DOI: 10.22092/vj.2017.115603.1365
شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تشخیص بافت‌های گیاهی در فرآورده‌های خام گوشتی با روش بافت‌شناسی

• **حسن مروتی (نویسنده مسئول)**
استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
• **مسعود ادیب مرادی**
استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
• **حمیدرضا مرادی**
دانش آموخته دکتری تخصصی بافت شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
• **مازیار تقوی**
کارشناس مسئول آزمایشگاه گوشت، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، موسسه تحقیقات استاندارد، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۷-۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۸-۲۱
Email: hmorovvati@ut.ac.ir

چکیده

استفاده از بافت‌های غیرمجاز، پروتئین‌ها و پرکننده‌های با منشأ گیاهی در تولید فرآورده‌های گوشتی در سال‌های اخیر افزایش یافته است. به‌منظور کنترل مواد تشکیل دهنده این محصولات آزمون‌های شیمیایی پاسخو نیستند و باید از روش بافت‌شناسی بهره برد. این مطالعه با هدف بررسی ساختارهای گیاهی مورد استفاده در تهیه فرآورده گوشتی حرارت ندیده (همبرگر) و مقایسه آن‌ها با عضله اسکلتی توسط روش بافت‌شناسی انجام گرفت. دراین مطالعه از عضله اسکلتی سینه مرغ، سویا، ایزوله سویا، گلوتن، پیاز، سیر، پودر پیاز، پودر سیر، فلفل دلمه و قارچ استفاده گردید. پس از تهیه جداگانه هریک از مخلوط‌های هموژن، نمونه‌ها به منظور ثبوت بافتی در فرمالین بافری ۱۰ درصد قرار گرفتند. برش‌های ۶ میکرومتری به روش استاندارد تهیه مقاطع بافتی تهیه و با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و تریکروماسون رنگ‌آمیزی شدند. نهایتاً، لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. نتایج مقاطع بافتی نمونه‌های سویا، گلوتن، سیر و پیاز نشان داد که این ترکیبات همانند عضله اسکلتی و سایر بافت‌های حیوانی دارای ساختار سلولی هستند که تفکیک آن‌ها در رنگ‌آمیزی H&E مشکل است. در رنگ‌آمیزی تریکروماسون این ساختارهای بافت گیاهی به‌طور کامل از عضله اسکلتی قابل تمایز بودند. با ارائه یافته‌های کلیدی تشخیصی در این مطالعه می‌توان گفت که بافت‌شناسی با کمک رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی نظیر تریکروماسون روش بسیار مناسبی برای تشخیص ساختار گیاهی از بافت‌های مجاز و غیرمجاز در فرآورده‌های گوشتی خام است.

کلمات کلیدی: بافت‌شناسی، فرآورده گوشتی،عضله اسکلتی، بافت گیاهی

● Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 123-132

Detection of herbal tissues in raw meat products using histology method

By: Morovvati, H., (Corresponding author) Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran. Adib Moradi, M., Professor, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran. Moradi, HR., PhD Graduate of Histology, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran. Taghavi, M., Senior expert of meat laboratory, Food Industry and Agriculture Department, Standard Research Institute, Karaj, Iran.

Email: hmorovvati@ut.ac.ir

Received: 2017-10-09 **Accepted: 2017-11-12**

The usage of unauthorized tissues, proteins and fillers with herbal origin in manufacture of meat products has increased in recent years. In order to control ingredients of these products, chemical tests are not accountable and histological methodsshould be used. This study was carried out aimed to investigate different herbals and proteins structures used in preparation of unheated meat products (hamburger), and comparing them with skeletal muscle tissue using histology. In this study, skeletal muscle tissue of chicken breast, soybeans, soy isolate, gluten, onion, garlic, onion powder, garlic powder, capsicum and mushrooms were used. After separate productionof each homogenized mixture, samples were placed in 10% buffered formalin for fixation. The 6 µ thickness sections were made using paraffin embedding method and stained by hematoxylin and eosin (H&E)and Masson's trichrome. Results of tissue sections of soy, gluten, garlic and onion showed that these mixtures similar to skeletal muscle and other animal tissues have cell structure that their separation is difficult in H&E staining. In Masson's trichrome, these herbal tissue structures were completely distinguishable from skeletal muscle.Through key diagnostic findings in this study, we can say that, histology with help of specific staining, such as Masson's trichrome is considered as a suitable method for detection of herbal structure from authorized and unauthorized tissues in raw meat products.

Key words: Histology, Meat product, skeletal muscle, Herbal tissue

مقدمه

فرآورده‌های گوشتی در ایران بر اساس درصد گوشت بکار رفته در فرمول ساخت آن‌ها به ۵ گروه فرآورده‌های گوشتی با ۴۰-۳۰ درصد گوشت، ۶۰-۵۵ درصد گوشت، ۷۰ درصد، ۸۰ درصد و ۹۰ درصد گوشت تقسیم می‌شوند (۳). استفاده از مواد اولیه مرغوب و مجاز و رعایت شرایط مطلوب بهداشتی در تولید این فرآورده‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. به منظور تهیه این محصولات علاوه بر گوشت اجزای دیگری به‌کار گرفته می‌شود. این فرآورده‌ها از نظر کمی و کیفی طبق ضوابط و استانداردهای ملی هر کشور تهیه و تولید می‌شوند (۹ و ۱۲). یکی از پرمصرف‌ترین فرآورده‌های گوشتی درسراسر جهان همبرگر است (۶).همبرگر در ایران عبارت است از گوشت چرخ‌کرده حیوانات حلال گوشت از قبیل گاو، گوساله، طیور که سایر ترکیبات مجاز معطر و گیاهی نیز به آن اضافه شده است.همواره به‌دلیل گرانی گوشت و محدودیت منابع تأمین آن، ازکیفیت و ارزش تغذیهای این فرآورده‌ها کاسته شده است. استفاده از بافت‌های غیرمجاز خوراکی، پروتئین‌ها و پرکننده‌های با منشأ گیاهی در تولید این محصولات در سال‌های اخیر با توجه به گزارشات، آمار و ارقام افزایش یافته است (۱). در بسیاری از مطالعات وجود این مواد غیرمجاز در فرآورده های گوشتی مختلف نشان داده شده است (۱ و ۲). دستورالعمل‌های کنترل کمی و کیفی (از نظر ترکیبات و مواد تشکیل‌دهنده) طبق مقررات و استانداردهای مدون تهیه و تولید می‌شوند.کنترل بهداشتی این فرآورده‌ها طبق دستورالعمل‌های موجود با روش‌های میکروبیولوژی انجام می‌شوند. اما به‌منظور کنترل مواد تشکیل‌دهنده این آزمون‌های شیمیایی جوابگو نیستند و بایستی از روش بافت‌شناسی بهره برد. در مطالعه ایزدی و همکاران (۲۰۱۶) با ارزیابی بافت‌های غیرمجاز درگوشت چرخکرده عرضه شده در شهر یزد نشان دادند که روش بافت‌شناسی روش بسیار مناسبی برای شناسایی تقلبات درفرآورده‌های گوشتی است (۳). لذا، آزمون بافت‌شناسی به‌عنوان روشی مرسوم و قابل اعتماد به‌منظور کنترل کیفیت دقیق محصولات گوشتی مدنظر قرار دارد. از این روش به عنوان آزمون تکمیلی در کنار آزمون‌های معمول شیمیایی کنترل کیفیت فرآورده‌های گوشتی بر اساس استاندارد ملی ایران استفاده می‌شود. روش بافت‌شناسی می‌تواند ساختارهای بافتی حیوانی (مجاز و غیرمجاز) از قبیل بافت‌های عضله، همبندی استخوان،

غضروف و غیره را در فرآورده‌های گوشتی مشخص کند. مطالعات بسیاری از روش بافت‌شناسی برای تشخیص و تعیین بافت‌های غیرمجاز در فرآورده‌های گوشتی از قبیل سوسیس، کالباس، همبرگر و گوشت چرخ‌کرده بهره برده‌اند (۱، ۴ و ۸). با توجه به این نکات، چالش‌ها و موانع تشخیصی نیز برای روش بافت‌شناسی وجود دارد که ممکن است مسیر کنترل کیفی فرآورده گوشتی را مشکل سازد. همچنین، قابل ذکر است که بجز بافت‌های عضله و هم‌بندی در تولید فرآورده‌های گوشتی ترکیبات دیگری از قبیل سویا، ایزوله پروتئین سویا، گلوتن، پیاز، سیر، پودر پیاز، پودر سیر، فلفل دلمه، قارچ و انواع دیگر بافت‌های گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بسیاری از این بافت‌های گیاهی نیز همانند بافت‌های حیوانی دارای ساختار سلولی مشخص هستند (۱). لذا یکی از چالش‌های پیش‌رو برای شخص بافت شناس و آزمایشگاه‌های تشخیصی و کنترل کیفی فرآورده‌های گوشتی تشخیص و تمیز این بافت‌های گیاهی و حیوانی مختلف از یکدیگر با روش بافت‌شناسی متعاقب مراحل مختلف فرآوری می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی و نشان‌دادن ساختارهای مختلف گیاهی و پروتئینی (سویا، ایزوله سویا، گلوتن، پیاز، سیر، پودر پیاز، پودر سیر، فلفل دلمه، قارچ) مورد استفاده در تهیه فرآورده گوشتی حرارت‌ندیده (همبرگر) و مقایسه آن‌ها با بافت عضله اسکلتی توسط روش بافت‌شناسی انجام می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از بافت عضله اسکلتی سینه مرغ، سویا، ایزوله سویا، گلوتن، پیاز، سیر، پودر پیاز، پودر سیر، فلفل دلمه و قارچ استفاده گردید. به‌منظور بررسی دقیق و حداکثر نزدیکی ساختارهای گیاهی مورد استفاده در ترکیبات فرآورده گوشتی تمام مواد گیاهی و پروتئینی در مطالعه حاضر از شرکت و کارخانجات صنایع غذایی گوشتیران (تهران) تهیه گردیدند. برای تهیه فرآورده‌های گوشتی در آزمایشگاه مواد غذایی کارخانه گوشتیران از تکنولوژی مخلوط‌شدن مواد مختلف توسط دستگاه آسیاب خانگی با دوران تیغه‌های آن حدود ۳۰۰۰ دور در دقیقه استفاده شد. این کار مخلوطی هموژن و یکنواخت را مانند همبرگر ایجاد می‌کند (۸). لذا هر یک از مواد گیاهی و پروتئینی به‌صورت جداگانه با مقداری از عضله اسکلتی سینه مرغ توسط این دستگاه کاملاً مخلوط و هموژن شدند. لازم به ذکر است به منظور مخلوط کردن کاملاً جداگانه هریک از مواد گیاهی و پروتئینی با عضله اسکلتی و ممانعت از تداخل این مواد باهم در طی بررسی‌های بافت‌شناسی، دستگاه و قطعات آن به‌طور کامل شسته می‌شدند. در مطالعه حاضر ۱۰ گروه نمونه شامل: ۱- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه سویا ۲- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه ایزوله سویا ۳- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه گلوتن ۴- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه سیر ۵- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه پیاز ۶- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه پودر سیر ۷- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه پودر پیاز ۸- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه فلفل دلمه ۹- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه قارچ و ۱۰- مخلوط هموژن بافت عضله اسکلتی به‌همراه تمامی مواد پروتئینی و گیاهی فوق تهیه گردیدند.

بلافاصله بعد از تهیه هریک از مخلوط‌های فوق، برای نمونه گیری از روش تدوین شده در استاندارد ملی استفاده گردید. بر این اساس، هرنمونه به سه برش مساوی تقسیم و به صورت تصادفی شماره گذاری شده و از هر کدام از برش‌ها نیز ۱ قطعه نیم سانتی‌متری در محلول فیکساتیو قرار گرفتند. از هر نمونه ۱۲ لام (بر روی هر لام سه برش) تهیه و توسط بافت‌شناس کار تشخیص بافت‌ها انجام شد (۳ و ۷). نمونه‌ها در پارچه‌های ظریف کتانی (به‌منظور ممانعت از هم گسیختن قبل از فیکس) پیچیده شده و در ظروف نمونه‌برداری حاوی فرمالین بافری ۱۰ درصد همراه کد مربوطه قرار داده شدند. با تعویض روزانه فرمالین بافر ۱۰ درصد و نهایتاً بعد از فیکس کامل نمونه‌ها با الکل‌های صعودی (الکل با درصدهای ۷۰، ۸۰، ۹۰، مطلق، مطلق) آبگیری شدند. مدت زمان لازم برای هریک از این محلول‌ها ۱/۵ ساعت بودند. سپس به‌منظور الکل‌زدائی از محلول گزیلول شامل یک ظرف محلول‌های میکس (۵۰ درصد الکل مطلق و ۵۰ درصد گزیلول) به مدت ۳۰ دقیقه و دو ظرف گزیلول خالص هر کدام به مدت ۲ ساعت استفاده شدند. سپس نمونه‌ها در دو ظرف حاوی پارافین مذاب با دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. در نهایت، نمونه‌ها با پارافین قالب‌گیری شدند (۲ و ۱۰).به روش استاندارد تهیه مقاطع بافتی برش‌های ۶ میکرومتری توسط دستگاه میکروتوم دورانی ایجاد شده و بر روی لام‌های شیشه‌ای قرار گرفتند. رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی به روش‌های معمول هماتوکسیلین و ائوزین **(H&E)** و اختصاصی تریکروماسون انجام گرفتند. نهایتاً، لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری (مدل زایس- آلمان) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه، رنگ آمیزی تریکروماسون برای مواردی استفاده شد که تشخیص بافت‌های گیاهی از بافت عضله اسکلتی با روش H&E ممکن نبود (۴). تشخیص نوع و ساختارهای گیاهی از بافت عضله اسکلتی درمحصول مورد مطالعه توسط متخصصین بافت‌شناس دارای مجوز فعالیت از سازمان استاندارد ایران تعیین و بیان گردید.

نتایج

ویژگی‌های ساختاری بافت عضله اسکلتی به‌صورت تعریف‌شده و مشخص در مقاطع بافتی مطالعه حاضر قابل درک بود. به این صورت که هسته (در صورت وجود) کاملاً بنفش تا تیره پررنگ دیده شد. سیتوپلاسم رشته‌های عضلانی به‌عنوان سرنخ مهم در شناسایی عضله اسکلتی در مقاطع فرآوری شده گوشتی حایز اهمیت است. این بخش از ساختار سلولی در رنگ‌آمیزی H&E به‌صورت رنگ قرمز مات دیده شدند. رشته‌ها و دستجات عضله اسکلتی در جهت‌گیری‌های طولی، مورب و عرضی دیده شدند.در یک رشته یا دسته عضلانی اسکلتی هسته‌ها به تعداد کم و با رنگ کاملاً تیره یا بنفش پررنگ به‌صورت نقاط کوچک و پراکنده مشخص شدند. در رنگ‌آمیزی اختصاصی تریکروم‌ماسون رشته‌ها و دستجات عضله اسکلتی به صورت قرمز پررنگ و درخشان‌تری نسبت به رنگ‌آمیزی H&E دیده شدند. شکل هسته و جهت‌گیری‌های آن مشابه ویژگی‌های آن در رنگ‌آمیزی H&E بود. همچنین، در رنگ آمیزی تریکروم‌ماسون بافت همبندی همراه عضله به‌علت داشتن رشته‌های کلاژن به‌صورت آبی کم‌رنگ تا پررنگ دیده شدند (شکل‌های ۱ و ۲). در ادامه، نتایج و مشاهدات هریک از مواد گیاهی و پروتئینی که در این

مطالعه با عضله اسکلتی مخلوط شده به‌صورت جداگانه به‌همراه تصاویر میکروسکوپی آورده شده است.

بافت عضله اسکلتی به‌همراه سویا

در مقاطع بافتی مخلوط هموژن عضله اسکلتی و سویا با رنگ‌آمیزی H&E، ساختار بافتی سویا به‌صورت سه نوع شکل کاملاً متفاوت از یکدیگر مشخص شدند: الف- ساختار بافتی سویا به‌صورت رشته‌هایی باریک کاملاً دراز و ممتد که اکثراً به-صورت دسته دسته در مقاطع بافتی مشخص شدند. رنگ این ساختارهای رشته‌ای به‌صورت نزدیکی با عضله اسکلتی ضمیمه مقطع و قرمز پررنگ تا قهوه‌ای سوخته دیده شدند (شکل۱ الف). لذا به‌منظور تفکیک کامل توسط رنگ‌آمیزی تریکروم‌ماسون رنگ‌آمیزی شدند. در رنگ‌آمیزی اختصاصی، بافت عضله اسکلتی به‌صورت کاملاً له شده و سست با رنگ قرمز پررنگ و گاهاً رنگ آبی مربوط به بافت همبندی همراه آن نیز مشخص شدند. بافت سویا در این رنگ‌آمیزی به‌صورت رنگ قرمز کم‌رنگ و حالت رشته‌ای مشبک با ساختار منسجم‌تری نسبت به بافت عضله اسکلتی دیده شدند (شکل۱ ب). ب- دیگر شکل ساختاری در مقاطع بافتی سویا ساختار سلولی مشخص‌تری نشان داد. به‌طوری‌که سلول‌های این بافت گیاهی با هسته مشخص و مرز سلولی آشکار به‌صورت ردیف‌شده (تسبیح مانند) دیده شدند. هسته در مرکز سلول و کاملاً تیره رنگ و بی‌شکل بودند. سیتوپلاسم ساختار سلولی بی‌رنگ دیده شدند (شکل۲). ج- این نوع از ساختار در بافت سویا نیز همانند نوع دوم ساختار سلولی بافت گیاهی را نشان داد. سلول‌هایی استوانه‌ای با مرز سلولی کم‌تر مشخص و هسته کشیده در امتداد سلول بودند. هسته‌ها به رنگ صورتی کم‌رنگ و سیتوپلاسم اطراف آن شیری تا صورتی ملایم دیده شدند. لازم به ذکر است نوع ب و ج از ساختار بافتی سویا بسیار کمتر از نوع الف آن در مقاطع دیده شدند (شکل۲).

بافت عضله اسکلتی به‌همراه ایزوله سویا

در مقاطع بافتی مخلوط هموژن عضله اسکلتی و ایزوله سویا با رنگ‌آمیزی H&E ساختار بافتی ایزوله سویا به‌صورت فقط یک شکل ساختاری توپر و متراکم که گاهاً گرد و دایره‌ای شکل بود، دیده شدند و فاقد ساختار سلولی بودند. اکثراً این ساختارهای گرد و توپر دارای حفره‌ای در مرکز بودند. رنگ ایزوله سویا در رنگ‌آمیزی H&E به‌صورت بنفش رنگ دیده شد که کاملاً از رنگ صورتی تا قرمز بافت عضله اسکلتی متمایز بود (شکل۱ پ). در رنگ‌آمیزی اختصاصی تریکروماسون، ساختار ایزوله سویا و بافت عضله اسکلتی با دو رنگ کاملاً مشخص از یکدیگر قابل تفکیک بودند. رنگ ساختارهای گرد، توپر و متراکم (گاهاً دارای حفره توخالی در مرکز) ایزوله سویا به‌صورت آبی ملایم دیده شدند. رنگ بافت عضله اسکلتی هم قرمز پر رنگ در لابلای ساختار ایزوله سویا دیده شدند (شکل۱ ت).

بافت عضله اسکلتی به‌همراه گلوتن

در رنگ‌آمیزی H&E، گلوتن در شکل‌هایی مختلف لابلای بافت عضله اسکلتی به‌وضوح مشخص شدند. ساختارهای گلوتن اکثراً به‌صورت مجتمع‌هایی به رنگ قرمزپررنگ دیده شدند. لذا از رنگ صورتی تا قرمز روشن بافت عضله اسکلتی متمایز بودند (شکل۳ الف). شکل ساختار سلولی نیز در مقاطع بافتی گلوتن دیده شد. این ساختار به‌صورت تجمع سلولی با سلول‌های مکعبی بزرگ که دارای هسته‌ای تیره و کاملاً بزرگ هم‌شکل سلول و مربعی بودند دیده شد. دیواره‌های بین سلولی ضخیم و واضح بودند. همچنین، سیتوپلاسم به‌صورت فضای اندک اطراف هسته و روشن بود دیده شد (شکل۳ الف). در رنگ‌آمیزی تریکروماسون، ساختارهای گلوتن به صورت آبی خیلی کم‌رنگ دیده شدند و کاملاً از بافت عضله اسکلتی متمایز بودند (شکل۳ ب).

برخلاف مقاطع بافتی در سه گروه فوق، نتایج سایر ساختارهای گیاهی به همراه بافت عضله اسکلتی که در ادامه خواهد آمد به رنگ‌آمیزی اختصاصی تریکروماسون نیازی نداشتند و با رنگ‌آمیزی H&E کاملاً از بافت عضله اسکلتی قابل تشخیص بودند.

بافت عضله اسکلتی به‌همراه سیر یا پودر سیر

در مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده با H&E، ساختار بافتی سیر و بافت عضله اسکلتی کاملاً از یکدیگر متمایز بودند. سیر دارای ساختار کاملاً سلولی با دیواره سلولی مشخص بود. سلول‌ها در ردیف‌های منظم و به‌صورت پشت سرهم قرار داشتند. هسته این سلول‌ها مربع تا مستطیلی تیره رنگ بوده و سیتوپلاسم اندک آن‌ها روشن دیده شدند. بافت عضله اسکلتی نیز به صورت قرمز رنگ در لابلای ساختار بافتی سیر دیده شدند (شکل۳ پ).

در مقاطع بافتی پودر سیر، علاوه بر ساختارهای سلولی ذکرشده برای مقاطع سیر، ساختارهای سلولی استوانه‌ای کشیده‌ای دارای دیواره سلولی مشخص وجود داشت. این سلول‌های استوانه‌ای توسط دیواره روشن تا زرد به یکدیگر چسبیده بودند. در انتهای سلول‌های استوانه‌ای کاملاً گرد و فاقد زاویه بودند. ضمناً در این سلول‌ها هسته‌ای مشخص دیده نشد (شکل۳ ت).

بافت عضله اسکلتی به‌همراه پیاز یا پودر پیاز

در مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده با H&E، ساختارهای سلولی و غیرسلولی در مقاطع بافتی پیاز در مقایسه با مقاطع پودر پیاز تفاوتی نشان ندادند. در شکل ساختاری سلولی، سلول‌های بزرگ مکعبی تا مستطیلی با هسته‌های گرد تا کشیده مستطیلی در وسط سلول و تیره رنگ و سیتوپلاسم به صورت روشن تا صورتی دیده شدند. دیواره بین سلول‌ها بسیار نازک و به‌ندرت دیده شدند. در شکل ساختار غیرسلولی، به‌صورت نوارهایی نازک به رنگ صورتی کاملاً روشن در لابلای بافت عضله اسکلتی (به‌صورت قرمز رنگ) دیده شدند (شکل‌های ۴الف و ۴ ب).

بافت عضله اسکلتی به‌همراه فلفل دلمه

در مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده با H&E، ساختار سلولی بافت فلفل دلمه کاملاً ساختار متمایزی از بافت عضله اسکلتی نشان داد. سلول‌ها در این ساختار سلولی با شکل‌های مختلف و فاقد هسته بودند. دیواره بین سلولی این سلول‌ها نازک بودند. در واقع، مقاطع بافت فلفل دلمه در بین بافت عضله اسکلتی (کاملاً قرمز رنگ) به‌صورت بافتی سست و بیشتر فاقد ساختار مشخص و بی‌رنگ دیده شدند (شکل ۴ ت).

بافت عضله اسکلتی به‌همراه قارچ

ساختار بافتی قارچ و عضله اسکلتی در مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده با H&Eاز یکدیگر کاملاً متمایز بودند. ساختار بافتی قارچ به‌صورت قطعاتی پیوسته فاقد ساختار سلولی مشخص دیده شدند که در اطراف دارای لبه‌هایی با بنفش پررنگ و در وسط آن بنفش کم‌رنگ و روشن بودند. گاهاً این قطعات فاقد لبه‌های پررنگ بنفش بودند و در لابلای این ساختارهای بافتی قارچ، بافت عضله اسکلتی نیز به‌صورت قرمز رنگ دیده شدند (شکل ۴ پ).

بافت عضله اسکلتی به‌همراه تمامی مواد پروتئینی و گیاهی فوق

با توجه به نتایج هریک از مواد گیاهی و پروتئینی که به‌صورت جداگانه در بالا آورده شدند، در مقاطع بافتی مخلوط عضله اسکلتی به‌همراه تمامی مواد گیاهی و پروتئینی هریک از ساختارهای بافتی قابل تشخیص بودند(شکل‌های۴ ج و ۴ خ). رنگ‌آمیزی اختصاصی تریکروماسون برای سهولت در تشخیص جداگانه مواد گیاهی و پروتئینی از بافت عضله اسکلتی در این مقاطع بسیار کاربردی دیده شدند (شکل‌های۴ ح و ۴ د).

بحث

آزمون بافت‌شناسی روشی برای مشاهده بافت‌های حیوانی مورد استفاده در تهیه مواد غذایی به‌ویژه فرآورده‌های گوشتی می‌باشد.در این روش، نمونه به‌منظورکنترل کیفیت بعد از مراحل آماده‌سازی بافتی در سطوح میکروسکوپی مورد مطالعه قرار می‌گیرد. این روش آزمون از سال ۱۹۱۰ به عنوان يك آزمایش کنترل کیفی در صنایع غذایی مورد استفاده قرارگرفته است (۱). در سال‌های اخیر، مطالعاتی که به‌منظور مطالعه و تشخیص بافت‌های غیرمجاز از نظر استاندارد ملی در تهیه فرآورده‌های گوشتی انجام شده است از روش آزمون بافت‌شناسی بهره برده‌اند (۱، ۳ و ۴). این در حالی‌ست که در کنار بافت‌های حیوانی از بافت‌های پروتئینی و گیاهی نیز در تهیه انواع فرآورده‌های گوشتی استفاده می‌شود. این ساختارهای گیاهی در مطالعات انجام گرفته بر روی فرآورده‌های گوشتی نادیده گرفته شده‌اند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هرکدام از این ترکیبات پروتئینی و گیاهی دارای ساختار بافتی و سلولی مشخصی هستند که در برخی موارد ممکن است تشابه ساختاری با یکدیگر و یا با بافت‌های حیوانی داشته باشند.نتایج مطالعه مقاطع بافتی مخلوط سویا و بافت عضله اسکلتی نشان داد که سویا دارای دو نوع ساختار رشته‌ای و سلولی است. ساختار رشته‌ای آن شباهت نزدیکی با رشته‌های بافت عضله اسکلتی داشت و در نتیجه برای تشخیص آن از رشته‌های عضله اسکلتی نیاز به رنگ‌آمیزی تریکروماسون دارد (۱۱) همسو با نتایج مطالعه حاضر توسط رنگ آمیزی تریکروماسون در مطالعه صادقی‌نژاد و همکاران در سال ۲۰۱۵ این ساختارهای بافت گیاهی سویا توسط با استفاده از رنگ‌آمیزی تولئیدن بلو از ساختار بافتی عضله اسکلتی قابل تمایز نشان داده شدند (۸). رشته‌های عضله اسکلتی در مقاطع نمونه‌های فرآورده گوشتی بر اثر پروسه کاتریزه شدن کاملاً له شده و ساختار طبیعی سلول و بافت را نشان نمی‌دهد. لذا در اکثر مواقع سلول‌های عضله اسکلتی فاقد هسته و خطوط تیره و روشن دیده شدند؛ بنابراین تشخیص آن با ساختار بافتی سویا خصوصاً در رنگ‌آمیزی معمولی H&Eسخت است. با توجه به نتایج رنگ‌آمیزی تریکروماسون برای بافت عضله اسکلتی، ساختارهای رشته‌ای سویا نیز در مقاطع بافتی به‌راحتی قابل تشخیص شدند. ساختار سلولی سویا در شکل استوانه‌ای آن در مقاطع بافتی مطالعه حاضر قابل توجه بود. این ساختارهای سلولی استوانه‌ای در رنگ‌آمیزی معمولی H&E نیز به‌راحتی دیده شدند که همسو با نتایج جاهد و رکنی در سال ۲۰۰۴ بود (۵). در مطالعات مختلف گزارش شده است که یکی از بافت‌های غیرمجاز در مقاطع نمونه‌های فرآورده‌های گوشتی بافت لوله گوارش می‌باشد. دلیل و ویژگی اصلی تشخیص بافت لوله گوارشی در این مطالعات وجود بافت پوششی استوانه‌ای ذکر شده است (۳ و ۴). در صورت وجود این نوع ساختار سلولی سویا می‌توان مقاطع بافتی را توسط دیگر رنگ‌آمیزی اختصاصی برای لوله گوارش به‌علت داشتن سلول‌های جامی از قبیل پریودیک-اسیدشیف (پاس) رنگ‌آمیزی کرد (۱۰). همچنین، گزارش شده است که این ساختار سلولی منحصر بفرد سویا را می‌توان توسط رنگ‌آمیزی تولئیدن بلو از بافت عضله اسکلتی گاو تشخیص داد (۸). در مطالعه حاضر، ساختار بافتی منحصر بفرد ایزوله سویا در مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده توسط H&E و تریکروماسون برای اولین بار به‌طور مشخص نشان داده شد.ایزوله سویا فاقد ساختار سلولی دیده شد، لذا در مقاطع فرآورده‌های گوشتی به‌راحتی از بافت عضله اسکلتی قابل تفکیک است و با دیگر بافت‌های حیوانی نیز تفاوت دارد.

نتایج مقاطع نمونه گلوتن توسط رنگ‌آمیزی H&E در مطالعه حاضر نشان داد که ساختار بافتی آن با ساختار عضله اسکلتی به‌دلیل داشتن رنگ صورتی تشابهت دارد. گزارش شده است که بافت عضله اسکلتی و عضله صاف در مقاطع بافتی فرآورده‌های گوشتی به‌دلیل پروسه‌های کاتریزه شدن و حرارتی می‌تواند اشتباه شوند (۲). رنگ‌آمیزی اختصاصی تریکروماسون مقاطع بافتی گلوتن در مطالعه حاضر نشان داد که این ساختار کاملاً آبی رنگ شده و لذا این رنگ‌آمیزی توانست بین بافت عضله (با رنگ قرمز) و ساختار بافتی گلوتن (با رنگ آبی) به‌طور دقیق‌تری از رنگ‌آمیزی H&E تمایز ایجاد کند. در مطالعه حاضر، ساختار سلولی گلوتن نیز در مقاطع بافتی دیده شد که با توجه به دیواره بین سلولی ضخیم و شکل هسته آن از ساختار سلول‌های حیوانی به آسانی قابل تفکیک است. نتایج مطالعه حاضر بر روی مقاطع بافتی سیر و پودر سیر دو نوع ساختار سلولی را نشان داد. ساختار سلولی مطبق با سلول‌های مکعبی و استوانه‌ای دارای هسته‌ها و دیواره بین سلولی که ظاهر ردیفی این سلول‌ها منحصربفرد و همانند صفحه رشد استخوان بود. این ساختار سلولی با ویژگی‌های ذکر شده و مشخص منحصر به سیر بود؛ لذا در مقاطع بافتی فرآورده‌های گوشتی با این کلید تشخیص می‌توان به وجود سیر در آن اشاره نمود. همچنین، شکل ساختاری دوم برای سیر که به‌صورت سلول‌های استوانه‌ای دیده شدند حایز اهمیت است و با بافت‌های حیوانی دارای پوشش استوانه‌ای (بالاخص لوله گوارش) مشابهت دارد. وجه تشخیص این ساختار سلولی در سیر با بافت‌های حیوانی در رنگ‌آمیزی H&E وجود دیواره بین سلولی ضخیم و عدم وجود هسته مشخص می‌تواند باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که وجود پیاز یا پودر پیاز با توجه به ساختار منحصربفرد آن در مقاطع بافتی فرآورده گوشتی قابل تشخیص است. هر دو ساختار سلولی و رشته‌ای آن در رنگ‌آمیزی H&E به‌راحتی قابل تشخیص است.همچنین، باتوجه

به نتایج مطالعه حاضر، می‌توان در مقاطع بافتی ساختار قارچ و فلفل دلمه را نیز باتوجه به ساختار منحصربفرد آن در رنگ‌آمیزی H&E تشخیص داد. لذا در گزارش‌های مطالعه مقاطع بافتی در آزمون بافت‌شناسی می‌توان به وجود گیاهان ذکر شده اشاره کرد.اکثر مطالعات انجام شده بر روی فرآورده‌های گوشتی به منظور تعیین بافت‌های غیرمجاز حیوانی از روش بافت‌شناسی بهره برده‌اند. از طرفی، مطالعه حاضر برای اولین بار از این آزمون برای تشخیص بافت‌های گیاهی و متمایز کردن آن‌ها از بافت عضله اسکلتی استفاده کرد و لذا برای مقایسه و استفاده از منابع مختلف با محدودیت و کمبود مطالعه در راستای اهداف مطالعه حاضر روبرو بودیم.

در مجموع می‌توان گفت که ترکیبات گیاهی و پروتئینی مورد استفاده در فرآورده‌های گوشتی به‌طور مشخص دارای ساختار سلولی و غیرسلولی هستند. همچنین، این ساختارها در اثر پروسه کاتریزه شدن فرآورده گوشتی همچنان در مقاطع بافتی دیده می‌شوند. با ارائه یافته‌های کلیدی تشخیصی در این مطالعه می‌توان گفت که بافت‌شناسی با کمک رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی نظیر تریکروماسون روش بسیار مناسبی برای تشخیص ترکیبات ساختار گیاهی و پروتئینی از بافت‌های مجاز و غیر مجاز در فرآورده‌های گوشتی خام است. پیشنهاد می‌گردد این روش در تشخیص ساختارهای گیاهی و پروتئینی از بافت‌های حیوانی در فرآورده‌های حرارت دیده نیز مطالعه گردد.

منابع مورد استفاده

1- Abbasy-Fasarani, M., H. Hosseini, G.R. Jahed-Khaniki, M. Adibmoradi and S. Eskandari. 2013. Histological study of industrial hamburgers containing 30 and 60 percent meat for presence of unpermitted edible tissues and correlation of this factor to meat connective tissue chemical indices. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology* 7,311-318.(In Farsi).

2- Daghighian, R., A. Javadi and S. Safavi. 2016. Histological and chemical evaluation of frauds in ground meat used for kebab in Tabriz. *Journal of Food Hygiene* 6,15-26. (In Farsi).

3- Izadi, F., J. Sadeghinezhad, B. Hajimohammadi, S. Taghipourzahir, H. Fallahzadeh, M. Sheibani and A. Mirjalili. 2016. Detection of unauthorized tissues in trade frozen minced meat marketed in Yazd with histological method. *Tolooebehdasht* 14,423-431. (In Farsi).

4- Jahed, K.G.R. and N. Rokni. 2007. Histological study of unpermitted tissues in heated meat products by using of masson's trichrome stain. *Pajouhesh and Sazandegi* 73,96-102. (In Farsi).

5- Jahed, K.G.R. and N. Rokni. 2004. Histological detection of soya in freezing raw hamburger of Iran. *Pajouhesh and Sazandegi* 62,71-75. (In Farsi).

6- Kamkar, A., N. Rokny, A. Rasouli and A. Shiroudi. 2004. Evaluating of hamburger quality using collagen content. *Pajouhesh and Sazandegi* 63,75-79. (In Farsi).

7- Rokni, N., M. Rezaeian, N. Nouri and F. Ebrahimpour. 2004. Detection of unauthorized tissues in some of distributed raw meat products in Tehran with histological methods. *Pajouhesh and Sazandegi* 17(4), 2-8. (In Farsi).

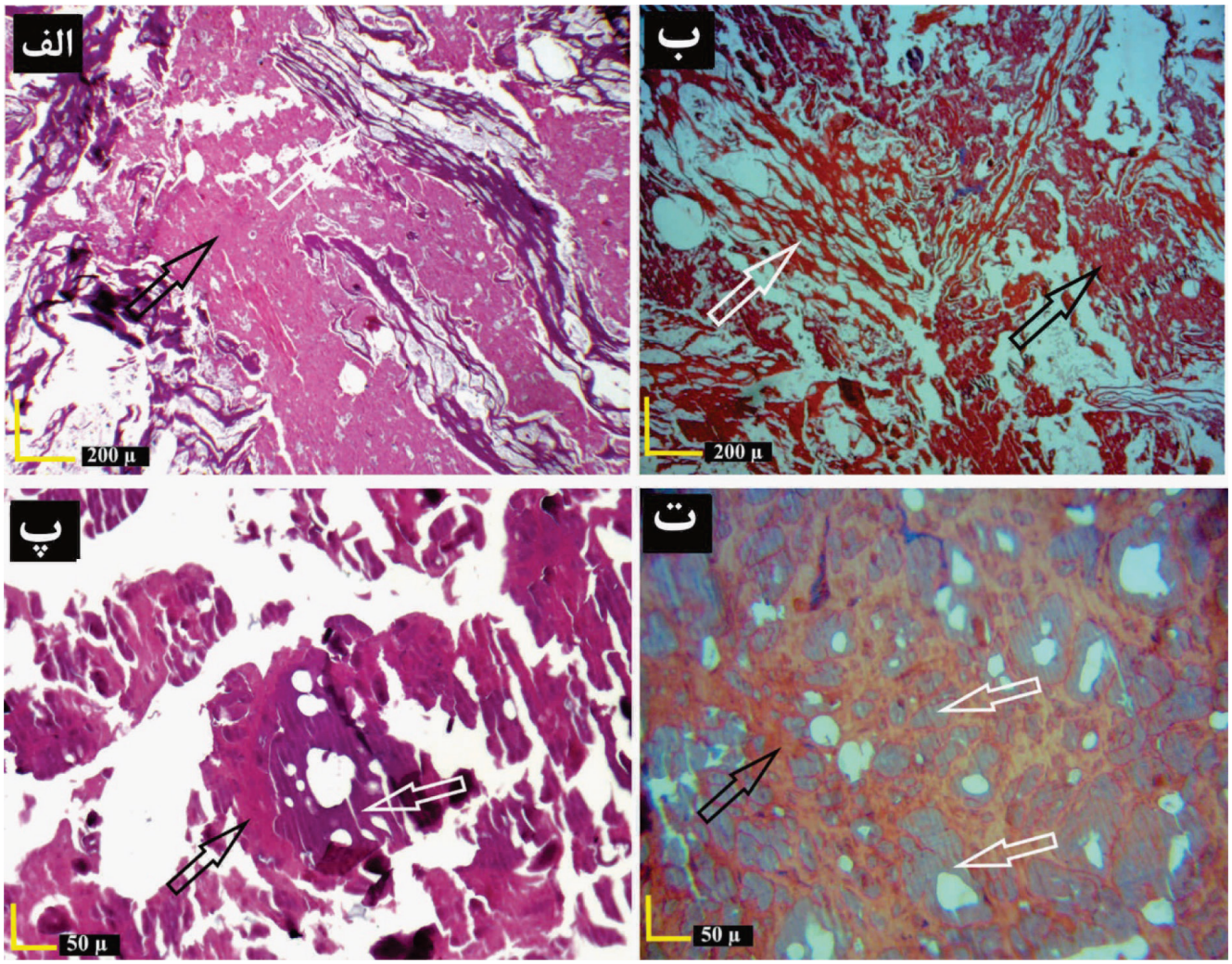
8- Sadeghinezhad, J., B. Hajimohammadi, F. Izadi, F. Yarmahmoudi and R. Latorre. 2015. Evaluation of the morphologic method for the detection of animal and herbal content in minced meat. *Czech Journal of Food Science* 33,564–569.

9- Sadeghinezhad, J., F. Izadi and R. Latorre. 2016. Application of histomorphological method to assess meat products. *Anatomical Sciences Journal* 13,73-78.

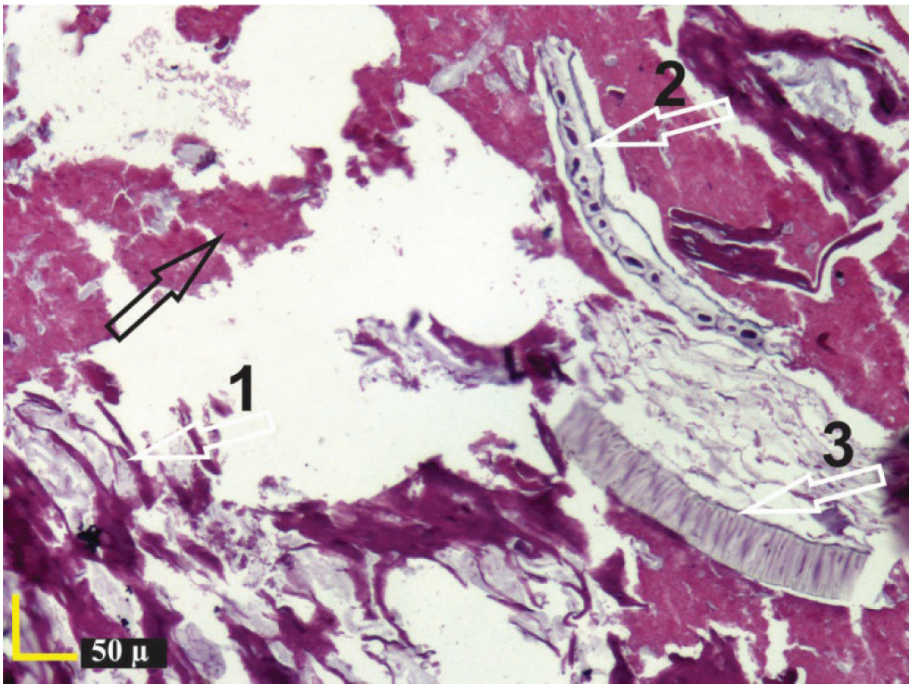
10- Suvarna, K.S., C. Layton and J.D. Bancroft. (2012). Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book. USA. *Elsevier Health Sciences*. P: 114-119.

11- Tafvizi, F. and M. Hashemzadegan. 2016. Specific identification of chicken and soybean fraud in premium burgers using multiplex-PCR method. *Journal of food science and technology* 53,816-823. (In Farsi).

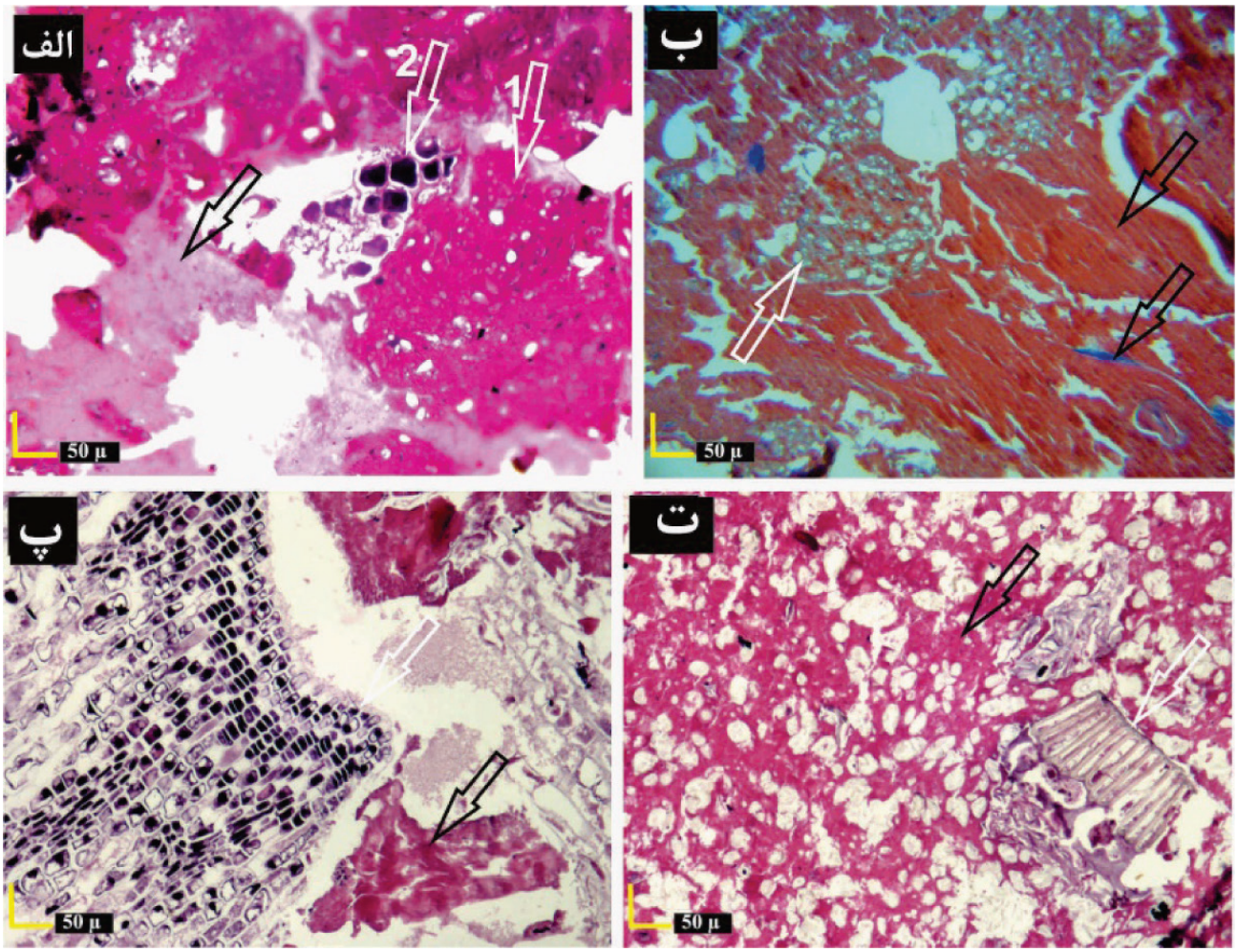
12- Yaghoubifar, M., A. Shakernejad and A. Akaberi. 2009. Comparison of the Quality and safety of Sausage and Salami with Standards in Sabzevar Iran. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 16,114-120. (In Farsi).



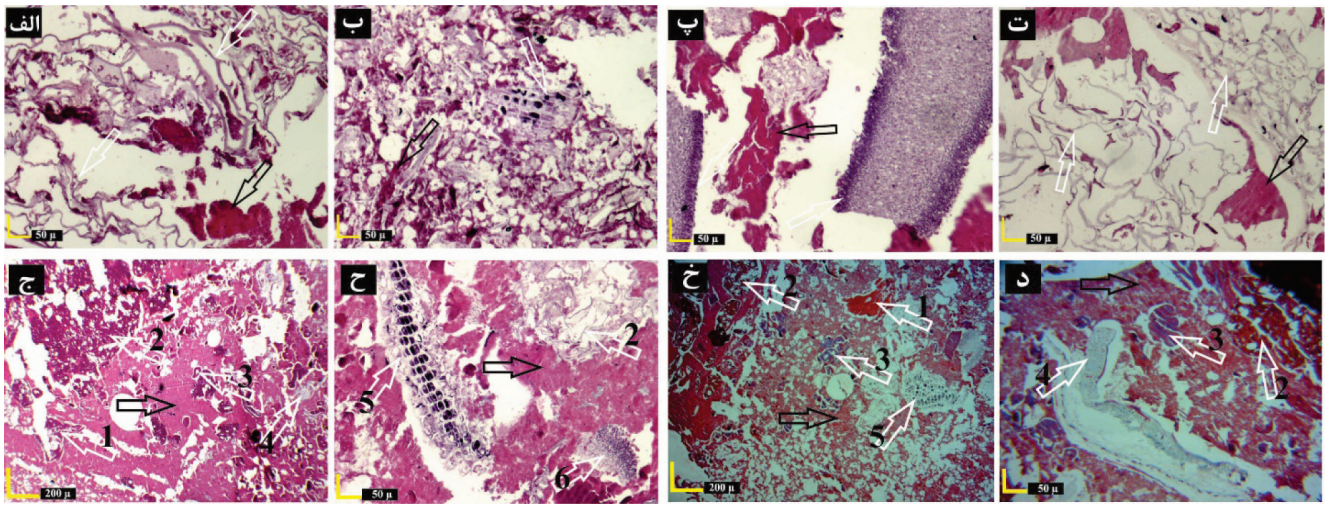
شکل ۱- مقطع بافتی مخلوط سویا (الف و ب) و ایزوله سویا (پ و ت) با بافت عضله اسکلتی. شکل ساختاری رشته‌ای (غیرسلولی) سویا (پیکان‌های سفید) در هردو رنگ‌آمیزی H&E (الف) و تریکروماسون (ب) از بافت عضله اسکلتی (پیکان‌های سیاه) قابل تفکیک است. در مقطع بافتی مخلوط ایزوله سویا با بافت عضله اسکلتی (پ و ت)، ساختار دایره‌ای و متراکم (پیکان‌های سفید) ایزوله سویا در هردو رنگ‌آمیزی H&E (پ) و تریکروماسون (ت) از بافت عضله اسکلتی (پیکان‌های سیاه) قابل تفکیک است.



شکل۲ - مقطع بافتی مخلوط سویا و بافت عضله اسکلتی (رنگ‌آمیزی H&E). سه نوع شکل ساختاری سویا شامل ساختار غیرسلولی رشته‌ای (۱)، ساختار سلول مکعبی (۲) و ساختار سلولی استوانه‌ای (۳) کاملاً متفاوت از یکدیگر قابل تشخیص هستند. پیکان سیاه: بافت عضله اسکلتی.



شکل۳- مقطع بافتی مخلوط گلوتن با بافت عضله اسکلتی (الف و ب) و مقطع بافتی مخلوط سیر یا پودر سیر با بافت عضله اسکلتی (پ و ت). ساختارهای غیرسلولی قرمز پررنگ (۱) و ساختار سلولی (۲) گلوتن (الف و ب) در هردو رنگ‌آمیزی H&E (الف) و تریکروماسون (ب) از بافت عضله اسکلتی (پیکان‌های سیاه) قابل تفکیک است. ساختار سلولی مطبق سیر (پیکان سفید) در مقاطع بافتی سیر و بافت عضله اسکلتی (پ) و ساختار سلولی استوانه‌ای (پیکان سفید) در مقاطع بافتی پودر سیر و بافت عضله اسکلتی (ت) قابل توجه است. پیکان‌های سیاه: بافت عضله اسکلتی.



شکل۴- مقطع بافتی مخلوط‌های جداگانه پیاز، پودر پیاز، قارچ، فلفل دلمه با بافت عضله اسکلتی (رنگ‌آمیزی H&E). ساختار سلولی پیاز (پیکان‌های سفید) در مقاطع بافتی پیاز با بافت عضله اسکلتی (الف) و ساختار سلولی (پیکان سفید) در مقاطع بافتی پودر پیاز با بافت عضله اسکلتی (ب) قابل توجه است.ساختار بافت قارچ (پیکان‌های سفید) در مقاطع بافتی قارچ با بافت عضله اسکلتی (الف) و ساختار بافتی فلفل دلمه (پیکان‌های سفید) در مقاطع بافتی فلفل دلمه با بافت عضله اسکلتی (ب) قابل مشاهده است. ساختارهای مختلف گیاهی و پروتئینی در هردو رنگ‌آمیزی H&E (ج و ح) و تریکروماسون (خ و د) از بافت عضله اسکلتی (پیکان‌های سیاه) قابل تفکیک است. ۱: سویا، ۲: گلوتن، ۳: ایزوله سویا، ۴: پیاز، ۵: سیر،۶: قارچ. بافت عضله اسکلتی (پیکان‌های سیاه).