اهمیت مطالعه هیستوپاتولوژیک و آماده سازی بافت های میگو برای مطالعات آسیب شناسی

محمد علی نظاری*[1]، وحید یگانه[1]، اشکان اژدی[1]، مریم میربخش[1]، محمد خلیل پذیر[1]
پژوهشکده میگوی کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران.
Ma. nazari89@gmail.com

چکیده:
بدیهی است در هنگام بروز یک بیماری در میگو، تغییراتی در بافت‌های مختلف بدن ایجاد می‌شود که در واقع مطالعه همین تغییرات مبنا و اساس پاتولوژی را تشکیل می‌دهد. بافت شناسی به عنوان یک ابزار تشخیص، بیماری را معلوم می‌کند ولی باید کلیه اطلاعات محیطی و بهداشتی به دست آمده یک جا جمع شود تا تصویر کامل تری از بیماری ارائه شود. هر چند از تکنیکهای تشخیصی سریع شبیه روش PCR که بسیار حساس و اختصاصی بوده نیز می توان استفاده نمود ولی در این روش معمولا از یک بافت مشخص برای شناسائی پاتوژن مشخص استفاده می‌شود و نمی توان در این روشهای اختصاصی، سایر پاتوژنها را مشخص کرد، که ممکن است سبب آلودگی میگو شده اند. بدون آماده سازی اولیه مناسب و تهیه مقاطع پاتولوژیک و اسلایدهای ارزشمند از آثار و ضایعات پاتوژن های بافتی، امر تشخیص قطعا دچار مشکل خواهد بود. بنابراین بهترین روش برای تشخیص بیماری‌ها به ویژه بیماریهای ویروسی و باکتریایی روش آسیب شناسی است. این روش می‌تواند تائیده ای طلائی بر روشهای دیگر باشد که در اصل به مطالعه و شناسایی اختلالات عملی و تغییرات ساختاری بافت ها می‌پردازد و بر اساس عوامل ظاهری و آرایش سلولها در ساختار طبیعی یک بافت نوع بیماری هدف، توسط میکروسکپ نوری و فراتر از آن میکروسکپ الکترونی تشخیص داده می‌شود.

کلمات کلیدی: میگو، آسیب شناسی، عوامل بیماریزا، تشخیص

مقدمه:

پیشرفت های شگرف و عظیم در حیطه علم آسیب شناسی، اطلاعات جدید و دستاوردهای بسیار ارزشمندی را در علوم تشخیصی آزمایشگاهی ایجاد نموده است، بطوریکه در اکثر آزمایشگاه های تشخیصی و تحقیقاتی دنیا با روش های پیشرفته پاتولوژی این مهم حاصل شده است (حقیقی خیابانیان اصل، 1386). ساختار و عملکرد بنیانی سلول در اجزای درونی آن نهفته است و بیماری را میتوان بر اساس تغییراتی که در سلول رخ می دهد تشخیص داد. این نظریه در خصوص آسیب شناسی سلولی نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار شد و زمینه ساز پیشرفت علم آسیب شناسی بافتی گردید. برای تشخیص و کنترل این بیماری های میگو در مزرعه ضروری است کهدر کنار سایر روش های تشخیصی از جمله روش های نوین ملکولی از بافت شناسی نیز به عنوان یک ابزار تشخیص، تکمیلی استفاده کرد ولی تشخیص نهایی عامل بیماری باید با در نظر گرفتن اطلاعات محیطی و بهداشتی به دست آمده و علایم آسیب شناسی انجام گیرد تا تصویر کامل تری از بیماری ارائه شود . انجام نسبتا آرام مراحل آسیب شناسی مشکل اصلی در این روش است که ممکن است چند روز طول بکشد. در این مقاله، روشهای نمونه برداری، آماده سازی نمونه های بافتی تا مرحله تهیه اسلاید که توسط میکروسکپ نوری قابل مشاهده شوند شرح داده شده است.

روش کار

انتخاب، جمع آوری و فیکس کردن (ثابت کردن) نمونه ها

اولین مرحله برای انجام عملیات آسیب شناسی در میگو، جمع آوری نمونه است که برای آماده کردن نمونه ها از روش استاندارد مربوط به آن استفاده می‌شود (Lightner, 1996). برای تشخیص یک بیماری، بخصوص بیماریهای ویروسی باید نمونه هایی را جمع آوری نمود که در وضعیت ظاهری وحرکات خود حالت غیر طبیعی نشان دهند و یا بیمار بنظر برسند. این نمونه‌ها را میتوان در کناره های استخرها مشاهده نمود. درجمع‌آوری نمونه‌ها این نکته حائز اهمیت بوده که فقط نمونه‌های زنده را باید جمع آوری کرد. نمونه‌های تلف شده به علت اتولیز و تغییر دربافت های بدن قابل استفاده نیست. با انجام عملیات فیکس کردن، سلولها و بافتها مانند زمانی که زنده بودند نگهداری و تغییرات پس از مرگ بعد از چند دقیقه شروع می‌شود (افشارنسب، 1386). به منظور جلوگیری از هضم بافت توسط آنزیم ها (اتولیز) ویا باکتریها، پایداری و حفظ ساختمان مرفولوژی و یا ویژگیهای شیمیایی بافت، جامد کردن مواد کلوئیدی آن، سخت نمودن بافت، سهولت رنگ آمیزی و حفظ درجه انکسار قطعات بافت (تغییرات پس از مرگ وضربه های وارد شده) لازم است که میگوهای زنده بلافاصله بعد از خارج شدن از آب درمعرض مواد شیمیایی مخصوصی قرار گیرند که به این عمل، ثبوت بافت یا

فیکساسیون (Fixation)، و به مواد شیمیایی، ثابت کننده یا فیکساتیو (Fixative) می‌گویند (دکتر بهروزی، 1384). از بهترین فیکس کننده ها برای میگو محلول فیکساتور آ اف آ داویسون می باشد. زیرا این فیکساتور دارای اسید استیک بوده و می تواند کلسیم را از پوسته خارجی میگو جدا نموده و به عمل برش دادن بافتها کمک نماید (Humason,1972)1972 Davidsons AFA). میگوها را بایستی با توجه به اندازه آن (کوچک وبزرگ بودن) به مدت 12 تا 72 ساعت در محلول داویدسون نگهداری نمود. لاروها و پست لاروها را میتوان مستقیما" در محلول فیکس کننده به مدت 12تا24 ساعت غوطه‌ور نمود و سپس به الکل 50-70 ٪ منتقل و در محیط آزمایشگاه نگهداری کرد ولی در میگوهای بزرگتر مطابق اندازه از24 تا 72 ساعت در محلول فیکساتیو قرار می‌دهیم (افشار نسب، 1386).

آماده سازی، برش و عملیات رنگ آمیزی بافتها:

بعد از فیکس کردن بافتها را قبل از اینکه برای قالب گیری آماده کنیم برش می‌دهیم. در برش از وسیله ای تیز استفاده نموده بطوریکه بافتها دچار صدمه یا خراشی نشوند. با توجه به اندازه‌ی (کوچک و بزرگ بودن) میگوها، عملیات برش انجام می‌شود. انجام برش در میگوهای بزرگتر از سه سانتی متر در قسمت سرسینه، بند اول، سوم و ششم و در میگوهای کوچکتر به صورت طولی برش داده می‌شود. پس از آن جهت آماده کردن بافتها (Processing) و آبگیری از آنها با غلظت درصدهای مختلف و طی مراحلی آماده سازی و قالب‌گیری (Embedding) به وسیله پارافین مذاب با دمای مناسب انجام می‌شود. پس از آن توسط دستگاهی بنام میکروتوم عملیات برش (مقطع گیری) به ضخامت 6 تا-3 میکرون انجام می‌شود (افشار نسب، 1386). تیغه باید تیز، محکم، بدون حرکت و زاویه صحیح داشته باشد. سپس به تدریج تمام سطح قالب با تیغه تماس حاصل می‌کند .

برای کلیه روشهای رنگ آمیزی سلولی، برش های ایجاد شده از قالب های پارافینی ابتدا باید از پارافین پاک شده و سپس آبگیری شوند. به منظور جداسازی پارافین از برش های تهیه شده، لام ها را در راک رنگ آمیزی قرار داده و دریک آون با حرارت 50 تا60 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه قرار داده می‌شود. با این کار علاوه بر اینکه برش ها روی سطح لام می چسبند، پارافین ها نیز پاک می شوند. سپس راک حاوی لام ها به ترتیب در محلول‌های آماده شده با توجه به زمان های اعلام شده در رنگ آمیزی، انتقال داده می شوند.

برای مطالعه بافتهای میگو در آسیب شناسی، بهترین رنگ آمیزی استفاده از رنگ هماتوکسلین وائوزین/ فلوکسین می‌باشد که بافتهای تهیه شده را که روی لام ثابت نموده، آبگیری و با هماتوکسیلین و ائوزین / فلوکسین رنگ آمیزی می‌شود. به منظور ساختن لامهای دائمی، ضروری است بعد از رنگ آمیزی نیز عملیات آبگیری انجام شود و لامها را به با مواد ضدآب پوشاند. به این معنا که مرحله مونت یا روکش کردن (Cover Slipping) انجام شود. در این مرحله روی برشهای رنگ آمیزی شده لامل مخصوص چسبانده می‌شود تا برش‌های روی لام از خراشیدگی و آسیب های دیگر برای سالیان دراز در امان باشند. توانایی تنظیم زمان در مراحل رنگ آمیزی به دلیل نوع بافت، اسیدی و قلیایی بودن رنگ ها درجهت بالا بردن رنگ آمیزی کیفیت یک اسلاید مناسب، کمک خواهد کرد.

نتایج آسیب شناسی درتشخیص بیماریها:

در تشخیص بیماریها، رنگ آمیزی بافتها حائز اهمیت می باشد. در رنگ آمیزی H & E، ترکیب هماتوکسیلین (آبی) یک ماده رنگی بازی است و ساختمانهایی که با آن رنگ می‌گیرند، به رنگ آبی تا بنفش دیده می‌شوند و به ساختمانهای بازوفیل موسوم هستند. ائوزین یک ماده رنگی اسیدی است و ساختمان هایی که با آن رنگ می‌گیرند، به رنگ قرمز دیده می‌شوند و به ساختمان اسیدوفیل یا ائوزوینوفیل موسوم‌اند. به عنوان مثال هسته بازوفیل و سیتوپلاسم اسیدوفیل است.کوتیکول و فیبرهای عضلانی به رنگ صورتی در می‌آیند (افشارنسب، 1386). رنگهای خنثی نیز بیشتر محلول در الکل و از ترکیب دو رنگ اسیدی و قلیایی حاصل می‌شوند. این رنگها هر دو ساختارهای اسیدی و قلیایی بافت ها را رنگ می کنند (حقیقی خیابانیان اصل، 1386). تفسیر نتایج رنگ آمیزی به مهارت و تجربه نیاز داشته و شخص باید به احتمال تغییرات ناشی از ماهیت آگاهی داشته باشد. اشتباه در تفسیر، ناشی از اشکالات تکنیکی و یا اشکال در نحوه خواندن نتایج است (سقاء و همکاران، 1382). با مطالعه تخصصی‌تر می‌توان با توجه به روشها و تکنیکهایی که هدف آن ها بررسی ساختمان اجزاء سلول و بافت ها (Tissue Structure) هستند به شناسایی بهتر عوامل بیماریزا پی برد با این روش تشخیص بیماریهای ویروسی، باکتریایی، قارچی، انگلی و سایر بیماریها (عوامل گوناگون) را می توان تفسیر کرد (پوستی و همکاران، 1385).

فهرست منابع:

1- افشارنسب، م. 1386. روشهای تشخیص بیماریهای میگو. موسسه تحقیقات شیلات ایران-مدیریت اطلاعات علمی. چاپ اول.
2- بهروزی، ش. 1384. روشهای آزمایشگاهی بیماری آبزیان - هیستوپاتولوژی. وزارت جهاد کشاورزی-موسسه تحقیقات شیلات ایران . پژوهشکده اکولوژی دریای خزر. جلد اول
3- پوستی، ا. ادیب مرادی، م. 1385. روش های آزمایشگاهی بافت شناسی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ اول.
4- حقیقی خیابانیان اصل، عادل. زمستان 1386. کتاب آسیب شناسی ماهی و میگو. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی. چاپ اول.
5- سقاء، ح، ر. سروش نیا، م وهمکاران.1382. کتاب جامع تجهیزات وفرآوردهای آزمایشگاهی.شرکت توسعه خدمات آزمایشگاهی ایران بهیما طب (سهامی خاص). جلد دوم. ویرایش دوم. ص 2686.
6- - Lightner D. 1996. Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp.section 2.
7- Humason, G. L (ed.) 1972. Animal Tissue Technique. 3th. W. H. Freeman and Co, San Francisco, C A.

،[1]