المحاضرة الثانية

التثبيت Fixation

المرحلة الثالثة

م.د.هبة الله عادل الحمداني

2020-2019

م.د.هبة الله عادل الحمداني

2- التثبيت Fixation

هي الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة من اجل إخضاعها للفحوصات النسيجية والكيمانسيجية ، وتهدف هذه الخطوة إلى المحافظة على النسيج ومحتوياته على الحالة التي كان عليها في جسم الكائن الحي أو قريبة من ذلك ، وتتم عملية التثبيت من خلال التفاعلات الكيميائية والتداخلات الفيزيائية بين المجاميع الفعالة للمثبت والمجاميع الفعالة للمواد الكيميائية الموجودة في النسيج (كربوهيدرات- بروتين- دهون- إنزيمات- أملاح معدنية- صبغات) .

تقوم عملية التثبيت بإيقاف عملية التفتت والتفسخ Disintegration و التعفن Putrefaction الناتجة عن نشاط البكتريا والفطريات وكذلك إيقاف عملية التحلل الذاتي للنسيج بفعل الإنزيمات.

الهدف من التثبيت:

1- تخثير البروتينات Coagulation of proteins وتحويل مكونات النسيج الذائبة الى مواد غير قابلة للذوبان في جميع المحاليل والأوساط الكيميائية التي سوف يتعرض لها النسيج في العمليات اللاحقة.
2- الحفاظ على سلامه الخلايا من التشوه Shrinkage والانتفاخ Swelling من خلال المحافظة على ضغطها الازموزي خلال تعرضها للمحاليل الكيميائية في عمليات نزع الماء والتخلل والطمر.
3- إعطاء النسيج قدر من الصلابة المطلوبة لتهيئة للتقطيع.
4- تهيئة النسيج بحيث يصبح سهل النفاذ وقابل للتصبيغ وتميز أجزاءه عن بعضها البعض عند الفحص تحت المجهر .

وحتى تتحقق الأهداف المرجوة من التثبيت المذكورة أعلاه لابد من مراعاة النقاط التالية :

- اختيار المثبت المناسب للعمل حسب الغرض من الدراسة.
- وضع العينة في المثبت مباشرة بعد أخذها من الجسم لمنع عملية التحلل والتفسخ .
- ان يكون حجم العينة صغير بحيث يسمح للمثبت بالنفاذ خلال العينة في وقت قصير (سمك العينة لا يزيد على 2-5 مم).
- ان يكون حجم المثبت عدة أضعاف حجم العينة (10- 20 ضعف).
- ضرورة التقييد بالفترة الزمنية اللازمة للتثبيت حسب المثبت المستخدم (24 ساعة على الأغلب)
- الأخذ في الاعتبار الآثار التي سيتركها المثبت على مكونات النسيج وتركيب الخلايا بعد التثبيت .
- إذا لم يتوفر المثبت المناسب في حالة طارئة يجب وضع العينة في السائل النيتروجيني (- 182 مئوية) إلى حين توفر المثبت المناسب.
- يجب غمر العينة لأكملها في المثبت وذلك برج المثبت عدة مرات بعد وضع العينة فيه حتى تتبلل جميع أسطح العينة بالمثبت.

المثبت Fixative

وهو عبارة عن وسط سائل يحتوي على مواد كيميائية بعضها يعمل على تثبيت المحتوى الكيميائي للخلايا والمواد بين الخلوية عن طريق التخثير والترسيب وبعضها يعمل على معاكسة الوسط المذيب على الخلايا النسيج من التشوه.

شروط المثبت الجيد:

1- يتخلل بالأنسجة بسهولة وبسرعة.

2- يعمل في درجة الحرارة العادية .

3- لا يحدث ضرر بالنسيج.

4- يعمل على تيبس النسيج نوعا ما بحيث يصبح قوامه سهل التقطيع.

5- لا يتعارض مع الصبغات المختلفة عند صبغ العينة.

6- يستمر مفعوله لمدة طويلة.

7- يقتل الجراثيم والفطريات التي تساعد على تحلل الأنسجة.

8- أن لا يترك المثبت أي اثأر سيئة أو إصباغ على النسيج.

9- أن يكون سعره مناسب ومتوفر باستمرار**.**

العوامل المؤثرة على التثبيت

1- الأس الهيدروجيني للمثبت: يجب أن يكون مابين (6-8) لان الزيادة الأس الهيدروجيني أو النقصان يتلف الأنسجة ويمكن الحصول على درجة الحموضة باستخدام محلول واقي Buffer .

2- درجة حرارة المكان : تزداد سرعة النفاذ بزيادة درجة حرارة المكان والعكس صحيح الا ان الحرارة العالية تتلف الأنسجة لذا يفضل ان تكون درجة الحرارة (25) درجة مئوية.

3- تركيز المثبت وكميته: يتناسب مع حجم العينة طرديا (10-20) ضعفا.

4- مدة التثبيت :تتناسب مع حجم العينة طردياً.

المثبتات المستخدمة في الدراسات النسيجية و الكيميانسيجية كثيرة قد تربو على (650)مثبت وقد صنفت بعدة طرق نذكر منها تصنيف بيكر 1960الذي صنف المثبتات الى :

1- **مثبتات كيمياوية مخثرة للبروتين** : مثل حامض البكريك (المر) ، كلوريد الزئبقك ، الكحول الاثيلي، الأسيتون ، ثالث كلوريد حمض الخليك.

2- **مثبتات كيمياوية مخثرة للبروتين** : مثل الفورمالدهيد ، حمض الخليك ، ثنائي كرومات البوتاسيوم ، رابع كلوريد الاوزميوم.

وهنالك عدة أنظمة لتصنيف المثبتات يعتمد بعضها على :

1- طبيعة عمل المثبت.

2- استعمال المثبت.

3- الغرض من الدراسة (نسيجية أو كيميانسيجية).

4- على المواد الموجودة في المثبت :

- مثبتات محتوية على مجموعات الدهايدية مثل مثبت الفورمالين ، فورمول الكالسيوم ، N.B.F وغيرها.
- مثبتات محتوية على ايونات معدنية مثل الزئبق ، مثبت زنكر، هلي، سوسا ، كروم، اوزميوم.
- مثبتات محتوية على حمض المر مثل مثبت روسمان ،بوان.
- مثبتات الكحول والاستون.

تركيب المثبت:

- مثبتات بسيطة
- مثبتات مركبة
- مثبتات تشريح دقيق
- مثبتات خلوية (نووية و سيتوبلازمية)

عبدالله عادل الحمداني

أنواع المثبتات الجيدة :

الفورمالين (10 %) Formalin

هو أكثر المحاليل المثبتة استعمالا والمركز منه عبارة عن 0.4 % فورمالدهيد وأحسن نسبة للفورمالين المثبت 0.1 % من المحلول المركز أي إضافة 10 مل من المحلول المركز إلى 90 مل من الماء المقطر.

(مدة تثبيت العينة من 42-12 ساعة على الأقل حسب حجم العينة)

مميزاته:

1- رخيص الثمن.
2- لا يسبب تصلب أو انكماش للنسيج إذا تركت العينة فيه فتره طويلة.
3- يصلح كمثبت لجميع الصبغات.
4- يمكن حفظ العينة فيه مدة طويلة.
5- يمكن الاكتفاء بغسل النسيج بعد التثبيت لمدة ساعة فقط.

عيوبه :

1- له تأثير ضار على الجلد لذلك يجب الاستعمال للقفازات.
2- يسبب بعض الالتهابات للغشاء المخاطي للأنف ولذلك يجب تهوية المكان جيدا.

محلول زنكر Zinker solution

م. عبد الله عادل الحمداني

يتكون من كلوريد زئبق 5 غم + دايكرومات بوتاسيوم 5,2 غرام + سلفات صوديوم 1 غم ويكمل الى 100 مل ماء مقطر ويضاف 5 مل حامض خليك الثلجي Pacial acidic acid قبل الاستعمال مباشرة .

مميزاته:

1- قوة حفظه للنواة.

2- يستعمل أكثر لنخاع العظام والأعضاء الدموية.

عيوبه:

1- يجب غسل النسيج بعد التثبيت بالماء الجاري لمدة 12 ساعة.

2- لا يمكن تثبيت العينة لأكثر من 24 ساعة .

محلول هيللي Helley fluid

هو احد المحاليل المثبتة المستعملة لحفظ العينات الجراحية ، يكون مشابهه في تركيبه لمحلول زنكر ولكن هنالك فرق في ان محلول هللي يتم إضافة 5 مل فورمالين قبل الاستعمال مباشره .

مميزاته : مثبت جيد للأعضاء الدموية (النخاع – الطحال)

عيوبه :

1- يجب غسل العينة لأكثر من 24 ساعة وإلا حدث ضرر للنسيج.

2- باهض الثمن .

وجيهة الله عادل الحمداني

محلول الكحول الاثيلي 96 %

تركيبه نأخذ منه 70 مل ويضاف إلى 26 مل ماء مقطر .

استخدامه :

يستخدم أكثر في تثبيت عينات السوائل والمسحات

عيوبه:

1- غالي الثمن
2- لا يستعمل كثيرا لضعف تخلله للأنسجة.
3- إذا تركت فيه العينة لفترة طويلة يسبب انكماش في النسيج ويعطي صلابة زائدة

المصادر :

1- **د.عمر عبد القادر (2012) التحضيرات المجهرية**

2- **شبكة الانترنيت**

د. هبة الله عادل الحمداني