مقایسه تهیه نمونه بافتهای نرم به روشهای سریع و معمولی جهت استفاده در میکروسکوپ الکترونی از نوع ترانسمیشن

* دکتر سهراب اکبری، دکتر حسن نیلی

*واحد میکروسکوپ الکترونی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز

خلاصه

نیاز به زمان طولانی جهت تهیه نمونه های بافتی برای استفاده در میکروسکوپ الکترونی از نوع ترانسمیشن (TEM) و استفاده از مواد فوق العاده فرار و در ضمن سرطان زا مانند پروپیلن اکسید در تهیه نمونه ها استفاده بهینه از این دستگاه مؤثر در تشخیص و تحقیقات بیولوژیك را مشکل زا می نماید. در این مطالعه نمونه بافتهای نرم کبد، پوست، مغز و روده موش سوری، با استفاده از روش سریع که طول زمان عملیات آن ۶ ساعت پیشنهاد می شود و روش معمولی که زمانی به طول ۷۴ ساعت نیاز داشت، مقایسه گردیدند. در انجام روش سریع، اندازه نمونه بافتی به نیم میلی متر مکعب تقلیل داده شد، از بافر کلوئیدین–اسید کلریدریك جهت ایجاد تسهیل در نفوذ اسمیوم تتروکسید در بافت استفاده گردید و انجماد رزین در ۸۵ درجه سانتی گراد انجام پذیرفت. در اجرای هر دو روش استفاده از استون به عنوان یك حلال کم ضرر به جای پروپیلن اکسید در تهیه نمونه‌ها مقایسه و سلولهای بافتهای مورد مطالعه از نظر ظاهری و تغییرات مورفومتریك در ارگانلهای آنها مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی کیفیت سلولها در کلیه بافتهای مورد مطالعه تشابه نزدیك آنها را نشان می دهد. در این مطالعه نشان داده شدکه جایگزینی استون به جای پروپیلن اکسید تهیه نمونه‌ها را از نظر زمانی کوتاهتر و همگنی عملیات را ساده تر می نماید. مقایسه مورفومتریك ($p< ۰/۰۵$) در بین ارگانلهای یکسان سلولهای تحت مطالعه تغییرات معنی داری را با توجه به تغییرات ایجاد شده در روش عملیات و جایگزینی حلال استون با پروپیلن اکسید نشان داد. بنابراین، با مقایسه روش معمولی با استفاده از پروپیلن اکسید، روش سریع با استفاده از استون در تهیه نمونه های بافتی نرم برای استفاده در TEM تحت شرایط پیشنهادی در این تحقیق می تواند راحت تر باشد.

کلمات کلیدی: میکروسکوپ الکترونی، بافت نرم، بیولوژی، استون، پروپیلن اکسید، تهیه نمونه، ترانسمیشن.

مقدمه

در دهه ۱۹۳۰ میلادی دریچه ای از دنیای مادون ریزبینی به وسیله کنول و روسکا (Knoll and Ruska) با کشف میکروسکوپ الکترونی بر دنیای علم باز شد. میکروسکوپ الکترونی با به کارگیری مزیت‌های موجود در طول موج بسیار کوتاه ناشی از حرکت الکترون‌ها توانست به میزان تا هزار برابر بر قدرت بزرگنمایی میکروسکوپ‌های نوری بیفزاید. با بهره مندی از این مزیت دید علمای مرتبط با علوم بیولوژی بر چهره واقعی ویروسها، عناصر تشکیل دهنده هسته سلول مثل DNA و بسیاری از ارگانل‌های ریز داخل سلولی برای اولین بار باز شد. این دستگاه جدید توانمندیهای زیادی در جهت شناخت تشکیلات واحد های حیاتی موجودات زنده ایجاد نمود. میکروسکوپ الکترونی این امکان را برای محققین فراهم کرده است تا بتوانند خصوصیت مولکولها و حتی اتم‌ها را مورد مطالعه قرار دهند (۲).

پیشرفتهای کنونی در به کارگیری میکروسکوپ الکترونی برای مطالعات بیولوژیك به صورت ناگهانی ایجاد نگردید بلکه این پیشرفتها نیازمند توسعه روشهای تهیه بافتهای مورد مطالعه موجودات بوده است . در تهیه نمونه‌های بیولوژیك برای استفاده در میکروسکوپ الکترونی از نوع ترانسمیشن (Transmission Electron Microscopy)که به صورت

Archive of SID

www.SID.ir

اختصار TEM گفته می شود، هر یك از مراحل انجام عملیات بر کیفیت تصاویر نهایی تهیه شده از میکروسکوپ تاثیر دارند(۲). تهیه نمونه‌های بیولوژیك برای استفاده در میکروسکوپ الکترونی از نوع TEM معمولاً به نه مرحله قابل تقسیم می‌باشند. این مراحل عبارتند از: (الف) ثابت کردن اولیه بافت، (ب) شستشو، (ج) ثابت کردن ثانویه، (د) شستشوی مجدد، (ه) آبگیری، (و) نفوذ دادن حلال انتقالی، (ز) نفوذ دادن رزین، (ح) قرار دادن بافت داخل رزین و (ط) عمل انجماد رزین . انجام عملیات فوق برای تهیه نمونه انواع بافتهای نرم بیولوژیك که اکثریت موارد مراجعه به آزمایشگاههای میکروسکوپ الکترونی را تشکیل می دهند با اتکا به روش ارائه شده به وسیله Robards و همکار به مدت زمانی ۷۴ ساعتی نیازمند است (۱۰). با توجه به نوع موادی که برای نفوذ در بافت استفاده می گردد، اندازه بافت و غلظت ثابت‌کننده‌های اولیه و ثانویه، مدت زمان انجام مراحل تهیه نمونه ممکن است به حداکثر ۱۶۴ ساعت افزایش یابد.

نیاز به زمان طولانی در تهیه نمونه های بافتی جهت استفاده در میکروسکوپ الکترونی همواره یکی از نکات منفی در استفاده مداوم از این وسیله در تحقیقات بیولوژیك بوده است. محققین مختلف از زمانهای گذشته با استفاده از وسائل و مواد مختلف سعی در از بین بردن این نقص کرده اند.

Hayat (۱۹۷۰) از یك روش سریع در تهیه نمونه های بافت نرم بدون مقایسه همه جانبه با روش های معمولی ذکر به میان آورده است. او که کل زمان مورد نیاز برای تهیه نمونه های بافتی را ۳ ساعت ذکر کرده است، استفاده از روش سریع در تهیه نمونه های بافتی نرم را مطلوب ارزیابی می نماید (۴). بنا به گزارش Bozzolla و همکار (۲) و بدون مقایسه با روش های معمولی، روش سریع تهیه نمونه های بافتی در بررسی های آسیب شناسی سلولی با استفاده از اپون رزین(Epon resin) و حلال پروپیلن اکسید (Propylene oxide) (۵) و با استفاده از رزین LR سفید (LR White) (۹) در حداکثر زمانی ۵ ساعت است.

هر چند که تحقیقات فوق جهت کاهش زمان عمل آوری بافتی با استفاده از بالا بردن درجه حرارت در مرحله انجماد آن بوده است، تحقیقات دیگر با استفاده از دستگاه میکروویو جهت سرعت بخشیدن به عمل ثابت کردن بافتی در هر دو مرحله ثابت کردن اولیه و ثانویه صورت پذیرفته است(۶، ۷، ۸) . سرعت بخشیدن در عمل آوری نمونه های بافتی جهت استفاده در تحقیقات ایمونوسیتوشیمی (Immunocytochemistry) هم از چشم محققین دور نمانده است. در این مورد با استفاده از ماده رزینی قابل نفوذ لوویکریل K4 M (K4M lowicryl) مدت زمان عمل آوری نمونه بافتی را به ۴ ساعت تقلیل داده اند (۱).

در عمل آوری نمونه های بافتی، مدتهاست که اثر به کارگیری عواملی مانند: غلظت، زمان و نوع ثابت کننده ها و غلظت، زمان و نوع حلال های شیمیایی که در عمل آبگیری وکمك به نفوذ رزین در بافت استفاده می گردد، بر ثابت کردن و یا خارج کردن ملکول های تشکیل دهنده عناصر سلولی ثابت شده است (۴) . در این جهت در صورت از بین رفتن و یا ثابت ماندن ملکولهای تشکیل دهنده عناصر سلولی عمل انقباضی متفاوت در ارگانل های داخل سلولی به وجود می آید که باعث تغییر در اندازه آنها خواهد بود. بنابراین، با به کارگیری عوامل جدید و توسعه روش ها در عمل آوری بافتی اثر آنها بر روی اندازه ارگانلها و یا اجزاء آنها مورد توجه می باشد.

استفاده مداوم از مواد سمی و خطرناك در عمل آوری بافتی برای کاربران دست اندرکار دارای خطرات قابل پیش‌بینی می باشد. از جمله این مواد استفاده از حلال فوق‌العاده فرّار و ایجاد کننده سرطان به نام پروپیلن اکسید می باشد (۲) . گذشته از آثار جانبی به کارگیری پروپیلن اکسید بر کاربران و کارشناسان در آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی، اثر این ماده در استخراج چربی های داخل سلولی بعد از عمل ثبوت ثانویه بافتی که به وسیله اسمیوم تتروکسید صورت می گیرد، بیش از سایر حلال ها می باشد(۴) . از این رو این تحقیق به منظور کاهش زمان تهیه نمونه های نرم در آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی و جایگزینی یك حلال کم ضرر به جای حلال پروپیلن

Archive of SID

www.SID.ir

اکسید از طریق مقایسه نتایج کیفی مقاطع بافتی در روش های مختلف عمل آوری بافتی ترسیم شده است. در این بررسی اثر به کارگیری روش های مختلف عمل آوری بافتی بر روی تغییرات اندازه ارگانلها و یا اجزاء تشکیل دهنده آنها مقایسه می گردد.

مواد و روش کار

در این مطالعه از چهار روش جهت تهیه نمونه های بافتی نرم پوست، روده، کبد و مغز موش سوری (Albino Swiss Mice, Charles Rever Strain) استفاده گردید. برای انجام روشهای به کار گرفته شده ارگانهای مورد مطالعه در حداقل زمان ممکن از حیوان بیهوش شده با اتر جدا و در داخل بافر فسفات (M ۰/۱، pH = ۷/۲) حاوی ۴٪ گلوتورالدئید قرار داده شد. بعد از جدا سازی بافتها در اندازه های لازم آنها در طول زمان تعیین شده برای ثبوت اولیه در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

روش اول : در روش اول این مطالعه روش پیشنهادی Robards و همکار که از نظر زمانی بهبود یافته است، به شرح جدول ۱ به کار گرفته شد. در این عملیات زمان خالص به کار گرفته شده ۷۴ ساعت محاسبه گردید (۱۰).

روش دوم: این روش از نظر مجموعه عملیات شباهت با عملیات در روش اول داشته با این تفاوت که در آن از استون به جای اتانول استفاده شده است. از آنجا که این حلال می تواند به عنوان یك ماده انتقالی به جای پروپیلن اکسید عمل نماید (۲) ، در این روش از پروپیلن اکسید استفاده نگردید و با توجه به حلالیت خوب اپوکسی رزین در استون از این حلال در عمل نفوذ رزین در بافت استفاد گردید. از مجموعه زمان خالص به کار رفته شده در روش اول به علت حذف زمان مجاورت دادن بافت به پروپیلن اکسید به میزان ۲۰ دقیقه در روش دوم از زمان خالص عملیات اول کم گردید.

روش سوم: این روش که یك روش سریع در عمل آوری بافتی می باشد از نظر ترتیب عملیات مشابه آنچه در روش اول عمل گردید، انجام پذیرفت. اختصاصات به کار گرفته شده در این روش این بود که: اندازه بافت به نصف کاهش پیدا کرد (۰/۵ میلی مترمکعب)، از ترکیب کولیدین- اسیدکلریدریك (Collidine-HCl) به عنوان بافر جهت بالا بردن قدرت نفوذ اسمیوم تتروکسید و از حرارت ۸۵ درجه سانتی گراد جهت انجماد رزین استفاده شد. مجموعه کل عملیات در این روش در جدول ۲ نشان داده شده است.

با تغییرات به وجود آمده در روش سوم مدت زمان عمل‌آوری نمونه‌های بافتی در این روش به ۵ ساعت و ۲۰ دقیقه تقلیل پیدا نمود.

روش چهارم: روش چهارم هم برای عمل آوری بافتی به طریق سریع استفاده گردید. با انجام تغییراتی ترتیب عملیات در این روش مشابه روش سوم بود. اختلاف این روش با روش سوم به کار گیری اتانول به جای استون در عمل آبگیری بافتی بود. با حذف استون در عملیات آبگیری بافتی از پروپیلن اکسید خالص به عنوان حلال انتقالی با دو تعویض هر کدام به مدت ۵ دقیقه پس از آبگیری کامل با اتانول استفاده گردید (۵). در این روش برای حل کردن رزین در عمل نفوذ پذیری آن از پروپیلن اکسید استفاده شد. مجموعه زمان به کار گرفته شده برای انجام این روش ۵ ساعت و ۳۰ دقیقه برآورد گردید.

در این مطالعه رزین مورد استفاده از متداول ترین نوع آن انتخاب شد. این رزین تحت عنوان کیت آگار رزین ۱۰۰ (Agar resin 100 Kit, Agar, England) می باشد. این کیت از چهار ماده تشکیل شده که برای تهیه آگار رزین در سختی متوسط استفاده گردید. از این نسبت برای تهیه رزین در هر چهار آزمایش استفاده شد.

مواد مورد استفاده از شرکت‌های آگار و مرك در خلوص مطلوب جهت استفاده در میکروسکوپ الکترونی (EM grade) و حلال‌ها و مواد شیمیایی (Analytical grade) انتخاب شدند. pH ترکیبات مورد استفاده در مجاورت بافتها شامل ثابت کننده ها و بافرهای مورد استفاده به میزان ۷/۲ تنظیم گردید. در این آزمایش از آب مقطر دوبار تقطیر در ظروف شیشه‌ای استفاده شد. کلیه مراحل عملیات بعد از انجام

Archive of SID

www.SID.ir

عمل آوری نمونه های بافتی در هر چهار روش تحت مطالعه که شامل تهیه مقاطع بافتی، رنگ‌آمیزی، بررسی نمونه و ظهور فیلم و تهیه عکس می باشد، در شرایط مساوی به شرح زیر انجام پذیرفت. مقاطع ضخیم با استفاده از دستگاه اولترامیکروتوم در ضخامت نزدیك به یك میکرون تهیه گردید. مقاطع نازك در اندازه‌ای تنظیم شد که کلیه نمونه‌ها در سطح حمام موجود در پشت تیغه اولترا میکروتوم بازتاب طلایی رنگ داشتند. مقاطع نازك بر روی صفحات مشبك (Grids) مسی با مش ۲۰۰ ثابت و سپس به ترتیب با استات اورانیل و سیترات سرب رنگ آمیزی گردیدند.

نمونه ها تحت شرایط یکسان در زیر میکروسکوپ الکترونی CM10 Philips بررسی و همگی با بزرگنمایی ۲۸۵۰۰ برابر تصویربرداری گردیدند. فیلم‌های تهیه شده از هر نمونه در شرایط یکسان با استفاده از ماده ظهور D11 در pH= ۱۱/۲ ، درجه حرارت ۲۲ درجه سانتیگراد، مدت زمان ظهور (۲ دقیقه) ظاهر و سپس با استفاده از ماده ثبوت تجارتی به مدت ۵ دقیقه ثابت گردیدند. بررسی کیفی مقاطع بافتی ضخیم پس از رنگ آمیزی با تولوئیدین بلو ۱٪ در زیر میکروسکوپ نوری انجام گرفت. مقایسه سلولی با بررسی پنج مورفومتر زیر انجام و بستگی به موقعیت آنها ارزیابی گردید (۲):

۱- همگنی در اجزاء داخل سلولی و مشخص بودن محدوده های ارگانلها، ۲- واضح بودن دیواره های اجزاء داخل سلولی، ۳- وجود و یا عدم وجود فضا های خالی در بین ساختمان میتو کندریها، ۴- تورم در میتوکندریها، ۵- وجود فضاهای کاذب در داخل سیتوپلاسم

تغییرات مورفومتری اجزاء داخل سلولی با اندازه گیری ۲۰ مورد از ارگانلها و یا اجزاء هر کدام از آنها بعد از تنظیم دکمه های مربوط به اندازه گیری محورها و اشکال با گرید استاندارد مختص برای میکروسکوپ الکترونی فیلیپس توسط این دستگاه بر حسب نانومتر در موارد زیر مطالعه گردید:

۱- بافت کبد، قطر کریستاهای داخل میتوکندری و قطر لوله های شبکه اندوپلاسمیك خشن هپاتوسیت ها، ۲- بافت مغز، قطر کریستاهای داخل میتوکندریها و قطر شبکه آندوپلاسمیك صاف در سلولهای هرمی واقع در لایه خاکستری مغز۳- روده، قطر میکروویلیها و قطر شبکه آندوپلاسمیك خشن سلولهای استوانه ای ساده روده باریك، ۴- پوست، تغییرات در قطر فیلامنهای تارهای الاستیك در قسمت میان پوست و قطر شبکه آندوپلاسمیك صاف در سلولهای رو پوست.

نتایج

کیفیت مقاطع تهیه شده

تهیه مقاطع ضخیم از هر کدام نمونه‌ها به آسانی صورت گرفته و در مقام مقایسه اختلافی بین هیچکدام از نمونه ها در تهیه مقاطع ضخیم به وسیله اولترامیکروتوم وجود نداشت. همچنانکه مقاطع ضخیم تهیه شده از چهار ارگان مختلف تحت مطالعه در اشکال 1A، 1B، 1C و 1D نشان داده شده است در کلیه مقاطع تهیه شده یکنواختی در ثابت کردن بافت‌های مختلف آشکار و محدوده‌های سلولی با توجه به آشکار بودن هسته‌های سلولی روشن می باشد. در سلولهای رو پوستی عمل‌آوری شده در روشهای کوتاه مدت محدوده بین سیتوپلاسم و هسته و همچنین وجود هستك‌ها در داخل هسته کمتر نمایان بودند (شکل1E). کیفیت اجزاء داخل سلولی چهار ارگان مطالعه شده بر اساس پنج عامل مورد بررسی در جدول شماره ۳ نمایان می باشد. در این جدول نام ارگانهای مورد بررسی و روش‌های عمل آوری آنها به صورت زیر تعریف شده‌اند:

۱- IAF = سلولهای استوانه ای روده باریك در روش سریع با استفاده از استون

۲- IPF = سلولهای استوانه ای روده باریك در روش سریع با استفاده از پروپیلن

۳- IAN = سلولهای استوانه ای روده باریك در روش معمولی با استفاده از استون

۴- IPN = سلولهای استوانه ای روده باریك در روش معمولی با استفاده از پروپیلن اکسید

۵- LAF = سلولهای کبدی در روش سریع با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

استون

۶- LPF = سلولهای کبدی در روش سریع با استفاده از پروپیلن اکسید

۷- LAN = سلولهای کبدی در روش معمولی با استفاده از استون

۸- LPN = سلولهای کبدی در روش معمولی با استفاده از پروپیلن اکسید

۹- NAF = سلولهای هرمی در ماده خاکستری مغز در روش سریع با استفاده از استون

۱۰- NPF = سلولهای هرمی در ماده خاکستری مغز در روش سریع با استفاده از پروپیلن اکسید

۱۱- NAN = سلولهای هرمی در ماده خاکستری مغزدر روش معمولی با استفاده از استون

۱۲- NPN = سلولهای هرمی در ماده خاکستری مغز در روش معمولی با استفاده از پروپیلن اکسید

۱۳- SAF = سلولهای رو پوست در روش کوتاه مدت با استفاده از استون

۱۴- SPF = سلولهای رو پوست در روش کوتاه مدت با استفاده از پروپیلن اکسید

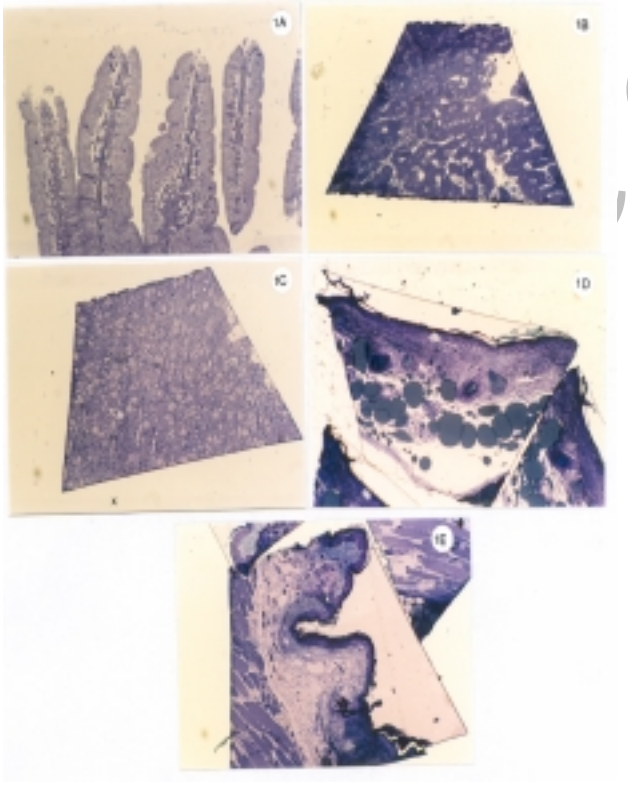
۱۵- SAN = سلولهای رو پوست در روش معمولی با استفاده از استون

۱۶- SPN = سلولهای رو پوست در روش معمولی با استفاده از پروپیلن اکسید

کیفیت ساختار داخل سلولی از نمونه هایی که به روش های مختلف تهیه شده اند در مجموعه تصاویر ۲ تا ۶ نشان داده شده است.

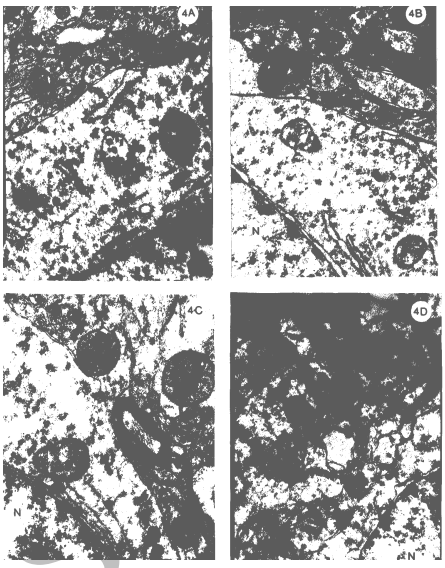
در سلولهای بر گرفته از نمونه ها، نمونه هایی قابل ملاحظه بودند که در میتوکندری آنها فضاهای خالی وجود داشته‌اند. این نمونه ها شامل نمونه‌هایی بودند که از مواردی چون 2A و در مرحله بعدی 2B (تصاویر ۲) در روش سریع گرفته شده اند در حالی که چنین فضا های خالی در داخل میتوکندری نمونه های تهیه شده به روش معمولی (2C و 2D) دیده نشد (تصاویر۲) .

موارد مشابه آن شامل کلیه موارد تصویر برداشته شده از بافت مغز در هر چهار نوع عملیات تهیه نمونه (تصاویر۴) می باشد. در نمونه های تهیه شده از ساختمان پوست در روش های سریع عمل آوری بافتی در سلولهایی که به طرف لایه رو پوست قرار داشتند و خود سلول های رو پوست همگنی ضعیف در اجزاء سلولی مشاهده گردید و دیواره های ارگانل های آنها به خوبی واضح نبودند (موارد 5A و 5B در مجموعه تصاویر شماره ۵) . در این نمونه ها فضاهای خالی در میتوکندری ها دیده شد. همگنی در اجزاء داخل سلولی با سوق پیدا کردن سلولها به طرف لایه زیر پوست (سلولهای عضلانی) تهیه شده به روش کوتاه مدت وجود داشت (تصاویر۶) و کیفیت ارگانلها مشابه با نمونه هایی بود که با روش معمولی تهیه شده اند.

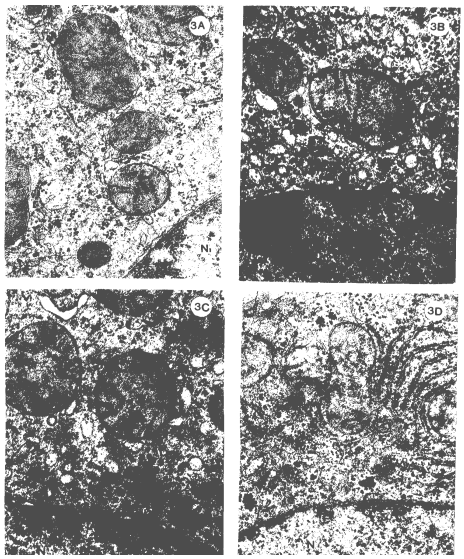


شکل ۱: ساختمان کرکهای روده (1A)، قسمت مرکزی یک لوبول کبدی(B۱) ، ماده خاکستری مغز(C۱) که نمای یکسانی در روش های سریع و معمولی تهیه بافتی داشتند.، (1D) ساختمان پوست در گوش خارجی می باشد که به روش معمولی تهیه شده و (1E) ساختمان پوست در گوش خارجی می باشد که به روش سریع تهیه شده است. کلیه بافتها از موش سوری جدا شده و با تولوئیدین بلو رنگ آمیزی شده است (بزرگنمائی ۸۸) .

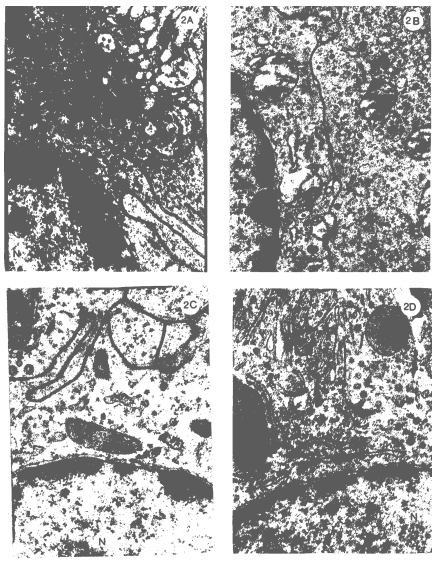
www.SID.ir



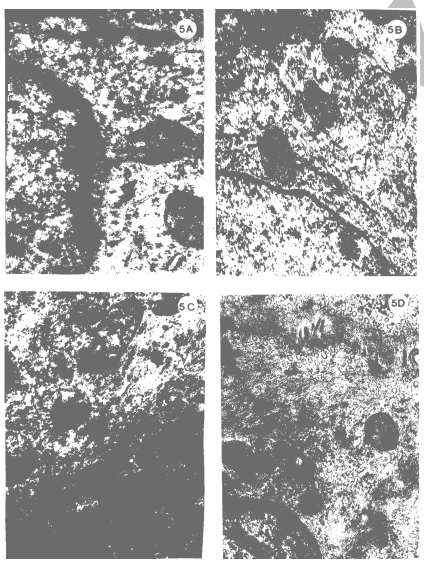
شکل ۲ : سلولهای پوششی ساده روده باریک موش سوری تهیه شده از روشهای مختلف عمل آوری بافتی جهت استفاده در میکروسکوپ الکترونی. 2A – روش عمل آوری سریع با استفاده از استون. 2B – روش عمل آوری سریع با استفاده از پروپیلن اکسید. 2C – روش عمل آوری معمولی با استفاده از استون.2D – روش عمل آوری معمولی با استفاده از پروپیلن اکسید. در اشکال مختلف هسته سلولها (N) از سیتوپلاسم قابل تفکیک می باشد. میتوکندری های حفره دار در روش های عمل آوری سریع بافتی دیده می شوند (بزرگنمائی ۲۸۵۰۰).



شکل ۳ : سلولهای هپاتوسیت موش سوری تهیه شده از روشهای مختلف عمل آوری بافتی جهت استفاده در میکروسکوپ الکترونی. 3A – روش عمل آوری سریع با استفاده از استون. 3B – روش عمل آوری سریع با استفاده از پروپیلن اکسید. 3C – روش عمل آوری معمولی با استفاده از استون. 3D – روش عمل آوری معمولی با استفاده از پروپیلن اکسید. در اشکال مختلف هسته سلولها (N) از سیتوپلاسم قابل تفکیک می باشد. نمونه ها از نظر فاکتورهای مقایسه شده دارای وضعیت مشابه می باشند(بزرگنمائی ۲۸۵۰۰).



شکل ٤ : سلولهای هرمی بافت خاکستری مغز موش سوری تهیه شده از روشهای مختلف عمل آوری بافتی جهت استفاده در میکروسکوپ الکترونی. 4A – روش عمل آوری سریع با استفاده از استون. 4B – روش عمل آوری سریع با استفاده از پروپیلن اکسید. 4C – روش عمل آوری معمولی با استفاده از استون. 4D – روش عمل آوری معمولی با استفاده از پروپیلن اکسید. در اشکال مختلف هسته سلولها (N) از سیتوپلاسم قابل تفکیک می باشد. میتوکندری های حفره دار در روش های مختلف عمل آوری بافتی دیده می‌شوند (بزرگنمائی ۲۸۵۰۰).



شکل ۵ : سلولهای رو پوست گوش خارجی موش سوری تهیه شده از روشهای مختلف عمل آوری بافتی جهت استفاده در میکروسکوپ الکترونی. 5A – روش عمل آوری سریع با استفاده از استون. 5B – روش عمل آوری سریع با استفاده از پروپیلن اکسید. 5C – روش عمل آوری معمولی با استفاده از استون. 5D – روش عمل آوری معمولی با استفاده از پروپیلن اکسید. در اشکال مختلف هسته سلولها (N) از سیتوپلاسم قابل تفکیک می باشد. در هم ریختگی در ارگانل های داخل سلولی تهیه شده با روش سریع وجود دارد. (بزرگنمائی ۲۸۵۰۰).

www.SID.ir

جـدول ۱: روش عمل‌آوری بافتهای نرم (۱۰).

زمان عملیات	مواد شیمیایی و اختصاصات عملیات	عملیات
٤ ساعت	فسفات بافر M ۰/۱ حاوی گلوتورالدئید ٤٪ اندازه بافت $1mm^3$	ثابت کردن اولیه بافت
۳۰ دقیقه	فسفات بافر M ۰/۱ ، سه بار شستشو هر بار ده دقیقه	شستشوی بافتی
۲ ساعت	اسمیوم تتروکسید ۱٪ در فسفات بافر M ۰/۱	ثابت کردن ثانویه بافت
۳۰ دقیقه	فسفات بافر M ۰/۱ ، سه بار شستشو هر بار ده دقیقه	شستشوی بافتی
۱۵ دقیقه	اتانول ۳۵٪	ابگیری بافتی
۱۵ دقیقه	اتانول ۵۵٪	ابگیری بافتی
۱۵ دقیقه	اتانول ۷۵٪	ابگیری بافتی
۱۵ دقیقه	اتانول ۹۵٪	ابگیری بافتی
۲۰ دقیقه	اتانول مطلق (دوبار تعویض) در زمانهای مساوی	ابگیری بافتی
۲۰ دقیقه	حلال انتقالی (پروپیلن اکسید دو بار تعویض)	تعویض حلال اولیه
۱ ساعت	محلول اگار ۱۰۰ رزین در پروپیلن اکسید به نسبت۱:۱	نفوذ رزین در بافت
۲ ساعت	محلول اگار ۱۰۰ رزین در پروپیلن اکسید به نسبت۱:۳	نفوذ رزین در بافت
۱۲ ساعت	محلول اگار ۱۰۰ رزین خالص	نفوذ رزین در بافت
۲ ساعت	محلول اگار ۱۰۰ رزین خالص (تعویض)	نفوذ رزین در بافت
۲۰ دقیقه	محلول اگار ۱۰۰ رزین خالص	قالب گیری
٤۸ ساعت	رزین محتوی بافت (قرار دادن در اون ٦۰ درجه سانتیگراد)	انجماد رزین

جـدول ۲: روش عمل‌آوری بافتهای نرم در زمان کوتاه مدت.

زمان عملیات	مواد شیمیایی و اختصاصات عملیات	عملیات
۳۰ دقیقه	فسفات بافر M ۰/۱ حاوی گلوتورالدئید ٤٪ اندازه بافت $0/5mm^3$	ثابت کردن اولیه بافت
۱۵ دقیقه	فسفات بافر M ۰/۱ ، سه بار شستشو هر بار ۵ دقیقه	شستشوی بافتی
۳۰ دقیقه	اسمیوم تتروکسید ۱٪ در بافر-کلوئیدین-اسیدکلریدریک	ثابت کردن ثانویه بافت
۱۵ دقیقه	فسفات بافر M ۰/۱ ، سه بار شستشو هر بار ۵ دقیقه	شستشوی بافتی
۵ دقیقه	استون ۳۰٪	ابگیری بافتی
۵ دقیقه	استون ۵۰٪	ابگیری بافتی
۵ دقیقه	استون ۷۰٪	ابگیری بافتی
۵ دقیقه	استون ۹۵٪	ابگیری بافتی
۱۰ دقیقه	استون ۱۰۰٪ (دوبار تعویض)	ابگیری بافتی
۱۵ دقیقه	محلول اگار ۱۰۰ رزین در استون خالص به نسبت ۱:۱	نفوذ رزین در بافت

جـدول ۳: مقایسه نتایج کیفی سلول‌های استوانه ای روده، سلول‌های هپاتوسیت کبد، سلول‌های هرمی مغـزی و سـلول‌هـای رو پوسـت مـوش سوری عمل آوری شده با روش های سریع و معمولی به وسیله میکروسکوپ الکترونی.

عوامل کیفی / ارگان و روش عمل‌آوردن	همگنی در اجزاء سلولی	واضح بودن دیواره اجزاء سلولی	عدم وجود فضای خالی در میتوکندری	عدم تورم در میتوکندری	وجود فضاهای کاذب در داخل سیتوپلاسم
IAF -۱	+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +
IPF -۲	+ + +	+ + +	+	+ +	+ + +
IAN -۳	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
IPN -۴	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
LAF -۵	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
LPF -۶	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
LAN -۷	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
LPN -۸	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +
NAF -۹	+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +
NPF -۱۰	+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +
NAN -۱۱	+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +
NPN -۱۲	+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +
SAF -۱۳	+	+	+	+ + +	+ + +
SPF-۱۴	+	+ +	+	+ +	+ + +
SAN-۱۵	+ + +	+ +	+ + +	+ + +	+ + +
SPN-۱۶	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +

کیفیت مطلوب = + + + کیفیت متوسط = + + کیفیت ضعیف = +

Archive of SID

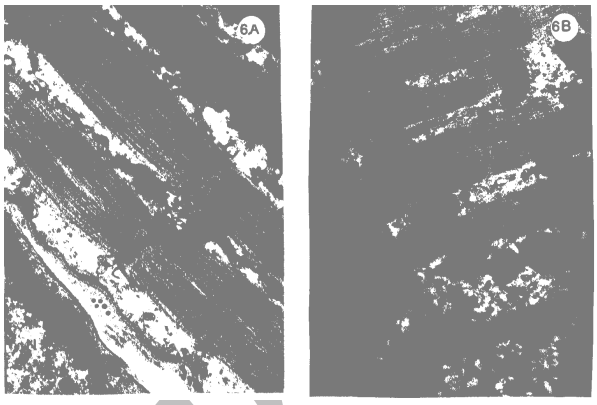
www.SID.ir

جـدول ٤: مقایسه مورفومتری اورگانل‌ها و یا اجزاء آنها در بافتهای نرم کبد، مغز، روده و پوست موش سوری توسط میکروسکوپ الکترونی.

شماره	موارد محاسبه شده	متوسط اندازه (nm)	انحراف معیار (nm)	موارد محاسبه شده
۱	LAFMC	۱۹/۲۴	±۵/۸۷	موارد محاسبه شده مربوط به بافت کبد
۲	LPFMC	۱۹/۳۱	±۳/۱۳	
۳	LANMC	۲۰/۲۴	±۳/۵۰	
۴	LPNMC	۱۹/۰۹	±۲/۷۹	
۵	LAFIRR	۴۴/۱۴	±۵/۷۳	
۶	LPFIRR	۵۸/۲۳	±۸/۷۳	
۷	LANIRR	۴۹/۲۸	±۴/۳۲	
۸	LPNIRR	۴۹/۹۳	±۶/۷۲	
۱	NAFMC	۲۵/۴۴	±۴/۰۶	موارد محاسبه شده مربوط به بافت مغز
۲	NPFMC	۲۲/۵۳	±۳/۳۸	
۳	NANMC	۲۶/۲۰	±۴/۱۱	
۴	NPNMC	۲۲/۶۳	±۴/۱۵	
۵	NAFISR	۲۸/۶۶	±۳/۹۷	
۶	NPFISR	۲۶/۶۲	±۴/۷۴	
۷	NANISR	۲۶/۳۴	±۴/۴۶	
۸	NPNISR	۲۸/۲۸	±۴/۰۷	
۱	IAFMV	۱۲۵/۰۶	±۸/۰۶	موارد محاسبه شده مربوط به بافت روده
۲	IPFMV	۱۱۴/۳۰	±۴/۸۵	
۳	IANMV	۱۲۳/۱۵	±۷/۳۳	
۴	IPNMV	۱۲۶/۶۰	±۱۰/۸۹	
۵	IAFIRR	۶۵/۲۲	±۹/۱۹	
۶	IPFIRR	۷۲/۹۶	±۱۰/۹۱	
۷	IANIRR	۶۱/۵۷	±۹/۱۹	
۸	IPNIRR	۵۸/۳۰	۱۰/۲۷	
۱	SAFMW	۶۹/۱۴	±۱۰/۰۳	موارد محاسبه شده مربوط به بافت پوست
۲	SPFMW	۷۱/۴۲	±۷/۹۶	
۳	SANMW	۷۶/۷۴	±۱۲/۳۹	
۴	SPNMW	۶۲/۱۹	±۷/۹۶	
۵	SANISR	۲۷/۵۱	±۲/۶۱	
۶	SANISR	۳۰/۰۱	±۳/۵۹	
۷	SANISR	۳۶/۷۶	±۱۲/۰۵	
۸	SPNISR	۳۰/۲۶	±۴/۹۲	

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶: سلولهای بافت عضلانی در ناحیه زیر پوست گوش خارجی موش سوری تهیه شده از روشهای سریع تهیه نمونه های بافتی جهت استفاده در میکروسکوپ الکترونی، 6A- روش عمل آوری سریع با استفاده از استون 6B- روش عمل آوری سریع با استفاده از پروپیلن اکسید. ارگانل ها در نمونه های تهیه شده از سلولهای زیر پوستی بافتهای تهیه شده با روشهای سریع عمل آوری بافتی دارای در هم ریختگی نیستند (بزرگنمائی ۲۸۵۰۰).

تغییر ات مورفومتریک ارگانل‌ها و یا اجزاء آنها

برای بررسی های انجام شده بر روی تغییرات مورفومتریك ارگانل‌ها و یا اجزاء آنها در هر سلول هدف ۲۰ مورد مختلف انتخاب و تحت زاویه یکسان اندازه‌گیری گردیدند. برای سهولت در بررسی نتایج موارد انتخاب شده همراه با خلاصه کلمات آنها با حروف لاتین در پرانتز ذکر گردیده اند. موارد انتخاب شده برای بافت کبد شامل قطر کریستاهای داخل میتوکندری (MC) و قطر لوله شبکه آندوپلاسمیك خشن (IRR) سلولهای هپاتوسیت بودند. این موارد برای سلولهای بافت مغز شامل قطر کریستاهای داخل میتوکندری و قطر لوله شبکه آندوپلاسمیك صاف (ISR) در سلول های هرمی قشر خاکستری بودند. در بافت روده قطر میکروکرك‌ها (MV) و قطر لوله شبکه آندوپلاسمیك خشن انتخاب گردید و برای بافت پوست تغییرات در قطر رشته های الاستیك (MW) واقع در زیر سلولهای اپی تلیوم و قطر لوله شبکه آندوپلاسمیك صاف سلولهای رو پوست انتخاب شد. اندازه‌گیری برای هر مورد در جدول ۴ درج گردیده است. مقایسه آماری موارد مشابه انتخاب شده برای هر بافت در روشهای عمل‌آوری مختلف از طریق آزمایش t-test با در نظر گرفتن $P<0/05$ نشان می دهد که اثر کاهش زمان عمل‌آوری و یا به کارگیری استون به جای پروپیلن اکسید به عنوان ماده انتقالی تأثیرات با مفهوم روشن و قابل پیش‌بینی بر اندازه ارگانلها و یا اجزاء آنها ایجاد می نماید. این تاثیرات با مفهوم آماری شامل کوچکتر کردن و یا ایجاد چروکیدگی در اندازه قطر کریستاهای میتوکندری سلولهای هرمی مغز در هر دو روش سریع و معمولی، ایجاد چروکیدگی در قطر رشته های الاستیك پوستی و قطر لوله های شبکه آندوپلاسمیك رتیکولوم صاف سلولهای رو پوست در روش معمولی و قطر میکروکرك های روده باریك در روش سریع در اثر استفاده از پروپیلن اکسید در تهیه نمونه های بافتی می باشد. ایجاد چروکیدگی در اثر استفاده از استون در تهیه نمونه های بافتی در مورد قطر لوله های شبکه آندوپلاسمیك رتیکولوم خشن در سلولهای هپاتوسیت و سلولهای استوانه ای ساده روده در روش سریع ملاحظه گردید.

با توجه به توضیحات فوق‌الذکر جهت مشخص نمودن خلاصه‌های مربوط به موارد محاسبه شده در تغییرات مورفومتریك ارگانل ها و یا اجزاء آنها توضیحات مربوط به جدول ۳ را با علائم خلاصه شده مربوط به هر کدام از ارگانل‌های بررسی شده توام نمائید. برای مثال LAFMC، محاسبه قطر کریستاهای میتوکندری واقع در سلولهای هپاتوسیت را نشان می دهد که با روش کوتاه مدت با استفاده از استون تهیه شده است.

بحث

کیفیت مقاطع تهیه شده

برای کلیه روشهای انجام شده در این پژوهش اصلاح بلاك‌ها (Blocks) و آشکار کردن نمونه ها (Trimming) در داخل آنها به وسیله تیغ فلزی به صورت مطلوب قابل انجام بود. به صورت تجربی این نتیجه نشان دهنده متناسب بودن میزان سختی رزین به کار گرفته شده و تناسب میزان حرارت و زمان به کار گرفته شده برای انجماد رزین درکلیه روشهای

Archive of SID
www.SID.ir

انجام شده می باشد. مقاطع ضخیم بافتی بجز در مورد نمونه های پوست که به روش سریع و با استفاده از هر دو حلال استون و پروپیلن اکسید (تصویر 1E) تهیه شده سایر مقاطع بافتی برای انتخاب سلولهای هدف مطلوب بودند. در نمونه های پوست که به روش سریع تهیه شده اند، به نظر می رسد به علت عدم توان نفوذ به موقع و کافی، ثابت کننده اولیه در طول نیم ساعت مجاورت به بافت نتوانسته است سلولهای رو پوستی را ثابت کرده و در نتیجه ثابت کننده ثانویه هم به نوبه خود نتوانسته است فاصله های مشخص هسته و سیتوپلاسم را به خوبی ترسیم نماید . تصویر 1D که بر گرفته از مجاورت ۴ ساعته بافت به ثابت کننده اولیه در روش معمولی می باشد، به صورت جزئی در قسمتی از سلولهای رو پوست این مورد صورت گرفته ولی قسمت عمده آن از این نقص دور می باشد.

Bozzola and Russell در بررسی های خود مجموعه های بافتی یکنواختی را مورد توجه قرار می‌دهند که با وجود نفوذ خوب ثابت کننده اولیه در داخل آنها حدود ارگانلهای داخل سلولی در بعضی از سلولها کاملا روشن نبودند. آنها با بررسی های خود این نتیجه را اظهار می دارند که سلولهای مختلف حتی از یك نوع توان مختلفی در جذب اسمیوم تتروکسید به عنوان ثابت کننده ثانویه دارند(۲). در بررسی های انجام شده پیرامون نتایج این تحقیق با مقایسه تصاویر1D و1E با میکروسکوپ نوری و تصاویر5A و 5B با میکروسکوپ الکترونی که در هم ریختگی ارگانلهای داخلی سلولهای رو پوست را به خوبی نمایان می کند، عدم اثر کافی ثابت کننده اولیه در سلول های رو پوست را روشن می نماید. در بررسی های میکروسکوپ الکترونی از همین مقاطع از آنجا که قسمت های زیرین بافت پوست از چنین نقصی برخوردار نمی‌باشد. به نظر می رسد که قرارگرفتن لایه شاخی برروی سلولهای اپیدرمی از نفوذ به موقع و کافی ثابت کننده اولیه در آنها جلوگیری کرده است . مقایسه بافتهای عمل آوری شده در روشهای معمولی که بافت به مدت چهار ساعت در مجاورت ثابت کننده اولیه قرار داده شده بود(تصویر 1D) و اشکال 5C و 5D در تصاویر ۵ طولانی تر کردن زمان غوطه وری بافت های پوست با ثابت کننده اولیه را در رفع این نقص در روش تهیه بافت به روش سریع قابل توجه قرار می دهد.

با توجه به تجربیات متعدد، در بین نواقص(artifacts) ایجاد شده در نمونه های تهیه شده برای استفاده در میکروسکوپ الکترونی ثبوت ناقص بافتها عمومی ترین و مهم ترین می باشند (۲). وجود نواقص ثبوت در بافتها به اندازه ای است که به قول این محققین "هرگز هیچ نوع سلولی بدون نواقص ثبوت بافتی نیست". این محققین به طور عمده نواقص ناشی از عدم ثبوت کافی بافتی را در عدم همگنی در اجزاء داخل سلول، واضح نبودن دیوارهای ارگانلهای داخل سلول، وجود فضای خالی در داخل میتوکندریها همراه با تورم آنها و وجود فضاهای کاذب در داخل سیتوپلاسم می دانند.

در نمونه‌هایی مانند 2A و 2B و کلیه نمونه هایی که از مغز تهیه گردیدند، وجود حفرات در میتوکندریها همراه با تورم در آنها قابل مشاهده بودند. این نوع نواقص می توانند به ترتیب اهمیت در اثر دو عامل ایجاد گردند. به عنوان عامل نخست این نواقص را در اثر توقف تنفس سلولی (۳) و به عنوان عامل ثانوی در اثر ثابت کردن ناکافی بافتی می شمارند(۲). از مجموع نظرات این محققین چنین استنباط می گردد که تاخیر در ثابت کردن میتوکندریها در داخل سلول و ادامه فعالیتهای حیاتی آنها در محیط خالی از اکسیژن قابل دسترسی باعث ایجاد این دگرگونیها می گردد.

عامل دیگری که ممکن است در جهت ایجاد حفره در میتوکندریها مورد توجه قرار گیرد به کارگیری حلال ها در انجام عمل آبگیری، انتقال و کمك به نفوذپذیری رزین در بافت باشد. هر چند در عملیات تهیه نمونه های بافتی در روشهای مختلف از بافر فسفات که یك بافر انتخابی و مطلوب جهت جلوگیری از ترشح مواد بعد و همراه به کارگیری مواد ثابت کننده می باشد (۱۰)، استفاده گردید ولی به کارگیری حلال هایی مثل استون و پروپیلن اکسید باعث حلالیت ترکیب های لیپیدی و خروج آنها از سلول ها می گردند.

Archive of SID

www.SID.ir

حلال های مختلف بر اساس اثرآنها بر روی حلالیت مواد لیپیدی داخل سلول حتی پس از ثابت کردن ثانویه آنها به وسیله اسمیوم تتروکسید طبقه بندی شده است . در این طبقه بندی پروپیلن اکسید بیشترین اثر را در حلالیت فسفولیپیدهای داخل سلول دارد (۴). در بین نمونه هایی که نواقص میتوکندریها را نشان می دهند، دو دسته نمونه وجود دارند. اول نمونه هایی هستند که در روش عمل آوری سریع با مجاورت نیم ساعته در مقابل ثابت کننده اولیه تهیه شدند. این نمونه ها شامل آنهایی هستند که در تصاویر 2A و 2B در نمونه های مربوط به روده و تصاویر 5A و 5B مشاهده می گردند. ایجاد نواقص در این دسته از نمونه ها می تواند در اثر زمان ناکافی مجاورت سلولها با ثابت کننده اولیه باشد. دسته دوم کلیه نمونه های مربوط به قشر خاکستری مغز می‌باشند که در کلیه تصاویر ۴ مشاهده می گردند. این نمونه ها هم در روش سریع و هم در روش معمول تهیه نمونه های بافتی دچار نواقص یکسانی در میتوکندریها گردیده اند. در مورد این نواقص در سلولهای هرمی بافت خاکستری مغز می توان عنوان کرد که تاخیر در مجاورت ثابت کننده اولیه به سلولها باعث گردیده است که آنها ایجاد گردند. Cheville حداکثر زمان رسیدن مواد ثابت کننده به سلولهای مغزی را ۱۲ دقیقه تخمین زده است . بنابراین اگر در طول ۱۲ دقیقه ثابت کننده نتواند خود را به سلولهای مغزی برساند میتوکندریها می توانند با توقف تنفس دچار نواقصی چون وجود حفره و تورم گردند(۳) .

گذشته از اثر عدم ثبوت به موقع و کامل در تهیه بعضی از نمونه های بافتی، در مرحله بعد از عمل ثبوت ثانویه نواقص قابل توجهی در بافتهای عمل آورده شده دیده نشد . نواقصی که ممکن است در طول عملیات آبگیری، نفوذپذیری رزین، قالب گیری و منجمد کردن بافت در داخل رزین ایجاد گردد عمدتا شامل ایجاد حفره هایی است که در نتیجه عدم خروج آب و یا حلال ها از داخل مواد رزینی نفوذ یافته در داخل بافت ایجاد می گردد (۲). در هر چهار عملیات انجام شده چنین حفره‌هایی در بافتها مشاهده نگردید.

با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می توان اظهار نمود که نواقص ایجاد شده در روشهای به کار گرفته شده در مورد بافت های مورد آزمایش عدم نفوذ کافی و یا به موقع مواد ثابت کننده در داخل بافت ها در روش سریع برای قسمت رو پوست، سلولهای پوششی ساده روده باریک و هرمی قشر خاکستری مغز حیوان مورد آزمایش می باشد. در حال حاضر، روش های متنوعی جهت بهبود بخشیدن به نفوذ به موقع وکافی مواد ثابت کننده به خصوص ثابت کننده اولیه در اختیار می باشد. روش های به کار گرفته شده در این پژوهش برای ثابت کردن بافت روش غوطه ور کردن بافت های مورد مطالعه بعد از جدا کردن تازه و به موقع آنها از بدن حیوان تحت آزمایش بوده است. هرچند که به کارگیری این روش می تواند کاربردی تر از روش تزریق وریدی مواد ثابت کننده در حیوان تحت آزمایش باشد ولی به کارگیری روش فرو بردن بافتی در مواد ثابت کننده اولیه برای بافت مغز به نظر می رسد که کاربردی نباشد. بنابراین باید سعی گردد در صورتی که نظر مطالعه کننده بررسی بافت هایی نظیر مغز باشد که کمبود اکسیژن اثر کوتاه مدتی در تغییرات داخل سلولی آنها دارد حتی المقدور از روش ثابت کردن بافتی به طریق تزریق وریدی استفاده گردد و در صورتی که موقعیت حیوان از نظر اندازه مجال انجام چنین روشی را نمی دهد، سرعت ثابت کردن و اندازه بافت را باید آنچنان تنظیم نمود که مواد ثابت کننده بتوانند به موقع در سلولهای هدف مطالعه نفوذ نمایند. از طرف دیگر با تحقیقات انجام شده به کارگیری میکروویو در سرعت بخشیدن به نفوذ مواد ثابت کننده در بافت وکاهش زمان ثابت کردن بافتی می تواند اثر زیادی در از بین بردن نواقص تهیه بافتی ایجاد نماید (۷، ۸).

در مورد نواقص ایجاد شده در سلولهای رو پوست و سلولهای استوانه ای ساده روده باریک به نظر می‌رسد زمان طولانی تر از ۳۰ دقیقه برای ثابت کردن اولیه بافتی در روش سریع مورد نیاز باشد. بنابراین در صورتی که اندازه بافت های مورد آزمایش

Archive of SID

www.SID.ir

به اندازه نیم میلی متر باقی بماند، می توان پیش بینی کرد که اضافه کردن حداقل ۴۵ دقیقه برای ثابت کردن اولیه بافتی می تواند در رفع نواقص ایجاد شده در تهیه بافت پوست و روده به روش سریع مؤثر باشد. در نهایت در صورتی که در عملیات تهیه بافتی به روش سریع که در این پژوهش به کار گرفته شده است ۴۵ دقیقه به مجموع عملیات اضافه گردد، کل زمان مورد نیاز تهیه بافتی به ۶ ساعت بالغ می گردد. با توجه به قابل مقایسه بودن کیفیت بافتهای تهیه شده در روش سریع با استفاده از حلال استون به عنوان ماده آبگیری کننده و کمك کننده به نفوذ رزین در بافت و اثرهای نامطلوب پروپیلن اکسید در آزمایشگاه (۲) و خارج کردن مواد لیپیدی موجود در داخل سلول (۴) توصیه می گردد که از حلال پروپیلن اکسید به عنوان یك حلال عمومی در انجام عملیات تهیه مقاطع بافتی استفاده نگردد.

تغییر ات مورفومتریک ارگانل‌ها و یا اجزاء آنها

تغییرات مورفومتریك ارگانلها و یا اجزاء آنها در داخل سلولهای تهیه شده دارای مفهوم آماری همه گیر در اندازه عوامل مورد نظر نبودند. این تغییرات در مورد چروکیده شدن کریستاهای میتوکندری سلولهای هرمی مغز در هر دو روش به کار گرفته شده، قطر رشته های الاستیك در قسمت میان پوستی و قطر لوله های شبکه رتیکولو اندوپلاسمیك صاف سلولهای رو پوست در روش معمولی و قطر میکروکرك های روده باریك در روش سریع تهیه نمونه های بافتی می باشد که در کلیه این موارد با به کار گیری پروپیلن اکسید ایجاد گردید. با مراجعه به قسمت مواد و روش کار این پژوهش ضمن توجه به اینکه مجاورت استون با بافتها در روشهای سریع و معمولی بسیار طولانی تر از پروپیلن اکسید بوده است، پروپیلن اکسید توانسته است حتی با مجاورت کوتاهتر در ارگانل های ذکر شده در فوق ایجاد چروکیدگی نماید. در سایر موارد بررسی شده هم که تغییرات مورفومتریك دارای مفهوم آماری نبودند همین نکته می‌تواند مورد توجه باشد که قدرت زیادتر پروپیلن اکسید می تواند برابر با زمان طولانی تر مجاورت استون با قسمت های مورد مطالعه در سلولها باشد. از زمانهای گذشته قدرت بالای پروپیلن اکسید در حلالیت چربیها و خروج آنها از داخل سلول به ویژه برای آن دسته از چربیها که تحت اثر اسمیوم تتروکسید ثابت نمی‌گردند، شناخته شده است (۴) . ارگانلهایی که در آنها در اثر استفاده از استون چروکیدگی ایجاد گردید تنها قطر لوله های شبکه رتیکولو اندوپلاسمیك خشن سلولهای کبدی و استوانه ای روده در روش های سریع تهیه نمونه های بافتی بودند. پیرامون چکونگی اثر استون در ایجاد چروکیدگی در این ارگانل در حال حاضر توجیهی در اختیار نمی باشد.

تشکر و قدردانی

هزینه های انجام این پژوهش از بودجه تحقیقاتی دانشگاه شیراز تامین شده است. نویسندگان به این ینوسیله از اختصاص بودجه لازم جهت اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Altman L. G., Schneider B. G., Papermaster D. S., 1984, Rapid embedding of tissues in Lowicryl K4M for immunoelectron microscopy, Histochem. Cytochem., 32: 1217-1223.
2. Bozzolla J. J., Russell L. D., Electron microscopy, Second ed., Jones and Bartlett, London, 1999, 1-147, 443-475.
3. Cheville N. F., Cell pathology, Second ed., The Iowa State University Press, Ames, Towa, USA, 1983, 1-28.
4. Hayat M. A., Principle and techniques of electron microscopy, Volume 1, Van Nostrand Reinhold Co., London, 1970, 1-179.
5. Johannesssen J. V., 1973, Rapid processing of kidney biopsies for electron microscopy, Kidney Intrnat., 3: 46-52.
6. Leonard J. B., Shepardson S. P., 1994, A comparison of heating modes in rapid fixation techniques for electron microscopy, Histochem. Cytochem., 42: 383-391.
7. Login G. R., Dwyer B. K., Dvorak A. M., 1990, Rapid primary microwave-osmium fixation. 1. preservation of structure for electron microscopy in seconds, Histochem. Cytochem., 38: 755-762.
8. Login G. R., Stavinoba W. B., Dvorak A. M., 1986, Ultrafast microwave energy fixation for electron microscopy, Histochem. Cytochem., 34: 381-387.
9. Miller L. A., 1982, Practical rapid embedding procedure for transmission electron microscopy, Lab. Med., 13: 752-56.
10. Robards A. W., Wilson A. J., Procedure in electron microscopy, John Wiley and Sons, Singapore, 1993.

Archive of SID
www.SID.ir