



جایگزینی روش های سنتی آماده سازی بافت با روش های مدرن

مزایای آماده سازی بافت های پاتولوژی به روش

Microwave Assisted Rapid Tissue Processing (MARTP)

و مقایسه آن با روش های روتین



The deadliest ailments on Earth, mapped by their affected tissues

Artist and physician Odra Noel has created an arresting map of global health, plotting microscopic views of the diseased tissues that correspond to each region's deadliest illnesses

جایگزینی روش های سنتی آماده سازی بافت با روش های مدرن

امروزه ارزش روش های پاتولوژی بر هیچ یک از پزشکان پوشیده نیست اما جایگاه آن با به کار گیری تکنیک های طولانی و تاخیر در جوابدهی کمی مخدوش شده است. از جمله مراحل وقت گیر در این بخش تثبیت و آماده سازی بافت می باشد.

اولین قدم ها در رفع معایب فوق برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ توسط Mayers با ابداع روش فیکسسیون بافتی از طریق فن آوری میکروویو Microwave Assisted Rapid Tissue Processing (MARTP) برداشته شد. طبیعتاً در شروع، به علت عدم وجود ابزار و راه کارهای مناسب، ورود این روش به دنیای پاتولوژی آسان نبود. طی دهه های گذشته مشکلات فوق به تدریج مرتفع گردید و این فن آوری در دامنه وسیعی از آناتومیال پاتولوژی نظیر بررسی بافت ها با روش های میکروسکوپ نوری و الکترونی، رنگ آمیزی هیستوشیمیایی، دکلسیفیکاسیون استخوان و مرحله بازیافت آنتیژن (Antigen Retrieval) در ایمونوهیستوشیمی و غیره وارد گردید.

فن آوری MARTP باعث می گردد تا نه تنها هزینه های گران بستری بیماران کاهش یابد بلکه به پزشکان قابلیت آن را می دهد تا برنامه درمانی خود را در موارد بیماری های خطیر به سرعت طراحی کنند.

زمان جایگزینی روش های سنتی که از ۱۰۰ سال پیش تا کنون تغییری نکرده اند و حداقل نقایص آنها تاخیر جوابدهی، گذراندن مراحل متعدد و طولانی، ریسک تماس با مواد سمی و تخریب اسیدهای نوکلئیک بافت می باشد، فرار سیده است.

فن آوری MARTP باعث می گردد تا نه تنها هزینه های گران بستری بیماران کاهش یابد بلکه به پزشکان قابلیت آن را می دهد تا برنامه درمانی خود را در موارد بیماری های خطیر به سرعت طراحی کنند.

فن آوری MARTP به تدریج در کنار روش های معمول از اواسط دهه ۱۹۹۰ مطرح گردید هر چند که در ابتدای کار انتقاداتی به این روش وارد بود. مطالعات متعدد انتقادات فوق را رفع نموده و MARTP را به عنوان جایگزین مناسب روش های معمول Tissue Processing معرفی نموده است. در این زمینه باید به مطالعات ارزشمند Lyska و Ralph Rhor اشاره کرد که در ستور بعد به تفصیل خواهد آمد.

با وجود انتقادهای گوناگون در بدو ابداع MARTP، این روش دارای مزایای بسیاری است که مهم ترین آن صرفه جوئی در وقت و جوابدهی در روز دریافت نمونه می باشد. فن آوری MARTP باعث می گردد تا نه تنها هزینه های گران بستری و نگرانی های بیماران کاهش یابد بلکه به پزشکان قابلیت آن را می دهد تا برنامه درمانی خود را در مورد بیماری های خطیر به سرعت طراحی کنند.

به عنوان مثال می توان به دو مطالعه در این زمینه اشاره کرد: Morales و همکارانش در یک مطالعه نشان دادند که تعداد مواردی که در روز دریافت نمونه جواب دریافت کرده اند با استفاده از MARTP از ۱٪ به ۵۵٪ در بخش پاتولوژی آنها افزایش یافته است.

در مطالعه ای دیگر Leong و همکارانش ثابت کردند با بکار گیری MARTP زمان مورد نیاز برای جوابدهی از ۲۱ ساعت به ۵/۶ ساعت در بخش پاتولوژی آنها کاهش یافته است.

طبق مطالعات فوق و سایر تجربیات، باید اذعان داشت زمان جایگزینی روش های سنتی که از ۱۰۰ سال پیش تا کنون تغییری نکرده اند و حداقل نقایص

آنها تاخیر جوابدهی، گذراندن مراحل متعدد و طولانی، ریسک تماس با مواد سمی و تخریب اسیدهای نوکلئیک بافت می باشد فرار سیده است.

طبق مطالعات فوق و سایر تجربیات، باید اذعان داشت زمان جایگزینی روش های سنتی که از ۱۰۰ سال پیش تا کنون تغییری نکرده اند و حداقل نقایص آنها تاخیر جوابدهی، گذراندن مراحل متعدد و طولانی، ریسک تماس با مواد سمی و تخریب اسیدهای نوکلئیک بافت می باشد فرار سیده است.

زمان جایگزینی روش های سنتی که از ۱۰۰ سال پیش تا کنون تغییری نکرده اند و حداقل نقایص آنها تاخیر جوابدهی، گذراندن مراحل متعدد و طولانی، ریسک تماس با مواد سمی و تخریب اسیدهای نوکلئیک بافت می باشد، فرار سیده است.

مزایای آماده سازی بافت های پاتولوژی به روش

Microwave Assisted Rapid Tissue Processing (MARTP)

و مقایسه آن با روش های روتین

در سال های اخیر ارائه خدمات پزشکی سریع بسیار مورد توجه قرار گرفته زیرا افزایش سرعت ارائه خدمات، منجر به کاهش زمان بستری می شود که گاهی بسیار گران قیمت است. از سوی دیگر بخش پاتولوژی همواره از قسمت هایی بوده که تاخیر زیادی را به امور درمان تحمیل نموده است.

یکی از راه های افزودن سرعت جریان کار در بخش پاتولوژی ابداع Frozen section بوده که باعث تسریع تشخیص، خصوصاً در حین اعمال جراحی گردید ولی مشکلات این روش نظیر پیچیدگی آماده سازی بافت، مشکل بودن برش بعضی از بافت ها نظیر چربی و نیز ایجاد برخی تغییرات مورفولوژیک از مقبولیت این روش در بین پاتولوژیست ها کاسته است.

گام مهم دیگری که طی ۳۰ سال گذشته در جهت تسریع تشخیص پاتولوژی برداشته شده روش MARTP می باشد. در سال ۱۹۹۳ Leong روش MARTP را برای به کار گیری در آزمایشگاه های پاتولوژی شرح داد و از آن پس به تدریج ابزار این روش وارد آزمایشگاه ها گردید.

MARTP به تدریج جای خود را در میان آن دسته از پزشکان بالینی که به مداوای بیماری های حاد و شدید مشغول بودند باز کرد، چرا که روش های روتین نیاز به ساعت های طولانی برای آماده سازی بافت دارند در حالی که MARTP می تواند این زمان را بسیار کوتاه نموده و به تشخیص سریع کمک نماید.

در برخی مطالعات محققان به بررسی مفید بودن روش MARTP در آزمایشگاه و امکان جایگزینی آن به جای روش های روتین سنتی پرداخته اند. به طور مثال L. Ralph Rhor و همکارانش این روش ها را مقایسه نموده اند. آنها تعداد ۱۵۸ جفت نمونه را از ۱۱۱ بیمار به صورت اتفاقی از میان بافت های پذیرش شده روزمره بخش پاتولوژی یک بیمارستان انتخاب نمودند. در هر دو روش نمونه ها ابتدا در محلول 10% Buffered formalin neutral 10% حداقل برای یک ساعت فیکس گردیدند. سپس از میان هر جفت بافت یکی به روش روتین و دیگری به روش MARTP آماده گردید. در هر روش زمان بندی کار برای بافت های کوچک و بزرگ متفاوت بوده، به این ترتیب که در روش سنتی زمان کل آماده سازی بافت برای نمونه های کوچک و بزرگ به ترتیب ۸ و ۱۲ ساعت و در روش MARTP ۱۵ و ۶۰ دقیقه بوده است. در مواردی که نمونه های بزرگ همراه چربی بود هاند نظیر پوست، پستان و روده خصوصاً زمانی که بافت خوب فیکس نشده بود زمان کار در روش MARTP به ۹۰ دقیقه افزایش داده شد که در مقابل ۸ و ۱۲ ساعت در روش روتین کماکان مطلوب به نظر می رسد.

در سال های اخیر ارائه خدمات پزشکی سریع بسیار مورد توجه قرار گرفته زیرا افزایش سرعت ارائه خدمات، منجر به کاهش زمان بستری می شود که گاهی

دانشگاهی به عنوان روش روتین گردد چرا که آنها به مدت سه سال متوالی این تکنیک را به عنوان روش روتین در آزمایشگاه خود انتخاب کردند و توانسته اند از این طریق به بسیاری از نمونه ها در روز دریافت، پاسخ دهند.

در مطالعه های دیگر Lyska L. Emerson و همکاران کیفیت رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی را در بافت های آماده شده با روش های سنتی و MARTP با هم مقایسه نموده اند. آنها تعداد ۳۰ بافت (۲۰ عدد نئوپلاستیک و ۱۰ عدد غیر نئوپلاستیک) را از میان کارهای روزانه بخش پاتولوژی برگزیدند. قطعه ای از بافت را برای MARTP و قطعه ای را برای آماده سازی به روش سنتی جدا نمودند. پس از قالب گیری با روش microarray اسلایدها را آماده نمودند. سپس اسلایدهای آماده شده با ۴۴ مارکر ایمونوهیستوشیمی مختلف رنگ آمیزی گردیدند. در مرحله بعدی دو پاتولوژیست بدون اطلاع از نوع روش آماده سازی، اسلایدها را مورد بررسی قرار داده و وسعت رنگ گرفتن جمعیت سلولی مورد نظر را به ترتیب زیر مشخص نمودند:

- ۱- ۰٪ - ۲۴٪
- ۲- ۲۵٪ - ۴۹٪
- ۳- ۵۰٪ - ۷۴٪
- ۴- ۷۵٪ - ۱۰۰٪

از نظر شدت رنگ آمیزی نیز به ترتیب زیر طبقه بندی صورت گرفته است:

- ۱- ضعیف
- ۲- متوسط
- ۳- قوی

تحلیل نتایج حاکی از ۵/۸۵٪ تطابق در وسعت رنگ پذیری و ۵/۸۶٪ در شدت رنگ آمیزی در بین دو روش می باشد که تطابق کیفیت قابل قبولی محسوب می شود.

بحث

از زمان شروع هیستوپاتولوژی پارانین به عنوان بهترین embedding media تا کنون استفاده شده است. خواص فیزیکی پارانین یعنی آب شدن ساده و جامد شدن در دمای اطاق که به آن درجه سختی می رسد که قابل برش باشد، پارانین راه ماده ارجح برای embedding تبدیل کرده است. قابلیت مهم دیگر پارانین آن است که درجه دمایی که در آن به مایع تبدیل می شود کمتر از آن حدی است که به بافت آسیب بزند.

MARTP به تدریج جای خود را در میان آن دسته از پزشکان بالینی که به مداوای بیماری های حاد و شدید مشغول بودند باز کرد، چرا که روش های روتین نیاز به ساعت های طولانی برای آماده سازی بافت دارند در حالی که MARTP می تواند این زمان را بسیار کوتاه نموده و به تشخیص سریع کمک نماید.

MARTP تکنیک سنتی را از سه طریق: سرعت دادن به مرحله فیکساسیون، آنگیری در یک مرحله و واردسازی پارانین به بافت با دمای بیشتر به خوبی تسریع نموده است.

در روش های سنتی قبل از مرحله embedding باید مراحل متعددی طی شود. ابتدا فیکساسیون متناسب با سایز و نوع بافت و سپس مراحل آنگیری با استفاده از درجات صعودی الکل صورت می گیرد. در مراحل بعدی شفاف سازی با

در سال های اخیر ارائه خدمات پزشکی سریع بسیار مورد توجه قرار گرفته زیرا افزایش سرعت ارائه خدمات، منجر به کاهش زمان بستری می شود که گاهی بسیار گران قیمت است.

سرانجام پس از انجام برش بافت و تهیه اسلایدها، دو پاتولوژیست مجرب بدون اطلاع از اینکه اسلاید مورد مطالعه آنها به چه روشی آماده شده است بررسی نمونه ها را به عهده گرفتند.

روش بررسی نمونه ها به این صورت بوده که مشاهده گران نمونه ها را به صورت: satisfactory, suboptimal but satisfactory و unsatisfactory طبقه بندی کردند. نتایج نشان داد که تقریباً تطابق کاملی بین گزارشات دو پاتولوژیست وجود دارد. نظرات پاتولوژیست ها در دو جدول ۱ و ۲ خلاصه شده است.

جدول ۱: مشکلات بافتی مشاهده شده در روش MARTP

مشکل مشاهده شده	کیفیت بالا	نوع بافت
Poor fixation	Unsatisfactory	رحم
Darkened center of tissue, less penetration?	Suboptimal	رحم
Suboptimal fixation	Suboptimal	رحم
Not optimally fixed fat	Suboptimal	پستان
Suboptimal fixation fatty tissue dropout	Suboptimal	غده لنفاوی
Suboptimal cellular detail	Suboptimal	کولون

جدول ۲: مشکلات بافتی مشاهده شده در روش روتین

مشکل مشاهده شده	کیفیت بالا	نوع بافت
Fragmented tissue	Suboptimal	بیوپسی دستگاه گوارش
Suboptimal clarity and cellular detail	Suboptimal	بیوپسی کبد
Suboptimal clarity and cellular detail	Suboptimal	بیوپسی کبد
Suboptimal cellular detail	Suboptimal	غده لنفاوی
Section too thick	Suboptimal	بیوپسی پروستات
Section too thick	Suboptimal	بیوپسی پروستات
Section too thick	Suboptimal	بیوپسی پروستات
Suboptimal fixation/penetration	Suboptimal	کولون

در روش MARTP ۶ نمونه Suboptimal و یک نمونه Unsatisfactory در حالی که در روش سنتی ۸ نمونه Suboptimal گزارش شدند که از تطابق قابل قبولی برخوردار هستند. از سوی دیگر کیفیت نمای میکروسکوپی بافت ها در هر دو روش شباهت زیادی به یکدیگر داشته و تفکیک آنها غیر ممکن بوده است.

در این مطالعه هیچ گونه تفاوتی در کیفیت اسلایدها بین دو روش MARTP و روش سنتی مشاهده نشده است. از میان ۱۵۸ جفت نمونه تعداد اسلایدهایی که در هر دو روش suboptimal گزارش شدند تقریباً یکسان بوده (۶ مورد در MARTP و ۸ مورد در روش روتین) و تنها یک مورد در روش MARTP، unsatisfactory for diagnosis گزارش شده است.

در نهایت گروه پژوهشگران این مطالعه به این نتیجه رسیده اند که MARTP می تواند جایگزین روش سنتی حتی در آزمایشگاه یک بیمارستان بزرگ

MARTP به تدریج جای خود را در میان آن دسته از پزشکان بالینی که به مداوای بیماری های حاد و شدید مشغول بودند باز کرد، چرا که روش های روتین نیاز به ساعت های طولانی برای آماده سازی بافت دارند در حالی که MARTP می تواند این زمان را بسیار کوتاه نموده و به تشخیص سریع کمک نماید.

7. L.Ralph Rohr, MD, Lester J. Layfield, Deborah Wallin, HT (ASCP), and Denise Hardy, HT (ASCP). A Comparison of Routine and Rapid Microwave Tissue Processing in a Surgical Pathology Laboratory. *Am J Clin Pathol* 2001; 115:703-708
8. Lyska L.Emerson, MD, Sheryl R. Tripp, Mt(ASCP), QIHC(ASCP), Bradley C.Baird, MS, Mstat, Lester J. Layfield, MD, and L.Ralph Rohr, MD. A comparison of immunohistochemical stain quality in conventional and rapid microwave processed tissues. *Am J Clin Pathol* 2006; 125: 176-183.
9. Mac-Moune Lf, Lai KN, Chew EC, et al. Microwave fixation in diagnostic renal pathology. *Pathology*. 1987; 19: 17-21.
5. Kok LP, Boon ME, Suurmeijer AJ. Major improvement in microscopic-image quality of cryostat sections: combining freezing and microwave-stimulated fixation. *Am J Clin Pathol*.1987; 88: 620-623.
10. Ruijter Et, Miller GJ, Aalders TW, et al. Rapid microwavestimulated fixation of entire prostatectomy specimens. *JPathol*. 1997; 183: 369-375.
11. Margo CE, Saxe S, Grossniklaus HE. Microwave-stimulated chemical fixation of whole eyes. *Ophthalmology*. 1992; 99: 1117-1122.
12. Margo CE, Saxe S, Grossniklaus HE. Microwave-stimulated chemical fixation of whole eyes. *Ophthalmology*. 1992; 99: 1117-1122.

گزیلن و بعد وارد کردن پارافین به بافت انجام می شود. این روش بین ۱۲-۸ ساعت به طور معمول طول می کشد. MARTP تکنیک سنتی را از سه طریق سرعت دادن به مرحله فیکساسیون، آگیری در یک مرحله و واردسازی پارافین به بافت با دمای بیشتر به خوبی تسریع نموده است. MARTP به سایر شاخه های پاتولوژی نیز وارد شده و سرعت و کیفیت کار را بهبود بخشیده است. Mac-Moune نتایج خوبی را از ایمونوفلورسانس بیوپسی های کلیه که توسط میکروویو در سالین فیکس شده بودند به دست آوردند. Kok و همکاران با استفاده از روش میکروویو برای فیکس کردن اسلایدهای تهیه شده در روش frozen section که با محلول اتانول و polyethylene glycol پوشیده شده بودند به کیفیت خوبی از اسلایدها بدون افزایش زمان پاسخ دهی دست یافتند. تجربیات دیگر حاکی از مفید بودن MARTP در فیکساسیون whole prostate gland و whole eye می باشد. از سایر مزایای MARTP آن است که در این روش از ماده سمی گزیلن استفاده نشده و مصرف فرمالین به حداقل رسیده، لذا بین پرسنل آزمایشگاه مقبولیت یافته است. لازم به ذکر است در مواردی که پاتولوژی نقش اساسی در تعیین سریع روش درمان مانند رد پیوند کلیه و نیز موارد Rapid progressive glomerulonephritis (RPGN) MARTP بسیار کمک کننده است. مجموعه دستاوردهای فوق مؤید آن است که MARTP واجد قابلیت های لازم برای استفاده روتین در بخش پاتولوژی بوده و می تواند سرعت و کیفیت خدمات آزمایشگاه پاتولوژی را بهبود بخشد.

MARTP تکنیک سنتی را از سه طریق: سرعت دادن به مرحله فیکساسیون، آگیری در یک مرحله و واردسازی پارافین به بافت با دمای بیشتر به خوبی تسریع نموده است.



References:

1. Mayers CP. Histological fixation by microwave heating. *J Clin Pathol*. 1970; 23:273-275.
2. Lyska L.Emerson, MD Sheryl R. Tripp, MT(ASCP), QIHC(ASCP), Bradley C. Baird, MS, Mstat, Lester J. Layfield, MD, and L. Ralph Rohr, MD. A comparison of immunohistochemical stain quality in conventional and rapid microwave processed tissues. *Am J Clin Pathol* 2006; 125:176-183.
3. Lyaka L.Emerson, MD, Sheryl R. Tripp, MT(ASCP), QIHC(ASCP), Bradley C. Baird, MS, Mastat, Lester J. Layfield, MD, and L>Ralph Rohr, MD. A comparison of immunohistochemical stain quality in conventional and rapid microwave processed tissues. *Am J Clin Pathol* 2006;125:176-183.
4. Morales AR, Nassiri M, Kanhou R, et al. Experience with an automated microwave-assisted rapid tissue processing method: validation of histologic quality and impact on the timeliness of diagnostic surgical pathology. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:528-536.
5. Leong AS-Y. Microwaves and turnaround times in histopathology: is this a new era histotechnology. *Am J Clin Pathol* 2004; 121:460-462.
6. Leong AS-Y. Microwave techniques for diagnostic laboratories. *Scanning*. 1993;15:88-98.

بولتن داخلی

مدیر مسئول: دکتر محمد رضا حکمت
 به کوشش گروه علمی آزمایشگاه دنا (نیلوفر سابق)
 دکتر مسعود گرشاسبی، دکتر میترا رفیع زاده، دکتر نوشین ندایی
 دکتر محمد رضا حکمت

گروه آزمایشگاه های دنا

۱- تهران، آزمایشگاه دنا (نیلوفر سابق)، خیابان ولیعصر، بین بیمارستان دی و پل همت، خیابان نیلو، نبش بن بست دوم
 تلفن: ۴۳۹۳۶

۲- اسلامشهر، آزمایشگاه گامت، خیابان امام سجاد (زر افشان)، نبش کوچه ۲۱ (شهید موسوی)، پلاک ۳
 تلفن: ۵۶۳۴۰۲۴۳

۳- کرج، آزمایشگاه دنا، خیابان طالقانی شمالی، بالاتر از خیابان بهار، نبش خیابان کاج، پلاک ۱۵۱
 تلفن: ۰۲۶-۳۲۲۱۳۵۹۵