T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOYMUŞ TUZLU (NaCl) SU ÇÖZELTİSİNİN DOKU TESPİT İŞLEMİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Ümit ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Kemal ÇİFTÇİ

KONYA-2016

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOYMUŞ TUZLU (NaCl) SU ÇÖZELTİSİNİN DOKU TESPİT İŞLEMİNDE KULLANIMININ ARAŞTIRILMASI

Ümit ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PATOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Kemal ÇİFTÇİ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16202019 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2016

ÖNSÖZ

Doku tespitlerinde yaygın olarak %10'luk formaldehit tercih edilmektedir. Yapılan çalışmalar ile formaldehitin genotoksik, mutajenik, teratojenik ve embriyotoksik etkilerinin de olduğu belirlenmiştir (Casanova ve ark. 1988, McLaughlin 1994, Shaham ve ark. 1996). Ayrıca formaldehitin özellikle solunum sistemi, sinir sistemi ve sindirim sistemi gibi birçok sistem üzerinde karsinojenik etki yaptığı da kaydedilmektedir (McLaughlin 1994).

Formaldehitin sağlık üzerine çok ciddi olumsuz etkileri olduğu iyi bilinmesine karşın halen rutin doku tespitlerinde yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra, alternatif tespit solüsyonuna yönelik arayışlar da devam etmektedir. Doymuş tuzlu su çözeltisi alternatif tespit solüsyonu olabilir mi hususunda sınırlı sayıda da olsa çalışmalar yapılmış ve otolizi önlediği vurgulanmıştır. Bu nedenle doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinin farklı koşullarda dokuları ne oranda tespit edebileceği incelenerek, rutin uygulamalarda formaldehit solüsyonuna alternatif bir tespit solüsyonu olarak araştırılması amaçlanmaktadır. Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 16202019 proje numarası ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren sürekli bana destek olan, tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesi aşamasında her türlü desteğinden dolayı çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa Kemal ÇİFTÇİ' ye, yüksek lisans eğitimim süresince teorik ve pratik bilgilerinden yararlandığım Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Hüdaverdi ERER, Prof. Dr. Mustafa ORTATATLI, Prof. Dr. Fatih HATİPOĞLU ve Doç. Dr. Özgür ÖZDEMİR'e, tez çalışmam esnasında her türlü yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Funda TERZİ' ye, teşekkür ederim.

Veteriner Hekim olmamda büyük katkısı olan saygıdeğer babam Latif ÖZDEMİR, sevgili annem Lütfiye ÖZDEMİR ve sevgili ablam Şükriye ERKEK 'e teşekkürlerimi sunarım.

Ümit ÖZDEMİR

Konya, Haziran 2016

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR iv

1.GİRİŞ 1

1.1.Fiksatifler 1

1.1.1.Tespit İşleminde Başlıca Önemli Faktörler; 2

1.2. Fiksatif Türleri 3

1.2.1.Tespit Solüsyonlarında Kullanılan Bazı Kimyasal Ajanlar 3

1.2.2.Tespit Solüsyonları 5

1.3. Doymuş Tuzlu Su Solüsyonu ve Doku Tespiti 9

2. GEREÇ VE YÖNTEM 11

2.1. Materyal 11

2.2. Metot 11

2.2.1 Histopatolojik İnceleme 12

3. BULGULAR 13

4. TARTIŞMA 30

5. SONUÇ ve ÖNERİLER 34

6.KAYNAKLAR 35

7. EKLER 37

EK A: Etik Kurul Onayı 37

8. ÖZGEÇMİŞ 39

SİMGELER VE KISALTMALAR

Cl : Klor

Cm^3 : Santimetre küp

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

g : Gram

GHz : Saniye başına bir milyar (1.000.000.000/s) devir

HCO3 : Bikarbonat

HE : Hematoksilen ve Eosin boyası

K : Kelvin

MHz : Saniye başına bir milyon (1.000.000/s) devir

ml : Mililitre

mm : milimetre

mRNA: Messenger Ribo Nükleik Asit

mol : Bir tane su molekülünün kütlesi

mOsm : Bir litre çözeltide çözünmüş partikül sayısı

Na : Sodyum

NaCl : Sodyum klorür

PAS : Periyodik Asit Şift

pH : Asit ve alkalin yoğunluğunun göstergesi

ppm : Herhangi bir karışımda toplam madde miktarının milyonda 1 birimlik maddesidir

RNA : Ribo Nükleik Asit

OsO_4 : Osmiyum Tetraoksit

^0C : Santigrat derece

µ : Mikron

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Doymuş Tuzlu (NaCl) Su Çözeltisinin Doku Tespit İşleminde Kullanımının Araştırılması

Ümit ÖZDEMİR
Patoloji (Vet) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA – 2016

Rutin doku tespitlerinde genelde %10'luk formaldehit tercih edilmektedir. Formaldehit etkili bir tespit solüsyonu olmasına karşın, genotoksik mutajenik, teratojenik, embriyotoksik ve karsinojenik gibi insan sağlığı açısından zararlı yan etkileri de söz konusudur. Bu nedenle formaldehit solüsyonuna alternatif bir tespit solüsyonları arayışları da devam etmektedir. Bu çalışmada doymuş tuzlu su çözeltisinin farklı koşullarda dokuları ne oranda tespit edebileceği incelenerek rutin uygulamalarda kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Çalışmada doymuş tuzlu su solüsyonunun dokuların tespitindeki özelliklerini araştırmak için 6 baş ruminant kadavrası materyal olarak kullanılmıştır. Kesilmiş veya yeni ölmüş hayvanlardan karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, kalp, sindirim sistemi mukozası, lenf düğümü ve beyinden alınan marazi maddeler çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Bu maksatla 7 grup oluşturuldu ve dokuların tespitleri; I.Grup: %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisiyle oda ısısında, II. Grup: Doymuş tuzlu su çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında, III. Grup: Doymuş tuzlu su çözeltisinde 60 °C etüvde 12 saat, IV. Grup: Doymuş tuzlu su çözeltisinde 70 °C su banyosunda 2 saat, V. Grup: Doymuş tuzlu su çözeltisinde 80 °C su banyosunda 1 saat, VI. Grup: Doymuş tuzlu su çözeltisinde 90 °C su banyosunda 15 dakika, VII. Grup: Önce doymuş tuzlu su çözeltisinde12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat bekletilerek yapıldı. Daha sonra rutin doku takibi yapılarak 5-6 mikronluk kesitler alınıp HE ile boyanıp ışık mikroskobunda incelendi.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada doymuş tuzlu su solüsyonunda 24 saat oda sıcaklığında, 12 saat 60 °C etüvde, 1 saat 80 °C su banyosunda ve 90 °C su banyosunda 15 dakika tespit uygulamalarında genelde yeterli bir tespit elde edilememiştir. Bunun yanında tuzlu su solüsyonunda 70 °C su banyosunda 2 saat tespit uygulamalarında kısmi tespitler yapılabilmiş, önce doymuş tuzlu su solüsyonunda 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat tespit uygulamalarında ise formaldehite yakın düzeyde tespitler gerçekleşmiştir. Buradan doymuş tuzlu su solüsyonunda tespit potansiyeli olduğu, bunun için de bu konudaki çalışmaların devam etmesi gerektiği, olumlu sonuçlar alınabileceği kanısına varılmıştır. Ayrıca formaldehit solüsyonunun bulunamadığı durumlarda doku örneklerinde otolitik değişiklikleri durdurabilmek için geçici olarak doymuş tuzlu suya alınabileceği ve daha sonra formaldehit solüsyonuna aktarılmasının uygun olacağı anlaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Doymuş tuzlu su; doku tespiti; formaldehit.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of The Use of

Saturated Saline Solution in The Tissue Fixation

Ümit ÖZDEMİR
Department of Pathology (Veterinary)

MASTER'S THESIS/ KONYA – 2016

In routine tissue fixation, 10% formaldehyde solution is usually preferred. Although formaldehyde is an effective fixative solution, there are side effects, harmful in terms of human health, such as genotoxic, mutagenic, teratogenic, embryotoxic and carcinogenic. Therefore, searches for an alternative fixative solution to formaldehyde solution have been progressed. In this study, the usefulness and availability of saturated salt (NaCl) water solution for routine applications of tissue fixation has been investigated in different conditions and tissues.

In the study, six ruminant cadavers were used as a material for detecting the effectiveness of saturated saline solution on tissue fixation. The tissue samples taken from liver, lung, kidneys, spleen, heart, gastrointestinal mucosa, lymph nodes and brain from slaughtered or newly dead animals were formed the material of the study.

For this purpose, 7 different groups were designed and fixations of the tissues were performed with relevant solutions; Group I: 10% buffered formalin solution at room temperature, Group II: saturated salt (NaCl) water solution at room temperature for 24 hours, Group III: saturated salt (NaCl) water solution in 60 °C oven for 12 hours, Group IV: saturated saline (NaCl) solution in 70 °C water bath for 2 hours, Group V: saturated brine (NaCl) solution in 80 °C water bath for 1 hour, Group VI: saturated brine (NaCl) solution in 90 °C water bath for 15 minutes and Group VII: firstly saturated salt (NaCl) water solution for 12 hours and then tissues were allowed to stand in 10% formaldehyde solution for 24 hours. After fixation trials, the tissues were processed routinely and cut at 5-6 micron sections, stained with Haematoxylin and Eosin, and then examined under light microscope.

In conclusion, in the study, a sufficient fixation has not been obtained with saturated saline solutions at room temperature for 24 hours, in 60 °C oven for 12 hours, in 80 °C water bath for 1 hour and in 90 °C water bath for 15 minutes for tissue fixation. But, a partial fixation could be made with saturated saline solution in 70 °C water bath for 2 hours, and an adequate fixation close to the classical formaldehyde solution was achieved in Group VII, in which the tissues were firstly fixed in saturated saline solution for 12 hours and then transposed to 10% formaldehyde solution for 24 hours. Thus, it has been realized that the saturated brine solutions may have a potential for tissue fixation, and also needs to continue to work on this subject because possible positive results could be taken in the future. Besides, it has been concluded that, in case of absent of formaldehyde solution, a saturated saline solution available at anywhere can be temporarily used to fix and to stop autolytic changes in tissue samples, and then tissues should be transposed to the appropriate formaldehyde solution for fully and sufficient fixation at laboratory or in available.

Key words: formaldehyde; saturated saline solution; tissue fixation.

1.GİRİŞ

1.1.Fiksatifler

Gerek canlıdan alınan biyopsi materyali, gerekse kadavradan alınan doku parçalarında fermentlerin ve mikroorganizmaların etkisiyle otolitik değişiklikler gelişerek doku ve hücreler canlıdaki yapılarını kaybederler. Canlıdaki hastalık halleri ve canlının ölüm nedenini belirlemek, doku ve hücreleri tanıyarak patolojik değişiklikleri belirleyebilmek için otolitik değişikliklerin oluşması durdurulmalıdır. Doku ve hücrelerin otolizini durdurmak için bir tespit solüsyonuna konularak dokular alındığı hali ile tespit edilmesi gerekmektedir (Ünsaldı ve Çiftçi 2010, Pabuçcuoğlu 2016). Bu olaya fiksasyon, kullanılan maddeye de fiksatif veya tespit solüsyonu adı verilir. Tespitin amacı postmortem değişikliğin önüne geçmek, hücre ve dokuları alındığı haliyle koruyabilmektir.

Hücre ve dokuların yapılarını anlamak, hücre ve dokulardaki değişiklikleri belirlemek ve böylece canlıdaki hastalıkları, ölüm nedenlerini belirleyebilmek için yüzyıllar boyunca birçok tespit solüsyonu, fiksatif denenmiş ve kullanılmıştır (Gbadamosi 2014).

Fiksatiflerin temel ilkesi, spesifik moleküllerin kaybını önleyerek, doku yapısını korumak ve sertleştirmektir (Gbadamosı 2014). Bundan dolayı fiksatifler, doku ve hücrelerde proteinler, lipidler, mRNA ve DNA gibi hücresel bileşiklerin kaybı asgari düzeyde olmalı ve sitoplazmik membran, endoplazmik retikulum, nüklear membranlar, mitokondri ve lizozom gibi makromoleküllerin yıkımlanmasını önlemelidir. Ayrıca fiksatifler dokulardaki enzimlerin ve mikroorganizmaların aktivitesini durdurarak hücrelerin yıkımlanmasını engellemelidir (Eltoum ve ark. 2001a). İyi bir fiksatifin diğer önemli bir özelliği ise güçlü dezenfektan olmalıdır ki, alınan doku ve organ parçası içinde herhangi bir hastalık etkeni varsa onu dezenfekte ederek araştırmacı için zararsız hale getirmelidir (Titford 2001, Eltoum ve ark. 2001b). Aynı zamanda bir fiksatif dokuyu sertleştirmeli ve böylece dokunun ince dilimler halinde kesilmesini kolaylaştırmalıdır (Ünsaldı ve Çiftçi 2010). Fiksatifler proteinlerin kendi arasında, proteinlerin belirli kısımları arasında ve protein-nükleik asit arasında kovalent çapraz bağlanma oluşturarak çözülmez hale getirmelidir. En iyi çapraz bağlanma oluşturan fiksatifler formaldehit ile gluteraldehittir. Ayrıca

dokuda bulunan serbest suyun difüzyonunu ve proteinleri pıhtılaştırmalıdır (Eltoum ve ark 2001a). Fiksatifler yağlı dokuları, kolay dağılan lenfatik dokuları ve biyopsi gibi küçük materyaller ile farklı hayvan türlerinden alınan farklı ebatlardaki dokuları tespit edebilmelidir. Bunların yanı sıra iyi bir fiksatif, DNA/RNA hibridizasyon, immunohistokimyasal boyama tekniklerini gibi histopatoloji laboratuvarlarında kullanılan testler için de kullanılabilecek tespitler yapabilmelidir. Rutin boyama olan Hematoksilen- Eozin boyama ile de iyi sonuç verebilmelidir (Dapson 1993).

1.1.1.Tespit İşleminde Başlıca Önemli Faktörler;

1. Hidrojen iyonu konsantrasyonu ve tamponlar; dokuların tespiti amacıyla kullanılan maddeler farklı pH değerlerine sahiptir. Bu nedenle hidrojen iyonu yoğunluğu ilave kimyasallarla ile normal sınırlar içinde tutulmalıdır. İyi bir tespit için solüsyonun pH değeri 6 ile 8 arasında olmalıdır (Pabuçcuoğlu 2016).

2.Sıcaklık; fiksatiflerin, kimyasal reaksiyonları, çapraz bağlanması ve proteinlerin çöktürmesi gibi etkileri sıcaklığa bağlıdır (Bullock 1984). Solüsyondaki moleküllerin dokuya difüzyonu sıcaklık artışı ile birlikte artar. Yüksek sıcaklıkta kullanılan formaldehitin penetrasyonunda da artış vardır (Eltoum ve ark 2001a). Ancak sıcaklığın 60 ^{0}C'nin üzerinde olması halinde hem otolitik değişikliklere ve hem de dokunun immunreaktifitesinin azalmasına neden olabilmektedir. Isı ile tespit için, mikrodalga fırınlar tercih edilmelidir. Bu işlem tespit solüsyonundaki dokularda kimyasal reaksiyonlar hızlanır ve molekülleri daha etkin uyarır (Pabuçcuoğlu 2016).

3. Fiksatiflerin penetrasyonu; dokuların fiksasyonunda, tespit solüsyonun nüfuz etmesi yavaş bir işlem olduğu için, alınan doku örnekleri mümkün olduğunca küçük ebatlarda ya da ince olmalıdır(Pabuçcuoğlu 2016).

Medavar (1941) fiksatiflerin dokuya nüfuz etmesi üzerine yaptığı çalışmada penetrasyon derinliğini (d), fiksasyon zamanını (t), fiksatifin difuzyon yapabilme katsayısını (K sabiti) olarak kullanarak fiksasyon olgusunu "$d=K\sqrt{t}$" şeklinde formüle etmiştir. Buna göre penetrasyon derinliğinin tespit süresinin kare köküyle orantılı olduğunu kaydetmiştir. Ayrıca K katsayısı her bir fiksatif için farklı olduğunu da bildirmiştir. Buradaki 1 saat içerisindeki difüzyon katsayısı, fiksatifin dokuya milimetrik difüzyonunu ifade eder.

4. Tespit Solüsyonunun osmolaritesi; yoğun solüsyonlar hücrede büzüşmeye, hipotonik fiksatifler ise hücrede şişkinliğe neden olur. Tespit için en uygun solüsyonlar kısmen hipertonik olanlardır (Eltoum ve ark 2001a, Pabuçcuoğlu 2016).

5. Fiksatifin Yoğunluğu; formalin konsantrasyonu %10 üzerinde olduğunda dokuların sertleşmesini ve büzüşmesini arttırırken, etanol konsantrasyonu %70 altında olduğunda dokulardan suyu dehidre edememektedir (Fox ve ark. 1985).

6. Tespit süresi; tespit süresinin belirlenmesinde, hidrojen iyon konsantrasyonu, pH, sıcaklık, fiksatifin penetrasyonu, konsantrasyonu gibi faktörlerle yakından ilişkilidir. Tespit süresi normalden fazla uzatılırsa dokuda fazlaca bir sertleşme ve büzüşme şekillenir (Pabuçcuoğlu 2016).

1.2. Fiksatif Türleri

Günümüzde tespit solüsyonları yaygın olarak histolojik, histopatolojik incelemeler için kullanılmakta ise de son zamanlarda immunolojik incelemeler için de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunun için tespit sırasında antijenlerin özelliklerinin fazla bir değişime uğramaması arzu edilir. Günümüzde en yaygın kullanılan ve tercih edilen tespit solüsyonu tabi olarak formaldehittir. Özellikle histopatolojide formaldehitten sonra sık kullanılan tespit solüsyonları alkol ve alkolden hazırlanan Carnoy bileşiği ile formaldehitten hazırlanan Bouin ve B5 solüsyonlarıdır. Yine günümüzde immunohistokimyasal çalışmaların yanı sıra polimeraz zincir reaksiyonu ve in situ hibridizasyon gibi dokulardan teşhise yönelik metotların yaygınlaşması da daha yeni tespit solüsyonu arayışlarına neden olmaktadır (Pabuçcuoğlu 2016).

1.2.1.Tespit Solüsyonlarında Kullanılan Bazı Kimyasal Ajanlar

1.2.1.1.Sıvı Tespit Ajanları

Absolut etil alkol: Tespitte kullanılan alkol yüzdelerine bağlı olarak dokuyu sertleştirir ve büzüştürür. Bu nedenle dokuların absolut etil alkol ile tespitinde yaygın olarak sitoplazmalarda büzüşmeler oluşabilir. Yalnız glikojen gibi suda eriyecek maddelerin incelendiği çalışmalarda absolut etil alkol tercih edilir (Demir 2001, Koptagel 2016).

Formaldehit: Formaldehit suda, ayrıca alkol ve eterde de iyi çözünür. Oldukça aktif bir madde olan formaldehit birçok madde ile birleşerek polimerleşir. Günümüzde de teknik ve ekonomik bakımdan en çok kullanılan tespit solüsyonu olan formol ticari olarak % 37'lık formaldehit olarak bulunur. Doku ve hücrelerdeki proteinleri çöktürmez (Demir 2001). Formaldehitle RNA-protein, DNA-protein ve protein-protein çapraz bağlanma oluşturur (Doenecke 1978). Dokudaki yağları ne korur ne de yıkımlar. Ancak kompleks lipitlerin tespiti için iyi bir solüsyon olup, nötral lipitler üzerine etkisizdir. Karbonhidratlar için de tespit edici değildir (Demir 2001).

Gluteraldehit: Gluteraldehit ilk olarak Sabatini ve ark. (1963) tarafından bir fiksatif olarak tanıtılmıştır. Elektron mikroskopi ve enzim histokimyası çalışmalarında dokuların fiksasyonu için özellikle gluteraldehit tercih edilmektedir (Sabatini ve ark. 1963, Hayat 1986). Gluteraldehit amino lipitler ile çapraz bağlanma oluşturarak membran yapısını korumaktadır. Gluteradehitin moleküler yapısı ortamın pH ve sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir (Hayat 1986). Gluteraldehitin dokulara difüzyonu formaldehitten daha yavaştır. Gluteraldehit dokuyu çok fazla sertleştirmesi nedeniyle düşük konsantrasyonlarda (% 0.5) kullanılır. Bu durum ayrıca dokuda hem antijenik yapının, hem de ince yapının korunmasını sağlar (Demir 2001). Gluteraldehitin kullanımında pH 7.0-7.4 olarak tavsiye edilmektedir (Hayat 1986).

Trikloroasetik asit: Sülfür grubu amino asitleri iyi korur. Dokuların dekalsifikasyonunda kullanılır (Koptagel 2016).

Asetik asit: Tek olarak kullanılmaz. Dokuya hızlı ve iyi nüfuz eder, ancak alyuvarların lizisine yol açar, kollajen fibrilleri şişirir. Nükleoproteinleri çöktürür. Bazı sitoplazmik granüller üzerine çözücü bir etkiye sahiptir (Koptagel 2016).

1.2.1.2-Katı Tespit Ajanları

Civa Klorür: Dokuların fiksasyonunda lipitleri yıkımlamaz ve proteinlerle birleşmeden tüm proteinleri çöktürebilir. Dokuya hızla nüfuz ederek hem çekirdeği hemde sitoplazmayı iyi tespit eder. Ancak dokuyu sertleştirir ve biraz büzer. Civa klorür genellikle diğer tespit solüsyonları ile beraber kullanılır (Demir 2001, Koptagel 2016).

Potasyum dikromat: Hücre sitoplazması ve mitokondriyi iyi tespit eder ve ayrıca fosfolipitlerin fiksasyonunu sağlar (Baker 1965, Demir 2001). Genellikle diğer ajanlarla karıştırılarak kullanılır. Potasyum dikromatla tespit edilen dokular da alkole alınmadan önce akarsuda yıkanmalıdır (Koptagel 2016). Potasyum dikromat yıkıcı özellikleri azaltmak için uygun oranlarda ozmiyum tetraoksit veya formaldehit ile karıştırılır **(**Baker 1965).

Kromik Asit: Genellikle %2'lik çözeltileri kullanılır. Proteinleri presipite eder ve karbohidratları tespit eder. Alkol ve formalin ile birlikte kullanılmamalıdır (Koptagel 2016).

Pikrik Asit: Dokuların fiksasyonunda hızlı ve iyi bir şekilde dokuya nüfuz eder ve tüm proteinleri çöktürür (Demir 2001). Fiksasyonda suda doygun çözeltisi kullanılmakta olup, fiksasyon işleminden sonra alkole alınmalıdır (Koptagel 2016).

Osmiyum tetraoksit (OsO_4)**:** Hücrenin temel bileşenleri olan mitokondri, golgi, yağ, miyelin vs. maddelerin tespitinde kullanılan en iyi solüsyonlardan biridir (Porter ve Kallman 1952, Riemersma 1962, Hopwood 1969). Daha ziyade elektron mikroskobik inceleme yapılacak dokuların tespitinde kullanılır. Dokuya yavaş nüfuz eder fakat lipitler için ideal fiksatiftir (Hopwood 1969). Osmiyum tetraosik periferik sinirlerdeki myelinli liflerini boyamak için kullanılmaktadır. Olfaktorik ve optik sinirlerin fiksasyonunda en uygun olanıdır (Demir 2001).

1.2.2.Tespit Solüsyonları

1.2.2.1. Etil Alkol Solüsyonu

Etil alkol özellikle biyopsi materyallerinde (%90-96) primer fiksatif olarak, ayrıca doku ve hücrelerdeki glikojenin korunması ve bazı histokimyasal çalışmalar için kullanılmaktadır. Formol ve benzeri ajanlarda tespit edilen dokular akarsuda yıkandıktan sonra dehidrasyon için %70'lik etil alkole alınır. Dokuya nüfusu yavaş olup, proteinlerde denatürasyona neden olur, dokudan su çekerek büzüştürür ve dokuyu sertleştirir (Demir 2001, Pabuçcuoğlu 2016). Bu nedenle 5 mm den daha kalın olmayan dokular için 6-8 saatlik bir tespit yeterlidir. Çözülebilir nükleik asitleri ve suda çözünmeyen albümin ve globülini çöktürür (Demir 2001). İçerisinde suda

eriyebilecek maddelerin bulunduğu dokular absolut alkolde tespit edilmelidir (Ünsaldı ve Çiftçi 2010).

1.2.2.2.Carnoy fiksatifi

Bu bileşik absolut alkol, glasiyal asetik asit ve kloroformdan hazırlanır (Absolut alkol 60 ml, kloroform 30 ml, glacial asetik asit 10 ml). Her türlü dokunun tespitinde kullanılabilir. Hızlı ve en iyi penetrasyona sahip olan fiksatiflerden biridir (Luna 1968). Dokularda RNA belirlemek amacıyla kullanılan Metil green pyronin boyası yapılacak dokuların fiksasyonunda kullanılmaktadır (Eltoum ve ark 2001a). Glikojen ve plazma hücreleri incelemelerinde tercih edilir (Luna 1968, Eltoum ve ark 2001a,). Özellikle 3-5 ^{o}C'de tespit edilirse glikojen için uygundur (Demir 2001). Dokularda büzüşme ve sertleşmeye neden olmaktadır. Bu nedenle 4 saatten fazla dokuların tespiti yapılmamalıdır (Luna 1968, Pabuççuoğlu 2016). Asit fast basiller ile eritrositleri yıkımlar (Luna 1968, Eltoum ve ark 2001a, Pabuççuoğlu 2016)

1.2.2.3. Bouin solüsyonu

Pikrik asit, formaldehit ve asetik asitten meydana gelir (75 ml doymuş pikrik asit eriyiği, 75 ml formol, 5 ml asetik asit) (Demir 2001). Testis biyopsilerinin ve balık dokularının tespitinde Bouin solüsyonu tercih edilmelidir (Pabuççuoğlu 2016). Bouin solüsyonu, Trichrome boyamalarda bağ dokusunu tespit amacıyla kullanılmaktadır (Eltoum ve ark 2001a). Bouin solüsyonu temas ettiği bütün materyalleri sarıya boyar. Bu boyamalar %50'lik ve %70'lik alkol serileriyle büyük oranda giderilebilir. Bunun için dokuların makroskobik ayrıntılarını daha iyi görmek gerektiğinde dokular bu alkol serilerinden geçirilebilir (Eltoum ve ark 2001a).

1.2.2.4. B5 Tespit Solüsyonu

Bu bileşik sodyum asetat, cıva klorür ve formalinden hazırlanır (Demir 2001). Bu solüsyon dalak ve lenf düğümleri gibi lenfoid dokuların tespitinde tercih edilir. Çünkü B5 solüsyonu ile sitoplazma ve çekirdekteki ayrıntılar daha iyi seçilebilir. Yalnız B5 tespit solüsyonu taze olarak hazırlanmalı. Uzun süreli tespitler dokuyu fazla sertleştirip daha kırılgan yapacağından bu solüsyonda dokular 2-4 saatten fazla

tutulmamalı sonrasında hemen formaline alınması daha uygun bir doku tespiti sağlar (Pabuçcuoğlu 2016).

1.2.2.5. Zenker Tespit Solüsyonu

Zenker solüsyonu civa klorür, potasyum dikromat ve glasiyal asetik asitten hazırlanır (Potasyum dikromat 2,5 g, civa klorür 5-8 g, distile su 100 ml ve glasiyal asetik asitten %5) (Demir 2001). Zenker solüsyonu dokuları genelde 8-12 saat içerisinde tespit eder ve daha çok kemik iliği biyopsileri için tercih edilir. Bu solüsyonla tespitlerde histopatolojik detay oldukça iyidir, fakat moleküler analizler ve immunohistokimyasal çalışmalarda tercih edilmemektedir (Pabuçcuoğlu 2016).

1.2.2.6. Formaldehit Solüsyonu (Formalin)

Günümüzde birçok alanda kullanılan formaldehit, histoloji, anatomi ve patoloji laboratuvarlarında dokuların tespitinde en çok tercih edilen solüsyondur. Formaldehit doku fiksasyonunda ilk olarak Ferdinard Blum tarafından kullanmıştır (Fox ve ark 1985, Al- Saraj 2010). Dokular formalin içerisinde bozulmaksızın uzun süre saklanabilir. Bu özelliğinden her türlü doku ve organ materyalinin rutin fiksasyonu için kullanılmaktadır.

Formalin, formaldehitin sudaki % 37'lik çözeltisidir. Rutin tespitlerde kullanılan % 10'luk formalin solüsyonu, 100 cc formaldehit (% 37'lik), 900 cc su ile karıştırılmasıyla elde edilmektedir. Yani % 10'luk formalin solüsyonu, aslında formaldehitin % 4'lük çözeltisidir. Formaldehit, oda sıcaklığında 24 saatte, 37 ^{0}C ise 18 saatte dokuyu tespit ettiği belirlenmiştir (Fox ve ark 1985). Formaldehit tespitlerinde biyopsi örnekleri için genelde 5-6 saat ve daha büyük doku örnekleri için ise 12-24 saatlik tespit uygun bulunmaktadır (Pabuçcuoğlu 2016). Formaldehitle fiksasyon süresince, RNA-protein, DNA-protein ve protein-protein çapraz bağlanma oluşmaktadır (Doenecke 1978). Formaldehitin uzun süreli fiksasyonunda dokularda oluşan çapraz bağlanmaya bağlı olarak immunohistokimyasal boyamalarda veya histolojik boyamalarda zayıf bağlanma oluşmaktadır (Prento ve Lyon 1997, Eltoum ve ark 2001a). Formaldehit daha ziyade ışık mikroskobik incelemeler yapılacak dokuların tespitinde tercih edilen bir tespit solüsyonudur. Elektron mikroskobik incelemeler için hazırlanan dokuların tespiti için uygun değildir (Pabuçcuoğlu 2016).

Formalin ve formaldehit uygun ortamlarda saklanmazsa asidik bir karakter kazanacağından, kullanılmadan önce solüsyonun pH'sı kontrol edilip pH ~7,0 olarak ayarlanmalıdır. Gerekirse magnezyum karbonat, kalsiyum karbonat, fosfat ve tris gibi nötralize edici tamponlar kullanılmalıdır (Pabuçcuoğlu 2016).

Formaldehit solüsyonu dokuları tespitte etkili bir madde olmasına karşın insan sağlığına yönelik önemli zararlar içerir. Yapılan çalışmalar formaldehitin; genotoksik etkisine ilgili kromozomal hatalarına, tek zincir kırıklarına, kardeş kromatit değiş tokuşuna ve hücrede değişimlere neden olarak gen mutasyonlarına yol açar (Casanova ve ark. 1988, Shaham ve ark. 1996). Ayrıca formaldehitin uzun süreli kullanımlarında karsinojenik, mutajenik, teratojenik ve embriyotoksik (McLaughlin 1994) etkili bir tespit solüsyonu olduğu bildirilmiştir. Formaldehitin kanserojenik etkisinin özellikle solunum, sinir ve sindirim sistemlerinde daha yaygın olduğu belirlenmiştir (Kerns ve ark. 1983, Usanmaz ve ark. 2002, Zararsız ve ark. 2006). Uzun süre formaldehitle çalışan kişilerde yapılan araştırmalarda beyin, kolon ve kan dokusu ile ilgili kanserlerin daha sık görüldüğü de kaydedilmiştir (Shaham ve ark. 1996, Schlink ve ark. 1999). Yine yapılan çalışmalarla formaldehitin, tubuli seminiferus kontortusun germinal hücrelerinin dejenerasyonuna neden olarak infertiliteye ve/veya döl verim düşüklüğüne yol açtığı da tespit edilmiştir (Chowdhury ve ark. 1992, Thrasher ve Kilburn 2001, Özen ve ark. 2005). Thrasher ve Kilburn (2001) gebe fareler üzerinde yaptıkları bir çalışma ile embriyo ölümlerinin ve fötal dokularda kriptorşidizm ile aberrant ossification venters gibi anamolilerin arttığı deneysel olarak da ortaya konulmuştur. Kuş ve ark. (2008) ise omega-3 yağ asitlerinin formaldehitin testislerde neden olduğu apoptozisi önlediğini bildirmişlerdir. Formaldehitin solunum sistemi toksisitesi düşük konsantrasyonlarda (0.5 ppm) bile ortaya çıktığı, akut olaylarda burun ve boğazda yanma hissi, nefes darlığı, öksürük, hırıltılı solunum gibi klinik semptomlara, yüksek konsantrasyonlarda ise pulmoner ödem, inflamasyon ve pnömoniye neden olduğu da bilinmektedir (Kriebel ve ark. 2001). Mesleki olarak formaldehitle çalışan işçiler arasında akciğer kanserinden ölüm oranının %30 daha fazla olduğu belirtilmiştir (McLaughlin 1994). Formaldehitin santral sinir sistemi üzerinde de toksik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir. Formaldehitin nörotoksik etkileri akut etkilenmelerde baş ağrısı, baş dönmesi, keyifsizlik, uykusuzluk ve iştahsızlık, uzun süreli etkilenmelerde

ise duygu-durum bozuklukları, davranış bozuklukları ve epilepsi gibi kalıcı nörotoksisite belirtilere neden olduğu kaydedilmektedir (Gürel ve ark.2005, Zararsız ve ark. 2006). Gürel ve ark.(2005) formaldehitin hipokampus ve frontal korteks üzerinde toksik etki yaparak, her iki beyin bölgesinde nöronlarda dejenerasyon ve piknotik değişime neden olduğunu kaydetmişlerdir. On üç hafta boyunca 10 ve 20 ppm dozunda formaldehit inhalasyonuna maruz bırakılan ratlarda nazal bölgede tümör geliştiği bildirilmiştir (Feron ve ark. 1988).

Yapılan bütün bu çalışmalar sonucu günümüzde formaldehitin sağlık üzerine çok ciddi olumsuz etkileri olduğu çok iyi bilinmesine karşın etkin doku tespit özelliği nedeniyle de halen doku tespitlerinde rutin olarak kullanılmaktadır. Alternatif tespit solüsyonuna yönelik arayışlar da devam etmektedir.

1.3. Doymuş Tuzlu Su Solüsyonu ve Doku Tespiti

Doğada yaygın olan tuz kaynakları katı ve sıvı olarak iki şekildedir. Katı tuz kaynakları kaya tuzlarıdır. Sıvı tuzların kaynakları ise denizler, tuzlu göller ve tuzlu sulardır (Ergin 1998).

Sodyum klorür, fiziksel ve kimyasal özelliği; moleküler formül NaCl, Molar 58,4277 g/mol, özgül ağırlığı 2,16 g/cm^3 ve beyaz yada renksiz görünümdedir. Erime ısısı 801 °C ve kaynama ısısı 1738 K ve suda 35.9 g/mol çözünür (Gbadamosi 2014).

Doymuş tuzlu su çözeltisi 1000 ml kaynama derecesindeki (96 °C) suya 357 gr NaCl eklenerek hazırlanmaktadır (Al- Saraj A. 2010).

Doymuş tuzlu su çözeltisi alternatif tespit solüsyonu olabilir mi hususunda sınırlı sayıda da olsa çalışmalar yapılmıştır. Al- Saraj (2010) 3 adet tavşandan karaciğer, böbrek, dalağını doymuş tuzlu su, formaldehit ve distile su çözeltisinde ayrı ayrı tespit ederek formaldehit ile tuzlu su çözeltisini doku tespiti yönünden değerlendirmiştir. Çalışmanın sonucunda tuzlu su çözeltisinin otolizi önlediği, tespit özelliğinin formaldehite benzer olduğu, doku kesitlerinin mikroskobik incelemelerinde histolojik detayların formaldehite yakın düzeyde olduğunu kaydetmiştir. Sonuç olarak bu konuda daha detaylı çalışmaların yapılması gerektiğini

ve doku tespit etmek amacıyla zorunlu durumlarda kullanılabileceğine dikkat çekmişlerdir. Olszewski ve ark. (2004) deri ve lenf düğümlerinin oda sıcaklığında anhidrid sodyum klorür çözeltisi içinde bir hafta ve bir ay süreyle bekletmeleri sonucunda dokuların moleküler yapılarını ve immunoreaktivitesini koruduğunu kaydetmişlerdir. Gbadamosi (2014) yetişkin erkek ratların karaciğer ve testis dokusunu doymuş tuzlu suda 12, 24, 48 ve 168 saat süreyle tespit ederek yaptığı çalışmada, karaciğer dokusunu 48 saate kadar olan sürelerde tespit ettiğini ve karaciğerin rutin histolojik prosedüründe kullanılabileceğini, fakat testis dokusunu tespit etmediğini bildirmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı ve Nekropsi salonunda yapılmıştır. Nekropsi salonuna nekropsi için canlı getirilen ve kesilen 6 baş ruminant kadavrasından alınan karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, kalp, sindirim sistemi mukozası, lenf düğümü ve beyin dokuları materyal olarak kullanılmıştır.

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Kurulu'nun 26.11.2015 tarih ve 2015/95 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

2.2. Metot

Bu kadavraların nekropsilerini takiben (karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, kalp, sindirim sistemi mukozası, lenf düğümü ve beyinden) alınan dokular;

I.Grup (Kontrol Grubu): %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisinde 24 saat (oda sıcaklığında),

II. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 24 saat (oda sıcaklığında),

III. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 60 °C etüvde 12 saat,

IV. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 70 °C su banyosunda 2 saat,

V. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 80 °C su banyosunda 1 saat,

VI. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 90 °C su banyosunda 15 dakika,

VII. Grup: Önce doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat oda ısısında,

tespit amacıyla bekletildi.

Alınan bu doku örnekleri 4-5 mm kalınlığında küçültülerek doku takip kasetlerine konuldu ve 12-24 (formol 24, tuzlu suda 12 saat) saat akan suda yıkandı. Daha sonra doku takip cihazında (Leica TP 1020) sırasıyla %70, %80, %90, %96 ve

absolut alkollerden sonra 2 kez ksilol, ksilollü parafin, yumuşak parafin (46-48 °C'de eritilmiş) ve sert (56-58 °C'de erimiş) parafinde ikişer saat bekletildikten sonra blok parafinle bloklandı. Her bloktan histopatolojik incelemeler için mikrotomla (Leica RM 2125RT) 5μ kalınlığında kesitler lamlara alınarak etüvde 10 dakika kurutuldu ve 5'er dakika 3 kez ksilol ve ardından da %100, %96, %90, %80, %70'lik alkollerden geçirildikten sonra Hematoksilen - Eosin (HE) yöntemi ile boyandı (Luna 1968). Bu dokular binoküler başlıklı ışık mikroskobunda (Olympus BX51) incelendi. Gerekli görülen olgulardan fotoğraflar çekildi (Olympus DP12 Microscopic Digital Camera Systems).

2.2.1 Histopatolojik İnceleme

Çalışmada her grup için ayrı ayrı alınan karaciğer, böbrek, akciğer, dalak, lenf düğümü, bağırsak kalp ve beyine ait dokuların kesitleri tespite ilgili bulgular yönünden mikroskobik olarak incelendi. Mikroskobik bulgular aşağıda belirtilen skorlamaya göre değerlendirildi. Formol ve tuzlu su tespiti yapılan dokuların mikroskobik incelemelerinde dokularda gözlenen tespit ile ilgili yetersizlikler esas alınarak normal tespitten otolitik değişikliklere kadar olan mikroskobik bulgular 0, 1, 2, ve 3 olmak üzere skorlandı.

Bu skorlamada;

0 (Normal Tespit): Hücre sınırları belirgin, sitoplazmada büzüşme yok, çekirdek kromatinleri belirgin, piknoz yok, eritrositlerde hemoliz yok, çizgili kaslarda striasyon görülebilmekte.

1 (Az Hatalı Tespit): Sitoplazmada kısmi büzüşme, çizgili kaslarda striasyon kaybı, eritrositlerde kısmi hemoliz, bazı hücrelerde çekirdek kromatinleri net değil.

2 (Yetersiz Tespit): Hücrelerde şişkinlik, hücre sınırları belirsiz, eritrositlerde hemoliz belirgin, bazı hücrelerin çekirdeklerinde piknoz,

3 (Otoliz): Hücrelerin sınırları seçilemiyor, çekirdekler tamamen piknotik, eritrositlerde şiddetli hemoliz ve dokularda otolitik değişiklikler oluşmuş.

3. BULGULAR

Mikroskobik incelemelerde çalışmanın bütün gruplarına ait dokularda tespite ilgili gözlenen bulgular belirlenen kriterlere göre skorlanarak her bir hayvana ait sonuçlar tablolar halinde sunulmuştur (Çizelge 3.1., 3.2., 3.3., 3.4., 3.5., 3.6., 3.7., 3.8.).

Çizelge 3.1. Birinci hayvandaki her bir gruba ait dokularda yapılan tespit ve gözlenen mikroskobik bulgular ve skor değerleri.

Birinci Hayvan **Kayıt No: 94/16**	Karaciğer	Akciğer	Böbrek	Kalp	Dalak	Beyin	Lenf Düğümü	Sindirim Sistemi Mukozası
I. Grup: %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisiyle oda ısısında	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında	3	3	3	3	3	3	3	3
III. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 60 °C etüvde 12 saat	3	3	3	2	3	2	3	2
IV. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 70 °C su banyosunda 2 saat	2	2	2	2	2	2	3	2
V. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 80 °C su banyosunda 1 saat	2	3	3	2	2	2	3	3
VI. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 90 °C su banyosunda 15 dakika	3	3	3	3	3	2	3	3
VII. Grup: Önce doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat oda ısısında	1	2	2	1	2	1	2	2

Çizelge 3.2. İkinci hayvandaki her bir gruba ait dokularda yapılan tespit ve gözlenen mikroskobik bulgular ve skor değerleri.

İkinci Hayvan **Kayıt No: 95/16**	Karaciğer	Akciğer	Böbrek	Kalp	Dalak	Beyin	Lenf Düğümü	Sindirim Sistemi Mukozası
I.Grup: %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisiyle oda ısısında	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında	3	3	3	3	3	3	3	3
III. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 60 °C etüvde 12 saat	3	3	3	2	3	2	3	3
IV. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 70 °C su banyosunda 2 saat	3	3	3	2	3	2	2	3
V. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 80 °C su banyosunda 1 saat	3	3	3	2	3	3	3	3
VI. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 90 °C su banyosunda 15 dakika	3	3	3	3	3	3	3	3
VII. Grup: Önce doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat oda ısısında	2	2	2	2	2	2	2	2

Çizelge 3.3. Üçüncü hayvandaki her bir gruba ait dokularda yapılan tespit ve gözlenen mikroskobik bulgular ve skor değerleri.

Üçüncü Hayvan **Kayıt No: 100/16**	Karaciğer	Akciğer	Böbrek	Kalp	Dalak	Beyin	Lenf Düğümü	Sindirim Sistemi Mukozası
I. Grup: %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisiyle oda ısısında	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında	3	2	3	2	3	3	3	3
III. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 60 °C etüvde 12 saat	3	3	3	2	3	3	3	3
IV. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 70 °C su banyosunda 2 saat	3	2	3	2	3	2	3	3
V. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 80 °C su banyosunda 1 saat	2	2	2	2	3	2	3	3
VI. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 90 °C su banyosunda 15 dakika	2	3	2	1	3	3	2	2
VII. Grup: Önce doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat oda ısısında	2	2	1	1	2	1	2	2

Çizelge 3.4. Dördüncü hayvandaki her bir gruba ait dokularda yapılan tespit ve gözlenen mikroskobik bulgular ve skor değerleri.

Dördüncü Hayvan **Kayıt No: 99/16**	Karaciğer	Akciğer	Böbrek	Kalp	Dalak	Beyin	Lenf Düğümü	Sindirim Sistemi Mukozası
I. Grup: %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisiyle oda ısısında	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında	3	3	3	3	3	3	3	3
III. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 60 °C etüvde 12 saat	3	3	3	3	3	3	3	3
IV. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 70 °C su banyosunda 2 saat	2	2	2	2	2	3	3	2
V. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 80 °C su banyosunda 1 saat	3	3	3	2	3	3	3	3
VI. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 90 °C su banyosunda 15 dakika	3	3	3	3	3	3	3	3
VII. Grup: Önce doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat oda ısısında	2	2	2	2	2	2	2	2

Çizelge 3.5. Beşinci hayvandaki her bir gruba ait dokularda yapılan tespit ve gözlenen mikroskobik bulgular ve skor değerleri.

Beşinci Hayvan **Kayıt No: 104/16**	Karaciğer	Akciğer	Böbrek	Kalp	Dalak	Beyin	Lenf Düğümü	Sindirim Sistemi Mukozası
I. Grup: %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisiyle oda ısısında	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında	3	3	3	2	3	3	3	3
III. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 60 °C etüvde 12 saat	3	2	3	2	3	3	3	3
IV. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 70 °C su banyosunda 2 saat	2	2	3	2	3	2	3	2
V. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 80 °C su banyosunda 1 saat	2	2	3	2	3	3	3	2
VI. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 90 °C su banyosunda 15 dakika	3	2	3	2	2	3	2	2
VII. Grup: Önce doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat oda ısısında	1	2	2	1	2	1	2	1

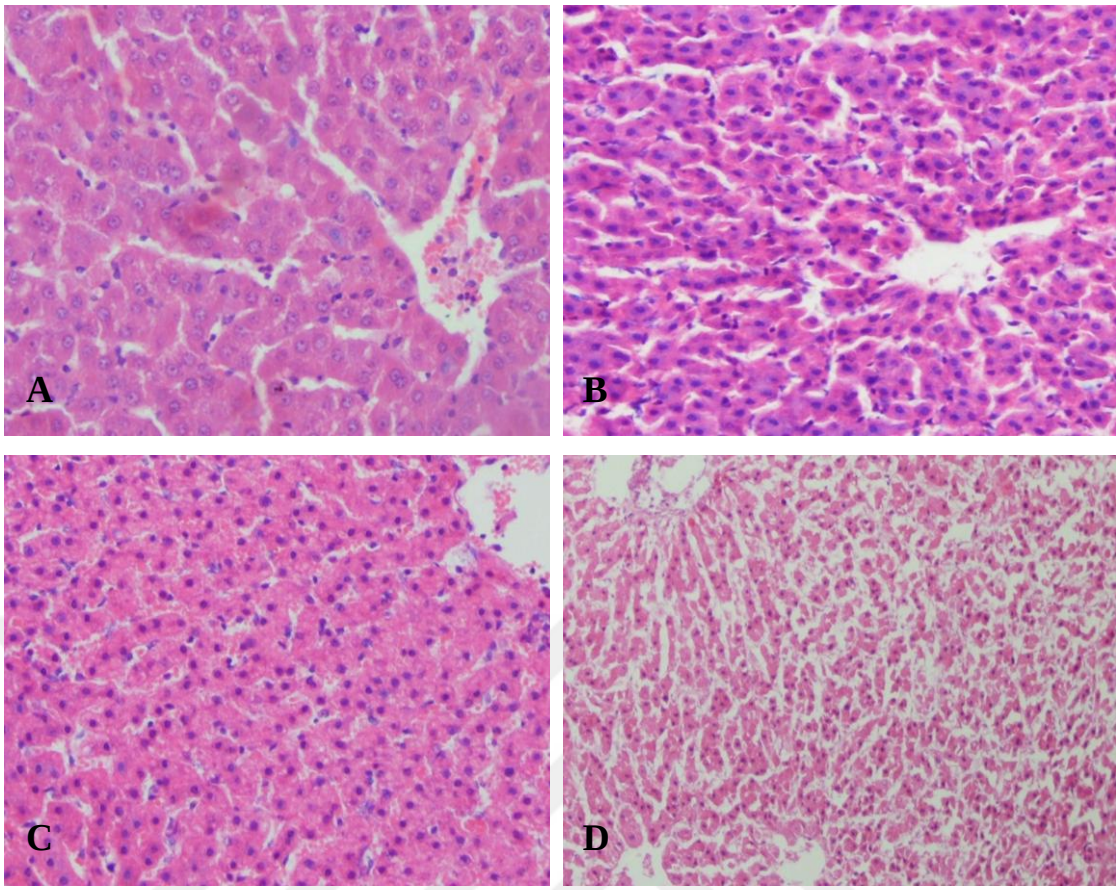
Çizelge 3.6. Altıncı hayvandaki her bir gruba ait dokularda yapılan tespit ve gözlenen mikroskobik bulgular ve skor değerleri.

Altıncı Hayvan **Kayıt No: 145/16**	Karaciğer	Akciğer	Böbrek	Kalp	Dalak	Beyin	Lenf Düğümü	Sindirim Sistemi Mukozası
I. Grup: %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisiyle oda ısısında	0	0	0	0	0	0	0	0
II. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında	3	3	3	2	3	3	3	3
III. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 60 °C etüvde 12 saat	3	2	3	2	3	3	3	3
IV. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 70 °C su banyosunda 2 saat	2	2	2	2	2	2	2	3
V. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 80 °C su banyosunda 1 saat	3	2	3	2	2	2	3	2
VI. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 90 °C su banyosunda 15 dakika	3	2	3	2	3	3	3	3
VII. Grup: Önce doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat oda ısısında	2	1	2	1	1	1	1	2

Çizelge 3.7. Altı hayvandaki her bir gruba ait dokularda tespite ilgili gözlenen mikroskobik bulgular ve skor değerlerinin matematiksel ortalamaları.

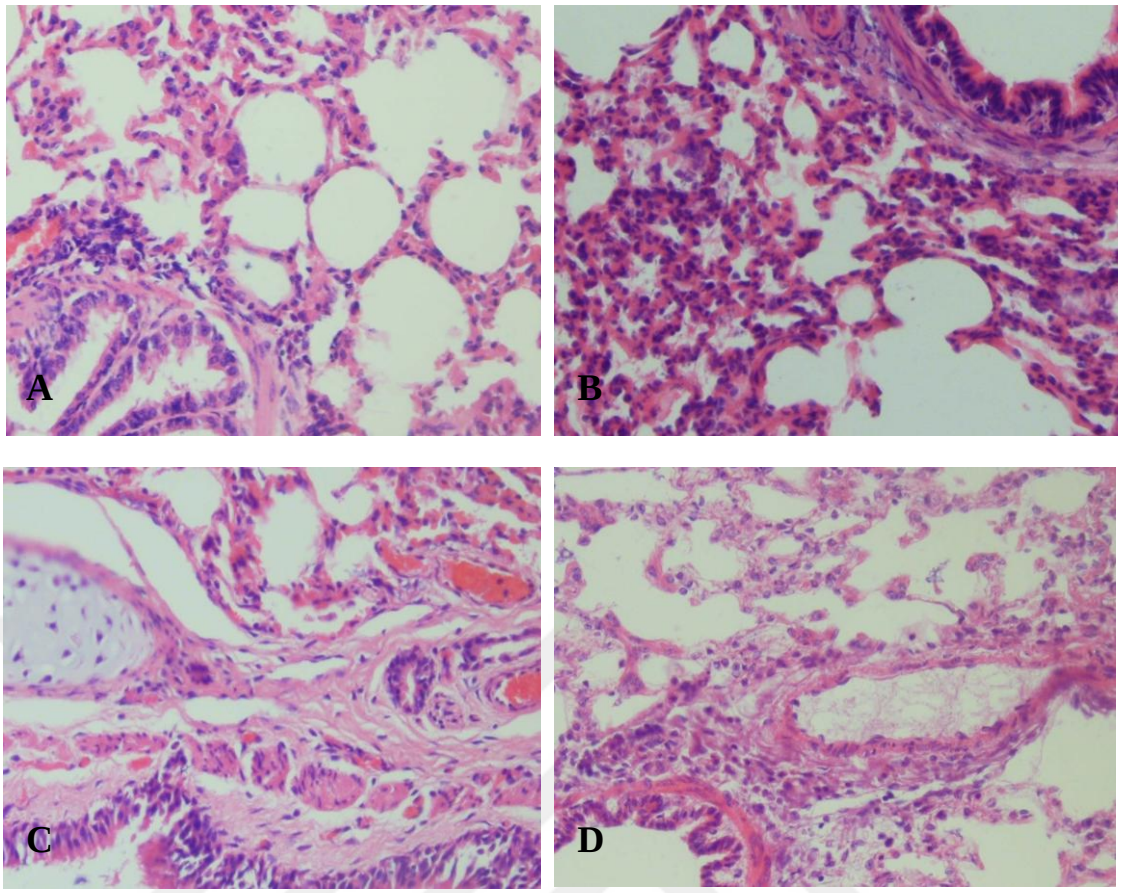
Altı hayvanın ortalama değerleri	I. Grup: %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisiyle oda ısısında	II. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 24 saat oda sıcaklığında	III. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 60 °C etüvde 12 saat	IV. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 70 °C su banyosunda 2 saat	V. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 80 °C su banyosunda 1 saat	VI. Grup: Doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 90 °C su banyosunda 15 dakika	VII. Grup: Önce doymuş tuzlu (NaCl) su çözeltisinde 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat oda ısısında
Karaciğer	0 (0,0,0,0,0,0)	3 (3,3,3,3,3,3)	3 (3,3,3,3,3,3)	2 (2,3,3,2,2,2)	2.5 (2,3,2,3,2,3)	3 (3,3,2,3,3,3)	2 (1,2,2,2,1,2)
Akciğer	0 (0,0,0,0,0,0)	3 (3,3,2,3,3,3)	3 (3,3,3,3,2,2)	2 (2,3,2,2,2,2)	2,5 (3,3,2,3,2,2)	3 (3,3,3,3,2,2)	2 (2,2,2,2,2,1)
Böbrek	0 (0,0,0,0,0,0)	3 (3,3,3,3,3,3)	3 (3,3,3,3,3,3)	2.5 (2,3,3,2,3,2)	3 (3,3,2,3,3,3)	3 (3,3,2,3,3,3)	2 (2,2,1,2,2,2)
Kalp	0 (0,0,0,0,0,0)	2.5 (3,3,2,3,2,2)	2 (2,2,2,3,2,2)	2 (2,2,2,2,2,2)	2 (2,2,2,2,2,2)	2 (3,3,1,3,2,2)	1 (1,2,1,2,1,1)
Dalak	0 (0,0,0,0,0,0)	3 (3,3,3,3,3,3)	3 (3,3,3,3,3,3)	3 (2,3,3,2,3,2)	3 (2,3,3,3,3,2)	3 (3,3,3,3,2,3)	2 (2,2,2,2,2,1)
Beyin	0 (0,0,0,0,0,0)	3 (3,3,3,3,3,3)	3 (2,2,3,3,3,3)	2 (2,2,2,3,2,2)	2,5 (2,3,2,3,3,2)	3 (2,3,3,3,3,3)	1 (1,2,1,2,1,1)
Lenf Düğümü	0 (0,0,0,0,0,0)	3 (3,3,3,3,3,3)	3 (3,3,3,3,3,3)	3 (3,2,3,3,3,2)	3 (3,3,3,3,3,3)	3 (3,3,2,3,2,3)	2 (2,2,2,2,2,1)
Sindirim Sistemi Mukozası	0 (0,0,0,0,0,0)	3 (3,3,3,3,3,3)	3 (2,3,3,3,3,3)	2,5 (2,3,3,2,2,3)	3 (3,3,3,3,2,2)	3 (3,3,2,3,2,3)	2 (2,2,2,2,1,2)

Mikroskobik incelemeler sonucu her hayvanın karaciğer, böbrek, dalak, akciğer, kalp, beyin, sindirim sistemi mukozası ve lenf düğümlerinden her bir tespit gurubu için aynı mikroskobik büyütmelerde ayrı ayrı fotoğraflar alındı. Fotoğraflara ilgili açıklamalarda fotoğrafın hangi tespit gurubuna ait olduğu ve mikroskobik değerlendirmeler de belirlenen skoru da kaydedildi. Karaciğerle ilgili şekiller şekil 3.1 olarak, Akciğerle ilgili şekiller şekil 3.2 olarak, Böbrekle ilgili şekiller şekil 3.3 olarak, Kalple ilgili şekiller şekil 3.4 olarak, Dalakla ilgili şekiller şekil 3.5 olarak, Beyinle ilgili şekiller şekil 3.6 olarak, Lenf düğümü ile ilgili şekiller şekil 3.7 olarak, sindirim sistemi mukozası(bağırsak) ile ilgili şekiller şekil 3.8 olarak gösterilmiştir.



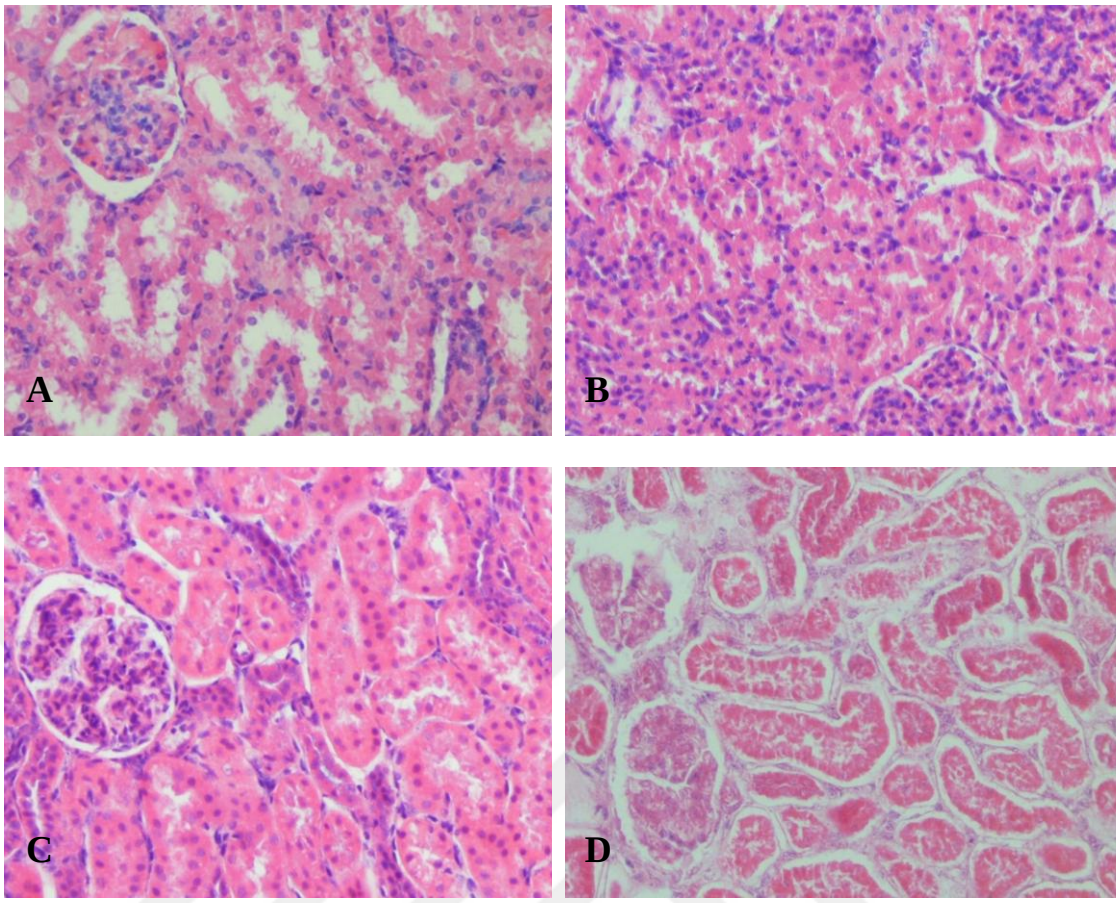
Şekil 3.1. Karaciğer, HE. x400.

A. I. grup 1. hayvan. Normal düzeyde bir tespit. Skor değeri 0,
B. VII. grup 1. hayvan. Az Hatalı Tespit. Skor değeri 1,
C. VII. grup 3. hayvan. Yetersiz tespit. Skor değeri 2,
D. II. grup 1. hayvan. Otolitik. Skor değeri 3.



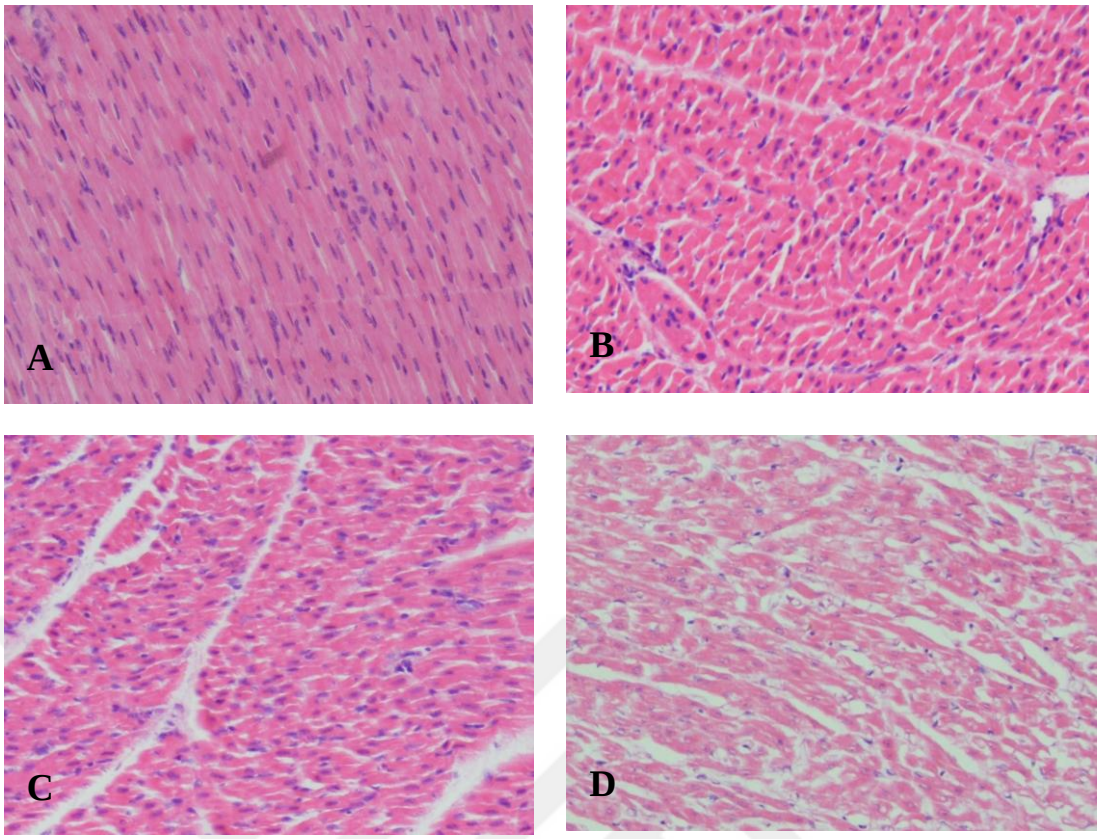
Şekil 3.2. Akciğer, HE. x400.

A. I. grup 1. hayvan. Normal düzeyde bir tespit. Skor değeri 0,
B. V. grup 3. hayvan. Az Hatalı Tespit. Skor değeri 1,
C. VII. grup 5. hayvan. Yetersiz tespit. Skor değeri 2,
D. II. grup 1. hayvan. Otolitik. Skor değeri 3.



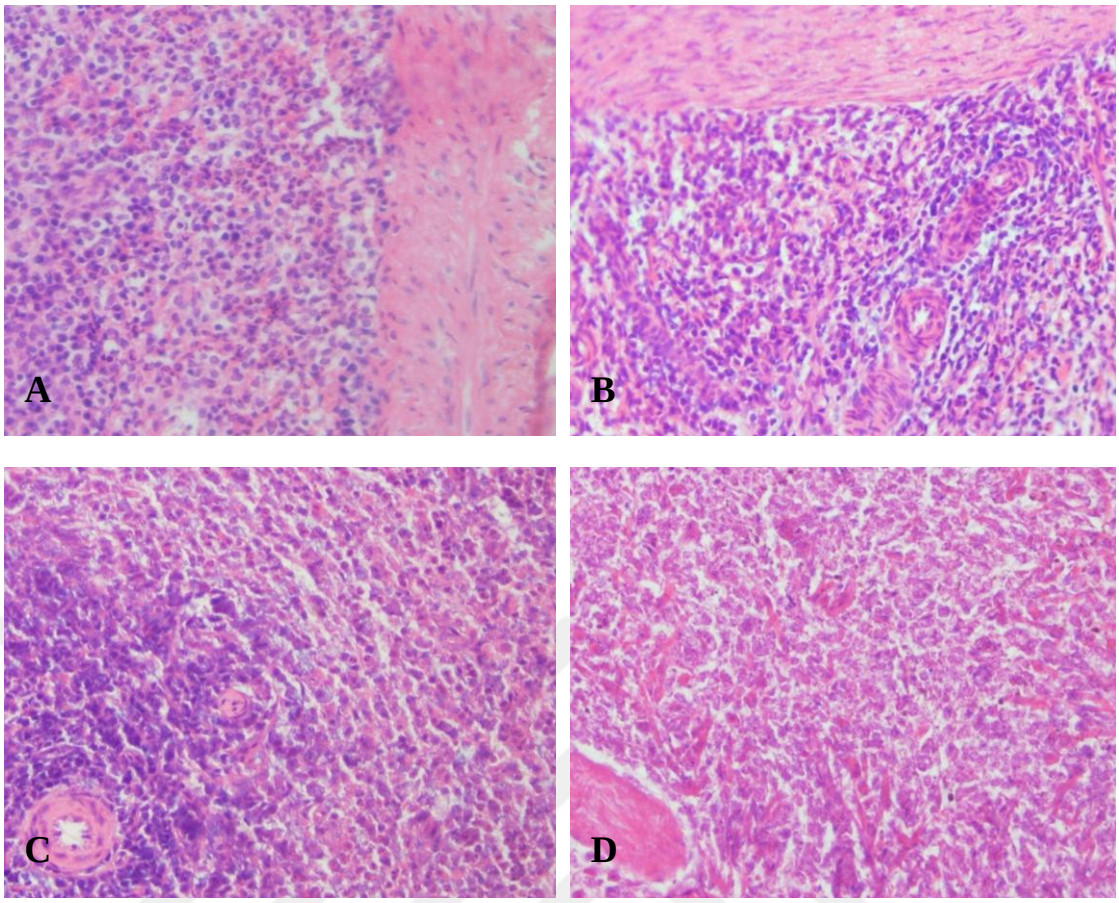
Şekil 3.3. Böbrek, HE. x400.

A. I. grup 3. hayvan. Normal düzeyde bir tespit. Skor değeri 0,
B. VII. grup 3. hayvan. Az Hatalı Tespit. Skor değeri 1,
C. VI. grup 3. hayvan. Yetersiz tespit. Skor değeri 2,
D. III. grup 3. hayvan. Otolitik . Skor değeri 3.



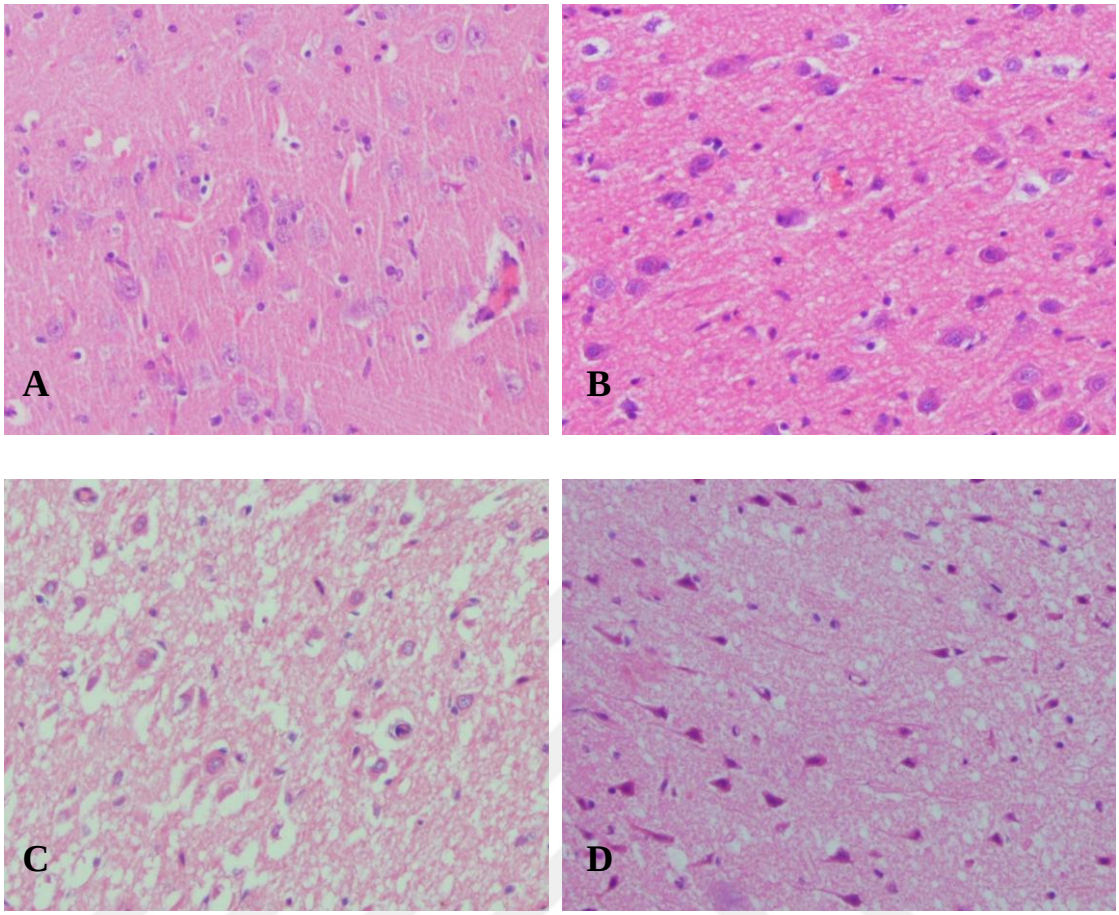
Şekil 3.4. Kalp, HE. x400.

A. I. grup 1. hayvan. Normal düzeyde bir tespit. Skor değeri 0,
B. VI. grup 3. hayvan. Az Hatalı Tespit. Skor değeri 1,
C. IV. grup 1. hayvan. Yetersiz tespit. Skor değeri 2,
D. II. grup 1. hayvan. Otolitik . Skor değeri 3.



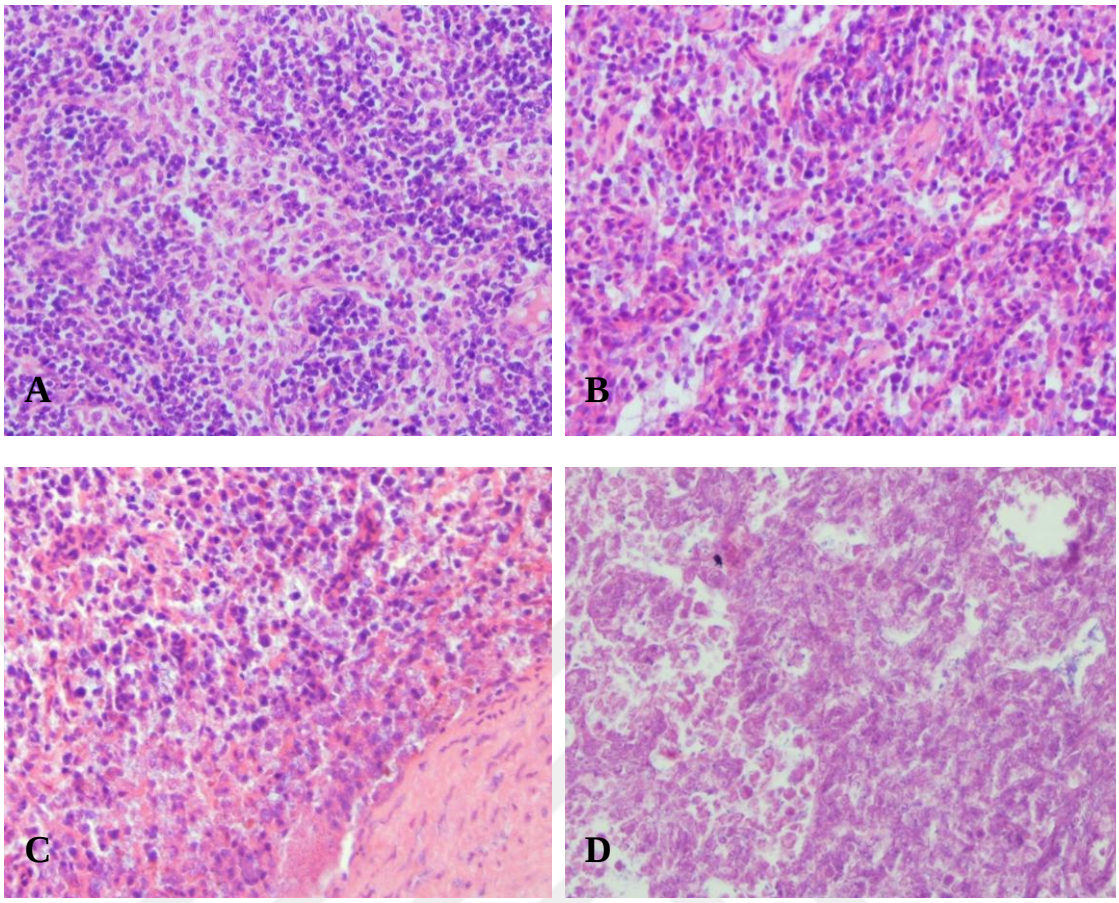
Şekil 3.5. Dalak, HE. x400.

A. I. grup 3. hayvan. Normal düzeyde bir tespit. Skor değeri 0,
B. VII. grup 4. hayvan. Az Hatalı Tespit. Skor değeri 1,
C. V. grup 1. hayvan. Yetersiz tespit. Skor değeri 2,
D. III. grup 3. hayvan. Otolitik . Skor değeri 3.



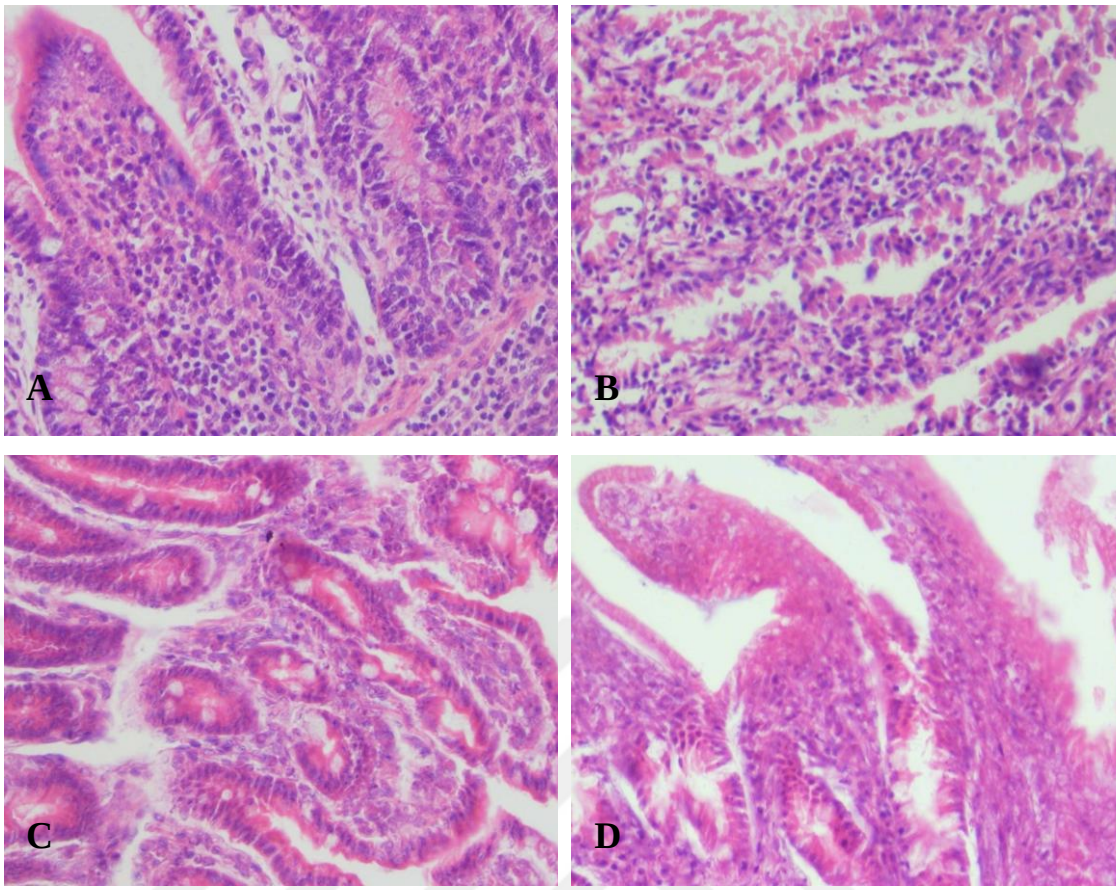
Şekil 3.6. Beyin, HE. x400.

A. I. grup 3. hayvan. Normal düzeyde bir tespit. Skor değeri 0,
B. VII. grup 3. hayvan. Az Hatalı Tespit. Skor değeri 1,
C. V. grup 3. hayvan. Yetersiz tespit. Skor değeri 2,
D. II. grup 3. hayvan. Otolitik . Skor değeri 3.



Şekil 3.7. Lenf düğümü, HE. x400.

A. I. grup 1. hayvan. Normal düzeyde bir tespit. Skor değeri 0,
B. VII. grup 4. hayvan. Az Hatalı Tespit. Skor değeri 1,
C. VI. grup 3. hayvan. Yetersiz tespit. Skor değeri 2,
D. III. grup 1. hayvan. Otolitik. Skor değeri 3.



Şekil 3.8. Sindirim Sistemi Mukozası (Bağırsak), HE. x400.

A. I. grup 1. hayvan. Normal düzeyde bir tespit. Skor değeri 0,
B. VII. grup 5. hayvan. Az Hatalı Tespit. Skor değeri 1,
C. III. grup 1. hayvan. Yetersiz tespit. Skor değeri 2,
D. II. grup 1. hayvan. Otolitik . Skor değeri 3.

4. TARTIŞMA

Nekropside kadavradan alınan doku örnekleri ya da canlıdan alınan biyopsiler bir tespit solüsyonunda tespit edilmezler ise lizozomal enzimlerin ve/veya mikroorganizmaların etkisiyle otolitik değişikliklere uğrar. Böylece hücre ve dokuların yapıları bozulur ve istenmeyen değişiklikler meydana gelir. Hücre ve dokuların mikroskobik incelemelerinin yolu başta iyi bir tespitten geçer. Bu nedenle alınan dokuların hemen tespit solüsyonuna alınıp o andaki halleri ile tespiti yapılmalıdır. Bu maksatla yüzyıllar boyunca çok çeşitli tespit solüsyonları denenmiş ve kullanılmıştır. Daha çok, doku ve hücrelerde proteinler, lipidler, mRNA ve DNA gibi hücresel bileşiklerin kaybını asgari düzeye indirecek ve sitoplazmik membran, endoplazmik retikulum, nüklear membranlar, mitokondri ve lizozom gibi makromoleküllerin yıkımlanmasını önleyerek dokuyu sertleştirecek tespit solüsyonları tercih edilmektedir (Eltoum ve ark. 2001a). Böylece tespit olan bu doku ve hücreler ışık mikroskobik, elekromikroskobik ve immunhistokimyasal metodlarla incelenmektedir. Bu incelemeler sonucu hem tespit olmuş bu doku ve hücrelerin yapısı belirlenmekte, hem de dokularda oluşan değişikliklere ilgili hastalıkların teşhisi yapılabilmekte ve/veya canlının ölüm nedenini belirlenebilmektedir. Bütün bu nedenlerden daima daha iyi, daha kullanışlı tespit solüsyonları arayışlarına yönelik çalışmalar da devam etmektedir.

Günümüzde dokuların tespiti amacıyla birçok kimyasal madde kullanılmakta olup, bunlardan en yaygın kullanılanı formaldehittir. Çünkü formaldehit dokuları iyi tespit edebilen, kolay bulunan ve ucuz bir tespit solüsyonudur. Ancak formaldehit insan sağlığı açısından zararlı olup, gen mutasyonları, kromozomal hatalar, tek zincir kırıkları, kardeş kromatit değiş tokuşu ve hücre değişimlerini kapsayan genotoksik (Casanova ve ark. 1988; Shaham ve ark. 1996), mutajenik, teratojenik, embriyotoksik ve karsinojenik (McLaughlin 1994) etki oluşturmaktadır. Bu önemli yan etkileri nedeniyle formaldehite alternatif olabilecek tespit solüsyonu arayışları da devam etmektedir. Tespit maksadıyla kullanmak üzere üzerinde çalışılan solüsyonlardan bir tanesi de doymuş tuzlu su solüsyonudur (Al-Saraj 2010).

Doymuş tuzlu su solüsyonunun doku tespitindeki rolünün araştırıldığı bu çalışmada dokuların alınmasından hemen sonra formolde tespit edilen kontrol grubu

(Grub I) olgularda hücre sınırları ve çekirdek kromatinlerinin belirgin olduğu, sitoplazmada büzüşmenin, çekirdekte piknozun, eritrositlerde hemolizin olmadığı, ayrıca çizgili kaslarda striasyonun görülebildiği iyi derecede bir tespitin olduğu gözlendi. Bu durum formole eş, yeterli düzeyde bir tespitin olduğunu, tespite yönelik bir sorunun olmadığını ifade etmek için "0" rakamı ile değerlendirildi. Bu durum aynı zamanda çalışmada tespitten boyamaya, preparat haline getirilmeye kadar olan aşamaların uygun bir şekilde yapıldığını da ifade etmektedir.

Çalışmanın II. Grubunda (doymuş tuzlu su solüsyonunda 24 saat oda sıcaklığında yapılan tespit uygulamalarında) kalp hariç alınan bütün organlarda tespitin gerçekleşmediği, otolitik değişikliklerin geliştiği, kalpte ise kısmi bir tespitin gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Bu durum 24 saat boyunca oda sıcaklığında doymuş tuzlu su çözeltisinin bütün organlar için histopatolojik inceleme amaçlı doku tespit solüsyonu olarak kullanılamayacağına işaret etmektedir. Halbuki Al- Saraj (2010) 3 adet tavşanın karaciğer, böbrek ve dalağından alınan doku örnekleri doymuş tuzlu su, formaldehit ve distile su solüsyonunda ayrı ayrı tespit ederek formaldehit ile tuzlu su çözeltisini doku tespiti yönünden kıyasladığı çalışmada tuzlu su çözeltisinin otolizi önlediği, tespit özelliğinin formaldehite benzer olduğu, doku kesitlerinin mikroskobik incelemelerinde histolojik detayların formaldehite yakın düzeyde olduğunu ve zorunlu durumlarda kullanılabileceğini kaydetmiştir. Bahsedilen çalışmada doku tespit durumu sadece tespit oldu veya otolitik olduğu şeklinde bir değerlendirilme yapılmıştır. Bir dokunun tespit durumunun sadece bu şekilde ele alınması yeterli bulunmamalıdır. Çünkü doku tespitleri çok farklı seviyelerde oluşabilmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmada doku tespit düzeyleri 0, 1, 2 ve 3 olmak üzere 4 farklı seviyede değerlendirildi. Böylece dokularda gözlenen farklı seviyelerdeki tespit durumları ortaya konmaya çalışıldı. Al- Saraj (2010) tarafından yapılan çalışmada doymuş tuzlu suda gerçekleştirilen ve yeterli bir tespitin olduğu kaydedilen dokuların mikroskobik resimleri incelendiğinde görülecektir ki tuzlu su tespitlerinde hücreler sadece kaba hatları ile görülebilmekte, çoğu hücrede sitoplazmalar eozinofilik, çekirdek kromatinleri ise seçilememektedir. Halbuki yapılan bu çalışmada benzer seviyedeki tespitlerin skoru 2 olarak, yani tespit histopatolojik değerlendirmeler için yetersiz olarak belirlendi.

Yine aynı konuda Gbadamosi (2014) tespit solüsyonu olarak doymuş tuzlu su (sofra tuzuyla hazırlanan) ve doymuş sodyum klorid, doku olarak da karaciğer ve testisten alınan numuneler kullanarak yaptığı çalışmada her iki solüsyonda da karaciğer örneklerinin yeterli düzeyde tespit olduğunu, testislerden alınan örneklerin ise yeterince tespit edilemediğini kaydederek, doymuş tuzlu su solüsyonunun karaciğer tespitleri için maksimum 48 saat periotta kullanıldığı zaman dokuyu tespit ettiği ve ayrıca daha ucuz ve karsinojenik olmadığı için rutin histolojik prosedüründe kullanılabileceği bildirilmiştir. Gbadamosi (2014) de çalışmasında tespit sonuçlarını sadece tespit yeterli veya otoliz şekillendi şeklinde değerlendirmiş, daha önce de bahsedildiği gibi tespit durumu daha detaylı incelenmeliydi. Ayrıca ilgili çalışmanın karaciğer tespiti bulguları incelendiğinde o bulguların sağlıklı bir histopatolojik incelemeler için uygun olmadığı da anlaşılmaktadır. Çünkü histopatolojik incelemeler dokulardaki patolojik tablonun teşhisine yönelik bir çalışmadır. Bu nedenle hücre sitoplazma ve çekirdeklerindeki, interstistisyel dokulardaki değişiklikler açık ve net olarak gözlenebilmesi gerekir. Bu da öncelikle dokunun iyi tespitini gerektirir. Araştırıcı da bu değerlendirmesinin histoloji laboratuvarı çalışmaları için olduğunu vurgulamıştır.

Çalışmanın III. Grubunda (doymuş tuzlu su solüsyonunda 60 °C etüvde 12 saat tespit uygulamalarında) kalpten alınan dokularda kısmi bir tespitin gerçekleşmiş olmasına karşın diğer organlarda tespitin yeterli düzeyde olmadığı, otolitik değişikliklerin geliştiği anlaşılmaktadır. Bu durum 12 saat boyunca 60 °C etüvde doymuş tuzlu su çözeltisinin kalp hariç çalışmada kullanılan diğer organlar için uygun bir doku tespit solüsyonu olarak kullanılamayacağına işaret etmektedir.

Çalışmanın IV. Grubunda (doymuş tuzlu su solüsyonunda 70 °C su banyosunda 2 saat uygulamalarında) otolitik değişiklikler sadece lenf düğümleri ve dalakta şekillendiği, diğer organlarda ise grup I ve II'ye göre kısmi bir tespitin gerçekleşmiş olduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgulardan ısı uygulamasının tuzlu su solüsyonunun tespit potansiyelini artırdığı, bu konuda farklı süreleri ve farklı ısı seviyelerini içeren yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmanın V. Grubunda (doymuş tuzlu su solüsyonunda 80 °C su banyosunda 1 saat uygulamalarında) ve VI. Grubunda (doymuş tuzlu su

solüsyonunda 90 °C su banyosunda 15 dakika uygulamalarında) genelde yeterli bir tespit elde edilememiştir. Bu durum 70 °C'nin üstü ısı uygulamalarının tuzlu su solüsyonunun tespit potansiyelini artırmadığı, hatta olumsuz yönde etkilediğinin bir göstergesidir.

Çalışmanın VII. Grubunda (önce doymuş tuzlu su solüsyonunda 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat uygulamalarında) kalp ve beyin dokularında formaldehit tespitlerine yakın düzeyde, diğer organlarda ise kısmi bir tespitin gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Elde edilen bu sonuç formaldehit solüsyonunun bulunamadığı durumlarda doku örneklerinin doymuş tuzlu suya alınarak 12 saat içerisinde formaldehit solüsyonuna geçilerek organ ve dokularda gelişebilecek otolitik değişikliklerin önüne geçilebileceğini ifade etmektedir. Yalnız tuzlu sudan formaldehite geçişte dokular önce 15-20 dakika süre ile akansuda yıkanıp tuzun uzaklaştırılması gerekmektedir.

Olszewski ve ark. (2004) deri ve inguinal lenf düğümlerinden alınan doku örneklerinin anhidrid sodyum klorür solüsyonu içerisinde bir hafta ve bir ay süreyle beklettikleri dokular üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda dokuların morfolojik yapılarını ve immunoreaktivitesini koruduğunu kaydetmişlerdir. Derinin otolitik değişikliklerin en geç şekillendiği bir organ olması nedeniyle tuzlu su tespitleri yeterli olabilir. Fakat yapılan bu çalışmada oda sıcaklığındaki doymuş tuzlu su solüsyonlarında lenf düğümü tespitleri yeterli düzeyde değildi. Araştırıcılar da dokuların sadece morfolojik yapılarını koruduklarından bahsetmekte, histopatolojik değerlendirmeleri hakkında bilgi vermemiştir.

Gbadamosi (2014) rat karaciğeri ve testisleri ile yaptığı çalışmada doymuş tuzlu su solüsyonunun doku tespit potansiyeli olduğunu, fakat tespit potansiyelinin organlar arasında farklı düzeyde olduğunu belirterek doymuş tuzlu su solüsyonunun tespit amacıyla kullanılmasına yönelik daha fazla çalışmaların yapılmasının gerekli olduğunu vurgulamıştır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada doymuş tuzlu su solüsyonunda 24 saat oda sıcaklığında, 12 saat 60 °C etüvde, 1 saat 80 °C su banyosunda ve 90 °C su banyosunda 15 dakika tespit uygulamalarında genelde yeterli bir tespit elde edilememiştir. Bunun yanında tuzlu su solüsyonunda 70 °C su banyosunda 2 saat tespit uygulamalarında kısmi tespitler yapılabilmiş, önce doymuş tuzlu su solüsyonunda 12 saat, daha sonra %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat tespit uygulamalarında ise yeterli düzeyde, histopatolojik incelemelerin yapılabileceği, formaldehite yakın tespitler gerçekleşmiştir. Bu çalışmada doymuş tuzlu su solüsyonunun bir tespit potansiyeli olduğu, bunun için de doku tespit özellikleri olan farklı kimyasallarla birlikte veya daha başka metotlarla bu konudaki çalışmaların devam etmesi gerektiği, olumlu sonuçlar alınabileceği kanısına varılmıştır.

Ayrıca formaldehit solüsyonunun bulunamadığı durumlarda doku örneklerinde otolitik değişiklikleri durdurabilmek için geçici olarak doymuş tuzlu suya alınabileceği ve daha sonra formaldehit solüsyonuna alınmasının uygun olacağı anlaşılmıştır.

6.KAYNAKLAR

Al-Saraj A, 2010. Use of saturated sodium chloride solution as a tissue fixative. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 24,1, 53-58.

Baker JR, 1965. The fine structure produced in cells by primary fixatives2. Potassium dichromate. Quart. J. micr. Sci, 106, 1,15-21.

Bullock GR, 1984. The current status of fixation for electron microscopy: a review. Journal of Microscopy, 133,1, 1-15.

Casanova M, Heck HAD, Everitt JI, Harrington WW, Popp JA, 1988. Formaldehyde concentrations in the blood of rhesus monkeys after inhalation exposure. Food Chem Toxicol, 26, 715- 716.

Chowdhury AR, Gautam AK, Patel KG, Trivedi HS, 1992. Steroidogenic inhibition in testicular tissue of formaldehyde exposed rats. Indian J Physiol Pharmacol, 36, 162-168.

Dapson RW, 1993. Fixation for the 1990s: a review of needs and accomplishments. Biotechnology and Histochemistry, 68,75-82.

Demir R, 2001. Histolojik Boyama Teknikleri Başvuru Kitabı, Palme yayıncılık 1.Baskı, s. 1-16

Doenecke D,1978. Digestion of Chromosomal Proteins in Formaldehyde Treated Chromatin. Hoppe-Seyler's Z.Physiol Chem, 359, 2, 1343-1352.

Eltoum LE, Fredenburgh J, Grizzle WE, 2001a. Advanced concepts in fixation: effects of fixation on immunohistochemistry and histochemistry, reversibility of fixation and recovery of proteins, nucleic acids, and other molecules from fixed and processed tissues, special methods of fixation. Journal of Histotechnology, 24, 201-210.

Eltoum I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle W, 200lb. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. Journal of Histotechnology, 24, 173-190.

Ergin Z, 1998. Tuzun Üretim Teknolojisi ve İnsan Sağlığındaki Yeri. Madencilik, 27, 1, s.10-30.

Feron VJ, Bruyntjes JP, Woutersen RA, Immel HR, Appelman LM, 1988. Nasal tumors in rats after short-term exposure to a cytotoxic concentration of formaldehyde. Cancer Lett, 39, 101- 111.

Fox CH, Johnson FB, Whıtıng J, and Roller PP, 1985. Formaldehyde Fixation. 33,8, 845-853.

Gbadamosi MT, 2014. Comparative Study Of The Effect Of Table Salt in 10% Formal Saline And Saturated Sodıum Chloride Solutıon As Tıssue Fixatıves. Master tesis, Department Of Human Anatomy Faculty Of Medıcıne Ahmadu Bello Unıversıty, Zarıa, Nigeria.

Gürel A, Coşkun O, Armutçu F, Kanter M, Ozen OA, 2005. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. J Chem Neuroanat, 29, 173-178.

Hayat MA, 1986. Gluteraldehyde:Role in Electron Microscopy. Micron and Microscopica Acta, 17, 2, 115-135.

Hopwood D, I969. Fixatives and fixation: a review. Histochemical Journal I, l323-360.

Koptagel E, 2016. Işık Mikroskopik Teknikler. Erişim tarihi, 11.03.2016. Erişim adresi, http://tipedu.cumhuriyet.edu.tr/Donem1/DonemI20052006/2006IV/EmelKoptagel/mikroskobik_teknikler.doc/

Kriebel D, Myers D, Cheng M, Woskie S, Cocanour B, 2001. Short term effect of formaldehyde on peak expiratory flow and irritant symptoms. Arch Environ Health, 56, 11-18.

Kuş İ, Zararsız İ, Akpolat N, Ögetürk M, Kuş M. A, Aslan O, Sarsılmaz M, 2008.Deneysel Formaldehit Zehirlenmesinde Omega-3 Yağ Asitlerinin Testislerdeki Antiapopitotik Etkileri: İmmunohistokimyasal Bir Calısma. Fırat Tıp Derg, 13(3), 162-166.

Luna LG, 1968. Manual of histologic staining methods of the armed forces institue of pathology. 3rd ed, Mc Graw-Hill Book Company, p. 32-44.

McLaughlin JK, 1994. Formaldehyde and cancer. A critical review. Int Arch Occup Environ Health, 66, 295-301.

Medawar PB,1941. III.-The Rate Of Penetratiıon Of Fixatives. Journal of the Royal Microscopical Society, 62,1-2, 46-59.

Olszewski WL, Zolich D, Manokaran G, Tripathi MF, 2004. Sodium chloride fixation of tissues under field conditionsin tropical countries. Journal of Immunological Methods, 284, 39– 44.

Ozen OA, Akpolat N, Songur A, Kuş I, Zararsız I, Özaçmak VH, Sarsılmaz M, 2005. Effect of formaldehyde inhalation on Hsp70 in seminiferous tubules of rat testes: an immunohistochemical study. Toxicol Ind Health, 21, 249- 254.

Pabuccuoğlu HU, 2016. Makroskopik Değerlendirme Ve Tespit (Fiksasyon), Erişim tarihi, 11.03.2016. Erişim adresi, www.turkpath.org.tr/file 2_makroskopi_tespit_UP_metin.pdf /

Porter KR ve Kallman F.(1952). The Properties And Effects Of Osmium Tetroxide As A Tissue Fıxative wıth Specıal Reference To Its Use For Electron Microscopy. Experimental Cell Research.4,1,127-141.

Prento P, Lyon H, 1997. Commercial Formalin Substitutes for Histopathology. Biotechnic & Histochemistry, 72, 5, 273-282.

Riemersma JC,1962. Osmium Tetroxide Fixation of Lipids:Nature of the Reaction Products. J Histochem Cytochem, 11, 3, 436-442.

Sabatini DD, Miller F, Barrnett RJ, 1963. Aldehyde Fixation for for Morphological an Enzyme Histochemical Studies with the Electron Microscope. Histochemical Society Symposium Applications of Cytochemistry to Electron Microscopy, 57-71.

Schlink K, Janben K, Nitzsche S, Gebhard S, Hengstler JG, Klein S, Oesch F, 1999. Activity of O6-methylguanine DNA methyltransferase in mononuclear blood cells of formaldehyde-exposed medical students. Arch Toxicol, 73, 15-21.

Shaham J, Bomstein Y, Meltzer A, Kaufman Z. Palma E, Ribak J, 1996. DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde in vitro and in vivo studies. Carcinogenesis, 17, 121- 125.

Tanyolaç A, 1999.Özel Histoloji. Yorum Matbaacılık, s. 15-210.

Thrasher JD, Kilburn KH, 2001. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. Arch Environ Health, 56, 300- 311.

Titford M, 2001. Safety Considerations in the Use of Fixatives, Journal of Histotechnology 24,3, 165-171.

Usanmaz SE, Akarsu ES, Vural N, 2002. Neurotoxic effects of acute and subacute formaldehyde exposures in mice. Envir Toxicol Pharmacol, 11, 93-100.

Ünsaldı E, Çiftçi MK, 2010. Formaldehit, kullanım alanları, risk grubu, zararlı etkileri ve koruyucu önlemler.Yüzüncü yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 21, 1, 71-75.

Zararsiz I, Kus I, Akpolat N, Songur A, Ogeturk M, Sarsilmaz M, 2006. Protective effects of O-3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. Cell Biochem Funct, 24, 237- 244.

8. ÖZGEÇMİŞ

Veteriner Hekim Ümit ÖZDEMİR 1987 yılında Konya'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Konya'da tamamladı. Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2011 yılında mezun oldu. 2011-2012 yılında Gökçeada 5. Alay Komutanlığında Veteriner Hekim Asteğmen rütbesi ile askerlik görevini tamamladı. 2013 yılında Siverek Gıda, Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü'nde göreve başladıktan sonra 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Eğitimine devam eden Veteriner Hekim Ümit ÖZDEMİR Şanlıurfa' da yaşamaktadır.