

Medikolegal Otopsilerde Erken Myokard Enfarktüsünün; Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC), İmmünohistokimya ve Histokimya Yöntemleri İle Değerlendirilmesi

EVALUATION OF EARLY MYOCARDIAL INFARCTION IN MEDICOLEGAL AUTOPSY CASES WITH TRIPHENYL TETRAZOLIUM CHLORIDE (TTC), HISTOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS

Dr. Nursel GAMSIZ BİLGİN,^a Dr. Mete K.GÜLMEN,^b Dr. Ahmet HİLAL,^a Dr. Necmi ÇEKİN^b

^aAdli Tıp AD, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, MERSİN

^bAdli Tıp AD, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, ADANA

Özet

Amaç: Erken myokard enfarktüsü; koroner kan akımında azalma yada tamamen kesilmeye bağlı olarak myositlerde meydana gelen nekroz olarak tanımlanmaktadır. Erken myokard enfarktüsünü tanımlamak, mekanizmasını anlamak ve halk sağlığına yönelik veri tabanı oluşturması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışmada, 30 Ani Beklenmedik Şüpheli Ölüm olgusu seçildi ve kalp dokusundan örnekler alındı. Örnekler; Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC), histokimya ve immünoenzimatik yöntemler ile değerlendirildi.

Bulgular: TTC sonrası erken myokard enfarktüsü olarak şüphelenip myokardiyal doku örneği aldığımız olgu sayımız 23'tü. TTC ile şüphelenip örnek aldığımız 23 olgunun 16'sında histokimyasal ve immünoenzimatik yöntemlerle akut myokard enfarktüsü saptandı. HBFP ve PTAH diğer histokimyasal boyalarla paralellik gösterdi. İmmünoenzimatik boyalar ile taze enfarktüs alanı Anti Myoglobin, Anti Myosin ve Anti Desmin antikorları negatif boyanma gösterirken bu alanda Anti C5b9 antikorun pozitif boyanması akut enfarktüsü destekler özellikeydi.

Sonuç: Histopatolojik değerlendirmenin makroskopik ve mikroskopik olmak üzere iki aşamalı olduğu, bu nedenle sadece histokimyasal ve immünoenzimatik yöntemlerin ön planda tutulmayıp TTC makroskopik tanı yönteminin de günlük uygulamada yer alması gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Ani ölüm, myokard enfarktüsü, immünohistokimya, otopsi, triphenyl tetrazolium chloride (TTC)

Abstract

Objective: Early myocardial infarction can be defined as the necrosis of the myocyte due to a total occlusion in the coronary arteries or a serious decrease in the blood flow. This study aims to find out a morphological method in defining early myocardial infarction and to understand the mechanisms of early myocardial infarction and bring up data for public health issues.

Material and Methods: In this study, 30 medico-legal autopsies of unexpected suspicious death cases were selected and their hearts were examined. Early myocardial infarction was evaluated with using, Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC), histochemical and immunoenzymatic methods at the pathology laboratory at department of forensic medicine.

Results: In 23 cases, we thought early myocardial infarction after TTC and took myocardial tissue samples. Of the 23, 16 were consistent with early myocardial infarction according to histochemical and immunoenzymatic methods. As for the immunoenzymatic stains, while the Anti Myoglobin, Anti Myosin and Anti Desmin antibodies showed negative dying in the newly infarcted area, the positive dying of Anti C5b9 in this area had the characteristics to support the idea of early infarction.

Conclusion: One should not forget that histopathological evaluation has two phases such as the macroscopic and microscopic steps, and for this reason one should not depend upon only the histochemical and immunoenzymatic methods, but, in our opinion, TTC morphological diagnostic method should also be introduced to the routine.

Key Words: Sudden death, myocardial infarction, immunohistochemistry, triphenyl tetrazolium chloride (TTC)

Türkiye Klinikleri J Foren Med 2005, 2:53-60

Geliş Tarihi/Received: 14.02.2005

Kabul Tarihi/Accepted: 05.07.2005

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Nursel GAMSIZ BİLGİN
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Adli Tıp AD, 33079, MERSİN
nurselbilgin@yahoo.com

Copyright © 2005 by Türkiye Klinikleri

Ani beklenmedik ölümlerin ülkelere göre değişkenlik gösterdiği, ülkenin sağlık hizmetlerinin kalitesi, yaygınlığı, toplumun sosyokültürel ve ekonomik yapısı ile

ilişkili olduğu bilinmektedir. İskemik kalp hastalıklarına bağlı patolojiler ölümlerin önemli bir kısmından sorumlu tutulmaktadır.¹⁻⁵

Erken myokard enfarktüsünün iskemik kalp hastalıklarına bağlı ölümlerin çoğundan sorumlu tutulduğu, hastaların genellikle fatal bir aritmi nedeni ile öldüğü belirtilmektedir. Erken myokard enfarktüsü; koroner kan akımında azalma yada tamamen kesilmeye bağlı olarak myositlerde meydana gelen nekroz olarak tanımlanmaktadır. Myokardiyal enfarktüsde izlenen farklı nekroz tipleri farklı patolojik mekanizmalarla meydana gelmektedir.¹⁻⁸

Myokardiyal nekrozu tanımaya yarayan morfolojik yöntemler; yapısal değişiklikler gerçekleşinceye kadar myositlerin yaşamasını gerektirmektedir. Doku preparatlarının optimal düzeyde sağlandığı hayvan çalışmalarında bile, bu sürenin 4-6 saat olduğu belirtilmektedir.⁶⁻¹¹

Yapılan çalışmalarda; myokard enfarktüsünü takip eden 24-48 saat içinde oluşan makroskobik değişikliklerin tanımlanmasının zor olduğu, bu amaçla NBT (Nitro Blue Tetrazolium) ve TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) morfolojik tanı yöntemlerinin kullanıldığı bilinmektedir.⁹⁻¹⁵

Dokuda oksidatif enzimlerin histokimyasal lokalizasyonları için tetrazolium tuzlarının kullanımı 1942'den daha eskilere dayanmaktadır. TTC morfolojik tanı yöntemini Lie 1975, Fishbein 1981 yılında tarif etmişlerdir. Tetrazolium tuzlarında biyokimyasal reaksiyon oksidasyon-redüksiyona dayanmaktadır.^{9,11-15}

Enfarktüsü göstermek amacıyla kullanılan histokimyasal yöntemin temeli; iskemi alanındaki enzimlerin azalması ve/veya tükenmesi, belirteçlerin artması sonucunda kana enzimlerin salınması ve membran bütünlüğünün bozulmasına dayanmaktadır.^{9-11,16-18}

İmmünohistokimya günümüzde diagnostik patolojiye yardımcı bir yöntem olarak oldukça yaygınlaşmıştır.^{16,19-23}

Bu çalışmanın amacı; Adli Tıp günlük uğraşısında sorun oluşturan "Ani Beklenmedik Şüpheli Ölümlerde" erken myokard enfarktüsü'nün

tanımlanmasını ve ölüm nedeninin belirlenmesini sağlayarak, adli olgulara açıklık getirmek, bölgemizdeki myokard enfarktüsü görülme sıklığı hakkında bilgi edinmek ve halk sağlığına yönelik veri tabanı oluşturmaktır.

Gereç ve Yöntemler

Adli Tıp Kurumu Adana Grup Başkanlığından çalışma için izin alındıktan sonra Morg İhtisas Dairesinde otopsileri yapılan, 30 Ani Beklenmedik Şüpheli Ölüm olgusundan cinsiyet ve yaş ayrımı yapılmaksızın, standart çıplak gözle enfarktüsü düşündürecek alan olup olmadığına bakılmaksızın myokarddan örnekler alındı. Örnekler TTC morfolojik tanı yöntemi, histokimya ve immünoenzimatik yöntemlerle incelenerek değerlendirildi.

Otopside alınan myokard dilimleri, çeşme suyu ile yıkandıktan sonra hazırlanan %10'luk TTC (Merck 8380) solüsyonu içine konularak, etüvde 37°C'de 20 dakika bekletildi. Etüvden çıkarıldıktan sonra örneklerin makroskobik görünümünün 1. ve 5. günlerde fotoğrafları çekildi. Myokard örnekleri %10'luk tamponlanmış formaldehit içerisine konularak doku takibi ve parafin bloklar haline getirilene kadar bekletildi.^{9,12,14,15} Myokard örneklerine; H+E, Van Gieson, Masson Trikrom, HBFP (Lie'nin Hematoksilan Basic Fuchsin Picrik Asidi) ve PTAH (Mallory'nin Fosfotungstik Asit Hematoksileni) histokimyasal boyaları uygulandı.^{17,18,20,23,24}

İmmünoenzimatik (ICC) boyama için Avidin-Biotin Complex (ABC) yöntemi seçildi. Ünlversal kit olarak ABC yöntemi ile uyumlu DAKO LSAB+Kits (K 0690) kullanıldı. Bu yöntem ile çalışabilir özellikteki; Anti C5b9 (DAKO M 0777), Anti Myoglobin (DAKO A 0324), Anti S100 (Novo Castra, NCL-S100), Anti Desmin (Novo Castra NCL-DES-DERII), Anti SMA (Novo Castra NCL-SMA), Anti Myosin (Zymed 08-0105) primer antikorları kullanıldı.^{19,21}

İmmünoenzimatik boyamada Hsu ve arkadaşlarının tanımladığı yöntem uygulandı. Myokarttan alınan iki ayrı kesit pozitif ve negatif boyanmak üzere lam üzerine alındı. Negatif

kontrol örneklerine boya aşamaları sırasında antikor uygulanmadı, diğer aşamalar yöntemde belirtildiği gibi uygulandı.¹⁹

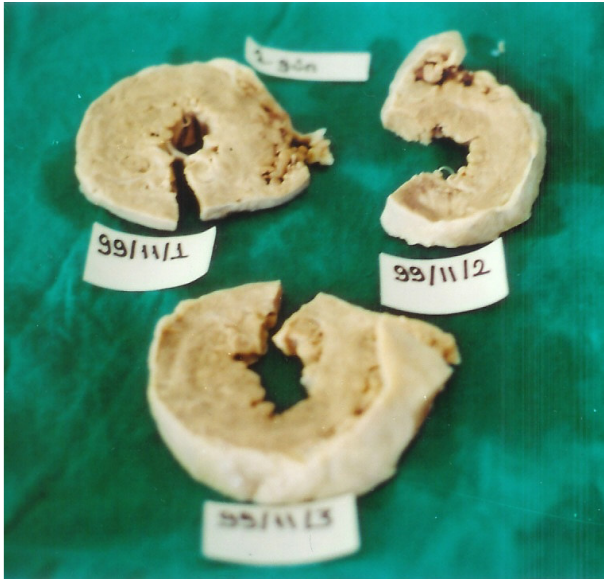
Myokarttan her bir Poly L. Lysine (PLL)'li lam üzerine 5 mikron kalınlığında pozitif ve negatif kontrol için 2 kesit alındı. Kesitler deparafinize edilip, alkolden geçirildikten sonra Phosphate Buffer Saline (PBS) ile yıkandı. Her yıkama sonrası kesitlerin etrafı kurulandı ve kurulama işlemi her basamakta tekrarlandı, kurulanan kesitler nemli ortama konuldu ve çalışma nemli ortamda sürdürüldü.

Çalışmaya alınan olguların yapılan H+E, histokimyasal ve immünoenzimatik boyalı preparatları ışık mikroskobunda değerlendirildi.

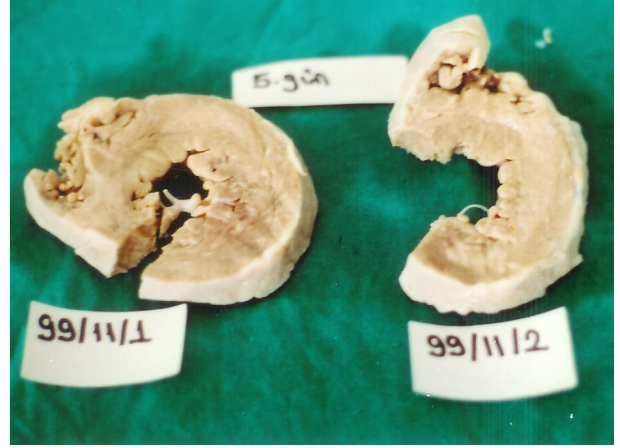
Bulgular

Çalışmaya alınan 30 olgunun hepsi Ani Beklenmedik Şüpheli Ölüm olgusuydu. Olguların 24 (%80)'ü erkek, 6(%20)'sı kadındı. 31-40 yaş grubu 12 (%40) olgu ile ilk sıradaydı ve yaş ortalaması 39.1'di.

TTC sonrası erken enfarktüs olarak şüphelenip myokardiyal doku örneği aldığımız olgu sayımız 23'tü (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1. 11 nolu olguda TTC morfolojik tanı yöntemi ile saptanan eski enfarktüs alanları ile komşu alanlarda yeni enfarktüs alanları. 1.gün fotoğrafı.



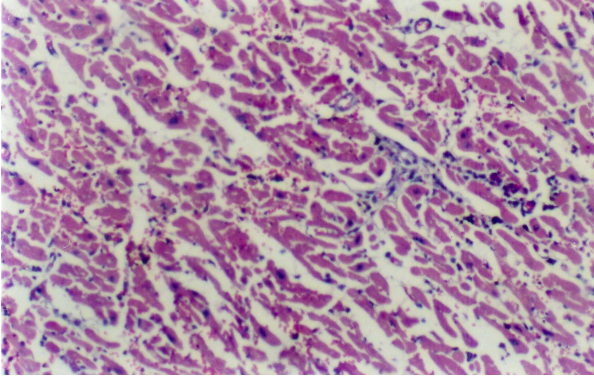
Şekil 2. 11 nolu olgunun TTC morfolojik tanı yöntemi ile 5.gün fotoğrafı.

Olguların H+E, Van Gieson ve Masson Trikrom boyalarında, vasküler yapıları çevreleyen fibröz doku artışının parankim içine doğru ilerlediği görüldü. Mikroskobik düzeyde erken enfarktüs alanı saptandı (Şekil 3,4,5). HBFP ve PTAH ile aynı alan daha net görüldü (Şekil 6,7) ve HBFP ile PTAH'ın diğer histokimyasal boyalarla paralellik gösterdiği saptandı.

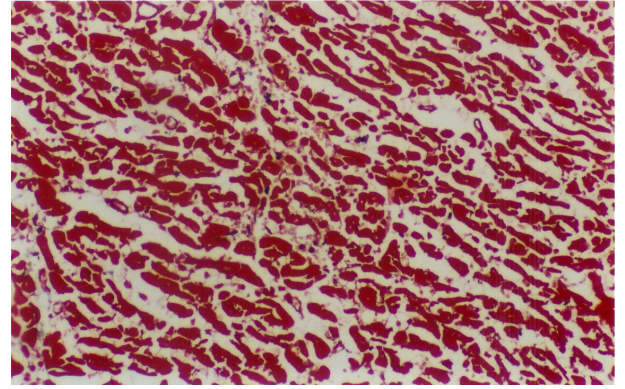
İmmünoenzimatik boyalarda; erken enfarktüs alanında Anti Myoglobin, Anti Myosin ve Anti Desmin antikorları negatif boyanma gösterirken bu alanda Anti C5b9 antikorun pozitif boyanması erken enfarktüsü destekler özellikteydi (Şekil 8,9,10).

Erken enfarktüs alanlarında Anti S-100 antikor negatif, Anti SMA antikor negatif boyandı. Anti SMA antikor ile iskemik alanda vaskülarizasyon artışı saptandı.

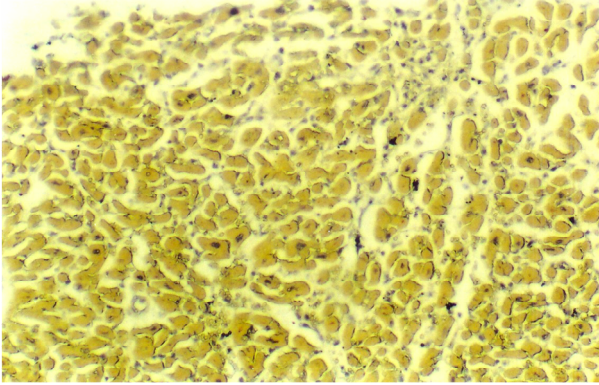
Sonuç olarak TTC ile yeni olarak düşünülüp örneklediğimiz 23 olgunun 16'sında ve TTC ile yeni enfarktüs görmediğimiz 7 olgunun 3'ünde olmak üzere toplam 19 olguda yapılan H+E, histokimyasal ve immünoenzimatik boyalar ile erken enfarktüs alanı saptandı. Yapılan H+E, histokimyasal ve immünoenzimatik boyalar ile elde edilen sonuçların TTC sonuçları ile paralellik gösterdiği sonucuna varıldı.



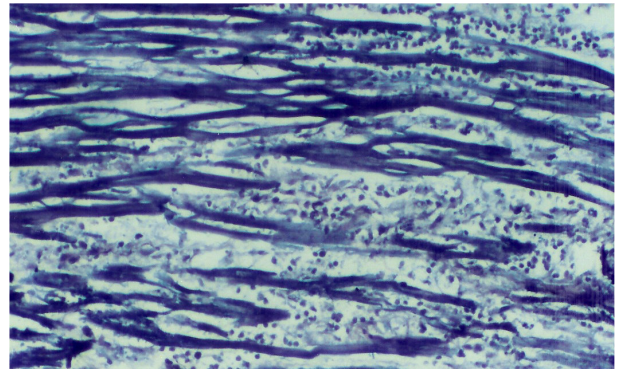
Şekil 3. 11 nolu olgunun myokard dokusunda taze enfarktüs ile uyumlu olduğu düşünülen şüpheli alan, X350, H+E.



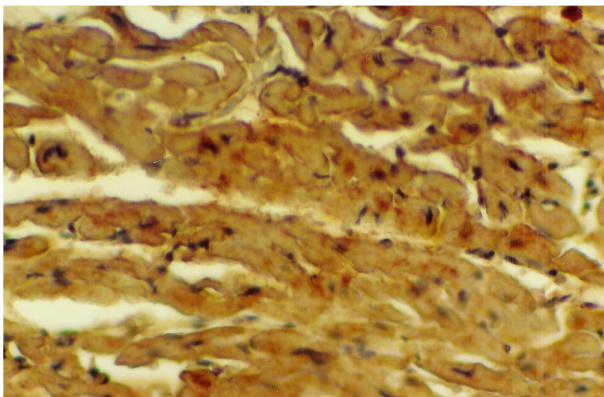
Şekil 4. 11 nolu olgunun myokard dokusunda taze enfarktüs ile uyumlu düşünülen şüpheli alan, X350, Masson Trikrom.



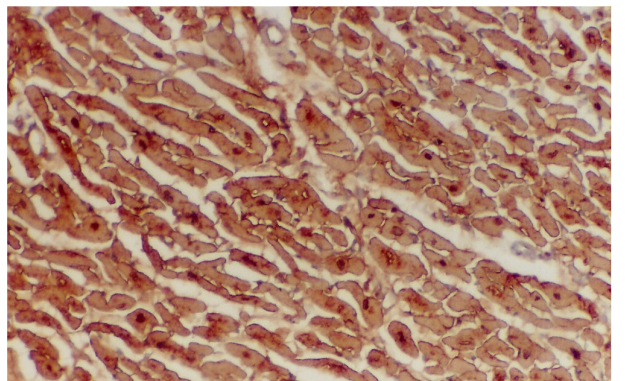
Şekil 5. 11 nolu olgunun myokard dokusunda taze enfarktüs ile uyumlu olduğu düşünülen şüpheli alan, X350, HBFP.



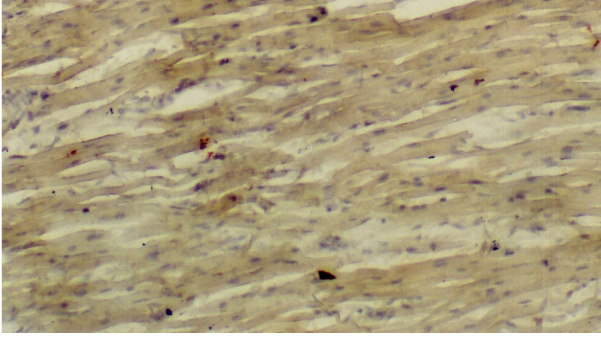
Şekil 6. 11 nolu olgunun myokard dokusunda taze enfarktüs ile uyumlu olduğu düşünülen şüpheli alan, X350, PTAH.



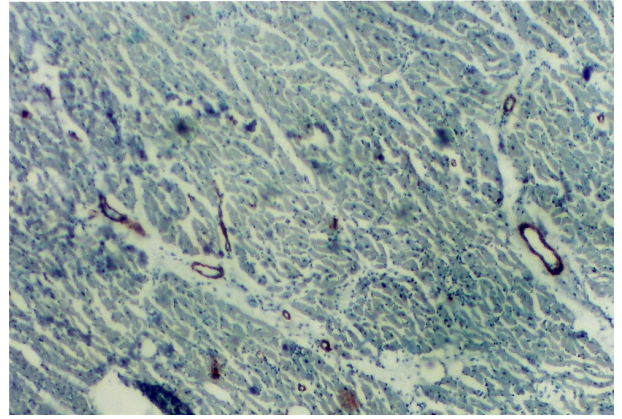
Şekil 7. Myokard dokusunda sitoplazmik granüler tarzda pozitif ICC boyanma, X475, Anti C5b9 Antikor, ABC yöntemi.



Şekil 8. 11 nolu olgunun myokard dokusundaki ICC negatif boyanma, X350, Anti Myoglobin Antikor, ABC yöntemi.



Şekil 9. 11 nolu olgunun myokard dokusundaki ICC negatif boyanma, X350, Anti Desmin Antikor, ABC yöntemi.



Şekil 10. 11 nolu olgunun myokard dokusundaki ICC negatif boyanma, X350, Anti SMA Antikor, ABC yöntemi.

Tartışma

Adli patolojide en sık karşılaşılan sorun genellikle şüpheli myokard enfarktüsü olgularında tanının doğruluğudur. Rutin makroskobik ve mikroskobik incelemeler ile her zaman bu lezyonların saptanması olası değildir. Bu lezyonların saptanabilmesi ve morfolojiye yansiyabilmesi için ölüm öncesi geçmesi gereken süre tam olarak bilinmemektedir.^{4-6,8,10,11,15}

Tetrazolium boyalarının iskemik hasarın erken döneminde myokard enfarktüsünü tespit etmek amacıyla kullanımının deneysel ve klinik çalışmalarda giderek popülerite kazandığı, irreverzible hasar bölgesinin erken safhalarında olmasına rağmen nekroz için sensitif bir marker olduğu, 2-4 saatte tanı koyulabileceği belirtilmektedir.⁹⁻¹⁵ Adegboyage ve arkadaşları çalışmalarında akut myokard enfarktüsü makroskobik tanısında, TTC morfolojik tanı yönteminin %77.4 sensitiviteye, %92,6 spesifiteye sahip ve güvenilir olduğunu göstermişlerdir.¹⁴

Bununla birlikte TTC morfolojik tanı yönteminin, postmortem 18 saatten daha uzun süre ve 4°C'de bekletilmiş cesetlerde güvenilir olmadığı çünkü myokardın dehidrogenaz enzim aktivitesinde postmortem interval süresince değişikliklerin görüldüğü ve bir miktar otolizin geliştiği, gelişen otolizin enzim sistemlerini etkilediği de bilinmektedir.^{14,15,25,26} TTC ve NBT gibi morfolojik, immünoenzimatik, histokimyasal

yöntemler erken enfarktüsün saptanmasında oldukça yardımcı olmakla birlikte rutinde uygulanmasının pratik olmadığı ve de tek başlarına yeterli olamadıkları da bilinmektedir.^{8-16,20,22,24,25}

Çalışmamızda TTC morfolojik tanı yöntemi ile 30 olgudan 23 (%76.6)'ünde erken enfarktüs ile uyumlu alanlardan şüphelenildi. Şüphelenilen 23 olgunun 16'sında, şüphelenmediğimiz 7 olgunun 3'ünde olmak üzere toplam 19 (%63.3) olguda histokimyasal ve immünoenzimatik yöntemlerle erken myokard enfarktüsü saptandı.

Olgulara ait ölü muayene tutanakları incelendiğinde; enfarktüsden kaç saat sonra ölümün gerçekleştiği ile ilgili bilgiye rastlanmadı. Otopsilerin ise 12 ila 24 saat sonrasında yapıldığı öğrenildi. Enfarktüs ile otopsi arasında geçen süre ile ilgili yeterli bilgi olmaması nedeniyle enfarktüs sonrası en erken ne kadar sürede TTC morfolojik tanı yöntemi ile erken enfarktüs saptanabileceği hakkında yorum yapılamadı.

TTC solüsyonunun makroskobik tanıda fikir verebileceği ve histopatoloji için yol gösterici olabileceği kanısına varıldı. Bu nedenle Adli Tıp günlük uğraşısında oldukça ciddi sorun oluşturan erken myokard enfarktüsünün tanımlanabilmesi ve ölüm nedeninin belirlenmesinde, sürüncemede kalan adli olgulara açıklık getirilmesinde ve de bölgemizde myokard enfarktüsü görülme sıklığı hakkında bilgi edinilmesinde kullanılabileceği kanısına varıldı.

Leadbetter ve arkadaşları, histokimyasal olarak H+E, HBFP, PTAH ve immünoenzimatik yöntemlerden Anti C5b9 ve Anti Myoglobin antikor kullandıkları çalışmalarında; H+E'nin 6 saatten önce iskemik değişiklikleri açıklamada yetersiz olduğunu, PTAH'ın kontraksiyon bantlarını açıklamakla birlikte spesifik olmadığını, Myokardın iskemik hasarında negatif reaksiyon veren myoglobinin HBFP ile aynı zamanda paralel olarak boyanmasının agonal değişiklikleri gösterebildiğini, Anti C5b9 Antikor ile nekrotik myositlerde toplanan kompleman kompleksinin 40 dakika gibi kısa sürede tayin edilebildiği, iskemik nekrozis için spesifik olduğunu ve pozitif boyanmasının erken enfarktüsü gösterdiğini belirtmişlerdir.²²

Leadbetter ve arkadaşları; ölüm ile semptomlar arasındaki intervalin 6-8 saatten kısa olması halinde HBFP ile pozitif boyanmanın erken iskemi bulgusu olarak kabul edildiğini, bu alanların diğer yöntemlerle yapılan incelemelerde normal ya da tanısal olmayan değişiklikler gibi görüldüğünü, HBFP ile boyanmada akut myokard enfarktüsü çevresini saran iskemik liflerin varlığının da izlendiğini, bu liflerin H+E ile normal olarak saptandığını, normal myokardın ve belirgin nekrotik myokardın HBFP ile boyanmadığını, 36 saate kadar olan sürede postmortem değişikliklerden etkilenmediğini belirtmişlerdir.⁹

HBFP ve PTAH boyama sonuçlarımızda; HBFP ile fuksin pozitif boyanma alanları iske miyi ve myosit düzeyindeki nekrozu göstermekteydi. PTAH ile sağlıklı myokardiyal lifler, nükleuslar ve fibrin mavi, kollajen sarımsıya kadar değişen renkte kuvvetli boyanırken, iskemiden nekroza doğru boyanmanın zayıfladığı ve nekroz alanlarında boyanmanın fakirleştiği ve kaybolduğu saptandı. H+E boyanmasında şüphemiz devam etmekle birlikte HBFP ve PTAH boyalarının değerlendirilmeleri sonucunda erken enfarktüs alanları daha belirgin olarak dikkat çekti. HBFP ve PTAH'ın diğer histokimyasal boya yöntemleri ile elde edilen sonuçlarla paralellik gösterdiği saptandı.^{9,16,17,22,27}

Günlük yaşamda tanı amacıyla kullanımı mutlak olan H+E yanı sıra gerekli bazı özel histokimyasal boya yöntemlerinin bir panel

şeklinde çalışılmasının ve kullanılmasının daha doğru ve sağlıklı bir tanıya götüreceği ve ekonomik yük getirmeyeceği kanısına varıldı.^{1,2,6,8-13,16,22,23,27}

Makroskobik olarak myokard enfarktüsü ve/veya önemli derecede koroner arterosklerozu olan olgulardan alınan örneklerde, Anti Seruloplazmin, Anti Myosin, Anti Myoglobin ve Anti CRP antikorlarla yapılan immünohistokimyasal boyama paterni ve H+E, PTAH, HBFP ile olan boyama paterninin korelasyon gösterdiği, HBFP ve antikor ile immünohistokimyasal olarak boyamanın H+E, ve PTAH'a göre myokardiyumdaki hipoksik hasarı belirlemede daha hassas olduğu, ancak Anti Seruloplazmin, Anti Myosin, Anti Myoglobin ve Anti CRP antikorlarla yapılan boyamada boyama kaybının oluşunun buradaki nekrozu gösterdiğini, bu bulguların HBFP boyamayla benzer bulgular verdiğini sonuç olarak belirtilmektedir.^{20-22,27-31}

Çalışma kapsamına aldığımız olgulara Anti C5b9 Antikor uygulandığında; eski enfarktüs alanlarında gelişen fibröz dokuya bağlı olarak 2 olguda negatif boyanma özelliği görüldü. Erken enfarktüs gördüğümüz 16 olgunun tamamı ve şüpheli bulunan 12 olgunun üçünde (toplam 19 olguda) Anti C5b9 Antikor ile sitoplazmada granüler tarzda pozitif boyanma özelliğinin varlığı, erken enfarktüsü destekleyen bulgu olarak değerlendirildi. Bu nedenle Anti C5b9 antikoru erken enfarktüsde diğer tüm yöntemlere ek olarak önemli bir ayıraç ve yardımcı olduğu, kalbe özgün bir belirteç olması nedeniyle tanı aşamasında hata payını en aza indirdiği ve güvenilir özelliklerde olduğu sonucuna varıldı. Benzeri çalışmalardan elde edilen bulguların da bu görüşümüzü desteklemekteydi.²⁹⁻³¹

H+E morfolojik tanı yöntemi ile şüpheli olarak değerlendirilen 23 olgudan 16'sında H+E ve diğer özel histokimyasalların yanı sıra HBFP ve PTAH ile taze myokard enfarktüsü tanısına ulaşıldı. Ancak başta Anti C5b9 antikor, Anti Myoglobin antikor ve Anti Myosin antikor ile bu tanıyı destekler bulgular elde edildi. Çalışmamızda elde edilen bu sonuç benzer çalışmalarla uyumlu bulundu. HBFP histokimyasal boya yönteminin immünoenzimatik yöntemler ile paralel ilişkili

olduğunu ve bunun günlük uygulamalar için son derece yararlı olabileceği kanısına ulaşıldı. Ancak bu yöntemin de ölümden 24 saat sonra otopsi yapılan olgularda otoliz nedeniyle aynı paralel ilişkilenebilirliği gösteremediği saptandı. Bu varılan sonuç ve yorumlardan otoliz gelişmiş dokularda, boya tekniğinin doğru ve anlamlı sonuçlar vermeyebileceğinin, boya yöntem basamaklarının dikkatle uygulanması gerekeceğinin göz önünde bulundurulması gerektiği kanısına ulaşıldı.

Romain ve arkadaşları, Anti Desmin, Anti Fibrinojen ve Anti C5b9 antikorlarının rutin H+E ile saptanamayan kardiyomyositik hasarı açıkladığını, hasarlı myositlerde Anti Desmin kaybı olduğunu, sarkoplasmik immünoboyanmanın Anti C5b9 ve Anti Fibrinojen ile gözlendiğini, Anti Fibrinojen antikorunun Anti C5b9'dan daha yüksek boyanma sensitivitesi ve Anti Desminden daha iyi boyanma spesifitesinden dolayı daha elverişli olduğunu belirtmişlerdir.²⁸⁻³²

Çalışma kapsamına aldığımız olgularımızda, Anti C5b9 antikor'da sitoplazmada granüler tarzda pozitif boyanma ve eski enfarktüs alanlarında fibröz doku nedeni ile negatif boyanma varlığının, kaynaklarda izlediğimiz çeşitli çalışmalarla uyumlu olduğu saptandı. Desmin, myoglobin ve myosin normal kalp dokusunun bileşenleri olması nedeni ile, intakt myofibrillerde pozitif boyanma göstermektedir. İskemiden nekroza kadar olan evresinde boyanmada kayıp izlenmektedir. Nekroz alanlarında ise negatif boyanma özellikleri görülmektedir. Bu bulgumuzun yapılan çalışmalarla uyum olarak değerlendirildi.^{20,22,28-32}

Olgularımıza uyguladığımız Anti SMA antikor, tüm olgularda pozitif boyanma özelliği göstermektedir. 10 olguda bu boyanma özelliği ile, revaskülarizasyonun varlığı saptandı. Anti SMA antikor myokard içerisinde yer alan damar yapılarının H+E ve diğer özel histokimyasal boyalar ile ayırt edilemeyen özelliklerini ortaya koymakta önemli bir belirteçtir. Özellikle hasarlı dokularda ortaya çıkan onarım yanıtı olarak revaskülarizasyon sıklıkla görülmektedir. Gerek serimizde gerekse de başka çalışmalar açısından bu özelliğin saptanması da yararlıydı.

Kardiyovasküler sistem lezyonlarının

belirlenebilmesi, ayırıcı tanımı sağlanabilmesi ve sağlıklı yorum yapılabilmesi için immünoenzimatik yöntemin uygulandığı panel antikor seçimi önem kazanmaktadır. Panel antikor uygulamalarının tercih nedenleri arasında; yöntemin ucuzlaması, monoklonal antikor üretimindeki gelişmeler ve hata payını azaltması sayılabilir. Çalışmamızda da morfolojik, histokimyasal ve immünoenzimatik belirteçlerin çok sayıda ve panel şeklinde uygulanması ile hata payı en aza indirilmiş ve sağlıklı tanımlara ulaşılabilmektedir. Yöntem seçimlerinde çalışmacılar özellikle bu konuyu göz önünde bulundurmaları gerekmektedir.^{1,2,10,16,19-22,24,29-31}

Ani beklenmedik ölüm olgularında tanı, ölüm nedeni ve mekanizmasının saptanmasında zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu tür olgularda öykü, iyi bir adli tahkikat ve olay yeri keşfi, tüm laboratuvar tetkiklerinin eksiksiz yapılması, otopsinin olabildiğince erken ve usulüne uygun olarak yetkili ve yetkin kişilerce yapılarak histopatolojik örneklemenin özenle gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Histopatolojik değerlendirmenin makroskobik ve mikroskobik olmak üzere iki aşamalı olduğu akılda tutulmalı, bu nedenle sadece histokimyasal ve immünoenzimatik yöntemler ön planda tutulmayıp makroskobik değerlendirme içerisinde yer alan TTC morfolojik tanı yönteminin de günlük uygulamada yer alması gerekmektedir. Özellikle ani ölümlerde kardiyovasküler sistemin değerlendirilmesinde özel önem ve özenin gösterilerek, sayılan tüm yöntemlerin uygulanmasının, bu tür olgularda, bugüne kadar yaşanan zorlukları aşılmasına ve adaletin hızlanmasına yardımcı olacağı kanısı ve inancındayız.

KAYNAKLAR

1. Hilal A. Rastgele Seçilmiş Adli Otopsi Olgularında Aterosklerozis Zemininde Chlamydia Pneumonia'nın Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1998.
2. Gülmen MK. Medikolegal Otopsilerde Sağ Ventrikül Yağlanması Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 1997.
3. Di Maio DJ, Di Maio VJ. Deaths Due to Naturel Disease. In: Di Maio DJ, Di Maio VJ, eds. Forensic Pathology, Boca, Rotan Ann Arbor, London, Tokyo, 1993:43-8.

4. Knight B. Unexpected and Expected Death From Natural Causes. In: Knight B, eds. *Simpson's Forensic Medicine*, 10th Ed. London, Sdynded, Auckland 1991:166-71.
5. Buja LM, Willerson JT. Relationship of Ischemic Disease to Sudden Death. *JFSCA*, 1991;36:25-33.
6. Hirsch CS, Morris RC, Moritz AR. Scientific Medicolegal Investigation, Sudden Death from Disease. In: Hirsch CS, Morris RC, Moritz AR. Eds. *Handbook of Legal Medicine*, 5th Ed., The CV Mosby Company, St Louis, Toronto, London, 1979: 22-29.
7. McManus BM, Dvies MJ. Heart Disease in the Adult. In: Ed's Damjanov I, Linder J. *Anderson's Pathology*. Mosby Company, Boston, Philadelphia, London, Tokyo, New York, 1996:1256-1338.
8. Cattellier MJ, Waller BF, Clark MA, Pless JE, Hawley DA, et al. Cardiac Pathology in 470 Consecutive Forensic Autopsies. *JFSCA* 1990;35:1042-1054.
9. Lie JT, Holley KE, Kampa WR, Titus JL. New Histochemical Method for Morphologic Diagnosis of Early Stages of Myocardial Ischemia. *Mayo Clin Proc* 1971;46:319-27.
10. Kloner RA, Darsee JR, DeBoer LW, Carlson N. Early Pathologic Detection of Acute Myocardial Infarction. *Arch Pathol Lab Med*, 1981;105:403-6.
11. Hougen HP, Valenzuela A, Lachica E, Villanueva E. Sudden Cardiac Death: A Comparative Study of Morphological, Histochemical and Biochemical Methods. *Forensic Science International* 1992;52:161-9.
12. Bederson BJ, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, et al. Evaluation of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride as a Stain for Detection and Quantification of Experimental Cerebral Infarction in Rats. *Stroke* 1986;17:1304-8.
13. Ranasinghe H, Smith NM. Evaluation of a Lactate Dehydrogenase-Nitro Blue Tetrazolium Method of Detecting Unapparent Myocardial Infarction Using a Standardised Sampling Technique. *Forensic Science International* 1980;16:153-8.
14. Adegboyega PA, Adesokan A, Haque AK, Boor PJ. Sensitivity and Specificity of Tetrazolium Chloride in the Gross Diagnosis of Acute Myocardial Infarcts. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:1063-8.
15. Fihlsbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando E, et al. Early Phase Acute Myocardial Infarct Size Quantification: Validation of the Triphenyl Tetrazolium Chloride Tissue Enzyme Staining Technique. *Am Heart J* 1981;101:593-600.
16. Brinkmann B, Sepulchre MA, Fecner G. The Application of Selected Histochemical and Immunohistochemical Markers and Procedures to the Diagnosis of Early Myocardial Damage. *Int J Leg Med* 1993;106:135-41.
17. Allen TC. Hematoxylen and Eosin. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, eds. *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology. Washington 1992;53-8.
18. Prophet EB. Fixation. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, eds. *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington 1992;25-9.
19. Hsu SM, Raine L, Fanger H. A Comparative Study of the Peroxidase-Antiperoxidase Method and an Avidin-Biotin Complex Method for Studying Polypeptide Hormones with Radioimmunosay Antibodies. *Am J Clin Pathol* 1981;75:734-8.
20. Edston E. Evaluation of Agonal Artifacts in the Myocardium Using a Combination of Histological Stains and Immunohistochemistry. *Am J Forensic Med Pathol* 1997;18:163-7.
21. Cote RJ, Taylor CR. Immunohistochemistry and Related Marking Techniques. In: Damjanov I, Linder J, eds. *Anderson's Pathology*. Mosby Company, Boston, Philadelphia, London, Tokyo, New York, 1996. p.136-75.
22. Leadbeatter S, Wawman HM, Jasani B. Immunohistochemical Diagnosis of Early Myocardial Ischaemic/Hypoxic Damage. *Forensic Science International* 1989;40:171-80.
23. Beckstead JH. Histochemistry. In: Damjanov I, Linder J, eds. *Anderson Pathology*. Mosby Company, Boston, Philadelphia, London Tokyo, New York 1996. p.176-89.
24. Stahl E. Screening of Myocardial Contraction Bands: A Comparison Between Two Histological Staining Methods. *Forensic Science International* 1990;45:151-7.
25. Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, Hansen S, et al. Infarct Size Measurement by Triphenyl Tetrazolium Chloride Staining Versus in Vivo Injection of Propidium Iodide. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:2169-75.
26. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium Staining of Irreversible Injury Following Coronary Artery Occlusion in Rats. *Am J Pathol* 1985;121:522-30.
27. Rajs J, Jakobsson S. Experiences with The Hemotoxylin Basic Fuchsin Picrik Acid Staining Method for Morphologic Diagnosis of Myocardial Ischemia-an Experimental Study in Forensic Pathology. *International Symposium on Natural Unexpected Death* 1975:1-5.
28. Fracalanci P, Gallo P, Bernucci P, Silver MD. The Pattern of Desmin Filaments in Myocardial Disarray. *Hum Pathol* 1995;26:262-6.
29. Romain N, Michaud K, Mangin P. Evaluation of Immunohistochemical Detection of Early Ischaemic Myocardial Damage. *International Association of Forensic Sciences, 15th Triennial Meeting*. Los Angeles, California, 22-28 August 1999: 170.
30. Nishida S, Hiruma S, Hashimoto S. Immunohistochemical Change of Actin in experimental Myocardial Ischemia. It's Usefulness to Detect Very Early Myocardial Damages. *Histol Histopathol* 1987;2:417-28.
31. Dorandeu A. Evaluation of Three Markers, One Histochemical (Orange Acridine) Two Histochemical (Vinculin and α Actin) for the Post Mortem Diagnosis of Recent Cardiac Ischemia without Detectable Infarction Changes. *International Association of Forensic Sciences, 15th Triennial Meeting*. Los Angeles, California, 22-28 August 1999:195.
32. Ariza A, Coll J, Fernandez-Figueras MT, Lopez MD, Mate JL. Desmin Myopathy: a Multisystem Disorder Involving Skeletal, Cardiac and Smooth Muscle. *Hum Pathol* 1995;26:1032-7.