkemizde yanlış uygulamalara oldukça sık olarak rastlamaktayız.

6- Formalin çözeltilerinin bulunmadığı ortamlarda, hastanelerde en kolay bulunan fiksatif alkollerdir. Ancak özellikle yüksek gradlı veya absolu alkoller, hücrelerde büzülme artefaktına, dokularda kuruma ve sertleşmeye yol açtıkları için morfolojik incelemelerde tercih edilmezler. Genotipik incelemeler için uygun fiksatiflerdir. Mecbur kalırsa absolu alkol yerine %70-80 lik alkoller kullanılabilir. Ülkemizde bu konuda da hatalı uygulamalara rastlamaktayız.

7- Bu başlık altında, bir kez daha belirtmekte yarar görüyorum, **“biopsi materyali, klinik bilgilerin ve ayırıcı tanı listesinin bulunduğu bir gönderme formu eşliğinde gönderilmelidir”**. Ne yazık ki, ülkemizde bu konuya en ileri merkezlerde bile yeterince dikkat edilmemektedir. Hematopatoloji ile uğraşan patoloğların klinisyenlerden ortak ve öncelikli isteği; tanıya gidiş sürecine “pas” diyerek değil “iki sanzatu” ile başlamaları, yani “biopsi indikasyonu koyduran klinik tablo bilgilerini patoloğa bildirmeleridir.”

Dokunun Örneklenmesi-Bloklanması

Günümüzde modern inceleme tekniklerinin katkıları gözardı edilemez, ancak iyi kalitede parafin blok kesitlerinin hematopatoloğlar için önemini dışlamak mümkün değildir. Konvansiyonel ışık mikroskopik inceleme, hematopatoloji için altın standarttır ve bizim lenfoid proliferasyonları anlamamızın başlangıç noktasıdır. Daima en üst düzey öneme sahiptir. En azından ilk doku örneklerinde hastalığı temsil edebilecek bölgelerin öncelikle konvansiyonel parafin takip işlemi için ayrılması gereklidir.

Doku örneğinin Tanımlanması

İnceleme, materyalin makroskopik özelliklerinin (sayı, kapsül özelliği, boyut, şekil, kıvam, renk, kesit yüzeyi özellikleri v.b) saptanması ve kaydedilmesi ile başlar.

Doku örneğinin Dilimlenmesi

Total olarak çıkarılmış bir lenf nodülü, uzun eksen boyunca hilustan geçecek şekilde bir kesit yapılarak iki ana yarıma ayrılır. Daha sonra ekvatoriyal kesitten kutuplara doğru 3 er mm kalınlığında olmak üzere birbirine paralel olarak kesitler yapılarak lenf nodülü dilimlere ayrılır. Dilimleme işlemi; dokunun yumuşak oluşu nedeniyle bazen başarılı bir şekilde yapılamaz, doku hırpalanabilir.

Bu durumda kesim işleminin devam ettirilmesi doğru değildir. Doku, tesbit çözeltisi içine alınır. Homojen-düzdün olarak kesilebilecek kıvama gelinceye kadar dokunun sertleşmesi beklenir (5-15 dakika). Bekleme süresi koagülatif fiksatiflerde oldukça kısa, formol çözeltilerinde ise nisbeten uzundur. Dış yüzü sertleşen doku daha kolay dilimlenebilir kıvama gelince dilimleme işlemine devam edilir. Kullanılan bıçakların uygun yapıda olması dokunun hırpalanmadan dilimlenmesi açısından önem taşır. Bıçağın profili mümkün olduğunca ince ancak buna karşılık stabilitesi yeterli düzeyde olmalıdır. Bıçak uzunluğu ve bıçağın eni kesilecek dokunun boyutlarına göre ayarlanmalıdır. Ancak pratik uygulamalarda 8 cm uzunluğundaki low profil mikrotom bıçakları, uygun bir tutucu sap modülüne monte edildiğinde lenf nodülü biopsi örneklerinin çoğunun dilimlenmesinde yeterli olmaktadır. Bistüri kullanımı her zaman iyi sonuç vermeyebilir. Bistürilerin bıçak uzunluğu bazı büyük nodüllerin homojen olarak dilimlenmesinde yetersiz kalmaktadır. Traş bıçağı kullanımı, bıçağın stabilitesinin yetersiz olması nedeniyle bazı durumlarda uygun değildir. Bu işlemde en önemli özellik bıçağın keskin olması ve kesim hareketlerinin doğru yapılmasıdır. Bıçak hiçbir şekilde doku içine doğru bastırılarak-itererek ilerletilmemelidir. Bıçak öne-arkaya homojen olarak hareket ettirilmeli, bu sırada bıçak mümkün olduğunca bizim itme kuvvetimizle ve hızla değil, yavaş yavaş ve neredeyse kendiliğinden ilerliyormuş gibi doku içine doğru yol alınmalıdır. Bu sırada dokunun geniş yüzeyi kesim tahtası üzerinde olmalı, diğer elimiz dokunun dış yüzeyini mümkün olan en az basınç kullanarak ve ezip sıkıştırmadan sabitlemelidir (Bu işlemin kolayca yapılabilmesi için basit kesim makineleri üretilmiştir.). Bu işlem sırasında doku hiçbir zaman kuru bir kesim tahtası ile temas ettirilmemelidir. Kesim tahtası serum fizyolojik veya fiksatif çözeltisi ile ıslatılmış olmalıdır.

Dokundurma preparatlarının hazırlanması

Doku dilimleri, taze kesit yüzeyleri üstte baka-cak şekilde kesim tahtasına dizilir. En geniş yüzeye sahip olan ve patolojik değişiklikler gösteren dilimlerin yüzeyindeki serum ve kan gibi fazla sıvı bir lam kenarı veya kurutma kağıdı ile nazıkçe silinir. Lam, kesit yüzeyine dokundurularak yüzeydeki hücre tabakasının lam yüzeyine alınması sağlanır. Lam aşırı bir kuvvetle bastırılmamalı ve yanal hareketler yapılmamalıdır. Dokundurma süresi, az hücre veren dokularda uzun, çok hücre veren dokularda kısa tutulmalıdır. İlk dokundurma prepa-

ratına alınan hücre miktarına göre daha sonraki lamaların dokundurma süreleri ayarlanabilir. Bol hücre taşıyan nisbeten kalın tabakalı preparatlar yaş fiksasyon ile fikse edilmelidir. Genellikle ilk dokundurular hücreden zengindir, yaş fiksasyona alınır. Son dokundurmalarda ise hücre tabakası incedir, havada kurutularak fikse edilirler. Yaş fiksasyon, preparatlar derhal %96 lik etanol içine alınarak yapılır. Bu preparatlar PAP ve/veya HE yöntemi ile boyanarak incelenirler. Havada kurutulan preparatların bir kısmı absolu metanol içine alınarak tesbit edilir. Metanolün mutlaka taze, saf ve kaliteli olmasına dikkat edilmelidir. Bu preparatlar Romanowsky boyaları ile (MGG vb) boyanarak incelenirler. Havada kurutulmuş preparatlardan bir kısmı ise kapaklı lam kutuları içinde, -20°C veya -86°C de antijenik-genotipik incelemeler için saklanabilirler. Preparat sayısı vakanın özelliklerine ve incelemeyi yapan birimin imkanlarına göre ayarlanır.

Doku örneklerinin kasetlenmesi

Dilimlerin çevresini tam olarak saran sağlam bir kapsül varsa bu kapsül bir veya iki noktadan makas ucu ile çentik yapacak şekilde kesilir (Aksi taktirde, kapsül ve parenkimin dehidratasyon işlemine farklı derecede yanıt vermesi nedeniyle doku dilimi kıvrılacak ve dilimin parafine düzdün şekilde gömülmesi mümkün olmayacaktır). Elde edilen dilimler mümkünse bütün halinde takip işlemine alınmalıdır. Dilim çapı, teknisyenin tecrübesine, mikrotomda kesit yapma kapasitesine, kullanılan mikrotomun cinsine göre ayarlanabilir. Kapasiteyi aşan büyük çaplı dilimler iki veya daha fazla parçaya ayrılıp küçültülebilir. Genel olarak alınan parçaların en büyük çapının 1 cm den daha büyük olmaması, mikrotomda kesit yapma işleminin kolay yapılması açısından tercih edilmektedir. Ancak en büyük ekvatoryal enlem düzleminde lenf nodülü parenkiminin bir bütün halinde mikroskopta incelenmesi, bazı vakalarda patoloğa önemli avantajlar sağlayabilir. Eğer lenf nodülü parenkiminin kompartmanlararası ilişkisinin incelenmesi önem taşıyorsa, 1 cm nin üzerinde çapa sahip olsa bile en az bir adet doku dilimi, bütün halinde takip edilmelidir. Elde edilen dilimler standart doku kasetlerine konularak takip işlemine alınırlar. Günümüzde kullanılan standart plastik doku takip kasetlerinin derinliği, eskiden kullanılan çelik doku takip kasetleri ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür (5 mm). Bu nedenle kasete alınan doku kalınlığının 3 mm nin üzerinde olmaması gerekir. Daha kalın dokular, kasetlerin iç yüzeyine yapışır ve

takip çözeltilerinin serbestçe dolaşımını engelleyerek doku takip kalitesinin bozulmasına yol açar. Dokunun özellikle santral bölgelerinde takip yetersizlikleri ve tüm dokuda birbirinden farklı takip zonları oluşur. Bu durum ise mikrotom kesim işleminde sorunlar çıkarır, ince homojen kesit alınmaz, kesitlerde morfolojik ve antijenik açıdan farklı özellikler taşıyan zonlar oluşur, tanı ve yorum hatalarına yol açar. Bu vesile ile bir kez daha vurgulamak gerekirse **“alınan doku örneklerinin 3 mm den daha kalın olmaması için azami dikkat sarfedilmelidir”**. Dalak dokusu kendine özgü yapısı ve kandan zengin bir organ oluşu nedeniyle blokama ve kasetleme işleminde bazı özellikler gösterir. Dokunun mümkün olduğunca kandan arındırılmasına çalışılmalıdır. Alınan doku dilimleri tamponlanmış nötral formalin çözeltisi içinde çalkalanarak yıkanır, faza kan giderilir. Bu işlem fiksatif çözeltisi değiştirilip yenilenerek birkaç kez tekrarlanır ve daha sonra doku dilimleri nihai fiksatif içine alınır.

Özel incelemeler için örnek alınması

Yukarıda rutin histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için gerekli dokuların parafin doku takibine ne şekilde hazırlanacağı anlatılmıştır. Bu incelemeler dışında, duruma göre özel incelemeler için de doku örneklerinin bir kısmı özel şekilde ayrıca takibe alınır. Bu incelemelerden başlıcaları şunlardır. Hücre süspansiyonunda flow cytometric immunfenotipleme ve konvansiyonel sitogenetik çalışmalar için doku-hücre kazıntısı alın-

ması; moleküler genotipik çalışmalar ve cryostat kesit işlemleri için taze dokunun dondurularak saklanması ve mikrobiyolojik incelemeler için steril ortamda özel besiyerlerine doku örneği alınmasıdır. Mikrobiyolojik inceleme örneklerinin steril ameliyathane şartlarında alınmasında yarar vardır. Aşağıda çalışma modeli ve uygun doku örnekleri tablo halinde verilmektedir.

Doku örneklerinin tesbiti-fiksasyonu

Fiksatifler; doku ve hücresel elemanları denatüre hale getirip otolizi durdurur, dokuyu daha sonra uygulanacak takip işlemlerine uygun ve çevre etkenlere karşı dayanıklı hale getirir. **Tüm amaçlar için uygun “en iyi” fiksatif yoktur.** Amaca en uygun fiksatif veya fiksatifler veya fiksatif kombinasyonları kullanılarak sonuca ulaşılmaya çalışılır. Cerrahi patolojide en yaygın olarak kullanılan fiksatif %10 formalin (%3.7 lik formaldehid) çözeltisidir. Nisbeten zararsız ve ucuzdur, çevre için önemli bir toksik atık sorunu oluşturmaz. Ancak formaldehid çözeltileri stabil çözeltiler değildir. Piyasada çok çeşitli ve kalitesiz çözeltiler bulunmaktadır. Mutlaka sertifikalı çözeltiler kullanılmalıdır. Beklemekle metilen glikol polimerleri oluşur, formik asit oranı artar, pH düşer. Asidik formalin çözeltilerinde formene adı verilen insolubl, siyah renkli pigment oluşur. Bu pigment dokulara çöker. Formene pigmentinin oluşumunu engellemek için stok çözeltilerinin alkali çözeltiler katılarak stabilize edilmesinde yarar vardır (kalsiyum karbonat). Tüm bu sorunların giderilmesi için paraformalde-

Tablo 1. Uygulama Yöntemlerine Göre Uygun Doku Örneği Tipleri

Çalışma Tipi	Taze, steril doku	Taze doku	Havada Kurumuş imprint	Cryostat Kesit	Parafin Kesit
1-İmmünohistokimya* (stoplazmik ve bazı yüzey antijenleri)			X	X	X
2-İmmünohistokimya (yüzey immüngloblinler)			X ^b	X	
3-Flow sitometrik fenotip		X			
4-Moleküler genotip				X	X ^c
5-Sitogenetik analiz	X				
6-Mikrobiyolojik analiz	X				

a-Antijen tipi ve fiksatifle göre değişir.

b-Yüzey Ig için sitosantrifüj preparatları tercih edilir.

c-Sadece alkol fiksate dokular uygun olur.

hidten taze olarak %4 lük formaldehid çözeltisi hazırlayıp aynı gün kullanmak gerekir. Ancak günlük pratikte bu yöntem kullanılamamaktadır. Bunun yerine sertifikalı (güvenilir üretici firma, stabilizator olarak belirli miktarda metanol içeren, son kullanım tarihi belirli) formalin çözeltisinden hazırlanan tamponlanmış nötralize %10 luk formalin çözeltisi kullanılabilir. Bu çözelti tercihan günlük-taze olarak hazırlanıp kullanılmalı, hazırlanan çözelti en çok bir hafta süre içinde tüketilmelidir. Dokulara gerçek bir aldehid fiksasyonu uygulamak için formaldehitin dokuya ulaşmasından itibaren 10-12 saat kadar bir sürenin geçmesi gerekir. Ayrıca formaldehitin dokuya penetrasyonu için geçecek sürenin de bu süreye eklenmesi gerekir (penetrasyon süresinin hesaplanması için $d=k \sqrt{t}$ formülü kullanılır. d = penetrasyon derinliğidir. k = penetrasyon sabiti formaldehid için 0.7 dir. t = penetrasyon için gerekli süredir). Kısaca, 3-4 mm kalınlığında bir doku diliminin tamamının gerçek bir aldehid fiksasyonu ile fikse olması için geçecek zaman, yaklaşık 14 saat kadardır. Ancak pratik uygulamalarda bu süre oldukça uzundur ve klinik baskılar sonucu günlük uygulamalarda bu süre 3-4 saate kadar kısaltılmıştır. Bu sürenin en az 6 saat olması “şizofrenik fiksasyon zonlarının” minimuma indirilmesi için önerilir. Süre kısaltıldıkça aldehid fiksasyonundan ziyade dehidratasyon aşamasında kullanılan alkollerin etkisi belirginleşecek ve doku alkol tipi bir fiksasyon morfolojisi sergileyecektir. Ülkemizdeki takiplerde genellikle alkolün baskın olduğu şizofrenik tesbit paterni görülmektedir. Aldehid fiksatifler proteinlerin amino grupları ile metilen köprüleri veya karbon bağları oluşturur, nazik bir kimyasal fiksasyon sağlar. Bu özellik elektronmikroskopik çalışmalar için istenen bir özelliktir. Ancak parafin doku takip aşamaları ve parafin kesit işlemleri sırasında kromatini ve sitoplazmik yapıları dış etkenlere karşı yeterince dirençli bir hale getirmez, rijit bir fiksasyon sağlamaz. Bu nedenle, parafin blok kesitlerinde, özellikle ince veziküller kromatinli nüvelerin kromatini parçalanıp dağılılabılır, öbekler halinde toplanabilir, arada bırak bölgeler kalır. Buna “nuclear bubbling” artefaktı denir. Diğer taraftan stoplazma elemanları sağlam-rijit bir şekilde tesbit olmadığı için daha sonra uygulanan alkol dehidratasyonunda büzülür, sitoplazma olduğundan küçük görülür, birbirine komşu hücreler birbirinden uzaklaşır. Benzer büzülme nükleuslarda da görülür. Bu tür morfolojik değişimlerin dışında kimyasal bir fiksasyon olması nedeniyle proteinlerin yapısını kimyasal olarak değiştirdiği için proteinlerin antijenik özelliklerini de

değiştirmiş olur. Gerçek aldehid fiksasyonu ile tesbit olmuş dokuda bazı antijenlerin saptanabilmesi için aldehid gruplarının proteinlere bağlandığı yerden koparılıp uzaklaştırılması yani proteinlerin yeniden açığa çıkarılması gereklidir. Bu işleme “antijen retrieval” veya “antijen unmasking”, “antijen recovery” adı verilmektedir. Hematopatoloji, diğer patoloji disiplinlerine göre sitomorfolojik ayrıntılara ve antijenik özelliklere çok daha fazla dayanmak zorundadır. Bu nedenle, aldehid fiksasyonunun dezavantajları göz önüne alındığında, farklı fiksatif kullanımları gündeme gelmiştir. Bu fiksatiflerin çoğu proteinleri koagüle ederek daha sağlam, rijid bir yapı oluştururlar. Bu maddelerin bazıları asidik çözeltilerdir. Proteinlerin kendi isoelektrik pH larından uzaklaşarak koagüle olmalarını sağlar (glisial asetik asit, pikrik asit içeren Bouin çözeltisi gibi). Diğer bazıları ise metalik katyonlar içerir. Proteinlerin aminoasit zincirlerinin meydana getirdiği organik gruplar ile büyük, insoluble koordinasyon kompleksleri oluştururlar (civa klorür içeren B5 ve Zenker; çinko klorür içeren formalin zinc). Bu özelliklerden de yararlanmak için formalin ile protein prespitan çözeltileri bir arada içeren karma fiksatifler de kullanılmaktadır. (B5, bouin, formalin zinc, Hollande). Protein presipitan ajanlar; HE kesitlerinde daha keskin bir nükleer ayrıntı sağlar, immunreaktiviteyi artırır. Ayrıca, daha önce formalin ile tesbit edilmiş ve parafin takibi uygulanmış dokular, geri takip ile suya getirilip protein prespitan fiksatiflerle fikse edildiğinde, sitomorfolojik ve antijenik özelliklerin kısmen düzeldiği görülmektedir.

Diğer bir fiksatif grubu ise alkol içeren fiksatiflerdir. Alkol, protein prespitan ve dehidratan özelliklere sahiptir. Bu nedenle antijen korunumu iyidir. Ağır metaller gibi kromatinde kırıklara yol açmadığı için moleküler genotipik çalışmalar için de uygun bir fiksatifdir. Ancak dehidratasyona yol açtığı için doku ve hücrelerde büzülme artefaktlarına neden olur. Bu özellik küçük dokularda çok belirgindir ve “kuruma artefaktı” oluşturacak düzeye ulaşır. Bu nedenle alkol, tekbaşına konvansiyonel HE histolojisi için kullanıma uygun değildir. Bunun yerine alkolün de yer aldığı karma fiksatifler tercih edilir (AFA çözeltisi: metanol, formalin, glisial asetik asit). Tablo III de bazı fiksatiflerin olumlu ve olumsuz yönleri karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Universal bir fiksatif olması nedeniyle nötral tamponlu %10 formalin, hematopatoloji alanında tercih edilebilecek bir fiksatifdir. Ancak, özellikle yanlış uygulamaların da katkısı ile (yetersiz fiksasyon süresi, standart dışı çözelti kullanımı, agresif

Tablo II. Bazı Fiksatiflerin İçerikleri

Nötral Tamponlu %10 Formalin

%37-40 lik formaldehit.....	100 ml
Distile su.....	900 ml
Sodyum fosfat monobazik monohidrat.....	4 gr
Sodyum fosfat dibazik anhidroz.....	6,5 gr

Zinc formalin

%37-40 formaldehid.....	100 ml
Distile su.....	900 ml
ZnCL2.7H2O.....	10 gr

AFA Fiksatif

Absolu etanol veya metanol.....	750 ml
%37-40 formaldehit.....	200 ml
Glasiyal asetik asit.....	50 ml

B5 Fiksatif

Stok Çözeltili	
HgCl 2.....	12 gr
Sodyum asetat.....	2,5 gr
Distile su.....	200 ml (Isıtlarak karıştır pH5.8 e ayarlanır)
B5 Çalışma Çözeltili	
Stok B5 çözeltisi.....	20 ml
%37-40 lik formaldehid.....	2 ml
(Kullanımdan hemen önce karıştırılarak hazırlanır)	

Hollande Fiksatif

Bakır asetat.....	25 gr
Pikrik asit.....	40 gr
%37-40 formaldehid.....	100 ml
Glasiyal asetik asit.....	5 ml
Distile su.....	1000 ml ye tamamla

dehidratasyon uygulamaları) morfolojik incelemelerde hematopatologların istediği standart kalite düzeyine her zaman tam olarak ulaşmak mümkün olmamaktadır. Hematopatologların önemli bir bölümü, morfolojik ayrıntı konusundaki üstünlüğü nedeniyle koagülatif fiksatifleri (B5, Zinc formalin, Hollande,AFA, Bouin vb) tercih etmektedir. Çevre için toksik atık olmaları nedeni ile B5 ve benzeri ci va içeren fiksatifler son yıllarda giderek daha az kullanılmaktadır. Bouin çözeltisi antijenik incelemelerde zaman zaman sorun oluşturmaktadır. Zinc formalin ve Hollande çözeltisi hem morfolojik hem de antijenik incelemelerde başarılı sonuçlar vermektedir. Özellikle küçük dokularda (tru-cut, kemik iliği trephine, küçük insizyonlar) Hollande fiksatifi ile mükemmel morfolojik ayrıntı elde edilmektedir. Ancak tüm bu ağır metalli koagülatif fiksatifler nükleik asit zincirlerinde kırılmalara yol açmaktadır. Bu nedenle moleküler genotipik ve sitogenetik çalışmalarda bazı sorunlara yol açabilirler. AFA fiksatifi, nükleik asit korunumu konusundaki üstünlüğü nedeni ile önümüzdeki yıllarda yaygın kullanıma aday fiksatiflerden biridir. Nüklear mor-

folojik detay mükemmeldir. Stoplazmik büzölmeye ve küçük parçalarda kurumaya yol açabilir. Antijenik incelemelerin bazılarında optimal şartların araştırılması gerekmektedir.

İstanbul Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında, taze gelen lenf nodülleri ayrı parçalar halinde, Hollande, AFA ve formalin zinc ile fikse edilerek morfolojik, antijenik ve genotipik incelemeler için kullanıma uygun geniş bir doku yelpazesi oluşturulmaya çalışılmaktadır. Fiksasyon süresi Hollanda ve formalin zinc için 12 saattir. Küçük dokular (tru-cut, 1-2 mm lik insizyonlar, punch biopsiler ve endoskopik biopsiler) için 3-4 saat yeterlidir. Daha önce formalin fiksasyonu uygulanmış dokularda formalin zinc ve AFA ile post fiksasyon uygulaması, kaliteyi arttırmaktadır. Kötü takip edilmiş dokularda ise geri takip işlemi sonrası B5 ile post fiksasyon iyi sonuç vermektedir. AFA ile fiksasyonda 4-6 saat yeterlidir. Küçük dokular çok daha kısa sürede fikse olurlar. AFA hariç diğer tüm fiksatiflerde fiksasyon sonrasında 20-30 dakikalık bir yıkama işlemi uygulanmalıdır. AFA da ise direk olarak alkollere geçilebilir. Tablo II'de bazı fiksatiflerin formülleri verilmektedir.

Doku Takip İşlemi

Çok çeşitli takip şemaları önerilebilir. Hiçbirisi "en iyi" takip şeması değildir. Her dokunun kendine özgü en uygun takip şeması vardır. Ancak her doku için ayrı şema uygulamak pratik açıdan mümkün değildir. Genel olarak dokuların büyüklükleri ve içerdikleri su oranlarına göre gruplandırılıp takip etmekte yarar vardır. Küçük dokular dehidradasyon işlemine çok duyarlıdır. Bu nedenle ayrı bir makinada takip edilmeleri uygundur. Fiksasyon aşaması oda sıcaklığında yapılmalıdır. Fiksasyon süresini kısaltmak amacı ile yüksek sıcaklık uygulamalarından kaçınılmalıdır (Otolitik olayı artırır). Takip şemasının diğer aşamalarında sıcaklığın 45°C yi geçmeyecek şekilde yükseltilmesi zararlı bir etki yaratmadan reaksiyon hızını artırır. Parafin sıcaklığı, parafinin erime derecesinin birkaç derece üstünde olmalıdır. 70°C nin üstüne çıkılmamalıdır (pişme-termal denatürasyon). Antijen korunum düzeyinin de artırılması için 62°C nin geçilmemesi tercih edilir. Parafin impregnasyon aşamasında vakum ve basınç uygulamaları yararlıdır. Diğer aşamalarda yararı tartışmalıdır. Dehidratasyon işlemi mutlaka düşük gradlı alkollerden başlamalıdır. %30-%50 lik alkoller ile başlamak uygun ise de pratik uygulamalarda %70 lik alkolden başlanması da kabul edilebilir. Dehidratasyona hiçbir şekilde %95-96 veya absolu alkol ile

Tablo III. Fiksatiflerin Karşılaştırmalı özellikleri

Özellikler	Tamponlu formalin	Hollande	B5	Formalin Zinc.	Bouin	Alkol.	AFA
Nükleus Detay	Bubling artefakt.	Keskin, net	Keskin, net	Formalinden iyi	Keskin, net	Keskin büzülme	Keskin büzülme
Stoplazma Detay	Büzülme	İyi	İyi	Büzülme	İyi	Büzülme	Büzülme
Antijen korunumu	Orta	İyi	İyi	İyi	Orta	İyi	İyi
Takip makinasına uyum	Evet	Evet	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet
Stabilite	Kısa(günler)	İyi	Çok kısa	Kısa(günler)	Kısa(günler)	İyi	İyi
Maliyet	Düşük	Orta	Yüksek	Düşük	Düşük	Orta	Orta
Çalışana toksite	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Çevreye toksite	Yok	Yok	Var	Yok	Yok	Yok	Yok
Elektron mikroskopi.	İyi	Kötü	Kötü	Yeterli	Kötü	Kötü	Kötü
Nükleik asit korunumu	İyi	Kötü	Kötü	?	Kötü	İyi	İyi

başlanmamalıdır. Büzülme artefaktlarına ve yanma-kavrulma artefaktlarına yol açar. Nükleus ve stoplazma büzülür. Nükleuslar soluk zayıf boyanır, çift kırıcılıkları artar, sitoplazmalarda aşırı eosinofilik boyanmaya yol açar. Absolu alkol süresi dokunun büyüklüğüne ve su içeriğine göre ayarlanmalıdır. Genellikle lenf nodüllerinde 2 saati geçmemelidir. Küçük dokularda 30-60 dakika yeterli olur. Tüm çözeltilerin periodik olarak yenilenmesi başanlı bir takip için gereklidir. İhmal edilmemelidir

Parafin Gömme

Takip parafini ile gömme parafinin birbiri ile uyumlu olmasına dikkat edilmelidir. Gömme parafinin kalitesi, kesit alma işlemini etkileyen parametrelerden biridir. Dokunun sertlik derecesi, kullanılan bıçağın cinsi, kullanılan mikrotomun özellikleri, kesit alma işlemindeki tercih (seri-tek tek), teknisyenin kişisel tercihleri gibi pek çok faktör parafin cinsinin belirlenmesinde etkili olacaktır. Ancak genel olarak erime derecesi yükseldikçe parafinin sertliğinde giderek artış olur. Gömme işlemi, dokunun soğumasına fırsat verilmeden hemen yapılmalı, parafinin dokuya zarar vermeyecek en yüksek sıcaklık düzeyinde iken, (visikozitesi en az düzeyde iken) uygulanmalıdır. Soğutma-katılaştırma işlemi mümkün olan en kısa sürede hızla yapılmalıdır (soğuk plaka üzerine alınarak). Parafindeki bu sıcaklık değişimi ne kadar büyük ve ne kadar kısa sürede olursa katılaştıran parafinin mikro kristal boyutları da o derecede küçük olur ve parafin dokuyu o derecede daha iyi sarar. Ancak bu üst ve alt sıcaklık seviyeleri, dokunun yüksek sıcaklıktan zarar görmeyeceği ve parafinin ise düşük sıcaklıktan çatlayıp kırılmayacağı düzeylerde olmalıdır. Gömme işleminde modern parafin doku gömme sistemlerinin kullanılması büyük kolaylık sağlamaktadır. Blok taşıyıcı olarak plastik kaset kul-

lanılıyorsa bu kasetlerin elastiklik derecesi ve parafini kavrama kapasitesi önemlidir. Bu işlem için özel olarak formüle edilmemiş plastik maddelerden yapılan kasetler kesim işlemi sırasında sorun oluşturabilirler.

Kesit Alma İşlemi

En fazla emek ve tecrübe gerektiren, insan faktörünün en belirgin olduğu aşamadır. Kaliteli bir kesit; pek çok inceleme yöntemi ve patoloğun histopatolojik yorumu için vazgeçilmez temel ihtiyaçtır. Bu nedenle patoloğlar laboratuvarlarında standart üst düzey bir kesit kalitesini sağlamak ve bu kaliteyi devam ettirmek zorundadır. Hematopatolojide sitomorfolojik ayrıntı diğer patoloji disiplinlerine göre çok daha fazla değer taşımaktadır. Hücre yoğunluğunun fazlalığı ve hücrelerin nisbeten daha küçük boyutlu hücreler olması; daha ince bir kesit yapma ihtiyacını doğurmaktadır. Sitomorfolojik detay için ince bir kesite, kompartmanlar arası ilişki ve infiltrasyon paternini belirlemek için de dokunun tüm yüzeyini temsil eden düzgün-kırışık-sız bir kesite ihtiyaç vardır. Tüm yüzeyi temsil eden hem ince hem de kırışık-sız kesit alma işlemi; tecrübe, sabır, bilgi ve teknolojik destek gerektiren kompleks bir iştir. Doku öncelikle çok iyi şekilde tesbit ve takip edilmiş, kesime uygun bir parafin içine gömülmüş olmalıdır. Parafin blok, kesimden önce uygun bir soğutucuda mümkün olduğu kadar soğutulmalıdır (Bloğun çatlayıp kırılmasına izin vermeyecek soğuklukta, 0°C-, -10°C), Soğutulan blok titreşimsiz sağlam bir ortama yerleştirilmiş mikrotoma monte edilir. Bloğun mikrotoma tam olarak yerleştirilmiş olmasından emin olunmalı en ufak titreşimin kesit kalitesini etkileyeceği unutulmamalıdır. Aynı şekilde mikrotomun tüm parçalarının titreşimsiz bir kesit işlemi yapacak konumda olmasına dikkat edilmelidir. Kaliteyi et-

Tablo IV. Bazı hatalar, nedenleri ve sonuçları

Aşama	Hata	Sonuç
Doku transportu	Dokunun kuru gazlı beze konulması	Yüzey doku şeridinde kurumaya bağlı artefak
Blokama	Doku örneklerinin kalın alınması	Doku santralinin yumuşak kalmasına bağlı olarak kesitlerin düzensiz ve kötü oluşu
Fiksasyon	Uygun olmayan fiksasyon süresi; Civalı fiksatiflerde uzun süre fiksasyon	Kesitlerde uniform yırtıklar parçalanmalar Dokuda kırılanlık artışı, kesitlerde çatlaklar yarıklar.
Dehidratasyon	Alkollere su karışmış olması veya Alkollerde yetersiz süre takip	Kesitlerde küçük düzensiz çatlaklar-yarıklar oluşur. Bu bölgelerde boyanma zayıftır Kromatin bulanıktır.
Clearing	Xylende aşırı uzun kalma; Xylenin alkol ile bulaşık olması ve Parafin penetrasyonunun iyi olmaması	Dokuda sertleşme, kırılanlık artışı Kesitler ezilmiş ve kırışık olarak gelir. şerit halinde kesit alınmaz.
İnfiltration	Çok sıcak parafin	Hücre sel bütünlüme, kollajende bazofili
Embeding	Parafin banyosunda çıkandıktan Sonra gömme işleminin geç yapılması	Doku çevresinde hava boşlukları, parafinin dokuyu iyi sarmaması ve buna bağlı olarak kesitte yırtılmalar
Kesit işlemi	Uygun olmayan bıçak açısı Kesici kenarda defekt	Venedik kepenği tabir edilen artefak Vertikal yırtıklar.
Kesit yüzdürme	Kesitin su banyosuna konulurken Dikkatli olunmaması	Kesitte katlanmalar ve yırtıklar
Kurutma	Etüvün çok yüksek sıcaklıkta oluşu	Nuclear bubling artefak ve ısı hasarı
Boyanma	Eosinden sonra yetersiz yıkama	Kesitte aşırı kırmızı görüntü immunoblast nüvelerinde eosinofili boyanma

kileyen en önemli parametrelerden biri bıçağın kalitesi ve teknik olarak uygunluğudur. Disposable bıçak kullanımı günümüzde standart hale gelmiştir. İnce kesit almak için bıçak açısı 22° olan bıçaklar daha uygundur. Ancak bu bıçaklar dayanıksız olduğu için maliyetleri yüksektir. Genel olarak 35° lik bıçaklar kullanılmaktadır. Kesit yüzeyinin karbon, teflon vb. maddelerle kaplanması bıçağın dayanıklılığını arttırmaktadır. Ancak bu bıçaklarla ince kesit yapmak biraz daha tecrübeli olmayı gerektirir. Önemli özelliklerden biri bıçak kesim açısı ve kesit vuru hızıdır. Sertçe dokularda bıçak kesim açısı düşük, vuru hızı yüksek; yumuşak dokularda ise bıçak kesim açısı yüksek, vuru hızı düşük tutulmalıdır. Alınan kesitlerin akordeon şeklinde gelmesi durumunda açısı artırılmalı, rulo şeklinde gelmesi halinde azaltılmalıdır. Shuttering veya Venetian blind olarak bilinen ince-kalın dalgalı kesit oluşumu yanlış bıçak açısına veya sistemin stabil olmamasına bağlıdır. Diğer bir özellik bıçak kesim kenarının pürüzsüz, artefaksız ve keskin olmasıdır. Defektif bıçak kenarları çizilmelere, keskinliğini yitirmiş bıçak kenarları ise dokunun ezilerek, akordeon tarzında kesilmesine yol açar. Bıçak kesim kenarında, bıçak kesim sırtlarında ve kesilmekte olan bloğun kenarlarında doku ve parafin

artıkları bulunmamalıdır. Doku alkollerde aşırı derecede dehidrate olmuş ise bloktaki kurumuş doku yüzeyine gliserol sürdükten sonra kesit yapılması önerilir. Doku yeterince tesbit olmamış ve bu nedenle santral kısım yumuşak kalmışsa kesit yüzeyine buz koyarak soğutmak yararlıdır.

Kesitlerin Su Banyosunda Açılması-Lama Alınması

Su banyosunda yüzdürülerek yapılan bu işlemde bazı pratik noktalara dikkat edilmelidir. Su banyosunun sıcaklığı, parafinin erime derecesinin 10°C altında olmalıdır. 30 saniyelik yüzdürme süresi kesitlerin açılması için genellikle yeterlidir. Yüksek sıcaklık ve yüzdürme süresinin uzaması kesit kompartmanlarının dağılmasına yol açar. Kesitin kolay ve kısa sürede açılmasını sağlamak için su banyosuna alkol veya deterjan katılabilir. Bu işlem yüzey gerilimini azaltarak kesitin su yüzeyinde yayılmasını kolaylaştırır. Diğer bir seçenek; kesitlerin önce %50 lik alkol damlatılmış lam üzerine alınması, kesit kırışıklıklarının arasına alkolün girmesi ve daha sonra bu lamın su banyosuna daldırılarak kesitin yüzdürülmesidir. Kesitin lama yapışma özelliğini arttırmak için lamlar daha önceden poly-L-lysine veya APES ile kaplanabilir. An-

çak normal standart dokular ve boyama yöntemleri için bu tür adeziv maddelerin kullanılmasına gerek yoktur.

Kesitlerin Kurutulması

Kesitlerin ince olması ve sitomorfolojik ayrıntıların önemli olması nedeniyle kurutma işleminin nazik ve dikkatli bir şekilde yapılması gerekir. Yüksek sıcaklıklarda hızlı kurutma işlemleri uygun değildir. Sıcak plaka ile kurutma yapılmamalıdır. Kurutma işlemi sırasında lam üzerinde su damlalarının bulunması, etüvün nemli olması istenmeyen özelliklerdir. Sıcak ortamda suyun buharlaşması sırasında dokunun su buharı ile hasara uğraması mümkündür. Bu nedenle lam taşıyıcıya yerleştirilen kesitler, fazla suyun sızması için oda sıcaklığında yere dik pozisyonda bir süre bekletilir. Daha sonra 45-50°C sıcaklıktaki etüve alınıp 2 saat kadar bekletilerek kurutma işlemi tamamlanır. Bu sırada parafin yumuşar, kesit lam ile temas kurar ve lama yapışır. Etüv havasında nem oranının düşük olması gereklidir. Bu amaçla hava dolaşımı olan, fan sistemine sahip özel kurutma etüvleri daha uygundur. Nem oranı düşüktüçe kurutma süresi kısalmır, su buharına bağlı doku hasarları azalır.

Boyama

Kurutulan kesitler ksilen serilerinden geçirilerek parafin giderilir. Bu işlemin başarısı için ksilenin temiz, uygulama süresinin yeterli olması gerekir. Yetersiz deparafinizasyon, boyanın başarısız olmasına yol açar. Standart boyama yöntemi HE dir. Ek olarak giemsa, PAS ve retikülin lif boyaları

uygulanabilir. Mayer hematoksilen gibi progresif hematoksilenler tercih edilmelidir. Eosin ile boyanma şiddeti, bazı kurallara bağlı kalınmak şartı ile patoloğun tercihinine bırakılabilir. İmmunoblast-sentroblast gibi hücrelerin nükleolusu eosinofilik olmamalı, buna karşı Reed-Sternberg hücrelerinin nükleolusu eosinofilik boyanmalıdır. Eosin ile boyanma derecesi, boya sonrası alkoller içindeki geçiş zamanı değiştirilerek istenilen düzeyde ayarlanabilir. Daha sonra uygulanacak dehidratasyon ve ksilende parlatma aşamalarının yetersiz ve uygun şekilde yapılması halinde çift kırıcılık ve bulanıklık nedeniyle mikroskopik görüntü kalitesi bozulacaktır.

KAYNAKLAR

1. David Hopwood, Fixation and fixatives, in John Bancroft, Marilyn Gample, eds. Theory and practise of histological techniques, Edinburgh, Churchill-Livingstone, 2002, 63-84.
2. Graeme Anderson and John Bancroft, Tissue processing and microtomy in John Bancroft, Marilyn Gample eds., Theory and practise of histological techniques, Edinburgh, Churchill-Livingstone, 2002, 85-108.
3. Peter M. Banks, Technical factors in the preparation and evaluation of lymph node biopsies in Daniel M. Knowles ed. Neoplastic Hematopathology, Philadelphia, Lippincott Williams-Wilkins, 2001, 467-482.
4. Alfred C. Feller, Jacques Diebold, Practical Advices: Methods for the diagnosis of malignant lymphoma, in Alfred C. Feller, Jacques Diebold, Histopathology of nodal and extranodal non Hodgkin's lymphomas, Berlin, Springer, 2004,409-419.