



مقایسه قدرت فیکساسیون فرمالین با عصاره هیدروالکلی گیاه رزماری و نفوذ آن‌ها در مغز ماهی

عارف نورایی^۱ - زهرا بختیاری^{۱*}

۱- گروه بافت شناسی ، دانشکده پیرا دامپزشکی، دانشگاه ایلام، ایران- ایران

نویسنده مسئول: z.bakhtiary@ilam.ac.ir

چکیده

روش فیکس کردن نمونه های پستانداران با ماهی ها تقریباً یکسان است اما نکته قابل توجه این است نمونه ها در ماهی بسیار سریعتر دچار اتولیز و خود هضمی می شوند. از طرفی نیاز هست که ترکیبات گیاهی جایگزین فیکس کننده معمول یا فرمالین شوند چونکه فرمالین دارای عوارض متعددی می باشد. در این مطالعه تعداد ۶ مغز ماهی در دو محلول یعنی فرمالین ۱۰ درصد و عصاره هیدروالکلی گیاه رزماری مقایسه شدند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه رزماری می تواند فیکس کننده مناسبی جهت نمونه ها و ارگان های ماهی باشد اما قدرت نفوذ آن نسبت به فرمالین کمتر است، همچنین عصاره این گیاه سبب تغییر رنگ نمونه به سمت قهوه ایی رنگ شدن می شود که می تواند با استفاده از تکنیک رنگبری کلروفیل این مشکل را نیز حل نمود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و سایر تحقیقات گذشته می توان گفت عصاره های گیاهی که خاصیت ضد قارچی و میکروبی دارند می توانند جایگزین فرمالین در تثبیت بافتی شوند.

واژه های کلیدی: فیکساسیون ، فرمالین، رزماری، مغز ماهی.

۱- مقدمه

فیکساتور انتخابی جهت تثبیت نمونه ای تشریحی و بافتی ارگان های مختلف ماهی محلول های کارنوی و فرمالین ۱۰ درصد هستند که محلول کارنوی به دلیل گران قیمت بودن و در دسترس نبودن کمتر مورد استفاده قرار می گیرد اما معمولترین روش فیکس شدن ارگان های ماهی جهت تشریح و پاساژ بافتی فرمالین است، فرمالین دارای معایب فراوانی می باشد. استفاده از فرمالین سابقه طولانی در تثبیت بافت دارد فرمالدئید اولین بار توسط دانشمند روسی به الکساندر باتلر ف در ۱۸۵۹ کشف شد [۱]. در سال ۱۸۹۳، فردیناند بلوم قدرت تثبیت کننده فرمالدئید را کشف کرد و چندین آزمایش را در مورد استفاده از فرمالین در بافت شناسی و آسیب شناسی آغاز کرد [۲]. این تثبیت کننده به مدت ۱۵۰ سال مورد استفاده قرار گرفته است و یک سازش بهینه را نشان می دهد. به طور گسترده برای حفظ مورفولوژی، آنتی ژنی و ویژگی های مولکولی اکثر بافت ها استفاده می شود [۳]. استفاده طولانی مدت از فرمالین دارای عوارض متعددی می باشد، از جمله کاهش فعالیت های حرکتی، کاهش اشتها، سردرد جزیی، سمیت عصبی غیرقابل برگشت [۴]. استنشاق فرمالین سبب ناراحتی های تنفسی و آسیب به ریه می شود [۵]. هنگامی که فرمالدئید بیش از حد وارد سیستم گردش خون می شود، می تواند به سرعت سلول های کبد، کلیه ها، قلب و مغز را نکروز کند [۶]. فرمالدئید در دمای اتاق به صورت گاز است ، اما در آب به خوبی حل شده و به صورت محلول آبی به صورت ۳۷٪ فرمالین عرضه می



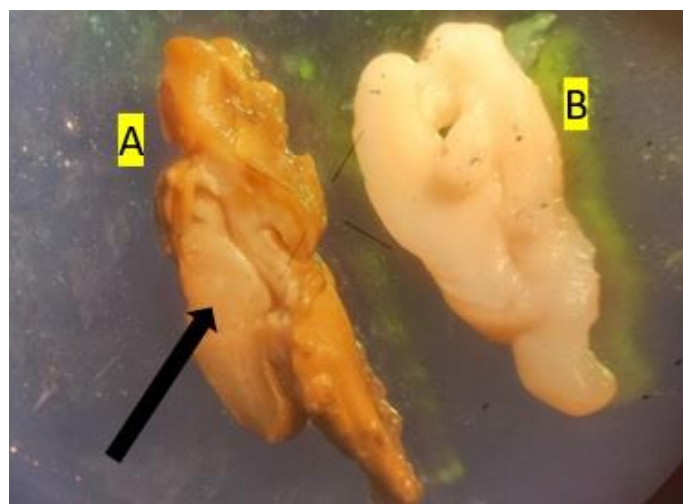
شود. امروزه این ماده به علت داشتن خواص شیمیایی موجود در آن به عنوان یک فیکساتیو خوب و ارزان، ولی بسیار مضر برای سلامتی انسان مورد توجه قرار دارد که بر این اساس مطالعات متعددی نیز بر روی خواص آن صورت گرفته است [۷]. با توجه به مطالب گفته شد نیاز به جایگزین محلولی جهت فیکس شدن نمونه های ماهی ضروری به نظر می رسد، این جایگزین باید علاوه بر خاصیت گند زدایی و فیکس کنندگی بایستی دارای اثرات ضد قارچی و میکروبی نیز باشد تا از رشد میکروارگانیسم ها در نمونه ها جلوگیری کند. رزماری می تواند جایگزین مناسبی برای این فیکساتور باشد. اسانس رزماری از ترکیباتی است که خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن در بسیاری از موارد به اثبات رسیده است و ترکیبات ضد میکروبی مانند ترکیبات فنولی به وفور در آن یافت می شود. از اسانس رزماری در لوازم آرایشی و بهداشتی نیز استفاده می شود [۸]. گیاه رزماری حاوی اولئورزین و تانن، پینن، کامفر، بورنیل استات و... می باشد. رزماری در واقع شامل مقادیر متغیری از مواد آروماتیک و فرار است که می توان به فالونوئیدهایی مانند دیوسمتین، هیسپیدولین و آپی ژن و گروه فنلی مانند کافئیک، کلروژنیک و رزمارینیک اسید اشاره کرد. هم چنین رزماری حاوی مقادیر زیادی از سالیسیالت ها می باشد [۹]. بنابراین هدف از مطالعه حاضر دستیابی به فیکساتوری طبیعی و گیاهی است که جایگزین فرمالین شود و بتواند نمونه های تشریحی ماهی را فیکس کند و ارزان قیمت و نیز در دسترس باشد.

۲- مواد و روش کار

در این مطالعه از ۶ قطعه ماهی استفاده شد، در ابتدا سر ماهی ها جدا گردید سپس در ناحیه دوسال جمجمه برشی میانی- خلفی زده شد و استخوان های ناحیه سقف جمجمه برش داده شدند در ادامه پوست و استخوان های سقف جمجمه برداشته شدند در گام بعدی استخوان های جانبی جمجمه توسط پنس دندان موشی به آرامی شکسته شدن و سپس از قسمت حباب بویایی به سمت مخچه کل مغز به آرامی برداشته شد. نمونه های مغزی جدا شده در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند. در این مطالعه از فرمالین تجاری ۳۷ درصد استفاده شد که به نسبت ۱ به ۹ با آب مقطر رقیق شد تا فرمالین ۱۰ درصد به دست آید. همچنین نمونه های مغز ماهی در گروه دوم در محلول عصاره رزماری فیکس شدند. عصاره رزماری به روش سوکسوله و عصاره هیدروالکلی به دست آمد. پس از گذشت یک هفته از قراردادن این دو نمونه نمونه ها در این دو محلول، مغزها متعاقب برش میانی به دو نیم تقسیم شدند. علاوه بر آن برش فرونتال نیز داده شدند تا میزان نفوذ این دو محلول در نمونه ها بررسی شوند.

۳- نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه رزماری قدرت نفوذ کمتری در نمونه های تشریحی مغز داشت (شکل ۱) ولی فرمالین ۱۰ درصد به خوبی در نمونه ها نفوذ کرده بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که از عصاره گیاه رزماری می توان برای نمونه هایی با ضخامت کم استفاده شود. نتایج این مطالعه نشان داد که می توان با جداسازی فرکشن های موثر در فیکس کنندگی گیاه رزماری می تواند این عصاره جایگزین مناسبی جهت فیکس کردن نمونه ها در فرمالین باشد. در بررسی ظاهری نمونه ها مشاهده شد که نمونه های فیکس شده با رزماری تا حدودی تغییر رنگ دادند (شکل ۲) که این تغییر رنگ می تواند تاثیرات منفی داشته باشد بنابراین با رنگ بری این عصاره با کربن فعال و الکل می توان این مشکل را نیز بر طرف نمود.



شکل ۱: مقایسه قدرت نفوذ رزماری و فرمالین. (A) نمونه فیکس شده با رزماری. فلش مشکی نشان دهنده رنگ روشن تر قسمت میانی مغز نسبت به لایه ی قشری، نشان دهنده نفوذ ضعیف عصاره رزماری به لایه های درونی مغز. (B) نمونه فیکس شده مغز با فرمالین ۱۰ درصد.



شکل ۲: مقایسه فیکسسیون رزماری و فرمالین. (A) نمونه فیکس شده با رزماری. تغییر رنگ به سمت قهوه‌ای شدن کاملاً مشهود است. (B) نمونه فیکس شده با فرمالین کاملاً رنگ طبیعی خود را حفظ کرده است.

امروزه استفاده از فیکساتورهای مناسب جهت حفظ ارگان های ماهی از اهمیت ویژه ای برخوردار است، فیکساتوری که علاوه بر حفظ مورفولوژی ارگان ها بتواند در تثبیت بافتی جهت انجام هرگونه تکنیک بافت شناسی مناسب باشد و از طرفی این فیکساتور بر سلامت فرد تاثیر نگذار و ارزان و در دسترس باشد. معمولترین فیکساتور جهت حفظ مورفولوژی و تثبیت بافتی در ماهی ها محلول کارنوی و فرمالین هستند که هرکدام دارای عوارض بسیاری می باشند از این رو تحقیقات به سمتی پیش رفت که محققین بتوانند جایگزین مناسبی جهت فرمالین پیدا کنند. Lam-Ubol و همکاران در مطالعه ایی به بررسی قدرت فیکس کنندگی عصاره انگور و میپوآکائین پرداختند مطالعه آن ها نشان داد که در ۲۴ ساعت و ۷۲ ساعت پس از فیکس شدن نمونه و انجام پاساژ بافتی قدرت فیکس کنندگی این دو ماده همانند فرمالین بود و تفاوت چندانی بین نمونه های مختلف مشاهده نشد [۱۰]. در مطالعه ایی دیگر



که به بررسی خاصیت فیکس کنندگی عسل و فرمالین و مقایسه آن با فیکس کنندگی الکل و فرمالین پرداخته شد نشان داده شد که ترکیب عسل و فرمالین می تواند یک فیکس کننده مناسب باشد؛ عسل می تواند خاصیت توکسیک و بوی تند و نامطبوع فرمالین را کاهش دهد [۱۱]. مطالعات متعددی نشان داده اند که شکر، عسل، انگور و الوئه ورا می توانند جایگزین های طبیعی جهت فیکس نمونه های بافتی و تشریحی باشند [۱۲]. فیکس کننده های طبیعی بی ضرر و دوستدار محیط زیست هستند، توانایی حفظ مورفولوژی بافت مشابه فرمالین را دارند، مقرون به صرفه هستند و به راحتی در طی پردازش آزمایشگاهی و رنگ آمیزی قابل استفاده هستند، و پتانسیل جلوگیری از اتولیز و پوسیدگی بافت ها را دارند. [۱۳]. در مطالعه ای به بررسی اثرات شکر زرد و امواج مایکروویو بر روی قدرت تثبیت کنندگی بافت ها نشان داده که می تواند این دو را به عنوان جایگزین فرمالین در تثبیت بافت ها استفاده کرد (۱۲). در مطالعه ای دیگر نیز نشان داده شد که محلول سرکه نیشکر می تواند نمونه های بافتی را به خوبی تثبیت کند، آن ها نشان دادند که سرکه نیشکر بهتر از فرمالین ساختارهای بافتی را حفظ می کند بنابراین می تواند جایگزین مناسبی باشد که هیچگونه عوارضی بر سلامت افراد ندارد [۱۴]. در مطالعه ای جهت بهبود فیکس شدن کل بدن ماهی و نمونه های بافتی ماهی، کل بدن ماهی را به مدت ۱ ساعت در محلول فرمالین ۲۰ درصد و سپس به مدت ۵ ساعت در محلول بوئن قرار دادند، نشان داده شد به این روش کل بدن ماهی فیکس می شود مزیت این روش این است که نمونه فقط به مدت ۱ ساعت در فرمالین قرار می گیر و در نتیجه مواجهه با فرمالین بسیار کم می شود [۱۵]. هرچند که روش فیکس کردن نمونه های پستانداران با ماهی ها تقریباً یکسان است اما نکته قابل توجه این است نمونه ها در ماهی بسیار سریعتر دچار اتولیز و خود هضمی می شوند [۱۶] با توجه به نتایج مطالعه حاضر و سایر تحقیقات گذشته می توان گفت عصاره های گیاهی که خاصیت ضد قارچی و میکروبی دارند می توانند جایگزین فرمالین در تثبیت بافتی شوند.

مراجع

1. Gatta, L. B., Cadei, M., Balzarini, P., Castriciano, S., Paroni, R., Verzeletti, A., ... & Grigolato, P. (2012). Application of alternative fixatives to formalin in diagnostic pathology. *European journal of histochemistry: EJH*, 56(2).
2. Plénat, F., Antunes, L., Haller, T., Piet-Ounnoughene, M., Klein-Monhoven, N., Champigneulle, J., ... & Labouyrie, E. (2001, February). Formaldehyde fixation in the third millennium. In *Annales de pathologie* (Vol. 21, No. 1, pp. 29-47).
3. Abdu, H., Kinfu, Y., & Agalu, A. (2014). Toxic effects of formaldehyde on the nervous system. *International Journal of Anatomy and Physiology*, 3(3), 50-59.
4. Dan, S., Pant, M., Kaur, T., & Pant, S. (2020). Toxic effect of formaldehyde: A systematic review.
5. Nelson, N., Levine, R. J., Albert, R. E., Blair, A. E., Griesemer, R. A., Landrigan, P. J., ... & Swenberg, J. A. (1986). Contribution of formaldehyde to respiratory cancer. *Environmental Health Perspectives*, 70, 23-35.
6. Pandey, C. K., Agarwal, A., Baronia, A., & Singh, N. (2000). Toxicity of ingested formalin and its management. *Human & experimental toxicology*, 19(6), 360-366.
7. Chapot, B., Secretan, B., Robert, A., & Hainaut, P. (2009). Exposure to hazardous substances in a standard molecular biology laboratory environment: evaluation of exposures in IARC laboratories. *Annals of occupational hygiene*, 53(5), 485-490.
8. Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T., & Steinmann, E. (2013). Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *British journal of pharmacology*, 168(5), 1059-1073.



9. Yamakuchi, M., Bao, C., Ferlito, M., & Lowenstein, C. J. (2008). Epigallocatechin gallate inhibits endothelial exocytosis.
10. Lam-Ubol, A., Kitruangphatchara, K., Putthanuparp, T., Arayakhun, R., Kwanthong, R., & Choonhawarakorn, K. (2018). Nonformalin fixative agents: a comparative study of fixative efficacy and histomorphology. *International Journal of Surgical Pathology*, 26(8), 701-706.
11. Özkan, N., Şalva, E., Cakalağaoğlu, F., & Tüzüner, B. (2012). Honey as a substitute for formalin?. *Biotechnic & Histochemistry*, 87(2), 148-153.
12. Zainab, H., Hugar, D., Sultana, A., Moinuddin, M. K., Hussain, R., & Gadgikar, R. (2025). Comparison of Natural and Synthetic Fixative Using Routine and Microwave Fixation. *Bharati Vidyapeeth Journal of Dentistry and Allied Sciences*, 2(1), 10-17.
13. Sinha, N., Nayak, M. T., Sunitha, J. D., Dawar, G., Rallan, N., & Gupta, S. (2017). Comparative efficacies of a natural fixative with a conventional fixative. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 21(3), 458.
14. Gotur, Suhasini P., Nagaraju Kamarthi, and Vijay Wadhwan. "Sirka: An alternative to the formalin fixative." *Indian Journal of Pathology and Microbiology* (2023).
15. Miki, M., Ohishi, N., Nakamura, E., Furumi, A., & Mizuhashi, F. (2018). Improved fixation of the whole bodies of fish by a double-fixation method with formalin solution and Bouin's fluid or Davidson's fluid. *Journal of toxicologic pathology*, 31(3), 201-206.
16. Vendramin, N., Mikkelsen, S. S., & Olesen, N. J. (2015). Inter-laboratory proficiency test on notifiable fish diseases: a tool to strengthen diagnostic capacities for viral fish diseases. In *17th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish* (pp. 389-389). European Association of Fish Pathologists.