

**COMPARING THE EFFICIENCY OF COCONUT OIL
AND PALM OIL WITH XYLENE AS A CLEARING
AGENT IN CONVENTIONAL HEMATOXYLIN
AND EOSIN HISTOPATHOLOGICAL
STAINING PROCEDURE**

DISSERTATION

Submitted to The Tamil Nadu Dr. M.G.R Medical University
in partial fulfillment of the requirement for the degree of

MASTER OF DENTAL SURGERY



BRANCH - VI

ORAL PATHOLOGY AND MICROBIOLOGY

2015 - 2018

CERTIFICATE

Certified that the dissertation entitled: ***“COMPARING THE EFFICIENCY OF COCONUT OIL AND PALM OIL WITH XYLENE AS A CLEARING AGENT IN CONVENTIONAL HEMATOXYLIN AND EOSIN HISTOPATHOLOGICAL STAINING PROCEDURE”*** is a bonafide record of the work done by **Dr. Ashitha A S** under our guidance during her post graduate study during the period of 2015-2018 under THE TAMIL NADU DR. M.G.R MEDICAL UNIVERSITY, CHENNAI, in partial fulfilment for the degree of MASTER OF DENTAL SURGERY IN ORAL PATHOLOGY AND MICROBIOLOGY, BRANCH -VI. It has not been submitted (partial or full) for the award of any other degree or diploma.

Guide

Dr. T ISAAC JOSEPH

Professor and Head

Co-Guide

Dr. GIRISH K L

Professor

Department of Oral Pathology and Microbiology

Sree Mookambika Institute of Dental Science

Kulasekharam, Kanya Kumari District-629161

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Ashitha.docx (D34321489)
Submitted: 1/3/2018 5:52:00 PM
Submitted By: aadil.ashitha@gmail.com
Significance: 4 %

Sources included in the report:

A300_Project Report _ Assessment_15002888_15002888_001.docx (D29795623)
<http://www.docslides.com/www-arpapress-com-volumes-jpcs-vol8-jpcs-8-0>
http://www.arpapress.com/Volumes/JPCS/Vol8/JPCS_8_02.pdf

Instances where selected sources appear:

18

CERTIFICATE II

This is to certify that this dissertation work titled “**Comparing the Efficiency of Coconut Oil and Palm Oil with Xylene as a Clearing Agent in Conventional Hematoxylin and Eosin Histopathological Staining Procedure**” of the candidate **Dr. Ashitha AS** with registration Number **241521301** for the award of **MASTER OF DENTAL SURGERY** in the branch of Oral Pathology and Microbiology, [Branch- VI]. I personally verified the urkund.com website for the purpose of plagiarism Check. I found that the uploaded thesis file contains from introduction to conclusion pages and result shows **4**percentage of plagiarism in the dissertation.

Guide & Supervisor sign with Seal.

Date:

Place:

**SREE MOOKAMBIKA INSTITUTE OF DENTAL SCIENCES,
KULASEKHARAM**

ENDORSEMENT BY THE PRINCIPAL / HEAD OF THE INSTITUTION

This is to certify that this dissertation titled “**COMPARING THE EFFICIENCY OF COCONUT OIL AND PALM OIL WITH XYLENE AS A CLEARING AGENT IN CONVENTIONAL HEMATOXYLIN AND EOSIN HISTOPATHOLOGICAL STAINING PROCEDURE**” is a bonafide research work done by **Dr. Ashitha A S** under the guidance of **Dr. T Isaac Joseph** M.D.S, Professor and Head, Department of Oral Pathology and Microbiology, Sree Mookambika Institute of Dental Sciences, Kulasekharam.

Dr. Elizabeth Koshi MDS,

PRINCIPAL,

Sree Mookambika Institute of Dental Sciences.

V.P.M Hospital Complex,

Padanilam, Kulasekharam,

KanyaKumari District,

Tamil Nadu - 629 161

DECLARATION

I hereby declare that this dissertation titled “**COMPARING THE EFFICIENCY OF COCONUT OIL AND PALM OIL WITH XYLENE AS A CLEARING AGENT IN CONVENTIONAL HEMATOXYLIN AND EOSIN HISTOPATHOLOGICAL STAINING PROCEDURE**” is a bonafide record of work undertaken by me and that this thesis or a part of it has not been presented earlier for the award of any degree, diploma, fellowship or similar title of recognition.

Dr. Ashitha A S

MDS student,

Department of Oral Pathology and Microbiology,

Sree Mookambika Institute of Dental Sciences,

Kulasekharam, Kanya kumari District,

Tamilnadu.

ACKNOWLEDGEMENT

First and foremost, praises and thanks to **ALMIGHTY**, the most beneficent and merciful, for the showers of blessings throughout my life.

With great pleasure, I take this opportunity to express my sincere gratitude to my respected teacher and guide, **Dr. T Isaac Joseph M.D.S**, Professor and Head of the Department of Oral Pathology and Microbiology whose constant guidance, timely criticism and close supervision has enabled me to complete my thesis work successfully. His never-ending enthusiasm will remain as a perennial source of inspiration to my studies.

It is my distinct privilege to acknowledge my respected teacher and co-guide **Dr. Girish KL**, Professor, Department of Oral Pathology and Microbiology for his constant suggestions, good wishes and whole hearted willingness in sharing his vast experience throughout my post graduate course. His inspiration and untiring teaching will always be a driving force in my career.

I am happy to thank **Dr. Geetha Varghese** and **Dr. T Prasanth**, Professors, **Dr. Pradeesh Sathyan**, Reader and **Dr. Angelin D** and **Dr. Deepa A G**, Senior lecturers who always had a word of encouragement and advice. I always remain grateful to them.

I would like to extend my deepest thanks to **Dr. Velayuthan Nair**, M.B.B.S, M.S, Chairman and **Dr. Rema V Nair**, M.B.B.S, M.D, D.G.O, Director, Sree Mookambika Institute of Medical Sciences for providing the lab facilities to accomplish my dissertation work. I also extend my gratitude to **Dr. Elizabeth Koshi**, Principal, Sree Mookambika Institute of Dental Sciences for the motivation and support.

I am thankful to **Dr. Sarath Babu** for helping me with the statistical analysis involved in this study and to **Mrs. N Ringle Kiruba** for helping me with the laboratory procedures. I am thankful to **Leos Data Makers, Mr. Satheesh & Mrs. Alphonsa** for their help in carrying out all the DTP works.

I am thankful to my colleagues **Dr. Ani Simila C S, Dr. Abhilasha J V, Dr. Rajalekshmi M P** and my seniors **Dr. Krishna Prasad R S, Dr. Sudha Rani T, Dr. Akhil S, Dr. Jeslin Mary S** and **Dr. Aldrin Jerry** for their encouragement.

Special thanks goes to my beloved batch mate **Dr. Vidya S** whom stood with me both at good and bad times throughout my course. I acknowledge my colleague **Dr. Swetha D** whom kept me going and this work would not have been possible without her.

I acknowledge **Dr. Reshma R** and **Dr. Reshma Khader S** for their moral support, warm company and motivation, which drives me to give my best. Special mention goes to **Mr. Varun Nambiar** and **Dr. Sujith S** for their constant and unwavering support.

The people who mean the world to me, my parents **Dr. A Abdul Bary** and **Mrs. Shyla Bary**. I am grateful to them both for being wonderful role models to me. I am thankful to my brother **Dr. Ashik Bary**, my sister in law **Dr. Ashna Ashik** and my grandmother **Mrs. Fathima** for their unfailing support. Finally, I would like to thank my little boy **Aadil A Mohammed** for being my bundle of joy and ray of hope in my life.

Dr. Ashitha A S

CONTENTS

SI No:	Index	Page No
1	List of Abbreviations	i-ii
2	List of Tables	iii
3	List of Graphs	iv
4	List of Colour plates	v
5	List of Annexure	vi
6	Abstract	vii-viii
7	Introduction	1-3
8	Aims and Objectives	4
9	Review of Literature	5-26
10	Materials and Methods	27-34
11	Results and Observations	35-44
12	Discussion	45-49
13	Summary and Conclusion	50-51
14	Bibliography	ix-xv
15	Annexure	

LIST OF ABBREVIATIONS

ATP	Adenosine triphosphate
CIM	Clearing and infiltration mixtures
CK	Cytokeratin
CD	Cluster of differentiation
DNA	Deoxy ribonucleic acid
DPAS	Periodic acid schiff following diastase
DWS	Dish washing solution
EPA	Environmental protection agency
GMS	Grocott's methanemine silver
H/E	Hematoxylin and eosin
IHC	Immunohistochemical staining
IUPAC	International union of pure and applied chemistry
MHA	Methyl lippuric acid
MTBE	Methyl tert butyl ether
OSHA	Occupational safety and health administration
PAS	Periodic acid schiff
PCR	Polymerase chain reaction
PGME	Propylene glycol methyl ether
PPM	Parts per million
RCRA	Resource conservation and recovery act

RMO	Refined mineral oil
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
SBO	Soluble bioorganic substances
ScCo ₂	Super critical carbon dioxide
STB	Sulphation toluidine blue
TWA	Time weighed average

LIST OF TABLES

TABLE NO	TITLE
Table 1	Comparison of rigidity between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil
Table 2	Comparison of translucency between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil
Table 3	Comparison of changes after impregnation between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil
Table 4	Comparison of ease of sectioning between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil
Table 5	Comparison of nuclear staining within H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil
Table 6	Comparison of cytoplasmic staining within H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil
Table 7	Comparison of clarity of staining within H & E stained sections treated with xylene palm oil & coconut oil
Table 8	Comparison of nuclear staining between H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil
Table 9	Comparison of cytoplasmic staining between H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil
Table 10	Comparison of clarity of staining between H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil
Table 11	Comparison of mean H & E stained sections evaluation scores between xylene, palm oil & coconut oil

LIST OF GRAPHS

Graph No	TITLE
Graph 1	Comparison of rigidity between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil (Group A, Group B, Group C)
Graph 2	Comparison of translucency between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil (Group A, Group B, Group C).
Graph 3	Comparison of changes after impregnation between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil (Group A, Group B, Group C)
Graph 4	Comparison of ease of sectioning between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil (Group A, Group B, Group C)
Graph 5	Comparison of nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity within the groups (Group A, Group B, Group C)
Graph 6	Comparison of nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity between the groups (Group A, Group B, Group C)

LIST OF COLOUR PLATES

Colour Plate No	Title
CP 1	Soft tissue specimen for grossing
CP 2	Grossed specimen and labeled into C1, P1 and X1
CP 3	Tissue processing with palm oil
CP 4	Tissue processing with coconut oil
CP 5	Paraffin embedding bath
CP 6	Semiatomatic microtome
CP 7	Tissue floatation bath
CP 8	Slide warming table
CP 9	Incubator
CP 10	Hematoxylin and eosin staining reagents with palm oil
CP 11	Hematoxylin and eosin staining reagents with coconut oil
CP 12	Photomicrographs of H/E stained sections treated with xylene (x100)
CP 13	Photomicrographs of H/E stained sections treated with palm oil (x100)
CP 14	Photomicrographs of H/E stained sections treated with coconut oil (x100)

LIST OF ANNEXURE

Annexure No	Contents
Annexure 1	Institutional Research Committee Certificate
Annexure 2	Institutional Human Ethics Committee Certificate
Annexure 3	Patient Information Sheet <ul style="list-style-type: none">✓ English✓ Tamil✓ Malayalam
Annexure 4	Consent Form <ul style="list-style-type: none">✓ English✓ Tamil✓ Malayalam
Annexure 5	Case sheet proforma
Annexure 6	Data entry Sheet

ABSTRACT

BACKGROUND:

The histopathological laboratory technicians are routinely exposed to xylene during procedures like tissue processing, clearing, staining, placing a cover slip and cleaning tissue processors. On account of the Occupational Safety and Health Administration (OSHA) regulations, various xylene substitutes such as limonene reagents, aliphatic hydrocarbons, vegetable oils and mineral oils were tried in the past to avoid xylene in the laboratory. This study is designed to establish whether the use of coconut oil and palm oil at a maintained temperature as a clearing agent during tissue processing and as a dewaxing agent during staining has any effect on transparency, rigidity, change after impregnation, ease in sectioning and quality of staining such as nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity of staining as compared with the xylene treated counterparts.

AIMS AND OBJECTIVE:

- 1) To evaluate the efficiency of coconut oil and palm oil as a clearing agent for Hematoxylin and Eosin staining procedure and compare it with xylene.
- 2) To determine whether tissues cleared and dewaxed with coconut oil and palm oil are same or superior with the xylene treated tissues.

MATERIALS AND METHODS:

A total of 30 tissue specimens were collected, fixed in 10% formalin and sectioned into 3 equal parts and grouped as group A, B, and C. Group A tissue specimen were taken for routine processing followed by hematoxylin and eosin staining procedure with xylene as clearing agent, whereas group B tissue specimens were treated with heated palm oil at a temperature maintained at 60°C

instead of xylene as a clearing agent. Similarly group C tissue specimens were treated with heated coconut oil at a temperature maintained at 60°C instead of xylene as a clearing agent during processing. Gross tissue specimen evaluation like rigidity, translucency, change after impregnation and ease of sectioning were evaluated and was compared between the groups having group A as the control. All the specimens were processed, sectioned and stained using hematoxylin and eosin stain and were coded and observed for evaluation of nuclear staining, cytoplasmic staining and overall clarity of stained slide and the results were compiled and subjected to statistical analysis.

RESULTS:

Coconut oil treated specimen showed better characteristic features than palm oil treated specimen with respect to rigidity, translucency and change after impregnation which was 43.33%, 63.33% and 90% respectively. Both palm oil and coconut oil treated specimen showed similar features when compared with that of ease of sectioning. Among 90 hematoxylin and eosin stained slides, coconut oil treated sections showed better nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity of staining which was 83.33% ,93.33% and 93.33%.

CONCLUSION:

Coconut oil treated specimen showed better characteristic features than palm oil treated specimen with respect to rigidity, translucency and change after impregnation. Coconut oil treated sections showed better nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity of staining.

KEYWORDS:

Xylene, Coconut oil, Palm oil, Hematoxylin and eosin staining.

INTRODUCTION

The more sophisticated, immunological and molecular biological techniques have been introduced into pathological practice during past few decades that helps in precise diagnosis. However, hematoxylin and eosin (H & E) stained paraffin sections still remain the most widely used technique for routine diagnostic work¹. The main components in hematoxylin and eosin histopathologic staining procedure are xylene and graded alcohol other than hematoxylin and eosin. In the steps such deparaffinization, rehydration and dehydration, xylene as well as graded alcohol are the unavoidable chemical solutions². A wide range of chemicals which are potentially dangerous are employed in the pathological laboratory³.

Xylene is an aromatic hydrocarbon which is extremely biohazardous. The histopathological laboratory technicians are routinely exposed to xylene during procedures like tissue processing, clearing, staining, placing a cover slip and also while cleaning tissue processors. Xylene is exposed maximum during dewaxing of sections.

The main effects of inhaling xylene vapours are depression of the central nervous system with symptoms such as headache, dizziness, nausea and vomiting. Long-term exposure may lead to irritability, insomnia, agitation, extreme tiredness, tremors, impaired concentration and short-term memory⁴. Effects to reduce the health hazards due to xylene exposure in histologic laboratory must be made in order to make a more safer working environment by making histopathology technicians more familiar with the various health hazards, precautions and emergency procedures with respect to xylene exposure³.

Earlier aniline oil, benzene, chloroform, dioxane and toluene were routinely used in the histopathology laboratory. Later in 1950s xylene was made use instead of these chemicals and it was found out that it was also a failed alternative. Later during the mid 1970s, it was again found out that the xylene has got neurotoxic effect⁵.

The xylene free method for paraffin sections was developed and in use at Vrinnevi hospital, Sweden since 1995⁶. Technical grade xylene is a combination of the 3 isomers namely, Ortho, Para and Meta. This mixture is referred to as 'Xylol'. Studies have shown that xylene is well-absorbed by inhalation, oral and to some extent by the dermal route⁷. Once entered into the body it is stored in adipose tissue as it is soluble in it. It has a half life of 1 to 6 days in the subcutaneous fat. Studies have shown that laboratory workers exposed for 1.5 to 18 years were described as having the equivalent of general poisoning disorders including bone marrow toxicity and pancytopenia as caused by a wound contaminated with xylene⁸.

Effects of xylene on the tissues are due to depletion of mitochondrial enzyme adenosine triphosphate in the affected cells. Heart and kidney injuries, some fatal blood dyscrasias, and other less dangerous problems, such as skin erythema, drying, scaling and secondary infections are other toxic effects seen to be associated with use of xylene⁵.

Occupational Safety and Health Administration (OSHA) regulations has suggested that limonene reagents, aliphatic hydrocarbons and mineral oils were used to avoid the usage of xylene in the histopathologic laboratory. But these

xylene alternatives were proved as less effective and more costly⁹. Coconut oil, is a widely used vegetable oil. It's availability is easy and it is more popular for its non toxic nature. Furthermore it is known to get oxidized in a very slow rate, heat stable, and has got the highest resistance to rancidity¹⁰. Palm oil is widely available and a safer substitute for xylene. Hence, here we attempt to check the use of coconut oil and palm oil as a clearing agent during tissue processing and as a dewaxing agent during hematoxylin and eosin staining procedure has got any effect when compared with xylene processed tissue.

This study is designed to establish whether the usage of coconut oil and palm oil at a maintained temperature as a clearing agent during tissue processing and as a dewaxing agent during staining procedure has got any effect on transparency, rigidity, change after impregnation, ease in sectioning and quality of staining such as nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity of staining as compared with the xylene treated counterparts.

AIMS & OBJECTIVES

AIM

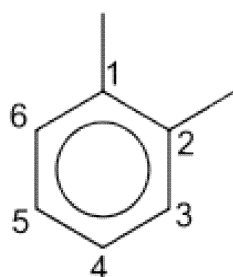
To evaluate the efficiency of coconut oil and palm oil as a clearing agent for hematoxylin and eosin staining procedure and compare it with xylene.

OBJECTIVE

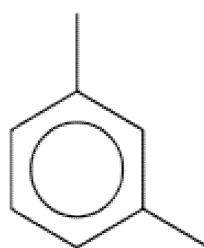
To determine whether tissues cleared and dewaxed with coconut oil and palm oil are same or superior with that of xylene treated tissues.

REVIEW OF LITERATURE

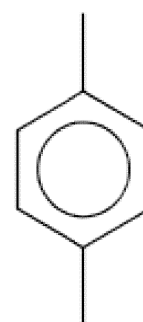
Xylene was first isolated and named by the French chemist Auguste Cahours in the year 1850, has been discovered as a component of wood tar. Xylene (from Greek means "wood"), xylol or dimethylbenzene is any one of three isomers of dimethylbenzene, or in a combination form. It has got a formula $(\text{CH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_4$ with each of these three compounds possess a central benzene ring with which two methyl groups are attached. These are colorless and flammable liquids with a great industrial value. The mixture is referred to as both xylene or xylenes. Xylene chemically exists in three isomeric forms. The isomers can be distinguished by the designations namely ortho (-o-), meta-(m-) and para(-p-), which specify to which carbon atoms (of the benzene ring) the two methyl groups are attached. Carbon atoms around the ring are counted starting from one of the ring carbons bonded to a methyl group, and counting towards the second methyl group, the o-isomer has the IUPAC name of 1,2-dimethylbenzene, the m-isomer is 1,3-dimethylbenzene and the p-isomer is 1,4-dimethylbenzene. Of the three isomers, the p-isomer is the most industrially used after since it can be oxidized to terephthalic acid¹¹.



1,2-dimethylbenzene
(*ortho*-xylene)



1,3-dimethylbenzene
(*meta*-xylene)



1,4-dimethylbenzene
(*para*-xylene)

Based on respective isomers, the physical and chemical properties of xylene differs. The melting point for m-xylene is around 47.87 °C and for p xylene is roughly around 13.26 °C. The boiling point for each isomer is around 140 °C. The density of each isomer is around 0.87 g/ml. It is less denser than water. In air, xylene can be smelled at low concentrations between 0.08 to 3.6 ppm (parts per million).In water, xylene can be tasted at a level between 0.53 to 1.8 ppm⁴.

In laboratories xylene is used to prepare dry ice bath. It has also got its purpose in light microscopes, the synthetic immersion oil can be removed from the microscopic objective using xylene solvent. In histopathology laboratory the application of xylene are, it is used as a clearing agent, to remove the paraffin wax and in restaining of archival slides and prior to mounting.¹²

XYLENE AND ITS HEALTH HAZARDS

The conventional hematoxylin and eosin staining procedure is the gold standard technique and usage of xylene as a clearing agent in H/E procedure is valid, but its major demerits are cost containment, toxicity and polluted working environment¹³. Xylene is easily absorbed by the oro-respiratory mucosal tract following ingestion and inhalation⁴. The penetration of xylene through dermal and epidermal layers are enhanced when it is present in varied physical states. In humans, 64% of the intaken dose reaches the systemic circulation¹⁴. Xylene is rapidly distributed to the tissues once it is absorbed. On absorption by blood, it attaches to serum protein to form a complex. Of the total absorbed xylene, 95% is metabolized in the liver to methyl hippuric acid (MHA) and about 70–80% of

metabolites are removed from body as urine within a time period of 24 hours. Since xylene is lipophilic, it is accumulated in adipose tissue. In murine studies, adipose tissues were examined to study the half-life for the elimination of xylene, which was estimated to be 7 hours, whereas in humans it is around 40 hours¹⁵. As per OSHA regulations, serum evaluation of MHA, which is the major metabolic product of xylene is mandatory among laboratory staffs and chemical factory employees. This is an accurate estimation of atmospheric exposure of xylene in the professional environment¹⁴.

United State Department of Health and Human services and Oak ridge National Laboratory reviewed the toxic effect of xylene and found out that xylene can cause health effects as a result of both acute (<14days) and chronic (>365 days) exposure. Accidental splash of xylene in the eye can result in eye damage. The effects can begin to occur with exposure to air levels of 100ppm. Following xylene ingestion, throat irritation can occur at approximately 200ppm within 3-5 minutes. Xylene exposure at 200ppm \leq can cause lung irritation, causes chest pain and results in shortness of breath. Liver and kidney damage are confirmed as a result of high exposure to xylene. Extreme exposure can result in pulmonary oedema⁴. Depletion of adenosine triphosphate, which is a mitochondrial enzyme are confirmed in specifically affected cells. Renal injuries, hematologic discrepancies which are morbid and other immediate complications such as erythema, pruritis, exfoliation of the dermal and epidermal layers; all these changes predisposes the skin to acquire opportunistic infections which are considered to be noxious effects associated with the usage of xylene¹⁶.

Xylene is capable of penetrating the garments and laboratory safety accessories such as gloves and boots which in turn leads to blistering and charring of skin and oedematous changes at the submicroscopic level⁴. Dermal absorption is minimal following exposure to xylene vapour. Ingestion of xylene has proved to cause severe gastrointestinal problems in humans. Limited studies were available for confirming and addressing the potential carcinogenic effects of xylene.

United States Environment Protection Agency (EPA) has placed xylene in weight of evidence group D, not classifiable as to human carcinogenicity¹⁷. Intra uterine effects of xylene on the foetus showed that retarded bone osteogenesis. In animals, behavioural changes has been reported in the absence of maternal toxicity. Inhalation of xylene by conceived woman can reach the growing foetus and it will contaminate the breast milk in lactating women⁴.

The studies on air contaminants by OSHA (Occupational safety and health administration-2005) reported a condition named as “Organic Solvent Syndrome” in which chronic exposure to xylene can cause generalized symptoms like cephalgia, irritable frame of mind, depression, loss of sleep, anxiety, fatigue, tremors, lack of concentration and short-term memory⁴.

Ogata M et al (1970) evaluated the urine of persons who are exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene as a test exposure to check for the presence of hippuric acid and m- or p- methyl hippuric acid. His study has shown that hippuric acid was excreted equivalent to 68 % of the toluene absorbed, and m-methyl hippuric acid equivalent to 72% of the m-xylene

absorbed. Up to hydrocarbon concentrations of 200 ppm the total quantity of hippuric acids excreted was proportional to the total exposure¹⁸.

Savoleinen H et al (1980) studied the effects of xylene on central nervous system. They isolated xylene in the peri, epi and endoneurium, which is due to the solubility of xylene through the hydrophobic layers of the neural envelop. They concluded that the metabolites of xylene interferes with the biochemical functions of proteins, this eventually leads to the malfunctioning of neurons. The pathogenesis of this is as follows: the chemical interaction with the protein layers or by the dissolution of the lipid layers are crucial for the physiological functioning of the membrane and the transmembrane proteins. At the biochemical level another important reaction i.e, methyl benzaldehyde production through the microsomal enzymes have also been reported¹⁹.

In a study by Jacobson GA et al (2003), they researched the association between the low level TWA atmospheric xylene in the aerosol exposure and urinary MHA among humans. A statistically significant result was obtained between environmental xylene exposure and urinary MHA measurements which was less than 15 p.p.m. And it was an accurate and reliable measurement for the same. Values were estimated before and after a work day and xylene exposure was less. However, MHA was significantly positive in all workers irrespective of their work hours. The study was followed up and the values of the MHA concentration in post-shift urine of 1.3 gm of creatinine after exposure to a TWA of 100 p.p.m. xylene¹⁴.

Hipolito RN (1980) elaborate the various symptoms seen in association with the laboratory technicians exposed to xylene over a period of 4 to 10 years. The symptoms included chronic headache, chest pain, leucopenia, malaise, impaired lung functioning, electrocardiographic abnormalities, dyspnea, cyanosis of hands, fever, and mental confusion. All these above mentioned symptoms were reversible ²⁰.

Taskinen H et al (1989) did a prospective cohort study in Scandinavian countries in which he studied the exposure of six organic solvents including xylene to evaluate any inherited defects are obvious in the foetus. The factors which significantly increased in the ratio of miscarriage of pregnancy following exposure of men/fathers working in close association with toluene or other organic solvents. Finally they concluded that there is no such association between parental exposures and congenital malformation in foetuses.²¹

Uchida Y et al (1993), in their study on the effects of xylene in musculoskeletal system observed that workers exposed to xylene reported reduced grasping power and associated reduced muscle power in extremities more frequently than unexposed controls group. Their study conclude that this was due to the effects on neurons by xylene, rather than a direct effect on muscles²².

Revilla AS et al (2007) assessed in-vitro adverse of effects toluene and xylene in hepatic tissue of murine samples for the aerobic respiration of succinate compounds. In their study various parameters such as membrane potential, ionic calcium release, reactive oxygen species, Adenosine tri

phosphate levels were assessed. According to their research, mitochondrial uncoupling through ATP depletion was the main cause for the biological hazardous effects of toluene and xylene.²³

Adrian F et al (2013) investigated the possible adverse effects of xylene on the vestibulocochlear system in human beings. A statistically significant results were obtained among the exposed and nonexposed participants. The xylene exposed individuals had pure tone threshold and an auditory brain stem response. A close association was observed between the auditory function and high urinary output of the chief xylene metabolite i.e, MHA. Poorer test result results were obtained in individuals with higher exposure than that with lower exposure²⁴.

Effects of xylene on various body systems⁴.

No.	Body system	Effects
1.	Central nervous system	Depression- Head ache, Dizziness, Nausea, Vomiting Long term exposure- 'Organic solvent syndrome'
2.	Eyes, Nose , Throat	Irritation, Damage surface of eye
3.	Respiratory system, Lungs	Irritation, Chest pain, Shortness of breath, Dyspnea, Impaired lung function, Pulmonary edema
4.	Blood	Anemia, Leucopenia
5.	Gastrointestinal tract	Nausea, Vomiting, Gastric irritation
6.	Musculoskeletal system	Reduced dexterity
7.	Skin	Irritation and dermatitis, dryness, flaking, cracking, burns and blistering
8.	Reproductive system	Contaminate breast milk Spontaneous abortions
9.	Foetus	Delayed ossification and behavioural effects
10.	Liver and Kidney	Injury at high exposure levels
11.	Carcinogenicity	Limited evidence
12.	General	Fever, Cyanosis, Malaise

Xylene substitutes

Generally, there are four classes of substitutes for xylene. These include

1. Limonene reagents
2. Aliphatic hydrocarbon mixtures
3. Aromatic hydrocarbon mixtures
4. Mineral oil mixtures

Limonene reagents

These reagents are prepared by steam distillation of orange peels. Major component is d-limonene. It is a biodegradable, noncorrosive and nonflammable product. Since they do not contain benzene and toluene, toxicity is less. Dry reasonably faster and leaves no residue. Because of its high vapor pressure, it does not evaporate fast; hence, cover slipping of multiple slides can be done easily. It produces minimal tissue shrinkage, soluble in alcohol and also in mounting media. But it is expensive and is oily in nature, with very offensive odor and has got degreasing effect when in contact with skin⁴.

Aliphatic hydrocarbon mixtures

These substitutes need longer time to produce similar changes on the tissue as that of their aromatic group because of their aliphatic structure. Mostly they are odorless and can be recovered by distillation. It is not easily biodegradable. Less expensive than limonene reagents. They are non greasy and less irritating to the skin than xylene and d-limonene-based clearing agents. It is classified as hazardous waste due to its flammability. More expensive and less tolerant of contamination than xylene⁴.

Aromatic hydrocarbon mixtures

Not much known because they are regarded as toxic as that of xylene. Aromatic hydrocarbon combinations with higher boiling point and lower volatility than xylene are being manufactured⁴.

Mineral oil mixtures

Combinations of various mineral oils are potential substitutes to xylene. Pure isopropanol or combined with liquid paraffin wax is a viable and inexpensive substitute for xylene in tissue processing⁴. Wastage management of mineral oil and its mixtures is conducted by mixing it with the already used paraffin and final solid is reduced to ashes⁹.

The major benefits of eliminating xylene from tissue processing techniques are:

1. Physical and mental fitness.
2. Limiting the exposure of a hazardous chemical, thereby reducing the cumulative effects of exposure to toxic chemicals for laboratory staff.
3. Economic wastage management protocol.

Xylene-free method offers maximum safety as well as superior quality in result, and it is cost-effective also²⁵. Several studies have been conducted to replace toxic agent xylene with substitutes in both clearing and dewaxing.

Bruun RB et al (1992) studied the efficiency of cooking oils such as olive oil and coconut oil over xylene. The study was divided into two groups, where in one group with histochemical staining method and the second group

with immunohistochemical staining. Their study showed marginal differences in the tissue property between the xylene processed when compared with the oil processed specimens. All the oil processed tissue samples were found adequate for histologic diagnosis. No differences were recorded between the above mentioned staining techniques. However, there was no qualitative differences between the groups, long-term reproducibility of oil-processed tissue remained to be justified in their study²⁶.

Buesa RJ (2000) conducted a study in which crude mineral oil products were used instead of xylene in tissue processing. Routine tissue processing methods were followed. The mineral oil was specially prepared as follows: an admixture of ethanol, isopropyl alcohol, and mineral oil was maintained at a temperature between 45⁰C and 50⁰C, with vacuum pressure and agitation. This was then subjected with mineral oil and molten paraffin wax in subsequent steps. The sample considered for this study were twelve routine conventional histochemical stainings and twenty one immunohistochemical staining. These groups were repeatedly tested nine times by multiple reviewers in a blinded method. The evaluation of the results in their study showed that the tissue processed with mineral oil were equivalent to that of the tissues which was processsd using xylene⁹.

A major benefit of mineral oil is that it is organic and is biologic and environment friendly. It also has an added advantage of simplifying the tedious task of microtomy⁹.

Peshkov MV and Busea RJ (2009) did a study and that showed mineral oil as the better clearing agents with respect to quality of sectioning and which helped the pathologists to draw to an accurate diagnosis using with both automatic and manual procedures, when mineral oil and isopropanol were used at a ratio of 5:1 and 2:1 respectively. Then it was subjected to undiluted mineral oil, maintained at a temperature of 50⁰C, there by making this a more safer and less expensive substitute of xylene¹⁶.

Andre et al (1994) in their study made use clearing and infiltration mixtures (CIMs) as a substitute for xylene. The tissue sample for the study was obtained from liver, brain and breast samples. Four CIMs, were taken and each was a combination of 2 parts of molten paraffin and 1 part of xylene or mono saturated, unsaturated or saturated oil. A substitute of paraffin to that of xylene only was considered to be the fifth regimen. The routine standard tissue processing protocol was done for the same. Evaluations were carried out during embedding, microtomy, and hematoxylin and eosin staining procedures. Gross details and microscopic characteristic evaluation were done by experienced professionals and concluded that wheather the tissue sections were appropriate for the diagnosis. Eventhough various CIMs could be used as effective xylene substitutes for satisfactory processing of tissues, occasionally minor errors occurred during processing and it also had disadvantages during sectioning and staining procedures²⁷.

Eleanor A et al (1997) presented a cost-effective, environmentally safer tissue processing technique that resulted in superior morphological details and

antigenicity preservation. In their procedure, they made use of paraffin oil instead of common xylene and limonene reagents. Paraffin oil was compatible with existing laboratory equipment and could be used in closed tissue processing instruments. The oil is economical because it is easily and quickly restored for repeated usage²⁸.

An evaluation was carried out by Falkeholm L et al (2001) in which tissue samples from 10 archival blocks were obtained, from breast, skin and intestine tissue. Three sections were made out of each tissue block and stained using H&E, periodic acid-Schiff (PAS), and Van Gieson's method. All were processed using xylene free method and also by conventional method. Once the slides were obtained, they were blinded and subjected to microscopic examination by nine pathologists. All the results were computed and scored which was found to be good in case of xylene free sections than that of xylene treated tissue sections. The staining characteristics of H&E and PAS stains were found similar. However, the sections stained with Van Geison were of poor quality which was accounted as usage of a batch of degraded stains. Thus they concluded the acceptability and application of non-xylene methods in myriad tissue staining techniques⁶.

Ofusori DA et al (2009) prepared a concoction of xylene and kerosene. This salient properties of xylene as a clearing agent was incorporated in this mixture in order to achieve good staining and cellular features. Their study results revealed that tissues were cleared well without any derangement in the morphology. On microscopic examination, the tissue staining characteristics were

approved by well qualified pathologists. The results of this study concluded that the xylene-kerosene solution could proved to be a promising clearing agent in the near future.²⁹

Bleuel E et al (2012) evaluated a solvent-free processing protocol in which fluid state of carbon dioxide was used as an intermediate. A series of staining techniques with standard operating procedures were carried out in their study. The clearing characteristics of this experimental solution was equivalent to that of the routine xylene processed tissue. The gross tissue size reduction was found to be at 15% for both the solutions. They concluded that this solution was a reliable clearing agent with appreciable tissue staining, morphology accounted to strong antigenicity.³⁰

Kunhua W et al (2012) prepared a concoction of 86% white oil and 14% N-heptane which was evaluated with xylene. Murine samples and human samples were treated with both these solutions and subjected to multiple staining procedures. On grossing both the groups demonstrated ease of sectioning and minimal tissue size reduction. The experimental solution used in their study revealed good cellular structure and histology with clarity in nuclear and cytoplasmic boundaries, when stained with hematoxylin and eosin solutions. The authors also found statistically significant values when the xylene and xylene substitute were stained following routine histochemical and immunohistochemical staining procedure.³¹

Piniewska D et al (2012) evaluated in their study, xylene free option for DNA extraction technique. In this study they used methyl tert-butyl ether

(MTBE), instead of xylene, for deparaffinization of tissue sections. The samples for their study was obtained from multiple tissues from randomly selected necropsies. They specifically evaluated deparaffinization procedure in association with automatic tissue staining equipment. Molecular methods were employed for DNA extraction and were amplified using Polymerase chain reaction and were genotyped with reference to the data base of human identification identifier. The conclusion of their study was that no significant changes were found between the two solutions with respect to the isolated microsatellite loci³².

Nangia R et al (2013) conducted a study to estimate the reliability of the tissue processing method using conventional microwave for head and neck biopsy samples by comparing two different xylene free techniques with the conventional method, based on the clarity of nucleo -cytoplasmic differentiation and staining of tissues processed by each method. In their study twenty oral mucosal biopsy specimens were cut into three equal parts and each part were processed by three processing techniques. Hematoxylin and eosin staining was performed at the same time and grading was done by four oral pathologists. They concluded that this methods shortens the time for tissue processing without affecting the architecture of the cells and with increased intensity of staining but it requires microwave tissue processor for best result.³³

Aydin I et al (2013) conducted a study in which they assessed the efficiency of a relatively newer solutions to formaldehyde and xylene on routine tissue processing techniques. In their study five fixative solutions and four clearing agents were used. The tissue samples obtained were scrutinized for the isolation of

DNA and RNA using chromogenic in situ hybridization. The qualitative assessment of DNA was conducted by polymerase chain reaction. Histochemical and immunohistochemical (IHC) staining results were compared in their study. The study results summarized that all the tissue sections had good quality. However, solutions that contain glyoxal as a main component in IHC stained sections needed to be evaluated. The clearance of signals with chromogenic in situ hybridization were almost same and well suitable for all the tissue samples. Formaldehyde free tissue samples were found to be appropriate for nucleic acid fixation.³⁴

Taneeru S et al (2013) compared the efficiency of xylene free sections processed with limonene oil and sesame oil and compared them with conventionally deparaffinized H&E sections. Their study revealed better results with sesame oil than limonene oil in tissue processing³⁵.

Premalatha BR et al (2013) did a study to assess the efficiency of refined mineral oil (RMO) for deparaffinizing the tissues when compared with that of xylene in routine hematoxylin and eosin staining procedure. Their study concluded that the staining quality obtained by xylene free method, using refined mineral oil was equally effective as the conventional method. In addition to that, this method is safer, faster and cost effective³⁶.

Sermadi W et al (2014) studied the reliability of coconut oil as a tissue clearing agent to compare it with xylene. In their study two groups containing 60 samples each were processed with the same tissue being divided into two parts. The first segment of every tissue was placed in xylene and the second segment

was immersed in coconut oil. All processed samples were evaluated for both grossing and microscopic features and comparison was done between the two groups. Their study concluded that there is significant shrinkage noted in xylene treated specimens when compared to that in coconut oil treated specimens and both the segments of the tissues treated in different solutions showed good staining qualities and morphologic cellular features¹⁰.

Ankle MR et al (2011), Ramulu S et al (2012) and Negi A et al (2013) evaluated the efficiency of 1.7% dish washing solution (DWS) in deparaffinization steps in H&E staining procedure. Among all, one section was stained with conventional H and E and other with DWS as a dewaxing agent in hematoxylin and eosin staining method. Slides were scored for various parameters such as nuclear staining, cytoplasmic staining, clarity of staining, uniformity, and crispness of staining. From the scores of these parameters the diagnostic adequacy of the slides was assessed. The conclusion of their study was that, a concentration of 1.7% of the dish wash solution was an efficacious deparaffinizing agent. This also proved to be an organic solution with relatively lesser biological effects, eco-friendly, and most importantly cost effective and a rapidly acting agent^{37,13,1}.

Henwood AF et al (2013) studied on special stains which was dewaxed by domestic dishwashing detergent in hot water and compared to xylene and alcohol dewaxing. They used multiple fungal stains used in their study were Grocott's Methenamine Silver (GMS), Periodic Acid Schiff's following diastase (PAS), and Sulphation Toluidine Blue (STB). A concentration of 2% dish wash solution

was used for the purpose of dewaxing. Their study revealed that detergent dewaxing is not only rapid, economical and biofriendly in contrast with xylene. This solution also proved to be a far superior clearing agent for fungal stains such as PAS, GMS and STB³⁸.

Ananthaneni A et al (2014) used 95% lemon water in addition to 1.5% dish wash solution as a dewaxing agent during conventional hematoxylin and eosin staining technique. Their study focused on identifying the staining characteristics of cytoplasm. This solution also deparaffinized better than that of xylene treated specimens with minimal paraffin wax retention³⁹.

An experimental study by Indu S et al (2014) compared the efficiency of cedar wood oil, as a possible alternative for xylene in routine hematoxylin and eosin staining procedures. 8% cedar wood oil and xylene were used in their study. The standardization protocol in their study was as follows: nuclear and cytoplasmic features, staining clarity, homogeneity of staining were assessed based on a scoring system. Their study revealed that a comparable association can be made between cedarwood oil and xylene with respect to the cellular features mentioned in the standardization protocol.⁴⁰

Swamy SRG et al (2015) conducted a study to evaluate the clearing efficiency and eco-friendly aspect of four naturally available oils. They are as follows Carrot oil, Olive oil, Pine oil and Rose oil, which were compared with the features of xylene. The methodology of their study was as follows: Formalin fixed tissue samples were taken and were subjected through ascending grades of alcohol. Tissue samples were immersed in each of the oils considered, and was

incubated in a hot air oven at 60-65 degree Celsius. The evaluation process was divided into two sub categories namely cellular architecture and quality of staining. All these test solutions were compared with xylene as a control solutions. The authors concluded that all the test solutions were equivalent to xylene as a clearing agent. However, among all the oils ,pine oil was by far the most superior test oil in both physical and clearing features. It also had far better cellular characteristics and appreciable clarity of staining, relative to the other test oils ⁵.

Inorder to achieve a complete xylene free environment, xylene has to be eliminated from all the essential steps in histopathological staining techniques. Various studies were also carried out for the replacement of xylene in tissue processing as well as staining.

Lyon H et al (1995) in their experimental study included three unbranched, saturated, aliphatic monoesters containing 12–14 carbon atoms. On large-scale testing of these compounds, they found butyldecanoate seen to be the closest to an ideal substitute for aromatic and aliphatic hydrocarbons in the histology department: the section quality was almost equal to that obtained with xylene. For dewaxing, it was used at a temperature maintained at 30–35°C⁴¹.

Maini D (1999) evaluated two short-chain aliphatic hydrocarbons and two long chain aliphatic hydrocarbons as a xylene substitutes in their study. The H&E stained slides were individually assessed by eight pathologists. The following features were evaluated as follows: nuclear staining, cytoplasmic staining, cytoplasmic clarity, hematoxylin staining, eosin staining, and overall appearance

of the section for each clearing agent. Their study concluded that overall, performance of the xylene substitutes studied was found to be inferior to xylene by the evaluators⁴².

Temel SG et al (2005) conducted an innovative study using 1,1,1 trichloroethane in hematoxylin and eosin staining method employing a conventional microwave. Experimental groups were processed with xylene and 1,1,1 trichloroethane and stained with hematoxylin and eosin using a microwave oven at a temperature maintained at 180°C for 30 sec. This method reduced the procedure time taken for the whole procedure, but also obtained a superior staining quality when compared to those stained by the conventional method. Their study results concluded that 1,1,1 trichloroethane can be used as a safe and effective clearing agent in hematoxylin and eosin staining technique⁴³.

Chen CY et al (2010) used Propylene glycol methyl ether (PGME) as substitute for xylene in histotechnology and histochemistry applications. Tissue specimens were fixed and cleared in either PGME or xylene, embedded in paraffin wax, then dewaxed in either PGME or xylene. Then sections were treated with the stains namely hematoxylin and eosin and three special stains of the Gordon/Sweet silver staining method, PAS, and Masson's trichrome, and immunostains including actin, CD3, CK, CK7 and CK9. Later these sections were mounted in a resinous medium consisting of PGME. Variables such as water tolerance, dimension change, organic solvency, and anti-fading efficacy also were assessed in their study. Tissues treated with PGME did not undergo shrinkage when compared to those treated with xylene. PGME treated tissues

exhibited less organic solvency than xylene. There was no discernible change in the colors of stains in sections processed with PGME even after storage for two years. Their study results confirmed that PGME is a novel xylene substitute for applications in histotechnology and histochemistry techniques⁴⁴.

Stockert JC et al (2012) replaced xylene with n -heptane for paraffin embedding and dewaxing procedures. Immediately after fixation for 30 minutes, tissue samples were sectioned into small pieces and fixation was done in a freshly prepared fixative for 24 hours. Specimens were washed in running tap water for 1 day and treated with ascending grades of alcohol for 1 hour at each concentrations. Clearing was accomplished using two changes of n -heptane for 10 minutes. Control samples were cleared in xylene and embedded using paraffine wax. The tissues cleared in n-heptane were placed in a mixture of paraffin and n-heptane in a ratio of 1:1 at 56 ° C for 1 hour, then embedded in paraffin wax at 56°C for 24 hour. Sections obtained were de-waxed with n-heptane for 15 minutes and hydrated in descending orders of alcohols. Their study revealed excellent preservation of morphology in all sections. Staining by hematoxylin and eosin and Masson's trichrome was identical to that of sections processed with xylene⁴⁵.

Patil S et al (2014) evaluated and compared the diagnostic ability of selective soft tissue specimens processed and stained by the conventional and also by xylene free microwave method. Each specimen was cut into two halves with one half processed and stained by the conventional method while the other by the microwave method. After the procedure ,blinded and four observers

evaluated the slides to evaluate cellular clarity, cytoplasmic details, nuclear detail and also color intensity. Their study results concluded that the microwave method showed better results as compared to the conventional method with respect to processing and staining procedure. The main reduction in time with the microwave method was observed⁴⁶.

Udonkang M et al (2014) made use of bleached palm oil at a temperature of 60⁰C as a xylene substitute for tissue clearing and dewaxing procedure. Fifteen sets of tissues were taken and divided into two groups. The first group was labelled as A and the tissues were treated with xylene as a control solution. The second group was labelled as B and was treated using bleached palm oil at 60 degrees. Both these sections were treated with routine hematoxylin and eosin staining with standard operating procedures. The results of their study was as follows: the quality of transparency, quality and clarity of staining were comparable between the test and the control samples. Thus the test oil was as good as the control oil and was also reasonably priced , easily procured and was organic in nature⁴⁷.

MATERIALS & METHODS

Study Setting:

The present study was carried out in the Department of Oral Pathology and Microbiology, Sree Mookambika Institute of Dental Sciences, Kulasekharam after obtaining clearance from the Institutional Research & Ethical Committee Board.

Study period: One year

Study design: Cross sectional Comparative study.

Study subjects:

Soft tissue specimen from those patients fulfilling the inclusion and exclusion criteria of the study are to be taken from the department of oral and maxillofacial surgery of Sree Mookambika institute of dental sciences. All of these tissues are to be taken during routine surgical removal of impacted third molar. The subjects selected for the study were explained about this study and informed consent was be taken.

Detailed description of the groups:

Group A - Tissue undergoing conventional hematoxylin and eosin histopathological procedure with Xylene .

Group B - Tissue undergoing conventional hematoxylin and eosin histopathological procedure replacing Xylene with palm oil.

Group-C - Tissue undergoing conventional hematoxylin and eosin histopathological procedure replacing Xylene with coconut oil.

Inclusion criteria:

1. Gingival tissue.
2. Tissue specimen with size measuring not less than 1cm.

Exclusion criteria:

1. Inadequate tissue specimen.
2. Tissue specimen which are not adequately formalin fixed.

Sample size of each group:

Group A– 30

Group B – 30

Group C – 30

Total sample size of the study: 90

Sample size is calculated based on the equation: $\frac{4PQ}{(d)^2}$

P = Percentage of any one variants in study

Q= 100 – P

d= 20% of P

Level of confidence=95%

Level of power=80%

With reference to the study conducted by Udonkang et al in 2014⁴⁷, the obtained

P = 80

Q = 20

d = 16

Sample size= 25,

Here 30 is included as the sample size per group for this study.

Equipment and Armamentarium

1. Tissue cassette
2. 10% Buffered Formalin
3. Absolute alcohol (Nice Chemical Pvt Ltd)
4. Xylene (Nice Chemical Pvt. Ltd)
5. Palm oil (Freshly extracted palm oil- Oil palm India Ltd, Kollam)
6. Coconut oil (Freshly extracted coconut oil - Gandhipuram Oil Mills, Trivandrum)
7. Paraffin wax (Nice Chemical Pvt.Ltd)
8. L-blocks
9. Paraffin wax bath (Guna Serological water bath)
10. Rotary microtome (Spencers, Model No : 1010-SMT-006)
11. Tissue floating water bath (Yorco)
12. Slide warming table (SH Brand)
13. Staining Jar
14. Microscope slides (Labtech Medico P Ltd)
15. Slide rack (Equitron)
16. Hematoxylin (Nice Chemical Pvt.Ltd)
17. Eosin (Nice Chemical Pvt.Ltd)
18. Cover slip 25x50mm (Blue star)
19. DPX Mountant (Nice Chemical Pvt.Ltd)

20. Electronic Timer (Pacer)
21. Dish wash solution (Vim)
22. Paraffin wax (Himedia Laboratory Pvt. Ltd)
23. Incubator (Kemi)
24. Light microscope (Labomed, Model number Lx200)

Procedure in Detail :

Soft tissue specimen from those patients fulfilling the inclusion and exclusion criteria of the study were taken from the department of oral and maxillofacial surgery of sree mookambika institute of dental sciences. All of these tissues were taken during routine surgical removal of impacted third molar. The subjects selected for the study were explained about this study and informed consent was taken. The sample included a total of 30 tissue specimens.

Each of 30 specimens removed during surgical procedure were fixed with 10% buffered formalin for 48 hour All the tissue specimens were cut into three equal parts and were arranged it experimental groups namely Group A, Group B and Group C, in which each group consisting of 30 tissue bits.

For Group A, after fixation, tissues were dehydrated through ascending grades of alcohol (70%, 90%, 100%) for 1 hour in each change. Dehydrated tissues were dealcoholized (cleared) by using two changes of xylene, xylene I for 45 minutes and xylene II for 30 minutes. The cleared tissues were then impregnated in two changes of molten paraffin wax (wax I for 1 hour and wax II for 1 hour 30 minutes). Embedding was carried out in molten paraffin wax using

plastic disposal cassettes and allowed to solidify before microtomy. Tissue blocks were sectioned at thickness of 4 μm with a rotary microtome and sections floated in a warm water bath and each picked in pairs on albuminized glass slides.

Before staining, the slides were dewaxed in xylene I and II for 5 minute each, was then passed through descending grades of alcohol (100%, 90%, 70%) and was rinsed it in water for 2 minutes. Hydrated sections were stained in haematoxylin solution for 10 minutes and was rinsed in water for 2 minutes. Then differentiation was done by a single dip in 1% acid alcohol and tap water wash for 30 seconds. The sections were then counterstained in 1% eosin solution for 1 minute, and dehydrated with 70% ,90% and 100% for 1 minute each. Clearing of the slides using 3 changes of xylene (I, II and III) for 1 minute each was done, air dried and mounted with DPX mountant.

For Group B, after fixation, tissues were dehydrated through ascending grades of alcohol (70%, 90%, 100%) for 1 hour in each change. Dehydrated tissues were dealcoholized (cleared) by using two changes of heated palm oil at 60°C in an incubator for 1 hour each. The cleared tissues were impregnated in two changes of molten paraffin wax (wax I for 1 hour and wax II for 1 hour 30 minutes). Embedding was done in molten paraffin wax using plastic disposal cassettes and allowed to solidify before microtomy. Tissue blocks were sectioned at 4 μm with a rotary microtome and sections floated in a warm water bath and each picked in pairs on albuminized glass slides.

Before staining, the slides must be dewaxed in heated palm oil at 60°C in an incubator for 5 minute each, and was rinsed it in 1 change of 1.7% dish wash

solution prewarmed at 60°C .Then was passed it through descending grades of alcohol (100%, 90%, 70%) for 5 minutes each and was rinsed it in water for 2 minutes. Hydrated sections were stained in haematoxylin solution for 10 minutes and was rinsed in water for 2 minutes. Then differentiation was done by a single dip in 1% acid alcohol and tap water wash for 5 minutes. The sections were then counterstained in 1% eosin solution for 2 minutes, and dehydrated with 70% ,90% and 100% for 1 minute each. Clearing of the slides using 2 changes of preheated palm oil at 60 °C for 1 minute each was done, air dried and mounted with DPX mountant.

For Group C, after fixation, tissues were dehydrated through ascending grades of alcohol (70%, 90%, 100%) for 1 hour in each change. Dehydrated tissues must be dealcoholized (cleared) by using two changes of heated coconut oil at 60°C in an incubator for 1 hour each. The cleared tissues were impregnated in two changes of molten paraffin wax (wax I for 1 hour and wax II for 1 hour 30 minutes).Embedding was done in molten paraffin wax using plastic disposal cassettes and allowed to solidify before microtomy. Tissue blocks were sectioned at 4 µm with a rotary microtome and sections floated in a warm water bath and each picked in pairs on albuminized glass slides.

Before staining, the slides must be dewaxed in heated coconut oil at 60°C in an incubator for 5 minute each, and was rinsed it in 1 change of 1.7% dish wash solution prewarmed at 60°C .Then was passed it through descending grades of alcohol (100%, 90%, 70%) for 5 minutes each and was rinsed it in water for 2 minutes. Hydrated sections were stained in haematoxylin solution for 10 minutes

and was rinsed in water for 2 minutes. Then differentiation was done by a single dip in 1% acid alcohol and tap water wash for 5 minutes. The sections were then counterstained in 1% eosin solution for 2 minutes, and dehydrated with 70% ,90% and 100% for 1 minute each. Clearing of the slides using 2 changes of preheated coconut oil at 60 °C for 1 minute each was done, air dried and mounted with DPX mountant.

Interpretation of Results :

During the tissue processing, in all the three groups, macroscopic observations based on rigidity, translucency, change after impregnation, and ease of sectioning were noted. Microscopic examination of prepared hematoxylin and eosin stained slides for nuclear staining, cytoplasmic staining and overall clarity of staining in all the three groups were evaluated by an experienced pathologist (observer I) under 10x and 40x magnification using Light microscope.

Parameters to be studied are

I) Gross tissue specimen evaluation

- a) Rigidity.
- b) Translucency.
- c) Change after impregnation.
- d) Ease of sectioning.

II) Hematoxylin and eosin stained slide evaluation

- a) Nuclear staining.
- b) Cytoplasmic staining.
- c) Clarity of staining.

Statistical Analysis :

All data were entered in a prepared data entry sheet. Data were entered in Microsoft excel application. The results obtained was analyzed by statistical package for SPSS 16.0 version. Annova test , Dunnet test and Chi square test was applied to find statistical significance between the groups.

COLOR PLATES

CP -1 : Soft tissue specimen for grossing



CP -2 : Grossed specimen and labeled into C1, P1 and X1



CP -3 : Tissue processing with cocount oil



CP -4 : Tissue processing with palm oil



CP -5 : Paraffin embedding bath



CP -6 : Semiautomatic microtome



CP -7 : Tissue floatation bath



CP -8 : Slide warming table



CP -9 : Incubator



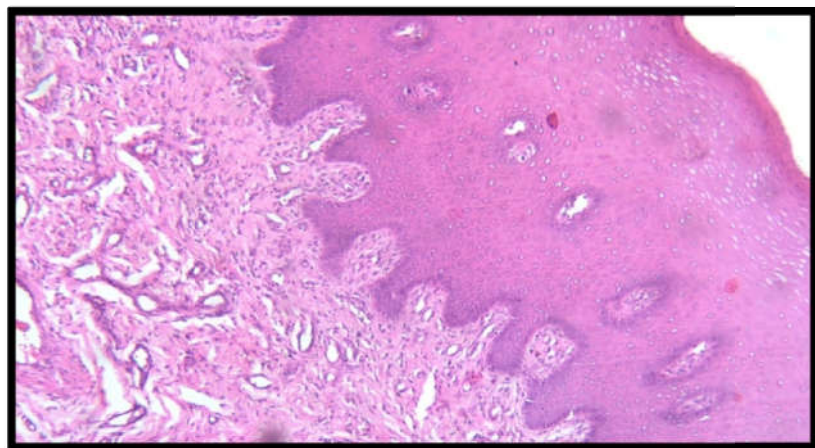
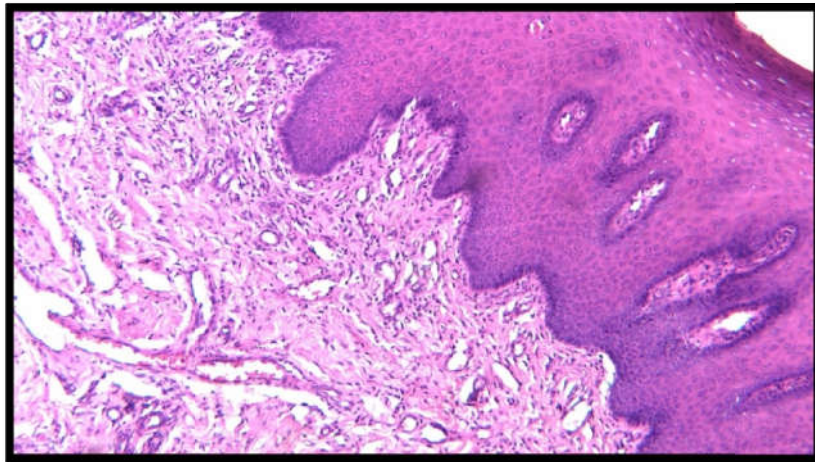
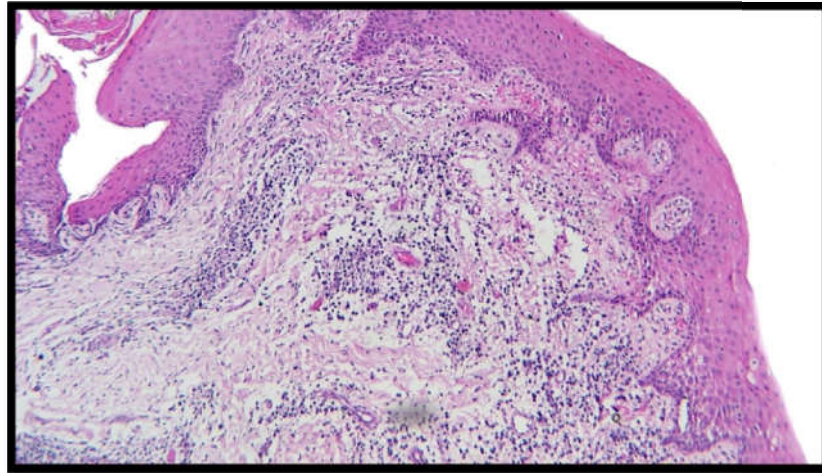
CP -10 : Hematoxylin and eosin staining reagents with palm oil



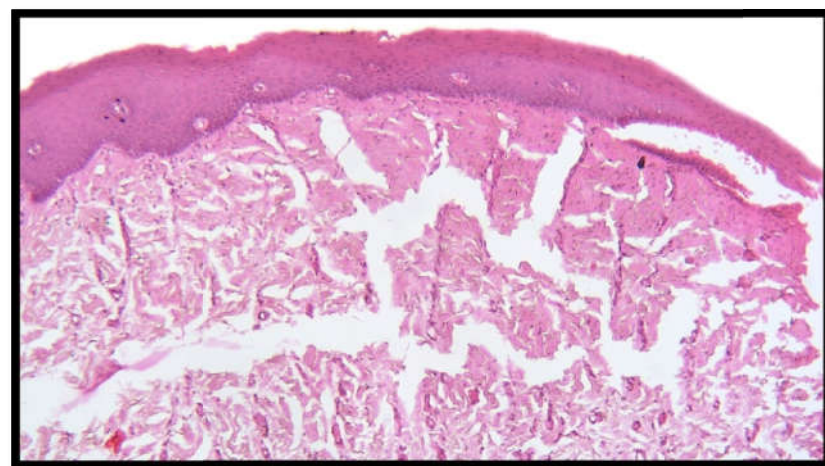
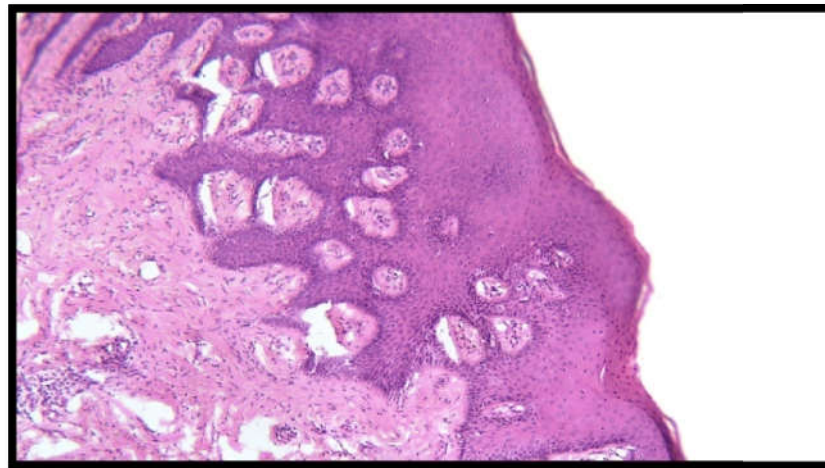
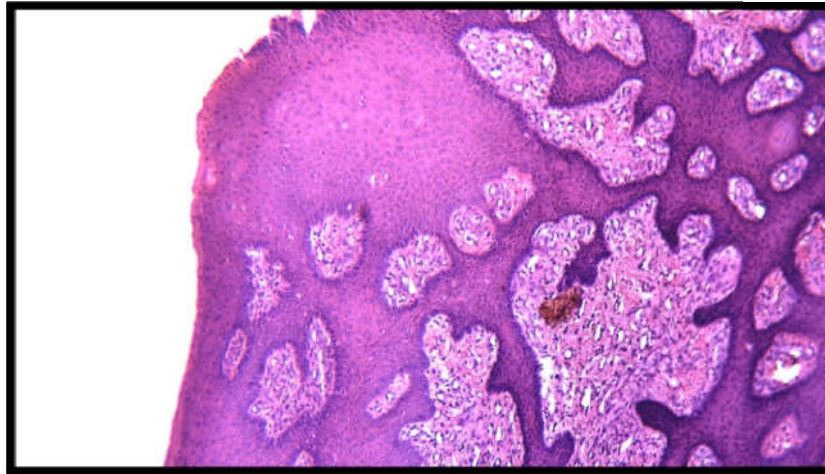
CP -11 : Hematoxylin and eosin staining reagents with coconut oil



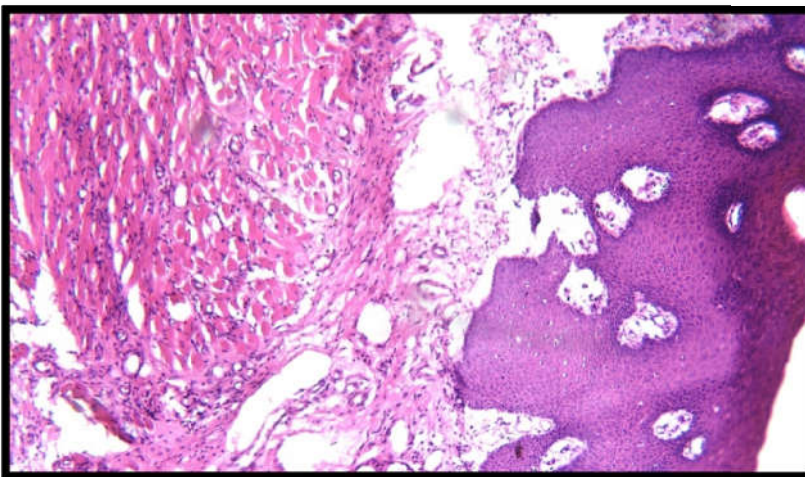
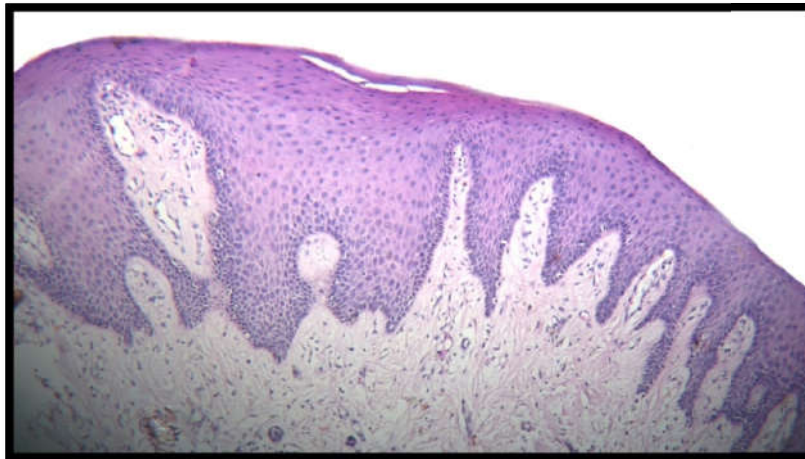
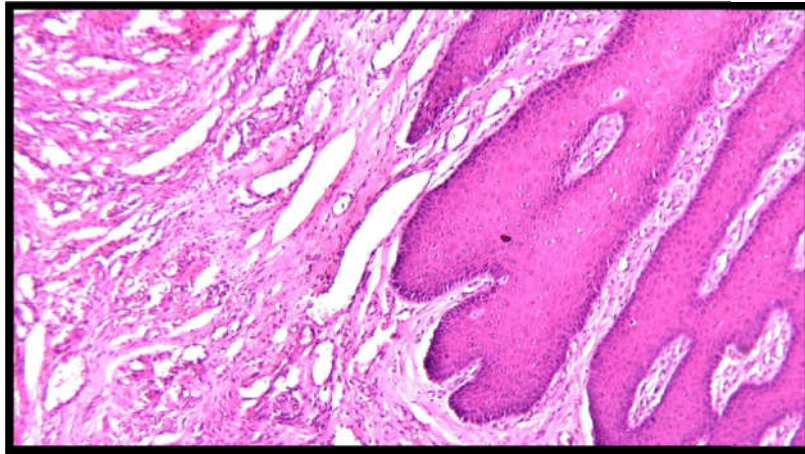
CP -12 : Photomicrographs of H/E stained sections treated with xylene
(x100)



**CP -13 : Photomicrographs of H/E stained sections treated with palm oil
(x100)**



**CP -14 : Photomicrographs of H/E stained sections treated with coconut oil
(x100)**



RESULTS & OBSERVATIONS

The present study was carried out in Department of Oral pathology and Microbiology, Sree Mookambika Institute of Dental Sciences, Kulasekharam. Soft tissue specimens from those patients undergoing third molar extraction and fulfilling the inclusion and exclusion criteria of the study were obtained from the department of oral and maxillofacial surgery. A total of 30 tissue specimens were collected, fixed in 10% formalin and sectioned into 3 equal parts and grouped as group A, B, and C.

Group A tissue specimen were taken for routine processing followed by hematoxylin and eosin staining procedure with xylene as clearing agent, whereas group B tissue specimens were treated with heated palm oil at a temperature maintained at 60°C instead of xylene as a clearing agent. Similarly group C tissue specimens were treated with heated coconut oil at a temperature maintained at 60°C instead of xylene as a clearing agent during processing. Gross tissue specimen evaluation like rigidity, translucency, change after impregnation and ease of sectioning were evaluated between groups based on scoring criteria given by Wajid Sermadi et al¹⁰.

All the specimens were processed, sectioned and stained using hematoxylin and eosin stain. After staining, all slides were coded and observed for evaluation of nuclear staining, cytoplasmic staining and overall clarity of stained slide and subsequent scores were given. After the evaluation of tissue specimens and stained slides, the results were compiled and subjected to statistical analysis. The data was expressed in number, percentage. Statistical Package for Social Sciences (SPSS 16.0 version) was used for analysis. One way

ANOVA (Post hoc) followed by Dunnett t-test and Chi square test was applied to find the statistical significance between the groups. P value ($p < 0.05$) considered significant at 95% confidence interval.

The rigidity of the specimen was compared between the groups having group A as the control. Group B and group C were evaluated to determine whether they are inferior, same or superior as that of group A specimens. Among 30 specimens, which were cleared using palm oil, 33.33%, 40% and 26.67% showed inferior, same and superior rigidity characteristics respectively. Among 30 specimens cleared using coconut oil, 23.33%, 43.33% and 33.33% showed inferior, same and superior rigidity characteristics as that of xylene with p value of 0.04, 0.01 and 0.03 which was statistically significant (Table 1).

The translucency of the specimen was compared between the groups having group A as the control. Among 30 specimens, which were cleared using palm oil, 20%, 26.67% and 53.33% showed inferior, same and superior translucency characteristics respectively. Among 30 specimens cleared using coconut oil, 20%, 16.67% and 63.33% showed inferior, same and superior translucency characteristics as that of xylene with p value 0.04, 0.001 (statistically highly significant) and 0.01 (Table 2).

The changes after impregnation of the specimen was compared between the groups having group A as the control. Among 30 specimens, which were cleared using palm oil, 16.67% and 83.33% showed inferior and same change after impregnation characteristics. Among 30 specimens cleared using coconut oil, 10% and 90% showed inferior and same change after impregnation with a p

value of 0.04 and 0.04 which was statistically significant (Table 3). None of the specimens among group B and group C showed superior features as than that of xylene.

The ease of sectioning of the specimen was compared between the groups having group A as the control. Among 30 specimens, which were cleared using palm oil, 6.67% and 93.33% showed inferior and same ease of sectioning characteristics. Among 30 specimens cleared using coconut oil 6.67% and 93.33% showed inferior and same ease of sectioning characteristics with a p value 0.04 (statistically significant) and 2.78 (statistically not significant) Table 4). None of the specimens among group B and group C showed superior features as than that of xylene.

All the specimens were processed, sectioned and stained using hematoxylin and eosin stain. Group A specimens were subjected to routine hematoxylin and eosin staining procedure, whereas group B and group C specimens were cleared using palm oil and coconut oil maintained at a temperature of 60°C respectively. The stained sections were assessed for nuclear staining, cytoplasmic staining and over all clarity of staining.

When all the stained slides were assessed for nuclear staining, among group A, 6.67% showed poor nuclear staining and 93.33% showed good nuclear staining, with a p value of 0.06, which was statistically not significant. Among group B, 30% showed poor nuclear staining, whereas 70% showed good nuclear staining with a p value of 0.03, which was statistically significant. Among group

C, 16.67% showed poor nuclear staining and 83.33% showed good nuclear staining, with a p value of 0.04, which was statistically significant.

Cytoplasmic staining of all stained slides were evaluated and among group A, 6.67% showed poor cytoplasmic staining and 93.33% showed good cytoplasmic staining, with a p value of 0.06, which was not statistically significant. Among group B, 16.67% showed poor cytoplasmic staining and 83.33% with good cytoplasmic staining features, with a p value of 0.04 which was statistically significant. Among group C, 6.67% showed poor cytoplasmic staining and 93.33% with good cytoplasmic staining, with a p value of 0.06 which was not statistically significant.

All the stained slides were assessed for clarity of staining and among group A, 6.67% showed poor clarity of staining, whereas 93.33% showed good clarity of staining with a p value of 0.06 which is statistically not significant. Among group B 20% showed poor clarity of staining and 80% showed good clarity in staining, with a p value of 0.03, which is statistically significant. Among group C, 6.67% showed poor clarity of staining, whereas 93.33% showed good clarity of staining, with a p value of 0.06 which is not statistically significant.

TABLES

Table-1: Comparison of rigidity between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Inferior to xylene		Same as xylene		Superior to xylene	
	Number	%	Number	%	Number	%
Xylene	0	0.00	30	100.00	0	0.00
Palm oil	10*	33.33*	12*	40.00*	8*	26.67*
Coconut oil	7*	23.33*	13*	43.33*	10*	33.33*
p value	0.04		0.01		0.03	

(*p<0.05 significant group-A with other groups)

Table-2: Comparison of translucency between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Inferior to xylene		Same as xylene		Superior to xylene	
	Number	%	Number	%	Number	%
Xylene	0	0.00	30	100.00	0	0.00
Palm oil	6*	20.00	8*	26.67	16*	53.33
Coconut oil	6*	20.00	5*	16.67	19*	63.33
P value	0.04		0.001		0.01	

(*p<0.05 significant group-A with other groups)

Table-3: Comparison of changes after impregnation between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Inferior to xylene		Same as xylene		Superior to xylene	
	Number	%	Number	%	Number	%
Xylene	0	0.00	30	100.00	0	0.00
Palm oil	5*	16.67	25*	83.33	0	0.00
Coconut oil	3*	10.00	27	90.00	0	0.00
P value	0.04		0.04			

(*p<0.05 significant group-A with other groups)

Table-4: Comparison of ease of sectioning between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Inferior to xylene		Same as xylene		Superior to xylene	
	Number	%	Number	%	Number	%
Xylene	0	0.00	30	100.00	0	0.00
Palm oil	2*	6.67	28	93.33	0	0.00
Coconut oil	2*	6.67	28	93.33	0	0.00
P value	0.04		2.78			

(*p<0.05 significant group-A with other groups)

Table-5: Comparison of nuclear staining within H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Poor		Good		P value
	Number	%	Number	%	
Xylene	2	6.67	28	93.33	0.06
Palm oil	9	30.00	21*	70.00	0.03
Coconut oil	5	16.67	25*	83.33	0.04

(*p<0.05 significant compared with the groups)

Table-6: Comparison of cytoplasmic staining within H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Poor		Good		P value
	Number	%	Number	%	
Xylene	2	6.67	28	93.33	0.06
Palm oil	5	16.67	25*	83.33	0.04
Coconut oil	2	6.67	28	93.33	0.06

(*p<0.05 significant compared with the groups)

Table-7: Comparison of clarity of staining within H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Poor		Good		P value
	Number	%	Number	%	
Xylene	2	6.67	28	93.33	0.06
Palm oil	6	20.00	24*	80.00	0.03
Coconut oil	2	6.67	28	93.33	0.06

(*p<0.05 significant compared with the groups)

Table-8: Comparison of nuclear staining between H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Poor		Good	
	Number	%	Number	%
Xylene	2	6.67	28	93.33
Palm oil	9*	30.00	21*	70.00
Coconut oil	5*	16.67	25*	83.33
P value	0.04		0.04	

(*p<0.05 significant compared Group-A with other groups)

Table-9: Comparison of cytoplasmic staining between H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Poor		Good	
	Number	%	Number	%
Xylene	2	6.67	28	93.33
Palm oil	5*	16.67	25*	83.33
Coconut oil	2	6.67	28	93.33
P value	0.04		0.04	

(*p<0.05 significant compared Group-A with other groups)

Table-10: Comparison of clarity of staining between H & E stained sections treated with xylene, palm oil & coconut oil

Groups	Poor		Good	
	Number	%	Number	%
Xylene	2	6.67	28	93.33
Palm oil	6*	20.00	24*	80.00
Coconut oil	2	6.67	28	93.33
P value	0.04		0.04	

(*p<0.05 significant compared Group-A with others)

Table-11: Comparison of mean H & E stained sections evaluation scores between xylene, palm oil & coconut oil

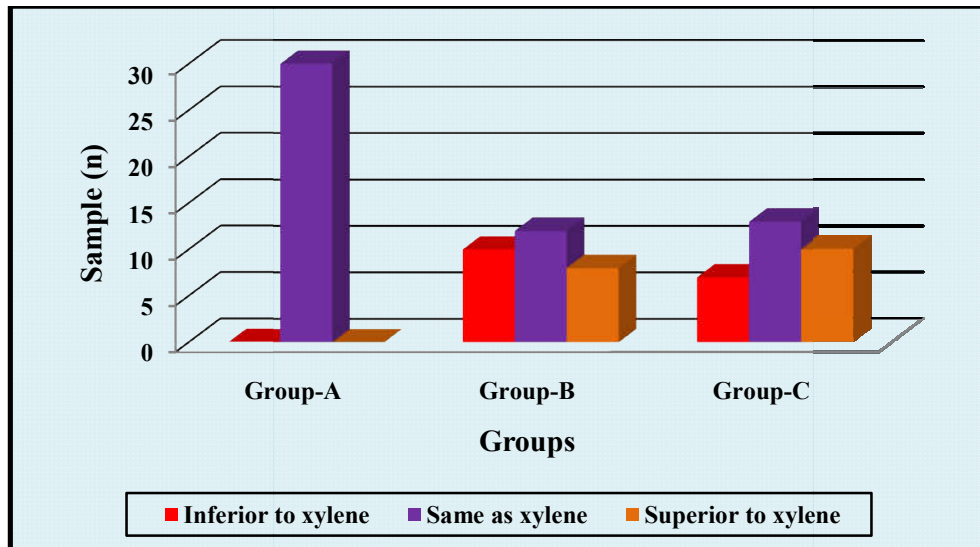
Groups	Nuclear staining (MEAN±SD)	Cytoplasmic staining (MEAN±SD)	Clarity of staining (MEAN±SD)
Xylene	0.93±0.25	0.93±0.25	0.93±0.25
Palm oil	0.70±0.47*	0.83±0.37*	0.80±0.40*
Coconut oil	0.83±0.37* [#]	0.93±0.25 [#]	0.93±0.25 [#]

(*p<0.05 significant compared Group-A with other groups,

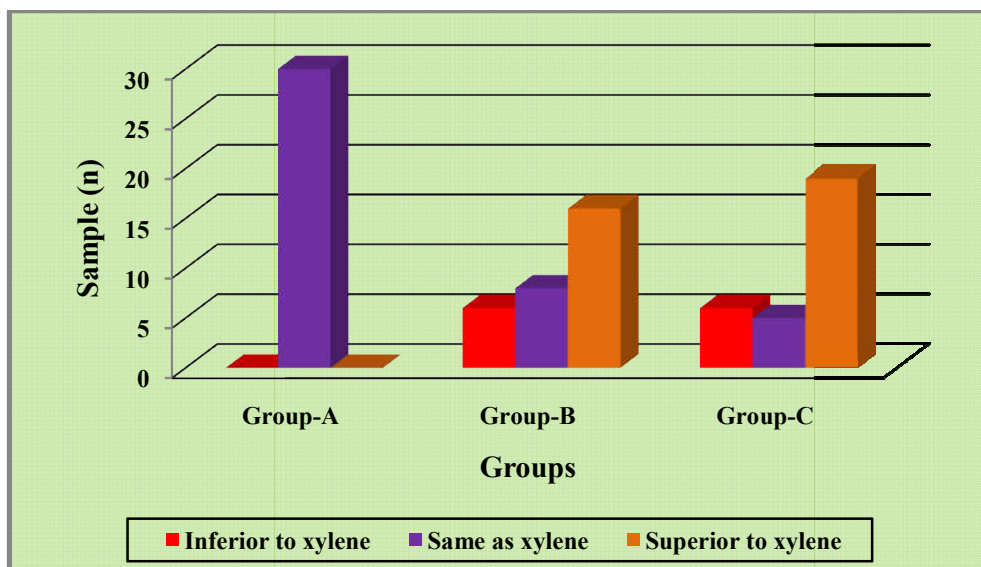
[#]p<0.05 significant compared Group-B with other groups)

GRAPHS

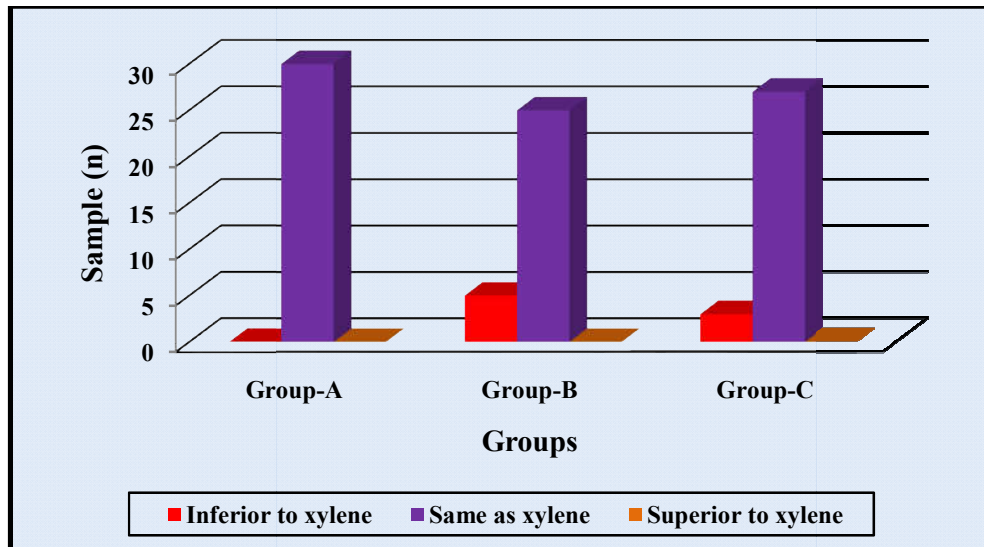
Graph-1 Comparison of rigidity between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil (Group A, Group B, Group C)



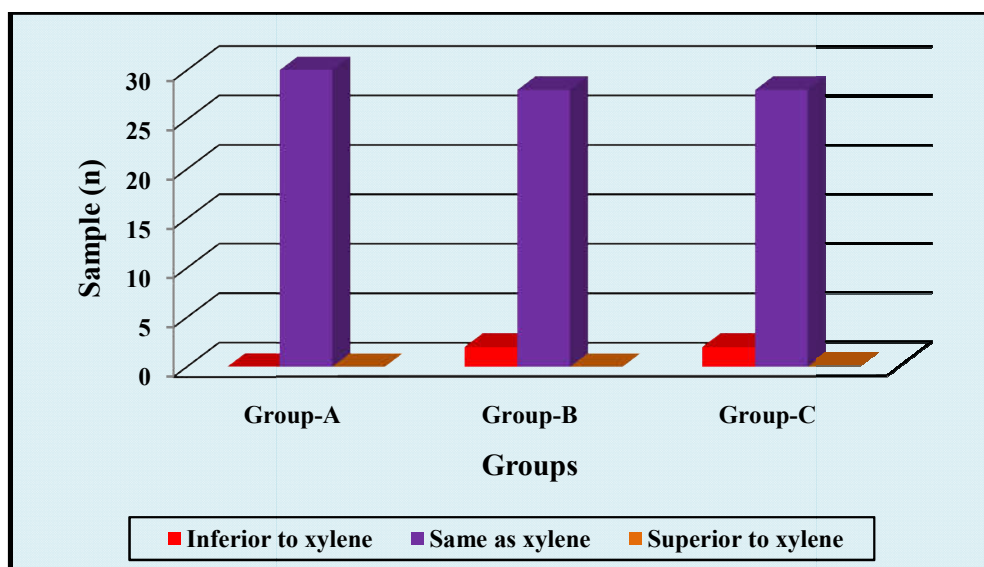
Graph-2 Comparison of translucency between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil (Group A, Group B, Group C).



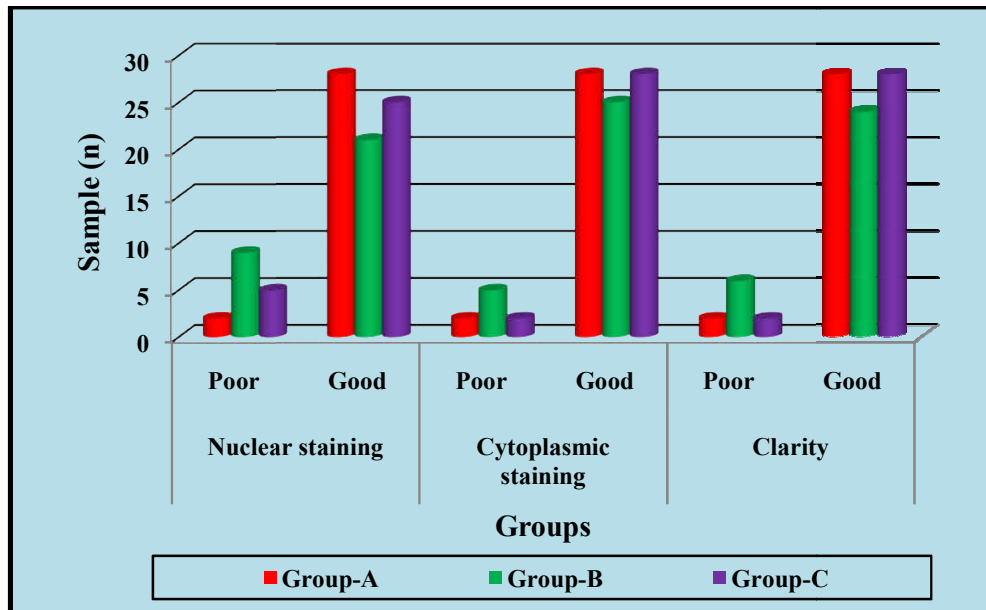
Graph -3 Comparison of changes after impregnation between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil (Group A, Group B, Group C)



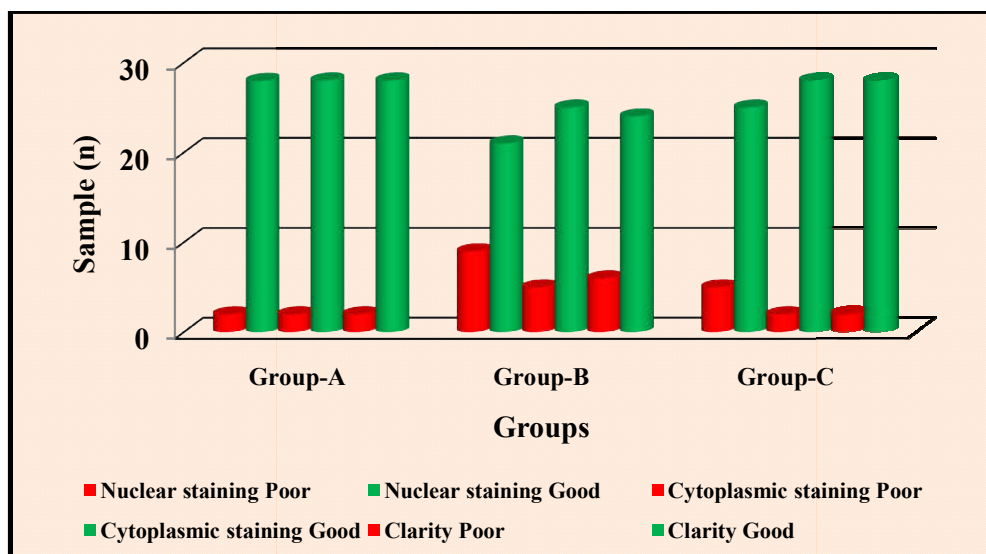
Graph-4 Comparison of ease of sectioning between specimens treated with xylene, palm oil & coconut oil (Group A, Group B, Group C)



Graph-5 Comparison of nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity within the groups (Group A, Group B, Group C)



Graph-6: Comparison of nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity between the groups (Group A, Group B, Group C)



DISCUSSION

Xylene became the clearing agent of choice when chloroform was found as a carcinogen. A safer substitute xylene was also declared as a health hazardous clearing agent. Under the Resource conservation and recovery act (RCRA), xylene is considered to be one of the hazardous waste⁵. Later it was replaced with safer chemicals which became a major objective of researchers and manufacturers. The proposed substitutes included terpenes, alkanes, vegetable oil etc¹⁶. Considering all the hazardous health effects of xylene, this study was done in search of a much more safer alternative to xylene using palm oil and coconut oil. These two oils are widely used as a natural flavor additives for food and also in alternative medicine therapy.

Clearing agent is used as an intermediate solvent which is completely miscible with ethanol and also with paraffin wax. Ideally this solvent will displace the ethanol in the tissue, then this in turn will be displaced by molten paraffin wax. In order to consider any solution as a clearing agent, it has to penetrate into tissue rapidly to clear them completely. For a better penetration of any solution, the viscosity of the solution plays a major role, that is a less viscous solution penetrates faster when compared to that of high viscous solutions. According to Bernoulli's principle of fluid dynamics, viscosity of the fluid is considered to be indirectly proportional to the temperature, which means, as the temperature increases the viscosity of the fluid decreases and as a result penetration of fluid increases⁵.

In this present study both palm oil and coconut oil were more viscous when compared with that of xylene. Hence in order to decrease the viscosity of

these oils and for an increased penetration into tissues and clear them at a faster rate, clearing of tissue after dehydration in both processing and staining procedures were carried out using an incubator at a temperature maintained at 60°C.

Routine paraffin wax tissue processing requires properly timed dehydration, clearing (de-alcoholization), infiltration and embedding procedures. On microtomy, sections were dewaxed and further dehydration was done before staining procedure. In this study, tissue specimens were processed in parallel with xylene, palm oil and coconut oil as a clearing agent and as a dewaxing agent.

While evaluating the rigidity of the gross tissue specimens treated with palm oil and coconut oil, 33.33% of coconut oil treated specimen showed superior quality than that of xylene and 43.33% showed similar features as that of xylene treated specimens. 26.67% of palm oil treated specimen showed superior features and 40% showed same features as that of xylene. Translucency of the specimen was also evaluated in our study, which showed 63.33% showing better features in coconut oil treated specimens and 53.33% in palm oil treated specimens. 83.33% of palm oil treated tissues and 93.33% of coconut oil treated tissues showed same features of change after impregnation as that of xylene treated specimens. 93.33% of both palm oil and coconut oil treated specimens showed same qualities of that of xylene while evaluation of ease of sectioning. While comparing the nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity of staining of all the hematoxyline and eosin stained slides, coconut oil treated slides showed better staining qualities ie 83.33%, 93.33% and 93.33% respectively.

Rasmussen et al in 1992 made use of mixture of coconut oil and olive oil as a clearing agent in routine hematoxylin and eosin histopathological staining procedure. In their study, incomplete impregnation was noted and that leading to problems while sectioning and they concluded that the mixture was ineffective as a clearing agent⁴⁸. In contrast to the observation in their study, this study found out that coconut oil treated specimen showed better features with respect to gross tissue evaluation, especially with changes after impregnation and ease of sectioning thereafter. This difference could due to the presence of olive oil in the prepared mixture, which would have adversely affected the whole procedure there by interacting with the properties of coconut oil.

A study by Taneeru S et al in 2013 evaluated the efficiency of limonene oil and sesame oil in terms of nuclear staining, cytoplasmic staining, uniformity, clarity and intensity of staining³⁵. Their study concluded that specimens cleared with sesame oil had all the staining features which were adequate for that of diagnosis aspect, which were consistent with that of our study results.

Sermadi W et al in 2014 checked the efficiency of coconut oil as a clearing agent, where in it was concluded that xylene treated tissue specimens were more rigid (73%) than that of coconut oil treated specimens. Translucency of the specimen was also evaluated in their study, which showed 100% better features in coconut oil treated specimens. 100% of coconut oil treated specimen showed same features as that of xylene treated specimens with respect to change after impregnation and ease of sectioning .In their

study there was not much difference in staining quality and tissue architecture in both coconut oil and xylene treated slides¹⁰.

Our study results are in agreement with another study by Udonkang M et al in 2014, using bleached palm oil and their results showed 93% of palm oil processed tissues appeared transparent after clearing as compared with xylene processed specimens. Ease of microtomy was also evaluated and they concluded that easy microtomy was found in 100% of xylene exposed specimen and 73.7% of palm oil exposed specimens. Hematoxylin and eosin stained slide evaluation was done and evaluated based on nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity of staining, in which 100% of all specimens showed normal nuclear and cytoplasmic staining in both the groups⁴⁷.

Indu S et al in 2014 concluded that adequate nuclear staining was observed in 90% in cedarwood oil and 93% in xylene. Also adequate cytoplasmic staining and overall uniformity of staining were noted in 93.33% of cedarwood oil treated slides⁴⁰. All the samples in their study had appreciable results when treated with cedarwood oil as compared with that of xylene according to the grossing and microscopic features.

Sugunakar Raju G S et al in 2015 evaluated four different oils namely rose oil, carrot oil, pine oil and olive oil as a clearing agent instead of xylene. Gross tissue specimen evaluation such as translucency, rigidity, shrinkage, section cutting and cellular architecture and staining quality were evaluated for all the oils. Pine oil was having superior characteristic features when compared with the other three oils. Tissue morphology was well preserved in all of the

tissue sections cleared by using these four different oils and a clear demarcation was noticed in nucleus and cytoplasm. Their results concluded that over all staining quality was equivalent with that of xylene treated slides⁵. Our study results with respect to nuclear and cytoplasmic clarity in hematoxylin and eosin stained slides were in agreement with this study.

In another study conducted by Buesa RJ in 2000, mineral oil was used in proportion with ethanol and isopropyl alcohol as a clearing agent for tissue specimen⁹. Here in this study the processed tissue with mineral oil showed equivalent qualities when compared with that of xylene processed tissue.

SUMMARY & CONCLUSION

The main aim of this study was to evaluate the efficiency of coconut oil and palm oil as a clearing agent for hematoxylin and eosin staining procedure.

A total of 30 tissue specimens were collected, fixed in 10% formalin and sectioned into 3 equal parts and grouped as group A, B, and C. Group A tissue specimen were taken for routine processing followed by hematoxylin and eosin staining procedure with xylene as clearing agent, whereas group B tissue specimens were treated with heated palm oil at a temperature maintained at 60°C instead of xylene as a clearing agent. Similarly group C tissue specimens were treated with heated coconut oil at a temperature maintained at 60°C instead of xylene as a clearing agent during processing. Gross tissue specimen evaluation like rigidity, translucency, change after impregnation and ease of sectioning were evaluated and compared between the groups having group A as the control. All the specimens were processed, sectioned and stained using hematoxylin and eosin stain and were coded and observed for evaluation of nuclear staining, cytoplasmic staining and overall clarity of stained slide.

Coconut oil treated specimen showed better characteristic features than palm oil treated specimen with respect to rigidity, translucency and change after impregnation which was 43.33%, 63.33% and 90% respectively. Both palm oil and coconut oil treated specimen showed similar features when compared with that of ease of sectioning. Among 90 hematoxylin and eosin stained slides coconut oil treated sections showed better nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity of staining which was 83.33% , 93.33% and 93.33%.

Xylene is an aromatic hydrocarbon which is extremely biohazardous. The exposure of xylene is maximum during dewaxing of sections and the histopathological laboratory technicians are routinely exposed to xylene during procedures. Effects to minimize the health hazards in the histopathology laboratory should be made to create a much more safer working environment by increasing the awareness among histopathology lab manager and assistants. Short educational programs targeting standard operating procedures, safety precautions and emergency management should be encouraged.

The xylene free method for paraffin sections was developed and in use at Vrinnevi hospital, Sweden since 1995⁶. On account of the Occupational Safety and Health Administration regulations, various other xylene alternatives namely limonene reagents, aliphatic hydrocarbons, vegetable oils and mineral oils were tried in the past to avoid xylene usage in the laboratory.

This study is designed to establish whether the usage of coconut oil and palm oil at a maintained temperature as a clearing agent during tissue processing and as a dewaxing agent during staining procedure has any effect on transparency, rigidity, change after impregnation, ease in sectioning and quality of staining such as nuclear staining, cytoplasmic staining and clarity of staining as compared with the xylene treated counterparts. Our study results suggests that both the oils, especially coconut oil treated specimen showed better characteristic features than palm oil treated specimen with respect to both gross specimen evaluation and also with the quality of staining. Further studies with larger sample size and more parameters are required to validate the better results with the usage of biofriendly xylene alternatives.

BIBLIOGRAPHY

1. Negi A Puri, Gupta R, Chauhan I, Nangia R, Sachdeva A. Biosafe alternative to xylene: A comparative study. *J Oral Maxillofac pathol* 2013; 17(3) :363-6.
2. Bancroft JD, Gamble M. *Tissue processing: Theory and practice of histologic techniques*. 6th ed. USA Churchill Livingstone: Elsevier; 2011 .P. 83-93
3. Dapson JC, Dapson RW. *Clearing agents. Hazardous materials in histopathology laboratory, regulations, risks, handling and disposal*. 4th ed. Battle Creek: Anatech; 2005. p. 65-78.
4. Kandyala R, Raghavendra S P, Ragasekharan S T. Xylene: An overview of its health hazards and preventive measures. *J Oral Max Pathol* 2010;14(1) :1-5.
5. Raju GSS, Surapaneni RKN, Pavan G, Kulkarni, Thokala M R, Pavan P. Bio-friendly alternatives for xylene - Carrot oil, olive oil, pine oil, rose oil. *Journal of clinical and diagnostic research*. 2015;9(11):16-8.
6. Falkeholm L, Crawford. A Xylene-free method for histologic preparation: A multicentre evaluation. *Laboratory Investigation* 2001;81(9) :1213-21
7. Rajan ST, Malathi N. Health hazards of xylene. *Journal of clinical and diagnostic research* 2014;8(2) :271-4.
8. Erikson T, Amed V, Leibach S J, Bushnik F, Saxon A, Knopse W H. Acute bone marrow toxicity and pancytopenia following exposure to lead chromate, xylene and ethylbenzene in a degloving injury. *Am J Haematol* 1994;47(4) :257-61.
9. Beusa RJ. Mineral oil: The best xylene substitute for tissue processing yet?. *The J Histotechnol* 2000;23(2) :143-8.

10. Sermadi W, Prabhu S, Acharya S, Javali S B. Comparing the efficacy of coconut oil and xylene as a clearing agent in the histopathology laboratory. *J Oral Maxillofac Pathol* 2014;18(1) :49-53.
11. Fabri, Jorg Graeser, Ulrich, and Simo, Thomas A. Xylene In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 7th edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2000. p.2-8
12. Carson, Freida, Hladik, Christa. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. 3rd edition. American Society for Clinical Pathology Press; 2009. p.35-7.
13. Ramulu S, Koneru A, Ravikumar S, Sharma P ,Ramesh DNS V, Patil R. Liquid dish washing soap: An excellent substitute for xylene and alcohol in hematoxylin and eosin staining procedure. *Journal of Orofacial Sciences* 2012;4(1):37-42.
14. Jacobson GA, Ann SA. Biological Monitoring of Low Level Occupational Xylene Exposure and the Role of Recent Exposure. *Occup. Hyg* 2003;47(4): 331–6.
15. Langman JM. Xylene: Its toxicity, measurements of exposure levels, absorption, metabolism and clearance. *Pathology* 1994;26(3) :301-9.
16. Busea RJ, Peshkov MV. Histology without xylene. *Annals of Diagnostic Pathology* 2009;13(4) :246-256.
17. Toxicological profile for xylene. U.S Department of Health and Human Services, public health service, Agency for toxic substance and disease registry. Atlanta: Georgia;1993.

18. Ogata M, Tomokuni K, Takatsuka Y. Urinary excretion of hippuric acid and m or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and -xylene as a test of exposure. *Br J Int Med* 1970;27(8) :43-50.
19. Savoleinen H, Pfaffli P. Dose-dependent neurochemical changes during short term inhalation exposure to m-xylene. *Arch Toxicol* 1980;45 :117-122.
20. Hipolito R N. Xylene poisoning in laboratory workers: Case reports and discussions. *Lab Med* 1980;11(3) :593-595.
21. Taskinen H, Anttila A, Lindbohm M, Sallmén M, Hemminki K. Spontaneous abortions and congenital malformations among the wives of men occupationally exposed to organic solvents. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 1989;15(5) :345-352.
22. Uchida Y, Nakatsuka H, Ukai H, Watanabe T, Liu Y T, Huang M Y. Symptoms and signs in workers exposed predominantly to xylene. *Int Arch Occup Environ Health* 1993;64(8) :597-605.
23. Revilla A S, Pestana C R, Pardo-Andreu G L, Santos A C, Uyemura S A, Gonzales M E, Curti C. Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial uncoupling. *Toxicol In Vitro* 2007;21(5) :782–788.
24. Adrian F, Bradley M, Felipe C. Xylene-Induced Auditory Dysfunction in Humans. *Ear Hear* 2013;34(5) :651–660.
25. Haas M. Eliminating the use of xylene in tissue processing. *The Biomedical scientist* 2010;487-488.

26. Bruun R B, Noring H K, Mellerup I, Sether G, Christensen. Vegetable oils instead of xylene in tissue processing. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 1992;100(9) :829-831.
27. Andre GG, Wenger JB, Reboloso D, Arrington JB, Mehm WJ. Evaluation of Clearing and Infiltration Mixtures (CIMS) As Xylene Substitutes for Tissue Processing. *J Histotechnol* 1994;17(2):137-42.
28. Eleanor A, Michael HE, Matthew H. Cost effective, environmentally safe tissue processing method with paraffin oil. *Journal of Histotechnology* 1997;20(2):133-137.
29. Ofusori DA, Ayoka AO, Adeeyo OA, Adewole SO. Mixture of kerosene and xylene: a contribution to clearing agents. *Int. J. Morphol* 2009;27(1) : 211-218.
30. Bleuel E, Den Dunnen WFA. Solvent free tissue processing using supercritical CO₂. *Histopathology* 2012;61(6) :1198-1208.
31. Kunhua W, Chuming F, Xun L. A Novel Non-Toxic Xylene Substitute (SBO) for Histology. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 2012;9(1) :43-49.
32. Piniewska D, Wojtas M, Polańska N, Stawowiak A, Konieczna-Waśkowska M, et al. The Comparison of Paraffin Dewaxing Using Methyl Tert-Butyl Ether and Xylene in DNA Extraction from Autopsy Specimens. *J Forensic Res* 2012;3(2):175-179.
33. Nangia R, Puri A, Gupta R, Bansal S, Negi A, Mittal M. Comparison of conventional tissue processing with microwave processing using

- commercially available and domestic microwaves. *Indian J Oral Sci* 2013;4(2):64-69.
34. Aydin I, Yorukoglu K, Cingoz S, Agilkaya S. The effect of the alternative solutions to formaldehyde and xylene on tissue processing. *Indian J Pathol Microbiol* 2013;56(3) :221-230.
35. Taneeru S, Guttikonda VR, Vanajakshi CN, Korlepara R. Xylene free method for tissue processing: a pilot study. *Health Sciences* 2013;2(3) :1-12.
36. Premalatha BR, Patil S, Rao RS, Indu M. Mineral oil- A Biofriendly substitute for xylene in Deparaffinization: A Novel Method. *JCDP* 2013; 14(2) :281-286.
37. Ankle MR, Joshi PS. A Study to evaluate the efficacy of xylene-free hematoxylin and eosin staining procedure as compared to the conventional hematoxylin and eosin staining: An experimental study. *J oral and maxillofacial Pathology* 2011;15(2) :161-7.
38. Henwood A F, Prasad L, Bourke V M. The application of heated detergent dewaxing and rehydration to techniques for the demonstration of fungi: a comparison to routine xylene-alcohol dewaxing. *Journal of Histotechnology* 2013;36(2) :45-50.
39. Ananthaneni A, Namala S, Guduru VS, Ramprasad VVS, Ramisetty SD, Udayashankar U, Naik KK. Efficacy of 1.5% Dish Washing Solution and 95% Lemon Water in Substituting Perilous Xylene as a Deparaffinizing Agent for Routine H and E Staining Procedure: A Short Study. *Scientifica*

- [Internet].[cited 2017 March];707310. Available from <http://dx.doi.org/10.1155/2014/707310>.
40. Indu S, Ramesh V, Indu PC, Prashad KV, Premalatha B, Ramadoss K. Comparative efficacy of cedarwood oil and xylene in hematoxylin and eosin staining procedures: An experimental study. *J Nat Sc Biol Med* 2014;5(2):284-7.
41. Lyon H, Holm I, Prent P, Balslev E. Non-hazardous organic solvents in the paraffin-embedding technique: a rational approach. *Histochemistry and Cell Biology* 1995;103(4) :263-269.
42. Maini D. A Closer Look at Xylene Substitutes to Reduce the Hazardous Waste Stream. *Technical Bulletin for Histotechnology* 1999;30 :15-18.
43. Temel SG, Noyan S, Cavusoglu I, Kahveci Z. A simple and rapid microwave-assisted hematoxylin and eosin staining method using 1,1,1 trichloroethane as a dewaxing and a clearing agent. *Biotechnic Histochemistry* 2005;80(4) :123-132.
44. Chen CY, He T, Mao XL, Friis TE, Qin RH, Jian YT. A novel xylene substitute for histotechnology and histochemistry. *Biotechnic Histochemistry* 2010;85(4): 231-240.
45. Stockert JC, Lopez-Arias B, Castillo PD, Romero A, Blazquez-Castro A. Replacing xylene with n-heptane for paraffin embedding. *Biotechnic Histochemistry* 2012;87(7) :464-467.

46. Patil S, Rao RS, Nagaraja A, Kumar SD. Comparison of conventional and microwave histo-processing of various oral soft tissue specimens. *J Dent Res Rev* 2014;1(1):3-6.
47. Udonkang M, Eluwa M, Ekanem TB, Asuquo OR, Akpantah AO. Bleached palm oil as substitute for xylene in histology. *JPCS* 2014;8 :8-17.
48. Rasmussen B, Hjort K, Mellerup I, Sether G, Christensen N. Vegetable oils instead of xylene in tissue processing. *Acta Pathol Microbio Immunol Scandinavica* 1992;100(9):827-31.

ANNEXURE

SREE MOOKAMBIKA INSTITUTE OF DENTAL SCIENCES
KULASEKHARAM, KANYAKUMARI DIST., TAMIL NADU, INDIA.



INSTITUTIONAL RESEARCH COMMITTEE

Certificate

This is to certify that the research project protocol, ***Ref no. 07/07/2016*** titled, ***“Prevalence of morphological variants of mandibular second premolar in Kulasekharam population”*** submitted by ***Dr. Ashitha A. S., II Year MDS, Department of Oral Pathology and Microbiology*** has been approved by the Institutional Research Committee at its meeting held on ***09th August 2016.***

Convener
Dr. T. Sreelal

Secretary
Dr. Pradeesh Sathyan



INSTITUTIONAL HUMAN ETHICS COMMITTEE

SREE MOOKAMBIKA INSTITUTE OF MEDICAL SCIENCES,
KULASEKHARAM, TAMILNADU

Communication of Decision of the Institutional Human Ethics Committee(IHEC)

SMIMS/IHEC No:1 /Protocol no:18 / 2016

Protocol title: Prevalence of morphological variants of mandibular second premolar in Kulasekharam population
Principal Investigator: Dr. Ashitha.A.S
Name& Address of Institution: Department of Oral Pathology Sree Mookambika Institute of Medical Sciences, Kulasekharam
<input checked="" type="checkbox"/> New review <input type="checkbox"/> Revised review <input type="checkbox"/> Expedited review
Date of review (D/M/Y): 14.12.2016
Date of previous review , if revised application:
Decision of the IHEC: <input checked="" type="checkbox"/> Recommended <input type="checkbox"/> Recommended with suggestions <input type="checkbox"/> Revision <input type="checkbox"/> Rejected
Suggestions/ Reasons/ Remarks:
Recommended for a period of : six months

Please note*

- Inform IHEC immediately in case of any Adverse events and Serious adverse events.
- Inform IHEC in case of any change of study procedure, site and investigator
- This permission is only for period mentioned above. Annual report to be submitted to IHEC.
- Members of IHEC have right to monitor the trial with prior intimation.

Reneegalanganadha
Signature of Member Secretary IHEC



CONSENT FORM
PART 1 OF 2
INFORMATION FOR PARTICIPANTS OF THE STUDY

Dear Volunteers,

We welcome you and thank you for your keen interest in participation in this research project. Before you participate in this study, it is important for you to understand why this research is being carried out. This form will provide you all the relevant details of this research. It will explain the nature, the purpose, the benefits, the risks, the discomforts, the precautions and the information about how this project will be carried out. It is important that you read and understand the contents of the form carefully. This form may contain certain scientific terms and hence, if you have any doubts or if you want more information, you are free to ask the study personnel or the contact person mentioned below before you give your consent and also at any time during the entire course of the project.

1. Name of the Principal Investigator:

Dr. Ashitha.A.S,
Post Graduate student
Department of Oral Pathology and Microbiology,
Sree Mookambika Institute of Dental Sciences,
Kulasekaram, KanyaKumari District-629161

2. Name of the Guide:

Dr. T. Isaac Joseph
Head of the Department,
Department of Oral Pathology and Microbiology,
Sree Mookambika Institute of Dental Sciences.
Kulasekaram, KanyaKumari District-629161

3. Name of the Co-Guide:

Dr. Girish K.L,
Professor,
Department of Oral Pathology and Microbiology.
Sree Mookambika Institute of Dental Sciences.
Kulasekaram, KanyaKumari District-629161

4. Institute:

Sree Mookambika Institute of Dental Sciences,
V.P.M Hospital complex, Padanilam, Kulasekaram,
Kanyakumari District- 629161
Tamilnadu.

5. Title of the study:

“Comparing the efficiency of coconut oil and palm oil with xylene as a clearing agent in conventional Hematoxylin and Eosin histopathological staining procedure”

6. Background information: Scientific Journals

7. Aims and Objectives:

- To evaluate the efficiency of coconut oil and palm oil as a clearing agent for Hematoxylin and Eosin staining procedure and compare it with xylene.
- To determine whether tissues cleared and dewaxed with coconut oil and palm oil are same or superior with the xylene treated tissues.

8. Scientific justification of the study:

On account of the Occupational Safety and Health Administration (OSHA) regulations, various xylene substitutes, such as, limonene reagents, aliphatic hydrocarbons, vegetable oils and mineral oils were tried in the past to avoid xylene in the laboratory. However, these substitutes were found to be less effective and more expensive⁵. Coconut oil is a commonly used vegetable oil, available throughout the tropical world. It is non-toxic, heat stable, slow to oxidize and has highest resistance to rancidity⁶. Palm oil promises to be widely available and safe substitute for xylene. Hence, here we attempt to check the use of coconut oil and palm oil as a clearing agent during tissue processing and as a dewaxing agent during Hematoxylin and Eosin staining procedure has any effect when compared with the xylene processed tissue.

9. Procedure for the study:

Soft tissue specimen from those patients fulfilling the inclusion and exclusion criteria of the study are to be taken from the department of Oral and maxillofacial surgery of Sree Mookambika institute of dental sciences. All of these tissues are to be taken during routine surgical removal of impacted third molar. The subjects selected for the study must be explained about this study and informed consent must be taken. The sample included a total of 30 tissue specimens.

Each of 30 specimens removed during surgical procedure were fixed with 10% buffered formalin for 48 hour All the tissues have to cut into three equal parts and arrange it experimental group namely Group A, Group B and Group C, in which each group consisting of 30 tissue bits.

For Group A, after fixation, tissues were dehydrated through ascending grades of alcohol (70%, 90%, 95%, absolute I, absolute II and absolute III) for 1 hour in each change. Dehydrated tissues must be dealcoholized (cleared) by using two changes of xylene, xylene I for 45 minutes and xylene II for 30 minutes. The cleared tissues have to be infiltrated in two changes of molten paraffin wax (wax I for 1 hour and wax II for 1 hour 30 minutes). Embedding must be done in molten paraffin wax using plastic disposal cassettes and allow it to solidify before microtomy. Tissue blocks must be sectioned at 4 μ m with a rotary microtome and sections floated in a warm water bath and each picked in pairs on albuminized glass slides.

Before staining, the slides must be dewaxed in xylene I and II for 5 minute each, pass it through descending grades of alcohol (absolute, 90%, 70%) and rinse it in water for 2 minutes. Hydrated sections must be stained in Haematoxylin solution for 10 minutes and rinse in water for 2 minutes. Then differentiation must be done by a single dip in 1% acid alcohol and tap water

wash for 30 seconds. The sections must be counterstained in 1% Eosin solution for 1 minute, and dehydrate with 70% ,80% and 90% for 1 minute each. Two changes of absolute alcohol must be done. Clear the slides using 3 changes of xylene (I,II and III) for 1 minute each have to be done, air dry and mount with DPX mountant.

For Group B, after fixation, tissues were dehydrated through ascending grades of alcohol (70%, 90%, 95%, absolute 1, absolute 2 and absolute 3) for 1 hour in each change. Dehydrated tissues must be dealcoholized (cleared) by using two changes of heated palm oil at 60°C for 1 hour each. The cleared tissues have to be infiltrated in two changes of molten paraffin wax (wax I for 1 hour and wax II for 1 hour 30 minutes). Embedding must be done in molten paraffin wax using plastic disposal cassettes and allow it to solidify before microtomy. Tissue blocks must be sectioned at 4 µm with a rotary microtome and sections floated in a warm water bath and each picked in pairs on albuminized glass slides.

Before staining, the slides must be dewaxed in heated palm oil at 60°C for 5 minute each, pass it through descending grades of alcohol (absolute, 90%, 70%) and rinse it in water for 2 minutes. Hydrated sections must be stained in Haematoxylin solution for 10 minutes and rinse in water for 2 minutes. Then differentiation must be done by a single dip in 1% acid alcohol and tap water wash for 30 seconds. The sections must be counterstained in 1% Eosin solution for 1 minute, and dehydrate with 70% ,80% and 90% for 1 minute each. Two changes of absolute alcohol must be done. Clear the slides using 3 changes of preheated palm oil at 60 °C for 1 minute each have to be done, air dry and mount with DPX mountant.

For Group C, after fixation, tissues were dehydrated through ascending grades of alcohol (70%, 90%, 95%, absolute 1, absolute 2 and absolute 3) for 1 hour in each change. Dehydrated tissues must be dealcoholized (cleared) by using two changes of heated coconut oil at 60°C for 1 hour each. The cleared tissues have to be infiltrated in two changes of molten paraffin wax (wax I for 1 hour and wax II for 1 hour 30 minutes). Embedding must be done in molten paraffin wax using plastic disposal cassettes and allow to solidify before microtomy. Tissue blocks must be sectioned at 4 µm with a rotary microtome and sections floated in a warm water bath and each picked in pairs on albuminized glass slides.

Before staining, the slides must be dewaxed in heated coconut oil at 60°C for 5 minute each, pass it through descending grades of alcohol (absolute, 90%, 70%) and rinse it in water for 2 minutes. Hydrated sections must be stained in Haematoxylin solution for 10 minutes and rinse in water for 2 minutes. Then differentiation must be done by a single dip in 1% acid alcohol and tap water wash for 30 seconds. The sections must be counterstained in 1% Eosin solution for 1 minute, and dehydrate with 70% ,80% and 90% for 1 minute each. Two changes of absolute alcohol must be done. Clear the slides using 3 changes of heated coconut oil at 60°C for 1 minute each have to be done, air dry and mount with DPX mountant.

During the tissue processing, in all the three groups, macroscopic observations based on rigidity, translucency, change after impregnation, gross shrinkage and ease of sectioning must be noted. Microscopic examination of

prepared Hematoxylin and Eosin stained slides for nuclear staining, cytoplasmic staining and overall clarity of staining in all the three groups must be evaluated by two experienced pathologists (observer I and observer II) under 10x and 40x magnification using Light microscope. All data are to be entered in data entry sheet prepared. Data will be entered in Microsoft excel application.

10. Expected risks for the participants:

No risk.

11. Expected benefits of research for the participants:

- You will not be required to pay for this test.
- You can enquire about the outcome of the procedures and your details.

12. Maintenance of confidentiality:

- You have the right to confidentiality regarding the privacy of your medical information
(Personal details, results of physical examinations, investigations, and your medical history).
- By signing this document, you will be allowing the research team investigators, other study Personnel, sponsors, institutional ethics committee and any person or agency required by law to view your data, if required.
- The results of clinical tests and therapy performed as part of this research may be included in your medical record.
- The information from this study, if published in scientific journals or presented at scientific meetings, will not reveal your identity.

13. Why have I been chosen to be in this study?

- a) Chosen because of grouping under the inclusion and exclusion criteria
- b) Need of good sampling size

14. How many samples will be in the study? 30 samples per group.

15. Agreement of compensation to the participants (In case of a study related injury):

Patient will be taken care in case of complication and medical treatment will be provided in the institution.

16. Anticipated prorated payment, if any, to the participant(s) of the study:

No

17. Can I withdraw from the study at any time during the study period?

- The participation in this research is purely voluntary and you have the right to withdraw from this study at any time during the course of the study without giving any reasons.
- However, it is advisable that you talk to the research team prior to stopping information.

18. If there is any new findings/information, would I be informed? Yes
19. Expected duration of the participant's participation in the study: 1 Year
20. Any other pertinent information: No other information
21. Whom do I contact for further information?
For any study related queries, you are free to contact:
Dr. Ashitha A.S,
Post Graduate student.
Department of Oral Pathology and Microbiology,
Sree Mookambika Institute of Dental Sciences,
Kulasekaram, KanyaKumari District-629161.
Mobile No: 8281401187
aadil.ashitha@gmail.com

Place:
Date:

Signature of Principal Investigator

Place:
Date:

Signature of the participant

PART 2 OF 2

PARTICIPANTS CONSENT FORM

The details of the study have been explained to me in writing and the details have been fully explained to me. I am informed that the result of the study is beneficial to me and the society. I confirm that I have understood the study and had the opportunity to ask questions. I understand that my participation in the study is voluntary and that I am free to withdraw at any time, without giving any reason. I understand that there is no risk for me in participating in this study. I have been given an information sheet giving details of the study. I fully consent to participate in the study titled

“Comparing the efficiency of coconut oil and palm oil with xylene as a clearing agent in conventional Hematoxylin and Eosin histopathological staining procedure.”

Serial no/Reference no:

Name of the participant:

Address of the participant:

Contact number of the participant:

Signature/Thumb impression of the
participant/ Legal guardian (if age < 18)

Witnesses 1.

2.

Place:

Date:

ஓப்புதல் படிவம்
பகுதி 1
ஆய்வில் பங்கேற்பவர்களுக்கான விவரம்

அன்பார்ந்த பங்கேற்பாளர்களே,

இந்த ஆராய்ச்சியில் ஆர்வத்துடன் பங்கேற்க வந்திருக்கும் உங்களுக்கு எங்களுடைய வரவேற்பினையும் நன்றியையும் தெரிவித்துக் கொள்கிறோம். இந்த ஆராய்ச்சியில் கலந்து கொள்வதற்கு முன்பு, இது எதனால் மேற்கொள்ளப்படுகிறது என்று புரிந்து கொள்வது மிகவும் அவசியமானது. இந்த படிவம் ஆராய்ச்சிக்கு தொடர்புடைய அவசியமானது. இந்த படிவம் ஆராய்ச்சிக்கு தொடர்புடைய விவரங்களை தெரிந்து கொள்ள உதவுகிறது. இந்த ஆராய்ச்சி இதனுடைய தன்மை, தேவை, அனுகூலங்கள், அபாயம், வசதியின்மை, முன்னெச்சரிக்கை மற்றும் தவல்கள் எல்லாம் எவ்வாறு மேற்கொள்ளப்படுகிறது என்பதினை விவரிக்கிறது. இதில் ஆய்விற்கான படிவத்தில் உள்ள குறிப்புகளை படித்து புரிந்துக் கொள்வது மிகவும் அவசியமானது. இதில் சில அறிவியல் சொற்கள் பயன்படுத்தப்பட்டிருக்கிறது. அதனால் ஏதேனும் ஐயங்களோ அல்லது மேலும் ஏதேனும் விவரங்கள் தெரிந்து கொள்ள வேண்டி இருந்தாலோ இந்த ஆராய்ச்சி செய்பவரையோ அல்லது கீழே கொடுக்கப்பட்டிருக்கும் நபர்களில் யாரையேனும், ஓப்புதலுக்கு முன்போ அல்லது இவ்வாராய்ச்சியின் முழு காலத்திலோ எந்தவிதமான தயக்கமும் இன்றி கேட்டு தெரிந்து கொள்ளலாம்.

1. முதன்மை சோதனையாளர் பெயர் : டாக்டர். அஷ்தா, ஏ.எஸ்.
முதுநிலை மாணவர்
வாய் நோய்களின் இயல்பு மற்றும்
நுண்ணுயிரியில் பிரிவு
புரீ மூகாம்பிகா பல் மருத்துவச் கல்லூரி,
குலசேகரம் - 629 161, கன்னியாகுமரி
மாவட்டம்.
2. வழிகாட்டுனர் பெயர் : டாக்டர். டி. ஐசக் ஜோசப்
தலைமை பேராசிரியர்,
வாய் நோய்களின் இயல்பு மற்றும்
நுண்ணுயிரியில் பிரிவு
புரீ மூகாம்பிகா பல் மருத்துவச் கல்லூரி,
குலசேகரம் - 629 161, கன்னியாகுமரி
மாவட்டம்.
3. துணை வழிகாட்டுனர் பெயர் : டாக்டர். கிரிஷ் கே.எல்
பேராசிரியர்
வாய் நோய்களின் இயல்பு மற்றும்
நுண்ணுயிரியில் பிரிவு
புரீ மூகாம்பிகா பல் மருத்துவச் கல்லூரி,
குலசேகரம் - 629 161, கன்னியாகுமரி
மாவட்டம்.

4. நிறுவனம் : ஸ்ரீ மூகாம்பிகா பல் மருத்துவக் கல்லூரி,
வி.பி.எம். மருத்துவமனை வளாகம்,
படநிலம், குலசேகரம்,
கன்னியாகுமரி மாவட்டம் 629 161
தமிழ்நாடு.

5. ஆராய்ச்சியின் தலைப்பு :
ஹிமடாக்ஸிலின் மற்றும் யோசின் திசு இயல்பு நிறவேறுபாட்டில்
தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில் எண்ணெயில் சைலினை தெளி
பொருளாகப் பண்படுத்தி அதன் ஆற்றலை ஒப்பிடச் செய்யும் செயல்முறை.

6. பின்னணி தகவல் :
அறிவியல் சார்ந்த குறிப்பேடு

7. குறிக்கோள்கள்:

- ஹிமடாக்ஸிலின் மற்றும் இயோசின் நிற வேறுபாடு செயல்முறையில்
தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில் எண்ணெய் தெளிபொருளாக
பயன்படுத்தி அதன் ஆற்றலை சைலினுடன் மதிப்பிடுதல்.
- தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில் எண்ணெயை வைத்து செய்த
திசு தெளிவடைதல் மற்றும் மெழுகு அகற்றல் ஒரே மாதிரியாக உள்ளதா
அல்லது சைலின்னால் செய்யப்பட்ட திசுக்கள் மேலாக உள்ளதா
என்பதை பற்றி கண்டுபிடித்தல்.

8. ஆய்வின் அறிவியல் சார்ந்த நிரூபணம்:

ஆக்குபேஷனல் சேஃப்டி அன்ட் ஹெல்த் அட்மினிஸ்டிரேஷன்
(ஔநஏஅ) விதிமுறைப்படி, சைலின் போன்ற பல்வேறுபட்ட மாற்றக்கூறுகள்
லிமோனின் சேர்மங்கள், அலிஃபேடிக் ஹைட்ரோகார்பன்ஸ், தாவர எண்ணெய்
மற்றும் தாது எண்ணெய் முதலியவற்றை ஆய்வாலையில் முன்னர் சைலினுக்கு
பதிலாக சோதித்து பார்த்தனர்.

இருப்பினும் இந்த மாற்றக்கூறுகள் அனைத்தும் விலை
அதிகமானதாகவும், குறைந்த ஆற்றலை கொண்டவையாகவும் இருந்தது.
தேங்காய் எண்ணெய் இந்த உலகில் எளிதில் கிடைக்க கூடிய அனைவராலும்
பயன்படுத்தப்படக் கூடிய தாவர எண்ணெய் இது நச்சுத்தன்மையற்றது, வெப்ப
நிலை மாறாதது, மெதுவாக கனியகூடியது மற்றும் துர்நாற்றத்தை பெருமளவு
தடுக்கக்கூடியது. பனை எண்ணெய் அதிக அளவில் கிடைக்கக்கூடியதாகவும்
பாதுகாப்பனதாகவும் சைலின் மாற்றாகவும் கருதப்படுகிறது.

இந்த இடத்திலிருந்து நாங்கள் தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில்
எண்ணெயை திசு செயல்முறையின் போது தெளி பொருளாகவும் மற்றும்
ஹிமடாக்ஸிலின் இயோசின் நிறவேறுபாடு செயல்முறையின் போது
மெழுகழிக்கும் பொருளாகவும் பயன்படுத்தி ஏதேனும் பலன் உள்ளதா என்று
சைலின் திசு செயல்முறையுடன் ஒப்பிட்டு பார்க்கும் முயற்சியை செய்கிறோம்.

9. செயல்முறை:

நோயாளிகளின் மென் திசு மாதிரி எடுக்கும் பொழுது அவர்களின்
உள்ளேறிய மற்றும் வெளியேறிய குறிப்புகளை ஸ்ரீ மூகாம்பிகா பல் மருத்துவக்

கல்லூரியின் வாய் மற்றும் முக அறுவை சிகிச்சை பிரிவில் இருந்து எடுக்கப்படுகிறது. இந்த திசு மாதிரிகள் அனைத்தும் வழக்கமான பல் அகற்றும் முறையின் போது எடுக்கப்படுகிறது. இதை தேர்ந்தெடுத்ததற்கான காரணங்களையும் இந்த ஆய்வினை பற்றியும் விளக்கி காட்டாயமாக ஒப்பந்த வாக்குமூலம் வாங்க வேண்டும். இந்த மாதிரிகள் மொத்தம் 30 திசு மாதிரிகளை கொண்டது.

இந்த 30 மாதிரிகள் ஒவ்வொன்றும் அறுவை சிகிச்சையின் போது எடுக்கப்பட்டு அதை 10% பாதுகாக்கப்பட்ட ஃபார்மலினில் 48 மணி நேரம் பொருத்த வேண்டும், பின்பு திசுக்களை மூன்று சரிபாதி யாக பிரித்து பிரிவு அ, பிரிவு ஆ, பிரிவு இ என்று சோதனைப் பிரிவில் வரிசைப்படுத்தி, ஒவ்வொரு பிரிவிலும் உள்ள திசுக்களை 30 பாகங்களாக பிரிக்க வேண்டும்.

அ பிரிவில், பொருத்துதல், கழிந்த பிறகு, உயர்தர ஆல்ககாலை (70%, 90%, 95%, அப்சொலியுட் ஐஐ அப்சொலியுட் ஐஐஐ) கொண்டு ஒரு மணி நேரத்திற்கு ஒரு முறை திசுக்களின் ஈரப்பதத்தை நீக்க வேண்டும். ஈரபதம் நீக்கிய திசுக்களை ஆல்க்காலில் இருந்து பிரிக்க இருவேறு வகையான சைலின், சைலின் ஐ-ல் 45 நிமிடமும், சைலின் ஐஐ-ல் 30 நிமிடமும் வைக்க வேண்டும். ஒரு பிளாஸ்டிக் உறையில் மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகை பயன்படுத்தி பதிய வைத்து பின் மைக்ரோடோமிக்கு முன்பு திமாக்க வேண்டும். திசு துண்டுகளை சுழல் இயந்திரமான மைக்ரோடோம் வைத்து 4μம் அளவில் பிரித்தெடுத்து, அதை மிதமான சூடு கொண்ட தண்ணீரில் மிதக்க விட்டு அல்புமின் கண்ணாடி வில்லையில் ஒவ்வொன்றாக தேர்ந்தெடுத்து வைக்க வேண்டும்.

நிறவேறுபாட்டிற்கு முன்பு, கண்ணாடி வில்லைகளை சைலின் ஐ மற்றும் ஐஐ-ல் 5 நிமிடம் வீதம் வைத்து மெழுகை அகற்றி கீழ் தர ஆல்ககாலில் (அப்சொலியுட் 90%, 70%) மாற்றி பின் அதை தண்ணீரில் 2 நிமிடம் அலச வேண்டும். ஈரப்பதமேறிய தொகுதிகளை நிறவேறுபாடு செய்யும் போது ஹிமடாக்ஸிலின் கரைசலில் 10 நிமிடம் வைத்து பின் 4 நிமிடம் தண்ணீரில் அலச வேண்டும். பின்பு 1% ஆல்ககால் அமிலத்தில் ஒரு தடவை முழுகச் செய்து 30 வினாடிகள் குழாய் நீரில் கழுகி வேறுபாடு செய்ய வேண்டும். பிறகு தொகுதிகளை கூடுதல் நிறவேறுபாடு செய்ய 1% இயோசின் கரைசலில் 1 நிமிடம் வைத்து பின் 70%, 80%, 90% வீதம் 1 நிமிடம் ஈரப்பதம் நீக்க வேண்டும். இரு வேறு அப்சொலிட் ஆல்ககால் செய்ய வேண்டும். மூன்று விதமான சைலின் (ஐ, ஐஐ மற்றும் ஐஐஐ) 1 நிமிடம் வீதம் வைத்து வில்லைகளை தெளிவாக்கி, தூய்மையாக்கி ஈடல மெளன்டன் வைத்து பாடம் செய்ய வேண்டும்.

ஆ பிரிவில் பொருத்துதலுக்கு பிறகு, உயர்தர ஆல்ககால் (70%, 90%, 95% அப்சொலிட் 1, அப்சொலிட் 2, அப்சொலிட் 3)யை 1 மணி நேரம் வைத்து திசுக்களை ஈரபதம் அகற்ற வேண்டும். பின் ஈரபதம் அகற்றிய திசுக்களை இரு வேறு விதமான 60°இ கொண்ட சூடான பாமயில் எண்ணெயில் 1 மணி நேரம் தெளிவாக்க வேண்டும். தெளிவாகிய திசுக்களை இரு விதமான மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகில் (மெழுகு 1-ல் 1 மணி நேரமும், மெழுகு ஐஐ-ல் ஒன்றரை மணி நேரமும்) வடிகட்ட வேண்டும். பிளாஸ்டிக் உறையில் மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகு வைத்து பதனிடுதல் செய்து பின் மைக்ரோடோமிக் முன்பு திடமாக்க வேண்டும். திசு துண்டுகளை சுழல் இயந்திரமான மைக்ரோடோம் மூலம் 4μம் அளவில் பிரித்தெடுத்து, அதை மிதமான சூடு கொண்ட தண்ணீரில்

மிதக்க விட்டு அல்புமின் கண்ணாடி வில்லைகளில் ஒவ்வொன்றாக தேர்ந்தெடுத்து வைக்க வேண்டும். %

நிற வேறுபாட்டிற்கு முன்பு, கண்ணாடி வில்லைகளை 60°இ கொண்ட சூடான பாமயில் எண்ணெயில் 5 நிமிடம் வைத்து மெழுகை அகற்றி, கீழ்தர ஆல்ககாலுக்கு (ப்சொலிட் 90%, 70%) கொண்டு சென்று பின் 2 நிமிடம் தண்ணீரில் அலச வேண்டும். ஈரபதமேறிய தொகுதிகளை ஹிமாடாக்ஸிலின் கரைசலில் 10 நிமிடம் வைத்து பின் 2 நிமிடம் தண்ணீரில் அலசி நிறவேறுபாடு செய்ய வேண்டும். பின்பு 1% ஆல்ககால் அமிலத்தில் ஒரு தடவை முழுகச் செய்து குழாய் நீரில் 30 வினாடிகள் கழுகி பிரித்தெடுக்க வேண்டும். 1% இயோசின் கரைசலில் தொகுதிகளை 1 நிமிடம் வைத்து கூடுதல் நிற வேறுபாடு செய்து பின் 70%, 80%, 90%-ல் 1 நிமிடம் வைத்து ஈரபதம் அகற்ற வேண்டும். இருவிதமான அப்சொலிட் ஆல்ககாலில் செய்ய வேண்டும். மூன்று விதமான 60°இ கொண்ட சூடாக்கிய பாமயில் எண்ணெயில் 1 நிமிடம் வைத்து வில்லைகளை தெளிவாக்கி, துய்மையாக்கி ஈடல மெளன்டன்ட் வைத்து பாடம் செய்ய வேண்டும்.

இ பிரிவில் பொருத்துதலுக்கு பிறகு, உயர்தர ஆல்ககாவில் (70%, 90%, 9%) அப்சொலிட் 1இ அப்சொலிட் 2, அப்சொலிட் 3) 1 மணி நேரம் வைத்து திசுக்களில் உள்ள ஈரபதம் அகற்ற வேண்டும். பின் ஈரபதம் அகற்றிய திசுக்களை இருவிதமான தேங்காய் எண்ணெயில் 60°இ 1 மணி நேரம் வைத்து தெளிவாக்க வேண்டும். தெளிவாகிய திசுக்களை இருவிதமான மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகு (மெழுகு 1-ல் 1 மணி நேரமும், மெழுகு 2-ல் ஒன்றரை மணி நேரமும்) வைத்து வடிகட்ட வேண்டும். பிளாஸ்டிக் உறையில் மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகு வைத்து பதனிடுதல் செய்து பின் மைக்ரோடோமிக்கு முன் திடமாக்க வேண்டும். திசு துண்டுகளை சுழல் இயந்திரமான மைக்ரோடோம் மூலம் 4μம் அளவில் பிரித்தெடுத்து, அதை மிதமான சூடு கொண்ட தண்ணீரில் மிதக்க விட்டு அல்புமின் கண்ணாடி வில்லைகளில் ஒவ்வொன்றாக தேர்ந்தெடுத்து வைக்க வேண்டும்.

நிறவேறுபாட்டிற்கு முன்பு, கண்ணாடி வில்லைகளை 60°இ கொண்ட சூடான தேங்காய் எண்ணெயில் 5 நிமிடம் வைத்து மெழுகை அகற்றி, கீழ் தர ஆல்ககாலுக்கு (அப்சொலிட் 90%, 70%) கொண்டு சென்று பின் தண்ணீரில் 2 நிமிடம் அலச வேண்டும். ஈரபதமேறிய தொகுதிகளை ஹிமாடாக்ஸிலின் கரைசலில் 10 நிமிடம் வைத்து பின், 2 நிமிடம் தண்ணீரில் அலசி நிறவேறுபாடு செய்ய வேண்டும். பின்பு 1% ஆல்ககால் அமிலத்தில் ஒரு தடவை முழுகச்செய்து குழாய் நீரில் 30 வினாடிகள் கழுகி பிரித்தெடுக்க வேண்டும். 1% இயோசின் கரைசலில் தொகுதிகளை 1 நிமிடம் வைத்து கூடுதல் நிறவேறுபாடு செய்து பின் 70%, 80%, 90%, 1 நிமிடம் வைத்து ஈரபதம் அகற்ற வேண்டும். இரு விதமான அப்சொலிட் ஆல்ககாலில் செய்ய வேண்டும். மூன்று விதமான சூடான தேங்காய் எண்ணெயை 60°இ---ல் 1 நிமிடம் வில்லைகளை வைத்து தெளிவாக்கி, துய்மையாக்கி, ஈடல மெளன்டன்ட் வைத்து பாடம் செய்ய வேண்டும்.

திசு செயல்முறையின் போது மூன்று பிரிவுகளிலும், மேக்ரோஸ்கோபிக் ஆற்றாலை கொண்டு அதன் கடினதன்மை, ஊடுருவல், பலமானதற்கு பிறகுள்ள மாற்றம், சுரசுருப்பான சுருக்கங்கள் எளிதில் பிரித்தெடுத்தல் ஆகியவற்றை கண்காணிக்க வேண்டும். மைக்ரோஸ்கோபிக் சோதனைக்கு தேவையான

ஹமடாக்ஸிலின் இயோசின் நிறவேறுபாடு வில்லைகள் மையக்கரு நிறவேறுபாடு, சைட்டோபிலாஸ்மிக் நிறவேறுபாடு மற்றும் அனைத்து மூன்று விதமான நிறவேறுபாடுகளையும் நோய் இயல்பினை கண்டுபிடிக்கும் வல்லுனரை (பார்வையாளர் 1 மற்றும் பார்வையாளர் 2) வைத்து மதிப்பிட வேண்டும். அனைத்து கோட்பாடுகளையும் குறித்து வைக்க வேண்டும். தகவல்கள் அனைத்தும் மைக்ரோசாஃப்ட் எக்ஸல் அப்ளிகேஷனில் பதிய வேண்டும்.

10. பங்கேற்பாளர் எதிர்பார்க்கும் விளைவுகள்
இல்லை

11. பங்கேற்பாளர் ஆராய்ச்சியில் எதிர்பார்க்கும் அனுகூலங்கள்?

- இந்த சோதனைக்காக பணம் எதுவும் செலுத்த வேண்டாம்
- இந்த செய்முறையின் விளைவுகளையும், விளக்கங்களையும் நீங்கள் கேட்டு தெரிந்து கொள்ளலாம்.

12. இரகசியத்தன்மை காத்தல்?

உங்களிடம் இருந்து சேகரித்த எந்த விபரமும் இரகசியமாக வைக்கப்படும். இதன்மூலம் கிடைக்கும் புள்ளிவிபரம் மட்டும் வெளியிடப்படும் மற்றும் படி தனிநபரின் சொந்த விபரங்கள் வெளியிடப்படமாட்டாது.

13. எதனால் இந்த ஆய்வில் நான் பங்கேற்க தேர்ந்தெடுக்கப்பட்டேன்?

- அ) எனது கல்வி நிறுவனத்தின் நிபந்தனைகளுக்கு இது உட்பட்டது.
- ஆ) தாங்கள் இந்த ஆய்வின் சேர்ப்பு மற்றும் விடுப்பு கட்டளையின் உள் அமையப் பெறுவதால்
- இ) சமூகத்திற்கு உதவிக்கு

14. இந்த ஆய்வில் எத்தனை பேர் பங்கேற்கிறார்கள்?

ஒவ்வொரு குறும்பிலும் 30 பேர்

15. இந்த ஆய்வின் மூலம் ஏதேனும் பின்விளைவுகள் ஏற்பட்டால் ஆராய்ச்சியாளர் பொறுப்பு ஏற்பாரா?

ஆம்

16. இந்த ஆராய்ச்சியில் பங்குபெறுவோருக்கு எவ்வித தொகையும் வழங்கப்படுமா?

இல்லை

17. நான் இந்த ஆராய்ச்சியிலிருந்து விருப்பப்பட்டால் எந்த காலகட்டத்திலும் விலகலாமா?

நோயாளியின் எந்த ஒரு கட்டுப்பாடு, நிபந்தனைகளின் கீழ் இந்த ஆய்விற்கு உட்படுத்தப்படவில்லை. அவர்களின் முழு ஒத்துழைப்பு மற்றும் சம்மதத்தின் பேரில் மட்டுமே பங்கெடுத்துள்ளனர்.

18. ஏதேனும் புதிய செய்தி, புதிய கண்டுபிடிப்பு பற்றி நான் அறிவிக்கப்படுவேனா? ஆம்

19. ஆராய்ச்சியின் எதிர்பார்க்கப்படும் பங்குகால அளவு? ஒரு வருடம்

20. வேறு ஏதேனும் பொருத்தமான விபரங்கள் உண்டா? இல்லை

21. இவ்வாராய்ச்சியைப் பற்றிய விவரங்களை யாரிடம் கேட்டு தெரிந்துக் கொள்வது?

டாக்டர். அஷ்தா, ஏ.எஸ்.

முதுகலை மாணவர்

வாய் நோய்களின் இயல்பு மற்றும் நுண்ணுயிரியியல் பிரிவு

ஸ்ரீ மூகாம்பிகா பல் மருத்துவக் கல்லூரி,

குலசேகரம் - 629 161, கன்னியாகுமரி மாவட்டம்.

கைபேசி : 828140-1187

மின் அஞ்சல் : aadil.ashitha@gmail.com

இடம் :

தேதி :

முதன்மை ஆராய்ச்சியாளரின்

கையொப்பம்

ஓப்புதல் படிவம்

தலைப்பு :

“ஹிமடாக்ஸிலின் மற்றும் யேசுவின் திசு இயல்பு நிறவேறுபாட்டில் தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில் எண்ணெயில் சைலினை தெளி பொருளாகப் பண்படுத்தி அதன் ஆற்றலை ஒப்பிடச் செய்யும் செயல்முறை”

பங்கேற்பாளரின் பெயர் :

முகவரி :

இந்த ஆராய்ச்சியின் தகவல்கள் அனைத்தும் என்னிடம் தெளிவாக எழுத்துமூலம் விளக்கப்பட்டுள்ளது. இந்த ஆராய்ச்சியின் முடிவுகள் எனக்கு நேரடியாக பயன்பராவிட்டாலும் மருத்துவத்துறையின் முன்னேற்றத்திற்கு பயன்படும் என்பதை அறிவேன். இவ்வாராய்ச்சியைப் பற்றி நான் தெளிவாக புரிந்துக் கொண்டுள்ளேன். நான் தானாக முன்வந்து இதில் பங்குப் பெறுகிறேன் என்பதை அறிவேன். இதிலிருந்து எந்த நேரமும் எக்காரணமும் கூறாமல் வந்தாலும் இந்த மருத்துவமனையில் எனக்கு கிடைக்கும் மருத்துவ உதவி எவ்விதத்திலும் பாதிக்கப்படாது என்பதையும் அறிவேன். இவ்வாராய்ச்சியின் மூலம் வரும் முடிவுகள் மற்றும் தகவல்களை அறிவியல் துறையின் பயன்பாடுகளுக்கு (மட்டுமே) உபயோகப்படுத்திக் கொள்ள சம்மதிக்கிறேன். எனக்கு இவ்வாராய்ச்சியைப் பற்றி விரிவான தகவல்கள் அடங்கிய படிவம் தரப்பட்டுள்ளது.

பங்கேற்பாளரின் கையொப்பம் -.....

தேதி :

பங்கேற்பாளரின் முகவரி :

பங்கேற்பாளரின் கைபேசி எண் :

சாட்சி ஒப்பம்

தேதி :

பெயர் & முகவரி :

முதன்மை ஆராய்ச்சியாளரின் கையொப்பம்

தேதி :

**SREE MOOKAMBIKA INSTITUTE OF DENTAL SCIENCES,
KULASEKHARAM
(Affiliated to Tamilnadu Dr. MGR Medical University)**

**COMPARING THE EFFICIENCY OF COCONUT OIL AND PALM OIL
WITH XYLENE AS A CLEARING AGENT IN CONVENTIONAL
HEMATOXILIN AND EOSIN STAINING PROCEDURE.**

CASE PROFORMA

Name : **OP No:**

Age/Sex :

Occupation:

Address : **Ph no:**

Medical status:

Provisional diagnosis:

Code number for specimen:

Date:

DATA SHEET

COMPARING THE EFFICIENCY OF COCONUT OIL AND PALM OIL WITH XYLENE AS A CLEARING AGENT IN CONVENTIONAL HEMATOXYLIN AND EOSIN PROCEDURE.

Observer - I

Gross tissue specimen evaluation

Sample no:	Rigidity	Translucency	Change after impregnation	Gross shrinkage	Ease of sectioning

SCORE 0 - Finding is inferior to xylene treated specimen

SCORE 1 - Finding is similar to xylene treated specimen

SCORE 2 - Finding is superior to xylene treated specimen

H/E stained slide evaluation

Sample No:	Nuclear staining	Cytoplasmic staining	Clarity of staining

SCORE 0 – Indistinct

SCORE 1 – Distinct

ஒப்புதல் படிவம்
பகுதி 1
ஆய்வில் பங்கேற்பவர்களுக்கான விவரம்

அன்பார்ந்த பங்கேற்பாளர்களே,

இந்த ஆராய்ச்சியில் ஆர்வத்துடன் பங்கேற்க வந்திருக்கும் உங்களுக்கு எங்களுடைய வரவேற்பினையும் நன்றியையும் தெரிவித்துக் கொள்கிறோம். இந்த ஆராய்ச்சியில் கலந்து கொள்வதற்கு முன்பு, இது எதனால் மேற்கொள்ளப்படுகிறது என்று புரிந்து கொள்வது மிகவும் அவசியமானது. இந்த படிவம் ஆராய்ச்சிக்கு தொடர்புடைய அவசியமானது. இந்த படிவம் ஆராய்ச்சிக்கு தொடர்புடைய விவரங்களை தெரிந்து கொள்ள உதவுகிறது. இந்த ஆராய்ச்சி இதனுடைய தன்மை, தேவை, அணுகூலங்கள், அபாயம், வசதியின்மை, முன்னெச்சரிக்கை மற்றும் தவல்கள் எல்லாம் எவ்வாறு மேற்கொள்ளப்படுகிறது என்பதினை விவரிக்கிறது. இதில் ஆய்விற்கான படிவத்தில் உள்ள குறிப்புகளை படித்து புரிந்துக் கொள்வது மிகவும் அவசியமானது. இதில் சில அறிவியல் சொற்கள் பயன்படுத்தப்பட்டிருக்கிறது. அதனால் ஏதேனும் ஐயங்களோ அல்லது மேலும் ஏதேனும் விவரங்கள் தெரிந்து கொள்ள வேண்டி இருந்தாலோ இந்த ஆராய்ச்சி செய்பவரையோ அல்லது கீழே கொடுக்கப்பட்டிருக்கும் நபர்களில் யாரையேனும், ஒப்புதலுக்கு முன்போ அல்லது இவ்வாராய்ச்சியின் முழு காலத்திலோ எந்தவிதமான தயக்கமும் இன்றி கேட்டு தெரிந்து கொள்ளலாம்.

1. முதன்மை சோதனையாளர் பெயர் : டாக்டர். அஷ்தா, ஏ.எஸ்.
முதுநிலை மாணவர்
வாய் நோய்களின் இயல்பு மற்றும்
நுண்ணுயிரியில் பிரிவு
ஸ்ரீ மூகாம்பிகா பல் மருத்துவச் கல்லூரி,
குலசேகரம் - 629 161, கன்னியாகுமரி
மாவட்டம்.
2. வழிகாட்டுனர் பெயர் : டாக்டர். டி. ஐசக் ஜோசப்
தலைமை பேராசிரியர்,
வாய் நோய்களின் இயல்பு மற்றும்
நுண்ணுயிரியில் பிரிவு
ஸ்ரீ மூகாம்பிகா பல் மருத்துவச் கல்லூரி,
குலசேகரம் - 629 161, கன்னியாகுமரி
மாவட்டம்.
3. துணை வழிகாட்டுனர் பெயர் : டாக்டர். கிரிஷ் கே.எல்
பேராசிரியர்
வாய் நோய்களின் இயல்பு மற்றும்
நுண்ணுயிரியில் பிரிவு
ஸ்ரீ மூகாம்பிகா பல் மருத்துவச் கல்லூரி,
குலசேகரம் - 629 161, கன்னியாகுமரி
மாவட்டம்.

4. நிறுவனம்

: ஸ்ரீ முகாம்பிகா பல் மருத்துவக் கல்லூரி,
வி.பி.எம். மருத்துவமனை வளாகம்,
படநிலம், குலசேகரம்,
கன்னியாகுமரி மாவட்டம் 629 161
தமிழ்நாடு.

5. ஆராய்ச்சியின் தலைப்பு :

ஹிமடாக்ஸி-ன் மற்றும் யோசின் திசு இயல்பு நிறவேறுபாட்டில்
தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில் எண்ணெயில் சை-னை தெளி
பொருளாகப் பண்படுத்தி அதன் ஆற்றலை ஒப்பிடச் செய்யும் செயல்முறை.

6. பின்னணி தகவல் :

அறிவியல் சார்ந்த குறிப்பேடு

7. குறிக்கோள்கள்:

- ஹிமடாக்ஸின் மற்றும் இயோசின் நிற வேறுபாடு செயல்முறையில்
தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில் எண்ணெய் தெளிபொருளாக
பயன்படுத்தி அதன் ஆற்றலை சை-னுடன் மதிப்பிடுதல்.
- தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில் எண்ணெயை வைத்து செய்த
திசு தெளிவடைதல் மற்றும் மெழுகு அகற்றல் ஒரே மாதிரியாக உள்ளதா
அல்லது சை-ன்னால் செய்யப்பட்ட திசுக்கள் மேலாக உள்ளதா
என்பதை பற்றி கண்டுபிடித்தல்.

8. ஆய்வின் அறிவியல் சார்ந்த நிரூபணம்:

ஆக்குபேஷனல் சேஃப்டி அன்ட் ஹெல்த் அட்மினிஸ்டிரேஷன்
(நுநா) விதிமுறைப்படி, சை-ன் போன்ற பல்வேறுபட்ட மாற்றக்கூறுகள்
- மோனின் சேர்மங்கள், அ-ஃபேடிக் ஹைட்ரோகார்பன்ஸ், தாவர எண்ணெய்
மற்றும் தாது எண்ணெய் முதல்-யவற்றை ஆய்வாலையில் முன்னர் சை-னுக்கு
பதிலாக சோதித்து பார்த்தனர்.

இருப்பினும் இந்த மாற்றக்கூறுகள் அனைத்தும் விலை
அதிகமானதாகவும், குறைந்த ஆற்றலை கொண்டவையாகவும் இருந்தது.
தேங்காய் எண்ணெய் இந்த உலகில் எளிதில் கிடைக்கக் கூடிய அனைவராலும்
பயன்படுத்தப்படக் கூடிய தாவர எண்ணெய் இது நச்சுத்தன்மையற்றது, வெப்ப
நிலை மாறாதது, மெதுவாக கனியகூடியது மற்றும் துர்நாற்றத்தை பெருமளவு
தடுக்கக்கூடியது. பனை எண்ணெய் அதிக அளவில் கிடைக்கக்கூடியதாகவும்
பாதுகாப்பனதாகவும் சை-ன் மாற்றாகவும் கருதப்படுகிறது.

இந்த இடத்தி-ருந்து நாங்கள் தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில்
எண்ணெயை திசு செயல்முறையின் போது தெளி பொருளாகவும் மற்றும்
ஹிமடாக்ஸி-ன் இயோசின் நிறவேறுபாடு செயல்முறையின் போது
மெழுகழிக்கும் பொருளாகவும் பயன்படுத்தி ஏதேனும் பலன் உள்ளதா என்று
சை-ன் திசு செய்முறையுடன் ஒப்பிட்டு பார்க்கும் முயற்சியை செய்கிறோம்.

9. செய்முறை:

நோயாளிகளின் மென் திசு மாதிரி எடுக்கும் பொழுது அவர்களின்
உள்ளேறிய மற்றும் வெளியேறிய குறிப்புகளை ஸ்ரீ முகாம்பிகா பல் மருத்துவக்
கல்லூரியின் வாய் மற்றும் முக அறுவை சிகிச்சை பிரிவில் இருந்து

எடுக்கப்படுகிறது. இந்த திசு மாதிரிகள் அனைத்தும் வழக்கமான பல் அகற்றும் முறையின் போது எடுக்கப்படுகிறது. இதை தேர்ந்தெடுத்ததற்கான காரணங்களையும் இந்த ஆய்வினை பற்றியும் விளக்கி காட்டாயமாக ஒப்பந்த வாக்குமூலம் வாங்க வேண்டும். இந்த மாதிரிகள் மொத்தம் 30 திசு மாதிரிகளை கொண்டது.

இந்த 30 மாதிரிகள் ஒவ்வொன்றும் அறுவை சிகிச்சையின் போது எடுக்கப்பட்டு அதை 10% பாதுகாக்கப்பட்ட ஃபார்ம- னில் 48 மணி நேரம் பொருத்த வேண்டும், பின்பு திசுக்களை மூன்று சரிபாதிமாக பிரித்து பிரிவு அ, பிரிவு ஆ, பிரிவு இ என்று சோதனைப் பிரிவில் வரிசைப்படுத்தி, ஒவ்வொரு பிரிவிலும் உள்ள திசுக்களை 30 பாகங்களாக பிரிக்க வேண்டும்.

அ பிரிவில், பொருத்துதல், கழிந்த பிறகு, உயர்தர ஆல்ககாலை (70%, 90%, 95%, அப்சொ- யுட் ஐஐ அப்சொ- யுட் ஐஐஐ) கொண்டு ஒரு மணி நேரத்திற்கு ஒரு முறை திசுக்களின் ஈரப்பதத்தை நீக்க வேண்டும். ஈரபதம் நீக்கிய திசுக்களை ஆல்க்கா- ல் இருந்து பிரிக்க இருவேறு வகையான சை- ன், சை- ன் ஐ-ல் 45 நிமிடமும், சை- ன் ஐஐ-ல் 30 நிமிடமும் வைக்க வேண்டும். ஒரு பிளாஸ்டிக் உறையில் மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகை பயன்படுத்தி பதிய வைத்து பின் மைக்ரோடோமிக்கு முன்பு திமாக்க வேண்டும். திசு துண்டுகளை சுழல் இயந்திரமான மைக்ரோடோம் வைத்து 4μம் அளவில் பிரித்தெடுத்து, அதை மிதமான சூடு கொண்ட தண்ணீரில் மிதக்க விட்டு அல்புமின் கண்ணாடி வில்லையில் ஒவ்வொன்றாக தேர்ந்தெடுத்து வைக்க வேண்டும்.

நிறவேறுபாட்டிற்கு முன்பு, கண்ணாடி வில்லைகளை சை- ன் ஐ மற்றும் ஐஐ-ல் 5 நிமிடம் வீதம் வைத்து மெழுகை அகற்றி கீழ் தர ஆல்ககா- ல் (அப்சொ- யுட் 90%, 70%) மாற்றி பின் அதை தண்ணீரில் 2 நிமிடம் அலச வேண்டும். ஈரப்பதமேறிய தொகுதிகளை நிறவேறுபாடு செய்யும் போது ஹிமடாக்ஸி- ன் கரைச- ல் 10 நிமிடம் வைத்து பின் 4 நிமிடம் தண்ணீரில் அலச வேண்டும். பின்பு 1% ஆல்ககால் அமிலத்தில் ஒரு தடவை முழுகச் செய்து 30 வினாடிகள் குழாய் நீரில் கழுகி வேறுபாடு செய்ய வேண்டும். பிறகு தொகுதிகளை கூடுதல் நிறவேறுபாடு செய்ய 1% இயோசின் கரைச- ல் 1 நிமிடம் வைத்து பின் 70%, 80%, 90% வீதம் 1 நிமிடம் ஈரப்பதம் நீக்க வேண்டும். இரு வேறு அப்சொ- ட் ஆல்ககால் செய்ய வேண்டும். மூன்று விதமான சை- ன் (ஐ, ஐஐ மற்றும் ஐஐஐ) 1 நிமிடம் வீதம் வைத்து வில்லைகளை தெளிவாக்கி, தூய்மையாக்கி ஈடல மெளன்டன்ட் வைத்து பாடம் செய்ய வேண்டும்.

ஆ பிரிவில் பொருத்துதலுக்கு பிறகு, உயர்தர ஆல்ககால் (70%, 90%, 95% அப்சொ- ட் 1, அப்சொ- ட் 2, அப்சொ- ட் 3)யை 1 மணி நேரம் வைத்து திசுக்களை ஈரபதம் அகற்ற வேண்டும். பின் ஈரபதம் அகற்றிய திசுக்களை இரு வேறு விதமான 60°இ கொண்ட சூடான பாமயில் எண்ணெயில் 1 மணி நேரம் தெளிவாக்க வேண்டும். தெளிவாகிய திசுக்களை இரு விதமான மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகில் (மெழுகு 1-ல் 1 மணி நேரமும், மெழுகு ஐஐ-ல் ஒன்றரை மணி நேரமும்) வடிகட்ட வேண்டும். பிளாஸ்டிக் உறையில் மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகு வைத்து பதனிடுதல் செய்து பின் மைக்ரோடோமிக் முன்பு திடமாக்க வேண்டும். திசு துண்டுகளை சுழல் இயந்திரமான மைக்ரோடோம் மூலம் 4μம் அளவில் பிரித்தெடுத்து, அதை மிதமான சூடு கொண்ட தண்ணீரில் மிதக்க விட்டு அல்புமின் கண்ணாடி வில்லைகளில் ஒவ்வொன்றாக தேர்ந்தெடுத்து வைக்க வேண்டும். %

நிற வேறுபாட்டிற்கு முன்பு, கண்ணாடி வில்லைகளை 60°இ கொண்ட சூடான பாமயில் எண்ணெயில் 5 நிமிடம் வைத்து மெழுகை அகற்றி, கீழ்தர ஆல்ககாலுக்கு (ப்சொ- ட் 90%, 70%) கொண்டு சென்று பின் 2 நிமிடம் தண்ணீரில் அலச வேண்டும். ஈரபதமேறிய தொகுதிகளை ஹிமாடாக்ஸி-ன் கரைச- ல் 10 நிமிடம் வைத்து பின் 2 நிமிடம் தண்ணீரில் அலசி நிறவேறுபாடு செய்ய வேண்டும். பின்பு 1% ஆல்ககால் அமிலத்தில் ஒரு தடவை முழுகச் செய்து குழாய் நீரில் 30 வினாடிகள் கழுகி பிரித்தெடுக்க வேண்டும். 1% இயோசின் கரைச- ல் தொகுதிகளை 1 நிமிடம் வைத்து கூடுதல் நிற வேறுபாடு செய்து பின் 70%, 80%, 90%-ல் 1 நிமிடம் வைத்து ஈரபதம் அகற்ற வேண்டும். இருவிதமான அப்சொ- ட் ஆல்ககால்- ல் செய்ய வேண்டும். மூன்று விதமான 60°இ கொண்ட சூடாக்கிய பாமயில் எண்ணெயில் 1 நிமிடம் வைத்து வில்லைகளை தெளிவாக்கி, துய்மையாக்கி ஈடல மெளன்டன்ட் வைத்து பாடம் செய்ய வேண்டும்.

இ பிரிவில் பொருத்துதலுக்கு பிறகு, உயர்தர ஆல்ககாவில் (70%, 90%, 9%) அப்சொ- ட் 1இ அப்சொ- ட் 2, அப்சொ- ட் 3) 1 மணி நேரம் வைத்து திசுக்களில் உள்ள ஈரபதம் அகற்ற வேண்டும். பின் ஈரபதம் அகற்றிய திசுக்களை இருவிதமான தேங்காய் எண்ணெயில் 60°இ 1 மணி நேரம் வைத்து தெளிவாக்க வேண்டும். தெளிவாகிய திசுக்களை இருவிதமான மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகு (மெழுகு 1-ல் 1 மணி நேரமும், மெழுகு 2-ல் ஒன்றரை மணி நேரமும்) வைத்து வடிகட்ட வேண்டும். பிளாஸ்டிக் உறையில் மோல்டன் பாராஃபின் மெழுகு வைத்து பதனிடுதல் செய்து பின் மைக்ரோடோமிக்கு முன் திடமாக்க வேண்டும். திசு துண்டுகளை சுழல் இயந்திரமான மைக்ரோடோம் மூலம் 4μம் அளவில் பிரித்தெடுத்து, அதை மிதமான சூடு கொண்ட தண்ணீரில் மிதக்க விட்டு அல்புமின் கண்ணாடி வில்லைகளில் ஒவ்வொன்றாக தேர்ந்தெடுத்து வைக்க வேண்டும்.

நிறவேறுபாட்டிற்கு முன்பு, கண்ணாடி வில்லைகளை 60°இ கொண்ட சூடான தேங்காய் எண்ணெயில் 5 நிமிடம் வைத்து மெழுகை அகற்றி, கீழ் தர ஆல்ககாலுக்கு (அப்சொ- ட் 90%, 70%) கொண்டு சென்று பின் தண்ணீரில் 2 நிமிடம் அலச வேண்டும். ஈரபதமேறிய தொகுதிகளை ஹிமாடாக்ஸி-ன் கரைச- ல் 10 நிமிடம் வைத்து பின், 2 நிமிடம் தண்ணீரில் அலசி நிறவேறுபாடு செய்ய வேண்டும். பின்பு 1% ஆல்ககால் அமிலத்தில் ஒரு தடவை முழுகச்செய்து குழாய் நீரில் 30 வினாடிகள் கழுகி பிரித்தெடுக்க வேண்டும். 1% இயோசின் கரைச- ல் தொகுதிகளை 1 நிமிடம் வைத்து கூடுதல் நிறவேறுபாடு செய்து பின் 70%, 80%, 90%, 1 நிமிடம் வைத்து ஈரபதம் அகற்ற வேண்டும். இரு விதமான அப்சொ- ட் ஆல்ககால்- ல் செய்ய வேண்டும். மூன்று விதமான சூடான தேங்காய் எண்ணெயை 60°இ---ல் 1 நிமிடம் வில்லைகளை வைத்து தெளிவாக்கி, துய்மையாக்கி, ஈடல மெளன்டன்ட் வைத்து பாடம் செய்ய வேண்டும்.

திசு செயல்முறையின் போது மூன்று பிரிவுகளிலும், மேக்ரோஸ்கோபிக் ஆற்றாலை கொண்டு அதன் கடினதன்மை, ஊடுருவல், பலமானதற்கு பிறகுள்ள மாற்றம், சுரகருப்பான சுருக்கங்கள் எளிதில் பிரித்தெடுத்தல் ஆகியவற்றை கண்காணிக்க வேண்டும். மைக்ரோஸ்கோபிக் சோதனைக்கு தேவையான ஹிமாடாக்ஸி-ன் இயோசின் நிறவேறுபாடு வில்லைகள் மையக்கரு நிறவேறுபாடு, சைட்டோபிலாஸ்மிக் நிறவேறுபாடு மற்றும் அனைத்து மூன்று விதமான நிறவேறுபாடுகளையும் நோய் இயல்பினை கண்டுபிடிக்கும் வல்லுனரை (பார்வையாளர் 1 மற்றும் பார்வையாளர் 2) வைத்து மதிப்பிட வேண்டும்.

அனைத்து கோட்பாடுகளையும் குறித்து வைக்க வேண்டும். தகவல்கள் அனைத்தும் மைக்ரோசாஃப்ட் எக்ஸல் அப்ளிகேஷனில் பதிய வேண்டும்.

10. பங்கேற்பாளர் எதிர்பார்க்கும் விளைவுகள் இல்லை

11. பங்கேற்பாளர் ஆராய்ச்சியில் எதிர்பார்க்கும் அனுகூலங்கள்?

- இந்த சோதனைக்காக பணம் எதுவும் செலுத்த வேண்டாம்
- இந்த செய்முறையின் விளைவுகளையும், விளக்கங்களையும் நீங்கள் கேட்டு தெரிந்து கொள்ளலாம்.

12. இரகசியத்தன்மை காத்தல்?

உங்களிடம் இருந்து சேகரித்த எந்த விபரமும் இரகசியமாக வைக்கப்படும். இதன்மூலம் கிடைக்கும் புள்ளிவிபரம் மட்டும் வெளியிடப்படும் மற்றபடி தனிநபரின் சொந்த விபரங்கள் வெளியிடப்படமாட்டாது.

13. எதனால் இந்த ஆய்வில் நான் பங்கேற்க தேர்ந்தெடுக்கப்பட்டேன்?

- அ) எனது கல்வி நிறுவனத்தின் நிபந்தனைகளுக்கு இது உட்பட்டது.
- ஆ) தாங்கள் இந்த ஆய்வின் சேர்ப்பு மற்றும் விடுப்பு கட்டளையின் உள் அமையப் பெறுவதால்
- இ) சமூகத்திற்கு உதவிக்கு

14. இந்த ஆய்வில் எத்தனை பேர் பங்கேற்கிறார்கள்?

ஒவ்வொரு குரூப்- லும் 30 பேர்

15. இந்த ஆய்வின் மூலம் ஏதேனும் பின்விளைவுகள் ஏற்பட்டால் ஆராய்ச்சியாளர் பொறுப்பு ஏற்பாரா?

ஆம்

16. இந்த ஆராய்ச்சியில் பங்குபெறுவோருக்கு எவ்வித தொகையும் வழங்கப்படுமா?

இல்லை

17. நான் இந்த ஆராய்ச்சியி- ருந்து விருப்பப்பட்டால் எந்த காலகட்டத்திலும் விலகலாமா?

நோயாளியின் எந்த ஒரு கட்டுப்பாடு, நிபந்தனைகளின் கீழ் இந்த ஆய்விற்கு உட்படுத்தப்படவில்லை. அவர்களின் முழு ஒத்துழைப்பு மற்றும் சம்மதத்தின் பேரில் மட்டுமே பங்கெடுத்துள்ளனர்.

18. ஏதேனும் புதிய செய்தி, புதிய கண்டுபிடிப்பு பற்றி நான் அறிவிக்கப்படுவேனா? ஆம்

19. ஆராய்ச்சியின் எதிர்பார்க்கப்படும் பங்குகால அளவு? ஒரு வருடம்

20. வேறு ஏதேனும் பொருத்தமான விபரங்கள் உண்டா? இல்லை

21. இவ்வாராய்ச்சியைப் பற்றிய விவரங்களை யாரிடம் கேட்டு தெரிந்துக் கொள்வது?

டாக்டர். அஷ்தா, ஏ.எஸ்.

முதுகலை மாணவர்

வாய் நோய்களின் இயல்பு மற்றும் நுண்ணுயிரியியல் பிரிவு

ஸ்ரீ முகாம்பிகா பல் மருத்துவக் கல்லூரி,

குலசேகரம் - 629 161, கன்னியாகுமரி மாவட்டம்.

கைபேசி : 828140-1187

மின் அஞ்சல் : aadil.ashitha@gmail.com

இடம் :

தேதி :

முதன்மை ஆராய்ச்சியாளரின்

கையொப்பம்

ஒப்புதல் படிவம்

தலைப்பு :

“ஹிமடாக்ஸி- ன் மற்றும் யேசுவின் திசு இயல்பு நிறவேறுபாட்டில் தேங்காய் எண்ணெய் மற்றும் பாமயில் எண்ணெயில் சை-னை தெளி பொருளாகப் பன்படுத்தி அதன் ஆற்றலை ஒப்பிடச் செய்யும் செயல்முறை”

பங்கேற்பாளரின் பெயர் :

முகவரி :

இந்த ஆராய்ச்சியின் தகவல்கள் அனைத்தும் என்னிடம் தெளிவாக எழுத்துமூலம் விளக்கப்பட்டுள்ளது. இந்த ஆராய்ச்சியின் முடிவுகள் எனக்கு நேரடியாக பயன்பராவிட்டாலும் மருத்துவத்துறையின் முன்னேற்றத்திற்கு பயன்படும் என்பதை அறிவேன். இவ்வாராய்ச்சியைப் பற்றி நான் தெளிவாக புரிந்துக் கொண்டுள்ளேன். நான் தானாக முன்வந்து இதில் பங்குப் பெறுகிறேன் என்பதை அறிவேன். இதி-ருந்து எந்த நேரமும் எக்காரணமும் கூறாமல் வந்தாலும் இந்த மருத்துவமனையில் எனக்கு கிடைக்கும் மருத்துவ உதவி எவ்விதத்திலும் பாதிக்கப்படாது என்பதையும் அறிவேன். இவ்வாராய்ச்சியின் மூலம் வரும் முடிவுகள் மற்றும் தகவல்களை அறிவியல் துறையின் பயன்பாடுகளுக்கு (மட்டுமே) உபயோகப்படுத்திக் கொள்ள சம்மதிக்கிறேன். எனக்கு இவ்வாராய்ச்சியைப் பற்றி விரிவான தகவல்கள் அடங்கிய படிவம் தரப்பட்டுள்ளது.

பங்கேற்பாளரின் கையொப்பம் -.....

தேதி :

பங்கேற்பாளரின் முகவரி :

பங்கேற்பாளரின் கைபேசி எண் :

சாட்சி ஒப்பம்

தேதி :

பெயர் & முகவரி :

முதன்மை ஆராய்ச்சியாளரின் கையொப்பம்

தேதி :

സമ്മത പത്രം - ഭാഗം - 1

പഠനവുമായി സഹകരിക്കുന്ന വ്യക്തികളുടെ അറിവിലേക്ക്

പ്രിയപ്പെട്ട സന്നദ്ധ സേവകരേ,

ഞങ്ങൾ നിങ്ങളെ സ്വാഗതം ചെയ്യുന്നു. അതോടൊപ്പം ഈ പഠനവുമായി സഹകരിക്കാനുള്ള സന്നദ്ധതയോട് നന്ദി രേഖപ്പെടുത്തുന്നു. നിങ്ങൾ ഈ പഠനത്തിൽ പങ്കെടുക്കുന്നതിനു മുൻപ് ഈ പഠനം എന്തിനാണ് നടത്തപ്പെടുന്നത് എന്ന് അറിയേണ്ടതുണ്ട്. അതിനാൽ ഈ ഫോറത്തിൽ ഗവേഷണ പഠനത്തിന്റെ വിവരങ്ങളും മറ്റും വിശദമായി രേഖപ്പെടുത്തിയിരിക്കുന്നു. ഈ പഠനത്തിന്റെ രീതി, ഉദ്ദേശം, പ്രയോജനം, അപകടസാധ്യത, ക്ലേശം, മുൻകരുതൽ, എങ്ങനെ ഈ പഠനം മുൻപോട്ടു കൊണ്ടുപോകുന്നു എന്നിങ്ങനെ എല്ലാ വിവരങ്ങളും ഫോറത്തിൽ രേഖപ്പെടുത്തിയിരിക്കുന്നു. സദയം ഈ വിവരങ്ങൾ വായിച്ചു മനസ്സിലാക്കുവാൻ അഭ്യർത്ഥിക്കുന്നു. ഈ വിവരങ്ങളിൽ ശാസ്ത്രപരമായ പദങ്ങൾ ഉള്ളതിനാൽ സംശയനിവാരണത്തിനു പ്രധാന പഠനകർത്താവിനോടോ താഴെ രേഖപ്പെടുത്തിയിരിക്കുന്ന വ്യക്തികളോടോ ഫോറം ഒപ്പിടുന്നതിനു മുൻപോ അല്ലെങ്കിൽ ഈ പഠനത്തിന്റെ കാലാവധി തീരുന്നതുവരെയോ സമീപിക്കാവുന്നതാണ്.

- 1. മുഖ്യ ഗവേഷകൻ : **ഡോ. അഷിത. എ. എസ്.**
ബിരുതാനന്തര ബിരുത വിദ്യാർത്ഥിനി
ഓറൽ പത്തോളജി & മൈക്രോബയോളജി വിഭാഗം
ശ്രീ മൂകാംബിക ഇൻസ്റ്റിറ്റ്യൂട്ട് ഓഫ് ഡെന്റൽ സയൻസ്,
കുലശേഖരം - 629 161.
- 2. പ്രധാന മാർഗ്ഗദർശി : **ഡോ. റ്റി. ഐസക് ജോസഫ്**
ഓറൽ പത്തോളജി & മൈക്രോബയോളജി വിഭാഗം മേധാവി
ശ്രീ മൂകാംബിക ഇൻസ്റ്റിറ്റ്യൂട്ട് ഓഫ് ഡെന്റൽ സയൻസ്,
കുലശേഖരം - 629 161.
- 3. സഹ മാർഗ്ഗ ദർശി : **ഡോ. ഗിരീഷ്. കെ. എൽ**
പ്രൊഫസർ
ഓറൽ പത്തോളജി & മൈക്രോബയോളജി വിഭാഗം
ശ്രീ മൂകാംബിക ഇൻസ്റ്റിറ്റ്യൂട്ട് ഓഫ് ഡെന്റൽ സയൻസ്,
കുലശേഖരം - 629 161.
- 4. ഇൻസ്റ്റിറ്റ്യൂട്ട് : **ശ്രീ. മൂകാംബിക ഇൻസ്റ്റിറ്റ്യൂട്ട് ഓഫ് ഡെന്റൽ സയൻസ്**
പടനിലം, കുലശേഖരം, കന്യാകുമാരി - 629 161.
തമിഴ്നാട്.

5. **പഠനത്തിന്റെ പേര്:**

ഹെമറ്റോക്സിലിൻ & ഇയോസിൻ സ്റ്റേയിനിംഗ് പ്രക്രിയയിൽ ക്ലിയറിംഗ് ഏജന്റായി വെളിച്ചെണ്ണയുടെയും, പാം ഓയിലിന്റേയും പ്രയോജനക്ഷമതയെ ക്സൈലിനുമായി താരതമ്യം ചെയ്യുന്ന പഠനം

6. **അടിസ്ഥാന വിജ്ഞാന ?**

ഈ വിഷയത്തിലെ ശാസ്ത്ര പ്രസിദ്ധീകരണങ്ങൾ

7. **ഉദ്ദേശവും ലക്ഷ്യവും**

ഹെമറ്റോക്സിലിൻ & ഇയോസിൻ സ്റ്റേയിനിംഗ് പ്രക്രിയയിൽ ക്ലിയറിംഗ് ഏജന്റായി വെളിച്ചെണ്ണയുടെയും പാം ഓയിലിന്റേയും ഉപയോഗത്തെപ്പറ്റി പഠിക്കുകയും, അവയുടെ ഉപയോഗക്ഷമത ക്സൈലിനുമായി താരതമ്യം ചെയ്യുകയും അവയുടെ ഉപയോഗക്ഷമത ക്സൈലിനുമായി താരതമ്യം ചെയ്യുകയും ആണ് പ്രഥമ ഉദ്ദേശം. വെളിച്ചെണ്ണയും പാം ഓയിലും ഉപയോഗിച്ച് ഡിവാക്സിംഗും, ക്ലിയറിംഗും ചെയ്യപ്പെട്ട ടിഷ്യൂവിനാണോ മേന്മ എന്നറിവാനുള്ള പഠനം.

8. **പഠനത്തെക്കുറിച്ചുള്ള ശാസ്ത്രീയ ന്യായീകരണം**

ഓക്കുപ്പേഷണൽ സേഫ്റ്റി & ഹെൽത്ത് അഡ്മിനിസ്ട്രേഷൻ നിയന്ത്രണങ്ങളുടെ പശ്ചാത്തലത്തിൽ ലബോറട്ടറികളിൽ ക്സൈലിൻ ഒഴിവാക്കാനും പകരം വിവിധ പദാർത്ഥങ്ങൾ ഉപയോഗിക്കാനും ശ്രമങ്ങൾ നടത്തിയിട്ടുണ്ട്. എന്നാൽ അവയുടെ ഗുണമേന്മ കുറവാണെന്നും ചിലവ് കൂടുതലാണെന്നും കണ്ടെത്തി. വളരെ വ്യാപകമായി ഉപയോഗിച്ചുവരുന്ന സസ്വഎണ്ണകളാണ് വെളിച്ചെണ്ണയും പാം ഓയിലും. വിഷാംശമില്ലെന്നു മാത്രമല്ല താപത്തിനെ ചെറുക്കാനുള്ള കഴിവ്, കുറഞ്ഞ ഓക്സിഡേഷൻ തോത്, റാൻസിഡിറ്റി പ്രതിരോധിക്കാനുള്ള കഴിവ്, കുറഞ്ഞ ഓക്സിഡേഷൻ തോത്, റാൻസിഡിറ്റി പദാർത്ഥങ്ങളെക്കുറിച്ചുള്ള കഴിവ് എന്നിവയും ഇവയുടെ മേന്മകളാണ്. ഹെമറ്റോക്സിലിൻ ഇയോസിൻ സ്റ്റേയിനിംഗ് പ്രക്രിയയിൽ കിലറിംഗ് ഏജന്റായും, ഡിവാക്സിംഗ് ഏജന്റായും വെളിച്ചെണ്ണയുടെയും പാം ഓയിലിന്റേയും ഉപയോഗം പഠനവിധേയമാക്കുകയും ഇവയുടെ ഉപയോഗക്ഷമത ക്സൈലിനുമായി താരതമ്യം ചെയ്യുകയുമാണ് ഈ പഠനത്തിലൂടെ ഉദ്ദേശിക്കുന്നത്.

9. **പഠനത്തിന്റെ രീതി**

ശ്രീ. മുകാംബികാ ഇൻസ്റ്റിറ്റ്യൂട്ട് ഓഫ് ഡെന്റൽ സയൻസിലെ ഓറൽ & മാക്സിലോ ഫേഷ്യൽ സർജറി വിഭാഗത്തിൽ വരുന്ന നിശ്ചിത മാനദണ്ഡം പാലിക്കുന്ന രോഗികളിൽ നിന്നും സ്പെസിമൻ ശേഖരിക്കും. ഇംപാക്ട്ഡ് തേഡ് മോളാർ ദന്തം എടുക്കപ്പെടുന്നവരോട് പഠനത്തെപ്പറ്റി വിശദീകരിക്കുകയും അവരുടെ അറിവോടുകൂടിയ സമ്മത പത്രം വാങ്ങുകയും ചെയ്യും. 30 സ്പെസിമനുകൾ ഫിക്സ് ചെയ്തശേഷം ഓരോന്നിനേയും മൂന്നായി വിഭജിക്കുന്നു. ഇവയെ എ.ബി.സി എന്നിങ്ങനെ മൂന്നു ഗ്രൂപ്പായി തിരിക്കുന്നു. ഓരോ ഗ്രൂപ്പിലും 30 ടിഷ്യൂസ്പെസിമനുകൾ വീതം ഉണ്ടായിരിക്കും.

ഗ്രൂപ്പ് .എ.

ഫിക്സേഷനും, ഡിഹൈഡ്രേഷനും ശേഷം ആൽക്കഹോൾ മാറ്റുന്ന ക്ലിയറിംഗ് പ്രക്രിയ ക്സൈലിൻ ഉപയോഗിച്ച് രണ്ട് ഘട്ടമായി നടത്തുന്നു. മോൾട്ടൺ പാരഫിൻ വാക്സിൽ എംബഡ് ചെയ്ത ശേഷം റോട്ടറിമൈക്രോട്ടോം ഉപയോഗിച്ച് സെക്ഷനുകൾ എടുത്ത് സ്റ്റെഡുകൾ ഉണ്ടാക്കുന്നു. വാക്സ് മാറ്റാൻ രണ്ട് ഘട്ടങ്ങളിലായ് 5 മിനിറ്റ് വീതം ക്സൈലിൻ ഉപയോഗിക്കുന്നു. ഹെമറ്റോക്സിലിൻ ഇയോസിൻ എന്നിവ ഉപയോഗിച്ച് നിറം കൊടുത്ത ശേഷം ആൽക്കഹോൾ ഉപയോഗിച്ച് ഡിഹൈഡ്രേഷൻ ചെയ്യുന്നു. വീണ്ടും ഇവയുടെ ഉപയോഗക്ഷമത ക്സൈലിനുമായി താരതമ്യം ചെയ്യുകയുമാണ് ഈ പഠനത്തിലൂടെ ഉദ്ദേശിക്കുന്നത്

ഗ്രൂപ്പ്. ബി.

ഈ വിഭാഗത്തിൽ ഫിക്സേഷനും ഡീഹൈഡ്രേഷനും ശേഷം ക്ലിയറിംഗിന് ഒരു മണിക്കൂർവീതം രണ്ട് ഘട്ടങ്ങളായി 60° C ചൂടാക്കിയ പാഠ ഓയിൽ ഉപയോഗിക്കുന്നു. മോൾട്ടൺ വാക്സിൽ എംബഡ് ചെയ്ത് റോട്ടറിമൈക്രോട്ടോം ഉപയോഗിച്ച് സെക്ഷനുകൾ എടുത്ത് സ്ലൈഡ് ഉണ്ടാക്കുന്നു. വാക്സ് മാറ്റാൻ ഇവിടെ 60° C ചൂടാക്കിയ പാഠ ഓയിൽ ആണ് ഉപയോഗിക്കുന്നത്. ഹിമറ്റോക്സിലിൻ, ഇയോസിൻ എന്നിവ ഉപയോഗിച്ച് നിറം നൽകിയശേഷം ആൾക്കഹോൾ ഉപയോഗിച്ച് 60° C ചൂടാക്കിയ പാഠ ഓയിൽ ഉപയോഗിക്കുന്നു. പിന്നെ സ്ലൈഡ് മൗണ്ട് ചെയ്യുന്നു.

ഗ്രൂപ്പ്. സി.

ഈ വിഭാഗം സ്പെസിമെന്റുകളിൽ ഫിക്സേഷനും ഡീഹൈഡ്രേഷനും ശേഷം ക്ലിയറിംഗിനായി ഒരു മണിക്കൂർ വീതം രണ്ടു പ്രാവശ്യം 60° C ചൂടാക്കിയ വെളിച്ചെണ്ണ ഉപയോഗിക്കുന്നു. വാക്സിൻ എംബഡ് ചെയ്ത് സെക്ഷനുകൾ എടുത്തശേഷം വാക്സ് മാറ്റാൻ വീണ്ടും 60° C ചൂടാക്കിയ വെളിച്ചെണ്ണ ഉപയോഗിക്കുന്നു. ഹിമറ്റോക്സിലിൻ, ഇയോസിൻ സ്ലെയിനുകൾ ഉപയോഗിച്ച് നിറം നൽകിയശേഷം ആൾക്കഹോൾ ഉപയോഗിച്ച് ഡീഹൈഡ്രേറ്റ് ചെയ്യുന്നു. സ്ലൈഡ് ക്ലിയർ ചെയ്യാൻ 60° C ചൂടാക്കിയ വെളിച്ചെണ്ണ ഉപയോഗിച്ച ശേഷം സ്ലൈഡ് മൈണ്ട് ചെയ്യുന്നു.

വിദഗ്ദ പതോളജിസ്റ്റുകളുടെ സഹായത്തോടെ എല്ലാവിഭാഗം സ്ലൈഡുകളുടെയും നഗ്നനേത്രവിശകലനവും സൂക്ഷ്മദർശിനിലൂടെയുള്ള വിശകലനവും നടത്തുന്നു. എല്ലാവിഭാഗങ്ങളും നിശ്ചിത ഫോറങ്ങളിൽ രേഖപ്പെടുത്തുകയും കമ്പ്യൂട്ടറിന്റെ സഹായത്തോടെ വിശകലനം ചെയ്യുകയും ചെയ്യുന്നു.

- 10. പഠനത്തിൽ പങ്കെടുക്കുന്നവർക്ക് വരാവുന്ന ദേഷ്യഫലം
യാതൊരു ദോഷഫലങ്ങളും ഇല്ല. വെറും ഒരു പരിശോധന മാത്രം
- 11. പഠനം മൂലം പങ്കെടുക്കുന്ന ആൾക്ക് ഉണ്ടാകുന്ന നേട്ടം ?

ഇതിന് പണമൊന്നും നൽകേണ്ടതില്ല നിങ്ങളുടെ ദന്തനിരകളെക്കുറിച്ച് ചോദിച്ച് മനസ്സിലാക്കാവുന്നതാണ്.

12. പഠനത്തിന്റെ സഹസ്യ സ്വഭാവം ?

നിങ്ങളെക്കുറിച്ചുള്ള വിവരങ്ങളും, വൈദ്യശാസ്ത്രവിവരങ്ങളും രഹസ്യമായി സൂക്ഷിക്കുന്നതാണ്. ഗവേഷണ സംഘത്തിലെ അംഗങ്ങൾ, ഈ സ്ഥാപനത്തിലെ എതിക്സ് കമ്മറ്റി, നിയമം അനുശാസിക്കുന്ന മറ്റ് ഏജൻസികൾ എന്നിവർക്കുമാത്രം. ആവശ്യമെങ്കിൽ ഗവേഷണ വിവരങ്ങൾ പരിശോധിക്കാം. നിങ്ങളുടെ മെഡിക്കൽ രേഖകളിൽ ഗവേഷണ വിവരം രേഖപ്പെടുത്തും. ഗവേഷണഫലങ്ങൾ പ്രസിദ്ധീകരിക്കുകയോ, ശാസ്ത്രവേദികളിൽ അവതരിപ്പിക്കുകയോ ചെയ്യുമ്പോൾ നിങ്ങളുടെ വ്യക്തിഗത വിവരങ്ങൾ വെളിപ്പെടുത്തുന്നതല്ല.

13. എന്നെ എന്തുകൊണ്ട് ഈ പഠനത്തിൽ ഉൾപ്പെടുത്തിയത് ?

പഠനത്തിന് ഉൾപ്പെടുത്താൻ യോഗ്യനായതിനാലും, കൂടുതൽ പങ്കാളികൾ പഠനത്തിന് ആവശ്യമായതിനാലും ആണ് താങ്കളെ ഉൾപ്പെടുത്തിയത്.

14. എത്ര സാംബിളുകളാണ് ഈ പഠനത്തിൽ ഉൾപ്പെടുത്തിയിട്ടുണ്ട്. 30/ഗ്രൂപ്പ്

15. നഷ്ടപരിഹാരത്തെക്കുറിച്ചുള്ള ധാരണ ?

പഠനത്തിൽ പങ്കെടുക്കുന്നവർക്ക് പഠനവുമായി ബന്ധപ്പെട്ട് എന്തെങ്കിലും പ്രശ്നങ്ങളുണ്ടായാൽ ആവശ്യമായിവന്നാൽ ചികിത്സയും മറ്റും ഈ സ്ഥാപനത്തിൽ നിന്ന് നൽകുന്നതാണ്.

16. ധന സഹായം? - ഇല്ല

17. പഠനത്തിനിടയിൽ എനിക്ക് പിന്മാറ്റം കഴിയുമോ ? -
സ്വമേധയാ ആണ് താങ്കൾ ഈ പഠനത്തിൽ പങ്കെടുക്കുന്നത്. താങ്കൾക്കിഷ്ടമുള്ളപ്പോൾ ഇതിൽ നിന്ന് പിന്മാറ്റം അവകാശമുണ്ട്. പിന്മാറ്റന്മേൽ ഗവേഷണസംഘത്തോട് വിവരം പറയുക.
18. പുതിയ എന്തെങ്കിലും വിവരം ഉണ്ടെങ്കിൽ അറിയിക്കുമോ ?
അതെ തീർച്ചയായും
19. പഠനത്തിന്റെ കാലാവധി? ഒരു വർഷം
20. മറ്റെന്തെങ്കിലും വിവരങ്ങൾ ? ഇല്ല
21. കൂടുതൽ വിവരങ്ങൾക്കായി താഴെ പറയുന്നവരെ നിങ്ങൾക്ക് ബന്ധപ്പെടാവുന്നതാണ്.

ഡോ. അഷിത. എ. എസ്.
 ബിരുതാനന്തര ബിരുത വിദ്യാർത്ഥിനി
 ഓറൽ പത്തോളജി & മൈക്രോബയോളജി വിഭാഗം
 ശ്രീ മൂകാംബിക ഇൻസ്റ്റിറ്റ്യൂട്ട് ഓഫ് ഡെന്റൽ സയൻസ്,
 കുലശേഖരം - 629 161.
 മൊബൈൽ നമ്പർ : 8281401187
 ഇ-മെയിൽ ഐഡി: aadil.ashitha@gmail.com

സ്ഥലം:

പ്രഥമ അന്വേഷകന്റെ ഒപ്പ്

തീയതി :

പങ്കെടുക്കുന്ന ആളിന്റെ ഒപ്പ്

സമ്മതപത്രം

ഭാഗം - 2

ഈ പഠനത്തെ പറ്റിയുള്ള എല്ലാ കാര്യങ്ങളും എനിക്ക് പറഞ്ഞ് മനസ്സിലാക്കി തരികയും അതിന്റെ ഒരു പകർപ്പ് എനിക്കു നൽകുകയും ചെയ്തിട്ടുണ്ട്. ഈ പഠനം ഗവേഷണത്തിനായി ഉള്ളതാണെന്നും എനിക്ക് ഇതിൽ നിന്ന് നേരിട്ട് ഒരു ഫലവും ഉണ്ടാകില്ലെന്നും ഞാൻ മനസ്സിലാക്കുന്നു. ഈ പഠനത്തിന്റെ രീതിയും ഉദ്ദേശവും എനിക്ക് മനസ്സിലാക്കി തന്നിട്ടുണ്ട്. അതു പോലെ എനിക്ക് സംശയങ്ങൾ ചോദിക്കാൻ അവസരങ്ങൾ ലഭിച്ചിട്ടുണ്ട്. ഇതിൽ പങ്കെടുക്കാനും പങ്കെടുക്കാതിരിക്കാനും ഉള്ള അവകാശം എനിക്കുണ്ടെന്നും അതുപോലെ പഠനത്തിന്റെ ഏതു ഘട്ടത്തിലും ഇതിൽ നിന്ന് പിൻവങ്ങാനുള്ള സ്വാതന്ത്ര്യവും എനിക്കുണ്ടെന്ന് ഞാൻ മനസ്സിലാക്കുന്നു. ഈ പഠനത്തിൽ പങ്കെടുക്കുന്നതു കൊണ്ടോ, പങ്കെടുക്കാത്തതുകൊണ്ടോ എന്റെ മറ്റു ചികിത്സകളെ ബാധിക്കുന്നതല്ലെന്ന് ഞാൻ അറിയുന്നു.

ഹെമറോക്സിലിൻ & ഇയോസിൻ സ്റ്റെയിനിയം പ്രക്രിയയിൽ ക്ലിയറിംഗ് ഏജന്റായി വെളിച്ചെണ്ണയുടെയും പാം ഓയിലിന്റെയും പ്രയോഗക്ഷമതയെ ക്സൈലിനുമായി താരതമ്യം ചെയ്യുന്ന പഠനം എന്ന ഗവേഷണത്തിൽ പങ്കെടുക്കുന്നതിനും ഇതിന്റെ ഫലങ്ങൾ ശാസ്ത്രലേഖനത്തിൽ പ്രസിദ്ധീകരിക്കുന്നതിനും എനിക്ക് സമ്മതമാണെന്ന് ഞാൻ ഇതിനാൽ അറിയിച്ചുകൊള്ളുന്നു.

സീരിയൽ നമ്പർ / റഫറൻസ് നമ്പർ :

പങ്കെടുക്കുന്ന ആളിന്റെ പേര് :

മേൽവിലാസം :

ഫോൺ നമ്പർ :

ഒപ്പ് / വിരലടയാളം

സാക്ഷി :

സ്ഥലം :

തീയതി