

Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Sarf Malzemelerimiz ve Özellikleri Nelerdir?

What are the Characteristics of the Supplies Used in Pathology Laboratory?

Emel Ebru PALA¹ , Kutsal YÖRÜKOĞLU² 

¹ Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir Tıp Fakültesi, Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İZMİR

² Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı, İZMİR

ÖZET

Dokular fiksasyonla başlayan, makroskopik örnekleme, doku takibi (dehidratasyon, şeffaflaştırma, sertleştirme (infiltrasyon/impregnasyon), gömme (bloklama), kesit alma, rutin boyama, kapama işlemleri ile devam eden laboratuvar süreçleri sonunda mikroskopik incelemeye hazır hale getirilir. Tüm bu aşamalar için gerekli olan oldukça uzun bir sarf malzeme listesi mevcuttur. Formaldehid, etil alkol, ksilen, parafin, hematoksilen, eozin, giemsa, EA50, EA65, OG65, entellan, hidroklorik asit, formik asit, frozen balzamu (kriomatriks), doku takip kaseti, basemould (doku gömme kalıbı), mikrotom bıçağı, makroskopi bıçağı, lam, lamel, sepet, mape, plastik doku saklama kapları en temel sarf malzemeler arasında sayılabilir. Patologlar olarak sarf malzemelerin teknik özelliklerine hakim olmalı, teknik şartnameleri özenle hazırlamalı ve numunelerin şartnamelere uygunluğunu dikkatle araştırmalıyız. İyi bir histopatolojik inceleme için, iyi tespit olmuş, takip, bloklama, kesit, boyama basamakları sorunsuz doku kesitlerine ihtiyaç vardır. Bunun için de kaliteli sarf malzeme kullanımı son derece önemlidir.

Anahtar Sözcükler: Patoloji, Laboratuvar, Sarf malzeme

ABSTRACT

Tissues pass through fixation, macroscopic examination and grossing, tissue processing (dehydration, clearing, infiltration), embedding, sectioning, staining and coverslipping periods before microscopic examination. A long list of pathology laboratory supplies are needed for these processes. Formaldehyde, ethyl alcohol, xylene, paraffine, hematoxylin, eosin, giemsa, EA50, EA65, OG65, entellan, hydrochloric acid, formic acid, cryomatrix, tissue processing cassette, basemould, microtome blade, grossing blades, slide, coverslip, slide holder, plastic tissue container are the main supplies of the laboratory. Pathologist should be aware of the technical features of the supplies and prepare the technical specification sheet carefully. Optimal histopathological examination depends on well-fixed, processed and stained tissue sections so we need high quality laboratory supplies.

Keywords: Pathology, Laboratory, Supplies

GİRİŞ

Dokular fiksasyonla başlayan, makroskopik örnekleme, doku takibi (dehidratasyon, şeffaflaştırma, sertleştirme (infiltrasyon/impregnasyon), gömme (bloklama), kesit alma, rutin boyama, kapama işlemleri ile devam eden laboratuvar süreçleri sonunda mikroskopik incelemeye hazır hale getirilir. Tüm bu aşamalar için gerekli olan oldukça uzun bir sarf malzeme listesi mevcuttur. Formaldehid, etil alkol, ksilen, parafin, hematoksilen, eozin, giemsa, EA50, EA65, OG65, entellan, hidroklorik asit, formik asit, frozen balzamu (kriomatriks), doku takip kaseti, basemould (doku gömme kalıbı), mikrotom bıçağı,

makroskopi bıçağı, lam, lamel, sepet, mape, plastik doku saklama kabı (15 ml, 500 ml, 1lt, 5 lt) en temel sarf malzemeler arasında sayılabilir. Bu makalede sarf malzeme teknik şartnamelerinin hazırlanmasına temel teşkil edecek genel hükümlerden, uygun depolama koşullarından ve makroskopi/tespit, doku takibi, kesit /boyama ana başlıkları altında bazı sarfların kimyasal ve fiziksel özelliklerden bahsedilecektir.

SARF MALZEME ALIMINDA TEMEL HUSUSLAR

Sarf malzeme alımında ilk aşama spesifik özellikleri belirten teknik şartnamelerin hazırlanmasıdır. Bu noktada dikkat edilmesi gereken en önemli husus hazırlanan şartnamenin sadece

bir firmayı işaret etmemesidir. Süreç öncesinde 4734 sayılı Kamu İhale Kanunu (KİK) dikkatle incelenmelidir (1). Sarf malzeme teknik şartnamelerinde tüm malzemeler için gerekli olan genel hükümler yer almalıdır. Bu hükümler arasında orijinal broşürün ihale dosyasında bulunması, ürünün orijinal ambalajında teslim edilmesi, ambalaj üzerinde üretici adı ve adresi, ürün adı, barkod-katalog numarası, üretim tarihi, son kullanım tarihi ve saklama koşullarının belirtilmesi gereklidir.

Ulusal Bilgi Bankası (UBB), T.C. İlaç ve Tıbbi Cihaz Ulusal Bilgi Bankası (TİTUBB) ve CE direktiflerinden tıbbi cihaz yönetmeliği direktifleri alan, in vitro Tıbbi Tanı Cihazları Yönetmeliği kapsamındaki ürünler ile bunların satışını yapan işletmelerin kayıt altına alındığı web tabanlı kayıt sistemidir (2). İlaç veya tıbbi cihaz alanında faaliyet gösteren ve tedarik zincirindeki üretici veya ithalatçı tüm firmalar Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Ulusal Bilgi Bankasına kayıtlı olmalıdır (2). In vitro tıbbi tanı incelemesi için insan vücudundan alınan örneklerin konulması ve muhafaza edilmesi amacıyla kullanılan numune kapları in vitro Tıbbi Tanı Cihazları Yönetmeliği kapsamındaki ürünler arasındadır (3). Dolayısıyla numuneleri koyduğumuz tespit solüsyonu içeren kapların UBB kaydı gereklidir.

Tüm kimyasal sarf maddeler için güvenlik bilgi formları (GBF) tedarikçi firma tarafından teslim edilmelidir. Bu formlar kimyasalların kullanımında dikkat edilmesi gereken hususlar, geçimlilikleri ve depolama koşullarını içerir. GBF'de kimyasal maddeye ait özellikler, H (Hazard: Kimyasal maddelerin içerdiği tehlikeler), P (Precautionary: Alınması gereken önlemler) şeklinde belirtilir. Formlara ilişkin eğitimler düzenlenmeli ve herkesin kolayca ulaşabileceği yerlerde bulunmalıdır.

İhale sonrasında, muayene değerlendirme komisyonu numunelerin teknik şartnameye uygunluğunu değerlendirir. Bu değerlendirme uygunluk belgesi/katalog ya da yeterli miktarda numune incelenerek yapılabilir. Numunedeki olumlu özelliklerin, ihalede talep edilen miktarın tümünde izlenmesi gerekir.

Cihazlarda olduğu gibi sarf malzemeler için de envanter listesi oluşturulmalıdır. Sarf malzemelerin depolanmasında dikkat edilmesi gereken hususlar ise şöyle sıralanabilir;

- Kimyasal maddeler mutlaka etiketli olmalı ve açılma tarihleri kaydedilmelidir.
- GBF'lerde belirtilen saklama koşullarına uygun depolama yapılmalıdır.
- Depolarda mutlaka kimyasal madde dökülme kiti bulunmalıdır.
- Uyarı işaretleri (sigara içilmez, yanıcı sıvılar, asitler, vb.) bulunmalıdır.
- Dolaplar malzemenin düşmesini engelleyecek şekilde kenarlıklı raflardan oluşmalı ve duvara monte edilmiş olmalıdır.

I- TESPİT/MAKROSKOPI

Tespit

İyi bir histolojik preparat elde edebilmek için "uygun bir fiksatifle yeterli süre tespit" en önemli basamaktır. Tespitin amacı protein, lipit, karbonhidratları koagüle veya presipite etmek ve takip/ döküm sırasında karşılaşılabilecek reaksiyonlara karşı dirençli kılmaktır (4).

Tespit; dokuyu hücrel enzimlerin neden olduğu otolizden korur, enfeksiyöz ajanları inaktive eder ya da öldürür, dokuyu sertleştirir ve doku komponentlerini stabilize eder. Fiksatifleri; aldehidler (formaldehid, glutaraldehid vb.), protein denatürasyonu yapanlar (metil alkol, etil alkol, asetik asit), fiziksel ajanlar (ısı, mikrodalga) ve diğerleri (civa klorür, pikrik asit, vb.) olarak sınıflandırmak mümkündür (4). İyi bir fiksatiften beklenen özellikler dokuyu büzmemesi, şişirmemesi, enzimleri inaktive etmesi, dokudaki mikroorganizmaları öldürmesi, dehidratan, seffalandırıcı, sertleştirici, boyayıcı ajanlarla karşılaştığında dokunun orijinal şeklini korumasıdır (5). Standart ve en çok tercih ettiğimiz formalin fiksatifi formaldehidin %40'lık çözeltisidir. Dolayısıyla rutinde kullandığımız %10'luk formalin, %4'lük formaldehid solüsyonu ile eş değerdir. Nonkoagulan bir fiksatif olup, çapraz bağ oluşturarak dokuyu stabilize eder (6). Formalin her türlü materyalin rutin fiksasyonu için kullanılabilir. Formalinde tespit edilen dokulara histokimya, immünohistokimya, moleküler tetkikler uygulanabilir (6).

Konsantrasyon %37-38, özgül ağırlığı 1,07-1,09 g/ml olmalıdır. Piyasaya sunulmadan önce çökme ve tortulanmayı engelleyici ve koruyucu olarak %8-12 oranında metanol ile stabilize edilir. pH değerini 6.8-7.2 aralığında tutabilmek için sodyum fosfat tuzları ile tamponlanmalıdır. Tercihen 5lt'lik ambalajlarda olmalıdır. Teslim almadan önce getirilecek numunelerde mutlaka dansite ölçümü yapılmalı, konsantrasyonu %35-37 altında olanlar kabul edilmemelidir.

Kalitesiz formaldehid solüsyonu ile tespit tüm süreçleri olumsuz etkiler. Kalitesiz formaldehid üretim aşamasındaki sorunlara bağlı olabileceği gibi, çözeltinin uzun süre, uygun olmayan sıcaklıklarda (15°C'nin altında) beklemiş olması ya da formaldehid molekülünün kolayca kimyasal değişime uğramasına bağlı olabilir.

Formaldehid stabil bir molekül değildir. Monomer ve polimerler içerir. Polimerize oldukça, molekül ağırlığı artar, penetrasyon hızı yavaşlar ve fiksasyon gücü azalır. Su ile reaksiyona girerek metilen glikol halini alır. Formik aside dönüştüğünde ise pH'sı düşer ve asidik pH'da kanlı dokularda hemoglobin ile hematin pigmenti oluşur (7). Bunu önlemek için %37-40'lık formaldehid (100 ml), distile su (900 ml) sodyum fosfat monobazik monohidrat (4 gr), sodyum fosfat dibazik anhidroz (6,5 gr) formülasyonu ile tamponlanabilir.

Etil alkol (%70-100) nadiren primer fiksatif olarak kullanılmaktadır. Özellikle glikojenin korunması ve bazı histokimyasal çalışmalarda tercih edilir. Etil alkolün olumsuz etkileri, dokudan su çekerek protein denatürasyonuna, dokunun sertleşmesine, büzülmesine ve hücre distorsiyonuna yol açmaktadır (8). Ayrıca yağların erimesine neden olabileceğinden lipid çalışmalarında kullanılmamalıdır.

Testis biyopsilerinin tespitinde Bouin, kemik iliği tespitinde B5 solüsyonu (9) tercih edilebilir.

Doku Takip Kaseti

Doku takip kasetlerinin ebatları 4x2,8x0,65 cm olmalıdır. İyi kalitede plastik malzemeden imal edilmeli, doku takip kimyasallarından etkilenmemelidir. Kaset üzerinde protokol numarası yazılabilen eğimli bir yüzey bulunmalıdır. Yazılar işlem sırasında silinmemelidir. İstendiği taktirde yan yüzeylere de yazı yazılabilecek özellikte üretilmiş olmalıdır. Kasetlerde kimyasalların geçişini sağlayan delikler bulunmalıdır. Kasetler kapaklı olmalıdır, kapaklar kaset üzerine monte edilmiş açık durumda olmalıdır. Kaset yazma cihazlarında takılma olmayacak şekilde tüm yüzeyler pürüzsüz olmalıdır.

II-DOKU TAKİBİ

Dehidratasyon

Fikse olmuş su içeren dokular parafinle infiltre olmaz, çünkü parafin suda eriyen bir madde değildir. Fikse dokunun parafinle infiltre olabilmesi için dehidratasyon yani dokudaki suyun uzaklaştırılması ve şeffaflaştırma gereklidir.

Fiksasyonu tamamlanmış dokuların sudan ve tespit solüsyonundan kurtarılması için dilüsyonel dehidratasyon yöntemiyle dokuların artan konsanstrasyonda alkollere transferi ile doku suları uzaklaştırılır. Alkollerin çoğu hidrofiliktir ve dokularda-

ki suyu en iyi çeken maddedir. Yükselen alkol konsantrasyonlarının (%70, %80, %95, absolu alkol) kullanılması, dokunun büzülmeden dehidrate olmasını sağlar. Doku takibinde dehidratasyonun yetersiz olması, doku takibi işlemlerinin kalitesini düşürür ve yumuşak dokular elde edilmesine yol açar. Aşırı dehidratasyon ise sert, kırılğan dokulara neden olur. Dehidratasyonda kullanılabilen maddeler etil alkol, metil alkol ve asetonur.

Etil alkol en çok kullanılan dehidratasyon maddesidir. Berrak, renksiz, kolay alev alabilen, orta derece toksik bir maddedir. Hızlı etkili ve hidrofiliktir. Dehidratasyon için yükselen konsantrasyonlarda kullanılmalıdır.

Alkollerin doğal formu ve metillenmiş/denatüre edilmiş formu mevcuttur. Patolojide denatüre alkol kullanılır. Metilasyon işlemi metanol, isopropanol kullanılabilir. Denatürasyon için kullanılan katkılar takip ve boyama sorunlarına yol açabilir. Metanol oranı yüksek olmamalıdır. Alkolometre ile konsantrasyonu ölçülmelidir (Şekil 1). Konsantrasyon normal olsa bile, alkol kaynaklı takip ve boyamada sorun yaşıyorsa kimyasal analiz raporu istenebilir. Kimyasal analizde damıtma yöntemiyle kaynama derecelerine göre tüm bileşenler ayrılabilir.

Aseton renksiz, berrak, alev alabilen ve karakteristik kokulu bir dehidrandır. Hızlı dehidratasyon yapmakta ve dokuları sertleştirmektedir. Etanol ve metanole göre çözücü etkisi daha fazla olduğundan özellikle yağlı dokuların takibinde dehidratasyon maddesi olarak kullanılması önerilmektedir (10).

İsopropanol etanole en uygun alternatiftir. Reaksiyon hızı yavaştır. Büzülme ve sertleştirme etkisi daha azdır. Etanolden daha az hidrofilik ama daha iyi lipid çözücüdür. Hem su hem erimiş parafinle geçimlidir. Mikroalga takibinde ksilen yerine kullanılabilir. Sert, dens dokuların takibinde tercih edilir (11).

Şeffaflandırma

Şeffaflandırıcı maddeler; dokuyu şeffaflaştıran, dokudan dehidratanları uzaklaştıran maddelerdir. Çoğu dehidratasyon ajanı, sertleştirici olarak kullanılan parafin ile geçimsizdir. Dehidratasyon ve infiltrasyon arasında geçiş solventi gereklidir. Bu solvent sudan ve dehidratan maddeden yoksun dokuyu sertleştirici maddenin nüfuz etmesini sağlar.

Şeffaflandırıcılar, hidrokarbonlar (toluen, ksilen, benzen, petrol çözücüler (aromatik, alifatik, naftanik) kloroform); esterler (N-butil asetat, metil benzoat, metil salisilat); terpenler (sedir ağacı yağı, limonen, terpinol) olmak üzere üç gruba ayrılabilir (12).

Ksilen en sık kullanılan şeffaflandırıcı ajandır. Molekül ağırlığı 106,17gr/mol, yoğunluğu 0,86 g/ml olmalıdır (12). Saflığı en az %97, içerdiği su oranı %0,01 arasında olmalıdır. İçerdiği etil benzen oranı maksimum %3, bileşimindeki toluen oranı maksimum % 0,1 olmalıdır (13,14). Kullanım kolaylığı açısından 5 litrelik orijinal ambalajında olmalıdır.



Şekil 1: Alkol konsantrasyonunu ölçmek için laboratuvarımızda bulunması gereken alkolmetre.

Ksilen hem alkol hem parafinde eriyebilen hidrokarbon çözücüdür. Alkol ve parafinle hızla yer değiştirir. Doku uzun süre ksilende kalırsa sertleşme meydana gelir. Işığın kırma indeksi proteinlere çok yakındır. Bu nedenle takip esnasında doku ksilene doymuşsa, ışığa tutulduğunda şeffaf görünür.

Toluen, ksilene göre yavaş etkilidir ve daha az sertleştirir. Klo-roform daha yavaş etkilidir. Özellikle tendon, kas ve uterus örnekleri için alternatif bir şeffaflandırıcı olarak bildirilmektedir. Limonen ise ksilene göre dokuları daha az sertleştirir, parafin ile daha uyumludur (14).

Sertleştirme (İnfiltrasyon)

Dehidratasyon ve şeffaflandırmadan sonra dokulardan iyi kesit alınabilmesi için sertleştirilmesi gerekir. Bu işleme infiltrasyon/impregnasyon (doyurma) da denilmektedir.

Parafin en yaygın kullanılan sertleştirici maddedir. Parafin ham petrolün rafinerizasyonu sırasında oluşan bir yan üründür. Patolojide kullanılabilmesi için üst düzeyde saflaştırılması ve yağ oranının düşürülmesi gerekir. Kalıplar halinde gelen parafin kullanım kolaylığı açısından boncuk parafin haline çevrilir (Şekil 2). Polimerik maddeler eklenerek sertliği artırılır. Kesit için polimer katkılı olanlar tercih edilebilir. Parafinin etkinliği erime noktasına göre değişir. Erime noktası arttıkça parafin sertleşmektedir, bu da özellikle küçük dokularda seri kesit alınmasını zorlaştırmaktadır. Patolojide tercih edilen erime noktası 56-58 C'dir. Kaliteli bir parafin iyi filtre edilmiş olmalı, erime sonrası partikül içermemelidir. Yağsız, kokusuz, renksiz, berrak olmalıdır ve gömmede bulanıklık oluşturmamalıdır. Kalıptan kolayca ayrılabilmesi, donduğunda çatlamamalıdır. İnce, seri kesit verebilmeli, kesit sırasında kırılma ve rulo oluşumu az olmalı, su banyosunda dağılmamalıdır. Kısa sürede kolayca deparafinizasyon sağlanabilmeli, artık kalmalı ve boyaya etkisi olmamalıdır.



Şekil 2: Kullanım kolaylığı açısından büyük plakalardan elde edilen boncuk parafin.

III-KESİT- BOYAMA

Mikrotom Bıçakları

Mikrotom bıçakları 80x8x0,25 mm boyutlarda, kesme ağı 35 derece olmalıdır. Mikrotom cihazı bıçak tutucusuna uygun tasarımı olmalı, rotary, kızaklı mikrotomlar, frozen cihazlarında kullanılabilir. Paslanmaz çelik malzemeden imal edilmiş ve çizik oluşturmaması için özel teflon ile kaplı olmalıdır. Bıçağın yüksekliğine ve kalınlığına göre, düşük ve yüksek profilli olmak üzere iki tip bıçak mevcuttur (Şekil 3). Mikrotomun modeli ve bıçak tutucusunun özelliğine göre seçim yapılmalıdır.

Lam&Lamel

Renkli, rodajlı lamalar 76x26mm boyutlarında olmalıdır. Bir ucu rodajlı olmalı, yazı yazılabilmeli, rahat okunmalıdır. Renklendirilmiş alan ksilen ve alkole dirençli olmalı, kabarma, soyulma, atma ve renk kaybı olmamalıdır. Renkli alan boyama solüsyonlarında renk almamalı, orijinal renginde değişim olmamalıdır. Kenarları traşlanmış, köşeleri küt olmalıdır.

Yüzeyi tozsuz, çapaksız olmalı, birbirine yapışmamalıdır. Doku penetrasyonu kuvvetli olmalı, kesit alma ve boyama aşamalarında dökülme yaşanmamalıdır.

Lameller ihtiyaca göre 24x50, 24x60, 24x24 mm boyutlarda tercih edilebilir. Birbirine yapışmayan, kolay kırılmayan, temiz ve şeffaf özellikte olmalıdır.

Hematoksilen&Eozin

Hematoksilen&Eozin, patoloji laboratuvarında en sık kullandığımız rutin boyadır. Hematoksilenin doğal formunun boyama yeteneği çok azdır veya yoktur. Bu nedenle doğal veya kimyasal yolla oksidasyona ihtiyaç vardır. Sodyum iodat / civa oksit gibi oksitleyici ajanlarla kimyasal yolla renklendirilmeden



Şekil 3: Boyutları 80x8x0,25mm olan düşük profilli mikrotom bıçağı ve 80x14x0,32 mm olan yüksek profilli mikrotom bıçağı.

sorumlu ana oksidasyon ürünü hemateine okside olur (15). Dokulara bağlanma kapasitesi düşüktür. Boyama etkinliğini arttırmak için alüminyum, demir tuzları ile mordantlama, renklerinin sabitleştirilmesi gerekir. Böylece hematoksilen boya çözeltisi elde edilir (Hematoksilen + Oksidasyon ajanı + Mordant = Hematoksilen Boya Çözeltisi)

Oksidasyon sağlayan kimyasal miktarı ve kalitesi önemlidir. Hazır hematoksilen çözeltisi hava, ışıkla temastan korunmalı, her gün süzülmesi, en geç bir ay içerisinde tüketilmelidir. Aksi takdirde oksidasyon devam eder, çökelti oluşur, boyama gücü azalır, istenen kontrast elde edilemez.

Eozin rutin histolojik boyamada hematoksilenlere zıt boya olarak sitoplazma boyanmasında kullanılır. Alkolik ve su bazlı formları mevcuttur.

Boyalar teslim edildikten sonra son kullanım tarihinden önce çökelti ya da bozulmalar gerçekleşirse yeni ürünle değiştirileceğine dair madde teknik şartnameye eklenmelidir.

Kapama için doğal veya sentetik reçine kullanılabilir. Doğal reçinelerin kuruma süresi uzundur, eozin birkaç yılda solar. Günümüzde sentetik reçineler tercih edilmektedir.

SONUÇ

Patologlar olarak sarf malzemelerin teknik özelliklerine hakim olmalı, teknik şartnameleri özenle hazırlamalı ve numunelerin şartnamelere uygunluğunu dikkatle araştırmalıyız. İyi bir histopatolojik inceleme için, iyi tespit olmuş, takip, bloklama, kesit, boyama basamakları sorunsuz doku kesitlerine ihtiyaç vardır. Bunun için de kaliteli sarf malzeme kullanımı son derece önemlidir.

KAYNAKLAR

1. 4734 sayılı Kamu İhale Kanunu: 24648 sayılı, 4.1.2002 tarihli resmi gazete.
2. T.C. İlaç ve Tıbbi Cihaz Ulusal Bilgi Bankası: www.titubb.titck.gov.tr.
3. İn vitro Tıbbi Tanı Cihazları Yönetmeliği: 26398 sayılı, 09.01.2007 tarihli resmi gazete.
4. Baker JR. Fixation in cytochemistry and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 1958;6:303-8.
5. Doğan Ö. Histopatolojik tanı sürecinde standardizasyon. *Aegean Pathology Journal.* 2005;2:8-28.
6. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(7):1016-9.
7. Taqi SA, Sami SA, Sami LB, Zaki SA. A review of artifacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2018;22(2):279.
8. Panzacchi S, Gnudi F, Mandrioli D, Montella R, Strollo V, Merrick BA, Belpoggi F, Tibaldi E. 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):750-60.
9. Troiano NW, Ciovacco WA, Kacena MA. The effects of fixation and dehydration on the histological quality of undecalcified murine bone specimens embedded in methylmethacrylate. *J Histotechnol.* 2009;32(1):27-31.
10. Mullink H, HenzenLogmans SC, Tadema TM. Influence of fixation and decalcification on the immunohistochemical staining of cell-specific markers in paraffin-embedded human bone biopsies. *J Histochem Cytochem.* 1985;33(11):1103-9.
11. Viktorov IV, Proshin SS. Use of isopropyl alcohol in histological assays: dehydration of tissue, embedding into paraffin, and processing of paraffin sections. *Bull Exp Biol Med.* 2003;136(1):105-6.
12. Metgud R, Astekar MS, Soni A, Naik S, Vanishree M. Conventional xylene and xylene-free methods for routine histopathological preparation of tissue sections. *Biotech Histochem.* 2013;88(5):235-41.
13. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Organic Solvents, Resin Monomers and Related Compounds, Pigments and Occupational Exposures in Paint Manufacture and Painting. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 1989.
14. Shariff S, Kaler AK. Principles & Interpretation of Laboratory Practices in Surgical Pathology, 1st ed. Nayak R, editor. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2016.
15. Harris HF. On the rapid conversion of haematoxylin into haematein in staining reactions. *Journal of Applied Microscopic Laboratory Methods.* 1900;3(3):777.