หลักการเก็บรักษาเนื้อเยื่อทางชีวภาพ โดยวิธีกำซาบด้วยสารพลาสติก

เอมอร เจริญสธรพพีช, วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์)*
อุทัย ตันกิตติวัฒน์, สพ.บ.*

บทคัดย่อ การเก็บรักษาเนื้อเยื่อทางชีวภาพโดยวิธีกำซาบด้วยสารพลาสติก (plastination) ถูกคิดค้นและพัฒนาขึ้นมาโดย Dr. Gunther von Hagens จากมหาวิทยาลัยไฮเดลเบอร์ก ประเทศเยอรมันนี สำหรับเก็บรักษาเนื้อเยื่อทางชีวภาพไม่ให้เน่าและมีลักษณะเหมือนธรรมชาติ โดยมีหลักการว่าน้ำและไขมัน ในเนื้อเยื่อจะถูกแทนที่ด้วยโพลิเมอร์ โดยการใช้ขั้นตอนการทำให้เป็นสูญญากาศ สารพลาสติก เช่น ซิลิโคน อีพ็อกซี่เรซิน หรือโพลีเอสเทอร์เรซิน ก็จะกำซาบเข้าสู่เนื้อเยื่อ คุณสมบัติของเนื้อเยื่อที่กำซาบด้วยสารพลาสติกที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของโพลิเมอร์ที่ใช้ เช่น อาจมีความยืดหยุ่นได้ หรือแข็ง และขุ่นหรือโปร่งใส เนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนการเก็บรักษาโดยการกำซาบด้วยสารพลาสติก แล้วจะมีลักษณะแห้ง ไม่มีกลิ่น คงทนถาวร เก็บรักษาไว้ได้นาน และสามารถจับต้องได้อย่างใกล้ชิด

Abstract **Principles of plastination.**

Em-orn Jaroensuppaperch, MSc. (Anatomy)*
Uthai Tankittiwat, D.V.M.*

Plastination invented by Dr. Gunther von Hagens from University of Heidelberg, Germany is a unique method of preserving tissue in a life like state. In the plastination technique, biological tissue water and lipids are replaced by cured polymers through forced impregnation. It is a vacuum process in which biological specimens are impregnated with a reactive polymers such as silicone rubber, epoxy or polyester resin. The improved properties of plastinated specimens are mainly accounted for by the superior quality of curable polymers. The class of polymer used determines the mechanical (flexible or firm) and optical (opaque or transparent) properties of the specimens. Plastination specimens are dry, odorless, durable, last indefinitely and can literally be grasped.

(MJS 1997 ; 2 : 95 - 99)

* ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University.

บทนำ

ตามปกติการเก็บรักษาเนื้อเยื่อหรืออวัยวะทางชีวภาพไม่ให้เน่า มักจะใช้น้ำยาดองฟอร์มาลิน โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยะที่ต้องการมาดองไว้ในน้ำยาดองฟอร์มาลินในโหลที่ทำด้วยพลาสติกใส ซึ่งการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไม่ให้เน่าด้วยวิธีนี้มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ไม่สามารถจับต้องได้และอาจมีการระเหยของน้ำยาดองหรือการรั่วซึมของน้ำยาดองทำให้ต้องคอยเติมน้ำยาดองอยู่เสมอ นอกจากนี้ในขั้นตอนการเตรียมน้ำยาดองฟอร์มาลินที่ระเหยขึ้นมายังระคายเคืองต่อเยื่อบุตาและเยื่อเมือกระบบทางเดินหายใจ ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ตั้งแต่อดีตที่ผ่านมานักกายวิภาคศาสตร์จึงได้พยายามค้นหาวิธีเพื่อจะเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อทางชีวภาพไม่ให้เน่าโดยให้เนื้อเยื่อที่ได้มีลักษณะแห้งคงทนถาวร เก็บไว้ได้นานและสามารถจับต้องได้ โดยไม่ต้องดองไว้ในน้ำยาดองฟอร์มาลินซึ่งมีหลายวิธี เช่น วิธีการใช้พาราฟิน[1] (paraffinization technique) เนื้อเยื่อที่ได้จะมีลักษณะแห้งและเหมือนธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากพาราฟินไวต่อความร้อนทำให้เหลวได้ง่ายและติดไฟได้ ปัจจุบัน Dr.Gunther von Hagens นักกายวิภาคศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยไฮเดลเบอร์ก ประเทศเยอรมันนี ได้คิดค้นวิธีการสำหรับการเก็บรักษาเนื้อเยื่อทางชีวภาพโดยการกำซาบด้วยสารพลาสติก ที่เรียกว่า plastination[1] โดยมีหลักการว่าน้ำและไขมันในเนื้อเยื่อจะถูกแทนที่โดยสารพลาสติก เช่น ซิลิโคน อีพ็อกซี่เรซิน หรือโพลีเอสเทอร์เรซิน ทำให้เนื้อเยื่อที่ได้มีลักษณะแห้ง ไม่มีกลิ่น คงทนถาวรเก็บรักษาไว้ได้นานและจับต้องได้สามารถนำมาใช้ศึกษา หรือจัดแสดงไว้ในพิพิธภัณฑ์ทางกายวิภาคศาสตร์ได้เป็นอย่างดี เทคนิคนี้นอกจากจะใช้เก็บรักษาเนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาทางกายวิภาคศาสตร์แล้วยังสามารถใช้ในการเก็บรักษาเนื้อเยื่อเพื่อใช้ศึกษาทางพยาธิวิทยา นิติเวชวิทยา และเนื้อเยื่อทางชีวภาพอื่น ๆ[1] ได้อีกด้วย

ขั้นตอนการเก็บอวัยวะเนื้อเยื่อโดยวิธีกำซาบด้วยสารพลาสติก (principle of the plastination procedure) มี 4 ขั้นตอน ที่สำคัญคือ

1. Fixation[1,2,6]

ส่วนมากเนื้อเยื่อทางชีวภาพที่จะนำมาทำการกำซาบด้วยสารพลาสติกต้องเริ่มต้นด้วยการดองเนื้อเยื่อก่อนสามารถกระทำได้โดยใช้เทคนิคการดองเนื้อเยื่อที่ใช้อยู่ทั่วไป น้ำยาดองที่รู้จักกันดีและนิยมใช้ในขั้นตอนการเก็บรักษาเนื้อเยื่อโดยวิธีการกำซาบด้วยสารพลาสติกคือ น้ำยาดองฟอร์มาลิน โดยใช้ความเข้มข้น 1-20% ปกติจะใช้ความเข้มข้นประมาณ 5% โดยการผสมน้ำยาดองฟอร์มาลิน 5 ส่วน ต่อน้ำ 95 ส่วน โดยปริมาตรวิธีการดองด้วยน้ำยาดองฟอร์มาลินมีหลายวิธี เช่น การฉีดน้ำยาดองเข้าทางหลอดเลือดแดงในคนที่เสียชีวิต และการ perfusion กรณีเป็นสัตว์ทดลอง ส่วนอวัยวะที่ตัดออกมาสามารถดองได้โดยการแช่ไว้ในน้ำยาดองฟอร์มาลิน เพื่อให้น้ำยาดองแทรกซึมเข้าไป ขณะทำการดองต้องให้เนื้อเยื่ออยู่ในสภาพธรรมชาติ

2. Dehydration[1,6]

เนื่องจากสารโพลีเมอร์ที่ใช้ไม่สามารถกำซาบเข้าแทนที่น้ำและไขมันที่อยู่ในเนื้อเยื่อได้โดยตรง จึงต้องทำการดึงน้ำและละลายไขมันออกก่อน ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อในขบวนการเก็บรักษาเนื้อเยื่อโดยวิธีการกำซาบด้วยสารพลาสติกโดยวิธีการที่เรียกว่า freeze substitution เป็นการแช่เนื้อเยื่อลงในน้ำยาอะซีโตน (acetone) ที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3-5 สัปดาห์ โดยให้เปลี่ยนน้ำยาอะซีโตน 2-3 ครั้ง ข้อเสียของวิธีการทำ freeze substitution คือการทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งในเนื้อเยื่อโดยเฉพาะเนื้อเยื่อที่จะใช้ศึกษาทางจุลภายวิภาคศาสตร์ (histology) แต่สามารถป้องกันได้โดยใช้น้ำยาดองฟอร์มาลินเข้มข้น 20-100% ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารป้องกันผลึกน้ำแข็งในเนื้อเยื่อได้ ขั้นตอน dyhydration ต้องให้มีน้ำเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อน้อยกว่า 1% ส่วนการละลายไขมันออกจากเนื้อเยื่อให้แช่เนื้อเยื่อไว้ในน้ำยาอะซีโตนที่อุณหภูมิห้อง กรณีเนื้อเยื่อที่มีไขมันมาก เช่น กระดูก ไขมันใต้ผิวหนังและอวัยวะในช่องท้อง อาจละลายไขมันออกจากเนื้อเยื่อในขั้นสุดท้ายด้วย methylene chloride

3. Forced Impregnation[1]

เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญที่สุดของการเก็บรักษาเนื้อเยื่อโดยวิธีการกำซาบด้วยสารพลาสติก ในขั้นตอนนี้สารตัวกลางที่นำเข้าไปแทนที่น้ำและไขมันในเนื้อเยื่อจะถูกแทนที่ด้วยสารพลาสติกโดยแรงดันสูญญากาศโดยมีหลักการคือ เมื่อนำเนื้อเยื่อที่มีสารตัวกลางอะซีโตนหรือ methylene chloride ไปแช่ในสารละลายพลาสติก เนื่องจากสารตัวกลางมีความดันไอสูง และจุดเดือดต่ำ (อะซีโตน : +56°C, methylene chloride : +40°C) ขณะที่สารพลาสติกมีความดันไอต่ำและจุดเดือดสูง เมื่อทำให้เป็นสูญญากาศสารตัวกลางจะค่อยๆ ระเหยออกมาจากเนื้อเยื่อในรูปฟองอากาศสารพลาสติกที่อยู่รอบๆ ก็จะกำซาบเข้าไปแทนที่ ขบวนการ forced impregnation สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อใช้สารพลาสติกเป็นอีพ็อกซี่เรซินและโพลีเอสเทอร์เรซิน หรือในตู้เย็นจัดที่ -25 องศาเซลเซียส ในกรณีที่ใช้ซิลิโคนเป็นสารพลาสติก

4. Curing (hardening)

เป็นขั้นตอนที่ทำให้สารพลาสติกที่กำซาบเข้าไปอยู่ในเนื้อเยื่อแข็งตัวขึ้นโดยขบวนการโพลิเมอร์ไรเซชั่น ซึ่งมี 3 วิธีหลักตามชนิดของสารพลาสติกที่ใช้

4.1 Gas curing[1,5]

ใช้กับเนื้อเยื่อที่ถูกกำซาบด้วยสารซิลิโคนโดยให้เนื้อเยื่อดังกล่าวสัมผัสกับไอระเหยของตัวทำแข็ง BIODUR S6 ในตู้ปิดสนิทโดยใช้เครื่องปั๊มอากาศในตู้ปลา (aquariun air pump) เป็นอุปกรณ์ทำให้ตัวทำแข็ง S6 ระเหยกลายเป็นไอขึ้นมา ไอระเหยของตัวทำแข็ง S6 จะทำให้เกิดการยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของซิลิโคนให้เป็นสายยาวจึงเกิดการแข็งตัวของสารซิลิโคนขึ้น

4.2 การ Curing เนื้อเยื่อที่ถูกกำซาบด้วยอีพ็อกซี่เรซิน (E12) หรือ polymerizing emulsion[1,4,8] ***(PEM)***

โดยใช้ข้อดีของสารเอมีน (amines) ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อ เนื่องจากสารเอมีนของเนื้อเยื่อเป็นตัวเร่ง (accelerators) การแข็งตัวของสารพลาสติกที่มีประสิทธิภาพร่วมกับตัวทำแข็งสารพลาสติกที่ผสมอยู่ในอีพ็อกซี่เรซิน หรือ PEM ดังนั้นการทำให้สารพลาสติกดังกล่าวแข็งตัวขึ้นจึงอบเนื้อเยื่อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสก็เพียงพอ

4.3 การ curing เนื้อเยื่อที่ถูกกำซาบด้วยโพลิเอสเทอร์-โคโพลิเมอร์[1,3,7]

การทำให้สารพลาสติกประเภทนี้แข็งตัวต้องใช้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UVA-light) ตามด้วยการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

เทคนิคการเก็บรักษาเนื้อเยื่อโดยวิธีกำซาบด้วยสารพลาสติก (plastination technique)

การเก็บรักษาเนื้อเยื่อโดยวิธีกำซาบด้วยสารพลาสติกมี 4 เทคนิคตามลักษณะของเนื้อเยื่อที่จะนำมากำซาบด้วยสารพลาสติก คือ

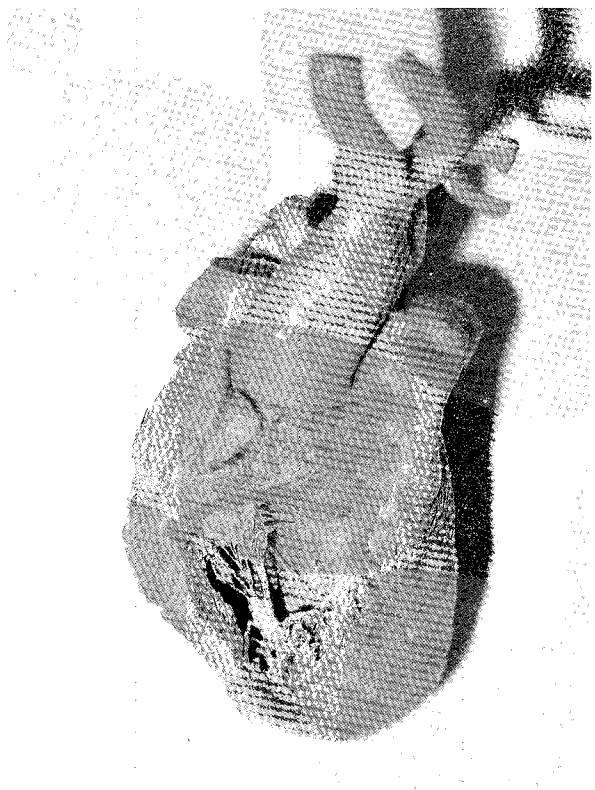
1. Standard silicone technique[1,5]

เทคนิค S10 standard silicone จะทำให้เนื้อเยื่อที่ได้ลักษณะโค้งงอยืดหยุ่นได้และทึบแสง เหมาะสำหรับเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่เป็นอวัยวะหรือทั้งร่างกาย หลังจากขั้นตอน fixation และ dyhydration แล้วจะนำเนื้อเยื่อมากำซาบด้วยส่วนผสมสารซิลิโคน S10 กับตัวทำแข็ง S3 ที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เมื่อเนื้อเยื่อกำซาบด้วยสารพลาสติกอย่างสมบูรณ์แล้วก็จะทำให้สารซิลิโคนในเนื้อเยื่อแข็งตัวโดยอบด้วยไอระเหยของตัวทำแข็ง S6 (รูปที่ 1,2,3)

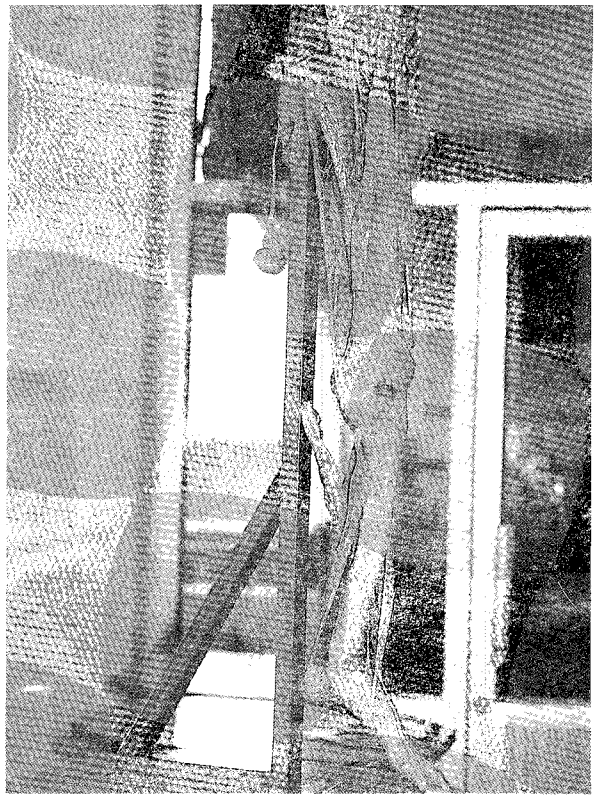
2. Polymerizing emulsion technique[1,4]

เทคนิคนี้เนื้อเยื่อจะกำซาบด้วยสาร polymerizing emulsion (PEM) เนื้อเยื่อที่ได้จะมีลักษณะแข็งและทึบแสงข้อดีของเทคนิคนี้คือ ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างชั้นไขมันซึ่งเห็นเป็นสีขาวกับชั้นกล้ามเนื้อและอวัยวะซึ่งจะเห็นสีน้ำตาลเข้ม วิธีนี้เหมาะสำหรับใช้กับชิ้นส่วนของร่างกายที่ตัดให้เป็นแผ่นหนา 15-30 มิลลิเมตร ขั้นตอนการทำ forced impregnation ของสาร PEM โพลิเมอร์ สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง การทำให้สารพลาสติกแข็งตัวสามารถกระตุ้นการเกิดขึ้นได้โดยสารเอมีนในเนื้อเยื่อและการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนเนื้อเยื่อที่ได้มีลักษณะแห้ง (รูปที่ 4)

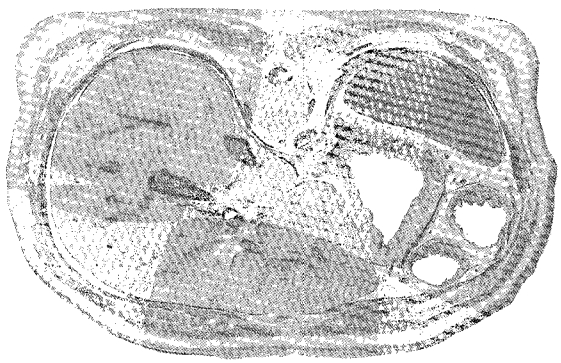
รูปที่ 1 ทารกคู่แฝดในครรภ์แท้งที่อายุ 20 สัปดาห์ กำซาบด้วยสารซิลิโคน S10



รูปที่ 2 หัวใจมนุษย์ แสดงลิ้นหัวใจกำซาบด้วยสารซิลิโคน S10



รูปที่ 3 ขาที่เลาะแสดงกล้ามเนื้อ หลอดเลือด และเส้นประสาทกำซาบด้วยสารซิลิโคน S10



รูปที่ 4 แผ่นลำตัวตัดหนา 2 ซม. กำซาบด้วยสารอีพ็อกซี่-ซิลิโคน โคโพลิเมอร์ (PEM) จะเห็นความแตกต่างระหว่างชั้นไขมันซึ่งเห็นสีขาวกับส่วนของกล้ามเนื้อและอวัยวะซึ่งเห็นสีน้ำตาลเข้ม

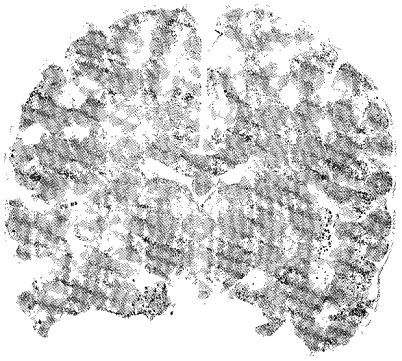
3. Sheet plastination technique สำหรับแผ่นลำตัว[1,8] (body slices)

เทคนิคนี้เหมาะสำหรับเก็บรักษาชิ้นส่วนของร่างกายหรืออวัยวะที่ตัดให้เป็นแผ่นบางประมาณ 2 มิลลิลิตร โดยใช้เทคนิค E12 เนื้อเยื่อที่ได้จะมี

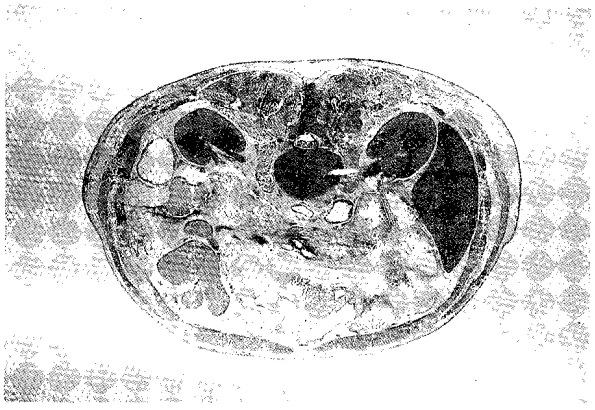
ลักษณะโปร่งใส (transparent) หลังจากที่ dehydration เนื้อเยื่อที่ได้ตัดให้เป็นแผ่นบางด้วยวิธี freeze substitution และละลายไขมันออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ไว้ในอะซีโตนที่อุณหภูมิห้องแล้วแผ่นเนื้อเยื่อที่ได้ก็จะนำมากำซาบด้วยส่วนผสมของอีพ็อกซี่เรซิน E12 กับตัวทำแข็งที่เหมาะสม จากนั้นทำการ curing เนื้อเยื่อไว้ในช่องกระจกที่ทำเป็นแบบหล่อเมื่อเรซินแข็งตัวดีแล้วก็เอาแบบออก และนำไปเลื่อยตบแต่งให้ได้รูปร่างตามต้องการ (รูปที่ 6)

4. Sheet plastination technique สำหรับแผ่นสมอง[1,3,7] (brain slices)

เทคนิคนี้สำหรับเก็บรักษาสมองที่ตัดให้เป็นแผ่นหนา 4-6 มิลลิเมตร โดยใช้เทคนิค P35 หรือ P40 ซึ่งใช้สารพลาสติกประเภทโพลิเอสเทอร์เรซินกำซาบเข้าสู่สมองในขั้นตอน forced impregnation จากนั้นทำให้แผ่นสมองแข็งตัวในเรซินโดยใช้แสงอัลตร้าไวโอเลต และอาจตามด้วยการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เทคนิคนี้จะทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างเนื้อเทา (gray matter) และเนื้อขาว (white matter) ของสมองได้อย่างชัดเจน ทำให้ศึกษารายละเอียดของเส้นใยประสาทและกลุ่มเซลล์ประสาทในสมองดียิ่งขึ้น (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 สมองตัดในแนวโคโรนาลย้อมสี แล้วกำซาบด้วยสารโพลิเอสเทอร์ เรซิน แสดงให้เห็นถึงกลุ่มเซลล์ประสาทและทางเดินของใยประสาทในสมอง



รูปที่ 6 แผ่นลำตัวตัดในแนวขวางหนา 2 มม. ที่ผ่านการทำ Sheet Plastination ด้วย อีพ็อกซี่เรซิน (E 12)

เอกสารอ้างอิง

1. v. Hagens G. The current potential of plastination. Anat Embryol 1987 ; 175 : 411-21.
2. Oostrom K. Fixation of tissue for plastination : General principles. J Int Soc Plastination 1987 ; 1 : 3-11.
3. v. Hagens G. Plastination of brain slices according to the P-40 procedure. Institute for plastination 1994.
4. Lischka M, Prohoda M. Plastination of whole-body slices with polymerizing emulsion. J int Soc Plastination 1987;1: 17-22.
5. Bickley HC, Donner RS. Preservation of tissue by silicone rubber impregnation J Int Soc Plastination 1987;1:30-8.
6. Tiedemann K. Ivic-Matijas D. Dehydration of macroscopic specimens by freeze substitution in acetone. J Int Soc Plastination 1988; 2:2-6.
7. Weber W. Henry RW. Sheet plastination of the brain-P35 technique, Filling method. J Int Soc Plastination 1992; 6:29-33.
8. Weber W, Henry RW. Sheet plastination of body slices-E12 technique, Filling method. J Int Soc Plastination 1993; 7:16-22.