



پاساز بافتی

- **آبگیری (Dehydration):** به غیر از بافت مخصوص برش های انجمادی و فرسایشی که نیاز به قالب گیری ندارند، دیگر نمونه ها می بایست آبگیری، شفاف سازی و آغشته سازی شده و سپس قالب گیری شوند. **آبگیری به معنی خارج کردن کامل آب از نمونه می باشد چه با استفاده از معرف ها و یا به صورت خشک کردن انجمادی.** معرف هایی نظیر الکل، استون و دیوکسان (دی اکسید دی اتیلن) استفاده می شوند که الکل بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. روند آبگیری بافت از الکل 70 شروع و به الکل مطلق ختم می شود. بافت در هر الکل به اندازه ای باقی می ماند که برای اشباع شدن کامل لازم است. در صورتیکه نمونه به مدت طولانی در الکل بماند سبب چروکیدگی و سختی بافت خواهد شد.
- **شفاف سازی (Clearing):** مفهوم اصلی اینکار شفاف کردن نمونه نیست بلکه جایگزین کردن مایع جاذب با ماده ای که است که قابل حل در محیطی است که قرار است نمونه در آن قالب گیری شود. بنابراین طی این مرحله الکل از بافت جدا می شود. برخی معرف های شفاف کننده عبارتند از:
 - 1- **گزیلول:** نمونه با ضخامت 5 میلی متر را طی نیم تا یک ساعت شفاف می کند. الکل را سریع جدا می کند. چنانچه زمان طولانی شود بافت سخت و شکننده خواهد شد.
 - 2- **تولون:** الکل را سریع جدا می کند و برای کارهای سریع استفاده می شود. زمان انجام کار یک تا دو ساعت.
 - 3- **بنزن:** زمان انجام کار یک تا 5 ساعت است. نسبتاً سریع، حداقل چروکیدگی را دارد ولی قابلیت اشتعال دارد.
 - 4- **کلروفرم:** زمان انجام کار 12 تا 24 ساعت است. برای نمونه های سخت مثل پوست فیبروئید و دکلسیفیه توصیه می شود. برای نمونه های بزرگ مفید است. بافت روی محلول شناور است و باید به طریقی به زیر کلروفرم برده شود.
 - 5- **تتراکلرید کربن:** زمان انجام کار 8 تا 15 ساعت است. عمل آن شبیه کلروفرم است ولی ارزانتر است. در فضای بسته بسیار سمی است.
 - 6- **لگروئن:** زمان انجام کار 12 ساعت است. اثر آن کند بوده و برای مواد روتین توصیه نمی شود. بافت را به اندازه تولون یا گزیلول سفت نمی کند.
 - 7- **روغن آنیلین:** غالباً برای شفاف کردن حشرات و جنین ها استفاده می شود.
 - 8- **روغن سدر:** زمان انجام کار دو تا سه روز است. حداقل شکنندگی و چروکیدگی را دارد ولی کند است.

پاساز بافتی

• **آغشته سازی (Impregnation):** یعنی اشباع کردن بافت توسط ماده ای که نمونه در آن قالب گیری می شود. در روش مقاطع پارافینی، یعنی خارج کردن کامل عامل شفاف کننده که غالباً گزپیل یا تولوئن می باشد و جایگزینی پارافین در بافت. **پارافین با درجه ذوب 45 تا 60 درجه** به کار برده می شود. **پارافین مورد استفاده باید عاری از گرد و غبار، آب یا اجسام خارجی باشد.** برای اطمینان از خلوص پارافین باید پارافین مذاب را با استفاده از کاغذ صافی معمولی در تنوری که دمای آن دو درجه سانتی گراد بیش از نقطه ذوب پارافین باشد، پالایش کرد. آغشته سازی با روش های زیر انجام می شود:

1- روش دستی: چهار تعویض پارافین هر یک به مدت 15 دقیقه و در آخرین تعویض به مدت 3 ساعت (جدول مربوطه در اسلاید بعدی).

2- روش اتوماتیک: دو بار تعویض پارافین انجام می شود. در این روش چون پارافین تحرک دارد بنابراین خروج عامل شفاف کننده تسریع می شود و دوبار تعویض کافی خواهد بود.

3- آغشته سازی در خلا: توسط حمام مخصوص قالب گیری در خلا انجام می شود و برای بافت هایی مانند استخوان، پوست، ریه یا هر بافت متراکم و سختی مفید بوده و آغشته سازی خیلی سریع انجام می شود.

• به هر حال نمونه نباید بیش از حد در پارافین بماند چون باعث سختی و چروکیدگی خواهد شد. اگر زمان کافی نبوده باشد نیز به دلیل بقای عامل شفاف کننده، بلوک نرم و شکننده خواهد بود و مقطع گیری بخوبی انجام نشده و مقاطع روی آب دچار شکستگی خواهند شد.

جدول ۱ : جدول زمانی عملیات تهیه مقطع برای صمغ پارافین

	روش اتوماتیک	روش دستی	تکنیک دستی سریع
فرمالین ده درصد	۲ ساعت	۲۴ ساعت	سی دقیقه در ۶۰° سانتی گراد
فرمالین ده درصد	۲ ساعت	-	-
الکل ۷۰ درصد	۲ ساعت	۶ ساعت	سی دقیقه در ۶۰° سانتی گراد
الکل ۹۰ درصد	۲ ساعت	یک شب	سی دقیقه در ۶۰° سانتی گراد
الکل مطلق	۱ ساعت	۲ ساعت	سی دقیقه در ۶۰° سانتی گراد
الکل مطلق	۱ ساعت	۱ ساعت	-
الکل مطلق + سولفات مس	* ۱ ساعت	۱ ساعت	-
الکل مطلق + استون	-	-	پانزده دقیقه در ۶۰°
استون	-	-	۱۵ دقیقه در شصت درجه سانتی گراد
گزیل یا تولوئن	۱ ساعت	۱ ساعت	۱۵ دقیقه در دمای اطاق
گزیل یا تولوئن	۱ ساعت	۱ ساعت	۱۵ دقیقه در دمای اطاق
صمغ	۲ ساعت	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه
صمغ	-	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه
صمغ	-	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه
صمغ	-	۱۵ دقیقه	۱۵ دقیقه
صمغ	۳ ساعت	۳ ساعت	یک ساعت

۵ ساعت ۱۸ ساعت ۳۲ ساعت زمان کل

* سولفات مس اختیاری است.

دستگاه اتوتکنیکون (Tissue processor)

مراحل فیکس (فرمالین)، آبگیری (اتانول)، شفاف سازی (گزیلول)، آغشته سازی (پارافین) به طور اتوماتیک در این دستگاه انجام می شود. قسمت های مختلف دستگاه عبارتست از:

- سبد کوچک برای نگهداری نمونه ها
- سبد بزرگ (زنبیل) حاوی سبد های کوچک نمونه
- ظروف شیشه ای 10 عدد برای محلول ها: یک ظرف فرمالین 10 درصد، هفت ظرف اتانول که شامل الکل 50، 70، 80، 90، 96، 100 و 100 می باشد و دو ظرف گزیلول
- ظروف فلزی گرم شونده 2 عدد جهت ذوب پارافین
- هم زن مکانیکی برای چرخاندن سبد بزرگ در محلول ها
- تایمر. تنظیم زمان که برابر زمان تنظیمی سبد بزرگ از محلولی به محلول دیگر منتقل می شود: فرمالین 2 ساعت- هر الکل 1 ساعت، الکل 100 هر کدام 2 ساعت- گزیلول به ترتیب 1.5 و 2 ساعت- پارافین به ترتیب 1.5 و 2 ساعت.



نمونه هایی از مواد مورد استفاده برای آغشته سازی و قالب گیری

- **پاراپلاست:** مخلوطی از پارافین تخلیص شده با درجه بالا و چندین پلیمر پلاستیکی است که دارای خاصیت الاستیسیته بالایی است. روش کار همانند مقطع پارافینه است. گاهی ترکیب پاراپلاست و پارافین هم مورد استفاده قرار می گیرد.

- **تیشومات:** فرآورده ای از پارافین است که دارای لاستیک است و همانند روش مقطع پارافینه استفاده می شود.

- **ژلاتین:** غالباً برای قالب گیری نمونه های نازک و قطعات بافتی که نیاز به مقاطع انجمادی دارند به کار می رود. چون محلول در آب است نمونه ها نیازی به آبگیری و شفاف شدن ندارند. نمونه فیکس شده با فرمالین باید به مدت 12 تا 24 ساعت با آب لوله شسته شود. روش کار با مقطع پارافینه متفاوت است.

- **صمغ استر (Ester wax):** از پارافین سخت تر است و نقطه ذوب آن پایینتر است. در آب نامحلول ولی به علت محلول بودن در الکل 95 امکان آغشته سازی بدون استفاده از محلول های شفاف کننده روتین وجود دارد. روش کار با این صمغ متفاوت از مقطع پارافینه است.

- **سلوئیدین:** مناسب برای نمونه های سفت و شکننده است. به طور روتین به کار نمی رود ولی برای کارهای نورولوژیک مفید است. نمونه استحکام بیشتری نسبت به پارافین خواهد داشت، بنابراین نمونه های بزرگتری را با این ماده می توان مقطع گیری کرد. چون در حین کار به حرارت نیاز نیست، حداقل چروکیدگی را دارد. اما معایب آن نسبت به پارافین بیشتر است و کمتر مورد استفاده قرار می گیرد.

- **صمغ های محلول در آب:** مهمترین صمغ محلول در آب، **گلیکول های پلی اتیلن** می باشد. نسبت به پارافین محاسنی دارد از جمله: چروکیدگی کمی دارد- نمونه نیاز به آبگیری و شفاف سازی ندارد- نمونه شکننده نمی شود- برای کاربر روی آنزیم ها مفید است- نمونه استحکام بیشتری دارد. علیرغم این محاسن به دلیل محلول بودن در آب، شناور ساختن و مونته کردن برش ها مشکل بوده و بنابراین به طور روتین مورد استفاده قرار نمی گیرد.

قالب گیری

- قالب گیری یعنی قرار دادن بافت آغشته شده در وضعیت کاملاً مناسب در قالب حاوی ماده و سپس جامد کردن بلوک روی صفحه سرد در یخچال و یا فرو بردن در آب سرد به محض تشکیل یک لایه سفت در سطح بلوک. این ماده می تواند پارافین (به طور روتین استفاده می شود) باشد یا مواد دیگری که برای قالب گیری مورد استفاده هستند.
- به محض سفت شدن، بلوک از قالب خارج می شود.
- نمونه باید با حالت دقیقی قالب گیری شود. سطحی که می بایست شروع برش گیری باشد، مشخص شود. به عبارت دیگر جهت جلوگیری از اشتباه در آغاز برش، سطح مقابل علامت زده شده و یا با شکاف کم عمقی مشخص می شود. بهتر است بخش نرم نمونه اول و بخش سخت نمونه بعداً برش زده شود.

Cold plate

صفحه سرد کننده تا منفی 10 درجه
برای منجمد و سرد کردن بلوک ها



نحوه قالب گیری

- **قالب لوکهارت** قدیمی ترین نوع قالب است که مورد استفاده است. انواع دیگری از قالب ها نیز مثل **تیشوکاست** و **یا قالب استیل** امروزه مورد استفاده قرار می گیرند.
- **مراحل قالب گیری:**

- 1- آماده سازی پارافین یعنی ذوب کردن پارافین
 - 2- آماده کردن قالب لوکهارت و تنظیم سایز بلوک مورد نظر
 - 3- تنظیم دمای پارافین مذاب در حدود 56 تا 58 درجه سانتیگراد
 - 4- پر کردن قالب از پارافین مذاب
 - 5- انتقال نمونه با استفاده از پنس داغ به داخل قالب با رعایت نکات مربوطه و جهت دلخواه. چنانچه بلافاصله نمونه انتقال داده شود احتمال دارد که نمونه در کف قالب قرار گیرد.
 - 6- وارد کردن لیبل یعنی مشخصات نمونه روی قالب
- گاهی اوقات به جای پر کردن کامل قالب از پارافین قبل از قرار دادن نمونه، ابتدا بخشی از قالب یعنی حدود یک سوم قالب از پارافین پر شده و اندکی بعد که پارافین داخل قالب کمی سفت شد نمونه در قالب قرار می گیرد و سپس تمام قالب از پارافین پر می شود. در اینحالت احتمال یک دست نبودن و دو تکه شدن قالب وجود دارد.

قالب استیل



قالب لوکهارت



تیشوکاست

این قالب برای تمام مراحل
از فیکس تا قالب گیری
می تواند استفاده شود



خطا های احتمالی مراحل مختلف

- **فیکس ناقص:** احتمال دارد بخش مرکزی نمونه فیکس نشده و در نتیجه نمونه چروکیده و برش خوب انجام نخواهد شد.
- **آبگیری ناقص:** آبگیری بخش مرکزی نمونه انجام نشده و پارافین در بافت خوب نفوذ نخواهد کرد.
- **آغشتگی ناقص:** احتمال دارد به دنبال آبگیری ناقص، عدم شفاف شدن مناسب و باقی ماندن گزیلول در بافت رخ داده و در نهایت برش خوب انجام نخواهد شد.
- **قالب گیری:** تغییر شکل قالب متداولترین اشکال در زمان قالب گیری است. شکل قالب، یک دست نبودن قالب از اشکالات این مرحله است که برش را سخت خواهد کرد.