التثبيت

المثبتات fixation :

في مجال علم الأنسجة ، علم الأمراض ، علم الخلية يكون التثبيت هو عمليات كيميائية الغرض منها المحافظة على الأنسجة الحيوية من التحلل (إما بالانحلال الذاتى أو التعفن) ، يعمل التثبيت على إيقاف التطور في التفاعلات الكيميائية الحيوية أو ربما يزيد من الشد الميكانيكى أو الثبات والاستقرار للأنسجة المعالجة .

الغرض من التثبيت :

الغرض من التثبيت هو المحافظة على العينة من المادة الحيوية (نسيج أو خلايا) في حالة أقرب ما يكون إلى الحالة الطبيعية إلى أقصى قدر ممكن ، ولتحقيق هذا الغرض لا بد من توافر عدة اشتراطات :

أولاً : يجب أولا حماية العينة من المؤثرات الداخلية ويكون ذلك بإيقاف تأثير إنزيمات التحلل البروتينى التى تعمل على هضم وإتلاف العينة .

ثانيا : يعمل المثبت على حماية العينة من المؤثرات الخارجية ، المثبتات عامة سامة لمعظم الكائنات المجهرية (البكتريا على وجه الخصوص) التى قد تتواجد في العينة أو التى ربما تستعمرها هذه الكائنات المجهرية ، علاوة على ذلك فإن المثبتات تعمل على تحويل النسيج المراد تثبيته كيميائيا بحيث يصبح غير مستساغا (إما غير قابلة للهضم أو سامة) للكائنات المجهرية .

ثالثا : كثيرا ما تعمل المثبتات على تحويل الخلايا والأنسجة إلى مستوى الجزيئات الأمر الذى يزيد من الشد الميكانيكى مما يساعد على الاحتفاظ بالشكل الخارجى للعينة أثناء عمليات تجهيز الشرائح التالية

عمليات التثبيت :

التثبيت هو في الواقع أول خطوة في سلسلة من العمليات تهدف في النهاية إلى تحضير عينة من المادة البيولوجية تمهيدا لفحصها بالميكروسكوب أو إجراء عمليات

تحاليل مختلفة ، وبناء عليه فإن اختيار المثبت أو الطريقة المتبعة في التثبيت تتوقف على الهدف النهائى المراد الحصول عليه من العينة .

أنواع التثبيت :

- **التثبيت بالحرارة :**

تترك العينة لتجف في درجة حرارة الغرفة العادية ثم تمسك الشريحة بملقاط وتمرر خلال لهب موقد بنزن لعدة مرات حتى تلتصق العينة بالشريحة .

- **الغمر :**

تغمر العينة في المادة المثبتة ، يجب أن تنتشر المادة المثبتة خلال النسيج ، وبناء عليه يجب أن يؤخذ في الاعتبار حجم النسيج وكثافته ونوع المادة المثبتة عند التفكير في تثبيت العينة بما يعنى أن تثبيت العينة كبيرة الحجم يحتاج إلى كميات أكبر من المثبت .

أنواع المثبتات :

يقوم المثبت بالتأثير على بروتينات الخلية فيحولها إلى مواد غير قابلة للذوبان في المحاليل التى تستخدم في خطوات التحضير التالية ، ويتم ذلك بطريقتين

☒ **أولا : عدم الترسيب :**

وتعتمد هذه الطريقة على تحويل البروتينات إلى مركبات حبيبية صغيرة جدا غير قابلة للذوبان ، وهى تعمل عن طريق تكوين روابط كيميائية تساهمية (مشتركة) بين البروتينات في النسيج . وبهذه الطريقة يتم تثبيت البروتينات القابلة للذوبان في هيكل الخلية مما يضيف صلابة للنسيج ، من بين أشهر المثبتات بهذه الطريقة الفورمالديهيد formaldehyde (غالبا ما يباع في الأسواق تحت اسم الفورمالين) ، الجلوتيرالدهيد glutaraldehyde ، ربما لا يخترق الأخير الأنسجة السميكة بنفس القدرة التى يخترق بها الفورمالين .

كثيرا ما يستخدم رابع أكسيد الأزميوم osmium tetroxide في تحضير العينات للميكروسكوب الإلكتروني وذلك لأن معدن الأزميوم الثقيل يترسب على الأغشية الخلوية فيجعلها شديدة الوضوح علاوة على عمل هذا المركب كمثبت فعال ، ولا تستخدم في تحضير العينات للميكروسكوب الضوئى لأن قدرتها على اختراق القطاعات السميكة للأنسجة ضعيفة للغاية .

☒ **ثانيا : الترسيب :**

وذلك بتحويل البروتينات الجلوبيولينية السيتوبلازمية القابلة للذوبان إلى بروتينات غير قابلة للذوبان فتترسب على هيئة ألياف دقيقة . أشهر المثبتات المرسبة الإيثانول Ethanol والميثانول Methanol والاسيتون Acetone .

يستخدم أيضا حمض الخليك Acetic acid (الذى يغير من خواص البروتين الأصلية) بالاشتراك مع مثبتات رسوبية أخرى . الكحولات تتسبب (بذاتها) في انكماش الأنسجة أثناء التثبيت بينما حمض الخليك (بمفرده) يرتبط بالأنسجة مسببا انتفاخها ، استخدام الاثنان معا يساعد على الاحتفاظ بالشكل الخارجى للنسيج .

بعد الانتهاء من عملية الترسيب ، تمرر العينات في عدة محاليل مختلفة حتى نصل إلى مرحلة التقطيع وفيما يلى موجزا لهذه الخطوات :

(1) **الغسيل washing :**

ويكون بالماء أو بغيره من المواد لإزالة بقايا مواد التثبيت حتى لا تتفاعل مع المواد المستخدمة في الخطوات التالية .

(2) **التجفيف dehydration :**

يجب أولا نزع الماء من العينات ويكون ذلك بإمرار العينات في تركيزات متصاعدة من الكحول الإثيلى الذى يعمل على سحب الماء من الخلايا تدريجيا ، وبنهاية هذه الخطوة يكون الكحول الاثيلى قد حل تماما محل الماء الموجود في العينات

(3) **الترويق** clearing :

توضع العينات في مادة مروقة مثل الزيلين ، والتلوين ، والبنزين وبعض الزيوت مثل زيت خشب الأرز والغرض من ذلك أن تحل هذه المواد المروقة محل الكحول لتجعل العينة رائقة وشفافة .

(4) **التشريب** impregnation :

ويكون ذلك باستخدام الشمع المنصهر عند درجة 60م° وبهذه الطريقة يحل الشمع المنصهر محل المروقات السابق استخدامها ، وتصبح مكونات الخلايا والأنسجة محاطة بالكامل بالشمع المنصهر وبذا تكون أقرب ما تكون إلى حالتها الطبيعية .

(5) **الطمر** embedding :

بعد الانتهاء من الخطوات السابقة تصبح العينة جاهزة للخطوة التالية وهى الطمر ويكون ذلك بنقل العينات إلى شمع نقى منصهر ، ثم يترك ليبرد فيتحول إلى كتلة صلبة تحتوى على العينة بداخلها .

التقطيع

يجب تثبيت النسيج البيولوجى في إطار صلب حتى يمكن تقطيعه إلى قطاعات رفيعة بسمك 5 mμ (ميكرومترات : 1000 ميكرومتر = 1 مم) وذلك للميكروسكوب الضوئى ، وبسمك 80 – 100 nm (نانومتر، 10000000 نانومتر = 1 مم) للميكروسكوب الإلكترونى ، يستخدم الميكروتوم لتجهيز القطاعات والشرائح .

تستخدم الأسلحة من الصلب في تجهيز قطاعات من الأنسجة النباتية أو الحيوانية المراد فحصها بالميكروسكوب الضوئى ، بينما تستخدم الأسلحة الزجاجية في تجهيز شريحة قطاع للميكروسكوب الضوئى وشرائح رقيقة للغاية للميكروسكوب الإلكترونى . تستخدم الأسلحة المصنعة من الماس لتجهيز شرائح من المواد الصلبة مثل العظام والأسنان لكل من الميكروسكوب الضوئى والإلكترون .