

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN THIẾU MÁU LẠNH LÊN SỰ BIỂU HIỆN CỦA CÁC DẤU ẤN ER, PR VÀ HER-2 TRONG UNG THƯ VÚ BẰNG KỸ THUẬT NHUỘM HÓA MÔ MIỄN DỊCH

Đoàn Thị Phương Thảo¹, Hà Phạm Yên Vy¹,
Luu Đức Tùng², Dương Ngọc Thiên Hương¹

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Khi liệu pháp nội tiết hỗ trợ ngày càng được quan tâm, kết quả hoá mô miễn dịch đáng tin cậy góp phần mở rộng tỷ lệ bệnh nhân ung thư vú được điều trị an toàn mà không cần hoá trị liệu. Thời gian thiếu máu lạnh là một trong những yếu tố có tác động nhất định đến kết quả hoá mô miễn dịch, dẫn đến chẩn đoán và điều trị không phù hợp cho bệnh nhân.

Mục tiêu: Khảo sát sự ảnh hưởng của các mốc thời gian thiếu máu lạnh lên sự biểu hiện của các dấu ấn ER, PR và Her-2.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu thăm dò, chọn mẫu có chủ đích các mẫu mô ung thư vú thỏa điều kiện từ tháng 02/2022 đến tháng 08/2022. Các mẫu mô được cắt nhỏ và cho vào dung dịch formalin đậm trung tính 10% ở từng mốc thời gian từ < 1 giờ đến 8 giờ. Sau đó các mẫu được ngâm trong formalin từ 8 đến 32 giờ, tiến hành xử lý, cắt mỏng, nhuộm với kháng thể ER, PR và Her-2 nhằm đánh giá sự thay đổi kết quả biểu hiện trên các mẫu mô sau thời gian trì hoãn cố định.

Kết quả: Dựa trên kết quả đánh giá 65 lát cắt mô cho thấy cường độ bắt màu của ER, PR suy giảm, tỷ lệ nhân tế bào thoái hoá của ER, PR gia tăng, tương quan mạnh với thời gian trì hoãn cố định (với $|r| > 0,5$) và các mối tương quan này có ý nghĩa thống kê (với $p < 0,05$). Giá trị về cường độ bắt màu của Her-2 ở các trường hợp 3+/2+ hoàn toàn không thay đổi tại các thời điểm trì hoãn cố định. Các giá trị còn lại về tỷ lệ bắt màu của ER, PR, Her-2 và tỷ lệ màng tế bào vỡ/giới hạn không rõ của Her-2 có sự thay đổi nhưng không đáng kể, không có ý nghĩa thống kê với thời gian trì hoãn cố định mẫu.

Kết luận: Thời gian thiếu máu lạnh kéo dài làm suy giảm cường độ bắt màu của ER, PR và gia tăng tỷ lệ nhân tế bào thoái hoá của ER, PR. Cường độ bắt màu của Her-2 ở các trường hợp 3+/2+ hoàn toàn không thay đổi tại các thời điểm trì hoãn cố định khác nhau.

Từ khóa: thiếu máu lạnh, kỹ thuật hóa mô miễn dịch, thụ thể Estrogen (ER), thụ thể PR (thụ thể progesterone), thụ thể Human epidermal growth factor receptor-2 (Her-2).

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFECT OF COLD ISCHEMIA TIME ON ER, PR AND HER-2 EXPRESSIONS IN BREAST CANCER BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Background: When hormone therapies are progressively drawing much attention to breast cancer treatment, reliable immunohistochemical

¹Khoa Giải phẫu bệnh, Bệnh viện Đại học Y Dược TPHCM

²Bộ môn Mô phôi – Giải phẫu bệnh, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Hà Phạm Yên Vy

Email: vy.hpy@umc.edu.vn

Ngày nhận bài: 22.10.2022

Ngày phản biện khoa học: 08.10.2022

Ngày duyệt bài: 24.10.2022

results contribute to the increasing proportion of patients who are safely treated without chemotherapy. Cold ischemia time is one of the crucial factors, which can alter immunohistochemical results leading to inappropriate diagnosis and treatment for patients.

Objectives: Evaluate the effect of cold ischemia time periods on ER, PR and Her-2 expressions.

Subjects and Methods: Exploratory research, purposeful sampling qualified breast cancer tissues from February 2022 to August 2022. The tissue is dissected into small samples and exposed to 10% neutral buffered formalin (NBF) at various delayed fixation time from < 1 hour to 8 hours. After being immersed in NBF for a period between 8 and 32 hours, the samples are processed, microtomed, and stained with ER, PR and Her-2 antibodies to evaluate the alteration in expression of these biomarkers.

Results: Based on the evaluation of 65 tissue specimens, the intensity of both ER and PR staining decreased and the percentage of degenerative nuclei increased in cells with ER, PR expression. This strongly related to delay fixation time (with $|r| > 0,5$) and these correlations are statistically significant (with $p < 0.05$). The value of the intensity of Her-2 staining is completely unchanged at various delay fixation times. The values of the percentage of cells stained with ER, PR, Her-2 and the ratio of broken cell membrane to unknown limit of Her-2 have changed insignificantly and instatistically with each period of delay fixation time.

Conclusions: Prolonged cold ischemia time decreased the intensity of both ER and PR staining and increased the percentage of degenerative nuclei in cells with ER, PR expression. The intensity of stained cells of Her-

2 in the cases of 3+/2+ is completely unchanged at different delay fixation times.

Keywords: cold ischemia time, immunohistochemistry, estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (Her-2).

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hoá mô miễn dịch (HMMD) là một kỹ thuật phổ biến nhất hiện nay đối với bệnh ung thư vú (UTV) [8]. Tiêu chuẩn vàng để kiểm tra các dấu ấn sinh học ở vú là thực hiện kỹ thuật HMMD trên mẫu cố định trong Formalin, vùi trong paraffin (FFPE) [1], tuy nhiên, sự biến đổi của một số yếu tố trong quá trình xử lý mô có thể làm thay đổi kết quả của xét nghiệm này [6]. Mặc dù có rất nhiều khả năng ảnh hưởng đến chất lượng mô, nghiên cứu gần đây cho thấy thời gian thiếu máu lạnh (được định nghĩa là thời gian từ lúc lấy mô ra khỏi bệnh nhân đến khi bắt đầu cố định mô – theo ASCO/CAP) là rất quan trọng [1]. Nếu quá trình này bị chậm trễ, sự thoái hoá của các dấu ấn miễn dịch sẽ nhanh chóng xảy ra và hình thái cấu trúc mô cũng biến đổi do tế bào bị hoại tử. Hướng dẫn của Hội Ung thư Lâm sàng Hoa Kỳ/Cao đẳng Bệnh học Hoa Kỳ (ASCO/CAP) về UTV khuyến nghị thời gian thiếu máu lạnh < 1 giờ, đảm bảo đánh giá chính xác các dấu ấn sinh học mô. Thời gian thiếu máu lạnh đã được chứng minh có những ảnh hưởng nhất định đến sự bộc lộ các dấu ấn trong kỹ thuật HMMD. Nhằm xem xét tác động của thời gian thiếu máu lạnh đối với sự biểu hiện của các dấu ấn sinh học mô trong bệnh UTV, đề xuất thực hiện nghiên cứu “Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thiếu máu lạnh lên sự biểu hiện của các dấu ấn ER, PR và Her-2 trong ung thư vú bằng kỹ thuật nhuộm hóa mô miễn dịch”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**Thiết kế nghiên cứu:**

Đây là nghiên cứu tìm hiểu về ảnh hưởng của thời gian thiếu máu lạnh lên sự biểu hiện của các dấu ấn sinh học mô (cụ thể ở đây là sự tăng giảm biểu hiện nếu có của ER, PR, Her-2 trên mẫu mô UTV) trong kỹ thuật nhuộm HMMD, để từ đó củng cố quy trình kỹ thuật, đảm bảo chất lượng tiêu bản nhuộm HMMD từ những bước đầu của quá trình xử lý bệnh phẩm, hỗ trợ chẩn đoán chính xác, hoàn toàn không nghiên cứu về kết quả nhuộm HMMD trên bệnh học UTV. Nghiên cứu thăm dò, chọn mẫu có chủ đích các mẫu mô UTV và theo dõi ảnh hưởng của thời gian thiếu máu lạnh đối với dự biểu hiện của các

kháng nguyên: ER, PR và Her-2.

Tiêu chuẩn chọn mẫu:

Mẫu mô vú ung thư lớn trên 3cm và được chẩn đoán là UTV nguyên phát bởi các bác sĩ chuyên ngành tại Khoa Giải phẫu bệnh – Bệnh viện Đại học Y Dược TPHCM từ tháng 02/2022 đến tháng 08/2022. Có 10 mẫu mô vú ung thư thỏa mãn tiêu chuẩn chọn mẫu được thu thập và nhuộm HMMD; trong đó ER, PR cùng có biểu hiện dương trên 5 mẫu và Her-2 có biểu hiện dương trên 3 mẫu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

Các mẫu đã tân hoá trị bổ trợ, mẫu sinh thiết kim, sinh thiết lõi, mẫu sau xử lý không đạt v.v.

Xác định biến số:

Bảng 1. Các biến số cần thu thập trong nghiên cứu

Tên biến số	Phân loại biến số	Giá trị của biến	Định nghĩa giá trị của biến
Thời điểm cố định	Biến số định lượng	Ngày và giờ bắt đầu và kết thúc cố định	Dựa vào thời gian nhận mẫu mô tươi và các mốc thời gian thực hiện nghiên cứu
Tỷ lệ bắt màu		Từ 0 đến 5 điểm (ER, PR) Từ 0% đến 100% (Her-2)	Dựa vào khảo sát các tiêu bản GPB và HMMD đưa ra kết luận.
Cường độ bắt màu		Từ 0 đến 3 điểm	
Tỷ lệ nhân tế bào thoái hoá		Từ 0 – 100%	
Tỷ lệ màng tế bào vỡ/giới hạn không rõ		Từ 0 – 100%	

Phương pháp nghiên cứu:

Nghiên cứu thu thập các mẫu mô UTV và theo dõi ảnh hưởng của thời gian thiếu máu lạnh đối với sự biểu hiện của các kháng nguyên: ER, PR và Her-2. Sau khi thực hiện đầy đủ chẩn đoán cho bệnh nhân, một phần

nhỏ mẫu mô tươi còn lại (phần dành cho nghiên cứu) không cố định ngay mà được cắt thành 5 phần với độ dày 0,3mm, kích thước tương đồng đảm bảo sự thẩm thấu formalin đúng thời điểm cố định là như nhau ở mỗi phần, để ở nhiệt độ phòng (25°C) và lần lượt

được cố định trong dung dịch formalin đậm trung tính 10% tại thời điểm 30 phút, 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ và 8 giờ. Các mẫu mô sau khi được cố định và xử lý, đúc thành khối trong paraffin sau đó thực hiện cắt mỏng, nhuộm Hematoxylin – Eosin (HE), khoanh vùng mô u xâm lấn trên lam, block và đục TMA (Tissue Microarray) [5]. Khối TMA được cắt mỏng và nhuộm đồng thời HE và hoá mô miễn dịch với kháng thể ER, PR và Her-2. Tổng cộng 65 lát cắt mô tương ứng với 5 thời điểm khảo sát có biểu hiện nhuộm HMMD dương tính, trong đó 50 lát cắt nghiên cứu ER, PR và 15 lát cắt nghiên cứu Her-2. Tất cả các lát cắt được nhuộm đồng thời cùng một quy trình trên cùng hệ thống máy nhuộm tự động Ventana BenchMark ULTRA (Roche), sử dụng kháng thể nguồn Ventana dòng SP1 cho ER, 1E2 cho PR và 4B5 cho Her-2; sau đó so sánh biểu hiện của các dấu ấn trên mẫu được cố định ở các mốc thời gian khác nhau của cùng 1 bệnh nhân.

Phương pháp đánh giá, đo lường kết quả:

Các tiêu bản nhuộm được đánh giá bởi 2 Bác sĩ giải phẫu bệnh độc lập tại Bệnh viện Đại học Y Dược TPHCM. Sự khác biệt đáng kể sẽ được đối chiếu và trung bình của các tỷ lệ được tính là kết quả cuối cùng. Nghiên cứu sử dụng thang điểm Allred để đánh giá đối với ER, PR và thang điểm UK NEQAS (UK NEQAS ICC & ISH Immunocytochemistry Journal – Run 120 – Jan 2018) để đánh giá đối với Her-2. Các số liệu sau khi đánh giá được thu thập, xử lý bằng phần mềm Stata MP 14 và Microsoft Excel. Phân tích sự tương quan giữa cường độ bắt màu, tỷ lệ phần trăm tế bào bắt màu

và tỷ lệ phần trăm nhân tế bào thoái hoá hoặc màng tế bào vỡ/giới hạn không rõ với thời gian trì hoãn cố định mẫu mô trong dung dịch formalin đậm trung tính 10%.

Đạo đức trong nghiên cứu:

Nghiên cứu đã được thông qua Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Đại học Y dược Thành phố Hồ Chí Minh thẩm định, xét duyệt, số 859/HĐĐĐ-ĐHYD ngày 23 tháng 12 năm 2021.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

65 lát cắt mô cho biểu hiện nhuộm HMMD dương tính với 3 kháng thể ER, PR và/hoặc Her-2 từ 10 mẫu thu thập ban đầu được đánh giá và ghi nhận kết quả. Kết quả được lấy trung bình giá trị đánh giá của các mẫu mô tại từng thời điểm và được thể hiện ở bảng 2, biểu đồ 1, 2, 3, 4; hệ số tương quan r và hệ số xác định r^2 được thể hiện ở bảng 3.

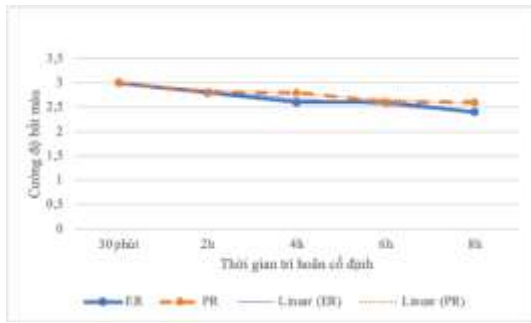
Kết quả này cho thấy cường độ bắt màu của ER, PR và thời gian trì hoãn cố định có tương quan nghịch, mạnh, có ý nghĩa thống kê (với $|r| > 0,5$, $p < 0,05$). Bên cạnh đó, có tương quan thuận, mạnh, có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ nhân tế bào thoái hoá của ER, PR và thời gian trì hoãn cố định (với $|r| > 0,5$, $p < 0,05$). Giá trị về cường độ bắt màu của Her-2 hoàn toàn không thay đổi tại các thời điểm trì hoãn cố định 2/4/6/8 giờ. Các giá trị còn lại về tỷ lệ bắt màu của ER, PR, Her-2 và tỷ lệ màng tế bào vỡ/giới hạn không rõ của Her-2 có sự thay đổi nhưng không đáng kể trong suốt 5 khung giờ trì hoãn cố định. Sự thay đổi các giá trị này mang tính không liên tục, không có ý nghĩa thống kê với thời gian trì hoãn cố định mẫu.

Bảng 2. Kết quả đánh giá biểu hiện của ER, PR và Her-2

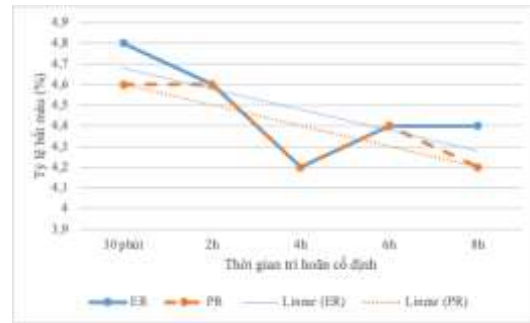
Dấu ấn	Thời gian trì hoãn cố định	Giờ				
		<1	2	4	6	8
ER (N=5)	Cường độ bắt màu	3	2,8	2,6	2,6	2,4
	Độ lệch chuẩn	0	0,4	0,5	0,5	0,5
	Tỷ lệ bắt màu	4,8	4,6	4,2	4,4	4,4
	Độ lệch chuẩn	0,4	0,5	0,8	0,9	0,9
	Tỷ lệ nhân tế bào thoái hoá (%)	26	38	42	48	49
	Độ lệch chuẩn	20,7	19,2	32,7	23,9	30,5
PR (N=5)	Cường độ bắt màu	3	2,8	2,8	2,6	2,6
	Độ lệch chuẩn	0	0,4	0,4	0,5	0,5
	Tỷ lệ bắt màu	4,6	4,6	4,2	4,4	4,2
	Độ lệch chuẩn	0,5	0,5	1,1	0,9	1,1
	Tỷ lệ nhân tế bào thoái hoá (%)	30	34	32	40	47
	Độ lệch chuẩn	18,7	16,7	23,9	25,5	30,7
Her-2 (N=3)	Cường độ bắt màu	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
	Độ lệch chuẩn	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
	Tỷ lệ bắt màu (%)	83,3	90	83,3	86,7	83,3
	Độ lệch chuẩn	5,8	0	5,8	5,8	5,8
	Tỷ lệ màng tế bào vỡ/giới hạn không rõ (%)	60	53,3	56,7	60	55
	Độ lệch chuẩn	43,6	40,4	40,4	43,6	43,3

Bảng 3. Hệ số tương quan, hệ số xác định, giá trị p giữa cường độ bắt màu, tỷ lệ bắt màu, tỷ lệ nhân tế bào thoái hoá/màng tế bào vỡ với thời gian trì hoãn cố định

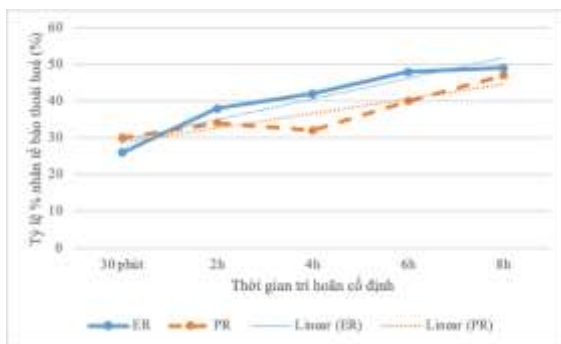
Dấu ấn	Tiêu chí	Hệ số		
		r	r ²	p
ER (N=5)	Cường độ bắt màu	-0,962	0,926	0,009
	Tỷ lệ bắt màu	-0,671	0,450	0,215
	Tỷ lệ nhân tế bào thoái hoá	0,934	0,872	0,020
PR (N=5)	Cường độ bắt màu	-0,934	0,872	0,020
	Tỷ lệ bắt màu	-0,789	0,623	0,112
	Tỷ lệ nhân tế bào thoái hoá	0,922	0,850	0,026
Her-2 (N=3)	Cường độ bắt màu	-	-	-
	Tỷ lệ bắt màu	-0,211	0,044	0,734
	Tỷ lệ màng tế bào vỡ/giới hạn không rõ	-0,142	0,020	0,820



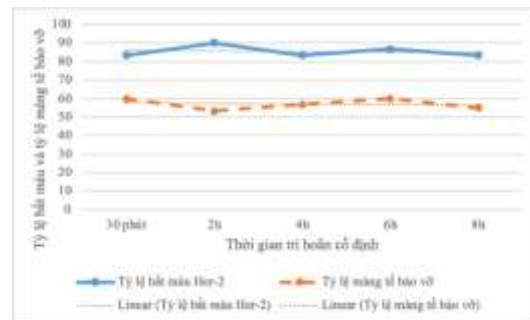
Biểu đồ 1. Sự thay đổi cường độ bắt màu (ER, PR) theo thời gian trì hoãn cố định



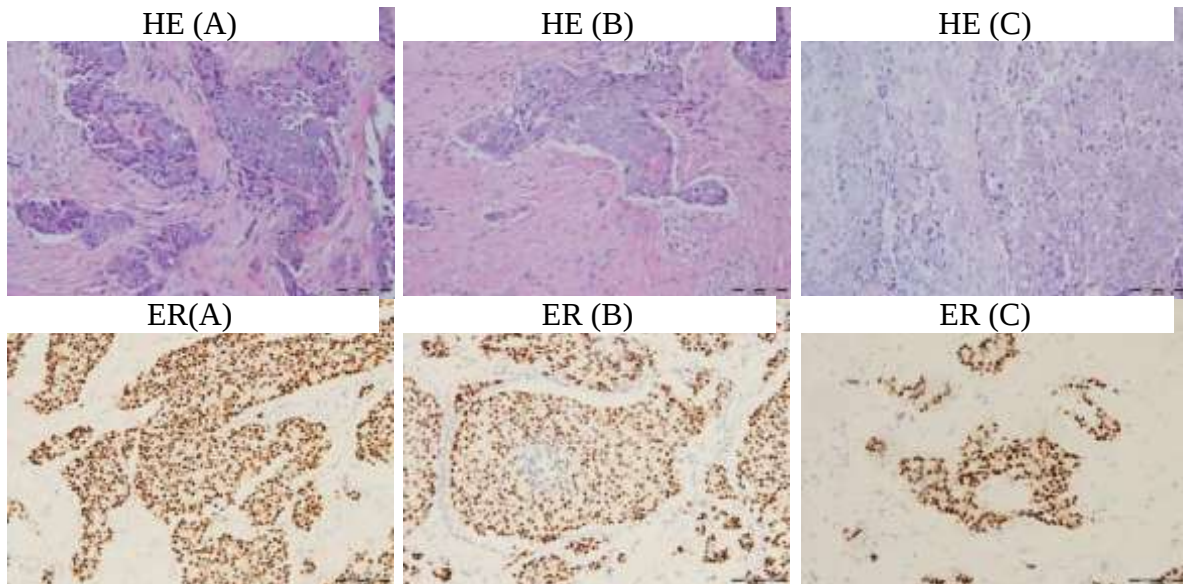
Biểu đồ 2. Sự thay đổi tỷ lệ bắt màu (ER, PR) theo thời gian trì hoãn cố định

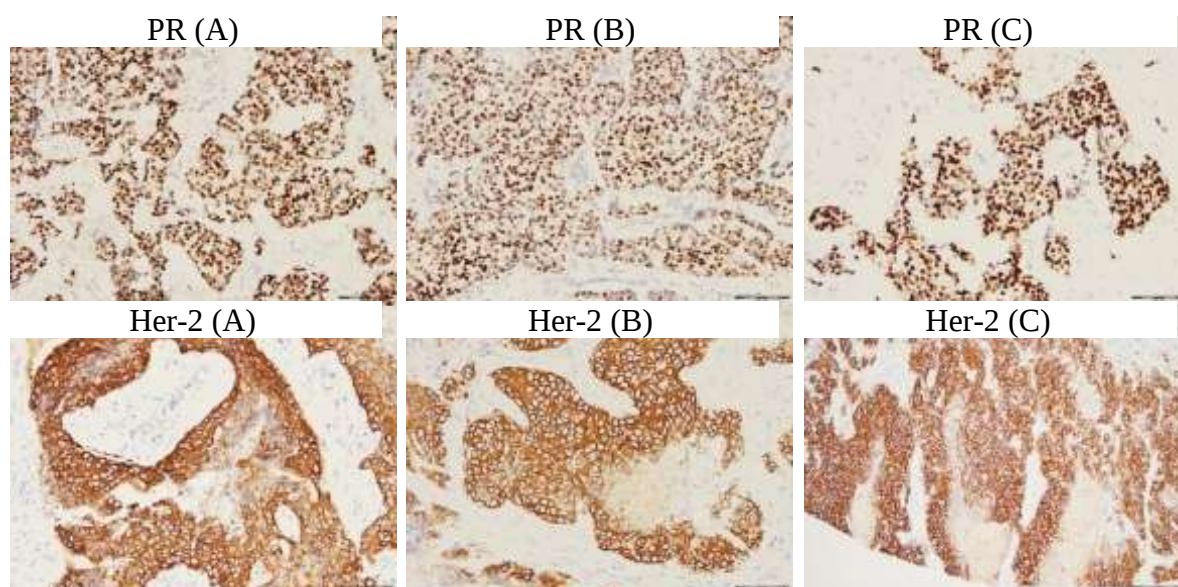


Biểu đồ 3. Sự thay đổi tỷ lệ nhân tế bào thoái hóa (%) (ER, PR) theo thời gian trì hoãn cố định



Biểu đồ 4. Sự thay đổi tỷ lệ bắt màu và tỷ lệ màng tế bào vỡ/giới hạn không xác định (%) (Her-2) theo thời gian trì hoãn cố định





Hình 1. Hình ảnh mô học (quan sát ở vật kính x20) các mẫu mô cho thấy sự thay đổi trên lam HE và sự thay đổi biểu hiện của ER, PR, Her-2 qua các thời điểm trì hoãn cố định 30 phút (Hình A), 4h (B) và 8h (C)

IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu của tác giả Qiu và cộng sự (CS) trên kháng thể từ Ventana cho thấy biểu hiện của ER bắt đầu giảm ở thời điểm 1 giờ khi sử dụng kháng thể dòng SP1; bên cạnh đó, biểu hiện của PR bắt đầu giảm ở thời điểm từ 4 giờ đến 8 giờ khi sử dụng kháng thể dòng 1E2; mặc dù không có ý nghĩa thống kê nhưng sự thay đổi này xảy ra ở cả cường độ và tỷ lệ bắt màu ER, PR [4]. Nghiên cứu của tác giả Yildiz – Aktas và CS thực hiện nhuộm hóa mô miễn dịch trên cùng hệ thống và kháng thể cho thấy mức giảm biểu hiện đáng kể sớm nhất được thấy ở mốc 2 giờ đối với cả ER và PR (khi mẫu được để ở nhiệt độ phòng) [7]. Nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cường độ và tỷ lệ bắt màu của ER, PR bắt đầu giảm ở thời điểm trì hoãn cố định 2 giờ, và sự suy giảm về cường độ bắt màu ER, PR là có ý nghĩa thống kê tương đồng với nghiên cứu của tác giả Yildiz – Aktas và CS; chênh lệch 1 giờ đối với ER và 2 đến 6 giờ đối với PR so với nghiên cứu của tác giả Qiu và CS và sự chênh lệch này

cần khảo sát thêm do trong nghiên cứu này chúng tôi chưa khảo sát ở thời điểm 1 giờ trì hoãn cố định mẫu.

Về biểu hiện của Her-2, một nghiên cứu của tác giả Neumeister và CS nhận thấy không có sự suy giảm hay một xu hướng có ý nghĩa thống kê nào về biểu hiện của Her-2 liên quan đến các khoảng thời gian thiếu máu lạnh [2]. Nghiên cứu của tác giả Pinhel và CS cho thấy ở các trường hợp Her-2 cho biểu hiện 3+ hoặc 2+, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa mẫu được cố định đúng quy cách và mẫu được trì hoãn thời gian cố định với quy trình xử lý thông thường [3]. Nghiên cứu của chúng tôi ở 3 trường hợp Her-2 biểu hiện 3+, 2+ nhận thấy không có sự thay đổi về cường độ bắt màu trung bình giữa các thời điểm trì hoãn cố định, tương đồng với nghiên cứu của tác giả Neumeister và CS, Pinhel và CS; tuy nhiên tỷ lệ bắt màu lại tăng lên ở 2/5 mốc thời gian khảo sát, dù so sánh ở thời điểm bắt đầu và kết thúc trì hoãn cố định thì tỷ lệ bắt màu không thay đổi. Sự xuất hiện một vài mốc thời gian cho

biểu hiện bất thường về tỷ lệ bắt màu trong nghiên cứu được giải thích do sự không đồng nhất trong biểu hiện giữa các phần của mẫu mô hoặc do lỗi kỹ thuật. Chúng tôi thực hiện TMA những vùng có nhiều tế bào u xâm lấn đã được khu trú mà không phải lấy trọn mẫu mô do vậy biểu hiện không tương đồng giữa các vùng của cùng một mẫu mô khi nghiên cứu là có thể giải thích được. Yếu tố kỹ thuật cũng đã được hạn chế đáng kể khi thực hiện nghiên cứu, tất cả các tiêu bản được thực hiện cùng một quy trình nhuộm, cùng một loại hóa chất và trên cùng một hệ thống máy có kèm mẫu mô dương đối chứng trên từng tiêu bản.

Bên cạnh đó, khi thời gian trì hoãn cố định kéo dài, tỷ lệ nhân tế bào thoái hóa của ER, PR gia tăng và sự thay đổi này có ý nghĩa thống kê. Khi so sánh giữa thời điểm bắt đầu và trì hoãn cố định, tỷ lệ màng tế bào vỡ/giới hạn không rõ trên tiêu bản nhuộm Her-2 được nhận thấy là không thay đổi, giữa các mốc thời gian còn có sự suy giảm. Sự xuất hiện bất thường này có thể được giải thích do bản chất mẫu mô u.

Nghiên cứu này còn tồn tại một số hạn chế khi số lượng mẫu cho biểu hiện nhuộm HMMD dương tính trên tổng số mẫu thỏa tiêu chuẩn chọn chưa lớn (5/10 đối với ER, PR và 3/10 đối với Her-2, trong đó không có trường hợp mẫu mô cho biểu hiện Her-2 1+), cần mở rộng số lượng mẫu và các khung thời gian khảo sát để đưa ra được kết luận chi tiết hơn.

V. KẾT LUẬN

Thời gian thiếu máu lạnh kéo dài làm suy giảm cường độ bắt màu của ER, PR và gia tăng tỷ lệ nhân tế bào thoái hóa của ER, PR. Cường độ bắt màu của Her-2 ở các trường hợp 3+/2+ hoàn toàn không thay đổi tại các thời điểm trì hoãn cố định khác nhau. Các giá trị còn lại về tỷ lệ bắt màu của ER, PR, Her-2 và tỷ lệ màng tế bào vỡ/giới hạn không rõ của Her-2 có sự thay đổi nhưng không đáng

kể, không có ý nghĩa thống kê thời gian trì hoãn cố định mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Khoury T.** Delay to Formalin Fixation (Cold Ischemia Time) Effect on Breast Cancer Molecules. *American Journal of Clinical Pathology*. 2018; 149(4):275–292.
2. **Neumeister VM, Anagnostou V, Siddiqui S, England AM, Zarrella ER, Vassilakopoulou M, Parisi F, Kluger Y, Hicks DG, Rimm DL.** Quantitative assessment of effect of preanalytic cold ischemic time on protein expression in breast cancer tissues. *J Natl Cancer Inst*. 2012; 104(23):1815–24.
3. **Pinhel IF, Macneill FA, Hills MJ, Salter J, Detre S, A'hern R, Nerurkar A, Osin P, Smith IE, Dowsett M.** Extreme loss of immunoreactive p-Akt and p-Erk1/2 during routine fixation of primary breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12(5):R76.
4. **Qiu J, Kulkarni S, Chandrasekhar R, Rees M, Hyde K, Wilding G, Tan D, Khoury T.** Effect of delayed formalin fixation on estrogen and progesterone receptors in breast cancer: a study of three different clones. *Am J Clin Pathol*. 2010; 134(5):813–9.
5. **Rimm DL, et al.** Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J*. 2001; 7(1):24–31.
6. **Yaziji H, Taylor CR, Goldstein NS, et al.** Consensus recommendations on estrogen receptor testing in breast cancer by immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008; 16:513–520.
7. **Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R.** The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2012; 25(8):1098–105.
8. **Zaha DC.** Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*. 2014; 5(3):382.