

İkili İskelet Boyamasında Mikrodalga Işınımının Kullanılması*

Fatma Bahar SUNAY*, Semiha ERSOY**, Zeynep KAHVECİ**

* Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.

** Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Görükle, Bursa.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, teratoloji araştırmalarında sık kullanılan ikili iskelet boyaması yöntemlerinden birisi olan Inouye'un metodunda 48-72 saat olarak belirtilmiş olan boyama aşamasını mikrodalga ışınımından yararlanarak kısaltmaktır. 24 adet bir günlük Swiss albino cinsi fare iki gruba (mikrodalga grubu ve kontrol grubu) ayrıldı. Mikrodalga grubunda yer alan deneklerin iskelet boyaması mikrodalga fırında, 40.47 ± 4.8 °C'de, 8 saat süreyle yapılırken kontrol grubundaki deneklerin iskelet boyaması Inouye'un metodunda belirtildiği gibi etüvde, 37 °C'de, 72 saat süreyle yapıldı. Deneklerin boyanma kalitesi incelendiğinde gruplar arasında önemli farklılık gözlenmedi. Böylece Inouye'un metodunda 72 saat olan iskelet boyaması süresi, mikrodalga ışınımı kullanıldığında, boyanmanın kalitesinde azalmaya neden olmadan, 8 saate indirildi. İkili iskelet boyamalarında, işlemin süresini kısaltmak için, mikrodalga ışınımından yararlanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Mikrodalga. Kıkırdak. Kemik. İskelet. Teratoloji.

Double Skeletal Staining With Microwave Irradiation

ABSTRACT

The aim of this study is to shorten the 48-72 hours lasting (48-72 hours-lasting) staining period of the most frequently used double skeletal staining method, Inouye's method, by microwave irradiation. 24 one-day-old Swiss albino mice were separated into two groups (microwave group and control group). Cases in the microwave group were stained by microwave oven at 40.47 ± 4.8 °C for 8 hours and cases in the control group were stained by conventional heating at 37 °C for 72 hours, as described by Inouye. When the staining quality of the cases compared no significant difference was found between groups. By the use of microwave irradiation, the duration of staining procedure, which originally was 72 hours, has been reduced to 8 hours without causing any reduction in the quality of staining. It is concluded that microwave irradiation can be used to decrease the time required for double skeletal staining.

Key Words: Microwave. Cartilage. Bone. Skeleton. Teratology.

Geliş Tarihi: 17.07.2009

Kabul Tarihi: 30.10.2009

* Bu çalışma 28 - 31 Ağustos 2000 tarihlerinde gerçekleştirilen V.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde ve 7 - 10 Eylül 2005 tarihlerinde gerçekleştirilen 4. Uluslararası Asya-Pasifik Anatomistler Kongresinde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Dr. F. Bahar SUNAY
Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Çağış Kampüsü, BALIKESİR
Tel: 0 266 6121454
GSM: 0 505 6634287
0 532 7494336
e-mail: sunay@balikesir.edu.tr

Endüstriyel ve farmakolojik ajanların teratojenik etkilerinin incelenmesinin vazgeçilmez aşamalarından birisi de iskelet sisteminde oluşturdukları malformasyonların belirlenmesidir. Bu amaç için en sık kullanılan yöntem iskelet boyaması yöntemidir^{1,2}.

İskelet sistemi üzerindeki teratojenik etkilerin araştırıldığı ilk çalışmalarda kullanılan iskelet boyaması yöntemleri Alizarin red-S ile kemik dokusunun boyandığı yöntemlerdir^{3,4}. Ancak, termdeki deney hayvanı fetuslarının iskeletinin önemli bir bölümünün kıkırdaktan oluşması nedeniyle, kemiğin tek başına boyanması ile elde edilecek sonuçların güvenilir olmayacağı ve kıkırdakta oluşan anomalilerin gözden kaçacağı anlaşıldıktan sonra iskeletin hem kıkırdak hem de kemik bölümlerinin boyanmasını sağlayan yeni yöntemler geliştirilmiştir⁵⁻⁸. Günümüzde, ikili

iskelet boyamasında sık kullanılan ve son derece güvenilir sonuçlar veren yöntemlerden birisi de iskeletin kemik kısımlarının Alizarin red-S ile kıkırdak kısımlarının ise Alcian blue ile boyandığı Inouye'un metodu-⁹.

Teratoloji çalışmalarının sonuçlarının objektif olmasında, yeterli ve güvenilir bir ikili iskelet boyama yönteminin kullanılmasının yanı sıra, denek sayısının mümkün olduğunca fazla olması da son derece önemlidir. Bu noktada, mevcut boyama yöntemlerinin uzun sürede tamamlanıyor olması kullanımına kısıtlılık getirmekte ve boyama yöntemlerinin daha kısa zamanda tamamlanmasını amaçlayan araştırmalara önem kazandırmaktadır. Literatür incelendiğinde, işlem süresini kısaltmak için fiksasyon aşamasının atlanmasının¹⁰⁻¹², maserasyon aşamasında yüksek konsantrasyonlarda KOH kullanılmasının^{10,12,13} ve ısının kimyasal reaksiyonları hızlandırıcı etkisinden yararlanmak amacıyla iskelet boyamasının çeşitli aşamalarının oda ısısı yerine inkübatörde gerçekleştirilmesinin^{9,14,15} denendiği ve başarılı sonuçların alındığı görülmektedir.

Histopatoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilen çeşitli işlemlerin kısaltılmasında kullanılan bir diğer ısı kaynağı da mikrodalga fırınlarıdır. Mikrodalga ışınımı; ışık ve elektron mikroskopik fiksasyon¹⁶⁻²⁰, doku takibi²¹⁻²³, boyama²⁴⁻³⁴, dekalsifikasyon³⁵⁻³⁸, histokimya ve immünohistokimya³⁹⁻⁴⁴, in situ hibridizasyon^{45,46} ve antijen retriveli⁴⁷⁻⁵⁰ gibi pek çok işlemde kullanılmıştır ve işlem sürelerini konvansiyonel ısı kaynaklarından daha fazla oranlarda kısalttığı görülmüştür.

Bu çalışmanın amacı, teratoloji araştırmalarında sık kullanılan ikili iskelet boyama yöntemlerinden birisi olan Inouye'un metodunda⁹ 48-72 saat olarak belirtilen boyama aşamasını mikrodalga ışınımından yararlanarak kısaltmaktır.

Gereç ve Yöntem

Bir günlük 24 adet Swiss albino türü fare eter inhalasyonu ile öldürüldükten sonra evissere edildi ve derileri soyuldu. Deneklerin her biri, %95'lik etanolde 4 gün süreyle fikse edildi ve yağ dokusunun uzaklaştırılması amacıyla, 24 saat absolu asetonda bekletildi.

Alcian blue 8GX (C.I. 74240, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA.) ile %70'lik etanolde %0,3'lük (gr/ml) Alcian blue stok solüsyonu ve Alizarin red-S (C.I. 58005, BDH Chemicals Ltd., Poole, England.) ile %95'lik etanolde %0,1'lik (gr/ml) Alizarin red-S stok solüsyonu hazırlandı. Boyama solüsyonu, 1 hacim Alcian blue stok solüsyonu, 1 hacim Alizarin red-S stok solüsyonu, 17 hacim %70'lik etanol ve 1 hacim glacial acetic asit kullanılarak hazırlandı.

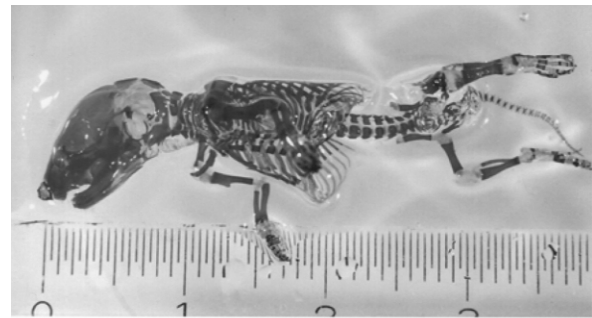
İskelet boyamasına başlamadan önce denekler her bir grupta 12 hayvanın bulunduğu 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubunda yer alan denekler, Inouye'un⁹ metodunda tarif edildiği şekilde, 37 °C'deki etüvde 72 saat boyandı. Mikrodalga grubunda yer alan deneklerin iskelet boyaması ise, frekansı 2450 MHz, maksimum çıkış gücü 900 W, magnetron ısınma süresi 4 sn, magnetron siklus süresi 25 sn olan gaz ekstraksiyon ve seramik thermocouple sıcaklık probuna (PT100) sahip Bosch HMT 882G marka modifiye mikrodalga fırında gerçekleştirildi. Mikrodalga ışınımına dayanıklı cam şale içine boya solüsyonu ve denekler konuldu. Şale fırının hot spot noktasına yerleştirildi. 250 ml'lik beher içinde 100 ml distile su water load olarak kullanıldı ve beher fırının sağ orta kısmına yerleştirildi. Fırının maksimum gücü (900 W) 20 saniye çalıştırılmasıyla boya solüsyonunun sıcaklığı 40 °C'ye yükseltildi. Daha sonra boyanın sıcaklığı 36 °C'ye düşene kadar ışınlamaya ara verildi. Boyama işlemine, ışınlama ve ara vermelerin tekrarlanması ile boya solüsyonunun ısısı 36-48 °C arasında tutularak, 8 saat devam edildi.

Boyama işleminin tamamlanmasının ardından tüm deneklerin maserasyonu ve saydamlaştırılması, Inouye'un metodunda⁹ tarif edildiği şekilde yapıldı. Denekler makro (1:4 1000 mm) objektif takılı Pentax marka gövdeyle, negadoskop üzerinde reproduksiyon aletiyle ve Nikon FX-35W gövde takılı Nikon SMZ-2T Stereoskopik Mikroskop ile fotoğraflandı.

Bulgular ve Sonuçlar

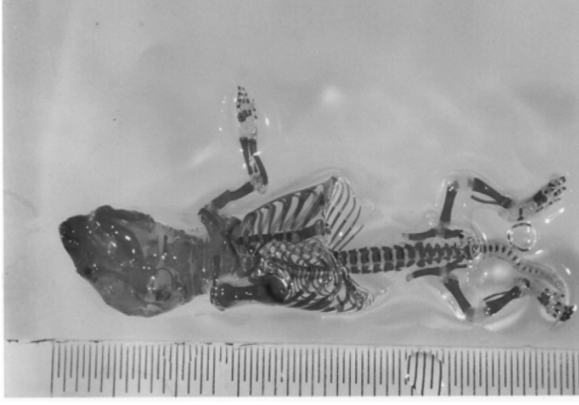
Kontrol grubunda yer alan fareler konvansiyonel etüvde, 37 °C'de, 72 saat, mikrodalga grubunda yer alan fareler ise mikrodalga fırında, 40.47±4.8 °C'de, 8 saat boyandılar.

Her iki grupta yer alan deneklerin iskeletlerinin hem kemik kısımlarının hem de kıkırdak kısımlarının eşit kalitede boyandığı gözlemlendi. Bu boyanma, her iki grupta da, iskelette bulunabilecek malformasyonların belirlenmesinde yeterli olacak düzeylerdeydi (Şekil 1-6).

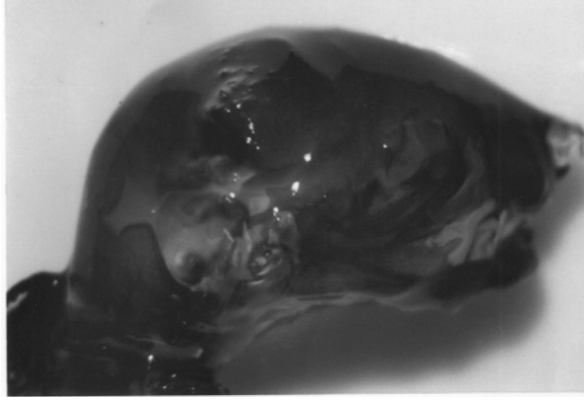


Şekil-1:
Kontrol grubuna ait bir deneğin genel görünümü

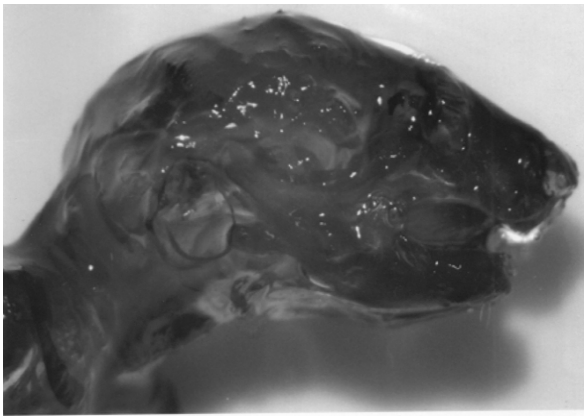
İkili İskelet Boyamasında Mikrodalga Kullanımı



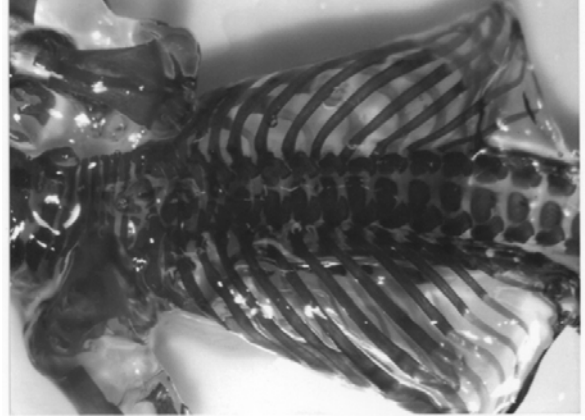
Şekil-2:
Mikrodalga grubuna ait bir deneğin genel görünümü



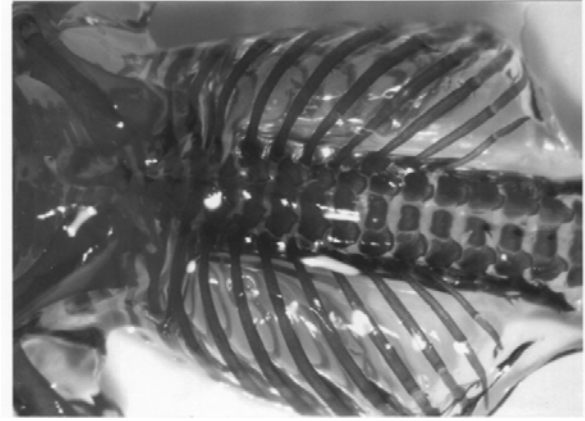
Şekil-3:
Kontrol grubuna ait bir deneğin kafatasının boyanmasını gösteren fotomikrograf.



Şekil-4:
Mikrodalga grubuna ait bir deneğin kafatasının boyanmasını gösteren fotomikrograf.



Şekil-5:
Kontrol grubuna ait bir deneğin torakal vertebralarının boyanmasını gösteren fotomikrograf.



Şekil-6:
Mikrodalga grubuna ait bir deneğin torakal vertebralarının boyanmasını gösteren fotomikrograf.

Tartışma

İskelet sistemindeki malformasyonların incelenmesi, hem deneysel teratolojik çalışmaların hem de piyasaya yeni sürülecek olan endüstriyel ya da farmakolojik ajanların zararlı etkilerinin incelendiği çalışmaların zorunlu aşamalarından birisidir. Her ne kadar, son yıllarda iskelet sisteminin incelenmesinde kullanılacak yeni teknikler önerilmişse de⁵¹⁻⁵⁴, bu amaç için hala en sık tercih edilen yöntem iskelet boyamasıdır.

İskelet boyaması yöntemlerinin en önemli dezavantajlarından birisi uzun zamanda tamamlanıyor olmalarıdır. Teratoloji çalışmalarında güvenilir sonuçların alınabilmesi için çok sayıda deneğin kullanılmasının gerekliliği metodun bu olumsuz yanını daha da önemli kılmaktadır. Bu çalışmada ikili iskelet boyaması metodlarından birisi olan Inouye'un metodu⁹ mikrodalga

ışınımından yararlanılarak daha kısa zamanda tamamlandı.

Çalışmada, yayınlanmış farklı iskelet boyaması yöntemleri içerisinde Inouye'un metodunun seçilmiş olmasının iki önemli nedeni vardır. Bunlardan ilki Inouye'un metodunun bir ikili iskelet boyaması metodu olması, yani bu metot ile iskeletin sadece kemik kısımlarının değil kıkırdak kısımlarının da boyanıyor olmasıdır. Inouye'un metodunda iskeletin kıkırdak bölümlerinin de boyanıyor olması önemlidir çünkü yapılan çalışmalar, teratolojik çalışmalarda sık kullanılan deney hayvanlarının iskeletinin önemli bir bölümünün kıkırdak olduğunu ve bu nedenle de sadece kemik kısımların boyanması durumunda kıkırdakta oluşan malformasyonların gözden kaçtığını ortaya koymuştur.^{5,9,55-59} Inouye'un metodunun tercih edilmesinin ikinci nedeni ise metodun tek aşamalı bir metot olmasıdır. İskeletin önce kıkırdak bölümlerinin, daha sonra kemik bölümlerinin boyandığı iki aşamalı metotlardan^{6-8,60-61} farklı olarak Inouye'un metodunda⁹ hem kemik hem de kıkırdak kısımlar aynı anda içerisinde hem Alcian blue'nun hem de Alizarin red-S'in bulunduğu boya solüsyonu ile boyanır. Bu da yöntemin hem daha pratik olmasını hem de daha kısa sürede tamamlanmasını sağlar.

Inouye'un metodunun literatürde yayınlanmış en kısa metot olmaması bu metodun seçilmesi ile ilgili olarak belirtilmesi gereken bir diğer konudur ve bu çalışmada Inouye'un metodunun tercih edilmesinin eleştirilmesine neden olabilir. Bugüne kadar rodentlerin iskelet sistemlerinin boyanmasına yönelik yayınlanmış metotlar arasında, en kısa boyama süresine sahip olan metot Kimmel ve Trammell¹¹ tarafından yayınlanan metottur. Ancak yapılan ön çalışmalarda Kimmel ve Trammell'in¹¹ metodu ile boyanan örneklerde kemik ve kıkırdak boyanmalarının yetersiz olduğu ve maserasyon ile saydamlaştırmanın tam olmadığı görüldüğü için çalışmada Inouye'un metodunun kullanılmasına karar verildi.

Literatür incelendiğinde, iskelet boyamalarının daha ilk yıllarında bile işlem süresini kısaltmaya yönelik araştırmaların planlandığı görülmektedir. Bu amaçla yapılması düşünülen ilk değişiklikler fiksasyon aşamasının atlanması ve maserasyon aşamasında yüksek konsantrasyonlarda KOH kullanılması olmuştur.

True¹⁰ hem fiksasyon aşamasını atlayarak hem de %5-10 gibi yüksek konsantrasyonlarda KOH kullanarak maserasyon işlemi hızlandırmayı denemiştir. Aynı araştırmacı tarafından önerilen bir diğer yenilik de maserasyon sıvısına, dokuları ağartıcı ajan olarak, hidrojen peroksitin (H₂O₂) eklenmesidir.

Jensh ve Brent¹³ ise KOH konsantrasyonları, maserasyon süreleri ve asetonda bekleme süreleri birbirinden farklı olan gruplarla yaptıkları çalışmalarının sonucunda iki farklı metot önermişlerdir. Bunlardan ilki 9 günde tamamlanan hızlı metottur. Araştırmacılar bu prosedür ile boyanan preparatların iyi say-

damlaşmadığını, ancak zamanın son derece önemli olduğu ve detaysız incelemelerin amaçlandığı çalışmalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Önerdikleri ikinci metot ise detaylı incelemenin amaçlandığı çalışmalar için uygundur ve 14 günde tamamlanmaktadır.

Selby¹² erişkin farelerde yaptığı çalışmasında hızlı ve kaliteli bir kemik boyaması metodu geliştirebilmek için; örneklerin fikse edilmediği, maserasyon aşamasında KOH'in farklı konsantrasyonlarının denendiği, daha iyi ve hızlı saydamlaştırma için gliserin, benzil alkol, etanol ve su karışımının kullanıldığı metotlar denemiştir ve çalışmalarının sonucunda iki farklı yöntem önermiştir. Bunlardan ilki kısa olan 3 günlük kemik boyaması metodudur. Araştırmacı bu metodun tek dezavantajının elde edilen örneklerin daha kırılabilir olması olduğunu bildirmiştir ve bu nedenle de zamanın uygun olması durumunda 11-14 gün süren ikinci prosedürün tercih edilmesini önermiştir.

Hem kemiğin hem de kıkırdakın boyandığı ilk hızlı boyama metodu ise Kimmel ve Trammell¹¹ tarafından 1981'de yayınlanmıştır. Kimmel ve Trammell de fikse edilmemiş fetuslar kullanmışlar ve boyama işlemini 39 saatte tamamlamışlardır.

Boyanmanın daha kısa zamanda tamamlanması için düşünülen bir diğer yol ısının kimyasal reaksiyonları hızlandırıcı etkisinden yararlanmak olmuştur ve bu amaçla iskelet boyamasının etüvde gerçekleştirildiği araştırmalar planlanmıştır. Hood ve Neill¹⁴ maserasyon ve saydamlaştırma aşamasında, Sedra¹⁵ ise hem maserasyon hem de boyama aşamalarında konvansiyonel etüvden yararlanmışlardır. Hood ve Neill'in çalışmasında maserasyon ve saydamlaştırma aşaması daha önce yayınlanmış metotlar ile karşılaştırıldığında kısaldı, Sedra aynı sonucu elde edemiştir. Bu durumun sebebi, büyük olasılıkla, önceki çalışmalarda kullanılan fiksatifin etanol olması ve buna karşılık Sedra'nın kullandığı fiksatifin maserasyon işlemini geciktirici etkiye sahip olduğu bilinen %10'luk formalin olmasıdır. Bu iki çalışma da sadece kemiğin boyandığı çalışmalardır. Inouye'un metodu ise boyama aşamasında ısının kullanıldığı ilk ikili iskelet boyaması metodudur.

Histopatoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilen çok sayıda işlemin süresini kısaltmada kullanılan bir diğer ısı kaynağı da mikrodalga fırındır. Mikrodalga ile ısıtma konvansiyonel ısıtmadan daha üstündür çünkü konvansiyonel ısıtma metotları dıştan ısıtmaya başlar. Mikrodalga ile ısıtma ise bir materyalin iç kısımlarının ısıtılmasında son derece etkilidir ve ısıtılan bu materyal doku gibi işlem sırasında karıştırılması mümkün olmayan bir materyal ise bu önemli bir avantajdır.⁶² Bu avantaj sayesinde histopatoloji laboratuvarlarında kullanılan pek çok yöntemin, işlem kalitesinde azalma görülmeksizin, daha kısa zamanda tamamlandığını bildiren çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Biz çalışmamızda ikili iskelet boyaması metotlarından biri olan Inouye metodunun boyama aşamasını kısaltmak için

İkili İskelet Boyamasında Mikrodalga Kullanımı

ısı kaynağı olarak mikrodalga ışınımını kullandık. Her ne kadar literatürde bütün bir fetusun mikrodalga ışınımı ile kısa sürede başarılı olarak fikse edildiği çalışmalara^{16, 17} rastladıkça da çalışmamızda fiksasyon aşamasını mikrodalgada gerçekleştirmeyi düşünmedik. Çünkü sözü edilen araştırmalarda kullanılan fiksatif %10'luk tamponlu nötral formalindi. Oysaki Inouye'un metodunda kullanılan fiksatif %95'lik etanoldür ve konsantrasyonu %50'nin üzerinde olan alkollerin mikrodalga fırınlarında kullanılması güvenli değildir⁶³. Sonuç olarak yöntemimiz, 72 saat olan boyama aşamasını, mikrodalga ışınımının kullanılması ile 8 saate indirdi ve boyanmanın kalitesinde herhangi bir azalmaya neden olmadı.

Sonuç olarak; sahip olduğu tüm kısıtlılıklara ve son yıllarda önerilen yeni metotlara rağmen, gelişimsel teratoloji çalışmalarında fetusların iskelet anomalilerinin incelenmesi için iskelet boyamalarının, tercihen de ikili iskelet boyamalarının yapılması gereklidir. Bu nedenle ikili iskelet boyaması tekniklerinin kısıtlılıklarını ortadan kaldıracak her türlü yöntem son derece değerlidir. Bizim çalışmamız, boyanma kalitesinde bozulmaya neden olmaksızın, boyama işleminin süresinin kısaltılmasını sağlayarak tekniğin önemli bir dezavantajının, uzun sürede tamamlanıyor olmasının, giderilmesine katkıda bulunmuştur. Bu nedenle elde ettiğimiz sonucun önemli olduğu düşüncesindeyiz. Bununla beraber, sadece boyama aşamasının kısaltılmasının tek başına yeterli olmadığı görüşündeyiz ve fiksasyon, maserasyon ve saydamlaştırma aşamalarının da mikrodalga ışınımından yararlanılarak kısaltılmasını sağlayacak yeni çalışmaların faydalı olacağına inanıyoruz.

Kaynaklar

1. Claudio L, Bearer CF, Wallinga D. Assessment of the U.S. environmental protection agency methods for identification of hazards to developing organisms, Part II: The developmental toxicity testing guideline. *Am J Ind Med* 1999; 35: 554-63.
2. Sunay FB. İkili iskelet boyamaları. *Uludağ Üniv Tıp Fak Derg* 2005; 31: 119-26.
3. Dawson AB. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin red-S. *Stain Technol* 1926; 1: 123-4.
4. Lipman H. Staining the skeleton of cleared embryos with alizarin red-S. *Stain Technol* 1935; 10: 61-3.
5. Kimmel CA, Laborde JB, Trammell CT. Evaluation of cartilage and bone formation in fetal skeletons following prenatal insult reveals abnormalities not apparent in Alizarin stained specimens. *Teratology* 1982; 25: 54A-55A.
6. Williams TW. Alizarin red-S and toluidine blue for differentiating adult or embryonic bone and cartilage. *Stain Technol* 1941; 16: 23-5.
7. Burdi A. Toluidine blue Alizarin red-S staining of cartilage and bone in whole-mount skeletons in vitro. *Stain Technol* 1965; 40: 45-8.
8. Burdi AR, Flecker K. Differential staining of cartilage and bone in the intact chick embryonic skeleton in Vitro. *Stain Technol* 1968; 43: 47-8.
9. Inouye M. Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by Alcian blue and Alizarin red S. *Cong Anom* 1976; 16: 171-3.
10. True RM. Staining of embryonic and small mammalian skeletal systems. *Stain Technol* 1947; 22: 107-8.
11. Kimmel CA, Trammell C. A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Technol* 1981; 56: 271-3.
12. Selby PB. A rapid method for preparing high quality alizarin stained skeletons of adult mice. *Stain Technol* 1987; 62: 143-6.
13. Jensch RP, Brent RL. Rapid schedules for KOH clearing and alizarin red S staining of fetal rat bone. *Stain Technol* 1966; 41: 179-83.
14. Hood RC, Neill WM. A modification of alizarin red-S technique for demonstrating bone formation. *Stain Technol* 1948; 23: 209-18.
15. Sedra S. Decreasing the time required for making an alizarin stained preparation. *Stain Technol* 1950; 25: 223-4.
16. Petrere JA, Schardein JL. Microwave fixation of fetal specimens. *Stain Technol* 1977; 52: 113-4.
17. Kahveci Z, Çavuşoğlu İ, Sırmalı ŞA. Microwave fixation of whole fetal specimens. *Biotech Histochem* 1997; 72: 144-7.
18. Mayers CP. Histological fixation by microwave heating. *J Clin Pathol* 1970; 23: 273-5.
19. Hopwood D, Coghill G, Ramsay J, Milne G, Kerr M. Microwave fixation: it's potential for routine techniques, histochemistry, immuno-cytochemistry and electron microscopy. *Histochem J* 1984; 16: 1171-91.
20. Wild P, Krähenbühl M, Schraner EM. Potency of microwave irradiation during fixation for electron microscopy. *Histochemistry* 1989; 91: 213-220.
21. Leong AS-Y. Microwave irradiation in histopathology. *Pathol Annu* 1988; 23: 211-34.
22. Leong AS-Y. Microwave techniques for diagnostic laboratories. *Scanning* 1993; 15: 88-98.
23. Leong AS-Y. A review of microwave techniques for diagnostic pathology. *MSA Bulletin* 1993; 23: 253-63.
24. Temel SG, Noyan S, Cavusoglu I, Kahveci Z. A simple and rapid microwave-assisted hematoxylin and eosin staining method using 1, 1, 1 trichloroethane as a dewaxing and a clearing agent. *Biotech Histochem* 2005; 80: 123-32.
25. Leong AS-Y. Microwave techniques for tissue fixation, processing and staining. *EMSA Bulletin* 1990; 20: 61-5.
26. Esterada JC, Brinn NT, Bossen EH. A rapid method of staining ultrathin sections for surgical pathology TEM with the use of the microwave-oven. *Am J Clin Pathol* 1985; 83: 639-41.
27. Küpelioglu AA, Gökden N, Gökden M, Özen E. Mikrodalga ışınlarının parafin kesitlerin boyanmasına etkisi. *Türk Patoloji Derg* 1989; 5: 7-11.
28. Feirabend HKP, Ploeger S. Microwave applications in classical staining methods in formalin-fixed human brain tissue: a comparison between heating with microwave and conventional ovens. *Eur J Morphol* 1991; 29: 185-97.
29. Cavusoglu I, Kahveci Z, Sırmalı SA. Rapid staining of ultrathin sections with the use of microwave oven. *J. Microsc* 1998; 192: 211-16.
30. Minbay FZ, Kahveci Z, Cavusoglu I. Rapid Bielschowsky silver impregnation method using microwave heating. *Biotech Histochem* 2001; 76: 233-37.
31. Noyan S, Kahveci Z, Cavusoglu I, Minbay FZ, Sunay FB, Sırmalı SA. Effects of microwave irradiation and chemical fixation on the localization of perisinusoidal cells in rat liver by gold impregnation. *J. Microsc* 2000; 197: 101-6.

32. Avci B, Kahveci N, Kahveci Z, Sirmali SA. Using microwave irradiation in Marchi's method for demonstrating degenerated myelin. *Biotech Histochem* 2006; 81: 63-9.
33. Feirabend HKP, Ploeger S, Kok P, Choufoer H. Does microwave irradiation has other than thermal effects on histological staining of the mammalian CNS? *Eur J Morphol* 1992; 30: 312-27.
34. Boon ME, Marres EM, Hoogveen MM, Goedbloed AF, Milios J. Visualization of vaginal flora in cervical smears using a modified microwave silver-staining method. *Histochem* 1998; 30: 75-80.
35. Vongsavan N, Matthews B, Harrison GK. Decalcification of teeth in a microwave oven. *Histochem J* 1990; 22: 377-80.
36. Roncaroli F, Mussa B, Bussolati G. Microwave oven for improved tissue fixation and decalcification. *Pathologica* 1991; 83: 307-10.
37. Faria MR, Denhichi P, Rodes DEM. Decalcification of mineralized rat mandible tissues with the aid of microwaves. *Rev Paul Med* 1992; 110: 283-84.
38. Doğan Ö, Bilgiç L, Demiryont M, Acunaş G. Kemik dokusunun dekalsifikasyonunda mikrodalga ışınlama yöntemi. *Türk Patoloji Derg* 1992; 8: 7-10.
39. Boon ME, Kok LP. Microwaves for immunohistochemistry. *Micron* 1994; 25: 151-70.
40. Zondervan PE, De Jong A, Sorber CWJ, Kok LP, De Bruijn WC, Van Der Kwast, Th H. Microwave-stimulated incubation in immunoelectron microscopy: A quantitative study. *Histochem J* 1988; 20: 359-64.
41. Van Dort JB, De Bruijn WC, Schneijdenberg TWM, Boon ME, Kok LP. Preservation of structure and cytochemical reactivity at the ultrastructural level, using microwave irradiation. *Histochem J* 1988; 20: 365-72.
42. Yasuda K, Yamashita S, Shiozawa M. An experimental study on the application of microwave fixation to immunohistochemical studies. *Acta Histochem Cytoc* 1989; 22: 91-103.
43. Leong AS-Y, Millios J. Accelerated immunohistochemical staining by microwaves. *J Pathol* 1990; 161: 327-34.
44. Vitarelli E, Sippelli G, Tuccari G, Barresi G. The use of microwave irradiation for immunohistochemistry: A new methodological proposal. *Histol Histopathol* 1995; 10: 35-8.
45. Coates PJ, Hall PA, Butler MG, D'ardenne AJ. Rapid technique of DNA-DNA in situ hybridisation on formalin fixed tissue sections using microwave irradiation. *J Clin Pathol* 1987; 40: 865-9.
46. Sugimura H. Detection of chromosome changes in pathology archives: an application of microwave-assisted fluorescence *in situ* hybridization to human carcinogenesis studies. *Carcinogenesis* 2008; 29: 681-7.
47. Temel SG, Minbay FZ, Kahveci Z, Jennes L. Microwave-assisted antigen retrieval and incubation with cox-2 antibody of archival paraffin-embedded human oligodendroglioma and astrocytomas. *J Neurosci Methods* 2006; 156:154-60.
48. Marani E. Microwave-antigen retrieval: The importance of pH of retrieval solution for MIB-1 staining. *Eur J Morphol* 1996; 34: 375-9.
49. Taylor CR, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C, Cote RJ. Comparative study of antigen retrieval heating methods: Microwave, Microwave and pressure cooker, autoclave and steamer. *Biotech Histochem* 1996; 71: 263-70.
50. Evke E, Minbay FZ, Temel SG, Kahveci Z. Immunohistochemical detection of p53 protein in basal cell skin cancer after microwave-assisted antigen retrieval. *J Mol Histol* 2009; 40: 13-21.
51. Burdan F, Rozylo-Kalinowska I, Katarzyna Rozylo T, Chahoud I. A new rapid radiological procedure for routine teratological use in bone ossification assessment: a supplement for staining methods. *Teratology* 2002; 66: 315-25.
52. Rozylo-Kalinowska I, Michalska A, Burdan F. Optimization of analysis of the skeletal ossification of laboratory animals by means of digital radiography software options. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska* 2002; 57: 106-12.
53. Augustine-Rauch K. Alternative experimental approaches for interpreting skeletal findings in safety studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; 80: 497-504.
54. Beckmann N, Kneuer R, Gremlich HU, Quintana HK, Ble FX, Müller M. In vivo mouse imaging and spectroscopy in drug discovery. *NMR Biomed* 2007; 20: 154-85.
55. Kelly WL, Bryden MM. A modified stain for cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuses and small vertebrates. *Stain Technol* 1983; 58: 131-4.
56. Ojeda JL, Barbosa E, Bosque PG. Selective skeletal staining in whole chicken embryos; A rapid alcian blue technique. *Stain Technol* 1970; 45: 137-9.
57. Trueman D, Jackson SW, Trueman B. An automated technique for double staining rat and rabbit fetal skeletal specimens to differentiate bone and cartilage. *Biotech Histochem* 1999; 74: 98-104.
58. Burdan F, Szumilo J, Dudka J, Klepacz R, Blaszcak M, Solecki M, Korobowicz A, Chalas A, Klepacki J, Palczak M, Zuchnik-Wrona A, Hadala-Kis A, Urbanowicz Z, Wojtowicz Z. Morphological studies in modern teratological investigations. *Folia Morphol* 2005; 64: 1-8.
59. Menegola E, Broccia ML, Di Renzo F, Giavini E. Comparative study of sodium valproate-induced skeletal malformations using single or double staining methods. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 15-23.
60. Wassersug RJ. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin fixed vertebrates. *Stain Technol* 1976; 51: 131-4.
61. Dingerkus G, Uhler LD. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technol* 1977; 52: 229-32.
62. Login GR, Dvorak AM. Microwave fixation provides excellent preservation of tissue, cells and antigens for light and electron microscopy. *Histochem J* 1988; 20: 373-87.
63. Login GR, Dvorak AM. Safety first. In: Login GR, Dvorak AM (eds). *The Microwave Tool Book*. 1st edition. Boston: Beth Israel Corporation; 1994. 17-28.