بررسی اثر روشهای مختلف فیکساسیون بر مقاطع بافتی کبد خرگوش نژاد داچ (*Oryctolagus cuniculus*)

- **علی انیسیان***: گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر
- **سعیده ولی الهی:** دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی، تهران
- **محمدرضا تقدیری:** دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۹

چکیده

انسجام ساختار یک بافت جانوری بستگی زیادی به نظم و ترتیب و آرایش مولکولهای پروتئینی آن دارد. اجزای اصلی که در ساختمان بافت شرکت دارند شامل: لیپوپروتئین‌ها، گلیکوپروتئین‌ها و پروتئینهای گلبولی می‌باشند که در مطالعات بافت‌شناسی باید توسط مواد پایدارکننده فیکس شوند. خوشبختانه اکثر فیکساتیوها شکل و مکان قرارگیری پروتئینهای پلی نوکلئوتیدی و مواد موکوسی را حفظ می‌کنند. بسیاری از روشهای ایمونولیبلینگ بعلاوه رنگ آمیزی‌های رایج به راحتی در برشهای انجمادی با سرعت بسیار بیشتری قابل اجرا می‌باشند. ضمن اینکه این روش باعث وارد آمدن کمترین آسیب به مناطق آنتی زنیک می‌گردند. بنابراین واکنش آنتی ژن–آنتی بادی هنگام ایمونو لیبل کردن پروتئینها در حداکثر میزان خود انجام می‌شود. با این وجود برش‌های انجمادی معمولاً به تنهایی نمی‌توانند ساختمان بافت را به حدی حفظ کنند که برای استفاده در تشخیص یا فعالیت‌های تحقیقاتی مناسب باشد. بنابراین باید به روشی دست یافت که علاوه بر حفظ کیفیت بافت از کیفیت لیبلینگ خوبی نیز برخوردار باشد. استفاده از یک فیکساتیو شیمیایی قبل یا بعد از انجام برش انجمادی اولین انتخاب برای افزایش کیفیت بافت به منظور ایمونولیبلینگ می‌باشد. با این حال گزارشات کمی در خصوص تجزیه و تحلیل طبقه‌بندی شده مزایا و معایب مواد شیمیایی مختلف در نگهداری و حفظ برشهای انجمادی وجود دارد. هدف این مطالعه تعیین اثر پایدار کننده‌های رایج، بر برش‌های انجمادی است. سه نوع ماده پایدار کننده شیمیایی یعنی استون، فرمالین و پارا فرمالدئید برای تاثیرشان بر برش‌های انجمادی کبد مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های مورد استفاده برای ارزیابی استون، بدون پایدارسازی برش‌گیری شدند. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با استون پایدار شدند. بافت‌های پایدار شده با فرمالین و پارافرمالدئید پس از ۴۸ ساعت، مورد برش‌گیری انجمادی قرار گرفته، با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده و با میکروسکپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج بافت‌های پایدار شده در پارافرمالدئید از نظر حفظ کیفیت ساختاری بافت و کیفیت رنگ آمیزی، در مجموع اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P\leq 005$) بهتر از فرمالین و استون بود. برای پایدارسازی برش‌های انجمادی در میان انواع پایدارکننده‌های، پارافرمالدئید انتخابی بهتر از فرمالین یا استون، در رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائورین و در سطح میکروسکوپ نوری می‌باشد.

کلمات کلیدی: فرمالین، رنگ‌آمیزی، پارافرمالدئید، استون، برش‌های انجمادی

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: anissian@abhariau.ac.ir

مقدمه

ساختمان بافت‌های جانوری بیشتر تحت تاثیر ساختارهای پروتئینی موجود در آن شکل می‌گیرند (۷). عوامل اصلی شرکت کننده در ساختمان سلولی مانند لیپوپروتئین‌ها که از ترکیبات اصلی غشای پلاسمایی و ارگانل‌های غشادار می‌باشد (۴). برای مطالعات بافت‌شناسی و پاتولوژی باید این ترکیبات، توسط فیکساتیو یا مواد پایدار کننده، پایدار شوند (۵). خوشبختانه بیشتر مواد پایدارکننده، شکل و مکان پروتئین‌های نامحلول، پلی نوکلئوتیدها و مواد موکوئیدی را حفظ می‌نمایند (۱۲). هر چند بعضی مواد پایدارکننده، برخی از مواد سلولی را بهتر پایدار می‌کنند (۲). در دهه‌های اخیر، برش‌های انجمادی برای مقایسه روش‌های مختلف پایدارسازی، فرآوری بافت، رنگ‌آمیزی‌های رایج و ایمونولیبلینگ، بسیار مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵). روش برش‌گیری توسط انجماد، نه تنها در وقت صرفه‌جویی می‌نماید (۱۷) بلکه باعث ایجاد حداقل آسیب به نواحی آنتی ژنیک می‌گردد (۱۶) و در نتیجه واکنش‌های آنتی ژن- آنتی بادی هنگام ایمونولیبل کردن پروتئین‌ها در حداکثر میزان خود انجام می‌گیرد (۸). با این حال، در این روش، نمی‌توان بافت‌ها را برای مدت طولانی از معرض تخریب، محافظت نمود (۱۴). استفاده از یک پایدار کننده شیمیایی قبل یا بعد از انجام برش، می‌تواند در جهت رفع این مشکل مفید باشد (۶). با این وجود، گزارشات کمی در این خصوص وجود دارد و مزایا و معایب مواد پایدار کننده شیمیایی را درخصوص برش‌های انجمادی، کمتر تجزیه و تحلیل نموده‌اند. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر پایدارکننده‌های انتخابی بر برش‌های انجمادی است. برای رسیدن به این هدف، در این تحقیق، ابتدا اثرات یکی از مواد ساده ارگانیک و سریع‌العمل مانند استون و سپس دو ماده پایدار کننده دیگر یعنی فرمالین و پارافرمالدئید بر برش‌های انجمادی بافت کبد، مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

مواد و روشها

در این تحقیق، سه نوع ماده مواد پایدار کننده شیمیایی یعنی استون که یک پایدار کننده سریع می‌باشد و فرمالین ۱۰ درصد بافر شده و پارا فرمالدئید مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌برداری از بافت کبد خرگوش نژاد داچ، خریداری شده از انستیتو پاستور انجام گرفت. پس از کشتن حیوان با دز بالای داروی نسدونال، کبد جدا گردید و در اندازه‌های ۱ در ۱ میلیمتر با قطر ۰/۵ سانتیمتر تقسیم و در ظروف حاوی ۵۰ سی‌سی از هر کدام مواد پایدار کننده ذکر شده، غیر از استون، قرار داده شدند. نمونه‌های مورد استفاده برای ارزیابی استون، بدون پایدارسازی به ضخامت ۵ میکرون، برش‌گیری شدند. سپس برش‌ها، به مدت ۱۰ دقیقه با استون پایدار شدند. پس از ۴۸ ساعت، بافت‌های قرار داده شده در فرمالین و پارافرمالدئید، مورد برش‌گیری انجمادی قرار گرفتند. براساس جدول کوهن و ضریب اثر ۰/۵، توان آزمون (Beta -۱) ۹۰ درصد و α= ۰/۰۵ حداقل حجم نمونه ۳۶ برش برای هر ماده پایدارکننده مشخص گردید. برش‌گیری از بافت کبد پایدار شده با هر کدام از مواد پایدار کننده ذکر شده، با ضخامت‌های ۵ میکرون صورت پذیرفت. نوع مواد پایدارکننده هر برش روی لام مربوطه بوسیله قلم الماس نوشته شد. برش‌ها با روش H&E رنگ‌آمیزی شدند. پس از انجام رنگ‌آمیزی و مونته کردن، تمام مشخصات نوشته شده روی اسلایدهای آماده شده قبل از مطالعه، با برچسبی پوشانده شدند تا مطالعه بصورت کور انجام پذیرد. مطالعه اسلایدها، براساس کیفیت حفظ ساختار کلی لبول‌های کبدی، شکل، آرایش و انسجام هپاتوسیت‌ها، همینطور کیفیت رنگ‌پذیری هپاتوسیت‌ها از جمله کیفیت رنگ‌پذیری هسته، کروماتین و هستک و سیتوپلاسم و نیز کنتراست بین هسته و سیتوپلاسم و اجزای تشکیل‌دهنده قطعه باب، انجام گرفت. امتیازدهی براساس متغیرهای فوق از"+" تا "++++" صورت گرفت و سپس داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳، به روش Kruskal-Wallis و تست تکمیلی Mann-Withney، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

نتیجه مطالعه میکروسکوپی بافت‌های کبد پایدار شده با مواد مختلف پایدار کننده به شرح زیر بود:

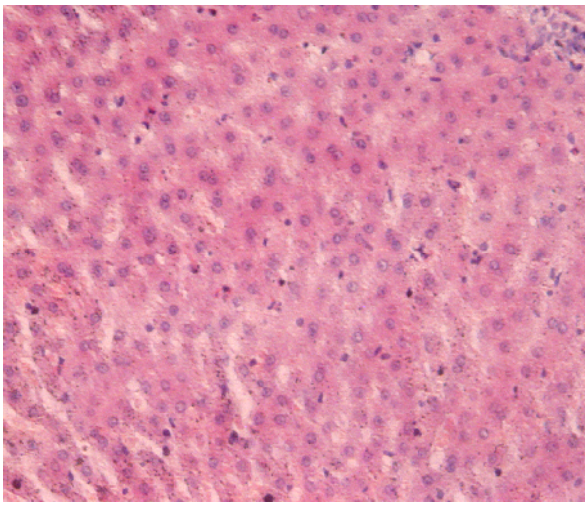
فرمالین

بافت‌های پایدار شده با این ماده دارای سازمان و معماری طبیعی بافت کبدی و ساختار کلی لبولهای کبدی بطور طبیعی قابل رویت بود. یعنی سیاهرگ مرکز لبولی در بخش میانی لبول و صفحات ریماک بصورت شعاعی در اطراف آن قرار داشتند. کیفیت رنگ‌پذیری هپاتوسیت‌ها نسبتاً مناسب بوده و هسته‌ها بصورت بازوفیلیک و یوکروماتیک و سیتوپلاسم آنها بصورت ائوزینوفیلیک مشاهده شد. همین طور شکل، آرایش و انسجام

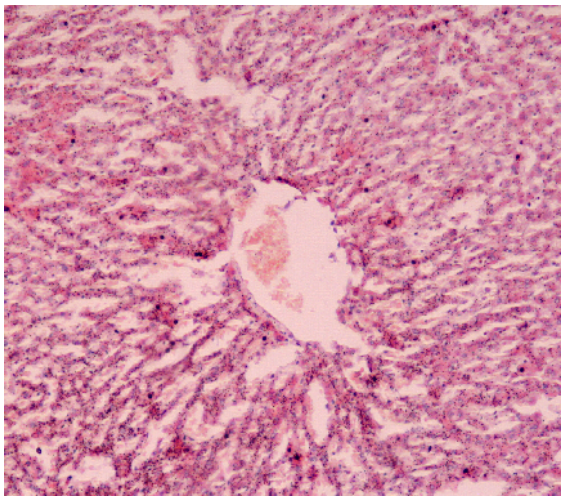
هپاتوسیت‌ها یعنی اندازه، شکل و ارتباط سلولها با هم بصورت طبیعی، حفظ شده بود. سینوزوئیدها در اندازه‌های طبیعی بود و سلولهای کوپفر در حاشیه آنها با هسته‌های هتروکروماتین قابل شناسایی و نیز اجزای تشکیل‌دهنده قطعه باب از قبیل مجرای صفراوی، سرخرگچه و سیاهرگچه باب با رنگ‌پذیری مناسب، سلولهای تشکیل‌دهنده آنها کاملاً واضح و قابل تشخیص بودند. کیفیت رنگ‌پذیری هسته، کروماتین و هستک و نیز کنتراست بین هسته و سیتوپلاسم اگرچه نامطلوب بود ولی کنتراست هسته و سیتوپلاسم تا حدی واضح و قابل تشخیص برآورد گردید (شکل ۱).

استون

بافت‌های پایدار شده با این ماده پایدار کننده، اگرچه دارای سازمان و معماری طبیعی بافت کبدی بودند و ساختار کلی لبولهای کبدی در آنها قابل رویت بود، ولی شکل، آرایش و انسجام هپاتوسیت‌ها مانند آنچه که در نمونه‌های پایدار شده در فرمالین وجود داشت، بخوبی حفظ نشده بود و بصورت چروکیده و گاهی بدون اتصال به یکدیگر دیده می‌شدند. هسته بعضی از هپاتوسیت‌ها علائمی از شروع نکروز نشان می‌دادند و پیکنوز در تعدادی از آنها مشهود بود. کیفیت رنگ‌پذیری هپاتوسیت‌ها مطلوب بود و هسته‌ها بصورت بازوفیلیک و یوکروماتیک و سیتوپلاسم آنها بصورت ائوزینوفیلیک دیده می‌شدند. کنتراست بین هسته و سیتوپلاسم نسبتاً واضح و قابل تشخیص بود. با چروکیدگی هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها متسع به نظر می‌رسیدند. ولی سلولهای کوپفر در حاشیه آنها با هسته‌های هتروکروماتین و زاویه‌دار قابل شناسایی بودند (شکل ۲).



شکل ۱: نمای هپاتوسیت‌ها در بافت پایدار شده با فرمالین (40x)



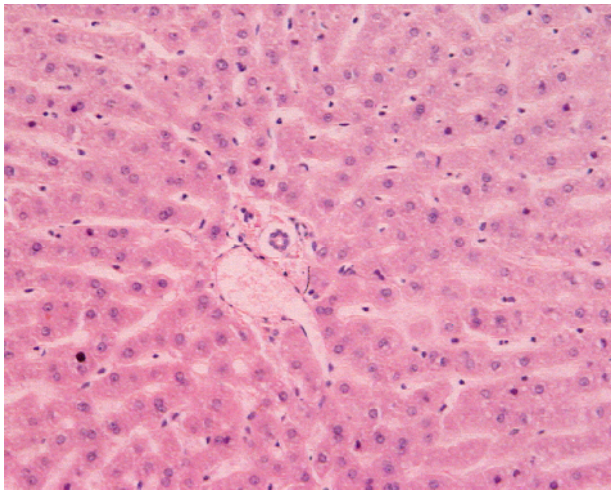
شکل ۲: بافت کبدی پایدار شده با استون، هپاتوسیت‌ها چروکیده شده و کیفیت حفظ ساختاری بافت، پایین می‌باشد. (10x)

پارافرمالدئید

بافت‌های پایدار شده با این ماده، از نظر کلی بسیار شبیه به بافت‌های پایدار شده با فرمالین بودند. سازمان و معماری طبیعی بافت، طبیعی بوده و ساختار کلی لبول‌های کبدی بطور طبیعی حفظ شده بود. کیفیت رنگ‌پذیری هپاتوسیت‌ها بسیار مطلوب بود. یعنی هسته‌ها بصورت بازوفیلیک و یوکروماتیک مشاهده و سیتوپلاسم آنها بصورت ائوزینوفیلیک و شفاف دیده می‌شدند. هپاتوسیت‌ها کمی چروکیده شده ولی در مجموع بطور پیوسته بهم قرار گرفته بودند. کیفیت رنگ‌پذیری هسته، کروماتین و هستک و نیز کنتراست بین هسته و سیتوپلاسم واضح و قابل تشخیص بود. سینوزوئیدها بطور نسبی در اندازه‌های طبیعی

بودند ولی چروکیدگی کمی که در هپاتوسیت‌ها وجود داشت، باعث متسع به نظر رسیدن آنها شده بود. سلولهای کوپفر در حاشیه سینوزوئیدها با هسته‌های زاویه‌دار و هتروکروماتین قابل رویت و نیز اجزای تشکیل‌دهنده قطعه باب، کاملاً واضح و قابل تشخیص بودند (شکل ۳).

تجزیه و تحلیل‌های آماری به روش Kruskal-Wallis و تست تکمیلی Mann-Withney نشان داد که بافتهای پایدار شده در پارافرمالدئید از نظر حفظ کیفیت ساختاری بافت با کیفیت رنگ‌آمیزی، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<0.05$) و در مجموع، بهتر از فرمالین و استون می‌باشد.



شکل ۳: کبد پایدار شده با مواد پارافرمالدئید که قطعه باب و هپاتوسیتها اطراف آن قابل مشاهده است (20x)

بحث

طی دهه‌های استفاده از برش‌های انجمادی بعنوان یک روش ترجیحی برای مطالعات بافتی بویژه در زمینه‌های ایمونوآنزیماتیک و ایمونوفلئورسنت پذیرفته شده است (۱۳). بطور کلی باور بر این است که انجماد بهترین روش برای حفاظت از مشخصه‌های آنتی ژنیکی می‌باشد (۹). اگر چه برای حفظ ساختار کلی بافت، مناسب و کافی نمی‌باشد. بنابراین استفاده از مواد پایدار کننده شیمیایی برای حفظ و نگهداری ساختمان بافت در برش‌های انجمادی، ضروری می‌باشد. پارافرمالدئید و فرمالدئید مواد پایدار کننده آلدئیدی بوده و باعث ایجاد اتصالات متقاطع درون مولکولی و بین مولکولی پروتئین‌های سلولی می‌گردد که خود باعث بوجود آمدن هتروپلیمرهای غیرقابل انعطاف‌تر می‌شود (۱۱). این تحقیق نشان داد که پایدارسازی برش‌های انجمادی توسط پارافرمالدئید، بر فرمالدئید و استون ارجحیت دارد که می‌تواند بدلیل داشتن ناخالصی‌های کمتر در آن باشد. استون، مانند اتانول و متانول، یک منعقدکننده ارگانیک ساده است که آب را در مواد پروتئینی هیدرولیز کرده و باعث تخریب مولکولی این پروتئین‌ها می‌گردد (۱۰). پروتئین‌های محلول در سیتوپلاسم منعقد شده و ارگانل‌ها تخریب می‌شوند. استون، چربی‌ها را از بافت خارج کرده ولی ترکیبات حاوی کربوهیدرات دست نخورده باقی می‌مانند (۱). استون به تنهایی برای پایدارسازی فیلم‌ها و گسترش‌های سلولی و همانطور که گفته شد، برای برش‌های انجمادی پایدار نشده بکار می‌رود (۳). این ماده برای بافت‌هایی که باید با پارافین قالب‌گیری شده و PCR شوند، مناسب نمی‌باشد. زیرا باعث چروکیدگی چشمگیر و سفتی بیش از حد بافت می‌گردد (۱۸). این حالت در بافت‌های پایدار شده با استون در این تحقیق نیز مشاهده شد.

پایدارسازی با استون می‌تواند تاثیرات مشخصی بر مولکول‌های پروتئینی سطحی سلول و عناصر اصلی اسکلت سلولی داشته باشد. گزارش شده است که ساختار میکروتوبول‌ها، در سلول‌های پایدار شده با استون، بطور ضعیف حفظ می‌گردد. پارافرمالدئید یکپارچگی و شکل بافت را حفظ می‌نماید.

همچنین آکروزوم اسپرم و غشاهای پلاسمایی را حفظ می‌کند. در حالیکه این موارد در بافت‌های پایدار شده با استون، غیرقابل قبول می‌باشد (۱۹). در نتیجه این مطالعه مشخص شد که پایدار سازی برش‌های انجمادی با پارافرمالدئید بهتر از فرمالین یا استون در رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین در سطح میکروسکپ نوری می‌باشد. در نهایت درخصوص نوع پایدار کننده، پارافرمالدئید می‌تواند بعنوان اولین انتخاب در میان پایدارکننده‌هایی مانند استون یا فرمالین چه از نظر حفظ ساختمان بافت و چه از نظر رنگ‌آمیزی محسوب گردد. از طرف دیگر تقویت اثر رنگ‌آمیزی یا رنگ‌پذیری بیش از حد، نباید در بافت وجود داشته باشد که باعث ایجاد جواب‌های اشتباه یا مثبت کاذب گردد. بعلاوه تغییر در انواع ترکیبات بافتی هنگام پایدار سازی، این سئوال را که آیا این اتفاقات در اثر انجام آزمایشات در شرایط غیریکسان رخ می‌دهد یا استفاده از مواد پایدارکننده مختلف باعث آن می‌شود نیاز به مطالعات بیشتر در این خصوص می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر که هزینه این تحقیق را تامین نموده است، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1-Ahangar, A.G.; Smernik, R.J.; Kookana, R.S. and Chittleborough, D.J., 2009. The effect of solvent-conditioning on soil organic matter sorption affinity for diuron and phenanthrene. Chemosphere, Vol. 76, No. 8, pp.1062-6.

2-Borgognoni, C.F.; Maizato, M.J.; Leirner, A.A.; Polakiewicz, B.; Beppu, M.M.; Higa, O.Z. and Pitombo, R.N., 2010. Effect of freeze-drying on the mechanical, physical and morphological properties of glutaraldehyde-treated bovine pericardium: evaluation of freeze-dried treated bovine pericardium properties. J. Appl. Biomater. Biomech. Vol. 8, No. 3, pp.186-90.

3-Bratthauer, G.L., 2010. Preparation of frozen sections for analysis. Methods Mol. Biol., 588:67-73.

4-Charoenwong, D.; Andrews, S. and Mackey, B., 2011. The role of rpoS in the development of cell envelope resilience and pressure resistance in stationary phase Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 77, No. 15, pp.5220-5229.

5-Chouinard, J.A.; Khalil, A. and Vermette, P., 2007. Method of imaging low density lipoproteins by atomic force microscopy. Microsc. Res. Tech. Vol. 70, No. 10, pp.904-907.

6-Cinar, O.; Semiz, O. and Can, A., 2006. A microscopic survey on the efficiency of well-known routine chemical fixatives on cryosections. Acta Histochem., Vol. 108, No. 6, pp.487-96.

7-Furuhashi, A.; Ayukawa, Y.; Atsuta, I.; Okawachi, H. and Koyano, K., 2011. The difference of fibroblast behavior on titanium substrata with different surface characteristics. Odontology. Jun 21.

8-Guduric-Fuchs, J.; Ringland, L.J.; Gu, P.; Dellett M.; Archer, D.B. and Cogliati, T., 2009. Immunohistochemical study of pig retinal development. Mol. Vis., Vol. 21, No.15, pp.1915-1928.

9-Halbower, A.C.; Mason, R.J.; Abman, S.H. and Tuder, R.M., 1994. Agarose infiltration improves morphology of cryostat sections of lung. Lab. Invest. Vol. 71, No. 1, pp.149-53.

10-Hastings, G.; Wang, R.; Krug, P.; Katz, D. and Hilliard, J., 2008. Infrared microscopy for the study of biological cell monolayers. I. Spectral effects of acetone and formalin fixation. Biopolymers. Vol. 89, No. 11, pp.921-30.

11-Marchini, M.; Ortolani, F. and Raspanti, M., 1993. Collagen-glutaraldehyde interaction as revealed by the D-banding of negatively stained fibrils and computer-drawn band patterns. Eur. J. Histochem., Vol. 37, No. 4, pp.363-73.

12-Moelans, C.B.; Oostenrijk, D.; Moons, M.J. and van Diest, P.J., 2011. Formaldehyde substitute fixatives: effects on nucleic acid preservation. J. Clin. Pathol. pp.960-967.

13-Robertson, D. and Isacke, C.M., 2011. Multiple immunofluorescence labeling of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Methods Mol. Biol., 724:69-77.

14-Sadler, T.R.; Khodavirdi, A.C.; Hinton, D.R. and Holschneider, D.P., 2009. Snap-frozen brain tissue sections stored with desiccant at ambient laboratory conditions without chemical fixation are resistant to degradation for a minimum of 6 months. Appl. Immunohistochem Mol. Morphol. Mar., Vol. 17, No. 2, pp.165-71.

15-Saga, K., 2005. Application of cryofixation and cryoultramicrotomy for biological electron microscopy. Med Mol Morphol. Vol. 38, No. 3, pp.155-60. Review.

16-Vanhecke, D.; Graber, W. and Studer, D., 2010. Rapidly excised and cryofixed rat tissue. Methods Cell Biol., 96:513-27.

17-Wellnitz, U.; Binder, B.; Fritz, P.; Friedel, G. and Schwarzmann, P., 2000. Reliability of telepathology for frozen section service. Anal. Cell Pathol., Vol. 21, No. 3-4, pp.213-22.

18-Yan, F.; Wu, X.; Crawford, M.; Duan, W.; Wilding, E.E.; Gao, L.; Nana-Sinkam, S.P.; Villalona-Calero, M.A.; Baiocchi, R.A. and Otterson, G.A., 2010. The search for an optimal DNA, RNA, and protein detection by in situ hybridization, immunohistochemistry, and solution-based methods. Methods. Vol. 52, No. 4, pp.281-6.

19-Yamashita, M.; Yamagata, K.; Tsumura, K.; Nakanishi, T. and Baba, T., 2007. A crosome reaction of mouse epididymal sperm on oocyte zona pellucida. J. Reprod. Dev. Vol. 53, No. 2, pp.255-62.