روش های تهیه مقاطع تشریحی

دکتر یوسفی

منبع: تکنیک های هیستوپاتولوژی. ترجمه و گردآوری، دکتر امیدی اشرفی- حسین رضایی

تهیه مقاطع تشریحی

متناسب با ماهیت نمونه و روش درخواستی ازروش های زیر برای مطالعه بافتی استفاده می شود:

- مقطع بافتی.
- تکنیک جداسازی: بافت در ظرف حاوی نرمال سیلین جدا شده و سپس روی لام قرار می گیرد.
- میکروانسینراسیون (Micrincineration): بیشتر برای تعیین عناصر معدنی در بافت به کار می رود. دو مقطع از بافت فیکس شده توسط الکل تهیه شده. یکی از آن ها در تنور مخصوص سوزانده و دیگری رنگ آمیزی معمولی شده. خاکستر یک مقطع در کنار مقطع رنگ شده بررسی می شود.
- رنگ آمیزی حیاتی (Vital staining) سلول های فاگوسیت کننده در محلول رنگی ساده با استفاده از تکنیک جداسازی رنگ می شود.
- اتورادیوگرافی: ایزوتوپ های رادیواکتیو به اعضا تزریق و سپس فیکس و مقطع گیری می شوند.

تجهیزات موجود در این آزمایشگاه

- دستگاه پردازش بافت Tissue processor آماده سازی بافت.
- میکروتوم روتاری دوار
- حمام بافت Tissue Bath
- - پارافین دیسپنسر
- - هود معمولی کلاس I
- - فور
- - انکوباتور
- - مایکروویو
- - ترازوی دیجیتالی
- میکروسکوپ نوری معمولی دوچشمی
- یخچال
- - میکروپیپت ثابت، پیپت و دماسنج
- - ظرف شیشه ای شامل ارلن مایر، قیف شیشه ای ، مزور، بشر، بالن ژوژه
- - زمان سنج، قلم الماس، جعبه لام و لامل

WATER BATH

SHIMAZ

عدسی چشمی
تغییر دهندهٔ فاصله عدسی‌ها
پیچ نگهدارنده
عدسی‌های شیئی
صفحه چرخان
دسته
گیره
تنظیم تند
تنظیم کند
صفحه میکروسکوب
کندانسور
پیچ حرکت اسلاید
لامپ
پایه
تنظیم میزان نور
کلید
migna.ir

IKA RCT basic

SHAFA GOSTAR
TEMPER CONTROL

انواع مقاطع

- مقطع بافتی، معمول ترین روش مطالعه بافت شناسی است که طی آن برش نازک از بافت تهیه و روی لام قرار داده می شود. در این روش می توان سلول ها را در رابطه با یکدیگر بدون جدا شدن از زمینه طبیعی دربافت مطالعه نمود. در این روش باید نمونه قالب گیری شود. نوع قالب بستگی به نوع بافت و نوع رنگ آمیزی دارد.

مقطع پارافینی: برای تهیه قالب از پارافین مذاب استفاده می شود

مقطع سلوئیدینی: سلوئیدین شکل خالص شده نیتروسلولز است و شبیه پارافین غیر محلول در آب است. قالب بدست آمده شبیه لاستیک است و نسبت به پارافین استحکام بیشتری دارد و برای نمونه ظریف مثل چشم استفاده می شود.

مقطع مضاعف: ترکیبی از پارافین و سلوئیدین. ابتدا سلوئیدین و سپس پارافین

مقطع ضخیم: درمواقع ضروری با تیغ برش زده شده و رنگ آمیزی می شود

اسمیر: پخش کردن نمونه با فشار روی لام

مقطع سایشی: ساییدن استخوان تا نازک شده و نور از آن عبور کند

نمونه برداری

- وسایل نمونه برداری: لوازم تشریح: (اسکالپل- قیچی- پنس- سند و...).
- اندازه نمونه: معمولا یک سانت در یک سانت مناسب است. در مورد نمونه های نادربعد از مرگ می تواند بزرگتر باشد.
- محل نمونه برداری: محلی از اندام انتخاب شود که بتوان تمام جزئیات بافتی را بررسی کرد. بافت در خصوص نمونه های آسیب شناسی باید بخشی از بافت طبیعی نیزهمراه بخش آسیب دیده بافت برداشت شود.
- انواع نمونه برداری: اتوپسی (بعد ازمرگ)- بیوپسی (بافت زنده).
- نحوه برداشت نمونه: در زمان نمونه برداری دقت شود که بافت کمترین آسیب را ببیند
- ثبت مشخصات نمونه: اطلاعات یا شناسنامه کامل نمونه ثبت شده وبه ظرف حاوی نمونه چسبانده شود.
- تثبیت ونگهداری نمونه (Fixation):

9
10
11
12
13
14
15

Formagel

Histo
Histo

مراحل تهیه مقطع بافتی

- تثبیت (Fixation)
- آبگیری (Dehydration)
- شفاف کردن (Clearing)
- آغشته کردن (Impregnation)
- قالب گیری (Blocking)
- برش یا مقطع گیری (Sectioning)
- قرار دادن برش بر روی لام
- رنگ آمیزی (Staining)
- مونتاژ یا چسباندن لامل روی لام رنگ شده (Mounting)

تثبیت کردن نمونه (Fixation)

- اهداف و اثرات فیکساسیون:

1- پایداری و نگه داری بافت بعد از مرگ تا حد امکان در وضعیت طبیعی
2- جلوگیری از اتولیز، فساد و تجزیه نمونه
3- جامد کردن مواد کلوئیدی آن
4- حفظ درجه انکسار بافت و تمایز بهتر سلول ها از یکدیگر
5- سهولت رنگ آمیزی البته با توجه به نوع فیکساتور
6- سخت کردن بافت که توسط آبگیری الکل تقویت می شود

- نکات مهم در فیکساسیون:

- نمونه تازه بوده و بلافاصله در محلول فیکساتورقرار گیرد
- ضخامت نمونه به گونه ای باشد که محلول فیکساتورتمام بخش های نمونه را در بر گیرد
- انتخاب محلول فیکساتور با توجه به نوع بافت و نوع نمونه و رنگ آمیزی انتخاب شود
- حجم محلول فیکساتور20 تا 50 برابرنمونه باشد
- دقت در انجام مراحل فیکس با توجه به نوع اندام

انواع محلول های فیکساتور

- **فرمالین:** محلول خالص آن با غلظت 40 درصد در بازار موجود است که 100 درصد محسوب می شود. گاز فرمالدئید از طریق اکسیداسیون الکل متیلیک ایجاد می شود. فرمالین 5 تا 10 درصد برای فیکس یا نگهداری نمونه ها استفاده می شود این محلول بر اثرماندن به علت تشکیل اسید فرمیک اسیدی می شود که برای جلوگیری از ایجاد لکه های قهوه ای یا طلایی در اعضائ حاوی خونی باید با افزودن کربنات کلسیم یا منیزیم ازحالت اسیدی به خنثی تبدیل می شود. می توان نمونه های حجیم را با فرمالین 10 درصد فیکس کرد که برش دادن را آسان می کند و برای حفظ رنگ طبیعی نمونه می توان آن را به مدت یک ساعت در الکل 70 درصد فروبرد. با ارزش ترین فیکساتیو برای نشان دادن فعالیت آنزیم است. مانع رسوب پروتئین ها می شود. بی ضرر ترین ماده فیکساتور می باشد. محل کار با فرمالین باید تهویه مناسب داشته باشد چون بخارات فرمالدئید برای مخاطات مضر است و هنگام کار باید از دستکش استفاده شود.

- **کلرید جیوه:** این ماده در دمای اتاق در آب به میزان 7 درصد، در آب جوشان به میزان 53 درصد و در الکل به میزان 33 درصد محلول است. باعث چروکیدگی بافت شده و لذا به تنهایی استفاده نمی شود و بیشتر در فیکساتورهای مرکب کاربرد دارد. باعث از بین رفتن شدید فلزات می شود، لذا از درب فلزی برای ظرف ها نباید استفاده شود.

- **تتروکسید اسمیوم:** گران قیمت بوده و غالبا به صورت محلول آبی دو درصد در تاریکی نگهداری می شود. به وسیله نور احیا می شود که برای جلوگیری از احیائ آن به هر 10 میلی لیتر محلول، یک قطره کلرید جیوه اضافه می شود. محلول نیم تا دو درصد آن استفاده می شود. غالبا به صورت مرکب و با املاح کروم به کار برده می شود.

انواع محلول های فیکساتور

- **اسید کرومیک:** محلول آبی یک تا دو درصد آن استفاده می شود. غالبا به صورت مرکب و با تتروکسید اسمیوم و یا دی کرومات پتاسیم استفاده می شود. تنها فیکساتوری است که سبب نگهداری کربوهیدرات ها و غیر محلول شدن آن ها در آب می شود. بافت های فیکس شده در این فیکساتور باید قبل از آبگیری در آب جاری لوله به مدت 24 ساعت شسته شوند.
- **پروکرومات پتاسیم:** به عنوان فیکساتور مرکب با دیگر فیکساتورها و یا محلول آبی 3 درصد استفاده می شود. نمونه قبل از آبگیری باید شسته شود. فیکساتور متداول برای میتوکندری می باشد.
- **اسید استیک گلاسیال:** واژه گلاسیال (یخی) به این دلیل به اسید استیک اضافه شده است که در دمای 17 درجه جامد می شود. در تعداد زیادی ازفیکساتور های مرکب جهت مقابله با چروکیدگی ایجاد شده توسط مواد دیگر مثل کلرید جیوه و یا فرمالین استفاده شده است. بیشتر به عنوان فیکساتور کروموزوم ها استفاده می شود.
- **اسید پیکریک:** به صورت خشک انفجاری است پس باید مرطوب نگهداری شود. بهتر است در آب مقطر نگهداری شود. به صورت محلول آبی یا الکلی اشباع شده حدود نیم تا یک درصد در دمای اتاق نگهداری می شود. بیشتردر محلول بوئن به کار می رود که فیکساتور ترکیبی حاوی اسید استیک گلاسیال و فرمالدئید است و یا همراه با الکل جهت فیکس گلیکوژن استفاده می شود.
- **الکل اتیلیک:** بیشتر برای آبگیری استفاده می شود ولی برای فیکس نیز از آن استفاده می شود. بیشتر در هیستوشیمی در رابطه با آنزیم ها و جهت فیکس اسمیرها کاربرد دارد. قدرت نفوذ کندی دارد.
- **استون:** بسیار شبیه الکل اتیلیک است. ضمنا آبگیر نیز می باشد. در تکنیک های هیستوشیمی بیشتر استفاده می شود. باعث حفظ گلیکوژن می شود.
- **الکل متیلیک:** جهت فیکس اسمیرهای خون و مغز استخوان در جریان رنگ آمیزی به کار می رود. مثل رنگ آمیزی لیشمن و رایت.

جدول ۱ ــ اثر معرفهای موجود در فیکساتورها بر مواد سلولی

	پروتئینها	نوکلئوپروتئین	چربی‌خنثی	گلیکوژن	میتوکندری و دستگاه گلژی	آنزیم‌ها
فورمالدئید	ترکیبات افزایشی	ترکیبات افزایشی	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	فیکس می‌شود	حفظ می‌شود
کلرید جیوه	رسوب می‌کند	رسوب می‌کند	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	ــ
تتروکسید اسمیوم	ترکیبات افزایشی	ترکیبات افزایشی	فیکس می‌شود	ــ	فیکس می‌شود	ــ
اسید کرومیک	رسوب می‌کند	رسوب می‌کند	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	ــ
بی کرومات پتاسیم	حفظ می‌شود	حل می‌شود	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	ــ
اسید پیکریک	رسوب می‌کند	رسوب می‌کند	ــ	رسوب می‌کند	ــ	ــ
اسیداستیک‌گلاسیال	فیکس نمی‌شود	رسوب می‌کند	ــ	حفظ می‌شود	تخریب می‌شود	ــ
اسیدتریکلراستیک	رسوب می‌کند	رسوب می‌کند	ــ	ــ	ــ	ــ
الکل اتیلیک	دناتوره می‌شود	دناتوره می‌شود	حل می‌شود	رسوب می‌کند	حل می‌شود	حفظ می‌شود
استون	حفظ می‌شود	حفظ می‌شود	حل می‌شود	اثرخیلی‌ضعیف	حل می‌شود	حفظ می‌شود

انتخاب فیکساتور در فیکساتورهای مرکب

- نکته مهم در انتخاب فیکساتور، اینست که هدف از بررسی لام بافتی مشخص باشد یعنی بدانیم که چه قسمتی از بافت یا سلول باید نشان داده شده و با چه تکنیکی انجام شود.

البته برخی از فیکساتورها تا حدودی در هر سه گروه جای می گیرند مثل محلول بوئن ولی بر حسب اجبار گاهی اوقات باید برخی قسمت های بافت را فدای دیدن قسمت مشخص شده نمود.

- فیکساتورها به سه گروه عمده تقسیم می شوند:

1- میکروآناتومیک: این گروه بیشترین استفاده را در تکنیک های متداول بافت شناسی دارند و ارتباط بین سلول و بافت ها را مانند زمان حیات عمدتا حفظ می کنند. در این گروه از تتروکسید اسمیوم به دلیل اختلال در رنگ آمیزی هماتوکسیلین استفاده نمی شود. نمونه هایی از این گروه در اسلاید های بعدی به همراه محاسن و معایب آورده شده است.

2- سیتولوژیک که شامل دو گروه هسته ای و سیتوپلاسمی می باشد: اساسا در ارتباط با فیکساسیون سلول و اجزائ آن به کار می رود. فیکساتورهای سیتوپلاسمی فاقد اسید استیک گلاسیال هستند چون میتوکندری و دستگاه گلژی را تخریب می کند. غالبا از تتروکسید اسمیوم برای نشان دادن این ها استفاده می شود. در فیکساتور هسته ای همیشه اسید استیک گلاسیال وجود دارد چون کروماتین هسته به این ماده تمایل دارد.

3- هیستوشیمی: این فیکساتورها سبب نگهداری مواد شیمیایی سلول و بافت می شوند ودرغالب موارد طبیعی است که جنبه های دیگر فیکساسیون را فدا کرد.

میکروآناتومیک

- **فرمل نمکی ده درصد:** 10 سی سی فرمالین با 0.9 گرم کلرید سدیم و 90 سی سی آب لوله. زمان فیکس 24 ساعت است برای نمونه کوچک.
محاسن: چروکیدگی کم ایجاد می کند- بافت برای مدت طولانی حفظ می شود به شرط تعویض مایع هر سه ماه یک بار- افزودن املاح کادمیوم و کبالت از خروج لیپید به فیکساتور جلوگیری می کند- چربی حفظ ولی فیکس نمی شود- روی سیتم عصبی اثر خوبی داشته و به عنوان محلول خنثی در اغلب تکنیک های هیستو شیمی به کار می رود- با اغلب تکنیک های رنگ آمیزی مثل تکنیک نقره نتیجه خوبی دارد- بهترین برای نمونه تشریح شده می باشد و رنگ بافت با فروبردن در الکل 70 درصد به دست می آید.

معایب: اثر آن ملایم و بافت را به اندازه کافی سخت نمی کند- در بافت رنگ آمیزی شده رنگ های اسیدی تیره تر دیده می شوند- بر روی اندام های حاوی خون ممکن است تولید انباشتگی یالکه نماید که با هیدروکسید سدیم الکلی یا اسید پیکریک برطرف می شود.

- **فرمالین ده درصد:** همان فرمل نمکی بدون کلرید سدیم می باشد. محاسن و معایب مشابه فرمل نمکی است.

- **فرمل کوروسیو(Corrosive formol):** 90 سی سی محلول آبی کلرید جیوه اسباع شده بعلاوه 10 سی سی فرمالین. زمان فیکس برای نمونه کوچک 3 تا 24 ساعت. **محاسن:** زمان فیکس سریع و فاقد چروکیدگی بافت- جزئیات سیتولوژیک و گلبول قرمز به خوبی حفظ می شود- هماهنگی با بیشتر روش های رنگ آمیزی مثل رتیکولوم نقره. **معایب:** نمونه نباید از یک سانت ضخیمتر باشد- باعث ایجاد لکه کلرید جیوه در بافت می شود.

- **محلول زنکر:** کلرید جیوه 0.5 گرم- سولفات سدیم (اختیاری) 1 گرم- بی کرومات پتاسیم 2.5 گرم و آب مقطر 100 سی سی. 5 سی سی اسید استیک گلاسیال اندکی قبل از مصرف اضافه می شود. زمان فیکس برای نمونه کوچک 12 تا 24 ساعت است. **محاسن:** برای کبد، طحال، فیبرهای بافت همبند و هسته ها عالی است- زمان نسبتا سریع فیکساسیون بدون چروکیدگی. **معایب:** بافت نباید ضخیم باشد- در صورت بقائ بافت در نمونه بیش از 24 ساعت نسج شکننده خواهد شد- برای برطرف شدن بی کرومات پتاسیم نیاز به شستشو به مدت 8 تا 12 ساعت دارد- ایجاد لکه کلرید جیوه می کند- بعد از افزودن اسید استیک گلاسیال پایدار نمی باشد.

میکروآناتومیک

- **محلول هلی (زنکر فرمل):** مشابه محلول قبلی است اما قبل از مصرف بجای اسید استیک گلاسیال 5 سی سی فرمالین به آن اضافه می شود.زمان فیکس برای نمونه کوچک 12 تا 24 ساعت است. **محاسن:** برای هیپوفیز، مغز استخوان، طحال و هسته ها توصیه می شود. رنگ آمیزی هسته نسبت به محلول زنکر نتیجه مناسب تری دارد. معایب آن همان معایب محلول زنکر است.
- **محلول بوئن:** 75 سی سی محلول آبی اسید پیکریک اشباع شده- 25 سی سی فرمالین و 5 سی سی اسید استیک گلاسیال. زمان فیکس برای نمونه کوچک 6 تا 12 ساعت. **محاسن:** مناسب برای جنین- تخریب بافتی آن اندک است- گلیکوژن را حفظ می کند- نتیجه رنگ آمیزی شفاف و برای اجزائ ریز بافت مناسب است- بافت را می توان به طور مستقیم به الکل 70 منتقل کرد. **معایب:** نفوذ ضعیف است- برای فیکس بافت کلیه مناسب نیست و برخی از ساختمان سیتوپلاسمی مثل میتوکندری تخریب می شود.
- **هایدن هاین (سوزا Susa):** 45 گرم کلرید جیوه- 5 گرم کلرید سدیم- 20 گرم اسید تریکلراستیک- 200 سی سی فرمالین و 800 سی سی آب مقطر. زمان فیکس برای نمونه کوچک 6 تا 12 ساعت. **محاسن:** برای بیوپسی، تومورها و پوست توصیه می شود- نفوذ سریع بدون چروکیدگی- رنگ آمیزی شفاف و بافت را می توان مستقیم به الکل 90 منتقل کرد. **معایب:** نمونه ضخیم نباشد- نفوذ درگلبول قرمز ضعیف است- ایجاد لکه جیوه می کند- برخی گرانیول های سیتوپلاسمی حل می شوند- امکان رنگ آمیزی الاستیک توسط وایگرت وجود ندارد

فیکساتورهای سیتولوژیک

با توجه به اینکه در درس تهیه مقطع هدف آشنایی بیشتربا نحوه فیکس بافت و رنگ آمیزی معمولی بافت ها می باشد و تشخیص اورگانل ها و گرانیول های سیتوپلاسمی یا جزئیات هسته ها که کار کاملا تخصصی محسوب می شود مورد نظر نیست، لذا از بیان محاسن و معایب فیکساتورهای سیتولوژیک صرفنظر شده است.

- **فیکساتوری سیتوپلاسمی:** این فیکساتورها همیشه فاقد اسید استیک گلاسیال می باشد چون میتوکندری و دستگاه گلژی تخریب می شود. غالبا از تتراکسید اسمیوم استفاده می شود. برخی ازاین فیکساتورها عبارتند از:

1- محلول فلمینگ فاقد اسید استیک: 15 سی سی اسید کرومیک 1 درصد بعلاوه تتراکسید اسمیوم دو درصد 4 سی سی. زمان فیکس نمونه کوچک 26 تا 48 ساعت.

2- محلول شامپی: 7 سی سی بیکرومات پتاسیم 3 درصد- 7 سی سی اسیدکرومیک 1 درصد و 4 سی سی تترواکسید اسمیوم 2 درصد. زمان فیکس برای نمونه کوچک 24 تا 48 ساعت است.

3- محلول رگود: 80 سی سی بیکرومات پتاسیم سه درصد و 20 سی سی فرمالین. زمان فیکس برای نمونه کوچک 12 ساعت.

4- محلول مولر: محلول 2.5 درصد بیکرومات پتاسیم است که در مدت 24 ساعت نمونه کوچک را فیکس می کند.

فیکساتورهای سیتولوژیک

- فیکساتورهای هسته ای: این فیکساتورها همیشه دارای اسید استیک گلاسیال هستند.

1- محلول فلمینگ: 15 سی سی اسید کرومیک یک درصد- 4 سی سی تترواکسید اسمیوم دو درصد و 1 سی سی اسید استیک گلاسیال. زمان فیکس 24 تا 48 ساعت.

2- محلول کارنوی: 60 سی سی الکل اتیلیک مطلق- 30 سی سی کلروفرم و 10 سی سی اسید استیک گلاسیال. زمان فیکس نیم تا 3 ساعت.

3- محلول بوئن: 75 سی سی اسید پیکریک آبی اشباع شده- 25 سی سی فرمالین و 5 سی سی اسید استیک گلاسیال. زمان فیکس 6 تا 24 ساعت.

4- محلول نیوکومو: 60 سی سی الکل ایزوپروپیلیک- 30 سی سی اسید پروپیونیک- 10 سی سی اترنفت- 10 سی سی استون و 10 سی سی دیوکسان. زمان فیکس در 3 درجه سانتیگراد 12 تا 18 ساعت.

- فیکساتورهای مخصوص اسمیر:

1- محلول شودین: 66 سی سی کلرید جیوه آبی اشباع شده- 33 سی سی الکل اتیلیک مطلق و 1 سی سی اسید استیک گلاسیال

2- اتر- الکل: اتر نفت و الکل مطلق به نسبت مساوی مخلوط می شود.

فیکساتورهای هیستوشیمی

- برخی از محلول ها که در تکنیک هیستوشیمی استفاده می شوند عبارتند از:
- 1- فرمل نمکی 10 درصد
- 2- الکل اتیلیک مطلق
- 3- محلول نیوکومر
- 4- استون

چگونگی فیکس نمونه های درشت

- **اندام های توخالی:** اندامی مثل معده باید با پنبه اشباع شده با فیکساتور پر شود و سپس تمام اندام در فیکساتور غوطه ور شود. توجه شود که پنبه زیاد می تواند به بافت سطح داخلی اندام آسیب بزند.
- **اندام های توپر:** باید فیکساتوردر شریان های اندام هایی مثل کلیه یا کبد تزریق شود و سپس اندام روی یک صفحه ضخیم از پنبه جاذب قرار گرفته و با استفاده از نخی که به عروق گره خورده در محلول فیکساتور معلق گردد.
- **پوست و روده:** این قبیل اندام ها باید در امتداد محور طولی باز و روی صفحات چوب پنبه ای یا چوبی با استفاده از سنجاق پهن شوند به گونه ای که سطح مخاط در بالا قرار گرفته و سپس در محلول فیکساتور قرار داده شوند. توجه شود که حتما مخاط در زیر محلول باشد.
- **ریه ها:** ریه با توجه به هوای موجود در سطح محلول شناور خواهد بود بنابراین باید سطح ریه با چند لایه گاز پنبه ای پوشانده شود و در برونش ها هم می توان محلول فیکساتور را تزریق کرد.
- **چشم:** با توجه به سختی صلبیه باید به همراه الکل فرمل دار تزریق در چشم انجام و سپس در محلول فیکساتور قرار داده شود.
- **مغز استخوان:** مقدار کمی مغز استخوان در یک لوله سانتریفیوژمخروطی حاوی فرمل زنکر قرار می گیرد. بعد از دو ساعت سانتریفیوژ انجام که در بالای لوله توده متراکمی ایجاد می شود. سپس مراحل معمولی فیکس انجام می شود.
- **مغز:** تمام مغز می بایست به وسیله طنابی که از زیر شریان باسیلار عبور می کند، آویزان شود. فیکس مغز مدت زمان بیشتری نیاز دارد.
- **نخاع:** سخت شامه اطراف نخاع باید باز شده و طناب نخاعی در یک ظرف شیشه ای بلند آویزان شود. در انتهای نخاع وزنه ای وصل می شود تا نخاع صاف بماند. البته می توان نخاع را همانند پوست یا روده هم فیکس کرد.

Decalcification

- نوعی یونیزاسیون است که طی آن املاح کلسیم از بافت استخوانی و دندان بعد از فیکساسیون جدا می گردد تا برش بافت به آسانی انجام شود. عمده روش های کلسیم زدائی عبارتند از:
- **حل کلسیم:** کلسیم از استخوان با استفاده از اسید به تنهایی و یا اسید به همراه مواد دیگری مثل الکل یا فرمالین.
- **الکتروفورز:** ایجاد الکترولیز باعث آزاد شدن یون کلسیم و کشیده شدن آن به سوی الکترود منفی خواهد شد. زمان جدا سازی کلسیم در این روش کاهش می یابد. اگر الکترولیت سرد نگه داشته شود، سرعت واکنش کند شده ولی برای رنگ آمیزی بهتر خواهد بود. روش روتین کلسیم زدایی نمی باشد.
- **تبادل یونی:** با استفاده از پلی استر و رزین ها تبادل یون کلسیم انجام می شود. ماده معمولی مورد استفاده ورسن یا E.D.T.A که مخفف اتیلن دیامین تترااستیک اسید می باشد. 5.5 گرم ماده ورسن و 100 سی سی فرمالین خنثی 10 درصد. زمان لازم برای کلسیم زدایی 7 تا 21 روز.
- محلول کلسیم زدا باید املاح کلسیم را کامل جدا کرده- اثر مضر روی سلول ها و فیبرهای بافت همبند نداشته و روی رنگ آمیزی نیز اثر منفی نداشته باشد.

محلول های کلسیم زدا

- **اسید نیتریک:** کلسیم زدای سریع و در غلظت بالا تخریب بالا دارد. اگر با الکل همراه شود تخریب کمتر خواهد شد. معمولا به صورت محلول آبی 5 درصد و یا 10 درصد و یا با معرف های دیگر استفاده می شود.
- **اسید هیدروکلریک:** بیشتر به تنهایی استفاده می شود. سرعت کلسیم زدایی از اسید نیتریک کمتر ولی قدرت تخریب به اندازه اسید نیتریک است. به صورت محلول یک درصد در الکل 70 درصد نیز برای کلسیم زدایی سطحی بلوک ها استفاده می شود.
- **اسید فرمیک:** نسبتا سریع است. میزان تخریب کم است. اسید بافت را باید قبل از آبگیری خنثی کرد. نتیجه رنگ آمیزی بهتر است. برای کار فوری توصیه نمی شود.
- **اسید تریکلراستیک:** کلسیم زدای ضعیف و کند است.
- **اسید سولفوریک:** اسید ضعیف که بیشتر برای اسپیکول های کوچک استخوانی به کار می رود.
- **فنل (اسید کربولیک):** کلسیم زدا نبوده و محلول 4 درصد آبی آن می تواند بافت های فیبروئیدی مثل رحم فیبروئید شده را نرم کند.
- **فلوروگلوسین- اسید نیتریک:** 10 سی سی اسید نیتریک و 1 گرم فلوروگلوسین. این مخلوط زیر دودکش بالای شعله هم زده و به آن 100 سی سی اسید نیتریک اضافه می شود. زملن کلسیم زدایی برای بلوک کوچک در حد 5 میلی متر حدود 12 تا 24 ساعت است. کلسیم زدای قوی ولی نتیجه رنگ آمیزی خوب نیست.
- **اسید نیتریک آبی:** 5 یا 10 سی سی اسید نیتریک و آب مقطر تا 100 سی سی. سرعت خوب برای بلوک کوچک در حد 5 میلی متر 12 تا 24 ساعت. تخریب کم.
- **محلول پرنی (Perenyi):** 4 قسمت اسید نیتریک 10 درصد- 3 قسمت اسید کرومیک نیم درصد و 3 قسمت الکل اتیلیک مطلق. زمان کلسیم زدایی برای بلوک کوچک 2 تا 7 روز. عملکرد ملایم- نتیجه رنگ آمیزی خوب و نمونه را می توان مستقیم به الکل 90 منتقل کرد.برای کلسیم زدایی روتین توصیه می شود.
- **محلول فون ابنر (Von Ebner):** 50 سی سی کلرید سدیم آبی اشباع شده- 50 سی سی آب مقطر و 8 سی سی اسید هیدروکلریک. زمان کلسیم زدایی برای بلوک کوچک 3 تا 7 روز. نسبتا سریع و نتیجه رنگ امیزی خوب. بدون شستن می توان آبگیری انجام داد. برای دندان ها توصیه می شود. برای ارزیابی میزان کلسیم زدایی از تست شیمیایی نمی توان استفاده کرد.
- **اسید فرمیک- سیترات سدیم:** 50 سی سی محلول سیترات سدیم آبی 20 درصد و 50 سی سی اسید فرمیک 45 درصد. زمان کلسیم زدایی 3 تا 14 روز. عمل آن کند بوده و برای استخوان متراکم و کلسیم زدایی نمونه های روتین توصیه نمی شود.
- **محلول فلمینگ:** 15 سی سی اسید کرومیک 1 درصد- 4 سی سی تتروکسید اسمیوم دو درصد و 1 سی سی اسید استیک گلاسیال. بیشتر فیکساتور است اما برای اسپیکول های ریز استخوان مناسب است. نمونه باید به طور کامل با آب جهت برطرف شدن املاح کروم شسته شود. تست شیمیایی برای ارزیابی کلسیم زدایی مناسب نیست.

روش های ارزیابی درجه کلسیم زدایی

- **تست های فیزیکی:** خم کردن بافت و یا استفاده از سوزن. خم کردن بافت کانون های کلسیم باقی مانده را در مرکز بافت مشخص نمی کند پس روش مطمئنی نیست. استفاده از سوزن این مشکل را برطرف می کند ولی باعث تخریب بافتی جزئی شده و اثر سوزن در بافت پس از رنگ آمیزی باعث ایجاد آرتیفکت خواهد شد. به هر حال در مواقعی استفاده از این روش ها اجتناب ناپذیر می باشد.
- **تست های شیمیایی:** اساس این تست ها بر وجود کلسیم در محلول کلسیم زدا استوار است. زمانی که کلسیم قابل تشخیص نباشد یعنی کلسیم زدایی انجام شده است. در جریان کلسیم زدایی معمولا هر 24 تا 48 ساعت محلول تعویض می شود و تست روی محلول دور ریخته شده انجام می شود.

1- استفاده از آمونیاک غلیظ که به صورت قطره قطره به 5 سی سی محلول کلسیم زدا اضافه می شود. اگر محلول به دلیل تشکیل هیدروکسید کلسیم ابری شد، نشان دهنده کامل نبودن کلسیم زدایی است.

2- اگزالات آمونیم آبی اشباع شده 0.5 میلی لیتراضافه می شود، اگرحالت ابری به دلیل وجود اگزالات کلسیم اتفاق افتاد یعنی کلسیم زدایی کامل نشده است و اگر محلول شفاف شد و بعد از 30 دقیقه نیز شفاف باقی ماند یعنی اینکه کلسیم زدایی کامل شده است.

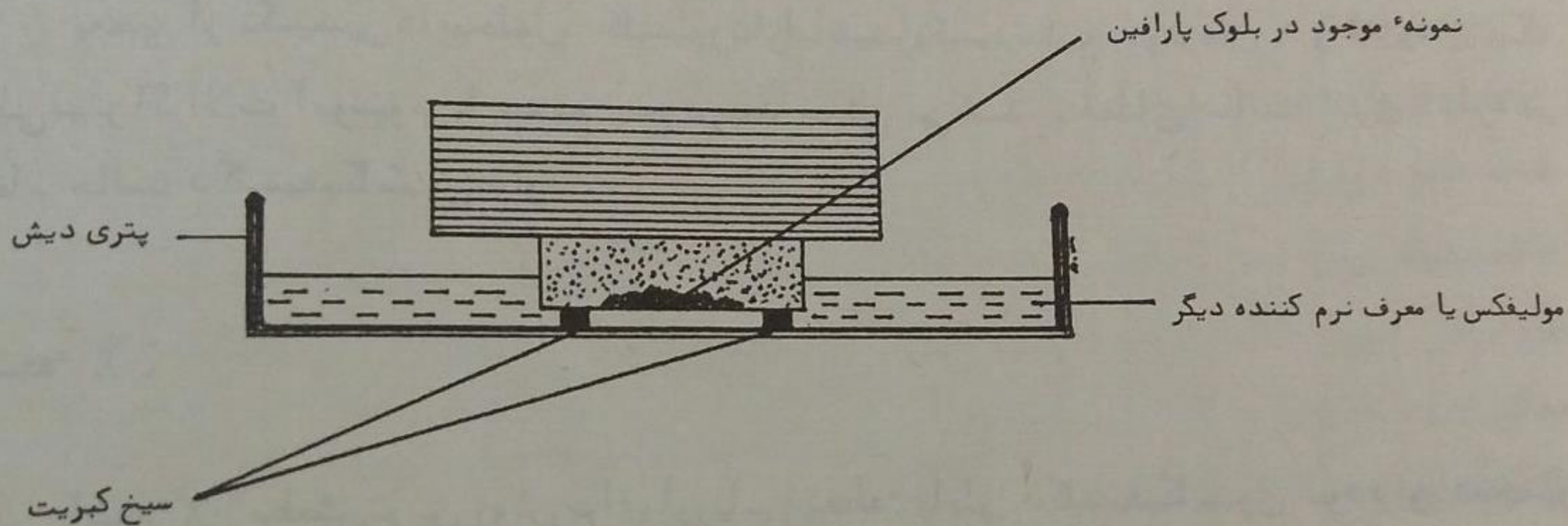
3- اضافه کردن 5 سی سی هیدروکسید سدیم دو نرمال و 1 سی سی اگزالات سدیم یا آمونیم 5 درصد و عدم مشاهده حالت ابری نشان دهنده اتمام کلسیم زدایی است.

- **اشعه ایکس:** مطمئن ترین روش برای ارزیابی اتمام کلسیم زدایی است. تنها به لحاظ اقتصادی مقرمن به صرفه نیست مگردر مواردی که تعداد زیادی نمونه با همدیگرمورد ارزیابی قرار گیرند.

کلسیم زدایی سطحی و نرم ساختن بافت های سخت

در زمان برش بافت گاها با کانون های سختی در بافت مواجه ممی شویم که برای تیغه میکروتوم مضر است بنابراین با استفاده از معرف های زیر می توان این مشکل را برطرف کرد.

- محلول پرنی: بافت فیکس شده می بایست 12 تا 24 ساعت در این محلول باشد و سپس آبگیری شود. می توان سطح بلوک را به مدت یک یا دو ساعت قبل از مقطع گیری در محلول نرم کننده قرار داد.
- روش لاندروم (Lendrum): بعد از فیکساسیون و بعد از شستن فیکساتور، بافت در فنل آبی 4 درصد به مدت یک تا 3 روز باقی بماند. سطح برش خورده بلوک برای چند ساعت قبل از مقطع گیری در فنل غوطه ور می شود. چنانچه سطح برش خورده بلوک در معرض اسید هیدروکلریک دو درصد یا اسید هیدروکلریک 1 درصد و الکل 70 درصد برای چند ساعت قرار گیرد نتیجه خوبی خواهد داشت.
- مولیفکس (Mollifex): یکی از فراورده های داروئی خانه بریتانیا می باشد. برای نرم ساختن بافت سخت در بلوک بکار می رود. سطح برش بافت برای چند ساعت در محلول قرار می گیرد.



شکل ۳ ـ چگونگی قرار گرفتن بلوک در معرف نرم کننده