جامعة الانبار
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الرابعة

إزالة الكالسيوم، الغسل، الحفظ والانكاز

Decalcification, Washing, Preservation and Dehydration.

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الرابعة

إزالة الكالسيوم، الغسل، الحفظ والانكاز

Decalcification, Washing, Preservation and Dehydration.

إزالة الكالسيوم Decalcification

تصبح بعض النماذج صلبة جدا بعد عملية التثبيت مما يصعب عمل مقاطع لها وسبب ذلك يرجع إلى وجود املاح الكالسيوم بشكل رواسب او صفائح. آن ازالة الكالسيوم باستخدام الحوامض ليس سهلا ، وذلك لأن الحوامض تحلل البروتين لذا يجب اضافة مواد أخرى المحلول الحامض لمنع تحلل البروتين . ومن بين المحاليل شائعة الاستعمال لهذا الغرض هي :

محلول هوك Haug's solution ويحضر بمزج :

٧٠ سم^{٣} كحول تركيز ٩٥ %

٣٠ سم^{٣} ماء مقطر

١ غم فلوروكلوسينول

٥ سم^{٣} حامض النتريك

تغسل النماذج في ماء دافيء جاري ثم تعلق في المحلول الى أن تبدو عليها الطراوة عند وخزها أن طريقة الوخز قد تتلف النماذج في بعض الأحيان لذا يفضل استخدام الفحص التالي للتأكد من إزالة جميع أملاح الكالسيوم ، يضاف ١ سم^{٣} من محلول اوكزالات الصوديوم أو الأمونيا تركيز ٥ % إلى ٥ سم^{٣} من المحلول الحاوي على النماذج، يترك مدة ٥ دقائق ثم يراقب المحلول ففي حالة تكون رواسب تعني ان عملية الازالة غير مكتملة بعد اما اذا بقى المحلول رائقاً فأن ذلك يعني اكتمال عملية ازالة الكلس.

بالاضافة الى الطريقة اعلاه المستخدمة في ازالة املاح الكالسيوم هناك طرق عديدة أخرى يمكن استخدامها لازالة هذه الأملاح ومن بين هذه الطرق نذكر ما يلي :

١. طريقة التحلل الكهربائي Electrolysis method

ان الأساس في هذه الطريقة هو ميل ايون الكالسيوم إلى القطب السالب فعند تعليق العظام بواسطة سلك من البلاتين platinum في القطب الموجب و امرار تيار كهربائي فان ايون الكالسيوم يتحرر من العظام نحو القطب السالب.

٢. اضافة محاليل ازالة الكلس الى المثبتات.

يستخدم لهذا الغرض العديد من المحاليل تمزج مع المثبتات نذكر منها محلول للي Lillie's solution والذي يتكون من :

٨٥ سم^{٣} من حامض البكريك المائي تركيز ١-٢ %

١٠سم^{٣} فورمالين

٥ سم^{٣} حامض الفورميك المائي تركيز ٩٠ - ٩٥ % تترك النماذج في المحلول مدة ٢,١ يوم.

٣. اضافة محاليل ازالة الكلس إلى محاليل الانكاز .

يضاف محلول جنكن Jenkin's solution إلى محاليل الانكاز حيث يتألف من :

٧٣ سم^{٣} من الكحول المطلق

١٠ سم^{٣} ماء مقطر

١٠ سم^{٣} كلوروفورم

٣ سم^{٣} حامض الخليك الثلجي

٤ سم^{٣} حامض الهيدروكلوريك المركز

إزالة السليكا Desilicidation

يجب ازالة الجزء الصلد من الأنسجة المحتوية على السليكا قبل أن تقطع تلك الأنسجة ويستعمل لهذا الغرض حامض الهيدروفلوريك hydrofluoric acid . يمتاز هذا المحلول في مهاجمته للأغشية المخاطية لذلك فان استعماله يكون مصحوبا بالخطورة للمشتغل به . يضاف المحلول قطرة فقطرة إلى النسيج الذي يوضع مسبقا في وعاء مغلف بشمع البارافين لأن الحامض يهاجم الزجاج .

الغسل Washing

بعد الانتهاء من عملية التثبيت يجب غسل المادة جيدا لازالة بقايا المثبت وذلك لسببين اولها للحد من الافراط في تثبيت المادة overfixing والثاني لمنع تداخل بقايا المثبت غير المتحدة مع المواد الأخرى المستخدمة في الخطوات اللاحقة للتحضير وخاصة في عملية الصبغ. أن السوائل الواجب استخدامها للغسل تعتمد كليا على مكونات المثبت نفسه فعند استخدام المثبتات المائية aqueous fixatives يجب غسل النموذج المثبت بماء الحنفية الجاري وتتناسب مدة الغسل طرديا مع قوة المثبت وفترة التثبيت كذلك على حجم النموذج وعدد القطع المثبتة اضافة لذلك تحتاج عملية الغسل بالماء وقتا أطول إذا كان أحد مكونات المثبت مادة غير ذائبة Insoluble.

اما اذا استخدمت مثبتات غير مائية non – aqueous fixatives فيجب الغسل بالكحولات وبنفس تراكيزها في المثبت فمثلا عند استعمال مثبت (فورمالين – حامض الخليك – كحول اثيلي .F , A. A) يجب غسل المادة بالكحول كذلك عند التثبيت بمحلول بوين يجب غسل المادة بكحول تركيز ٥٠ % وذلك لأن غسله بالماء الجاري سوف يزيل قسما من البكريك الذائب . ومما تجدر الاشارة اليه انه عندما يراد قطع مقاطع باستخدام المشراح المجمد يجب تجنب الغسل بالكحولات وذلك لأن الكحولات تمنع عملية الانجماد . اضافة لما ذكر اعلاه هناك بعض المثبتات تحتاج إلى معاملات اضافية بعد الغسل فمثلا عند استعمال مثبت يدخل في تركيبه كلوريد الزئبقيك فان هذا المثبت سوف يترك بلورات ابرية داخل النموذج المثبت ربما تكون من كلوريد الزئبقوز مما يؤثر على عملية القطع sectioning لذا يتوجب ازالة البلورات من النموذج بواسطة اضافة كميات كافية من اليود الى سلسلة تراكيز الكحولات المستخدمة في عملية

الانكاز بحيث يكون لون هذه التراكيز الكحولية بني غامق بعدها يجب غسل المادة عدة مرات بكحول ٧٠% او ٨٠% الى ان يزول لون اليود.

الحفظ Preservation

عند تحضيرنا للنماذج أو المقاطع نحتاج في بعض الأحيان التوقف عند مرحلة معينة ولفترات طويلة أو قصيرة لسبب أو لآخر كأن يكون الوقت غير كافي للاستمرار بعملية التحضير وهذا يتطلب منا اختيار محلول مناسب بحيث يحافظ على النماذج أو المقاطع بشكلها الطبيعي دون أن يطرأ عليها أي تغيير ويعرف مثل هذا المحلول بالحافظ . ان لهذا الحافظ خاصية منع الجفاف والتقلص أو الانتفاخ كذلك يقوم بقتل البكتريا والفطريات ويوقف نشاط انزيمات التحلل الذاتي . وهناك العديد من محاليل الحفظ والقسم الأكبر منها مثبتات وبصورة عامة يمكن تقسيمها إلى ثلاثة أقسام هي :

١. الحفظ بالكحولات Preservation in alcohols

من المحاليل الشائعة للحفظ هي الكحولات حيث توضع النماذج في أنابيب أو قناني زجاجية صغيرة vials بعد تعليمها واحكام سد فوهتها وختمها بالشمع الذائب بعد ملئها بكحول ٧٠ % أو ٨٠ % ويجب تجنب سد فوهة الأنابيب الزجاجية باغطية فلينية وذلك لأن الكحولات تحلل المادة الدباغية tannin الداخلة في تركيب جدران الفلين وبالتالي تؤثر على محلول الحفظ وعلى المادة المحفوظة . وتستخدم هذه الأنابيب عادة لحفظ النماذج صغيرة الحجم وعند وجود عدد كبير من النماذج الصغيرة تقسم على عدة أنابيب وتوضع داخل قناني زجاجية واسعة بحيث يمكن سد فوهتها بسهولة.

٢. الحفظ بالمثبتات Preservation in fixatives

يوجد العديد من المثبتات التي تستخدم لغرض حفظ النماذج لفترات متفاوتة ومن المثبتات الشائعة :

أ. خليط فورمالين–حامض الخليك–كحول اثيلي (Formalin–acetic acid–alcohol F.A.A).

ب. محلول الكحول المفرمل Formal – alcohol

ت. الفورمالين المتعادل Neutral Formalin

ث. محلول بوين Bouin's fluid

ج. محلول گلسن Gilson's fluid

٣. الحفظ بشمع البارافين Preservation in Paraffin wax

في حالة اتباع طريقة شمع البارافين في تحضير المقاطع وعند توفر الوقت الكافي لإيصال المقاطع الى مرحلة الطمر embedding فتكون مادة الطمر هذه من أفضل المواد الحافظة لفترة طويلة شرط خزنها في درجات حرارة واطئة.

الانكاز Dehydration

عند تثبيت النماذج بالمثبتات المائية aqueous fixatives أو غير المائية – non aqueous fixatives تكون النماذج حاوية على كمية كبيرة من الماء في الحالة الأولى وقليلة في الحالة الثانية، وبالنظر لتأثير الماء السلبي في كلا الحالتين على العمليات التي تلي التثبيت لذا يتطلب ازالة جميع اثاره من النماذج واستبداله أو احلاله بمحاليل أخرى ويطلق على هذه العملية بالانكاز (سحب الماء) dehydration وذلك للأسباب التالية :

١. كثير من الصبغات التي تستخدم لتمييز اجزاء النموذج المحضر لا تذوب في الماء ولكنها تذوب في الكحولات .
٢. عدم امتزاج الماء مع شمع البارافين المستعمل في تشريب وطمر النموذج
٣. عدم امتزاج الماء مع اوساط التحميل الراتنجية resinous media.

ويعتبر الكحول من محاليل الانكاز شائعة الاستعمال وعند استخدام الكحول الإثيلي في عملية الاحلال محل الماء يجب أن تجري العملية بصورة تدريجية وذلك لأن سرعة انتشار الكحول داخل النموذج تكون شديدة قد تؤثر أو تتلف انسجته لذا يفضل اتباع احدى هاتين الطريقتين :

١. امرار النموذج على تراكيز تصاعدية من الكحول alcoholic series هي ٣٠ و ٥٠ و ٧٠ و ٨٠ و ٩٥ % ثم الى كحول مطلق ١٠٠ % ويفضل أن يبدل الأخير مرتين. تعتمد الفترة الزمنية اللازمة للانكاز على حجم وطبيعة ومحتوى النموذج المراد انكازه.

٢. زيادة تركيز الكحول وذلك باضافة كميات قليلة من الكحول تركيز ٩٥% وبصورة تدريجية إلى الماء الحاوي على النموذج ويفضل رج المحلول اثناء عملية الاضافة كذلك يستحسن سكب جزء من المحلول الحاوي على النموذج واضافة كحول ٩٥ % محله لغرض زيادة التركيز الى ان يصل تركيز الكحول الى ٩٥ % ثم الى كحول مطلق لاتمام عملية الانكاز. يترك النموذج في الكحول المطلق فترة معينة تعتمد على حجم وطبيعة النموذج نفسه مع مراعاة ان بقاءه في الكحول المطلق لفترة طويلة قد يسبب تصلده أو انكماشه.

ومن المحاليل الأخرى الشائعة والمستخدمة للانكاز الاسيتون والكحول المثيلي وثالث مثيلات الفوسفور.

ملاحظات هامة

١. يوضع النسيج في كل محلول لفترة تتراوح بين ساعة وساعتين ، وللتأكد من إزالة الماء من النسيج يستعمل تغييرين من الكحول المطلق.
٢. يجب عدم ترك النسيج في كحول ٩٥ % أو كحول مطلق لأكثر من ساعتين في كل تركيز ، لأن ذلك يؤدي إلى تقسيته.
٣. إذا اقتضت الظروف وقف عملية إزالة الماء ، فإن تركيز الكحول المفضل التخزين الأنسجة فيه هو ٧٠ ٪.

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف 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.

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