کشور را شناسایی کند. این وب‌سایت به‌صورت منظم به‌روزرسانی می‌شود، لذا بدین‌منظور صفحه‌ای ایجاد شده است تا کاربران بتواند از آخرین تغییرات مندرج مطلع شوند. صفحه‌ی دیگری نیز تحت عنوان چگونگی استفاده از فهرست داده‌ها در پایگاه مایکو-لیک ایجاد شده که کاربران به آسانی می‌توانند از آن برای تهیه‌ی فهرست منابع علمی خود در پایان‌نامه یا مقاله‌های علمی استفاده کنند.

طراحی این سامانه به شیوه‌ی پیشرفته و مطالعات مدرن فلورستیک در جهان انجام گرفته است که هم‌زمان کاربران را از آخرین پیشرفت‌های علم گلسنگ‌شناسی در کشور و نیز در استان و منطقه مطلع می‌کنند. امید است این سامانه تحت وب بتواند تحولی اساسی در علم گلسنگ‌شناسی ایران از بُعد آموزشی و پژوهشی به‌وجود آورد.

● از توضیح‌های شما سپاس‌گزاریم. امیدواریم این نوآوری و کوشش‌های شما در ایجاد، مدیریت و نگه‌داری این سامانه‌ی اینترنتی الگویی باشد برای دست‌اندرکاران و علاقه‌مندان دیگر موضوع‌های زیست‌شناسی.

پی‌نوشت

1. MYCO-LICH

در آزمایشگاه

هیستوتکنیک

روش‌های تهیه و آماده کردن برش در بافت‌شناسی جانوری

غلامرضا مقدسی
کارشناس ارشد فیزیولوژی جانوری از دانشگاه فردوسی مشهد
دبیر زیست‌شناسی و سرگروه زیست‌شناسی خراسان شمالی

کلیدواژه‌ها: تثبیت بافت، برش گیری بافت، میکروتوم، آب گیری بافت، شفاف‌سازی، رنگ آمیزی.

مقدمه

همزمان با پیشرفت در ساختن عدسی و میکروسکوپ‌های بهتر، روش‌های جانبی میکروسکوپی نیز ابداع شدند. سلول‌های برخی نمونه‌های زیستی، مانند پوست پیاز و مخاط دهان را می‌توان مستقیماً با میکروسکوپ مشاهده کرد. ولی اکثر نمونه‌ها قبل از بررسی به یک یا چند تیمار ویژه نیاز دارند. معمولاً اولین مرحله‌ی آماده‌سازی نمونه‌ها ثابت کردن آن‌هاست. نمونه‌ها طی **فرایند تثبیت**، درون یکی از چند حلال آلی قرار می‌گیرند. برخی از الکل‌ها، فرم آلدهید و گلوتارآلدهید معمول‌ترین تثبیت‌کننده‌ها هستند. هدف اصلی از تثبیت، ممانعت از حرکت و جابه‌جایی مولکول‌ها و اندامک‌های درون سلول است که در نتیجه، تصویر نهایی انعکاس صحیح‌تری از وضع سلول زنده خواهد بود. علاوه بر این، فرایند تثبیت تأثیری بر غشای سلول می‌گذارد که موجب افزایش نفوذپذیری رنگ به داخل سلول می‌شود. طبعاً تثبیت سول‌ها باعث مرگ آن‌ها می‌شود. معمولاً نمونه‌های بافت برای بررسی زیر میکروسکوپ بیش از حد ضخیم هستند و بنابراین باید آن‌ها را به صورت برش‌های بسیار نازک درآورد، به حدی که نور بتواند از آن‌ها بگذرد. برش‌هایی با ضخامت بین ۱ تا ۱۰ میکرومتر برای میکروسکوپ نوری مناسب‌اند. به علت نرم بودن و شکنندگی بافت‌ها، پیش از برش دادن آن‌ها، باید ابتدا بافت‌ها را در پارافین مذاب یا مواد مشابه دیگری قرار دارد. به این کار **قالب‌گیری** می‌گویند. مواد قالب‌گیری در حالت مایع علاوه بر این‌که بافت سلولی را احاطه می‌کنند، وارد آن نیز می‌شوند. پس از جامد شدن این مواد، قالب آماده‌ی برش‌گیری با **دستگاه میکروتوم** است. بخش مهم آن یک چاقو یا یک تیغه‌ی بسیار تیز است. روش دیگر **برش‌گیری** که نیاز به تثبیت کردن را برطرف می‌سازد، تهیه‌ی برش از بافت منجمد شده است.

سلول‌ها بی‌رنگ هستند و نور تقریباً به میزان یکسان از بخش‌های گوناگون آن‌ها عبور می‌کند، در نتیجه اغلب اجزای سلول قابل تشخیص نیستند و **تباین** یا **کنتراست** مطلوبی در تصویرها حاصل نمی‌شود. برای ایجاد تباین و تشخیص قسمت‌های مختلف، سلول را رنگ می‌کنند.

رنگ‌آمیزی معمولاً روی برش‌ها انجام می‌گیرد. رنگ‌های مختلفی شناسایی شده‌اند که هر یک توسط اجزا یا مولکول‌های خاصی در سلول جذب می‌شود و تشخیص آن‌ها را ممکن می‌سازد. جالب است بدانیم که علت ترکیب اختصاصی بسیاری از رنگ‌ها با اجزا یا مولکول‌های خاص برای ما روشن نیست. پس از قراردادن لامل (تیغک شیشه‌ای) روی برش‌های رنگ‌آمیزی شده، نمونه زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شود.

تهیه‌ی برش

تهیه‌ی برش معمولی‌ترین روش تهیه‌ی بافت‌ها برای مطالعات بافت‌شناسی و برای کارهای معمولی یا تحقیقاتی است. این روش به مفهوم تهیه‌ی مقاطع بسیار نازکی از بافت و سوار کردن آن‌ها روی لام، برای مطالعه در زیر میکروسکوپ است. بافت موردنظر غالباً با ماده‌ای قالب‌گیری می‌شود که در هنگام مقطع‌گیری باعث استحکام آن می‌شود. نوع ماده‌ی مذکور بستگی به نوع بافت و تکنیک‌های مورد نیاز جهت رنگ‌آمیزی دارد. پارافین معمولی‌ترین این مواد است. به عنوان یک اصل کلّی ماده‌ای که در محیطی مناسب قالب‌گیری شده، دارای مقاطع بسیار نازک‌تری نسبت به نمونه‌ای است که در این محیط واقع نشده است.

بنابراین، برای این‌که بتوان بافت را در پارافین قالب‌گیری کرد، باید عملیات زیر را به ترتیب انجام داد تا بافت برای پارافین‌گیری آماده شود. مجموع این عملیات را پاساژ یا گردش بافت[1] می‌گویند.

الف) آب‌گیری[2]

ب) الکل‌گیری و شفاف کردن[3]

ج) آغشتگی با پارافین[4]

د) قالب‌گیری[5]

همزمان با پیشرفت در ساختن عدسی و میکروسکوپ‌های بهتر، روش‌های جانبی میکروسکوپی نیز ابداع شدند

۱. آب‌گیری

آب‌گیری به مفهوم خارج کردن کامل آب از بافت است. بافت‌ها به طور طبیعی، حتی بعد از ثابت شدن، دارای مقداری آب هستند که اگر از بافت خارج نشود مانع نفوذ پارافین به داخل بافت می‌شود. برای این منظور آب اضافی بافت با مواد جاذب آب گرفته می‌شود. بدین منظور معمولاً از الکل اتیلیک با غلظت افزایشی استفاده می‌شود. برای شروع آب‌گیری درجه‌ی الکل اولیه بسته به نوع ماده‌ی فیکساتور، اندازه و جنس بافت دارد و معمولاً با الکل اتیلیک ۵۰ یا ۷۰ درجه شروع می‌شود. اگر بافت در الکل غلیظ قرار بگیرد، چروکیده می‌شود؛ چون آب آن خیلی سریع خارج می‌شود.

۱-۱. روش کار

پس از جدا کردن بافت از بقیه‌ی بخش‌ها، ابتدا فرمالین نمونه‌ی بافتی را با کاغذ خشک‌کن می‌گیریم. در صورتی که ضخامت نمونه‌ها زیاد (حدود یک سانتی‌متر) باشد، با استفاده از سوزن و با دقت و ملایمت سوراخ‌هایی در سطح نمونه ایجاد می‌کنیم تا عمل آب‌گیری به سرعت انجام شود. سپس نمونه‌ها را به شیشه‌های در سنباده‌ای محتوی الکل اتیلیک ۷۰ درجه، وارد می‌کنیم. بنابراین، به طور خلاصه، مراحل آب‌گیری به صورت زیر انجام می‌شود:

ـ الکل اتیلیک ۷۰ درجه، ۲٤ ساعت

ـ الکل اتیلیک ۹۰ درجه ۱، ٦ ساعت

ـ الکل اتیلیک ۹۰ درجه ۲، ٦ ساعت

ـ الکل اتیلیک ۹٦ درجه، ۱۲ ساعت

در انجام مراحل آب‌گیری رعایت نکات زیر الزامی است:

الف) حجم الکل‌ها باید ۱۰۰-۵۰ برابر حجم نمونه‌ی بافتی باشد.

ب) برای تسریع در عمل آب‌گیری می‌توان ظرف نمونه‌ی آب‌گیری را تکان داد. حرارت نیز در مواردی که سرعت عمل نیاز است، آب‌گیری را تسریع می‌کند.

ج) چون الکل اتیلیک رطوبت هوا را جذب می‌کند، باید از ظرف در سنباده‌ای استفاده شود. به علاوه چون آب در ته ظرف الکل جمع می‌شود، باید حتی‌المقدور از ظروف شیشه‌ای پهن استفاده کنیم.

۲. شفاف‌سازی

شفاف‌سازی به مفهوم شفاف ساختن بافت نیست، هر چند که این حالت نیز ممکن است در بعضی از موارد اتفاق افتد. مفهوم شفاف‌سازی جانشین کردن مایع جاذب (الکل اتیلیک) با حلال ماده‌ای است که نمونه می‌باید در آن قالب‌گیری شود.

به علاوه، چون درجه‌ی انکسار نور در بافت‌ها مشابه یا نزدیک هم است، لازم است درجه‌ی انکسار تغییر یابد. بدین منظور، عمل شفاف‌سازی انجام می‌شود. شفاف‌کردن علاوه بر این که درجه‌ی انکسار بافت را بالا می‌برد، از سخت شدن بافت‌ها نیز جلوگیری می‌کند. برای شفاف کردن از محلول‌هایی مثل گزیلن، تولوئن، بنزن، بوتانل و... استفاده می‌شود.

۲-۱. روش کار

نمونه‌های بافتی را بعد از خارج کردن از الکل اتیلیک ۹٦ درجه ابتدا خشک می‌کنند. مراحل شفاف‌سازی با استفاده از محلول بوتانل به ترتیب زیر انجام می‌شود:

۱. بوتانل اول ۱٤ ساعت

۲. بوتانل دوم ۱۲ ساعت

۳. بوتانل سوم ۱۰ ساعت

باید دقت کنیم که حجم بوتانل در حدود ۱۰۰-۵۰ برابر حجم نمونه بافتی باشد.

۳. آغشته‌سازی

آغشته‌سازی یا پارافین‌گیری به مفهوم اشباع کردن کامل بافت با ماده‌ای است که نمونه باید در آن قالب‌گیری شود. در روش مخصوص مقاطع پارافینی، این

عمل به مفهوم خـارج کردن کامل عامل شـفاف کننده (بوتانل) و جانشین کردن آن با پارافین اسـت. پارافین‌گیری در اتو با دمای ٦٠-٥٤ (در آزمایشـگاه‌ها اغلب از دمای ۵۸ درجه‌ی سـانتی‌گراد استفاده می‌کنند) انجام می‌شـود. دمـای اتو باید همواره ثابت باشد. آغشته‌سازی با یکی از روش‌های دسـتی، اتوماتیک و یا در خلأ انجام می‌شود.

۳-۱. روش کار

یـک روز قبـل از شـروع مرحله‌ی آغشـتگی، پارافین جامد را در اتویی که دمای آن ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد است، قرار می‌دهیم. بعد از ذوب شدن پارافین، در هر یک از بشرهایی که قبلاً تهیه شده‌اند، ۵۰ سی‌سـی پارافین مذاب می‌ریزیم. سپس نمونه‌های بافتی را بعد از خروج از بوتانل سـوم ابتدا با کاغذ خشک‌کن، خشک و سـپس به آرامی وارد بشـرهای محتوی پارافین مذاب، که مشـخصات مربوط به نمونه روی آن درج شده است، می‌کنیم. بشـرها را در اتویی که دمای آن روی ۵۸ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شده است، قرار می‌دهیم. بعد از ۸ ساعت پارافین نمونه‌ها را بـا پارافین جدیـد، تعویض می‌کنیم. تعویض پارافین را چهار بار انجام و هر بار نمونه‌ها به مدت ۸ ساعت درون پارافین مذاب قرار می‌دهیم.

باید دقت کنیم که:

الف) پارافین مورد اسـتفاده خالص، فاقد گـرد و خاک و اجسـام خارجی و بدون قطرات آب و شـفاف باشد. برای این منظور، قبل از استفاده، پارافین مذاب را می‌توان از طریق کاغذ صافی در اتویی که دمای آن ۲ درجه سانتی‌گراد بیش‌تر از نقطه‌ی ذوب پارافین است، پالایش کرد.

ب) نمونه‌هـای بافتی نباید به مدت طولانـی در پارافین مـذاب باقی بمانند. چـون در این صـورت بافت‌هـا دچار چروکیدگی فراوان و سختی بیش از حد می‌شـوند. هم‌چنین، اگر مدت آغشتگی کامل نباشد، عامل شفاف کننده (بوتانل) در بافت باقی مانده و بلوک حاصل نرم و شکننده خواهد شد. در نتیجه مقطع‌گیری به‌خوبـی انجام نمی‌شـود و هنگامی که مقطع روی آب شـناور می‌شـود، دچار شکستگی خواهد شد.

ج) حجم پارافین باید در حدود ۵۰-۲۵ برابر حجم نمونه‌ی بافتی باشد.

د) مدت آغشـتگی و تعـداد دفعات عوض کردن بافت در جریان آغشتگی به چهار عامل اندازه، نوع بافت، نوع ماده‌ی شـفاف‌کننده و نوع اتو یا کـوره‌ی مورد استفاده بستگی دارد.

۴. قالب‌گیری

در این مرحله نمونه‌ی بافتی آغشـته شده به پارافین را در داخل پارافین مذاب و در وضعیـت کاملاً مناسب قرار می‌دهیم. ضمن انجماد پارافین، نمونه نیز در داخل آن باقی می‌ماند و آماده‌ی مقطع‌گیری می‌شود.

یکی از مسائل مهم در جهت‌گیـری[6] یعنی قـرار دادن بافت به‌طور دقیق و صحیح در قالب است. این جای‌گذاری باید قبـل از انجام عملیات بافت‌شناسـی مشـخص شـود و برای قالب‌گیری و تهیه‌ی بلوک انواع مختلفی از قالب‌ها استفاده می‌شود. در این روش از قالب‌های آلومینیومی استفاده می‌کنیم.

۴-۱. روش کار

لازم اسـت قبـل از شـروع کار برچسب‌هایی متناسـب با نمونه‌ها تهیه کنیـم. مراحل تهیه‌ی بلوک را به صورت زیر انجام می‌دهیم:

۱. ابتدا مقداری پارافین مذاب در کف قالب (که در یک سطح صاف مثل کاشی قرار داده می‌شـود) می‌ریزیم تا سـفت شود، سپس بقیه‌ی پارافین مذاب را روی آن می‌ریزیم تا سفت شود.

۲. با پنس گرم نمونه‌های بافتی را در پارافین قرار می‌دهیم. دقت کنیم که حباب تشکیل نشود.

۳. سطح برش را به طرف کف ظرف قرار می‌دهیم.

٤. برچسب یا نمره را در سطح مقابل سطح برش قرار می‌دهیم، به گونه‌ای که قابل خواندن باشد.

۵. وقتی پارافین کاملاً سـرد شـد، قالب‌ها را به یخچال منتقل می‌کنیم.

٦. بعـد از ۱ تـا ۲ سـاعت پارافین به‌خوبی سفت و سخت می‌شود و می‌توان بلوک‌ها را از قالب آلومینیومی خارج کرد. به این ترتیب بلوک‌های پارافینی حاوی نمونـه‌ی بافتی بـرای مقطع‌گیری کاملاً آماده‌انـد. باید دقت کنیم که در هر قالب بیش از ۳۰ میلی‌متر پارافین روی بافت را بپوشاند. لذا اندازه‌ی قالب را باید متناسب با اندازه‌ی بافت انتخاب کنیم.

سـلول‌ها بی‌رنگ هسـتند و نور تقریباً به میزان یکسان از بخش‌های گوناگون آن‌ها عبور می‌کند، در نتیجه اغلب اجزای سـلول قابل تشـخیص نیستند

۵. برش بافت یا مقطع‌گیری

در این مرحله نمونه‌های دارای قالب پارافینی را با دستگاهی به نام میکروتوم[7] به ضخامت ۱۰-۵ میکرون برش می‌دهیم. متداول‌ترین نـوع میکروتوم، میکروتوم چرخان[8] است که در اکثر آزمایشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این دستگاه می‌توان مقاطع پشت سرهم (سـریالی) تهیه کـرد. ما بـرای تهیه‌ی برش عرضی بـه ضخامت ۸ میکرون از جنین‌های ۲۰ روزه‌ی رت و از میکروتوم

چرخان[۸] آزمایشگاه بافت‌شناسی استفاده کردیم.

۵-۱. روش کار

قبل از برش برداری، باید بلوک تراشیده و روی پایه نصب شود. سطوح جانبی بلوک تا حاشیه‌ی بافت و سطوح فوقانی و تحتانی آن تا ۵ میلی‌متری مانده به بافت را می‌تراشیم. باید توجه داشت که همه‌ی سطوح بلوک به حالت موازی باشد. در این حالت بلوک پارافین برای نصب روی پایه آماده است. علاوه بر

این، قبل از شروع به کار باید دمای حمام آب (بن ماری) را به ۵۰-۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (۶-۵ درجه پایین‌تر از درجه‌ی ذوب پارافین) رساند. هم‌چنین لازم است تعدادی لام به تعداد مورد نیاز تهیه کنیم و با استفاده از قلم الماس کد بلوک و نیز شماره‌ی برش را به صورت سریال روی آن‌ها درج کنیم.

۱. بلوک را در گیره‌ی میکروتوم جای می‌دهیم، به‌طوری که سطح بالا و پایین آن به موازات لبه‌ی تیغ قرار گیرند.

۲. گیره و بلوک را در جای خود قفل و میکروتوم را برای تهیه‌ی مقاطع ۸ میکرونی تنظیم می‌کنیم.

۳. باید توجه داشته باشیم که تیغ به طور مطمئن بسته شده باشد.

۴. سطح بلوک را تراش می‌دهیم تا کاملاً صاف شود. هنگامی که تیغ میکروتوم به محل نمونه رسید، مقاطع را به کمک قلم‌مو یا پنس با ملایمت برمی‌داریم و در سطح حمام آب شناور می‌کنیم. مقاطع ناقص را از دور خارج می‌کنیم و مقاطع کامل بعد از پهن شدن، با فرو بردن لام در حمام آب با زاویه‌ی ۴۵ درجه و بالا آوردن آن به صورت عمودی از سطح آب جمع‌آوری می‌کنیم. باید دقت کنیم که حتی‌الامکان مقاطع در وسط لام قرار گیرند. هم‌چنین در صورتی که مقاطع بزرگ باشند، برای هر لام فقط یک مقطع کافی است.

۵. لام‌ها را به آرامی روی یک سطح صاف در دمای آزمایشگاه قرار داده می‌دهیم.

۶. لام‌های تهیه شده را در جعبه‌ی لام می‌چینیم و برای خشک شدن کامل در اتو (دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) قرار می‌دهیم. بعد از ۲۴ ساعت لام‌ها جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌ها آماده‌اند.

باید در نظر داشته باشیم که:

الف) بریدگی مقاطع در حین کار، نشان‌دهنده‌ی دندانه‌دار بودن لبه‌ی تیغ یا وجود گرد و غبار یا مو در لبه‌ی تیغ است. بنابراین، لازم است لبه‌ی تیغ را هر از چند گاهی، در ضمن کار با زایلن تمیز و خشک کنیم.

ب) وجود نوارهای افقی ضخیم و نازک در مقطع ممکن است به علت شُل بودن تیغ یا بلوک، سختی زیاد بلوک، یا کُندی تیغ باشد.

ج) نازک بودن مقاطع در یک انتها به علت وجود ناحیه‌ای کُند روی تیغ است.

د) انحنادار بودن نوار مقاطع به علت وجود ناحیه‌ی کُند روی تیغ یا موازی نبودن حواشی بلوک است.

هـ) وجود حفره در مقطع به علت وجود حباب در مایع مخصوص قالب‌گیری، یا وجود ناحیه‌ی سخت در بافت است.

و) در صورتی که هوا گرم باشد، برش‌ها به سختی برداشته می‌شوند و اغلب دچار پارگی می‌شوند. در این صورت می‌توان با گذاشتن یخ روی سطح بلوک (به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه) آن را سفت کرد.

هر چند که بیش‌تر مقاطع قدرت چسبیدن به لام‌های خشک را دارند، ولی معمولاً برای چسبیدن بهتر مقاطع به لام توصیه می‌شود که از مواد چسباننده استفاده شود. تعداد زیادی ماده‌ی چسباننده (مثل گلیسرین، آلبومین، پلاسما، خمیر نشاسته و ژلاتین) برای این منظور موجود است. می‌توان برای افزایش قدرت چسبندگی لام‌ها از ژلاتین استفاده کرد. بدین منظور ۰/۳ گرم پودر ژلاتین را به کمک همزن مغناطیسی در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل می‌کنیم. سپس محلول ژلاتین را در بوکالی می‌ریزیم. با فرو بردن لام‌ها به مدت چند ثانیه در محلول، لام‌ها ژلاتینه می‌شوند. لام‌ها پس از خشک‌شدن قابل استفاده‌هستند.

۶. رنگ‌آمیزی

هدف از رنگ‌آمیزی متمایز کردن سلول‌ها، اجزای سلولی و عناصر تشکیل‌دهنده‌ی بافت‌ها از نظر نوری، برای مطالعه‌ی میکروسکوپی است. واکنش‌های رنگ‌آمیزی بر سه اصل حلالیت، جذب و آغشتگی استوارند. روش رنگ‌آمیزی معمولی، یعنی استفاده از **هماتوکسیلین وائوزین**، روش متداول در اکثر آزمایشگاه‌هاست.

هماتوکسیلین نوعی رنگ بازی است و ساختارهایی را که با آن رنگ می‌گیرند به رنگ آبی تا بنفش درمی‌آورد. این ساختارها به ساختارهای بازوفیل موسوم‌اند. ائوزین نوعی ماده‌ی رنگی اسیدی است و ساختارهایی را که با آن رنگ می‌شوند به رنگ قرمز درمی‌آورد. این ساختارها به ساختارهای اسیدوفیل یا ائوزینوفیل موسوم‌اند. با این روش رنگ‌آمیزی هسته‌ها به رنگ آبی و سیتوپلاسم به رنگ قرمز در می‌آیند. اغلب فیکساتورها به جز آن‌هایی که حاوی تتروکسید اسمیوم هستند، برای این روش رنگ‌آمیزی مناسب هستند.

۶-۱. روش کار

به‌طور کلی قبل از آن‌که مقاطع پارافینی را رنگ‌آمیزی کنیم، باید پارافین را از مقطع خارج کنیم و آب‌دهی نیز انجام دهیم. برای حذف کردن پارافین از گزیلن (زایلن) و برای آب‌دهی از الکل اتیلیک با درجات نزولی استفاده می‌کنیم. بعد از رنگ‌آمیزی، مقاطع احتیاج به آب‌گیری و شفاف‌سازی دارند. عمل آب‌گیری با استفاده از الکل مطلق و شفاف‌سازی با زایلن انجام می‌شود. بنابراین، روش رنگ‌آمیزی H-E به این صورت انجام می‌شود.

۱. زایلن I و II هر یک به مدت سه دقیقه

۲. الکل‌هایی با درجات نزولی (مطلق ۹۶، ۷۰ و ۵۰ درجه) هریک به مدت سه دقیقه

۳. آب مقطر سه دقیقه

٤. هماتوکسیلین هاریس ۵ دقیقه

۵. شست‌وشو با آب جاری ۳ دقیقه

٦. ائوزین ۵ دقیقه

۷. آب مقطر ۳ دقیقه

۸. الکل مطلق ۳ دقیقه

۹. زایلن I و II هر یک به مدت ۳ دقیقه

باید دقت کنیم که:

الف) بعد از رنگ‌آمیزی، لام‌ها به مدت زیادی در الکل نمانند، چون رنگ آن‌ها زایل می‌شود.

ب) لام‌ها را باید بعد از خارج کردن از محلول ابتدا به صورت نسبی خشک، سپس وارد محلول بعدی کرد.

ج) هرچه لام‌ها مدت بیش‌تری در آخرین زایلن بماند، شفاف‌تر می‌شوند.

۷. چسبانیدن

چسباندن که اصطلاحاً مونته‌کردن مقاطع نیز نامیده می‌شود، به این مفهوم است که بعد از رنگ‌آمیزی و قبل از مطالعه‌ی مقطع، باید روی آن لامل قرار گیرد تا حمل و نقل آن آسان باشد و از آسیب دیدن مقطع جلوگیری به عمل آید.

مواد مونته کننده به دو گروه تقسیم می‌شوند:

۱. مواد آبی مثل ژله‌ی گلیسرین، محیط آپاتی و محیط فارانت. مواد آبی هنگامی برای مونته کردن به کار می‌روند که رنگ توسط الکل برداشته شده و یا از بین می‌رود مثل رنگ‌آمیزی چربی (سودان).

۲. مواد رزینی مثل کانادا بالسام، دپکس و انتلان، که در زایلن یا تولوئن حل می‌شوند.

ضریب انکسار مواد مونته کننده باید حتی‌الامکان نزدیک به شیشه باشد.

۷-۱. روش کار

۱. زیادی زایلن را از اطراف مقطع پاک می‌کنیم.

۲. یک یا دو قطره انتلان را بر مقطع می‌ریزیم و اجازه می‌دهیم تا همه‌ی سطح مقطع را آغشته کند. مقدار واقعی ماده‌ی مونته‌کننده مورد نیاز بستگی به اندازه مقطع دارد.

۳. لامل را به‌طور مایل به مقطع نزدیک می‌کنیم و آن را به آرامی روی ماده‌ی مونته کننده قرار می‌دهیم.

٤. هرگونه حباب هوا را با فشردن آرام لامل و یا به ضربات ملایم از بین می‌بریم.

۵. زیادی انتلان را می‌توان با زایلن پاک کرد.

لام‌های تهیه شده پس از ۷۲ ساعت کاملاً خشک می‌شوند. سپس می‌توان با محلول اسید الکل ۳٪ (۳ سی‌سی اسید کلریدریک در ۹۷ سی‌سی الکل اتیلیک ۹٦ درجه) لام‌ها را کاملاً تمیز و شفاف کرده. پس از حذف انتلان اضافی به کمک تیغ اسکالپل لام‌ها آماده مطالعه می‌شوند.

وجود حفره در مقطع به علت وجود حباب در مایع مخصوص قالب‌گیری یا وجود ناحیه‌ی سخت در بافت است

پی‌نوشت

1. Processing
2. Dehydration
3. Clearing
4. Infiltration-impregnation
5. Blocking-embedding-casting
6. Orientation
7. Microtome
8. Rotary microtome

منابع

۱. بهادری، مسلم؛ فن آسیب‌شناسی و روش‌های رنگ‌آمیزی؛ تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳٦۹.
۲. امیدی اشرفی، عباسعلی؛ رضایی، حسن؛ تکنیک‌های هیستوپاتولوژی؛ چاپ اول، مشهد، انتشارات دانشگاه مشهد، ۱۳٦۸.
۳. سپیدار، علی اکبر؛ موش‌ها (جوندگان)، چاپ اول، تهران، سمیران، ۱۳٦۹.
٤. الهی، الهه و همکاران؛ زیست‌شناسی پیش‌دانشگاهی؛ انتشارات آموزش‌وپرورش، ۱۳۷۷.