

دستورالعمل فنی پردازنده‌های بافتی (TP) Tissue Processors

کلیات

این دستگاه نمونه‌های بافتی را برای انجام قالب‌گیری و تهیه برش‌های بسیار نازک با میکروتوم و رنگ‌آمیزی آماده می‌کند.

این دستگاه به دو روش متداول TP Conventional Overnight (CTP) و سریع Fully Automated Microwave – Associated Rapid TP (RTP) عمل می‌کنند.

چگونگی کاربری

الف - روش متداول (CTP): بیش از یکصد سال از قدمت این روش می‌گذرد. اصول این روش به شرح زیر است:

بافت‌های برش خورده را داخل سبد (Basket) فلزی یا کائوچو قرار داده و آنها را داخل حامل‌های سبکی (Basket carrier) گذاشته و زمان تعویض ظروف را تنظیم کرده و سپس دستگاه را روشن می‌کنیم. این دستگاه دارای ۱۲ ظرف (container) است و تغییرات لازم در بافت‌ها را طی چهار مرحله ثبوت (Fixation)، آب‌گیری (Dehydration)، شفاف‌سازی (Cleaning) و آغشتگی (Impregnation) به پارافین به ترتیب زیر ایجاد می‌نماید:

برای ثبوت از دو ظرف فرمالین ۱۰٪ استفاده می‌گردد. مراحل آب‌گیری به‌وسیله شش ظرف اتانول به ترتیب ۷۰، ۹۰، ۹۶، ۱۰۰ و ۱۰۰ درجه انجام می‌شود. سپس بافت از دو ظرف گزینول برای شفاف‌سازی عبور می‌کند و در نهایت در دو ظرف پارافین مایع با دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد ($2^{\circ}\text{C} \pm 56$) قرار می‌گیرد. در مدل‌های جدیدتر جهت نفوذ بهتر پارافین در نمونه‌های بافتی بر روی ظرف پارافین دوم یک پمپ خلا (vacuum unit) قرار گرفته است.

زمان بندی توصیه شده برای قرار دادن بافت‌ها در ظرف حامل محلول‌ها به ترتیب زیر است:

- ظروف فرمالین هر کدام به مدت دو ساعت
 - ظروف الکل هر کدام به مدت یک ساعت به جز ظروف الکل ۱۰۰ درجه هر کدام به مدت دو ساعت
 - ظروف گزینول هر کدام به مدت ۱/۵ ساعت
 - ظروف پارافین اول به مدت دو ساعت و دوم به مدت سه ساعت
- البته با توجه به کیفیت لام‌های تهیه شده این زمان‌بندی را می‌توان اندکی تغییر داد و کالیبر نمود.

ب - روش سریع (RTP): این دستگاه‌ها براساس امواج مایکروویو عمل نموده و نمونه‌ها یا برش‌های بافتی تازه یا ثابت شده در فرمالین را که ضخامت آنها حداکثر ۱/۵mm باشد، در مدت ۶۸ دقیقه پروسس می‌نمایند. از مزایای این روش این است که هر ۱۵ دقیقه می‌توان نمونه جدیدی را به دستگاه داد. کیفیت DNA و RNA استخراج شده بافتی به مراتب بهتر از روش CTP است.

نگهداری

الف - پاک کردن (Cleaning) و مراقبت از دستگاه:

توجه کنید در هنگام تمیز کردن، دستگاه باید از منبع تغذیه قطع گردد. برای تمیز کردن ظروف، سید و حامل سید از آب گرم و پاک‌کننده‌های معمولی استفاده می‌کنیم. در مورد ظروف پارافین، ابتدا پارافین گرم را داخل ظرف مناسبی ریخته و پارافین باقی‌مانده را پس از سرد شدن با اسپاجولای غیرفلزی می‌تراشیم (استفاده از گریلول توصیه نمی‌گردد). زنگ را با آب و حلال مناسب پاک می‌کنیم. قطرات پارافین ریخته شده باید روزانه تمیز شوند و به‌علاوه سطح محلول‌ها و پارافین کنترل شود. قطعات مکانیکی دستگاه باید هر شش ماه یک‌بار کنترل شوند.

کنترل قطعات الکتریکی باید توسط کارشناسان فنی مجرب و آشنا به سیستم صورت گیرد.

ب- دمای حمام پارافین:

دمای حمام پارافین معمولاً حدود $56 \pm 2^\circ\text{C}$ است. دما باید به‌طور روزانه کنترل گردد و با استفاده از پیچ تنظیم در دمای مناسب قرار داده شود. باید توجه شود که دمای حمام پارافین با نقطه ذوب پارافین خریداری شده متناسب باشد.

کنترل کیفیت

تعداد ۵۰-۱۰۰ نمونه پاتولوژی (با توجه به منابع مختلف) به‌صورت تصادفی جهت کنترل کیفی توسط یک پاتولوژیست انتخاب می‌گردد. پس از رنگ‌آمیزی H&E، کیفیت لام در دو گروه Satisfactory یا Suboptimal قرار گرفته و نتایج ارزیابی می‌شود. دمای حمام پارافین را روی منحنی حرارت ثبت نموده و بر مبنای نتایج آن تصمیم‌گیری می‌گردد. حمام پارافین باید درجه حرارت قابل تنظیم به‌وسیله ترموستات داشته و با یک دماسنج که داخل آن قرار می‌گیرد، دمای روزانه آن ثبت شود. تنظیم دما به نوع پارافین بستگی دارد ولی به‌طور کلی نباید از 60°C بالاتر رود. سطح محلول‌های داخل ظروف باید از قسمت فوقانی آنها حدود $2/4$ سانتی‌متر فاصله داشته باشد و محلول‌ها بسته به حجم و تعداد بافت‌ها و حجم کاری به‌طور منظم تعویض گردند. هر گاه ثبوت بافت به‌درستی انجام نگیرد وسط قالب خراب شده و بافت داخل آن خشک و چروکیده می‌شود.

چنانچه آب‌گیری کامل انجام نگیرد، باعث ایجاد اشکال در مراحل شفاف کردن و آغشتگی می‌گردد که نتیجه آن چروکیدگی و خشکی نمونه‌ها و همچنین ایجاد فرورفتگی در سطح بلوک است. برش‌های حاصل از این بلوک‌ها روی حمام آب بافتی تکه تکه و جدا می‌گردند. اگر آغشتگی با پارافین کامل نباشد وسط بلوک نرم و بوی ماده شفاف‌کننده را می‌دهد. بلوک‌ها باید یکنواخت و شفاف باشند، چین‌دار یا خط‌خطی بودن آنها به علت پارافین یا موم متبلور شده است. اگر بافت‌ها بسیار سخت باشند ممکن است به‌علت وجود نسوج ضخیم کلاژن،

استخوان، پوست، چشم و تیروئید کلونیدی و دکالسیفیکاسیون ناکامل و بدی ثبوت، حرکت سریع از آب به داخل الکل با درجه بالا، زیاد ماندن در گزیلول یا زیاد ماندن در حمام پارافین و یا بالا بودن درجه حرارت حمام پارافین باشد.

چنانچه نسوج خیلی چرب بوده و قابل برش نباشند، علت آن است که چربی بافت خوب گرفته نشده است. پس باید بافت بار دیگر داخل ماده شفاف کننده قرار گیرد و سپس پردازش از آن مرحله ادامه یابد.

بافت‌های مختلفی که داخل یک بلوک قرار می‌گیرند باید از نظر نوع و چگالی با یکدیگر هماهنگ باشند. اگر بافت‌ها بد پردازش شده باشند، باید بلوک‌ها را دوباره در گزیلول قرار داد تا پارافین آنها برداشته شود و سپس در الکل مطلق، ۹۵، ۸۰ درجه قرار گیرند و به ملایمت دهیدراته و شفاف شوند و با پارافین آغشته شده و مجددا قالب‌گیری شوند.

کالیبراسیون

تنظیم کردن زمان قراردادن بافت‌ها در ظرف‌های حامل محلول‌ها با توجه به کیفیت لام‌های تهیه شده صورت می‌پذیرد که معمولا به صورت تجربی می‌توان این زمان‌ها را تا رسیدن به مقدار بهینه تغییر داد.

کالیبر کردن دستگاه با توجه به راهنمای دستگاه در زمان مقرر توسط شرکت مربوطه صورت می‌گیرد.

ایمنی

با توجه به عوارض مواد شیمیایی مصرفی مانند فرمالین و گزیلول، کاربران باید حین انجام کار از دستکش و ماسک مناسب استفاده نمایند. برقراری تهویه مناسب در محل استقرار دستگاه ضروری است. به علت استفاده از محلول‌های با قابلیت اشتعال، از قراردادن شعله باز یا عوامل احتراق‌زا در نزدیکی دستگاه جلوگیری شود.

در روش سریع (RTP) به علت عدم استفاده از محلول‌های بالا احتمال ایجاد عوارض برای کاربر کمتر است.