

بررسی روشهای جدید برای

تهیه مقطع‌های بافت شناسی و آسیب شناسی

و تعویض پارافین بـمـا هـ پـلاستیکـی . بنام کلیکول متاکریلات

دکتر بامشاد* دکتر رجحان**

گرچه در اکثر موارد قالب‌گیری بافتها برای مقاطع میکروسکپی توسط پارافین جامد انجام میشود ولی برای استفاده از مزایای بیشترگاهی ناگزیرند از مواد دیگری استفاده نمایند چنانچه برای مطالعه استخوان دکلسیفیه یا بافتهای شکننده دیگر مانند چشم ماده سلودین Cellodin را بکار میبرند . همچنین در مواردیکه بررسیهای دقیق بافت شناسی و آسیب شناسی مورد نظر باشد از پلاستیک استفاده میکنند .

پلاستیک مخصوصی که برای این منظور بکار میبرند بنام کلیکول متاکریلات Metacrylate Glycol بوده و با آب قابل امتزاج است این ماده در نتیجه پلی‌مریزاسیون Polymerization مخلوطی از متیل و بوتیل متاکریلات بدست میاید و مزیت آن نسبت به پارافین اینست که اولاً مقاطع معمولی که توسط پارافین بضمخامت ۵-۸ میکرون تهیه میشود ممکن است به ۱-۲ میکرون تقلیل داده و در نتیجه ساختمانهای ظریف بافتها را مطالعه نمود ثانیاً با بکار بردن این پلاستیک مقدار زیادی از عوامل مصنوعی بافتها Artifact کاسته شده و برشها روشتر تهیه میشوند .

البته باید اقرار کرد که هر یک از این روشها و استعمال مواد مختلف دارای عیوبی میباشد که در این مختصر از بحث درباره آنها صرف نظر میکنیم .

بطور کلی عدم بضاعت کافی برای مطالعات الکترون میکروسکپی سبب شده است

* استاد دانشکده پزشکی

** استادیار دانشکده پزشکی

که روش‌های جدیدی برای ثابت کردن و قالب‌گیری بافتها بکار رود بشرح زیر:
اول از نظر مایعات ثابت‌کننده: اخیراً برای ثابت کردن بافتها موادی مانند گلو تارالدئید glutaraldehyde و آکروئین Acrolein و محلول اسمیوم تتروکسید Osmium tetroxide پیشنهاد شده است و بنابر عقیده عده‌ای محلول اخیر مزایای بیشتری داشته و اکثراً از این ماده استفاده میکنند.

دوم از نظر قالب‌گیری: برای قالب‌گیری مقاطع بافتی از رزینهای مخصوصی مانند Epen استفاده میکنند. زیرا این قبیل مواد اولاً باسانی بریده میشوند ثانیاً در مقابل اشعه الکترونی Electron پایدار میمانند ثالثاً با روشهای ساده‌ای برای مطالعه بامیکروسکپهای معمولی بهتر رنگ آمیزی میشوند.

اما عیب رزینها اینست که در مقابل حلالها بخوبی بر طرف نمیشوند و عیب محلول اثباتی اسمیوم تتروکسید اینست که عمیقاً خواص رنگ‌پذیری بافتها را دگرگون میکند. معهداً در بعضی موارد بکار بردن این مواد برای مطالعه مقاطع بافتی بامیکروسکپ معمولی بسیار با ارزش است.

امروزه بکار بردن گلیکول متاکریلات برای قالب‌گیری بافتی بمنظور مطالعه با میکروسکپ معمولی و مطالعات هیستوشیمی بسیار مورد توجه است چه این پلاستیک نسبت به پلاستیکهای دیگر صرفه و مزایای مسلمی در بردارد:

اول اینکه چون این منومر (monomer) خود قابل امتزاج با آب است لزومی ندارد که برای آنگیری بافتها مدت‌ها معطل شوند تا آب برشها بکلی گرفته شود (چنانچه برای پلاستیکهای دیگر این عمل ضروریست)

دوم اینکه عمل پلی‌مریزاسیون معمولاً بطور یکنواخت و سریع انجام میگردد.

سوم اینکه پلی‌مر مزبور رنگهای محلول در آب را براحتی بخود جذب می‌کند و لذا مقاطع بافتی به روش‌های رنگ‌آمیزی معمولی بدون نیاز برداشتن و زایل کردن ماده پلاستیک بخوبی رنگ می‌شود.

اینک مورد استعمال گلیکول متاکریلات را برای قالب‌گیری بافتهای انسانی که از اتوپسی بدست آمده است بیان میکنیم:

نخست تکه‌های بافت را که بطور معمولی در محلول فرمالین ثابت شده است مورد استفاده قرار میدهیم.

روش کار همانست که در آزمایشگاه‌های هیستولوژی معمول و متداول است فقط باید بلوکهای بافتی کوچکتر و باندازه $2 \times 2 \times 2$ میلیمتر باشد.

در این روش علاوه بر اینکه تمام تشکیلات بافت محفوظ میماند بسیاری از عوامل مصنوعی (Artefact) که از قالب‌گیری با پارافین ایجاد میگشت دیده نخواهد شد و چون رنگ آمیزی نیز بروش معمولی صورت میگیرد ساختمانهای سلولی و بافتی با خواص رنگ پذیری طبیعی و معمولی خود بخوبی مشخص میشوند.

در این بحث نتایج قالب‌گیری بافتها که بوسیله ماده پارافین، اپون (Epon) و گلیکول متاکریلات انجام شده است باهم مقایسه می‌شوند و بدین وسیله مسائل هیستوپاتولوژی بافت کبد انسانی که از اتوپسی بدست آمده و دچار پرخونی مرکز لبولی و آتروفی و نکروز بوده‌اند مورد تفسیر و شرح قرار میگیرد.

وسایل و روش کار

۹۰ برش کبدي که از اتوپسی‌های متوالی بدست آمده بود بطور معمول با پارافین قالب‌گیری کرده و مورد بررسی قرار گرفت.

۸ مورد آن درجات مختلف پرخونی مرکز لبولی و آتروفی و نکروز نشان میدادند (فاصله بین مرگ و اتوپسی از ۳۰ دقیقه تا ده ساعت متغیر بود) نمونه‌های دیگری از همین مقاطع برای مطالعه بیشتر در محلول فرمالین نگهداری شده بود. برشهایی از کبدهای فوق تهیه کرده با سه ماده یکی پارافین و دیگری اپون و سومی گلیکول متاکریلات قالب‌گیری بعمل آمد سپس بلوکها را بریده- رنگ کرده و نتایج سه مورد با هم مقایسه گردید.

بعلاوه بافتهای ریه- قلب- طحال- عقده لنفاوی- معده- روده بزرگ- پانکراس- کلیه- مثانه- پروستات- آندومتر- تیروئید- آدرنال- مغز و بالاخره کبدهای طبیعی را که از اتوپسی یا بیوپسی بدست آمده و در فرمالین فیکسه شده بود با گلیکول متاکریلات قالب‌گیری کرده و پس از رنگ آمیزی نتایج آن با مقاطع همان بافتها که بوسیله پارافین قالب شده بود مقایسه گردید.

الف- قالب‌گیری با پارافین: اندازه مقاطع بافتی را بقطعات تقریبی $15 \times 15 \times 2$ میلیمتر تهیه و توسط اتو تکنیکون عمل کرده برای آب‌گیری (dehydration) بافتی دیوکسان (dioxan) بکار می‌برند سپس مقاطع را بضمخامت ۶ میکرون بریده با هماتو کسلین اتوزین رنگ میکنند

ب- قالب‌گیری با Epon - اندازه مقاطع بافتی رادر حدود $2 \times 2 \times 2$ میلیمتر تهیه و بوسیله الکل اتیلیک آب آنرا میگیرند. سپس با مخلوط Porter-Blum ۲۵ تا یک میکرون با تیغه دیاموند و میکروتوم Porter-Blum میبرند و سپس با Azure II و متیلین بلورنگ میکنند

ج- قالب‌گیری با گلیکول متاکریلات. قطعات بافتی را با اندازه $2 \times 2 \times 2$ میلیمتر تهیه و معمولاً بطریق زیر عمل آبگیری را انجام میدهند: مقطع را از چهار شیشه متوالی الکل متیلیک (Methylalcohol) عبور میدهند و در هر یک بمدت ۳۰ دقیقه نگاه میدارند و سپس آنرا دو مرتبه هر یک بمدت یکساعت از مخلوط منومر پلاستیک با درجه حرارت معمولی اطاق عبور میدهند. (در بعضی موارد الکل متیلیک را حذف کرده و بجای آن برای آبگیری بافتی چهار مرتبه مقطع را از مخلوط منومر پلاستیک عبور میدهند).

در هر حال قطعات بافتی را که بیکی از طرق فوق آب‌گیری کردند بوسیله دستمال کاغذی (Paper tissue) مقدار اضافی منومر شانرا گرفته سپس آنرا در کپسول‌های ژلاتینی No. 00 قرار داده کپسول را از مخلوط منومر لبریز میکنند و بطوریکه تا حد امکان از هوا خالی باشد کلاهک کپسول را بدقت میپوشانند.

(گاهی برای اینکه پلی‌مریزاسیون متحدالشکل گردد حبه کوچکی از پارافین را بر روی سطح فوقانی مخلوط منومر داخلی کپسول قرار میدهند تا در حرارت اتو ذوب شده لایه‌ای از پارافین بضخامت چند میلیمتر پوششی برای منومر ایجاد نماید که مانع نفوذ هوا باشد) بالاخره کپسول‌ها را در یک اتو با 60°C درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهند و پلی‌مریزاسیون در فاصله ۶ ساعت صورت میگیرد.

سپس کپسول ژلاتینی را بوسیله یک تیغ تیز بریده بر می‌دارند و رویه بلوک را سوهان می‌زنند تا ابعاد بلوک با اندازه 2×2 میلیمتر برسد. باید توجه داشت وقتیکه بلوک را تازه از اتو برمی‌دارند پلاستیک سخت و شکننده است لکن پس از سی دقیقه در حرارت و آتمسفر معمولی اطاق بلوکها با آسانی بریده می‌شوند (در مواردیکه هوا خشک باشد بلوکهای پلاستیک را ابتدا در یک ظرف شیشه‌ای دهان‌گشاد و در باز می‌گذارند سپس این ظرف را بداخل یک ظرف فلزی دردار محتوی 50°C سانتیمتر مکعب آب بمدت ۳۰ دقیقه قرار داده و محکم در ظرف فلزی را می‌بندند تا بلوک و پلاستیک آن نرم و قابل برش گردد).

رسوب فیبرین در فضا های دیس دیده نمیشود . بطور کلی در زیر میکروسکپ سلولهاییکه در قسمت مرکز لبول قرار گرفته اند کوچکتر از سلولهای محیطی هستند و همچنین در عین حالیکه سیتوپلاسمشان - اسیدوفیل است حاوی ارگاستوپلاسم با دانه های بازوفیل زیادتری هستند . در بعضی از سلولها یک ناحیه اسیدوفیل جلب توجه میکند که حاوی گرانولهایبسیار و بنظر میرسد میتو کندری باشد .

در دومورد سلولهای پارانشیمال در اطراف وریدمرکزی لبولی حاوی تعدادی واکوال چربی بود و فضای دیس مانند کبدهایی که فاقد متامورفوز چربی هستند گشاد و پراز اریتروسیت بودند. ضمناً مقاطعی که بوسیله گلیکول متاکریلات و پارافین قالب گیری شده بود باهم مقایسه شدند. اهم اختلاف عبارت بود از :

۱ - مقاطع پارافین بالطبع ضخیمتر بود .

۲ درمقاطع تهیه شده بامتد پارافین رویت فضاهای دیس و آندوتلیوم سینوزوئیدها بوضوح مقدور نبود و فقط در بعضی جاها هسته آندوتلیوم دیده میشد .

۳ - در مقاطع پارافین در ناحیه سانترال لبولهای کبدی یک هیپرامی و ازدیاد گلوبولهای قرمز وجود داشت ولی مقدور نبود تشخیص داده شود که این گلوبولهای قرمز در داخل سینوزوئیدها هستند یا در فضای دیس، همچنین مجاری ریز صفراوی قابل تشخیص نبود .

در ضمن مقاطعی که بااپون قالبگیری شده و باالترامیکروتوم بریده و رنگ شده بودند با مقاطع گلیکول متاکریلات چندان تفاوتی نداشت و حتی میتوان گفت دربرش اخیر از عوامل مصنوعی (Artefact) بمراتب کاسته شده بود .

تفسیر

در این مقاله روش بکاربردن پلاستیک جدیدی بنام گلیکول متاکریلات برای قالبگیری بافتها شرح داده شده است این متد در ضمن اینکه برای کارکنان آزمایشگاه سهل است از نظر سرعت عمل نیز قابل ملاحظه میباشد . زیرا پلی مریزاسیون پلاستیک کاملاً در فاصله ۶ ساعت در ۶درجه سانتی گراد صورت میگيرد و سپس میتوان بوسیله میکروتومهای معمولی باتیغه فولادی خیلی تیزمقاطع را بضخامت ۱-۲ میکرون برید . ضمناً اشخاصی که با تکنیک پارافین مقاطع را تهیه میکردند بزودی با این روش نیز عادت کرده مهارت پیدا میکنند. همچنین در این روش نیازی به برداشتن ماده پلاستیک

نبوده و بدون اتلاف وقت رنگ می‌شود و بطور خلاصه در این روش مزایای بشرح زیر وجود دارد:

- ۱- جزئیات ساختمانی بافتها با وضوحی بیش از حد معمول دیده می‌شود.
- ۲- چون برشها خیلی نازکند با درشت‌نمایی بزرگ میتوان از ساختمانهای بافتی، فتومیکروگرافیهی واضحی تهیه کرد.
- ۳- چون وضع سلولها بسیار خوب حفظ می‌شود با انواع رنگهای اختصاصی میتوان آنها را رنگ کرد.
- ۴- این تکنیک مخصوصاً برای مقاطعی که از بیوپسی کلیه و کبد بدست می‌آید بسیار مفید و با ارزش است.

اما باید اذعان کرد که این روش برای کارهای عادی هیستوپاتولوژی همیشه عملی نیست زیرا مقاطعی که بزرگتر از 2×2 میلیمتر باشند براحتی بریده نخواهند شد و حال آنکه در بررسی متاستاز عقده‌های لنفاوی یا بررسی کانونهای کوچک کارسینومای پروستات که لازمست مقاطع بیش از 2×2 میلیمتر باشد بکاربردن این روش ابدأ مناسب نیست.

اما مطلبی که احتیاج بتفسیر دارد اینست که چرا در سینوزوئیدهای نواحی مرکز لوبولی مقداری بیشتر از سینوزوئیدهای محیطی گلبول قرمز دیده می‌شود در صورتیکه میدانیم پس از مرگ خون در داخل سیستم عروقی باقی میماند و لذا انتظار میرود که این خون در همه قسمت سینوزوئیدهای یک لوبول کبدی بیک نسبت مستقر شود.

تفسیر ما در این باره باین طریق است که در کبدهای مبتلا ببنکروز و پرخونی بسیاری از گلبولهای قرمز خارج از سینوزوئیدها و داخل در فضای دیس گشادشده میباشند و این امر در نتیجه ضایعات سلولهای آندوتلیال سینوزوئیدها پیش می‌آید. زیرا این سلولها در حال طبیعی در مقابل گلبولهای قرمز سدی هستند که اجازه ورود آنها را بفضای دیس نمیدهند و لسی چون سلولهای مرکز لوبولی همیشه مقدار کمی اکسیژن نصیبشان می‌شود در بیماریهای قلبی و آنوکسی حد اقل اکسیژن لازم هم بسلولهای مرکز لوبولی نمیرسد و لذا اولین دسته سلولی که در اثر کمبود اکسیژن آزرده می‌شوند ناحیه مرکز لوبولی و بالاخص سلولهای آندوتلیال سینوزوئیدها هستند که متأثر شده

سدشانرا شکسته و اجازه میدهند گلبول قرمز وحتىى مقدارى مایع اضافى وارد فضاى دیس شود .

خلاصه

بافتهائیکه از اتوپسى بدست آمده و در فرمالین بطریقه معمولی فیکسه شده بوسیله گلیکول متاکریلات قالبگیری شدند. انجام عمل از قالبگیری با پارافین چندان مشکل تر نیست .

اندازه مقاطع را $2 \times 2 \times 2$ میلیمتر تهیه و بضخامت ۱-۲ میکرون با تیغه های فولادی میکروتوم دوار میبرند .

در مقاطع رنگ شده حفاظت وضع سلول و بافت با این روش بهتر از پارافین است .

مواردی از نکروز سانترال لبول کبدی مورد مطالعه قرار گرفت. ضایعه اساسی در نتیجه آنوکسی، در آندوتلیوم سینوزوئیدهای منطقه مرکزی لبول کبدی پیدامیشود و در نتیجه گلبولهای قرمز و سفید همراه با مقدارى مایع وارد فضاى دیس می شوند ضمناً اتروفى سلولهای پارانشیمال موجب اتساع فضاى دیس میگردد .

مأخذ

- 1- Archives of Pathology vol 81, No. 5, 391 - 397, 1966
- 2- A G. Everson Pearse Histochemistry Second Edition 1960