ارائه تکنیک جدید
VITAL PERFUSION - FIXATION

نویسندگان: دکتر سعید عسگری[1] ، دکتر محمد جعفر اقبال[2]،
دکتر مسعود پریرخ[3]

خلاصه

در تحقیقات هیستوپاتولوژیک بر روی حیوانات آزمایشگاهی باید از تکنیکی بهره گرفت که بتواند فیکساسیون بافتهای زنده مورد نظر را به بهترین وجهی تامین نماید تا اولین گام در روند تهیه نمونه های بافتی که مرحله بسیار مهمی است بخوبی انجام گردد.

اگرچه تاکنون تکنیکهای مختلفی جهت وایتال پرفیوژن ماده فیکساتور معرفی شده اما در تابستان سال ۱۳۷۱ برای اولین بار در دنیا تکنیک Vital Perfusion Fixation جدیدی توسط ما ابداع و بر روی گربه مورد استفاده واقع شد. استفاده از این تکنیک دارای مزایایی است که در مقایسه با سایر تکنیکها قابل توجه می باشد.

این تکنیک ابداعی جدید در ۵ مرحله به انجام می رسد و از سادگی و سهولت ویژه ای برخوردار است به نحوی که در تحقیقاتی که از سال ۱۳۷۱ به بعد بر روی مدل آزمایشگاهی گربه در دندانپزشکی به انجام رسیده است به صورت شایعی مورد استفاده واقع شده است.

کلید واژه ها: فیکساسیون - وایتال پرفیوژن - تکنیک جدید

مقدمه:

اگر در هنگامی که سلولهای یک بافت و یا ارگان زنده هستند، از طریق عروقی که وظیفه خون رسانی به آنها را برعهده دارند ماده فیکساتیو را تزریق نموده تا سلولها در همان حالت و بدون هرگونه تغییری ثابت شوند عمل وایتال پرفیوژن انجام شده است. در تابستان سال ۱۳۷۱ تکنیک جدیدی توسط گروه تحقیقاتی ما بر روی گربه ها ابداع و از آن تاریخ به بعد مورد استفاده قرار گرفت که در این مقاله شرح داده می شود. با اطلاعات موجود تاکنون این روش گزارش نشده است.

مواد و روشها:

مرحله اول - بیهوشی و جلوگیری از انعقاد خون:

جهت بیهوشی عمیق و Relaxation کامل گربه از تزریق مخلوط Ketamin (20mg/kg) و HCl Xylazin (1.5 mg/kg) بصورت IM استفاده شده و سپس برای جلوگیری از پروسه انعقاد ۱/۵ml هپارین لئو (5000Iu/ml) مستقیماً بداخل قلب تزریق شد.

مرحله دوم - فلپ:

برای انجام فلپ باید در سمت چپ قفسه سینه برشی از محل اتصال اولین دنده با استخوان جناغ سینه شروع شده و تا قسمت میانی آخرین دنده بصورت مایل ادامه یابد. این مسیر قبلاً با کنار زدن موها مشخص شده و با

۱- استادیار بخش اندودانتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۲- استادیار بخش اندودانتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۳- استادیار بخش اندودانتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تزریق لیدوکائین ۲٪ همراه با اپی نفرین ۱/۱۰۰۰۰۰ بیحس می‌شد.

پس از برش لایه های درم، هیپودرم، چربی، نیامهای عضلانی و عضلات سینه ای و دنده ای، دنده ها در معرض دید قرار گرفته و با استفاده از قیچی در همان مسیر قطع می شوند. در نهایت فلپ با انجام برشی در بین دو دنده آخر به سمت وسط قفسه صدری آزاد می شود. در این حالت قلب و کلیه عروق مرتبط با آن بدلیل کلاپس ریتین براحتی در دسترس عمل کننده قرار می گیرند.

مرحله سوم ـ تخلیه خون:

اگر هدف فیکساسیون Upper (U.L) Limb حیوان باشد ابتدا ورید (S.V.C) Superior vena cava که خون سیاهرگی U.L را به قلب باز می گرداند، در فاصله ۵ cm از قلب و شریان آئورت نزولی (D.A) را در فاصله C M ۱۰-۸ از محل جدا شدن شرائین کاروتید (C.A)از قوس آئورت قطع می گردند. با این عمل در عرض مدت کوتاهی بیشتر خون حیوان از شبکه عروقی خارج شده و در همین حال از داخل قفسه صدری به وسیله ساکشن تخلیه می گردد.

در صورتیکه هدف فیکساسیون (L.L) Lower Limb باشد باید ورید Inferior (I.V.C) Vena Cava را در فاصله ۵ cm از قلب و شریان آئورت را بلافاصله پس از محل جدا شدن C.A قطع کرد.

اگر فیکاسیون تمام بدن حیوان غیر از قلب مدنظر باشد هر دو ورید S.V.C و I.V.C را در فواصل ۵cm از قلب و شریان آئورت صعودی (A.A) را بلافاصله پس از خروج از قلب باید قطع نمود.

مرحله چهارم ـ شستشوی عروق:

برای خارج کردن خون باقی مانده در داخل عروق باید با استفاده از یک مایع ایزوتون (سرم فیزیولوژی) همراه با فشار مناسب (120mmHg) ابتدا خون را رقیق و سپس کاملاً خارج کرد. بسته به اینکه هدف عمل کننده فیکساسیون کدام قسمتهای بدن حیوان باشد یکی از روشهای ذیل بکار می رود:

برای فیکساسیون U.L باید شریان A.A قبل از محل جدا شدن شرائین C.A را با پنس هموستات لیگاتور کرده و سپس لولهٔ سرم که بصورت مورب قطع گردیده به داخل شریان D.A و بسمت قلب هدایت شود. برای حصول اطمینان از عدم جابجائی لوله سرم و یا خارج شدن آن با استفاده از نخ بخیه، جداره شریان بر روی لوله سرم محکم می گردد. بدین ترتیب مسیر جریان مایع از D.A به سمت C.A بوده و پس از مشروب نمودن U.L از طریق S.V.C که قبلاً قطع شده بداخل قفسه صدری خواهد بود . برای فیکساسیون L.L باید لوله سرم به داخل شریان D.Aدر خلاف جهت قلب فرو برده شود بنابر این مایع تزریقی پس از عبور از ارگانهای اندام تحتانی از طریق I.V.C به داخل قفسه صدری تخلیه خواهد شد. برای فیکساسیون تمام بدن حیوان باید لوله سرم بداخل شریان A.A فرو برده شود و در جای خود ثابت شود. بنابر این مایع تزریق شده پس از مشروب نمودن تمام بافتها و ارگانهای بدن حیوان در مسیر برگشت خود بسوی قلب، از طریق وریدهای اصلی S.V.C و I.V.C که قطع شده اند، بداخل قفسه صدری تخلیه خواهد شد.

مرحلهٔ پنجم ـ فیکساسیون:

پس از اینکه عروق خونی بافتها و ارگانهای موردنظر در مدت کوتاهی کاملاً شستشو داده شدند، باید بجای مادهٔ شستشو دهنده از مایع فیکساتیو موردنظر استفاده کرد و با همان شرایطی که ذکر شد پرفیوژن آن انجام شود.

نکته جالب توجه اینکه می توان با وجود ساکشن در قفسه صدری، فلپ را مجدداً به محل اولیه بازگرداند و بنابر این از تبخیر مادهٔ فیکساتیو و نهایتاً آلودگی هوای محل کار جلوگیری به عمل آورد.

نتایج:

با انجام این تکنیک جدید عمل فیکساسیون بر روی بیش از بیست گربه انجام شد. در تمامی نمونه ها طول مدت انجام کار کمتر از یکساعت بوده و در هیچ موردی آلودگی محیط کار با ماده فیکساتیو رخ نداد .پس از انجام مراحل آزمایشگاهی و تهیه مقاطعی به قطر ۶µm و رنگ آمیزی با H&E اسلایدهای هیستولوژیک بدست آمده مؤید فیکساسیون عالی بافتهای مورد نظر بودند.

بحث:

برای اینکه مطالعات هیستولوژیک بصورت صحیحی انجام شوند باید از روشهایی بهره جست که با انجام آنها انواع سلولهای بافتهای سخت، نرم و آماسی، همچنین رشته ها و مواد زمینه ای بافتها بدون هیچ نوع تغییری مثل اتولیز در محل اولیه خود باقی بمانند و بدیهی است که این امر جز با انجام فیکساسیون ایده‌آل میسر نیست. تاکنون روشهای متعددی جهت تکنیکهای فیکساسیون مورد استفاده قرار گرفته اند (۶-۱). برخی از محققین استفاده از ابزارهای خاصی را نیز توصیه کرده اند (۷،۸). یکی از روشهای فیکساسیون وایتال پرفیوژن است که بوسیله آن بافتهای زنده از طریق عروق خونی مربوطه با ماده فیکساتیو ثابت می شوند. در این عمل هر چه سرعت انجام کار و میزان انتشار ماده فیکساتیو بیشتر باشد، سلولها شرایط خود را بهتر حفظ می کنند. بدیهی است فیکساسیون با این روش نسبت به روش

Immersion ترجیح دارد.

امروزه در یکی از تکنیکهای متداول (۹) فیکساسیون سر و صورت حیوان از طریق دو شریان کاروتید در ناحیه گردن به انجام می‌رسد که این کار بدلیل ظرافت این عروق مشکل و وقت‌گیر بوده و علاوه بر آن این شرائین باید بصورت جداگانه ای پس از کنار زدن انساج پوشاننده پیدا شده و سپس سوزن تزریق بداخل آنها هدایت شود. این احتمال وجود دارد که به دلیل استفاده از سوزن دیوارهٔ این عروق سوراخ و یا پاره شود که در این صورت باید این کار مجدداً بر روی قسمتهای فوقانی تر عروق انجام گردد .همچنین باید در این تکنیک وریدهای Jugular که درناژ خون سر و صورت را بر عهده دارند در ناحیه گردنی قطع شوند و چون در این ناحیه حفره‌ای جهت تجمع خون و مایعات استفاده شده و بنابراین تخلیهٔ آنها وجود ندارد باید حیوان در یک پوشش پلاستیکی قرار گیرد تا خون و مایعات بر روی میز کار نریزند. اما حتی با اتخاذ این تدابیر محلولهای فیکساتیوی که از موضع عمل به سمت پوشش پلاستیکی جریان می یابند تبخیر شده و باعث ایجاد ناراحتی در دستگاه تنفسی و سوزش چشم عمل کنندگان می شوند.

در تکنیک جدیدی که ابداع و شرح داده شد عروق اصلی براحتی یا انجام یک فلپ از طریق قفسه صدری در دسترس عمل کننده قرار می گیرند و بنابراین در مدت زمان کوتاهی این عروق پیدا و قطع شده و سپس لوله سرم در داخل شریان مورد نظر ثابت می شود. از طرف دیگر چون خون و مایعات تزریقی (بسته به روش استفاده شده) از راه I.V.C و S.V.C. و یا هر دو بداخل قفسه صدری تخلیه می شوند، ابتدا در این حفره محدود تجمع یافته و سپس توسط ساکشن تخلیه می شوند و بنابر این از ریختن و تبخیر آنها ممانعت به عمل می‌آید.

در مجموع مزایای تمیز بودن، راحتی، سادگی و سرعت این تکنیک جدید ارجحیت فاحشی نسبت به سایر تکنیکهای معمول دارا می باشند و ضمناً استفاده از این تکنیک بدلیل مزایای شرح داده شده در کلیه مدلهای آزمایشگاهی با آناتومی عروقی مشابه قابل انجام است.

REFRENCES:

1- Moolenbeek C., A Simple method for whole-body perfusion fixation of rats and mice, *Z-Versuchstierkd*, 1982; 24(3):131-2.

2- Bondonna.T. J. Jackuet Y. Wolg G., Perfusion fixation procedure for immediate histologic processing of brain tissue, *Physiol-Behav.*, 1977, 19(2): 345-7.

3 - Heide S., Perfusion fixation of rat molar pulp tissue for light microscopy, *Scand. J. Dent. Res.*, 1973, 81(2): 135-44.

4 - Garant P. R., The organization of microtubules within rat odontoblast processes revealed by perfusion fixation with glutaraldehyde, *Arch. Oral. Biol.*, 1972, 17 (7): 1047-58.

5 - Williams T. H. Jew J. Y., An improved method for perfusion fixation of neural tissues for electron microscopy, *Tissue-Cll*, 1975, (3): 407-18.

6 - Maunsbach A. B., The influence of different fixatives and fixation methods on the ultrastructure of rat kidney proximal tubule cells. I. Comparison of different perfusion fixation methods and of glutaraldehyde, formaldehyde and osmiun tetrocide fixatives, *J. Ultrastruct. Res.*, 1966, 15(3): 242-82.

7- Hiraoka J. Wang W., A new infusion needle for perfusion fixation, *Stain. Technol.*, 1989, 64(2): 102-3.

8 - Jonkers B.W. Sterk J. C. Wouterlood F. G., Transcardial perfusion fixation of the CNS by means of a compressed-air-driven-device, *J. Neurosci. Methods*, 1984, 12(2); 141-9.

9 - Yoshida M. Hotta Y. Miyazaki T. Watanabe O. Ichikawa T., Local perfusion fixation of dog's head and neck for electron microscopy especially of teeth and their surrounding tissues, *Shikwa-Gakuho*, 1974, 74(2): 419-26.