

# Farklı Fiksatiflerin Deri Dokusunun İmmünohistokimyasal Boyanmasına Olan Etkileri

Tahsin Murad Aktan<sup>1</sup>, Gökhan Cüce<sup>1</sup>, Zekeriya Tosun<sup>2</sup>, Selçuk Duman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Necmettin Erbakan, Faculty of Meram Medical, Department of Histology Embryology Konya, Turkey

<sup>2</sup>Selçuk University, Faculty of Selçuk Medical, Department of Plastic Surgery, Konya, Turkey.

*Eur J Basic Med Sci* 2012;2(2):46-49

Received: 28.05.2012

Accepted: 09.07.2012

**Correspondence (Yazışma Adresi):**  
Gökhan Cüce, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı, Morfoloji Binası, 1. Kat, Meram, 42090, Konya.  
Email: gokhancuce@gmail.com

*The Effects of Different Fixatives on Immunohistochemical Staining of Skin Tissue*

## ABSTRACT

We aimed to investigate the effect of Carnoy and %10 formaldehyde fixatives on immunohistochemical staining properties and morphological structure of skin tissue. Fresh skin samples were obtained from Department of Plastic Surgery, Faculty of Selçuk Medicine. The skin samples were divided to two groups as making fixation in Carnoy whether % 10 formaldehyde solutions. After fixation, the same routine histological process were applied to skins samples. While immunohistochemical staining and other stainings, the same methods were applied to 5 micron thick paraffin sections from skin tissue. Hematoxylin-Eosin and Masson's Trichrome histochemical stains and F8, Actin and Ki67 immunohistochemical stains were applied to all groups. There was not a morphological difference between Carnoy and Formaldeyde fixed tissue sectiones according to Hematoxylin-Eosin and Masson Trichrome staining. However, the immunohistochemical stained preparations which were fixed with 10% formalin, corroded. And integrity was lost in the retrieval stage performed with microwave. Abrasion was seen in the reticular layer of dermis in which fixed in formalin. When compared with formalin fixation to make fixation with by Carnoy solution gives successful results in the retrieval stage performed with microwave according to skin tissue.

**Key words:** Carnoy, Formaldehyde, Morphology, Antigen Retrieval, Immunohistochemistry

## ÖZET

Çalışmada Carnoy ve %10'luk formaldehit tespit solüsyonlarının deri dokusunun morfolojik ve yapısına ve immünohistokimyasal boyanma özelliklerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Taze deri dokuları Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı'ndan elde edildi. Deri dokusu örnekleri Carnoy ve % 10'luk formaldehit solüsyonlarında tespit edildi. 2 günün sonunda, deri dokularına aynı rutin histolojik takip prosedürü uygulandı. 5 mikron kalınlığındaki parafin kesitlere histokimyasal (Hematoksilen Eozin,

*Masson Trikrom*) ve immünohistokimyasal (F8, Ki67 ve anti-aktin) boyamalarda aynı metodlar uygulandı. Hematoksin Eozin ve Masson Trikrom boyamalarda Carnoy ve %10'luk formaldehit tespiti yapılan dokulardan hazırlanan kesitlerde morfolojik bir farklılık görülmedi. Bununla birlikte, %10'luk formaldehit tespiti yapılan dokulardan hazırlanan kesitlerde, mikrodalga ile gerçekleştirilen antijen geri kazanım (retrieval) aşamasında kesitlerde yıpranma ve doku bütünlüğünde kayıplar gözlemlendi. Aşınma daha çok retiküler dermis tabakasında görüldü. Carnoy ile tespit edilen deri dokusundan hazırlanan kesitlerde %10'luk formaldehit solüsyonuna göre antijen retrieval aşamasının daha başarılı olduğu söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Carnoy, Formaldehit, Morfoloji, Antijen Retrieval, İmmünohistokimya

## GİRİŞ

Fiksasyon dokunun hücreler de dahil tüm bileşenleriyle beraber tespit edilmesini sağlayan bir süreçtir. Dokunun in-vivo mikroanatomik görüntüsünün stabilize edilmesini sağlar (1). Yani fiksasyonun amacı dokunun morfolojik yapısının korunmasıdır. Hücre kültürleri, yaymalar (smear), parafin bloklar ve kesitler fiksatif işlemlere tabi tutulur.

Fiksasyon, kimyasal ve fiziksel metotlarla gerçekleştirilebilir. Kimyasal metotlar kimyasal çapraz bağlayıcı ajanları içerir ki; bunlar arasında: formaldehit ve gluteraldehit bulunmaktadır (2,3). Formaldehit hızlı bir şekilde dokulara nüfuz ederken proteinleri yavaşça fikse eder. Fiziksel fiksasyon ısı, organik maddeler ve asit yardımıyla bileşenleri dondurarak, pıhtılaştırarak ya da çökelterek yapılan fiksasyondur. Fiziksel tespit yöntemi ile kullanılan fiksatiflere örnek olarak Clark (etanol ve asetik asit karışımı), Carnoy ( etanol, kloroform ve asetik asit karışımı) verilebilir (4).

Histoloji ve patoloji laboratuvarlarında dokuları tespit işlemi için formaldehit solüsyonu en çok kullanılan solüsyondur (5). Formaldehit oda sıcaklığında sıvı halden doğrudan gaz haline dönüşebilir, rahatsız edici bir kokusu ve renksiz bir görünümü bulunmaktadır (6-8). Fakat kanserojen özelliğinden dolayı ve aynı zamanda çevre açısından da büyük tehdit oluşturmaktadır (5).

İmmünoperoksidaz antikor boyama yönteminin laboratuvar uygulamalarında yer almasıyla; birçok antikorun taze dokularda çalışması, ancak formaldehitte tespit edilmiş dokularda sonuç vermemesi, antijenik epitoplara formaldehit solüsyonu tarafından değişikliğe uğratıldığı veya

yok edildiğini düşündürmüştür (9). Formaldehitin moleküler grupları çapraz bağlayarak immünohistokimyasal reaksiyonları engellediği belirtilmiştir (5). Bu epitoplara birkaç epitop erişim yöntemiyle geri kazanılabilir (10). Bu yöntemlerden bir tanesi de antijen retrievaldir (1). Antijen retrieval uygulamaları arasında enzim, protein denatüre ediciler ve ısı kullanılmaktadır. Çeşitli solüsyonlar içinde kesitlere ısı uygulanmasının formaldehit fiksasyonu sonucu oluşan çapraz bağları açtığı ve formaldehit fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku kesitlerinde birçok antijenin immün boyanma özelliğini arttırdığı belirtilmektedir (4).

Formaldehit fiksasyonu birçok proteinin antijenik yapısını değiştirmekle birlikte sonuçta iyi bir morfoloji ortaya koyması sebebi ile en çok kullanılan tespit solüsyonu unvanını hala korumaktadır. Bu nedenle iyi korunmuş hücresel ayrıntılar ile antijenik yapıların belirlenmesi özelliklerini birleştirmek için birçok çalışma yapılmaktadır (11).

Bu çalışmada, Carnoy ve % 10'luk formaldehit solüsyonlarında tespit edilmiş deri dokusunda, tespit yönteminin, antijen retrieval basamağında mikrodalga ısıtma yönteminin kullanıldığı immünohistokimyasal boyama işleminin sonuçları üzerindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılacak materyal, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı'ndan, estetik amaçlı operasyonlardan arta kalan deri dokularından elde edildi. Hastalardan bilgi onayı alındı ve onay verenlerin dokuları çalışmaya dahil edildi.

Deri örnekleri 1'er cm'lik parçalara ayrıldı. 2 gün boyunca %10'luk tamponlanmış nötral formaldehit ve Carnoy solüsyonunda oda ısısında bekletilerek tespit edildi. 2 günün sonunda deri dokularına aynı rutin histolojik takip metodu uygulandı.

Dokular tespit solüsyonlarından çıkartıldıktan sonra, rutin histolojik takip basamakları izlenerek, sırasıyla % 50-60-70-80-90 ve 96'luk alkol serilerinde 30'ar dakika, şeffaflanma gerçekleşinceye kadar da kesitler bekletildi. Toplamda 4 saat olmak üzere 3 ayrı parafinden geçirildi ve parafin blok makinesinde bloklandı. Yedişer adet 5 mikronluk parafin kesitler normal ve lizinli lamlara alındı. Histokimyasal boya ve immüno-

histokimyasal işaretleme prosedürleri, Carnoy ve formaldehitte fiksasyonu yapılmış her iki grup için de aynı şekilde uygulandı. Hematoksilin Eozin, Masson Trikrom boyaları ve F8, Ki67 ve anti-aktin immünohistokimyasal boyalar uygulandı.

#### **Antijen Retrieval (geri kazanımı) uygulaması**

Kesitler mikrodalga şalesi içinde 700 Watt'ta üç kez 5 dakika boyunca bekletildi. Her 5 dakikanın sonunda kesitlerin bulunduğu şaleler 1-2 dakika için soğumaya alındı. Her soğutma esnasında kesit şalesinde eksilen sıvı tamamlandı. 3. kez uygulama sonrasında kesitler 30 dk süreyle dinlemeye bırakıldı.

### **BULGULAR**

Carnoy (Resim A) ve formaldehitte (Resim B) fikse edilmiş deri dokularında Hematoksilin- Eozin ve Masson Trikrom boyaları için herhangi bir morfolojik değişikliğe rastlanmamıştır.

Carnoy ile tespit edilen deri dokularında doku bütünlüğü korunmuş ve aynı zamanda immünohistokimyasal işaretleme için (marker) tutulumunun kuvvetli olduğu gözlenmiştir (Resim C, Resim D, Resim E, Resim F).

Fakat, immünohistokimya prosedüründe %10'luk formaldehit içinde tespit edilen deri dokularında mikrodalgada 700 watlık antijen retrieval işleminden sonra doku bütünlüğünün kaybolduğu ve sadece kesintisiz bir epitel tabakasının bulunduğu görülmüştür. Dermisin retiküler tabakasında çok fazla aşınma olmuştur. İmmünohistokimyasal işaretleme için tutulumu zayıf olarak gözlenmiştir (Resim G, Resim H). Preparatlardaki geniş doku hasarından dolayı herhangi bir istatistiksel değerlendirmeye gerek olmadığı düşünülmüştür.

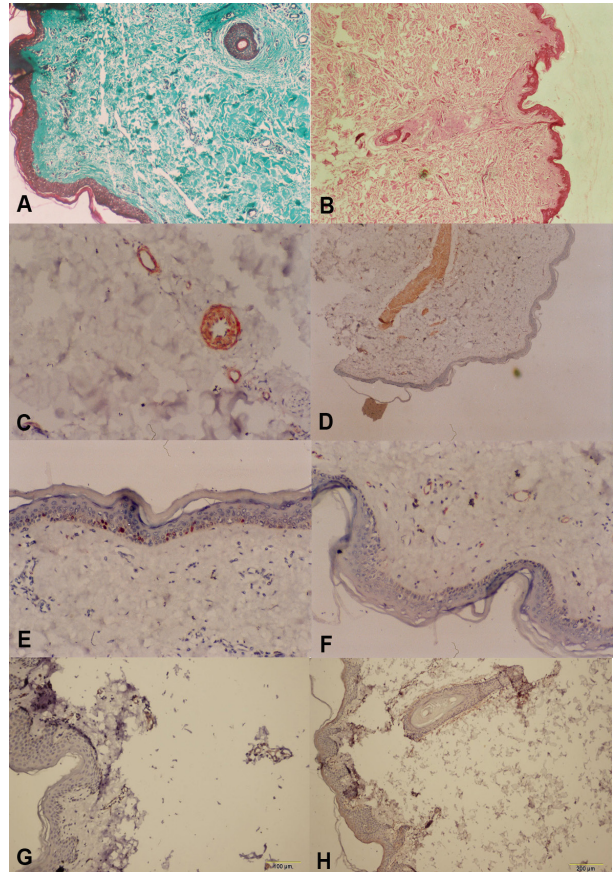
### **TARTIŞMA**

Ardışık tespit, dehidrasyon ve parafine gömme işlemlerine bağlı olarak antijen epitoplarının immünoreaktivitesinin kaybı sebebiyle immünohistokimya başarısızlık oluşabilmektedir (12). Bunun nedeni, formalin-parafin işleminin, epitop hasarına ve/veya antikor blokajına yol açmasıdır (13).

Bu problemlerin üstesinden gelebilmek amacı ile; çeşitli antijen retrieval teknikleri geliştirilmiştir. Antijen retrieval aşaması antijen epitoplarının yeniden serbest bırakılmasını sağlar ki; bunu da fiksasyon tarafından

değiştirilen protein konformasyonunu remodifiye ederek gerçekleştirir. Bunlardan bazıları enzim veya ısı uygulama teknikleridir. Bu tekniklerin mekanizmalarının anlaşılmadan kullanımı sonucunda hatalı pozitif ya da negatif sonuçlar çıkabilmektedir (12). Antijen retrieval aşamasında ısı uygulaması için mikrodalga fırın, etüv, düdüklü tencere ve otoklavdan yararlanılmaktadır (14).

Mikrodalga fırınlarda yaklaşık 2,45 GHz'lik frekans kullanılır (15). Kullanılan bu frekans su içeren materyaller tarafından absorbe edilir. Gıda maddelerinde su bulunması nedeni ile bu maddeler ısınır. Ancak, mikrodalga fırınlar için üretilen kaplarda su bulunmadığı için bu kaplar etkilenmeyecektir (16).



**Resim:** A: Carnoy tespiti yapılmış deri dokusu, X4, Masson Trikrom. B: Formaldehit tespiti yapılmış deri dokusu, X4, Hematoksilin Eozin. Carnoyda tespit edilen deri dokusunda uygulanan markerler, C:Aktin, X20., D: Aktin, X20., E:Ki67,X20., F:F8, X20. Formaldehitte tespit edilen deri dokusu, G:Aktin, H: F8.

Anlaşıldığı üzere mikrodalga fırındaki elektromanyetik dalgalar, Carnoy ve %10'luk formaldehitte tespit edilen deri dokularında Carnoyda tespit edilmiş deri dokularına zarar vermemiş, fakat Formaldehitde tespit edilen deri dokularından alınan kesitler ise anti retrieval aşamasından sonra dökülmüştür. Carnoy ve formaldehit'de tespit edilen dokulara aynı rutin histolojik takip prosedürünü uyguladığımız belirtilmişti. Mikrodalgadan kaynaklanan elektromanyetik dalgaların su tarafından emilmesi ve buharlaşması düşünüldüğünde, Formaldehitde tespit edilen deri dokusundan alınan kesitlerde Carnoya göre daha fazla su molekülünün tutulduğu ve bu su moleküllerinin buharlaşması sırasında dokudan ayrılırken doku bütünlüğüne de zarar verdiğini düşündürmektedir. Carnoy'da tespit edilen dokulardan alınan kesitlerde dökülme olmaması, Carnoy solüsyonu hazırlanırken kullanılan absolü alkolün (17) deri dokusunun takibinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Antijen retrieval aşamasında kullanılan tamponların molaritesinin önemli olmadığı, fakat pH ayarlanmasında kullanılan NaOH'in, mikrodalgada kesitlerin lamlardan ayrılmasına neden olabileceği belirtilmektedir (14). Kullandığımız tamponlara NaOH eklediğimiz için kesitlerin dökülmesine etkiyen mekanizmanın NaOH kökenli olmadığını düşünülmektedir.

Sonuç olarak; çalışmamızda Carnoy solüsyonunda tespit edilen doku kesitleri, formaldehit solüsyonunda tespit edilen doku kesitlerine göre daha başarılı sonuçlar vermiştir. Formaldehit solüsyonuna göre daha az toksik olup; buna güçlü bir alternatif olarak önerilebilir. Bu sonuçların asellüler dermis değerlendirmelerinin daha doğru yapılabilmesi için ayrı bir değeri bulunmaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. William E Grizzle. *Models of fixation and tissue processing*. *Biotech Histochem* 2009; 84(5): 185-93.
2. Jamur MC, Oliver C. *Cell fixatives for immunostaining*. *Methods Mol Biol* 2010; 588: 55-61.
3. Pekmez H, Camcı NC, Zararsız İ, Kus İ, Ogeturk M, Yılmaz HR, Sarsılmaz M. *The Effect of Melatonin Hormone on Formaldehyde-Induced Liver Injury: A Light Microscopic and Biochemical Study*. *Fırat Tıp Dergisi* 2008; 13(2): 92-7.
4. Yamashita S. *Heat-induced antigen retrieval: Mechanisms and application to histochemistry*. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 2007; 41: 141-200.
5. Van Essen HF, Verdaasdonk MA, Elshof SM, de Weger RA, van Diest PJ. *Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: influence on immunohistochemis-*

*try*. *J Clin Pathol* 2010; 63(12): 1090-4.

6. Zararsız M, Kuş H, Yılmaz HR, Köse E, Sarsılmaz M. *Deneysel formaldehit toksisitesi sonucu hipokampusta oluşan doku hasarına karşı Omega-3 yağ asitlerinin antioksidan etkileri*. *FÜ Sağlık Bil Derg* 2008; 22(2): 59-64.
7. Köse E, Sarsılmaz M, Meydan S, Pekmez H, Dabak DÖ, Kavaklı A, Ögetürk M. *Solunum yoluyla formaldehit ve lavanta uygulanan sıçan testislerinin değerlendirilmesi; Bir histolojik çalışma*. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2010; 17(3): 169-73.
8. Ünsaldı E, Çiftci MK. *Formaldehit, Kullanım Alanları, Risk Grubu, Zararlı Etkileri ve Koruyucu Önlemler*. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi* 2010; 21(1): 71-5.
9. Gugic D, Nassiri M, Nadji M, Morales A, Vincek V. *Novel tissue preservative and tissue fixative for comparative pathology and animal research*. *Journal of Experimental Animal Science* 2007; 43(4): 271-81.
10. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. *Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry*. *Am J Surg Pathol* 2000; 24(7): 1016-9.
11. Tingstedt JE, Tornehave D, Lind P, Nielsen J. *Immunohistochemical detection of SWC3, CD2, CD3, CD4 and CD8 antigens in paraformaldehyde fixed and paraffin embedded porcine lymphoid tissue*. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 15:94(3-4): 123-32.
12. Ezaki T. *Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: Its potential drawbacks and optimization for double immunostaining*. *Micron* 2000; 31(6): 639-49.
13. Daneshlab N, Doré JJ, Smeda JS. *Troubleshooting tissue specificity and antibody selection: Procedures in immunohistochemical studies*. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2010; 61(2): 127-35.
14. Minbay FR, Eyigör Ö, Çavuşoğlu İ, Kahveci Z. *Reseptör İmmünohistokimyasında Mikrodalga Işınımlı "Antijen Retrieval" Yönteminin Kullanımı*. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2002; 28(2): 21-6.
15. Hines-Peralta AU, Pirani N, Clegg P, Cronin N, Ryan TP, Liu Z, Goldberg SN. *Microwave ablation: results with a 2.45-GHz applicator in ex vivo bovine and in vivo porcine liver*. *Radiology* 2006; 239(1): 94-102.
16. Güler Ç, Çobanoğlu Z. *Elektro Manyetik Radyasyon*. *Ankara: Aydoğdu Ofset*, 1994:15.
17. Demir R. *Histolojik Boyama Teknikleri Başvuru Kitabı*. *Ankara: Palme Yayıncılık*, 2001.