

Göz dokusunun farklı fiksatifler ve farklı doku takip yöntemleri kullanılarak histolojik olarak incelenmesi

Histological investigation of the eye tissue using different fixatives and different tissue preparation methods

Ebru ALİMOĞULLARI¹ (ID), Hazal DEMİR¹ (ID), Bahar KARTAL¹ (ID)

ÖZET

Amaç: Tüm dokuların ışık mikroskop altında incelemesinde fiksasyon ana basamaktır ve sonraki basamakları etkilemektedir. Farklı fiksasyon yöntemleri vardır ve bu amaç için farklı fiksatifler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, göz dokusunun inceleneceği çalışmalarda hangi fiksatifin seçimi ile iyi sonuç elde edilebileceğinin araştırılması planlanmıştır; doku bütünlüğünün korunması açısından, göz dokusunda altı farklı doku takibi yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 12 adet dişi Wistar Albino cinsi ratlardan alınan 24 adet göz dokularına altı farklı doku takip yöntemi farklı dehidrasyon ajanları (aseton ve alkol) ve farklı fiksatifler (%10'luk formalin, Bouin ve %4'lük paraformaldehit) uygulanmıştır. Elde edilen bloklardan alınan kesitler hematoksilin ve eozin boyası ile boyanarak histomorfolojik olarak ışık mikroskop altında incelenmiştir. Uygulanan farklı fiksatiflerin ve dehidrasyon ajanlarının göz dokuları için uygunluğu ve dokularda oluşan farklılıklar belirtilmiştir.

ABSTRACT

Objective: Fixation is the basic step in the investigation of the tissues by light microscopy and affects the following steps. There are different fixation methods and different fixatives are used for this purpose. In this study, it was planned to examine which fixative gives the best result in the examination of the eye tissue. In terms of preserving tissue integrity, the study aimed to examine the effects of six different tissue preparation methods on eye structure.

Methods: Six different tissue processings methods, different dehydrating agent (alcohol and acetone) and different fixatives (10% formaline, Bouin and 4% paraformaldehyde) were applied to 24 eye tissues taken from 12 female Wistar Albino rats. Sections taken from the obtained blocks were stained with hematoxylin and eosin dye and evaluated histomorphologically under the light microscope. The suitability of the different fixatives and dehydration agents applied to eye tissues and the differences that occur in the tissues are indicated.

¹Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Ankara, Türkiye



İletişim / Corresponding Author : Ebru ALİMOĞULLARI

Yıldırım Beyazıt Üni. Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD., Çankaya / Ankara - Türkiye

E-posta / E-mail : ebrualimogullari@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 13.01.2025

Kabul Tarihi / Accepted : 02.02.2025

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2025.59144

Alimoğulları E, Demir H, Kartal B. Göz dokusunun farklı fiksatifler ve farklı doku takip yöntemleri kullanılarak histolojik olarak incelenmesi. Turk Hij Den Biyol Derg, 2025; 82(1): 119 - 130

Bulgular: Göz preparatlarında kornea, sklera, koroid, retina, iris ve siliyer cisimdeki histolojik yapılar ele alınmıştır. Bu doğrultuda, değerlendirilen tüm parametreler grup I, grup II, grup III, grup IV, grup V ve grup VI'da doku bütünlüğü ve tüm yapılar göz önüne alındığında genel olarak morfolojik açıdan benzer sonuç verdiği gözlenmiştir. Ancak göz dokularının bütünlüğü değerlendirildiğinde göz küresindeki histolojik katmanların bütünlüğünün en iyi şekilde grup IV bouin fiksatifyle asetonlu grupta korunduğu izlenmiştir. Gruplar arasında katmanlar tek tek incelendiğinde ise kornea, sklera, koroid ve retina yapılarının anlamlı derecede farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

Sonuç: En iyi seviyede histomorfolojik incelemeler için, doku takibi dikkat edilmesi gereken önemli bir süreçtir. Bu süreç ne kadar başarılı ise mikroskoptaki görüntü düzeyi de o kadar iyi olacak ve histomorfolojik incelemelere uygun bir zemin oluşturacaktır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere dayanarak göz doku takibi sürecinde fiksatif olarak bouin, dehidratif ajan olarak ise aseton kullanımını önermekteyiz. Bu çalışmanın sonuçlarının genellenebilmesi ve geliştirilebilmesi için daha fazla yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Aseton, dehidrasyon, doku takibi, fiksasyon, göz, histoloji

Results: The histological structure of rat eye samples was investigated in terms of the cornea, sclera, choroid, retina, iris and ciliary body. There was not any important difference among the groups. Accordingly, it was observed that all evaluated parameters generally gave similar results in terms of morphology when tissue integrity and all structures were considered in group I, group II, group III, group IV, group V, and group VI. However, when the integrity of the eye tissues was evaluated, it was observed that the integrity of the histological layers in the eyeball was best preserved in the group IV Bouin fixative and acetone group. When the layers were examined individually between the groups, it was determined that the cornea, sclera, choroid and retina structures did not differ significantly.

Conclusion: For optimal histomorphological examinations, the tissue preparation process is important to follow. The more successful this process is, the better the level of detail in the microscope will be and it will provide a suitable basis for basic histomorphological examinations. According to the findings of our study, we can recommend using Bouin as a fixative and acetone as a dehydrating agent in the eye tissue preparation process. Further studies are needed to generalize and improve the results of this study.

Key Words: Acetone, dehydration, tissue preparation, fixation, eye, histology

GİRİŞ

Dokuların ışık mikroskobu altında incelenebilmesi için hazır hale getirilmesi amacıyla yapılan işlem basamaklarına doku takibi adı verilmektedir. Doku takibi sürecinde fiksasyon (tespit), dehidrasyon, şeffaflandırma, sertleştirme ve gömme aşamaları bulunmaktadır (1).

Doku takinde ilk aşama fiksasyon basamağıdır (2). Fiksasyonun amacı, dokunun özelliklerini

canlı durumundakine en yakın şekliyle sabitlemek, muhafaza etmek ve dış etkenlerden korumaktır (3). Fiksasyon işleminde dokular otolize yol açan bakteriyel ve enzimsel faktörlerden, enfeksiyöz ajanlardan korunmaktadır, hücreler ve hücreler arası komponentler stabilize olmaktadır (4-6). Ayrıca fiksasyon işleminin dokularda sertleşme, şişme, büzüşme ve moleküler kayıplar gibi histokimyasal çalışmalarını etkileyebilecek dezavantajları da vardır (4).

Tespiti etkileyen faktörler osmolarite, pH, dokunun boyutu, konsantrasyon, sıcaklık ve tespitin süresidir (7). Kullanılan fiksatif konsantrasyonuna bağlı olarak dokuların boyanmasının da farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Dokunun tespit solüsyonuna maruz kalma süresinde fiksasyonu etkileyen faktörler arasında çok önemli yer tutmaktadır. Dokunun büyüklüğüne bağlı olmakla birlikte genellikle 24-48 saat civarında dokuların yeterince tespit oldukları bilinmektedir. Bu sürenin gerekenden kısa olması yetersiz fiksasyona, uzun olması ise dokuda kırılmalara yol açmaktadır (8).

Tespit için kullanılan solüsyonlara fiksatif adı verilmektedir. Farklı fiksasyon yöntemleri ve bu yöntemlerde kullanılan farklı fiksatifler bulunmaktadır. Tüm dokular için uygun tek bir fiksatifin olmaması nedeniyle bazen fiksatiflerin kombine kullanılması, birinin eksikliğinde karışımında bulunan diğer fiksatif ile kompanse edilmesiyle sorunlara çözüm bulunmaya çalışılmıştır (9). Genellikle yaygın kullanılan fiksatif, formalindir ve aldehit grubu fiksatiflerden biridir. 24 saat sürede %10'luk formalin solüsyonu 2-3 mm'lik doku tespiti ve penetrasyonu sağlar (10). Fiksatifler; aldehidler (formaldehit, glutaraldehit vb.), oksitleyici ajanlar (potasyum dikromat, osmium tetroksit, potasyum permanganat) protein denatürasyonu yapanlar (asetik asit, etil alkol, metil alkol), fiziksel (mikrodalga, ısı) ve diğerleri (pikrik asit, civa klorur, v.b.) olarak belli başlıklar altında toplanırlar (11).

Fiksasyon süreci tamamlanan dokular ikinci basamak olan dehidrasyon aşamasına geçerler. Dokudan suyun uzaklaştırılması olarak bilinen dehidrasyon aşamasında kullanılan ajanların çoğu alkolden oluşur. Dokunun dehidrate olması için dokular dereceli yükselen alkol serilerinden geçirilir ve dokunun içindeki su alkol ile yer değiştirir (10). Dehidrasyon aşaması dokunun parafin vb. sert maddelere gömülebilmesi için gereklidir. Dehidrasyon ajanları içerisinde alkoller (bütanol, denatüre alkol, etil alkol, isopropanol, metanol), glikol-eterler (dioksan, etoksi etanol, polietilen glikol) ve diğer

dehidrasyon ajanları (aseton, tetrahidrofuran, 2,2 dimetoksipropan) yer alır. En yaygın kullanılan dehidrasyon ajanı etil alkoldür. Berrak, renksiz, orta derece organik, kolay alev alabilen ve toksik çözeltiler ile karışabilen bir maddedir. Hızlı etkili ve hidrofilik bir dehidrasyon ajanı olarak bilinmektedir. Dehidrasyon basamağı için artan konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Diğer bir dehidrasyon ajanı ise asetondur. Aseton renksiz, berrak, alev alabilen ve karakteristik kokulu bir dehidrasyon ajanıdır. Aseton hızla dehidrasyon yapmaktadır. Aseton hızlıca buharlaşıp dokuların sertleşmesini sağlamaktadır. Asetonun etanol ve metanol ile karşılaştığında, çözücü etkisinin daha çok olduğu görülmüştür, bu özelliğinden dolayı da yağlı dokuların takibinde kullanılması önerilmektedir (2).

Göz histolojik olarak dıştan içe doğru üç katmandan oluşmaktadır. En dışta kornea ve skleradan oluşan korneaskleral katman bulunur. Ortada vasküler katman (diğer adı uvea) koroid, siliyer cisim ve irisi içermektedir. En içteki üçüncü katman retina kendi içinde dışta retinal pigment epitel (tek katlı prizmatik epitel) ve içte nöral retinadan meydana gelir. Kornea gözün ön 1/6 sını kaplayan konveks biçimli, avasküler transparan yapıdır. Limbus bölgesiyle skleraya geçiş gösterir. Histolojik olarak beş tabakadan oluşur. Dıştan içe doğru sırasıyla bu tabakalar; kornea epitel (keratinizasyon göstermeyen çok katlı yassı epitel), Bowman membranı, kornea stroması, Descemet membranı ve kornea endotel şeklinde düzenlenmiştir. Sklera gözün arka 5/6 sını kaplayan beyaz, mat yapıdır. Sıkı fibröz bağ dokusu yapısındadır. Koroid, sklera ile retina arasında bulunan orta tabakadır. Kan damarları ve melanin pigmentinden zengindir ve koyu kahverengi renktedir. Bu vasküler tabaka retina için besin maddelerini sağlar. Skleranın ön bölümünde yer alan siliyer cisim koroidin lens hizasında öne doğru genişlemesiyle oluşan, epitel ve stromadan meydana gelir. İris, lens yüzeyinin ön kısmında bulunan kontraktıl bir diyaframdır. Gözün en iç tabakası olan retina ise ince bir tabakadır. İçte

vitroz humore bakan nöral retina ve dışta koroide bakan retinal pigment epitelinden oluşur. Dış tabakada yer alan retinal pigment epiteli tek katlı kübik epitelden oluşur. İç tabakada yer alan nöral retina ışığa duyarlı reseptör hücreleri ve nöranal ağ içeren kendi içinde dokuz histolojik tabakaya ayrılan katmandır (12).

Bu çalışmanın amacı göz dokusunun inceleneceği çalışmalarda fiksatiflerin tespit özelliklerine göre en ideal kullanımlarını ortaya çıkarmak ve doku tespit işlemindeki etkilerini belirlemektir. %10`luk formalin, Bouin ve %4`lük paraformaldehit çözeltileri olmak üzere üç farklı fiksatif ile hazırlanmıştır. Ayrıca alkol ve aseton dehidrasyon ajanları da karşılaştırılmıştır. Doku bütünlüğünün korunması açısından, göz dokusunda altı farklı doku takibi yönteminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, Nesa Deney Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarından temin edilen 12 adet dişi Wistar albino tipi sıçanların 24 adet göz dokuları materyal olarak kullanılmıştır. Göz dokusunun çalışılacağı kısım göz önünde bulundurularak, gruplara ait gözlerin lateral kısımlarından küçük kesiler atılarak vitroz sıvısı çıkarılmıştır. Böylece organın en iç kısımlarına fiksatiflerin nüfuz etmesi ve gözün iç tabakalarının fikse olması sağlanmıştır.

Sıçanlardan alınan dokular farklı fiksatifler ile (formalin, bouin, paraformaldehit) 24 saat süreyle tespit edilmiştir. Tespit basamağının ardından akan su altında yıkanan doku örnekleri, altı farklı doku takip yöntemi ile dereceli alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlanmış ve parafinde gömülüp bloklanmıştır. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan bu kesitlere genel histolojik görünümü değerlendirmek üzere Hematoksilen & Eosin (H&E) boyası uygulanmıştır.

Öncelikle, kesitler H&E boyama için 58 °C etüvde 2 saat inkübe edilmiştir. Sonra, kesitler 30 dakika boyunca ksilen ile muamele edilmiş ve ardından üçer

dakika boyunca dereceli azalan alkol serilerinden geçirilmiştir. Slaytlar musluk suyu altında yıkadıktan sonra, bunları Gill's hematoksilende (Merck, Darmstadt, Almanya) 5 dk bekletilmiştir. Akarsuda yıkamanın ardından eozin (Bio-Optica, Milano, İtalya) ile 1 dk boyanmıştır. Slaytlar dereceli artan alkol serilerinden geçirilmiş ve kapatma öncesi ksilende bekletilmiştir. Daha sonra, slaytlar entellan (107960, Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya) kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır.

Altı farklı doku takip yöntemleri uygulanan gözlere ait slaytlarda gözün tabakalarındaki histolojik yapılar ele alınmıştır. Göz dokusundaki yapıların incelenmesi sağlanarak gruplar arasındaki farkları ortaya çıkarmak amaçlanmıştır. Hazırlanan preparatlar morfolojik özellikleri analiz etmek için ışık mikroskopunda (Olympus BX43, Japonya) incelenmiş ve ilgili kısımlardan fotoğraflar çekilmiştir.

Altı farklı doku takibi işlemi manuel olarak yapılmıştır.

Bu çalışma, Nesa Deney Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:03.08.2024, Karar No: 052).

BULGULAR

Çalışmamızda, altı farklı doku takip yöntemi uygulanan gözlere ait preparatlarda kornea, sklera, koroid, retina, iris ve siliyer cisimdeki histolojik yapılar ele alınmıştır. Belirtilen bütün bölgeler için Grup I (formalin fiksatifyle asetonsuz doku takibi) (Şekil 1); Grup II (formalin fiksatifyle asetonlu doku takibi) (Şekil 2); Grup III (bouin fiksatifyle asetonsuz doku takibi) (Şekil 3) ; Gup IV (bouin fiksatifyle asetonlu doku takibi) (Şekil 4); Grup V (paraformaldehit fiksatifyle asetonsuz doku takibi) (Şekil 5); Grup VI (paraformaldehit fiksatifyle asetonlu doku takibi) (Şekil 6) ile hazırlanan göz preparatları incelenmiştir. Ayrıca histolojik doku takibi protokolleri Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Histolojik doku takibi protokolleri

Grup I: Formalin fiksatifyle asetonsuz doku takip protokolü	Grup II: Formalin fiksatifyle asetonlu doku takip protokolü	Grup III: Bouin fiksatifyle asetonsuz doku takip protokolü	Grup IV: Bouin fiksatifyle asetonlu doku takip protokolü	Grup V: Paraformaldehit fiksatifyle asetonsuz doku takip protokolü	Grup VI: Paraformaldehit fiksatifyle asetonlu doku takip protokolü
Formalin, %10 24 saat	Formalin, %10 24 saat	Bouin 24 saat	Bouin 24 saat	Paraformaldehit, %10 24 saat	Paraformaldehit, %10 24 saat
Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat	Akan su altında 2 saat
Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat	Alkol, %75 1 saat
Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece	Alkol, %75 1 gece
Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat
Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat	Alkol, %96 1 saat
Alkol, %100 1 saat	Aseton 1, 20 dk	Alkol, %100 1 saat	Aseton 1, 20 dk	Alkol, %100 1 saat	Aseton 1, 20 dk
Alkol, %100 1 saat	Aseton 2, 20 dk	Alkol, %100 1 saat	Aseton 2, 20 dk	Alkol, %100 1 saat	Aseton 2, 20 dk
Ksilen 1-5 dk	Aseton 3, 20 dk	Ksilen 1-5 dk	Aseton 3, 20 dk	Ksilen 1-5 dk	Aseton 3, 20 dk
Parafin I'de 1 saat	Ksilen 1-5 dk	Parafin I'de 1 saat	Ksilen 1-5 dk	Parafin I'de 1 saat	Ksilen 1-5 dk
Parafin II'de 1 saat	Parafin I'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat	Parafin I'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat	Parafin I'de 1 saat
Parafin III'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat	Parafin III'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat	Parafin III'de 1 saat	Parafin II'de 1 saat
Bloklara gömme	Parafin III'de 1 saat	Bloklara gömme	Parafin III'de 1 saat	Bloklara gömme	Parafin III'de 1 saat
	Bloklara gömme		Bloklara gömme		Bloklara gömme

Uygulanan farklı fiksatiflerin ve dehidrasyon ajanlarının göz dokuları için uygunluğu ve dokularda oluşan farklılıklar Tablo 2'de belirtilmiştir. İlk olarak gruplar arasındaki göz dokularının bütünlüğü değerlendirildiğinde göz küresindeki histolojik katmanların bütünlüğü en iyi şekilde Grup IV bouin fiksatifyle asetonlu grupta gözlenmiştir.

Grup I formalin fiksatifyle asetonsuz grupta, koroid ile retina arasında az miktarda ayrılmalar olduğu ve göz küresinin bütünlüğünün bozulduğu H&E boyanma sonuçlarında tespit edilmiştir (Şekil 1).

Grup II formalin fiksatifyle asetonlu grup incelendiğinde göz dokusunun bütünlüğünü koruduğu

ve yapıların histolojik özelliklerinin normal olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).

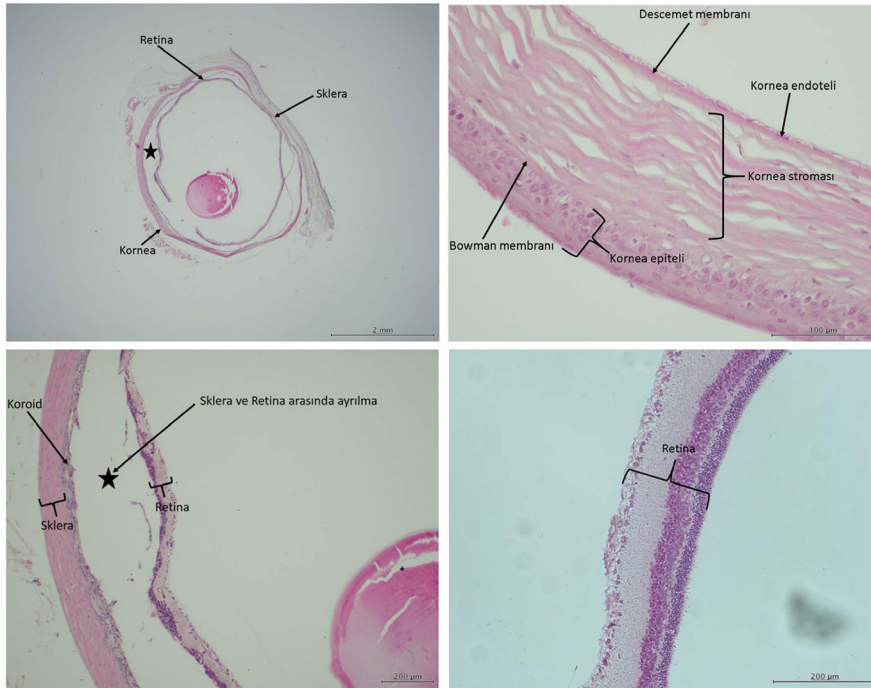
Göz dokusunun katmanlarında yer alan yapılar kornea, sklera, koroid ve retina tek tek incelendiğinde formalin asetonlu ve formalin asetonsuz gruplarda yapıların normal histolojik özellikleri taşıdığı gözlenmiştir (Şekil 1,2).

Grup III, bouin fiksatifyle asetonsuz grupta ise göz dokusunun histolojik katmanları arasında özellikle sklera ve retina arasında ayrılmalar olduğu H&E boyanma sonuçlarında gözlenmiştir (Şekil 3). Ancak katmanlar tek tek incelendiğinde kornea, sklera ve retinada herhangi bir hasar tespit edilmemiştir.

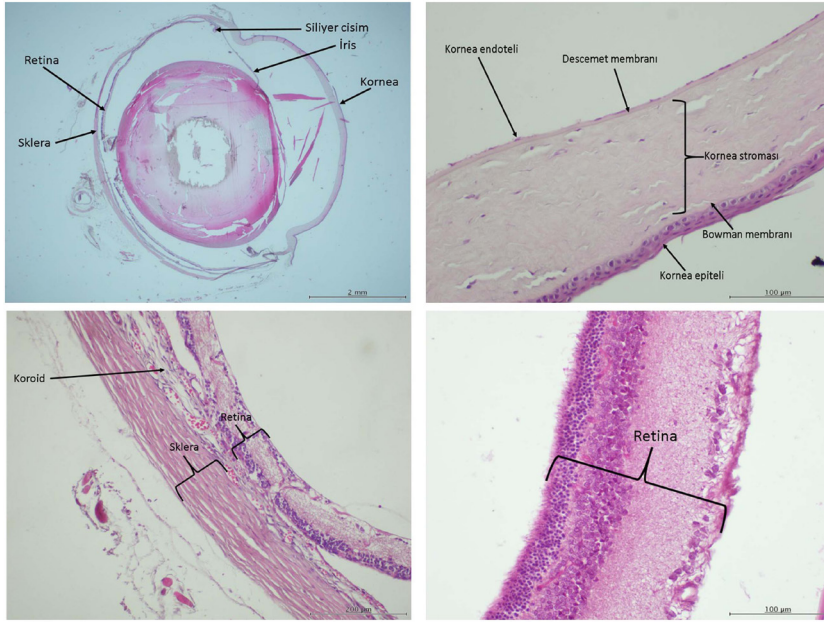
Tablo 2. Farklı fiksatiflerin ve dehidrasyon ajanlarının göz dokuları için uygunluğu ve dokularda oluşan farklılıklar

	Grup I: Formalin fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü	Grup II: Formalin fiksatifile asetonlu doku takip protokolü	Grup III: Bouin fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü	Grup IV: Bouin fiksatifile asetonlu doku takip protokolü	Grup V: Paraformaldehit fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü	Grup VI: Paraformaldehit fiksatifile asetonlu doku takip protokolü
Kornea	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	++++
Sklera	++++	++++	++++	+++++	+++	++
Koroid	++++	++++	++++	+++++	+++	+
Retina	+++	++++	+++	++++	++	+
İris	++	+++	+++	+++++	++	++
Siliyer Cisim	++	++++	+++	+++++	+++	+++

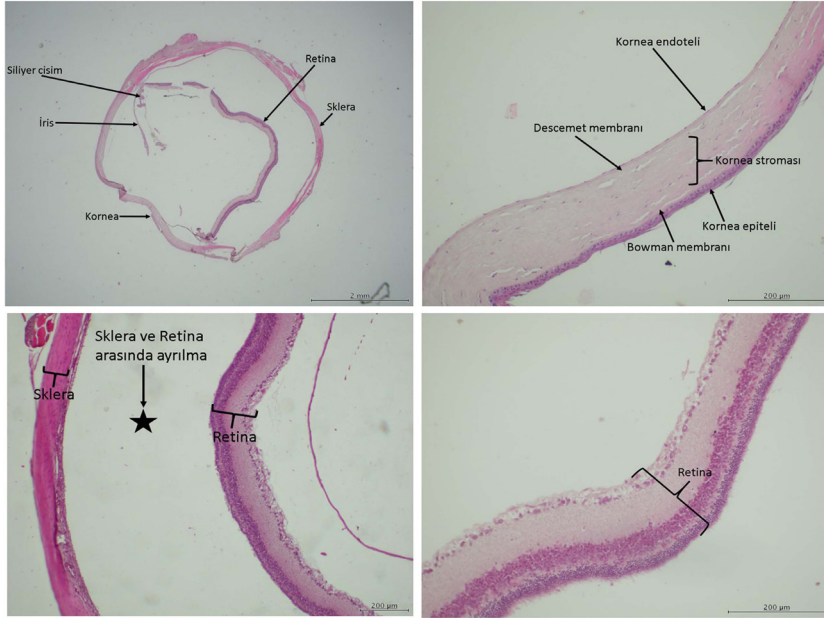
*+++++: Çok iyi; ++++: İyi; +++: Orta; ++: Kötü; +: Çok kötü.



Şekil 1. Grup I: Formalin fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü örneği ile elde edilen ratın göz kesiti (HE, 2X, 10X, 20X, 40X).



Şekil 2. Grup II: Formalin fiksatifyle asetonlu doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 20X, 40X).



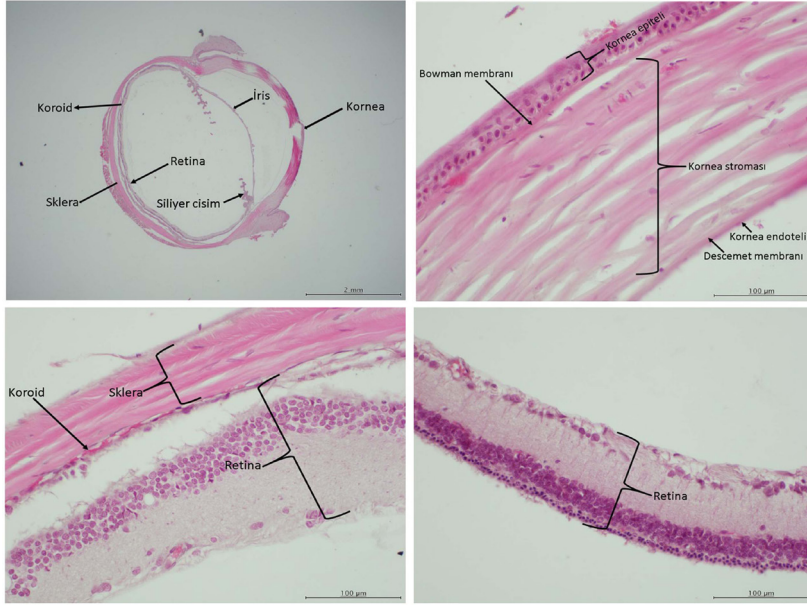
Şekil 3. Grup III: Bouin fiksatifyle asetonuz doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 10X, 20X).

Grup IV bouin fiksatifyle asetonlu grupta H&E boyanma sonuçlarında korneaskleral katman, vasküler katman ve retina arasında bir bütünlük

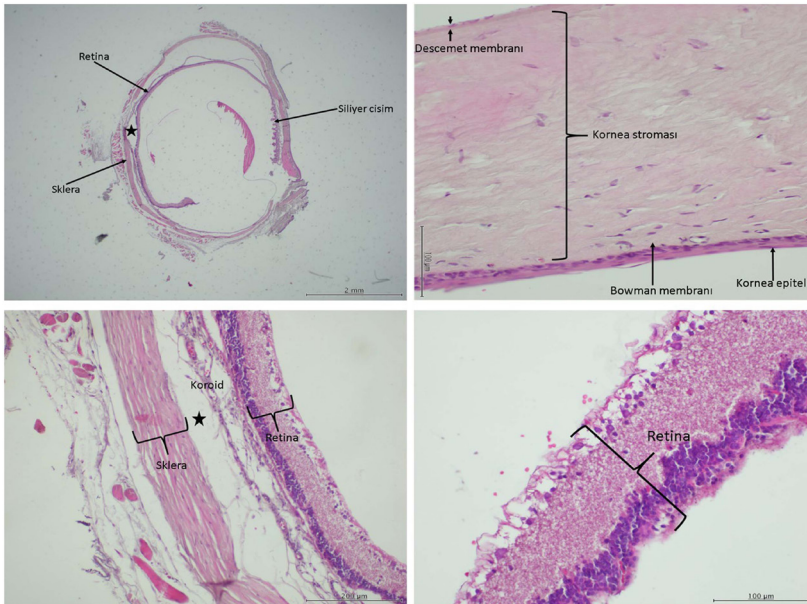
olduğu, kornea ve skleranın, koroid ve retinanın normal histolojik yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 4).

Grup V paraformaldehit fiksatifile asetonsuz (Şekil 5) ve Grup VI paraformaldehit fiksatifile asetonsuz (Şekil 6) gruplarının her ikisinde de doku bütünlüğünün bozulduğu, göz küresinin her üç histolojik katmanları arasında ayrılmalar, yer yer

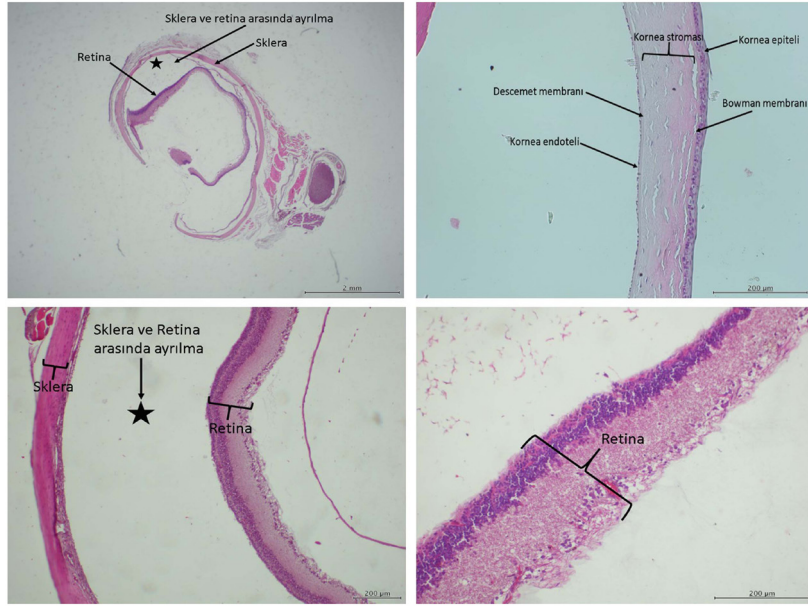
yırtılmalar ve bozulmalar olduğu tespit edilmiştir. Ancak katmanlar tek tek incelendiğinde kornea, sklera, koroid ve retina yapılarının anlamlı derecede hasarlı olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4. Grup IV: Bouin fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 40X).



Şekil 5. Grup V: Paraformaldehit fiksatifile asetonsuz doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 20X, 40X).



Şekil 6. Grup VI: Paraformaldehit fiksatifile asetonlu doku takip protokolü örneği ile elde edilen bir ratın göz kesiti (HE, 2X, 10X, 20X).

TARTIŞMA

Çeşitli fiksasyon methodları ve bu methodlarda kullanılan farklı fiksatifler bulunmaktadır. Tüm farklı dokular için uygun olan tek bir fiksasyon ajanının bulunmaması araştırmacıların farklı fiksasyon ajanları üzerine yoğunlaşmasına yol açmıştır. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, formalin fiksatifinin bir ya da birkaç farklı fiksatifle karşılaştırıldığı gözlenmiştir. Literatürde yer alan farklı çalışmalarda, çeşitli fiksasyon tipleri karaciğer dokusunda (13), ince iğne aspirasyonlarında (14), akciğer (15) ve kolon kanserlerinde (16), normal kolon mukoza örneklerinde (17) ve tiroid dokusunda (18) incelenmiştir. Bu ideal fiksatif arayışlarından dolayı, dehidratif alternatifleri geri planda kalmıştır.

Dehidrasyon ajanları seçiminde dikkat edilmesi gereken hususlar arasında doku takibinde kullanılan diğer solüsyonlar ile uyumlu olması, ekonomik olması ve dokuyu ne kadar küçülttüğü sayılabilir. Dehidrasyonun yeterli olmadığı durumda infiltrasyon ve şeffaflandırma basamakları da güzel olmayacağı

için ortası yumuşak, çamur gibi dokular elde edilebilmektedir. Tam tersine fazla dehidrasyon durumu ise zor kesit alınabilen, kırılğan ve çok sert dokular elde edilmesine yol açar (19).

Diagnostik patolojide, yüz yılı aşkın süredir rutin fiksatif olarak %3.7'lik formaldehit çözeltisi (%10'luk formalin) kullanılmaktadır (20). Bunun en önemli nedeni, formaldehit solüsyonunun kolay uygulanabilmesi, iyi mikroskopik görüntü elde edilebilmesi ve pahalı olmaması gibi avantajları olmasıdır (21).

Yapılan bir çalışmada, farklı fiksatifler kullanılarak hayvanlardan alınan göz ve testis dokuları karşılaştırılmıştır. Geleneksel Davidson fiksatifinden farklı oranlarda alkol, asetik asit ve formalin kullanılarak hazırlanan modifiye edilmiş bir Davidson fiksatifinin, hem immünohistokimyasal boyama hem de detaylı histopatolojik inceleme için Bouin sıvısına benzer ve birçok açıdan daha üstün bir koruma sağladığını gösterilmiştir. Ayrıca, hüresel koruma kalitesi Davidson fiksatifininkinden daha düşük olmasına rağmen, gözler için kabul edilebilir

bir fiksatif sağladığı bildirilmiştir (22). Başka bir çalışmada ise proliferatif vitreoretinopati tavşan modeli kullanılarak, fiksatif seçiminin sonucu önemli ölçüde etkilediği bulunmuştur. %4 formaldehit ile fiksasyonun, fiksasyonla ilişkili retina dekolmanına yol açtığı gösterilmiştir. Bu nedenle, proliferatif vitreoretinopati veya ilaç testi çalışmalarında göz dokularını değerlendirmek için 36-48 saat boyunca %1 tamponlu formaldehitte birlikte %1,25 glutaraldehit kombinasyonu önerilmiştir (23).

Sıçan pankreas dokularında yapılan bir çalışmada iki farklı fiksasyon yöntemi (immersiyon ve perfüzyon), üç farklı fiksatif solüsyonu (%4 paraformaldehit+%7.5 pikrik asit, Bouin sıvısı, nötral formalin) ve değişik fiksasyon süreleri denenmiştir. Oda sıcaklığında 24 saat Bouin fiksatifinde tutmayı ya da oda sıcaklığında 48 saat nötral formalinde tutmayı önermişlerdir. Fiksasyonu hızlı bir şekilde tamamlamak istenilen durumlarda ise; Bouin'in fiksatif ile 15 dk ıslatma aşamasından sonra 45 sn mikrodalga ışınlama uygulaması önerilmiştir (24). Kedi ovaryumlarında yapılan bir çalışmada ovaryumun cerrahi operasyonları sırasında uygulanan ligasyon sonrasında dokunun uzaklaştırılması arasındaki geçen sürede Bouin ve %10 tamponlu formalin fiksatiflerinin doku korunması ve foliküller üzerine etkilerinin ortaya konulması doğrultusunda uygun fiksatifin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak Bouin fiksatifinin formalin fiksatifine göre belirgin oranda daha iyi bir folikül ve hücre bütünlük göstermekle beraber genel tüm yapının korunumunu sağladığı bildirilmiştir (25).

Farklı fiksatifler kullanılarak yapılan bir çalışmada Zenker, Bouin, Orth, %10'luk formalin, Schaudin, Clark, Carnoy, B5, Regaud, ve alkol-formalin fiksatiflerinin duodenum, karaciğer, mide, dalak, ve böbrek dokularının bazı bölgelerindeki uygunluklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, mide ve böbrekte incelenen tüm bölgeler, duodenumda tunika muskularis, lamina propria, lamina epitelyalis için en uygun olan fiksatifin Clark

olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Bouin solüsyonunun dalak dokusu için ve alkol-formalin solüsyonunun ise karaciğer dokusu için uygun fiksatifler olduğu belirlenmiştir (26).

Bu çalışmada göz dokusunun inceleneceği çalışmalarda hangi fiksatifin ve dehidrasyon ajanının seçilmesi ile iyi sonuç elde edilebileceği araştırılmıştır. Diğer çalışmalardan farklı olarak göz dokusuna dehidrasyon ajanları ve fiksatifleri farklı olan altı adet doku takip yöntemi uygulanmıştır. Üç doku takip protokolünde dehidrasyon ajanı olarak alkol diğer üçünde alkol ve aseton kullanılmıştır. Ayrıca farklı fiksatifler (formalin, bouin, paraformaldehit) uygulanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan farklı dehidrasyon ajanları ve farklı doku takipleri ile elde ettiğimiz kesitler, mikroskobik olarak alışılagelmiş morfolojiye benzer ya da daha iyi özellikte sonuçlar vermiştir. Değerlendirilen tüm parametreler Grup I, Grup II, Grup III, Grup IV, Grup V ve Grup VI'da doku bütünlüğü ve tüm yapılar göz önüne alındığında genel olarak, morfolojik açıdan benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Ancak göz dokularının bütünlüğü değerlendirildiğinde göz küresindeki histolojik katmanların bütünlüğünün en iyi şekilde Grup IV bouin fiksatifine asetonlu grupta bulunduğu görülmüştür. Gruplar arasında katmanlar tek tek incelendiğinde ise kornea, sklera, koroid ve retina yapılarının anlamlı derecede farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, rutin histolojik incelemelerde, doku morfolojisinin korunmasındaki en önemli basamak doku takibidir. Bu süreç ne kadar başarılı ise mikroskoptaki ayrıntı düzeyi de o kadar iyi olacak ve temel histomorfolojik incelemeler için en uygun zemin oluşacaktır. Bizde bu çalışmada elde ettiğimiz verilere dayanarak göz doku takibi sürecinde fiksatif olarak bouin, dehidratif ajan olarak ise aseton kullanımını önermekteyiz. Bu çalışmanın çıktılarının genellenmesi ve geliştirilebilmesi için daha fazla yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma, Nesa Deneysel Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarı Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirilmiştir (Tarih:03.08.2024, Karar no: 052).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Layton C, Bancroft JD, Suvarno K. Fixation of tissues. In: Suvarno K, Layton C, Bancroft JD, eds. Bancroft's Theory and practice of histological techniques. 8th ed. London: Churchill Livingstone, 2018:43-67.
2. Carson FL. Histotechnology:Histotechnology: A Self-Instructional Text. 2nd ed. Chicago: American Society for Clinical Pathology Press, 1997.
3. Carson FL, Kingsley WB, Race GJ. Drierite as a dehydrant, indicator and marker for paraffin embedded tissues. Am J Med Tech, 1970; 36: 283-5.
4. Eltoun I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. J Histotechnol, 2001; 24(3): 173-90.
5. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. J Histochem Cytochem, 1985; 33(8): 845-53.
6. Grizzle WE. Models of fixation and tissue processing. Biotech Histochem, 2009; 84(5): 185-93.
7. Braet F, Ratinac K. Creating next-generation microscopists: structural and molecular biology at the crossroads. J Cell Mol Med, 2007; 11: 759-63.
8. Hopwood D, Coghill G, Ramsay J, Milne G, Kerr M. Microwave fixation: its potential for routine techniques, histochemistry, immunocytochemistry and electron microscopy. Histochem J, 1984; 16(11):1171-91.
9. Hopwood D. Fixation and fixatives. In: Bancroft JD, Stevens A, eds. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th edition. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1996; 20-35.
10. Turner CR, Zuczek S, Knudsen DJ, Wheeldon EB. Microwave fixation of the lung. Stain Technol, 1990; 65(2):95-101.
11. Pabuccuoğlu HU. Makroskopik Değerlendirme Ve Tespit (Fiksasyon). https://turkpath.org.tr/files/2_makroskopi_tespit_UP_metin.pdf, [Erişim Tarihi: 10.02.2025].
12. Ross MH, Pawlina W. Histoloji konu anlatımı ve atlas, Baykal B, Çeviri ed. Histology Subject Expression and Atlas, 6. Basım. Ankara: Palme Yayıncılık, 2017.
13. Cox ML, Schray CL, Luster CN, Stewart ZS, Korytko PJ, M Khan KN, et al. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. Exp Mol Pathol, 2006; 80(2):183-91.

14. Gazziero A, Guzzardo V, Aldighieri E, Fassina A. Morphological quality and nucleic acid preservation in cytopathology. *J Clin Pathol*, 2009; 62(5):429-34.
15. Arzt L, Kothmaier H, Quehenberger F, Halbwedl I, Wagner K, Maierhofer T, et al. Evaluation of formalin-free tissue fixation for RNA and microRNA studies. *Exp Mol Pathol*, 2011; 91(2):490-5.
16. 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(2):115-23.
17. Baloglu G, Haholu A, Kucukodaci Z, Yilmaz I, Yildirim S, Baloglu H. The effects of tissue fixation alternatives on DNA content: a study on normal colon tissue. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2008; 16(5):485-92.
18. Lassalle S, Hofman V, Marius I, Gavric-Tanga V, Brest P, Havet K, et al. Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives. *Thyroid*, 2009; 19(11):1239-48.
19. Çakalağaoğlu F. Doku takibi. *Aegean Pathol J*, 2005; 2: 29-30.
20. Grizzle WE. The use of fixatives in diagnostic pathology. *J Histotechnol*, 2001; 24(3): 151-2.
21. Coleman WB, Tsongalis GJ. *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*. 2nd ed. Clifton: Humana Press, 2006.
22. Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol*, 2002; 30(4):524-33.
23. Nassar K, Lüke J, Lüke M, Kamal M, Soliman MM, Grisanti S, et al. Effect of different fixative solutions on eyes with experimental proliferative vitreoretinopathy. *Int J Exp Pathol*, 2015; 96(2):103-10.
24. Öztürk N, Kahveci Z, Eyigör Ö, Sırmalı Ş. Pankreas dokusunun değişik yöntemlerle fiksasyonu. *Uludağ Üni Tıp Fak Derg*, 2002; 28(3): 71-5.
25. Çelikkan FT, Acar DB, Demirel MA, Ekim B, Özkavukçu S, Kanca H, et al. Kedi Ovaryumunun tespitinde zamanlamanın ve kullanılan fiksatiflerin folikül korunması üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. *J Ankara Univ Fac Med*, 2021; 74(2):156-60.
26. Gün H, Demirbağ E, Çınar K. Farklı fiksatiflerin bazı dokular için uygunluğunun belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üni Fen Bil Enst Derg*, 2014; 15(2):75-9.