

## Farklı Fiksatiflerin Bazı Dokular İçin Uygunluğunun Belirlenmesi

Hatice GÜN\*, Emel DEMİRBAĞ, Kenan ÇINAR

Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü /ISPARTA

Alınış Tarihi:11.05.2011 Kabul Tarihi:07.07.2011

**Özet:** Bu çalışmada Carnoy, Orth, Regaud, Schaudin, Bouin, B5, Clark, %10'luk formalin, Zenker ve alkol-formalin fiksatiflerinin böbrek, dalak, karaciğer, mide ve duodenum dokularının bazı bölgeleri için uygunluklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna göre, böbrek ve midede incelenen tüm bölgeler, duodenumda lamina epitelyalis, lamina propria ve tunika muskularis için en uygun fiksatifin Clark olduğu tespit edildi. Bouin solüsyonunun dalak ve alkol-formalin solüsyonunun karaciğer için uygun fiksatifler olduğu belirlendi. Schaudin solüsyonuyla tespit edilen dokuların hemen hemen hepsinde ayrılmalar ve doku bütünlüğünde bozulmalar saptandı. Regaud ve B5 solüsyonlarının dalak, Bouin ve %10'luk formalin solüsyonlarının duodenum, Orth solüsyonunun karaciğer, Carnoy, Zenker ve alkol-formalin solüsyonlarının böbrek dokularında çalışılan bölgeler için uygun fiksatifler olmadığı belirlendi.

**Anahtar sözcükler:** *Rattus rattus*, İmmersiyon, Fiksasyon, Fiksatif uygunluğu

### The Determination of the Suitability of Different Fixatives for Some Tissues

**Abstract:** In this study it was aimed to determination of the suitability of Carnoy, Orth, Regaud, Schaudin, Bouin, B5, Clark, 10% formalin, Zenker and alcohol-formalin fixatives for some regions of kidney, spleen, liver, stomach and duodenum tissues. According to this, it was determined that the most suitable fixative was Clark for examined regions in kidney and stomach, and lamina epithelialis, lamina propria and tunica muscularis in duodenum. It was established that Bouin solution was suitable for spleen and alcohol-formalin solution was suitable for liver. The degradations in tissue integrity and separations were determined in fixed tissues with Schaudin solution. It was identified that they were not suitable fixatives for examined regions that Regaud and B5 solutions in spleen, Bouin and 10% formalin solutions in duodenum, Orth solution in liver, and Carnoy, Zenker and alcohol-formalin solutions in kidney.

**Keywords:** *Rattus rattus*, Immersion, Fixation, Suitability of fixative

### Giriş

Tüm dokuların mikroskopik incelemesinde fiksasyon temel basamaktır ve sonraki aşamaları etkiler (Kiernan, 2008). Fiksasyonun amacı, dokuların morfolojik özelliklerini canlı durumundakine en yakın şekliyle korumaktır (Fox vd., 1985; Arnold vd., 1996). Fiksasyonun metabolizmayı durdurma (Braet ve Ratinac, 2007), organellerin ve moleküllerin yapısını sabitleme (Rockey vd., 2009) ve ilerleyen aşamalar için daha dayanıklı ve daha ulaşılabilir materyal elde etme gibi amaçları da vardır. Fiksasyonu etkileyen faktörler pH, sıcaklık, konsantrasyon, osmolarite, tespitin süresi ve dokunun boyutudur (Freida, 1997). Aynı zamanda dokuların boyanmasının da kullanılan fiksatif konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği saptanmıştır (Hopwood, 1996). Bu çalışmada bazı fiksatiflerin farklı dokular üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanı Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarından temin edilen 5 adet Wistar albino türü sıçanların (*Rattus rattus*) mide, bağırsak, karaciğer, dalak ve böbrekleri materyal olarak kullanıldı. Alınan doku örnekleri Carnoy, Orth, Schaudin, Bouin, B5, Clark, %10 formaldehit, Zenker, alkol-formalin (Grizzle, 2008) ve Regaud (Culling vd., 1985)'da immersiyon tarzında tespit edildi. Alınan örnekler Zenker solüsyonunda 8 saat, Regaud solüsyonunda 24 saat, Orth ve %10'luk formalin solüsyonlarında 48 saat tespit edildi. Tespit edildikten sonra 24 saat akan suda

yikanan örnekler, dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi ve parafinde bloklandı. Carnoy ve Clark solüsyonlarında 90 dakika, alkol-formalin ve B5 solüsyonlarında 4 saat, Schaudin ve Bouin solüsyonlarında 16 saat tespit edilen örnekler rutin histolojik doku takibi aşamasından geçirildi. Doku takibi aşamasından geçirilen örnekler parafinde bloklandı. Hazırlanan bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitlere genel histolojik yapıyı belirlemek amacıyla Hematoksilen-Eosin (Freida, 1997) boyama yöntemi uygulandı. Hazırlanan preparatlar Olympus CX 41 tipi ışık mikroskopunda incelendi ve ilgili kısımlarından fotoğraf çekimleri yapıldı.

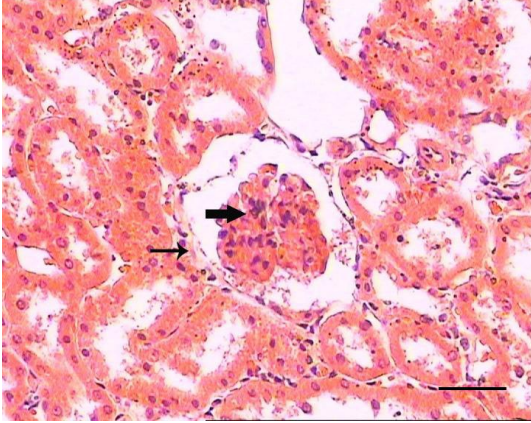
### Bulgular

Uygulanan fiksatiflerin böbrek, karaciğer, dalak, mide ve bağırsak dokuları için uygunluğu ve fiksasyonlar sonucu dokularda oluşan farklılıklar Çizelge 1'de belirtildi.

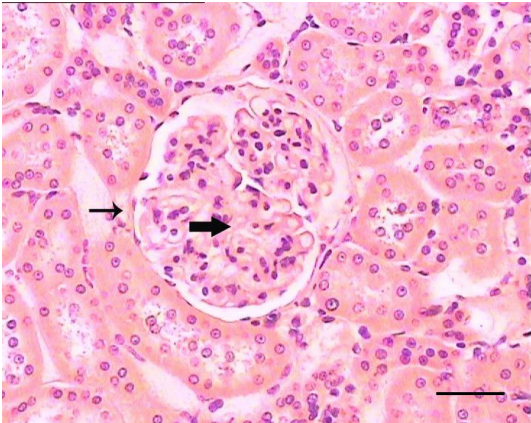
### Böbrek

Böbrek preparatlarında glomerulus, tubulus proksimalis, tubulus distalis, çıkan henle, inen henle ve bowman kapsüllerindeki histolojik yapılar ele alındı. Buna göre belirtilen bütün bölgeler için en iyi fiksatifin Clark olduğu gözlemlendi. Schaudin solüsyonunda glomerulus yumağı ile bowman kapsülü arasında çok fazla ayrılmaların olduğu (Şekil 1) belirlendi. Clark ile tespit edilen dokularda glomerulus yumağı ile Bowman

kapsülü arasında ayrılmaların olmadığı (Şekil 2) tespit edildi. Schaudin, Carnoy, Zenker ve alkol-formalinde tespit edilen dokularda tubulus proksimalis, tubulus distalis, çıkan henle ve inen henlelerin hücre sınırlarında parçalanmaların meydana geldiği tespit edildi. B5 ve Regaud'da tespit edilen dokularda tüm oluşumların bütünlüklerini korudukları belirlendi.



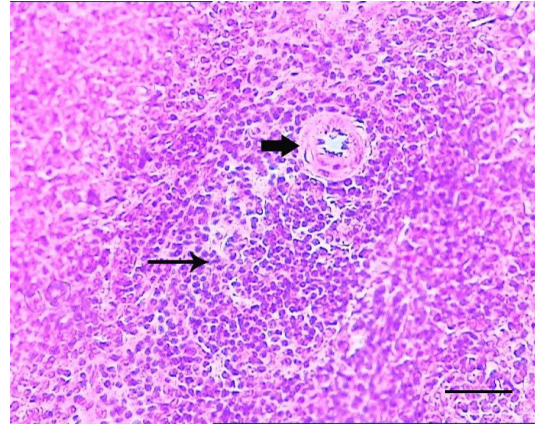
**Şekil 1.** Schaudin solüsyonu  
Böbrek. Glomerulus (kalın ok) ve Bowman  
kapsülü (ince ok). H&E. Bar: 40µm



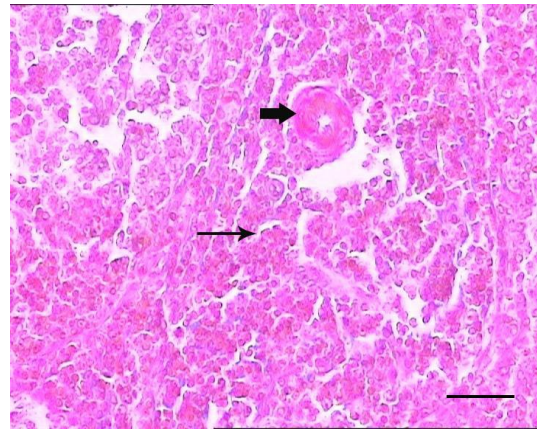
**Şekil 2.** Clark solüsyonu.  
Böbrek. Glomerulus (kalın ok) ve Bowman  
kapsülü (ince ok). H&E. Bar: 40µm

#### Dalak

Bouin ve %10'luk formalin'in dalak preparatlarında dikkate alınan Arteria centralis, trabekül, lenf folikülü ve kapsüller için uygun fiksatifler olduğu gözlemlendi (Şekil 3). B5 solüsyonuyla tespit edilen dokularda lenf folikülleri ve kapsülde artefaktların meydana geldiği belirlendi (Şekil 4). Regaud'un da belirtilen bölgeler için uygun fiksatif olmadığı tespit edildi.



**Şekil 3.** Bouin solüsyonu. Dalak. Lenf folikülü  
(ince ok) ve Arteria centralis (kalın ok).  
H&E. Bar: 40 µm

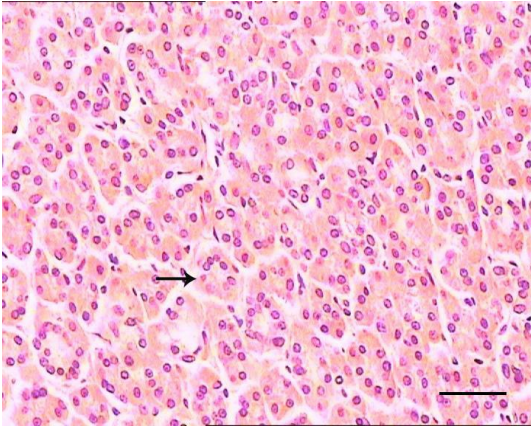


**Şekil 4.** B5 solüsyonu. Dalak.  
Lenf folikülü (ince ok) ve Arteria centralis  
(kalın ok). H&E. Bar: 40 µm

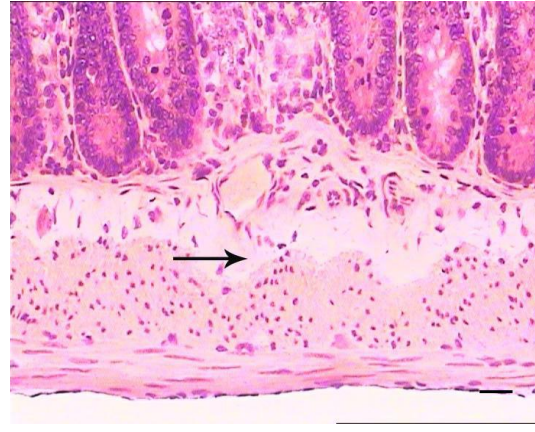
#### Mide

Lamina epitelyalis, lamina propria, submukoza ve tunika muskularis için Clark solüsyonunun en uygun fiksatif olduğu ve belirtilen bölgelerin doku bütünlüklerini korudukları gözlemlendi (Şekil 5). Schaudin ve %10'luk formalinde tespit edilen dokularda lamina epitelyaliste doku bütünlüğünde bozulma saptandı. Lamina propriada ise korpus glandulalar arasındaki bağ dokusunda ve submukozada ayrılmaların meydana geldiği gözlemlendi. Lamina propriadaki korpus glandulaların etraflarındaki bağ dokusundan ayrılıp döküldükleri belirlendi (Şekil 6).

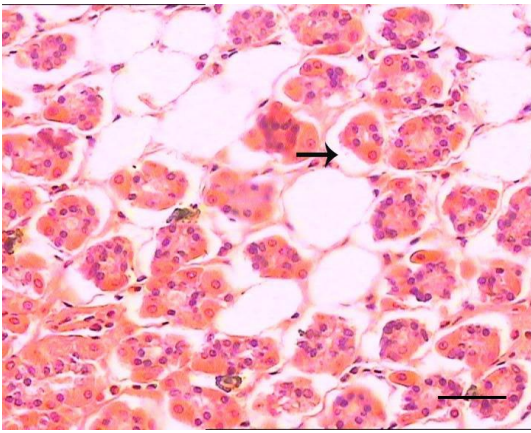




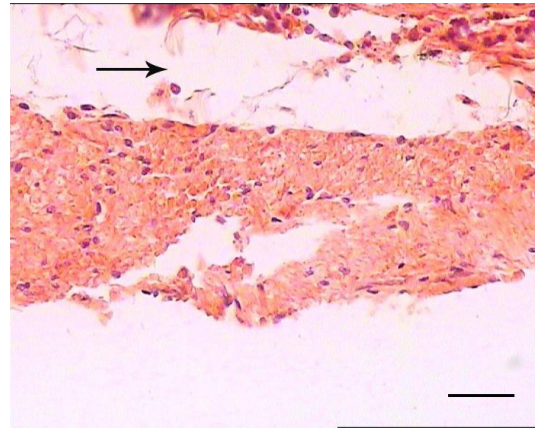
**Şekil 5.** Clark solüsyonu. Mide. Lamina propria. Korpus glandula (ok). H&E. Bar: 40  $\mu$ m



**Şekil 7.** Alkol formalin solüsyonu. Duodenum. Submukoza (ok). H&E. Bar: 40  $\mu$ m



**Şekil 6.** Schaudin solüsyonu. Mide. Lamina propria. Korpus glandula (ok) H&E. Bar: 40  $\mu$ m



**Şekil 8.** Schaudin solüsyonu. Duodenum. Submukoza (ok). H&E. Bar: 40  $\mu$ m

### Duodenum

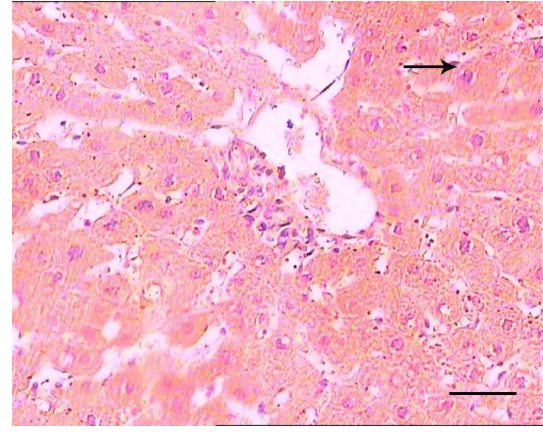
Lamina epitelyalis, lamina propria, submukoza ve tunika muskularis bölgeleri dikkate alındı. B5 ve Clark solüsyonlarının lamina propria ve tunika muskularis bölgeleri için uygun fiksatifler olduğu belirlendi. Ayrıca lamina epitelyalis için en uygun fiksatifin Clark solüsyonu olduğu tespit edildi. Clark solüsyonunda lamina propriada korpus glandula ve çevresindeki bağ dokusunun bütünlüğünü koruduğu gözlemlendi. Submukozadaki en uygun fiksatifin alkol-formalin olduğu saptandı (Şekil 7). Schaudin ve %10'luk formalin solüsyonlarında lamina epitelyalis ve tunika muskularisin doku bütünlüklerinde bozulmalar olduğu, lamina propriada korpus glandulanın bağ dokusundan ayrıldığı ve submukozada ayrılımların meydana geldiği (Şekil 8) tespit edildi.

### Karaciğer

Karaciğer preparatlarında Vena centralis, Kiernan aralığı, hepatosit ve sinüzoidlerin alkol-formalin (Şekil 9) ve Clark solüsyonlarında doku bütünlüklerini korudukları gözlemlendi. Carnoy, Orth ve Zenker fiksatiflerinde sinüzoidlerde genişlemeler tespit edilirken, hepatositlerin sınırlarının belirgin olmadığı gözlemlendi. Orth ve Bouin solüsyonlarında tespit edilen dokularda Kiernan aralığı ile hepatositler arasındaki bağ dokusunda ayrılımların olduğu saptandı (Şekil 10). Zenker ve Carnoy solüsyonları ile Vena centralislerin çevrelerinde bulunan bağ dokusundan ayrıldıkları belirlendi.



**Şekil 9.** Alkol-formalin solüsyonu. Karaciğer. Kiernan aralığı ve hepatosit (ok). H&E. Bar: 40 µm



**Şekil 10.** Orth solüsyonu. Karaciğer. Kiernan aralığı ve hepatosit (ok). H&E. Bar: 40 µm

**Çizelge 1.** Fiksatiflerin böbrek, karaciğer, dalak, mide ve bağırsak dokuları için uygunluğu ve fikse etmesindeki farklılıklar

FİKSATİF	CARNOY	ORTH	REGAUD	SCHAUDIN	BOUIN	B5	CLARK	%10 FORM.	ZENKER	ALKOL-FORM.	
<b>BÖLGE</b>											
<b>DALAK</b>	K	+++	++	++	++	+++++	+	+++	++++	++	+++
	T	+++	+++	+	++	+++++	+	+++	++++	++	+++
	Lf	+++	++	+	++	+++++	+	+++	++++	++	+++
	Ac	+++	+++	+	++	+++++	+	+++	++++	++	+++
<b>DUO.</b>	Le	++++	+	+	+	+	+++	+++++	+	++++	++++
	Lp	++++	+	+	+	+	+++++	+++++	+	++++	++++
	Tm	+	+	++	+	+	+++++	+++++	+	++++	++++
	S	+	++	+	+	+	+++	+	+	+	+++++
<b>K. CİĞER</b>	Sin	+	+	++	+++	++++	+++	++++	++	+	+++++
	H	+	+	+++	+++	++++	++	+++	+++	+	+++++
	Ka	+	+	+++	+	+	+++	++++	+	+	+++++
	Vc	+	+	++++	++	++++	+++	+++	+++	+	+++++
<b>MİDE</b>	Le	++++	++	+++	+	+	++++	+++++	+	++++	+
	Lp	++++	++	+++	+	+++	++++	+++++	+	++++	++
	Tm	++++	+++	+++	+	+++	++++	+++++	+	++++	++
	S	++++	++	+++	+	+++	++++	+++++	+	++++	++
<b>BÖBREK</b>	G	+	+++	++++	+	++++	++++	+++++	++++	+	+
	Tp	+	+	+++	+	+++	++++	+++++	+	+	+
	Td	+	+	+++	+	++	++++	+++++	+	+	+
	Çh	+	+++	+++	+	+	++++	+++++	+	+	+
	İh	+	+++	+++	+	+	+++	+++++	+	+	+
	Bk	+	++	++++	+	++++	++++	+++++	+++	+	+

K: Kapsül; T: Trabekül; Lf: Lenf folikülü; Ac: Arteria centralis; Le: Lamina epitelyalis; Lp: Lamina propria; Tm: Tunika muskularis; S: Submukoza; Sin: Sinuzoid; H: Hepatosit; Ka: Kiernan aralığı; Vc: Vena centralis; G: Glomerulus; Tp: Tubulus proksimalis; Td: Tubulus distalis; Çh: Çıkan henle; İh: İnen henle; Bk: Bowman kapsülü; +++++: Çok iyi; ++++: İyi; +++: Orta; ++: Kötü; +: Çok kötü

## Tartışma

Hindi (Akaydın ve Özcan, 2005) ve koyun (Sayın, 2001) böbreklerinin ve bazı memeli türlerinde (Cesta, 2006) dalağın histolojik yapısını belirlemeye yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Ancak fiksatiflerin böbrek, dalak, karaciğer, mide ve duodenum üzerindeki etkilerine yönelik çalışmaya rastlanmamıştır.

Köktürk vd. (1999) sıçanların böbrek dokuları üzerine, 0.1 M fosfat tamponlu %10 formaldehit, 0.1 M fosfat tamponlu glutraldehit, 0.1 M kakodilat tamponlu paraformaldehit tespit solüsyonlarıyla immersiyon tespit yöntemi kullanarak yapmış oldukları çalışmada tubuluslarda ve Bowman kapsülünde parçalanmaların meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise %10'luk formalinle tespit edilen böbrek dokularında Bowman kapsülünde parçalanma olmadığı, alkol-formalinle tespit edilen dokularda ise parçalanmaların meydana geldiği tespit edildi.

## Kaynaklar

Akaydın, Y., Özcan, Z., 2005. Hindi (*Meleagris gallopavo*) Böbreğinin Yapısı Üzerine Işık Ve Elektron Mikroskopik Çalışmalar. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 52, 149-155.

Arnold, M.M., Srivastava, S., Fredeburg, J., Stockard, C.R., Myers, R.B., Grizzle, W.E., 1996. Effects of Fixation and Tissue Processing on Immunohistochemical Demonstration of Specific Antigens. Biotechnic & Histochemistry, 71, 224-230.

Braet, F., Ratinac, K., 2007. Creating Next-Generation Microscopists: Structural and Molecular Biology at the Crossroads. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 11, 759-763.

Culling, C.F.A., Allison, R.T., Barr, W.T., 1985. Cellular Pathology Technique. Butterworths, London, 642 pp.

Cesta, M.F., 2006. Normal Structure, Function and Histology of the Spleen. Toxicologic Pathology, 34 (5), 455-465.

Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P., 1985. Formaldehyde Fixation. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 33, 845-853.

Freida, L.C., 1997. Histotechnology. ASCP Press, Hong Kong, , 304 pp.

Grizzle, W.E., 2008. Fixation of Tissues. Pp. 53-74. In. J.D. Bancroft and M. Gamble (Editors). Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier Health Sciences, China, 725 pp.

Hopwood, D., 1996. Fixation and Fixatives. Pp. 23-45. In. J. Bancroft and A. Stevens (Editors). Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill-Livingstone, Edinburg, 766 pp.

Kiernan, J.A., 2008. Histological and Histochemical Methods Theory and Practice. Scion Publishing Limited, UK, 606 pp.

Köktürk, S., Ceylan, S., Yardımoğlu, M., Dalçık, H., Gonca, S., 1999. Farklı Tespit Solüsyonlarıyla Perfüzyon ve İmmersiyon Tespit Yöntemlerinin Değişik Dokularda Işık Mikroskopik Düzeyde Karşılaştırılması. Genel Tıp Dergisi, 9 (4), 135-139.

Rockey, D.C., Caldwell, S.H., Goodman, Z.D., Nelson, R.C., Smith, A.D., 2009. Liver Biopsy. Hepatology, 49 (3), 1017-1044.

Sayın, N., 2001. Koyun ve Yeni Doğan Kuzularda Peripolar Hücreler ve Granüllü Tübülüs Hücreleri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 54 (1), 1-5.