Doku Tespit Solüsyonu ve Süresinin İmmünhistokimya'ya Yansıması

Dr. Handan Zeren*, Dr. Fazilet Kayaselçuk*, Dr. Ediz Coşar*, Dr. İlhan Tuncer*,

ÖZET

İmmünohistokimya günümüzde diagnostik patolojiye yardımcı bir yöntem olarak oldukça yaygınlaşmıştır. Bu çalışmada, patolojik spesmenlerin tespitinde kullanılan tespit solüsyonunun immünohistokimyasal çalışmadaki önemini bir kez daha vurgulamayı amçaladık. Dokuz farklı dokudan elde edilen toplam 10 adet spesmen aynı boyutlarda örneklenerek farklı tespit solüsyonlarında tespit edildi, buna ek olarak tamponlanmamış formaline konulan dokular farklı sürelerde tespit işlemine maruz bırakıldı. Toplam 18 adet mono veya poliklonal antikor avidin-biotin peroksidaz teknik ile dokulara uygulanarak sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Uygulanan antikorlardan LCA, lizozim, Fak VIII, beta-HCG, NSE-ER, p53, ve S-100 protein tespit süresinden en fazla etkilenen antijenler olarak saptandı. Antijenik özellikleri koruma yönünden %10'luk buffer formalinin tamponlanmamış formaline oranla çok daha güvenilir bir tespit solüsyonu olduğu ortaya kondu. L-26 ve UCHL- 1, tespit işleminden en az etkilenen antjijenler olarak belirlendi. Alkolde tespit edilen dokulardaki antijenik korunma, pek çok dokuda beklenenden daha başarısız sonuçlar verdi.

Anahtar kelimeler: İmmünohistokimya - Fiksasyon - Formalin

SUMMARY

Immunohistochemistry is a commonly used goal in today's diagnostic pathology. In this study, using nine different tissue samples, we evaluated a number of fixation procedures including four different solutions and four different durations of fixation. Eighteen different antibodies were performed by streptavidin-biotin peroxidase technixue. LCA, Lysozyme, Factor VIII, vimentin, betaHCG, NSE- ER- p53 and S-100 protein were found to be the most sensitive antigens regarding the fixation process, whereas L26 and UCHL-1 were the most resistant ones. Buffered formalin was a better fixative than non-buffered formalin solution in the preservation of antigenic properties. Unlike the previously reported series, alcohol fixed tissues demonstrated an inconsistent immunostaining.

Key words: Immunohistochemistry - Fixation - Formalin

GİRİŞ

İmmünohistokimyasal tekniklerin sağlıklı şekilde sonuçlanması pek çok faktöre bağlıdır. Bunların başlıcaları arasında, uygulamayı yapan teknik elemanın tecrübesi, kullanılan antikoru hazırlayan firma, dokunun özellikleri ve tespiti sayılabilir. Doku tespiti, çok önemli olduğu halde en son düşünülen faktördür. En yaygın kullanılan tepsit solüsyonu, morfolojik detayı en iyi şekilde koruyan formalindir. %10 oranında sulandırılmış formaldehid veya %4'lük paraformaldehid solüsyonu halinde rutin patolojik spesmenlerin tespitinde kullanılan formalinin, özellikle uzun süreli temas sonucunda hücre membranlarında ve mitokondriumlarda bozulmaya ve dokunun antijenik özelliklerinde büyük ölçüde kayba neden olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur[1,2,3,4]. Buna karşılık alkol, B5, formalin-civa klorid gibi fiksatifler antijenleri daha iyi korumaktadır[4,5]. Dokudaki antijen kaybını önlemek amacıyla mikrodalga fırın tespiti çalışmaları da iyi sonuçlar vermiştir[3]. Ancak, mikrodalga fırının her laboratuarda bulunmayışı ve kullanımının pratik olmayışı, civanın ise son derece toksik bir madde olup dikkatli bir kullanım gerektirmesi bunların kullanımını kısıtlamaktadır.

Formalin solüsyonu, ideal olarak pH 7.0'ye kadar sodyum fosfat ile tamponlanarak kullanılır. Bazı laboratuarlarda ise bu işlem yapılmaksızın basit yüzde hesabı ile sulandırmak suretiyle solüsyon hazırlanmakta ve kullanılmaktadır. Sözkonusu ikinci uygulama morfolojik detayı koruma açısından çok fazla sorun yaratmasa da immunhistokimya yönünden uygun bir tespit solüsyonu olduğu şüphelidir. Kullandığımız tespit solüsyonunun oldukça pahalı bir teknik olan immünohistokimyaya olan etkisini ortaya koyduğumuz takdirde en iyiye doğru arayışımızı sürdürmemiz ve beklentilerimizi bulgularımız ışığında değerlendirmemiz çok daha sağlıklı olacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Materyal, Çukurova Üniversite Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na tetkik amacıyla gönderilen 10 ameliyat spesmeninden (kronik tonsillitis nedeniyle 2 adet tonsillektomi, birer adet koriokarsinom nedeniyle histerektomi, Ewing's sarkom nedeniyle artikülektomi, infiltratif duktal karsinom nedeniyle mastektomi, meningioma eksizyonu, rabdomyosarkom eksizyonu, seröz papiller kistadenokarsinom nedeniyle ooferektomi, malign sinir kılıfı tümörü eksizyonu, büyük hücreli akciğer karsinomu nedeniyle lobektomi materyalleri) oluşmaktaydı. Materyallerden, yaklaşık 1x1x0.5 cm boyutlarda 7'şer örnek alınarak kasetlere kondu. Dört spesmen tamponlanmamış formalinde (NBF) sırasıyla 3 saat, 12 saat, 3 gün ve 12 gün bekletilerek takibe alındı. Diğer üç örnek absolü alkol, Dubosque - Brazil (DBB) ve buffer formalinde (BF) üçer saat bekletildi. Takip işlemlerinden geçirilen örnekler parafine gömülerek bloklandı. Hazırlanan 5 mikron kalınlığındaki kesitler poly - L-lysin ile muamele edilmiş lamlara alındı. Deparafinize ve tekrar hidrate edilen kesitlere StreptAvidin-Biotin (Zymed,

* Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı

Multilink Universal kit) yöntemiyle çeşitli antikorlar uygulandı. Uygulanan antikorlar, dilüsyonları, ve ait oldukları firmalar Tablo 1'de gösterilmiştir. Uygulanan teknikte kesitler:

1- %3 hidrojen peroksid solüsyonu damlatılarak 5 dakika inkübe edildi.

2- Bazı antikorlar için (Bkz. Tablo 1) 30 dakikalık tripsinizasyon basamağı uygulandı.

3-Monoklonal antikorlar için normal tavşan serumunda 20

Antikor	Monoklonal/ Poliklonal	Dilüsyon	Firma	TR
Broad spectrum keratin	Monoklonal	KH	DPC-immustain	+
Lysozyme	Poliklonal	KH	DPC-immustain	+
Factor VIII	Poliklonal	KH	DPC-immustain	+
Kappa	Poliklonal	KH	Biogenex	+
Lambda	Poliklonal	KH	Biogenex	+
CEA	Monoklonal	KH	DPC-immustain	-
Beta-HCG	Monoklonal	KH	DPC-immustain	-
Desmin	Monoklonal	KH	DPC-immustain	+
EMA (Epithelial membrane antigen)	Monoklonal	KH immustain	DPC-	-
LCA (Leucocyte common antigen)	Monoklonal	KH	DPC-immustain	-
S-100	Monoklonal	KH	DPC-immustain	-
Vimentin	Monoklonal	KH	DPC-immustain	+
NSE (Neuron specific enolase)	Monoklonal	KH	DAKO	-
NFP (Neurofilament protein)	Monoklonal	KH	Zymed	-
p53	Monoklonal	KH	Novocastra	+
L26 (Bcell-CD20)	Monoklonal	1:50	DAKO	-
UCHL-1 (Tcell)	Monoklonal	1:50	DAKO	-
Estrogen receptor (ER)	Monoklonal	1:50	DAKO	-

TR: Tripsinizasyon, KH: Kullanıma hazır

Tablo 1 : Çalışmada kullanılan antikorlar

dakika inkübe edildi.

4- Primer antikorlar : Monoklonal antikorlar 1 saat, poliklonal antikorlar 30 dakika inkübe edildi. Negatif kontrol için kesitlere normal serum damlatıldı.

5- Biotinlenmiş anti-fare ve anti-tavşan immünglobulinler damlatılarak 30 dakika bekletildi.

6- Horseradish peroksidaz (HRP)-konjuge streptavidinde 30 dak. inkübe edildi.

7- AEC (aminetil karbazol) kromojeni kullanımdan hemen önce hazırlanarak 10-15 dakika muamele edildi.

8. Musluk suyunda yıkanarak Mayer's hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı, gliserin jel ile kapatıldı.

Işık mikroskobik inceleme, Nikon marka ışık mikroskobu ile yapıldı. İmmünboyanma yoğunluğu değerlendirilerek +/- : şüpheli; + : hafif şiddetli; ++ : orta şiddetli; +++: şiddetli olarak skorlandı.

BULGULAR

Materyallere uygulanan antikorlar ve elde edilen immünohistokimyasal boyanma şiddetleri Tablo II, III ve IV'de gösterilmektedir.

ANTİJEN	3 SAAT	12 SAAT	3 GÜN	12 GÜN	ALKOL	DBB	FBF
KERATİN	T1 Fo++ T2 -	T1 +++ T2 ++	T1 ++ T2 ++	T1 ++ T2 +++	T1 +++ T2 ++	T1 ++ T2 ++	T1 +++ T2 +++
LİZOZİM	T1 Fo++ T2 ++	T1 + T2 -	T1 - T2 -	T1 - T2 -	T1 ++ T2 -	T1 - T2 ±	T1 +++ T2 +++
FAKTÖR-8	T1 + T2 ±	T1 +++ T2 ++	T1 ++ T2 ±	T1 + T2 Fo=	T1 +++ T2 -	T1 ± T2 +	T1 +++ T2 +++
EMA	T1 Yü + T2 Yü++	T1Yüzey T2 Yü ++	T1 Yü T2 Yü+	T1 T2 Yü+	T1 ++ T2 Y+++	T1 - T2 +++	T1 - T2 ++
VİMENTİN	T1 Fo + T2 ++	T1 + T2 ++	T1 ± T2 +	T1 - T2 ±	T1 ++ T2 +	T1 - T2 +++	T1 +++ T2 +++
KAPPA	T1 + T2 +++	T1 + T2 ++	T1 + T2 ++	T1 ± T2 +	T1 ++ T2 +	T1 +++ T2 ++	T1 ++ T2 ++
LAMBDA	T1 ++ T2 +++	T1 ++ T2 ++	T1 + T2 ±	T1 + T2 ±	T1 ++ T2 ±	T1 + T2 ++	T1 ++ T2 ++
L-26	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 ++	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 +++
UCHL-1	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 ++	T1 +++ T2 +++	T1 +++ T2 ++
LCA	T2 +++	T2 +++	T2 +++	T2 +	T2 +	T2 ±	T2 +++

Tablo 2 : Tonsil Grubu 1 (T1) ve 2 (T2)

OLGU	KORİOKARSİNOM	EWING'S SARKOM	MEME DUKTAL CA.	MENENJİOMA	
	B-HCG	NSE	ER	EMA	ER
1	+	±	-	+++	-
2	Fokal +	-	±	++	-
3	Fokal +	±	%1	Fo+++	-
4	Fokal ±	-	%5	Fo+++	-
5	++	±	%10	Fo +	-
6	++	++	-	+	-
7	++	+	%15	+++	Ender +

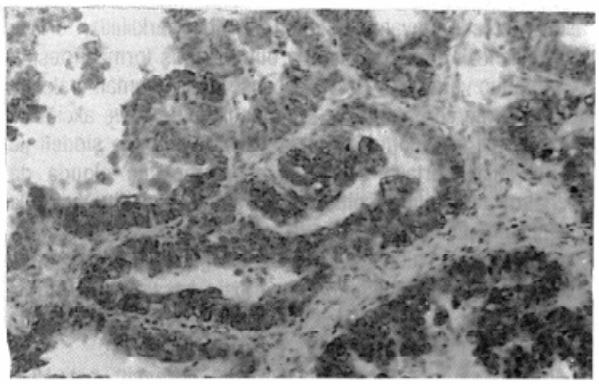
Tablo 3 : Antijenik boyanmanın skorlanması (2).

OLGU	RHABDOMYOSARKOM			SERÖZ PAPİLLER KİSTADENOCA		MALİGN SCHWANNOMA		BÜYÜK HÜCRELİ CA.
	Viment	Desmin	P53	CEA	Keratin	S-100	NFP	Keratin
1	+++	+++	-	-	±	±	+	±
2	+++	+++	-	-	Fo +	-	-	±
3	++	+	Fo+	-	±	-	±	±
4	+++	+++	+	-	Fo ±	++	±	Fo ++
5	+++	+++	-	-	±	-	-	++
6	++	++	-	-	-	-	-	++
7	+++	+++	+	-	+++	+++	Fo +	+++

Tablo 4 : Antijenik boyanmanın skorlanması (3).

Çalışmamızda kullandığımız geniş spekturumlu keratin, iki tonsil, seröz papiller kistadenokarsinom, büyük hücreli karsinom olgularına uygulandı. Elde edilen sonuçlar farklı spesmenlerde bazı farklılıklar göstermekle birlikte fiksasyon süresinin bu antijeni fazla etkilemediği gözlendi. Alkol, oldukça iyi, DBB ise farklı sonuçlar verdi. En iyi sonuçlar ise tartışmasız bir şekilde buffer formalin (BF) ile elde edildi (Şekil 1). Tonsil materyallerinde vimentin, f-VIII, (lizozim EM-A, kappa, Lambda ve LCA, fiksasyon süresiyle paralel olarak belirgin bir şekilde solma gösterdiler (Şekil 2,3,4,5).

Lizozim ve F-VIII, kısa süreli BF fiksasyonu ile en şiddetli immün boyanmayı gösterirken EMA- alkol ve DBB'de iyi reaksiyon verdi. LCA- kappa ve lambdanın her iki formalin solüsyonunda da kısa süreli tespitten fazla etkilenmedikleri görüldü. Seröz papiller adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olgularına uygulanan keratin ise en iyi sonucu BF ile verdi. Menejioma olgusunda EMA, fiksasyon süresinden daha



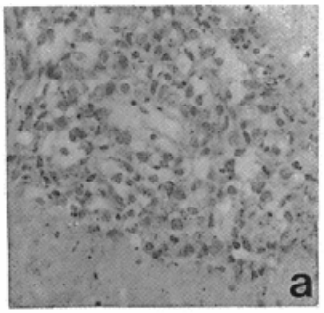
Şekil 1 : Seröz papiller kistadenokarsinom. Buffer formalinde (BF) 3 saat tespit edilmiş dokuda (++) immunboyanma (Keratin, Avidin-Biotin peroksidazx250

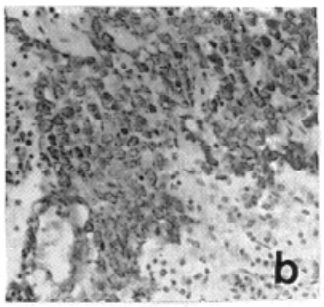
fazla etkilendi. BF ile en iyi sonuç elde edilen diğer antijenler sırasıyla; Beta HCG, NSE, Er- p53, ve NFP olarak belirlendi (Şekil 6).

TARTIŞMA

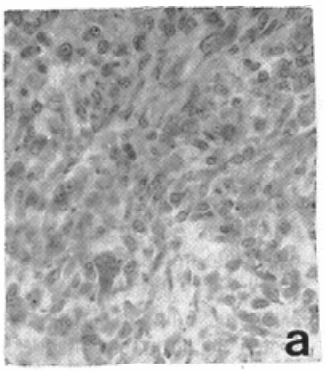
Patoloji alanında en oloğanüstü gelişmelerinden biri olarak kabul edilmesi gereken immünohistokimya, duyarlığı daha da

Şekil 2a : Tamponlanmamış formalinde (NBF) 12 saat tespit edilen tümör dokusunda (-) immunboyama (Keratin, Avidin-Biotin peroksidaz x400).

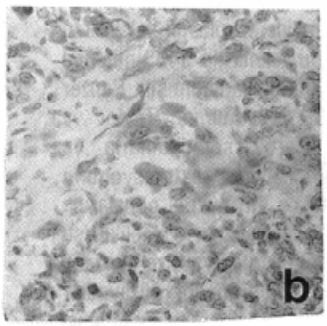




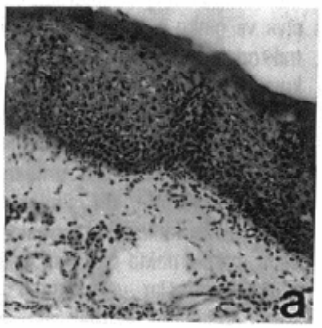
Şekil 2b : Butter formalinde 3 saat tespit edilen dokuda (+++) immunboyanma (Keratin, Avidin-Biotin peroksidazx400).



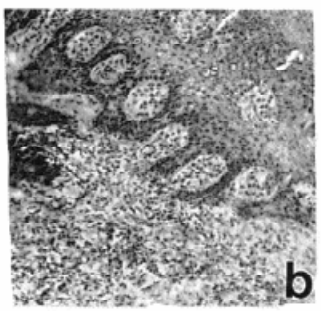
Şekil 3a : NBF'de 12 gün tespit edilen dokuda (++) immunreaksiyon (Vimentin, AB peroksıdaz x400)



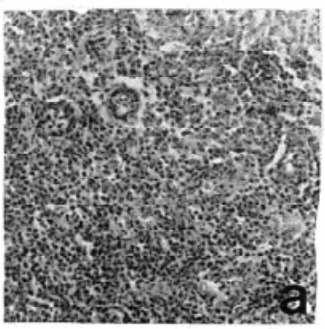
Şekil 3b : BF'de tespit edilen dokuda (+++) immunreaksiyon (Vimentin, AB peroksidazx400).



Şekil 4a : Buffer formalinde 3 saat tespit edilen dokuda fokal (+++),



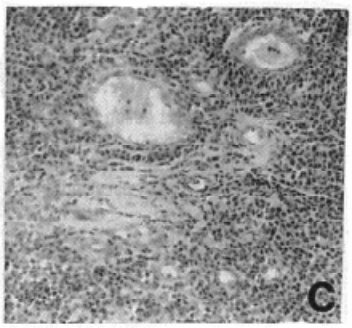
Şekil 4b : NBF'de 3 saat tespit edilen dokuda fokal (++) immunboyanma (keratin, AB peroksidaz x250



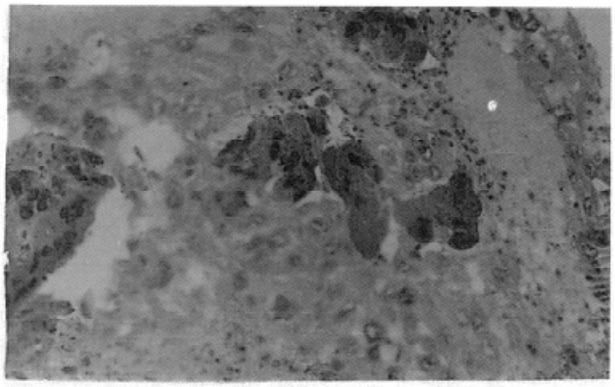
Şekil 5a : BF'de 3 saat tespit edilmiş dokuda (+++).



Şekil 5b : NBF'de 3 saat tespit edilmiş dokuda (++).



Şekil 5c : NBF'de 12 saat tespit edilmiş dokuda (±).



Şekil 4b : Koriokarsinom olgusu. BF'de 3 saat tespit edilen dokuda, atipik hücre sitoplazmalarında Beta HCG ile (++) boyanma (AB peroksidaz x400).

artırma arayışı içinde gelişimini sürdürmektedir. Bu amaçla yeni bazı metodlar geliştirilmekte, daha duyarlı antikorlar elde edilmekte, diğer taraftan çeşitli nedenlerle antijenik kayba uğrayan dokularda bunun restorasyonu için çaba sarfedilmektedir. Peroksidaz-antiperoksidaz tekniğinden sonra geliştirilen Avidin-Biotin kompleks metod ve immunogold tekniklerle immünohistokimya gerçekten de daha duyarlı hale getirilmiş[6,7], fiksasyon yöntemlerine mikrodalga fiksasyonu eklenerek antijen kaybı önlenmeye çalışılmış[8], tekniğe proteolotik enzim basamağı eklenerek maskelenmiş antijenlerin açığa çıkarılması başarıyla uygulanmış[4], özellikle son yıllarda daha da yaygınlaşan antijenik özellikleri geri dönüştürme teknikleri geliştirilmiştir[9,10]. Shi ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada [9], uzun süreli formalin fiksasyonuna maruz bırakılmış dokulardan elde edilen kesitler distile su veya civa ve çinko gibi metal solüsyonları içeren plastik şalelerden mikrodalga fırına yerleştirilmiş ve bu teknik ile 349 antijende kuvvetli boyanma özelliklerinde geri dönüş saptanmıştır. Benzer bir çalışma 1994'de California/ABD'de yapılmış, Taylor ve arkadaşları nükleer antijenlerde farklı solüsyonlarla ve mikrodalga tekniği ile antijenik özelliklerin restorasyonunu yayınlamışlardır[10]. Bu teknikler oldukça ümit verici olmalarına karşın rutin kullanıma girmeleri zaman alacaktır. Öncelikle şu anda uygulamakta olduğumuz immonhistokimya bize ne denli sağlıklı sonuçlar vermektedir, güvenilirliği hangi düzeydedir sorularına yanıt bulmak amacıyla bu çalışma planlanmış ve yapılmıştır.

Üretilmekte olan antikorların da bir evrim geçirdiklerini söylemek bir yanılgı olmaz. Lenfosit belirleyici antikorları örnek olarak verirsek, OK-la, B-1, T-11, Leu-1 gibi ilk B ve T lenfosit belirleyicileri yalnız tespit edilmemiş dokulardan elde edilen frozen kesitlerde çalışmaktaydı. Yapılan çalışmalar dokuları işlemlerden geçirerek, veya farklı fiksasyon bileşimleri ve farklı immünohistokimyasal teknikler deneyerek antijenik özelliklerini korumaya yönelikti [11,12]. Biz çalışmamızda anti-kappa, anti-lambda, L26(B) ve UCHL-1(T)yi kullandık. Formalin fiksasyonunun ilk iki antikorun çalışmasını süre ile paralel olarak azalttığını, L26 ve UCHL- 1'in ise ne tespit solüsyonundan ne de tespit süresinden etkilenmediğini gözledik. Bu iki antikor ile elde edilen antijenik boyanma, serimizdeki tüm basamakları içeren en kuvvetli boyanma olarak saptandı.

Proteolitik enzimlerle sindirim basamağı pek çok antijenin açığa çıkarılmasında başarı ile uygulanmaktadır. Laboratuarımızda tripsin, rutin olarak pek çok antikorla birlikte uygulanmaktadır (Tablo 1). Battifora ve Kopinski [4] tarafından yayınlanan çalışmada geniş spektrumlu bir monoklonal antikor kullanılarak keratinlerin immunohistokimyasal özellikleri araştırılmış, formalin ve alkolde farklı sürelerde tespit edilen dokulardan elde edilen kesitlerde immünohistokimyasal tekniğe farklı proteolitik enzim basamakları eklenmiştir. Bu çalışmada etki yönünden proteolotik enzimler (tripsin, pepsin veya pronaz) arasında belirgin fark bulunmamış, alkolde fikse edilen dokularda bu basamağa gerek olmadığı, formalin tespitli dokularda ise tespit süresi uzadıkça enzim sindirim süresinin de uzatılması gerektiği vurgulanmıştır. Aynı çalışmada, farklı dokuların keratinle boyanma özelliklerinin farklı olduğu da belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda tonsil epiteli ile seröz papiller kistadenokarsinom, ve akciğerin büyük hücreli karsinomu arasında keratin boyanma şiddeti ile ilgili farklılıklar ortaya çıkmıştır, ancak her üç olguda da bufferlanmış formalin tespiti çok iyi sonuç vermiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmanın aksine alkol tespiti ile seröz papiller kistadenokarsinom, ve akciğerin büyük hücreli karsinomu arasında keratin boyanma şiddeti ile ilgili farklılıklar ortaya çıkmıştır, ancak her üç olguda da bufferlanmış formalin tespiti çok iyi sonuç vermiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmanın aksine alkol tespiti ile ortaya çıkan boyanma tonsil dokusunda BF ile aynı, diğer iki dokuda ondan daha zayıftır. Yine çalışmamızda, tripsin basamağının süresi değiştirilmemiş, süre ile bağlantılı olarak antijenik boyanmada solma saptanmıştır.

Alkol fiksasyonu, Keratin, L26, UCHL-1 (tonsil), beta-HCG (koriokarsinom), vimentin, desmin (rabdomyosarkom), östrojen reseptör (duktal karsinom) boyalarında BF ile aynı şiddette antijenik boyanma sağlamış, yalnız EMA (tonsil) ile BF'den daha üstün bulunmuştur. Uzun süreli NBF ile karşılaştırıldığında ise pek çok antijende üstünlük göstermektedir. BF tespit süresi de arttırıldığı takdirde belki yine antijenik kayıp belirginleşecek, alkol tespiti ön plana çıkacaktır.

Nükleer prognostik faktörler, daha çok tanı amacıyla kullanılan diğer antijenlerden farklı olarak lezyonun biyolojik davranışı ve tedaviye vereceği cevap ile ilgili bilgiler verdikleri

için daha önemli bir konumdadırlar. Bu antijenler aynı zamanda formaline son derece hassas olup ya özel fiksatifler, ya da rutin kullanımda sıklıkla immünohistokimyasal tekniğe ek olarak antijenik maskelenmeyi ortadan kaldırıcı bazı basamaklar gerektirirler [10,13]. Kullanıma hazır kesitlerin sitrat buffer, üre solüsyonu gibi bazı solüsyonların içerisinde mikrodalgaya maruz bırakılmaları bunlardan biridir[10]. Bu yöntem, laboratuarımızda yeni denenmeye başlamış, başarılı sonuçlar elde edilmiş, rutin kullanıma hazırlanmaktadır. Bu çalışmada ise kullanılan iki prognostik belirleyici için (ER ve p53 ise belirgin bir farklılık göstermemiştir. Bu sonuçlar, özellikle hastanın tedavisini etkileyecek bu tip antijenik çalışmalarda optimum düzeyin saptanması ve standardizasyonun belirlenmesinin ne denli önemli olduğunu gözler önüne sermektedir.

Sonuç olarak, imkmünohistokimya laboratuarlarında çok sık olarak tekrarlanması gereken bir otokontrol mekanizması işler hale getirilmelidir. Buffer formalin, tespit solüsyonu olarak kullanılmalı, gerektiği takdirde immünohistokimyasal tekniklerde çeşitli modifikasyonlara gidilmelidir. Her antijen için bir pozitif, bir negatif kontrol mutlak çalışmaya dahil edilmelidir.

İmmunohistokimya laboratuarımızı en iyiye yöneltmek için büyük uğraş veren ve bu çalışmada bize yardımcı olan teknisyenlerimiz Haşmet Sarıcalar ve Gülafer Korkut'a teşekkürü borç biliriz.

KAYNAKLAR

1. Fox C.H., Johnson F.B, Whiting J., Roller P.P: Formaldehyde fixation. The Journal of Histochemistry andr Cytochemistry 1985; 33:845-853.
2. Mullink H., Henzen-Logmans S.C., Tadema T.M., Mol J.J., Meijer C.J.L.M.: Influence of fixation and decalcification on the immunohistochemical staining of cell-specific markers in paraffin-embedded human bone biopsies. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1985; 33:1103-1109.
3. Leong A.S. - Y., Duncis C.G: Antigen preservation in microwave irradiated tissues: a comparison with formaldehyde fixation. Journal of Pathology 1988; 156: 275-282.
4. Battifora H., Kopinsky M: The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins. A comparison of formalin and ethano fixation. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1986; 34: 1095-1100.
5. Tuncer İ: Patolojide tümör markerları. VIII. Ulusal Patolöji Kongre Kitabı, Cilt Ii, Ankara: Ankara Üni. Basımevi, 1989; 1291.
6. Hsu S.M., Raine L., Fanger H: Use of avidin-biotin complex (ABC) in immunoperoxiades techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedure. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1981; 29: 577-580.
7. Scopsi L., Larsson L. - I: Increased sensitivity in immunocytochemistry. Effects of double application of antibodies and of silver intensification on immunogold and peroxidase antiperoxidase staininig techniques. Histochemistry 1985; 82:321-329.
8. Hopwood D., Coghill G., Ramsay J., Milne G., Kerr M: Microwave fixation: its potential for routine techniques, histochemistry, immunohistochemistry, and electron microscopy. Histochemical Journal 1984; 16:1171-1191.
9. Shi S.-R., Key M.E., Kalra K.L: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1991; 6:741-748.
10. Taylor C.R., Shi S.-R., Chaiwun B., Young L., Imam S.A., Cote R.J: Strategies for improving the immunohistohemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin paraffin sections. Human Pathology 1994; 25:263-270.
11. Sheibani K., Wingberg C.D., Van de Velde S., Williams Ö., Rappaport H: Detection of lymphocyte antigens in tissues placed in transport medium. Comparison with cryostat fresh-frozen section technic. An immunologic study of 56 cases. A.C.J.P. 1986; 85: 297-304.
12. Holgate C.S., Jackson P., Pollard K., Lunny D.y, Bird C.C: Effect fixation on T and B lymphocyte surface membrane antigen demonstration in paraffin processed tissue. Journal of Pathology 1986; 149:293-300.
13. Burford-Mason A., MacKay A.J., Cummins M., Dardick I: Detection of proliferating cell nuclear antigen in paraffin embedded specimens is dependent on preembdeding tissue handling and fixation. Arch. Pathol. Lab. Med. 1994; 118:1007-1013.