جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الثانية

التخدير القتل التثبيت والتصلد

Anesthetization, Killing, Fixing and Hardening

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الثانية

التخدير القتل التثبيت والتصلد

Anesthetization, Killing, Fixing and Hardening

التخدير Anesthetization

عند تحضير النماذج الكاملة whole mount أو المقاطع sections لبعض الحيوانات خاصة اللافقرية منها invertebrates التي تميل الى التقلص أو سحب مجساتها tentacles أو لواحقها الاخرى appendages أو أن تتكور ball up عند تثبيتها يجب تخديرها قبل عملية التثبيت للمحافظة على شكل الحيوان، كذلك تستخدم عملية التخدير عندما يراد تحضير عضو او جزء من عضو او نسيج لحيوان كبير تفاديا للتشوه الذي قد يحدث لها في حالة قتل الحيوان دون تخديره ومن الطرق والمواد المستخدمة لهذا الغرض نذكر منها ما يلي:

١. الكلوروفورم Chloroform

تستخدم هذه المادة لتخدير انواع مختلفة من الحيوانات وبطرق متنوعة فمثلا عندما يراد تخدير الحيوانات المائية aquatic animals توضع بضع قطرات على سطح الماء أو بضع قطرات في قناني خاصة عند تخدير الحشرات insects والعنكبوتيات Arachnids.

٢. الايثر والكحول Ether and alcohol

يستخدم كل منها بصورة خاصة لتخدير حيوانات المياه العذبة fresh water animals والديدان الأرضية earth worms وتتم عملية التخدير باضافة الكحول إلى الماء بصورة تدريجية بواسطة أنبوب يمكن السيطرة عليه إلى أن يصبح تركيز الكحول حوالى ١٠% كذلك يستخدم الايثر كالكلوروفورم في تخدير الحشرات.

٣. كلوريد المغنيسيوم أو كبريتات المغنيسيوم Magnesium chloride or magnesium sulfate

يستخدم كل منهما بصورة ناجحة لتخدير الكثير من الحيوانات مثل شقائق البحر Sea Anemones والمرجان Coral والديدان الحلقية Annelids والغلاليات Tunicates وبعض من الحيوانات الرخوية أو النواعم Mollusca.

وتتم العملية بوضع بلورات كبريتات المغنيسيوم في كيس وتعليقها بحيث تمس سطح الماء الحاوي على الحيوانات ثم يسحب الماء بصورة تدريجية الى ان يكتمل التخدير اي عندما لا يبدي الحيوان أي حركة عند لمسه أو وخزه بعدها يسحب الماء بحيث يبقى جزءا قليلا يغطي الحيوانات ثم يضاف المثبت وعند تصلد الحيوانات جزئيا تنقل إلى مثبت جديد fresh fixative، ويمكن أن تتم عملية التخدير ايضا بوضع الحيوانات في محلول لهذه المواد بتركيز ٣٣%.

٤. الكوكايين Cocaine

يستخدم لتخدير الحيوانات الهدبية Ciliates و الدولابيات Rotifers والحيوانات الحزازية Bryozoa والهايدرا Hydra وبعض الديدان worms والنواعم أو الرخويات Nudibranches ويتم التخدير باضافة ١% من المحلول الى القناني الحاوية على الحيوانات ثم تراقب حركتها وبعدها تثبت .

٥. المنثول Menthol

يستخدم للحيوانات صعبة التخدير كالحيوانات البحرية الثابتة sessile marine animals وحيوانات امعائية الجوف Coelentrates وبعض الحزازيات والهدريات Hydroids وكذلك الأسماك المفلطحة Flukes وذلك بنثر المنثول على سطح الماء ويمكن الحصول على افضل النتائج عند مزج 45 غم من المنثول مع 55 غم من مائيات الكلور chloral hydrate حيث يطحن ويمزج سوية مع قليل من الماء ويقطر على سطح الماء وتحتاج الحيوانات الكبيرة للتخدير حوالي ١٢ ساعة. كذلك يمكن استخدام مائيات الكلور لوحده في التخدير عند نثره على سطح الماء الحاوي على الحيوانات كالديدان الحلقية والكأسية والنواعم والحيوانات الحزازية وقسم من الديدان المسطحة ذات الأهداب Turbellaria.

٦. الكلوريتون Chloretone

يستعمل الكلوريتون لتخدير بعض الحيوانات وذلك بوضع الحيوانات في محلول ٠,٣٣% إلى ٢% وتعتمد مدة التخدير على نوع الحيوان وتركيز المحلول فمثلا عند تخدير الضفدعة frog لأجل دراسة الدورة الدموية في الصفاق web توضع في محلول ٢% ولمدة ٤ – ٨ دقائق بعدها تغلف بقطعة قماش مشبعة بالمحلول الى أن يبدو على الحيوان الارتخاء الكامل ثم يفحص الصفاق تحت المجهر.

٧. الخنق Asphyxiation

تستخدم هذه الطريقة مع بعض الحيوانات خاصة القواقع Snails وتتم بوضع الحيوان في قنينة ماء مغلي بعد تبريده ثم يحكم سد القنينة.

٨. التبريد Cooling

تتم عملية التخدير بالتبريد الجزئي لبعض الحيوانات كالأسماك fishes والديدان الشريطية Tapeworms وذلك بوضع الحيوانات في جليد مملح أو ماء مثلج أو داخل ردهات المجمدات إلى أن ترتخي الحيوانات بعدها تنقل إلى ماء فاتر ثم تثبت.

القتل Killing

يعرف القتل بأنه عملية إيقاف دائمي وسريع لجميع الفعاليات الحيوية للكائنات، ويظهر من التعريف بأن عملية القتل ليست مهمة جدا إلا أن الحقيقة تظهر عكس ذلك حيث أن لعملية القتل أهمية كبيرة جدا تعتمد عليها جميع الخطوات المقبلة، فمثلا عندما يراد دراسة الخلية النطفية spermatocyte لحشرة مستقيمة الأجنحة Orthoptera فعند قتل الحشرة بواسطة التخدير يظهر سايتوبلازم الخلية بشكله الشبكي الدقيق وتظهر الكروموسومات واضحة ومتباعدة اما اذا قتلت الحشرة بالسيانيد cyanide فان السايتوبلازم يظهر بشكل حبيبي والكروموسومات تكون متقاربة وغير واضحة المعالم اضافة لذلك تظهر الياف المغزل spindle fibers اقصر مما هي عليه.

التثبيت والتصلد Fixing And Hardening

تكون معظم المواد المستخدمة للقتل مثبتة في نفس الوقت ولكن يجب أن نعلم بأن عملية القتل والتثبيت هما عمليتين مختلفتين، التثبيت هو عملية الحفاظ على شكل وحجم الخلايا والأنسجة والأنظمة النسيجية وجميع العناصر النووية nuclear elements والسايتوبلازمية cytoplasmic كا لو كانت بشكلها الطبيعي نوعا ما قبل التثبيت، لذلك يجب الإسراع في تثبيتها أو حفظها لفترة قصيرة في جهاز تبريد قبل التثبيت تفاديا لحدوث التغيرات في تركيبها بعد الموت post – mortal changes و هذه التغيرات هي:

١. عند ترك النماذج في الهواء تجف وتتقلص بسبب فقدانها الماء بعملية التبخير.
٢. اذا تركت في محلول ذو تركيز معين فسوف تخضع لظاهرة الانتفاخ أو التقلص الأزموزي Osmotic swelling or shrinkage.
٣. تبدأ البكتريا بالتكاثر وبالتالي تحطم الخلايا والأنسجة وتعرف هذه العملية بالتعفن putrefaction.
٤. بعد موت الخلايا تبدأ بعض الأنزيمات والمعروفة باسم مجموعة الـ cathepsin بعملها العكسي فهي بدلا من قيامها ببناء جزيئات البروتين من الحوامض الأمينية تقوم بتكسير جزيئات البروتين وتحوله الى حوامضه الأمينية وتعرف هذه العملية باسم التحلل الذاتي autolysis.

فوائد التثبيت:

١. إبقاء محتويات النسيج على حالها من حيث موقعها وطبيعتها وحجمها، وذلك بتقوية بنية النسيج، مما يمكن من عمل تحضيرات دائمة منه.
٢. تقوية الأنسجة بتقسيتها، لتصمد أمام العمليات التالية كالقطع بأقل قدر من التشوه.
٣. تحسين قدرة أجزاء النسيج على تقبل الصبغ.
٤. جعل مركبات النسيج تقاوم الحرارة العالية، عند الطمر في الشمع وتخلله لها.

مواصفات المثبت الجيد:

١. سرعة النفاذ إلى داخل النسيج.
٢. قلة التأثير الكيماوي والفيزيائي على مكونات النسيج.
٣. عدم تغير تركيبه مع الزمن.
٤. سهولة التداول.
٥. اعتدال السعر.

طرائق التثبيت:

يتم التثبيت إما بوسائل طبيعية أو كيميائية.

التثبيت بالوسائل الطبيعية يندرج تحت هذا النوع استخدام وسائل الحرارة، والتجفيف عند درجة الحرارة العادية، أو المنخفضة، والتجميد.

١. **التثبيت بالحرارة.**

ترتكز هذه الطريقة على كون البروتينات تتخثر بالحرارة، وعيبها الوحيد هو تكون اشكال مصطنعة artifacts داخل الأنسجة.

٢. **التثبيت بالتجفيف عند درجة الحرارة العادية.**

تفيد هذه الطريقة عند تحضير مسحات الدم، أو نخاع العظم، ولكن استعمالها محدود، ويحتاج الأمر عادة إلى مثبت آخر عند الصبغ.

٣. **التثبيت بالنيتروجين السائل.**

في هذه الطريقة يقطع النسيج قطعاً صغيرة، تجمد في النيتروجين السائل (-١٦٠°س)، ثم تجفف في جهاز خاص، وتطمر حالا في شمع البرافين. هذه الطريقة مفيدة في إظهار الإنزيمات والدهون في المقاطع، و بها يتجنب استعمال المواد الكيمياوية فتبقى مكونات النسيج على حالها ولكن يؤخذ عليها صغر حجم العينات وتكون بلورات الجليد فيها.

٤. التثبيت بالوسائل الكيميائية.

لعل أهم ميزة للمثبتات الكيماوية هي قدرتها على تثبيت الأنسجة بكفاءة عالية. ولكن لا يعتمد مثبت واحد لتثبيت الخلايا او مكونات النسيج، وهذا هو سبب وجود عدد كبير من الصيغ الكيماوية للمثبتات المستعملة في التحضيرات المجهرية. وكما سنبين لاحقا فإن معظم المثبتات تحضر من أكثر من مكون واحد، لينسنى الاستفادة من الخواص التي يتمتع بها كل مكون. والمثبتات الكيماوية إما أن تخثر البروتين وتحافظ على هيكلية الخلايا بحيث يسهل اختراقها من وسط التشريب، غير أنها تحطم بعض العضيات، مثل الميتوكوندريا، ومن هذه المثبتات حامض البكريك وكلوريد الزئبق والكحول الإيثيلي، والأسيتون، وإما أن لا تخثر البروتين وتحول السيتوبلازم إلى مادة هلامية غير مترسبة تكون فيها العضيات محفوظة بشكل جيد، ولكن لا يخترقها وسط التشريب بسهولة، ومن هذه المثبتات، الفورملدهايد وحامض الخليك وثنائي كرومات البوتاسيوم، ورابع أكسيد الأوزميوم وعلى هذا الأساس، فإن المثبتات الجيدة تحتوي مكونات مخثرة واخرى غير مخثرة بحيث تجمع فوائد النوعين.

عند تثبيت المواد يجب اتباع والأخذ بنظر الاعتبار ما يلي:

١. يجب تثبيت المادة بعد جمعها وبأسرع وقت ممكن وذلك لمنع تغيرات بعد الموت، أو حفظها في الثلاجة لوقت قصير لحين تثبيتها.
٢. لأجل الحصول على أفضل النتائج يجب اختيار خليط من المحاليل المثبتة بحيث يكون واحدة أو أكثر مخثرة وواحد أو أكثر غير مخثرة وذلك لغرض أداء مهمتين في آن واحد.
٣. يجب اختيار المثبت الملائم لكل دراسة معينة وذلك لأن لكل مثبت له مساوءه ومحاسنه فمثلا الفورمالديهايد يثبت السايتوبلازم من جهة لكنه يمنع تغلغل الشمع من جهة اخرى كذلك هو رديء التثبيت للكروماتين chromatin ويجعل وسط السايتوبلازم قاعدي. أما حامض البكريك picric acid فهو يجلط السايتوبلازم ويسمح للشمع بالتغلغل الا انه يجعل النسيج لينا يصعب قطعه بالمشراح الدوار rotary microtome وهو جيد لتثبيت الكروماتين ويجعل وسط السايتوبلازم حامضي.
٤. أن بعض المثبتات تعمل على زيادة تقبل سطوح المواد للصبغات (مرسخات) بينما البعض الآخر يعمل على عرقلة عملية الصبغ بصبغات معينة لذلك يجب اختيار مثبت

خاص اذا اريد الصبغ بصبغة معينة، علما بأن هناك بعض المثبتات يمكن اعتبارها عامة وتستخدم مع أغلب الصبغات.

٥. يجب أن تكون قنينة التثبيت واسعة بحيث يمكن وضع النموذج المراد تثبيته فيها بسهولة كذلك يجب أن يكون حجم المادة المثبتة من ١ الى ٢٠ مرة بقدر حجم النموذج وذلك لمنع الالتفاف أو الانحناء من ناحية وعدم تخفيف المثبت من ناحية اخرى.

٦. يجب عدم ترك النموذج في المثبت اكثر من الوقت اللازم حيث أن مدة التثبيت تعتمد وتناسب عكسيا مع شدة نفاذه داخل الأنسجة وعلى تركيزه ودرجة حرارته وطرديا مع سمك وصلابة النموذج.

٧. يجب تقطيع المادة المراد تثبيتها بين ٢-٦ ملم سمكا وذلك للسماح للمثبت بالتغلغل في الوقت المحدد أما إذا اريد تحضير عضو أو جزء كبير من عضو فيجب عمل شق incision للسماح للمثبت بالتغلغل.

المصادر Reference

١ -العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمودالعلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.

٢ -الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.

٣ -نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.

4- Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.