



Kedi ve Köpek Dokularının Farklı Fiksatiflerle Tespiti ve Histolojik Görünümlerinin Karşılaştırılması*

Hazal ÖZTÜRK GÜRGEN, Funda YILDIRIM

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul-TÜRKİYE

Sorumlu yazar: Hazal ÖZTÜRK GÜRGEN; E-posta: hazal.ozturk@istanbul.edu.tr; ORCID: 0000-0003-2748-6189

Atıf yapmak için: Öztürk Gürgen H, Yıldırım F. Kedi ve Köpek dokularının farklı fiksatiflerle tespiti ve histolojik görünümünün karşılaştırılması. Erciyes Univ Vet Fak Derg 2020; 17(3): 242-247.

Özet: Tespit işlemi, hücre ve doku komponentlerinin ölüm sonrasında morfolojik özelliklerinin canlıdaki durumuna en yakın şekilde sabitleyip, histolojik olarak incelenmesine olanak tanır. Tespit işleminde kullanılan kimyasal ajanlara fiksatif denir. Yirminci yüzyıldan günümüze kadar rutin doku tespit işleminde formaldehit çözeltisi kullanılmaktadır. Her fiksatif doku tespit işlemi süresince doku histomorfolojisinin incelenmesi adına avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle tespit işlemi için amaca yönelik doğru fiksatif ile çalışılması gerekir. Bu çalışmada hedef, 3 farklı fiksatif ile hazırlanan 4 çözeltinin, diğer faktörler optimum seviyede tutularak, doku tespit işlemi sürecinde nasıl etkilere sahip olduklarını belirlemek ve tespit özelliklerine göre en ideal kullanım amaçlarını ortaya çıkarmaktır. Bu amaçla, çalışmada doku tespit işlemi sırasında fiksatiflerin dezavantajlarından etkilenen ve hücre morfolojisinin incelenmesinde zorluklarla karşılaşılan dalak ve böbrek dokuları üzerinde çalışıldı. Yaklaşık 0.5 cm kalınlığındaki doku örnekleri hazırlanan % 3.7'lik, %10'luk formaldehit ve Hollande çözeltilerinde 16 saat, Carnoy çözeltisinde ise 4 saat süre ile tespit edildi. Rutin doku takip işlemlerinden geçirildikten sonra alınan doku kesitleri H&E ile boyandı. Bu dokuların histomorfolojik incelemeleri yapıldığında hücre sitoplazma boyanması için en uygun fiksatifin %3.7'lik formaldehit çözeltisi olduğu, hücre çekirdek ve çekirdekçiklerinin morfolojisini ortaya koymada ise Carnoy ve Hollande çözeltilerin kullanımlarının ideal olduğu, ancak Carnoy çözeltisinin eritrositlerde ileri düzeyde lizise yol açtığı gözlemlendi. Sonuç olarak, doku tespit işleminde %3.7'lik formaldehit çözeltisinin kullanımı ideal bulunurken, Carnoy ve Hollande çözeltilerinin ise hücre çekirdeklerindeki histomorfolojik değişikliklerin detaylı incelenmesini gerektiren hastalıklarda etkili bir kullanım oluşturacakları ön görüldü.

Anahtar kelimeler: Carnoy, formaldehit, Hollande, tespit işlemi

Fixation and Comparative Histologic Evaluation of Cat and Dog Tissues using Different Fixatives

Summary: Fixation is a procedure that allows histological evaluation of cells and tissue components by fixing them to their closest morphological features in life-like state after death. Formaldehyde solution has been in use since the 20th century. During the tissue fixation, each fixatives represent their own advantages and disadvantages on the examination of histomorphological properties of the tissues. So that, the fixation has to be performed with the appropriate fixative depending on the research aim. The aim of this study was to determine the effects of four solutions, prepared by 3 different fixatives, on the tissue fixation process by keeping the other factors at an optimum level and to determine the most ideal use according to the fixation properties. For this purpose, the spleen and kidney tissues were studied, since they are generally affected by the disadvantages of fixatives during the tissue fixation process and lead to difficulties in examining cell morphology. Tissue samples of 0.5 cm thickness were fixed in the 3.7%, 10% formaldehyde and Hollande solutions for 16 hours and Carnoy solution for 4 hours. Thereafter, tissue samples were routinely proceeded, and sections were stained by H&E. The histomorphological examinations of these tissues revealed that the most suitable fixative for cytoplasmic staining was 3.7% formaldehyde solution, while the use of Carnoy and Hollande solutions was ideal in revealing the morphology of the nucleus and nucleolus. However the Carnoy solution caused high lysis in erythrocytes. As a result, it was concluded that the 3.7% formaldehyde solution could be ideally used in tissue fixation process, whereas Carnoy and Hollande solutions were seen to be effective in diseases that require detailed examination of histomorphological changes in nucleus and nucleolus.

Key words: Carnoy, fixation, formaldehyde, Hollande

Giriş

Tespit işlemi, çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemlerle dokuların ölüm sonrasında yaşamsal dönemindeki haline en yakın şekilde korunmasını sağlayarak, mik-

roanatomik yapılarını en ideal düzeyde inceleyebilmek için uygulanan bir seri işlemin ilk basamağını oluşturur (Grizzle, 2001). Tespit işlemi sırasında dokular otolize yol açan bir takım enzimsel ve bakteriyel faktörlerden, enfeksiyöz ajanlardan korunur, hücreler ve hücreler arası komponentler stabilize olur (Fox ve ark., 1985; Eltoum ve ark., 2001; Grizzle, 2009). Bunların yanı sıra, tespit işleminin dokularda büzülme, şişme, sertleşme ve hatta moleküler kayıplar gibi

Geliş Tarihi/Submission Date : 04.02.2020
Kabul Tarihi/Accepted Date : 17.08.2020

*Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa 20. Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Bilimsel Araştırma Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

histokimyasal çalışmaların kalitesini etkileyebilecek dezavantajları da bulunmaktadır (Eltoum ve ark., 2001).

Doku tespit işlemi kimyasal ve fiziksel yöntemlerle yapılabilir. Fiziksel yöntemler arasında; mikrodalg kullanımı gibi ısı işlem uygulamaları ve -40°C'de dondurma metotları bulunmaktadır. Beşeri ve veteriner patolojide en sık tercih edilenler ise kimyasal yöntemlerdir (Eltoum ve ark., 2001). Kimyasal yöntemlerde dokunun "fiksatif" olarak adlandırılan çözeltilerde bekletilmesi söz konusudur. Fiksatifler çözelti içerisindeki çözünür proteinler üzerindeki etkilerine göre; koagülan ve non koagülan fiksatifler olmak üzere sınıflandırılır (Eltoum ve ark., 2001). Çalışma prensiplerine bakıldığında koagülatif fiksatiflerin proteinleri çöktürerek jel haline getirdiği, koagülatif olmayan fiksatiflerin ise proteinlerle çapraz bağlar oluşturduğu bildirilmiştir (Eltoum ve ark., 2001; Doğan, 2005). Çözünür proteinler çözülme proteinler haline getirilir, böylece dokular in vivo şartlardaki en yakın vaziyetine benzer şekilde sabitlenir ve dokuların yapısı korunur (Doğan, 2005). Bu kapsamda, fiksatif ajanların tek başlarına değil de karışım halinde kullanılmasının daha iyi sonuç verdiğinin fark edilmesiyle, yeni bir sınıflandırma önerilmiştir: Aldehitler (formaldehit, glüteraldehit), oksitleyiciler (osmium tetroksit, potasyum permanganat), protein denatüre ediciler veya koagülanlar (asetik asit, metil alkol), çapraz bağ yapan diğer ajanlar (karbodiiminler), fiziksel ajanlar ve diğerleri (civa klorür, pikrik asit) (Baker ve Silvertone, 1976). Histopatoloji ve patoloji laboratuvarlarında 20. yy'den bu yana mikroskopik incelemeler için %3.7'lik formaldehit çözeltisi (veya %10'luk formalin) rutin olarak kullanılmaktadır (Grizzle, 2001). Fakat iyi bir tespit işlemi için seçilen fiksatifler amaca yönelik olmalıdır, bu da uygun bir fiksatif veya karma fiksatifleri kullanmakla mümkündür (Baker ve Silvertone, 1976). Fiksatifin seçimi kadar, tespit işleminde kullanılan fiksatifin pH'sı, fiksatifte bekletilme süresi, tespit işlemindeki sıcaklık değeri, fiksatifin konsantrasyonu, ozmolaritesi ve iyon kompozisyonu, ek elektrolit ilavesi gibi unsurların optimum düzeylerde olması ve uygun fiksatifin seçilmesi tespit işleminin kalitesini etkileyen diğer faktörler arasında yer almaktadır (Eltoum ve ark., 2001).

Bu çalışmada, %3.7'lik ve %10'luk formaldehit, Hollande ve Carnoy çözeltileri olmak üzere 3 farklı fiksatif ile hazırlanan 4 çözeltinin, çevresel faktörler optimum seviyede tutularak, doku tespit sürecinde nasıl etkilere sahip olduklarını belirlemek ve tespit özelliklerine göre en ideal kullanımını ortaya çıkarmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada kullanılacak fiksatif çözeltiler anabilim dalı laboratuvarımızda aşağıdaki formülasyonlara göre hazırlandı: %3.7'lik formaldehit çözeltisi (%37'lik for-

malin ve distile su- %10'luk karışım); %10'luk formaldehit çözeltisi (%37'lik formaldehit ve distile su- %25'lik karışım); Carnoy çözeltisi (absolüt alkol 60 ml, kloroform 30 ml ve asetik asit 10 ml); Hollande çözeltisi (70 g bakır asetat, 120 gr pikrik asit, 3.75 ml glacial asidik asit, 300 ml formalin, 3 lt distile su). İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı'na rutin uygulamalar çerçevesinde getirilen, 5 kedi ve 5 köpeğe uygulanan nekropsilerden elde edilen toplam 10 adet böbrek ve 10 adet dalak dokusu örnekleri %3.7'lik ve %10'luk formaldehit, Hollande ve Carnoy çözeltileri, çevresel faktörler optimum seviyede tutularak, formaldehit ve Hollande çözeltilerinde yaklaşık 16 saat, Carnoy çözeltisinde ise 4 saat süre ile tespit edildi. Fiksasyon sonrası çeşme suyu altında yıkanan doku örnekleri rutin histolojik doku takibi aşamalarından geçirildi ve parafin bloklara gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan 3-4 µm kalınlığında kesitler alınarak H&E ile boyandı. H&E boyama için kesitler; sırasıyla %100'lük, %90'lık, %70'lik alkol serisine daldırma, 1 defa çeşme suyuna daldırma, Hematoksilin'de 5 dk bekletme, 15 dk çeşme suyunda bekletme, 2 dk Eozin'de bekletme ve sırasıyla %70'lik, %90'lık, %100'lük alkol serisine daldırma, ksilole daldırma ve yapıştırıcı ile lamel kapatılması prosedüründen geçirilmiştir.

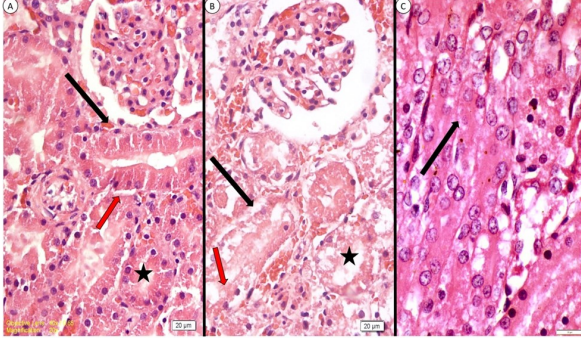
Örnekler ışık mikroskopunda (Olympus BX50) incelendi. Histolojik görünümü değerlendirmek üzere çekirdek, çekirdekçik, sitoplazma boyanmaları ve morfolojik özellikleri, çekirdek ve hücresel düzeyde büzüşme, çekirdek ve hücresel bileşenlerin bozulması ile birlikte eritrositlerin boyanma durumları değerlendirme parametreleri olarak seçildi. Parametreler görüntü kalitesi açısından çok iyi (+++), iyi (++) ve zayıf (+) olmak üzere derecelendirildi.

Bulgular

Kedi ve köpek nekropsilerinden alınan dalak ve böbrek dokularının tespit işleminin ardından, %3.7'lik formaldehit, Hollande ve Carnoy çözeltilerinde dokuların dilimlenebilir kıvamda olduğu gözlemlendi. Örnekler doku takip kasetine alınırken ve parafin doku bloklarından mikrotomla kesit alınması sırasında herhangi bir parçalanma gözlenmedi. Ancak %10'luk formaldehit çözeltisi ile tespit edilen dokularda parafin kesitlerinin alınması sırasında, bu dokuların hafif kırılğan olduğu ve yer yer parçalandığı gözlemlendi.

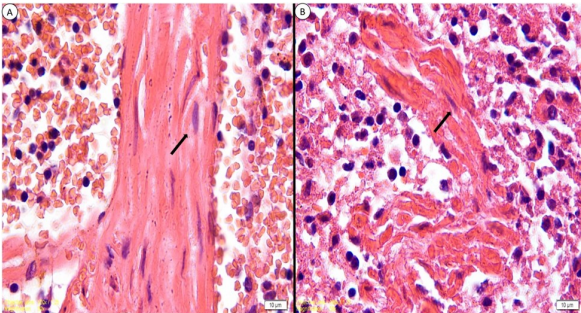
Mikroskopik incelemede böbrek tubul epitel hücrelerine bakıldığında, %3.7'lik formaldehit çözeltisinde hücrelerin optimal düzeyde boya aldığı, sitoplazma ve sitoplazma-çekirdek sınırlarının çok iyi olmasının yanı sıra hücrelerin bazal membran sınırında kaldığı gözlemlendi (Şekil 1A). Ancak %10'luk formaldehit çözeltisinde bu hücrelerin eozinle açık pembe renge boyandığı ve hücrelerin sitoplazmalarında vakuoler değişiklikler olduğu, ayrıca çoğu alanda tubulusların bazal membrandan ayrıldığı ve epitellerde dökülme

olduğu izlendi (Şekil 1B). Hollande (Şekil 1C) ve Carnoy çözeltilerinde ise tubul epitellerinin sitoplazmalarında yoğun eozinofilik boyanma ve hücrelerde şişkinlik gözlemlendi.



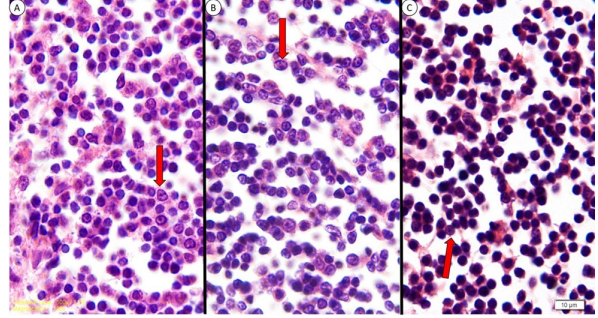
Şekil 1. Böbrek tubul epitel hücreleri. **A.** %3.7'lik formaldehit çözeltisinde tubul epitellerinin hem boyanma (yıldız), hem de hücre sitoplazma ve sitoplazma- çekirdek (kırmızı ok) ve bazal membran sınırları optimum düzeyde (siyah ok). **B.** %10'luk formaldehit çözeltisinde tubul epitel hücrelerinin sitoplazma ve sitoplazma- çekirdek sınırlarının iyi korunmadığı (kırmızı ok) ve epitel hücrelerde vakuoler değişiklikler (yıldız) olduğu, hücrelerin bazal membrandan ayrıldığı (siyah ok) gözleniyor. **C.** Hollande çözeltisi ile yoğun hücre sitoplazmalarında yoğun eozinofilik boyanma ve şişkinlik, ancak bazal membran sınırları optimum düzeyde (siyah ok)

%3.7'lik formaldehit çözeltisinde dalak trabekül miyositlerinde sarkoplazma ve sarkoplazma- çekirdek sınırlarının çok iyi korunduğu (Şekil 2A), ancak %10'luk formaldehit çözeltisinde bu hücrelerde ileri dereceli dehidrasyon ve büzümeye yol açtığı, sitoplazmalarının yoğun hiyalinize görünümde olduğu izlendi (Şekil 2B). Farklı çözeltilerin sitoplazma boyanması ve histomorfolojik incelemeye katkısı Tablo 1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 2. Dalak trabeküler kas hücreleri. **A.** %3.7'lik formaldehit çözeltisi ile tespit edilen dalak trabeküler kas hücrelerinde, hücrelerin sarkoplazma ve sarkoplazma - çekirdek sınırları (ok). **B.** %10'luk formaldehit çözeltisinde bu hücrelerde ileri dereceli dehidrasyon ve büzümeye efekti ile birlikte, sitoplazmalarında yoğun hiyalinizasyon görüntüsü (ok)

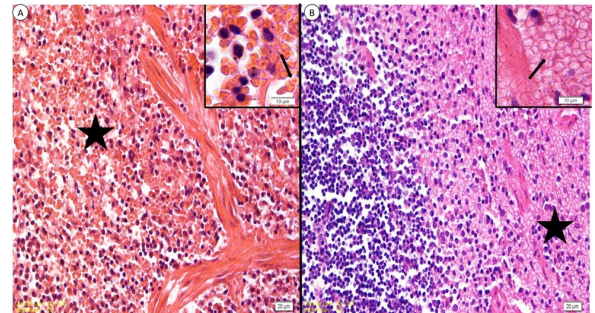
Dalak ve böbrek dokularındaki hücre çekirdek ve çekirdekçiklerinin boyanma durumları histolojik olarak değerlendirildiğinde; en iyi morfolojik strüktür Hollade ve Carnoy çözeltilerinde gözlemlendi (Şekil 3A, B). %3.7'lik formaldehit çözeltisinde ise çekirdekte daha yoğun (hiperkromazik) bir boyanmaya yol açtığı saptandı (Şekil 3C).



Şekil 3. Dalak doku örnekleri lenfositlerdeki hücre çekirdek ve çekirdekçiklerinin histomorfolojik incelenmesi. **A** ve **B.** Hücre çekirdek ve çekirdekçik detayları Hollade (**A**) ve Carnoy (**B**) çözeltilerinde belirgin (kırmızı oklar) **C.** %3.7'lik formaldehit çözeltisinde çekirdekte daha yoğun (hiperkromazi) boyanma (kırmızı ok)

Derecelendirme yapıldığında Hollade ve Carnoy çözeltilerinin çekirdek morfolojileri %3.7'lik ve %10'luk formaldehit çözeltilerine göre daha detaylı incelenebilir oldukları, %3.7'lik formaldehit çözeltisinin ise %10'luk formaldehit çözeltisine oranla daha iyi olduğu izlendi (Tablo 1).

Eritrositlerin durumu incelendiğinde ise, %3.7'lik formaldehit çözeltisinde eritrositlerin morfolojik yapısı ve boyanması çok iyi gözlenirken (Şekil 4A), Carnoy çözeltisinde eritrositlerde belirgin lizis izlendi (Şekil



Şekil 4. Eritrositlerin histolojik görünümü. **A.** %3.7'lik formaldehit çözeltisinde eritrositlerin morfolojik yapısı (yıldız). Ek resim, daha yüksek büyütmede izlenen eritrositlerin boyanması optimum düzeyde ve merkezlerindeki konkav görünüm belirgin (ok). **B.** Carnoy çözeltisinde eritrositlerde belirgin lizis (yıldız). Ek resimde eritrositler daha yüksek büyütmede, hücre kenarları ince kontörle çizilmiş gibi ve merkezleri solgun boyanma ile karakterize (ok)

4B). Hollande çözeltisinde eritrositlerdeki lizis zayıf iken, %10`luk formaldehit çözeltisinde lizis görülmedi, ancak eritrositlerin morfolojik yapısı ve boyanması %3.7`lik formaldehit çözeltisine kıyasla daha soluk izlendi (Tablo 1).

mine tabi tutulduğunda, fiksatifin lenf yumrularına nüfus ederek onları formaldehit çözeltisine göre daha görünür kıldığı, böylece saptanan lenf nodu sayısında belirgin artış izlendiği ve bunun sonucunda da gastrointestinal bölge tümörlerinin evrelendirme sistemine

Tablo 1. %3.7`lik ve %10`luk formaldehit çözeltileri, Carnoy ve Hollande çözeltilerinin dalak ve böbrek dokuları üzerindeki fiksatif etkileri

Kullanılan fiksatif	Çekirdek ve çekirdekçik boyanması	Sitoplazma boyanması	Eritrosit boyanması
%3.7`lik F	++	+++	+++
%10`luk F	+	+	++
Hollande	+++	+	+
Carnoy	+++	++	+

(F: Formaldehit çözeltisi)

Tartışma ve Sonuç

Diagnostik patolojide rutin fiksatif olarak yüz yılı aşkın süredir %3.7`lik formaldehit çözeltisi (%10`luk formalin) kullanılmaktadır (Grizzle, 2001). Bunun en önemli nedenleri, formaldehit çözeltisinin pahalı olmaması, kolay uygulanabilmesi ve iyi mikroskopik görüntü elde edilebilmesi gibi avantajlar sağlamasıdır (Coleman ve Tsancolis, 2006). Fakat formaldehitin bilinen en büyük dezavantajı yüksek kanserojen etkiye sahip olmasıdır. Yapılan bir çalışmada yüksek miktarda formaldehite maruz kalan ilgili iş grubundaki insanlarda lenfohematopoetik malignitelerin artış gösterdiği (Freeman ve ark. 2009), respiratuvar sistem ve göz için irritan nitelikte olduğu (Drury ve Wallington, 1980) bildirilmiştir. Formaldehit fiksatiflerinin bu tip dezavantajları ve doku üzerindeki olumsuz etkilerine karşılık, formaldehit içermeyen etanol bazlı fiksatiflerin kullanılmasına yönelik girişimler yapılmıştır (Warmington ve ark. 2000; Gillespie, ve ark., 2002). Warmington ve ark. (2000) formaldehite alternatif olarak etanol bazlı bir fiksatif önerirken, Ahmed ve ark. (2010) alternatif olarak, etanol bazlı Carnoy fiksatifinin rutin olarak formaldehit yerine kullanılamayacağını öne sürmüşlerdir.

Rutin formaldehit çözeltisi yerine amaçlarına uygun seçilen farklı fiksatiflerin patolojik tanıya yönelik daha iyi makroskopik (Luz ve ark., 2008) ve mikroskopik (Grizzle, 2001) değerlendirme imkânı sağladığı bildirilmiştir. Bu durum, özellikle kanser olgularının evrelendirilmesinde (staging), prognoz tayinin belirlenmesinde oldukça önemlidir. Kanser olgularında lenf nodu metastazlarının değerlendirilmesi, tümör evrelendirme sisteminin bir parçasıdır. Bununla ilgili olarak, insan hekimliğinde gastrointestinal sistem lenf nodlarının gözden kaçabildiği, dolayısıyla kolon ve rektal kanserlerine yönelik evrelendirme sisteminde zorluk oluşturduğu bildirilmiştir (Resch, 2013). Bir araştırmada, kadavralar üzerinden gastrointestinal sistemde yer alan lenf yumruları Carnoy çözeltisi ile tespit işle-

daha iyi uygunluk gösterdiği rapor edilmiştir (Luz ve ark., 2008).

Doku takip prosedürlerinde diğer önemli bir kriter ise kesit alma sırasında iyi tespit işleme tabi tutulmaması örneklerin parçalanmasıdır (Singhal ve ark., 2016). Doku büyüklüğü, oda sıcaklığı, çözelti pH'sı koşullarından bağımsız olarak, fiksatif türüne göre dokuların çözelti içerisinde tespit olma süreleri farklılık gösterir (Kahyaoğlu ve Gökçimen, 2017). Formaldehit çözeltisi için optimum süre 12 - 24 saat olarak belirlenmiştir (Fox, 1985). Başka bir formalin türevi fiksatif olan Hollande çözeltisi için tespit işlem süresinin 4 - 18 saat aralığında olduğu bildirilmiştir (Kahyaoğlu ve Gökçimen, 2017). Alkol bazlı fiksatiflerin ise tespit işlem süresi daha kısadır, bunun nedeni alkolün dokulara hızlı bir şekilde nüfus etmesidir (Bancroft ve Gamble, 2008). Bu fiksatiflerin arasında yer alan Carnoy çözeltisi hızlı tespit edebilme özelliği sayesinde, hemen sonuç verilmesi gereken durumlarda tercih edilir (Bancroft ve Gamble, 2008). Bu çözelti ile tespit işlemi için 1 - 4 saatlik bir zaman diliminin yeterli olduğu bildirilmiştir (Kahyaoğlu ve Gökçimen, 2017). Buna karşılık, yapılan başka bir çalışmada ise Carnoy fiksatif için en ideal süre 6 saat olarak belirlenmiştir (Singhal ve ark., 2016). Bu bilgiler göz önünde bulundurularak, bu çalışmadaki tespit işlemi farklı yüzdelerdeki formaldehit ve Hollande çözeltileri için 16 saat, ve Carnoy çözeltisi için ise 4 saat süre zarfında yapıldı. Tespit işlemi sonrasında, doku kesitleri alınırken izlenen doku parçalanma durumu az miktarda da olsa %10`luk formaldehit çözeltisi sırasında oluştu. Diğer tespit çözeltilerinde dokularda herhangi bir parçalanma durumunun gözlenmemesi daha önce bu çözeltiler için bildirilen optimum süreleri doğrular nitelikte bulundu.

Tespit çözeltilerinin hücre morfolojisi üzerine etkileri daha önce hem çözeltiler hem de tespit işlem süreleri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir (Benerini Gatta ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda temel prensip tespit çözeltilerinin rutinde kullanılan H&E boyama

yöntemine göre farklı doku ve hücrelerdeki sitoplazma ve çekirdek boyanmalarını, hücrelerin büzüşme ve bozulma durumlarını değerlendirmek yönünde olmuştur (Pereira ve ark., 2015, Singhal ve ark., 2016). Rutin kullanımdaki %3.7'lik formaldehit çözeltisinin, sitoplazma ve çekirdekte büzüşme, hücreler arasında ayrılmalar izlenmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Doğan, 2005). Bunun nedenleri arasında formaldehitin stokta bekledikçe pH'nin asidik duruma gelmesi, ve hücre sitoplazma ve çekirdek morfolojinin değerlendirilmesinde artefaktal görümlere yol açabilmesi sayılabilmektedir (Crawford ve Barer, 1951). Ayrıca, aldehit grubu fiksatifler proteinler ile daha zayıf olan metilen ve karbon bağları oluşturmaktadır, bu da yeterli düzeyde bir fiksasyon sağlamadığı için parafin ile yapılan ileri takip aşamalarında sitoplazma ve çekirdek boyanmasında artefaktlara yol açmaktadır (Doğan, 2005). Çalışmamızda yüksek konsantrasyonlu (%10) formaldehit çözeltisinde benzer artefaktal bulgular izlendi.

Hücre morfolojisinin tanıda önemlilik arz ettiği hematopatoloji ve sitopatoloji dallarında formalin ile protein presipitan özellikleri bir arada içeren karma fiksatiflerin kullanımı önerilmektedir. Bunlar arasında bulunan Hollande çözeltisi tespit işleminde H&E kesitlerinde çekirdek morfolojisinin daha ayrıntılı incelemesine olanak tanır (Doğan, 2005). Benzer şekilde, çekirdek morfolojisinin iyi incelenmesini gerektiren birçok tümör şüpheli olguda; çekirdek büyüklüğü, çekirdek sitoplazma oranı ve çekirdekçiğin büyüklüğü, rengi ve sayısı gibi morfolojik detaylar tanıda oldukça önemlidir (Grizzle, 2009). Hücre çekirdek morfolojisinin iyi gözlemlendiği başka bir diğer fiksatif olarak Carnoy çözeltisi bildirilmektedir (Bancroft ve Gamble, 2008). Çalışmamızda, hücre çekirdek morfolojisinin detayları daha açık renkli boyanma ile en iyi şekilde Carnoy ve Hollande çözeltilerinde gözlenmesi literatürler bilgileriyle uyumlu bulundu. Formaldehit çözeltisi çalışma boyunca taze olarak hazırlandığı için, formaldehit çözeltisi ile tespit işleminde izlenen daha yoğun çekirdek boyanmasının olası pH değişikliğinden değil, daha önce de belirtildiği gibi, bu çözeltinin tek başına iyi bir protein presipitan özellikte olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Dokulara boya bağlanma prensiplerine göre presipite proteinlerde boya moleküllerinin bağlanacağı yüzeyler azaldığı için, presipitan özelliği yüksek fiksatiflerle daha açık tonlarda boyanma ile gerçekleşmektedir.

Carnoy çözeltisinin dezavantajı olarak bildirilen eritrolizis bulgusu (Baker ve Silvertone, 1976), çalışmamızda da izlenmiştir. Çalışmamızda eritrositlerde optimum tespit için % 3.7'lik formaldehit çözeltisi ile gerçekleştiği gözlemlendi.

Sonuç olarak, çalışmamızda rutin olarak kullanılan % 3.7'lik çözeltisi ile birlikte %10'luk formaldehit, Carnoy ve Hollande çözeltilerinin dalak ve böbrek dokuları üzerindeki tespit etkileri karşılaştırılmalı olarak

incelendi. Bu bulgular neticesinde, rutin histopatolojik inceleme prosedürlerinde %3.7'lik formaldehit çözeltisinin doku tespit işleminde daha etkili kullanılabileceği belirlendi. Ancak Carnoy ve Hollande çözeltilerinin hücre çekirdeklerindeki histopatolojik değişikliklerin detaylı incelenmesini gerektiren durumlarda, özellikle neoplastik hastalıklarda ve lenfoid sistem patolojisinde, etkili bir kullanım oluşturulacağı ön görüldü. % 10'luk hazırlanan formaldehit çözeltisinin ise dokularda kostik etkiye sebep olduğu ve fiksatif kullanıma uygun olmayacağı tespit edildi.

Teşekkür

Çalışmamıza yapmış olduğu katkılarından dolayı Veteriner Hekim Merve Moral'a teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Ahmed HG, Mohammed AI, Hussein MOM. A comparison study of histochemical staining of various tissues after Carnoy's and formalin fixation. *Sud J Med Sc* 2010; 5(4): 277-83.
- Baker FJ, Silvertone RE. *Introduction to Medical Laboratory Technology*. Fifth Edition. London: Butterworth & Co Ltd. 1976; p. 312
- Bancroft JD, Gamble M. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Sixth Edition. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone/Elsevier, 2008; p. 53-75.
- Benerini Gatta L, Cadei M, Balzarini P, Castriciano S, Paroni R, Verzeletti A, Cortellini V, De Ferrari F, Grigolato P. Application of alternative fixatives to formalin in diagnostic pathology. *Eur J Histochem* 2012; 56(2): e12.
- Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. Second Edition. New Jersey: Humana Press, Clifton, 2006; p. 204.
- Crawford NC, Barer R. The action of formaldehyde on living cells as studied by phase-contrast microscopy. *Q J Microsc Sci* 1951; 3(20): 403-452.
- Doğan, Ö. Histopatolojik tanı sürecinde standardizasyon. *APJ* 2005; 2: 8-28.
- Drury RAB, Wallington EA. *Carleton Histological Techniques*. Fifth Edition. London: Oxford University Press, 1980; p. 36-44.
- Eltoum I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J Histotechnol* 2001; 24(3): 173-90.
- Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 1985; 33(8): 845-53.

- Freeman LEB, Blair A, Lubin JH, Stewart PA, Hayes RB, Hoover RN, Hauptmann M. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries: The national cancer institute cohort. *J Natl Cancer Inst* 2009; 101 (10): 751-61.
- Gillespie JW, Best CJ, Bichsel VE, Cole KA, Greenhut SF, Hewitt SM, Ahram M, Gathright YB, Merino MJ, Strausberg RL, Epstein JI, Hamilton SR, Gannot G, Baibakova GV, Calvert VS, Flaig MJ, Chuaqui RF, Herring JC, Pfeifer J, Petricoin EF, Linehan WM, Duray PH, Bova GS, Emmert-Buck MR. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *Am J Pathol* 2002; 160(2):449-57.
- Grizzle WE. The use of fixatives in diagnostic pathology. *J Histotechnol* 2001; 24(3): 151-2.
- Grizzle WE. Models of fixation and tissue processing. *Biotech Histochem* 2009; 84(5): 185-93.
- Kahyaoğlu F, Gökçimen A. Light microscopic determination of tissue. *East J Med* 2017; 22(3): 120-4.
- Luz DABP, Ribeiro U Jr, Chassot C, Collet E, De Salles Collet e Silva F, Ceconello I, Corbett CE. Carnoy's solution enhances lymph node detection: An anatomical dissection study in cadavers. *Histopathology* 2008; 53(6): 740-2.
- Pereira MA, Dias AR, Faraj SF, Cirqueira Cdos S, Tomitao MT, Nahas SC, Ribeiro U Jr, de Mello ES. Carnoy's solution is an adequate tissue fixative for routine surgical pathology, preserving cell morphology and molecular integrity. *Histopathology* 2015; 66(3): 388-97.
- Resch A, Langner C. Lymph node staging in colorectal cancer: Old controversies and recent advances. *World J Gastroenterol* 2013; 19(46): 8515-26.
- Singhal P, Singh NN, Sreedhar G, Banerjee S, Batra M, Garg A. Evaluation of histomorphometric changes in tissue architecture in relation to alteration in fixation protocol - an invitro study. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(8): 28-32.
- Warmington AR, Wilkinson JM, Riley CB. Evaluation of ethanol-based fixatives as a substitute for formalin in diagnostic clinical laboratories. *J Histotechnol* 2000; 23(4): 299-308.