

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**FORMALİN VE KSİLOL YERİNE KULLANILAN
SOLÜSYONLARIN DOKU TAKİBİNE ETKİSİ**

ILGIN KARAMAN

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2011

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ PATOLOJİ
ANABİLİM DALI

FORMALİN VE KSİLOL YERİNE KULLANILAN SOLÜSYONLARIN DOKU TAKİBİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

ILGIN KARAMAN

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir

(Proje no: 2009. KB. SAG. 018).

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	i
Resim Listesi	ii
Kısaltmalar	iv
Teşekkür	vi
Özet	1
İngilizce Özet	3
Giriş ve Amaç	5
Genel Bilgiler	7
Gereç ve Yöntem	22
Bulgular	34
Tartışma	68
Sonuçlar	85
Kaynaklar	87

TABLO LİSTESİ

1. Formalinin doza bağı toksik etkileri.....	12
2. HER2 tespitinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması.....	21
3. Çalışmada kullanılan fiksatifler.....	22
4. Çalışmada kullanılan şeffaflandırıcılar.....	22
5. Uygulanan 13 farklı doku takip protokolü.....	23
6. Uygulanan HK'sal ve İHK'sal boyalar.....	26
7. Solüsyonların koku açısından değerlendirmesi.....	34
8. H&E boyalı kesitlerde nükleer değerlendirme.....	38
9. HK'sal boyama sonuçlarının değerlendirilmesi.....	43
10. İHK yazılım programı ile elde edilen veriler.....	44
11. Bildiğimiz formalin ve çalışmada kullanılan alternatif fiksatiflerin üretici firmalar tarafından sunulan özellikleri.....	71
12. Bildiğimiz ksilen ve çalışmada kullanılan diğer alternatif şeffaflandırıcıların üretici firma tarafından sunulan özellikleri.....	72
13. Formalinin, çalışmada kullanılan FineFIX® ile karşılaştırıldığı çalışmalar ve bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar.....	73
14. Formalinin, Glyo-Fixx ile karşılaştırıldığı çalışmalar ve bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar.....	74
15. 1, 2, 3, 4 ve 5 nolu doku takiplerinin karşılaştırılması.....	79

RESİM LİSTESİ

1. Formalin ile doku fiksasyonu esnasındaki reaksiyonlar.....	9
2. Hidrokarbonların aromatik ve alifatik iki farklı yapısı.....	18
3. Hibridizasyon işleminin temel reaksiyonları.....	20
4. 1 no'lu hızlı doku takip metodu.....	24
5. 2-13 no'lu takip protokolleri.....	25
6. HK'sal ve İHK'sal boyamalar için oluşturulan TMA'lar.....	27
7. TMA kesitine ait, bilgisayar ortamına aktarılmış görüntü. İHK yazılım programı tarafından değerlendirilmesi istenen reprezentatif alanların işaretlenmiş olduğu izleniyor.....	28
8. PureLink™ spin column-bazlı pürifikasyon metodu.....	31
9. RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation™ ekstraksiyon kiti, ekstraksiyon protokolü....	33
10. Karaciğer dokusu, H&E boyalı kesitler.....	35
11. 6 nolu doku takibine ait kesitlerde histomorfoloji.....	36
12. 8 nolu doku takibine ait kesitlerde histomorfoloji.....	37
13. 1, 2, 6 ve 10 nolu doku takiplerinin nükleer morfoloji açısından karşılaştırılması.....	39
14. Fine-FIX®'in kullanıldığı doku takiplerine (7 ve 11 nolu doku takipleri) ait kesitlere örnek.....	40
15. HK'sal boyalar ile elde edilen boyama örnekleri.....	41
16. TMA-Kc kesitinde Retikülin boyama sonuçları.....	42
17. TMA-M (Tablo 6) bloğu kesitine ER nükleer antikoruna ile uygulanan İHK'sal boyama sonuçları.....	45
18. TMA/R-Ktm (Tablo 6) bloğu kesitine P53 nükleer antikoruna ile uygulanan İHK'sal boyama sonuçları (kolon tm).....	46

19. TMA/R-Ktm (Tablo 6) bloğu kesitine Ki67 nükleer antikoru ile uygulanan İHK'sal boyama sonuçları (kolon tm).....	47
20. TMA/D-M (Tablo 6) bloğu kesitine p63 nükleer antikoru ile uygulanan İHK'sal boyama sonuçları (deri dokusu).....	48
21. HMWK, meme tümörü dokusu (TMA/M).....	50
22. CK, deri dokusu (TMA/M).....	51
23. CK20 (TMA/R-Ktm).....	52
24. HEP A, karaciğer dokusu (TMA/Kc).....	54
25. CD3, sirotik karaciğer parankimi (TMA/Kc).....	56
26. CD20, sirotik karaciğer parankimi (TMA/Kc).....	57
27. LCA, sirotik karaciğer parankimi (TMA/Kc).....	58
28. CGA, mide mukozası (TMA/D-M).....	59
29. Melan-A, deri dokusu (TMA/D-M).....	60
30. Aktin, Uterus doku kesiti (TMA/A-U).....	61
31. CISH. Negatif ve pozitif kontrollerde boyanma.....	63
32. CISH ile elde edilen sonuçları gösteren bazı örnekler.....	64
33. Farklı fiksatifler ve farklı şeffaflandırıcılar ile oluşturulan farklı doku takiplerinin eşit koşullarda uygulandığı kolon tümör dokusu örneklerinden, ekstraksiyon sonrası elde edilen DNA kalitesinin, agaroz jel elektroforezi ile analizi ve karşılaştırılması.....	65
34. Farklı fiksatifler ve farklı şeffaflandırıcılar ile oluşturulan farklı doku takiplerinin, eşit koşullarda uygulandığı kolon tümör dokusu örneklerinde, DNA kalitesinin PCR-bazlı analizi.....	66

KISALTMALAR

aa	Aminoasit
AB	Alcian Blue (Histokimyasal boya)
CK	Sitokeratin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DTno	Doku Takip Numarası
EM	Elektron mikroskopu
ER	Östrojen reseptörü
EtOH	Etil alkol
FFPG	Formalinle Fikse-Parafine Gömülü
FİSH	Floresan İn Situ Hibridizasyon
H-E	Hematoksilen-Eozin
HK	Histokimya
HMWK	Yüksek Molekül Ağırlıklı Keratin
IM	Işık mikroskopu
İHK	İmmünohistokimya
İSH	İn Situ Hibridizasyon
KGA	Kromogranin A
LCA	Lökosit Common Antigen
MDHDT	Mikrodalga Destekli Hızlı Doku Takibi
OSHA	Occupational Safety and Health Administration
PAS	Periodic Acid Schiff (Histokimyasal boya)

P-CEA	Poliklonal karsino embriyonik antijen
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (“Polymerase Chain Reaction”)
PR	Progesteron reseptörü
RNA	Ribonükleik Asit
TMA	Doku Mikrodizini (“Tissue Microarray”)
TTF-1	Tiroid Transkripsiyon Faktörü-1
VVG	Verhoeff’s Van Gieson

TESEKKÜR

Patoloji uzmanları, sağlık sisteminin teşhisten tedaviye giden sürecinde, hastanın alacağı tedaviyi yönlendirecek önemli bir noktada hizmet vermektedirler. Patoloğu yaptığı işte mutlu edecek en önemli şey, patoloji raporunu eksiksiz ve hatasız şekilde hazırlamış ve hastayı doğru şekilde tedaviye yönlendirmiş olmaktır. Bunun için patoloji asistanlarını, iyi bir patolog olma yolunda, teorik yönden ağır, zorlu bir eğitim süreci bekler. Bu eğitimin en başında asistan, çoğunlukla önceden hakkında pek fikir sahibi olunmayan makroskopi salonuyla; artık günlerinin büyük bir kısmını birlikte geçireceği mikroskop ile hücrelerimizin o pembe-mavi dünyasıyla ve de bölümdeki kalın kalın kitaplarla dolu o büyük kitaplıkla tanışır. Ardından dört yıl geçer ve bugün benim bulunduğum noktaya ulaşır...

Bu süreci kendileriyle paylaşma şansına eriştiğim, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda hizmet veren, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Erdener ÖZER ve her biri birbirinden değerli hocalarım Prof. Dr. Tülay CANDAN, Prof. Dr. Kutsal YÖRÜKOĞLU, Prof. Dr. Meral KOYUNCUOĞLU, Prof. Dr. Sülen SARIOĞLU, Prof. Dr. Özgül SAĞOL, Prof. Dr. Banu LEBE, Prof. Dr. Burçin TUNA, Prof. Dr. Sermin ÖZKAL, Prof. Dr. Çağnur ULUKUŐ, Uzm. Dr. Duygu GÜREL, Uzm. Dr. Merih GÜRAY BUDAK, Uzm. Dr. Ő. Mehtat ÜNLÜ'ye,

Kendileri ile çalışma, tecrübelerinden yararlanma şansına eriştiğim, ancak yakın zamanda emekli olan, patolojinin değerli isimleri, saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Őerafettin CANDAN, Prof. Dr. Uğur PABUÇCUOĞLU ve Prof. Dr. Aydanur KARGI'ya,

Sürecin başında biz asistanlarına patolojiyi sevmeleri için büyük destek verdiği, "umbilikal kord kesitindeki gülen yüzü, plasenta kesitindeki kalp şeklini almış villusları" görmemizi sağladığı, bize dünyada patolojiyi tanıtıp, bu doğrultuda ufkumuzu genişlettiği ve kapılar açtığı için, sevgili hocam Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Erdener ÖZER'e,

Uzmanlık eğitiminin zorlu tez sürecinde, beni zoru başarabileceğime inandıran, takıldığım düğümleri çözen, yaptığım hatalarda beni toparlayıp moral veren ve ders almamı sağlayan, tecrübesiz bir orkestrayı başarıya taşıyan mükemmel bir Őef gibi beni en doğru şekilde

yönlendirerek sonuca ulaştıran, bu süreci kendisi ile paylaşma şansına eriştiğim değerli hocam Prof. Dr. Kutsal YÖRÜKOĞLU'na,

Tezimin moleküler ayağı için yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Sultan CİNGÖZ'e,

Çalışmamızı destekleyen, kullandığımız solüsyonların Türkiye'deki yetkili satıcı firmaları olan KAPLAN Uluslararası Elektronik Müm. ve Tic. Ltd. şti.'ne, Deksan A.ř.'ye, SERMED Tıbbi Malzeme İthalat ve Tic. Ltd. şti.'ne ve N.İ.C. Medikal San. ve Tic. Ltd. şti.'ne,

Tez sürecimde verdikleri kıymetli destek için, yaptıkları işin önemini bilerek titizlikle çalışan, yaptığımız işin önemini bilerek bize saygı gösteren, varlıkları ile makroskopi salonuna kişilik kazandıran, zeki, çalışkan ve güler yüzlü, kıymetli teknisyenlerimiz Serkan AYDINOĞLU ve Mert KIRMIZI'ya,

Tez sürecimde bana destek olan ve uzmanlık eğitimim süresince benden güler yüzlerini hiçbir zaman esirgemeyen teknisyenlerimiz Ayşen ÇAYAN, Nalan OKAY, Necati DENİZ ve Yahya Tufan ORHAN'a,

İyi günümde kötü günümde her zaman yanıbaşımnda olan canım annem Zeliha KARAMAN'a, canım kardeşlerim Işıl-Elif KARAMAN'a ve canım amcalarım Nazmi-Mustafa KARAMAN'a sonsuz teşekkürler ediyorum.

...Gelişen ve gelişmeye devam eden bilim ve teknoloji nedeniyle bilgi yükü sürekli artmaya devam eden tıp dünyasına, bundan on yıl önce bilgisizce adım atmış biri olarak bugün, bu dünyanın güzel bir dalında bilerek ve isteyerek uzmanlaşıyor olmanın mutluluğunu yaşıyorum. Son olarak da, bu güzel güne erişmemde çok büyük emeği, alın teri olan, bugün hayatta olmasa da, bundan önce olduğu gibi bundan sonra da her daim en büyük manevi desteğim olmaya devam edecek canım babam İsmail KARAMAN'a sonsuz teşekkür ediyorum, saygı, sevgi ve özlemlerle anıyorum.

Ilgın KARAMAN

İzmir, 2011

ÖZET

FORMALİN VE KSİLOL YERİNE KULLANILAN SOLÜSYONLARIN DOKU TAKİBİNE ETKİSİ

Dr. Ilgın KARAMAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

karaman.2410@hotmail.com

Amaç: Formalin ve ksilolün önemli toksik, allerjen ve karsinojen etkileri vardır. Günümüzde, bu kimyasalların yerine geçebilecek daha az toksik maddeler piyasaya sürülmüştür. Bu maddelerin, histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalara; in situ hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu gibi incelemelere olumsuz etki etmemesi beklenir. Çalışmamızda, Türkiye'de ticari olarak satılan alternatif kimyasalların etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 5 farklı fiksatif (Formalin, Glyo-Fixx[®], FineFIX[®], Cell block[®] ve Greenfix[®]) ve 4 farklı şeffaflandırıcı (Ksilen, Sub-X[®], Bio Clear[®], Shandon Xylene Substitute[®]) kullanılarak 13 farklı doku takibi kurgulanıp, 13 farklı dokuya uygulandı. Hematoksilen-Eozin boyalı kesitler histomorfolojik düzeyde niteliksel olarak karşılaştırıldı. Hazırlanan doku mikrodizini kesitlerine histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar uygulandı. Histokimyasal boyamalar niteliksel, immünohistokimyasal boyamalar ise bilgisayar programında (3D Histech NuclearQuant[®], MembraneQuant[®]) niceliksel olarak karşılaştırıldı. Kromojenik in situ hibridizasyon uygulandı ve sinyal kalitesi değerlendirildi. DNA ve RNA ekstraksiyonu uygulanarak ve DNA niteliği polimeraz zincir reaksiyonu ile değerlendirilerek doku takipleri moleküler düzeyde kıyaslandı.

Bulgular: Tüm doku takiplerinde kesit kalitesinin iyi olduğu gözlemlendi. Histokimyasal boyama sonuçları, alternatif solüsyonların tümünün bu uygulamalar açısından uyumlu olduğunu gösterdi. İmmünohistokimyasal boyamalarda etken maddesi glyoxal olan fiksatiflerle olumsuz sonuçlar elde edildi. Kromojenik in situ hibridizasyon ile tüm doku örneklerinde sinyalin okunaklılığı, zeminin kontrastı benzer ve iyi özellikte bulundu. Ayrıca

formalin içermeyen takiplerin moleküler korunma açısından, formalin içerenlere göre üstün olduğu görüldü.

Sonuç: Tüm parametreler birlikte değerlendirildiğinde, Glyo-Fixx[®], Cell block[®] ve FineFIX[®] kullanılan doku takiplerinin, biraz daha üstün oldukları dikkati çekmektedir. Daha az toksik, daha az iritan olmaları, iyi morfolojik sonuç vermeleri, histokimyasal boyamalar ile uyumlu olmaları ve moleküler koruma açısından formaline üstün olmaları nedeni ile alternatif fiksatifler, rutin patoloji ve araştırmalarda formalinin yerini almaya adaydır. Alternatif fiksatif arayışının geri planda bıraktığı alternatif şeffaflandırıcıların da ksilenin yerini almaya güçlü adaylar olduğu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Doku fiksasyonu, formalin, DNA, RNA, patoloji, moleküler

ABSTRACT

THE EFFECT OF THE ALTERNATIVE SOLUTIONS WHICH ARE PRODUCED TO BE USED IN PLACE OF FORMALIN AND XYLENE ON TISSUE PROCESSING

Ilgın KARAMAN MD

Dokuz Eylül University School of Medicine Department of Pathology

karaman.2410@hotmail.com

Aim: Formaldehyde and xylene are main solutions of tissue processing. But these chemical substances have important toxic, allergen and carcinogenic effects on human body. Nowadays, nontoxic or lesser toxic new commercial solutions have been produced to be used in place of formaldehyde and xylene. It is expected to be compatible with histochemical and immunohistochemical stainings, also with in situ hybridisation and polymerase chain reaction from these new alternative solutions. In this study, we aimed to assess the impact of new alternative solutions on methods mentioned above.

Methods: Thirteen different tissue processings were designed and performed on 13 different tissues by using five different fixatives (Formaldehyde, Glyo-Fixx[®], FineFIX[®], Cell block[®] ve Greenfix[®]) and four different clearing agents (Xylene, Sub-X[®], Bio Clear[®], Shandon Xylene Substitute[®]). Haematoxylin&Eosine stained sections were compared by using qualitative histomorphological criteria. Histochemical and immunohistochemical stains were performed by using tissue microarrays. Histochemical staining results were compared by using qualitative criteria while immunohistochemical staining results were compared with quantitative data which were had by using a computer programme (3D Histech NuclearQuant[®], MembraneQuant[®]). Tissue sections were tested for the availability of chromogenic in situ hybridisation, by using a Her-2/neu protocol. Also different tissue processings were compared at molecular level by performing DNA and RNA extraction, and DNA quality by polymerase chain reaction.

Results: The quality of sections was well for all tissue processings. Histochemical staining results showed that all alternative solutions which were used are suitable for this application. Immunohistochemical staining results showed that alternative solutions which contain glyoxal as active agent need optimization for this application. The clearance of signals with chromogenic in situ hybridisation were nearly same and well for all tissue samples. Furthermore, tissue processes which do not contain formaldehyde were found to be superior compared with ones which contain formalin as fixative solution on molecular preservation.

Conclusion: We have demonstrated that formaldehyde-free fixatives have potential in routine pathology and research to replace formaldehyde in histomorphology and protein preservation. When all parameters were evaluated together it was found that the tissue processes which contain Glyo-Fixx[®], Cell block[®] and FineFIX[®] as fixative solution were superior compared the others. We have also demonstrated that alternative clearing agents which stayed behind the scenes because of the search of ideal fixative have the potential in routine pathology to replace xylene.

Key Words: Tissue fixation, formalin, DNA, RNA, pathology, molecular

GİRİŞ VE AMAC

Hastalıkların önemli bir bölümüne tanı koymanın ve klinikopatolojik parametreler konusunda yeterli düzeyde bilgi edinmenin yolu, biyopsi örneklerinin en iyi şekilde değerlendirilmesinden geçer. Bu süreçte, patolog sorumluluğunun sadece morfolojik özelliklerin belirlenmesi ile sınırlı olduğu dönem geride kalmıştır. Patologlardan, lezyonların sadece morfolojik özelliklerini belirlemesi değil, lezyonu morfolojik-antijenik-genetik özellikleri ile klinikopatolojik bir antite halinde tanımlaması istenmektedir. Tanıya gidişte en temel basamak olarak önemini korusa da, iyi bir histomorfolojik inceleme tek başına yeterli olmamaktadır. Büyük ölçüde proteinlerden oluşan antijenlerin immünolojik yöntemlerle incelenmesi de gerekmektedir. Bu yüzden, uygulayacağımız fiksasyon yönteminin, proteinlerin antijenik özelliklerini değiştirmeden koruması ve immünotipik inceleme yöntemlerine elverişli hale getirmesi beklenmektedir. Bununla birlikte, oldukça artan immünohistokimya (İHK) kullanımı yanısıra, insitu hibridizasyon (İSH) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi modern tanısal testlerin kullanımı da giderek yaygınlaşmaktadır. Fiksasyon sistemleri tartışılırken, artık sadece proteinler değil, nükleik asitler de göz önünde bulundurulmaktadır.

Bilindiği gibi, c-erbB2, meme kanserinde postoperatif tedavinin belirlenmesinde ve prognoz tahmininde kritik öneme sahip İHK'sal bir belirteçtir. İHK'sal olarak c-erbB2 kuvvetli pozitif olan olgular doğrudan Herceptin tedavisine yönlendirilirken, c-erbB2 kuşku pozitif olarak değerlendirilen olgular için bu pozitifliği doğrulamak amaçlı İSH uygulanmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda c-erbB2 kuvvetli pozitif iken floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile negatif olguların bildirilmesi, c-erbB2 kuvvetli pozitif olup doğrudan Herceptin tedavisi uygulanan hastaların bir kısmının bu tedaviye yanıt vermemesi, “c-erbB2'nin yönlendiriciliği ne derece güvenli?”, “doku takibindeki sorunlar bunda ne derece etkili?” ve “her olguya FISH uygulanmalı mı?” gibi soruları doğurmuş, bu sorular da araştırmacıları fiksasyonun ve/veya doku takibinin bu konudaki etkilerini incelemeye sevk etmiştir (1, 2).

Hem morfolojik hem de antijenik özelliklerin istenilen düzeyde korunmasını sağlayacak mükemmel bir fiksatif (tespit solüsyonu) bulunmamaktadır ve günden güne gelişen teknoloji, alternatif tespit solüsyonu arayışını doğurmaktadır.

Patoloji laboratuvarlarında kullanılan ana kimyasallar olan formalin ve ksilolün çalışanlar üzerine önemli toksik, allerjen ve karsinojen etkileri vardır. Doku tespiti ve takibinde kullanılan bu kimyasalların tercih edilme nedenleri, ucuzluk, kolay ulaşılabilirlik ve konvansiyonel yöntemlerin kullanılmasına olanak sağlamalarıdır. Günümüzde, bu kimyasalların yerine geçebilecek daha az toksik maddeler piyasaya sürülmüştür. Bu maddelerin İHK'sal boyama, İSH, PCR gibi ileri incelemelere olumsuz etki etmemeleri, uyum sağlamaları beklenir. Bu etkiyi araştıran münferit çalışmalar, bir ya da birkaç kimyasalı formalin ya da ksilol ile karşılaştırarak incelemiştir. Ancak, tümünü birden hem formalin ve ksilol ile, hem de birbirleri ile karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, Türkiye'de ticari olarak satılan alternatif kimyasalların, yukarıda belirtilen beklentiler dahilinde doku takibine etkisi araştırılmıştır.

Başlıca amaçlarımız ise şunlardır:

- Farklı doku tespit ve takip solüsyonlarını güvenilirlik, pratiklik ve maliyet açısından birbirleri ile kıyaslamak,
- Farklı doku takiplerinin laboratuvar işlemlerine, morfolojiye, histokimyasal (HK) ve İHK'sal boyamalara etkisini değerlendirmek,
- Doku takibinin İSH uygulamasına etkisini belirleyebilmek,
- Doku takibinin moleküler düzeydeki etkilerini belirleyebilmek,
- Doku morfolojisini en iyi şekilde sunacak ve dokuda moleküler yapıyı, formaline kıyasla niceliksel ve niteliksel olarak daha iyi şekilde koruyacak uygun fiksatifi ve uygun doku takibi metodunu tespit edebilmek.

Etik Kurul Kararı

Çalışmamız, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından, 31.07.2009 tarih ve B.30.2.DEÜ.0.01.00.00/15500 sayılı yazı ile onaylanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Fiksasyon, doku takibi ve boyama gibi komponentleri kapsayan histoteknik süreç, temel olarak, hücre içi ve hücre dışı doku bölmeleri ile çeşitli hücrelerarası ilişkilerin belli bir andaki durumunun yakalanması ve görüntülenmesini amaçlar. Fiksasyondan başlayarak parafin kesitlere dek uzanan ve HK'sal ya da İHK'sal boyamalarla devam eden ödünlere sonucunda ortaya çıkan görsel ürünün, canlı dokunun olabilecek en iyi durağan (statik) görüntüsünü sağladığı varsayılır. Dolayısıyla, dokunun canlı organizmadan ayrılmasını izleyen süreçteki fiksasyon ve doku takibi sırasında, yapısal ve kimyasal bütünlük açısından verilen ödünlere en az düzeyde tutulması gerekir.

Fiksasyon

Fiksasyon, klasik doku takip işleminin ilk aşamasıdır (3). Dokunun canlı organizmadaki durumuna en yakın şekilde sabitlenip (protoplazmadaki protein, lipid, karbonhidrat ve diğer maddeleri koagüle veya presipite ederek), dış etkenlere dirençli hale getirilmesidir.

Fiksasyon işleminde başlıca hedefler şunlardır (4):

1. Hücresel enzimlerin neden olacağı otolizi önlemek,
2. İnfeksiyöz ajanları inaktive etmek/öldürmek ve bakteriyel hasarı önlemek,
3. Dokuyu şekil ve hacim açısından sabitleştirmek,
4. Dokunun canlıdaki yapısına olabildiğince benzer şekilde korunmasını sağlamak,
5. Dokuyu daha sonra uygulanacak takip işlemlerine dayanıklı hale getirmek,
6. Dokuyu daha sonra uygulanacak boyama ve inceleme yöntemlerine elverişli hale getirmek.

Tespit için kullanılan ajanlar *fiksatif* olarak adlandırılır. Maalesef yukarıda sıralanan fiksasyon hedeflerinin tümünü karşılayan tek bir fiksatif mevcut değildir. Günümüze kadar, her biri bir ya da birkaç açıdan diğerinden üstün, farklı yapıda çeşitli fiksatifler üretilmiştir. Bu fiksatifler aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır:

1. Aldehitler (formaldehit, glüteraldehit, glyoxal, acrolein),
2. Oksitleyiciler (osmium tetroksid, potasyum permanganat, potasyum dikromat),

3. Protein denatürasyonu yapanlar veya koagülanlar (etil alkol, metil alkol, asetik asit),
4. Çapraz bağ yapan diğer ajanlar (carbodiiminler),
5. Fiziksel ajanlar (ısı, mikrodalga),
6. Diğerleri (civa klorür, pikrik asit, boya maddeleri).

Uzunca bir süredir, patoloji labortuvarlarının genelinde yaygın şekilde kullanılan fiksatif, aldehit grubu fiksatiflerden olan *formalin*dir. Patolojide kullanılan diğer fiksatifler arasında Carnoy gibi alkol bazlı fiksatifler yanısıra, formaldehit içeren Bouin ve B5 gibi fiksatifler bulunmaktadır.

Günümüzde Kullanılan Fiksatifler ve Başlıca Özellikleri

Evrensel Fiksatif: Formalin

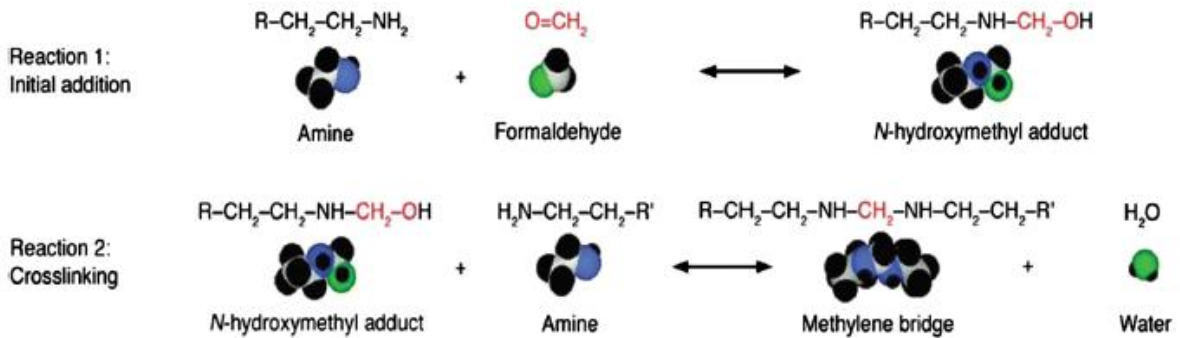
Uzunca bir süredir dünya genelinde, patoloji laboratuvarlarında standart fiksatif olarak kullanılagelmiş bu kıymetli solüsyonun patolojideki yerini anlayabilmek için, dokudaki etkisini ve bu etkiyi nasıl gerçekleştirdiğini bilmek önemlidir. Dolayısıyla öncelikle, doku formalin ile karşılaştığında kimyasal ve moleküler düzeyde nelerin olup bittiğine göz atmak gerekir.

Formalin, formaldehitin sudaki %40'lık çözeltisidir. Patoloji laboratuvarlarında, standart fiksatif olarak, 1 hacim formalinin (formalinin, formaldehitin %40'lık çözeltisi olduğunu tekrarlamak istiyorum!) 9 hacim su ile karıştırılmasıyla elde edilen “%10'luk formalin” kullanılmaktadır. Dolayısıyla %10'luk formalin, formaldehitin sudaki %4'lük çözeltisidir ($40/100 \times 10/100 = 4/100$).

Aldehitler olarak bilinen organik molekül sınıfının en basit üyesi olan formaldehit (CH_2O), solüsyon içerisinde polimerize olma eğilimindedir. Yani, monomerik subünitler (CH_2O) bir araya gelerek, molekül ağırlığı daha yüksek agregatlar oluştururlar. %10'luk formalin içerisinde ise, formaldehit genellikle monomerik formda bulunur. Ancak fiksasyon ile polimerizasyon belirginleşmeye başlar ve polimerizasyon ile de molekül ağırlığı artan formaldehit moleküllerinin penetrasyon hızı yavaşlar (moleküler ağırlık ve penetrasyon hızı genellikle ters orantılıdır). Bu nedenle de, üreticiler, polimerizasyonun önüne geçmeye yardımcı olması amacıyla, formalin solüsyonuna metanol eklerler. Metanol her ne kadar bir

alkol olsa da (bir aldehit değil) görece formaldehite yakındır. İki molekül arasındaki tek fark şudur: metanolde C ve O atomları tek bağ ile bağlı iken (C-OH); aldehitte C ve O atomları çift bağ ile bağlıdır (H-C=O). Bu da ayrıca metanolün vücuda neden toksik olduğunu gösterir. Sindirilmiş ya da absorbe edilmiş metanol, vücutta formaldehite ve formaldehitin oksidasyon ürünü olan formik asite oksidize edilir (oksidasyon zinciri metanol-formaldehit-formik asit şeklinde gider).

Formaldehit, non-koagulan bir fiksatifdir. Dokuya kimyasal olarak bağlanırken, kendinden sonra gelen belirtecin penetrasyonunu engelleyecek jel-benzeri bir matriks oluşumuna neden olmaz. Formaldehitin başlıca bağlandığı doku kısımları, aminoasitlerde (aa) bulunan reaktif hidrojen atomlarıdır. Bütün aa'ler, molekülün bir ucunda bir amino grubu (-NH₂) ve diğer uçta ise bir karboksil grubu (-CO₂H) içerir. Böylelikle bir protein oluşturmak üzere biraraya gelip bağlandıklarında, proteinin bir ucu bir amino grubu (N-terminali), diğer ucu ise bir karboksil grubu (C-terminali) olacaktır. Formaldehit molekülü çoğunlukla, proteinlerin N-terminali ile etkileşir ve protein molekülleri arasında metilen köprüleri (H-C-H) oluşturur (Şekil 1; 'Reaction 1'). N-terminali ile olan bu reaksiyonun, formalin solüsyonlarının pH'sına ve aa'lerin biyokimyasal özelliklerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Formaldehit ayrıca aa sisteini içindeki sülfidril gruplarına da bağlanarak, proteinleri daha ileri stabilize eden çapraz bağlar oluşturur (Şekil 1; 'Reaction 2'). Bu köprüler ve çapraz bağlar, dokuyu stabilize edip korumakla birlikte, çeşitli İHK prosedürlerinde epitop açığa çıkarma (retrieval) basamağına ihtiyaç duyuran oluşumlardır.



Şekil 1: Formalin ile doku fiksasyonu esnasındaki reaksiyonlar.

Formalin fiksatif olarak kullanılırken, solüsyonun pH'ı dikkat edilmesi gereken özelliklerdendir. Yukarıda da belirtildiği gibi, formalin solüsyonu olağan pH aralığında iken, formaldehit molekülleri normal olarak proteinlerin N-terminal ucu ile bağlanacaktır. Bu pH, genelde nötrale yakındır. Bir formaldehit solüsyonunun pH'ı çok asidik olduğunda, bu solüsyona maruz kalan kanlı dokularda, asidik ortamın hemoglobin üzerinde yaptığı etki sonucu, koyu kahverengi/siyah renkli, insolubl, yapay bir pigment oluşur. Bu pigment *hematin* (asit hematin, formalin pigmenti, formene) olarak isimlendirilir. Bu nedenlerle, formalin solüsyonlarının pH'ı genelde 6'nın üzerinde tutulur.

Formalin, atmosferik oksijene maruz kaldığında formik aside oksidize olmaya meyilli olduğundan, solüsyonların çoğu hematin pigment oluşumunu inhibe etmek için tamponlanır. Yaygın olarak kullanılan tampon fosfattır (5). Etkili bir tamponlayıcı olmakla birlikte, fosfatı formalin içinde kullanırken, fosfat çökeltisi oluşumunu önlemek amacı ile, dehidrasyon işlemi maksimum %70 konsantrasyonda başlanmalıdır. Bu çökeltiler, dokuda yapay kalıntılara neden olabilir ve daha fazlası, alkol tüpünde blokaja neden olabilir. Bu oluşumu önlemek için, ilk alkolü %70 ya da daha düşük tutmaya ek olarak, fosfat dışında bir başka tampon ile tamponlanmış formalin solüsyonu da kullanılabilir. Bu fiksatifler fosfat-tamponlularla aynı sonuçları verir ve fosfat çökelti oluşumu problemi de olmaz.

Aldehit grubunun en basit üyesi olan formaldehit, belki en hızlı fiksatif değildir, ancak histoloji ve araştırma laboratuvarlarında uygulanan diğer yöntemler ile en uyumlu fiksatifdir. Ucuzdur. Mikrop öldürücüdür. Patoloji laboratuvarında en sık karşılaşılan etkenler olan hepatit B ve C virüsleri, tüberküloz basili, kist hidatid etkeni ve daha nadir olsa da HIV (AIDS etkeni) ile enfekte materyallerden kaynaklanabilecek enfeksiyonlara karşı koruyucudur. Her türlü materyalin rutin fiksasyonu için kullanılabilir. Formalinde tespit edilen dokulara, birçok özel boya ve İHK uygulanabilmektedir. Ancak, tespit proteinlerin çapraz bağlanması ile gerçekleştiğinden, antijenite zamanla azalır. Bu dezavantaj antijeni açığa çıkarma yöntemleri ile bir noktaya kadar tersine çevrilebilmektedir. Formalin ürik asit kristallerinin erimesine yol açar. Fiksasyonun 24 saatten fazla sürmesi durumunda meme dokusundaki kalsifikasyonlar da çözünebilir. Işık mikroskopik (IM) olarak incelenecek dokuların tespitinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte, elektron mikroskopik inceleme yapılması gerekli olan dokuların tespiti için uygun değildir. Yukarıda da belirtildiği gibi, beklemekle asidik karakter kazandığından, solüsyonun pH'sının yaklaşık 7.0 olarak

ayarlanması için çeşitli tampon sistemleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında fosfat yanı sıra, kalsiyum karbonat, magnezyum karbonat ve TRIS tamponları sayılabilir. Tampon içermeyen formalinin raf ömrü kısadır.

%10'luk formalin 24 saatte 2-3 mm'lik doku penetrasyonu ve tespiti sağlamaktadır. Bu nedenle, dokuların tespiti için saatler geçmesi gerekmektedir. Ancak formalinde tespit, konsantrasyon ve ısıya bağlıdır. Sürenin kısaltılması amacıyla, ısı 60°C civarında sabit tutulan bir etüvde fiksasyon gerçekleştirilebileceği gibi, yine bu amaçla formalinin ısı 65°C'yi geçmeyecek şekilde mikrodalga fırında ışınlama yapılabilir. Ancak, yüksek ısıda otolizin hızlanması fiksasyon sırasında sürekli yüksek ısı kullanmayı sakıncalı kılmaktadır.

Genel olarak cerrahi materyalden elde edilen doku örneklerinin optimal tespiti için 24 saat kadar (ya da en azından bir gece) formalinde kalması önerilmekte ise de, küçük doku örnekleri için 24 saatlik bir süre pratik değildir. Bu tür biyopsilerde fiksatif penetrasyonu hızlı olduğundan, bunlar patoloji laboratuvarına ulaştıkları gün histoteknik işleme alınabilirler. İğne biyopsileri ve endoskopik biyopsi örnekleri için 5-6 saat ve daha büyük doku örnekleri için 12 saatten fazla fiksasyon önerilmektedir. Dokunun yeterli düzeyde tespit olduğundan kesin olarak emin olmak için biyopsilerde 6-18 saat ve cerrahi materyalde ise 12-36 saat tespit gerektiği belirtilmiştir. Eğer, oda sıcaklığında klasik olarak önerilen 24 saatlik formalin tespiti beklenmeden doku dehidratasyon işlemine alınırsa, yani tespit süresi kısaltılırsa, formalin ve etanol tespitinin bir karışımı ortaya çıkar. Dolayısıyla, tespit tamamlanmadan kesintiye uğratılması; formalin tespitinin sadece dokunun dış kısmına sınırlı kalmasına, dokunun derinlerine doğru gittikçe dehidratasyon serisindeki alkol koagülasyonunun baskın olmasına ve dokunun merkezinin ise taze ve tespitsiz olarak kalmasına neden olur (şizofrenik fiksasyon). Uzamış formalin fiksasyonu ise aşırı çapraz bağların oluşumuna neden olarak İHK'sal incelemeleri olumsuz etkileyebilir. Ayrıca nükleik asitlerin elde edilmesini engelleyebilir.

Formalin ve Organizmaya Etkileri

Patoloji laboratuvarlarımızın çoğunda, uygun havalandırma sistemi ve işlemi biten dokuların depolanacağı çalışma ortamından ayrı odalar mevcut değildir. Çalışanlar, dokuların içerisinde saklandığı mevcut formalinin buharlaşmasına bağlı belli seviyede formaldehite sürekli olarak maruz kalmaktadır. Ayrıca makroskopik inceleme, paraformaldehitten solüsyon

hazırlama, formalin hazırlanması, örneklerin formaline transferi, kullanılmış formalinin atık bidonlarına aktarımı gibi durumlarda, kısa süreli ancak daha yüksek seviyeli formaldehit maruziyeti söz konusudur.

Formalin buharının havadaki konsantrasyonu ppm (part per million) ile ifade edilmektedir. 1 ppm, 1m³ havadaki 1.248 mg formalin buharına eşittir (6, 7). Hissedilebilir formaldehit düzeyi 0.1-0.5 ppm (parts per million, yaklaşık 0.12-0.6 mg/m³) iken, 0.5-1.0 ppm (0.6-1.2 mg/m³) formaldehit göz iritasyonuna, 1.0 ppm'nin üzerinde formaldehit ise burun ve boğaz iritasyonuna neden olmaktadır (7) (Tablo 1).

OSHA (The Occupational Safety and Health Administration) tarafından belirlenmiş ve kabul edilen formalin buharı güvenlik düzeyleri TWA*: 1 ppm, STEL*: 2 ppm, TLV*: 0.50-0.75 ppm'dir. Patoloji laboratuvarlarındaki formaldehit maruziyetinin yüksek olduğu ve 0.5 mg/m³ limitini¹ sıklıkla aştığı bildirilmektedir. IARC kaynaklarında patolojilerde STEL düzeyleri 3 ppm ve üzerinde ölçülmüştür (6, 8). Ayrıca formalin IARC Grup 1 kategorisinde yer alan bir karsinojendir.

Tablo 1: Formalinin doza bağlı toksik etkileri

Formalin Düzeyi	Toksik Etkiler
0.05 – 1.0 ppm:	Kötü koku
0.05 – 2.0 ppm:	Göz iritasyonu, nöropsişik etki
0.1 – 2.5 ppm:	Burun ve boğaz iritasyonu
5 – 20 ppm:	Göz yaşarması, dispne, öksürük, burun-göz-farinkste yanma
+20 ppm:	Pulmoner ödem, pnömoni
+100 ppm:	Ölüm

1 ppm: 1.248 mg/m³

Kullanılan diğer fiksatifler ve başlıca özellikleri

Alkol: Etil alkol (%70-100) nadiren primer fiksatif olarak kullanılmaktadır. Glikojenin korunması ve bazı HK'sal çalışmalar için kullanılabilirse de, çok sayıda dezavantajı mevcut-

¹Kimyasal maddelere maruziyeti belirlemede, kimyasal maddeye maruz kalınan süreyi ve kimyasal maddenin düzeyini birlikte ele alan bazı terimler kullanılmaktadır: **STEL** (Short term exposure limit): Kısa süre (15-30 dakikayı geçmeyen) içerisinde izin verilebilecek maksimum maruziyet düzeyini ifade eder. **TWA** (Time weighted average exposure value): Sekiz saatlik çalışma süresinde çalışanın maruz kaldığı ortalama düzeydir. **TLV** (Threshold limit value): Sekiz saatlik çalışma süresinde çalışanın maruz kaldığı en yüksek değerdir.

tur. Etil alkol dokudan su çekerek protein denatürasyonuna, dokunun sertleşmesine, büzülmesine ve hücre distorsiyonuna yol açar. Ayrıca yağların erimesine neden olabildiğinden lipid çalışmaları ya da myelin boyaları söz konusu olduğunda kullanılmamalıdır.

Carnoy fiksatif: Glasiyel asetik asit, absöü etanol ve kloroformdan meydana gelen bir karışım fiksatifdir. Her türlü dokunun tespitinde kullanılabilir. Hızlı penetrasyon gösterir ve bu nedenle bazı laboratuvarların acil işlem gerektiren biyopsileri için yeğlenmektedir. Glikojen ve plazma hücreleri için iyi bir fiksatifdir. Ayrıca, nükleik asitlerin incelenmesini gerektiren durumlarda da önerilmektedir. Büzülme ve sertleşmeyi önlemek için dört saatten fazla tespit yapılmamalıdır. Kloroform tehlike yaratabilir. Ayrıca kollajen iyi korunmaz ve asit fast basiller boyanmaz. Eritrositler lizise uğrar.

Bouin solüsyonu: Pikrik asit, formaldehit ve asetik asitten meydana gelen bir karışım fiksatifdir. Özellikle küçük biyopsiler için yeğlenir. Klasik olarak testis biyopsilerinin tespitinde önerilmektedir. Eritrositler lizise uğrar ve demir ile küçük kalsiyum depolanmaları çözünürler. Pikrik asit DNA degradasyonuna yol açabildiğinden, dokuların intakt DNA gerektiren çalışmalarda kullanılmasıyla çelişir.

Hollande solüsyonu: Pikrik asit, formalin, asetik asit, bakır asetatın meydana gelen bir karışım fiksatifdir. Bouin solüsyonunun modifikasyonudur. Özellikle lenfoid sistem ve gastrointestinal traktüse ait olanlar olmak üzere, küçük biyopsilerin tespitinde kullanılır. Bouin'e benzer dezavantajları vardır.

B5 fiksatif: Civa klorür, sodyum asetat ve formalinden oluşan bir karışım fiksatifdir. Lenf nodları, dalak gibi lenfoid dokular ile lenfoproliferatif hastalık kuşkusunu bulunan tüm dokuların rutin tespitinde kullanılır. Mükemmel sitolojik ayrıntı sağladığı gibi, lenfoid belirleyiciler için antijen korunması da üst düzeydedir. Bununla birlikte dezavantajları da mevcuttur. Öncelikle, B5 stabil bir fiksatif olmadığından taze olarak hazırlanması gerekir. Aşırı tespit, dokuda sertleşme ve frajiliteye yol açtığından, dokunun B5'de 2-4 saat kaldıktan sonra formaline konması gerekir. Ayrıca bazı antijenlerin korunmasında sorun olabilir (keratin immünreaktivitesi gibi). Formalinde tespit edilmiş dokulara B5 post-fiksasyonu (dokunun ardışık olarak ikinci bir fiksatif ile tespit edilmesi) uygulanabilir.

Zenker fiksativ: Potasyum dikromat, civa klorür ve glacial asetik asitten oluşan bir karışım fiksativdir. Kemik iliği biyopsileri için kullanılabilir. Dokular hızlı bir şekilde 8-12 saat içinde tespit olur. Histolojik ayrımı çok iyidir. Eritrositler eridiğinden kanlı materyaller için yeğlenebilir. Fiksasyondan sonra kromat birikintilerini uzaklaştırmak için iyodla muamele gerekir. Moleküler analizler ve İHK için uygun değildir. Civalı fiksativlerle birlikte metal enstrümanlar kullanılmamalıdır.

Fiksativler üzerine bir karşılaştırma: Ülkemizdeki durum

Fiksativler; doku ve hücrel 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” fiksativ yoktur. Amaca en uygun fiksativ veya fiksativler (postfiksasyon) veya fiksativ kombinasyonları (karışım fiksativler) kullanılarak sonuca ulaşılmaya çalışılır.

Cerrahi patolojide en yaygın olarak kullanılan fiksativ %10'luk formalin çözeltisidir. Ucuzdur, kullanımı pratiktir ve çevre için önemli bir toksik atık sorunu oluşturmaz. Piyasada çok çeşitli ve kalitesiz çözeltiler bulunmaktadır. Mutlaka sertifikalı çözeltiler kullanılmalıdır. Formaldehid çözeltileri stabil çözeltiler değildir. Beklemekle metilen glikol polimerleri oluşur, formik asit oranı artar ve pH düşer. Asidik formalin çözeltilerinde oluşan insolubl *formene* pigmenti dokulara çöker. Formene pigmentinin oluşumunu engellemek için stok çözeltilerinin, alkali çözeltiler katılarak stabilize edilmesinde yarar vardır (kalsiyum karbonat). Tüm bu sorunların giderilmesi için paraformaldehitten 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 tercihen 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. Kısaca, 3–4 mm kalınlığında bir doku diliminin tamamının gerçek bir aldehid fiksasyonu ile fikse olması için geçecek zaman, yaklaşık 16 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” minumuma indirilmesi için önerilir. Süre kısaltıkça aldehid fiksasyonundan ziyade dehidratasyon aşamasında kullanılan alkollerin etkisi belirginleşecek ve doku alkol tipi bir fiksasyon morfolojisi sergileyecektir. Ülkemizdeki takiplerde, alkolün baskın olduğu şizofrenik tespit paternini görmek mümkündür.

Aldehid fiksatifler proteinlerin amino grupları ile metilen köprüleri veya karbon bağları oluşturur, nazik bir kimyasal fiksasyon sağlar. Bu özellik elektron mikroskopik 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 veziküler kromatinli nüvelerin kromatini parçalanıp dağılabilir, öbekler halinde toplanabilir, arada berrak bölgeler kalır. Buna “nuclear bubling” artefaktı denir. Diğer taraftan sitoplazma elemanları sağlam-rijit bir şekilde tespit olmadığı için daha sonra uygulanan alkol dehidratasyonunda büzülür, sitoplazma olduğundan küçük görülür, birbirine komşu hücreler birbirinden uzaklaşır. Benzer büzülme nukleuslarda 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 tespit olmuş dokuda bazı antijenlerin saptanabilmesi için aldehid gruplarının proteinlere bağlandığı yerden koparılıp uzaklaştırılması yani proteinlerin yeniden açığa çıkarılması gereklidir. Bu işleme “antijen retrieval” (antijen açığa çıkarma) adı verilmektedir.

Aldehid fiksasyonunun antijenite üzerine olan 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 (glasial asetik asit, pikrik asit içeren Bouin çözeltisi gibi). Diğer bazıları ise metalik katyonlar içerir. Proteinlerin aa zincirlerinin meydana getirdiği organik gruplar ile büyük, insoluble koordinasyon kompleksleri oluştururlar (civa klorür içeren B5 ve Zenker). Bu özelliklerden de yararlanmak için formalin ile protein presipitan çözeltileri bir arada içeren karma fiksatifler de kullanılmaktadır (B5, Bouin, Hollande). Protein presipitan ajanlar; HE kesitlerinde daha keskin bir nükleer ayrıntı sağlar, immunreaktiviteyi artırır.

Diğer bir fiksatif grubu ise alkol içeren fiksatiflerdir. Alkol, protein presipitan ve dehidratan özelliklere sahiptir. Bu nedenle antijen korunması 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 artefaklarına neden olur. Bu özellik küçük dokularda çok belirgindir ve “kuruma artefaktı” oluşturacak düzeye ulaşır. Bu nedenle alkol, tek başına konvansiyonel H&E histolojisi için kullanıma uygun değildir. Bunun yerine alkolün de yer aldığı karma fiksatifler tercih edilir (AFA çözeltisi: metanol, formalin, glacial asetik asit).

Evrensel bir fiksatif olması nedeniyle nötral tamponlu %10 formalin, tercih edilebilecek bir fiksatifdir. Ancak, özellikle yanlış uygulamaların da katkısı ile (yetersiz fiksasyon süresi, standart dışı çözelti kullanımı, agresif dehidratasyon uygulamaları) morfolojik incelemelerde standart kalite düzeyine her zaman tam olarak ulaşmak mümkün olmamaktadır. Özellikle morfolojik ayrıntı konusunda üstünlükleri olmasına karşın, çevre için toksik atık olmaları, maliyetinin yüksek olması ve de nükleik asit korunmasının kötü olması gibi nedenlerle B5 ve benzeri civa içeren fiksatiflerin rutin olarak kullanımı tercih edilmemektedir. 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 biyopsiler, küçük insizyonlar, endoskopik biyopsiler, deri punch biyopsileri) Hollande fiksativi ile mükemmel morfolojik ayrıntı elde edilmektedir. Ancak tüm bu ağır metalli koagülatif fiksatifler nükleik asit zincirlerinde kırılmalara yol açmaktadır.

Patolog Karl Weigert 1893’de formalin ile fiksasyondan sonra elde edilen kesitlerin kalitesinin daha iyi olduğunu fark etmiş ve o zamandan bugüne dek, formalin patoloji laboratuvarlarımızda standart fiksatif olarak kullanılagelmiştir. Formalin mükemmel fiksatif değildir, bu nedenle bu süreçte yeni fiksatif arayışı hep sürmüştür ve yukarıda da belirttiğim gibi birbirlerine farklı açılardan üstün fakat yine mükemmel olmayan çeşitli fiksatifler üretilmiştir. Ancak hiçbiri formalinin yerini alamamıştır. Bugün dünya genelinde patoloji bölümlerinde depolanan dokular formalin ile fikse, parafine gömülü (FFPG) dokulardır. Histoloji teknikleri ve antikor imalatçılarının hemen tümü, ürünlerini FFPG dokulara göre optimize etmişlerdir. Toksik ve karsinojenik etkileri yanı sıra formalinin bir diğer dezavantajı, bir fiksatif olarak moleküler testler açısından sınırlı etkinliğidir.

Yukarıda belirtilen avantajlar ve dezavantajlar gözetilerek, uzunca bir süredir patoloji laboratuvarlarımızda, histopatolojik doku takip işlemlerinde ağırlıklı ve yaygın bir şekilde formaldehit çözeltileri kullanılmaktadır. Ancak günümüzde, teknolojik gelişmelere bağlı olarak bu konuda yeni arayışlar ve değişiklikler gündemdedir:

- İHK'sal yöntemlerin kullanımının artması ve yaygınlaşması ile birlikte antijen korunmasının gündeme gelmesi.
- Moleküler biyoloji yöntemlerinin kullanıma girmesi ile birlikte nükleik asit korunmasının gündeme gelmesi.
- Toksik ve karsinojen etkilere bağlı sağlık sorunlarının gündeme gelmesi.
- İnfeksiyöz ajanların yarattığı sorunlar.
- Kimyasal olmayan bir yöntem olarak mikrodalga ışınlamanın gündeme girmesi.

Tüm bu sorunlar doku fiksasyonu için formalin alternatiflerinin arayışını doğurmuş ve birçok bilim adamı ve şirket, çok sayıda yeni, formaldehit içermeyen, daha az toksik fiksatif geliştirmiştir (9). Türkiye'de ticari olarak satışa sunulan formaline alternatif fiksatifler Glyofixx® (Shandon), Cell block® (Biooptica), Greenfix® (NIC), Finefix® (Milestone)'dir. Ancak, Finefix® dışında bu solüsyonların, patolojide kullanılan ileri inceleme yöntemleri açısından uygunluğu henüz araştırılmamıştır.

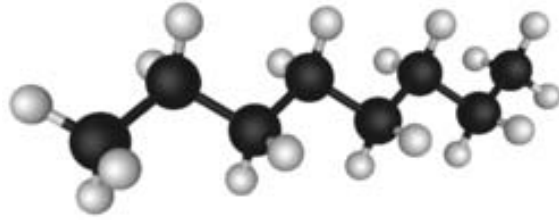
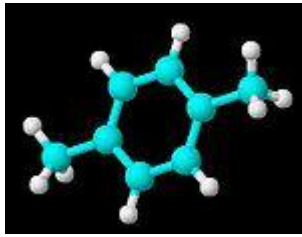
Şeffaflandırma

Fiksasyon süreci tamamlanan dokular, mikroskopik incelemeye hazır hale getirilmesi amacı ile, doku takibi olarak bilinen, gömme ile sona eren, dokunun çeşitli solüsyonlarda bekletilmesini kapsayan işlemler dizisine tabi tutulur. Bu işlemler dizisinde doku öncelikle dehidratasyon amaçlı artan alkol serilerinde tutulur ve doku içindeki su alkol ile yer değiştirir. Bir sonraki aşama, doku içindeki alkolün, organik solventler (şeffaflandırıcı ajan) ile yer değiştirme süreci olan şeffaflandırmadır. Daha sonraki ve son aşama ise dokuyu sertleştiren, bu kez şeffaflandırıcı ajan ile parafinin yer değiştirdiği impregnasyon aşamasıdır. Alkol gibi dehidratasyon için kullanılan maddeler, impregnasyon için kullanılan parafin gibi maddelerle uyuşmazlar. Şeffaflandırıcı ajanlar ise her ikisiyle de geçimlidirler. Bu nedenle alkol ve parafin arasında geçiş maddesi olarak kullanılırlar. Eğer fiksatif ile gömme materyali birbiri

ile uyumlu olsaydı, o takdirde şeffaflandırıcı ajan kullanımına yani şeffaflandırma aşamasına gerek kalmazdı.

“Şeffaflandırıcı ajan” teriminin nedeni bu maddelerin dokuyu transparan (saydam) hale getirmesidir. Ülkemizde kolayca bulunan ve başlıca kullanılan şeffaflandırıcı ajan ksilen’dir (Xylene). Ancak azalmış toksisiteleri nedeni ile ksilen alternatifi solüsyonlar da popülerite kazanmaktadır. Azalmış toksisite, bu solüsyonların ksilenden farklı moleküler yapılarının sonucudur.

Ksilen, aromatik hidrokarbonlar olarak bilinen organik moleküller kategorisindedir. Bu kategorideki moleküller, halka yapısı oluşturan karbon ve hidrojen atomları içerirler (Şekil 2). Ksilenin kimyasal formülü C_8H_{10} ’dur. İki metil grubunun ($-CH_3$) bağlandığı altı karbon halkası içerir. Başka deyişle, bi-metile bir benzen türevidir. Ksilen alternatifleri ise alifatik hidrokarbonlar kategorisindedir. Kimyasal yapılarında, halka yerine zincir oluştururlar. Moleküler yapılarındaki bu farklılık, ksilen türevlerini ksilenden daha az toksik kılmaktadır.



Şekil 2: Hidrokarbonların aromatik ve alifatik iki farklı yapısı.

Moleküler yapı, kısmen maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirler. Aromatik hidrokarbonlar, alifatik hidrokarbonlardan çok daha zararlıdır. Ksilen alternatiflerinin popülerite kazanmasının en büyük nedeni de budur. Ancak toksisitedeki değişikliğe, performansta da değişiklik eşlik etmektedir. Alifatik yapılarından dolayı bu substratlar, aromatik karşılıklarının yaptığı aynı etkiyi gerçekleştirmek için daha uzun süreye ihtiyaç duyarlar. Çünkü alifatik yapı, penetrasyon oranını düşürür. Ayrıca ksilene göre, solüsyonun daha sık aralıklarla değişmesi gerekecektir, çünkü alifatik hidrokarbonlar kontaminasyona, aromatik hidrokarbonlardan daha az toleranslıdır. Yine doku takibinde kullanılan parafinin de daha sık aralıklarla değiştirilmesi gerekecektir. Rutinde, parafinin ne zaman değişmesi gerektiğini gösteren en kolay yöntem, parmağımızı içine daldırdığımızda yağlı/yoğun kıvamlı bir hal aldığını fark etmektir. Ksilen alternatifleri kullanıldığında, alifatik yapıları nedeni ile, parafinin çok daha hızlı yağlı hal aldığı fark edilecektir (yağlar da alifatik hidrokarbon

komponentleri içerirler). Bu nedenlerle daha az zararlı olan bu ksilen alternatifleri kullanılırken, bazı protokol değişikliklerine ihtiyaç duyulacaktır.

Aromatik hidrokarbonlar nörotoksisite ile belirli benzer akut toksik etkilenebilir. Kronik maruziyette ise farklı patolojik durumlar izlenebilir. Benzen oldukça myelotoksiktir. Bu solventler, solunum yolu, sindirim yolu ya da deri yoluyla organizmaya penetre olabilir. Bunlardan solunum yolu en sık etkilenim yoludur. Sindirim yolu ile etkilenim genellikle kaza ile olur. Ksilen ile yapılan hayvan deneyleri ve insanlardaki araştırmalar sonucunda karsinogen olduğuna dair bir kanıt elde edilememiştir.

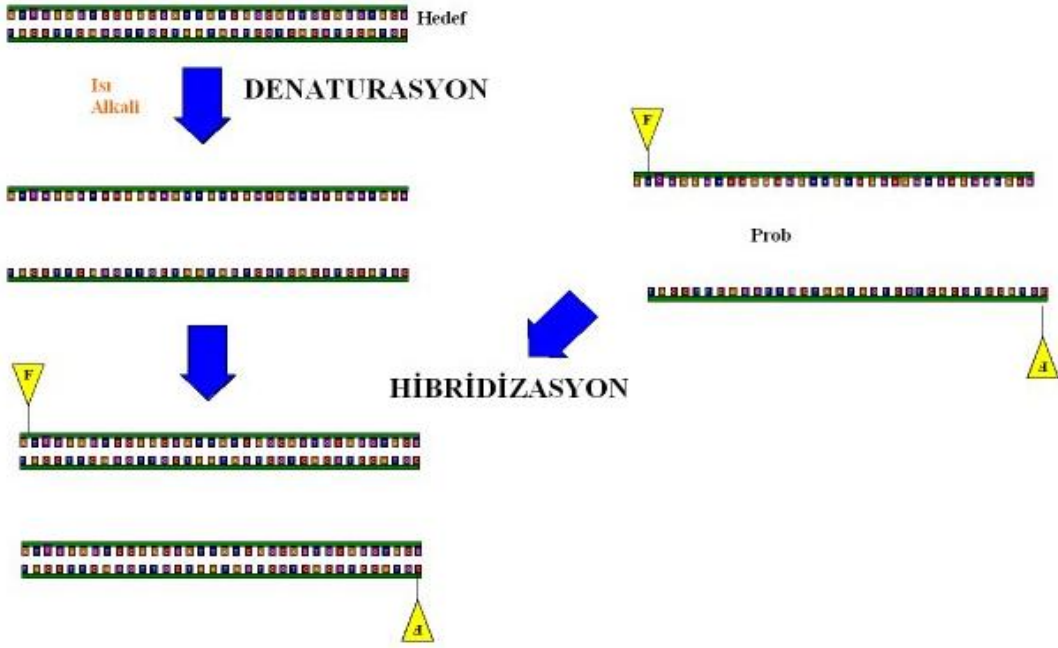
Günümüzde ksilen yerine geçebilecek daha az toksik şeffaflandırıcılar üretilmiştir (10). Türkiye’de ticari olarak satılan ksilene alternatif şeffaflandırıcılar Xylene Substitute® (Shandon), Bio Clear® (Bio-Optica), Sub-X® (Surgipath), Ottix® (Diapath)’dir. Ancak bu solüsyonların patolojide kullanılan ileri inceleme yöntemleri ile uygunluğu henüz araştırılmamıştır.

Hibridizasyon

‘Hibridizasyon’un kelime anlamı, ‘birbirini tamamlayan moleküllerin birleşmesi’dir. Birbirlerini tamamlayan nükleik asitler DNA ya da RNA olabilir. Moleküller arasındaki bağlanma esas olarak hidrojen bağıyla sağlanır. Bu bağlar adenin ile timin arasında iki, guanin ile sitozin arasında üç hidrojen bağı şeklinde oluşur. Hibridizasyon, moleküler biyolojide, özđün nükleik asit dizilerini tanımlamak için kullanılan güçlü bir yöntemdir. İki tamamlayıcı nükleik asit dizisinin (iplikçiğin), uygun ortamda çiftli DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA yapılar oluşturması olarak tanımlanabilir. Tek zincirli nükleik asitlerin çift zincirli yapılar yapmaya eğilimi, bu yöntemin temelini oluşturmaktadır.

Bu yöntemin ilk aşaması, DNA’nın çift heliks yapısının ısı ve/veya yüksek pH(>13) ile karşılaştığında bozulması ve tekli diziler haline almasıdır ki “denatürasyon” olarak adlandırılır (şekil 3). Ancak tekli diziler uygun tamamlayıcı dizilerle tekrar ikili yapılar haline alırlar (Hibridizasyon-DNA renaturation, reassociate, reanneal). Tekli dizilerden en az birine, işaretleyici bir moleköl (radyoizotop, floressein vb) bağlandığı takdirde, özđün ikili yapılar laboratuvarında çeşitli yöntemlerle saptanabilmekte ve böylelikle hibridizasyon ya da bağlanmanın gerçekleştiği anlaşılabilmektedir (11). Burada tamamlayıcı sekansları bulmak için kullanılan işaretili dizilere ‘prob’ adı verilir. Probun özđün olduğu nükleik asit dizisi ise

hedef (target) olarak adlandırılır. İşaret, floresan boya maddesi olabileceği gibi, IM ile görülebilecek nonfloresan bir boya maddesi de olabilir. İşaretleyicinin tipine göre hibridizasyon işleminin adı değişecektir. Hibridizasyon işlemimizin adı; probumuzda işaret olarak floresan boya maddesi mevcut ise FISH, IM ile görülebilecek nonfloresan bir boya maddesi mevcut ise CISH olacaktır (11).



Şekil 3: Hibridizasyon işleminin temel reaksiyonları

HER2/neu (c-erbB2 veya HER 2)

İnsan kanser modelinde c-erbB2 reseptör overekspresyonu ve gen amplifikasyonu, onkojenik transformasyon ve tümörögenezisde rol oynar. c-erbB2 geni, 17. kromozomun uzun kolunda lokalize bir protoonkogendir. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesi veya HER ailesinin [HER-1 (c-erbB-1,EGFR), HER-2 (c-erbB-2), HER-3 (c-erbB-3), HER-4 (c-erbB-4)] dört üyesinden biri olan HER2/neu, 185 kDa ağırlığında, tirozin kinaz aktivitesi olan bir transmembran glikoproteini kodlar. c-erbB2 için tanımlanmış ligand proteini yoktur. Reseptör aktivasyonu için ligand, reseptör, dimer oluşumu gibi üç değişkene ihtiyaç vardır (12). Ligand reseptöre bağlandıktan sonra, bu reseptör HER-1, HER-2, HER-3 ve HER-4 reseptörlerinden biri ile bağlanarak dimer oluşturur. Dimer oluşumu iki aynı reseptör (homodimer) ile veya iki farklı reseptör (heterodimer) ile olabilir. Daha sonra intrasellüler bölgede yer alan tirozin kinaz fosforile olur ve sinyal iletim yolları ligand ve

dimer tipine bağılı olarak aktive olur. Nükleusta bazı genler aktive olarak hücre bölünmesi gerçekleşir. HER2'nin belli bir ligandı olmamasına karşın, HER2 heterodimerleri uzun süreli ve potent etkiye sahip olduklarından HER2 ailenin diğeri tarafından dimerleşme için tercih edilir (13). Bu durum HER2'nin tümörogenizdeki önemini açıklamaktadır; çünkü ortamda HER2 ne kadar fazla ise oluşan heterodimer sayısı, iletilen sinyalin süresi ve gücü o oranda artmaktadır.

HER2/neu Tespit Yöntemleri

Normal hücrelerde HER2'nin iki gen kopyası bulunmaktadır. Kanserli hücrelerde gen kopya sayısı bu rakamın çok üzerindedir. HER2 tespitinde en sık kullanılan iki yöntem; İHK ve İSH'dir (Tablo 2).

Tablo 2: HER2 tespitinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması

	CISH	FISH	İHK
Sinyal stabilitesi	Arşivlenebilir	Zamanla solar	Arşivlenebilir
Mikroskop	Işık alanı	Floresans	Işık alanı
Büyütme	x40	x60-100	x20-40
Protokol uzunluğu	Overnight + 3h, 55 dk	Overnight + 3h, 12 dk	3h, 2 dk
Morfoloji	İyi	Kısıtlı	İyi
Eğitim gerekliliği	Orta	Yüksek	Düşük
İnternal kontrol	Evet	Evet	Hayır
Yorum	Objektif/kantitatif	Objektif/kantitatif	Subjektif/kalitatif
Masraf	Orta	Yüksek	Düşük

CISH'in avantajları:

- Pratik ve maliyet açısından üstün olması,
- İHK ile benzer bir tekniğin kullanımı,
- Değerlendirmenin, laboratuvarlarda mevcut IM ile yapıyor olması,
- Gen durumunun doku morfolojisi ile birlikte değerlendirilebilmesi,
- Arşivlenebilir ve kantitatif sonuçların elde edilmesi.

GEREC VE YÖNTEM

Kullanılan Solüsyonlar

Fiksasyon aşamasında, standart fiksatif formalin yanı sıra, Türkiye’de ticari olarak satışı sunulan, formalin alternatifi dört ayrı fiksatif (Tablo 3); şeffaflandırma aşamasında ise, standart olarak kullanılan ksilen yanı sıra, Türkiye’de ticari olarak satışı sunulan, ksilen alternatifi üç ayrı şeffaflandırıcı kullanıldı (Tablo 4).

Tablo 3: Çalışmada kullanılan fiksatifler

Fiksatif	Firma	Başlıca Etken Madde
<i>Formalin</i> [®]		Formaldehit
<i>Glyo-Fixx</i> [®]	Shandon	Glyoxal
<i>FineFIX</i> [®]	Milestone, Bergoma, Italy	Etanol ile dilüe patentli formül
<i>Cell block</i> [®]	Biooptica	Glyoxal
<i>Greenfix</i> [®]	DiaPath	Ethandial

Tablo 4: Çalışmada kullanılan şeffaflandırıcılar

Şeffaflandırıcı	Firma	Yapısı
<i>Ksilol</i>	Riedel-de Haen	Aromatik hidrokarbon
<i>Xylene Substitute</i> [®]	Shandon	Alifatik hidrokarbon
<i>Bio Clear</i> [®]	Bio-Optica	Terpen
<i>Sub-X</i> [®]	Surgipath	Alifatik hidrokarbon

Çalışmada, yukarıda belirtilen beş farklı fiksatif ve dört farklı şeffaflandırıcı kullanılarak, 13 farklı doku takibinin uygulanması planlandı (Tablo 5).

Tablo 5: Uygulanan 13 farklı doku takip protokolü

DTno	Fiksatif	Dehidratasyon	Şeffaflandırma	Gömme
1	F	*Aseton ve alkol bazlı (propanol ve dimetil sülfoksit içerikli) bir solüsyon karışımı + mikrodalga		*Parafin ve mineral yağı karışımı
2	F	E	K	P
3	F	E	Ksilen Substitute®	P
4	F	E	Bio Clear®	P
5	F	E	Sub-X®	P
6	Glyofix®	E	K	P
7	Finefix®	E	K	P
8	Cell block®	E	K	P
9	Greenfix®	E	K	P
10	Glyofix®	E	Ksilen Substitute®	P
11	Finefix®	E	Ksilen Substitute®	P
12	Cell block®	E	Bio clear®	P
13	Greenfix®	E	Sub X®	P

DTno: Doku takip numarası, F: Formalin, E: Etanol serilerinden oluşan, patoloji laboratuvarlarının genelinde kullanılan alkol takibi, K: Ksilol, P: Parafin.

* Tissue-Tek Xpress x120 (Sakura Finetech USA, Inc.; Torrance, CA) ile uygulanan mikrodalga doku takibi.

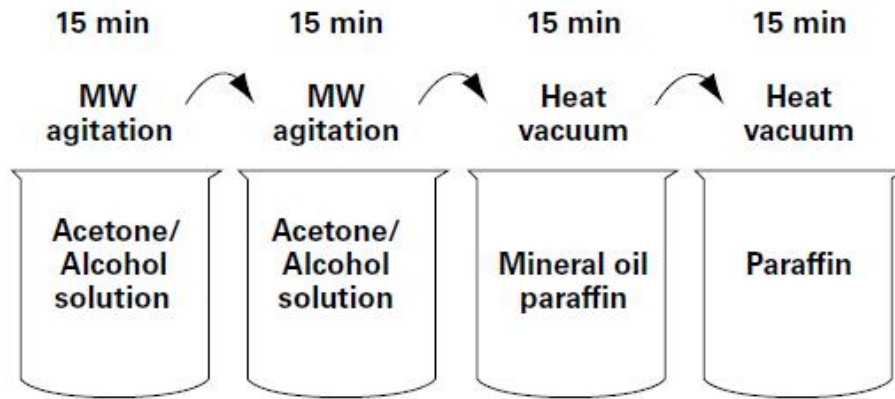
Doku Örneği Toplama ve Fiksasyon

Doku örnekleri aynı gün toplandı. Patolojik incelemeyi olumsuz etkilememek için, özellikle radikal rezeksiyon materyalleri seçildi. Doku toplama işleminin yapıldığı güne ait ameliyat listesine bağlı olarak, on farklı non-tümöral doku (serviks, uterin korpus, over, rektum, yağ doku, safra kesesi, deri, mide, akciğer, karaciğer) ve üç farklı tümör dokusu (sigmoid kolon tümör dokusu, akciğer tümör dokusu ve meme tümör dokusu) çalışıldı. Operasyon sırasında kan damarı desteği kesilen dokuların, ameliyathaneden patoloji

laboratuvarına en kısa sürede (5-15 dakika) ulaşması sağlandı. Dokular, makroskopi salonuna ulaşır ulaşmaz makroskopik incelemesi yapılarak, önceden planlanan 13 farklı doku takibi (Tablo 5) için, her dokudan hızlıca, ortalama 5-10 mm çaplı, 1.5-2 mm kalınlıkta 13'er örnek alındı ve kodlanarak kasetlendi. Kasetler uygun fiksatiflere konularak, oda sıcaklığında fiksasyon aşamasına geçildi. Uygulanan fiksasyon süresi, dokuların makroskopi salonuna aynı gün içerisinde, ancak farklı saatlerde ulaşmış olması nedeni ile 15-24 saat arasında değişti.

Doku Takibi

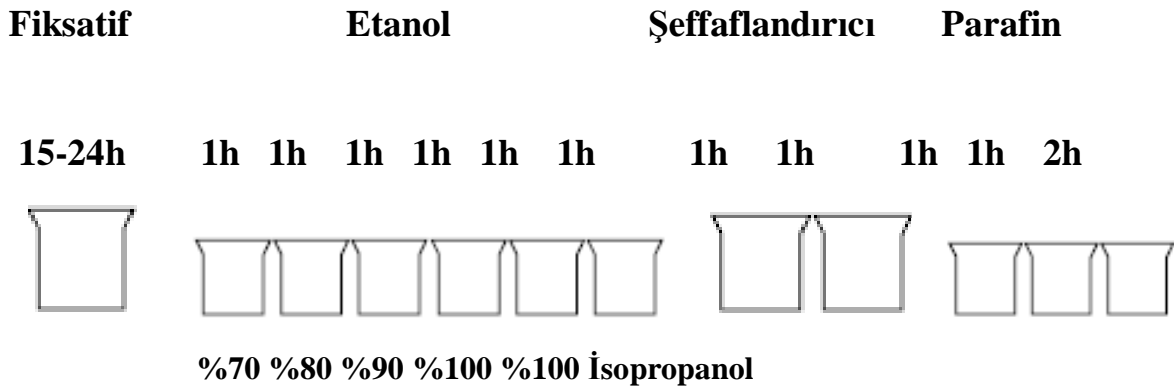
1 no'lu doku takibi, "Tissue-Tek X-Press x120 (Sakura Finetek USA, Torrance, CA)" tam otomatik, mikrodalga destekli hızlı doku takip cihazında gerçekleştirildi. Cihaz dört istasyon içermektedir. İlk iki istasyon mikrodalga, diğer ikisi ise vakum üniteleridir. Kasetler her istasyonda 15 dk kalır ve bir diğerine robotik kol yardımı ile aktarılır. Sonuç olarak takip bir saatte tamamlanır. İlk iki istasyon dehidratasyon ve şeffaflandırmayı, son iki aşama ise gömme işlemini gerçekleştirir. İlk iki istasyonda örnekler aseton ve alkol bazlı (propanol ve dimetil sülfoksit içerikli) bir solüsyon karışımı içine daldırılır, mikrodalga uygulamasına maruz bırakılır ve 62°C'de çalkalanır. Üçüncü istasyonda, doku örnekleri parafin ve mineral yağı karışımı içinde 65°C'ye ısıtılır ve vakuma maruz bırakılır. Son olarak, dördüncü istasyonda, 65°C parafin havuzu içindeki örnekler vakum uygulanır (Şekil 4).



Şekil 4: 1 no'lu hızlı doku takip metodu.

2-13 no'lu doku takiplerinin alkol takibi aşaması ortak olup, tam otomatik kapalı doku takip cihazında (Leica) gerçekleştirildi (Şekil 5). Uygulanan alkol takip protokolü, her biri bir saat süren toplam altı istasyon içermektedir. İstasyonlar şu şekildedir: %70 etanol içeren bir

istasyon, %80 etanol içeren bir istasyon, %90 etanol içeren bir istasyon, absöü etanol içeren iki istasyon ve isopropanol içeren bir istasyon. Ardından şeffaflandırma ve gömme aşamalarına elde takip ile devam edildi. Bu doku takipleri için şeffaflandırma aşamasında biri ksilen, diğeri ksilen alternatifi olmak üzere dört farklı şeffaflandırıcı kullanıldı (Ksilol, Xylene Substitute[®], Bio Clear[®], Sub-X[®]). Doku örnekleri şeffaflandırma aşamasında, iki ayrı kutuda birer saat olmak üzere, her bir solüsyonda toplam iki saat bekletildi (kutu-1’de bir saat, kutu-2’de bir saat olacak şekilde). Ardından parafin içeren sıralı üç ayrı kutuda toplam 4 saat gömme aşaması uygulandı (kutu-1’de 1 saat, kutu-2’de 1 saat, kutu-3’de 2 saat).



Şekil 5: 2-13 no’lu takip protokolleri. Bu doku takiplerinin fiksasyon ve şeffaflandırma aşamalarında farklı solüsyonlar kullanılmıştır. Dehidratasyon ve gömme aşamaları ise ortaktır.

169 adet bloğun (13 farklı doku X her bir dokudan 13’er örnek = 169 kaset) her birinden 4 mikronluk kesitler alınarak H&E ile boyandı. Kesitler doku bütünlüğü açısından değerlendirildi ve gerekli bulunanlardan (örneğin kesitte epidermisi çıkmamış deri dokusu blokları) yeni kesitler alındı. Ardından kesitler, kesitin bütün olarak histolojik kalitesi, hematoksilin ve eozin boyalarının kesitteki kontrastı ile sitoplazma, kromatin ve nükleer membranı içeren parametreler ile H&E düzeyinde morfolojik olarak değerlendirildi.

Elde ettiğimiz dokulara uygulanacak HK’sal ve İHK’sal boyalar, örneklenen dokuların niteliğine bakılarak belirlendi. HK’sal boyama için periodic acid Schiff (PAS), Retikulin, Masson, Verhoeff’s Van Gieson (VVG), ve Alcian blue (AB) seçildi. İHK’sal boyama için ise hem nükleer hem sitoplazmik boyanma sağlayan, rutinde sorun çıkartan ve daha fazla kullanılan antikorların seçilmesine özen gösterildi (Tablo 6). Ardından meme tümör dokusundan (M); karaciğer dokusundan (Kc); rektum mukozası&kolon tümör dokularından

(R-Ktm); deri&mide dokularından (D-M) ve akciğer&uterus dokularından (A-U) olmak üzere beş ayrı doku dizini (TMA) oluşturuldu (Şekil 6). Bunun için H-E boyalı kesitlerden ilgili alanlar işaretlenerek, doku bloklarından 3 mm çaplı doku korları alındı (Tissue-Tek® Quick-Ray™ 8018). Takiben HK'sal ve İHK'sal boyamalar için bu TMA'lardan 4 mikron kalınlıkta kesitler alındı.

Tablo 6: Uygulanan HK'sal ve İHK'sal boyalar

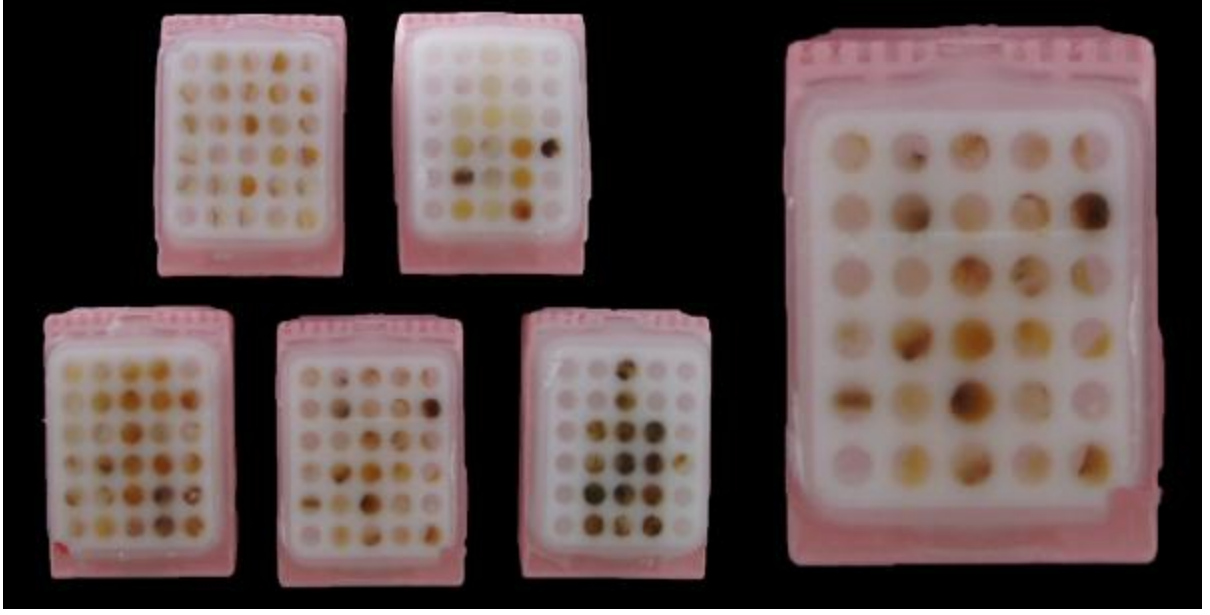
TMA		HK	İHK	
Kod	Doku/dokular		Nükleer	Sitoplazmik
M	Meme tümör	-	ER, PR	HMWK, cerbB2
Kc	Karaciğer	Retikülin, Masson		P-CEA, HepatositA, CD3, CD20, LCA
R-Ktm	Rektum ve kolon tm	AB	P53, ki67	CK20, Kappa, lambda, S100, CD38
D-M	Deri ve mide	PAS, VVG	P63	Melan-A, CGA, CK, HMB45,CD117
A-U	Akciğer tm ve uterus	-	TTF-1	CD10, Caldesmon, CK7, Vimentin, Desmin, CD34, Aktin

ER: Östrojen reseptörü, PR: Progesteron reseptörü, TTF-1: Tiroid transkripsiyon faktör-1, HMWK: Yüksek molekül ağırlıklı keratin, P-CEA: poliklonal anti-karsino embriyonik antijen, CGA: Kromogranin A, CK: Sitokeratin.

Histokimya-İmmünohistokimya

Histokimya

HK'sal boyama için, TMA bloklarından 4 mikron kalınlıkta kesitler alındı. Sirotik karaciğer dokusuna ait TMA bloğuna ait kesite uygulanan gümüş boyama ile retikülin fibrillerindeki, Masson ile fibrotik dokudaki boyanma; rektum mukozası ve kolon tümör dokularından oluşturduğumuz TMA bloğuna ait kesite uygulanan AB ile kolon mukoza epitel hücresi ve tümör hücrelerindeki asidik müsin boyanması; deri ve mide mukozası dokularından oluşturduğumuz TMA bloğuna ait kesitlere uygulanan VVG ile dermisteki elastik fibriller boyanma, PAS ile mide mukoza epitelindeki mukus hücrelerinin salgı materyalindeki eozinofilik boyanma değerlendirilmiştir (Tablo 6).



Şekil 6: HK'sal ve İHK'sal boyamalar için oluşturulan TMA'lar.

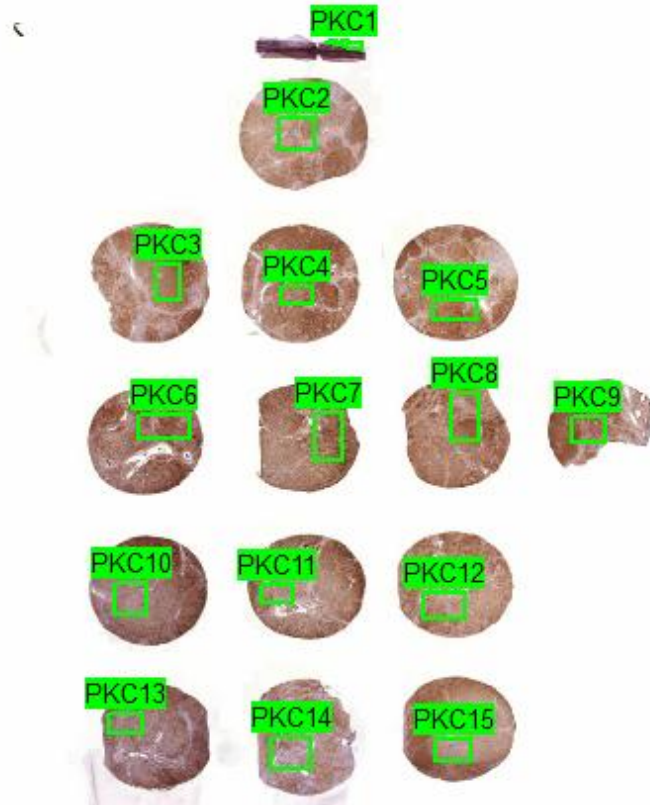
İmmünohistokimya

TMA kesitlerine, standart avidin-biotin complex (ABC) metodu ile, altısı nükleer (ER, PR, p53, p63, TTF-1, ki-67), 24'ü sitoplazmik olmak üzere (cerbB2, HMWK, pan-sitokeratin (pan CK), CK7, CK20, aktin, desmin, caldesmon, vimentin, CD10, CD117, pCEA, Hepatosit-A, Melan-A, HMB45, S100, CD34, kappa, lambda, CD38, LCA, CD3, CD20, kromogranin-A) olmak üzere, toplam 30 çeşit primer antikor kullanılarak immünboyama uygulandı (Tablo 6). İHK boyama protokolü şu aşamaları içermektedir:

1. TMA'lardan ince lizimli lamlara, 3 mikron kalınlıkta kesitler alındı.
2. Kesitler etüvde yaklaşık 55⁰C'de bir gece bekletilerek parafin eritildi.
3. Ertesi gün kesitler ksilen ile deparafinize edildi.
4. Kesitler azalan alkol serilerinde rehidrate edildi.
5. Kesitler endojenöz peroksidaz aktivitesini bloke etmek amaçlı 15 dk süre ile "%0.3 H₂O₂" solüsyonunda bekletildi.
6. Tris/EDTA buffer'da (10mM/1mM; pH 9.0), 95⁰C'de (PT modülde) 20 dk antijen açığa çıkarma uygulandı (ısı ile açığa çıkarma).
7. Nonspesifik bağlanma reaksiyonunu (endojenöz biotini bloke etmek) önlemek amaçlı "ultra V block" (kullanıma hazır solüsyon) kullanıldı.
8. Primer Ab damlatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi ve Tris buffer ile yıkandı.

9. Biotin (*Secondary Antibody biotinilate*) damlatılarak 20 dk oda ısısında inkübe edildi ve Tris buffer ile yıkandı.
10. Streptavidin (*Tertiary Antibody Streptoavidinabiotin*) damlatılarak 20 dk oda ısısında inkübe edildi ve Tris buffer ile yıkandı.
11. 1 ml substrata 1 damla kromojen eklenerek hazırlanan DAB solüsyonu kesitlere damlatılarak 5-7 dk oda ısısında beklendi. Ardından kesitler çeşme suyunda yıkandı.
12. Hematoksilen ile kontrast boyama uygulandı.
13. Kesitler yükselen alkol serilerinde, her birinde 2'şer dk bekletildikten sonra ksilolde 5-10 dk bekletildi ve entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Boyanan kesitler sanal mikroskopta (Mirax Panoramic Midi) taratılıp, bilgisayar ortamında representatif alanlar işaretlendi (Şekil 7). Ardından bu işaretli alanlar İHK yazılım programı ile (3D Histech NuclearQuant[®], MembraneQuant[®]) bilgisayar ortamında değerlendirildi.



Şekil 7: TMA kesitine ait, bilgisayar ortamına aktarılmış görüntü. İHK yazılım programı tarafından değerlendirilmesi istenen representatif alanların işaretlenmiş olduğu izleniyor.

CISH

Çalışmamızda CISH uygulaması için “İnvitrogen, SPOT-Light HER2 CISH Kit”i kullanıldı. Uygulama iki günde tamamlandı. Şu aşamalar takip edildi:

- Uygulama aşamasına geçmeden önce, kullanılacak solüsyonlar (Ksilen, %100 EtOH, EtOH serileri (%70, %85, %95, %100), PBS/Tween 20 buffer, %3 H₂O₂), prospektüse uygun şekilde hazırlandı.

- Çalışmamız dahilindeki meme tümörü, kolon tümörü ve akciğer tümörü dokularına ait TMA blokları, bir adet pozitif kontrol bloğu (kendi arşivimize ve 2011 yılına ait, İHK’sal olarak cerbB2 ++, FISH pozitif olduğu bilinen meme tümör dokusu) ve 1 adet negatif kontrol bloğunun (primer antikör uygulamadığımız, kendi arşivimize ve 2011 yılına ait, İHK’sal olarak cerbB2 ++, FISH pozitif olduğu bilinen bir meme tümör dokusu) her birinden (toplam 5 ayrı blok), “Superfrost Plus microscope slide”larına, 4-5 mikron kalınlıkta kesitler alındı. Prospektüste, 2-3 mikron kalınlıkta kesitlerin, yanlış şekilde düşük gen kopyası sonucu verebileceği, bu nedenle 4-5 mikron kalınlıktaki kesitlerin daha uygun olacağı belirtilmektedir.

- Kesitler, etüvde, 60⁰C’de, 4 saat inkübe edildi.

- Uygulamanın ilk günü önceden hazırlanan ksilol ve absölü alkol ile kesitler deparafinize edildi. Deparafinizasyon sonrasında, Tris EDTA tampon içeren solüsyon içerisinde lamalar 15 dakika 98-100 ⁰C’de kaynatılarak ısı ile açığa çıkarma ön işlemi uygulandı. Bu işlemin ardından, pepsin içerikli bir solüsyon ile enzim sindirimi uygulandı. Örnekler daha sonra alkol serilerinde dehidrate edilip, havada kurutuldu ve HER2 probu eklendi. Prob uygulaması ve uygun ebatta lamel ile örneğin kapatılmasından sonra, 10 saatten uzun sürecek (bir gece) denatürasyon ve hibridizasyon aşamasına geçildi. Bu aşama için “hibridizer” cihazı (Dako, Code S2451) kullanıldı. Denatürasyon aşaması 95⁰C’de 5 dk, hibridizasyon aşaması ise 37⁰C’de ve 18 saat uygulandı.

- İkinci gün hibridize olmayan problemlerin uzaklaştırılması amacı ile örnekler yıkandı ve sinyali kromojenik olarak belirlemek amaçlı ardışık antikör uygulaması (“immünodetection”) yapıldı. Son olarak doku morfolojisini de belirlemek amaçlı örnekler Mayer’s hematoxilen ile boyanıp, lamel ile örtüldü. IM ile değerlendirme yapıldı.

Nükleik Asit Ekstraksiyonu

DNA Ekstraksiyonu ve Amplifikasyonu

Çalışmamızda DNA ekstraksiyonu için İnvitrogen'in genomik DNA pürifikasyon kiti (İnvitrogen PureLink Genomic DNA Kits, K1820) kullanıldı. DNA ekstraksiyonunun uygulanması için kolon tümör dokusu seçildi. Uygulamada kit prosedürlerine uyuldu. Lizat hazırlama, DNA bağlama, DNA yıkama ve DNA sıyırma olmak üzere 4 temel basamağı olan DNA ekstraksiyonunda (Şekil 8), kısaca aşağıdaki aşamalar takip edildi:

Lizat hazırlama: Aynı kolon tümör dokusuna ait, her biri için farklı doku takibi uygulanmış olan 13 adet parafin bloğunun her birinden, 10 mikron kalınlıkta, doku alanına göre 10-15 kesit alınarak, temiz 1.5 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi. Bu aşamada mikrotom ksilol ile dezenfekte edildi, steril eldiven ve kesitleri ependorflara yerleştirmek için steril kürdanlar kullanıldı. Kesitler ksilol ve absolü alkol kullanılarak, deparafinize ve rehidrate edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Daha sonra kalan çökelti üzerine "PureLink Genomic Digestion Buffer" ve "Proteinaz K" eklendi ve bu karışım 50⁰C'de bir gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün santrifüj sonrasında, lizat yeni bir temiz ependorf tübü içine aktarıldı. Ardından lizata RNAaz A, "PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer" ve absolü etanol tatbik edilip karıştırıldı. Bu şekilde homojen bir solüsyon elde edilip, "binding DNA" aşamasına geçildi.

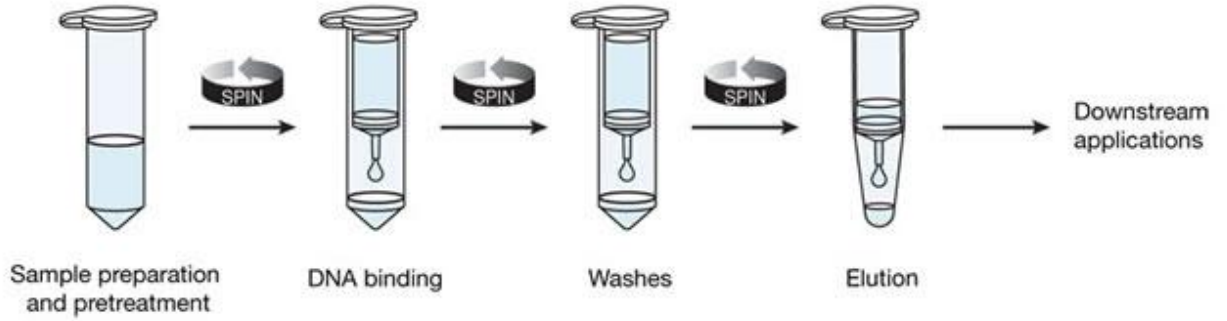
Binding DNA: Kit içinde olan toplayıcı tüp ("collection tube") içine "PureLink Spin Column" yerleştirildikten sonra, lizat "PureLink Spin Column" içine aktarıldı ve oda sıcaklığında, 1 dk, 10000g devirde santrifüj uygulandı. Santrifüj sonrası toplayıcı tüp atılarak, "PureLink Spin Column" yeni bir toplayıcı tüp içine yerleştirildi. DNA yıkama aşamasına geçildi.

DNA yıkama (Washing DNA): Kit içerisinde olan yıkama solüsyonları ile, prosedüre uygun şekilde DNA yıkandı.

DNA'nın elusyonu: "spin column" (DNA tutunmuş olan kolonlar) temiz bir eperndorf tüp içine yerleştirildikten sonra, kit içerisinde olan uygun "Elution" solüsyon ile ve prosedüre uygun şekilde, kolona tutunmuş olan DNA'lar ayrıldı. Bu aşama da tamamlandıktan sonra, en

başta parafinize doku kesitinden geriye, ependorf tübü içerisinde, arındırılmış/saf DNA elde edilmiş oldu. Elde edilen DNA, elektroforez aşamasına kadar -20°C 'de korundu.

Figure 1—Easy-to-follow PureLink™ spin column-based purification method.



Şekil 8: PureLink™ spin column-bazlı pürifikasyon metodu.

DNA konsantrasyonları Nanodrop ND-1000 UV spektrofotometre kullanılarak saptandı. İzole edilen örneklerdeki DNA bütünlüğü, her bir örnekten 500ng/ul DNA'nın jel elektroforezi ile belirlendi. Örneklerden elde edilen DNA'nın PCR reaksiyonlarında kullanılabilirliği, farklı büyüklükteki DNA fragmanları bütün örneklerde PCR ile amplifiye edilerek araştırıldı.

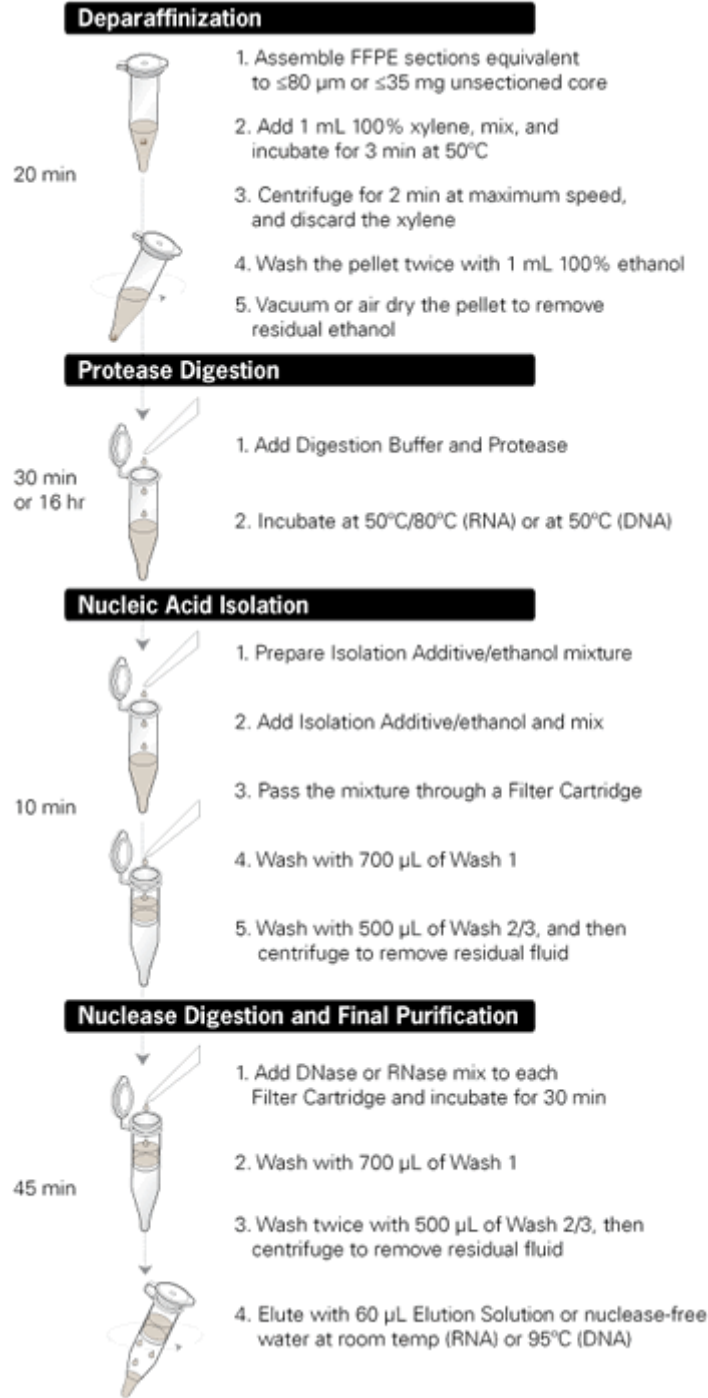
PCR

Oligo primer analiz yazılımı (National Bioscience, Inc) kullanılarak dizayn edilen üç çift primer PCR reaksiyonunda kullanılmıştır. PCR reaksiyonu 0,2µl hacimli steril ve tüm enzimlerden arındırılmış PCR tüpleri içerisinde total hacmi 15 µl olacak şekilde kurulmuştur. Reaksiyon final konsantrasyonu; 1 U DNA Taq polimeraz(Fermentas, EU), 25 ng genomik DNA, 1X DNA Taq polimeraz tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 0,6 pmol/µl ileri ve geri primerler, 0,2mM dNTP olacak şekilde optimize edilmiştir. Termal profil olarak; başlangıç denatürasyonu 95 °C'de 7 dakika, denatürasyon 95 °C'de 30 saniye, annealing belirlenen optimum sıcaklıkta 30 saniye, uzama aşaması 72 °C'de 30 saniye ve sonlanma uzaması 72

°C’de 7 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Kurulan her bir PCR grubunda negatif kontrol olarak kalıp yerine suyun konulduğu reaksiyon ile kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ardından PCR ürünleri 2%’lik agaroz jelde yürütülüp UV transilüminatör ile görüntülenmiştir.

RNA Ekstraksiyonu

Çalışmamızda fikse dokudan RNA ekstraksiyonu için, “RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation” ekstraksiyon kiti (Ambion Ltd, Cambridgeshire, UK) kullanıldı. RNA ekstraksiyonu, karaciğer dokusunda çalışıldı. Aynı karaciğer dokusuna ait, her biri için farklı doku takibi uygulanan 13 adet parafin bloğunun her birinden, 10 mikron kalınlıkta, 10 kesit alınarak, temiz 1.5 ml’lik ependorf tüplerine yerleştirildi. Bu aşamada mikrotom ksilen ile dezenfekte edildi; steril eldiven ve kesitleri ependorflara yerleştirmek için steril kürdanlar kullanıldı. Parafin kesitler 65⁰C’deki ksilen içinde bekletilerek, dokudan parafin uzaklaştırıldı. Ardından alkol solüsyonlarında yıkama ile ksilolun uzaklaştırılması sağlandı. Deparafinize örneklerdeki RNA ve DNA’ya kovalent şekilde bağlı proteinlerle diğer proteinlerin sindirimi için proteaz aşaması uygulandı. Genomik DNA’yı elimine etmek için DNAaz uygulandı. Son olarak ise kit protokolüne uygun şekilde RNA arındırıldı/pürifiye edildi (Şekil 9). RNA kalitesi kandan izole edilen RNA ile birlikte örneklerin elektroforezi yapılarak değerlendirildi.



Şekil 9: RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation” ekstraksiyon kiti, ekstraksiyon protokolü.

BULGULAR

Solüsyonların Koku Analizi

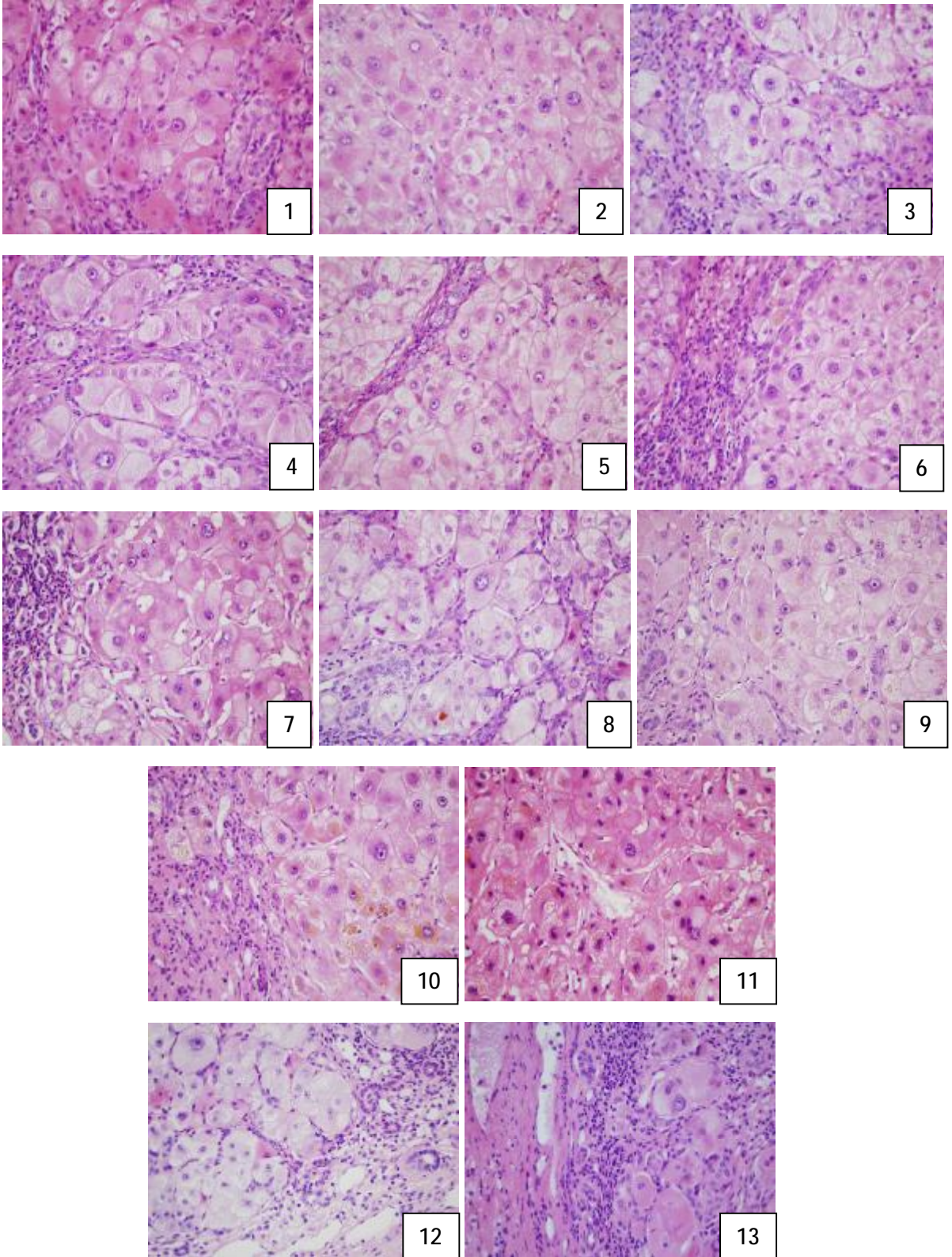
Kullanılan alternatif fiksatiflerin, formalin kadar keskin bir kokuya sahip olmadığı tespit edildi. Alternatif şeffaflandırıcılar içerisinde, Shandon Xylene Substitute® solüsyonun kokusuz olduğu, diğerlerinin ise ksilen kadar olmamakla birlikte, rahatsız edici bir kokuya sahip oldukları belirlendi (Tablo 7).

Tablo 7: Solüsyonların koku açısından değerlendirmesi

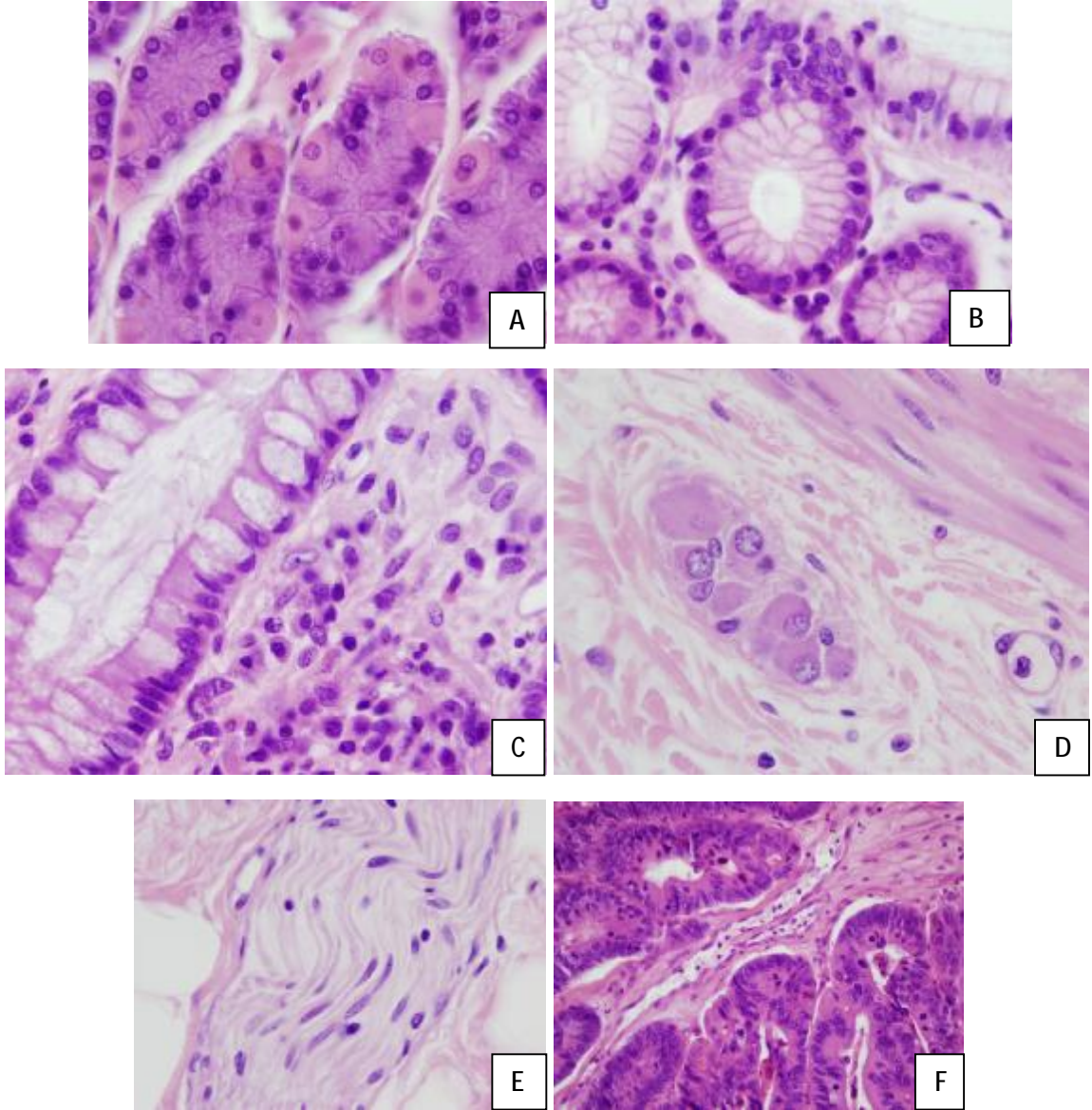
Fiksatif	Koku	Şeffaflandırıcı	Koku
<i>Formalin</i>	Rahatsız edici * Keskin	<i>Ksilen</i>	Rahatsız edici
<i>Glyo-Fixx</i>	Rahatsız edici (ancak formaline göre daha hafif)	<i>Shandon Xylene Substitute</i>	Rahatsız etmiyor * Kokusuz
<i>FineFIX</i>	Rahatsız etmiyor	<i>Bio Clear</i>	Rahatsız edici * Aromalı, portakalmsı bir koku
<i>Cell block</i>	Rahatsız etmiyor	<i>Sub-X</i>	Rahatsız edici * Ksilen gibi, ancak daha hafif
<i>Greenfix</i>	Rahatsız etmiyor	<i>Ottix Plus</i>	Rahatsız edici

Histomorfolojik Analiz

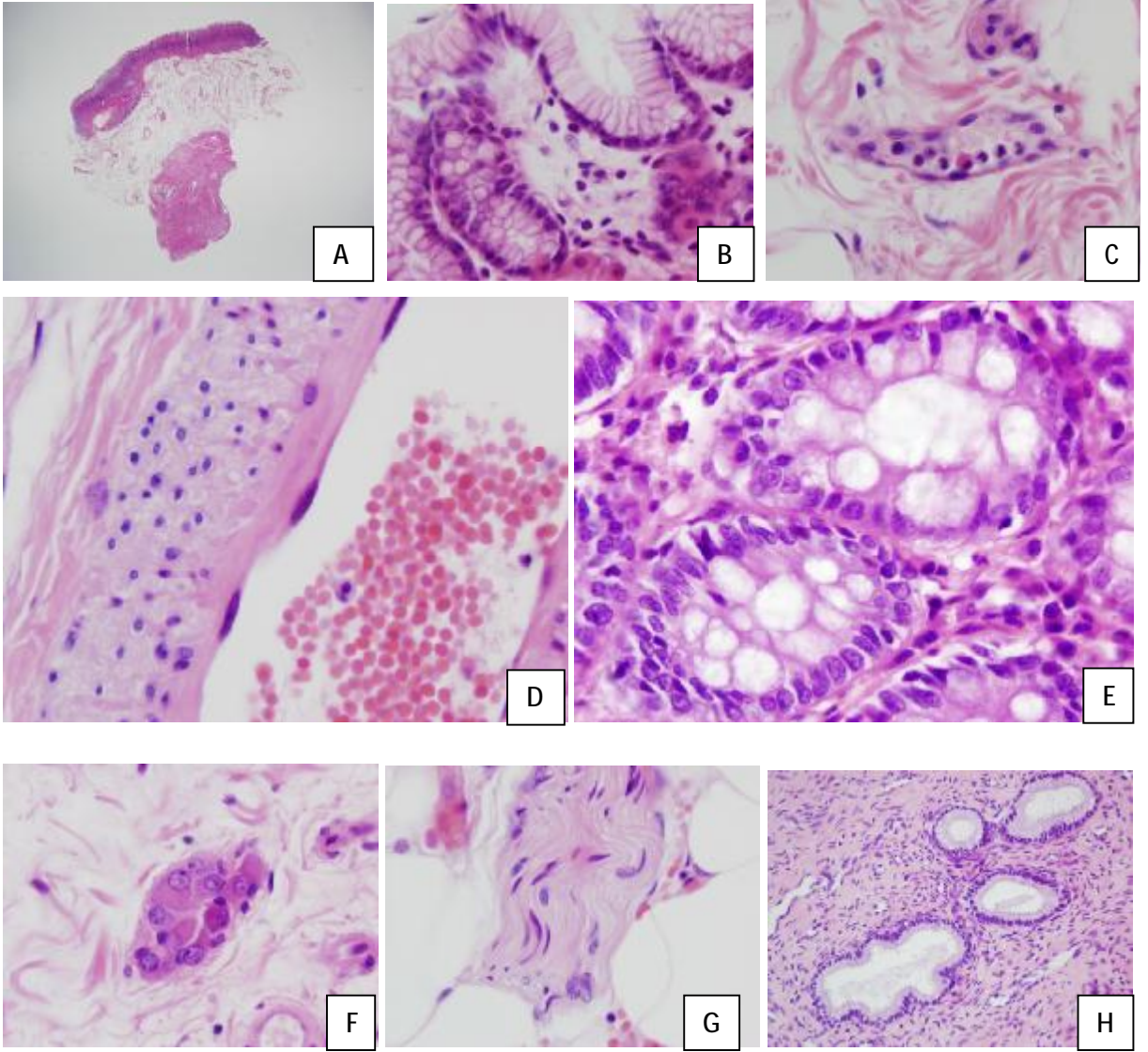
Tüm kesitler, kesit kalitesi (kesit kalınlığı, kesit bütünlüğü), H&E boyalarının kesitteki kontrastı ile sitoplazma, kromatin ve nükleer membranı içeren morfolojik parametreler açısından değerlendirildi. Her parametre, 1(kötü)-4(optimal) arasında skorlandı. Sonuçlar, bugün hemen tüm patoloji laboratuvarlarında standart olarak uygulanan doku takibi olan 2 no'lu takip ile karşılaştırıldı. Tüm parametreler birlikte değerlendirildiğinde, doku takiplerinin tümünde, 2 no'lu doku takibine kıyasla, benzer ya da daha iyi kalitede kesitler elde edildi (Şekil 10). Özellikle 6 (Şekil 11), 8 (Şekil 12), 10, 12 ve 13 no'lu doku takipleri ile elde edilen kesitler, her dört parametre açısından belirgin şekilde daha üstün bulundu.



Şekil 10. Karaciğer dokusu, H&E boyalı kesitler. Her biri farklı doku takibi ile işlem görmüş, karaciğer parankimine ait kesitler. Her kesitte, histomorfolojik özellikler hemen hemen benzer ve iyi özelliktedir. 1-13: Doku takip numaraları.



Şekil 11. 6 nolu doku takibine ait kesitlerde histomorfoloji. Çalıştığımız tüm doku çeşitlerinde bu doku takibi ile histomorfolojik olarak optimale yakın kesitler elde edilmiştir. Nükleer detay, sitoplazmik detay, nükleer membran, boyanma kalitesi ve kesit bütünlüğü çok iyidir. Bu doku takibinde fiksatif olarak Glyofixx® kullanılmıştır. (A) Mide korpus mukozasına ait bu kesitte (x100), gastrik bezler izlenmektedir. Bazofilik, ince granüler sitoplazmalı esas (zimojen) hücreler arasında, yuvarlak ya da piramidal şekilli, nükleusu santral yerleşimli, eozinofilik sitoplazmalı pariyetal hücreler net olarak seçilmektedir. (B) Mide mukozasına ait bu kesitte, lümeneye bakan yüzeyi örten, lamina propria içine uzanan, mukus salgılayan hücrelerden oluşan tek katlı prizmatik epitel izlenmektedir. (C) Rektum mukozasına ait bu kesitte, goblet hücrelerini içeren bez yapısı ve buna komşu lamina propriada inflamatuvar hücreler izlenmektedir. (D) Rektum mukozasına ait kesitte, myenterik pleksusa ait ganglion hücre kümesi izlenmektedir. Hücrelerin eozinofilik sitoplazması ve nükleer detayı oldukça reprezentatiftir. (E) Periferik sinir kesiti. (F) Kolon tümör dokusuna ait kesit.



Şekil 12. 8 nolu doku takibine ait kesitlerde histomorfoloji. 6 nolu doku takibine ait kesitlerde olduğu gibi, bu doku takibi ile elde edilen kesitlerde de kesit kalitesi, boyanma kalitesi ve histomorfolojik detayların tümü optimal özelliktedir. Bu doku takibinde fiksatif olarak Cell-block® kullanılmıştır. (A) Mide mukozasına ait kesit (x1.25). Bu doku takibine ait kesitlerin çoğunda, bu örnekte görüldüğü gibi katlanma mevcut değildir. (B) Mide mukozası, yüzey epitelii. (C-D) Vasküler yapılar. (E) Rektum mukozasına ait kesit. (F) Rektum mukozası, myenterik pleksusa ait ganglion hücre kümesi. (G) Periferik sinir kesiti. (H) Uterin serviksine ait kesit.

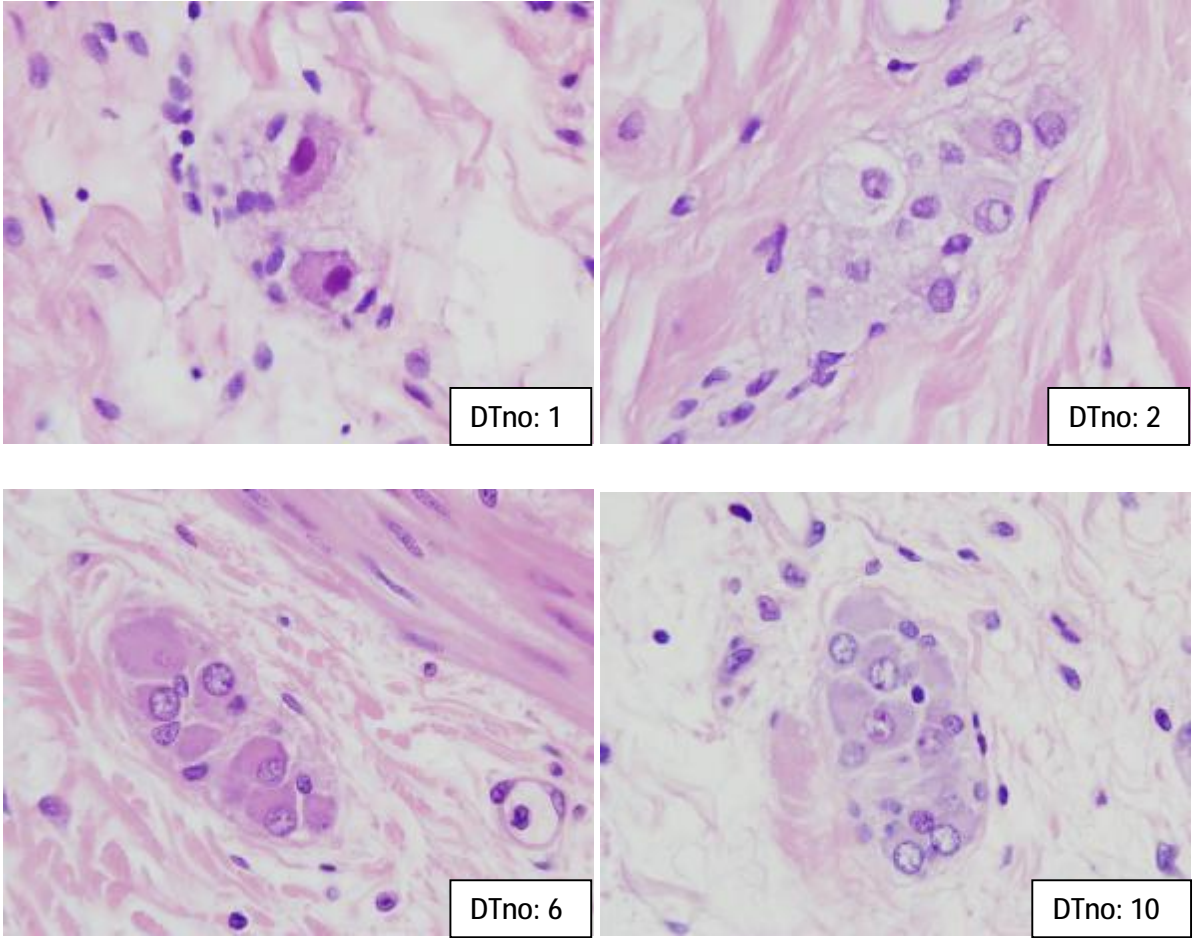
Resimlerden de izlendiği gibi, 6 ve 8 nolu doku takipleri ile edilen kesitler, optimal özellikler sergilemektedir. 10, 12, 13 nolu kesitler de yine iyi kalitededir. Bu doku takiplerinin tümünde alternatif fiksatifler kullanılmıştır (Tablo 5). Dolayısıyla bu alternatif fiksatifler (Glyofix®, Cell-block®) kesit kalitesi ve histomorfolojik kalite açısından formalinin yerini almaya aday gibi görünmektedir. Fiksatif olarak formalinin kullanıldığı 1-5 nolu doku takipleri incelendiğinde ise, 3, 4 ve 5 nolu kesitlerin, 1 ve 2 nolu kesitlerden histomorfolojik detay açısından daha iyi olduğu dikkati çekmektedir. 3, 4 ve 5 nolu doku takiplerinin farkı, alternatif şeffaflandırıcı solüsyonların kullanılmış olmasıdır.

Tablo 8: H&E boyalı kesitlerde nükleer değerlendirme.

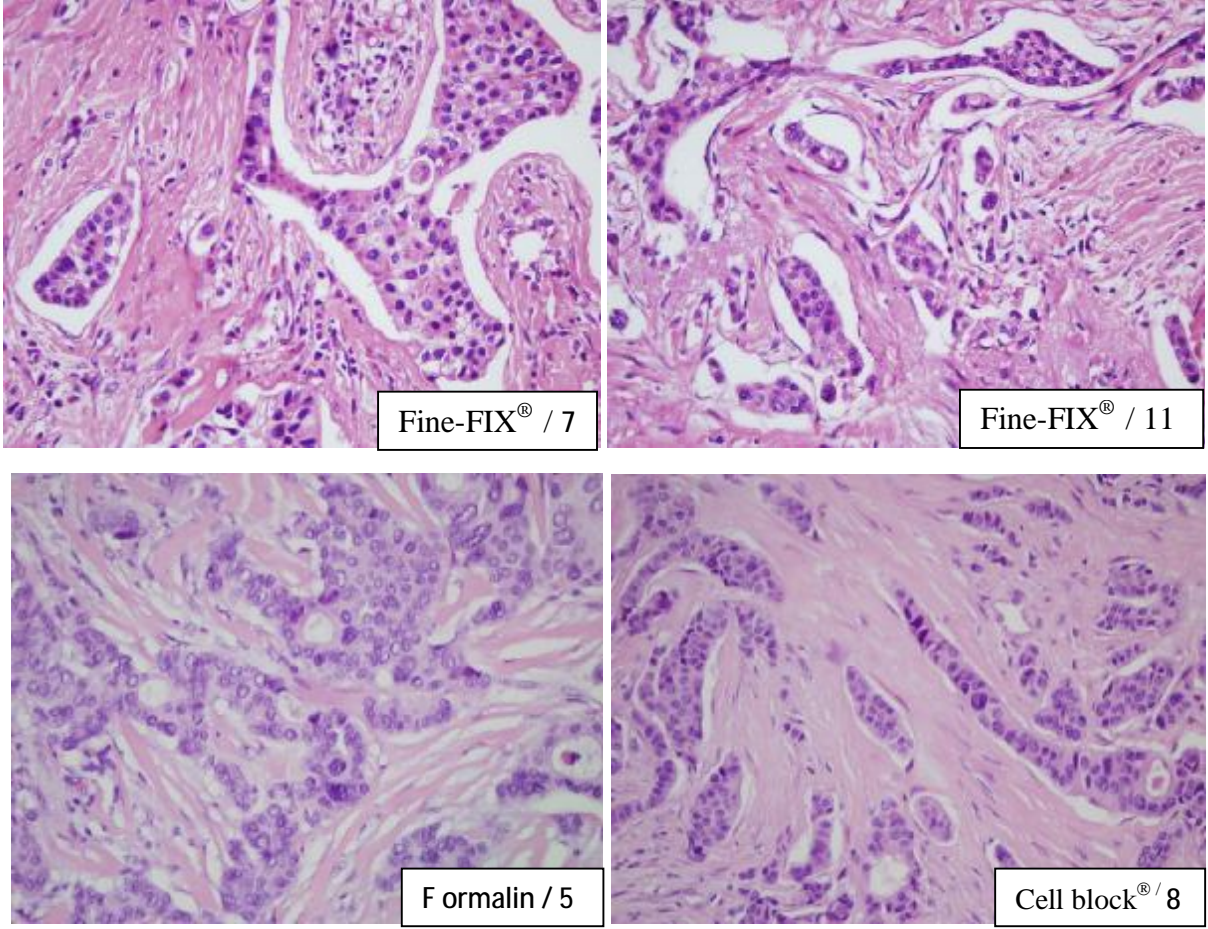
Dİno	ATm	MTm	Mide	Akc	R	S	Y	KTm	U	O	SK	D	Kc
1	3	2	3	2	1	3	2	4	2	3	2	4	4
2	4	4	4	3	3	2	2	4	3	3	2	4	4
3	4	4	4	3	3	4	2	4	2	4	3	3	4
4	4	4	3	4	2	4	3	4	3	2	2	3	4
5	4	4	4	3	4	4	2	4	3	3	3	3	4
6	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
7	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
8	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	3	4	4
9	4	4	3	4	4	3	3	4	4	1	3	4	4
10	4	4	4	2	4	4	4	4	4	4	3	4	4
11	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
12	4	4	4	4	4	4	4	Müsin	4	2	3	4	4
13	4	4	3	4	4	3	3	Müsin	4	4	4	4	4

H&E boyalı kesitlerde yapılan morfolojik değerlendirme parametrelerinden nükleer değerlendirmede sonuçları incelendiğinde, 1 numaralı doku takibi ile elde edilen kesitlerde, bu açıdan, diğerlerine kıyasla daha düşük sonuç elde edildiği görülmüştür. ATm: Akciğer tümörü, MTm: Meme tümörü, Akc: Akciğer, R: rektum, S:

Bir diğer dikkat çeken nokta, diğer aıllardan çok farklı olmamakla birlikte, 1 nolu doku takibine ait kesitlerde nükleer detayın diğerleri ile kıyaslandığında daha düşük sonuç vermiş olmasındır (Tablo 8, şekil 13). Ayrıca Fine-FIX®'in kullanıldığı doku takiplerine ait kesitlerde nükleer detay ve diğer hücresel morfolojik özellikler optimale yakın olmakla birlikte, doku büzüşmesi ile ilişkili bir miktar retraksiyon artefaktı ve kesit genelinde eozinin hematoksilene hafif baskınlığı söz konusudur (şekil 14).



şekil 13: 1, 2, 6 ve 10 nolu doku takiplerinin nükleer morfoloji açısından karşılaştırılması. 1 nolu doku tabine ait kesitlerde (DTno:1) nükleer detayın okunmasında güçlük çekilmektedir. Karşılaştırma amaçlı, nükleer detay okunaklığının iyi olduğu diğer kesitlerden örnekler verilmiştir (DTno:2, DTno:6). 2 nolu doku takibinde formalin, 6 ve 10 nolu doku takiplerinde Glyo-Fixx® kullanılmıştır. Doku Takip Numarası (DTno).

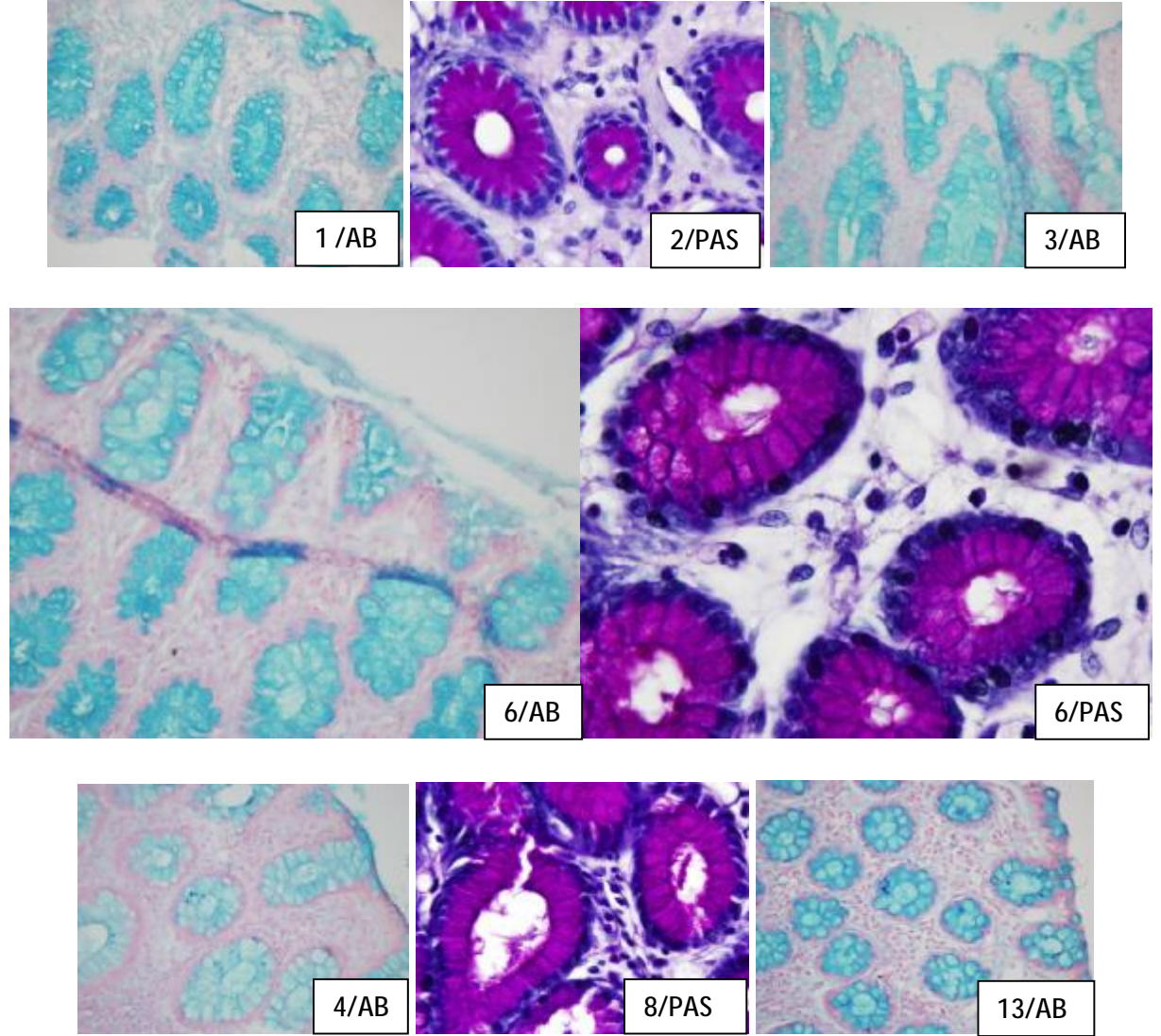


Şekil 14: Fine-FIX®'in kullanıldığı doku takiplerine (7 ve 11 nolu doku takipleri) ait kesitlere örnek. Meme tümör dokusuna ait bu fotoğraflarda da görüldüğü gibi, bu fiksatif dokuda bir miktar kontraksiyona ve çekilme artefaktına neden olmuştur. Ancak hücresel sitomorfolojik özellikler optimal düzeydedir. Karşılaştırma amaçlı diğer fiksatiflerle fikse meme tümör dokusu örnekleri verilmiştir.

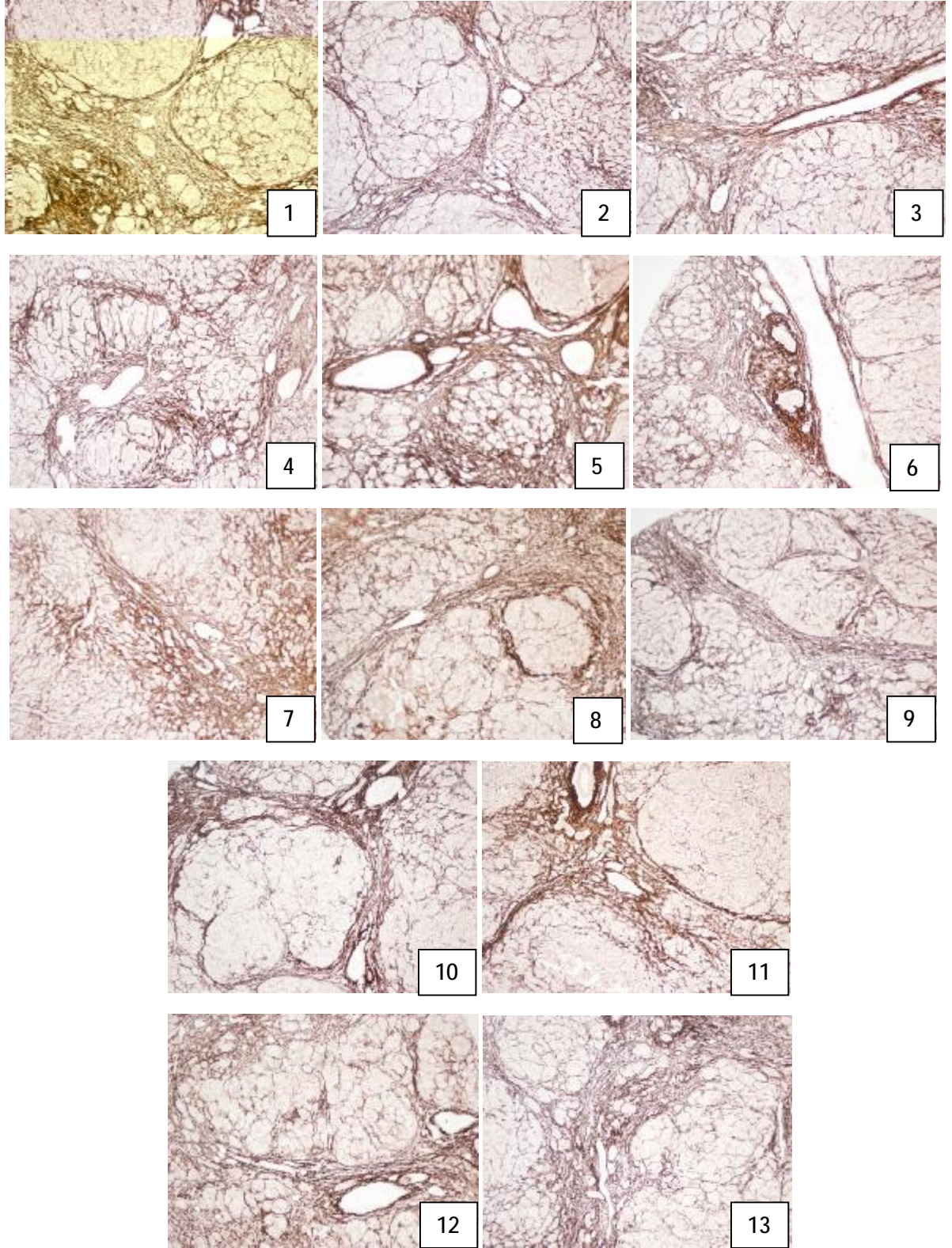
Histokimyasal Analiz

TMA kesitlerine uygulanan HK'sal boyama sonuçları, reaksiyonun şiddeti (parlaklık), boyanma paterni ve nonspesifik zemin boyanmanın varlığı açısından değerlendirildi ve 1 (kötü)-4 (optimal) arasında skorlandı. Deri dokusuna uyguladığımız VVG, rektum dokusuna uyguladığımız Alcian blue (Şekil 15), mide dokusuna uyguladığımız PAS (Şekil 15), karaciğer dokusuna uyguladığımız retikülin (Şekil 16) ve Masson HK'sal boyamalarının

değerlendirilmesinde, doku takipleri arasında fark izlenmedi ve hepsinde iyi özellikte boyanma elde edildi (Tablo 9).



Şekil 15. HK'sal boyalar ile elde edilen boyama örnekleri. AB: Alcian blue. PAS: Periodic acid schiff. Rakamlar doku takip numaralarını temsil etmektedir.



Şekil 16. TMA-Kc kesitinde Retikülin boyama sonuçları.

Tablo 9: HK'sal boyama sonuçlarının değerlendirilmesi.

DTno	MASKc	RETKc	ABr	ABskt	PASm	VERd
1	3	4	4	4	4	4
2	3	4	4	4	4	4
3	3	4	4	4	4	4
4	3	4	4	4	4	4
5	2	4	4	4	4	4
6	4	4	4	4	4	4
7	4	4	4	4	4	4
8	3	4	4	4	4	4
9	3	4	epitel yok	4	4	4
10	4	4	4	4	4	4
11	4	4	4	4	4	4
12	3	4	4	4	4	4
13	3	4	4	4	4	4

İmmünohistokimyasal Analiz

İHK'sal boyalar, TMA tekniği kullanılarak uygulandı. Boyama sonuçları nükleer ve membranöz boyanmayı ayrı olarak değerlendiren İHK yazılım programı ile bilgisayar ortamında değerlendirildi ve Tablo 10'de belirtilen veriler elde edildi. Biz karşılaştırma yaparken özellikle Hscore sayısını temel aldık. Hscore, pratik olarak, saptanan pozitif boyanmış objelerin ağırlıklı ortalaması olup, genel olarak >200 ise örneğin kuvvetli pozitif (+++) olarak değerlendirildiği bildirilmektedir. Ancak Hscore paydada boyanmayan obje sayısını da içerdiğinden, örneğin desmoplastik yanıtın daha yoğun olduğu tümör kesitinde boyanma şiddet ve dağılım olarak iyi olsa da, görece daha düşük bir değer vermektedir. Bu nedenle Hscore yanı sıra, $(CNO3/CNO1+CNO2+CNO3)$ ve $(CNO2+CNO3/CNO1+CNO2+CNO3)$ oranlarını da hesaplayarak değerlendirmeye aldık.

Tablo 10: İHK yazılım programı ile elde edilen veriler

Veri	Formül/Açıklama	Not
<i>FA</i>	mm ² olarak alan (Field area)	
<i>NO</i>	Saptanan obje sayısı (Number of detected objects)	
<i>fNO</i>	Obje yoğunluğu (frequency of detected objects)	
<i>Hscore</i>	$1*(NO+1/NO)*100 + 2*(NO+2/NO)*100 + 3*(NO+3/NO)*100$	Rutin tanıda kullanılan sayı*
<i>rNOPos</i>	$((NO+1 + NO+2 + NO+3) / NO)*100$	
<i>CNO:0</i>	(0) sınıfındaki obje sayısı	
<i>CNO:1+</i>	(1+) sınıfındaki obje sayısı	
<i>CNO:2+</i>	(2+) sınıfındaki obje sayısı	
<i>CNO:3+</i>	(3+) sınıfındaki obje sayısı	
<i>IS</i>	Boyanma şiddeti (intensity score)	Nükleer boyalar için

* Hscore, pratik olarak saptanan pozitif boyanmış objelerin ağırlıklı ortalaması olup, genel olarak >200 ise örnek kuvvetli pozitif (+++) olarak değerlendirilir.

Nükleer Boyalar

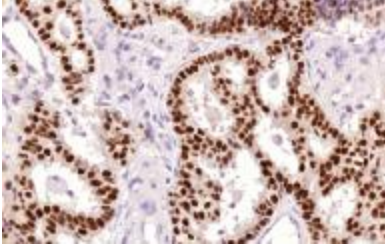
Nükleer boyaların (ER, PR, p53, Ki67, p63, TTF-1) değerlendirilmesi sonucu elde edilen tüm veriler birlikte ele alındığında, uyguladığımız doku takiplerinin tümü ile iyi ya da optimal özellikte boyanma elde edilmiştir (Şekil 17-20). Boyanmanın olmadığı ya da değerlendirmeyi olumsuz etkileyecek herhangi bir nonspesifik zemin boyanmanın olduğu doku kesit alanı izlenmemiştir.

Sitoplazmik Boyalar

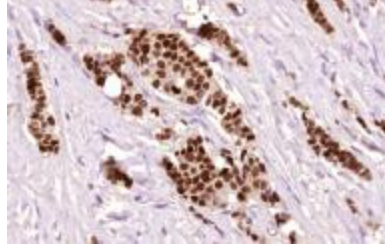
Cerb-B2: Örneklediğimiz meme tümör dokusu cerb-B2 negatif özellik göstermiş, bu nedenle değerlendirme yapılamamıştır.

Keratin boyaları: Çalışmamızda kullandığımız sitoplazmik keratin boyaları HMWK (meme tümör dokusu), CK (deri dokusu), CK20 (kolon tümörü ve kolon mukozası) ve CK7 (akciğer parankim dokusu)'dir. Meme tümör dokusuna uygulanan HWWK boyası ile 1, 2, 3,

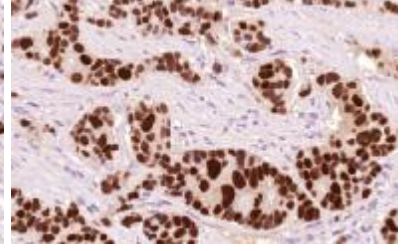
ER/1



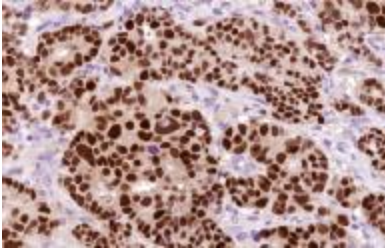
ER/2



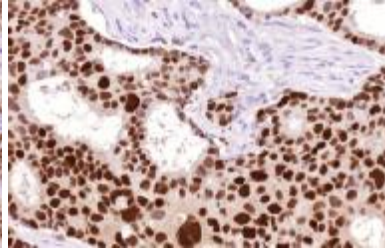
ER/3



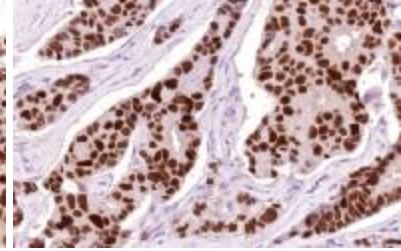
ER/4



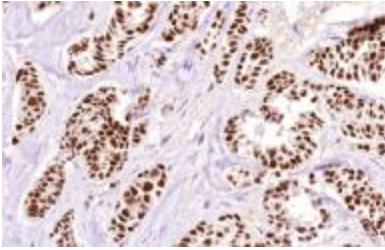
ER/5



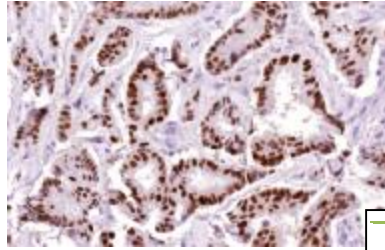
ER/6



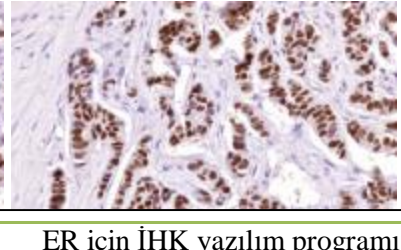
ER/7



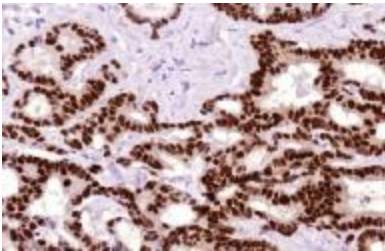
ER/8



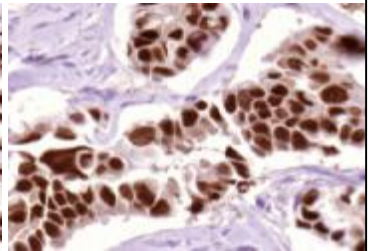
ER/9



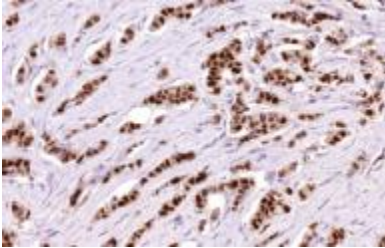
ER/10



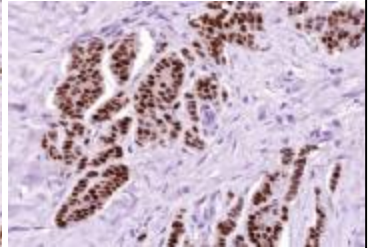
ER/11



ER/12



ER/13



ER için İHK yazılım programı verileri

Takip No	HSCORE	3/1+2+3 x100	2+3/1+2+3 x10
1	232,4234	61,4968348	94,52726159
2	211,1678	57,56013746	85,56701031
3	203,7399	70,73791349	89,86641221
4	244,0949	78,63735289	95,2905852
5	256,4102	83,29804905	99,21831743
6	191,8896	59,19214159	87,44178169
7	115,553	6,710213777	86,93586698
8	173,1338	45,50248139	91,32133995
9	165,848	46,74143039	94,7312738
10	172,9776	60,52702249	91,91339376
11	185,427	5,945945946	83,83783784
12	144,9882	47,01227205	86,40899186
13	146,1184	25,89777091	87,38171596

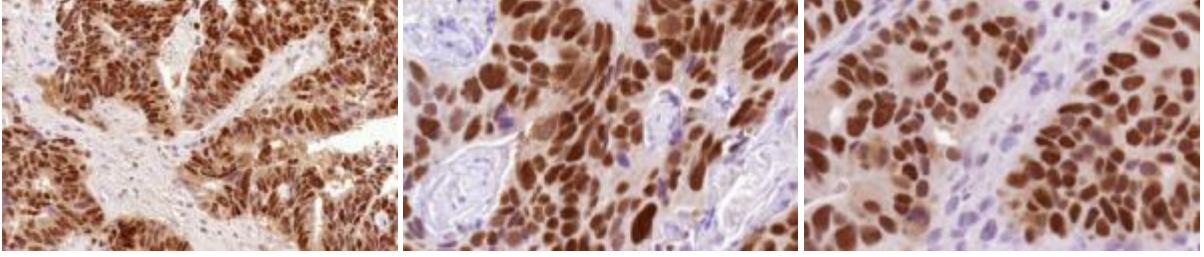
Şekil 17: TMA/M (Tablo 6) bloğu kesitine ER nükleer antikoruna uygulanan İHK'sal boyama sonuçları.

1-13:Doku takip no.

P53/1

P53/2

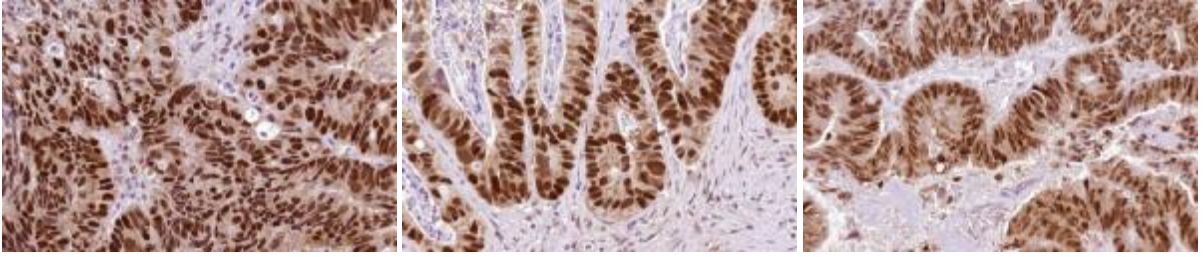
P53/3



P53/4

P53/5

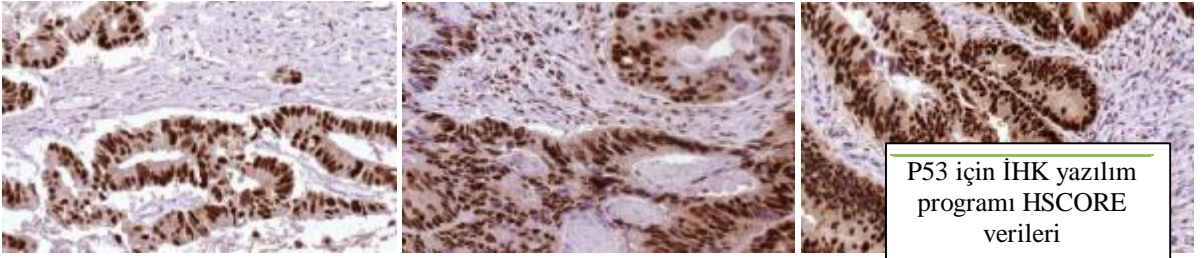
P53/6



P53/7

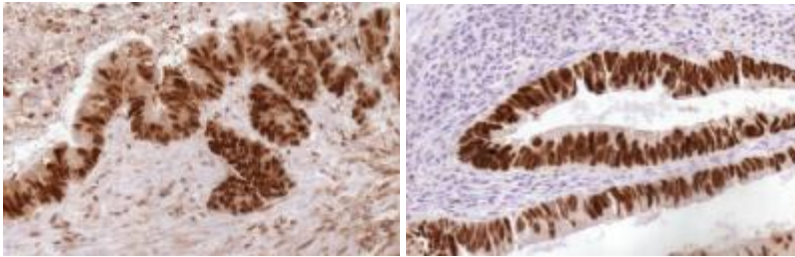
P53/8

P53/9



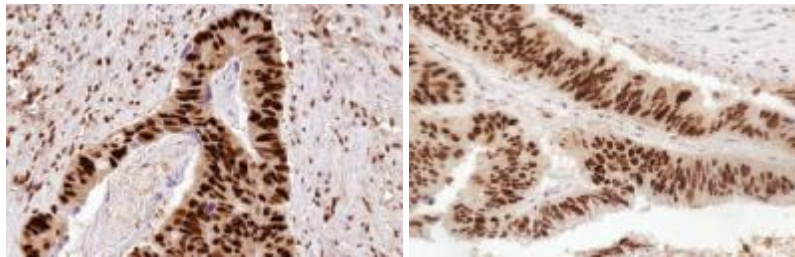
P53/10

P53/11



P53/12

P53/13



P53 için İHK yazılım
programı HSCORE
verileri

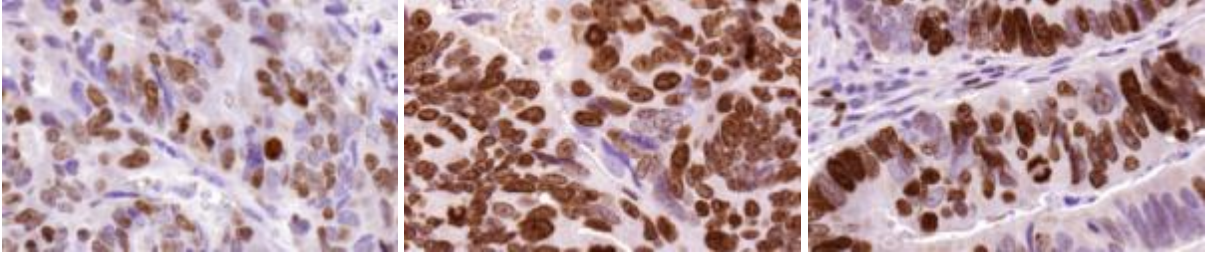
Takip No	HSCORE
1	282,7731
2	296,2963
3	273,9965
4	280,857
5	254,401
6	274,359
7	264,019
8	252,3525
9	230,4061
10	288,764
11	262,132
12	294,3101
13	283,6623

Şekil 18: TMA/R-Ktm (Tablo 6) bloğu kesitine P53 nükleer antikoruna ile uygulanan İHK' sal boyama sonuçları (kolon tm). 1-13:Doku takip no.

Ki67/1

Ki67/2

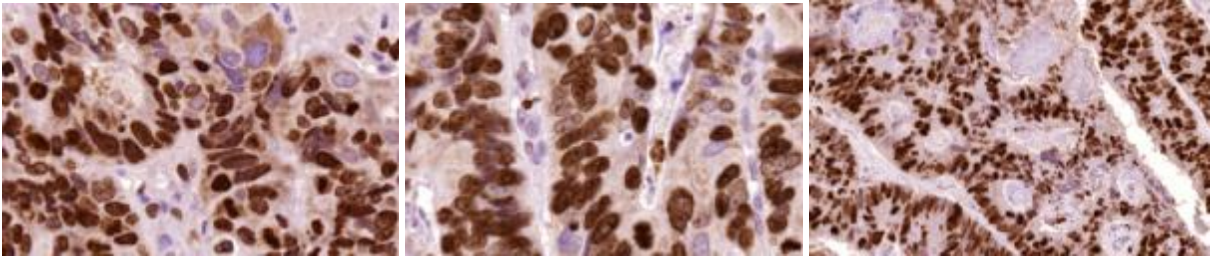
Ki67/3



Ki67/4

Ki67/5

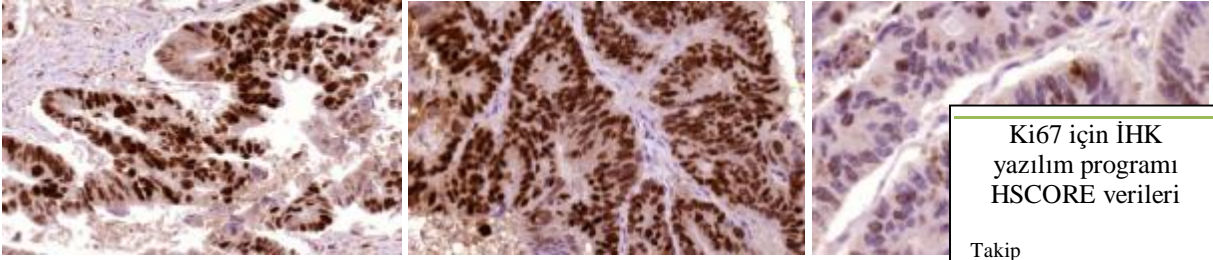
Ki67/6



Ki67/7

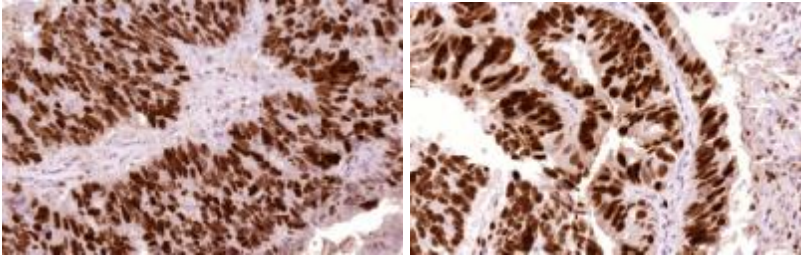
Ki67/8

Ki67/9



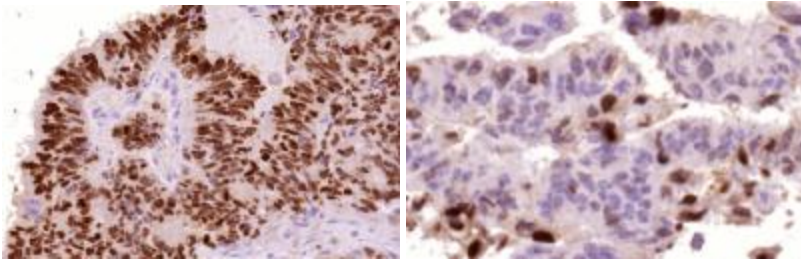
Ki67/10

Ki67/11



Ki67/12

Ki67/13



Ki67 için İHK
yazılım programı
HSCORE verileri

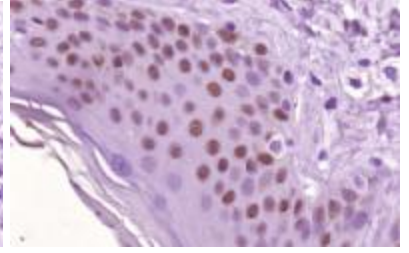
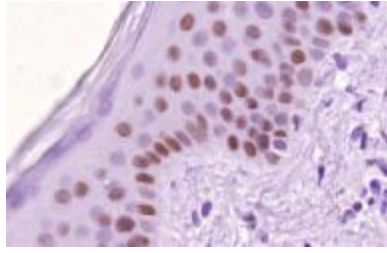
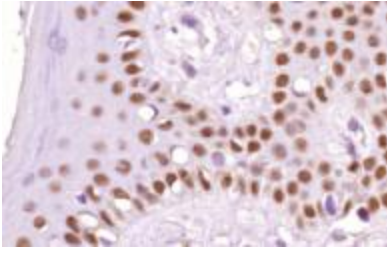
Takip No	HSCORE
1	112,2078
2	242,9072
3	232,1698
4	261,8377
5	266,1100
6	287,8996
7	258,9432
8	266,0738
9	183,5922
10	286,3089
11	260,1534
12	267,5365
13	163,5920

Şekil 19: TMA/R-Ktm (Tablo 6) bloğu kesitine Ki67 nükleer antikoru ile uygulanan İHK'sal boyama sonuçları (kolon tm). 1-13:Doku takip no.

P63/1

P63/2

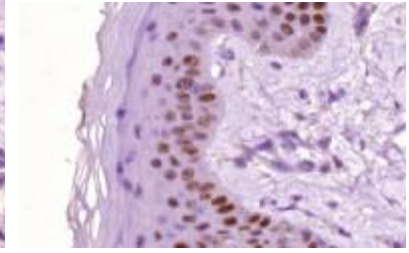
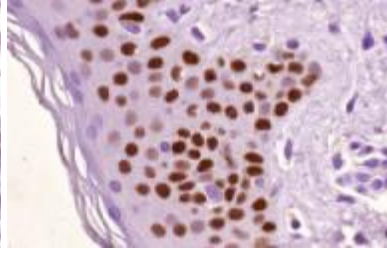
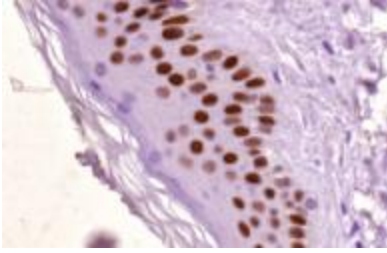
P63/3



P63/4

P63/5

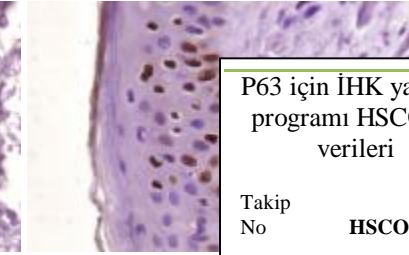
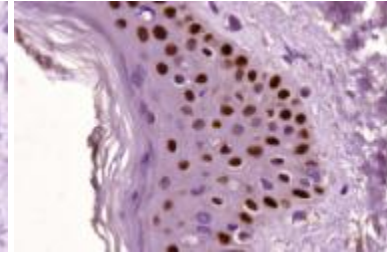
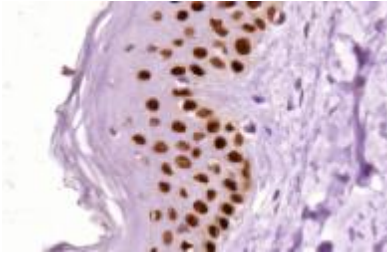
P63/6



P63/7

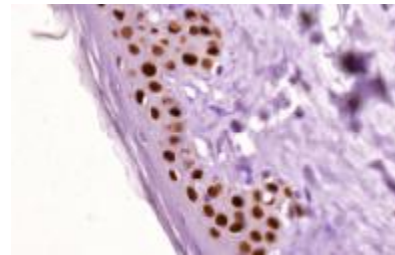
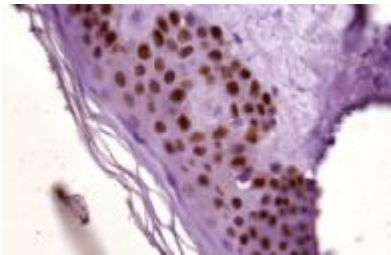
P63/8

P63/9



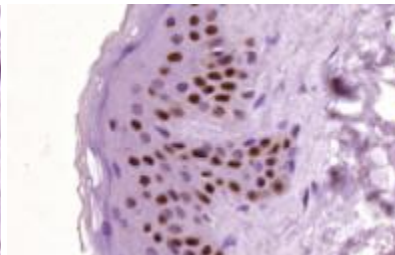
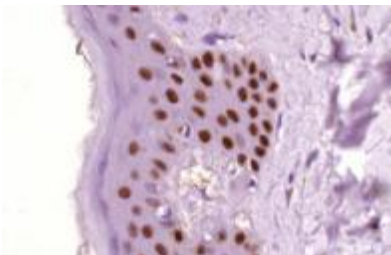
P63/10

P63/11



P63/12

P63/13



P63 için İHK yazılım
programı HSCORE
verileri

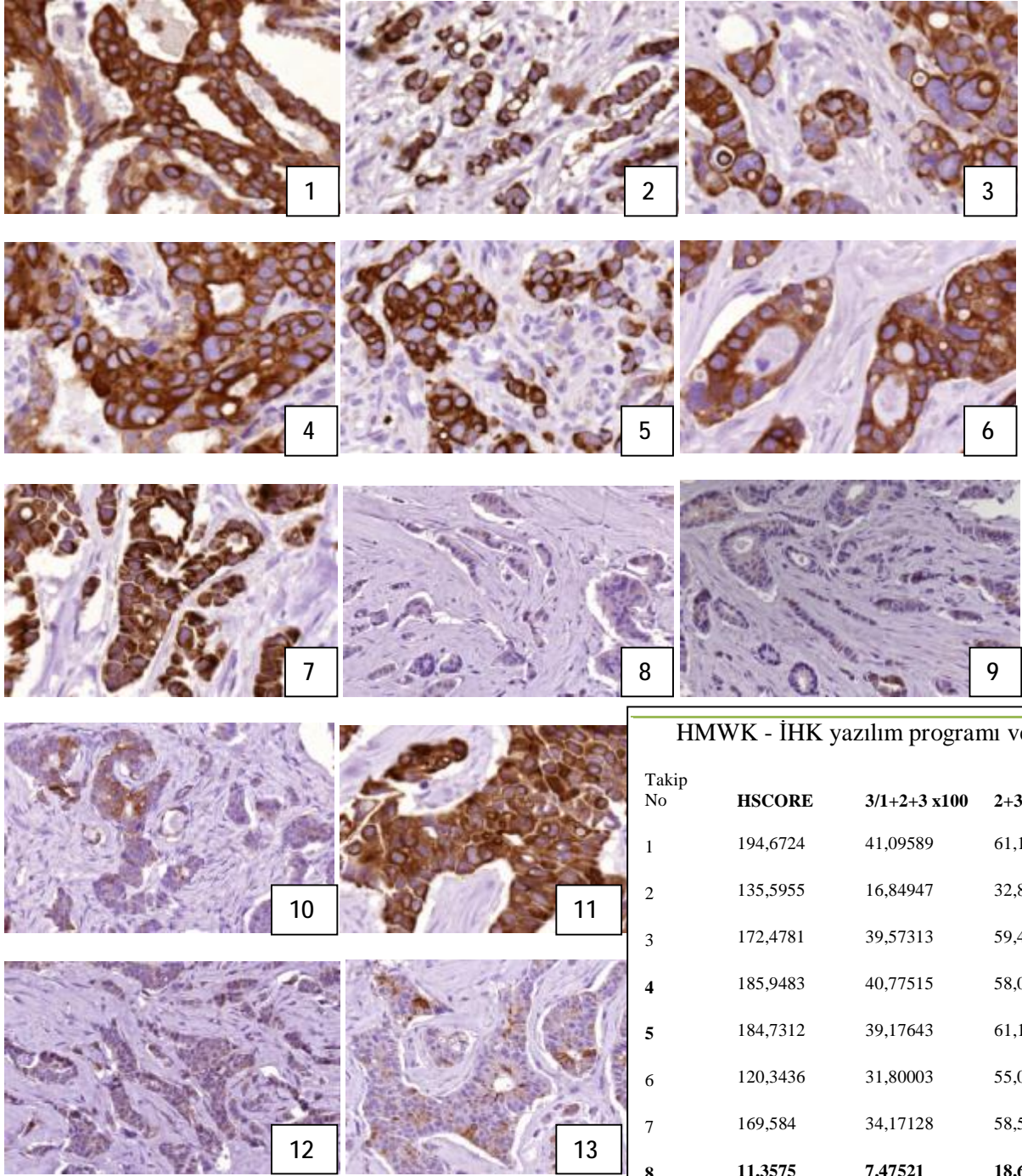
Takip No	HSCORE
1	217,6672
2	148,1928
3	137,9494
4	224,4027
5	238,2465
6	184,7525
7	219,8462
8	221,9325
9	163,1206
10	245,1128
11	218,5461
12	216,9788
13	187,3646

Şekil 20: TMA/D-M (Tablo 6) bloğu kesitine p63 nükleer antikoru ile uygulanan İHK' sal boyama sonuçları (deri dokusu). 1-13:Doku takip no.

4, 5, 6, 7 ve 11 nolu kesitlerde diffüz olumlu ve iyi özellikte boyanma izlenirken; 8, 9, 10, 12 ve 13 nolu kesitlerde boyanma olmamış ya da çok fokal ve zayıf boyanma olmuştur (Şekil 21).

CK boyası, deri ve mide mukoza dokusu içeren TMA bloğundan alınan kesite uygulanmıştır. Deri dokusu örneklerinde, CK ile tüm kesitlerde epidermiste boyanma mevcut olmakla birlikte, 6, 8, 9, 10, 12 ve 13 (HMWK ile boyanmanın olmadığı kesitler!) nolu kesitlerde boyanma şiddeti daha zayıf özelliktedir (Şekil 22). Mide mukoza örnekleri incelendiğinde ise, 2, 3, 4, 5, 7 ve 11 nolu kesitlerde, beklendiği gibi, kript epitelinde bazal membrana komşu nöroendokrin hücre ile uyumlu seyrek olarak yerleşik hücrelerdeki spesifik boyanma dışında boyanma izlenmemiştir. Diğer kesitlerde (1 no hariç) ise, bu nöroendokrin hücrelerdeki belirgin boyanma yanısıra, sekretuar hücrelerde de diffüz sitoplazmik boyanma görülmüştür. Rutinde mide mukozasında karsinom hücrelerini konfirme etmek için uygulanan CK İHK'sal boyası ile normal mide mukoza epitelinde izlenen bu diffüz boyanma, patolojik incelemeyi olumsuz etkileyebilecek bir sonuçtur. 1 nolu kesit olmadığı için değerlendirilememiştir.

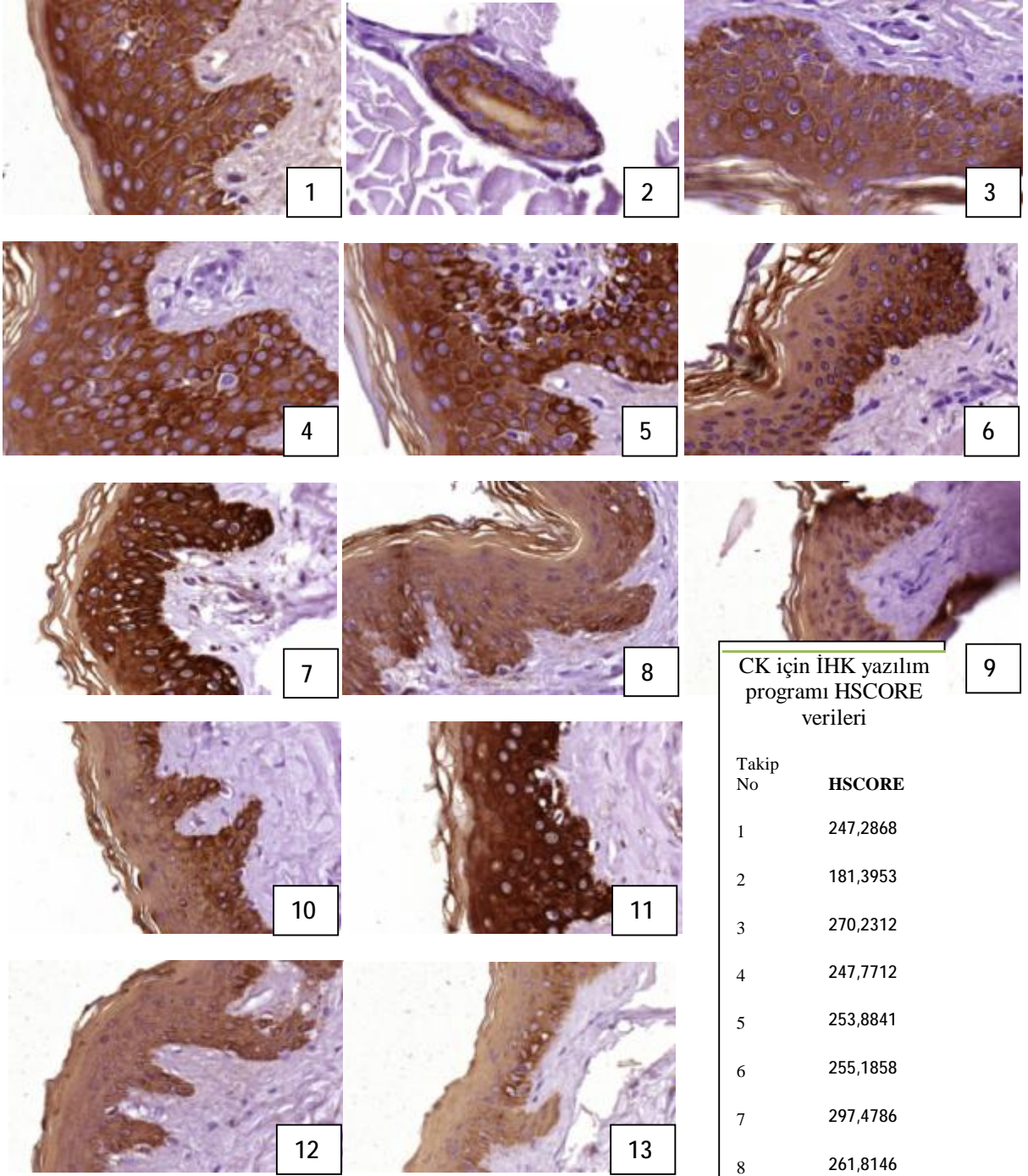
CK20 boyası, kolon tümör dokusu ve rektum mukoza dokusu içeren TMA bloğundan alınan kesite uygulanmış ve her iki dokudaki boyanma değerlendirilmiştir. Kolon tümör doku örneklerindeki CK20 boyanması incelendiğinde, 2, 3, 4 ve 5 nolu kesitlerde optimal İHK'sal boyanma, hematoksilen ile optimal kontrast boyanma ve net doku morfolojisi elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 23-A). 1 nolu kesitte boyanma daha hafif olmakla birlikte, doku morfolojisi iyidir. 9 nolu kesitte kuvvetli boyanma mevcut olmakla birlikte, hem hematoksilen kontrast boyanma hem de tümör bezlerini oluşturan hücre morfolojisi beklenen özellikte değildir. Diğer doku kesitleri daha çok müsin ya da desmoplastik stromayı temsil ettiğinden bu kesitlerde değerlendirme yapılamamıştır. Rektum mukoza doku örnekleri incelendiğinde ise, 2, 3, 4, 5 ve 7 nolu kesitlerde yine boyanma ve morfoloji açısından optimal özellikler izlenmiştir (Şekil 23-B). 6, 8, 12 ve 13 nolu kesitlerde boyanma olmakla birlikte, mukoza epitelindeki hücre morfolojisi beklenen özellikte değildir ayrıca hafif nonspesifik zemin boyanması mevcuttur. 1, 9, 10, 11 nolu kesitlerde ise mukoza epiteli çıkmadığı için değerlendirme yapılamamıştır.



Şekil 21: HMWK, meme tümörü dokusu (TMA/M). Hem fotoğraflar, hem de verilerden izlendiği gibi, 8, 9, 10, 12 ve 13 nolu kesitlerde boyanma olumsuz sonuçlanmıştır. Boyamanın TMA yöntemi ile eşit koşulda uygulanmış olması ve diğer keratin boyaları ile de benzer sonucun elde edilmiş olması anlamlıdır. Özellikle 3 ve 5 nolu kesitlerdeki tümör hücrelerinin ve desmoplastik stromanın belirgin morfolojisine, kontrast boyanmanın optimalliğine dikkat çekmek isterim. 1-13:Doku takip no.

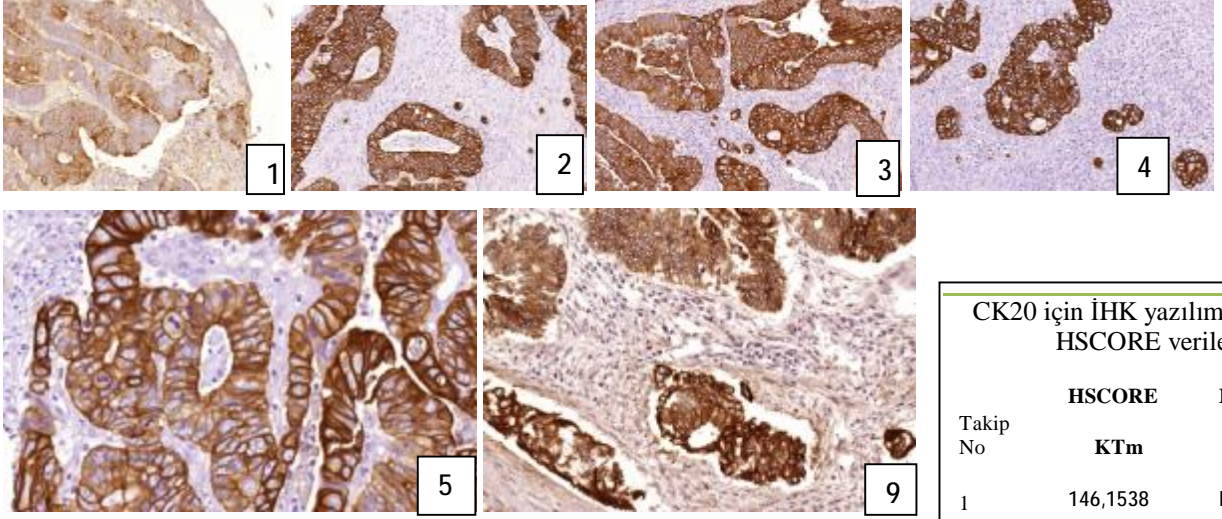
HMWK - İHK yazılım programı verileri

Takip No	HSCORE	3/1+2+3 x100	2+3/1+2+3 x100
1	194,6724	41,09589	61,19915
2	135,5955	16,84947	32,85954
3	172,4781	39,57313	59,42703
4	185,9483	40,77515	58,02962
5	184,7312	39,17643	61,13174
6	120,3436	31,80003	55,01868
7	169,584	34,17128	58,50021
8	11,3575	7,47521	18,68802
9	18,5923	1,670275	6,588308
10	18,1886	3,98393	18,78139
11	209,487	53,49265	64,70588
12	8,0884	3,606853	13,5257
13	21,6513	4,289092	18,37217

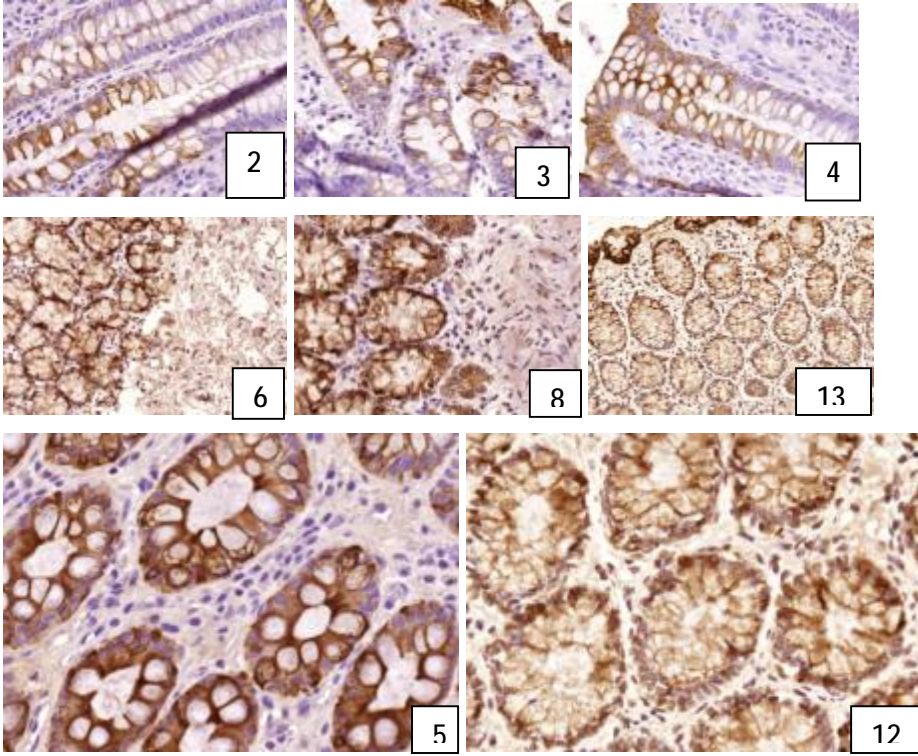


CK için İHK yazılım programı HSCORE verileri	
Takip No	HSCORE
1	247,2868
2	181,3953
3	270,2312
4	247,7712
5	253,8841
6	255,1858
7	297,4786
8	261,8146
9	294,6467
10	281,8182
11	298,8352
12	249,9392
13	286,3039

Şekil 22: CK, deri dokusu (TMA/D-M): Deri dokusu örneklerinde, CK ile tüm kesitlerde epidermiste boyanma mevcut olmakla birlikte, 6, 8, 9, 10, 12 ve 13 (HMWK ile boyanmanın olmadığı kesitler!) nolu kesitlerde boyanma şiddeti daha zayıf özelliktedir. 1-13:Doku takip no.



A: CK20, Kolon tümörü dokusu (1,2,3,4,5,9: Doku takip numaraları).



B: CK20, Rektum mukozası (2,3,4,5,6,8,12,13: Doku takip numaraları).

CK20 için İHK yazılım programı HSCORE verileri

Takip No	HSCORE	HSCORE
	KTm	R
1	146,1538	Doku yok
2	210,926	88,806
3	218,9633	106,9919
4	214,2713	191,1565
5	204,3976	182,2354
6	Müsin	155,2478
7	Müsin	151,1828
8	211,8231	174,6619
9	189,0359	Doku yok
10	Müsin	Doku yok
11	Müsin	Doku yok
12	143,3999	177,1257
13	123,1106	149,9201

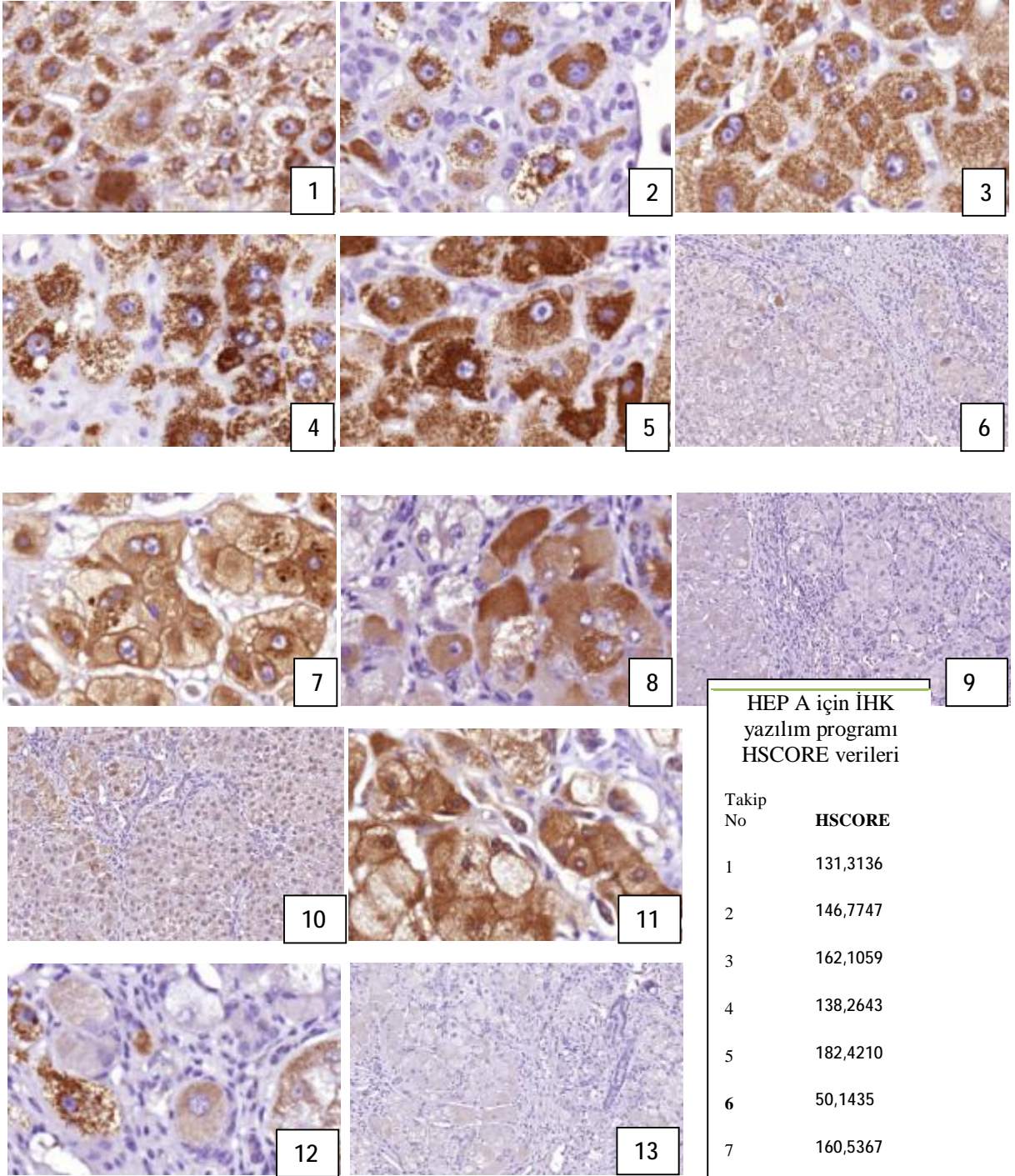
Şekil 23: CK20 (TMA/R-Ktm). (A) Kolon tümör dokusuna ait 2, 3, 4 ve 5 nolu kesitlerde optimal İHK'sal boyanma, hematoxilen ile optimal kontrast boyanma ve net doku morfolojisi izlenmektedir. 1 nolu kesitte boyanma daha hafif olmakla birlikte, doku morfolojisi iyidir. 9 nolu kesitte kuvvetli boyanma mevcut olup, hem hematoxilen ile kontrast boyanma hem de tümör bezlerini oluşturan hüresel morfoloji beklenen özellikte değildir. 5 ve 9 nolu kesitlere ait resimler (her ikisi de x20 büyütmede çekilmiştir), morfolojinin ve boyanma özelliklerin daha rahat karşılaştırılabilmesi için özellikle büyütülmüştür. 5 nolu kesitte hücrelerin tek tek seçilebiliyor oluşuna, mitotik figürlerin netliğine, kontrast boyanmanın optimal oluşuna dikkat ediniz. (B) Rektum mukozasına ait örneklerde ise 2, 3, 4, ve 5 nolu kesitlerde yine boyanma ve morfoloji açısından optimal özellikler izlenmiştir. 6, 8, 12 ve 13 nolu kesitlerde boyanma mevcut, ancak mukoza epitelindeki hüresel morfoloji beklenen özellikte değil, kontrast boyanma iyi değildir ve hafif nonspesifik zemin boyanması eşlik etmektedir. 5 ve 12 nolu resimler karşılaştırmanın daha rahat yapılabilmesi için büyük boyuttadır.

Akciğer parankim dokusuna uygulanan CK7 boyasıyla ise en iyi sonuçlar 2, 3, 5, 11 nolu kesitlerde izlenmiş, HMWK ve CK ile benzer şekilde 10, 12 ve 13 nolu kesitlerde çok zayıf ve fokal boyanma olmuştur. Morfoloji ve hematoksilen ile kontrast boyanma 2, 3, 4 ve 5 nolu kesitlerde optimaldir. Lam üzerinde 1 nolu doku kesiti bulunmadığından değerlendirilememiştir.

HEPA Sitoplazmik Boyası: Bir başka sitoplazmik İHK'sal boya olan HEPA ile, 6, 9, 10 ve 13 nolu kesitlerde boyanma olmamış, 8 ve 12 nolu kesitlerde ise periferik fokal boyanma görülmüştür (Şekil 24). Diğer kesitlerde ise iyi ya da optimal özellikte boyanma elde edilmiştir. İHK yazılım programından elde edilen verilerle birlikte değerlendirildiğinde yine en iyi sonuç 5 nolu kesite aittir. HEPA ile elde edilen sonuçlar keratin boyaları ile benzerdir.

Sonuç olarak HEPA ve keratin boyaları (HMWK, CK, CK7, CK20) ile ortak bazı veriler elde edilmiştir. Bu sitoplazmik boyalar ile yapılan boyama sonuçlarından elde edilen veriler birlikte değerlendirildiğinde, 5 nolu doku takibine ait kesitlerde optimal boyanma elde edilmiş olmasının yanısıra, boya kesitlerindeki hücrel morfolojinin okunaklığı ile hematoksilen ile kontrast boyanmanın da optimal oluşu dikkat çekicidir. 2, 3, 4, 7 ve 11 numaralı doku takiplerine ait kesitlerde de yine bu beş sitoplazmik boyanın hepsinde iyi sonuç elde edilmiştir. Bu bulgular İHK yazılım programı ile elde edilen verilerle de koreledir. Beş boyamanın hepsinde ortak olarak 10, 12, 13 nolu kesitlerde boyanma olmamış ya da fark edilir şekilde zayıf boyanma olmuştur. Ayrıca HMWK ve CK (deri) boyamaları ile ortak olarak 8 ve 9 nolu kesitlerde zayıf boyanma elde edilmiştir. Bu bulgular da yine program verileri ile koreledir (Şekil 21). Ek olarak, özellikle mide mukozasına ait CK boyamasında 6, 8, 9, 12 ve 13 nolu kesitlerde hücrel morfolojinin okunaklığındaki bozulma dikkat çekicidir.

Hem fotoğraflar, hem de verilerden görüldüğü gibi, bu beş sitoplazmik boya ile ortak şekilde, 5, 4, 3, 2, 7 ve 11 nolu kesitlerden en iyi sonuçlar; 10, 12, 13, 8 ve 9 nolu kesitlerde ise olumsuz sonuçlar elde edilmiştir. Boyamanın TMA yöntemi ile eşit koşulda uygulanmış olması ve sonuçların benzer sitoplazmik boyalar ile tekrarlanmış olması anlamlıdır. 2, 3, 4, ve 5 nolu takipler fiksatif olarak formalin içeren takiplerdir, ancak şeffaflandırıcı solüsyonları farklıdır. Örneğin 5 nolu doku takibi şeffaflandırıcı solüsyon olarak Sub-X içermektedir. Şeffaflandırıcı olarak Sub-X içeren diğer doku takibi olan ve fiksatif olarak Geenfix'in



HEP A için İHK yazılım programı HSCORE verileri

Takip No	HSCORE
1	131,3136
2	146,7747
3	162,1059
4	138,2643
5	182,4210
6	50,1435
7	160,5367
8	83,1435
9	10,4790
10	57,1341
11	161,4572
12	81,1036
13	7,3727

Şekil 24: HEP A, karaciğer dokusu (TMA/Kc): Bir başka sitoplazmik İHK'sal boya olan HEP A ile, 6, 9, 10, 12 ve 13 nolu kesitlerde olumsuz sonuç elde edildiği izlenmektedir. İHK yazılım programı ile elde edilen veriler de korele şekildedir. Bu sonuç keratin boyaları ile elde edilen sonuç ile benzerdir. 1-13: Doku takip numaraları.

kullanıldığı 13 nolu doku takibi ile elde edilen veriler, nükleer boyamalarda olduğu gibi 5 nolu takiple elde edilenden düşüktür. Benzer fark 3 (F,SK) ile 10 (Gly,SK); ve 4 (F,B) ile 12 (C,B) nolu doku takipleri arasında da mevcuttur.

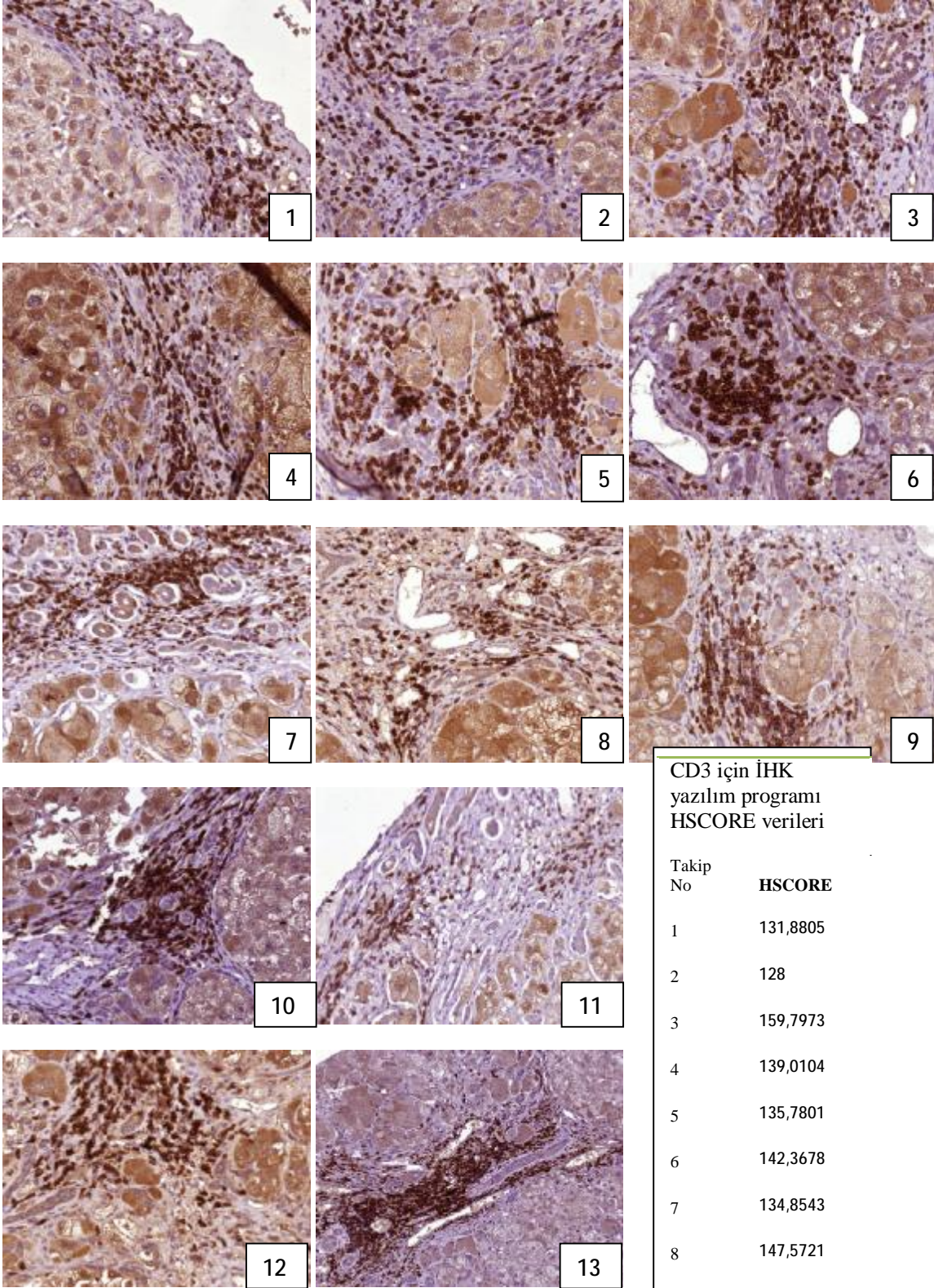
CD3, CD20, LCA, CD38: Bu boyamaların tümünde, tüm kesitlerde olumlu boyanma elde edilmiştir. CD3 İHK'sal boyama ile T lenfositlerin (Şekil 25), CD20 İHK'sal boyama ile B lenfositlerin (Şekil 26), LCA ile tüm lenfositlerin (Şekil 27) ve CD38 ile plazma hücrelerinin spesifik olarak ve uygun boyanma şiddeti ile boyandığı görülmüştür. Boyanmanın olmadığı kesit yoktur. CD38, CD20 ve LCA ile nonspesifik zemin boyanma izlenmezken, CD3 ile tüm kesitlerde, hepatositlerde bir miktar hafif sitoplazmik boyanma olmuştur. Ancak bu değerlendirmeyi olumsuz etkileyecek derecede değildir.

KromograninA: Her 13 farklı doku takibine ait kesitte, CGA İHK'sal boyama ile glandüler epitelde, sekretuar hücreler arasında mevcut olan nöroendokrin hücrelerin spesifik ve uygun boyanma şiddeti ile boyandığı izlenmektedir (Şekil 28). Boyanmanın olmadığı ya da değerlendirmeyi olumsuz etkileyecek herhangi bir nonspesifik zemin boyanmanın olduğu kesit yoktur. 1 nolu kesit olmadığından değerlendirilememiştir.

Melan-A: Özellikle 1 ve 10 nolu takiplere ait kesitlerde boyanma şiddeti düşük olarak izlenmektedir (Şekil 29). HMB45 ile de aynı bulgu elde edilmiştir.

Kappa-lambda: Teknik nedenlerle bu boyalar ile sağlıklı boyanma elde edilemediğinden değerlendirme yapılmamıştır.

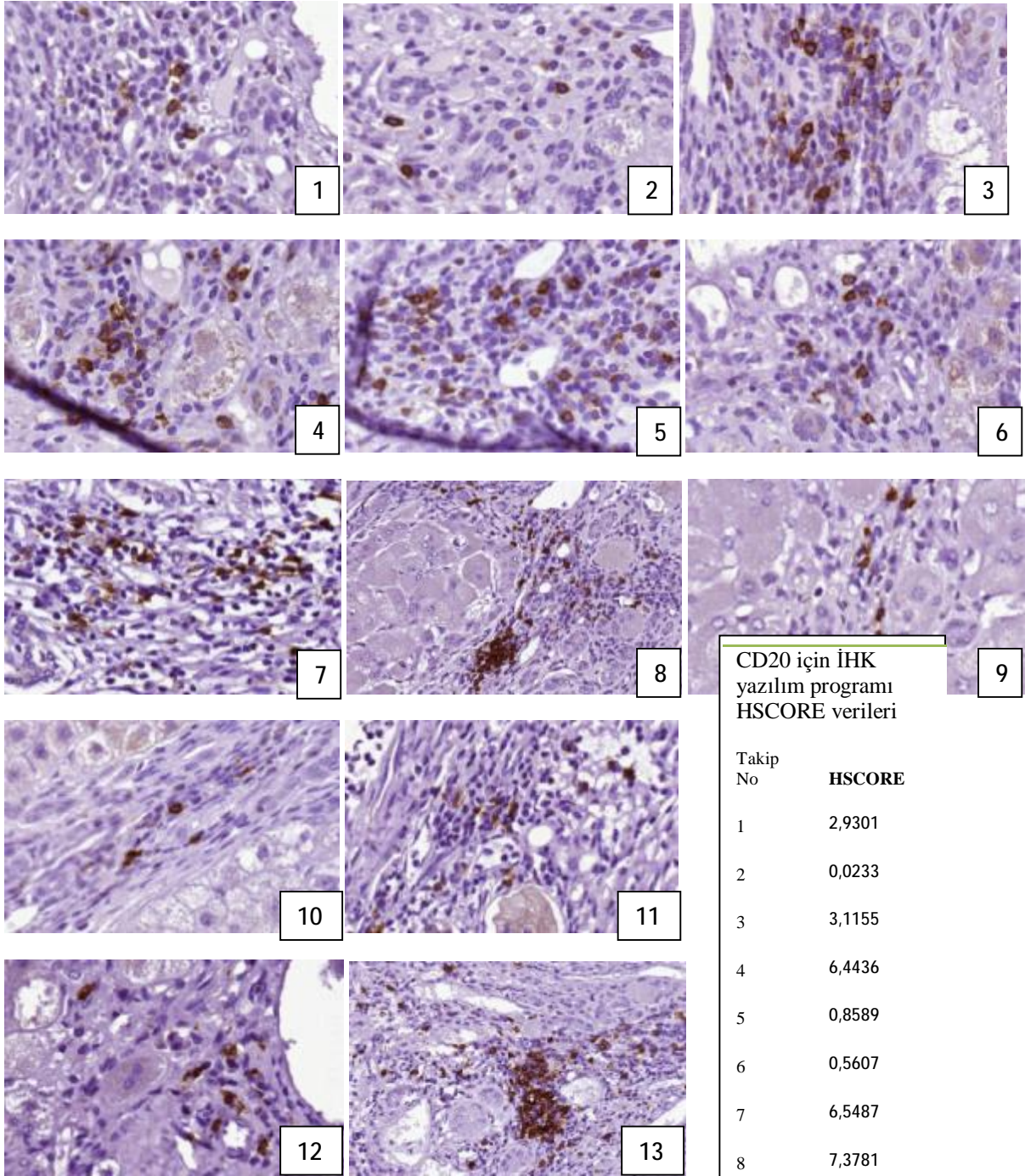
CD117: Deri ve mide mukoza doku örneklerinden oluşan TMA kesitine uygulanmıştır. Deri dokusuna ait kesitlerin tümünde CD117 ile epidermiste melanositlerde, dermiste ise mast hücrelerinde ve perivasküler hücrelerde boyanma izlenmiştir. 7 ve 11 nolu kesitlerde ayrıca keratinositlerde de benzer şekilde nükleer boyanma olmuştur. Mide mukozasına ait kesitlerde ise yüzeysel foveoler epitel boyanmazken, kriptlerde ve bez epitel hücrelerinde sitoplazmik boyanmanın olduğu görülmüştür.



CD3 için İHK
yazılım programı
HSCORE verileri

Takip No	HSCORE
1	131,8805
2	128
3	159,7973
4	139,0104
5	135,7801
6	142,3678
7	134,8543
8	147,5721
9	133,4583
10	113,6922
11	129,7465
12	157,9426
13	127,1582

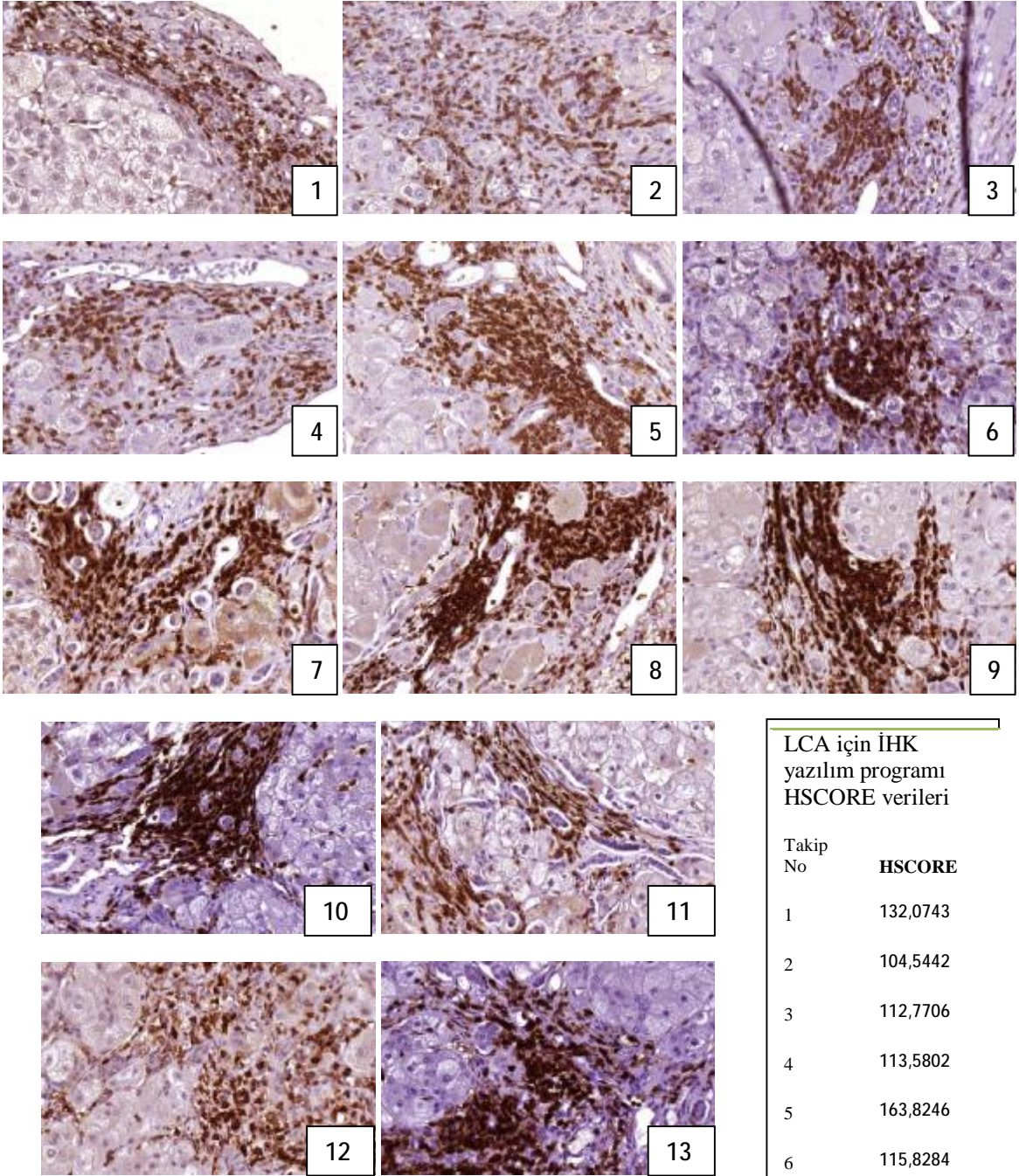
Şekil 25: CD3, sirotik karaciğer parankimi (TMA/Kc)



CD20 için İHK yazılım programı HSCORE verileri

Takip No	HSCORE
1	2,9301
2	0,0233
3	3,1155
4	6,4436
5	0,8589
6	0,5607
7	6,5487
8	7,3781
9	26,2295
10	0
11	4,5102
12	0
13	10,0091

Şekil 26: CD20, sirotik karaciğer parankimi (TMA/Kc).

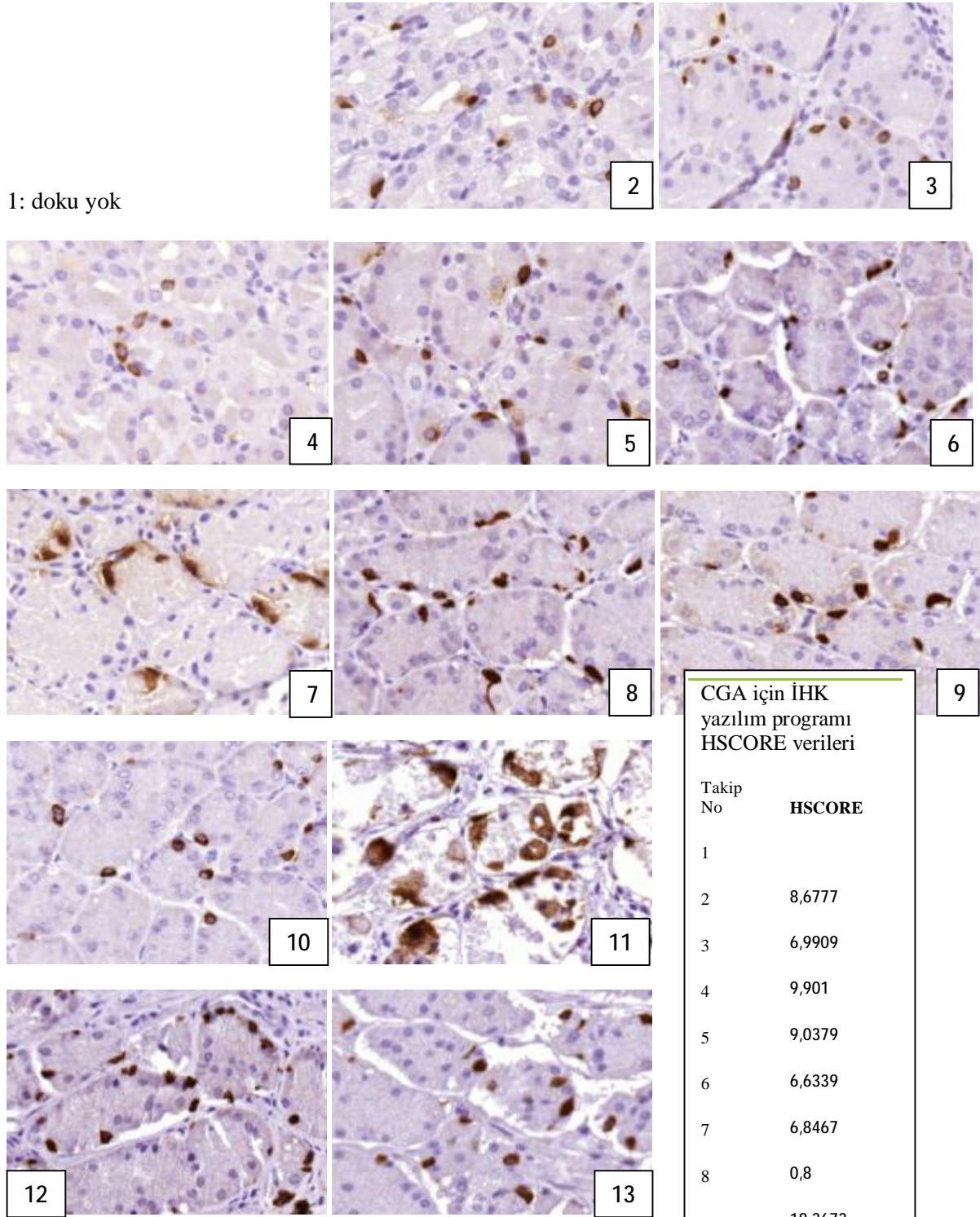


Şekil 27: LCA, sirotik karaciğer parankimi (TMA/Kc).

LCA için İHK
yazılım programı
HSCORE verileri

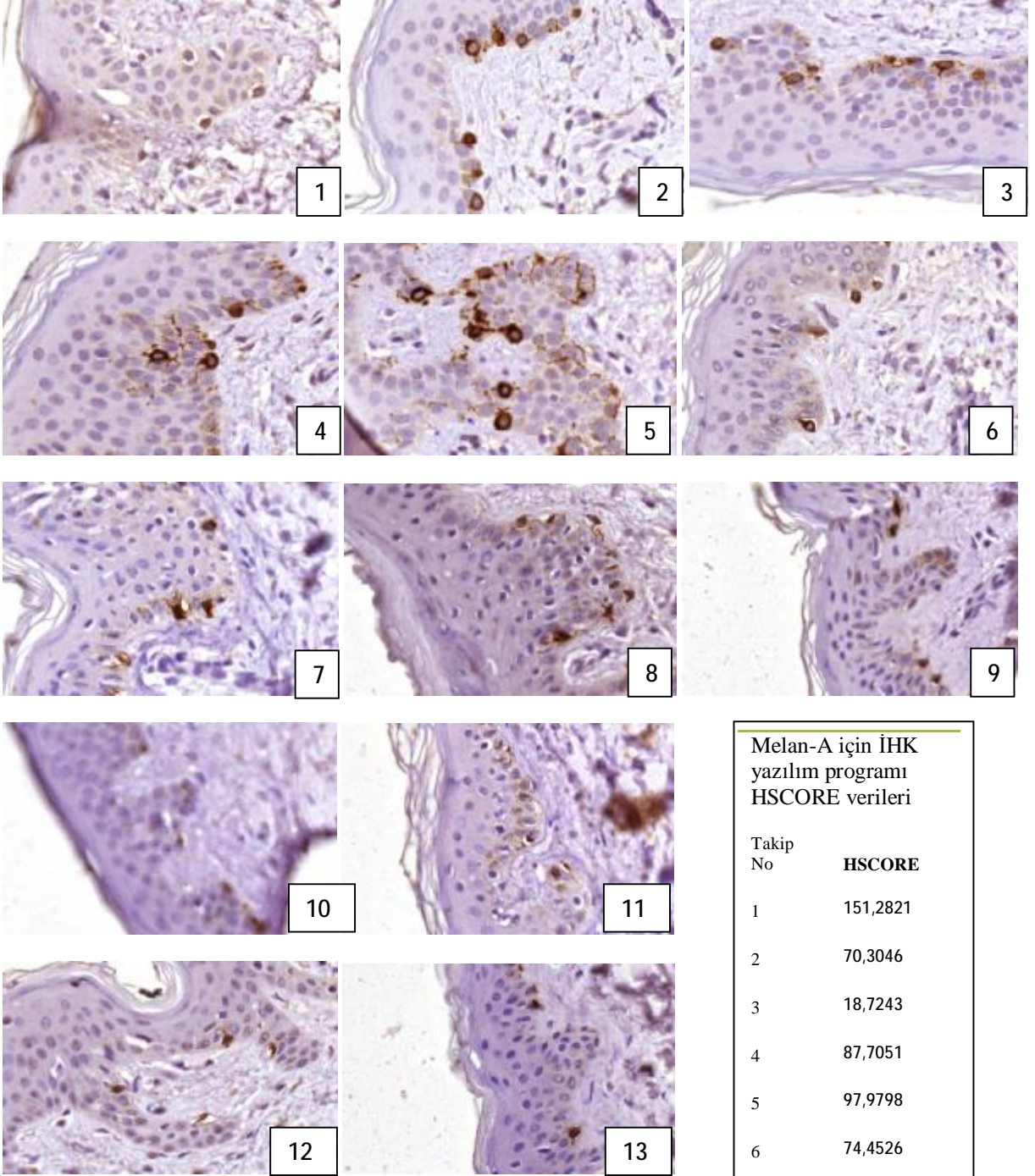
Takip No	HSCORE
1	132,0743
2	104,5442
3	112,7706
4	113,5802
5	163,8246
6	115,8284
7	151,9735
8	142,3301
9	131,9905
10	103,5181
11	144,9318
12	140,2141
13	98,2568

1: doku yok



CGA için İHK yazılım programı HSCORE verileri	
Takip No	HSCORE
1	
2	8,6777
3	6,9909
4	9,901
5	9,0379
6	6,6339
7	6,8467
8	0,8
9	18,3673
10	1,1173
11	6,9387
12	1,2245
13	0,5747

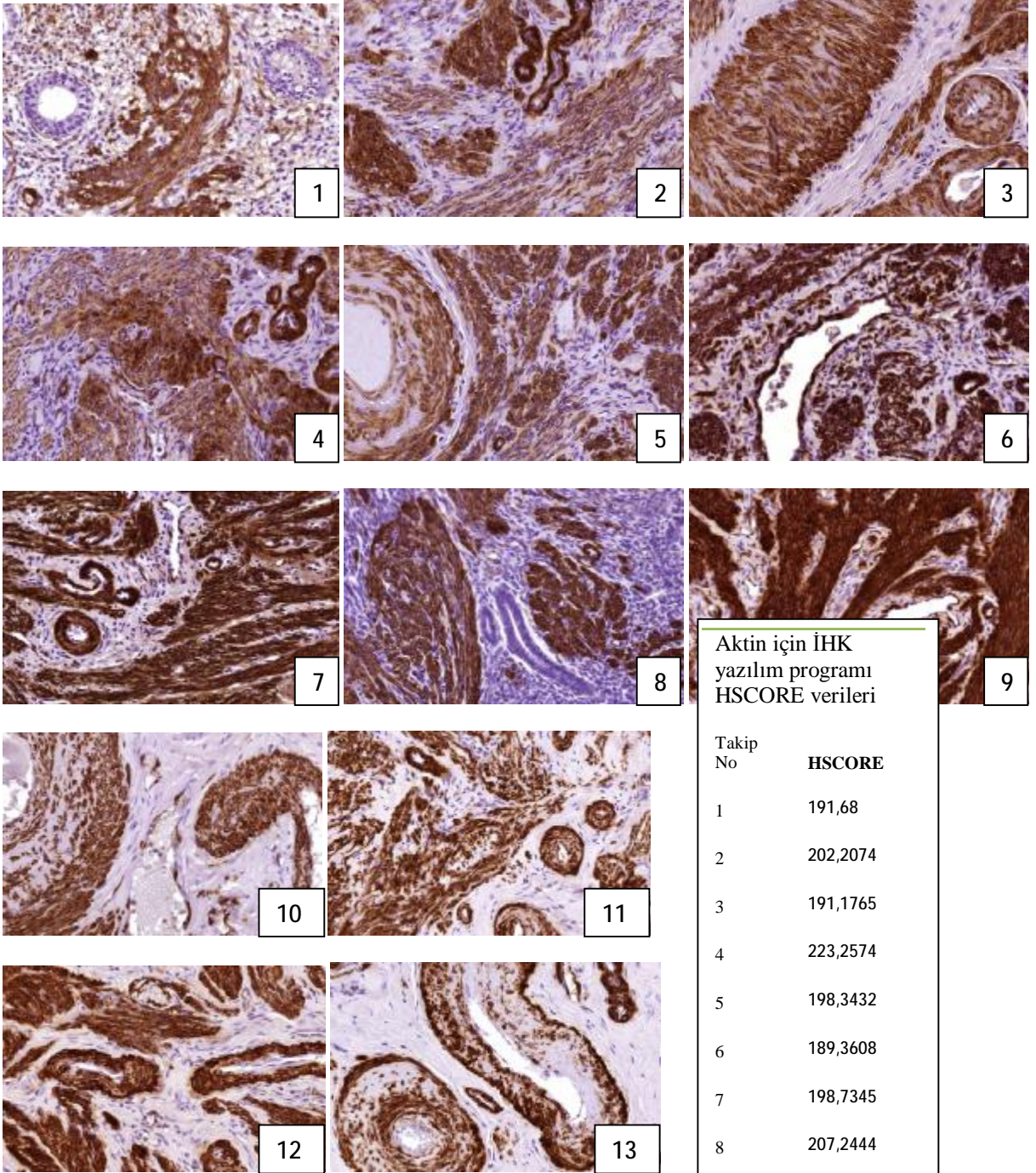
Şekil 28: CGA, mide mukozası (TMA/D-M)



Şekil 29: Melan-A, deri dokusu (TMA/D-M): 2, 3, 4 ve 5 nolu kesitlerde boyanma şiddetine, boyanan melanositlerin dendritik uzantılarının net bir şekilde izleniyor oluşuna, hematoxilen ile kontrast boyanmaya ve hüresel morfolojinin okunaklığına dikkat ediniz. Diğer kesitlerden özellikle 1 ve 10 nolu takiplere ait kesitlerde boyanma şiddeti düşük olarak izlenmektedir. HMB45 ile de aynı bulgular elde edilmiştir.

Melan-A için İHK yazılım programı HSCORE verileri

Takip No	HSCORE
1	151,2821
2	70,3046
3	18,7243
4	87,7051
5	97,9798
6	74,4526
7	107,267
8	108,816
9	45,679
10	4,8193
11	46,7341
12	48,6207
13	107,212



Aktin için İHK yazılım programı HSCORE verileri

Takip No	HSCORE
1	191,68
2	202,2074
3	191,1765
4	223,2574
5	198,3432
6	189,3608
7	198,7345
8	207,2444
9	226,7276
10	126,1438
11	140,2673
12	176,1132
13	203,2483

Şekil 30: Aktin, Uterus doku kesiti (TMA/A-U)

PCEA: En iyi sonuçlar 2,3,4,5 nolu kesitlerde izlenmiştir.

Vimentin, Aktin (Şekil 30), **Desmin, Caldesmon, CD34, CD10, S100:** Tüm kesitlerde olumlu boyanma izlenmiştir.

CISH Analizi

Bu yöntemde denatürasyon ardından, HER2 probu ile hibridizasyon uygulanmakta ve bu hibridize olan alanlar kromojenik olarak belirlenmektedir. Bu şekilde hücre nükleusundaki HER2 gen bölgesi, IM altında küçük kahverenkli bir nokta şeklinde izlenir. Normal hücrede ya da tümör hücresinde tek nokta yuvarlak, düzgün şekillidir. Eğer hücrede bu gende amplifikasyon/overekspresyon var ise, hücre nükleusundaki nokta sayısı artmış olarak izlenecektir. Amplifikasyon varlığının değerlendirme kriterleri, çalışmada kullanılan İnvitrogen “SPOT-Light HER2 CISH Kit”inde aşağıdaki gibi belirtilmektedir:

Amplifikasyon

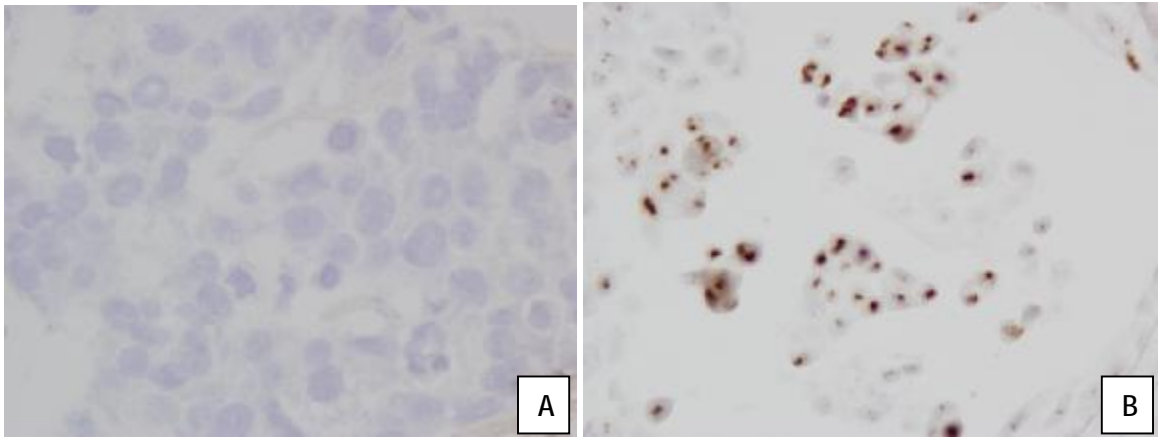
- **Yüksek amplifikasyon:** Kanser hücrelerinin %50’den fazlasında, her bir nükleusta, 10’dan fazla sayıda nokta ya da geniş kümeler ya da multipl nokta ve geniş küme karışımı şeklinde HER2 gen varlığı ile belirlenir. Buradaki geniş küme tanımı, aynı kesitteki normal epitelyal hücre ya da tümör hücresindeki tek bir nokta referans alındığında, bu tek nokta çapının en az 5 katı büyüklükte, irregüler şekilli sinyal kümesine karşılık gelmektedir.
- **Düşük amplifikasyon:** Kanser hücrelerinin %50’den fazlasında, her bir nükleusta, 5-10 adet nokta ya da küçük kümeler ya da noktalar ile küçük kümelerin karışımı şeklinde HER2 gen varlığı ile belirlenir. Buradaki küçük küme tanımı, aynı kesitteki normal epitelyal hücre ya da tümör hücresindeki tek bir nokta referans alındığında, bu tek nokta çapının 3-5 katı büyüklükte, düzensiz şekilli sinyal kümesine karşılık gelmektedir.

Non-amplifikasyon

- **Polizomi:** Kanser hücrelerinin %50’den fazlasında, her bir nükleusta, 3-5 nokta şeklinde HER2 gen varlığı ile belirlenir.
- **Diploidi:** Kanser hücrelerinin %50’den fazlasında, her bir nükleusta, 1-2 nokta şeklinde HER2 gen varlığı ile belirlenir.

Değerlendirmede 30 hücre nükleusundaki nokta sayısı, küçük/geniş sinyal kümesi varlığı (küçük küme=5 nokta, geniş küme=10 nokta) değerlendirilir ve ortalama hesaplanır. Ortalama 4-6 nokta ise; bir başka 30 hücre grubu daha değerlendirilir. Ortalama <4 ya da >6 ise başka bir hücre grubu değerlendirmesine gerek yoktur. Amplifikasyon var ya da yok şeklinde rapor edilir.

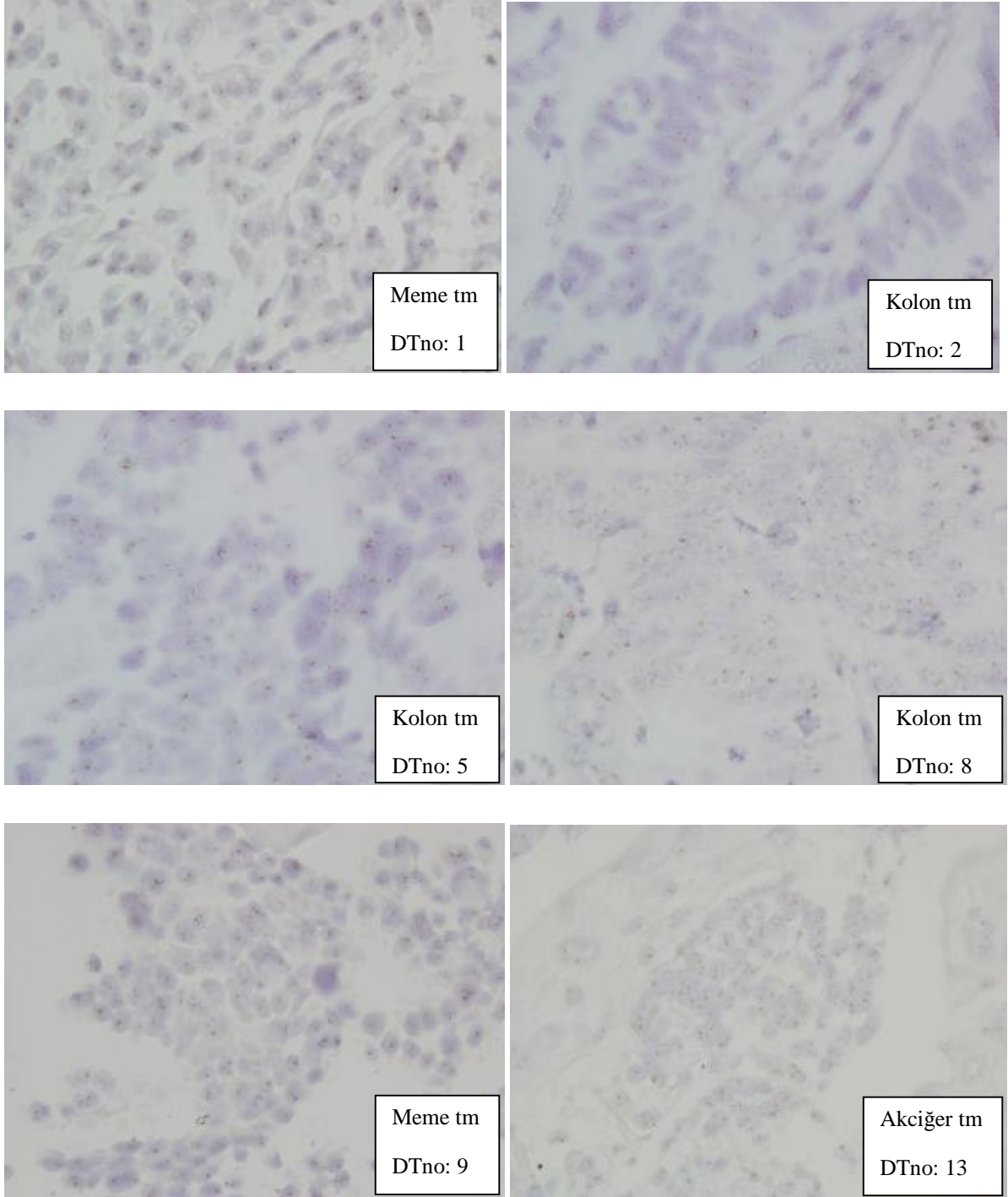
Çalışmamızda CISH yöntemi meme, kolon ve akciğere ait olmak üzere üç tümör dokusunda uygulandı. Değerlendirme yukarıda belirtilen kriterlere göre yapıldı. Kullandığımız pozitif ve negatif kontrolümüz, kendi arşivimize ve 2011 yılına ait, İHK'sal olarak cerbB2 ++ ve FISH pozitif olduğu bilinen meme tümör dokusuna aitti. Negatif kontrolde, beklendiği gibi hücre nükleuslarında sinyal izlenmedi (Şekil 31-A). Pozitif kontrolde ise hücre nükleuslarında beklendiği gibi yüksek amplifikasyon ile uyumlu sinyaller izlendi. Tümör hücrelerinin %50'sinden fazlasında, tek nokta ile kıyaslandığında bunun en az 5 katı büyüklükte, irregüler şekilli, 4'lük büyütmede dahi dikkati çeken HER2 gen kümeleri mevcuttu (Şekil 31-B).



Şekil 31: CISH. Negatif ve pozitif kontrollerde boyanma. (A) Negatif kontrol. (B) Pozitif kontrol.

13 farklı doku takibi uyguladığımız aynı tümör dokusuna ait örneklerden hazırlanan TMA'lardan (meme, kolon ve akciğer tümör dokularına ait üç ayrı TMA) elde edilen kesitlerde de kromojenik boyanma açısından olumlu sonuç elde edilmiştir. Boyanmanın izlenmediği kesit olmamıştır. Doku örneklerinin tümünde, tümör hücrelerinin %50'den fazlasında 2 nokta izlenmiştir. Kesitlerin hemen tümünde sinyalin okunaklılığı, zeminin

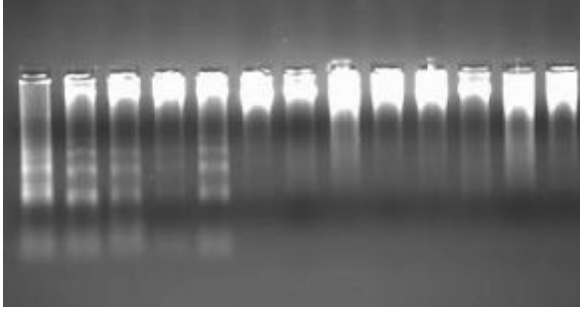
kontrastı benzer ve iyi özelliktedir (Şekil 32). Sadece 7 ve 11 takip nolu doku örneklerinde sinyaller soluk, zemin kontrast boyanma yetersiz özelliktedir.



Şekil 32: CISH ile elde edilen sonuçları gösteren bazı örnekler.

Moleküler Analiz

DNA Analizi

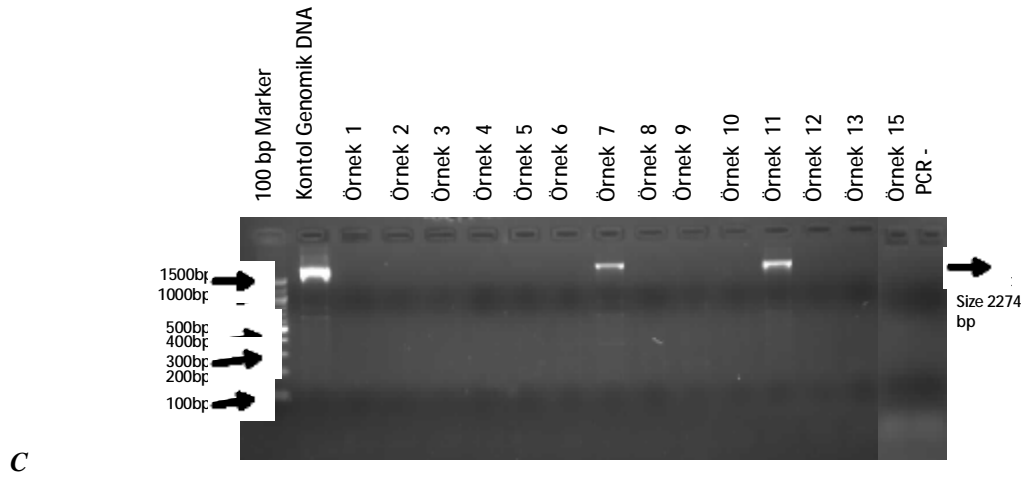
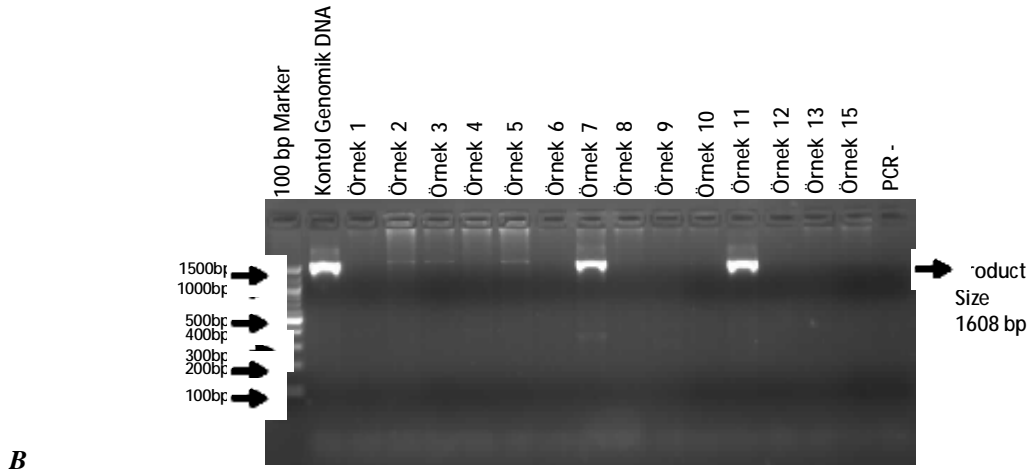
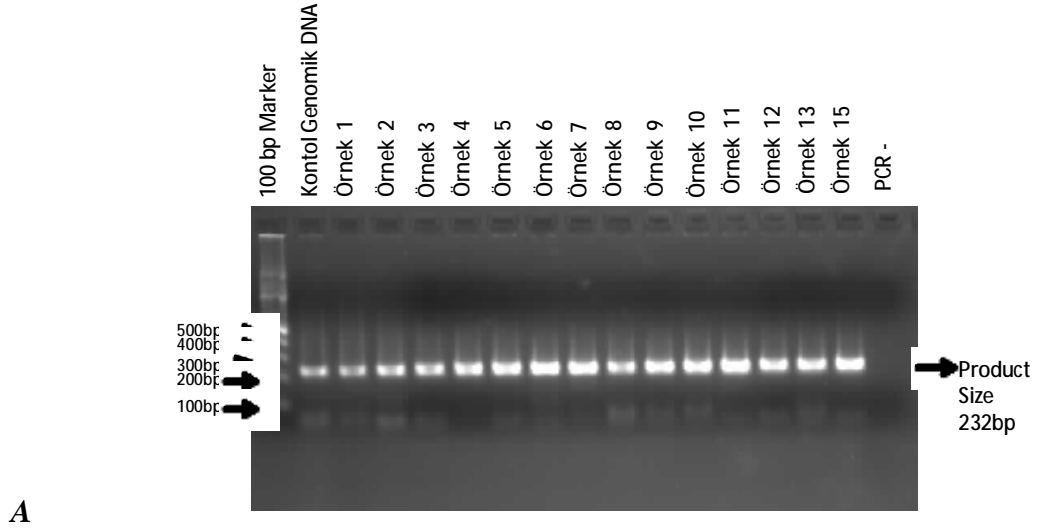


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

Şekil 33: Farklı fiksatifler ve farklı şeffaflandırıcılar ile oluşturulan farklı doku takiplerinin eşit koşullarda uygulandığı kolon tümör dokusu örneklerinden, ekstraksiyon sonrası elde edilen DNA kalitesinin, agaroz jel elektroforezi ile analizi ve karşılaştırılması. Her örnek %1'lik agaroz jele yüklendi ve DNA etidyum bromid boyama ile görüntüledi. 1-13: doku takip numaralarıdır.

Farklı doku takipleri uyguladığımız kolon tümör dokusu örneklerindeki DNA kalitesi jel elektroforezi ve PCR amplifikasyonu ile değerlendirildi. Jel elektroforez görüntüleme ile, 1 numara hariç diğerlerinde DNA kalitesinin iyi olduğu gözlemlendi (Resim 33). Özellikle 6-13 nolu doku takiplerine ait örneklerde, 1-5 nolu doku takiplerinden farklı olarak, DNA'ların aynı hızda tek kalın bir bant şeklinde olduğu, uzak bantların dolayısıyla çok küçük fragmanların olmadığı görüldü. Bu açıdan jel elektroforez ile, alternatif fiksatiflerle fikse edilen dokulardaki DNA kalitesi, formalin ile fikse edilenlere üstün bulundu. DNA örneklerinde standart PCR amplifikasyonu ile üç ayrı bölge amplifiye edildi (Resim 34). Amplifiye edilen DNA fragmanları 232bp, 1608 bp ve 2274 bp uzunluğunda olup, sadece 232 bp uzunluğundaki fragmanın tüm örneklerde amplifikasyonu gerçekleşti. Ancak, alternatif fiksatiflerle fikse dokulardan elde edilen DNA'nın PCR amplifikasyonu da, formalin ile fikse olanlardan daha güçlü sinyal verdi (Şekil 34A). 1608 bp büyüklüğündeki fragmanın 7 ve 11 numaralı örneklerde kontrol genomik DNA'dakine benzer şekilde amplifiye olduğu izlendi (Şekil 34B). Ayrıca zayıf olmakla birlikte 2, 3 ve 5 nolu örneklerde de bir miktar amplifikasyon gerçekleşti. 2274 bp büyüklüğündeki fragmanın amplifikasyonu ise, yalnız 7 ve 11 numaralı örneklerde gerçekleşti (Şekil 34C).

Şekil 34: Farklı fiksatifler ve farklı şeffaflandırıcılar ile oluşturulan farklı doku takiplerinin, eşit koşullarda uygulandığı kolon tümör dokusu örneklerinde, DNA kalitesinin PCR-bazlı analizi.



RNA Analizi

RNA kalitesi kandan izole edilen RNA ile birlikte örneklerin elektroforezi yapılarak değerlendirildi. Kandan izole edilen RNA da 28S ve 18 S'lik alt birimler net olarak görülürken parafine gömülmüş dokulardan izole edilen RNA lar jelde smear şeklinde gözlenmektedir.

TARTISMA

Klinik uygulamada, biyopsiler ve cerrahi rezeksiyon spesmenleri, otolizi ve pütrefaksiyonu önlemek için mümkün olan en kısa sürede fikse edilir ve parafin içine gömülürler. FFPG, dünya genelinde patoloji bölümlerinde uygulanan rutin doku takip metodudur. Fiksasyon, dokunun yapısal ve fonksiyonel komponentlerinin canlı haline mümkün olan en yakın şekliyle korunmasını sağlayan, dokuda ve hücredeki makromoleküllerin kompleks kimyasal modifikasyonlarını içeren bir yöntemdir. Formalin çapraz bağlanma oluşturan bir fiksatif olup, proteinler-arası metilen köprüleri oluşumuna ve eğer yeterli şekilde tamponlanmaz ise ortaya çıkan formik asit yoluyla nükleik asit fragmantasyonu ve degradasyonuna neden olur (14, 15).

Fiksasyon için kullanılan formalin ve başlıca doku takibinde şeffaflandırıcı solüsyon olarak kullanılan ksilen, günlük patoloji laboratuvar uygulamaları sırasında yoğun olarak maruz kalınan önemli kimyasal solüsyonlardır. Kimyasal maddelerin akut ve/veya kronik toksik etkileri yanısıra mutajenik, teratojenik ve karsinojenik etkileri de vardır. IARC (The International Agency for Research on Cancer) çalışma grubu kimyasal maddeleri, karsinojenik etkileri açısından, deneysel ve epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına dayanarak dört gruba ayırmaktadır. Grup 1'de yer alan kimyasal maddeler, insanda karsinojenik etkisi olduğu kesin gösterilen maddelerdir. Grup 2'de yer alan maddeler ise 2A ve 2B olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Grup 2A'da yer alan kimyasal maddeler insanlarda muhtemelen karsinojenik etkili maddeler iken, grup 2B dahilindeki maddeler ise insanlarda olası karsinojenik etkiye sahiptir. Grup 3'de yer alan maddelerin insanlarda karsinojenik etki oluşturduğuna dair yeterli kanıt bulunmamaktadır. Grup 4'ü insanlarda muhtemelen karsinojenik etki oluşturmayan maddeler oluşturmaktadır (6).

Ksilen, Grup 3 kategorisinde yer almaktadır. 1997 yılına dek IARC Grup 2A kategorisinde bulunan formaldehit ise, laboratuvar yanısıra, sanayi, kozmetik, giyim, kimya ve gıda sektöründe artan kullanımı ve buna ikincil yapılan çalışmalardan elde edilen dökümantasyonların sonuçlarıyla (16), 2004 yılında IARC çalışma grubu tarafından Grup 1 kategorisine alınmış ve dikkatleri üstünde toplamıştır (6). Formaldehit, Grup 1 kategorisinde, nazofarengeal kansere ve olasılıkla lösemiye neden olan karsinojen olarak sınıflandırılmaktadır (8, 17). Bu nedenle birçok Avrupa ülkesinde formaldehit kullanımı

sınırlandırılmıştır. Avrupa Birliği'nin, formaldehit kullanımını tamamen yasaklaması da olasıdır.

İdeal fiksatif, düşük toksisiteli olmalı, H&E boyama ile optimal histomorfoloji sunmalı, HK'sal ve İHK'sal boyama yöntemleri ile uyumlu olmalı ve moleküler analiz için DNA-RNA geri kazanımına izin vermelidir. Formalinin moleküler çalışmalar açısından dezavantajları ve insan sağlığı için bir risk faktörü oluşu gibi son zamanlarda ön plana çıkan olumsuz özellikleri, araştırmacıları düşük toksisiteli ve nükleik asit korunumu açısından ideal yeni bir fiksatif arayışına yöneltmiştir. Ticari olarak satışa sunulan çok sayıda alternatif fiksatif mevcuttur. Formaline alternatif fiksatifler, ya formaldehit-dışı bir aldehit komponenti içerirler ya da hiç aldehit komponenti içermezler (alkolik fiksatifler; Fine-FIX[®], UMFix[®], Carnoy fiksatif, Methacarn vb.) (18). Dolayısıyla kullanımlarının, laboratuvar personeli formaldehit maruziyetinden elimine etmesi beklenir. Ancak bu solüsyonların formalinin yerini alabilmesi için, birçok açıdan değerlendirilmeleri, formalin ile ve birbirleri ile kıyaslanmaları gereklidir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, formalinin bir ya da birkaç alternatif fiksatifle, bir ya da birkaç parametre açısından (çoğunlukla moleküler) karşılaştırıldığı görülmektedir. Çalışmaların özellikle moleküler etkilere yoğunlaştığı dikkati çekmektedir. Çalışmaların çoğunda, formaline alternatif fiksatiflerin moleküler metodların kullanımını açısından formalinden üstün oldukları gösterilmiştir. Ancak formaline alternatif fiksatiflerin rutin patoloji uygulamasında kullanılan prosedürler ile ne derece uyumlu oldukları daha az irdelenmiştir. Yine yapılan çalışmaların, akciğer kanserinde (15, 19), kolon kanserinde (20), efüzyonlar ve ince iğne aspirasyonlarında (21), tiroid dokusunda (22), karaciğer dokusunda (23), normal kolon mukoza örneklerinde (24) gibi değerlendirmeyi tek doku tipinde sınırladığı görülmektedir. Ayrıca bu ideal fiksatif arayışı, ksilen alternatiflerini geri planda bırakmıştır.

Biz de çalışmamızda, formalin yanı sıra Türkiye'de ticari olarak satışa sunulan formaline alternatif dört farklı fiksatif (Tablo 11), ksilen yanı sıra yine Türkiye'de ticari olarak satışa sunulan üç farklı ksilene alternatif şeffaflandırıcı ajanı (Tablo 12) kullanarak, 13 farklı doku takibi oluşturduk. Doku takiplerini, diğer çalışmalardan farklı olarak daha fazla doku çeşidi (serviks, uterin korpus, over, rektum, yağ doku, safra kesesi, deri, mide, akciğer, sigmoid kolon tümör dokusu, akciğer tümör dokusu ve meme tümör dokusu) üzerinde uyguladık. Bu doku takiplerinin kesit kalitesi, doku morfolojisi; patoloji laboratuvarlarında

yaygın olarak kullanılan HK'sal ve İHK'sal boyamalar; ISH, PCR gibi daha ileri inceleme yöntemleri üzerine etkilerini araştırıp karşılaştırdık.

Çalışmamızda formalin yanı sıra, Türkiye'de ticari satışa sunulmuş olan, formaldehit içermeyen dört farklı alternatif fiksatif kullanıldı. Bunlar içerisinde FineFIX[®], dünya genelinde üzerinde en çok çalışılan fiksatifdir (Tablo 13). Formülü patentlidir. Formalinsiz, su bazlı, konsentre bir solüsyon olup, kullanıma hazır değildir. Etanol ile dilüe edilerek kullanılır (1 birim FineFIX[®], 3 birim %98'lik etanol ile karıştırılır). Formaldehit yanı sıra, asetik asit de içermez. Toksisitesi daha düşüktür. Yapılan çalışmalarda histomorfolojik açıdan ve boyamalar açısından formalinle belirgin fark gözlenmemişken, özellikle moleküler korunma açısından formalinden üstün olduğu görülmüştür (22). Glyo-Fixx[®] aldehit grubu bir fiksatif olup, formaldehit yanı sıra metanol de içermez. Etken maddesi Glyoxal'dir. Önemli bir ticari fiksatif olan Glyoxal, moleküller arası köprüler oluştursa da, formaldehitte olduğu gibi çapraz bağ oluşturmaz (28). Literatürde Glyo-Fixx[®]'in de kullanıldığı üç yayın mevcuttur (Tablo 12). Greenfix[®] ve Cell-block[®] ise, Glyo-Fixx[®] gibi, formaldehit içermeyen aldehit grubu fiksatiflerdir. Literatürde bu iki fiksatifin kullanıldığı yayın mevcut değildir. Formalinin göze ve respiratuar mukozaya akut iritan etkisi, patologlar ve teknisyenler tarafından iyi bilinen bir dezavantajdır. Çalışmamızda kullandığımız bu dört alternatif fiksatif ile, rahatsız edici koku ve iritan etkiler açısından olumsuz bir etki saptanmamıştır. Çalışmamızda alternatif fiksatifler yanısıra, ksilene alternatif, daha az toksik etkili olan üç farklı şeffaflandırıcı solüsyon da kullandık. Literatürde ksilen alternatifleri ile ilgili yayınlar oldukça kısıtlıdır. Kullandığımız alternatif şeffaflandırıcılardan Shandon Xylene Substitute[®] kokusuz olması açısından diğerlerinden farklıdır.

Tablo 11. Bildiğimiz formalin ve çalışmada kullanılan alternatif fiksatiflerin üretici firmalar tarafından sunulan özellikleri (F: Formalin)

Fiksatif	FORMALİN	CELL-BLOCK	GLYO-FIXX	GREENFIX	FINEFIX
Etken madde	Formaldehit	Glyoxal	Glyoxal	Ethandial	Etanol ile dilüe edilen patentli formül
Avantaj	<ul style="list-style-type: none">- Deneyim, tecrübe- Bütün üretilen antikolarlar FFPGD için uygun- Proteinlerin sekonder yapısını korur- Arşivlenen blok ve lamaların hemen tümü ve histopatoloji makalelerinin çoğu FFPGD’lar üzerine- Kullanıma hazır- Ucuz- Lipid koruma	<ul style="list-style-type: none">- Formaldehit içermiyor- F gibi aldehit tipi fiksasyon- F göre daha az uçucu- Etki mekanizması formaldehit ile aynı- Kullanıma hazır- Yanıcı değil	<ul style="list-style-type: none">- Formaldehit içermiyor- F gibi aldehit tipi fiksasyon- Karsinojen değil- İritan etkili değil- F göre daha az uçucu- Rahatsız edici koku yok- Çevreye dost- Hücrel morfoloji daha iyi- Çalışma protokolünde değişiklik gerektirmiyor- Çapraz bağ oluşturmaz- Kullanıma hazır- Yanıcı değil	<ul style="list-style-type: none">- Formaldehit içermiyor- Metanol içermiyor- F gibi aldehit tipi fiksasyon- Toksik/zararlı değil- Kokusuz- Daha az uçucu- İritan değil- Yanıcı değil- Karsinojen değil- Çalışma protokolünde değişiklik gerektirmiyor- Doku takibinin diğer solüsyonları (alkol, ksilen) ile uyumlu- Dilüsyon gerektirmez, ürün kullanıma hazır- Kullanımı formalin gibi- Morfoloji, formalin ile kıyasla daha yüksek kalitede- Proteaz ve retrieval kullanılmaması öneriliyor	<ul style="list-style-type: none">- Formaldehit içermiyor- Asetik asit içermiyor- Düşük toksisite- Rutin histolojik uygulamalar için uygun- Moleküler analiz için uygun- Şpsemi hafifçe sertleştirerek, makroskopik örneklemeyi kolaylaştırır- F ile fiske spesmenlerdeki gri renk değişikliği izlenmez- Lenf nodları daha kolay diseke edilir ve kesit yüzlerinde parankim daha rahat seçilir
Dezavantaj	<ul style="list-style-type: none">- Karsinojen- Keskin koku- Toksik- İritan- Yavaş fiksasyon- Düşük moleküler korunma- HER2 FISH sonucunu olumsuz etkileme	<ul style="list-style-type: none">- Az deneyim- Teklikeli-zararlı- Mutojen- İritan- Ekotoksisite: bilinmiyor	<ul style="list-style-type: none">- Az deneyim- Teklikeli-zararlı- Mutojen- İritan- Ekotoksisite: bilinmiyor	<ul style="list-style-type: none">- Az deneyim- Kan hücreleri net değil/görünmez	<ul style="list-style-type: none">- Kullanıma hazır değil. Etanol ile karıştırılarak hazırlanır.- Çalışma protokolünde değişiklik: fiksasyon için önerilen sıcaklık 50C

Tablo 12: Bildiğimiz ksilen ve çalışmada kullanılan diğer alternatif şeffaflandırıcıların üretici firma tarafından sunulan özellikleri

Şeffaflandırıcı	KSİLEN	SHANDON XYLENE SUBSTITUTE	BIO-CLEAR	SUB-X
Etken madde		Alifatik hidrokarbon	Terpenik orjinli	Alifatik hidrokarbon
Avantaj	<ul style="list-style-type: none">- Bilinen ürün- İyi kalitede ürün	<ul style="list-style-type: none">- Düşük toksisite- Düşük buharlaşma- aromatik değil- Kokusuz- Deriye iritan değil- buharlaşma hızı ksilen ile aynı (kesitler hızlı kurur)- Yağsız- kullanıma hazır	<ul style="list-style-type: none">- Düşük toksisite- Düşük buharlaşma- Düşük yanıcılık- Ozon tabakasına zararsız	<ul style="list-style-type: none">- Aromatik değil, alifatik
Dezavantaj	<ul style="list-style-type: none">- Kötü koku- Zararlı- Şüpheli kanserojen- Tehlikeli atık olarak sınıflandırılır- Dermatite neden olur ve deriyi penetre eder	<ul style="list-style-type: none">- Yanıcı- Zararlı içerik: Alifatik hidrokarbon	<ul style="list-style-type: none">- Az deneyim- Zararlı içerik: D-Limonene- İritan- Tehlikeli atık- Balıklar ve suda yaşayan diğer organizmalara oldukça toksik- Daha pahalı	<ul style="list-style-type: none">- Yanıcı- Zararlı içerik: Alifatik hidrokarbon

Tablo 13: Formalinin, çalışmada kullanılan Fine-FIX® ile karşılaştırıldığı çalışmalar ve bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar

Formalin ile karşılaştırılan alternatif fiksatif/ler	Uygulanan yöntem/ler – karşılaştırılan parametre/ler	Sonuç	Kaynak
FINEFIX	İHK, DNA-RNA ekstraksiyonu ve amplifikasyonu, Western Blot analizi	FINEFIX > Formalin DNA analizi: Formalin fikse örnekten elde edilen en uzun amplikon 400 bps iken; Finefix ile fikse dokudan elde edilen en uzun amplikon 2400 bps. RNA analizi: formalin fikse dokudan elde olunan RNA uzunluğu yaklaşık 150 bps iken; finefix ile fikse dokudan elde olunan 600 bps.	20
FINEFIX	DNA ekstraksiyonu ve PCR	Morfoloji açısından Formalin > FineFIX Moleküler çalışma açısından FineFIX (248bps) > Formalin	25
FINEFIX	Sellüler morfoloji, nükleik asit kalitesi	FINEFIX > Formalin	21
FINEFIX, GLYO-FIXX, ExcellPlus, RCL2	Morfoloji, antijenisite, nükleik asit bütünlüğü	Histomorfolojik açıdan fark yok HK: fark yok İHK: F, FineFix, RCL-2 > ExcellPlus Moleküler: FINEFIX ve RCL2 > Formalin, ExcellPlus	22
FINEFIX, Methacarn	RNA analizi (RT-PCR, Northern Blot)	Methacarn, gen ekspresyon analizi için en uygun fiksatif ancak toksik Methacarn ve FineFIX, rRNA ve mRNA açısından daha koruyucu ve bu etki fiksasyon süresinden bağımsız	26
FINEFIX, RCL-2 ve HOPE	RNA, mikroRNA	RNA ve miRNA açısından, bu solüsyonlar Formaline üstün bulunmamış	15
FINEFIX, RCL-2 ve HOPE	Histomorfoloji İHK Western Blot	Formalinsiz fiksatifler, histomorfoloji ve protein korunumu açısından, rutin patoloji ve araştırmalarda formalinin yerini almaya aday	19
FINEFIX, RCL2, F-Solv	PCR, CISH, FISH	DNA ve RNA elde etme, kalitesi ve moleküler tanıma uygulanabilirlik açısından, alkol bazlı fiksatifler (FineFIX, RCL2), crosslinking fiksatiflere göre (NBF, F-Solv) daha iyi DNA: NBF ve F-Solv ile 300bp; FineFIX ve RCL2 ile 400bp	27

Tablo 14: Formalinin, Glyo-Fixx ile karşılaştırıldığı çalışmalar ve bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar.

Formalin ile karşılaştırılan alternatif fiksatif/ler	Uygulanan yöntem/ler – karşılaştırılan parametre/ler	Sonuç	Kaynak
GLYO-FIXX, FINEFIX, ExcellPlus, RCL2	Morfoloji, antijenisite, nükleik asit bütünlüğü	Histomorfolojik açıdan fark yok HK: fark yok İHK: F, FineFix, RCL-2 > ExcellPlus Moleküler: FINEFIX ve RCL2 > Formalin, ExcellPlus	22
GLYO-FIXX, NEO-FIX, HOPE	Protein tanıma	Morfolojik değerlendirme ve immünreaktivite aldehit bazlı fiksatiflerle fikse dokularda daha iyi. Non-aldehit bazlı fiksatiflerin kullanımı Western blot analizi ile daha yüksek verimde protein elde etmede avantaj sağlayabilir.	29
GLYO-FIXX, STFStreck, Omnifix, Histochoice, and HistoFix	Histomorfoloji	H&E boyalı kesitlerde histomorfolojik kalite açısından F diğerlerinden üstün bulunmuştur. Alternatif bir fiksatifin F'nin yerini alması durumunda, patoloğların kendilerinin bu farklı fiksatiflerle ilişkili mikroskopik detaylara alıştırmaları gereklidir.	30

Morfolojik tanıda en önemli noktalardan biri, benign ile malign dokuları ayırt etmektir. Bu ayırmadaki anahtarlar, dokuların organizasyon paternleri yanı sıra, şekil ve büyüklük farkları, nükleus/sitoplazma oranı, düzensiz kromatin yapısı ve nükleolün sayı, boyut ve rengi gibi nükleer özelliklerdeki farklılıklardır. Bu özelliklerin tümü %10NBF ile fikse ve H&E boyalı doku ile ilişkilidir (31). Patoloğların uzun yıllardır kazandıkları mikroskopik deneyim, formalin ile fikse doku kesitlerine aittir ve diğer fiksatiflerin sonucu olan morfolojik değişikliklere alışık değillerdir. Dolayısıyla eğer formalinin yerini yeni bir fiksatif alacak ise, elde edilecek histomorfolojik özelliklerin, formalin ile elde edilene eş ya da yakın olması beklenecektir. Histomorfolojik detayda meydana gelebilecek değişiklikler ya da olumsuzluklar, özellikle, formalin-ilişkili artefaktlar üzerinden hücrel değişikliklerin yorumlanmasında usta olan anatomik patoloğlar tarafından tepki alabilecektir (23).

Çalışmamızda kullandığımız farklı fiksatiflerle ve farklı doku takipleri ile elde ettiğimiz kesitler, mikroskopik olarak alışıl gelmiş morfolojiye benzer ya da daha iyi özellikte sonuç vermiştir. Değerlendirilen tüm parametreler, özellikle 6 ve 8 nolu doku takipleri ile optimale yakın özellikte bulunmuş ve hayranlık uyandırmıştır. Bu doku takiplerinin her ikisinde şeffaflandırıcı solüsyon olarak ksilol kullanılmış, ancak dokular formalin dışı alternatif bir

fiksatif ile fikse edilmiştir. 6 nolu takipte kullanılan Glyo-Fixx® ve 8 nolu takipte kullanılan Cell blok®, aynı etken maddeyi (Glyoxal) içeren aldehit türevi fiksatiflerdir. Glyo-Fixx® ile yapılan çalışmalarda genel olarak, morfolojik açıdan formaline benzer sonuç verdiği bildirilmektedir (22, 29). Wang YN ve arkadaşları, bu yıl yayınlanan çalışmalarında, formaldehit ve glyoxal fiksasyonunu farklı bir açıdan, histomorfometrik olarak karşılaştırmışlardır (32). Bu amaçla, plantar bölgeden örnekledikleri dokuda, deri kalınlığı, reteler arası indeks, elastik septa kalınlığı, adiposit alanı ve çapı gibi niceliksel ölçümler yapıp, formaldehit ve glyoxal açısından değerlendirmişlerdir. Belirgin bir fark saptamayarak, formalin fikse dokuda uygulanan ölçümlerin, glyoxal fikse dokularda da uygulanabileceğini belirtmişlerdir. Biz de çalışmamızda gördük ki, bu fiksatiflerle fikse ettiğimiz doku kesitleri, kesit kalitesi açısından (kesit bütünlüğünün tam olması, kesite bağlı artefaktların olmaması), dokunun yapısal morfolojisi açısından (dokuyu oluşturan farklı yapısal komponentlerin tek tek seçilebilirliği) ve hücresel detayların netliği açısından gerçekten de optimal özellikler taşımaktadır. Biz aynı etken maddeyi içeren aldehit türevi bu iki fiksatif ile elde edilen morfolojinin, formalin ile elde edilenden daha üstün olduğunu ve histomorfolojik açıdan formalinin yerini alabilecek güçlü adaylar olduğunu gördük.

Çalışmamızda kullandığımız, aldehit grubundan olmayan tek fiksatif olan FineFIX® ile de özellikle nükleer detay, sitoplazmik membran gibi özellikler açısından iyi kesitler elde edilmiş olmakla birlikte, diğerlerinden farklı olarak, saf etanolde olduğu kadar belirgin olmasa da bir miktar retraksiyon artefaktı izledik. Etanol, dokuyu proteinlerin çapraz bağlanması yoluyla korumadığından, bu fiksatiflerle ortaya çıkan morfoloji formalininki ile aynı değildir (23). FineFIX® büyük oranda etanol ile dilüe edilerek kullanılsa da, başarılı formülasyonu onu saf etanolden farklı kılmaktadır. Elde edilen kesitlerde morfoloji aldehit tipi fiksasyonu ile elde edilene yakın, özellikle nükleer detay açısından oldukça başarılıdır.

Fiksatif olarak formalinin kullanıldığı doku takipleri 1, 2, 3, 4, ve 5 nolu takiplerdir. Bu takiplerin morfolojik sonuçlarına bakıldığında, beşi ile de iyi kesitler elde edildiği gözlenmektedir. Tek belirgin fark, nükleer detayın okunaklılığı açısından, 1 numaralı doku takibinin başarısız oluşudur. 1 no'lu doku takibi, "Tissue-Tek X-Press x120 (Sakura Finetek USA, Torrance, CA)" tam otomatik, mikrodalga destekli hızlı doku takip (MDHDT) cihazında gerçekleştirilmiştir. Fiksasyonu tamamlanan kasetlenmiş dokular cihaza yerleştirildikten sonra takip bir saatte tamamlanır. Bu yöntemin, bir gece devam eden konvansiyonel doku takibinden en önemli farkı takip süresindeki bu kısalma ile, özellikle

küçük biyopsilerin laboratuvara ulaştığı gün mikroskopik değerlendirmesinin yapılabilmesine, gerekli boyaların da en kısa sürede istenmesine olanak sağlamasıdır. Bir diğer önemli avantajı ise, formalin ve ksilol gibi toksik maddelerin kullanımını elimine etmesidir. Bu takipte kullanılan solüsyon aseton ve alkol bazlı (propanol ve dimetil sülfoksit içerikli) bir karışım solüsyondur. Ek olarak mikrodalga, çalkalama ve vakum gibi fiziksel yöntemlerden de yararlanmakta ve bu şekilde doku takibi sürecini hızlandırmaktadır. Bu yöntem henüz sınırlı patoloji laboratuvarında kullanılmakta olup, deneyim azdır. Literatürde de bu yöntemin çalışıldığı araştırma kısıtlıdır (33, 34). Morales ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları çalışmada (33) farklı histolojilerdeki, formalin ile fikse 100 adet dokunun her birinden alınan iki örnekten biri konvansiyonel doku takip yöntemi, diğeri ise MDHDT ile işleme alınmış, ardından elde edilen kesitler öncelikle birbirleri ile histomorfolojik düzeyde karşılaştırılmış ve anlamlı fark ya da suboptimal özellikte bir kesit bulunmamıştır. Ardından 9 patologtan bu kesitleri mikroskop altında kör olarak inceleyip, konvansiyonel yöntem ile mi yoksa MDHDT yöntemi ile işlem gördüğünü tahmin etmeleri istenmiştir. Kesitlerin %46.9'unda hangi takip metodunun kullanıldığına karar verilememiş, %33.7'sinde doğru metod tahmin edilebilmiş, %19.4'ünde ise yanlış tahmin yapılmıştır. 14 olguda, patologların tümünde yapılan değerlendirmede tutarlılık tespit edilmiştir. Bu 14 olgunun 7'sinde, patologların tümü doğru metodu tespit edebilmişken, diğeri 7'sinde ise değerlendirmelerin tümü yanlış yapılmıştır. Ancak tutarlılık ya da tutarsızlıkların doku bazlı değerlendirilmesi yapılmadığı gözlenmektedir. Farklı dokular, farklı işlevleri nedeni ile, farklı yapısal komponentler ve farklı hücresellik içermekte olup, bu farklı yapısal komponentlerin doku takibinde kullanılan kimyasallardan etkilenimleri de farklılık göstermektedir. Dolayısıyla olguların yaklaşık 1/3'ünde (%33.7) metodun doğru şekilde tahmin edilmesi, mevcut farklılık açısından anlamlı olarak da değerlendirilebilir. Biz kendi çalışmamızda, özellikle nükleer morfolojinin 1 nolu doku takibinden olumsuz etkilendiğini gözlemledik.

Rutin histopatolojik incelemelerde, doku/hücre morfolojisinin korunmasında en önemli reaksiyon, proteinlerin stabilizasyonu/fiksasyonudur. Bu ne derece başarılı ise mikroskoptaki morfolojik ayrıntı düzeyi de o derecede üst düzeyde olacak, bu ise temel histomorfolojik incelemeler için uygun bir zemin oluşturacaktır (morfolojik fenotip). Ancak günümüzde iyi bir histomorfolojik inceleme tek başına yeterli olmamaktadır. Büyük ölçüde proteinlerden oluşan antijenlerin immünolojik yöntemlerle incelenmesi de gerekmektedir (immünolojik fenotip-immünfenotip).

İHK, biyolojik dokuda protein ekspresyonunun saptanmasında yaygın şekilde kullanılan basit ve ucuz bir metottür. İHK kullanımı, özellikle son birkaç dekad içinde belirgin şekilde artmıştır. İHK, tümör sınıflandırmasında ve orjini bilinmeyen metastatik tümörlerde primer tümör orjininin araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu nedenle İHK analiz sonuçları bu hastalarda belirleyici olabilmektedir. Onkoloji alanında, tümör dokusunda bir proteinin belirlenmesi, prognozu ve kemoterapötik ajana yanıtı öngörmek açısından önemli bir faktör olabilmektedir. İHK'nın kullanımı, protein ekspresyonun tespiti ve lokalizasyonun belirlenmesinde primer metod olarak ya da başka tekniklerin geçerliliğini kanıtlamak amacıyla, araştırmalarda da önemli bir yere sahiptir. Üstelik, birçok doku örneğinin tek bir parafin blokta toplanılabildiği bir yöntem olan TMA kullanımı ile, araştırmalarda İHK'dan yararlanım artmıştır (35-37). Bu yöntem ile, analiz için gerekli antikor miktarı oldukça azalmış ve sonuçları değerlendirmek için gereken süre de kısalmıştır. İHK'nın günümüzde, hem rutinde, hem de araştırmalarda sıkça kullanılan ve önemli yere sahip bir uygulama olduğu belirgindir.

Yukarıda bahsedilenlerden ötürü, gündemde olan formalinsiz doku fiksasyonu ile spesmenlerin takibinin kabul edilebilirliğinde, rutin H&E boyamadaki morfolojik kaliteden elde edilecek sonuç kadar, İHK'sal boyamalar ile de iyi sonuç elde edilmesi gereklidir. Bu yüzden de, uygulayacağımız fiksasyon yönteminden, proteinlerin antijenik özelliklerini değiştirmeden koruması beklenmektedir. Kullandığımız yeni fiksatifleri bu açıdan değerlendirebilmek için, çalışmamızda farklı dokulara farklı nükleer ve sitoplazmik İHK'sal boyamalar uygulanmıştır. Kullandığımız nükleer İHK'sal boyalar ile uyguladığımız doku takiplerinin tümünde iyi ya da optimal özellikte boyanma elde edilmiştir. Sitoplazmik boya sonuçları incelendiğinde ise, CD3, CD20, LCA ve CD38 gibi hücre yüzey proteinlerine (CD markerları) ve aktin, desmin, caldesmon gibi sitoplazmik filamentöz proteinlere yönelik antikorlar ile yapılan boyamalarda, nükleer boyalarda olduğu gibi doku takiplerinin tümünde iyi ya da optimal özellikte boyanma olmuştur. Ancak CK7, CK20, HMWK ve CK gibi sitoplazmik keratin boyaları ve HEPA sitoplazmik boyası ile, özellikle 1, 2, 3, 4, 5 nolu kesitlerden oldukça iyi sonuç elde edilirken, 6, 8, 9, 10, 12 ve 13 nolu doku takiplerine ait kesitlerden olumsuz sonuçlar elde edilmiştir. Boyamanın TMA yöntemi ile eşit koşulda uygulanmış olması ve sonuçların benzer sitoplazmik boyalar ile tekrarlanmış olması anlamlıdır. Bu iki grup karşılaştırıldığında en belirgin fark, iyi sonuç alınan 1, 2, 3, 4 ve 5 nolu takiplerin fiksatif olarak formalin içeriyor oluşudur. Formalin dışı fiksatiflerin kullanıldığı diğer

takiplere ait boya kesitlerinde, boyanmama ya da soluk boyanma gibi olumsuz boyanma sonuçları yanısıra, doku morfolojisindeki bozulma bir diğer dikkat çekici noktadır (Şekil 20). Çünkü H&E boyamada bu kesitlerde histomorfolojik düzeyde iyi ya da optimal sonuç elde edilmiştir. Bu nedenle, özellikle bu son bulgu da dikkate alındığında, rutin prosedürde değişiklik yapmadan uyguladığımız bu boyalar ile elde edilen olumsuz sonuçlar, bu doku takiplerinde kullanılan formalin dışı fiksatiflerin dokudaki etkileri ile, uygulanan İHK prosedürünün uyumsuz olabileceğini düşündürmektedir.

Patolog Karl Weigert 1893’de formalin ile fiksasyondan sonra elde edilen kesitlerin kalitesinin daha iyi olduğunu fark etmiş ve o zamandan bugüne dek, formalin patoloji laboratuvarlarımızda standart fiksatif olarak kullanılmaya gelmiş ve dolayısıyla antikör imalatçıların hemen tümü, ürünlerini FFPG dokulara göre optimize etmişlerdir (9). Çalışmamız, formalin dışı fiksatiflerin kullanılabilmesi için, özellikle İHK laboratuvarı açısından, her antikör için ayrı ayrı protokollerin tekrar optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu konuda bazı çalışmalarda (19), alternatif fiksatiflerin proteinler-arası çapraz bağ oluşturmuyor oluşu dikkate alınarak, özellikle proteinaz ön işleminin tamamen kaldırılması ya da sadece birkaç saniye uygulanması ve retrieval işlemlerinin de ayrıca adapte edilmesi gerekliliği vurgulanmıştır. Çünkü proteinler-arası çapraz bağ oluşmayan dokularda bu işlemlerle proteinler kolayca eriyebilecek ve yanlış negatif sonuç doğurabilecektir. Bizim İHK boyama protokolümüz proteinaz ile protein sindirimi içermemektedir. Ancak tamamen formalinin neden olduğu etkilere yönelik planlanmış retrieval işlemlerinin gözden geçirilmesi gerekliliği belirgindir. Dokular bu formaline alternatif solüsyonlarla fikse edildiğinde, özellikle bir kısmı cerbB2 gibi tedavi ilişkili olan belirleyicilerin optimize edilmesi, elde edilecek skor tanımlamalarının yeniden gözden geçirilmesi ve onaylanması gerekecektir.

İHK’sal boyamalar içinde en iyi sonuçlar, 1,2,3,4 ve 5 nolu takiplere ait kesitler ile elde edildiği belirtilmişti. Fiksatif olarak tümünde formalinin kullanıldığı bu doku takipleri irdelendiğinde, hep arka planda kalmış olan şeffaflandırıcı solüsyonlar ön plana çıkmaktadır. Bunlar içerisinde 2 nolu takipte rutin olarak patoloji laboratuvarlarımızın çoğunda kullanılan ve bir aromatik hidrokarbon olan toksik etkili ksilol kullanılmıştır. 3,4 ve 5 nolu takiplerde ise sırasıyla ksilenden daha az toksik olan Shandon Xylene Substitute®, Bio-clear® ve Sub-X® kullanılmıştır. 1 nolu doku takibi ise (MDHDT) henüz çok az laboratuvarlarda rutinde kullanılmakta olup şeffaflandırıcı solüsyon içermemektedir. Bu beş doku takibi içerisinde

özellikle 4 ve 5 nolu takiplerle, boyanma reaksiyonunun şiddeti, iyi morfolojik özellikler ve temiz zemin açısından test edilen birçok antikor için İHKsal boyamada en iyi sonuç elde edilmiştir (Tablo 15). Dolayısıyla, daha az toksik etkili ksilen alternatifi şeffaflandırıcı solüsyonlar, iritan ve toksik etkileri olan ksilenin yerini almak için kuvvetli adaylar gibi görünmektedir.

Tablo 15: 1, 2, 3, 4 ve 5 nolu doku takiplerinin karşılaştırılması*

Takip No	Şeffaflandırıcı	Hscore-ER (meme tm)	Hscore-ki67 (kolon tm)	Hscore-p63 (deri)	Hscore-CD38 (kolon tm)
1	YOK	232,4234	112,2078	217,6672	19,9819
2	KSİLEN	211,1678	242,9072	148,1928	30,7822
3	SHANDON KSİLEN SUBSTITUDE	203,7399	232,1698	137,9494	15,6526
4	BİO-CLEAR	244,0949	261,8377	224,4027	98,1215
5	SUB-X	256,4102	266,11	238,2465	66,9827

*Fiksatif olarak tümünde formalinin kullanıldığı doku takipleri içerisinde, verilerle belirli olan İHK'sal boyanma farklılığı, bu doku takiplerinde kullanılan farklı şeffaflandırıcı solüsyonlarla ilişkili gibi görünmektedir. Daha az toksik etkili oldukları bilinen alternatif şeffaflandırıcı solüsyonlar, belki de ksilenin yerini almaya çoktan hazırlar.

Moleküler biyolojideki ilerlemeler, hastalıkları anlamamızda büyük etkiye sahip olup tanısal ve terapötik tıbbi modernize etmektedir. Klinik patolojide, moleküler tanıların gelişmesi ile birlikte nükleik asit bazlı tahliller belirgin şekilde artmıştır (38). Ülkemizde de moleküler patoloji, klinik patoloji içerisindeki yerini edinmeye başlamıştır. Tanıya yönelik incelemelerin (morfolojik-immünotipik) zeminini oluşturan başlıca hedef molekül olan “protein”lerin yanı sıra, son yıllardaki bu teknolojik gelişmelerin etkisi ile artık ikinci bir hedef molekül daha vardır: “nükleik asitler” (DNA, RNA). Fiksasyon sistemleri tartışılırken artık sadece proteinler değil, nükleik asitler de göz önünde bulundurulmaktadır.

Moleküler genotipik incelemeler, genellikle taze ve dondurulmuş dokularda çalışmak üzere geliştirilmişlerdir. Çünkü intakt makromoleküller açısından en iyi kaynağı oluşturması nedeni ile taze doku ya da snap-frozen doku örnekleri moleküler analiz için uygun olan ana materyallerdir. Ancak bu doku örneklerinin doğru morfolojik detayı vermemesi ve histolojik tanıyı olumsuz etkileyebilmesi yanısıra, pratik olmayan ve masrafı büyük bir uygulama

olması nedeni ile patoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmamış, yalnızca büyük patoloji laboratuvarlarına ya da üniversitelere sınırlı kalmıştır (19, 26). Arşivlerimizde muhafaza ettiğimiz FFPGD'lerin, biomarker keşfi için dondurulmuş taze dokulara alternatif olabileceği, şimdilerde fark edilen bir durumdur. Proteinlerle karşılaştırıldığında, nükleik asitlerin fiksasyonu konusunda bilinenler daha azdır. Rutin histopatolojik inceleme amaçlı takiplerde, nükleik asitlerin fiksasyonu, dokunun genel fiksasyonu çerçevesinde gerçekleşmektedir. DNA ve RNA oda sıcaklığında formaldehid ile reaksiyona girmemektedir. Sıcaklık arttırıldığında nükleik asit zincirlerinin sarmal yapısı çözülmeye başlar ve 45°C den sonra RNA, 65°C den sonra ise DNA ile formaldehid arasında etkileşme gündeme gelir. Normal takip işlemlerinin uygulandığı oda sıcaklığında (20–25°C) formaldehid ile nükleik asitlerin denatürasyonu gerçekleşmez (dolayısıyla formalinin, virüsler veya prionun infeksiyon potansiyeli üzerine etkisi sorgulanmalıdır). Ancak takip işleminin ileri aşamalarında (parafinizasyon) sıcaklık yükseldiği için, doku içinde kalıntı halinde az miktarda bulunabilen formaldehitin etkisi söz konusu olabilir. Özetle, formaldehid ile fikse ve parafine gömülü (FFPG) dokuda, başka zarar verici etkenler söz konusu değilse, daha çok DNA olmak üzere nükleik asitlerin korunmuş durumda olması beklenir. Bu çok büyük moleküllerin %30 kadarı fiksasyon sırasında kaybedilir. Büyük ölçüde korunabilmelerinin nedeni çok büyük olan bu moleküllerin protein matriks tarafından sarılıp tutulmasıdır.

RNA, DNA'ya oranla daha instabil bir molekül olup çok hızlı ve geri dönüşümsüz olarak parçalanabilir (11, 39). Ribonükleazlar (RNazlar) oldukça stabil aktif enzimlerdir. Eser miktarda olduklarında bile RNA'nın parçalanmasına neden olur. Bu nedenle de RNA bazlı incelemelerin yapılabilmesi ve RNA'nın uygun koşullarda saklanabilmesi için RNazsız laboratuvar koşullarının sağlanması ve idamesi gereklidir. RNaz başlıca insan derisi, saç, tüy, tükürük ve ter gibi vücut salgılarında, bakteri ve küf mantarı içeren toz partiküllerinde, pipet uçlarında, laboratuvar tüplerinde, suda, çözeltiler ve solüsyonlarda, laboratuvar yüzeylerinde, cam veya plastik laboratuvar malzemelerinde ve dokunun kendisinde bulunur. Kısaca laboratuvarın her köşesi RNaz aktivitesi içerir ve bu nedenle de ortamdaki RNaz'ın inaktive edilmesi gereklidir (11).

Dokudan intakt nükleik asit toplamak için yapılan çalışmalarda genel olarak üç yoldan birinin kullanıldığı görülmektedir. Biri, fikse dokuda nükleik asitlerin fragmente olduğunu kabul ederek, bunun yerine OCT (Optimal Cutting Temperature) mediasına gömülü ani-

donmuş doku kullanmaktır. Bu yöntem ile iyi miktarda nükleik asit izole edilir, ancak dokuların -70 C'de muhafaza edilmesini gerektirir ki bu da çok sayıda örnekten oluşan rutin depolama işlemini pahalı hale getirir ve pratik değildir. Ek olarak örneklerin cryostat ile kesilmesi zor, zaman kaybettiricidir ve morfolojiyi hücre tipini zor tanıyacak kadar bozar (23, 26). Bazı araştırmacılar da benzer şekilde, biomoleküllerin kazanımını optimize etmek amaçlı, bir spesmenin iki parçaya bölünüp, bir parçasının dondurulup saklanmasını desteklemektedirler. Bu uygulama da pratik değildir; çünkü tümörler homojen kitleler değildir ve fikse olmayan spesmenin makroskopik inceleme ile tanınması sıklıkla olanaksızdır. Mikroskopik incelemesi yapılmaksızın dokudan nükleik asitlerin izole edilmesi, kontaminasyon ve/veya uygun olmayan dokunun analizi gibi olasılıkları doğuracak, bu da bu stratejinin uygulanmasını kısıtlayacaktır. Bu gerçek, moleküler analizin küçük lezyonlarda, özellikle biyopsi materyallerinde sürdürülme isteği ile daha karmaşık hale gelmektedir. Çünkü bütünü mikroskopik incelenmemesi uygunsuz/eksik tanı riskini doğuracaktır (3).

İkinci yaklaşım, formalinin histoteknoloji ve tanısal histopatolojinin temelini oluşturan fiksatif olduğunu kabul eder ve FFPGD'lardan nükleik asit izolasyonunu optimize edecek metodlar geliştirmeye çalışır. Formalin ile fiksasyon işlemi, dokuların yapısının optimal histolojik durumda kalıcı şekilde korunmasına ve uzun süreli kolay depolamaya olanak verir. FFPG materyali kullanmanın en büyük avantajı arşivden doku örneği elde etmenin kolaylığıdır. Çünkü taze donmuş doku elde etmek için bölümde bunun için ayrılmış bir bölüm, özel ekipman ve özel örnek toplama gerekmektedir. Dünya genelinde, patoloji departmanlarında, FFPG materyal barındıran geniş arşivler mevcuttur. Bu spesmenler, kanser prognozu ve/veya tedaviye cevabı daha iyi öngörebilmemizde yardımcı olabilmek için, hastanın klinik sonucu ile korele edilebilecek, morfolojik olarak tanımlı ve hastalığa spesifik örneklerin bulunduğu, zengin bir moleküler bilgi içeren, benzersiz bir kaynağı temsil etmektedir. FFPG tümörler yaygın şekilde ulaşılabilir durumda ise de, bu örneklerin gen profili araştırmalarında kullanılmasında önemli kısıtlamalar bulunmaktadır. Formalin fiksasyonu, bazlara mono-methylol grubunun bağlanması ile nükleik asitlerde kovalent modifikasyona, nükleik asitlerle proteinler arası çapraz bağ oluşumuna ve iplik kırılmalarına yol açar. Bu nedenle nükleik asitlerin verim, kalite ve bütünlüğünü tehlikeye atar (40, 41). FFPG dokudan genellikle yeterli miktarda DNA izole edilebilir. Ancak, elde edilen analiz edilebilir DNA fragmanlarının boyutu 300-500 baz çiftini geçmez. Bu sınırlılığın, sıklıkla iplik fragmentasyonun sonucu olduğu düşünülmektedir. Benzer kısıtlılık RNA için de

geçerlidir. Ek olarak, DNA ile karşılaştırıldığında, RNA patoloji pratiğindeki çeşitli doku takip aşamaları/işlemlerine çok daha duyarlıdır. RNA moleküllerinin intrinsik kısa yarı ömürleri, RNAaz enziminin tahmin edilen çevresel bolluğu ve RNA ipliklerinin küçük boyutu, onları degradasyona daha duyarlı hale getirir (38). Dolayısıyla, FFPG dokulardan nükleik asit ekstraksiyonu ve analizi hala üzerinde düşünülen bir konudur. Sonuç olarak, formalin kullanılarak morfoloji korunsa ve standart olarak fikse olmuş ve takip görmüş arşiv materyalini kullanmaya olanak sağlasa da bu yaklaşımda özellikle RNA olmak üzere, nükleik asit kalite ve miktarından ödün verilmiş olunur (26, 40). Bu metodla taze dokuda olduğundan %50-99 daha az RNA elde edilir, ve bu RNA'dan sağlanan ampliconlar genellikle 300 bazdan azdır (23).

Üçüncü yaklaşım ise, fikse dokulara benzer morfolojiyi sağlayan ve aynı zamanda nükleik asitlere daha az zarar veren fiksatiflerle farklı doku takibi metodları kullanarak, doku morfolojisi ve nükleik asit bütünlüğü arasında bir orta yol bulmaya çalışır. Özellikle, formalinin tehlikeli bir kimyasal olduğu ile ilgili artan kanıtların olması üzerine Avrupa'da bu fiksatifin yasaklanmasının önerilmesi, araştırmacıları bu yaklaşım üzerinde daha çok durmaya sevk etmiştir. Bu nedenlerle son yıllarda bazı aldehidsiz fiksasyon yöntemleri denenmiştir. Bugüne kadarki en ümit verici sonuçlar alkol bazlı fiksatifler ile elde edilmiştir. Çünkü alkol bazlı fiksatifler makromolekülleri enzimlerin inaktivasyonu ile proteinlerin denatürasyonu ve presipitasyonu (çökme) yoluyla korurlar. Ayrıca belirgin bir kimyasal değişiklik meydana getirmediğinden, nükleik asitleri de değiştirmezler. DNA, alkoller içinde kollabe olur. Alkolde denatüre olmuş DNA, rehidratasyon sonucunda orijinal şekline kısmen geri döner. PCR ve moleküler düzeyde çalışmalar söz konusu olduğunda, en elverişli DNA parçaları etanol tespitli dokulardan elde edilmektedir. Formalin tespitli dokulardan elde edilebilen parça uzantıları ise kısıtlıdır. RNA presipitasyonunda kantitatif açıdan en başarılı sonuçlar yine etanol ile alınmıştır. Formaldehid ile sonuçlar kötüdür. Bu özellikler laboratuvarda hazırlanmış solüsyonlarla ve ticari fiksatiflerle demonstre edilmiştir (26).

Çalışmamızda jel elektroforez görüntüleme ile 1 numara hariç diğerlerinde DNA kalitesinin iyi olduğu gözlemlendi. Ancak fiksatif olarak formalinin kullanıldığı takip numaralarında, diğerlerinden farklı olarak belirgin fragmentasyon ve küçük fragmanların varlığı dikkat çekici oldu. Çalışmamızda DNA kalitesi PCR amplifikasyonu ile değerlendirildi. Küçük boyutlu amplicon ile yapılan PCR ile tüm doku takiplerinde

amplifikasyon gerçekleşirken, büyük boyutlu amplikonlarla beklendiği gibi durum aynı olmadı. 1608 bp boyutlu amplikon ile 7 ve 11 numaralı örneklerde kontrol genomik DNA'dakine benzer şekilde güçlü sinyal ile belirli amplifikasyon izlendi. Ayrıca zayıf olmakla ve 5 nolu örnekte görece daha iyi olmakla birlikte 2, 3 ve 5 nolu örneklerde de bir miktar amplifikasyon gerçekleşti. 2274 bp boyutlu amplikon ile ise, yalnız 7 ve 11 numaralı örneklerde amplifikasyon gerçekleşti. RNA'nın jel elektroforez ile değerlendirmesinde ise 1, 2, 4, 5, 6, 7 ve 11 numaralı takiplerde RNA kalitesinin daha iyi olduğu tespit edildi. Dolayısıyla FineFIX®'in moleküler korunum açısından belirgin farkla diğerlerinin önüne geçtiği gözlemlendi. Özellikle 2000'in üzerinde boyutlu bir amplikon ile amplifikasyonun gerçekleşmiş olması dikkat çekiciydi. Elde ettiğimiz bu sonuç FineFIX® ile yapılan çalışmaların çoğunda da benzer şekildedir. Örneğin Giorgio Stanta ve arkadaşlarının FineFIX® ile formalini karşılaştırdıkları çalışmada, rutin formalin ile fikse ettikleri dokulardan elde ettikleri maksimum uzunluktaki DNA fragmanı yaklaşık 350 bases iken; FineFIX® ile fikse ettikleri dokudan elde ettikleri DNA fragman uzunluğu 2400 bazdır (20). Bu fark çok etkileyici olup, taze dokudan farklı olarak doku morfolojisini analiz etme ve doğru mikrodiseksiyon olanağı veren parafine gömülü arşiv materyallerinden etkili DNA molekül analiz etme şansı vermektedir. Aynı çalışmada FFPG dokulardan elde edilen RNA fragmanları 100-200 bases uzunlukta iken, FineFIX® ile fikse dokulardan elde edilen RNA sekans uzunluğu 600 bases ı bulmuştur. FFPG dokulardan RT-PCR analizi ile, spesifik RNA ların kantitatif analizi mümkündür. Ancak, engellenemeyen degradasyon nedeni ile bu dokulardan mutlak kantifikasyon uygun değildir. Yine aynı çalışmada FineFIX® ile bu RNA degradasyonun FFPG dokuya göre daha düşük olduğu ve daha uzun RNA sekanslarının ekstrakte edilebildiği belirtilmiştir. Alternatif fiksatiflerle yapılan çalışmalar incelendiğinde, FineFIX®'in bu konudaki üstünlüğü dikkat çekicidir.

RNA ekstraksiyonun, fiksasyondan ve doku takibi aşamalarından, DNA'ya göre daha çok etkilendiğini biliyoruz. Literatüre baktığımızda bu konuda, mikroRNA'ların (miRNA) ilgi çeken farklılığını görüyoruz. miRNA'lar genellikle 19-25 nükleotid boyutunda, protein kodlanmasında primer rol oynamayan ancak hedef miRNA'ların ekspresyonunu regüle eden, küçük RNA molekülleridir (15). Fizyolojik olduğu kadar gelişimsel çeşitli süreçleri regüle ettikleri düşünülmektedir. miRNA'ların fonksiyonunu etkileyen mutasyonların genetik hastalıklarda patogenetik bir rol oynadığı gösterilmiştir. miRNA'ların kanserdeki etkileri ise birlikte fonksiyon gösterdiği hedef mRNA'lara bağlıdır. Bazı miRNA'ların hem onkogen hem

de tümör süpresör olarak çift fonksiyona sahip olabileceği bildirilmiştir. Farklı tümör tiplerinde, onkogen ya da tümör süpresör olarak davranan miRNA'lar tanımlanmıştır. Bu nedenle fiksatiflerin RNA ve miRNA'ların kalite ve korunumu üzerine etkileri de ilgi çeken araştırma konularındandır. Bu güne kadar yapılan RNA ekstraksiyonu ile ilgili çalışmalarda, FFPGD'dan elde edilen başarılı amplifikasyonlar en fazla 200 bases boyutundaki küçük fragmanlarla sınırlı kalmış ve amplifikasyon verimi etanol ya da aseton bazlı fiksatiflerle fikse dokularda daha yüksek bulunmuştur. Lisa Arzt ve arkadaşlarının yakın zamanda yayınlanan, FineFix, RCL-2 ve HOPE olmak üzere üç formalinsiz alternatif fiksatifini kullanarak yaptıkları moleküler çalışmada, formalin ile kıyaslandığında, alternatif fiksasyonun ve fiksasyon süresinin mi-RNA miktarını etkilemediği gösterilmiştir (15). Bu, önceki çalışma sonuçlarını destekler niteliktedir (22, 41-43). Formalin fiksasyonunun RNA degradasyonuna neden olduğu ancak ortaya çıkan fragmanların hala saptanabilecek genişlikte olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, boyutlarının küçük oluşu nedeni ile, miRNA'ların formalin fiksasyonundan negatif olarak etkilenmedikleri belirtilmektedir. Dünya genelinde sahip olduğumuz zengin FFPGD arşivi düşünüldüğünde, bu arşive değer katan sevindirici bir sonuçtur.

Son olarak maliyet açısından bir değerlendirme yapmak uygun olacaktır. Bildiğimiz gibi formalinin en önemli avantajlarından biri ucuz oluşudur. Solüsyonların bir litrelerinin maliyetleri karşılaştırıldığında, alternatif fiksatiflerin formaline göre daha yüksek maliyetli olduğu görülmektedir. Alternatif solüsyonların fiyatı, formalinden kabaca 15-80 kat daha yüksektir. Alternatif şeffaflandırıcıların fiyatı ise ksilenden 7-10 kat daha fazladır. Ancak insan sağlığının maliyetle değerlendirilmemesi gerektiği düşünülmeli, kullanımı yaygınlaştığı takdirde bu alternatif solüsyonların fiyatlarının düşeceği göz önünde tutulmalıdır.

SONUCLAR

1. Alternatif fiksatifler daha az toksik ve daha az iritan etkilere sahipler. Ancak gerçek şu ki, bu solüsyonlar yine de kimyasal maddelerdir ve toksik potansiyele sahip komponentler mutlaka içerirler ve yanıcı özelliktedirler.

2. Formalin patoloji laboratuvarlarında en sık karşılaşılan etkenler olan hepatit B ve C virüsleri, tüberküloz basili, kist hidatid etkeni ve daha nadir olsa da HIV ile enfekte materyallerden kaynaklanabilecek enfeksiyonlara karşı koruyucudur ve bu açıdan güven vericidir. Formalinin yerini alacak fiksatiflerin bu açıdan da değerlendirilmesi gerekecektir.

3. Formalin, uzun yıllardır dünya genelinde, standart fiksatif olarak kullanılmaktadır. Patologların uzun yıllardır kazandıkları histomorfolojik deneyim, formalin-ilişkili artefaktlar üzerinden hücresel değişikliklerin yorumlanması üzerinedir. Bu nedenle formalinin yerini alacak ideal fiksatifin benzer histomorfolojik sonuç vermesi beklenmektedir. Bu açıdan bakıldığında etken maddesi glyoxal olan Glyo-Fixx® ve Cell block® bu açıdan en az formalin kadar başarılı bulunmuşlardır.

4. Çalışmamızda histokimyasal boyamalar açısından tüm doku takipleri ile birbirine yakın ve iyi sonuç elde edilmiştir. HK'sal boya panelimizde rutinde sık kullanılan boyalar kullanılmıştır. Ancak özellikle patojen tespitine yönelik boyama protokollerini de içerecek şekilde daha geniş bir panel kullanarak, yeni karşılaştırılmalı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

5. Çalışmamızda Glyo-Fixx® ve Cell block® ile, her ne kadar optimal histomorfoloji sergileyen kesitler elde edilse de, immünohistokimyasal boyamada olumsuz sonuçlar elde edilmiştir. Bunun nedeni antikor imalatçılarının hemen tümünün, ürünlerini FFPG dokulara göre optimize etmiş olmaları olabilir. Dolayısıyla formalinin yerini alacak solüsyonun öncelikle bu açıdan test edilmesi ve İHK prosedürlerinin bu solüsyona göre yeniden optimize edilmesi gerekli olacaktır.

6.1 numaralı doku takibimiz olan MDHDT, özellikle formalin ve ksilol gibi toksik solüsyonları elimine etmesi ve hızlı doku takibi uygulayabilmesi açısından dikkat çeken bir doku takip metodudur. Dünya genelinde çok az laboratuvarında kullanılmakta olup, elde edilen deneyim azdır. Çalışmamızda bu doku takibi ile elde ettiğimiz kesitlerde özellikle nükleer

detay açısından olumsuz histomorfolojik özellikler dikkati çekmiştir. Ayrıca moleküler korunum açısından da en olumsuz sonuçlar yine bu doku takibine aittir. Zaten üretici firma da moleküler çalışma yapılacak dokular için farklı bir fikzatif kullanılmasını önermektedir.

7.İHK boyamaları ile en iyi sonuçlar fiksatif olarak formalinin kullanıldığı doku takipleri ile elde edilmiştir. Bu doku takipleri kendi içinde karşılaştırıldığında, hepsinde farklı bir şeffaflandırıcı ajan kullanıldığı ve özellikle Bio-clear® ve Sub-X® in kullanıldığı doku takiplerinin daha iyi sonuç verdiği gözlenmektedir. Dolayısıyla, daha az toksik etkili ksilen alternatifi şeffaflandırıcı solüsyonlar, iritan ve toksik etkileri olan ksilenin yerini almak için kuvvetli adaylar gibi görünmektedir.

8.Moleküler korunum açısından FineFIX® gerçekten ideal bir fiksatiftir. Üstelik İHK boyama sonuçları da iyidir. Ancak alkol bazlı bir fiksatif olup, doku kesitlerinde bir miktar doku büzüşmesine neden olduğu izlenmiştir. Bununla birlikte hücresel düzeydeki histomorfoloji, özellikle nükleer morfolojik detay açısından optimaldir.

9.Tüm bu sonuçlar ve yakın zamanda yapılmış diğer çalışmaların sonuçları gösteriyor ki, daha az toksik, formaldehit içermeyen fiksatifler histomorfolojik ve protein korunumu açısından formalinin yerini almaya güçlü şekilde adaydırlar. Her birinin artıları, eksileri olmasına karşın, çalışmamızın verileri değerlendirildiğinde fiksasyonda formalin yerine FineFIX®, Glyo-Fixx® ve Cell block®,un ön plana çıktığını, morfolojik ve moleküler düzeyde daha iyi sonuç verdiğini, bu fiksatifler ile ksilen yerine Bio-clear® ve Sub-X® kullanıldığı takdirde daha da iyileşme sağlandığı sonucuna varılmıştır.

10.Ancak, glyoxal fiksasyonunda olduğu gibi optimal histomorfolojiyi, FineFIX® fiksasyonunda olduğu gibi fikse ve parafine gömülü bir dokudan elde edilebilecek optimal moleküler korunmayı sunacak alternatif bir fiksatif bulunsa dahi, bu solüsyonun mikroorganizmalar üzerine olacak etkisinin bilinmiyor oluşu, ideal bir fiksatif olabilirliğinin önünde engel teşkil edecektir. Dolayısıyla, yapılacak yeni çalışmalarda bu konu üzerinde de durulması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Beatty BG, Bryant R, Wang W, Ashikaga T, Gibson PC, Leiman G, Weaver DL. HER-2/neu detection in fine-needle aspirates of breast cancer: fluorescence in situ hybridization and immunocytochemical analysis. *Am J Clin Pathol.* 2004; 122:246-55.
2. Moatamed NA, Nanjangud G, Pucci R, Lowe A, Shintaku IP, Shapourifar-Tehrani S, Rao N, Lu DY, Apple SK. Effect of Ischemic Time, Fixation Time, and Fixative Type on HER2/neu Immunohistochemical and Fluorescence In Situ Hybridization Results in Breast Cancer. *Am J Clin Pathol.* 2011; 136:754-61.
3. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, Goralski TJ, Langmore JP, Raja RG, Williams PM, Palma JF, Warrington JA. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2008; 132:1929-35.
4. Prof Dr A. Ali K pelioglu, Prof Dr H. Uğur Pabuççupğlu. Patoloji ve Sitopatoloji Laboratuvar Teknikleri. Dokuz Eylül Üniversitesi Yayınları. 1995.
5. Chung JY, Braunschweig T, Williams R, Guerrero N, Hoffmann KM, Kwon M, Song YK, Libutti SK, Hewitt SM. Factors in tissue handling and processing that impact RNA obtained from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56:1033-42.
6.  ner Doğan. Standardization in the process of histopathological diagnosis– Histopatolojik tanı sürecinde standardizasyon. *Aegean Pathology Journal.* 2005; 2:8–28.
7. Y r koğlu K, Sayiner A, Akalın E. Occupational Health Hazards and Safety Guidelines in Histopathology Laboratory. *Aegean Pathology Journal.* 2005; 2:98-115.
8. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2006; 88:1-478.
9. Buesa RJ. Histology without formalin? *Ann Diagn Pathol.* 2008; 12:387-396.

10. Buesa RJ, Peshkov MV. Histology without xylene. *Ann Diagn Pathol.* 2009; 13:246-56.
11. 20. Ulusal Patoloji Kongresi, Moleküler Patoloji Kurs Notları, 2010.
12. Daniel F, Hayes and Ann D. Thor. C-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful markers. *Seminars in Oncology.* 2002; 29:231-245.
13. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Puztai L, Bloom KJ. The HER-2/neu gene and protein in breast cancer 2003. *The Oncologist.* 2003; 8:307-325.
14. Lykidis D, Van Noorden S, Armstrong A, Spencer-Dene B, Li J, Zhuang Z, Stamp GW. Novel zinc-based fixative for high quality DNA, RNA and protein analysis. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35.
15. Arzt L, Kothmaier H, Quehenberger F, Halbwedl I, Wagner K, Maierhofer T, Popper HH. Evaluation of formalin-free tissue fixation for RNA and microRNA studies. *Exp Mol Pathol.* 2011; 91:490-495.
16. Bosetti C, McLaughlin JK, Tarone RE, Pira E, La Vecchia C. Formaldehyde and cancer risk: a quantitative review of cohort studies through 2006. *Ann Oncol.* 2008;19:29-43.
17. Tang X, Bai Y, Duong A, Smith MT, Li L, Zhang L. Formaldehyde in China: production, consumption, exposure levels, and health effects. *Environ Int.* 2009; 35:1210-24.
18. René J. Buesa. Histology without formalin? *Annals of Diagnostic Pathology.* 2008;12:387-396.
19. Kothmaier H, Rohrer D, Stacher E, Quehenberger F, Becker KF, Popper HH. Comparison of formalin-free tissue fixatives: a proteomic study testing their application for routine pathology and research. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135:744-52.
20. Stanta G, Mucelli SP, Petrera F, Bonin S, Bussolati G. A novel fixative improves opportunities of nucleic acids and proteomic analysis in human archive's tissues. *Diagn Mol Pathol.* 2006;15:115-23.
21. Gazziero A, Guzzardo V, Aldighieri E, Fassina A. Morphological quality and nucleic acid preservation in cytopathology. *J Clin Pathol.* 2009; 62:429-34.

22. Lassalle S, Hofman V, Marius I, Gavric-Tanga V, Brest P, Havet K, Butori C, Selva E, Santini J, Mograbi B, Hofman P. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid*. 2009; 19:1239-48.
23. Cox ML, Schray CL, Luster CN, Stewart ZS, Korytko PJ, M Khan KN, Paulauskis JD, Dunstan RW. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Exp Mol Pathol*. 2006; 80:183-91.
24. Baloglu G, Haholu A, Kucukodaci Z, Yilmaz I, Yıldırım S, Baloglu H. The effects of tissue fixation alternatives on DNA content: a study on normal colon tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008; 16:485-92.
25. Mahjoub F, Zarei A, Jahanzad I, Shahsiah R, Derakhshandeh S, Najafi M. Comparison of formalin and FineFIX in preserving DNA material in small biopsies. *Pathol Int*. 2008; 58:678-80.
26. Dotti I, Bonin S, Basili G, Nardon E, Balani A, Siracusano S, Zanconati F, Palmisano S, De Manzini N, Stanta G. Effects of formalin, methacarn, and fineFIX fixatives on RNA preservation. *Diagn Mol Pathol*. 2010; 19:112-22.
27. Moelans CB, Oostenrijk D, Moons MJ, van Diest PJ. Formaldehyde substitute fixatives: effects on nucleic acid preservation. *J Clin Pathol*. 2011 Jun 29.
28. Dapson RW. Macromolecular changes caused by formalin fixation and antigen retrieval. *Biotech Histochem*. 2007 Jun;82(3):133-40.
29. Paavilainen L, Edvinsson A, Asplund A, Hober S, Kampf C, Pontén F, Wester K. The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells. *J Histochem Cytochem*. 2010; 58:237-46.
30. Titford ME, Horenstein MG. Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2005; 129:502-6. N
31. Grizzle WE. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem*. 2009; 84:185-93.
32. Wang YN, Lee K, Pai S, Ledoux WR. Histomorphometric comparison after fixation with formaldehyde or glyoxal. *Biotech Histochem*. 2011; 86:359-65.
33. Morales AR, Nassiri M, Kanhoush R, Vincek V, Nadji M. Experience with an automated microwave-assisted rapid tissue processing method: validation of

- histologic quality and impact on the timeliness of diagnostic surgical pathology. *Am J Clin Pathol.* 2004 Apr;121(4):528-36.
34. Munkholm J, Talman ML, Hasselager T. Implementation of a new rapid tissue processing method-advantages and challenges. *Pathol Res Pract.* 2008; 204:899-904.
 35. Jaraj SJ, Egevad L. Formalin fixation and immunoreactivity in prostate cancer and benign prostatic tissues. *APMIS.* 2010; 118:383-8.
 36. Susan Henshall. Tissue Microarrays. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.* 2003;8.
 37. Zhang DH, Salto-Tellez M, Chiu LL, Shen L, Koay ES. Tissue microarray study for classification of breast tumors. *Life Sci.* 2003; 73:3189-99.
 38. van Maldegem F, de Wit M, Morsink F, Musler A, Weegenaar J, van Noesel CJ. Effects of processing delay, formalin fixation, and immunohistochemistry on RNA Recovery From Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissue Sections. *Diagn Mol Pathol.* 2008; 17:51-8.
 39. Joon-Yong Chung, Till Braunschweig, Reginald Williams, Natalie Guerrero, Karl M. Hoffmann, Mijung Kwon, Young K. Song, Steven K. Libutti, and Stephen M. Hewitt. Factors in Tissue Handling and Processing That Impact RNA Obtained From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56:1033-1042.
 40. Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, Doleshal M, Riggenbach JA, Morrison CD, Jewell S, Labourier E. Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *J Mol Diagn.* 2008; 10:415-23.
 41. Ma Z, Lui WO, Fire A, Dadras SS. Profiling and discovery of novel miRNAs from formalin-fixed, paraffin-embedded melanoma and nodal specimens. *J Mol Diagn.* 2009; 11:420-9.
 42. Siebolts U, Varnholt H, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C, Odenthal M. Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR. *J Clin Pathol.* 2009; 62:84-8.
 43. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn.* 2008; 10:203-11.