

Doku Takip İşlemlerinde Formaldehitin Tamponlanarak Kullanılmasının Fiksasyona Etkilerinin İncelenmesi

Investigation of the Effects of Buffered Formaldehyde in an Automatic Production System on Fixation in Tissue Processing Procedures

Habib Serdar Aday  <https://orcid.org/0009-0004-1069-199X>
İstanbul Tıp Fakültesi
İstanbul Üniversitesi
Çapa (İstanbul, Türkiye)
saday@istanbul.edu.tr

Özetçe— Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı rutin histopatoloji laboratuvarında gerçekleşen analitik süreçte yer alan doku takip işlemlerinde kullanılmakta olan formaldehit temini, muhafazası, tamponlanması, dozajlanması ve kullanıma hazır hale getirilerek doku takip sistemlerinde kullanılması ve analitik süreçte doku takip sonrası faaliyetler kayıt altına alınarak genel fiksatif olarak kullanılan % 37-40 saflıkta formaldehitin kullanıma hazır hale getirilmesi ve fiksasyon etkinliği bu çalışmamızda farklı yönleri ele alınarak değerlendirilmiştir.

Formaldehit, doku takip işlemlerinde henüz yerine efektif bir unsur ikame edilememiş doku fiksasyon unsuru olarak kullanılan kimyasal bir unsurdur. Formaldehit; üstün fiksasyon yeteneklerini ideal şartlarına kavuşması halinde gösterebilmektedir. Bir doku takip laboratuvarında doku fiksasyonunu etkinlik ve hızının ideal şartlarda oluşması için öncesinde bu şartların sağlanması esastır. Formaldehit solüsyonu laboratuvar yönetiminin tercihine göre hazır tamponlanmış ve tamponsuz halde ticari halde pazarlanmaktadır. Her iki formda olsa da solüsyonun etkinliği için öncelikle üretim ve tavsiye edilen son tüketim tarihi arasında ideal zamanlamada çalışılması önemlidir. Formaldehit fiksatifinin ideal şartlarda hazırlanması ile doku takip işlemleri ve sonrasında gerçekleşecek mekanizmaların uygulanmasına olumlu etki ettiği, tanı süresi ve işlem maliyetini azaltarak hasta ve kamu menfaatine olumlu etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler — Doku takip, formaldehit, sodyum fosfat tamponu..

Abstract— In this study, different aspects of formaldehyde supply, storage, buffering, dosing and use in tissue tracking systems by making it ready for use and fixation efficiency of 37-40% pure formaldehyde used as a general fixative by recording the activities after tissue tracking in the analytical process carried out in the routine histopathology laboratory of the Department of Medical

Pathology were evaluated. Formaldehyde is a chemical element used as a tissue fixation element that has not yet been effectively replaced in tissue tracking procedures.

Formaldehyde can show its superior fixation capabilities when it reaches ideal conditions. In a tissue tracking laboratory, it is essential to provide these conditions beforehand for the effectiveness and speed of tissue fixation to occur under ideal conditions. Formaldehyde solution is commercially marketed as ready-buffered and unbuffered according to the preference of the laboratory management. Although it is in both forms, it is important to work at the ideal timing between production and the recommended expiration date for the effectiveness of the solution. It is aimed to show that the preparation of formaldehyde fixative under ideal conditions has a positive effect on tissue tracking procedures and the application of the mechanisms that will occur afterwards, and to show its positive effect on the patient and public interest by reducing the diagnosis time and process cost.

Keywords — Tissue fixation, formaldehyde, sodium phosphate buffer.

I. GİRİŞ

Tıbbi Patoloji laboratuvarında doku fiksasyonu için uzun süredir kullanılan unsur formaldehit olagelmıştır. Formaldehit; doku fiksasyonunda etkisini kısa sürede oldukça etkin biçimde göstermesi, maliyetinin uygun olması, kolaylıkla temin edilerek kullanılabilir olması avantajlarına sahip vazgeçilmesi zor bir fiksatif olarak varlığını koruyabilmiştir. Bu avantajlarının etkin halde sürebilmesi, formaldehit asitliğinin korunabilmesi ile doğrudan bağlantılıdır, ayrıca konsantrasyon oranı, aldehit yüzdesi ve dağılımı, aldehit üretim ve kullanım tarihi, hazırlanma şekli, kullanılan su kalitesi, ortam ve fiksatif sıcaklığı, su ve ürün asitliği, doku veya organın daha önce farklı bir kimyasal ile etkileşiminin olup olmaması, ortam hava kalitesi



ve hava ile temas ve süresi formaldehit etkinliğini belirleyen etkenlerdir. Ayrıca formaldehitin asidik ortamda; pikrik asit ve formik asite parçalanması ile preparatlarda siyah-kahverengi pigment oluşumu, dokuda formik asitten kaynaklanan harabiyet olasılığının artması, moleküler analizlerde formik asitin genetik materyali fragmante edebilme riski farklı sıklıkla kullanıcılar tarafından geri bildirim olarak sunulabilmektedir.

Formaldehit, doku takip işlemlerinde henüz yerine efektif bir unsur ikame edilememiş doku fiksasyon unsuru olarak kullanılan kimyasal bir unsurdur. Formaldehit; üstün fiksasyon yeteneklerini ideal şartlarına kavuşması halinde gösterebilmektedir. Bir doku takip laboratuvarında doku fiksasyonunu etkinlik ve hızının ideal şartlarda oluşması için öncesinde bu şartların sağlanması esastır. Formaldehit solüsyonu laboratuvar yönetiminin tercihiyle göre hazır tamponlanmış ve tamponsuz halde ticari halde pazarlanmaktadır. Her iki formda olsa da solüsyonun etkinliği için öncelikle üretim ve tavsiye edilen son tüketim tarihi arasında ideal zamanlamada çalışılması önemlidir. Formaldehit fiksatifinin ideal şartlarda hazırlanması ile doku takip işlemleri ve sonrasında gerçekleşecek mekanizmaların uygulanmasına olumlu etki ettiği, tanı süresi ve işlem maliyetini azaltarak hasta ve kamu menfaatine olumlu etkisinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

II. MATERYAL METOD

Taze halde olan formaldehit sıklıkla %37-40 veya kullanıma hazır %10 halde pazarlanmaktadır. Optimum şartlarda temin edilen ürünün teknik şartlarını karşılayan bir laboratuvar ortamında çalışılması 6331 sayılı iş güvenliği ve çalışan sağlığı cari mevzuatı gereğince yasal zorunluluktur. İdeal termal şartları sağlanmış (sıcaklık 19-23°C %30-60 bağıl nem) bir laboratuvar ortam ve fiksasyon sıcaklığının kontrolü gerek dokunun ideal sıcaklıkta fiksatifin dokuya nüfuz edebilme hızını gerekse dokunun fiksatiften korunma zarara uğramama şartlarını optimize etmesi açısından gözetilmelidir.

Zira ortam ve fiksatif sıcaklığının gerek takip sistemlerinde gerek ortamda ideal şartların üzerine çıkması halinde; fiksatifin doku içerisinde yayılma hızı beklenen hızın üzerine çıkacaktır. Bu durum fiksatif ile dokunun daha hızlı ve uzun süre etkileşim halinde kalmasına ve dolayısı ile fiksasyon kimyasal etkinliğinin artmasına neden olacaktır. Bu durum, doku takip işlemi sonrasında gerek boyama gerekse de histokimyasal, immunhistokimyasal ve moleküler çalışmalarda doku etkinliğinin azalmasına neden olabilir.

Yüksek sıcaklıkta fiksasyon ile menfi etkinin azaltılabilmesi için dokunun öncelikle oda sıcaklığında (298.15 K (25 °C, 77 °F) fiksasyonun başlatılması ardından 40-45°C sıcaklığa çıkartılarak uzun süreli fiksasyonun dokuda etkinliği artırması beklenecektir. Formaldehiti %10 formda, ideal şartlarda hazırlanmış dokuya tüm yüzeylerinden uzun süreli gece takibi (4 Saat-6 saat) eşdeğere şeklide etkin fiksasyonun oluşmasına katkı sağlayacaktır.(Tablo 1, Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4)

Tablo.1 Penetrasyon Hızı		
Formülasyon	$d = k \cdot v \cdot t$	
%10 Formaldehit		
Değer	Ölçüm	Birim
k	0,88	mm

Tablo.2 Tıbbi Patoloji A.D. Fiksasyon Süresi(saat)	
Formaldehit	Etanol
4	6

Tablo.3 Penetrasyon Hızı		
Formülasyon		$d = k \cdot v \cdot t$
%10 Formaldehit		
Değer	Ölçüm	Birim
k	0,88	mm

Tablo.4 Tıbbi Patoloji A.D. Penetrasyon Hızı(mm)	
Formaldehit	Etanol
0.7x v4=1,4	1xv6=2,3

Fiksatifin doku içerisine nüfuz etme işlemine fiksatifin penetrasyonu olarak adlandırılmaktadır. Penetrasyon; farklı bir sisteme, ağa konumuz gereği dokuya izin alınmaksızın yetkisiz bir şekilde giriş yapma işlemidir. Bilgisayar sistemine veya ağına bilişim virüsü girmesi ve bakteriyofaj penetrasyona örnek olarak verilebilir. Fiksasyon işlemlerinde; işlem gören toplam dokunun kapladığı alanı kapsayacak hacimden daha fazla fiksatif kullanılmaması halinde dokular içerisinde kısmen dahi olsa azalarak düşen fiksatif hacmi fiksasyon etkinliğine tesir edebilmektedir. Bu yüzden, fiksatif hacmi (20) oranı / doku hacmi (1) olacak şekilde tasarlanmalıdır. Toplam doku hacmine göre fazladan fiksatif hacmi olması önemlidir fiksasyon ilerledikçe fiksatif tükenir ve küçük bir toplam hacimde bu fiksasyon kalitesini etkileyebilir.

Formaldehit (%10) fiksatifinin dokular içerisine penetrasyonu ağır gerçekleşen bir ilerlemedir. Farklı fiksatiflerin dokuya penetrasyon hızı difüzyonu farklıdır ve fiksasyonda optimum şartların sağlanma için dokunun ideal büyüklükte, ideal derinlikte olması, fiksasyon süresinin dokuya göre ayarlanması esastır. Ancak farklı dokularda fiksatiflerin farklı hızda difuze olabilecekleri dikkate alınmalıdır.

Medawar PB. sabitleyicilerin penetrasyon oranı $d = K \cdot \sqrt{t}$ formülü ile tasarlanmıştır. Formüle; (d) penetrasyon derinliği, (K) difüzyon katsayısı, (t) zaman olarak ifade edilmektedir. Formaldehit (%10) fiksatifinin dokulara difüzyonunda, penetrasyon derinliğinin $K = 0,78$ olup bu değer etanol için 1,0'dir. Farklı bir söylemle; Fiksatifin 1 saat içerisindeki difüzyon katsayısı, fiksatifin dokuya difüzyonunun milimetre cinsinden mesafesidir. Böylelikle %10 formaldehit 1 saatte bir saatte 1 mm nüfuz etmesi eklenir. Bu durum, 10 mm' lik bir numunenin orjinine kadar fiksatifin ilerleyebilmesi için 25 saatlik bir süreye ihtiyaç duyulacaktır (5 mm = 5² saat). (1)

Formaldehit solüsyonunun doku fiksasyonunda etkinliğinin sağlanmasındaki temel unsurlardan bir başkası ise Ph değeridir. %10 nötrale edilmiş tamponlu formaldehit fiksatif; 1 küp şeker büyüklüğünde olan yumuşak doku içerisine difuze olma hızı; bir saatlik sürede yaklaşık 1,0 mm, 2 saatlik fiksasyon süresinde 1,4 mm, dört saatlik sürede 1,6mm, sekiz saatlik sürede, 2,2mm, sonrasında ise doku merkezine ulaşması beklenmelidir. Formaldehit %10 kullanıma hazır hale getirildikten hemen sonra şayet tamponlanmamış ise ortam ve solüsyon sıcaklığının da etkisi ile 1-2 sat içerisinde asitlik derecesinde düşme başlar. Formaldehit fiksatifinin tamponlanarak taze kullanılması halinde benzer dokularda eş sürelerde; yakın özellikteki dokularda gerçekleşecek fiksasyon hızı öngörülebilmektedir. Formaldehit tamponlama işlemi Tablo 5 ve Tablo 6'da görüldüğü şekilde yapılmıştır.

Tablo.5

Sodyum Fosfat Tamponu Hazırlama Tablosu

A- 4S Sodyum Hidrojen Fosfat anhidrous, (4,5 gr)

B- Sodyum 4-Hidrojen Fosfat 2-Hydrate, (4 gr)

C- 1 lt için gerekli miktarlar böyle ana elindeki sodyum tuzlarını su ortamı ayar değışe formül değışe.

D- 5 lt konantr formel için 5 lt tampon çözelti ve 40 lt su olacak şekilde doğulama cihazında yaptırınız kanşama da.

Sodyum Fosfat tamponu Hazırlamak için Gerekli Miktar	A- 4S Sodyum Hidrojen Fosfat anhidrous(Gram)	B- Sodyum 4-Hidrojen Fosfat 2-Hydrate(Gram)
1 Litre için	4,5	4
5 Litre için	22,5	20
10 Litre için	45	40
25 Litre için	92,5	80
40 Litre için	130	110

Tablo.6

Tamponlu Formaldehit Hazırlama Yönergesi

- Menüden Hazırlama Tuşuna Bas.
- Standard Tamponlu Hazırlama Bas.
- Tamponlu Formol Volumünü Belirle(Öm 300Litre).
- Beyat.
- 30 dak ile 60 dak arasında HAZIRLAMA SÜRESİNİ BEKLE.
- Kullanıma Hazır.

ÖNEMLİ: All pH değeri per den 1000 SÖZET TAMPONU için

NOT: SÖZET FORMASI 1000ml'dir.

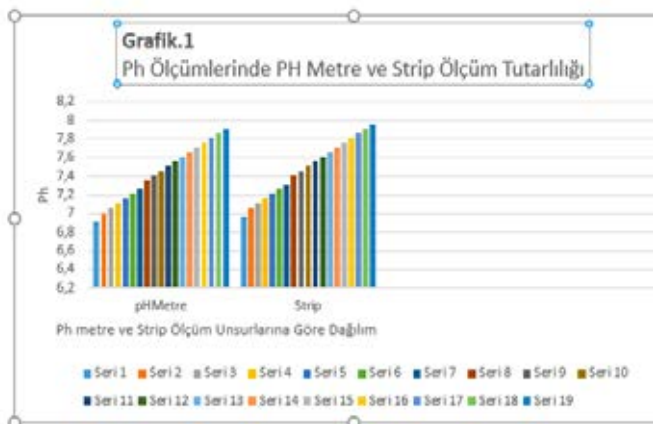
Böylelikle Ph kuvvetli asit değerlerine yaklaşır. Ph 5 ve altındaki değerlerde formaldehit hızlıca formik asit formuna dönüşerek dokularda yer alan hemoglobin ile tepkimeye girmesi beklenir. Bu etkileşimden formaldehit hematin meydana gelir dokularda siyah veya kahverengi pigment şeklinde granüler oluşumlara neden olur, doku takip ve tanı kalitesine olumsuz etki etme etkinliğinin önlenmesi hedeflenmiştir.

Formaldehit fiksatifinin fiksasyon hemen öncesinde tamponlanmış olması, ideal şartlarda hazırlanması, karıştırılmış olması ve dozajlanması fiksasyon etkinliği açısından önemlidir. Çalışmamızda yer alan formaldehit fiksatifinin taze olması, üretim tarihinden itibaren tavsiye edilen son kullanım tarihini aşmamış olması, teknik şartnamemizde aranan şartlara haiz istenilen evsafıta olması sağlanmıştır.

Formaldehit konsantre formdan (%38-40) halden kullanıma hazır hale getirilmesi sonrasında doku fiksasyonunda etkinliğinin incelenmesi, takip işlemi yapılarak incelenen preparatlarda sıklıkla artefaktların ekarte edilebilmesi için, 2022-2023 yılları arasında 434 gün boyunca Tıbbi Patoloji A.D. laboratuvarında formaldehit sodyum hidrojen fosfat ve disodyum hidroksi fosfat tuzlarının karışımı kullanılarak rutin protokol ile çözelti hazırlanmıştır.

III- BULGULAR

Solusyonun hazırlanmasında, Aquaderm revers osmosis su saflaştırma sisteminden elde edilen ve ortalama 9µS/saat iletkenlik değerinde ve en fazla 6,5 Ph değerinde olan su kullanılmıştır. Formaldehit otomatik formaldehit dozajlama makinesinde rutin tamponlu formaldehit programı kullanılarak doku fiksasyon ve takip işlemleri tam otomatik vakum-press kapalı sistem doku takip cihazı kullanılarak tamamlanmıştır. Tamponlama öncesinde kullanılmakta olan şebeke suyu her kullanımdan önce manuel şerit Ph kağıdı ve otomatik Ph metre ile 434 farklı ölçüm yapılmış, şerit Ph ölçer kağıtta asit bantında görüntü elde edilmiş, otomatik Ph metre de ise 5,5±0,7 aralığında ölçüm tespit edilmiştir.(Grafik.1)



Rutin tamponlama protokolü ve şebeke suyu kullanılarak otomatik formaldehit dozajlama makinesinde tamponlu formaldehit protokolunda üretilen tamponlu formaldehit hazırlanmıştır. Kullanıma hazır formaldehit proses öncesi manuel şerit Ph kağıdı ve otomatik Ph metre ile 434 farklı ölçüm yapılmış (Grafik 2), şerit Ph ölçer kağıtta alkali bantında

görüntü elde edilmiş, otomatik Ph metre de ise 7,6±0,7 aralığında ölçüm tespit edilmiş, elde edilen değerler Tablo 7 ve Tablo 8 'de gösterilmiştir.



Tablo.7	Şerit PhÖlçer	
Ölçüm Sayısı	434	434
Art Ort	Alkali Bant	7,6
St Sapma	***	0,7
İstatistiki Değer	Etkinlik%99,9	P< q 0,05
Sonuç	Ph metre Değerlerinin Doğrulayıcı Sonuç Elde edilmiştir.	Elde edilen formaldehit Ph doğruluk değerinin anlamlı olduğu anlaşılmıştır.

Tablo. 8Ph metre değerleri

-416 örnekte Ph7,61-7,71

-8 Çalışmada 7,51-7,61 Arasında

-9 Çalışmada 7,71-7,81 arasında değer elde edildi.

6,91	7,01	7,06	7,11	7,16	7,21	7,26	7,31	7,36	7,41
6,96	7,06	7,11	7,16	7,21	7,26	7,31	7,36	7,41	7,45

7,45	7,51	7,56	7,61	7,66	7,71	7,76	7,81	7,86	7,91
7,51	7,56	7,61	7,66	7,71	7,76	7,81	7,86	7,91	7,96

IV- TARTIŞMA

Rutin doku takip makinesinde üretilerek kapalı otomatik takip cihazlarında kullanılarak sonlandırılan takip işlemlerinde, formaldehitin tamponsuz takiplerde beklendiği üzere parçalanarak formik asit oluşturulmaması, asidik bir çözeltiden ziyade alkali ortamda takip işleminin tamamlanmış olması, formaldetten parçalanarak pikrik ve formik asitin hemoglobinle reaksiyona girememesi nedeniyle eskisi gibi pigment oluşturmadığı görülmüştür. Böylece formaldehit fiksatifinin doğru, yerinde, taze hazırlanması ve uygun şekilde tamponlanarak kullanılması halinde dokularda analitik süreçte oluşması istenmeyen özellikler olan; doku bütünlüğünün bozulması, dokunun ıslak kalması, nükleer materyalin soluk kalması ve küçülmesi, sitoplazmanın silik kalması, küçülmesi gibi dokunun istenilen ideal şartlardan uzaklaşması, kesit alma



zorluğu yaşanmasının önüne geçilebileceği gösterilmiştir. Birim zamanda üretilen preparat sayısının artması, kesit ve görüntü kalitesinin üst düzeyde çıkartılması, harcanan sarf malzeme miktarının sınırlandırılması, tanı süresinin kısaltılarak ileri düzey (İHC, FISH, nükleik Asit bazlı moleküler çalışmalar) analizler için ideal zemin(3) oluşturulmasına katkı sağladığı görülmüştür (Tablo 9).

Formaldehit fiksatifleri kullanılarak yapılan doku fiksasyon etkinliği ve süresinin artırılması için formaldehit fiksatifleri tam otomatik kapalı sistem takip cihazı üreticileri; rutin protokolünde 45-60 OC'ye kadar ısıtılması önerilebilmektedir. Böylelikle fiksasyon etkinliğinin arttığı bilinmekle birlikte dokularda sıcaklık ve fiksatif etkinliğinden kaynaklanabilecek reaktif değişimlere yol açabileceği göz ardı edilmemelidir.

Deney hayvanlarında yapılan deneysel çalışmalarda %10 konsantrasyonda formaldehit Ph derecesinin 5 ve aşağı inmesi halinde formik asit oluşması ile birlikte; formaldehite maruz kalan deney hayvanlarında mutajen etki yaptığı (Kawanishi, 1995)(4) belirlenmiştir. Bu durum ile karşılaşmamak için çalışmamızda kullanılan formaldehit aşağıda verilen oranlarda otomatik dozajlama ve karıştırma cihazında günlük tamponlanarak kullanılmıştır. Böylelikle formik asite dönüş ve dokularda pigmet oluşumu engellenmiştir. Formaldehit, memeli ve bakteri hücrelerinde mutasyonlarına oluşturabilmektedir.

Fransa hükümetinin formaldehit kullanımının belirlenmesi ile alakalı çalışmaları esnasında %10 formaldehit fiksasyon etkinliği FineFIX ve RCL2 gibi farklı fiksatifler ile immunhistokimyasal çalışmalarda immun reaktivite etkinliği, moleküler çalışmalarda kullanılacak DNA ve RNA izolasyon değerleri ile karşılaştırılmıştır. Yapılan değerlendirmede; anılan fiksatiflerin kullanımı halinde hematoksilen-eosine boyama, immune reaktivite doku morfolojisi üzerine menfi etki görülmediği ancak moleküler patolojik çalışmalarda en iyi sonuçların FineFIX ve RCL2 fiksatifleri ile alındığı gösterilmiştir.(7)

Her ne kadar çalışmamızda kontrol grubu kullanılmamış ise de; daha literatürde yer alan çalışmalara dayanarak rutin protokol ile doku katip sisteminde formaldehitin taze halde kullanılması, verilen yol ve yöntem ile tamponlanması, fiksatifin artırılmış nötral su ile dilue edilmesi halinde benzer sonuçlara ulaşılabileceğini göstermektedir.

Tablo.9 İdeal Formaldehit Fiksasyonu		
	Çap Küçülmüş	Normal
Nükleus	-	+
Nükleer Materyal	Açık Soluk Boyanmış	Koyu Parlak Boyanmış
	-	+
Sitoplazma	Küçülmüş	Normal
	-	+
Nemli Doku	Var	Yok
	-	+
Dokuda Sertlik	Kırılgan	İdeal Esnek
	-	+
Kesitte Parçalanma	Var	Yok
	-	+
Pigment	Var	Yok
	-	+

V- SONUÇ

Her ne kadar formaldehit fiksatifleri WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından sağlığa zararlı bir kimyasal olarak tanımlanmış ise de patoloji laboratuvarlarında doku fiksasyonu, histokimyasal boyama, immunhistokimyasal faaliyetlerde kullanım immunreaktivite için kullanılabilircek efektif, ekonomik bir fiksatif halen yaygın kullanıma girmemiştir. Bu nedenler göz önüne alınarak %10 formaldehit fiksatifinin yakın bir gelecekte de kullanımının devam edeceğini düşündürmektedir.

Tıbbi Patoloji rutin histopatoloji laboratuvarında fiksasyon iş ve işlemlerinde vakum-press özelliğine sahip tam otomatik, kapalı sistem doku takip makinalarında yapılan takip faaliyetinde %10 konsantrasyonda kullanıma hazır formaldehit fiksatifinin; tavsiye edilen son kullanma tarihini aşmadan, otomatik dozajlama sisteminde protokole uygun halde tamponlanıp, Ph seviyesi rutin aralıklarla kontrol edilerek homojen, ideal, nötral %10 konsantrasyonda formaldehit fiksatif üretmek, kullanmak ve böylelikle dokularda ideal, sürdürülebilir, ekonomik takip işlemi uygulamak mümkün olduğu gösterilmiştir.

İdeal fiksasyonun uygulanması halinde tanı süresinin kısaltılması, birim maliyetin azaltılması, histopatolojik işlemler sonrasında yapılabilecek ileri tetkik ve analiz işlemlerine uygun zemin hazırlandığı ve bu çalışmanın uzun sürelerle sari yapılabileceği anlaşılmıştır.

VI- KAYNAKLAR

- [1] Medawar PB. Sabitleyicilerin penetrasyon oranı. J Royal Microsc Soc 1941; 61 ;46-57
- [2] Ö. Doğan. © 2005 Aegean Pathology Society, APJ, 2, 8–28.
- [3] Kawanishi, M., Matsuda, T., Sasaki, G., Yagi, T., Matsui, S. ve Takebe, H. (1998a). İnsan hücrelerinde çoğaltılan mekik vektör plazmitlerinde krotonaldehit tarafından indüklenen mutasyonların bir spektrumu. Karsinogenez 19, 69–72. doi: 10.1093/carcin/19.1.690
- [4] Auerbach, C, Genetic And Cytogenetical Effects Of Formaldehyde And Related Compounds, *Mutation Research* 39: 317 (1977)
- [5] Akasaka S, Yamamoto K (1991) Construction of Escherichia coli K12 phr deletion and insertion mutants by gene replacement. Mutat Res 254:27–35
- [6] Auroma OI, Halliwell B, Gajewski E, Dizadaroğlu M (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. J Biol Chem 264:20509–20512
- [7] Sandra Lassalle 1, Véronique Hofman, Ilie Marius, Virginie Gavric-Tanga, Patrick Brest, Katia Havet, Catherine Butori, Eric Selva, José Santini, Baharia Mograbi, Paul Hofman (2009) Assessment of morphology, antigenicity, and nucleic acid integrity for diagnostic thyroid pathology using formalin substitute fixatives, Nov;19(11):1239-48. doi: 10.1089/thy.2009.0095.