بررسی روشهای جدید برای
تهیه مقطع‌های بافت شناسی و آسیب شناسی
و تعویض پارافین بماده پلاستیکی بنام گلیکول متاکریلات

دکتر بامشاد* دکتر رجحان **

گرچه در اکثر موارد قالب‌گیری بافتها برای مقاطع میکرسکپی توسط پارافین جامد انجام میشود ولی برای استفاده از مزایای بیشترگاهی ناگزیرند ازمواد 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 پلاستیك استفاده میکنند .

پلاستیك مخصوصی که برای این منظور بکار میبرند بنام گلیکول متاکریلات Metacrylate Giycol بوده وبا آب قابل امتزاج است این ماده درنتیجه پلی‌مریزاسیون Polymerization مخلوطی از متیل وبوتیل متاکریلات بدست میاید ومزیت آن نسبت بپارافین اینست که اولا مقاطع معمولی که توسط پارافین بضخامت۵-۸ میکرن تهیه میشود ممکن است به ۱-۲ میکرن تقلیل داده و در نتیجه ساختمانهای ظریف بافتها را مطالعه نمود ثانیاً با بکار بردن این پلاستیك مقدارزیادی ازعوامل مصنوعی بافتها Artefact کاسته شده وبرشها روشنتر تهیه میشوند.

البته باید اقرار کرد که هریك از این روشها و استعمال مواد مختلف دارای عیوبی میباشد که در این مختصر از بحث درباره آنها صرفنظر میکنیم .

بطور کلی عدم بضاعت کافی برای مطالعات الکترن میکرسکپی سبب شده است

---

* استاد دانشکده پزشکی

** استادیار دانشکده پزشکی

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

که روش‌های جدیدی برای ثابت کردن وقالب‌گیری بافتها بکار رود بشرح زیر:

اول از نظر مایعات ثابت کننده : اخیراً برای ثابت کردن بافتها موادی مانند گلوتارالدئید glutaraldehyde و آکرولئین Acrolein و محلول اسمیوم تتروکسید Osmium tetroxide پیشنهادشده است و بنابرعقیده عده‌ای محلول اخیرمزایای بیشتری داشته واکثراً از این ماده استفاده میکنند .

دوم از نظر قالب‌گیری: برای قالب‌گیری مقاطع بافتی‌اززرینهای مخصوصی مانند Epon استفاده میکنند . زیرا این قبیل مواد اولا بآسانی بریده میشوند ثانیاً در مقابل اشعه الکترونی Electron پایدار میمانند ثالثاً با روشهای ساده‌ای برای مطالعه بامیکرسکپهای‌معمولی بهتر رنگ‌آمیزی میشوند .

اما عیب رزینها اینست که در مقابل حلالها بخوبی بر طرف نمیشوند و عیب محلول‌اثباتی اسمیوم‌تتروکسیداینست که عمیقا خواص‌رنگ‌پذیری‌بافتهارا دگرگون میکند .معهذا دربعضی‌موارد بکاربردن‌این‌مواد برای‌مطالعه مقاطع بافتی‌بامیکرسکپ معمولی بسیار با ارزش است .

امروزه بکار بردن‌گلیکول متاکریلات برای قالب‌گیری بافتی بمنظور مطالعه با میکرسکپ معمولی ومطالعات هیستوشیمی بسیار مورد توجه است‌چه‌این‌پلاستیك نسبت به پلاستیکهای دیگر صرفه ومزایای مسلمی در بردارد:

اول اینکه چون این منومر (monomer) خود قابل امتزاج‌باآب‌است لـزومی نداردکه برای‌آبگیری بافتها مدتها معطل‌شوند تاآب برشهابکلی‌گرفته شود(چنانچه برای پلاستیکهای دیگر این عمل ضروریست)

دوم اینکه عمل پلی مریزاسیون معمولا بطور یکنواخت و سریع انجام میگیرد .

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

اینك مورد استعمال‌گلیکول متاکریلات را برای قالب‌گیری بافتهای انسانی که از اتوپسی بدست‌آمده است بیان میکنیم :

نخست تکه‌های بافت راکه بطور معمولی در محلول فرمالین ثابت‌شده‌است مورد استفاده قرار میدهیم.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

روش کار همانست که در آزمایشگاه‌های هیستولوژی معمول ومتداول است فقط باید بلوکهای بافتی کوچکتر وباندازه۲×۲×۲ میلیمتر باشد.

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

در این بحث نتایج قالب‌گیری بافتها که بوسیله‌سه ماده‌پارافین، اپون (Epon) وگلیکول متاکریلات انجام شده است باهم مقایسه می‌شوند و بدین وسیله مسائل هیستوپاتولوژی بافت کبد انسانی که از اتوپسی بدست‌آمده و دچار پر خونی مرکز لبولی وآتروفی ونکروز بوده‌اند مورد تفسیر وشرح قرار میگیرد.

وسایل و روش کار

۹۰ برش کبدی که از اتوپسی‌های متوالی بدست آمده بود بطورمعمول باپارافین قالب‌گیری کرده ومورد بررسی قرارگرفت.

۸ مورد آن درجات مختلف پرخونی مرکز لبولی وآتروفی 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 ونتایج‌سه مورد با هم مقایسه گردید.

بعلاوه بافتهای‌ریه- قلب- طحال- عقده لنفاوی- معده- روده بزرگ- پانکراس- کلیه- مثانه-پروستات-آندومتر-تیروئید -آدرنال- مغز وبالاخره کبدهای طبیعی‌را که‌از اتوپسی یا بیوپسی بدست‌آمده ودر فرمالین فیکسه شده بود با گلیکول متاکریلات قالب‌گیری کرده و پس از رنگ‌آمیزی نتایج‌آن با مقاطع همان بافتها که بوسیله پارافین قالب شده بود مقایسه‌گردید.

الف- قالب‌گیری با پارافین: اندازه مقاطع بافتی را بقطعات تقریبی ۱۵×۱۵×۲میلیمتر تهیه وتوسط‌اتوتکنیکون‌عمل کرده‌برای آب‌گیری(dehydration) بافتی دیوکسان (dioxan) بکار می‌برند سپس مقاطع رابضخامت ۶ میکرن بریده با هماتوکسیلین ائوزین رنگ میکنند

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

ب- قالب‌گیری با Epon - اندازه مقاطع بافتی رادرحدود۲×۲×۲ میلیمتر تهیه و بوسیله الکل اتیلیك‌آب‌آنرا میگیرند . سپس با مخلوط $\frac{50}{50}$ اپون قالب‌گیری نموده مقاطع‌رابضخامت ۲۵ر۰ تا یك میکرن باتیغه دیاموند ومیکرتوم Porter_Blum میبرند وسپس با Azure II ومتیلین بلورنگ میکنند

ج- قالب‌گیری باگلیکول‌متاکریلات. قطعات بافتی را باندازه ۲×۲×۲ میلیمتر تهیه ومعمولا بطریق زیرعمل‌آبگیریرا انجام میدهند: مقطع را از چهار شیشه متوالی‌الکل‌متیلیك(Methylalcohol) عبورمیدهندودرهریك‌بمدت۳۰دقیقه‌نگهمیدارند و سپس‌آنرا دو مرتبه هریك بمدت یکساعت از مخلوط منومرپلاستیك با درجه حرارت معمولی اطاق عبور میدهند . (در بعضی موارد الکل متیلیك را حذف کرده وبجای‌آن برای‌آبگیری بافتی چهار مرتبه مقطع را از مخلوط منومر پلاستیك‌عبور میدهند) .

در هرحال قطعات بافتی را که بیکی از طرق فوق‌آب‌گیری کردند بوسیله دستمال‌کاغذی (Paper tissue) مقدار اضافی‌منومرشانراگرفته‌سپس‌آنرادرکپسول‌های ژلاتینی No. 00 قرار داده‌کپسول را از مخلوط منومر لبریز میکنند وبطوریکه تاحد امکان از هوا خالی باشدکلاهك‌کپسول را بدقت میپوشانند.

(گاهی برای اینکه پلی‌مریزاسیون متحدالشکل‌گردد حبه‌کوچکی از پارافین را برروی سطح فوقانی مخلوط منومر داخلی‌کپسول قرار میدهند تا در حرارت اتو ذوب شده لایه‌ای از پارافین بضخامت چند میلیمتر پوششی برای منومر ایجاد نماید که مانع‌نفوذهوا‌باشد) بالاخره‌کپسول‌ها را در یك اتو با۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهند وپلیمریزاسیون در فاصله ۶ساعت صورت میگیرد .

سپس‌کپسول ژلاتینی را بوسیله یك تیغ تیز بریده بر می‌دارند و رویهٔ بلوك را سوهان می‌زنند تا ابعاد بلوك باندازه۲×۲ میلیمتر برسد. باید توجه داشت‌وقتیکه بلوك را تازه از اتو برمی‌دارند پلاستیك سخت وشکننده است لکن پس ازسی‌دقیقه در حرارت وآتمسفر معمولی اطاق بلوکها بآسانی بریده می‌شوند (در مواردیکه هوا خشك باشد بلوکهای پلاستیك را ابتدا دریك ظرف شیشه‌ای دهان‌گشاد ودرباز می‌گذارند سپس این ظرف را بداخل یك ظرف فلزی دردار محتوی ۵۰ سانتیمتر مکعب آب بمدت ۳۰ دقیقه قرار داده ومحکم در ظرف فلزی را می بندند تابلوك وپلاستیك‌آن نرم وقابل برش‌گردد) .

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

رسوب فیبرین در فضا های دیس دیده نمیشود . بطورکلی در زیر میکرسکپ سلولهائیکه در قسمت مرکزلبول قرارگرفته‌اندکوچکتر از سلولهای محیطی‌هستندو همچنین در عین حالیکه سیتوپلاسمشان ـ اسیدوفیل است حاوی ارگاستوپلاسم با دانه های بازوفیل زیادتری هستند . در بعضی از سلولها یك ناحیه اسیدوفیل‌جلب توجه میکندکه حاوی‌گرانولهائیست و بنظر میرسد میتوکندری باشد .

در دومورد سلولهای پارانشیمال دراطراف وریدمرکزی لبولی حاوی‌تعدادی واکوال چربی بود و فضای دیس‌مانندکبدهائی که‌فاقد متامورفوز چربی هستندگشاد وپراز اریتروسیت بودند. ضمنا مقاطعی که بوسیله‌گلیکول متاکریلات وپارافین‌قالب‌گیری شده بود باهم مقایسه شدند. اهم اختلاف عبارت بوداز :

۱ ـ مقاطع پارافین بالطبع ضخیمتر بود .

۲ درمقاطع تهیه‌شده‌بامتد پارافین‌رویت فضاهای دیس و آندوتلیوم‌سینوزوئید ها بوضوح مقدور نبود و فقط در بعضی جاها هسته‌آندوتلیوم دیده میشد .

۳ ـ در مقاطع پارافین در ناحیه سانترال لبولهای کبدی یك هیپرامی وازدیاد گلوبولهای قرمز وجود داشت ولی مقدور نبود تشخیص داده شود که این‌گلوبولهای 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 مقاطع‌گلیکول متاکریلات چندان تفاوتی نداشت و حتی میتوان گفت دربرش اخیر ازعوامل مصنوعی (Artefact) بمراتب‌کاسته شده بود .

تفسیر

در این مقاله روش بکاربردن پلاستیك جدیدی بنام‌گلیکول متاکریلات برای قالبگیری بافتها شرح داده‌شده است این‌متد درضمن اینکه برای‌کارکنان‌آزمایشگاه سهل‌است ازنظرسرعت عمل‌نیزقابل‌ملاحظه میباشد . زیرا پلی مریزاسیون پلاستیك کاملا در فاصله ۶ ساعت‌در ۶۰درجه سانتی‌گرادصورت‌میگیرد وسپس میتوان‌بوسیله میکروتومهای معمولی باتیغه فولادی خیلی‌تیزمقاطع‌را بضخامت ۱ـ۲ میکرن برید . ضمناً اشخاصی که با تکنیك پارافین مقاطع را تهیه میکردند بزودی با این روش نیز عادت‌کرده مهارت پیدا میکنند. همچنین دراین‌روش نیازی به‌برداشتن مادهٔ پلاستیك

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

نبوده وبدون اتلاف وقت رنگ می‌شود وبطورخلاصه دراین‌روش مزایائی بشرح زیر وجود دارد :

۱ ـ جزئیات ساختمانی بافتها با وضوحی بیش ازحد معمول دیده می‌شود .

۲ ـ چون برشها خیلی نازکند با درشت‌نمائی بزرگ میتوان از ساختمانهای بافتی، فتومیکروگرافیهای واضحی تهیه کرد.

۳ ـ چون وضع سلولها بسیارخوب حفظ می‌شود باانواع رنگهای اختصاصی میتوان آنهارا رنگ کرد .

۴ ـ این تکنیك 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 ۲ × ۲ میلیمتر باشند براحتی بریده نخواهند شد و حال آنکه در بررسی متاستاز عقده‌های لنفاوی یا بررسی کانونهای کوچك کارسینومای پروستات که لازمست مقاطع بیش از ۲ × ۲ میلیمتر باشد بکاربردن این روش ابداً 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 یك لبول کبدی بیك نسبت مستقر شود .

تفسیر ما در این باره باین طریق است که درکبدهای مبتلا بنکروز و پرخونی بسیاری از گلبولهای قرمز خارج ازسینوزوئیدها وداخل درفضای دیس گشادشده میباشند و این امر درنتیجهٔ ضایعات سلولهای آندوتلیال سینوزوئیدها پیش می‌آید . زیرا این سلولها در حال طبیعی در مقابل گلوبولهای قرمز سدی هستند که اجازهٔ ورود آنها را بفضای دیس نمیدهند ولـی چون سلولهای مرکز لبولی همیشه مقدار کمی اکسیژن نصیبشان می‌شود در بیماریهای قلبی و آنوکسی حد اقل اکسیژن لازم‌هم بسلولهای مرکزلبولی نمیرسد ولذا اولین دسته سلولی که دراثر کمبوداکسیژن آزرده می‌شوند ناحیه مرکز لبولی و بالاخص سلولهای آندوتلیال سینوزوئیدها هستند که متأثر شده

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]

سدشانرا شکسته و اجازه میدهندگلبول قرمز وحتی مقداری مایع اضافی وارد فضای دیس شود .

خلاصه

بافتهائیکه از اتوپسی بدست آمده و در فرمالین بطریقه معمولی فیکسه شده بوسیلهٔگلیکول متاکریلات قالبگیری شدند. انجام عمل ازقالبگیری با پارافین چندان مشکل‌تر نیست .

اندازهٔ مقاطع را ۲×۲×۲ میلیمتر تهیه و بضخامت ۱ـ۲ میکرن با تیغه‌های فولادی میکروتوم دوار میبرند .

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

مواردی ازنکروزسانترال لبول‌کبدی مورد مطالعه قرارگرفت. ضایعه اساسی درنتیجه‌آنوکسی، در آندوتلیوم سینوزوئیدهای منطقه مرکزی لبول‌کبدی پیدامیشود و در نتیجه‌گلبولهای قرمز و سفید همراه با مقداری مایع واردفضای دیس می‌شوند ضمناً اتروفی سلولهای پارانشیمال موجب اتساع فضای دیس میگردد .

مأخذ

1- Archives of Pathology vol 81, No. 5, 391 - 397, 1966

2- A G. Everson Pearse Histochemistry Second Edition 1960

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-28]