

Kedi Ovaryumunun Tespitinde Zamanlamanın ve Kullanılan Fiksatiflerin Folikül Korunması Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

Comparison of the Effects of Timing and Fixatives Type Used in the Detection of the Feline Ovary on the Protection of the Follicles Integrity

© Ferda Topal Çelikkan¹, © Duygu Baki Acar², © Mürşide Ayşe Demirel³, © Burcu Ekim⁴, © Sinan Özkavukçu⁵, © Halit Kanca⁶, © Seçkin Salar⁶, © Ayhan Baştan⁶, © Esra Erdemli¹

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

²Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, Türkiye

³Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Deney Hayvanları Bakım ve Deneysel Araştırmalar Ünitesi, Ankara, Türkiye

⁴Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi, Ankara, Türkiye

⁵Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üremeye Yardımcı Tedavi ve Eğitim Merkezi, Ankara, Türkiye

⁶Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Ovaryohisterektomi (OHE) ya da ovaryumun cerrahi operasyonlarında yapılan ligasyon doku bütünlüğü ve yapısını etkilemektedir. Özellikle çıkarılan ovaryumlar kemoterapi/radyoterapi alan hastalarda dondurulup çözülerek tekrar nakil edilecek ise ligasyonun ovaryum üzerindeki etkisinin histopatolojik analizi ve folikül görünüm ve yapılarının değerlendirilmesi önemli hale gelmektedir. Analizlerin doğru bir şekilde yapılabilmesi de dokunun doğru solüsyonla fikse edilmiş olmasını gerektirir. Biz de bu nedenle çalışmamızda kedi ovaryumlarında OHE sırasında uygulanan ligasyon sonrası dokunun uzaklaştırılması arasında geçen süre ile %10 tamponlu formalin ve Bouin fiksatiflerinin doku korunumu ve foliküller üzerine etkilerinin ortaya konulması ve elde edilen bulgular doğrultusunda uygun fiksatifin belirlenmesini amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Kliniği'ne rutin OHE amacıyla gelen sahipli kedilerden ovaryumların alınması sırasında, tek taraflı ligasyon 3 dakika süreyle uygulandı. Her ovaryumun yarısı Bouin yarısı %10 tamponlu formalin solüsyonuna alınarak bir günlük fiksasyon süresinden sonra rutin takibe alınıp hematoksilen eozinle boyandı ve sağlam ve dejenere primordiyal foliküller sayılarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Fiksatif tipinden bağımsız olarak operasyon sırasında ligasyon yapılarak ve yapılmaksızın çıkarılan ve doğrudan fiksatife alınan kedi ovaryumlarının hem makroskopik açıdan hem de histolojik değerlendirilmesinde doku korunumu ve bütünlüğü bakımından incelendiğinde bir fark ortaya çıkmadığı tespit edildi. Ovaryumlarda nekroz, konjesyon, ekstrasvazyon izlenmedi. Fiksatiflerin doku korunumuna etkisi incelendiğinde; Bouin ile fikse edilen kedi ovaryum korteksinde gözlenen foliküller çoğunlukla normal görünümde iken formalin ile fikse edilenlerin çoğunluğu dejenere görünümde foliküllerden oluşmaktaydı.

Sonuç: Çalışmamızda kedi ovaryumlarının fiksasyonunda kısa süreli ligasyonun etkisinin bulunmadığı ve Bouin solüsyonunun formaline göre belirgin olarak daha iyi bir folikül ve hücre bütünlükle birlikte tüm yapının korunumunu sağladığı ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kedi Ovaryumu, Ligasyon, Tamponlu Formalin, Bouin Solüsyonu

Abstract

Objectives: Ligation during ovariectomy (OHE) or surgical operations of the ovary affect the integrity and structure of the tissue. Evaluation of the ovarian follicle appearance and structures become important, especially if the removed ovaries are to be frozen and thawed and re-transplanted in patients receiving chemotherapy/radiotherapy. Accurate analysis requires fixation of the tissue with the convenient solution. In our

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Ferda Topal Çelikkan

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 506 479 47 02 E-posta:ftopal@ankara.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-8254-0558

Geliş Tarihi/Received: 11.01.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 19.03.2021

©Telif Hakkı 2021 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, Galenos Yayınevi tarafından yayımlanmıştır.

Yayımlanan tüm içerik CC BY-NC-ND lisansı altındadır.



Abstract

study, we aimed to demonstrate the effect of 10% buffered formalin and Bouin solution on feline ovarian follicles and to determine the fixative with the effect of the time elapsed between ligation and removal of tissue during OHE in feline ovaries.

Materials and Methods: Ovarian tissue samples from healthy, non-pregnant, owned domestic cats (aged 10-24 months) were obtained during routine OHE. Half of each ovary was immersed into Bouin and 10% buffered formalin solution, followed by routine tissue processing after a one-day fixation period, and stained with hematoxylin eosin. Healthy and degenerated primordial follicles were counted and compared between these groups.

Results: Regardless of the fixative type, there was no difference in tissue preservation and integrity in the macroscopic and histological evaluation of feline ovaries, which were removed during the operation with or without ligation and were directly fixed. Necrosis, congestion, or extravasation were not observed in the ovaries. The follicles observed in the feline ovarian cortex fixed with Bouin's solution were mostly healthy in appearance, the majority of those fixed with formalin consisted of degenerated follicles.

Conclusion: In our study, it was revealed that short-term ligation did not affect the fixation of feline ovaries and that Bouin solution provided a significantly better follicle and cellular integrity and preservation of the entire structure compared to formalin.

Key Words: Feline Ovary, Ligation, Buffered Formalin, Bouin's Solution

Giriş

Uterus, tuba uterinalar ve ovaryumların çıkarılması [total abdominal histerektomi-bilateral salpingo-ooferektomi (TAH-BSO)], kadınların benign veya malign jinekolojik sorunları nedeniyle tıp uygulamalarında oldukça sık gerçekleştirilen cerrahi bir işlemdir (1). Veteriner hekimlik alanında da ovaryohisterektomi (OHE) çok sık uygulanan bir operasyondur; kedi ve köpeklerde olumsuz davranış değişikliklerinin sonlandırılması, yavru alınmak istenmemesi, uterus ve ovaryum patolojilerinin tedavisi, özellikle sokak köpeklerinde popülasyon artışının kontrol altına alınması ve sokak hayvanlarının refahının artırılabilmesi amacıyla rutin olarak uygulanmaktadır (2). Rutin cerrahi işlemler ya da acil müdahale gerektiren kanama durumlarında doku ve organların uygun şekilde ligasyonu kritik öneme sahip ve zorunlu bir prosedürdür. Kedi ve köpeklerde OHE'de her iki ovaryumun kraniyalinde, asıcı ligamentlerde ve uterusun kaudalinde yer alan arter ve venler dikkatle ligatüre edilmekte ve ardından ovaryumlar ile kornu uteriler uzaklaştırılmaktadır. Kanamanın önlenmesi amacıyla uygulanan bu ligatürler dokunun kan akımını önleyerek iskemiye yol açmakta ve dokuda anoksiye sebep olmaktadır (3). Ovaryum patolojilerinde ya da bilimsel araştırmalarda histopatolojik analizlere ihtiyaç duyulmaktadır ve ligasyonun doku korunması üzerin etkisi henüz yeterince ortaya konulmamıştır.

Histolojik ve histopatolojik incelemelerde fiksasyon, incelenecek dokunun mevcut haliyle kalması, otoliz ve kontaminasyon ve bozulmanın önlenmesi amacıyla gerçekleştirilen ilk ve en temel adımdır. Fiksasyon işlemi sırasında dokunun bozulmanın önlemek için kompleks bir seri kimyasal olay gerçekleşmekte, yarı sıvı haldeki hücreler yarı katı hale geçerek hücre ve hücre dışı yapıların mikroskopta incelenmesine olanak vermektedir. Tüm mikroskopik hazırlıklarda dokunun en uygun şekilde fiksasyonu zorunludur, aksi halde ortaya çıkan hatalar ilerleyen aşamalarda düzeltilemez ve doğru tanı

yapılamaz (4). Doğru tanının konulabilmesinde dokuya uygun fiksatif seçimi de kritik öneme sahiptir. Bu amaçla formaldehit (%10 formalin), pikrik asit (Bouin solüsyonu), alkol (Klarck solüsyonu) ve civa klorür içeren (Zenker solüsyonu) fiksatif türleri gibi solüsyonlar geliştirilerek uygun dokuya uygun fiksatif kullanımı sağlanmıştır (5). Günümüzde en sık kullanılan fiksatif türlerinden biri %10 tamponlu formalin solüsyonudur. Formalinin kararlı bir solüsyon olması, hazırlama kolaylığı, maliyetinin düşük olması, birçok boyama türüne uygun olması, çok az artefaktla hücre/doku yapısını koruyabilmesi ve donmuş kesitler için uygun olması gibi avantajları vardır. Ancak tüm bu avantajlarının yanı sıra yavaş fiksasyon özelliği, dokulara yavaş penetre olması, çekirdek fiksasyonunda yetersiz kalabilmesi ve büzülmeye sebep olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (4,6). Formaline benzer olarak Bouin solüsyonu da yaygın olarak kullanılan fiksatiflerdendir. Hücre çekirdeğinin ve glikojenin en iyi şekilde korunmasını sağlamakta, immünohistokimyasal uygulamalar için uygun bir fiksasyon oluşturmada, küçük biyopsi örneklerinde dokuya verdiği sarı renk nedeniyle dokunun gömülmesi işlemi sırasında görünürlüğünü artırmakta ve kollajen fibrillerinin ölçümünde dokunun uygun şekilde fiksasyonunu sağlamaktadır. Bununla birlikte, dokuyu sarı renge boyaması, bazik boyalara az affinite göstermesi ve büzülmeye sebep olması gibi olumsuz yönleri de bulunmaktadır (4,7).

Sunulan çalışmada, kedi ovaryumlarında OHE sırasında uygulanan ligasyon ile dokunun uzaklaştırılması arasında geçen sürenin doku korunumuna etkisi ile kedi ovaryumunda %10 tamponlu formalin ve Bouin fiksatiflerinin etkisinin ortaya konulması ve uygun fiksatifin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmanın materyalini kliniğimize rutin OHE amacıyla getirilen dişi kedilerin ovaryumları oluşturdu. Gebe olmayan 1-2 yaş aralığında evcil 6 kedinin ovaryumları, rutin OHE sırasında

biri 3 dk süreyle ovaryan ve uterin pedikül ligasyonu yapılarak (L+) ve diğeri ligasyon yapılmaksızın (L-) alınarak Tablo 1'de içerikleri gösterilen %10 tamponlu formalin (pH: 7,2-7,4) ve Bouin solüsyonunda daldırma yöntemiyle tespit edildi.

Formalin (HistoPot, İrlanda) ve Bouin solüsyonunda (Pikrik asit; Merck, Almanya) 24 saat tespit edilen kedi ovaryumları rutin takip işlemine alındı. Dokudan fiksatif ve tortuların uzaklaştırılması için çeşme suyu altında yıkanması sonrasında dereceli alkollerden geçirilerek doku suyundan arındırıldı (dehidratasyon). Bu işlemde sonra ksilolde şeffaflandırıldı ve etüvde sıvı parafin içinde tutularak gömüldü. Mikrotomda (Leica, Germany) 4-6 µm kalınlığında alınan kesitler hematoxilen eozin ile boyandıktan sonra mikroskop altında incelenerek ovaryum folikülleri değerlendirildi. Sağlıklı ve dejenere olarak değerlendirilen primordiyal foliküller sayılarak karşılaştırıldı. Sağlıklı foliküller; çekirdek, sitoplazma ve hücre bütünlüğü olan ovositler ve çevresinde ovositle bağlantısı bozulmamış folikül hücreleri olarak değerlendirildi. Dejenere foliküllerde ise çekirdek ya da sitoplazma bütünlüğünü kaybetmiş ovositler ve çevresinde ovosit ile ilişkisini kaybetmiş ve hücre bütünlüğü bozulmuş folikül hücreleri olarak izlendi. Tüm folikül tipleri ovaryumda izlendi ancak primordiyal folikül sayısı istatistiksel değerlendirme için uygun bulundu.

İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS Windows sürüm 14.0 (SPSS, Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Formalin ve Bouin grubunda sayılan normal ve dejenere primordiyal folikül sayıları arasındaki farklılık ki-kare testi kullanılarak analiz edildi. P-değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Fiksatif tipinden bağımsız olarak operasyon sırasında ligasyon yapılarak ve ligasyon yapılmaksızın çıkarılan ve doğrudan fiksatife alınan (immersiyon) kedi ovaryumları makroskopik açıdan değerlendirildiğinde görünümünde bir fark izlenmediği dikkati çekti. Ligasyon yapılan ve yapılmayan grupların histolojik değerlendirilmesinde doku korunumu ve bütünlüğü bakımından incelendiğinde bir fark ortaya çıkmadığı tespit edildi (Şekil 1).

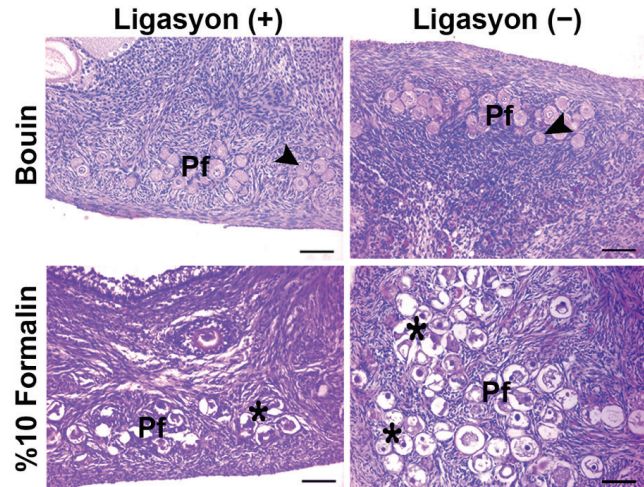
Fiksatiflerin doku korunumuna etkisi incelendiğinde; Bouin ile fikse edilen kedi ovaryum korteksinde gözlenen foliküller

çoğunlukla normal görünümde iken formalin ile fikse edilenlerin çoğunluğu dejenere görünümde foliküllerden oluşmaktaydı. Sağlıklı foliküllerin ovosit hücre zarı, sitoplazması ve çekirdeği yapısını korurken, folikül hücreleri ile olan bağlantıları ve teması bozulmamış şekilde gözlemlendi. İnterstisyumda hücrelerin bütünlükleri ve hücre dışı matriks yapılarıyla ilişkileri bozulmamıştı. Sağlıklı olmayan dejenere foliküllerin sitoplazması eozinofilik görünümde, piknotik çekirdekli ovositler ve çevresinde düzensiz, ovositlerle bağlantıları yer yer kopuk ve bütünlüğünü kaybetmiş folikül hücreleri izlendi (Şekil 1).

Bouin fiksatifleriyle tespit edilen ovaryumda değerlendirilen folikül sayısı 2.365, formalin ile fikse edilen ovaryumda değerlendirilen foliküllerin sayısı 2.345 olarak gözlemlendi. Bouin ile fikse edilen ovaryumdaki sağlıklı foliküllerin sayısının, formalin ile fikse edilen ovaryumdaki foliküllerin sayısına göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği belirlendi (Tablo 2; $\chi^2(3): 3.460,57; p<0,001$).

Tartışma

Cerrahi müdahalelerde ve araştırmalarda ligasyon oldukça sık yapılan bir işlemdir. Ligasyon yapılan doku ya da organda nekroz ve hemoraji ortaya çıkabilmektedir. Bu da tanı ve doku tanımlamasını değiştirip yanlış yorumlara neden olabilmektedir.



Şekil 1: Ligasyon yapılan ve yapılmayan ovaryumların %10 tamponlu formalin ve Bouin solüsyonuyla fiksasyon sonrası görüntüleri

Pf: Primordiyal folikül, ok ucu: Sağlam primordiyal foliküller, *: Dejenere primordiyal foliküller. Hematoxilen Eozin boyama. Bar=50 µm

Table 1: Tamponlu formalin ve Bouin solüsyonunun içeriği

Fiksatiflerin içeriği	Fiksatifler		Bouin solüsyonu	
	Tamponlu formalin			
	%37 Formalin	900 mL	Doygun pikrik asit	700 mL
	Su	100 mL	%37 Formalin	250 mL
	Sodyum fosfat, monobazik, monohidrat	4 gr	Glasiyal asetik asit	50 mL
	Sodyum fosfat, dibazik, anhidroz	6,5 gr		

Table 2: Tamponlu formalin ve Bouin solüsyonuyla fikse edilen ovaryumda sağlıklı ve dejenere primordiyal folikül sayılarının karşılaştırılması

Foliküller	Gruplar		
	Tamponlu formalin	Bouin solüsyonu	Toplam
Sağlıklı folikül	140 (%6,0)	2.168 (%91,7)	2.308 (%49,0)
Dejenere folikül	2.205 (%94,0)	197 (%8,3)	2.402 (%51,0)
Toplam	2.345	2.365	4.710

Mogheiseh ve ark.'nın (8) çalışmalarında köpeklerde reproduktif organlar uzaklaştırılmadan ovaryan pedikül ligasyonunun etkileri değerlendirildiğinde, ligasyondan sekiz hafta sonra histopatolojik muayene amacıyla alınan ovaryum örneklerinde iskemiye bağlı hemoraji, primordiyal ve primer foliküllerde nekroz, konjesyon, farklı derecelerde fibrozis varlığı ortaya konulmaktadır. Bu çalışmada ligasyondan sonra 3 dakika beklettiğimizde ligasyon yapılmayan gruba göre doku korunumu açısından bir fark olmadığını gösterdik. Mogheiseh ve ark.'nın (9) çalışması daha uzun süreli yapıldığı için hemoraji, fibrozis, konjesyon ve nekroz beklenen sonuçlardır. Kısa süreli ligasyonda uterin arterler ovaryumunu destekleyerek hücrede/dokuda hasar oluşmasını önlerler (10). Kanser tedavileri öncesinde ovaryumların korunması amacıyla çıkarılıp dondurularak saklandığı ve tedavi sonrası transplante edildiği bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda kısa süreli ligasyonun doku bütünlüğü ve folikül korunumu açısından fark oluşturmadığı gösterilmiştir.

Fiksatiflerin dokuyu canlıdan çıkarıldığı haliyle koruması önemlidir. Fiksasyon, histolojik tekniklerin ilk ve en önemli basamaklarından birisidir. Deney yapılan gruplar arasında sağlıklı karşılaştırma yapılabilmesi dokuların yapılarının korunabilmesine bağlıdır. Bu hem dokunun nasıl çıkarıldığı hem de hangi solüsyonla tespit edildiğiyle ilgilidir. Hiçbir fiksatif ideal olmasa da, her fiksatif bir şekilde hücrenin/dokunun yapısını, protein içeriğini veya histokimyasal boyamasını etkiler ve bu nedenle fiksatif ve takip süreci, amaca göre dikkatlice en başta seçilmelidir (11). Bununla birlikte, formalin, histoloji laboratuvarlarının çoğunda tercih edilen fiksatif olmaya devam etmektedir. Ancak ne yazık ki, formalinin biyolojik bir tehlike olduğu doğrulanmıştır, fiksatif olarak rutin kullanımı büyük bir sağlık ve güvenlik sorunudur ve bu nedenle daha güvenli alternatifler arayışı sürmektedir (12). Bouin fiksatifi reproduktif organlarda hücre/doku morfolojisini koruması ve immün işaretleme için gerekli epitoplara muhafaza etmesi nedeniyle tercih edilen bir fiksatiftir (13). İçinde hem pikrik asit, hem formalin hem de glasiyal asetik asit barındırması nedeniyle hücrede asetik asitle ortaya çıkan şişme, pikrik asitle ortaya çıkan büzüşmeyle dengelenir. Formalinin sitoplazmada neden olduğu bazofili pikrik asitle düzelir. Pikrik asit hem koagülasyon gerçekleştirerek hem de çapraz bağlantılar yaparak fiksasyonu gerçekleştirir ve Bouin solüsyonunun esas fiksasyon mekanizması pikrik asitin

etkisidir (14). Buffalo ve ark. (15) at ovaryumunu Bouin, Karnoy ve %10 formalin solüsyonunun her birinde farklı sürelerde (6, 12 ve 24 saat) tutarak fikse etmişler ve preantral folikülleri normal ve dejenere olarak değerlendirmişlerdir. Ovaryumların Bouin ve Karnoy solüsyonunda 12 ve 24 saatlerde fiksasyonu en uygun süre ve fiksatif olarak belirlemişlerdir. Sunulan çalışmamızda da kedi ovaryumunun Bouin solüsyonunda 24 saat tutulmasının uygunluğu bu çalışmanın bulgularına paralel olarak ortaya konulmuştur. Sarma ve ark. (16) fare ovaryumunda Bouin ve %10 formalin fiksatifi sonrasında primordiyal folikül sayımı yapıp karşılaştırdıklarında çalışmamızda olduğu gibi Bouin solüsyonunun folikül korunumunu sağlayarak tanımlanmasını kolaylaştırdığını bulmuşlardır.

Sonuç

Bir tek fiksatifin histopatolojik analizlerde tüm amaçlar doğrultusunda kullanılması mümkün değildir. Bazı fiksatifler çekirdek yapısını korurken, bazıları protein epitoplarnın kaybını önleyerek immün işaretlemeyi kolaylaştırır, bir kısmı hücre iskeletinin bütünlüğünü sağlarken, diğerleri de organel düzeyinde korunum sağlayarak ince yapı incelemelerine olanak sağlar. Bu nedenle, her organ ve doku için doğru fiksatif denenerek ortaya konulmalı ve amaca göre en iyi sonuç veren fiksatif kullanılmalıdır. Sunulan çalışmada da kedi ovaryumlarının fiksasyonunda kısa süreli ligasyonunun etkisinin bulunmadığı ve Bouin solüsyonunun formaline göre daha iyi bir doku korunumu sağladığı ortaya konulmuştur.

Etik

Etik Kurul Onayı: Hayvanların bakımı, hayvanlara yaklaşım ve tüm deneyler Helsinki Deklarasyonu'na uygun olarak gerçekleştirildi. Kedi ovaryumları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji kliniğine rutin ovaryohistektomi nedeniyle gelen kedilerden alındı.

Hakem Değerlendirilmesi: Editörler kurulunun dışından olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Doku örneklerinin toplanması: F.T.Ç., D.B.A., M.A.D., S.S., Konsept: F.T.Ç., D.B.A., M.A.D., S.S., B.E., Dizayn: E.E., A.B., H.K., S.Ö., Veri toplama veya İşleme: F.T.Ç., D.B.A., M.A.D., S.S., B.E.,

Analiz veya Yorumlama: E.E., A.B., Literatür Tarama: F.T.Ç., D.B.A., M.A.D., S.S., Yazan: F.T.Ç., D.B.A., M.A.D., A.B., E.E.

Çıkar Çatışması: Yazarların çalışmayla ilgili finansal ya da başka bir konuda çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Pekcan MK, Tasci Y, Kokanali MK, et al. Histerektomi ile Birlikte Yapılan Bilateral Salpingooferektomiye Bağlı Hipoöstrojenizmin Sistorektosel Gelişimine Etkisi. Gazi Medical Journal, 2018;29:202-205.
2. Baki Acar D. Evaluation of dog spaying, animal welfare, and dog owner/ caretaker knowledge in Afyonkarahisar Province. Medycyna Weterynaryjna. 2020;76:98-102.
3. Chouchani ET, Pell VR, James AM, et al. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. Cell Metab. 2016;23:254-263.
4. Rai R, Bhardwaj A, Verma S. Tissue Fixatives : A Review. International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis. 2016;4:183-187.
5. Culling CFA. Handbook of histopathological and histochemical techniques. 4th edition ed. 1985: Butterworth Publication.
6. Titford ME, Horenstein MG. Histomorphologic assessment of formalin substitute fixatives for diagnostic surgical pathology. Arch Pathol Lab Med. 2005;129:502-506.
7. Ananthanarayanan V, Pins MR, Meyer RE, et al. Immunohistochemical assays in prostatic biopsies processed in Bouin's fixative. J Clin Pathol. 2005;58:322-324.
8. Mogheiseh A, Nikahval B, Ahmadi N, et al. Bilateral ovarian pedicle ligation as an alternative to ovariectomy and ovarian response to eCG treatment. . Comp Clin Pathol. 2017;26:197-202.
9. Mogheiseh, A, Nikahval B, Ahrari Khafi MS, et al. Effects of bilateral whole vessel ovarian ligation on dogs' ovarian function and histopathology. Comp Clin Pathol. 2018;27:1085-1091.
10. Razi M, Najafpour AR, Najafi GHR, et al. The Effect of Ligation of the Ovarian Artery on Ovarian Follicular Function in Rats. Int J Vet Res. 2009;3:87-94.
11. Kiernan JA. Histological and Histochemical Methods Theory and Practice, 3rd Edition. Scion Publishing Limited, UK, 2008.
12. Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. Microscopy Today. 2000;8:8-13.
13. Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Seventh Edition.2013: Churchill Livingstone.
14. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. Methods. 2014;70:12-19.
15. Bufalo I, Miguez Gonzalez S, Bizarro da Silva C, et al. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of equine preantral ovarian follicles. Semina: Ciências Agrárias. 2016;37:243-250.
16. Sarma UC, Winship AL, Hutt KJ. Comparison of methods for quantifying primordial follicles in the mouse ovary. J Ovarian Res. 2020;13:121.