



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİSTOKİMYASAL BOYAMALAR İÇİN BAL, ETİL ALKOL VE
SİTRİK ASİTTEN OLUŞAN SOLÜSYONUN FİKSATİF
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yasin DEMİRASLAN

DOKTORA TEZİ

VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hakan ÖNER

BURDUR-2024

T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİSTOKİMYASAL BOYAMALAR İÇİN BAL, ETİL ALKOL VE
SİTRİK ASİTTEN OLUŞAN SOLÜSYONUN FİKSATİF
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yasin DEMİRSLAN

DOKTORA TEZİ

VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Hakan ÖNER

Bu Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 0912-DR-23 proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2024

KABUL ve ONAY SAYFASI

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Yasin DEMİRASLAN tarafından **Prof. Dr. Hakan ÖNER** yönetiminde hazırlanan “*Histokimyasal Boyamalar İçin Bal, Etil Alkol ve Sitrik Asitten Oluşan Solüsyonun Fiksatif Etkisinin Araştırılması*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği /oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Tarihi 01/07/2024

Prof. Dr. Emrah SUR
Selçuk Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Başkan

Prof. Dr. Hakan ÖNER
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Jüri

Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ
Erciyes Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Jüri

Prof. Dr. Zafer ÖZYILDIZ
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Jüri

Doç. Dr. Mehmet ÖZBEK
Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Jüri

ONAY

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ... / ... / Tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Doğa TEMİZSOYLU
Müdür
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim-öğretiminin ikincisini yaşadığım bu süreçte destekleyen, tavsiyelerini ve tecrübelerini paylaşan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Hakan ÖNER'e, tezin her adımında yardımlarını her daim hissettiğim Doç. Dr. Mehmet ÖZBEK'e, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın saygıdeğer öğretim üyelerine, doku örneklerinin toplanması ve işlenmesinde desteğini esirgemeyen Öğr. Gör. Harun KARACA ve Doktorant Rüveyda Hilal AKI'ya teşekkür ederim. Doktora tez projemi (0912-DR-23) maddi olarak destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın bu bölümünde ikinci kez doktora öğrenimi süresince manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Kıymetli Eşim Gülnaz DEMİRASLAN'a, kızlarım Zeynep Bilge, Gökçe ve Gülce'ye, bugünlere gelmemde tüm imkanlarını sunan Annem ve Babam'a minnet duygularıyla teşekkür ederim.

ETİK BEYAN

“Histokimyasal Boyamalar İçin Bal, Etil Alkol ve Sitrik Asitten Oluşan Solüsyonun Fiksatif Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Hakan ÖNER danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığımı beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı : Yasin DEMİRASLAN

Tarih :

İmza :

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vi
TABLolar	x
SİMGELEr ve KISALTMALAR	xi
TÜRKÇE ÖZET	xii
İNGİLİZCE ÖZET	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Fiksasyon	3
2.2. Fiksatifler	3
2.2.1. Formaldehit	4
2.2.2. Etanol ve Metanol	6
2.2.3. Bouin'in Fiksatif	7
2.3. Fiksatiflerin Etki Şekilleri	8
2.3.1. Koagüle Edici Fiksatifler	8
2.3.2. Çapraz Bağlayıcı Fiksatifler	8
2.3.3. Bileşik Fiksatifler	8
2.4. Etkili Bir Fiksatifte Aranılan Genel Özellikler	9
2.5. Fiksatif Araştırmalarına Örnekler	9
2.6. Bal	11
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1. Solüsyon	14
3.2. Uygulama	14
3.3. İstatistiksel analiz	15
4. BULGULAR	16
4.1. Beyin	16
4.2. Dil	21
4.3. Parotis	29
4.4. Karaciğer	34
4.5. Pankreas	42
4.6. Böbrek	45
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER

Şekil 4.1. Beyin doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği	17
Şekil 4.2. Beyin doku örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği	17
Şekil 4.3. Beyin doku örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği	18
Şekil 4.4. Beyin doku örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği	18
Şekil 4.5. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen beyin doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	19
Şekil 4.6. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen beyin doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	20
Şekil 4.7. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen beyin doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	21
Şekil 4.8. Dil doku örneklerinde hücre sınırı için kutu grafiği	22
Şekil 4.9. Dil doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği	23
Şekil 4.10. Dil doku örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği	23
Şekil 4.11. Dil doku örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği	24
Şekil 4.12. Dil doku örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği	24
Şekil 4.13. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	25
Şekil 4.14. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri.	25
Şekil 4.15. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri.	26
Şekil 4.16. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	26
Şekil 4.17. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri.	27
Şekil 4.18. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri.	27
Şekil 4.19. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	28
Şekil 4.20. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri.	28

Şekil 4.21. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri.	29
Şekil 4.22. Parotis bezi doku örneklerinde nükleer sınırlar için kutu grafiği	30
Şekil 4.23. Parotis bezi örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği	31
Şekil 4.24. Parotis bezi örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği	31
Şekil 4.25. Parotis bezi örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği	32
Şekil 4.26. Parotis bezi örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği	32
Şekil 4.27. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen parotis bezi doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	33
Şekil 4.28. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen parotis bezi doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	33
Şekil 4.29. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen parotis bezi doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	34
Şekil 4.30. Karaciğer doku örneklerinde hücre sınırları için kutu grafiği	35
Şekil 4.31. Karaciğer doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği	36
Şekil 4.32. Karaciğer doku örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği	36
Şekil 4.33. Karaciğer doku örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği	37
Şekil 4.34. Karaciğer doku örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği	37
Şekil 4.35. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	38
Şekil 4.36. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri.	38
Şekil 4.37. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri.	39
Şekil 4.38. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	39
Şekil 4.39. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri.	40
Şekil 4.40. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri.	40
Şekil 4.41. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	41

Şekil 4.42. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri.	41
Şekil 4.43. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri.	42
Şekil 4.44. Pankreas doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği	43
Şekil 4.45. Pankreas doku örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği	44
Şekil 4.46. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen pankreas doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	44
Şekil 4.47. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen pankreas doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	45
Şekil 4.48. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen pankreas doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	45
Şekil 4.49. Karaciğer doku doku örneklerinde nükleer sınırlar için kutu grafiği	47
Şekil 4.50. Böbrek doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği	47
Şekil 4.51. Böbrek doku örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği	48
Şekil 4.52. Böbrek doku örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği	48
Şekil 4.53. Böbrek doku örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği	49
Şekil 4.54. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	49
Şekil 4.55. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri.	50
Şekil 4.56. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri.	50
Şekil 4.57. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	51
Şekil 4.58. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri.	51
Şekil 4.59. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri.	52
Şekil 4.60. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri.	52
Şekil 4.61. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin	

Masson'un Trichrome boyanma özellikleri.	53
Şekil 4.62. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri.	53



TABLÖLAR

Tablo 4.1. Beyin doku örneklerine ait median ve p değerleri	16
Tablo 4.2. Dil doku örneklerine ait median ve p değerleri	22
Tablo 4.3. Parotis bezi doku örneklerine ait median ve p değerleri	30
Tablo 4.4. Karaciğer doku örneklerine ait median ve p değerleri	35
Tablo 4.5. Pankreas doku örneklerine ait median ve p değerleri	43
Tablo 4.6. Böbrek doku örneklerine ait median ve p değerleri	46
Tablo 4.7. Doku örneklerinin Masson'un Trichrome boyaması sonucunu gösteren istatistiksel veriler	54
Tablo 4.8. Doku örneklerinin PAS boyaması sonucunu gösteren istatistiksel veriler	55
Tablo 5.1. Balın fiksatif olarak araştırıldığı bazı çalışmalar	61

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
BM	Birleşmiş Milletler
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EAEVE	European Association of Establishments for Veterinary Education (Avrupa Veteriner Eğitim Kurumları Birliği)
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
g	Gram
IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
UN	Union Nation (Birleşmiş Milletler)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
µL	Mikrolitre
µm	Mikrogram

ÖZET

Histokimyasal Boyamalar İçin Bal, Etil Alkol ve Sitrik Asitten Oluşan Solüsyonun Fiksatif Etkisinin Araştırılması

Çevre, insan ve hayvan sağlığı için zararlı etkileri tespit edilen formaldehite alternatif bir kimyasalın keşfedilmesi için birçok bilimsel araştırma yürütülmüştür. Bu çalışmanın amacı değişen oranlarda bal, etil alkol ve sitrik asitten oluşan solüsyonların histolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan histokimyasal boyamalar için etkili bir alternatif fiksatif olup olamayacağını araştırmaktır. Çalışmada farklı oranlarda bal, etil alkol ve sitrik asitten oluşan solüsyonlar deneme grubu, formol ve Bouin solüsyonları ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Dokular cinsiyet farkı gözetmeden 10 adet Wistar Albino sıçanın beyin, dil, parotis bezi, karaciğer, pankreas ve böbreklerinden alındı. Örnekler deneme ve formol gruplarında 24, 48 ve 72 saat tespit edildi. Bouin solüsyonunda ise tespit süresi 24 saat olarak belirlendi. Histolojik kalitenin değerlendirilmesi için dokulardan alınan kesitlere hematoksilin-eozin, PAS (Periodic Acid Schiff) ve Masson'un Trichrome boyaması yapıldı. Hazırlanan kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirildi ve mikroskoba entegre digital kamerayla fotoğraflar çekildi. Çalışmada elde edilen skorlar istatistiksel olarak analiz edildi. Sonuç olarak çalışmamızda bal, etanol ve sitrik asitten oluşan solüsyonun yaygın kullanılan fiksatiflere alternatif olabileceği ile ilgili bulgular elde edildi. Özellikle %40 bal içeren solüsyonun standardize edildiği takdirde bu yönde bir adım önde olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Alkol, Bal, Bouin, Fiksasyon, Formaldehit, Histokimya

ABSTRACT

Investigation of the Fixative Effect of a Solution consisting of Honey, Ethyl Alcohol and Citric Acid for Histochemical Staining

Many scientific researches have been carried out to discover an alternative chemical to formaldehyde, which has been found to have harmful effects on the environment, human and animal health. The aim of this study was to investigate whether solutions of varying ratios of honey, ethyl alcohol and citric acid can be an effective alternative fixative for histochemical staining, which is frequently used in histological research. In the study, solutions of honey, ethyl alcohol and citric acid in different ratios were used as experimental groups and formol and Bouin solutions were used as control groups. Tissues were obtained from the brain, tongue, parotid gland, liver, pancreas and kidneys of 10 Wistar Albino rats regardless of sex. The samples were fixed in the test and formol groups for 24, 48 and 72 hours. In Bouin solution, the fixation time was determined as 24 hours. For the evaluation of histological quality, hematoxylin-eosin, PAS (Periodic Acid Schiff) and Masson's Trichrome staining were performed on the sections taken from the tissues. The sections were evaluated under a light microscope and photographs were taken with a digital camera integrated into the microscope. The scores obtained in the study were statistically analyzed. In conclusion, our study showed that a solution consisting of honey, ethanol and citric acid can be an alternative to commonly used fixatives. Especially if the solution containing 40% honey is standardized, it is thought to be one step ahead in this direction.

Keywords: Alcohol, Bouin, Fixation, Formaldehyde, Histochemistry, Honey

1. GİRİŞ

Dokuların mikroskopik düzeyde incelenmesi için temel adımlardan bir tanesi tespittir. Tespit için en çok kimyasal fiksatifler tercih edilir. Histolojik ya da histopatolojik doku takibi süreçlerinde, dokuların tespit edilmesinde en sık kullanılan fiksatifler ise %10 formol ve formaldehit içeriğine de sahip Bouin solüsyonlarıdır. Formaldehit renksiz, keskin kokulu ve sağlığa zararlı olduğu kanıtlanmış bir aldehittir (Brenner, 2014; Hayashi ve ark., 2014). Bu kimyasalın rutin olarak kullanılması sonucunda, formaldehite doğrudan maruz kalan kişilerde sinir ve solunum sistemi rahatsızlıklarının ortaya çıktığı bilinmektedir (Wantke ve ark., 2000; Brenner, 2014).

ABD Çevre Koruma Ajansı formaldehiti alışılmadık derecede yüksek veya uzun süreli maruziyet koşulları altında olası bir insan kanserojeni olarak sınıflandırmıştır (EPA, 1989). Bundan birkaç yıl sonra izin verilen maruziyet seviyesi 1 ppm'den 0.75 ppm'ye (ortalama günlük maruziyet) düşürülmüştür (OSHA, 1992). Bu gelişmeyi takiben de teknisyenlere ve patolojlara formaldehit maruziyetinin potansiyel toksisitesi vurgulanırken, alternatif fiksatiflerin araştırılması teşvik edilmiştir (Zanini ve ark., 2012).

Formolün düşük maliyeti, marka ikame ürünlere göre daha ucuz olması ve ayrıca piyasada birçok tedarikçi tarafından ve farklı uygun formatlarda hazır bulunması, alternatiflerin yayılmasını ve araştırılmasını engellemiştir. Formol fiksasyonunun dolaylı maliyetleri (örneğin: kullanılmış fiksatif ve fikse numunelerin uygun şekilde imha edilmesi; artık numunelerin yakılmasından kaynaklanan ürünlerin potansiyel toksisitesi ve davlumbazlar ile aspire edilmiş kabinler gibi aspirasyon cihazlarının kusursuz bakımının zorunlu gerekliliği) de dikkate alınmalıdır. Ayrıca, bir insan kanserojenine maruz kalan işçilerin yeterli sağlık gözetiminin gerekliliği de ek ve önemsiz olmayan bir ekonomik maliyet olarak düşünülmemelidir (Zanini ve ark., 2012).

Çevre, insan ve hayvan sağlığı için zararlı etkileri tespit edilen formaldehite alternatif bir kimyasalın keşfedilmesi için birçok bilimsel araştırma yürütülmüştür. Bu araştırmalar içerisinde doğal, sağlığa zararı olmayan ve kolay bulunabilen balın kullanılması dikkat çekicidir. Bal asidik pH derecesine sahip, yoğun şeker içerikli bir arı ürünüdür. Tezin amacı ise değişen oranlarda bal, etil alkol ve sitrik asitten oluşan

solüsyonların histolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan histokimyasal boyamalar için etkili bir alternatif fiksatif olup olamayacağını araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fiksasyon

Fiksasyon “otolizi önlemek, bakteriostatik etki oluşturmak, bu sayede dokunun korunmasını sağlamak” olarak tanımlanabilir (Bibbo, 1997; Woods ve Ellis, 1994). Dolayısıyla fiksasyon doku üzerinde kimyasal stabilite sağlayarak dokuyu bölümlere ayırmak için sertleştirir ve en önemlisi de otoliz ile bozulmayı (degradasyon) durdurur (Hewitson ve Darby, 2010). Fiksasyon, histopatolojik uygulamalarda doku örneklerinin incelenmesi ve saklanması için zorunlu bir adımdır. Bu işlem, hücre, ekstraselüler matriks unsurları ve diğer biyoaktif kısımların meydana getirdiği dokusal mimariyi korumalıdır (Bancroft ve Stevens, 2008). Fiksasyon, hücresel morfolojiyi mükemmel şekilde koruyabilen ancak, örnek bileşimini değiştirmeyen, kademeli ve karmaşık bir fizikokimyasal süreçtir. Bu açıdan farklı histopatolojik süreçler için belirli bir fiksatifin seçimi genellikle çoklu odaklanmayı gerektirir (Culling ve ark., 1985).

Dokuların mikroskopik olarak incelenmesi için fiksasyon temel adım olduğundan sonraki doku takibi süreçlerini doğrudan etkiler (Kiernan, 2008). Doku örnekleri fiziksel veya kimyasal yöntemlerle tespit edilebilir (Grizzle ve ark., 2008). Kimyasal fiksasyon metodunda dokuların “fiksatif” adı verilen kimyasal maddeler kullanılarak tespiti esastır. Bu metoda histopatoloji uygulamalarında sıkça başvurulur (Huang ve Yeung, 2015). Fiksatiflerin dokuya uygulanışı immersiyon (daldırma) ve perfüzyon (dolaşım yoluyla) olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir (Hewitson ve Darby, 2010).

2.2. Fiksatifler

Histopatolojik süreçlerde optimum faydayı sağlamak amacıyla geçmişten günümüze birçok fiksatif geliştirilmiştir. Bu fiksatifler bazen tek başına bir kimyasal bileşik olabildiği gibi, bazen de farklı kimyasalların karışımıyla oluşan birer çözelti olarak uygulanmıştır. Günümüzde sıklıkla kullanılan fiksatif formaldehittir. Bunun yanında etanol, Carnoy çözeltisi, Bouin ve B5 çözeltileri de histolojik araştırmalarda sıklıkla tercih edilen fiksatiflerdir. Ancak yeni histolojik teknikler, mevcut fiksatifleri

geliştirme ya da daha etkili fiksatif keşfetme arayışlarını beraberinde getirmektedir (Pabuçcuoğlu, 2021).

Fiksasyon için kullanılan kimyasallar genel olarak aldehitler, oksitleyici ajanlar, alkol bazlı fiksatifler ve metalik fiksatifler olmak üzere 4 grupta sınıflandırılabilir. Aldehitler (formaldehit, gluteraldehit vs.) ve oksitleyici ajanlar (osmiyum tetraoksit, potasyum permanganat) proteinleri çapraz bağlayarak dokuyu tespit eder. Alkol bazlı fiksatifler (metil alkol, etil alkol, asetik asit vs.) proteinleri denatüre edici ajanlardır. Metalik fiksatifler ise (cıva klorür, pikrik asit vs.) çözünmeyen metalik çökeltiler oluşturarak dokunun fiksasyonuna katkı sağlayan maddelerdir (Grizzle ve ark., 2008). Aşağıda çalışmada kullanılan fiksatiflerle ilgili bilgiler verilmiştir.

2.2.1. Formaldehit

Formaldehitin keşfi 1859'da Butlerov tarafından gerçekleştirilmiştir. 1889'da Ttrillat, ticari anlamda reaktif olarak formaldehit üreten ilk kişidir. Bu kimyasalın fiksatif olarak kullanılabileceğini ise 1892'de Ferdinand Blum öne sürmüştür (Fox ve ark., 1985; Al- Saraj 2010). Formaldehit renksiz, keskin kokulu, suda çok iyi çözünen bir aldehittir. Bu sıvı reaktif bir maddedir ve oda sıcaklığı koşullarında gaz haline geçer. Formaldehit yaygın bir fiksatif olarak kabul edilse de dokuları sertleştirip kurutması, gri bir renk tonu vermesi ve irrite edici kokusu nedeniyle “mükemmel solüsyon” olmaktan uzaktır (Brenner, 2014; Hayashi ve ark., 2014).

Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC), 2006 yılında formaldehiti insanlar için kanserojen olan maddeler grubunda sınıflandırmıştır. Formaldehite sürekli maruz kalan anatomist, patolog, histolog veya diğer meslek gruplarındaki kişilerde nazofarinks, kan, kolon ve beyin kanserleri sayısı, diğer meslek gruplarına göre belirgin şekilde fazladır (IARC, 2006). Formaldehit, 98/8/EC sayılı Biyosidal Ürünler Direktifine göre kadavra tespitinde kullanılmaması öğütlenen bir kimyasaldır (Avrupa Parlamentosu ve Konseyi, 1998). Almanya'da formaldehitin zararlı etkileri nedeniyle havalandırması “Zararlı maddeler yönetmeliğine uygun olmayan” birçok

anatomi laboratuvarı, koşullar uygun hale getirilene kadar geçici olarak kapatılmıştır (Hammer ve ark., 2012).

Fiksasyonda sıkça kullanılan formolün doku örneğine penetrasyonu afizik bir süreçtir (Grizzle ve ark., 2008). Formaldehit proteinlerin çapraz bağlanmasını sağlayarak metilen köprüleri oluşturur (Hewitson ve ark., 2010). Formaldehit, proteinlerle olduğu kadar nükleik asitlerle de reaksiyona girer ve nükleik asitler ile proteinler arasında nüfuz ederek “stabilize nükleik asit-protein kompleksi kabuğu” oluşturur (McGhee ve von Hippel, 1975; Chang ve Loew, 1994). Bu fiksatif pıhtılaşma etkisiyle değil, bazik amino asitlerin, özellikle lizin yan zincirlerine ve peptit bağlantılarının amid nitrojen atomlarına eklenerek tespit eder (Nowacek, 2010). Formaldehit bu reaksiyonları reaktif hipoksi metil gruplarını oluşturmak için yapar (Prophet, 1992). Doymamış yağlar ve kalsiyum iyonlarının varlığı formaldehit reaksiyonun indükleyicisidir. Buna rağmen formaldehit karbonhidratlarla reaksiyona girmeme eğilimi gösterir (Eltoum ve ark., 2001b). Formaldehit su, alkol ve eterde iyi çözünür. Bu kimyasal bileşik birçok madde ile birleşerek polimerleşme kabiliyetine de sahiptir (Demir, 2001).

Histolojik araştırmalarda en sık tercih edilen fiksatif olan formolün suyla on kat seyreltilmesi sonucunda elde edilen %10'luk çözeltidir. Bu çözelti aslında %4 sulu formaldehit çözeltisidir (Nowacek, 2010). Formaldehit kompleks lipidler için iyi bir fiksatifken, nötral lipidler üzerine etkisizdir (Demir 2001). Ayrıca bu bileşik karbonhidratların fiksasyonunda da tercih edilmez (Demir, 2001; Albert ve Johnson, 1998).

Formol uygun ortamlarda saklanmadığında asiditesi artar. Bu nedenle formol çözeltisinin kullanım öncesi pH'sı magnezyum karbonat, kalsiyum karbonat, fosfat veya tris gibi nötralize edici tamponlarla yaklaşık 7 değerine ayarlanabilir (Pabuççuoğlu, 2021). Bu şekilde hazırlanan çözeltilere de “nötr tamponlu formol” adı verilir (Nowacek, 2010).

Formol fiksasyon için her ne kadar sıklıkla kullanılsa da insan sağlığına yönelik dikkat çekici nitelikte zararları vardır. Bu zararlar literatür eşliğinde aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- ✓ Formole maruz kalan kişileri de cilt tahrişi, göz yanması, baş ağrısı, solunum sistemi tahrişi ve uzun süreli soluma sonrasında baş dönmesi ve burun kanaması gibi rahatsızlıklar görülür (Wantke ve ark., 2000; Brenner, 2014).
- ✓ Formol genotoksik etkiden dolayı kromozomal hatalara, kardeş kromatit transferine ve gen mutasyonlarına yol açar (Casanova ve ark. 1988; Shaham ve ark. 1996).
- ✓ Formole uzun süre maruz kalındığı durumlarda karsinogenik, mutajenik, teratojenik ve embriyotoksik etkilerle karşılaşılabilineceği bildirilmiştir (McLaughlin 1994).
- ✓ Formolün karsinogenik etkisinin özellikle solunum, sinir ve sindirim sistemini hedeflediği ifade edilmiştir (Usanmaz ve ark. 2002; Zararsız ve ark. 2006).
- ✓ Formole uzun süre maruz kalan kişilerde beyin, kolon ve kan dokusu ile ilgili kanserlerin daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (Schlink ve ark. 1999).
- ✓ Formolün tubuli seminiferi contorti'deki germ hücreleri üzerinde dejeneratif etki yaparak kısırlığa ve/veya spermatozoa kalitesinde düşüklüğe sebep olduğu bildirilmiştir (Özen ve ark. 2005).
- ✓ Formolün 0.5 ppm gibi küçük konsantrasyonlarda bile solunum sistemi toksisitesi oluşturduğu ifade edilmiştir (Kriebel ve ark. 2001).
- ✓ Formole uzun süre maruz kalındığında duygu-durum bozuklukları, davranış bozuklukları ve epilepsi gibi kalıcı nörotoksisite belirtilerinin gelişebileceği rapor edilmiştir (Gürel ve ark.2005, Zararsız ve ark. 2006).

2.2.2. Etanol ve Metanol

Etanol ve metanol için fiksasyon sırasıyla %50 ila 60 konsantrasyonda ve %80'den fazla konsantrasyonda başlar. Bu fiksatifler protein denatürasyonuna ve dehidrasyona neden olur. Alkol türevi fiksatifler hidrojen ve hidrofobik bağlanmada kesinti yapar. Tek başına primer fiksasyon olarak kullanılan etanol, sitoplazmik ve çekirdek ayrıntılarının hatalı gösterilmesine neden olsa da (Leong, 1994; Lillie ve

Fullmer, 1976) bazen glikojenin etkili bir şekilde korunması için kullanılabilir (Leong, 1994; Lillie ve Fullmer, 1976; Demir, 2001). Metanol ise daha çok kan veya sitolojik yayma preparatların fiksasyonu için kullanılır (Leong, 1994; Lillie ve Fullmer, 1976).

Etanolün %70'lik konsantrasyonu formol ve benzeri fiksatiflerle tespit edilen ve akarsuda yıkanan dokuların dehidrasyonu için kullanılır (Demir, 2001; Pabuççuoğlu, 2021). Bunun yanında içerisinde suda eriyebilecek yapıların bulunduğu doku örnekleri absol alkolde tespit edilir (Ünsaldı ve Çiftçi, 2010).

2.2.3. Bouin'in Fiksatif

Bouin'in fiksatif ilk olarak 19. yüzyılın sonlarında Pol Andre Bouin tarafından tanımlanmıştır (Baker, 1958). Bu fiksatif pikrik asit (doymuş %2,1'lik çözeltiden 75 mL), asetik asit (5 mL) ve formaldehitten (%40'lık 25 mL) oluşur (Hewitson ve Darby, 2010) ve proteinler üzerinde hem koagülatif hem de çapraz bağlama etkisine sahiptir (Baker, 1958). İçeriğindeki pikrik asit dokuya yavaşça penetre olarak proteinleri koagüle eder (Tu ve ark., 2011). Pikrik asit doku örneklerini sarıya boyar. Cıva klorür gibi pikrik asit de özellikle asidik boyamalardan sonra preparatlarda lekelenme oluşturur (Nowacek, 2010). Bu lekelenmeler ve sarı renk doku örneklerinin %50'lik ve %70'lik alkol serilerinden geçirilmesiyle giderilebilir (Eltoum ve ark 2001a). Asetik asit ise nispeten hızlı penetre olur ve pikrik asidin neden olduğu doku büzülmesine karşı koyar. Fiksatifin diğer bir bileşeni olan formaldehit ise proteinler arasında çapraz bağlar oluşturarak etki eder (Baker, 1958).

Bouin fiksatif özellikle yumuşak ve hassas dokular (beyin ve embriyolar gibi) ile küçük doku parçaları için sıkça tercih edilir (Ananthanarayanan ve ark., 2005; Hewitson ve Darby, 2010). Glikojen ve çekirdek için iyi bir koruyucudur, ancak yavaşça penetre olmasından dolayı böbrek dokusu ve mitokondri için elverişsizdir (Latendresse ve ark., 2002; Ananthanarayanan ve ark., 2005; Hewitson ve Darby, 2010). Bu fiksatif eritrositleri parçalar. Bouin'in fiksatif patlayıcı olduğundan dolayı dikkatli çalışılması gereken bir kimyasaldır (Kiernan, 2015).

2.3. Fiksatiflerin Etki Şekilleri

Fiksasyon amacıyla kullanılan kimyasal bileşikler farklı etkiler oluşturarak dokuları korur. Bu amaçla kullanılan fiksatifler koagüle edici, çapraz bağlayıcı ve bileşik fiksatifler olmak üzere üç grupta sınıflandırılabilir (Baker, 1958; Bancroft ve Stevens, 2008). Bunun yanında bazı fiksatifler hem koagüle edicidir hem de değildir. Buna örnek olarak asetik asitin çekirdek kromatinini koagüle edip, diğer proteinleri koagüle etmemesi örnek verilebilir (Nowacek, 2010).

2.3.1. Koagüle Edici Fiksatifler

Koagüle edici organik ya da inorganik fiksatifler dokudaki proteinleri pıhtılaştırarak suda çözünmesini engeller. Bu fiksatifler kollajen veya lipoproteinlerin yapılarını muhafaza eder. Buna rağmen koagüle edici fiksatiflerin sitoplazmik presipitasyona ve dolayısıyla mitokondrium ve salgı granüllerinin istenmeyen şekilde tespitine yol açması dezavantajdır (Lillie ve Fullmer, 1976; Grizzle ve ark., 2008). Koagülasyon özelliği nedeniyle en çok tercih edilen fiksatifler metanol, etanol, aseton, pikrik asit ve trikloroasetik asittir (Lillie ve Fullmer, 1976).

2.3.2. Çapraz Bağlayıcı Fiksatifler

Çapraz bağlayıcı fiksatifler protein veya nükleik asit düzeyinde çapraz bağlar kurarak fiksatif etki oluşturan kimyasallardır (Grizzle ve ark., 2008). En iyi çapraz bağlanma ile fiksasyon oluşturan kimyasallara örnek olarak formaldehit ile gluteraldehit verilebilir (Eltoum ve ark., 2001a). Çapraz bağlayıcı fiksasyon etkisi dolayısıyla en çok tercih edilen fiksatifler ise formaldehit, gluteraldehit, osmiyum tetraoksit, merkürük klorür ve civa klorürdür (Bancroft, 1990).

2.3.3. Bileşik Fiksatifler

Bileşik fiksatifler koagüle edici veya çapraz bağlayıcı özellikleri bilinen kimyasalların farklı oranlarda karıştırılarak oluşturulan ve çözelti şeklinde kullanılan fiksatiflerdir (Baker, 1958). Bu fiksatifler farklı kimyasalların en iyi özelliklerini

birleştirmek ve bunu fiksasyon işlemine yansıtmak amacıyla geliştirilmiştir (Nowacek, 2010).

2.4. Etkili Bir Fiksatifte Aranılan Genel Özellikler

Fiksatiflerin çalışma prensibi, hücresel ve hücre dışı bileşenleri in vivo olarak doku yapısına mümkün olduğunca yakın tutmak (Bancroft ve Gamble, 2019) ve moleküler kaybı önleyip dokunun yapısal özelliklerini korumak üzerinedir (Gbadamosi, 2014). Bu nedenle fiksatif özellikteki kimyasallar, doku ve hücrelerin protein, lipid, mRNA ile DNA gibi temel yapı taşlarının korunmasını sağlarken, plazmalemma, endoplazma retikulumu, çekirdek zarı, mitokondrium gibi makroünitelerin parçalanmasını engellemelidir. Ayrıca etkili fiksatifler doku örneklerindeki enzim ve mikroorganizma aktivitesini durdurarak otolizin önüne geçmeli ve hem proteinlerin kendi aralarında hem de protein-nükleik asit arasında çapraz bağlar oluşturarak bu yapıları çözünmez hale getirmelidir (Eltoum ve ark., 2001a). Bunun yanında etkili bir fiksatif doku örneğinde herhangi bir bulaşıcı antijen varlığını yok etmek ve araştırmacıyı korumak üzere güçlü bir dezenfektan özelliğinde de olmalıdır (Titford, 2001; Eltoum ve ark., 2001b). Etkili bir fiksatifte aranılan bir başka özellik ise dokuyu belli derecede sertleştirmesidir. Böylece dokulardan istenilen incelikte kesitler alınabilir (Ünsaldı ve Çiftçi, 2010).

Bugüne kadar tüm özellikleri bakımından ideal bir fiksatif bulunamamıştır. Çünkü mevcut fiksasyon yöntemleri ve fiksatifler sağlık risklerinin yanında dokuda büzülme, şişme, sertleşme ve renk değişimi gibi artefaktlar üreterek farklı derecede dezavantajlara sahiptir (Bancroft ve Gamble, 2019). Bu sorunlar nedeniyle, belirli bir fiksatifin seçimi genellikle iyi bir hedef belirlemeyi ve dikkatli olmayı gerektirir (Fox ve ark., 1985; Hewitt ve ark., 2008).

2.5. Fiksatif Araştırmalarına Örnekler

Formolün dezavantajları nedeniyle, daha güvenli bir alternatif fiksatif bulma arayışı araştırmacıların ilgi duyduğu bir konu olmuştur (Clark, 1983). Fiksasyonu

etkili bir şekilde gerçekleştirmek için uzun yıllar boyunca birçok fiksatif denenmiş ve etkileri bildirilmiştir (Gbadamosi 2014; Howat ve Wilson, 2014).

Formol fiksativi 150 yıldır kullanılmakta ve fiksasyon ortak bir fikir birliğini temsil etmektedir (Plenat ve ark., 2001). Bu fiksatif çoğu dokunun morfolojisini, antijenitesini ve moleküler özelliklerini korumak için yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte, bazı antijen, karbonhidrat, lipit ve nükleik asitlerin fiksasyonu için bir takım negatif yönlere sahiptir (Gatta ve ark., 2012). Formolün yaygın kullanım nedenleri ise düşük maliyet, basit laboratuvar hazırlık prosedürü, uzun süredir devam eden gelenek ve uluslararası kullanım şeklinde sıralanabilir (Zanini ve ark., 2012).

Zanini ve ark (2012) çalışmasında bazı doku örnekleri üzerinde farklı fiksatiflerin etkisini karşılaştırmıştır. Çalışmaya göre çinko tuzları ve etil alkol, hemoglobin ve miyogloblin gibi solunum enzimlerini ve oksijen taşıyıcı proteinleri değiştirmemektedir. Bu da renk solmasının (dokular üzerindeki formolün neden olduğu gibi) bu kimyasal bileşikler tarafından indüklenmediğini ve özellikle Z7 ile mükemmel şekilde korunduğunu göstermektedir (Zanini ve ark., 2012). Zanini ve ark. (2012) çalışmasında mikrobiyel varlığı da araştırmış ve sadece ZBF fiksasyonunda birkaç kez yüzeysel küfe rastlamıştır. Sonuç olarak bu çalışmada çinko bazlı fiksatifler, alkol-tansioaktif bazlı ve önemli bileşenler olarak asetik asit ve alkol içeren formüller veya glioksal kullanımının genel fiksasyon için uygun görüldüğünü ve formole etkili alternatifler olabileceklerini bildirmiştir (Zanini ve ark., 2012).

Nitratlar gıdanın şeklini ve yapısını koruma kapasitesine sahip olduğundan histoloji alanındaki kullanıma olasılıkları araştırılmıştır. Samuel ve Gheena (2017) sodyum nitratı bir fiksatif olarak denemiştir. Bu çalışmada sodyum nitrit tozu 30, 35, 40, 45 ve 50g şeklinde değişen konsantrasyonlarda 100 ml distile su içinde karıştırılmıştır. Çalışma sonucunda 45g sodyum nitrit konsantrasyonun fiksasyon için en uygunu olduğu kanısına varılmıştır. Bu bileşik ile maksimum başarı oranına ulaşmak için kullanılan dokunun boyutunun biraz daha büyük olmasına dikkat edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Samuel ve Gheena, 2017).

Gatta ve ark. (2012) çalışmasında farklı fiksatifleri alternatif oluşturma adına karşılaştırmıştır. Bu amaçla çalışmada formol, Greenfix, CyMol, UPM, Bouin ve

Hollande fiksatifleri kullanılmıştır. Gatta ve ark. (2012) çalışmasında histokimyasal olarak Hematoksilen-Eozin (H&E), Alcian-mavi (pH 2.5), Periyodik Asit Schiff (PAS), Masson'un Trichrome ve Demir Diamine boyama protokollerini uygulamıştır. Sonuç olarak Gatta ve ark. (2012) histokimyasal analizlerle ilgili olarak Greenfix'in formol için uygulanabilir bir alternatif olduğunu, UPM, Bouin, Hollande ve CyMol'un kabul edilebilir sonuçlar verdiğini belirtmiştir.

Türkmen ve ark. (2017) çalışmasında borik asitin formolle tespit edilmiş kas dokuları üzerindeki koruyucu etkilerini belirlemeye yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada %10 formol ile bir hafta fikse edilmiş kas dokuları %0.1, %0.2, %0.4, %5, %20 borik asit, %0.9 tuzlu su ve %10 formolde oda sıcaklığında 7 ay boyunca saklanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada (Türkmen ve ark., 2017) borik asidin yüksek konsantrasyonunun çizgili kas dokusu üzerinde korozif etkilerinin olduğu, düşük konsantrasyonunun ise mikroorganizmaların çoğalmasına ve proteolizine karşı herhangi bir koruyucu etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

2.6. Bal

Codex Alimentarius'a göre “Bal, bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitkilerin canlı kısımlarındaki emici böceklerin salgılarından üretilen nektarın bal arıları tarafından toplanması ve dönüştürülmesiyle ortaya çıkan doğal tatlı maddedir. Arıları bu nektarı kendilerine ait belirli maddelerle birleştirerek, biriktirir, kurutur, saklar ve peteklerde olgunlaşması için bırakır (Johnson ve Jadon, 2010). Bu bakımdan bal, şekerler ve diğer bileşiklerin bir karışımıdır. Bal krisin, pinobanksin, C vitamini, katalaz ve pinocembrin dahil olmak üzere birçok bileşik içerir (Johnson ve Jadon, 2010; Patil ve ark., 2013).

Balın antimikrobiyel özellikleri insanlar tarafından yüzyıllardır bilinir (Halawani ve Shohayeb, 2011; Al-Somai ve ark., 1994). Araştırmalarda (Al-Waili ve ark., 2011; Jenkins ve ark., 2011) balın yaklaşık 60 tür bakteriyi etkileyebildiği rapor edilmiştir. Ayrıca balın bazı mayalarda, Aspergillus ile Penicillium türlerinde, yaygın dermatofitlerde antifungal etkisi literatüre yansımıştır (Brady ve ark., 1997). Yakın tarihte de araştırmacılar balın antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve ayrıca ısıtılmamış

balın geniş spektrumlu bir antibakteriyel etki oluşturduğu vurgulanmıştır (Lusby ve ark., 2005). Balın antibakteriyel etkisi yüksek ozmolarite, düşük pH, hidrojen peroksit içeriği ve metilgliyoksal gibi peroksit olmayan fitokimyasal bileşenlerin varlığından kaynaklanır (Weston, 2000; Mavric ve ark., 2008). Bu etki aynı zamanda glikonik asit varlığından da artar (Khan ve ark., 2007). Bir çalışma hidrojen peroksit, metilgliyoksal ve arı defensin-I'in balın bakterisidal aktivitesinde rol oynayan faktörler olduğunu rapor etmiştir (Kwakman ve ark., 2010). Ayrıca balın antimikrobiyel etkisine katalaz, antioksidanlar (Gheldof ve ark., 2002; Schramm ve ark., 2003), lizozim, polifenoller, fenolik asitler, flavonoidler, arı peptitleri (abaesin, defensin-1, apidaesin, ve hymenoptaesin) de katkı sağlar (Xu ve ark., 2009; Kwakman ve ark., 2010).

Balın hayvansal ve bitkisel besin maddelerinin yanı sıra diğer organik nesneler üzerindeki koruyucu etkisi uzun yıllardır bilinmektedir. Sovyet bilim insanları Levina ve Tsarlin (1947; aktaran Mladenov, 1967) doku örneklerinin 4-6 ay kadar bal çözeltisi içerisinde muhafaza edebildiklerini belirtmişlerdir (Mladenov, 1967). Bilim insanları bal içine konulan dokuların 30 güne kadar korunduğu ve dokularda herhangi bir çürüme ile otoliz belirtisi gözlenmediğini bildirmişlerdir. Balın doku sertleştirme özelliği, “dokuları sertleştirerek etki gösteren” fiksatiflere benzerdir (Culling ve ark., 1985). Balın ayrıca asidik, koruyucu, dehidre edici ve doku sertleştirici özelliklere sahip olduğu da başka çalışmalarda gösterilmiştir. Bunun yanında bal en derin dokuya kadar nüfuz edebilir (Srii ve Marla, 2016). Balın doku koruyucu etkisi ile ilgili Subrahmanyam (1993) ile Sharquie ve Najim (2001) yaptıkları araştırmalar sonucunda balın iyi bir doku koruyucu olduğu sonucuna ulaşmıştır.

Literatür, bal fiksasyonu için iki olası mekanizmayı vurgulamaktadır. Birincisi, karbonhidratın glikonik asite dönüşmesidir. Bu kimyasal gıda ve ilaç endüstrisinde gıdanın bozulmasını önleyerek geniş bir uygulama alanına sahiptir (Sabarinath ve ark., 2016; Mandy ve Philip, 2009). Diğeri ise düşük pH'da formaldehit gruplarına parçalanan fruktozun baldaki varlığıdır. Aldehit grupları, doku fiksasyonuna yol açan lizin amino asitleri ile metilen köprüleri oluşturur. Bu bakımdan balın fiksasyon mekanizması formaldehite benzer (Patil ve ark., 2013; Sabarinath ve ark., 2016; Mandy ve Philip, 2009). Sulu çözelti içindeki formaldehit, metilen glikol adı verilen bir glikol (hidratlanmış formaldehit) oluşturmak için hidratlanır (Kiernan, 2000;

Grizzle ve ark., 2008). Çözeltide formaldehitin hidratlı formu ve metilen glikol lehine bir kimyasal denge vardır (Fox ve ark. 1985). Formaldehitin hem hidratlı hem de hidratlanmamış formları dokuyu tespit eder (Kiernan, 2000; Grizzle ve ark., 2008). Ayrıca balın askorbik asit yanında çeşitli vitaminler, karbonhidratlar, mineraller ve eser elementler içerdiği bilinmektedir. Bu durum balın düşük pH'lı olmasını sağlayarak nükleer boyama için iyi bir fiksatif olma özelliği meydana getirir (Avwioro ve ark., 2010).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Solüsyon

Çalışmada kullanılan deneme ve kontrol gruplarına ait bileşen ve solüsyon bilgileri aşağıda verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan balın kuru madde, asidite, pH, glikoz ve fruktoz oranları sırasıyla %89, 40 (mEq/kg bal), 5.2, %31, %39'dur.

- Deneme I (H50): 500 ml Bal, 500 ml Etil Alkol (%96), her 1 litre için 100 gr sitrik asit
- Deneme II (H40): 400 ml Bal, 600 ml Etil Alkol (%96), her 1 litre için 100 gr sitrik asit
- Deneme III (H30): 300 ml Bal, 700 ml Etil Alkol (%96), her 1 litre için 100 gr sitrik asit
- Kontrol I (Formol/F): 100 ml formaldehit (%37), 900 ml distile su
- Kontrol II (Bouin/B): 250 ml formaldehit (%37), 750 ml pikrik asit (%2,1), 50 ml Glasiyal asetik asit

3.2. Uygulama

Çalışmada doku örnekleri için cinsiyet farkı olmaksızın 10 adet Wistar Albino sıçan kullanıldı. Çalışma için Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alındı (2022/945). Genel anestezi altında dekapitasyonla ötenazi edilen hayvanların beyin, dil, parotis bezi, karaciğer, pankreas ve böbreklerinden 1cm³ boyutunda doku numuneleri elde edildi. Dokular deneme ve kontrol gruplarında 24, 48 ve 72 saat tespit edildi. Bouin solüsyonunda tespit süresi pikrik asitin dokuyu aşırı sertleştirmesinden dolayı 24 saat olarak belirlendi. Tespit sonrası dokular 24 saat çeşme suyunda yıkandı. Örnekler dereceli alkollerde (%70, %80, %96) 1'er saat, absol alkolde 2 saat bekletildikten sonra metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilip paraplastta bloklandı. Her bir parafin bloktan mikrotom (Rotatory Mikrotom Leica RM 2155 R) yardımıyla 50 µm aralıklarla 5 µm kalınlığında 18 adet kesit alındı. Histolojik kalitenin değerlendirilmesi için kesitlere hematoksil-eozin, PAS (Periodic Acid Schiff) (Cook, 1990) ve Masson'un Trichrome boyaması yapıldı. Hazırlanan kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirilip farklı bölgelerden

mikroskoba entegre digital kamerayla fotoğraflar çekildi (Olympus DP72, Japan). Histolojik değerlendirme semi-kantitatif olarak gerçekleştirildi. Her bir seri kesitin en az 10 farklı bölgesi 10x, 20x ve 40x'lik büyütmelemlerle değerlendirildi. Bu değerlendirmede boyanma kalitesi, çekirdek morfolojisi, sitoplazmik tespit ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin görünümü kriterleri dikkate alındı ve 1-3 arası skorlandı (1: Kötü, 2: Orta, 3: İyi). Her bir boyama yöntemindeki boyaların verdiği reaksiyonlar ayrı ayrı değerlendirilip ortalama bir skor tayin edildi.

3.3. İstatistiksel analiz

Çalışmada elde edilen skorlar istatistiksel olarak analiz edildi. Solüsyon ve tespit süresi farkı dikkate alındığında toplam 13 bağımsız grup oluştu. Gruplar arasındaki karşılaştırma için Kruskal-Wallis, post hoc Dunn, Ki-kare ve küçük örneklem büyüklüğü için Fisher testi uygulandı. Bu analizler için Minitab (version 19.0) programından yararlanıldı. İstatistiksel olarak önemlilik düzeyi $p < 0.05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

Çalışmada farklı doku örneklerinden elde edilen histolojik kesitlerin farklı boyama prosedürlerine göre işlendikten sonra ışık mikroskobu altında analiz edilmesiyle elde edilen bulgular aşağıda organlara göre sunuldu. Dokuların mikrotom yardımıyla kesitlerinin alınması sırasında gruplar arasında dikkate değer bir farklılık gözlenmedi.

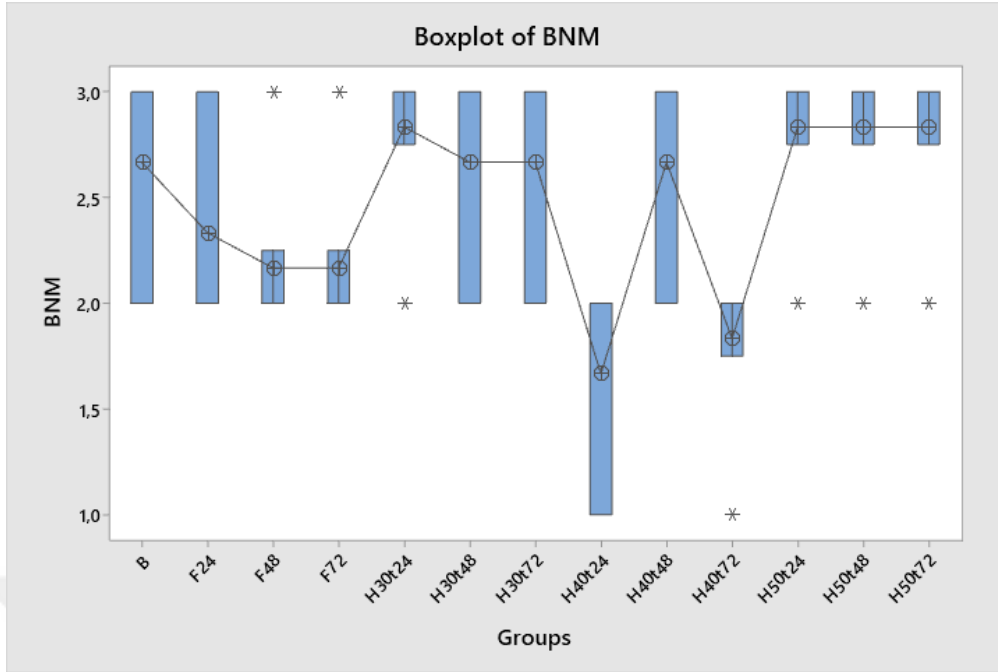
4.1. Beyin

Beyin doku örneklerindeki fiksasyon substansiya grizeye, substansiya alba, nöronlar, nöroglia hücreleri ve hücreler arası maddeler dikkate alınarak değerlendirildi (Şekil 4.5-7.). Elde edilen bulgular Tablo 4.1’de gösterildi. Buna göre özellikle H50 ve H30 grupların bütün kriterleri bakımından Bouin fiksasyonu ile benzer skorlara sahip olduğu gözlemlendi. Bu sonuca ait görseller Şekil 1-4 de sunuldu.

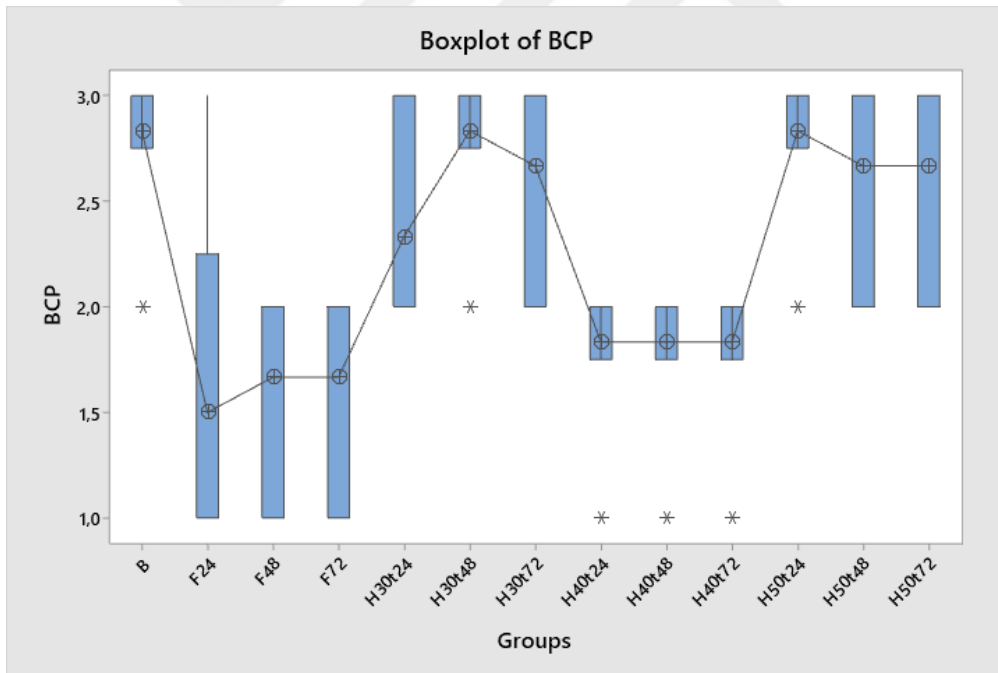
Tablo 4.1. Beyin doku örneklerine ait median ve p değerleri

Gruplar	NM	CP	EM	SQ
B	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
F24	2 ^a	1	2 ^a	1,5
F48	2 ^a	2	1	1
F72	2 ^a	2	1	1
H30t24	3 ^a	2 ^a	2	3 ^a
H30t48	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
H30t72	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
H40t24	2	2	2	2
H40t48	3 ^a	2	2 ^a	2
H40t72	2	2	2 ^a	2
H50t24	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
H50t48	3 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a
H50t72	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
p	0.010	0.000	0.000	0.000

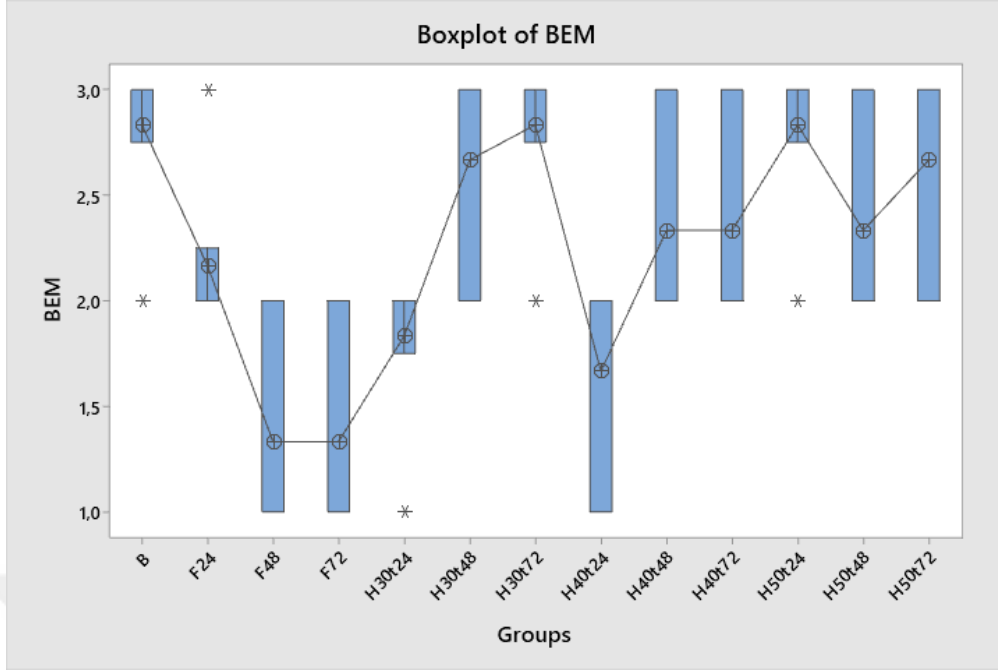
B: Bouin, F: Formol, H: Bal, NM: Nükleer Morfoloji, CP: Sitoplazma, EM: Ekstraselüler Matriks, SQ: Boyama kalitesi



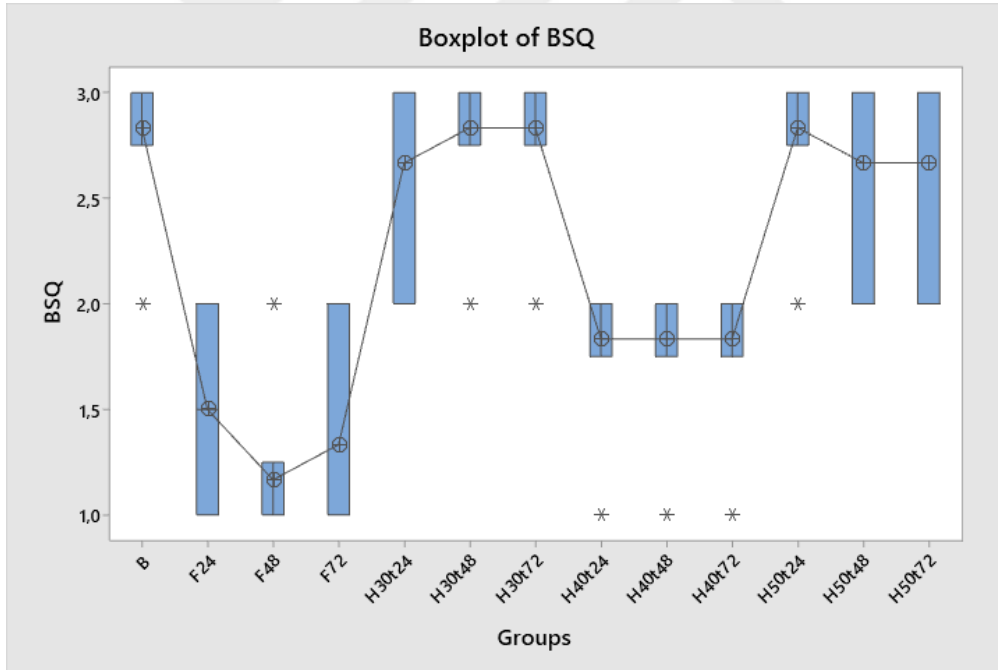
Şekil 4.1. Beyin doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği



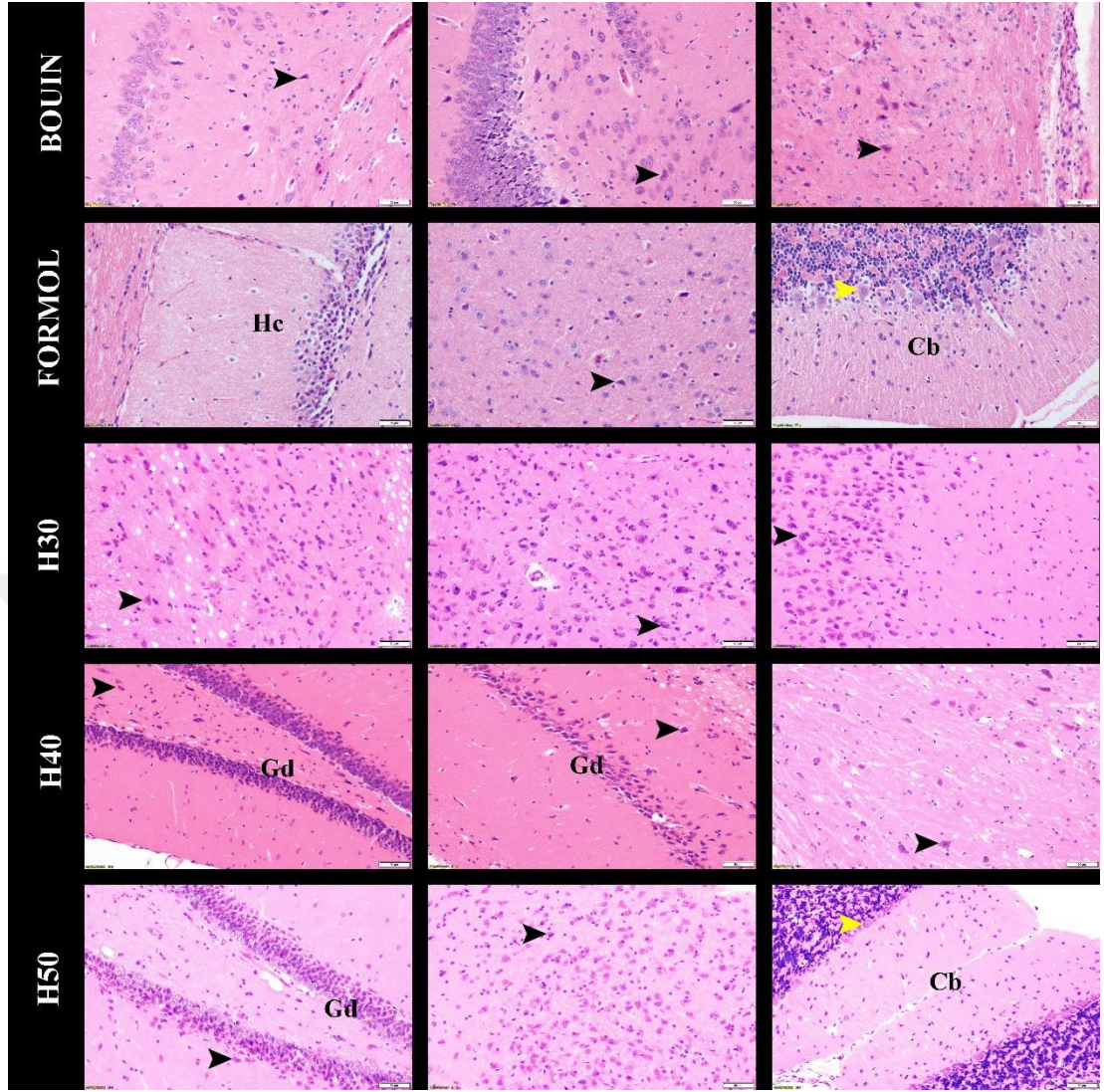
Şekil 4.2. Beyin doku örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği



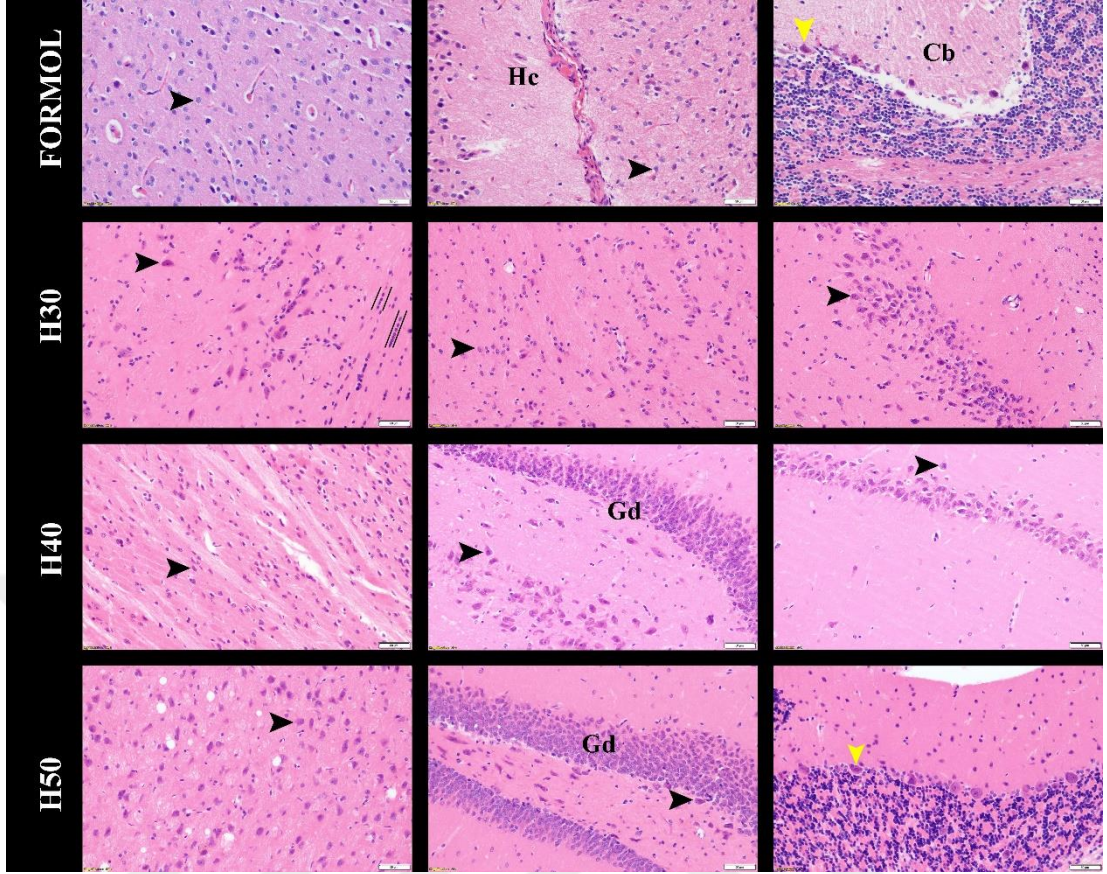
Şekil 4.3. Beyin doku örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği



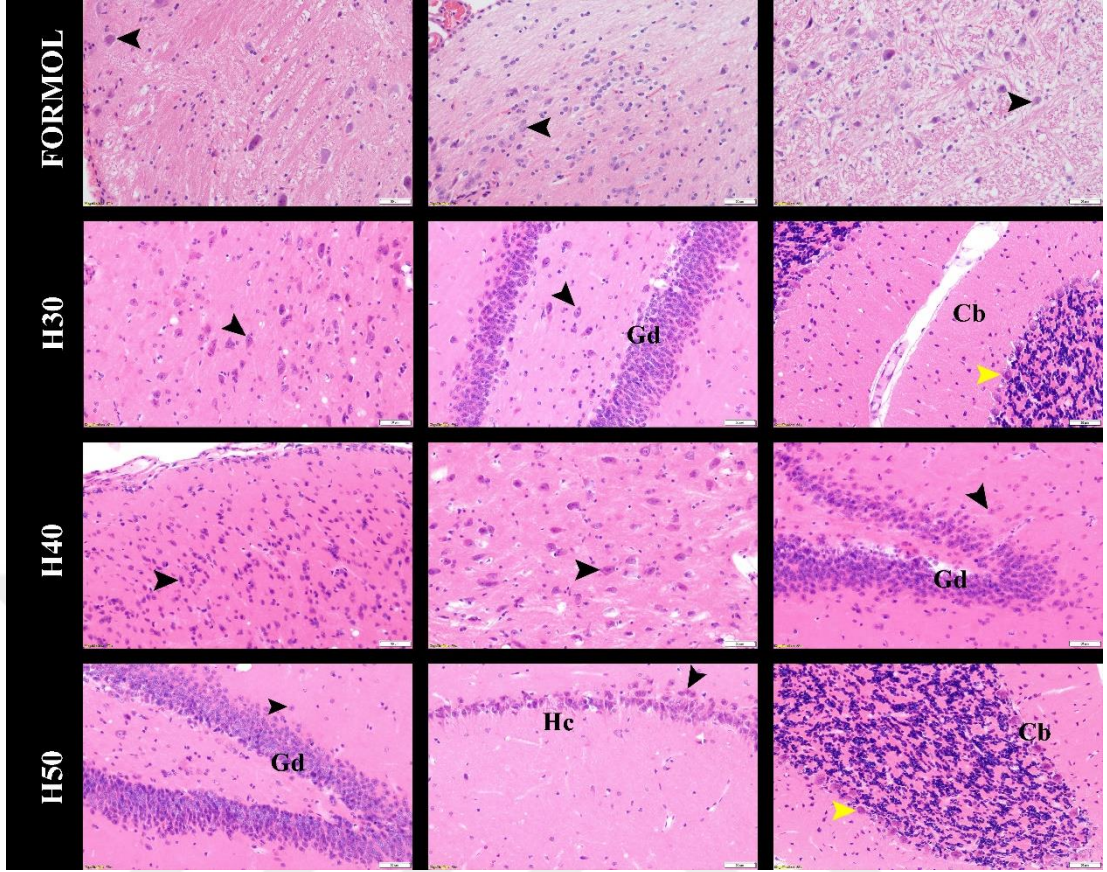
Şekil 4.4. Beyin doku örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği



Şekil 4.5. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen beyin doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Gd: Giyrus dentatus, Hc: Hippokampus, Cb: Serebellum Siyah ok başı: Nöron, Sarı ok başı: Purkinje hücresi. Bar: 50µm



Şekil 4.6. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen beyin doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'luk bal deneme grubu. Gd: Giyrus dentatus, Hc: Hippokampus, Cb: Serebellum Siyah ok başı: Nöron, Sarı ok başı: Purkinje hücresi, Çizgiler: Oligodentrosit. Bar: 50µm



Şekil 4.7. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen beyin doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Gd: Giyrus dentatus, Hc: Hippokampus, Cb: Serebellum Siyah ok başı: Nöron, Sarı ok başı: Purkinje hücresi. Bar: 50µm

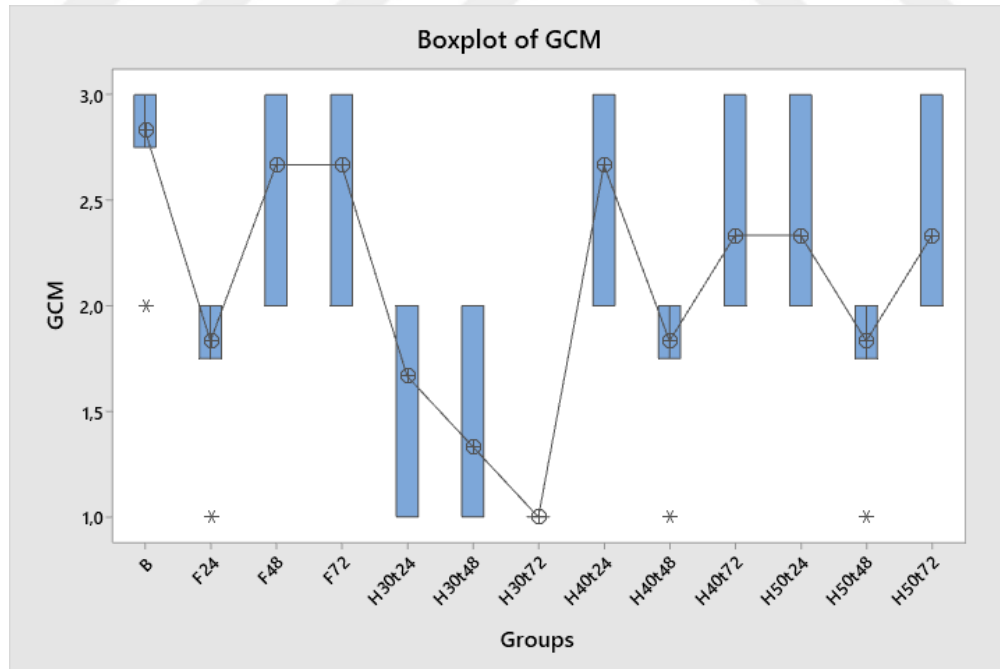
4.2. Dil

Dil doku örneklerindeki fiksasyon epitel, bağ ve kas doku özellikleri dikkate alınarak değerlendirildi (Şekil 13.-21.). Elde edilen bulgular Tablo 4.2'de gösterildi. Buna göre özellikle H40 ve H50 gruplarındaki kriterlerin birçoğu Bouin ve Formol fiksasyonu ile benzer skorlar gösterdi. Bu sonuca ait görseller Şekil 4.8-12'de sunuldu.

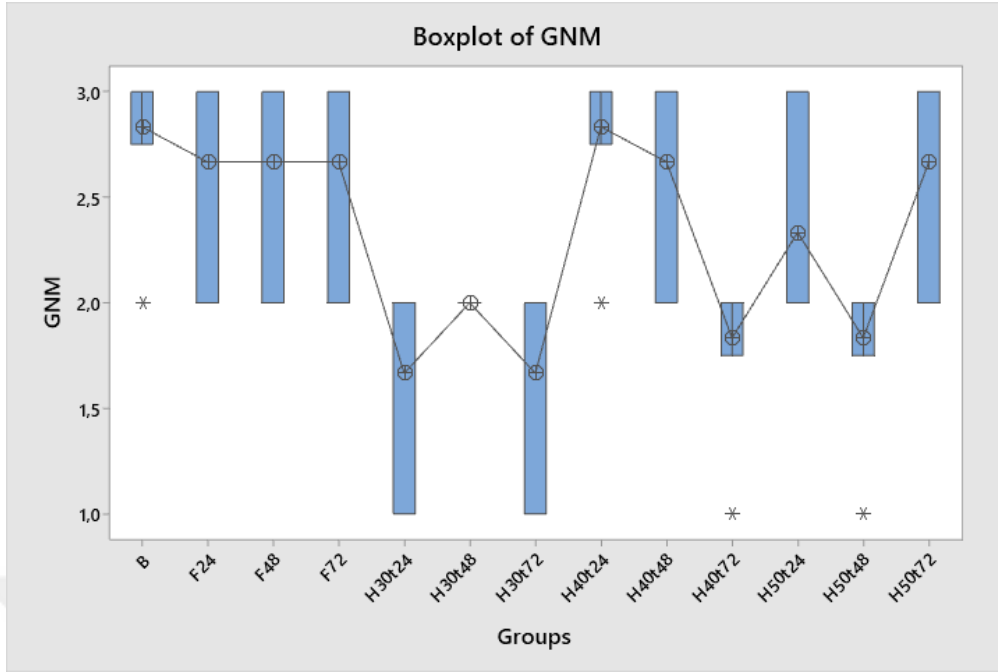
Tablo 4.2. Dil doku örneklerine ait median ve p değerleri

Grup	CM	NM	CP	EM	SQ
B	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
F24	2	3 ^a	2	2	2 ^a
F48	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
F72	3 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a	3 ^a
H30t24	2	2	2	2 ^a	2
H30t48	1	2	2	2	2
H30t72	1	2	2	2	2
H40t24	3 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a
H40t48	2	3 ^a	2 ^a	2	3 ^a
H40t72	2 ^a	2	3 ^a	2	3 ^a
H50t24	2 ^a	2 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a
H50t48	2	2	2 ^a	2	3 ^a
H50t72	2 ^a	3 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a
P	0.000	0.001	0.015	0.000	0.006

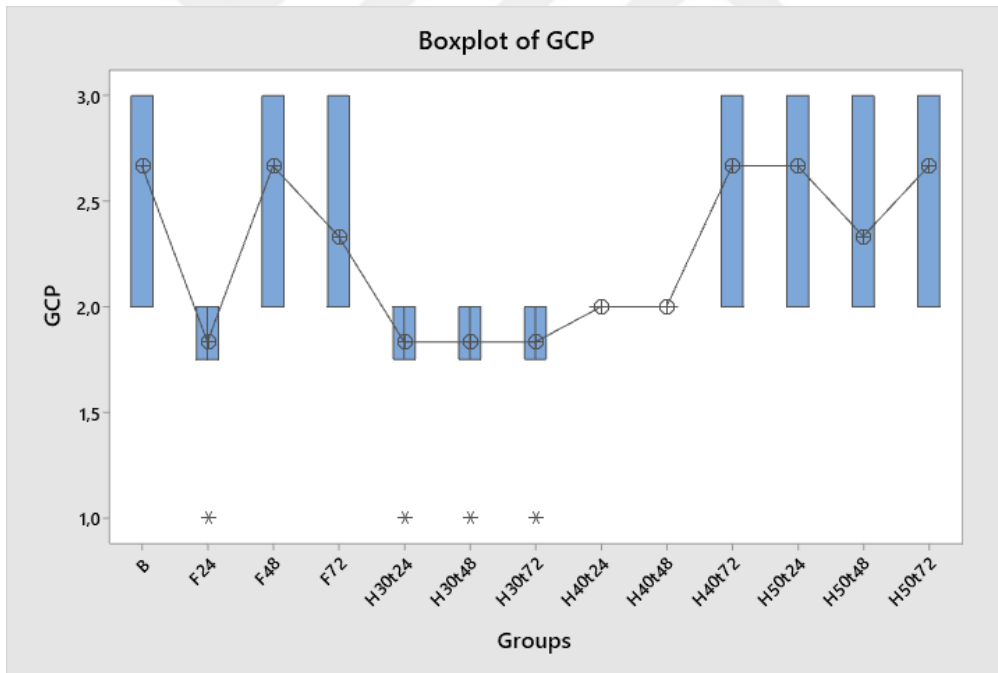
B: Bouin, F: Formol, H: Bal, NM: Nükleer Morfoloji, CM: Hücre Sınırı, CP: Sitoplazma, EM: Ekstraselüler Matriks, SQ: Boyama kalitesi



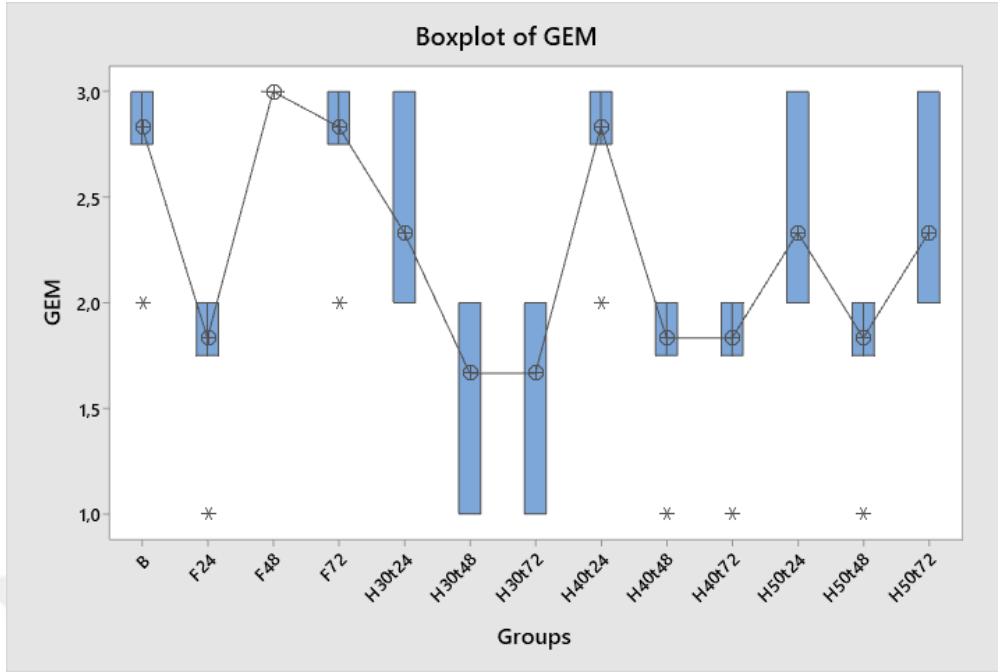
Şekil 4.8. Dil doku örneklerinde hücre sınırı için kutu grafiği



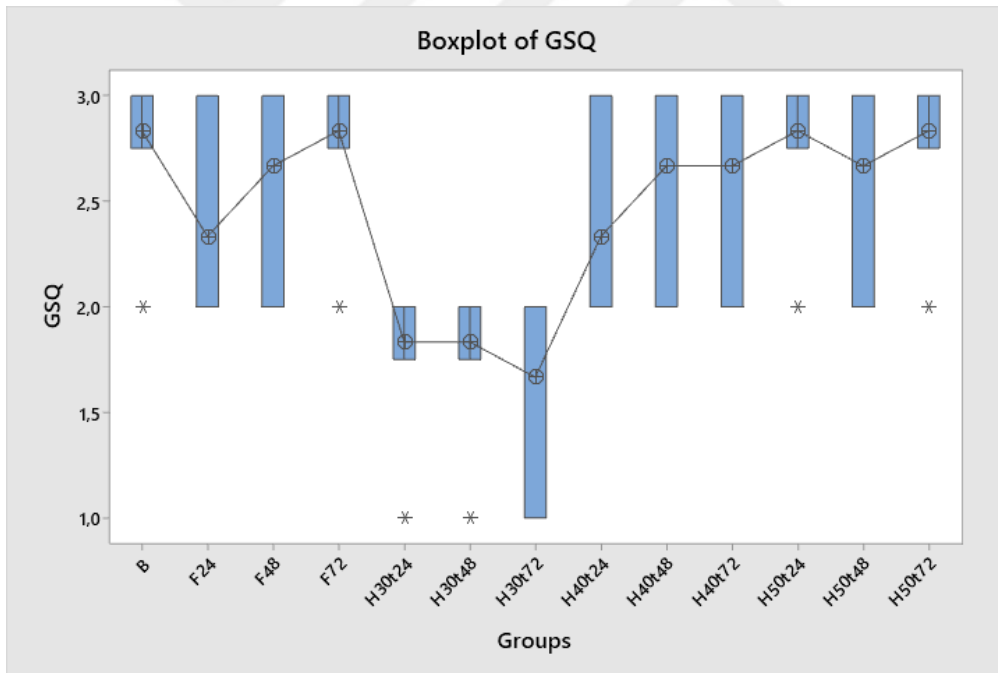
Şekil 4.9. Dil doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği



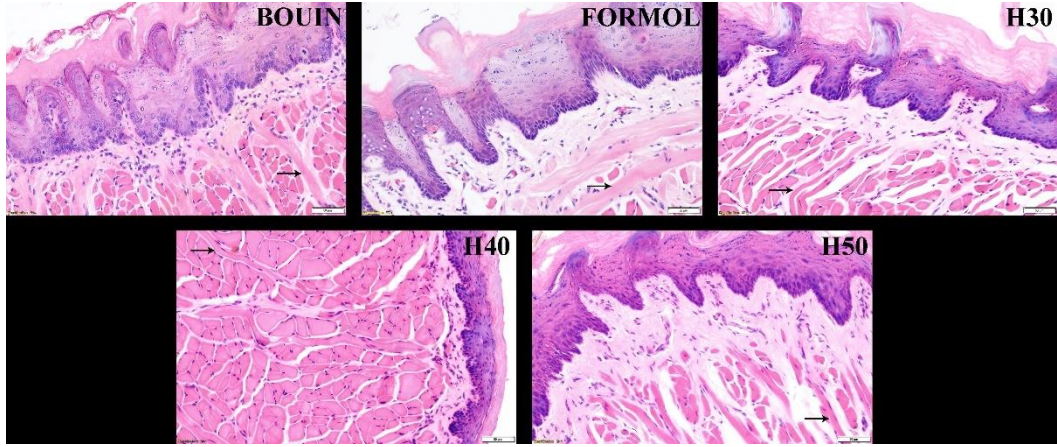
Şekil 4.10. Dil doku örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği



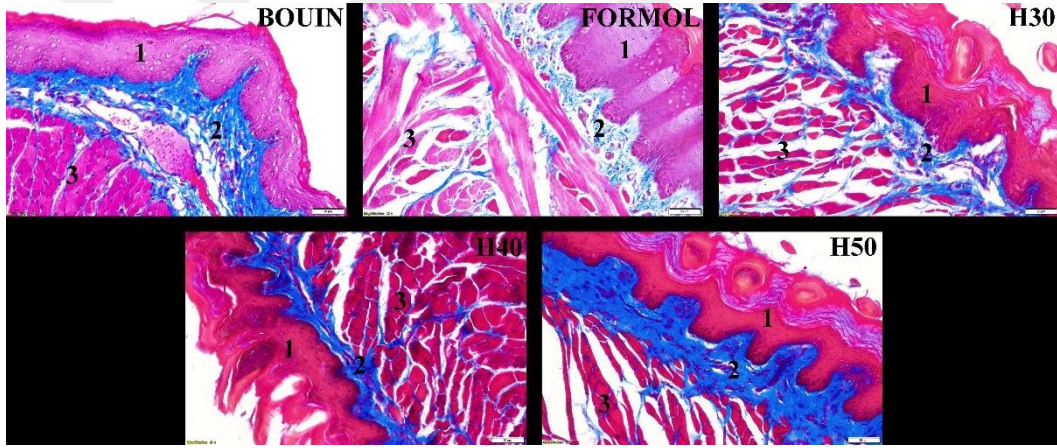
Şekil 4.11. Dil doku örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği



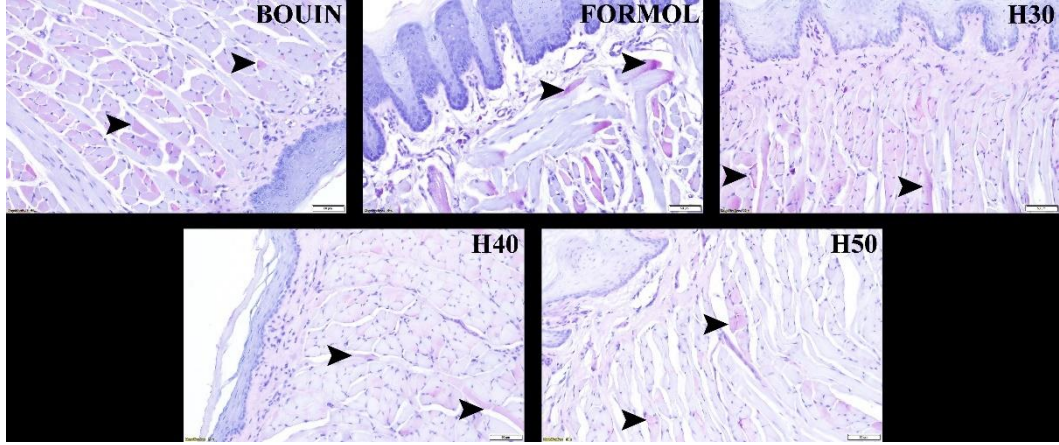
Şekil 4.12. Dil doku örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği



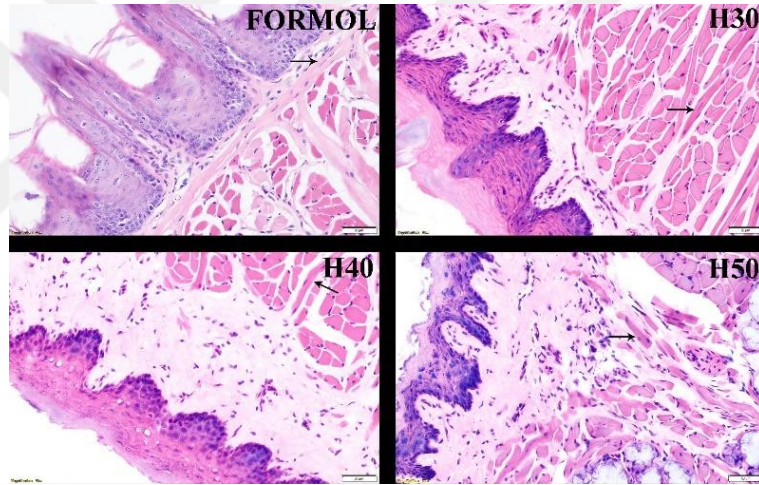
Şekil 4.13. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'lık bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok: İskelet kasındaki striasyon. Bar: 50µm



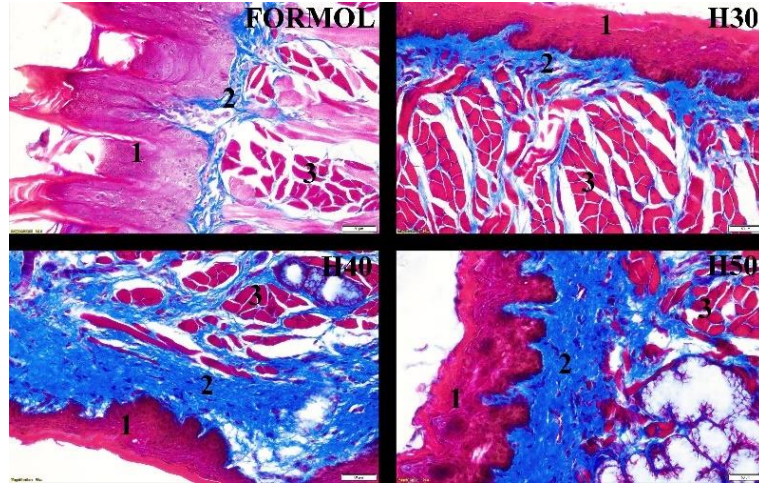
Şekil 4.14. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'lık bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. 1. Epitel doku, 2. Konnektif doku, 3. İskelet kası. Bar: 50µm



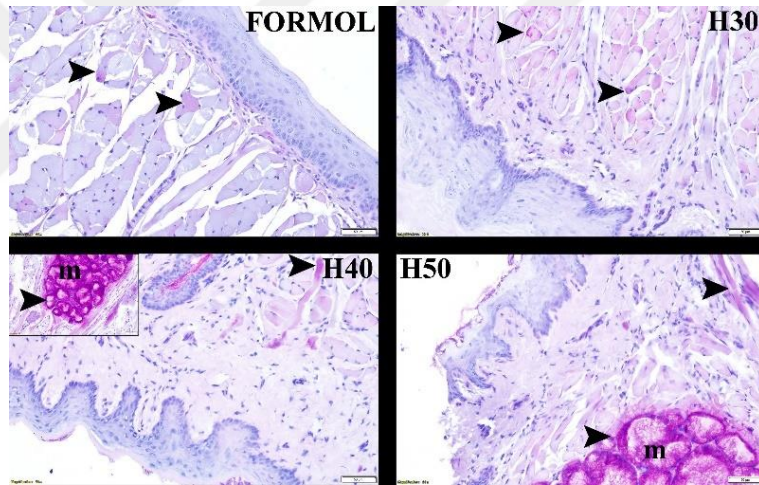
Şekil 4.15. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok başı: PAS pozitif alanlar. Bar: 50µm



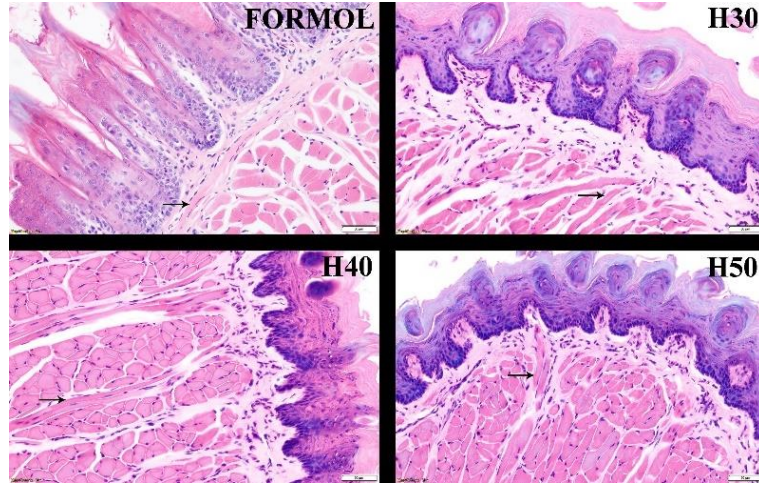
Şekil 4.16. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok: İskelet kasındaki sitriasyon. Bar: 50µm



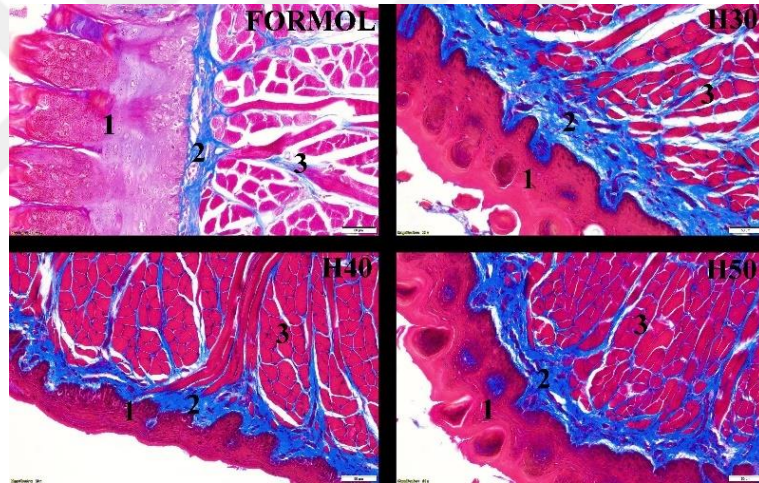
Şekil 4.17. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'lık bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. 1. Epitel doku, 2. Konnektif doku, 3. İskelet kası. Bar: 50µm



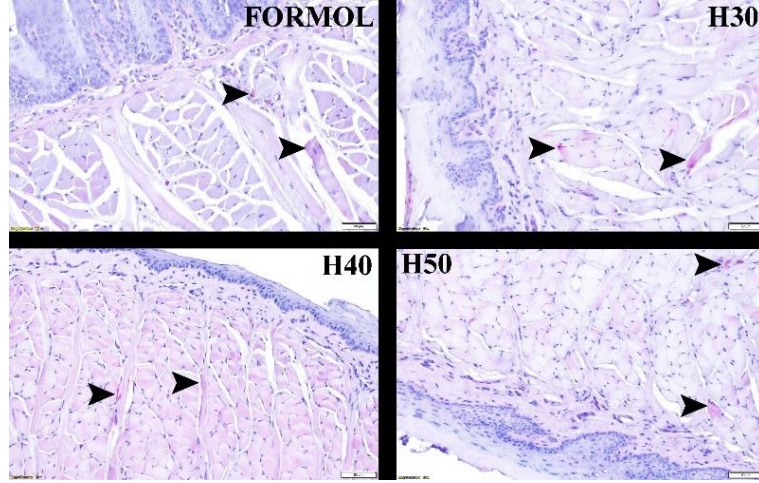
Şekil 4.18. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'lık bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. m: müköz tükrük bezi Ok başı: PAS pozitif alanlar. Bar: 50µm



Şekil 4.19. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'lık bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok: İskelet kasındaki sitriasyon. Bar: 50µm



Şekil 4.20. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'lık bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. 1. Epitel doku, 2. Konnektif doku, 3. İskelet kası. Bar: 50µm



Şekil 4.21. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen dil doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok başı: PAS pozitif alanlar. Bar: 50µm

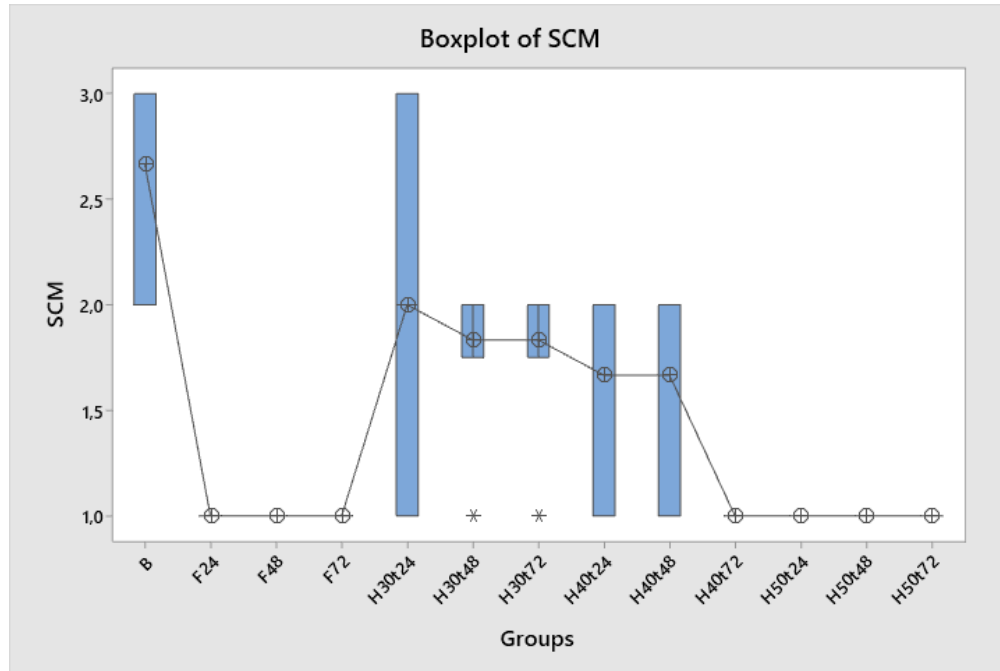
4.3. Parotis

Parotis bezi doku örneklerindeki fiksasyon bez epiteli ve akıtıcı kanallar dikkate alınarak değerlendirildi (Şekil 4.26-28.). Elde edilen bulgular Tablo 4.3'te gösterildi. Buna göre Bouin solüsyonu tüm özellikleri bakımından diğer gruplardan pozitif yönde ayrıldı. Bunun yanında H30 ve H40 gruplarındaki kriterlere ait skorların istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte Formol fiksasyonundan daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlara ait görseller Şekil 4.22-26'te sunuldu.

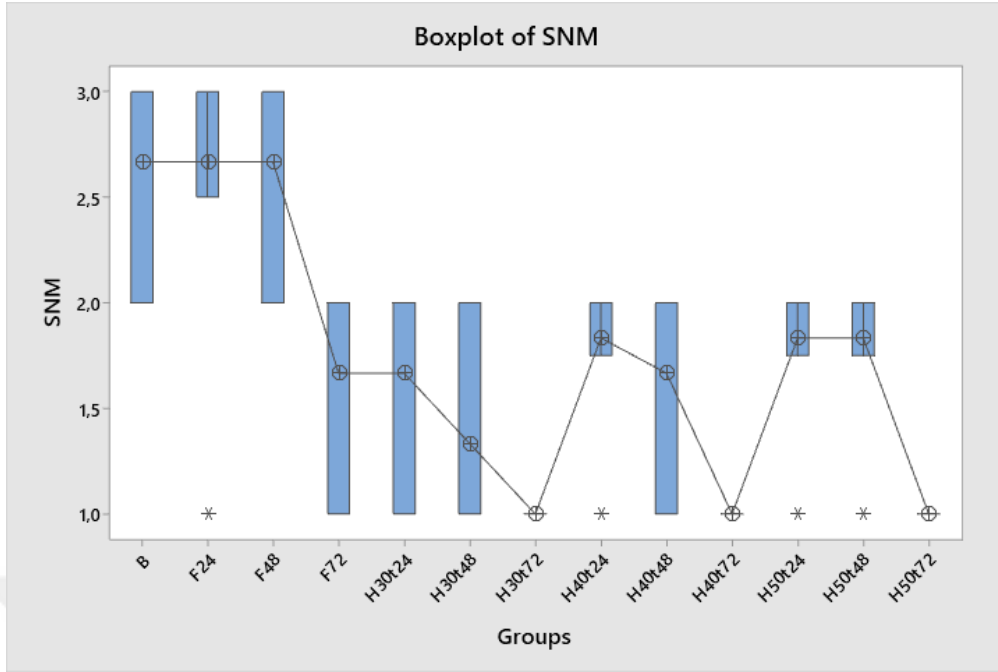
Tablo 4.3. Parotis bezi doku örneklerine ait median ve p değerleri, B: Bouin, F: Formol, H: Bal (Honey), CM: Hücre Sınırı (Cell Margin), NM: Nükleer Morfoloji (Nükleer Morphology), CP: Sitoplazma (Cytoplasm), EM: Ekstraselüler Matriks (Extracellular Matrix), SQ: Boyama kalitesi (Staining Quality)

Grup	CM	NM	CP	EM	SQ
B	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
F24	1	3 ^a	2	1	2
F48	1	3 ^a	1	1	1
F72	1	2	2	1	1
H30t24	2	2	2	2	2 ^a
H30t48	2	1	2	2	2
H30t72	2	1	2	2	2
H40t24	2	2	2	2	2
H40t48	2	2	2	2	2
H40t72	1	1	1	1	2
H50t24	1	2	1	1	1
H50t48	1	2	2	2	1
H50t72	1	1	1	1	1
P	0.000	0.000	0.002	0.001	0.003

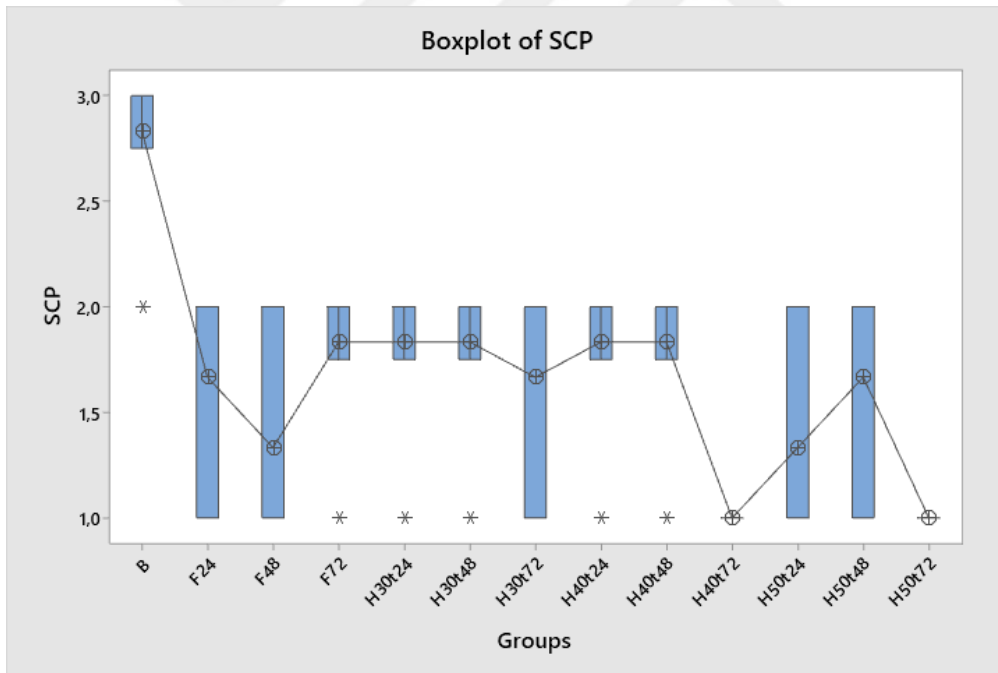
B: Bouin, F: Formol, H: Bal, NM: Nükleer Morfoloji, CM: Hücre Sınırı, CP: Sitoplazma, EM: Ekstraselüler Matriks, SQ: Boyama kalitesi



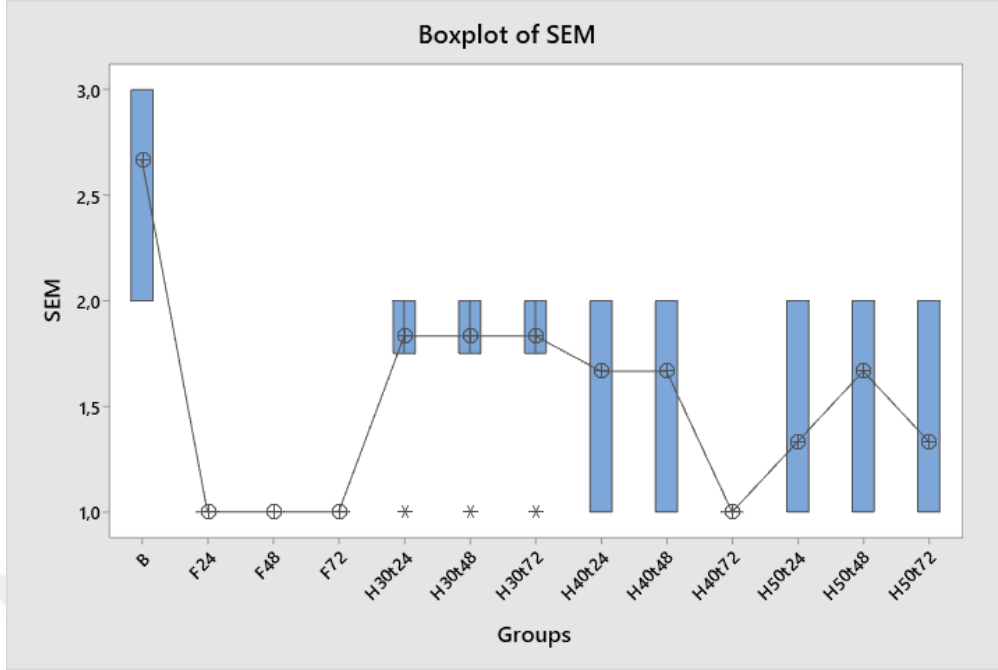
Şekil 4.22. Parotis bezi doku örneklerinde nükleer sınırlar için kutu grafiği



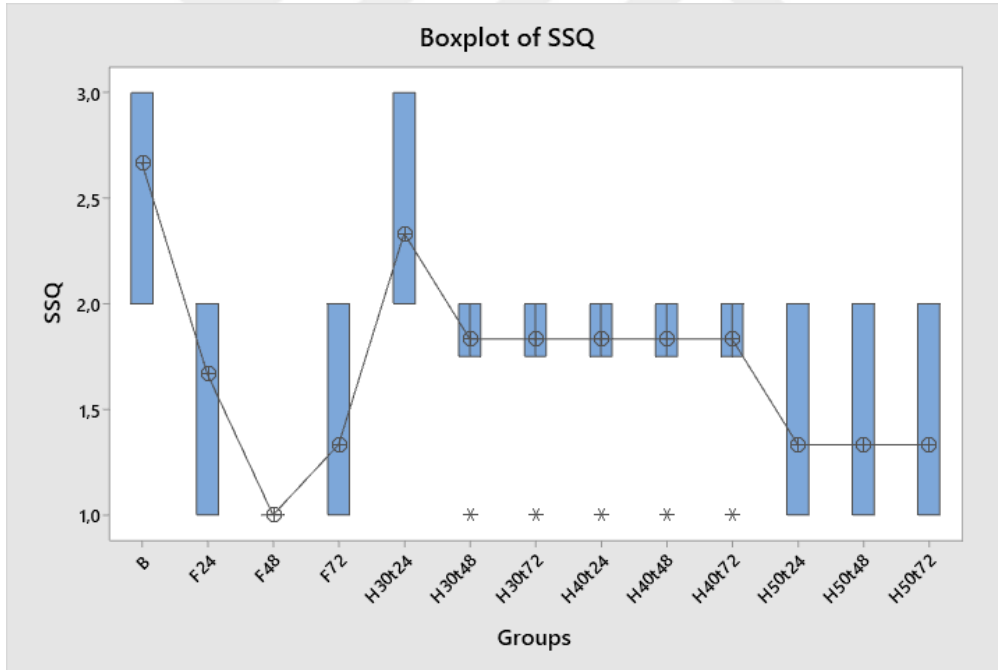
Şekil 4.23. Parotis bezi örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği



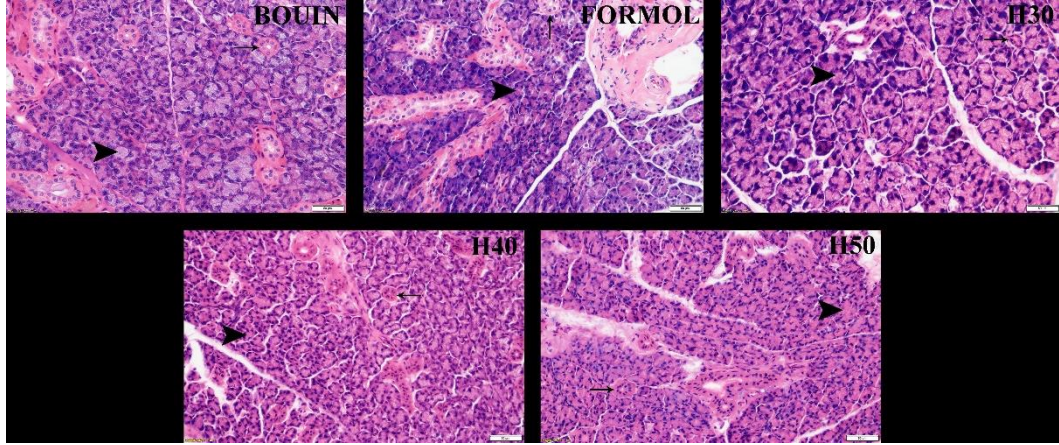
Şekil 4.24. Parotis bezi örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği



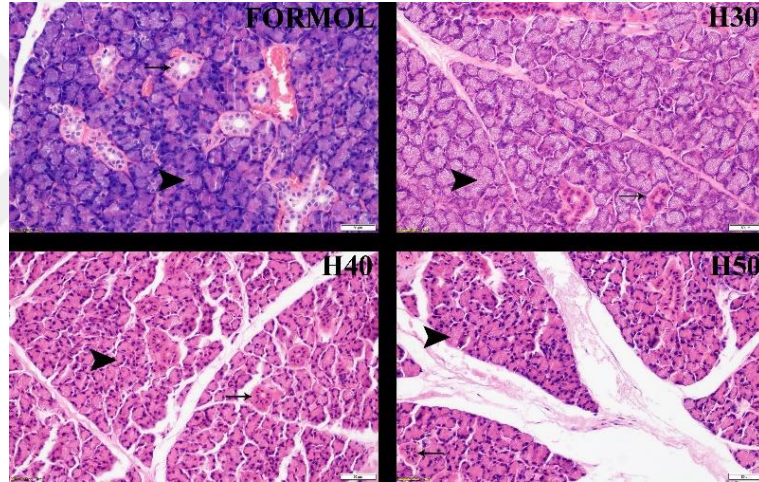
Şekil 4.25. Parotis bezi örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği



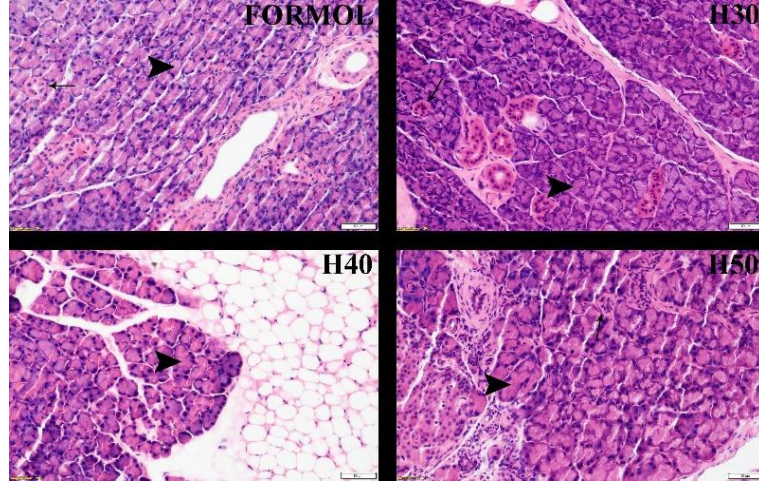
Şekil 4.26. Parotis bezi örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği



Şekil 4.27. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen parotis bezi doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok: duktus sitriatus, Ok başı: asinus, Bar: 50µm



Şekil 4.28. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen parotis bezi doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok: duktus sitriatus, Ok başı: asinus, Bar: 50µm



Şekil 4.29. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen parotis bezi doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok: duktus striatus, Ok başı: asinus, Bar: 50µm

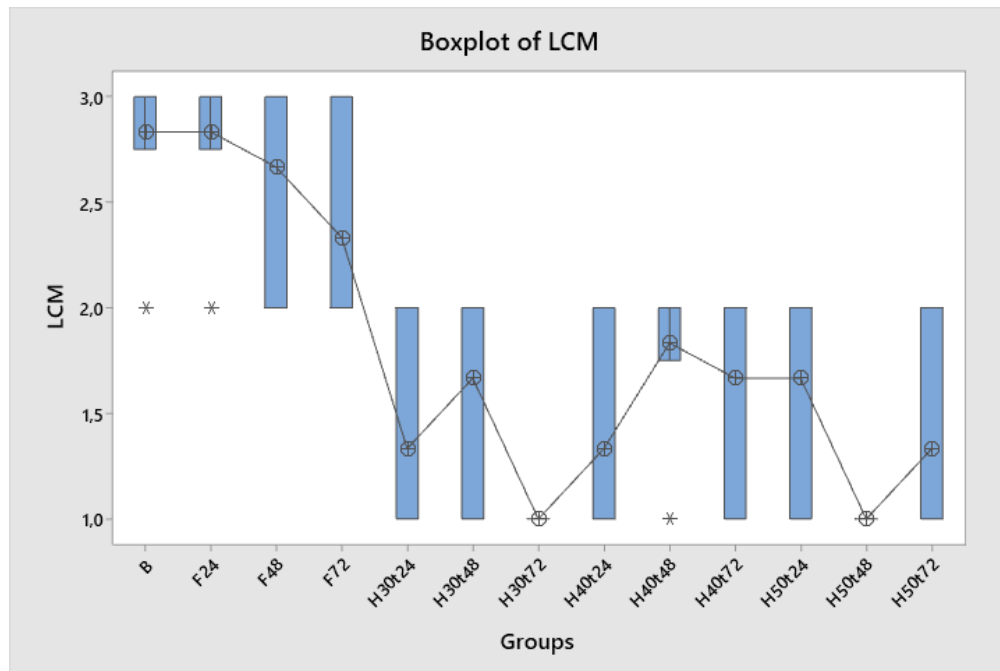
4.4. Karaciğer

Karaciğer doku örneklerindeki fiksasyon hepatositler, sinüzoidler, damarlar ve duktus biliiferusun yapısı dikkate alınarak değerlendirildi (Şekil 4.35-43.). Elde edilen bulgular Tablo 4.4'te gösterildi. Buna göre Bouin ve Formol fiksasyonlarına ait skorlar pozitif yönde birbirine benzerdi. Bu skorlara en yakın grup ise H40'ın 48 ve 72 saatlik fiksasyon gruplarıydı. Bu sonuçlara ait görseller Şekil 4.29-34'de sunuldu.

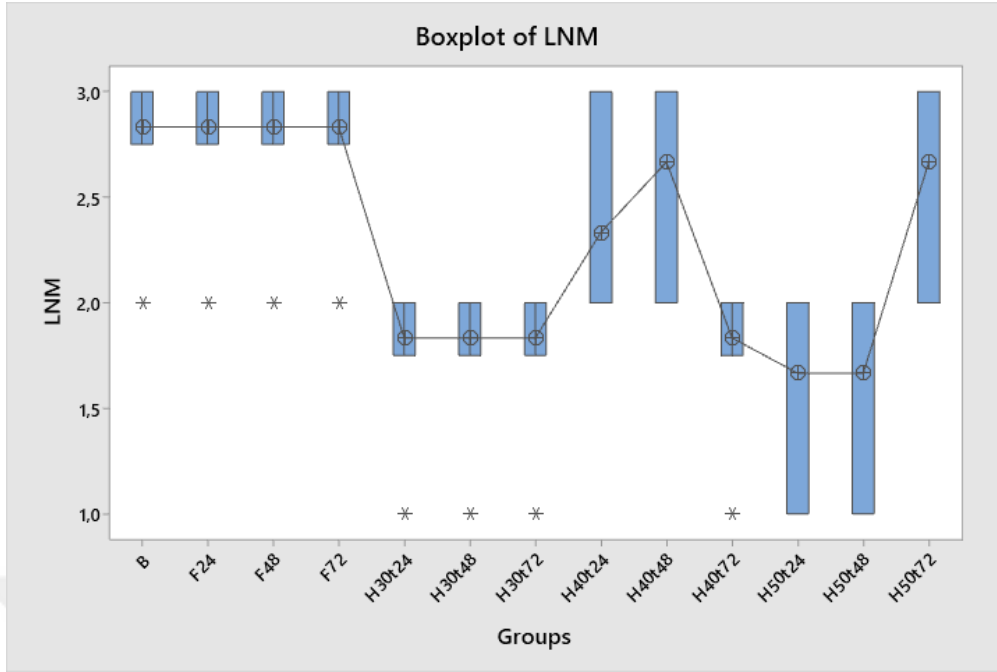
Tablo 4.4. Karaciğer doku örneklerine ait median ve p değerleri, B: Bouin, F: Formol, H: Bal (Honey), CM: Hücre Sınırı (Cell Margin), NM: Nükleer Morfoloji (Nükleer Morphology), CP: Sitoplazma (Cytoplasm), EM: Ekstraselüler Matriks (Extracellular Matrix), SQ: Boyama kalitesi (Staining Quality)

Grup	CM	NM	CP	EM	SQ
B	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
F24	3 ^a	3 ^a	3 ^a	2 ^a	3 ^a
F48	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
F72	2 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a
H30t24	1	2	2	1	1
H30t48	2	2	1	2 ^a	2
H30t72	1	2	2	2	1
H40t24	1	2	2	3 ^a	2
H40t48	2	3 ^a	2	2 ^a	2 ^a
H40t72	2	2 ^a	2	2 ^a	2
H50t24	2	2	2	2 ^a	2
H50t48	1	2	2	2	2
H50t72	1	3 ^a	2	2 ^a	2
P	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000

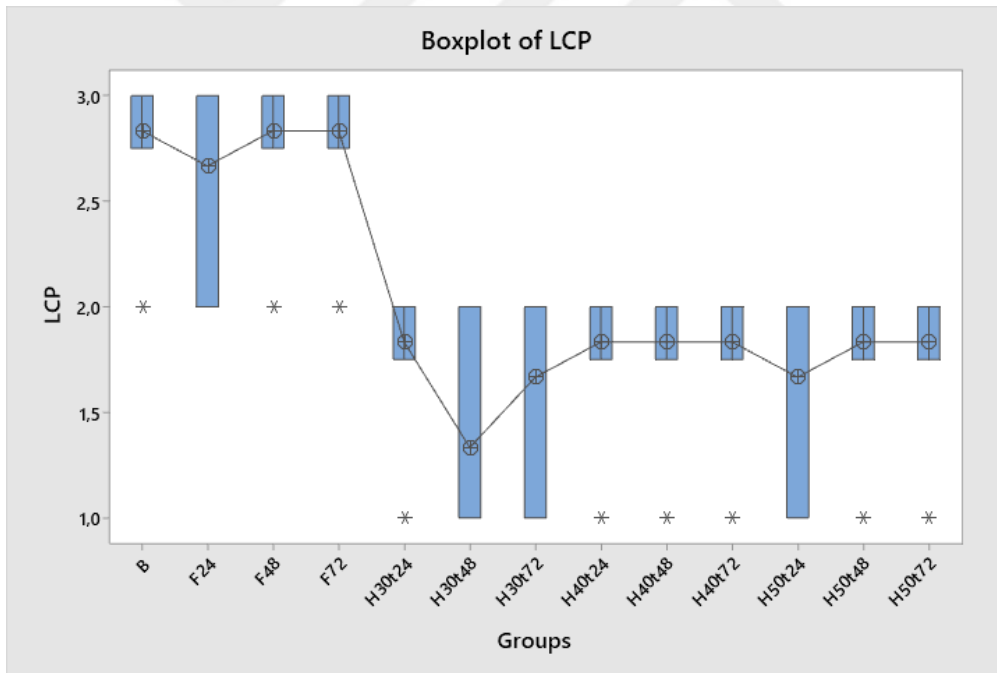
B: Bouin, F: Formol, H: Bal, NM: Nükleer Morfoloji, CM: Hücre Sınırı, CP: Sitoplazma, EM: Ekstraselüler Matriks, SQ: Boyama kalitesi



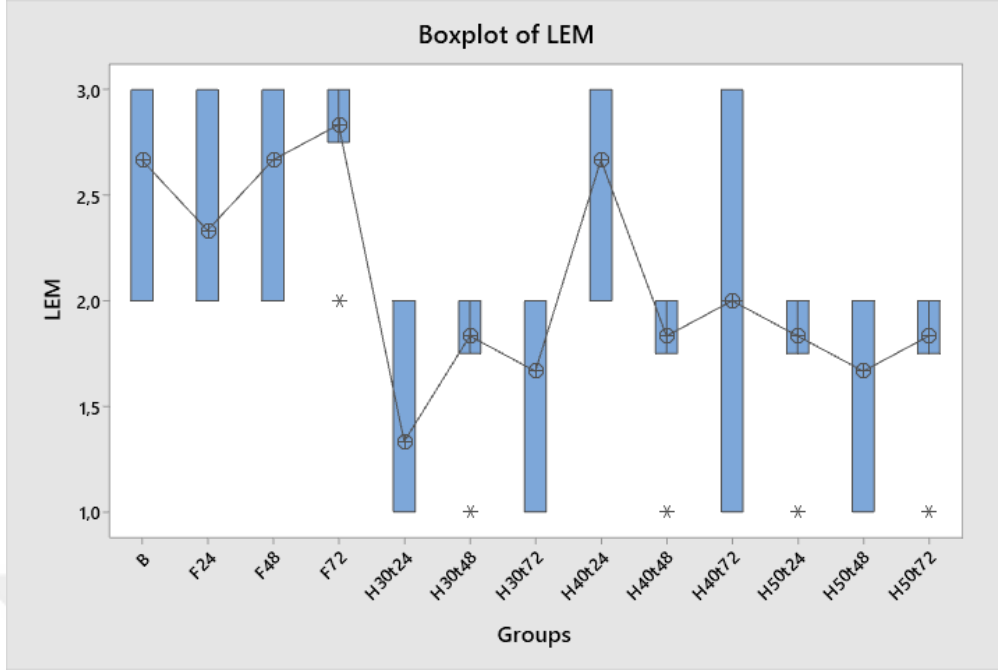
Şekil 4.30. Karaciğer doku örneklerinde hücre sınırları için kutu grafiği



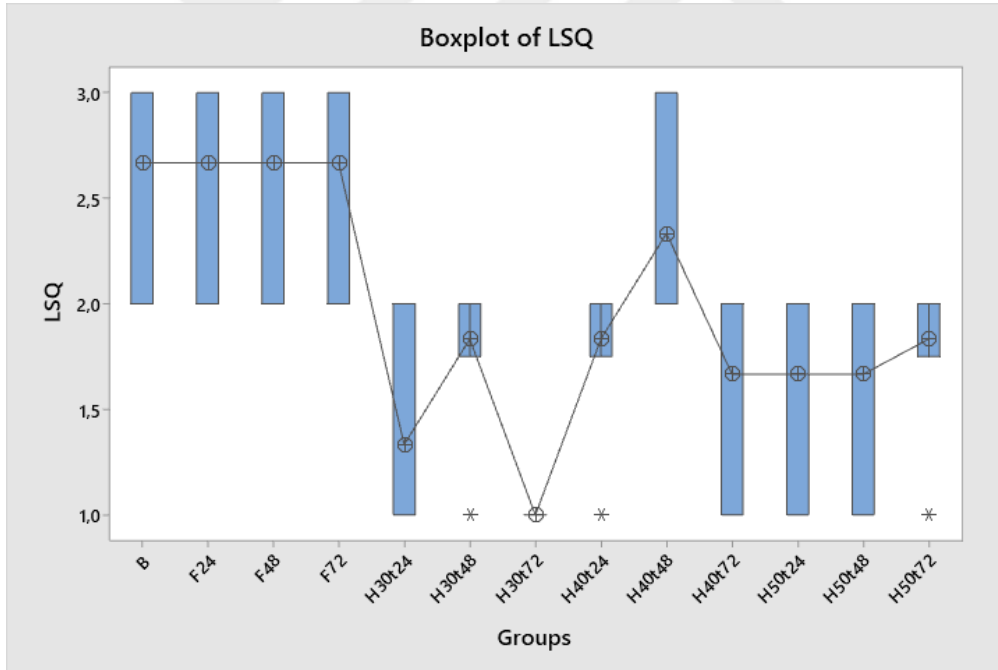
Şekil 4.31. Karaciğer doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği



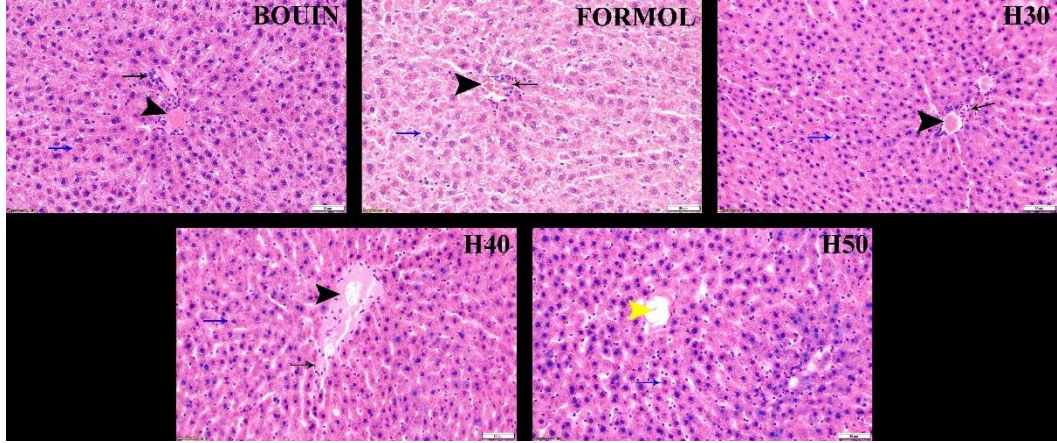
Şekil 4.32. Karaciğer doku örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği



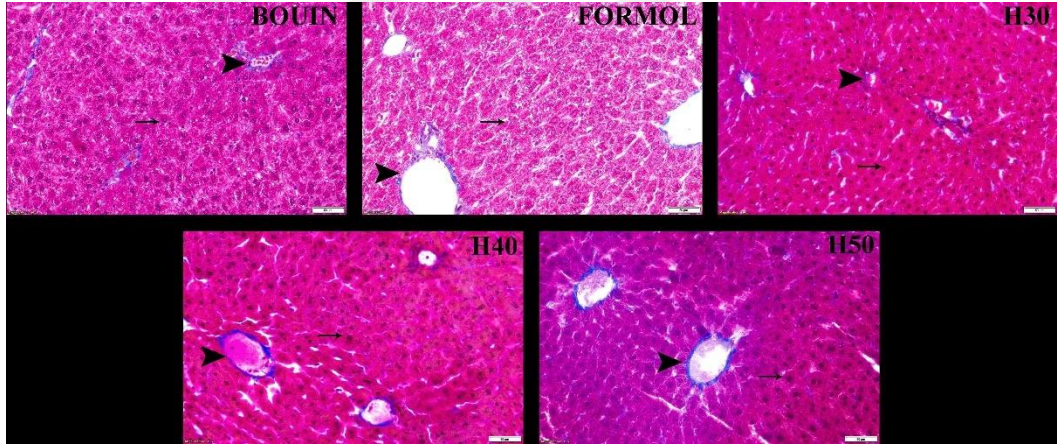
Şekil 4.33. Karaciğer doku örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği



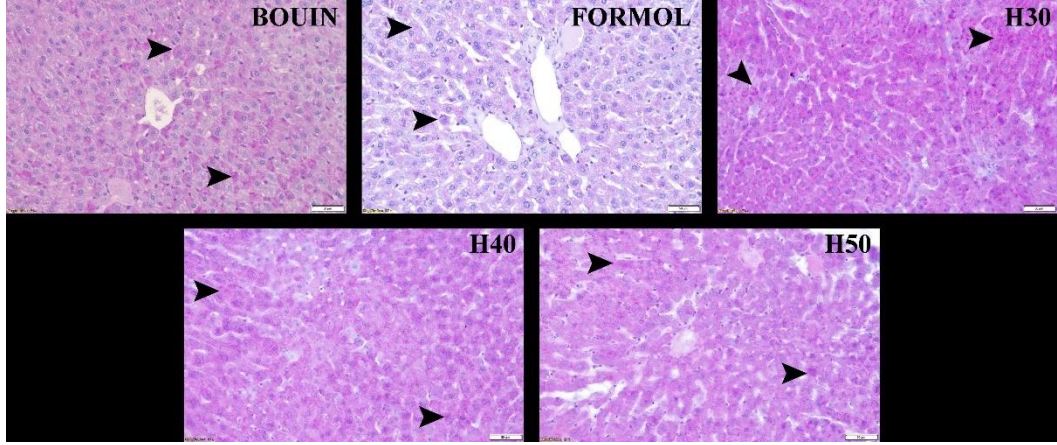
Şekil 4.34. Karaciğer doku örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği



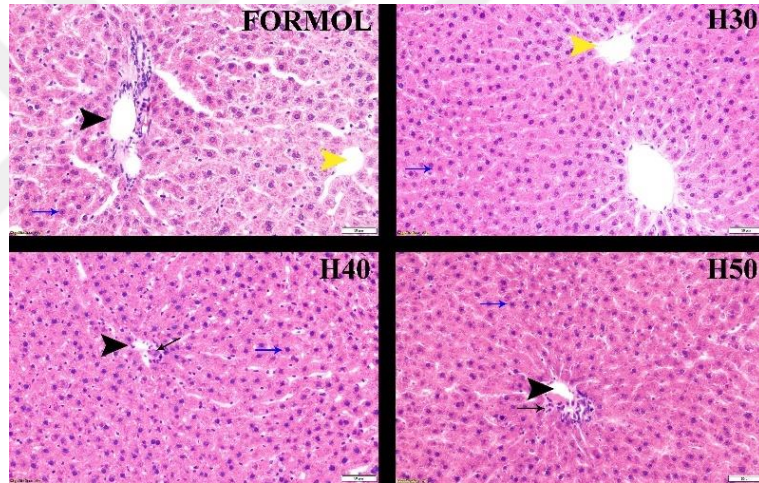
Şekil 4.35. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Siyah ok başı: vena porta, sarı ok başı: vena sentralis, siyah ok: duktus biliferus, mavi ok: hepatosit, Bar: 50µm



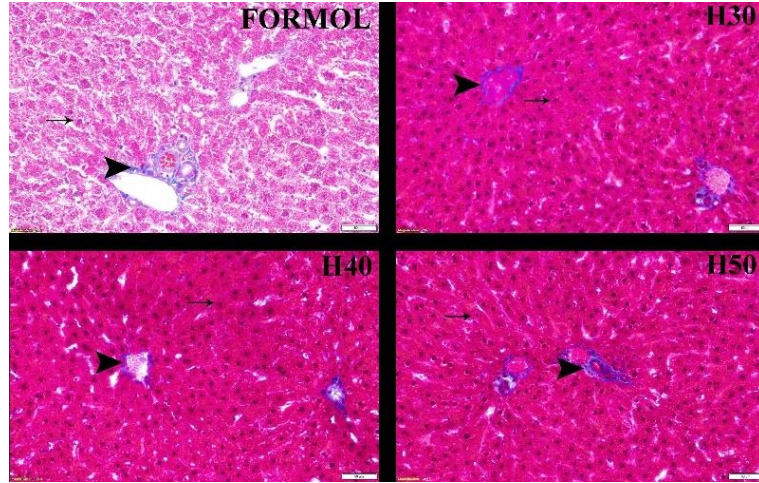
Şekil 4.36. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Siyah ok başı: vena, siyah ok: hepatosit, Bar: 50µm



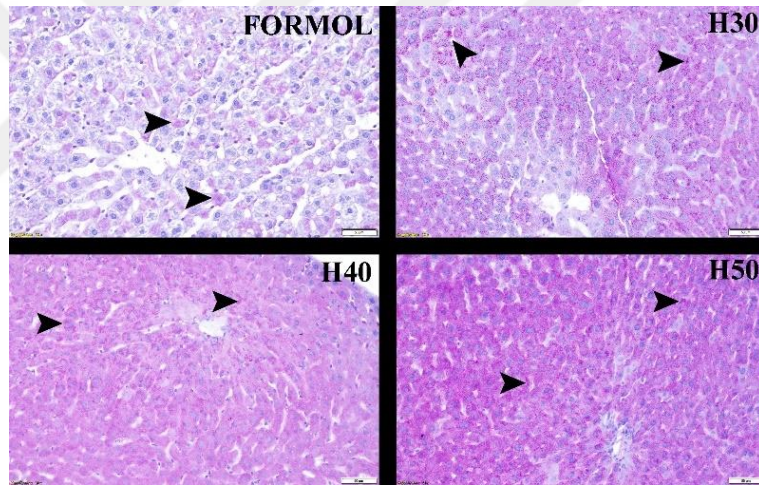
Şekil 4.37. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok başı: PAS pozitif alanlar. Bar: 50µm



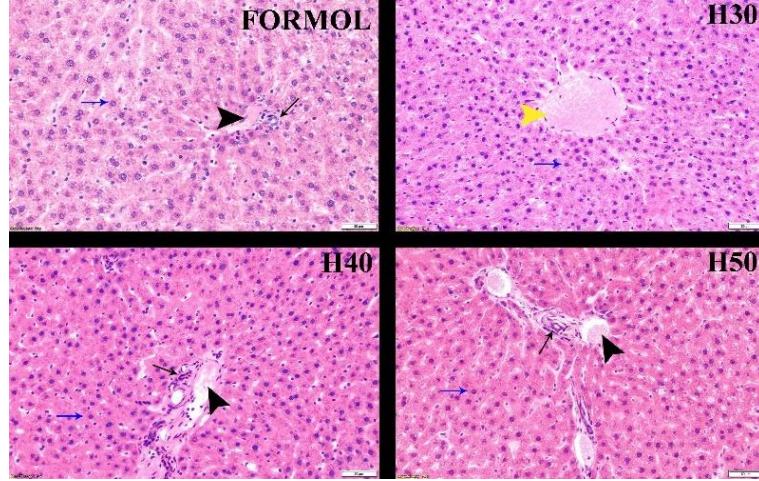
Şekil 4.38. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Siyah ok başı: vena porta, sarı ok başı: vena sentralis, siyah ok: duktus biliferus, mavi ok: hepatosit, Bar: 50µm



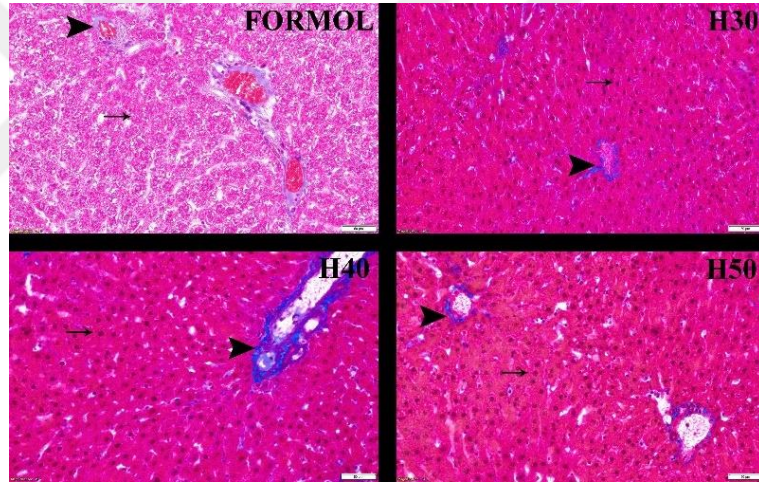
Şekil 4.39. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Siyah ok başı: vena, siyah ok: hepatosit, Bar: 50µm



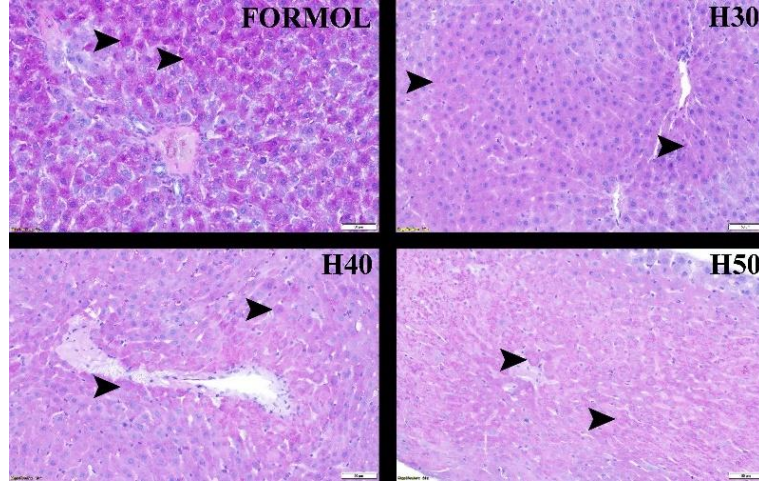
Şekil 4.40. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok başı: PAS pozitif alanlar. Bar: 50µm



Şekil 4.41. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'luk bal deneme grubu. Siyah ok başı: vena porta, sarı ok başı: vena sentralis, siyah ok: duktus biliferus, mavi ok: hepatosit, Bar: 50µm



Şekil 4.42. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'luk bal deneme grubu. Siyah ok başı: vena, siyah ok: hepatosit, Bar: 50µm



Şekil 4.43. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen karaciğer doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok başı: PAS pozitif alanlar. Bar: 50µm

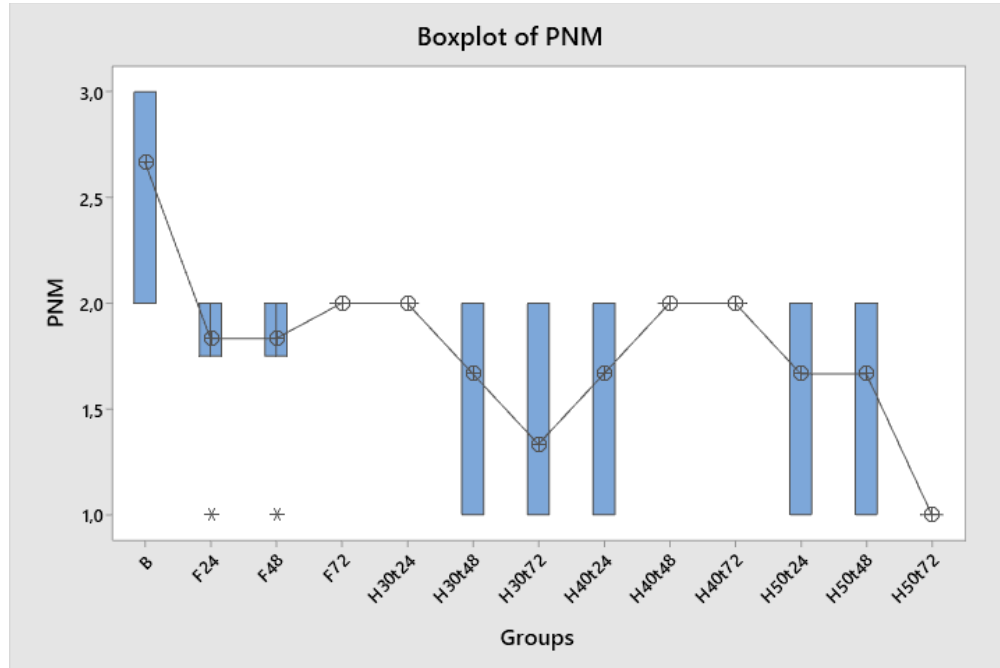
4.5. Pankreas

Pankreas doku örneklerindeki fiksasyon bez epiteli, akıtıcı kanallar ve Langerhans Adacığı dikkate alınarak değerlendirildi (Şekil 4.46-48.). Elde edilen bulgular Tablo 4.5'te gösterildi. Bouin solüsyonu tüm gruplardan sadece nükleer sınırlar bakımından istatistiksel olarak anlamlı derecede ayrıldı. Bunun dışında kalan özelliklere ait skorlar gruplara göre benzerdi. Bu sonuçlara ait görseller Şekil 4.44-45'de sunuldu.

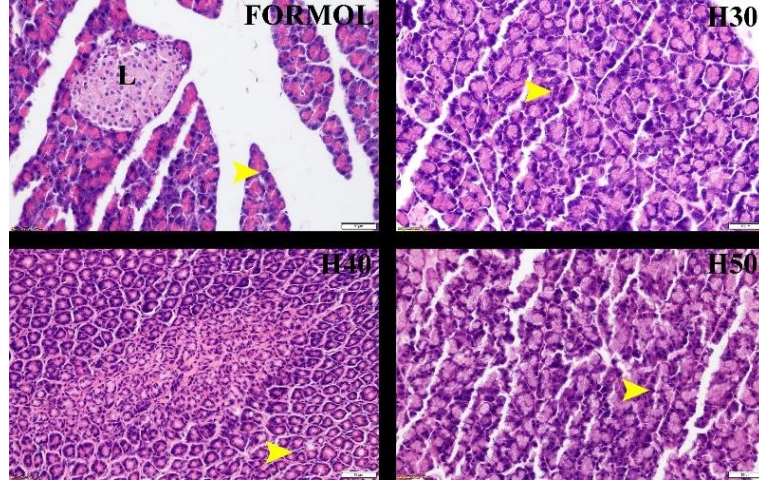
Tablo 4.5. Pankreas doku örneklerine ait median ve p değerleri, B: Bouin, F: Formol, H: Bal (Honey), CM: Hücre Sınırı (Cell Margin), NM: Nükleer Morfoloji (Nükleer Morphology), CP: Sitoplazma (Cytoplasm), EM: Ekstraselüler Matriks (Extracellular Matrix), SQ: Boyama kalitesi (Staining Quality)

Grup	CM	NM	CP	EM	SQ
B	2	3 ^a	2	2	2 ^a
F24	1	2	1	2	1
F48	2	2	2	2	1 ^a
F72	2	2	2	1	1
H30t24	2	2	2	2	2 ^a
H30t48	2	2	2	2	2 ^a
H30t72	1	1	1	2	1
H40t24	1	2	2	1	1 ^a
H40t48	2	2	2	2	2 ^a
H40t72	2	2	2	2	2 ^a
H50t24	1	2	2	2	2 ^a
H50t48	1	2	2	2	1 ^a
H50t72	1	1	1	1	2 ^a
P	0.052	0.012	0.757	0.135	0.012

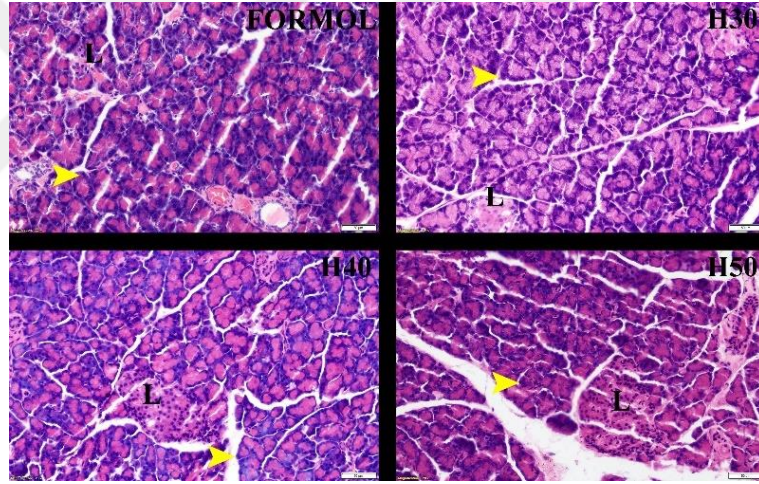
B: Bouin, F: Formol, H: Bal, NM: Nükleer Morfoloji, CM: Hücre Sınırı, CP: Sitoplazma, EM: Ekstraselüler Matriks, SQ: Boyama kalitesi



Şekil 4.44. Pankreas doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği



Şekil 4.47. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen pankreas doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. L: Langerhans adacığı, Ok başı: Asiner hücre, Bar: 50µm



Şekil 4.48. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen pankreas doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. L: Langerhans adacığı, Ok başı: Asiner hücre, Bar: 50µm

4.6. Böbrek

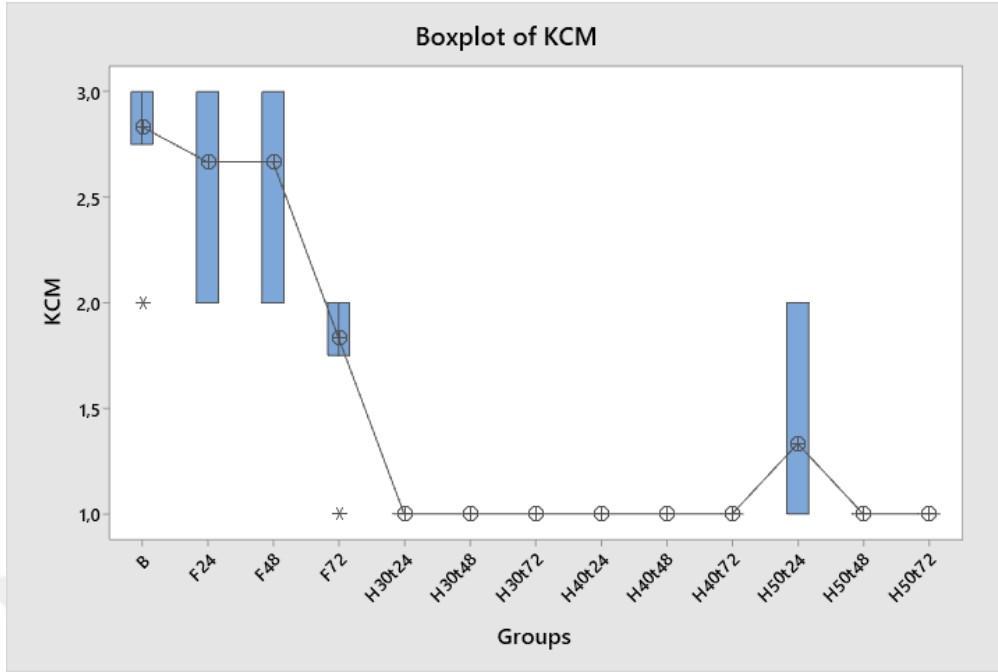
Böbrek doku örneklerindeki fiksasyon Malpighi cisimciğı, proksimal tubul, distal tubul, Henle kulpu ve toplayıcı borucukların yapısı dikkate alınarak değerlendirildi (Şekil 4.54-62.). Elde edilen bulgular Tablo 4.6'da gösterildi. Buna göre Bouin ve Formol fiksasyonlarına ait skorlar pozitif yönde birbirine benzerdi.

Deneme grupları ise negatif yönde ayrıştı. Bu sonuçlara ait görseller Şekil 4.49-53’de sunuldu.

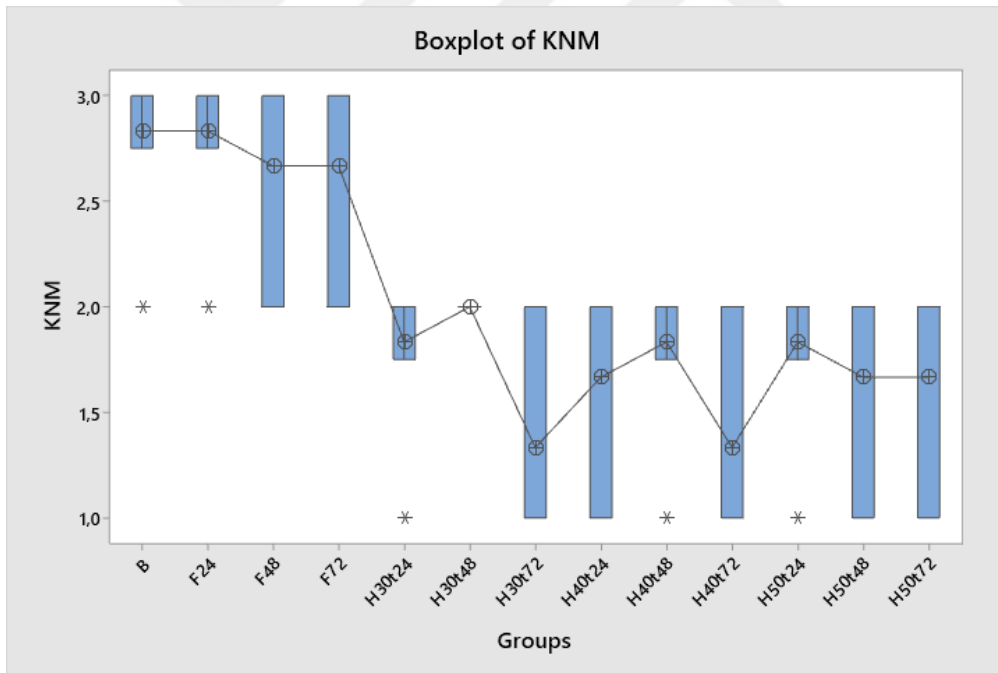
Tablo 4.6. Böbrek doku örneklerine ait median ve p değerleri, B: Bouin, F: Formol, H: Bal (Honey), CM: Hücre Sınırı (Cell Margin), NM: Nükleer Morfoloji (Nükleer Morphology), CP: Sitoplazma (Cytoplasm), EM: Ekstraselüler Matriks (Extracellular Matrix), SQ: Boyama kalitesi (Staining Quality)

Grup	CM	NM	CP	EM	SQ
B	3 ^a	3 ^a	3 ^a	2 ^a	2
F24	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3
F48	3 ^a	3 ^a	3 ^a	3 ^a	2
F72	2	3 ^a	2	3 ^a	2
H30t24	1	2	2	1	2
H30t48	1	2	2	1	1
H30t72	1	1	1	1	1
H40t24	1	2	2	2 ^a	2
H40t48	1	2	2	1	2
H40t72	1	1	1	2 ^a	1
H50t24	1	2	2	2 ^a	2
H50t48	1	2	1	1	1
H50t72	1	2	2	1	2
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020

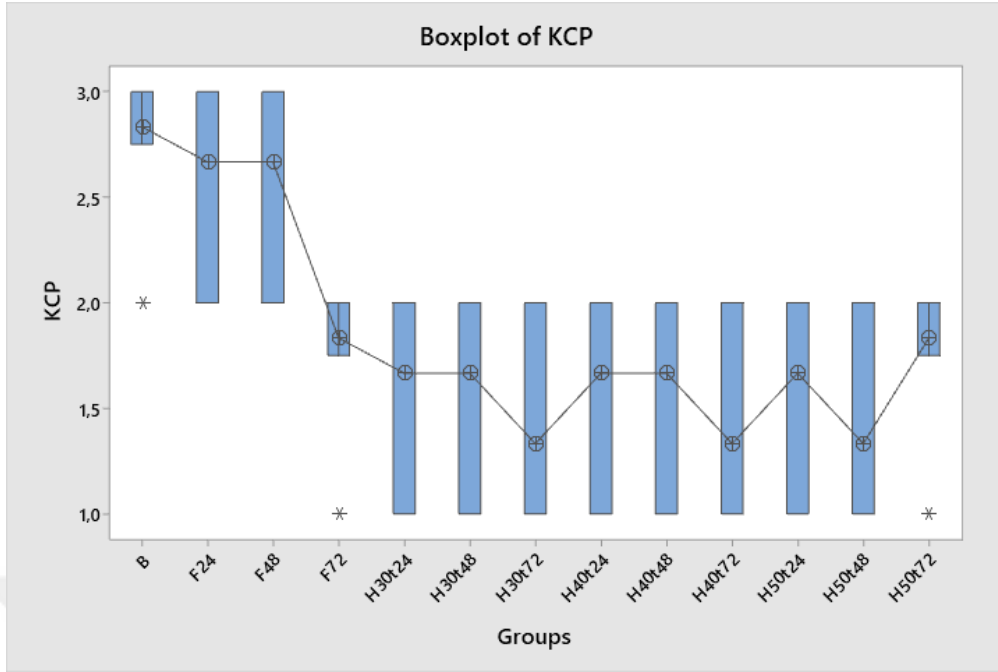
B: Bouin, F: Formol, H: Bal, NM: Nükleer Morfoloji, CM: Hücre Sınırı, CP: Sitoplazma, EM: Ekstraselüler Matriks, SQ: Boyama kalitesi



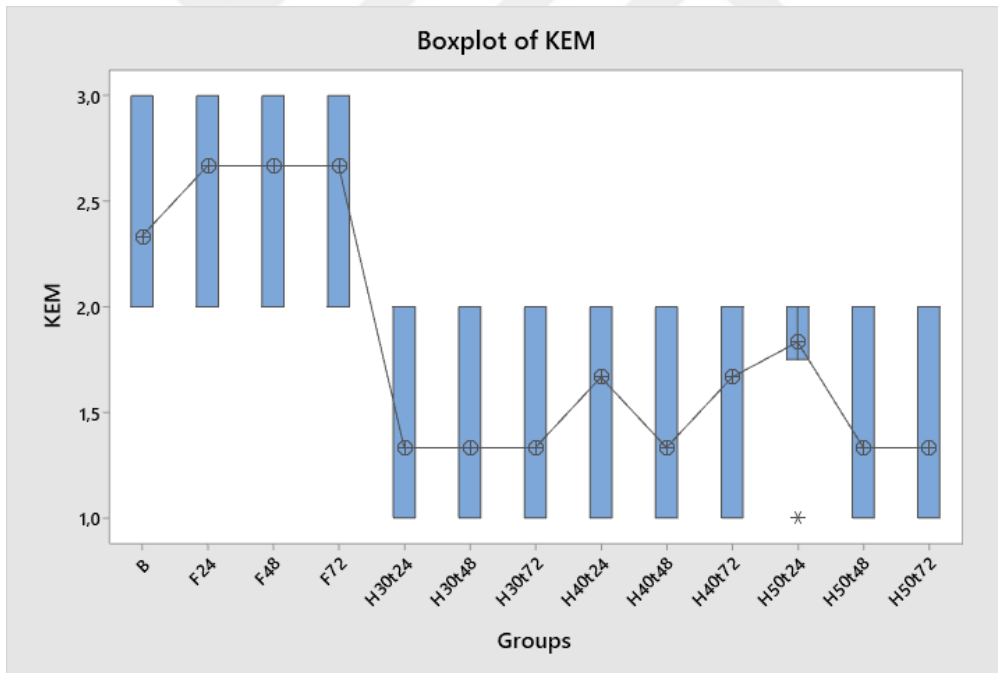
Şekil 4.49. Karaciğer doku doku örneklerinde nükleer sınırlar için kutu grafiği



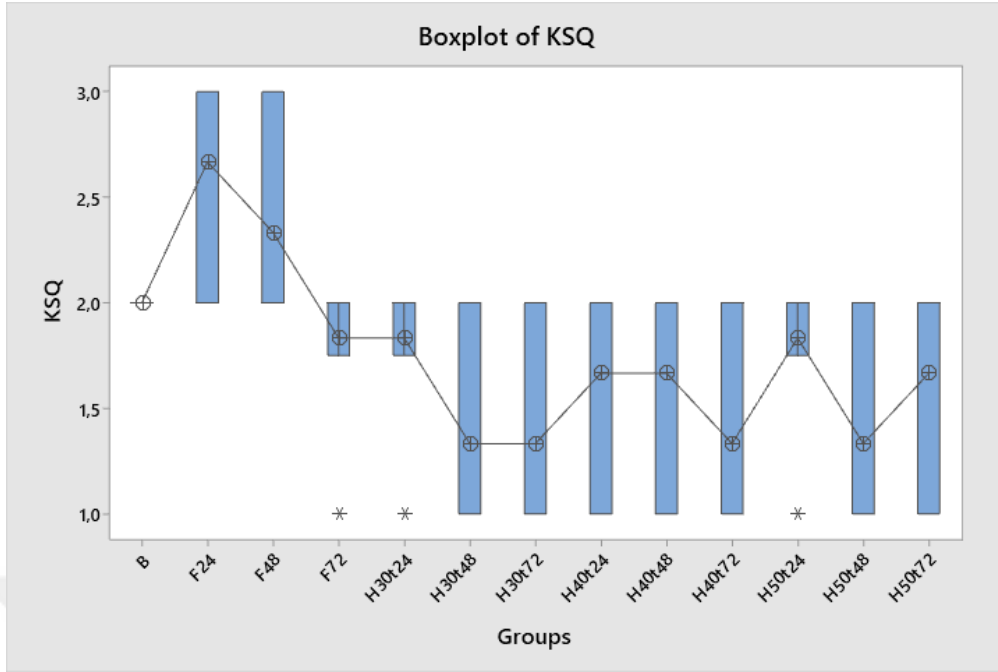
Şekil 4.50. Böbrek doku örneklerinde nükleer morfoloji için kutu grafiği



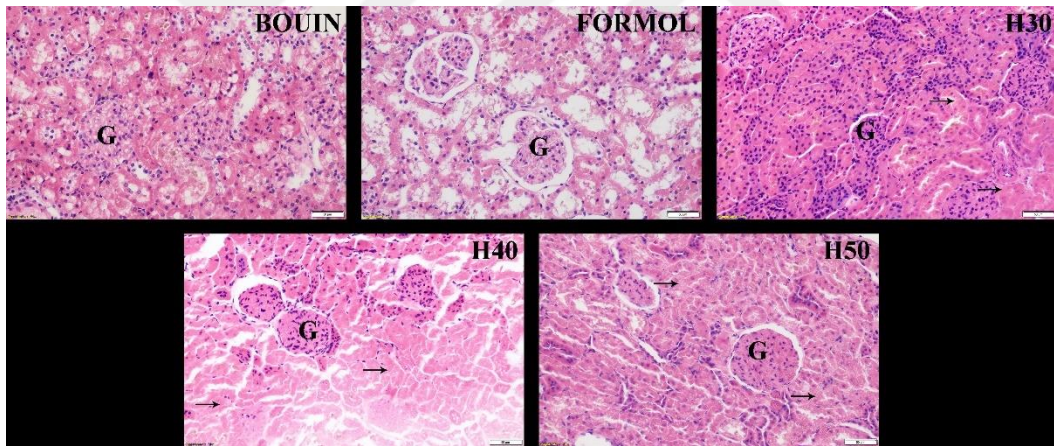
Şekil 4.51. Böbrek doku örneklerinde sitoplazma için kutu grafiği



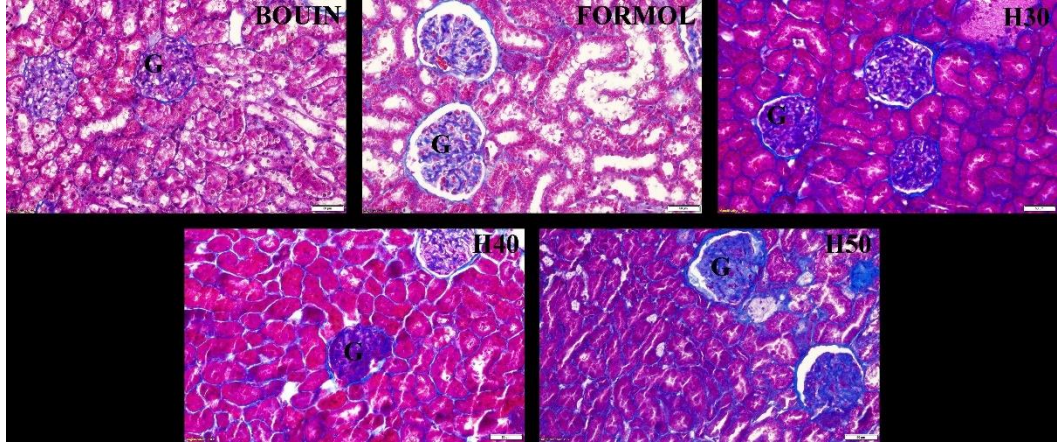
Şekil 4.52. Böbrek doku örneklerinde ekstrasellüler matriks için kutu grafiği



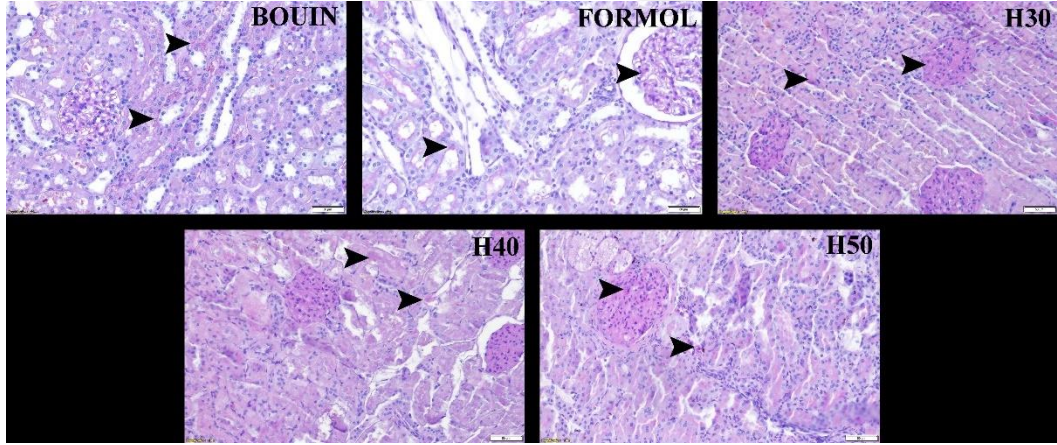
Şekil 4.53. Böbrek doku örneklerinde boyanma kalitesi için kutu grafiği



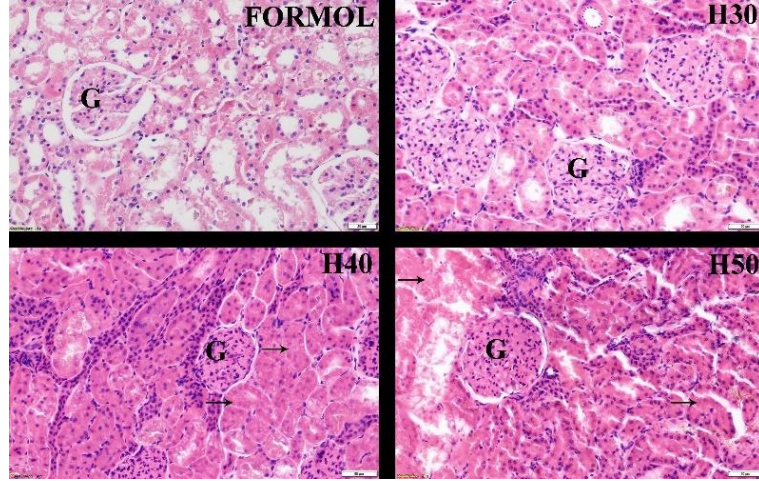
Şekil 4.54. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'luk bal deneme grubu. G: glomerulus, Ok: hücre çekirdeği kaybı, Bar: 50µm



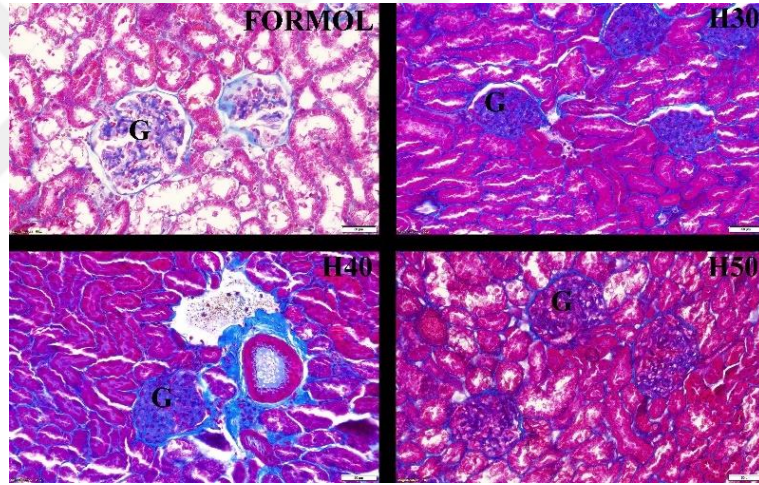
Şekil 4.55. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'lık bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. G: glomerulus, Bar: 50µm



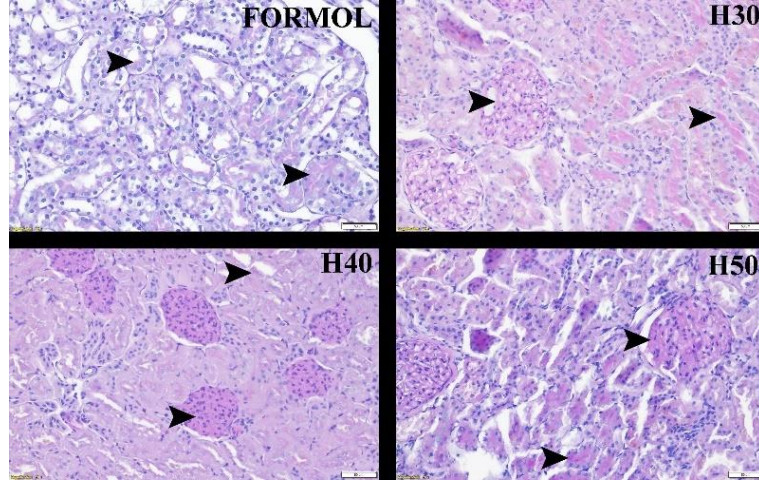
Şekil 4.56. 24 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'lık bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok başı: PAS pozitif alanlar. Bar: 50µm



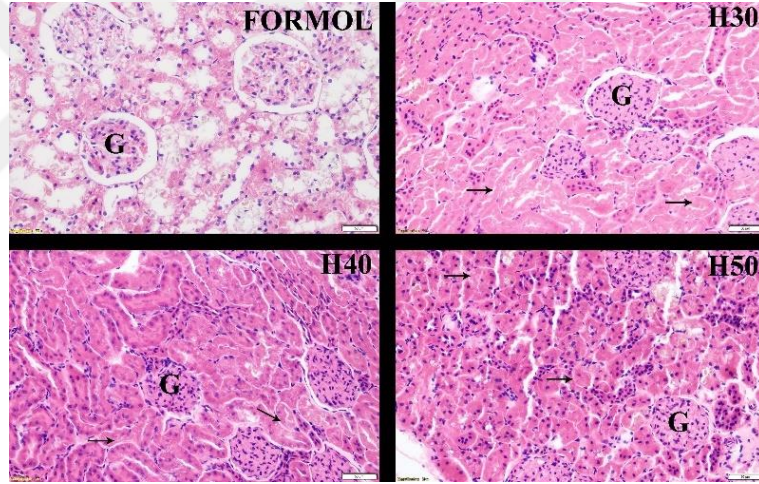
Şekil 4.57. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. G: glomerulus, Ok: hücre çekirdeği kaybı, Bar: 50µm



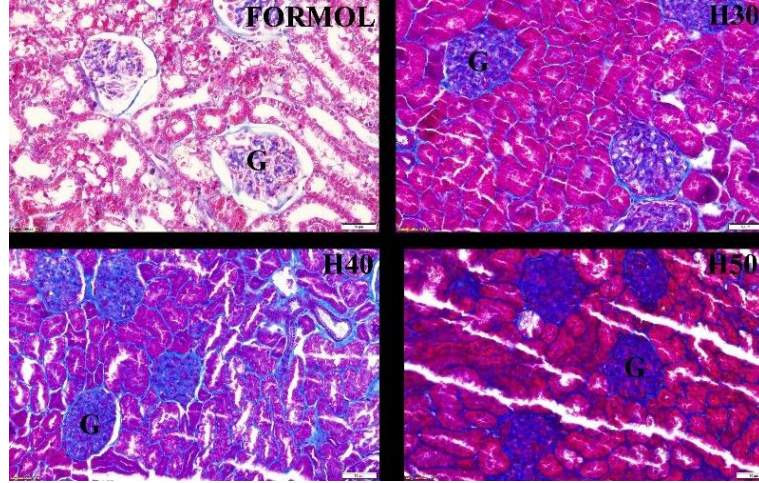
Şekil 4.58. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. G: glomerulus, Bar: 50µm



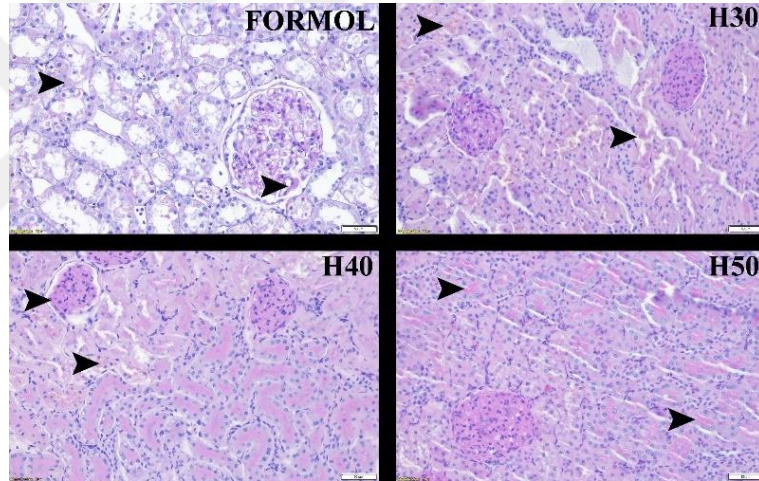
Şekil 4.59. 48 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok başı: PAS pozitif alanlar. Bar: 50µm



Şekil 4.60. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. G: glomerulus, Ok: hücre çekirdek kaybı, Bar: 50µm



Şekil 4.61. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin Masson'un Trichrome boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. G: glomerulus, Bar: 50µm



Şekil 4.62. 72 saat tespit solüsyonlarında bekletilen böbrek doku örneğinin PAS (Periyodik Asit-Schiff) boyanma özellikleri. H30: %30'luk bal deneme grubu, H40: %40'luk bal deneme grubu, H50: %50'lik bal deneme grubu. Ok başı: PAS pozitif alanlar. Bar: 50µm

Çalışmada farklı dokulardan alınan örnekler üzerinde yapılan Masson'un Trichrome ve PAS boyaması sonucunda elde edilen skorlar birlikte değerlendirildi. Bu incelemeye ait veriler Tablo 4.7-8'de sunuldu. Buna göre üçlü boyamada özgüllük ve affinite, PAS boyamada reaksiyon olup olmaması kriterlerine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

Tablo 4.7. Doku örneklerinin Masson'un Trichrome boyaması sonucunu gösteren istatistiksel veriler

Grup		Özgüllük		Affinite	
		Ina	a	Ina	a
B	n	6	12	4	14
	%	33,33	66,67	22,22	77,78
F24	n	5	13	8	10
	%	27,78	72,22	44,44	55,56
F48	n	10	8	8	10
	%	55,56	44,44	44,44	55,56
F72	n	5	13	9	9
	%	27,78	72,22	50	50
H30t24	n	6	12	8	10
	%	33,33	66,67	44,44	55,56
H30t48	n	7	11	7	11
	%	38,89	61,11	38,89	61,11
H30t72	n	4	14	7	11
	%	22,22	77,78	38,89	61,11
H40t24	n	8	10	8	10
	%	44,44	55,56	44,44	55,56
H40t48	n	5	13	7	11
	%	27,78	72,22	38,89	61,11
H40t72	n	8	10	9	9
	%	44,44	55,56	50	50
H50t24	n	7	11	3	15
	%	38,89	61,11	16,67	83,33
H50t48	n	6	12	4	14
	%	33,33	66,67	22,22	77,78
H50t72	n	9	9	4	14
	%	50	50	22,22	77,78

Özgüllük ve affinite için χ^2 (p) değerleri sırasıyla 8,861 (0,715) ve 12,685 (0,392).

Tablo 4.8. Doku örneklerinin PAS boyaması sonucunu gösteren istatistiksel veriler.

Grup		Ina	a
B	n	5	13
	%	27,78	72,22
F24	n	9	9
	%	50	50
F48	n	8	10
	%	44,44	55,56
F72	n	10	8
	%	55,56	44,44
H30t24	n	8	10
	%	44,44	55,56
H30t48	n	2	16
	%	11,11	88,89
H30t72	n	12	6
	%	66,67	33,33
H40t24	n	11	7
	%	61,11	38,89
H40t48	n	8	10
	%	44,44	55,56
H40t72	n	7	11
	%	38,89	61,11
H50t24	n	6	12
	%	33,33	66,67
H50t48	n	7	11
	%	38,89	61,11
H50t72	n	7	11
	%	38,89	61,11

χ^2 (p): 18,336 (0,106)

5. TARTIŞMA

Fiksasyon, histolojik veya histopatolojik prosedürlerin uygulanması için anahtar rol oynayan bir işlemdir. Bu işlem laboratuvarlarda genellikle “altın standart” olarak bilinen %10 formolle yapılmaktadır (Moelans ve ark., 2011). Formolün en iyi fiksatif olduğu ve bu nedenle herhangi bir nedenle alternatifine gerek olmadığı konusundaki genel bir fikir birliği literatür (Zanini ve ark., 2012) tarafından “dogma” olarak tanımlanmıştır. Formaldehite maruz kalmanın insan nazofaringeal karsinomu ve lösemiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (IARC, 2012). Formaldehitin kanserojen olduğuna ilişkin veriler, “formol dogmasını” yeniden düşünmek ve alternatif fiksatiflerin kullanımını değerlendirmek için önemli görünmektedir (Zanini ve ark., 2012). Bu görüşlerden hareketle çalışmamızda formaldehite alterantif bir fiksatif arayışı amacıyla farklı doku karakterlerine sahip organlarda bal, etil alkol ve sitrik asitten oluşan solüsyonların etkinliği araştırıldı. Literatür taramasında balın tek başına veya distile sulu çözeltilerinin fiksatif amaçlı kullanıldığı çalışmalar bulunmasına rağmen, araştırmamızda deneme grubu olarak yer alan alkol ve sitrik asit ilaveli bir bal solüsyonunun kullanıldığı veriye ulaşılamamıştır. Bu bakımdan araştırmamız ilk olma özelliği taşımaktadır. Bunun yanında literatürde formol ve Bouin fiksatiflerinin etkinliğinin farklı organlarda istatistiksel olarak karşılaştırıldığı bir araştırmaya da rastlanılmaması araştırmamızın baş bir pozitif yönü olarak değerlendirilmektedir. Ancak bu iki yenilikçi yaklaşım verilerin literatür eşliğinde kıyaslanması için sınırlama (limitation) oluşturmaktadır.

Gatta ve ark. (2012) çalışmasında farklı fiksatiflerin etkinliğini araştırmıştır. Bu çalışmanın ışık mikroskopik değerlendirmelerinde Bouin fiksativi ile tespit edilmiş dokularda çekirdekçik içinde daha yüksek kromatin çözünürlüğü görülürken, nükleer matris arka planının daha hafif boyandığı belirtilmiştir. Hematoksilen yoğunluğunun Bouin, UPM ve Cymol fiksasyonunda diğer gruplardan istatistiksel olarak önemli ölçüde düşük olduğu bildirilmiştir. Eozin yoğunluğu ise tüm alternatif fiksatiflerde formole göre daha fazla bulunmuştur (Gatta ve ark., 2012). Çalışmamızda ise büyük oranda Bouin fiksatifinin diğer gruplardan fiksasyon etkinliği bakımından daha pozitif bir etki oluşturduğu gözlemlendi. Ancak pankreas doku örneklerinde diğer fiksatiflere göre Bouin fiksatifinin de tam anlamıyla etkin bir fiksasyon oluşturamadığı saptandı.

Patil ve ark. (2013) pozitif kontrol olarak %20 bal, %20 şeker şurubu, %30 jaggery şurubu ile %10 formol ve negatif kontrol olarak distile su gibi farklı fiksatiflerin etkinliğini incelemek için keçi bukkal mukozasını kullanarak bir çalışma yürütmüştür. Bu çalışma sonucunda ise üç doğal fiksatif arasında en etkili fiksatifin jaggery şurubu olduğu vurgulanmıştır. Lalwani ve ark. (2015) farklı doku örnekleri üzerinde %10 işlenmemiş bal, %10 işlenmiş bal ve %10 nötral formolün fiksatif özelliklerini araştırmışlardır. Bu araştırmada doku örnekleri fiksasyondan sonra rutin prosedüre göre takip edilmiş ve boyanmıştır (HxE). Çalışma sonucunda doku örnekleri nükleer boyama bakımından değerlendirildiğinde işlenmiş bal, işlenmemiş bal ve NBF için optimum fiksasyon ve boyama etkinliğinin ortaya çıktığı belirtilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada (Lalwani ve ark. 2015) işlenmiş balın, işlenmemiş baldan daha iyi fiksasyon özelliğinde olduğu ve her iki bal türünün de formaldehite etkili bir alternatif olabileceği kanaatine varılmıştır. Chitemsetti ve ark. (2018) bir tür şeker olan jaggery ve khandsari'nin fiksatif olarak formol'e alternatif olup olamayacağını araştırmıştır. Bu amaçla araştırmacılar %30 jaggery, %30 khandsari ve %10 formol'de 30'ar doku örneğini tespit etmişlerdir. Doku örnekleri hücresel sınırlar, sitoplazmik ve nükleer detaylar, boyama kalitesi ve genel morfoloji açısından değerlendirilmiştir. Üç gruptaki tüm histomorfolojik kriterlere göre yapılan istatistiksel analizde ise %30 jaggery ile %30 khandsari, %30 jaggery ile %10 formol arasında anlamlı bir fark bulunurken, %30 khandsari ile %10 formol arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Chitemsetti ve ark. 2018). Ekiz ve Demiraslan (2021) koyun kalbi üzerinde farklı oranlarda hazırlanmış bal, etil alkol, gliserin, sitrik asit ve lavanta esansı solüsyonunun kadavra koruyucu etkinliğini incelemiştir. Bu araştırma kapsamında deneme gruplarından solüsyona maruz bırakıldıkları 3. gün, 75. gün, 150. gün ve 225. günde histolojik, mikrobiyolojik, tekstür, renk ve koku yönünden değerlendirmeler yapılmıştır. Çalışma bulguları arasında histolojik yapının formaldehit tespitine yakın oluşu, patojen mikroorganizma üremesinin olmadığı, hoş olmayan bir kokunun ortaya çıkmadığı vurgulanmıştır (Ekiz ve Demiraslan, 2021). Alwahaibi ve ark. (2021) çalışmasında nötr tamponlu ve tamponsuz Sümer balı (%10) ve Hurma balını (%10) ayrı ayrı fiksatif özellikler bakımından araştırmışlardır. Ayrıca nükleer ve boyanma kalitesine göre gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı vurgulanmıştır. Buna karşılık %10 nötr tamponlu Sümer balı, %10 nötr tamponlu Hurma balı, %10 Sümer balı ve %10 Hurma

balının sitoplazmik boyanma açısından anlamlı farklılıklar oluşturduğu rapor edilmiştir. Navaz ve ark. (2023) bal, Carnoy, Bouin ve Zenker solüsyonunun fikzasyon etkilerini hematoksilin, eozin, Masson Trichrome ve PAS boyaması kullanarak formolle karşılaştırmışlardır. Doku kesitleri nükleer ve sitoplazmik ayrıntılar ile boyama kalitesi açısından incelenmiştir. Sonuçta bal, Carnoy ve Bouin solüsyonlarında fikse edilen dokuların formole alternatif olabileceği bildirilmiştir. Bright ve ark. (2023a) farklı oranlardaki bal ve distile sudan oluşan solüsyonlarla formolü karaciğer ve böbrek doku örneklerinde hematoksilin, eozin boyama yöntemiyle kıyaslamışlardır. Bal solüsyonları ile formol fikzasyonu karşılaştırıldığında boyama özelliklerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilememiştir. Bunun yanında %25 ve %50 bal gruplarında böbrek doku örneklerinde sitoplazma perforasyonları görülmüştür. Sonuç olarak çalışmada %50, %75 ve %100 balın dokuların uzun süreli korunması için uygun olduğu ve ayrıca dokularda mükemmel nükleer boyanma sağladığı bildirilmiştir. Bright ve ark. (2023b) %65 ve %85 hurma ve bal fiksatifleri için formolle sabitlenmiş muadilleriyle karşılaştırıldığında boyama özelliklerindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı olmadığını vurgulamıştır ($p=0,210$). Ancak %45'lik hurma şurubu ile %10'luk formol karşılaştırıldığında berraklık ve morfoloji açısından istatistiksel olarak anlamlı farklar tespit etmiştir ($p=0,0026$). Araştırmacılar bal ve hurma şurubunun %65 ila %85 arasındaki daha yüksek bal konsantrasyonlarının, doku ve organların uzun vadede genel olarak korunması için uygun olduğu sonucuna varmışlardır. Demiraslan ve ark. (2024) bal, etil alkol, sıvı parafin, distile su ve sitrik asit içeren bir çözeltinin tavşan kadavraları için fiksatif-prezervatif etkiye sahip olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmanın histomorfolojik sonuçlarına göre böbrek ve bağırsak dışındaki dokuların formolle karşılaştırılabilir nitelikte olduğu belirtilmiştir. Yukarıda verilen literatür bilgisinden de anlaşılacağı üzere doğal ürünlerin formole alternatif bir fiksatif oluşturup oluşturamayacağı araştırılmıştır. Bu çalışmaların ortak yönü yüksek basit karbonhidrat içeriği olan ürünlerin kullanılmasıdır. Ancak daha etkili bir çıkarım ise bu ürünlerin optimize edildiği takdirde formole alternatif olarak kullanılabileceği yönündedir. Çalışmamızda ise farklı bir bakış açısıyla balın distile su ile dilüe edilmesi yerine fiksatif özelliği bilinen etanol ile çözelti haline getirip kullanılması hedeflendi. Bunun yanında deneme solüsyonlarına balın kristalizasyonunu önlemek ve hidrojen

peroksiti deokside etmek amacıyla antioksidan özelliği bilinen sitrik asit ilave edildi. Sonuçta çalışmamızda böbrek hariç diğer doku örneklerinde Bouin fiksativ ve formole alternatif olabilecek bulgular elde edildi. Dolayısıyla etanol ve sitrik asit ilaveli bal solüsyonları da yukarıda verilen literatüre uyumlu olarak formole alternatif bir fiksativ olarak kullanılabileceği kanaati oluştu.

Farklı fiksativlerin kullanıldığı bir çalışmada (Gatta ve ark. 2012) formol ile tespit edilmiş ve PAS ile boyanmış bronş duvarının mikroskopik incelemesinde iyi boyanma ve net kıkırdak tanımlaması saptandığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada Bouin ile fikse edilen dokuda PAS boyamanın çok yoğun olduğu belirtilmiştir. Formolle tespitli dokularda Masson'un Trichrome boyamanın renk, kontrast ve pozitiflik açısından iyi sonuçlar verdiği ifade edilmiştir (Gatta ve ark., 2012). İnsan ağız dokularında bal ve formolün karşılaştırıldığı bir araştırmada nükleer ve sitoplazmik detaylar ile boyamada anlamlı bir farklılığın gözlenmediği, ancak bağ dokusundaki homojenizasyonla ilgili bir sınırlamanın varlığı belirtilmiştir (Sabarinath ve ark., 2014). Jaggery ve balın 6 aylık süre boyunca uzun vadeli etkinliğini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada PAS ve Masson Trichrome gibi özel boyalar kullanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda üç fiksativin de formole eşdeğer sonuçlar gösterdiği vurgulanmıştır (Patil ve ark., 2015). Çalışmamızda da karaciğer, böbrek ve dil doku örneklerinin farklı solüsyonlarla tespit edilmesiyle elde edilen kesitlerde PAS ve Masson Trichrome boyamanın etkinliği karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre bu iki boyama prosedüründe gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca rastlanmadı. Dolayısıyla bu haliyle iki histokimyasal boyama için de bal, etanol ve sitrik asitten oluşan solüsyonun formol ve Bouin için bir alternatif olabileceği söylenebilir. Bunun yanında Bright ve ark. (2023a) %10 nötr tamponlu formole kıyasla balın koyu renginden dolayı boyanma yoğunluğunun daha belirgin olduğunu saptamıştır. Bu durum ise %25'lik bal grubunda optimum olarak gözlenmiştir. Çalışmamızda da deneme gruplarında istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte gözle görülür derecede boyanma affinesi artışı saptandı.

Fiksasyon süresi fiksativin etkinliğinde rol oynayan önemli bir faktördür. Formolle biyopsi boyutundaki doku örnekleri 5-6 saat, bundan daha büyük doku örnekleri ise 12-24 saatlik sürede tespit edilebilir (Pabuççuoğlu, 2021; Nowacek, 2010). Bouin fiksativiyile örnekler genellikle 24 saatte tespit edilir. Bu asidik karışımda

uzun süreli depolama, hidrolize ve boyanabilir DNA ile RNA'nın kaybına neden olur (Nowacek, 2010). Çalışmamızda fiksasyon süresiyle ilgili farkları da anlamak amacıyla 24 saat ve katları olacak şekilde 3 periyotta doku örnekleri incelendi. Bouin fiksatifinde hidrolizden dolayı sadece 24 saatlik fiksasyon uygulandı. İlk 24 saatlik solüsyon grupları karşılaştırıldığında sırasıyla beyin, dil ve karaciğerin histomorfolojik özellikleri bakımından Bouin ve deneme gruplarında benzerlikler saptandı. Beyin doku örneklerinin formolle fiksasyonu ise tüm periyotlarda bu gruplara göre daha zayıf nitelikteydi. Diğer açıdan 48 ve 72 saatlik periyotlar için beyinde bal grupları, karaciğer ve böbrekte ise formol daha kabul edilebilir sonuçlar ortaya koydu. Diğer organlarda formol ve deneme gruplarının histomorfolojisi benzerdi.

Bright ve ark. (2023b) çalışmasında doğal bileşiklerin (bal, hurma şurubu) %45'likten daha düşük konsantrasyonlarının mükemmel doku boyama özellikleri sağladığını ifade etmiştir. Düşük konsantrasyonlarda (%45 ve %65) bal ve hurma şurubu, yakın gelecekte formol kullanımının azaltılmasına ve ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilecek alternatifler olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır. Maaini ve Bryant (2006), balı fiksatif olarak kullanarak balın oda sıcaklığında düşük konsantrasyonlarla fikse edilen dokuların formol ile karşılaştırılabilir sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda da farklı konsantrasyonlarda bal içeren etanol ve sitrik asit içerikli deneme solüsyonlarının fiksatif etkisi araştırıldı. Buna göre beyin, böbrek ve dil dokuları için bal konsantrasyonu artışının fiksasyon üzerine etkili olduğu ile ilgili net bir sonuca ulaşılamadı. Buna karşın karaciğer dokusu için bal konsantrasyonu artışının kısmen negatif, pankreas için pozitif etkisinin olduğu ifade edilebilir.

Balın farklı formlarda fiksatif etkisini araştırmak amacıyla yapılan bazı çalışmalardan elde edilen bilgiler Tablo 5.1'de sunulmuştur. Bu çalışmalarda da ortak noktanın, balın formaldehite alternatif olabileceği ancak, dezavantaj nitelikteki sınırların ortadan kaldırılması gerekliliği olduğu göze çarpmaktadır.

Tablo 9Tablo 5.1. Balın fiksatif olarak araştırıldığı bazı çalışmalar (Thamilselvan ve ark., 2021)

Araştırmacı	Fiksatif	Bulgular	Sonuç	Sınırlar
Bhattacharyya ve ark. 2018	% 100 Bal, 10 % NBF	Nükleer detaylar ve sitoplazmik boyama için bal ve formol arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar var.	Formol yerine benzer sonuçlar veren çevre dostu doğal fiksatif bal kullanılabilir.	•Zamanla küflenme •Yoğun eozi boyama • Kesitlerin katlanması
Patil ve ark. 2013	% 20 Bal, % 10 NBF, Distile su	Sitoplazmik ayrıntılar ve nükleer ayrıntılar tatmin ediciydi ancak düzensiz boyama alanları gösterdi. Bal, dokuyu 24 saat boyunca koruyabildi.	Çevre dostu doğal fiksatifler formolün yerini alacak tüm yeni niteliklere sahiptir.	•Zaman içinde küflenmeye meyilli, dolayısıyla timol kullanılabilir
Patil ve ark. 2015	% 20 Bal, % 10 NBF, 6 ay süreli saklama	Hücrel ve nükleer berraklık, formole kıyasla belirgin hücrel ve nükleer büzülme ile kademeli olarak azaldı. Bununla birlikte, 6 ayın sonunda bal H&E boyaması için iyi kalitede sonuç vermiştir.	48 saat formol fiksasyonu, bal ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha iyi sonuçlar verdi. Bal ile sabitlenen dokular bir süre içinde yavaş yavaş bozulduğu için fiksasyon kalitesi garanti edilememiştir.	• Belirli bir süre içinde kalıpların büyümesi •Kırılganlık nedeniyle kırılma eğiliminde olduklarından balın kesilmesi sırasında özel dikkat gösterilmesi gerekir.
Srii ve ark. 2017	% 10 Bal, % 10 NBF	Formol veya balla fikse edilmiş dokularda önemli bir fiksasyon farkı belirlenmemiştir.	Balın yeni nitelikleri göz önüne alındığında, düşük konsantrasyonlarda formol kullanımını azaltmaya ve ortadan kaldırmaya yardımcı olabileceği sonucuna varılmıştır.	Bal ile sabitlenmiş dokular, H&E boyama ve özel boyamalarda kolajen liflerinin daha hyalinize görünümünü sergiledi.
Udonkang ve ark. 2018	% 20, % 50, % 70, % 90, % 100 Bal, % 10 NBF	%100, %90, %70 konsantrasyonlar, doku morfolojisinin orta derecede korunmasıyla iyi, yoğun ve berrak nükleer ve sitoplazmik boyama bulguları ortaya koymuştur.	%70 – 100 bal, uzun süreli brüt muhafaza için uygun bulunmuştur. %20-50 konsantrasyonlar ise mükemmel boyama özellikleri vermiştir.	Belirtilmemiştir.
Srii ve Marla. 2016	% 10 Bal, % 4 NBF	Formol veya balla fikse edilmiş dokularda önemli bir fiksasyon farkı belirlenmemiştir.	Balda sabitlenen dokular, formole kıyasla tatmin edici sonuçlar göstermiştir.	Belirtilmemiştir.
Sabarinath ve ark. 2014	Belirtilmemiş bal, % 10 formol	Bulgular, hem nükleer ayrıntılar hem de sitoplazmik boyama için bal ve formol arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar göstermiştir.	Balın, nükleer bir fiksatif amacıyla formole alternatif olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.	Bağ dokusunun homojenizasyonu
Ozkan ve ark. 2011	% 10 Bal, % 10 NBF (alkolik)	Sonuçlar, alkollü formol bal veNBF arasında önemli farklılıklar göstermiştir. Bal ile fikse edilmiş dokular, zayıf nükleer ve sitoplazmik detaylar ancak daha iyi hücrel morfoloji ortaya koymuştur	Bal fiksasyonu, neredeyse NBF ve alkollü formol ile benzer olduğu sonucu elde edilmiştir.	Belirtilmemiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Laboratuvar çalışanları seyreltik bir formaldehit çözeltisine maruz kaldıklarından dolayı fiksasyon için formol kullanılmasından kaynaklı olası tehlikeleri genellikle hafife almaktadır (Gatta ve ark., 2012). Ancak maruziyet periyodik ve büyük miktarlarda olduğundan kimyasal kanserojen olarak formaldehit riski hafife alınmamalıdır (Binetti ve ark., 2006; Lassalle ve ark., 2009; Stanta ve ark., 2006). Ayrıca, literatür DNA protein çapraz bağlarının formole maruz kalmasıyla kalıcı bir “imza” taşıyabileceğini öne sürmüştür (Shaham ve ark., 2003). Bununla ilgili olarak sağlık çalışanlarında kromozomal değişiklikler tespit edilmiş ve bu durum patoloji servislerindeki formol kullanımıyla ilişkilendirilmiştir (Santovito ve ark., 2011). Bu nedenle laboratuvar çalışanları için daha iyi teknik performans ve daha fazla koruma sağlayan formol fiksasyonuna alternatif arayışı kaçınılmazdır (Buesa, 2008). Son zamanlarda bilim insanları formaldehitin zararlı etkilerini fark etmişler ve yeni fiksasyon-prezervasyon çözeltileri geliştirmeye odaklanmışlardır (Nielsen ve ark. 2013).

Fiksasyon, histolojik veya histopatolojik prosedürlerin hayata geçirilmesinde kilit rol üstlenir. Fiksasyon metotlarının birbirlerine göre farklı derecede üstün yönleri olduğu gibi farklı fiksatiflerin de birbirlerine göre avantajı veya dezavantajı bulunur. Fiksasyonu veya fiksatifin doku üzerindeki etkisini ise sıcaklık, pH, konsantrasyon gibi değişik faktörler etkiler. Eğer kimyasal fiksatifler sayesinde doku tespiti yapılacaksa dokunun büzüşmesine neden olmayan, kesit almayı kolaylaştıran, dokunun histomorfolojik yapısını değiştirmeden koruyan, kesitlerin boyanmasını kolaylaştıran ve dokuyu sonrasında yapılacak çalışmalara uyumlu hale getiren bir fiksatif tercih edilmelidir (Tu ve ark., 2011). Ancak tüm bu istenilen özellikleri araştırmacılara sunabilen bir fiksatif henüz geliştirilememiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda Bouin ve formole ait referans histomorfolojik bilgiler sunulmasının yanında, bal, etanol ve sitrik asitten oluşan solüsyonun yaygın kullanılan fiksatiflere alternatif olabileceği ile ilgili bulgular elde edildi. Özellikle %40 bal içeren solüsyonun standardize edildiği takdirde bu yönde bir adım önde olduğu

düşünülmektedir. Yeni fiksatif araştırmaları için çalışmamızdan elde edilen tecrübelerle göre önerilerimiz aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

Öneriler:

- Bal veya doğal ürünlerin kullanılacağı fiksatiflerden oluşacak solüsyonun pH'sı tamponlanabilir.
- Araştırmanın detaylandırılabilmesi amacıyla imkanlar ölçüsünde renk ve kontrast analizi için bilgisayar programlarından faydalanılabilir.
- Böbrek ve pankreas gibi fiksasyonu zor olan dokular için fiksatifin penetrasyonunu kolaylaştırabilecek uygulamalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

Albert SB, Johnson A (1998). *Essential Cell Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing Inc.

Al-Somai N, Coley KE, Molan PC, Hancock BM (1994). Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of Manuka Honey. *Russ. Med. J.*, **87**, 9-12.

Alwahaibi N, Dhahli BA, Issaei HA, Wahaibi LA, Sinawi SA (2021). Efficiency of neutral honey as a tissue fixative in histopathology. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.04.27.437988v1.article-metrics>

Al-Waili NS, Salom K, Butler G, Al Ghamdi AA (2011). Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. *J. Med. Food.*, **14**, 1079-1096.

Ananthanarayanan V, Pins MR, Meyer RE, Gann PH (2005). Immuno-histochemical assays in prostatic biopsies processed in Bouin's fixative. *J. Clin. Pathol.*, **58**, 322–324

Avwioro G, Bankole J, Iyiola S, Avwioro T, Ankinola G (2010). One of the properties of honey in wound healing is prevention of autolysis. *Pharm. Lett.* **2**, 321–325.

Baker JR (1958). Fixation in cytochemistry and electron-microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, **6**, 303–308.

Bancroft JD (1990). *Theory and practice of histological techniques*. Edinburg: Churchill Livingstone, p: 31-74.

Bancroft JD, Gamble M (2019). *Theory and practice of histological techniques*. 8th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2019; 40–108

Bancroft JD, Stevens A (2008). *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, p: 72-82.

Bhattacharyya A, Gupta B, Singh A, Sah K, Gupta V (2018). Probing natural substitute for formol: Comparing honey, sugar, and jaggery syrup as fixatives. *Natl. J. Maxillofac. Surg.*, 2018, **9**, 14-21.

Bibbo M (1997). *Comprehensive Cytopathology*. 2nd ed., Philadelphia: W. B. Saunders, p: 889-900.

Binetti R, Costamagna FM, Marcello I (2006). Development of carcinogenicity classifications and evaluations: the case of formaldehyde. *Ann. Ist. Super Sanita*, **42**, 132-43.

Brenner E (2014). Human body preservation – old and new techniques, *J Anat.*, **224**, 316-344.

Bright OA, Albert OS, Michael AK, Perez Q, Dorcas OO, Ama AM, Josephine OT, Elisha MA, Godfred BA, Josephine AA, Sowah AC, Pokuaa AMK (2023a). A Comparative Study of the Fixative Properties of Honey and Formol. *Diagnos. Pathol. Open.*, **8**, 209.

Bright OA, Albert OS, Michael AK, Perez Q, Dorcas OO, Ama AM (2023b). Honey and date syrup as natural alternatives to formol in the demonstration of connective tissue. *J. Histol. Histopathol. Res.*, **7**, 1-9.

Bryan N and Ivy J (2015). Inorganic nitrite and nitrate: evidence to support consideration as dietary nutrients. *Nutr. Res.*, **35**, 643-654.

Buesa RJ (2008). Histology without formol? *Ann. Diagn. Pathol.*, **12**, 387-396.

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.

Chang YT, Loew GH (1994). Reaction mechanisms of formaldehyde with endocyclic imino groups of nucleic acid bases. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 3548–3555

Chittemsetti S, Nallamala S, Sravya T, Guttikonda VR, Manchikatla PK, Kondamari S (2018). Natural substitutes for formol: A boon to histopathology!! *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, **22**, 143.

Clark RP (1983). Formaldehyde in pathology departments. *J. Clin. Pathol.*, **36**, 839-846.

Cook HC (1990). Carbonhydrates. *The Theory and Practice of Histological Techniques*. Editör: Bancroft JD, Stevens, A. The Bath. Press. Avon. Sayfa: p:177-213.

Culling CFA (1985). *A Handbook of histopathological and histochemical techniques*. 4th ed. London: Butterworth Publication, p: 27–77

Demir R (2001). *Histolojik boyama teknikleri başvuru kitabı*. 1. Baskı, Palme yayıncılık: p: 40-200.

Demiraslan Y, Gürbüz İ, Özbek M, Şahan Yapicier Ö, Karaca H, Özel Ö, Öner H (2024). Cadaver preservative properties of a solution composed of honey, ethyl alcohol, liquid paraffin, distilled water and citric acid: Experiments on rabbit cadavers. *Anat. Histol. Embryol.*, **53**, e13032.

EAEVE (2010). Staying in Touch. 1st edn. Available at: <http://www.eaeve.org/publications/newsletter.html>

Ekiz R and Demiraslan Y (2021). Investigation of cadaver preservative properties of solutions obtained with a mixture of honey and ethyl alcohol in different proportions: a pilot study on sheep heart. *Veterinaria*, **70**, 229-43

Eltoum I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle W (2001b). Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J. Histotechnol.*, **24**, 173-190.

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. *J. Histotechnol.*, **24**, 201-210.

European Parliament and Council (1998). Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market. 98/8/EC, Brussels.

Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP (1985). Formaldehyde Fixation. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 845–853.

Gatta LB, Cadei M, Balzarini P, Castriciano S, Paroni R, Verzeletti A,

Gbadamosi MT (2014). Comparative Study of the Effect of Table Salt in 10 % Formal Saline and Saturated Sodium Chloride Solution as Tissue Fixatives. Master tesis, Department of Human Anatomy Faculty of Medicine, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria.

Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 5870–5877.

Grizzle WE, Fredenburg JL, Myers RB (2008). *Fixation of tissues*. In: Bancroft JD, Gamble M(eds). *Theory and Practice of Histological Techniques*, 8th ed., John Canelon (UK): Kathleen Neely (USA), p: 53-74.

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.

Halawani E and Shohayeb M (2011). Survey of the antibacterial activity of Saudi and some international honeys. *J. Microbiol. Antimicrob.*, **3**, 94-101.

Hammer N, Löffler S, Feja C, Sandrock M, Schmidt W, Bechmann I, Steinke H (2012). Ethanol–glycerin fixation with thymol conservation: a potential alternative to formaldehyde and phenol embalming. *Anat. Sci. Educ.*, **5**, 225–233.

Hayashi S, Homma H, Naito M, Oda J, Nishiyama T, Kawamoto A, Kawata S, Sato N, Fukuhara T, Taguchi H, Mashiko K, Azuhata T, Ito M, Kawai K, Suzuki T, Nishizawa Y, Araki J, Matsuno N, Shirai T, Qu N, Hatayama N, Hirai S, Fukui H, Ohseto K, Yukioka T, Itoh M (2014). Saturated salt solution method: a useful cadaver embalming for surgical skills training. *Medicine*, **93**, e196.

Hewitson TD, Darby IA (2010). *Histology Protocols*. 2nd ed., New York: Humana Press, pp: 1-40.

Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, Goralski TJ, Langmore JP, Raja RG, Williams PM, Palma JF, Warrington JA (2008). Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formol-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **132**,1929-35.

Howat WJ, Wilson BA (2014). Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*, **70**, 12-19.

Huang BQ, Yeung EC (2015). *Chemical and physical fixation of cells and tissues: an overview*. In: Yeung ECT, Stasolla C, Sumner MJ, Huang BQ, editors. *Plant Microtechniques and Protocols*. Switzerland: Springer International Publishing, p. 23-43.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2006). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and I-tert-Butoxy-2-propanol, Vol. 88. IARC, Lyon. pp. 2–8.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2012). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100F: A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations. In *Formaldehyde.*; 2012. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F-29.pdf>.

Jenkins R, Burton N, Cooper R (2011). Manuka honey inhibits cell division in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, **66**, 2536-2542.

Johnson S and Jadon N (2010). CSE Study: Antibiotic Residues in Honey.; 2010. p. 1-10.

Khan FR, Abadin UI, Rauf N (2007). Honey; Nutritional and medical Value. *Medscape Today.*, [Online] Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/565913>. Erişim Tarihi: 20.09.2022

Kiernan JA (2000). Formaldehyde, formol, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and whatthey do. *Micros. Today*. **1**, 8–12.

Kiernan JA (2008). *Histological and histochemical methods theory and practice*. UK: Scion Publishing Limited, p: 606.

Kiernan JA (2015). *Histological and histochemical methods theory and practice*. 5th Edition, UK: Scion Publishing Limited, p: 19.

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.

Kwakman PH, Te Velde AA, de Boer L, Speijer D, Vandenbroucke- Grauls CM, Zaat SA (2010) How honey kills bacteria. *FASEB J.*, **24**, 2576-2582.

Lalwani V, Surekha R, Vanishree M, Koneru A, Hunasgi S, Ravikumar S. (2015) Honey as an alternative fixative for oral tissue: An evaluation of processed and unprocessed honey. *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, **19**, 342-7.

Lassalle S, Hofman V, Marius I, Gavric-Tanga V, Brest P, Havet K, Butori C, Selva E, Santini J, Mograbi B, Hofman P (2009). Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formol substitute fixatives. *Thyroid*, **19**, 1239-48.

Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: Comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol Pathol.*, **30**, 524-533.

Leong AS (1994). *Fixation and fixatives*. In: Woods AE, Ellis RC, eds. *Laboratory Histopathology*. New York: Churchill Livingstone.

Leong AS, Duncis CG (1986). A method of rapid fixation of large biopsy specimens using microwave irradiation. *Pathology (Phila.)*, **18**, 222–225.

Leong AS, Leong Y (2005). *Microwave Technology For Light Microscopy and Ultrastructural Studies*. Bangkok: Milestone.

Lillie RD, Fullmer HM (1976). *Histopathologic technique and practical histochemistry*. 4th ed., New York: McGraw-Hill Book Company.

Lusby PE, Coombes AL, Wilkinson JM (2005). Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Arch. Med. Res.*, **36**, 464-467.

Maaini RA and Bryant P (2006). The effectiveness of honey as a substitute for formol in the histological fixation of tissue. *J. Histotechnol.* **29**, 173-6.

Mandy G and Philip B (2009). Immunohistochemical evaluation of ductal carcinoma in breast after preservation in honey. *J. Histotechnol.*, **32**, 54–59.

Mavric E, Wittmann S, Barth G, Henle T (2008) Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol. Nutr. Foods Res.*, **52**, 483-489.

McGhee JD, von Hippel PH (1975). Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. *Biochem.*, **14**, 1281–1296

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

Mladenov S (1967). The preservative effect of honey. *Pchelarstvo Magazine*, **12**.

Moelans CB, Hoeve N, Ginkel JW, Kate FJ, Diest PJ (2011). Formaldehyde substitute fixatives. Analysis of macroscopy, morphologic analysis, and immunohistochemical analysis. *Am. J. Clin. Pathol.*, **136**, 548–556.

Nawaz S, Nagi A, Bajwa A, Amjad A, Dawood HM, Ashraf M (2023). Comparison of Honey and Alcoholic Fixatives in Tissues Using Different Types of Stains: Honey and Alcoholic Fixatives in Tissues. *THJPRS*, **3**, 776–784.

Nielsen GD, Larsen ST, Wolkoff P (2013). Recent trend in risk assessment of formaldehyde exposures from indoor air. *Arch. Toxicol.*, **87**, 73–98.

Nowacek JM (2010). *Fixation and tissue processing*. Revised and Updated by JA Kiernan. In: Pathology Education Guide Special Stains and H & E, (eds. GL Kumar and JA Kiernan), 2nd ed., California: DAKO, pp: 141-152

Occupational exposure to Formaldehyde–OSHA (1992). Response to Court remand; final rule. 29 CFR 1910, Federal Register, **50**, 22290–22328.

Ozkan N, Salva E, Cakalağaoğlu F, Tüzüner B (2012). Honey as a substitute for formol? *Biotech. Histochem.*, **87**, 148-53.

Pabuççuoğlu HU (2021). Makroskopik Değerlendirme ve Tespit (Fiksasyon), Erişim tarihi, 20.05.2021. Erişim adresi, https://www.turkpath.org.tr/files/2_makroskopi_tespit_UP_metin.pdf

Patil S, Premalatha B, Rao R, Ganavi B (2013). Revelation in the field of tissue preservation – A preliminary study on natural formation substitutes. *J. Int. Oral. Health.*, **5**, 31–38.

Patil S, Rao RS, Ganavi BS, Majumdar B (2015). Natural sweeteners as fixatives in histopathology: A longitudinal study. *J. Nat. Sci. Biol. Med.*, **6**, 67-70.

Plenat F, Antunes L, Haller T, Piet-Ounnoughene M, Klein-Monhoven N, Champigneulle J, Chenal P, Bland V, Garcia-Pimenta F, Labouyrie E (2001). La fixation formolée à l'aube du troisième millénaire [Formaldehyde fixation in the third millennium]. *Ann. Pathol.*, **21**, 29-47.

Prophet EB (1992). *Fixation*. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory Methods in Histotechnology. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, p: 25-28.

Sabarinath B, Sivapathasundharam B, Sathyakumar M (2014). Fixative properties of honey in comparison with formol. *J. Histotechnol.*, **37**, 21-25.

Samuel AR ve Gheena D (2017). Potential alternative to formaldehyde fixatives - A study. *Int. J. Curr. Res.*, **9**, 46795-46799.

Santovito A, Schilirò T, Castellano S, Cervella P, Bigatti MP, Gilli G, Bono R, DelPero M (2011). Combined analysis of chromosomal aberrations and glutathione

S-transferase M1 and T1 polymorphisms in pathologists occupationally exposed to formaldehyde. *Arch. Toxicol.*, **85**, 1295–1302.

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.

Schramm DD, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Cardetti M, Keen CL (2003). Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1732-5.

Shaham J, Bomstein Y, Gurvich R, Rashkovsky M, Kaufman Z (2003). DNA-protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde. *Occup. Environ. Med.*, **60**, 403–409.

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.

Sharquie K and Najim RA (2001). 2001. Honey as a new tissue preservative. *J. PALD.*, **12**, 49-54.

Srii R and Marla V (2016). Bee honey as a locum for routine formol fixative. *Int. J. Sci. Res.*, **5**, 498–500.

Srii R, Peter CD, Haragannavar VC, Shashidara R, Sridhara SU, Srivatsava S (2017). Bee Honey as a Safer Alternative for Routine Formol Fixation. *Kathmandu Univ. Med. J.*, **15**, 308-312.

Stanta G, Mucelli SP, Petrera F, Bonin S, Bussolati G (2006). A novel fixative improves opportunities of nucleic acids and proteomic analysis in human archive's tissues. *Diagn. Mol. Pathol.*, **15**, 115-23.

Subrahmanyam M (1993). Storage of skin graft in honey. *Lancet*, **341**, 63-64.

Thamilselvan S, Don KR, Sherlin HJ, Jayaraj G, Santhanam A (2021). Honey as a natural alternative for formol fixative - a systematic review. *J. Evol. Med. Dent. Sci.*, **10**, 369-374

Titford M (2001). Safety Considerations in the Use of Fixatives. *J. Histotechnol.*, **24**, 165-171.

Tu L, Yu L, Zhang H (2011). Morphology of rat testis preserved in three different fixatives. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.*, **31**, 178-180

Türkmen R, Demirel HH, Akarca G, Akosman MS (2017). The Investigation of Potential Preservative Effect of Boric Acid on Formol Fixed Striated Muscle Tissues. *Kocatepe Vet. J.*, **10**, 317-321.

Udonkang MI, Ubi KA, Inyang IJ (2018). Honey as fixative and safer substitute for formol in histology. *Int. J. Med. Lab. Res.*, **3**, 11-7.

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

Ünsaldı E, Çiftçi MK (2010). Formaldehit, kullanım alanları, risk grubu, zararlı etkileri ve koruyucu önlemler. *Van Vet. J.*, **21**, 71-75.

Wantke F, Focke M, Hemmer W, Bracun R, Wolf-Abdolvahab S, Götz M, Jarisch R, Götz M, Tschabitscher M, Gann M, Tappler P (2000). Exposure to formaldehyde and phenol during an anatomy dissecting course: sensitizing potency of formaldehyde in medical students. *Allergy*, **55**, 84-7.

Weston RJ (200). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry.*, **71**, 235 - 239.

Woods AE, Ellis RC (1994). *Laboratory Histopathology*. New York: Churchill Livingstone, p: 10.1-1/10.10.1- 26.

Xu P, Shi M, Chen XX (2009). Antimicrobial peptide evolution in the Asiatic honey bee *Apis cerana*. *Plos One.*, **4**, e4239.

Zanini C, Gerbaudo E, Ercole E, Vendramin A, Forni M (2012). Evaluation of two commercial and three homemade fixatives for the substitution of formol: a formaldehyde-free laboratory is possible. *Environ. Health*, **11**, 59.

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.

1. Gürbüz İ, **Demiraslan Y**, Rajapaksha C, Weerakoon D, Fernando S (2023) "Are the mandible shapes of common (*Paradoxurus hermaphroditus*) and golden (*Paradoxurus zeylonensis*) palm civets different? A pilot study," Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences: Vol. 47: No. 1.
2. Demircioğlu İ, **Demiraslan Y**, Güngören G, Gezer-İnce N (2023). Determining the correlation between external structure and center of pressures (cop) analysis data of Aksaray Malaklı dogs: a pilot study, Veterinaria (Accepted paper)
3. Yaprak Ahmet, **Demiraslan Yasin**, Özgel Özcan (2023). Left lateral geometric morphometric analysis of four different goat breed skulls raised in Türkiye, Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University (Accepted paper)
4. Dörtbudak Muhammed Yaşar, **Demiraslan Yasin**, Demircioğlu İsmail (2022). Geometric analysis of otoliths in Cyprinion kais and Cyprinion macrostomus. Anatomia, Histologia, Embryologia. 51(6):696-702
5. Demircioğlu İsmail, Gündemir Ozan, **Demiraslan Yasin**, Güngören Gülşah, Gezer İnce Nazan, Yılmaz Bestami (2022). Temporospacial and Kinetic Gait Analysis in Aksaray Malaklı Shepherd Dogs. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 46(46), 559-564.
6. Güzel Barış Can, Koçyiğit Ali, Demircioğlu İsmail, **Demiraslan Yasin** (2022). Investigating metacarpi of Hamdani Sheep Via Different Measurement and Modelling Methods: A methodological study. Anatomia, Histologia, Embryologia, 51(4), 484-491
7. Şenol Esra, Gündemir Ozan, Duro Sokol, Szara Tomasz, **Demiraslan Yasin**, Karadağ Hüseyin (2022). A pilot study: Can Calcaneus Radiographic Image Be Used To Determine Sex and Breed in Cats?. Veterinary Medicine and Science, Doi: 10.1002/vms3.899
8. **Demiraslan Yasin**, Hız İhsan, Özdemir Berfu, Albay Soner, Aytok Ahmet İhsan, Özgel Özcan (2022). Shape Differences in the Auricula of the Human Foetus: A Geometric Morphometric Approach. Acta morphologica et anthropologica, 29, 104-116
9. Demircioğlu İsmail, **Demiraslan Yasin**, Güzel Barış Can, Demircioğlu Ayşegül (2022). Comparison of Cranium Shape in Hamdani and Awassi Sheep using Dorsal and Lateral Landmarks. Pakistan Journal of Zoology, Doi: 10.17582/journal.pjz/20220613180648
10. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Rajapakse Channa, K. Weerakoon Devaka, Fernando Saminda, Spataru Mihaela-Claudia, Gündemir Ozan (2022). Skull of the Asian (*Paradoxurus Hermaphroditus*) and the golden (*Paradoxurus Zeylonensis*) palm civet: Geometric morphometric analysis using palate, tooth and frontal landmarks. Anatomia, Histologia, Embryologia. 51(6):696-702
11. Yaprak Ahmet, **Demiraslan Yasin**, Özgel Özcan (2022). Investigation of the Skull Basally in Honamli, Hair, Kilis and Saanen Goats Using Geometric Morphometric Methods. Harran Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 11(2), 179-184.

12. **Demiraslan Yasin**, Demircioğlu İsmail, Güzel Barış Can (2022). Geometric Analysis of Mandible using Semilandmark in Hamdani and Awassi sheep. *Veterinary Journal of Ankara University*, Doi: 10.33988/auvfd.1099535.
13. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin** (2022). Geometric morphometric investigation of incus in horse (*Equus ferus caballus*) and donkey (*Equus Asinus*). *Black Sea Journal of Agriculture*, Doi: 10.47115/bsagriculture.1193712.
14. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Aksünger Karaavcı Funda, Yılmaz Osman, Demircioğlu İsmail (2022). Geometric Morphometric Analysis on The Skull of The Red Fox (*Vulpes Vulpes*). *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11(1): 1-7.
15. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin** (2021). Macroanatomical Features of Brachial Plexus and Its Branches in Günther's Vole (*Microtus Guentheri*). *Veterinary Research Forum*, 12(4), 395-399.
16. **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Özgel Özcan, Zümre Özlem (2021). The Mandibles of The Honamli and Hair Goats (*Capra Hircus*); A Geometric Morphometric Study. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 68(4), 321-328.
17. Oktay Tuğba, **Demiraslan Yasin** (2021). Intracranial Arteries of New Zealand Rabbits; Identification, Three Dimensional Modelling, and Morphometry By Computed Tomography Angiography. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 50(4), 707-715.,
18. Kırbaş Doğan Gülseren, Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Takcı İsmet (2021). Macroanatomic and Morphometric Analysis of The Brown Bear (*Ursus Arctos Horribilis*) Mandible. *International Journal of Morphology*, 39(2), 587-591.
19. Demircioğlu İsmail, **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Dayan Mustafa Orhun (2021). Geometric Morphometric Analysis of Skull and Mandible in Awassi Ewe and Ram. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27(1), 43-49.
20. Demircioğlu İsmail, Duro Sokol, Güngören Gülşah, Choudhary Om Prakash, Gündemir Ozan, **Demiraslan Yasin**, Pazvant Gülsün (2021). Digits Angle and Digits Length Ratio in Japanese Quail (*Coturnix Coturnix Japonica*). *Indian Journal of Animal Research*, 56(9), 1105-1109
21. Demircioğlu İsmail, **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Dayan Mustafa Orhun (2021). Examination of The Topography and Morphometry of Hypophysis (Glandula Pituitaria) in New Zealand Rabbit By Computed Tomography. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 16(2), 170-175.
22. Ekiz Ruhsar, **Demiraslan Yasin** (2021). Investigation of Cadaver Preservative Properties of Solutions Obtained With A Mixture of Honey and Ethyl Alcohol in Different Proportions; A Pilot Study on Sheep Heart. *Veterinaria*, 70(2): 229-243
23. Demircioğlu İsmail, Koçyiğit Ali, **Demiraslan Yasin**, Yılmaz Bestami, Gezer İnce Nazan, Aydoğdu Sedat, Dayan Mustafa Orhun (2021). Digit Bones (Acropodium) of Gazella (*Gazella Subgutturosa*); Three-Dimensional Modelling and Morphometry. *The Pakistan Veterinary Journal*, 41(4), 481-486

24. **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Demircioğlu İsmail, Dayan Mustafa Orhun (2021). The Lumbosacral Plexus of The Barn Owl (*Tyto Alba*): Formation, Branches and Distribution. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 50, 572-578.
25. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Aytek Ahmet İhsan, Onar Vedat, Özgel Özcan (2020). Kurt Ve Alman Çoban Köpeğinde Kafatasının Geometrik Morfometrik Analizi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26 (4), 525-532.
26. **Demiraslan Yasin**, Dayan Mustafa Orhun, Ertılav Kemal, Akbulut Yalçın, Özkadif Sema, Özgel Özcan (2020). Computed Tomography Imaging of Cavum Nasi and Sinus Paranasales in The Tuj Sheep. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 13(1), 1-8.
27. Demircioğlu İsmail, Kırbaş Doğan Gülseren, Aksünger Karaavcı Funda, Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin** (2020). Three-Dimensional Modelling and Morphometric Investigation of Computed Tomography Images of Brown Bear's (*Ursus Arctos*) Ossa Cruris (*Zeugopodium*). *Folia Morphologica*, 79(4), 811-816.
28. Dilek Ömer Gürkan, **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar (2019). Türkiye'de Ulusal Veteriner Anatomi Kongrelerinde Sunulan Bildiriler: Bir Eğilim Analizi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 4(2), 84-89.
29. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Dayan Mustafa Orhun, Aslan Kadir (2019). Morphometric and Macroanatomic Examination of Auditory Ossicles in Male Wolves (*Canis Lupus*). *Folia Morphologica*, 78(3), 600-605.
30. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Dursun Ahmet, Eliş Yıldız Sevdâ, Karadağ Sarı Ebru, Özgel Özcan (2019). The Morphological Investigations on The Heart and Some Vessels of Bovine Foetus Between The 15th and 25th Weeks of Gestation. *Folia Morphologica*, 78(3), 524-534.
31. Ekiz Ruhsar, **Demiraslan Yasin** (2018). Kadavra Hazırlamada Kullanılan Solüsyonlar Ve Güncel Yaklaşımlar. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 11(2), 105-108.
32. **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Dilek Ömer Gürkan, Özudoğru Şükrü, Özgel Özcan (2018). Skeletal Remains of Ruminantia Uncovered in Excavations Performed in Ancient City of Kibyra. *Journal of Applied Biological Sciences*, 12(2), 12-18.
33. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Kırbaş Doğan Gülseren, Aslan Kadir (2018). Hemşin Koyunlarında Metapodium'ların Morfometrik Ve Stereolojik İncelenmesi. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6(1), 1-14.
34. **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Dilek Ömer Gürkan, Özudoğru Şükrü, Özgel Özcan (2018). Kibyra Antik Kenti Kazılarında Ortaya Çıkarılan Koyun İskeleti Kalıntılarının Osteometrik Olarak İncelenmesi#. *Kocatepe Veterinary Journal*, 11(4).
35. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Karadağ Sarı Ebru, Aslan Kadir (2017). Morphologic and Morphometric Structure and Arterial Vascularization of Glandula Interdigitalis in Male Hemshin Sheep. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(2), 241-246.

36. Gürbüz İftar, Dayan Mustafa Orhun, **Demiraslan Yasin**, Aslan Kadir (2017). Macroanatomic Investigations on Arteria Celiaca and Its Branches in Malakan Horse. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 33(3), 133-137.
37. Özgel Özcan, Karakurum Emine, **Demiraslan Yasin**, Aykut Mevlüt (2017). The Effect of Stomach Different Fullness Levels on The Topography of Intestines in New Zealand Rabbit (*Oryctolagus Cuniculus* L.). Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 33(1), 8-15.
38. **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Özgel Özcan (2017). Macro-Anatomic Investigation of Larynx, Trachea and Lungs in Martens (Martes Foina). Journal of Veterinary Anatomy, 10(2), 75-83.
39. Dayan Mustafa Orhun, Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Özgel Özcan (2017). Craniometric Measurements of The Male Eurasian Lynx From Turkey. Animal and Veterinary Sciences, 5(1), 15.
40. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Aslan Kadir (2016). Malakan Atlarında Kalbin Arterial Vaskularizasyonu Üzerine Makroanatomik Bir Araştırma. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 11(3), 288-288.
41. Özkadif Sema, Dayan Mustafa Orhun, **Demiraslan Yasin**, Aykut Mevlüt, Özgel Özcan (2016). Morphometric Properties of Larynx and Trachea in The New Zealand Rabbit. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 32(4), 208-208.
42. Akbulut Yalçın, **Demiraslan Yasin**, Aslan Kadir, Ayşegül Çoban (2016). The Macroanatomy of The Sacral Plexus and Its Nerves in Eurasian Eagle Owls *Bubo Bubo*. Anatomia, Histologia, Embryologia, 45(5), 367-372.
43. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Gülbaz Filiz, Aslan Kadir (2016). Morphometric Features of The Mandible of Malakan Horse According To Gender. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 32(3), 136-136.
44. Özgel Özcan, Karakurum Emine, **Demiraslan Yasin** (2016). The Effect of The Different Strike Levels of The Stomach on The Kidneys in The New Zealand Rabbit *Oryctolagus Cuniculus* L. Eurasian Journal of Veterinary Sciences, 32(1), 1-1.
45. **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Dayan Mustafa Orhun, Akbulut Yalçın, Aslan Kadir, Özdemir Derviş (2015). Structural and Functional Properties of The Distal Muscles of Front and Hind Legs of Malakan Horses *Equus Caballus*. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 21(6), 863-870.
46. **Demiraslan Yasin**, Aykut Mevlüt, Özgel Özcan (2015). Macroanatomical Characteristics of Plexus Brachialis and Its Branches in Martens. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 39,
47. **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Aslan Kadir (2015). Merkepte *Equus Asinus* Ossicula Auditus Üzerinde Makroanatomik Ve Morfometrik Bir Çalışma. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 41(2), 151-154.
48. Dayan Mustafa Orhun, **Demiraslan Yasin**, Akbulut Yalçın, Duymuş Mahmut, Akosman Murat Sırrı (2014). The Morphometric Values of The Native Duck and Gooses Heads A Computed Tomography Study. Animal and Veterinary Sciences, 2(6), 175-178.

49. **Demiraslan Yasin**, Gülbaz Filiz, Dayan Mustafa Orhun, Özcan Sami, Akbulut Yalçın (2014). Morphometric Analysis of The Mandible of Tuj and Morkaraman Sheep. *Journal of Veterinary Anatomy*, 7(2), 75-86.
50. **Demiraslan Yasin**, Aslan Kadir, Gürbüz İftar, Özen Hasan (2014). Simental Bir Buzağıda Görülen Çoklu Konjenital Anomaliler. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(4), 629-632.
51. **Demiraslan Yasin**, Tufan Tuncay, Sarı Mehmet, Akbulut Yalçın, Dayan Mustafa Orhun, Kükürt Abdulsamed (2014). The Effect of Clinoptilolite on Long Bone Morphometry in Japanese Quail *Coturnix Coturnix Japonica*. *Animal and Veterinary Sciences*, 2(6), 179-183.
52. Akbulut Yalçın, **Demiraslan Yasin**, Aslan Kadir, Gürbüz İftar, Koral Taşçı Serap (2014). The Coronary Arteries and Myocardial Bridges in Zavot Breed Cattle. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2), 287-293.
53. **Demiraslan Yasin**, Akbulut Yalçın, Deprem Turgay, Karadağ Sarı Ebru, Aslan Kadir (2014). Morphological and Morphometrical Characteristics of The Interdigital Gland in Kivircik Sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 38, 485-489.
54. Gürbüz İftar, **Demiraslan Yasin**, Aslan Kadir (2016). Morphometric Analysis of The Skull of New Zealand Rabbit (*Oryctolagus Cuniculus* L) According To Gender. *Arc Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 1(2), 27-32.
55. **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Aslan Kadir, Akbulut Yalçın (2015). The Stereological and Morphometrical Analysis of Metapodium in Tuj and Morkaraman Sheep. *Arc Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 1(1), 12-23.
56. Özgel Özcan, Karakurum Emine, **Demiraslan Yasin** (2015). Determination of The Effect of Stomach Volume on Topographyof Liver of New Zealand Rabbit *Oryctolagus Cuniculus* L. *Arc Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 1(2), 33-41.
57. **Demiraslan Yasin**, Gürbüz İftar, Karaman Musa, Özen Hasan (2015). Malakan Irkı Bir Atta Sağ Abdominal Kriptorşidizm. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10(2), 116-119., Doi: 10.17094/Avbd.62600
58. Duymuş Mahmut, **Demiraslan Yasin**, Akbulut Yalçın, Orman Güneş, Aslan Kadir, Özcan Sami (2013). The Statistical Analysis of Some Volumetric Measurements in The Japanese Quails Head With Different Feather Color A Computed Tomography Study. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(4), 681-686.

Üyesi Olduğu Mesleki Kuruluşlar

1- Türk Veteriner Anatomi Derneği