T.C.
SAĞLIKBİLİMLERİÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE ULUSLARARASI TIP FAKÜLTESİ
KARTAL DR. LÜTFİ KIRDAR ŞEHİR HASTANESİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

OTOMATİZE DOKU TAKİBİNDE OLUŞABİLECEK HATALAR SONRASI HASAR GÖRMÜŞ DOKULAR İÇİN FARKLI KURTARMA PROTOKOLLERİNİN ETKİNLİĞİNİN SİSTEMATİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Ufuk Kayhan

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2025

T.C.
SAĞLIKBİLİMLERİÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE ULUSLARARASI TIP FAKÜLTESİ
KARTAL DR. LÜTFİ KIRDAR ŞEHİR HASTANESİ
TIBBİ PATOLOJİ KLİNİĞİ

OTOMATİZE DOKU TAKİBİNDE OLUŞABİLECEK HATALAR SONRASI HASAR GÖRMÜŞ DOKULAR İÇİN FARKLI KURTARMA PROTOKOLLERİNİN ETKİNLİĞİNİN SİSTEMATİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Ufuk Kayhan
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kayhan Başak

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL/2025

TEŞEKKÜR

Asistanlık süremde hem bilgi hem de deontolojik olarak beni geliştiren ve desteklerini esirgemeyen başta Prof. Dr. Nagehan Özdemir Barışık olmak üzere Prof. Dr. Aylin Ege Gül'e ve Doç. Dr. Sevinç Hallaç Keser'e

Meslek etiğini ve prensipli çalışma anlayışını örnek aldığım, akademik çalışmalara verdiği önem ve mesleki tecrübesi ile gelişimime büyük katkısı olan Prof. Dr. Kayhan Başak'a

Tıbbi bilgileri ve bakış açıları ile beni her zaman etkilemiş olan Dr. Şükran Kayıpmaz, Dr. Murat Erkan, Dr. Sibel Çetinkaya'ya

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum güzel iletişimlerini ve mesleki bigilerini kendime örnek aldığım Dr. Şermin Çoban Kökten, Dr. Gonca Gül Geçmen, Dr. Didem Canoğlu Doğan, Dr. Öncel İpekçi'ye

Eğitimime olan katkılarından dolayı Doç. Dr. Sibel Şensu, Doç. Dr. Selma Şengiz Erhan, Dr. Dilek Ece, Dr. Deniz Çelik, Dr. Zuhal Kuş Silav, Dr. Tufan Çiftçi, Dr. Begüm Yeni Erdem'e. Kıymetli Doç. Dr. Gülname Fındık, Dr. İrem Güvendir, Dr. Berfin Ekin Yıldız, Dr. Cansu Sönmez, Dr. Damla Karaman'a

Saygıdeğer kıdemlilerim Dr. Gizem Kat Anıl, Dr. Mervenur Solmaz, Dr. Ayşen Güler, Dr. Yağız İnallı, Dr. Begüm Ersoy'a

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr. Uğur Komutan, Dr. Ulya Durmuş, Dr. Ayşenur Yüksel, Dr. Burcu Ece Bozkurt, Dr. Şimal Tuğsuz, Dr. Evre Deveci, Dr. Nahide Başarı, Dr. Eylül Demirbaş, Dr. Deniz Kılıç, Dr. Merve Ak, Dr. Burcu Gürol, Dr. Ozan Arif Zelyurt, Dr. Fatma Kırdar, Dr. Feyza Taytaş, Dr. Arif Pala'ya

Şeyda Tijani başta olmak üzere bölümümüzün teknik ekibine

Desteklerini her zaman arkamda hissettiğim annem, babam ve kardeşlerime.

Psikolojik desteklerinden dolayı kedilerim Bal ve Badem'e

Her koşulda yanımda olan, bilgisi, zekası ve güzelliğiyle beni her zaman etkileyen canım kıdemlim, sevgili eşim Merve'ye sonsuz teşekkürlerimle..

Dr. Ufuk Kayhan

İstanbul, 2025

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
TABLOLAR LİSTESİ iv
ŞEKİLLER LİSTESİ vii
SİMGELER VE KISALTMALAR viii
ÖZET ix
ABSTRACT xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
1.1. Otomasyon Çağı ve Modern Histopatolojide Artefakt Sorunu 1
1.2. Kalite Kontrol ve Kurtarma Stratejileri 1
1.3. Çalışmanın Amacı ve Hipotezi 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Patolojinin Tarihsel Gelişimi ve Hücresel Patoloji 3
2.2. Biyolojik Sistemlerin Temeli Olarak Su 3
2.3. Histoteknoloji: Dokunun Mikroskoba Yolculuğu 5
3. GEREÇ VE YÖNTEM 8
3.1. Çalışma Tasarımı ve Etik Kurul Onayı 8
3.2. Doku Örneklerinin Hazırlanması 8
3.3. Dahil Etme ve Dışlama Kriterleri 9
3.4. Deneysel Artefakt Senaryolarının Oluşturulması 10
3.5. Kurtarma Protokolleri 12
3.6. Histolojik Değerlendirme 12
3.7. İstatistiksel Analiz 13
3.8. Etik Beyanlar Ve Uygunluk 14
4. BULGULAR 15
4.1. Genel Morfolojik Performans: Tanımlayıcı İstatistikler 15
4.2. Artefakt Senaryolarının Morfolojik Skorlar Üzerindeki Etkisi 16
4.3. Kurtarma Protokollerinin Genel Etkinliğinin Değerlendirilmesi 18
4.4. Tüm Artefakt Gruplarında Kurtarma Protokollerinin Karşılaştırmalı Etkinliği 18

4.5 Kurtarma Protokollerinin Organlara Göre Etkinliği 20
4.6. Doku Tiplerine Göre Kurtarma Protokollerinin Etkinliği 24
4.7. Artefakt Ana Senaryolarına Göre Kurtarma Protokollerinin Etkinliği 26
4.8. Artefakt Alt Senaryolarına Göre Kurtarma Protokollerinin Etkinliği 33
5. TARTIŞMA 51
5.1. Artefaktın Anatomisi: Hasarın Şiddeti, Süresi ve Dokunun Rolü 51
5.2. Hasar Mekanizmasına Dayalı Kurtarma Stratejileri 52
5.3. Dokuya Özgü Yanıtlar ve Protokol Standardizasyonunun Sınırları 54
5.4. Çalışmanın Kısıtlılıkları 54
6. SONUÇLAR 56
6.1. Sonuçlar 56
6.2. Öneriler 57
7. KAYNAKLAR 60
8. ÖZGEÇMİŞ 62
9. EKLER 65

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: HistoCore PEGASUS için önerilen doku takip programı 10
Tablo 4.1: Organ gruplarına göre genel morfolojik skorların dağılımı..... 16
Tablo 4.2: Doku tiplerine göre tanımlayıcı istatistikler 16
Tablo 4.3: Ana Senaryolara Göre Tanımlayıcı İstatistikler 17
Tablo 4.4: Alt senaryolara göre tanımlayıcı istatistikler 18
Tablo 4.5: Kurtarma protokollerine göre tanımlayıcı istatistikler 19
Tablo 4.6: Kurtarma protokollerinin genel etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 20
Tablo 4.7: Genel analizde istatistiksel olarakanlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 20
Tablo 4.8: Akciğer dokusunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 21
Tablo 4.9: Akciğer dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 22
Tablo 4.10: Meme dokusunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 23
Tablo 4.11: Kolon dokusunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 23
Tablo 4.12: Uterus dokusunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 24
Tablo 4.13: Rezeksiyon Normal dokularda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 25
Tablo 4.14: Biyopsi dokularında kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 26
Tablo 4.15: Rezeksiyon Tümör dokularında kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 27
Tablo 4.16:"Proses Öncesi Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 27
Tablo 4.17:"Proses Öncesi Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 28

Tablo 4.18:"Alkolde Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 29
Tablo 4.19:"Alkolde Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 29
Tablo 4.20:"Ksilende Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 30
Tablo 4.21:"Ksilende Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 31
Tablo 4.22:"Alkol Sonrası Havada Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 31
Tablo 4.23:"Alkol Sonrası Havada Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 32
Tablo 4.24:"Ksilen Sonrası Havada Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 33
Tablo 4.25:"Ksilen Sonrası Havada Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 34
Tablo 4.26:"16 Saat Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 35
Tablo 4.27:"16 Saat Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 35
Tablo 4.28:"64 Saat Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 36
Tablo 4.29:"64 Saat Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 37
Tablo 4.30:"Yarı Süre Alkolde Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 38
Tablo 4.31:"Yarı Süre Alkolde Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 38
Tablo 4.32:"Maksimum Süre Alkolde Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 39
Tablo 4.33: "Maksimum Süre Alkolde Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 40

Tablo 4.34:"Yarı Süre Ksilende Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 41
Tablo 4.35:"Yarı Süre Ksilende Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 41
Tablo 4.36:"Maksimum Süre Ksilende Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 43
Tablo 4.37:"Maksimum Süre Ksilende Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 43
Tablo 4.38:"Alkol Sonrası Yarı Süre Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 45
Tablo 4.39: "Alkol Sonrası Yarı Süre Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 45
Tablo 4.40:"Alkol Sonrası Maksimum Süre Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 46
Tablo 4.41:"Alkol Sonrası Maksimum Süre Kuruma" Senaryosunda anlamlı ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 47
Tablo 4.42:"Ksilen Sonrası Yarı Süre Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 48
Tablo 4.43:"Ksilen Sonrası Yarı Süre Kuruma" Senaryosunda anlamlı ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 48
Tablo 4.44:"Ksilen Sonrası Maksimum Süre Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları 49
Tablo 4.45:"Ksilen Sonrası Maksimum Süre Kuruma" Senaryosunda anlamlı ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi) 50
Tablo 4.46: Tüm ağır hasar bulgularının karşılaştırmalı özeti. 51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Solda ağır ksilen hasarına maruz kalmış tümörlü radikal akciğer dokusu, sağda aynı dokuya uygulan kombine 24 saatlik protokol sonucunda kesit kalitesi ve morfolofik detaylarda belirgin artış mevcut (20x H&E) 43

Şekil 2: Solda ağır ksilen hasarına maruz kalmış büyük büyütmede tümörlü radikal akciğer dokusu, sağda aynı dokuya uygulanan Kombine 24 saatlik protokol sonucunda büyük büyütme görünütüsünde boyanma, nükleer ve sitoplazmik detaylarda belirgin artış mevcut (40x H&E).....43

Şekil 3: Solda ağır ksilen hasarına maruz kalmış büyük büyütmede tümörlü radikal akciğer dokusu, sağda aynı dokuya uygulanan Serum Fizyolojik 24 saatlik protokol sonucunda büyük büyütme görünütüsünde boyanma kalitesinde, nükleer ve sitoplazmik detaylarda nispeten azalma mevcut (40x H&E) 43

Şekil 4: Solda ağır ksilen sonrası kuruma ardışık hasarına maruz kalmış tümörlü radikal akciğer dokusu, sağda aynı dokuya uygulanan Serum Fizyolojik 24 saatlik rekonstrüksüyon protokolü sonucunda dokudaki mikro çatlaklarda azalma, morfolojik detaylarda ve kesit kalitesinde belirgin artış mevcut (10x H&E).....50

Şekil 5: Karar ağacı 58

SİMGELER VE KISALTMALAR

DSCF : Dwass-Steel-Critchlow-Fligner

FISH : Floresan in situ Hibridizasyon (Fluorescence In Situ Hybridization)

H&E : Hematoksilen ve Eozin

ICC : Sınıf İçi Korelasyon Katsayısı (Intraclass Correlation Coefficient)

IHK : İmmünohistokimyasal

NaCl : Sodyum Klorür

NGS : Yeni Nesil Dizileme (Next-Generation Sequencing)

NTF : Nötr Tamponlu Formalin

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

TS : Toplam Skor

ÖZET

OTOMATİZE DOKU TAKİBİNDE OLUŞABİLECEK HATALAR SONRASI HASAR GÖRMÜŞ DOKULAR İÇİN FARKLI KURTARMA PROTOKOLLERİNİN ETKİNLİĞİNİN SİSTEMATİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Bu çalışma, otomatize doku takip cihazlarında meydana gelen hatalar (örn: kimyasalda aşırı bekleme, havada kuruma) sonucu morfolojik kalitesi bozulan dokuların kurtarılması için farklı reprosesing protokollerinin (Serum fizyolojik, geri takip, kombine) etkinliğini sistematik ve yarı-kantitatif olarak karşılaştırmayı amaçlamaktadır. Çalışmanın temel hipotezi, geri takip ve rehidrasyonu birleştiren kombine protokollerin diğer yöntemlere üstün olacağı yönündedir.

Gereç ve Yöntem: Deneysel çalışmada, 4 farklı organdan (akciğer, meme, kolon, uterus) alınan doku örneklerine 5 ana başlık, 10 alt başlık altında simüle edilmiş artefaktlar oluşturuldu. Hasarlı dokulara 8 farklı kurtarma protokolü uygulandı. Çift-kör yöntemle iki patolog tarafından değerlendirilen preparatların morfolojik kalitesi 0-12 arasında puanlandı ve gruplar Kruskal-Wallis H testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı ($p<0,05$).

Bulgular: Bulgular, en etkili kurtarma protokolünün hasar mekanizmasına göre belirgin bir şekilde değiştiğini göstermiştir. Ağır kimyasal hasar (“Maksimum Süre Ksilende Kalma”, C2) senaryosunda, hipotezi doğrulayacak şekilde, geri takip içeren Kombine protokoller Toplam Skor'da en başarılı sonuçları vermiştir ($p<0,05$). Buna karşın, en ağır kuruma hasarı (“Ksilen Sonrası Maksimum Süre Kuruma”, E2) senaryosunda, hipotezin aksine, en basit yöntem olan Serum fizyolojik protokolleri, Kombine protokollere ezici bir üstünlük sağlamıştır ($p<0,001$).

Sonuç: Çalışma, hasarlı dokuların kurtarılmasında “tek tip bir çözüm” olmadığını ve en doğru yaklaşımın, hasarın kimyasal veya fiziksel doğasına göre belirlenen kanıta dayalı bir karar algoritması olduğunu kanıtlamıştır. Serum fizyolojik rehidrasyonu, özellikle ağır kuruma hasarlarında güçlü, ucuz ve etkili bir

seçenek olarak öne çıkmaktadır ve laboratuvar pratiğinde ilk müdahale olarak düşünülmelidir.

Anahtar Kelimeler: Artefaktlar, Doku Takibi, Histopatoloji, Kurtarma Protokolleri, Reprosesing

ABSTRACT

SYSTEMATICAL EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF DIFFERENT RECOVERY PROTOCOLS FOR DAMAGED TISSUES AFTER ERRORS IN AUTOMATIZED TISSUE PROCESSING

Aim: This study aims to systematically and semi-quantitatively compare the efficacy of different reprocessing protocols (isotonic saline, reverse processing, combined) for the rescue of tissues with degraded morphological quality resulting from errors (e.g., prolonged immersion in chemicals, air drying) in automated tissue processors. The main hypothesis was that combined protocols involving reverse processing and rehydration would be superior to other methods.

Materials and Methods: In this experimental study, simulated artifacts were created on tissue samples from 4 different organs (lung, breast, colon, uterus) under 5 main scenarios, 10 sub-scenarios. Eight different rescue protocols were applied to the damaged tissues. The morphological quality of the slides, evaluated by two pathologists using a double-blind method, was scored between 0-12, and groups were statistically compared with the Kruskal-Wallis H test ($p<0,05$).

Results: The findings demonstrated that the most effective rescue protocol significantly varies depending on the damage mechanism. In the severe chemical damage scenario (“Maximum Time in Xylene”, C2), the Combined protocols including reverse processing yielded the most successful results in the Total Score ($p<0,05$), confirming the hypothesis. In contrast, in the most severe drying damage scenario (“Post-Xylene Air Drying”, E2), the simplest method, the Isotonic saline protocols, showed overwhelming superiority to the Combined protocols ($p<0,001$), contradicting the hypothesis.

Conclusion: This study proves that there is no “one-size-fits-all solution” for rescuing damaged tissues and that the most appropriate approach is an evidence-based decision algorithm determined by the chemical or physical nature of the

damage. Isotonic saline rehydration stands out as a powerful, inexpensive, and effective option, especially for severe drying artifacts, and should be considered as a first-line intervention in laboratory practice.

Key Words: Artifacts, Histopathology, Reprocessing, Rescue Protocols, Tissue Processing

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. OTOMASYON ÇAĞI VE MODERN HISTOPATOLOJIDE ARTEFAKT SORUNU

Histoteknolojideki adımların zamanlama, sıcaklık ve kimyasal konsantrasyonlar açısından hassas olduğu, 19. yüzyıldan beri bilinmektedir. 20. yüzyılın ortalarına kadar büyük ölçüde manuel olarak yürütülen bu süreçler 1970'lerden itibaren geliştirilen otomasyon teknolojileriyle birlikte büyük bir verimlilik ve standardizasyon kazanmıştır. Günümüzde histopatoloji laboratuvarlarının standardı haline gelen kapalı sistem sıvı transfer cihazları kullanılmaktadır. Bu sistem teknisyenlerin toksik maruziyetini azaltmakla birlikte farklı doku tipleri için özelleştirilmiş protokollerin oluşturulabilmesini sağlamıştır.

Ancak bu teknolojik ilerlemeler, histopatoloji laboratuvarını yeni ve potansiyel olarak daha yıkıcıbir hata türüne karşı savunmasız bırakmıştır. Manuel işlemlerdeki küçük zamanlama hatalarının yerini artık elektrik kesintisi, yazılım hatası veya mekanik bir arıza problemleri almıştır. Bu hatalarise yüzlerce doku örneğini aynı anda ve geri döndürülemez bir şekilde bozma riski taşımaktadır. Alarm sistemleri sorunu haber verse bile, mesai saatleri dışında veya hafta sonu bir arıza meydana gelebilir. Bu durum da dokuların bir kimyasalın içinde saatlerce beklemesine veya en kötü senaryo ile havada kurumasına yol açabilmektedir.

İşte buverimlilik ve standardizasyon artışına rağmen devam eden yıkıcı hata riskini açıklayan"otomasyon çelişkisi" olarak adlandırdığımız antite , bu tezin ana motivasyonunu ve çözüm aradığımız problem alanını oluşturmaktadır. Laboratuvarlar, bu tür kriz anlarında hasar görmüş geri dönüşü olmayan dokuları kurtarmak için kanıta dayalı, sistematik ve güvenilir protokollere ihtiyaç duymaktadır.

1.2. KALİTE KONTROL VE KURTARMA STRATEJİLERİ

Histopatolojide kalite güvencesi tanısal sürecin temel bir parçasıdır. Kalite değerlendirme çalışmalarının odağında son yıllarda önemli bir kayma gözlenmektedir. Tarihsel olarak analitik faza yoğunlaşılmış olsa da modern araştırmalar tanısal hataların önemli bir kaynağı olan preanalitik sürece giderek daha

fazla önem vermektedir. Doku fiksasyonu ve takibi gibi preanalitik değişkenlerin morfoloji üzerindeki olumsuz etkileri artık iyi biliniyor ancak bu hatalar meydana geldikten sonra hasarlı dokuları kurtarmaya yönelik sistematik, kanıta dayalı stratejileri değerlendiren çalışmaların sayısı hala görece sınırlıdır.

Bizim çalışmamızda olduğu gibihistolojik preperat kalitesini değerlendirmek için çeşitli semi-kantitatif skorlama sistemleri önerilmiştir. Örneğin,Rao ve ark. vePrats-Muñoz ve ark. Goss ve ark. tarafından sunulan metodolojiler, morfolojik kalitenin semi-kantitatif olarak puanlanabileceğini göstermesi açısından önemlidir (1–3). Bu çalışmalar, tezde kullanılan değerlendirme metodolojisi için de bir temel oluşturmaktadır.

Literatüre bakıldığında, otomasyon sistemlerindeki yıkıcı hataların bozduğu dokuları kurtarma yöntemlerini sistematik olarak kıyaslayan bir çalışmanın bulunmadığı görülmektedir.

1.3. ÇALIŞMANIN AMACI VE HİPOTEZİ

Histopatolojik tanının temeli, hücre morfolojisinin en doğru şekilde korunduğu kaliteli bir preparata dayanmaktadır. Literatürde preanalitik hataları gidermeye yönelik bazı kurtarma protokolleri tarif edilmiş olsa da (4), bunların etkinliğini; farklı artefakt senaryoları, doku kompozisyonları ve kurtarma süreleri altında sistematik olarak karşılaştıran kapsamlı bir çalışma henüz yoktur. Bu eksiklikten ötürü, alandaki mevcut öneriler genel tavsiyeler olmaktan öteye gitmemektedir.

Bu çalışma, iyi fikse edilmiş dokularda simüle edilmiş doku takip hatalarının yol açtığı morfolojik bozulmaların geri döndürülebilirliğine odaklanmaktadır. İlk olarak, farklı rekonstrüksiyon protokolleri (Serum fizyolojik, geri takip ve kombinasyonları) kullanılarak bu bozulmaların ne ölçüde geri döndürülebileceği, semi-kantitatif bir skorlama sistemiyle saptanacaktır. Bu saptamalar doğrultusunda, en etkin kurtarma stratejilerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

Çalışmamızın temel hipotezi; geri takip işlemi ile kimyasal olarak sıfırlanan dokulara (geritakip) ardından kontrollü Serum fizyolojik rehidrasyonu uygulanmasının (kombine protokol), tek başına uygulanan geri takip veya Serum

fizyolojik rehidrasyon yöntemlerine kıyasla, morfolojik kaliteyi geri kazanmada istatistiksel olarak anlamlı derecede daha üstün olacağıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PATOLOJİNİN TARİHSEL GELİŞİMİ VE HÜCRESEL PATOLOJİ

Patolojinin başlangıcını net bir çizgiyle belirlemek mümkün olmasa da, hastalıkları anlama çabası antik çağlara dayanmaktadır. MÖ 1500'lü yıllara ait Mısır tıbbi papirüslerinde çeşitli hastalıklara dair bilgiler bulunmaktadır. MÖ 400'lü yıllarda Hipokrat ve okulu, yara iyileşmesi, tümörler gibi birçok patolojik durumu açıklamıştır. Cornelius Celsus (MÖ 30 - MS 38) inflamasyonun dört klasik belirtisini tanımlarken, Galen bu tanıma beşinci klasik bulgu olan "fonksiyon kaybını" (functio laesa) eklemiştir (5).

Patolojinin ayrı bir disiplin olarak filizlenmesi, 15. yüzyılda Antonio Benivieni'nin (1443-1502) otopsi çalışmalarıyla başlamış, hastaların klinik öykülerini post-mortem bulgularla birleştirmiştir. 17. ve 18. yüzyıllar, patolojinin bilimsel temelini sağlamlaştıran devrimlere sahne olmuştur. William Harvey'in (1578–1657) kan dolaşımını keşfetmesi ve Giovanni Battista Morgagni'nin (1682–1771) hastaların klinik semptomlarını otopsi bulgularıyla sistematik olarak ilişkilendirmesi, hastalıkların organlardaki spesifik lezyonlardan kaynaklandığı ilkesini sağlam bir zemine oturtmuştur. Bu organ temelli yaklaşım, Marie Francois Xavier Bichat (1771-1802) ile doku düzeyine inmiştir (5).

Ancak patolojinin geleceğini asıl şekillendiren, patoloji tarihinin en büyük figürü kabul edilen Rudolf Virchow'dur (1821–1902). 1858'de yayınladığı "Die Cellularpathologie" (Hücresel Patoloji) adlı eseriyle, hastalıkların kaynağının organlar veya dokular değil, doğrudan hücreler olduğu "Omnis cellula e cellula" (Her hücre bir hücreden gelir) ilkesini ortaya koymuştur. Hastalık odağının hücreye kaymasıyla birlikte, o hücreyi mikroskop altında en doğru ve detaylı şekilde incelemeyi sağlayacak olan histoteknoloji bilimi doğmuştur (5).

2.2. BİYOLOJİK SİSTEMLERİN TEMELİ OLARAK SU

Su, insan vücudundaki en bol molekül ve canlı organizmaların ana bileşenidir. Neredeyse tüm fizyolojik süreçler suya bağlıdır. Bu nedenle su, "evrensel çözücü" olarak kabul edilir. Vücuttaki tüm sıvıların temelini oluşturarak besinlerin sindirimi, emilimi ve taşınması, atık ürünlerin uzaklaştırılması, hücre yapılarının stabilitesi ve vücut sıcaklığının düzenlenmesi gibi sayısız fizyolojik fonksiyonda rol oynar(6)

Suyun bu benzersiz rolü moleküler yapısından kaynaklanmaktadır. Bir su molekülü, bir oksijen atomuna kovalent olarak bağlanmış iki hidrojen atomundan oluşur. Oksijen atomunun yüksek elektronegatifliği, molekül içinde asimetrik bir yük dağılımı yaratarak suya "polar" bir özellik kazandırır. Bu polarite su moleküllerinin birbirlerine diğer moleküller arası kuvvetlerden daha güçlü bir bağ olan "hidrojen bağları" ile bağlanmasını sağlar. Suyun biyolojik sistemler için değerli kılan birçok özelliği, molekülleri arasındaki hidrojen bağlarından kaynaklanır. Bu özellikler, suyu pasif bir çözücü olmaktan çıkarıp hücresel yapı ve fonksiyonun aktif bir düzenleyicisi konumuna getirir (7,8)

2.2.1. Hücresel Yapı ve Fonksiyondaki Rolü

2.2.1.1. Hücre Hacmi ve Fonksiyonlarının Düzenlenmesi

Su, hücrelerin ana bileşenidir ve toplam vücut suyunun yaklaşık %55'i hücre içi sıvıyı oluşturur.Hücre dışı ve içi bölmeler arasındaki su akışları, hücre hacmini etkileyen birincil faktörlerdir. Hücre hacmi ise, epitel transportu, metabolizma, hormon salınımı, hücre göçü, çoğalması ve hatta hücre ölümü gibi çok çeşitli hücresel fonksiyonları düzenler (6).

2.2.1.2. Protein Katlanması ve Hücre Zarı Oluşumu

Sulu bir ortamda suyun hidrofobik (sudan kaçan) molekülleri dışlayarak onların bir araya toplanmasına neden olmasına “Hidrofobik etki” denir. “Hidrofobik etki” suyun en önemli etkilerinden biridir. Bu temel prensip, hem hücre zarlarını oluşturan lipitlerin kendiliğinden çift katmanlı bir yapı oluşturmasını sağlar hem de

proteinlerin hidrofobik kısımlarını içe, hidrofilik kısımlarını dışa doğru katlayarak fonksiyonel üç boyutlu yapılarını kazanmalarını sağlar. Vücut suyunun önemli bir kısmının bu şekilde makromoleküler bileşenlere bağlı olduğu belirtilmektedir (8)

2.2.1.3. Biyomoleküler Etkileşimler

Su sadece bir difüzyon ortamı olmakla kalmaz, aynı zamanda enzim-substrat etkileşimleri gibi kovalent olmayan bağların da bir aracısıdır.Biyokimyasal reaksiyonlarınbirçoğunun gerçekleşebilmesi için ideal bir ortam sağlar(8)

Çalışmamızda da histopatolojik bir örnektetemel hücresel mekanizmaları stabilize etme ile beraber doku mimarisini ve morfolojinin korunması istenmektedir. Bu bağlamda, çalışmada kullanılan Serum fizyolojik çözeltisi, ozmotik dengeyi sağlayarak hücre hacmini korumayı ve proteinlerin yapısal bütünlüğünü destekleyerek dokuyu onarmayı hedefler.

2.3. HİSTOTEKNOLOJİ: DOKUNUN MİKROSKOBA YOLCULUĞU

Histoteknoloji, doku örneklerinin cerrahi olarak alınmasından mikroskop altında incelenebilecek bir preparat haline getirilmesine kadar olan prosedürlerin bütününü kapsar. Bu sürecin temel amacı, dokunun hücresel yapısını ve morfolojisini, canlıdaki haline en yakın şekilde koruyarak, ince kesitler alınmasına ve boyanmasına olanak tanımaktır. Bu süreç, birbirini takip eden dört ana aşamadan oluşur: Fiksasyon, dehidrasyon, şeffaflandırma ve parafin infiltrasyonu.

2.3.1. Fiksasyon: Dokuyu Koruma

Histoteknik sürecin ilk ve en kritik adımı dokunun korunması, yani fiksasyonudur. Fiksasyonun temel amacı, hücreyi ve bileşenlerini proteinleri çapraz bağlarla sabitleyerek (cross-linking) hem otolizi hem de bakteriyel çürümeyi geri döndürülemez bir şekilde durdurmaktır (9,10). Başarılı bir fiksasyon aynı zamanda dokuyu sonraki kimyasal işlemlerin (alkol, ksilen vb.) potansiyel olumsuz etkilerine karşı dirençli hale getirir. Bu amaçla en yaygın kullanılan reaktif, %10'luk nötr tamponlu formalindir (NTF). Keskin nükleer detaylar elde etmek için çinko formalin solüsyonları veya işlem süresini kısaltmak için alkol içeren formalin gibi farklı fiksatifler de kullanılmaktadır (9,11,12).

2.3.2. Dehidrasyon: Suyun Uzaklaştırılması

Fiksasyonu tamamlanmış doku içine parafın gibi apolar bir materyalin girebilmesi için öncelikle içerdiği sudan arındırılması gerekir. Dehidrasyon dokudaki serbest suyu ve fiksatif kalıntılarını uzaklaştırma işlemidir. Bu süreçte kritik olan, hücrelerin yapısal bütünlüğü için gerekli olan "bağlı suyu" yerinde bırakmaktır. Bu dengeyi sağlamak için dokular artan konsantrasyonlarda dereceli alkol (genellikle etanol) serisinden geçirilir. Dokuların yüksek dereceli alkollerde aşırı süre bekletilmesi, bağlı suyun da kaybına yol açar. Bu durum, dokuda aşırı büzüşme, anormal boyanma ve mikrotomi sırasında kuru ve kırılgan kesitler elde edilmesi gibi ciddi artefaktlara neden olur (13). Özellikle bu tez çalışmasında incelenen dokuların alkolde aşırı süre bekletilmesi gibi proses hatalarında, bu mekanizma temel problem kaynağıdır.

2.3.3. Şeffaflandırma: Alkolün Yer Değiştirmesi

Dehidrasyon sonrası doku, alkol içerdiği için hala parafin ile karışamaz durumdadır. Şeffaflandırma aşamasında, dokudaki etil alkolü uzaklaştıracak ve aynı zamanda parafin ile karışabilen bir ara çözücü kullanılır. Günümüzde bu amaçla en yaygın kullanılan kimyasal iyi bir lipit çözücü olan ksilendir. Ancak ksilenin önemli dezavantajı dokuyu sertleştirme ve kurutma potansiyelidir. Ksilen, özellikle uzun süre maruziyette, dehidrasyon aşamasından kurtulmayı başarmış olan son bağlı su moleküllerini de dokudan sökerek aşırı kurumaya neden olabilir13. Bu olumsuz özellik çalışmamızın ana senaryolarından birini oluşturan, dokuların ksilende aşırı süre kalması durumunda artefakt oluşumunun temel mekanizmasını teşkil eder.

2.3.4. Parafin İnfiltrasyonu ve Gömme: Dokunun Desteklenmesi

Şeffaflandırılmış doku, son olarak erimiş parafin ile doldurularak (infiltrasyon) sert bir destek yapısı kazanır. Bu işlem, dokunun mikrotomda mikron kalınlığında ince kesitler halinde kesilebilmesini mümkün kılar. İnfiltrasyonun süresi ve sıcaklığı, dokunun aşırı büzüşmesini veya sertleşmesini önlemek için dikkatle ayarlanmalıdır. Parafinin tipi (düşük veya yüksek erime noktalı) de dokunun yoğunluğuna göre seçilmelidir. Önceki adımlardaki (dehidrasyon ve şeffaflandırma) herhangi bir yetersizlik, parafinin dokuya homojen bir şekilde nüfuz edememesine

yol açar. Bu da tanısal değeri olmayan yumuşak veya pürüzlü blokların üretilmesine neden olur (13).

2.3.5. Mikrotomi: İncelik ve Beceri Alanı

Mikrotomi, parafinize doku bloğundan, mikroskop altında incelenebilecek kadar ince (genellikle 3-5 mikron) kesitler alma işlemidir. Bu işlem, nesneyi bıçak karşısında hassas bir şekilde ilerleten mikrotom adlı cihazla yapılsa da, cihazı kulanan kişi sebebiyle günümüzde büyük ölçüde manuel bir süreçtir. Bloğun doğru açıyla yerleştirilmesi, fazla parafinin temizlenmesi, kesitin bütünlüğü bozulmadan lama alınması büyük ölçüde teknisyenin deneyimine ve becerisine bağlıdır (14).

Ancak vurgulanması gereken nokta, mikrotominin başarısının tamamen kendisinden önceki adımların (fiksasyon, dehidrasyon, şeffaflandırma, infiltrasyon) kalitesine bağlı olduğudur. Kuru, kırılgan, aşırı sertleşmiş veya tam parafinize olmamış bir bloktan en yetenekli teknisyenin bile tanısal değerde bir kesit alması imkansızdır**.** Bu durum, doku takip sürecindeki hataların sonraki tüm çabaları anlamsız bırakabileceğinin bir göstergesidir.

2.3.6. Histolojik Boyama: Dokuyu Anlamlandırmak

Mikrotomi ile elde edilen renksiz kesit hücresel bileşenleri işaretleyen histolojik boyama işlemiyle anlam kazanır. Boyama, boya molekülleri ile doku bileşenleri arasındaki coulombik çekimler, hidrojen bağları ve van der waals kuvvetleri gibi karmaşık fizyokimyasal ilkelere dayanır (15). Bu süreç; fiksasyon tipi, uygun takip, kesit kalınlığı ve dokunun kendi yapısı gibi faktörlerden etkilenir (16,17).

Patoloji pratiğinde altın standart, Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyamasıdır. Hematoksilen bazik bir boya olarak hücre çekirdeklerindeki nükleik asitlere bağlanarak onları mavi-mor renge boyarken; asidik bir boya olan eozin sitoplazma ve hücre dışı matriks proteinlerini pembenin farklı tonlarında boyar. Bu zıtlık, doku mimarisinin ve hücresel detayların net bir şekilde ayırt edilmesini sağlar (16,17).

Günümüz laboratuvarlarında H&E boyaması genellikle otomatik cihazlarla yapılsa da, boyanın tutarlılığı (parti farkları, pH, son kullanma tarihi) kaliteyi etkileyebilir. Unutulmamalıdır ki, en mükemmel ve en tutarlı boyama protokolü bile kötü işlenmiş bir dokuda kaybolmuş olan hücresel detayları geri getiremez veya var

olmayan bir şeyi boyayamaz. Boyamanın kalitesi, temelinde korunabilmiş bir morfolojinin varlığına bağlıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA TASARIMI VE ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, deneysel, in-vitro bir laboratuvar araştırması modeliyle tasarlanmıştır. Çalışma için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kartal Dr. Lütfi Kırdar Şehir Hastanesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 24.01.2025 tarihinde, 2025/010.99/12/16 karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır.

3.2. DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

Çalışmada kullanılan doku örnekleri, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kartal Dr. Lütfi Kırdar Şehir Hastanesi Tıbbi Patoloji Kliniği arşivinden, 01.05.2025 ile 30.05.2025 tarihleri arasında kabul edilen cerrahi rezeksiyon materyallerinden hazırlanmıştır. Farklı dokuların (parankimal, yağlı, glandüler, mezenkimal) proses hatalarına vereceği yanıtı kapsamlı bir şekilde değerlendirmek amacıyla; akciğer, meme, kolon ve uterus olmak üzere dört farklı organ grubu çalışmaya dahil edilmiştir.

Rutin patoloji pratiğinde sık karşılaşılması ve epitelyal tümörleri temsil etmesi nedeniyle akciğer, meme ve kolon organları için adenokarsinom tanıları seçilmiştir. Mezenkimal tümörlerin doku takip sürecindeki davranışını temsil etmesi amacıyla uterus için leiomyosarkom tanılı bir olgu tercih edilmiştir.

Her bir organdan, günlük patoloji rutinindeki farklı örnek tiplerini simüle edecek şekilde üç ana kategoride örnekleme yapılmıştır. Her kategori, her bir organ tipi (akciğer, meme, kolon, uterus) için 80'er adet kaset/blok oluşturacak şekilde planlanmıştır:

- **Rezeksiyon Materyalinde Tümör Dokusu:** Cerrahi rezeksiyon materyallerinin tümör içeren alanlarından, standart bir rezeksiyon parçasını temsil edecek şekilde 1,5 x 1,5 x 0,3 cm boyutlarında örnekler alınmıştır. (Her organ için 80 adet, toplam 320 blok).
- **Rezeksiyon Materyalinde Normal Doku:** Aynı rezeksiyon materyallerinden, tümör komşuluğundaki makroskopik olarak normal görünümlü alanlardan, yine 1,5 x 1,5 x 0,3 cm boyutlarında örnekler alınmıştır. (Her organ için 80 adet, toplam 320 blok).

- **Biyopsi Boyutunda Doku:** Küçük biyopsi materyallerini simüle etmek amacıyla iki farklı boyutta örnekleme yapılmıştır:
    - **Endoskopik Biyopsi (Kolon):** Kolon rezeksiyon materyallerinden, endoskopik biyopsi boyutlarına eşdeğer olacak şekilde yaklaşık 0,3 x 0,3 x 0,3 cm boyutlarında toplam 240 adet örnek alınmıştır. Bu örnekler, her kasette üç adet olacak şekilde gruplanmış ve 80 adet kaset olarak işleme alınmıştır.
    - **Tru-cut Biyopsi (Akciğer, Meme, Uterus):** Akciğer, meme ve uterus materyallerinden, iğne (tru-cut) biyopsi boyutlarını taklit edecek şekilde yaklaşık 0,2 x 0,2 x 1,5 cm boyutlarında 80'er adet örnek hazırlanmıştır.

Bu örnekleme şemasıyla her bir organ grubundan (Tümör + Normal + Biyopsi) 240'ar blok olmak üzere, çalışma kapsamında toplam 960 doku bloğu oluşturulmuştur. Tüm doku örneklerinin, standart takip öncesinde en az 24 saat süreyle %10'luk tamponlu formalinde fiksasyonlarının tamamlandığı teyit edilmiştir.

3.3. DAHİL ETME VE DIŞLAMA KRİTERLERİ

Çalışmaya dahil edilecek doku bloklarının seçiminde standardizasyonu sağlamak ve artefakt değerlendirmesini etkileyebilecek değişkenleri en aza indirmek amacıyla aşağıdaki kriterler belirlenmiştir:

Dahil Etme Kriterleri:

- Cerrahi rezeksiyon materyallerinden alınmış olması.
- Akciğer, meme, kolon (adenokarsinom tanılı) veya uterus (leiomyosarkom tanılı) organlarına ait olması.
- %10'luk nötr tamponlu formalinde (NTF) en az 24 saat süreyle tespit edilmiş olması.
- Makroskopik olarak yaygın nekroz, kalsifikasyon veya otoliz bulguları içermemesi.
- Standart boyutlarda (1,5x1,5x0,3 cm ve biyopsi boyutları) blok alınmasına olanak sağlayacak büyüklükte olması.

Dışlama Kriterleri:

- Yetersiz fikse edilmiş (örn: <24 saat) dokular.

- NTF dışında farklı bir fiksatifle (örn: alkol bazlı fiksatifler, Bouin solüsyonu) tespit edilmiş materyaller.
- Dekalsifikasyon gibi ek kimyasal işlem gerektiren kemik veya yoğun kalsifikasyon içeren dokular.
- Ameliyat öncesi neoadjuvan kemoterapi veya radyoterapi almış hastalara ait materyaller.
- Standart örnekleme için çok küçük veya uygun olmayan boyuttaki dokular.

3.4. DENEYSEL ARTEFAKT SENARYOLARININ OLUŞTURULMASI

Çalışmada doku takibi ve artefakt oluşturulan doku takipleri için HistoCore PEGASUS (Leica Biosystems, Nussloch, Almanya) otomatik doku takip cihazı kullanılmıştır. Günlük rutinde 12 saat 14 dakika süren doku takip programı kullanılmaktadır. Bu program, 45°C sıcaklıkta sırasıyla; 44 dakika formalin, 270 dakika dereceli etanol serisi, 180 dakika ksilen ve 200 dakika parafin infiltrasyonu aşamalarını içermektedir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: HistoCore PEGASUS için önerilen doku takip programı

Adım	Reaktif Tipi	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)	Basınç/Vakum (P/V)
1	Formalin	44	45	Ortam
2	Etanol (%70)	30	45	Ortam
3	Etanol (%90)	30	45	Ortam
4	Etanol (%100)	30	45	Ortam
5	Etanol (%100)	30	45	Ortam
6	Etanol (%100)	60	45	Ortam
7	Etanol (%100)	90	45	Ortam
8	Ksilen	45	45	Ortam
9	Ksilen	45	45	Ortam
10	Ksilen	90	45	Ortam
11	Parafin	60	65	Vakum
12	Parafin	60	65	Vakum

13	Parafin	80	65	Vakum

Deneysel artefakt senaryoları, aşağıdaki beş ana başlık altında oluşturulmuştur:

3.4.1. Ana Senaryo A: Fikse Dokunun Proses Öncesi Kuruması

Standart takibe alınmadan önce doku örnekleri, oda sıcaklığında (23°C) ve %40-50 nem oranında, üstü açık kaplarda kurumaya bırakılmıştır. Bu senaryo, geceyi temsile etmesi amacıyla 16 saat (Senaryo A1) ve haftasonunu temsil etmesi amacıyla 64 saat (Senaryo A2) olmak üzere iki farklı kuruma süresi için incelenmiştir.

3.4.2. Ana Senaryo B: Takip İçi Alkol Aşamasında Hata

Bu senaryo, otomatik takip cihazının dokuların %100'lük alkol banyosuna girmesinden itibaren dehidrasyon aşamasında arızalanmasını temsil etmektedir. Dokuların görebileceği hasarı maksimize etmek amacıyla %100'lük alkol banyosu tercih edilmiştir.Dokuların otomatik takip cihazında alkolde kalabileceği maksimum sürenin yarısı olan 295 dakika (Senaryo B1) ve alkolde kalabileceği maksimum süreolan 590 dakika (Senaryo B2) olmak üzere iki farklı süre için kasıtlı olarak bekletilmiştir.

3.4.3. Ana Senaryo C: Takip İçi Ksilen Aşamasında Hata

Bu senaryo dokular dehidrasyon aşamalarını tamamladıktan sonra, ksilen banyosuna girmesinden itibaren otomatik takip cihazının şeffaflandırma aşamasında arızalanmasını temsil etmektedir. Protokol, dokuların otomatik takip cihazında ksilende kalabileceği maksimum sürenin yarısı olan 190 dakika (Senaryo C1) ve ksilende kalabileceği maksimum süre 380 dakika (Senaryo C2) olmak üzere iki farklı süre için durdurulmuştur.

3.4.4. Ana Senaryo D: Alkol Sonrası Havada Kuruma

Doku örnekleri, standart takip programındaki tüm etanol serilerini (toplam 270 dk) normal bir şekilde tamamladıktan sonra, şeffaflandırma (ksilen) aşamasına geçmeden önce cihazdan alınarak, oda sıcaklığında (yaklaşık 22°C) ve %40-50 nem oranında, üstü açık kaplarda havada kurumaya bırakılmıştır. Bu senaryo, dokuların dehidrasyon aşamasından şeffaflandırma aşamasına geçerken arıza olasılığını temsil etmektedir. Simüle edilen bu aşamada dokuların hava ile temas edebileceği

maksimum sürenin yarısı 190 dakika (Senaryo D1) ve dokuların hava ile temas edebileceği maksimum süre 380 dakika (Senaryo D2) olmak üzere iki ayrı alt grupta incelenmiştir.

3.4.5. Ana Senaryo E: Ksilen Sonrası Havada Kuruma

Doku örnekleri, standart takip programındaki tüm etanol ve ksilen serilerini (toplam 450 dk) normal bir şekilde tamamladıktan sonra, parafin infiltrasyonuna geçmeden önce cihazdan alınarak, oda sıcaklığında (yaklaşık 22°C) ve %40-50 nem oranında, üstü açık kaplarda havada kurumaya bırakılmıştır. Bu senaryo, dokuların şeffaflandırma aşamasından parafin infiltrasyonu aşamasına geçerken arıza olasılığını temsil etmektedir. Simüle edilen bu aşamada dokuların hava ile temas edebileceği maksimum sürenin yarısı 100 dakika (Senaryo E1) ve dokuların hava ile temas edebileceği maksimum süre 200 dakika (Senaryo E2) olmak üzere iki ayrı alt grupta incelenmiştir.

3.5. KURTARMA PROTOKOLLERİ

Yukarıda belirtilen her bir artefakt grubuna (hasar kontrol grubu hariç), bir dizi rekonstrüksiyon protokolü uygulanmıştır.

- **Hasar Kontrol Grubu:**Hasara maruz bırakıldıktan sonra hiçbir kurtarma işlemi uygulanmadan doğrudan standart takibe devam edilen gruptur.
- **Serum Fizyolojik Rekonstrüksiyon Grubu:** Dokular, %0.9'luk Sodyum Klorür (NaCl) solüsyonu içinde 6, 12 ve 24 saat ayrı ayrı sürelerle bekletilmiştir.
- **Geri Takip Protokolü Grubu:** Dokular, sırasıyla ksilen (60°C, 60 dk), absolut alkol (60 dk) banyolarından geçirilerek kimyasal olarak sıfırlanmaya çalışılmıştır.
- **Kombine Protokol Grubu:** Geri takip protokolü uygulandıktan sonra, dokular %0.9'luk NaCl solüsyonu içinde 6, 12 ve 24 saat sürelerle ayrı ayrı bekletilmiştir.

Tüm rekonstrüksiyon protokollerinin tamamlanmasının ardından, doku örnekleri standart doku takip protokolü uygulanarak işlenmiş ve parafin bloklar haline getirilmiştir.

3.6. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Tüm gruplardan elde edilen parafin bloklardan 3 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Mikrotomi aşamasında teknisyen kaynaklı değişkenliği en aza indirmek amacıyla, tüm kesitler 15 yıllık deneyime sahip tek bir patoloji teknisyeni tarafından alınmıştır. Kesitler, standart Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama protokolü uygulanarak, aynı lot numaralı boya kitleri kullanılarak ve aynı Tissue-Tek Prisma® Plus (Sakura Finetek USA) otomatik boyama cihazında boyanmıştır.

Boyanan preparatların morfolojik kalitesi, bu çalışma için geliştirilen ve dört ana kritere (nükleer detay, sitoplazmik yapı, doku bütünlüğü, boyanma kalitesi) ayrılan bir semi-kantitatif skorlama sistemi ile değerlendirilmiştir. Puanlamayı biri kıdemli patoloji asistanı, diğeri 30 yıl deneyimli bir patolog olmak üzere 2 gözlemci yapmıştır. Her bir kriter, iki patolog tarafından bağımsız olarak 0'dan (çok kötü) 3'e (mükemmel) kadar puanlanmıştır. Bir preparatın nihai Toplam Değerlendirme Skoru (0-12 aralığında), bu dört alt kriterden aldığı puanların toplamı olarak hesaplanmıştır. Değerlendirme sürecinde gözlemci yanlılığını (observer bias) ortadan kaldırmak amacıyla, çalışma çift-kör (double-blind) bir tasarımla yürütülmüştür. Preparatlar rastgele bir kodlama sistemi ile numaralandırılmış, iki farklı gözlemcinin baktıkları preparatın hangi artefakt veya kurtarma grubuna ait olduğu konusunda hiçbir bilgisi olmaması sağlanmıştır.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizi, The jamovi project (2025). jamovi (Version 2.6) [Computer Software] kullanılarak yapılmıştır. Tüm gruplar için tanımlayıcı istatistikler (ortalama, standart sapma, medyan) hesaplanmıştır. Değerlendirmeyi yapan iki patoloğun puanlamaları arasındaki tutarlılık, iki yönlü sabit etkiler modeline dayalı Sınıf İçi Korelasyon Katsayısı ile değerlendirilmiştir. Analiz, patologların ölçümleri arasında iyi düzeyde bir tutarlılık olduğunu göstermiştir (ICC3 = 0.839, %95 Güven Aralığı [0.823, 0.854]).

Gruplar arasındaki morfolojik skor farklarının istatistiksel anlamlılığı, verilerin ordinal yapısı nedeniyle non-parametrik testler ile analiz edilmiştir. İkiden fazla grubun (örn: bir artefakt senaryosundaki 8 kurtarma protokolü) karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis H testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testinin

anlamlı çıktığı durumlarda, grupların birbirleriyle ikili karşılaştırmalarını yapmak ve Tip I hatayı kontrol etmek amacıyla post-hoc test olarak Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF) testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

3.8. ETİK BEYANLAR VE UYGUNLUK

Tez yazarı ve danışmanı, bu çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve yazımı aşamalarında herhangi bir potenansiyel çıkar çatışması olmadığını beyan eder. Bu tezin orijinalliği, lisanslı bir intihal tespit programı aracılığıyla kontrol edilmiş olup, 'Gereç ve Yöntem' ve 'Kaynaklar' bölümleri hariç olmak üzere benzerlik oranı %25'in altında saptanmıştır. Bu deneysel çalışma, EQUATOR (Enhancing the Quality and Transparency of Research) Network tarafından önerilen bilimsel araştırma raporlama ilkeleri dikkate alınarak tasarlanmış ve kaleme alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. GENEL MORFOLOJİK PERFORMANS: TANIMLAYICI İSTATİSTİKLER

Çalışma kapsamında 4 farklı organ (akciğer, meme, kolon, uterus) ve 3 farklı doku tipinden (rezeksiyon tümör, rezeksiyon normal, biyopsi) örneklerin 2 farklı gözlemci tarfından skorlanması sonucu toplam 1920 doku skorlama verisi mevcuttur. Organların herbirinden 480'er adet skorlama verisi mevcuttur.

Tablo 4.1: Organ gruplarına göre genel morfolojik skorların dağılımı

ORGAN	N	Ortalama (TS)	Medyan (TS)	Std. Sapma (TS)	Min (TS)	Maks (TS)
Akciğer	480	8,55	9	1,991	3	12
Meme	480	7,96	8	2,181	2	12
Kolon	480	7,90	8	1,994	2	12
Uterus	480	8,44	9	2,400	2	12

Kısaltma: TS: Toplam Skor

Tüm deney koşulları bir arada değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama toplam skor Akciğer dokularında (8,55 ± 1,99) gözlenirken, en düşük ortalama toplam skor ise Kolon dokularında (7,90 ± 1,99) saptanmıştır. Meme (7,96 ± 2,18) ve Uterus (8,44 ± 2,40) dokuları ise bu iki değer arasında skorlar almıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.2: Doku tiplerine göre tanımlayıcı istatistikler

DOKU_TIPI	N	Ortalama (TS)	Medyan (TS)	Std. Sapma (TS)	Min (TS)	Maks (TS)
Rezeksiyon Normal	640	8,32	8	2,139	2	12
Biyopsi	640	8,03	8	2,223	2	12
Rezeksiyon Tümör	640	8,29	8	2,124	2	12

Kısaltma: TS: Toplam Skor

Her bir doku tipinden 640’ar adet skorlama verisi mevcuttur. Üç farklı doku tipi karşılaştırıldığında, ortalama Toplam Skorların birbirine yakın olduğu bulunmuştur. En yüksek ortalama skor "Rezeksiyon Normal" dokularda (8,32 ± 2,14), en düşük ortalama skor ise "Biyopsi" örneklerinde (8,03 ± 2,22) elde edilmiştir (Tablo 4.2).

4.2. ARTEFAKT SENARYOLARININ MORFOLOJİK SKORLAR ÜZERINDEKI ETKİSİ

Farklı deneysel artefakt senaryolarının, doku morfolojisi üzerinde farklı düzeylerde etkilere sahip olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.3: Ana Senaryolara Göre Tanımlayıcı İstatistikler

ANA_SENARYO	N	Ortalama (TS)	Medyan (TS)	Std. Sapma (TS)	Min (TS)	Maks (TS)
Proses Öncesi Kuruma	384	7,60	7,5	2,534	3	12
Alkolde Kalma	384	9,54	9	1,450	6	12
Ksilende Kalma	384	8,08	8	1,748	3	12
Alkol Sonrası Kuruma	384	8,64	9	1,564	5	12
Ksilen Sonrası Kuruma	384	7,19	8	2,465	2	12

Kısaltma: TS: Toplam Skor

Her bir ana senaryodan 384’er adet skorlama verisi mevcuttur. Beş farklı ana artefakt senaryosu genel olarak karşılaştırıldığında, en yüksek ortalama Toplam Skor'un "Alkolde Kalma" (9,54 ± 1,45) senaryosunda olduğu tespit edilmiştir. En düşük ortalama Toplam Skor ise "Ksilen Sonrası Havada Kuruma" (7,19 ± 2,47) senaryosunda kaydedilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.4: Alt senaryolara göre tanımlayıcı istatistikler

ALT_SENARYO	N	Ortalama (TS)	Medyan (TS)	Std. Sapma (TS)	Min (TS)	Maks (TS)
16s_Kuruma (A1)	192	9,48	10	1,878	4	12
64s_Kuruma (A2)	192	5,72	5	1,505	3	11
Yari_Alkol (B1)	192	9,56	9	0,908	8	12
Maks_Alkol (B2)	192	9,53	10	1,842	6	12
Yari_Ksilen (C1)	192	8,44	8	1,878	4	12
Maks_Ksilen (C2)	192	7,71	7	1,528	3	11
AlkolSonrası_KurumaYari (D1)	192	8,20	8	1,680	5	12
AlkolSonrası_KurumaMaks (D2)	192	9,07	9	1,307	6	12
KsilenSonrası_KurumaYari (E1)	192	8,84	9	1,640	2	12
KsilenSonrası_KurumaMaks (E2)	192	5,55	6	2,012	2	10

Kısaltma: TS: Toplam Skor

Artefaktın uygulama süresinin skorlar üzerindeki etkisi alt senaryolarda incelenmiştir (Tablo 4.4):

- **Proses Öncesi Kuruma (Senaryo A):** 16 saatlik kuruma (A1) sonrası ortalama Toplam Skor 9,48 iken, 64 saatlik kuruma (A2) sonrası bu skor 5,72'ye düşmüştür.
- **Ksilen Sonrası Havada Kuruma (Senaryo E):** 100 dakikalık kuruma (E1) sonrası ortalama skor 8,84 iken, 200 dakikalık kuruma (E2) sonrası skor 5,55'e düşmüştür. Bu değer (5,55), çalışma kapsamında tüm alt senaryolar içinde en düşük ortalama Toplam Skor'dur.
- **Alkolde Kalma (Senaryo B):**"Yarı Süre" (B1) ve "Maksimum Süre" (B2) bekletilen grupların ortalama Toplam Skorları (sırasıyla 9,56 ve 9,53) birbirine çok yakındır.

4.3. KURTARMA PROTOKOLLERININ GENEL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tüm artefakt senaryoları birleştirildiğinde, 8 farklı kurtarma protokolünün genel ortalama skorları Tablo 4.5'te sunulmuştur.

Tablo 4.5: Kurtarma protokollerine göre tanımlayıcı istatistikler

KURTARMA_PROTOKOLU	N	Ortalama (TS)	Medyan (TS)	Std. Sapma (TS)	Min (TS)	Maks (TS)
Kontrol_Hasar	240	8,27	8	2,279	2	12
Kombine_6s	240	8,25	9	2,410	2	12
Kombine_12s	240	7,90	8	2,074	2	12
Kombine_24s	240	7,91	9	2,321	2	12
Geri_takip	240	7,98	8	2,380	2	12
Serum_fizyolojik_6s	240	8,28	8	2,001	3	12
Serum_fizyolojik_12s	240	8,53	8	1,938	4	12
Serum_fizyolojik_24s	240	8,55	9	1,749	5	12

Kısaltma: TS: Toplam Skor

Her bir kurtarma prokolünden 240'ar adet skorlama verisi mevcuttur. Genel ortalamada en yüksek Toplam Skorlar "Serum_fizyolojik_24s" (8,55 ± 1,75) ve "Serum Fizyolojik_12s" (8,53 ± 1,94) protokollerinde elde edilmiştir. "Kombine" ve "Geri takip" protokollerinin genel ortalama skorlarının, "Kontrol_Hasar" grubundan daha düşük olduğu saptanmıştır (Tablo 4.5).

4.4. TÜM ARTEFAKT GRUPLARINDA KURTARMA PROTOKOLLERİNİN KARŞILAŞTIRMALI ETKİNLİĞİ

Çalışmadaki tüm artefakt senaryoları bir havuzda toplandığında, 8 farklı kurtarma protokolünün genel değerlendirme kalitesi üzerindeki etkinlikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olup olmadığı incelenmiştir. Test sonucunda, Nükleus skoru hariç tüm morfolojik kriterlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar saptanmıştır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6: Kurtarma protokollerinin genel etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	11,2	7	0,130
Sitoplazma	**28,3**	**7**	**<0,001**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	**22,1**	**7**	**0,002**
Boyanma Kalitesi	**32,0**	**7**	**<0,001**
Toplam Skor	**17,2**	**7**	**0,016**

Bu genel farklılıkların pratik anlamını ve bir müdahalenin faydalı olup olmadığını anlamak için Kontrol Hasar grubuna karşı performansındeğerlendirildiği karşılaştırma (post-hoc) analizleri yapılmıştır:

Tablo 4.7: Genel analizde istatistiksel olarakanlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Sitoplazma	Serum_fizyolojik_24s	Kombine 12s	0,001
	Serum_fizyolojik 24s	Kombine 24s	<0,001
	Serum_fizyolojik 12s	Kombine 24s	0,043
Boyanma Kalitesi	**Serum_fizyolojik 6s**	**Kontrol Hasar**	**0,006**
	Serum_fizyolojik 6s	Kombine 12s	0,002
	Serum_fizyolojik 6s	Geri takip	0,041
	Serum_fizyolojik 12s	**Kontrol Hasar**	**0,011**
	Serum_fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,003
Toplam Skor	Serum_fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,049
	Serum_fizyolojik 24s	Kombine 12s	0,019

4.4.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Toplam Skor açısından, yapılan post-hoc testinde hiçbir kurtarma protokolü, Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük sağlayamamıştır.

Kontrol Hasar grubuna karşı yapılan ikili istatistiksel karşılaştırmalarda anlamlı bir başarının gözlemlendiği tek kriter Boyanma Kalitesi olmuştur. Bu kriterde, Serum Fizyolojik 6s ($p=0,006$) ve Serum Fizyolojik 12s ($p=0,011$) protokollerinin Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı derecede daha iyi sonuçlar verdiği saptanmıştır.

4.5. KURTARMA PROTOKOLLERİNİN ORGANLARA GÖRE ETKİNLİĞİ

Bu bölümde, kurtarma protokollerinin etkinliği, tüm artefakt senaryoları birleştirilerek her bir organ tipi için ayrı ayrı analiz edilmiştir. Temel amaç, herhangi bir kurtarma müdahalesinin, ilgili organda hiçbir işlem yapılmayan Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlayıp sağlamadığını belirlemektir.

4.5.1. Akciğer Dokusunda Kurtarma Protokollerinin Karşılaştırmalı Etkinliği

Çeşitli artefakt senaryolarına maruz bırakılmış Akciğer dokularında, 8 farklı kurtarma protokolünün değerlendirme kalitesi üzerindeki etkinliği karşılaştırılmıştır. Genel test sonuçları, Nükleus skoru hariç tüm morfolojik kriterlerde kurtarma protokolleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu göstermiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8: Akciğer dokusunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	11,0	7	0,139
Sitoplazma	26.1	7	<0.001
Morfoloji (Doku Mimarisi)	32,4	7	<0.001
Boyanma Kalitesi	14,4	7	0,044

Toplam Skor	22,0	7	0,003

Anlamlı bulunan bu genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.9'da özetlenmiştir.

Tablo 4.9: Akciğer dokusunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Sitoplazma	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,005
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 24s	0,001
Morfoloji	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 6s	<0,001
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,004
	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 6s	<0,001
	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 12s	0,006
Boyanma Kalitesi	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,010
Toplam Skor	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,004
	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 12s	0,012

4.5.1.1 Bulguların Değerlendirilmesi

Akciğer dokusu, kurtarma protokolleri arasındaki performans farklarının en belirgin olduğu organ olarak karşımıza çıkmakta ancak en başarılı protokoller Serum Fizyolojik 12s ve 24s olarak bulunsa da, bu protokollerin Kombine gruplarına olan üstünlüğü, Kontrol Hasar grubuna karşı bir üstünlüğe dönüşmemiştir.

Çalışmanın ana kriteri olan Toplam Skor ($p=0,003$) ve diğer tüm alt kriterlerde, test edilen yedi protokolün hiçbiri, hiçbir işlem yapılmayan Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlamamıştır.

4.5.2. Meme Dokusunda Kurtarma Protokollerinin Karşılaştırmalı Etkinliği

Meme dokusu örneklerinde, test edilen 8 farklı kurtarma protokolü arasında genel olarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Meme dokusunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	9,29	7	0,233
Sitoplazma	11,4	7	0,120
Morfoloji (Doku Mimarisi)	12,0	7	0,101
Boyanma Kalitesi	12,8	7	0,780
Toplam Skor	10,1	7	0,184

4.5.2.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Genel testte anlamlı bir fark bulunmadığı için, doğal olarak hiçbir kurtarma protokolü, Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır. Meme dokusu, bu çalışmada test edilen artefakt ve kurtarma senaryolarına en az yanıt veren doku tipidir.

4.5.3. Kolon Dokusunda Kurtarma Protokollerinin Karşılaştırmalı Etkinliği

Kolon dokusu örneklerinde, test edilen 8 farklı kurtarma protokolü arasında genel olarak istatistiksel olarak anlamlı bir farkın yalnızca Sitoplazma Skoru üzerinde olduğu saptanmıştır (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Kolon dokusunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	9,90	7	0,194
Sitoplazma	**22,4**	**7**	**0,002**

Morfoloji (Doku Mimarisi)	11,5	7	0,119
Boyanma Kalitesi	11,6	7	0,116
Toplam Skor	12,7	7	0,080

4.5.3.1.Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmanın ana değerlendirme kriteri olan Toplam Skor da dahil olmak üzere, hiçbir morfolojik kriterde, test edilen protokollerin hiçbiri Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük sağlayamamıştır. Sitoplazma skorunda gruplar arası farklar gözlense de yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda, Kontrol Hasar grubunu geçen bir protokol saptanmadı.

4.5.4. Uterus Dokusunda Kurtarma Protokollerinin Karşılaştırmalı Etkinliği

Çalışmanın son organ merkezli analizini oluşturan Uterus (leiomyosarkom) dokusu örneklerinde, protokoller arasında genel morfolojik kalitede bir fark saptanmazken, sadece boyanma kalitesinde anlamlı bir istatistiksel fark saptamıştır (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: Uterus dokusunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	4,68	7	0,699
Sitoplazma	7,24	7	0,404
Morfoloji (Doku Mimarisi)	4,32	7	0,743
Boyanma Kalitesi	**31,5**	**7**	**<0,001**
Toplam Skor	4,75	7	0,691

4.5.4.1. Bulguların Değerlendirilmesi:

Boyanma Kalitesi kriteri kurtarma protokollerinin ikili karşılaştırılmasıyla incelendiğinde, Serum Fizyolojik 6s protokolünün Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ve güçlü bir üstünlük sağladığı ($p < 0,001$) saptanmıştır.

4.6. Doku Tiplerine Göre Kurtarma Protokollerinin Etkinliği

Bu bölümde, veriler organ tipinden bağımsız olarak, doku örnek tipine göre (Rezeksiyon Normal, Biyopsi, Rezeksiyon Tümör) üç ana grupta analiz edilmiştir. Amaç, farklı örnek tiplerinin kurtarma müdahalelerine verdiği yanıtın, Kontrol Hasar grubuna kıyasla farklılık gösterip göstermediğini saptamaktır.

4.6.1. Rezeksiyon Normal Dokularda Kurtarma Protokollerinin Karşılaştırmalı Etkinliği

Rezeksiyon Normal doku örnekleri incelendiğinde, protokoller arasında genel morfolojik kalitede bir fark saptanmazken, sadece boyanma kalitesinde anlamlı bir istatistiksel fark saptamıştır (Tablo 4.13).

Tablo 4.13: Rezeksiyon Normal dokularda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	5,6	7	0,587
Sitoplazma	11,8	7	0,107
Morfoloji (Doku Mimarisi)	10,2	7	0,179
Boyanma Kalitesi	**14,3**	**7**	**0,047**
Toplam Skor	7,18	7	0,410

4.6.1.1.Bulguların değerlendirilmesi:

Boyanma kalitesi skorları için genel testte anlamlı bir fark bulunmasına ($p = 0,047$) rağmen, bu farkın hangi spesifik gruplar arasında olduğunu tespit etmek için yapılan testte, hiçbir ikili karşılaştırma $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.

4.6.2. Biyopsi Dokularında Kurtarma Protokollerinin Karşılaştırmalı Etkinliği

Organ tipinden bağımsız olarak, sadece Biyopsi doku skorlama verileri (N=640) incelendiğinde, uygulanan 8 farklı kurtarma protokolünün etkinliği karşılaştırılmıştır.Analiz sonuçlarına göre, protokoller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkınRezeksiyon Normal dokulara benzer şekilde yalnızcaBoyanma Kalitesi Skoru üzerinde olduğu saptanmıştır (Tablo 4.14).

Tablo 4.14: Biyopsi dokularında kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	3,22	7	0,864
Sitoplazma	10,3	7	0,171
Morfoloji (Doku Mimarisi)	13,8	7	0,055
Boyanma Kalitesi	**14,3**	**7**	**0,046**
Toplam Skor	7,95	7	0,337

Boyanma kalitesi skorları için genel testte anlamlı bir fark bulunmasına ($p = 0,046$) rağmen, bu farkın hangi spesifik gruplar arasında olduğunu tespit etmek için yapılan testte, hiçbir ikili karşılaştırma $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.

4.6.3. Rezeksiyon Tümör Dokularında Kurtarma Protokollerinin Karşılaştırmalı Etkinliği

Son analiz grubu olan Rezeksiyon Tümör doku skorlama verileri (N=640) incelendiğinde, uygulanan 8 farklı kurtarma protokolünün etkinliği karşılaştırılmıştır. Protokoller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın yalnızca Boyanma Kalitesi Skoru üzerinde olduğu görülmüştür. (Tablo 4.15)

Tablo 4.15: Rezeksiyon Tümör dokularında kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	8,91	7	0,259
Sitoplazma	12,2	7	0,096
Morfoloji (Doku Mimarisi)	6,09	7	0,530
Boyanma Kalitesi	**17,3**	**7**	**0,016**
Toplam Skor	7,59	7	0,370

Boyanma kalitesi skorları için genel testte anlamlı bir fark bulunmasına ($p = 0,016$) rağmen, bu farkın hangi spesifik gruplar arasında olduğunu tespit etmek için yapılan testte, hiçbir ikili karşılaştırma $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.

4.7. ARTEFAKT ANA SENARYOLARINA GÖRE KURTARMA PROTOKOLLERİNİN ETKİNLİĞİ

4.7.1. "Proses Öncesi Kuruma" (Senaryo A) Bulguları

Organ ve doku tipinden bağımsız olarak, sadece "Proses Öncesi Kuruma" (Senaryo A, N=384) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelendiğinde, protokoller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın Morfoloji (Doku Mimarisi) ve Boyanma Kalitesi skorları üzerinde olduğunu saptamıştır (Tablo 4.16).

Tablo 4.16:"Proses Öncesi Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	9,12	7	0,244
Sitoplazma	10,5	7	0,163
Morfoloji (Doku Mimarisi)	22,2	7	0,002
Boyanma Kalitesi	28,1	7	<0,001
Toplam Skor	12,4	7	0,089

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan post-hoc testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.17'de özetlenmiştir.

Tablo 4.17:"Proses Öncesi Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Morfoloji	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 6s	0,031
	Serum Fizyolojik 24s	Geri takip	0,003
Boyanma Kalitesi	**Serum Fizyolojik 12s**	**Kontrol Hasar**	**0,039**
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,043
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 24s	0,012
	Serum Fizyolojik 12s	Geri takip	0,002
	Serum Fizyolojik 6s	Geri takip	0,009

Boyanma Kalitesi ikili karşılaştırmalar ile incelendiğinde, Serum Fizyolojik 12s protokolünün Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı derecede daha iyi bir sonuç verdiği saptanmıştır ($p=0,039$).

4.7.2. "Alkolde Kalma" (Senaryo B) Bulguları

Organ ve doku tipinden bağımsız olarak"Alkolde Kalma" (Senaryo B, N=384) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verilerinde 8 farklı kurtarma protokolünün etkinliği karşılaştırılmıştır. Protokoller arasında Nükleus, Sitoplazma, Boyanma Kalitesi ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu ortaya koymuştur. Morfoloji (doku mimarisi) skorunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.18).

Tablo 4.18:"Alkolde Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	**46,9**	**7**	**<0,001**
Sitoplazma	**27,9**	**7**	**<0,001**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	7,12	7	0,417
Boyanma Kalitesi	**20,5**	**7**	**0,005**
Toplam Skor	**18,7**	**7**	**0,009**

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan post-hoc testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.19'da özetlenmiştir.

Tablo 4.19:"Alkolde Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Nükleus	**Kontrol Hasar**	**Serum Fizyolojik 6s**	**<0,001**
	Kombine 6s	Serum Fizyolojik 6s	<0,001
	Kombine 12s	Serum Fizyolojik 6s	0,037
	Kombine 24s	Serum Fizyolojik 6s	<0,001
	Geri takip	Serum Fizyolojik 6s	0,018
	Serum Fizyolojik 12s	Serum Fizyolojik 6s	<0,001
	Serum Fizyolojik 24s	Serum Fizyolojik 6s	0,008
Sitoplazma	Kombine 6s	Kombine 12s	0,010
	Kombine 6s	Kombine 24s	0,021
	Serum Fizyolojik 12s/24s	Kombine 12s	0,018
	Serum Fizyolojik 12s/24s	Kombine 24s	0,036
Boyanma Kalitesi	**Serum Fizyolojik 12s**	**Kontrol Hasar**	**0,020**
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 6s	0,041
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,004
Toplam Skor	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,016

4.7.2.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Alt kriterler incelendiğinde iki zıt bulgu öne çıkmıştır:

Faydalı Etki: Serum Fizyolojik 12s protokolü, Boyanma Kalitesi kriterinde Kontrol Hasar grubundan anlamlı derecede daha iyi bulunmuştur (p=0,020).

Zararlı Etki: Serum Fizyolojik 6s protokolü, Nükleus kriterinde Kontrol Hasar grubundan anlamlı derecede daha kötü bulunmuştur (p<0,001).

4.7.3. "Ksilende Kalma" (Senaryo C) Bulguları

"Ksilende Kalma" (Senaryo C, N=384) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelendiğinde, test edilen protokoller arasında tüm dört morfolojik kriter (Nükleus, Sitoplazma, Morfoloji, Boyanma) ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu ortaya konulmuştur (Tablo 4.20).

Tablo 4.20:"Ksilende Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	**23,2**	**7**	**0,002**
Sitoplazma	**22,1**	**7**	**0,002**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	**15,9**	**7**	**0,026**
Boyanma Kalitesi	**16,5**	**7**	**0,021**
Toplam Skor	**20,6**	**7**	**0,004**

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.21'de özetlenmiştir.

Tablo 4.21:"Ksilende Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Nükleus	Kombine 24s	Serum Fizyolojik 6s	0,009
	Kombine 24s	Serum Fizyolojik 12s	0,007
Sitoplazma	Kombine 24s	Serum Fizyolojik 6s	0,038
	Kombine 24s	Serum Fizyolojik 12s	0,014
Morfoloji	Kombine 12s	Serum Fizyolojik 6s	0,027
Boyanma Kalitesi	Kombine 12s	Serum Fizyolojik 12s	0,047
Toplam Skor	Kombine 12s	Serum Fizyolojik 12s	0,035
	Kombine 24s	Serum Fizyolojik 12s	0,012

4.7.3.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Yapılan ikili karşılaştırmalarda Kombine protokollerin Serum Fizyolojik protokollerine genel bir üstünlüğü bulunsa da Kontrol Hasar grubu ile aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir.

4.7.4. "Alkol Sonrası Havada Kuruma" (Senaryo D) Bulguları

Organ ve doku tipinden bağımsız olarak, sadece "Alkol Sonrası Havada Kuruma" (Senaryo D, N=384) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelendiğinde, protokoller arasında Sitoplazma, Morfoloji, Boyanma Kalitesi ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğugörülmüştür. Nükleus skorunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.22).

Tablo 4.22:"Alkol Sonrası Havada Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	5.85	7	0,558
Sitoplazma	**17.8**	**7**	**0,013**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	**14.9**	**7**	**0,038**
Boyanma Kalitesi	**39.5**	**7**	**<0,001**

Toplam Skor	**24.4**	**7**	**<0,001**

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.23'te özetlenmiştir.

Tablo 4.23:"Alkol Sonrası Havada Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Sitoplazma	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 12s	0,033
Morfoloji	Kombine 6s	Kombine 12s	0,021
Boyanma Kalitesi	**Kombine 6s**	**Kontrol Hasar**	**<0,001**
	Kombine 24s	**Kontrol Hasar**	**0,012**
	Geri takip	**Kontrol Hasar**	**0,040**
	Serum Fizyolojik 6s	**Kontrol Hasar**	**0,002**
	Serum Fizyolojik 24s	**Kontrol Hasar**	**<0,001**
	Kombine 6s	Kombine 12s	<0,001
	Kombine 24s	Kombine 12s	0,025
	Serum Fizyolojik 6s	Kombine 12s	0,005
	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 12s	0,001
Toplam Skor	**Kombine 6s**	**Kontrol Hasar**	**0,008**
	Serum Fizyolojik 24s	**Kontrol Hasar**	**0,019**
	Kombine 6s	Kombine 12s	0,002
	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 12s	0,005

4.7.4.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Ardışık fiziksel (Normal süre kimyasal + fiziksel kuruma) hasar içeren bu senaryoki ikili karşılaştırma sonuçları aşağıda özetlenmiştir:

Toplam Skor açısından, iki farklı yaklaşıma sahip olan Kombine 6s (p=0,008) ve Serum Fizyolojik 24s (p=0,019) protokolleri, Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlamıştır.

Boyanma Kalitesi kriterinde ise bu iki protokole ek olarak Kombine 24s, Geri takip ve Serum Fizyolojik 6s protokolleri de Kontrol Hasar grubunu anlamlı derecede geçmiştir.

4.7.5. "Ksilen Sonrası Havada Kuruma" (Senaryo E) Bulguları

"Ksilen Sonrası Havada Kuruma" (Senaryo E, N=384) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelendiğinde, test edilen protokoller arasında tüm dörtdeğerlendirme kriteri ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak oldukça anlamlı farklar olduğu saptanmıştır (Tablo 4.24).

Tablo 4.24:"Ksilen Sonrası Havada Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	36,8	7	<0,001
Sitoplazma	51,4	7	<0,001
Morfoloji (Doku Mimarisi)	43,4	7	<0,001
Boyanma Kalitesi	24,4	7	<0,001
Toplam Skor	39,8	7	<0,001

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan post-hoc testi, bu senaryo için çok sayıda anlamlı ikili karşılaştırma ortaya koymuştur. İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan bu karşılaştırmalar Tablo 4.25'te özetlenmiştir.

Tablo 4.25:"Ksilen Sonrası Havada Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Nükleus	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Kombine 12s	<0,05
	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Kombine 24s	<0,001
Sitoplazma	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Kombine 12s/24s	<0,05
	Serum Fizyolojik 24s	**Kontrol Hasar,** Kombine 6s, Geri takip	<0,05
Morfoloji	Serum Fizyolojik (12s, 24s)	Kombine (6s, 12s, 24s)	<0,05
	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Kombine 24s	<0,05
	Serum Fizyolojik 12s	Geri takip, **Kontrol Hasar**	<0,05
Boyanma Kalitesi	Serum Fizyolojik (6s, 12s)	Kombine 12s/24s	<0,05
Toplam Skor	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Kombine 12s	<0,01
	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Kombine 24s	<0,001

(Not: Tablodaki p-değerleri, orijinal tablolardaki çok sayıda anlamlı bulgunun bir özetidir.)

4.7.5.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Bu senaryodaki ikili karşılaştırmalarda, Serum Fizyolojik protokolleri (özellikle 12s ve 24s) Morfoloji ve Sitoplazma gibi birçok önemli kriterde Kontrol Hasar grubundan anlamlı derecede daha yüksek skorlar almıştır. Buna karşılık, hipotezi oluşturan Kombine ve Geri takip protokolleri, Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır.

4.8 ARTEFAKT ALT SENARYOLARINA GÖRE KURTARMA PROTOKOLLERİNİN ETKİNLİĞİ

4.8.1. "16 Saat Proses Öncesi Kuruma" (A1) Senaryosundaki Bulgular

"Proses Öncesi Kuruma" ana senaryosunun daha hafif düzeyi olan "16 Saat Kuruma" (A1, N=192) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri

incelendiğinde,protokoller arasında Nükleus, Boyanma Kalitesi ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu ortaya koymuştur. Sitoplazma ve Morfoloji skorlarında ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.26).

Tablo 4.26:"16 Saat Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	18,9	7	0,008
Sitoplazma	9,73	7	0,204
Morfoloji (Doku Mimarisi)	13,1	7	0,071
Boyanma Kalitesi	28,6	7	<0,001
Toplam Skor	17,7	7	0,013

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.27'de özetlenmiştir.

Tablo 4.27:"16 Saat Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Nükleus	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 24s	0,041
Boyanma Kalitesi	Kombine 6s	Kombine 24s	0,012
	Kombine 6s	Geri takip	0,012
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 24s	0,031
	Serum Fizyolojik 12s	Geri takip	0,031

4.8.1.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmanın ana kriteri olan Toplam Skor (p=0,013) ve diğer alt kriterlerde, test edilen yedi protokolün hiçbiri, hiçbir işlem yapılmayan Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır.

Alt kriterler incelendiğinde, bazı protokollerin birbirlerine karşı spesifik alanlarda (örn: Boyanma Kalitesi) üstünlükler sağladığı görülse de, bu etkiler ikili karşılaştırmalarla incelendiğinde morfolojik kaliteyi Kontrol Hasar grubunun ötesine taşıyacak düzeyde değildir.

4.8.2. "64 Saat Proses Öncesi Kuruma" (A2) Senaryosundaki Bulgular

"Proses Öncesi Kuruma" ana senaryosunun ağır hasar düzeyi olan "64 Saat Kuruma" (A2, N=192) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelendiğinde,Sitoplazma, Morfoloji, Boyanma Kalitesi ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu ortaya koymuştur. Sadece Nükleus skorunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.28).

Tablo 4.28:"64 Saat Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	10,9	7	0,141
Sitoplazma	**21,8**	**7**	**0,003**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	**39,1**	**7**	**<0,001**
Boyanma Kalitesi	**27,6**	**7**	**<0,001**
Toplam Skor	**30,2**	**7**	**<0,001**

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan post-hoc testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunanikili karşılaştırmalar Tablo 4.29'da özetlenmiştir.

Tablo 4.29:"64 Saat Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Sitoplazma	Serum Fizyolojik 12s / 24s	Geri takip	<0,05
	Serum Fizyolojik 12s / 24s	Serum Fizyolojik 6s	<0,05
Morfoloji	**Serum Fizyolojik 24s**	**Kontrol Hasar**, Kombine 6s, Geri takip	**<0,015**
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 6s, Geri takip	<0,05
	Kombine 12s	Geri takip, Kombine 6s	<0,05
Boyanma Kalitesi	Serum Fizyolojik 6s / 12s	Geri takip, Kombine 6s, 12s	<0,05
Toplam Skor	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Geri takip	<0,05
	Kombine 24s	Geri takip	0,043
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 6s	0,023

(Not: Tablodaki p-değerleri, orijinal tablolardaki çok sayıda anlamlı bulgunun bir özetidir.)

4.8.2.1. Bulguların Değerlendirilmesi

İyileştirici Etkiye Sahip Protokoller: Serum Fizyolojik 24s protokolü, doku mimarisini (Morfoloji) kurtarmada Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi sonuçlar vermiştir.

Etkisiz Kalan Protokoller: Geri takip ve kısa süreli Kombine protokolleri gibi daha karmaşık müdahaleler, Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır.

4.8.3. "Yarı Süre Alkolde Kalma" (B1) Senaryosundaki Bulgular

"Alkolde Kalma" ana senaryosunun daha hafif düzeyi olan "Yarı Süre Alkolde Kalma" (B1, N=192) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelendiğinde, protokoller arasında tüm dörtdeğerlendirme kriteri (Nükleus, Sitoplazma, Morfoloji, Boyanma) ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu görülmüştür. (Tablo 4.30).

Tablo 4.30:"Yarı Süre Alkolde Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	**75,7**	**7**	**<0,001**
Sitoplazma	**37,3**	**7**	**<0,001**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	**27,2**	**7**	**<0,001**
Boyanma Kalitesi	**22,9**	**7**	**0,002**
Toplam Skor	**21,9**	**7**	**0,003**

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.31'da özetlenmiştir.

Tablo 4.31:"Yarı Süre Alkolde Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Nükleus	**Kontrol Hasar**, Kombine (6,12,24s),Geri takip , Serum Fizyolojik (12,24s)	**Serum Fizyolojik 6s**	**<0,05**
Sitoplazma	Kombine 6s	Kombine 12s / 24s	<0,05
	Geri takip, Serum Fizyolojik (6s, 24s)	Kombine 12s	<0,05
	Serum Fizyolojik (6s, 24s)	Kombine 24s	0,035
Morfoloji	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 6s / 12s / 24s	0,045

Boyanma Kalitesi	Kombine 24s, Serum Fizyolojik (6,12,24s)	Kombine 6s	<0,05
Toplam Skor	**Serum Fizyolojik 24s**	**Kontrol Hasar**	**0,005**
	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 12s	<0.001
	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 24s	0,026

(Not: Tablodaki p-değerleri, orijinal tablolardaki çok sayıda anlamlı bulgunun bir özetidir.)

4.8.3.1. Bulguların Değerlendirilmesi

İyileştirici Etkiye Sahip Protokol: Bu senaryoda, Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağladığı saptanan tek protokol Serum Fizyolojik 24s olmuştur.

Zararlı Etkiye Sahip Protokol: Serum Fizyolojik 6s protokolü, nükleer morfolojiyi korumada Kontrol Hasar grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü bir sonuç vermiştir ($p<0,05$).

Etkisiz Kalan Protokoller: Hipotezi oluşturan Kombine ve Geri takip protokollerinin hiçbiri, Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır.

4.8.4. "Maksimum Süre Alkolde Kalma" (B2) Senaryosundaki Bulgular

"Alkolde Kalma" ana senaryosunun ağır hasar düzeyi olan "Maksimum Süre Alkolde Kalma" (B2, N=192) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelendiğinde, protokoller arasında Nükleus, Sitoplazma, Boyanma Kalitesi ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu ortaya koymuştur. Morfoloji skorunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.32).

Tablo 4.32:"Maksimum Süre Alkolde Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	**15,1**	**7**	**0,035**
Sitoplazma	**17,9**	**7**	**0,012**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	9,99	7	0,189
Boyanma Kalitesi	**31,8**	**7**	**<0,001**

Toplam Skor	**15,9**	**7**	**0,026**

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.33'te özetlenmiştir.

Tablo 4.33: "Maksimum Süre Alkolde Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Sitoplazma	Serum Fizyolojik 12s	Serum Fizyolojik 6s	0,014
Boyanma Kalitesi	Kombine 6s	Kombine 12s	0,036
	Geri takip	Kombine 12s	0,036
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 12s	<0,001
	Serum Fizyolojik 12s	Serum Fizyolojik 6s	0,035
	Serum Fizyolojik 12s	Serum Fizyolojik 24s	0,002
Toplam Skor	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 12s	0,034

4.8.4.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Toplam Skor ve diğer tüm alt kriterlerde test edilen yedi protokolün hiçbiri, işlem yapılmayan Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır.

Bu senaryoda en başarılı protokol Serum Fizyolojik 12s olarak öne çıksa da, Kontrol Hasar grubuna istatistiksel olaraküstün değildir.

4.8.5. "Yarı Süre Ksilende Kalma" (C1) Senaryosundaki Bulgular

"Ksilende Kalma" ana senaryosunun daha hafif düzeyi olan "Yarı Süre Ksilende Kalma" (C1, N=192) artefaktına maruz bırakılmış dokular incelendiğinde, 8 farklı protokolün etkinliği karşılaştırıldığında, protokoller arasında tüm dörtdeğerlendirme kriteri (Nükleus, Sitoplazma, Morfoloji, Boyanma) ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 4.34).

Tablo 4.34:"Yarı Süre Ksilende Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	27,3	7	<0,001
Sitoplazma	40,8	7	<0,001
Morfoloji (Doku Mimarisi)	40,9	7	<0,001
Boyanma Kalitesi	23,1	7	0,002
Toplam Skor	37,0	7	<0,001

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan test sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunanikili karşılaştırmalar Tablo 4.35'te özetlenmiştir.

Tablo 4.35:"Yarı Süre Ksilende Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Nükleus	**Kontrol hasar**, Kombine (6,12,24s), Serum Fizyolojik 24s	Serum Fizyolojik 6s	<0,05
Sitoplazma	**Kontrol hasar**, Kombine (6,12,24s), Geri takip	Serum Fizyolojik 6s / 12s	<0,05
Morfoloji	**Kontrol hasar**, Kombine 6s, Geri takip	Serum Fizyolojik 6s / 12s / 24s	<0,05
Boyanma Kalitesi	**Kontrol Hasar**	Serum Fizyolojik 24s	0,023

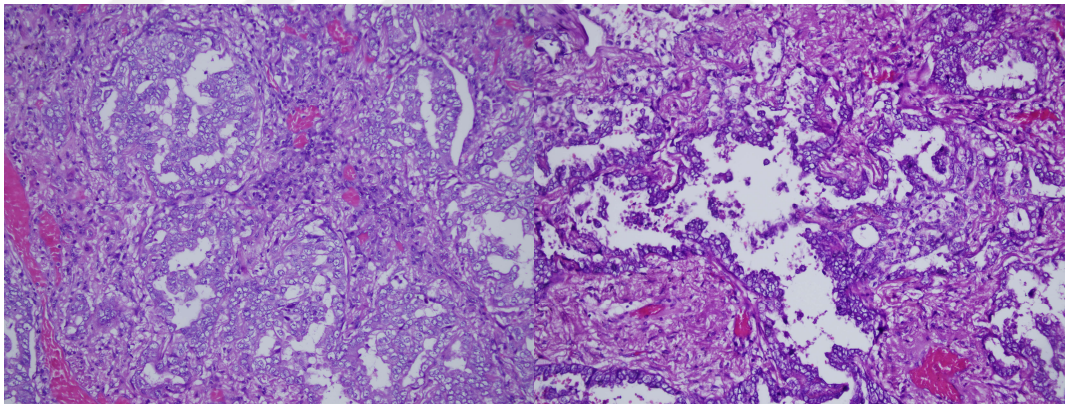
Toplam Skor	**Kontrol Hasar**, Kombine (6,12,24s), Geri takip	Serum Fizyolojik 6s	<0,05
	Kontrol Hasar, Kombine 6s	Serum Fizyolojik 12s	<0,05

(Not: Tablodaki p-değerleri, orijinal tablolardaki çok sayıda anlamlı bulgunun bir özetidir.)

4.8.5.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Zararlı Etkiye Sahip Protokoller: Bu senaryoda Serum Fizyolojik 6s ve Serum Fizyolojik 12s protokolleri, genel morfolojik kalite (Toplam Skor) açısından, hiçbir işlem yapılmayan Kontrol Hasar grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü sonuçlar vermiştir ($p<0,05$).

Nötr Etkili Protokoller: Buna karşılık, Kombine ve Geri takip protokolleri Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlamamış, ancak Serum Fizyolojik protokollerinin aksine ek bir hasara da yol açmamıştır. Bu protokollerin skorları, zararlı etki gösteren Serum Fizyolojik gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha iyi saptanmıştır.



Şekil 1: Solda hafif ksilen hasarına maruz kalmış tümörlü radikal akciğer dokusu, sağda aynı dokuya uygulanan Serum Fizyolojik 12 saatlik protokol sonucunda boyanma kalitesinde, doku bütünlüğünde, nükleer ve sitoplazmik detaylarda nispeten azalma mevcut (20x H&E)

4.8.6. "Maksimum Süre Ksilende Kalma" (C2) Senaryosundaki Bulgular

"Ksilende Kalma" ana senaryosunun ağır hasar düzeyi olan "Maksimum Süre Ksilende Kalma" (C2, N=192) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelendiğindeprotokoller arasında Nükleus, Morfoloji, Boyanma Kalitesi ve

Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu ortaya konmuştur. Sadece Sitoplazma skorunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.36).

Tablo 4.36:"Maksimum Süre Ksilende Kalma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	**18,2**	**7**	**0,011**
Sitoplazma	12,2	7	0,095
Morfoloji (Doku Mimarisi)	**28,4**	**7**	**<0,001**
Boyanma Kalitesi	**15,7**	**7**	**0,028**
Toplam Skor	**25,8**	**7**	**<0,001**

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan post-hoc testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.37'de özetlenmiştir.

Tablo 4.37:"Maksimum Süre Ksilende Kalma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

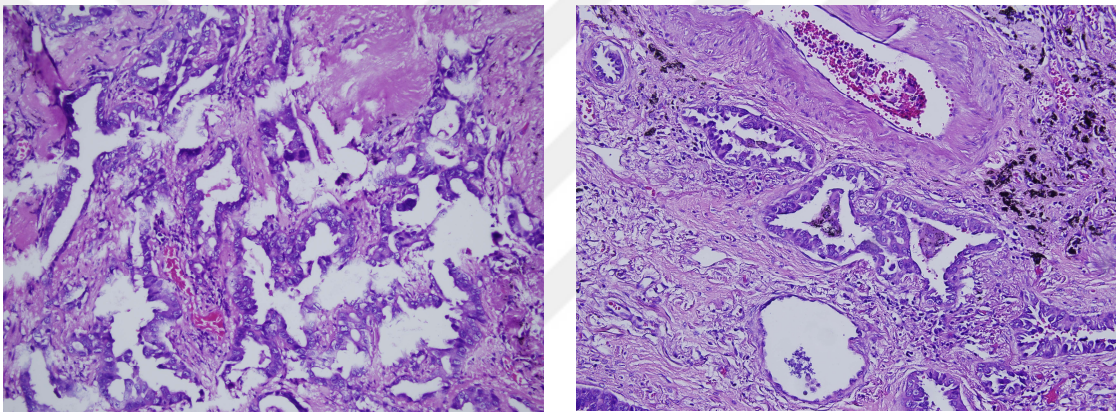
Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Nükleus	Kombine 24s	Kombine 6s	0,007
Morfoloji	Kombine 12s	**Kontrol Hasar**	**0,016**
	Kombine 12s	Kombine 6s	<0,001
	Kombine 24s	Kombine 6s	0,033
	Serum Fizyolojik 12s	Kombine 6s	0,012
Toplam Skor	Kombine 24s	**Kontrol Hasar**	**0,024**
	Kombine 12s	Kombine 6s	0,018
	Kombine 24s	Kombine 6s	<0,001

(No: Boyanma kalitesi skoru için genel Kruskal-Wallis testi anlamlı (p=0,028) olmasına rağmen, post-hoc testinde hiçbir ikili karşılaştırma p<0,05 düzeyinde istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.)

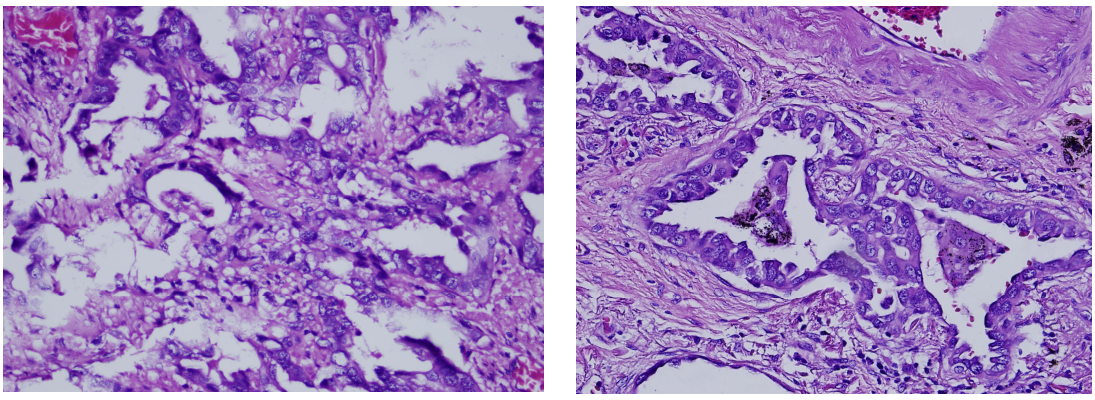
4.8.6.1 Bulguların Değerlendirilmesi

İyileştirici Etkiye Sahip Protokoller: Kombine 24s protokolü, genel morfolojik kaliteyi yansıtan Toplam Skor'da, hiçbir işlem yapılmayan Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha üstün bir sonuç elde etmiştir (p=0,024). Benzer şekilde, Kombine 12s protokolü de doku mimarisini (Morfoloji) kurtarmada Kontrol Hasar grubunu anlamlı derecede geçmiştir (p=0,016).

Etkisiz Kalan Protokoller: Basit rehidrasyon sağlayan Serum Fizyolojik protokoller, bu ağır kimyasal hasar karşısında Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır.



Şekil 2: Solda ağır ksilen hasarına maruz kalmış tümörlü radikal akciğer dokusu, sağda aynı dokuya uygulan kombine 24 saatlik protokol sonucunda kesit kalitesi ve morfolofik detaylarda belirgin artış mevcut (20x H&E)



Şekil 3: Solda ağır ksilen hasarına maruz kalmış büyük büyütmede tümörlü radikal akciğer dokusu, sağda aynı dokuya uygulanan Kombine 24 saatlik protokol

sonucunda büyük büyütme görünütüsünde boyanma, nükleer ve sitoplazmik detaylarda belirgin artış mevcut (40x H&E)

4.8.7. "Alkol Sonrası Yarı Süre Kuruma" (D1) Senaryosundaki Bulgular

"Alkol Sonrası Havada Kuruma" ana senaryosunun daha hafif düzeyi olan "Yarı Süre Kuruma" (D1, N=192) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelendiğinde, protokoller arasında Sitoplazma ve Boyanma Kalitesi skorları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu ortaya konmuştur. Nükleus, Morfoloji ve en önemlisi Toplam Skor parametrelerinde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Tablo 4.38).

Tablo 4.38:"Alkol Sonrası Yarı Süre Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	4,61	7	0,707
Sitoplazma	**16,9**	**7**	**0,018**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	12,8	7	0,078
Boyanma Kalitesi	**18,3**	**7**	**0,011**
Toplam Skor	8,68	7	0,277

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılantest sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunan ikili karşılaştırmalar Tablo 4.39'da özetlenmiştir.

Tablo 4.39: "Alkol Sonrası Yarı Süre Kuruma" Senaryosunda istatistiksel olarak anlamlı bulunan ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Boyanma Kalitesi	Kombine 6s	Kombine 12s	0,010
	Serum Fizyolojik 6s	Kombine 12s	0,002

4.8.7.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Çalışmanın ana kriteri olan Toplam Skor (p=0,277) ve diğer önemli morfolojik kriterlerde (Nükleus, Morfoloji), test edilen yedi protokolün hiçbiri, hiçbir işlem yapılmayan Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük veya zayıflık göstermemiştir.

Alt kriterler incelendiğinde, Boyanma Kalitesi gibi spesifik alanlarda bazı protokollerin (Kombine 12s) diğerlerine göre daha zayıf kaldığı görülse de, bu durum Kontrol Hasar grubuna kıyasla bir fark yaratmamıştır.

4.8.8. "Alkol Sonrası Maksimum Süre Kuruma" (D2) Senaryosundaki Bulgular

"Alkol Sonrası Havada Kuruma" ana senaryosunun ağır hasar düzeyi olan "Maksimum Süre Kuruma" (D2, N=192) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlamaverileri incelendiğinde, bu hasar düzeyinde protokoller arasında Nükleus, Morfoloji, Boyanma Kalitesi ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu ortaya konulmuştur. Sadece Sitoplazma skorunda gruplar arasında istatistiksel anlamlılık sınırda kalmıştır (p=0,050) (Tablo 4.40).

Tablo 4.40:"Alkol Sonrası Maksimum Süre Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	**20,2**	**7**	**0,005**
Sitoplazma	14,1	7	0,050
Morfoloji (Doku Mimarisi)	**15,5**	**7**	**0,030**
Boyanma Kalitesi	**42,4**	**7**	**<0,001**
Toplam Skor	**33,1**	**7**	**<0,001**

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan post-hoc testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunanikili karşılaştırmalar Tablo 4.41'de özetlenmiştir.

Tablo 4.41:"Alkol Sonrası Maksimum Süre Kuruma" Senaryosunda anlamlı ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Nükleus	Kombine 6s / 24s	Kombine 12s	<0,05
Morfoloji	Geri takip	**Kontrol Hasar**	0,021
Boyanma Kalitesi	Çeşitli Protokoller	**Kontrol Hasar**	<0,05
	Serum Fizyolojik 24s	Kombine 12s	0,001
Toplam Skor	Kombine 6s, 24s,Geri takip , Serum Fizyolojik 24s	**Kontrol Hasar**	<0,01

4.8.8.1. Bulguların Değerlendirilmesi

İyileştirici Etkiye Sahip Protokoller: Bu ağır hasar senaryosunda, Kombine 6s, Kombine 24s, Geri takip ve Serum Fizyolojik 24s protokollerinin tamamı, genel morfolojik kaliteyi yansıtan Toplam Skor'da, hiçbir işlem yapılmayan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük sağlamıştır ($p<0,01$).

Zayıf Protokoller: Önceki senaryolarda da zayıf performans gösteren Kombine 12s protokolü, bu senaryoda da Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır.

4.8.9. "Ksilen Sonrası Yarı Süre Kuruma" (E1) Senaryosundaki Bulgular

"Ksilen Sonrası Havada Kuruma" ana senaryosunun daha hafif düzeyi olan "Yarı Süre Kuruma" (E1, N=192) artefaktına maruz bırakılmış dokuların skorlama verileri incelenmiştir. Analizler, Nükleus, Sitoplazma, Boyanma Kalitesi ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 4.42).

Tablo 4.42:"Ksilen Sonrası Yarı Süre Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	**39,7**	**7**	**<0,001**
Sitoplazma	**39,4**	**7**	**<0,001**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	13,3	7	0,065
Boyanma Kalitesi	**21,3**	**7**	**0,003**
Toplam Skor	**32,6**	**7**	**<0,001**

Anlamlı bulunan genel farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla yapılan post-hoc testi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$) bulunanikili karşılaştırmalar Tablo 4.43'de özetlenmiştir.

Tablo 4.43:"Ksilen Sonrası Yarı Süre Kuruma" Senaryosunda anlamlı ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Nükleus	Kombine 6s	Kombine 12s/24s,Geri takip , Serum Fizyolojik 12s/24s	<0,05
Sitoplazma	**Kontrol Hasar**, Kombine 6s, Geri takip, Serum Fizyolojik 6s, 12s, 24s	Kombine 24s	<0,05
Boyanma Kalitesi	Kombine 6s	Kombine 12s, Serum Fizyolojik 24s	0,029
Toplam Skor	Kombine 6s	Kombine 12s, Kombine 24s, Serum Fizyolojik 24s	<0,015

	Serum Fizyolojik 6s	Kombine 24s, Serum Fizyolojik 24s	<0,05

4.8.9.1. Bulguların Değerlendirilmesi

Zararlı Etkiye Sahip Protokoller: Bazı uzun süreli müdahaleler dokuya ek hasar vermiştir. Özellikle Kombine 24s protokolü, sitoplazma gibi önemli kriterlerde, hiçbir işlem yapılmayan Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha kötü sonuçlar almıştır ($p<0,05$).

Daha Başarılı Protokoller: Buna karşılık, kısa süreli müdahalelerden olan Kombine 6s ve Serum Fizyolojik 6s, Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlamasa da, zararlı olduğu saptanan uzun süreli protokollere (Kombine 24s, Serum Fizyolojik 24s) karşı Toplam Skor'da anlamlı bir üstünlük göstermişlerdir.

4.8.10. "Ksilen Sonrası Maksimum Süre Kuruma" (E2) Senaryosundaki Bulgular

"Ksilen Sonrası Havada Kuruma" ana senaryosunun daha ağır düzeyi olan"Maksimum Süre Kuruma" (E2, N=192) artefaktına maruz bırakılan dokularda yapılananalizler, tüm dörtdeğerlendirme kriteri ve Toplam Skor üzerinde istatistiksel olarak oldukça anlamlı farklar olduğunu göstermiştir (Tablo 4.44).

Tablo 4.44:"Ksilen Sonrası Maksimum Süre Kuruma" Senaryosunda kurtarma protokollerinin etkinliğine ilişkin Kruskal-Wallis H Testi sonuçları

Morfolojik Kriter	Kruskal-Wallis χ^2	df	p-değeri
Nükleus	**75,8**	**7**	**<0,001**
Sitoplazma	**65,0**	**7**	**<0,001**
Morfoloji (Doku Mimarisi)	**88,8**	**7**	**<0,001**
Boyanma Kalitesi	**65,6**	**7**	**<0,001**
Toplam Skor	**107,0**	**7**	**<0,001**

Post-hoc analizi, bu senaryo için çok sayıda anlamlı ikili karşılaştırma ortaya koymuştur. Bulguların özeti Tablo 4.45'te sunulmuştur.

Tablo 4.45:"Ksilen Sonrası Maksimum Süre Kuruma" Senaryosunda anlamlı ikili karşılaştırmalar (DSCF Post-Hoc Testi)

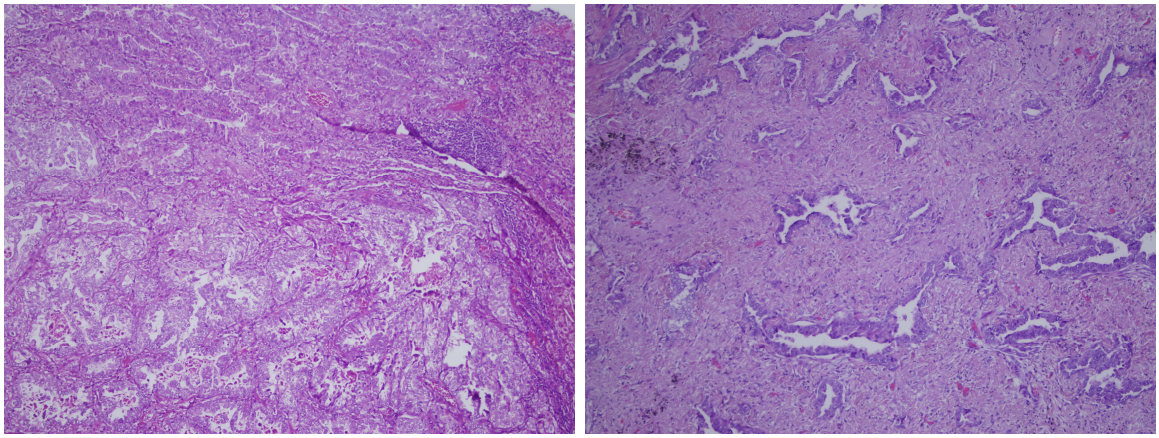
Değerlendirme Kriteri	Üstün Olan Protokol	Karşılaştırılan Protokol	p-değeri
Tüm Kriterler	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Kombine (6s, 12s, 24s)	<0,01
Tüm Kriterler	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Geri takip	<0,01
Tüm Kriterler	Serum Fizyolojik (6s, 12s, 24s)	Kontrol Hasar	<0,05

(Not: Bu senaryoda Serum Fizyolojik protokollerin üstünlüğü açık ve tutarlı olduğu için tablo tüm kriterleri kapsayacak şekilde özetlenmiştir.)

4.8.10.1. Bulguların Değerlendirilmesi

İyileştirici Protokoller: Bu senaryoda Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlayan stratejiler Serum Fizyolojik protokolleri olmuştur. Her üç Serum Fizyolojik protokolü de (6s, 12s, 24s), istisnasız tüm morfolojik kriterlerde ve en önemlisi Toplam Skor'da, hiçbir işlem yapılmayan Kontrol Hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha üstün bulunmuştur ($p<0,05$).

Etkisiz Kalan Protokoller: Buna karşılık, Kombine protokoller ve Geri takip protokolü, Kontrol Hasar grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır. Ayrıca bu protokoller, Serum Fizyolojik protokollerine kıyasla tüm kriterlerde daha düşük performans göstermişlerdir.



Şekil 4: Solda ağır ksilen sonrası kuruma ardışık hasarına maruz kalmış tümörlü radikal akciğer dokusu, sağda aynı dokuya uygulanan Serum Fizyolojik 24 saatlik rekonstrüksüyon protokolü sonucunda dokudaki mikro çatlaklarda azalma, morfolojik detaylarda ve kesit kalitesinde belirgin artış mevcut (10x H&E)

Tablo 4.46 Tüm ağır hasar bulgularının karşılaştırmalı özeti.

Hasar Tipi	En Başarılı Protokol(ler)	Kontrol Hasara Göre Etki	En Başarısız Protokol(ler) / Notlar
Ağır Kuruma Hasarı (Havada Kalma - A2)	Serum Fizyolojik 24s	Sınırlı İyileştirici	Toplam tüm protokoller yetersiz kaldı
Ağır Kimyasal Hasar (Alkolde Kalma - B2)	Serum fizyolojik 12s	Etkisiz	Kombine 12s. Sonuçlar daha belirsiz.
Ağır Kimyasal Hasar (Ksilende Kalma - C2)	Kombine 12s ve 24s	İyileştirici	Serum fizyolojik protokoller yetersiz kaldı.
Ağır Ardışık Kuruma Hasarı (Alkol Sonrası Kuruma - D2)	Kombine (6,24s), Geri takip, Serum fizyolojik 24s	İyileştirici	Kombine 12s. Farklı yaklaşımlar işe yaradı.
Ağır Ardışık Kuruma Hasarı (Ksilen Sonrası Kuruma - E2)	Serum fizyolojik (tüm süreler)	İyileştirici	Kombine ve Geri takip protokolleri tamamen başarısız.

5. TARTIŞMA

Modern patoloji laboratuvarlarında otomasyonun getirdiği standardizasyona rağmen cihaz arızaları gibi öngörülemeyen durumlar, doku takibinde önemli bir zafiyet oluşturmaya devam etmektedir. Bu çalışmada, otomasyon kaynaklı çeşitli doku takip hatalarının morfolojik etkileri ve bu hasarları gidermeye yönelik farklı kurtarma stratejilerinin etkinliği semi-kantitatif bir yaklaşımla saptanmıştır. Çalışmamızın tüm artefakt senaryolarını birleştiren genel analizi, test edilen hiçbir kurtarma protokolünün genele yayılan tutarlı bir başarı sağlayamadığını ortaya koymuştur (Tablo 4.6). Bu önemli bulgu, her duruma uyan tek tip bir çözümün olmadığını kanıtlamaktadır. Dolayısıyla bir kurtarma protokolünün başarısını tartışmadan önce, hasarın doğasınıanlamanın ne kadar önemli olduğu anlaşılmıştır. Hasarın morfoloji üzerindeki etkisi, maruz kalınan kimyasalın türüne, hatanın süresine ve dokunun köken aldığı organın yapısal özelliklerine göre değişmektedir. Bu bölümde, öncelikle bu hasar mekanizmaları ve ardından mekanizmalara uygun kurtarma stratejileri tartışılacaktır.

5.1. ARTEFAKTIN ANATOMİSİ: HASARIN ŞİDDETİ, SÜRESİ VE DOKUNUN ROLÜ

Çalışmamız, farklı artefakt senaryolarının doku üzerinde bıraktığı hasarın eşit olmadığını göstermiştir. Genel olarak, doku bütünlüğünü en çok bozan hasar tipinin ksilen sonrası havada uzun süre kuruma olduğu, en az bozanın ise alkolde uzun süre bekleme olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3). Bu durum, hasar mekanizmasındaki temel farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Alkolde uzun süre bekletilen dokularda büzüşme artefaktı görülür (18). Çalışmamızda bekleme süresinin artmasının morfolojik skoru anlamlı derecede kötüleştirmemesi dikkat çekicidir (Tablo 4.4). Alkolün birincil etkisi dehidrasyon olsa da, aynı zamanda bir dehidrant koagulan fiksatif olarak bilinir (19–21). Alkol, özellikle denatüre ediciliği en yükseklerden biri olan etanol, proteinleri denatüre ederek ve doku mimarisini belirli bir seviyede stabilize eder (22). Bu nedenle, hasar belirli bir doygunluk noktasına ulaştıktan sonra sürenin uzaması, ek bir yıkıma yol açmamaktadır. Buna karşın, temel mekanizması kontrolsüz ve hızlı su kaybı olan

proses öncesi kuruma ve ksilen sonrası havada kuruma gibi senaryolarda, hatanın süresi doğrudan hasarın şiddetiyle ilişkili bulunmuştur. Özellikle çalışmadaki en düşük morfolojik skorların kaydedildiği ksilen sonrası havada kuruma, iki adımlı bir hasar mekanizmasıdır: İlk adımda doku, normal bir takip adımı olan ksilen banyosundan geçer. Bu adım kendi başına bir hata olmasa da, dokuyu kırılgan ve hassas bir duruma getirir. Ksilen sadece alkolü değil, dokuya bağlı son su ve lipit moleküllerini de sökerekprotein ağını bir sonraki fiziksel strese karşı savunmasız bırakır(13).İkinci adımda hassas durumdaki doku havayla temas ettiğinde, içindeki uçucu solventin hızla buharlaşmasıyla ani fiziksel çöküşe uğrar. Benzer bir mekanizmayla, fiksasyon sırasında formalinin buharlaşmasının da intraepitelyal yarık oluşumuna ve akantolize neden olabildiği gösterilmiştir (10).

Bununla birlikte, artefaktın şiddetini belirleyen sadecehasarın türü ve süresi değildir. Dokunun kendi yapısal özellikleri de kritik bir rol oynamaktadır. Tüm deney koşulları bir arada değerlendirildiğinde, artefaktlara karşı en dirençli organın akciğer, en hassas organın ise kolon olduğu görülmüştür. Çalışmamızda artefaktlara karşı en dirençli organın akciğer olduğu görülse de, literatürde akciğerin kendi süngerimsi yapısından kaynaklanan psödopapiller vb. yapılar gibi tanısal tuzaklara yol açan farklı bazı pre-analitik artefaktlara yatkın olduğu gösterilmiştir (23). Çalışmamızda ise akciğerin kendine özgü havadar yapısı, solventlerin homojen bir şekilde nüfuz etmesine ve uzaklaşmasına olanak tanıyarak büzüşme riskini azaltırken; kolonun yoğun glandüler ve müsinöz yapısı, bu süreçleri zorlaştırarak daha şiddetli artefakt oluşumuna zemin hazırlamış olabilir.Çalışmamızda gözlemlediğimiz, akciğer ve kolon dokularının farklı yapısal özelliklerinin takip sürecinde farklı artefaktlara yol açması, pre-analitik değişkenlerin moleküler analizler üzerindeki önemini vurgulayan çalışmalarla tutarlıdır. Özellikle hewitt ve arkadaşlarının fiksasyon hızı gibi temel parametrelerin doku tipine göre önemli ölçüde değişebileceğini ve bu durumun organa göre standardize edilmemiş protokollerde sonuç tutarlılığını tehdit ettiğini belirtmektedir (24).

5.2. HASAR MEKANIZMASINA DAYALI KURTARMA STRATEJİLERİ

Çalışmamızın temel bulgusu, doğru kurtarma stratejisinin belirlenmesindeki asıl faktörün, karşılaşılan artefaktın altında yatan hasar mekanizmasına göre özelleşmesi gerektiğidir. Bu ilke, ksilende uzun süre bekletilen dokular ile ksilen sonrası havada kurutulan dokuların kurtarma protokollerine verdiği zıt yanıtlarda kanıtlanmıştır.

Ağır kimyasal hasar olarak tanımlayabileceğimiz ksilende uzun süre bekletilen dokularda, çalışmamızdaki geri takip işlemi içeren kombine protokoller en başarılı sonuçları vermiştir. Bu bulgu, ksilenin doku proteinlerini sertleştirerek yarattığı kimyasal engelin serum fizyolojik solüsyonu ile rehidrasyonu gibi fiziksel yöntemlerle aşılamadığını; bunun yerine dokuyu kimyasal olarak "sıfırlayan" bir geri takip işleminin başarılı bir rehidrasyon için ön koşul olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgumuzun kanıtı ağır hasar durumunda kombine protokolünün, hiçbir işlem yapılmayan kontrol hasar grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlamasıdır (Tablo 4.37). Bu, protokolün dokuyu sadece mevcut durumunu korumakla kalmayıp onardığını gösteren kritik bir bulgudur (Şekil 1, Şekil 2).

Buna karşın, en yıkıcı fiziksel hasar olan ksilen sonrası havada kuruma durumunda, sonuçlar tersine dönmüştür. Bu hasar tipinde, geri takip içeren kimyasal sıfırlama protokolleri tamamen etkisiz kalmıştır. Bu durum, hasarın onarımının artık kimyasal bir işlemden ziyade, kaybedilen sıvının yerine konması gibi yapısal bütünlüğü hedefleyen bir yaklaşım gerektirdiğini göstermektedir. Bu ağır kuruma hasarının en çarpıcı sonucu, çalışmadaki en basit müdahale olan her üç serum fizyolojik protokolünün de kontrol hasar grubuna göre tüm kriterlerde istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük sağlamasıdır (Tablo 4.45). Hipotezimizin aksine bu bulgu serum fizyolojik uygulamasının dokuyu kurtarmakla kalmayıp, hasarlı başlangıç durumuna göre belirgin şekilde iyileştirdiğini kanıtlamaktadır (Şekil 4).

Bu iki hasar tipi arasındaki zıtlık, laboratuvar pratiği için kritik bir mesaj vermektedir: Hasarın kaynağını bilmeden uygulanacak standart bir kurtarma protokolü, faydadan çok zarar getirebilir. Bu çalışmada da gördüğümüz gibi ksilende beklemiş bir dokuya doğrudan uygulanan basit rehidrasyonun, genel değerlendirme kalitesini (Toplam Skor), hiçbir kurtarma işlemi uygulanmayan hasarlı kontrol

grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla bozduğu kanıtlanmıştır (Tablo 35, Şekil 3). Benzer şekilde, alkolde uzun süre beklemiş bir dokuya uygulanan kısa süreli rehidrasyon da nükleer morfolojiye ek zarar vermiştir. Bu bulgularımız, körü körüne uygulanan bir kurtarma işleminin, hasar artırma işlemine dönüşme riskini ortaya koymaktadır.

5.3. DOKUYA ÖZGÜ YANITLAR VE PROTOKOL STANDARDİZASYONUNUN SINIRLARI

Çalışmamız, kurtarma protokollerinin etkinliğinin doku tipine göre de anlamlı farklılıklar gösterdiğini, literatürdeki gözlemlerle paralel olarak ortaya koymuştur (1,4). Akciğer dokusu genel olarak kurtarma işlemlerine istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar verirken (Tablo 4.8), meme dokusunda neredeyse hiçbir protokolün anlamlı bir fark yaratmaması dikkat çekicidir (Tablo 4.10). Bu durum O. Rolls ve Slaoui & Fiettetarafından da vurgulandığı gibi, büyük ve yağlı dokuların takip protokolleri için en zorlu materyallerden biri olmasıyla açıklanabilir (4,25).

Meme dokusunun yoğun yağ içeriği, sulu solüsyonların etkinliğini ciddi şekilde engelleyerek hem hasarın boyutunu artırmış hem de kurtarma çabalarını sonuçsuz bırakmış olabilir. Benzer şekilde, uterusun yoğun düz kas yapısı ve kolonun müsinöz içeriği gibi özellikler de protokollerin başarısını etkileyen faktörler olarak değerlendirilmelidir. Bu "dokuya özgü yanıt", laboratuvarların tek bir standart "kurtarma protokolü" uygulamasının neden her zaman başarılı olamayacağını açıklamaktadır. Bulgularımız, O Rolls'un sunduğu karar ağaçlarına benzer şekilde sorunun çözümünde doku tipinin de göz önünde bulundurulması gerektiği fikrini güçlü bir şekilde desteklemektedir (4).

5.4. ÇALIŞMANIN KISITLILIKLARI

Bu çalışmanın bulguları değerli olmakla birlikte, bazı kısıtlılıkları da mevcuttur. İlk olarak, farklı koşullar altında gerçek bir laboratuvar kriz anının tüm değişkenlerini tam olarak yansıtmayabilir. İkinci olarak, çalışmada kullanılan doku tipleri yaygın yumuşak doku örneklerini temsil etse de, dekalsifikasyon gerektiren kemik gibi sert dokular çalışma kapsamına alınmamıştır. Bu çalışmada elde edilen kurtarma protokolü sonuçları, dekalsifiye edilmiş dokular için doğrudan geçerli

olmayabilir. Benzer şekilde lenf nodları, beyin veya deri gibi farklı yapısal özelliklere sahip diğer dokularda da sonuçların farklılık gösterebileceği unutulmamalıdır. Özellikle mezenkimal dokuları temsilen kullanılan Uterus örneklerinin tek bir vakadan elde edilmiş olması, bu doku tipine ait sonuçların genellenebilirliğini sınırlamaktadır. Son olarak, geliştirdiğimiz skorlama sistemi literatüre dayansa da "yarı-kantitatif" bir yöntemdir ve doğası gereği bir miktar öznellik içerebilir. Ancak bu durum, çift-kör tasarım ve biri kıdemli patoloji asistanı, diğeri 30 yıl deneyimli bir uzman patolog olmak üzere iki farklı gözlemcinin değerlendirmesiyle en aza indirilmeye çalışılmıştır.

6. SONUÇLAR

6.1. SONUÇLAR

Bu deneysel çalışma, otomatize doku takip sürecindeki hatalar sonrası hasar görmüş dokuların kurtarılmasına yönelik stratejilerin etkinliğini sistematik olarak karşılaştırmış ve aşağıdaki temel sonuçlara ulaşmıştır:

6.1.1. Genellenebilir "En İyi" Kurtarma Protokolü Yoktur

Çalışmamızın en temel bulgusu, hasarlı dokuları kurtarmak için her duruma uyan evrensel bir protokolün olmadığıdır. En etkili strateji, dokunun maruz kaldığı hasarın mekanizmasına doğrudan bağlıdır. Bu durum, başlangıç hipotezimizin sadece ağır kimyasal hasar "Ksilende Kalma" durumunda doğrulanması, ancak ağır fiziksel hasar "Kuruma" durumunda reddedilmesiyle kanıtlanmıştır.

6.1.2. Mekanizmaya Özgü Çözüm Etkilidir

Başarılı bir kurtarma için hasarın doğasına uygun bir müdahale gerekmektedir:

Ksilen Kimyasal Hasarında: Dokuyu kimyasal olarak sıfırlayan ve uzun süreli rehidrasyon içeren Kombine protokoller, hasarlı kontrol grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlayarak en etkili yöntem olmuştur.

Fiziksel Hasarda (örn: Ksilen Sonrası Havada Kuruma): En basit ve en ucuz yöntem olan serum fizyolojik ile rehidrasyon, hasarlı kontrol grubuna göre anlamlı bir iyileşme sağlayarak en etkili strateji olarak saptanmıştır.

6.1.3. Yanlış Müdahale Zarar Verebilir

Hasar tipine uygun olmayan bir kurtarma protokolü seçimi, dokuyu iyileştirmek yerine daha da kötüleştirebilir. Kurumuş bir dokuya Kombine protokol uygulamak veya alkol hasarlı bir dokuya kısa süreli rehidrasyon yapmak gibi yanlış müdahalelerin morfolojiyi daha da bozduğu gösterilmiştir.

6.1.4. Doku Tipinin Etkisi

Kurtarma protokollerinin başarısı, dokunun yağ veya kas içeriği gibi içsel özelliklerinden de etkilenmektedir. Özellikle yağ içeriği zengin olan Meme dokusunda, test edilen hiçbir protokolün anlamlı bir üstünlük sağlayamaması, bu doku tipinin reprosesing işlemlerine karşı en dirençli materyallerden biri olduğunu göstermektedir (4,25).

6.2. ÖNERİLER

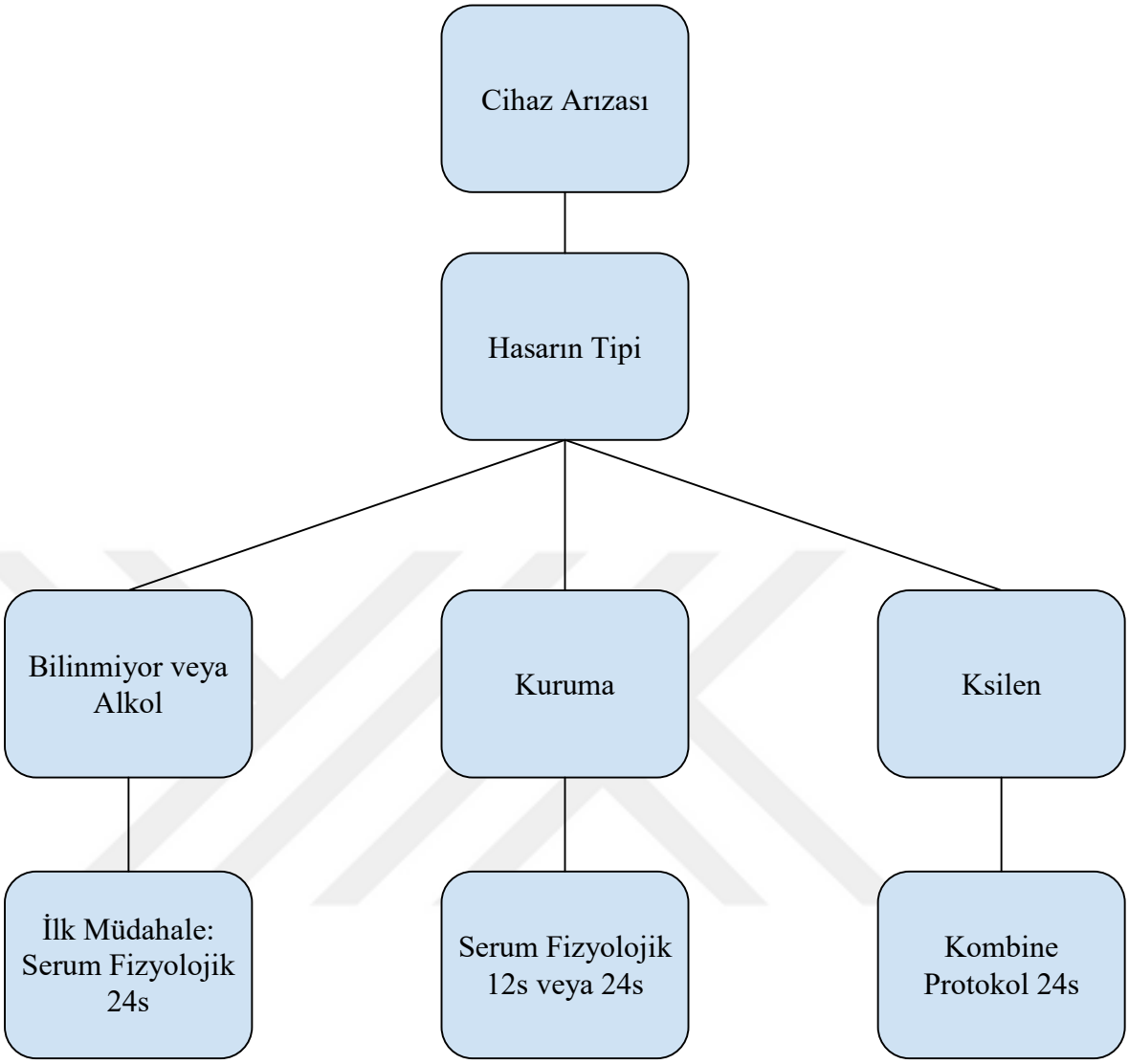
Bu sonuçlar ışığında, hem laboratuvar pratiği hem de gelecek çalışmalar için şu öneriler geliştirilmiştir:

6.2.1. Laboratuvar Pratiğine Yönelik Öneriler

Laboratuvarların, tüm kriz anları için tek bir standart protokol yerine, hasarın nedenine göre hareket eden aşağıdaki gibi kanıta dayalı bir karar algoritması benimsemesi önerilir:

- **Hasar nedeni ksilen ise (Kimyasal Hasar):** Dokuyu kimyasal olarak sıfırlayan Kombine 24s protokolü tercih edilmelidir.
- **Hasar nedeni kuruma ise (örn:Ksilen Sonrası Havada kalma):** Dokuyu tekrar solventlere maruz bırakmaktan kaçınarak, rehidrasyon sağlayan Serum fizyolojik 12s veya 24s protokolü uygulanmalıdır.
- **Hasarın nedeni belirsiz veya alkol ise:** En az risk taşıyan ve birçok durumda etkili olan Serum fizyolojik 24s protokolünün ilk müdahale olarak denenmesi en güvenli yaklaşımdır.

Bu algoritmanın etkinliği için, cihaz arızalarının doğru şekilde dokümante edilmesi önem taşımaktadır (Şekil 5)



Şekil 5: Karar ağacı

6.2.2. Gelecek Çalışmalara Yönelik Öneriler

6.2.2.1. İmmünohistokimyasal (IHK) ve Moleküler Validasyon

Bu çalışmanın en önemli devam adımı, morfolojik olarak başarılı bulunan kurtarma protokollerinin (özellikle serum fizyolojik ve Kombine), dokunun antijenik ve moleküler bütünlüğü üzerindeki etkilerinin incelenmesidir. Morfolojik olarak kurtarılmış bir dokunun, antijenik özelliklerini ne ölçüde koruduğu kritik bir sorudur (1,26). Bu nedenle, kurtarılan dokularda IHK boyanmasının ve DNA/RNA kalitesinin (PCR, FISH, NGS için) ne düzeyde korunduğu mutlaka araştırılmalıdır.

6.2.2.2. Farklı Doku Tiplerinin İncelenmesi

Bu çalışmanın kapsamı dışında kalan kemik (dekalsifikasyon sonrası), beyin ve deri gibi özgün yapıdaki dokular için de benzer sistematik çalışmaların yapılması, daha evrensel kurtarma rehberlerinin oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

6.2.2.3. Protokol Sürelerinin Optimizasyonu

Başarılı bulunan protokollerin (örn: Serum fizyolojik 12s/24s), daha kısa sürelerde de benzer başarıyı gösterip göstermeyeceği araştırılarak laboratuvar iş akışları için zaman optimizasyonu sağlanabilir.

Sonuç olarak bu çalışma, laboratuvar kriz anlarında değerli hasta materyallerini kurtarmak için rasyonel ve kanıta dayalı bir yaklaşımın temelini atmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Goss G, Petras RE, Perkins A, Miller M. Effects of Refixation and Reprocessing on the Quality of Slides Prepared from Paraffin Embedded Tissues. J Histotechnol. 1992;15(1):43-47. doi:10.1179/his.1992.15.1.43
2. Prats-Muñoz G, Malgosa A, Isidro A, Galtés I. Optimizing specimen processing for ancient soft tissue specimens. Biotech Histochem. 2015;90(4):278-287. doi:10.3109/10520295.2014.989400
3. Rao S, Masilamani S, Sundaram S, Duvuru P, Swaminathan R. Quality Measures in Pre-Analytical Phase of Tissue Processing: Understanding Its Value in Histopathology. J Clin Diagn Res. 2016;10(1):EC07-EC11. doi:10.7860/JCDR/2016/14546.7087
4. Geoffrey O Rolls. Difficult Blocks and Reprocessing. Leica Biosystems. Preprint posted online 2021. [Erişim tarihi: 2025 Eylül 22].https://www.leicabiosystems.com/sites/default/files/media_document-file/2024-03/210443_Rev_B_Difficult_Blocks_and_Reprocessing_Full.pdf
5. Van Den Tweel JG, Taylor CR. A brief history of pathology: Preface to a forthcoming series that highlights milestones in the evolution of pathology as a discipline. Virchows Arch. 2010;457(1):3-10. doi:10.1007/s00428-010-0934-4
6. Kavouras SA, Anastasiou CA. Water Physiology: Essentiality, Metabolism, and Health Implications. Nutr Today. 2010;45(6):S27. doi:10.1097/NT.0b013e3181fe1713
7. Harvey AH, Friend DG. Physical properties of water⋆. Içinde: Palmer DA, Fernández-Prini R, Harvey AH, ed. Aqueous Systems at Elevated Temperatures and Pressures. Academic Press; 2004:1-27. doi:10.1016/B978-012544461-3/50002-8
8. Riveros-Perez E, Riveros R. Water in the human body: An anesthesiologist's perspective on the connection between physicochemical properties of water and physiologic relevance. Ann Med Surg (Lond). 2018;26:1-8. doi:10.1016/j.amsu.2017.12.007
9. Grizzle WE, Stockard CR, Billings PE. The Effects of Tissue Processing Variables Other Than Fixation on Histochemical Staining and Immunohistochemical Detection of Antigens. J Histotechnol. 2001;24(3):213-219. doi:10.1179/his.2001.24.3.213
10. Jimson S, Malathi L, Kumar G, Balachander N. Artifact in Histological Section. Biomed Pharmacol J. 2016;9(2):843-845. doi:10.13005/bpj/1014
11. Eltoum I, Fredenburgh J, Grizzle WE. Advanced Concepts in Fixation: 1. Effects of Fixation on Immunohistochemistry, Reversibility of Fixation and Recovery of Proteins, Nucleic Acids, and other Molecules from Fixed and Processed Tissues. 2. Developmental Methods of Fixation. J Histotechnol. 2001;24(3):201-210. doi:10.1179/his.2001.24.3.201
12. Eltoum I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. J Histotechnol. 2001;24(3):173-190. doi:10.1179/his.2001.24.3.173
13. Wolfe D. 6 - Tissue processing. Içinde: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, ed. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (Eighth Edition). Elsevier; 2019:73-83. doi:10.1016/B978-0-7020-6864-5.00006-2

14. Spencer LT. 7 - Microtomy for paraffin and frozen sections. Içinde: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, ed. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (Eighth Edition). Elsevier; 2019:84-95. doi:10.1016/B978-0-7020-6864-5.00007-4
15. Prentø P. Staining of macromolecules: possible mechanisms and examples. Biotech Histochem. 2009;84(4):139-158. doi:10.1080/10520290902908810
16. Bancroft JD, Layton C. 10 - The hematoxylins and eosin. Içinde: Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD, ed. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques (Eighth Edition). Elsevier; 2019:126-138. doi:10.1016/B978-0-7020-6864-5.00010-4
17. Lyon H, ed. Theory and Strategy in Histochemistry. Springer; 1991. doi:10.1007/978-3-642-73742-8
18. Margarone JE, Natiella JR, Vaughan CD. Artifacts in oral biopsy specimens. J Oral Maxillofac Surg. 1985;43(3):163-172. doi:10.1016/0278-2391(85)90154-5
19. Essen HF van, Verdaasdonk MAM, Elshof SM, Weger RA de, Diest PJ van. Alcohol based tissue fixation as an alternative for formaldehyde: influence on immunohistochemistry. J Clin Pathol. 2010;63(12):1090-1094. doi:10.1136/jcp.2010.079905
20. Panzacchi S, Gnudi F, Mandrioli D, Falcioni L, Bacci B, Vornoli A, et al. Effects of short and long-term alcohol-based fixation on Sprague-Dawley rat tissue morphology, protein and nucleic acid preservation. Acta Histochem. 2019;121(6):750-760. doi:10.1016/j.acthis.2019.05.011
21. Rahman MdA, Sultana N, Ayman U, Akter A, Islam MR, Hossain M. Alcoholic fixation over formalin fixation: A new, safer option for morphologic and molecular analysis of tissues. Saudi J Biol Sci. 2022;29(1):175-182. doi:10.1016/j.sjbs.2021.08.075
22. Bhakuni V. Alcohol-Induced Molten Globule Intermediates of Proteins: Are They Real Folding Intermediates or Off Pathway Products? Arch Biochem Biophys. 1998;357(2):274-284. doi:10.1006/abbi.1998.0794
23. Thunnissen E, Blaauwgeers HJLG, de Cuba EMV, Yick CY, Flieder DB. Ex Vivo Artifacts and Histopathologic Pitfalls in the Lung. Arch Pathol Lab Med. 2016;140(3):212-220. doi:10.5858/arpa.2015-0292-OA
24. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Chung JY, Nsouli-Maktabi H, Sorensen PH, et al. Tissue Handling and Specimen Preparation in Surgical Pathology: Issues Concerning the Recovery of Nucleic Acids From Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue. Arch Pathol Lab Med. 2008;132(12):1929-1935. doi:10.1043/1543-2165-132.12.1929
25. Slaoui M, Fiette L. Histopathology Procedures: From Tissue Sampling to Histopathological Evaluation. Methods Mol Biol. 2011;691:69-82. doi:10.1007/978-1-60761-849-2_4
26. Lunetta M, Grivois M, Hansen C, Ouine B, Racaud-Sultan C. Comparative study of two reprocessing methods for formalin fixed paraffin embedded tissue. J Histotechnol. 2022;45(3):120-128. doi:10.1080/01478885.2022.2062532