المحاضرة الثالثة

(الغسلWashing ، نزع الماءDehydration، الترويق Clearing،التخللInfiltration)

المرحلة الثالثة

م.د.هبة الله عادل الحمداني

2020-2019

3- عملية الغسل Washing

يجب غسل العينة بعد التثبيت وذلك لازالة ماتبقى من اثر المثبت على العينة

- تغسل العينات المثبتة في مثبت بوان بالكحول 70% حتى يزول اللون الاصفر .
- تغسل العينات المثبتة في محلول زنكر بالكحول 96% مشبع باليود ومدة الغسيل تتراوح من 5-8 ساعات.
- تغسل العينات المثبتة في مثبت روسمان تغسل بالكحول 96%.
- تغسل العينات المثبتة في الفورمالين بماء الصنبور الجاري لمدة 24 ساعة.

4- عملية نزع الماء Dehydration

وهي الطريقة التي يتم بواسطتها إحلال مادة محل الماء الموجود في النسيج هذه المادة تذوب فيها المحاليل والمواد المستعملة في الخطوات القادمة مع عدم تشويه النسيج وتتم هذه العملية بتمرير العينة في سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من الكحول الاثيلي لمنع انكماش الأنسجة في حالة لو وضعت في كحول مطلق مباشرة ويفضل الكحول لأنه يمتزج بسهولة مع الماء ومع مادة الزايلول المروقة والتي بدورها تمتزج جيدا مع مادة الطمر البرافينية .

الماء لا يمتزج مع شمع البرافين لذلك يجب التخلص من الماء الموجود في النسيج الخلوي حتى تسهل عملية نفاذ البرافين المصهور الى داخل الأنسجة وتتم عملية نزع الماء بتمرير العينة على سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من محاليل الكحول الاثيلي وتتراوح المدة اللازمة لترك العينة في كل خطوة من خطوات نزع الماء في محاليل الكحول المختلفة التركيز من 30 دقيقة إلى ثلاث ساعات كحد أقصى ويفضل ان تمرر العينة في مراحلها الأخيرة من خطوات نزع الماء على

محلولين منفصلين من الكحول المطلق ولمدة تتراوح من ساعتين الى ثلاث ساعات في كل مرة وذلك لزيادة التأكيد من تمام نزع الماء من العينة.

عند تحضير سلسلة متدرجة التركيز يفضل استخدام 95 % كحول اثيلي بدلا من الكحول المطلق ومنه تعمل التركيز المطلوبة فلكي نحضر محلول بتركيز 70 % نأخذ 70 مل من محلول الكحول 95 % ونضيف إليه 25 مل من الماء المقطر ليكون التركيز النهائي من الكحول 95 %.

5- عملية الترويق Clearing

العملية التي بواسطتها يتم إحلال مادة محل مادة نزع الماء حيث تقوم هذه العملية بالسماح لمادة شمع البرافين بالدخول إلى الأنسجة في الخطوة اللاحقة لان الكحول المستخدم في نزع الماء لايمتزج مع شمع البرافين لذا تستخدم مادة مورقة تذوب في الكحول وشمع البرافين وكذلك تجعل النسيج شفافا.

من أمثلة المواد المروقة (الزيلول-الكلورفورم-تولوين-بنزين-زيت خشب الارز) وعند استخدام الزيلول والتولوين يحدث أحيانا أن يتعكر لون محلول مادة الترويق وهذا دليل على عدم اكتمال نزع الماء من نسيج العينة في هذه الحالة يجب إرجاع العينة إلى سلسلة الكحولات للتأكد من عملية نزع الماء بشكل تام أما المدة الكافية لترك العينة في المحلول المروق فهذا يعتمد على نوع وحجم العينة فكلما زاد حجم العينة كلما زادت مدة الترويق.

الكحول لا يمتزج مع شمع البرافين لذا يعتبر محلول الزيلول من انسب المحاليل المروقة لسهولة امتزاجه مع البرافين والكحول وهنالك مواد يمكن استخدامها كمروقات مثل التولوين والبنزين و الكلوروفورم ولكنا سريعة التطاير.

6- عملية التشريب أو التخلل Impregnation or infiltration

عبارة عن إحلال كامل للمادة المستخدمة في الطمر مكان المادة المروقة ويعتبر شمع البرافيين من أشهر المواد المستخدمة في تشريب النشيج حيث انه يتخلل العينة بسرعة دون إحداث ضرر بتركيبها النسيجي ،كما انه يكسبها دعامة قوية لتهيئتها للقطع بالميكروتوم، ويساعد على حفظها في الظروف العادية لفترة طويلة دون اي اذى.

تتم العملية بتمرير العينة في مزيج متساوي من الشمع والمادة المروقة (1:1) ثن تنقل العينة الى شمع البرافين المطلق المنصهر داخل الفرن وتكرر هذه العملية لعدة مرات (2-3) مرات كل مره لمدة نصف ساعة، كما تعتمد عدد المرات تغيير الشمع حسب نوع العينة بحيث تقل كلما كانت العينة رخوة وتزداد كلما كانت العينة صلبة.

ويجب أن يراعي التالي :

1- أن يتم التخلل لكامل أجزاء العينة ويحل محل المادة المروقة وإلا فان عملية تحضير القطاعات ستكون غاية في الصعوبة.
2- يجب أن يكون شمع البرافين تام الانصهار (درجتان اعلى من درجة الانصهار) حيث يمتاز بنفاذية أسرع.
3- يعتمد زمن التخلل على سمك وحجم العينة ويفضل أن لايزيد سمكها عن 5 مم وإلا يزيد زمن التخلل لعينات العضلات والأنسجة الضامة عن ثلاث ساعات حتى لا يتسبب في صلابتها بينما يمكن إن تترك عينات الجلد والجهاز العصبي في الشمع المنصهر حتى ست ساعات .
4- يجب إلا يقل حجم الشمع إلى حجم العينة عن عشرون ضعفا.

ويمكن في تقنيات أخرى استخدام مادة السللودين (Celloidin) في عملية التخلل كما يجب ان يكون الطمر بنفس المادة.

7- عملية الطمر Embedding

وهي عملية الغرض منها عمل قالب من العينة بحيث تحيط بها المادة الطامرة وتدعمها والمواد المستخدمة نوعين :

1- بعضها يذوب في الأوساط المائية عند الحرارة العالية مثل الاكار Agar والجلاتين والشمع الكربوني Carbowax.
2- البعض الاخر لا يذوب في الأوساط المائية مثل شمع البرافين والسيللودين والميتاكريلات وشمع الاستر.

إلا إن البرافين أشهرها وأكثرها استخداما في معامل الأنسجة وكيمياء الأنسجة ، وشمع البرافين عبارة عن مادة هيدروكربونية ممزوجة بمواد بلاستيكية .

وهنالك عدة انواع من شمع البرافين تبعا لدرجة انصهاره:

- البرافين الرخو Soft paraffin ينصهر عند درجة حرارة (45-50) درجة مئوية.
- البرافين المتوسط Medium paraffin ينصهر عند درجة حرارة (50-55) درجة مئوية.
- البرافين الصلب Hard paraffin ينصهر عند درجة حرارة 56-68) درجة مئوية.

ان اهم عامل لاختيار نوع الشمع هي حرارة الفرن التي يعمل فيها القطاعات ونوعية العينة تحت الفحص ، ولعمل قالب شمعي يعبأ الشمع المنصهر داخل القالب ثم تنقل العينة باستخدام ملقط وتوضع العينة بالاتجاه المرغوب فيه ، بعدها يترك القالب على سطح ثلجي فترة قصيرة ليبرد سطحه الخارجي ، وحتى لا يلتصق الشمع بإطراف القالب المعدنية فإنه يفضل مسح قاعدته وإطرافه الداخلية بالفازلين أو بالجلسرين قبل ذلك.

مع العلم ان هنالك انواع جديدة من اجهزة الطمر التي تستخدم الشبكات البلاستيكية الخاصه بتمرير القطاعات ومن ثم تطمر القطاعات في النهاية في هذه الشبكات

(لهذه القوالب ميكروتوم خاص ذو حامل ملائم لحجم هذه الشبكات يختلف عن الميكروتوم ذو الحامل الخاص بالقالب المعدني القديم).

وحده صب شمع البرافين

8- عملية التشذيب Trimming

بعد تحضير القوالب الشمعية يستحسن تشذيبها بشفرة حادة حتى تصبح العينة في وضع مناسب للتقطيع بحيث تصبح أطرافها متوازية ويمكن أن تنطبق على حافة سكين الميكروتوم.

9- تقطيع العينة Sectioning

تثبت العينة على حامل العينة Specimen holder في الميكروتوم كما يجب أن يزود جهاز القطع بسكين حادة جدا ويحدد القطاع المرغوب فيه (3-7) ميكرون للبرافين وبسمك (10-15) ميكرون للسيللودين ، القطاعات الجيدة عادة تكون على

شكل أشرطة Ribbons أو سلسلة من القطاعات ويفضل أن توضع هذه الأشرطة على صفيحة سوداء حتى يسهل تمييز القطاعات واخذ المناسب منها لوضعه على الشريحة الزجاجية .

10-تحميل القطاعات Mounting

يقصد بها وضع القطاع النسيجي على شريحة زجاجية ويمكن ان تتم هذه العملية بوضع القطاع في حمام مائي بدرجة حرارة (40-45) درجة مئوية ويترك القطاع يطفو على سطح الماء لمدة (1-2) دقيقة حتى ينفرد تماما ، تمرر الشريحة الزجاجية تحت هذا القطاع ويلتقط بحيث يلتصق على وسط الشريحة، وذلك برفع الشريحة باتجاه القطاع إلى الأعلى مع عدم السماح لتكون أي فقاعه هوائية ، تترك الشريحة لتجف على مجفف الشرائح (45) درجة مئوية لمدة 24 ساعة تقريبا كما يفضل ان تكون الشريحة قد دهنت بلاصق ماير (عبارة عن حجمين متساويين من مادة زلال البيض والجلسرين مع سلسلات الصوديوم) كمادة حافظة ، ينقل القطاع إلى شريحة مجهريه عليها قطرة ماء ثم توضع على مجفف الشرائح وتترك حتى تتبخر القطرة المائية ويلتصق جيدا على الشريحة والمدهونة بلاصق ماير مسبقا.

المصادر :

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

2- شبكة الانترنيت