الفصل الرابع

معاملة الخزع النسيجية

تشتمل معاملة الخزع النسيجية بعد تثبيتها لتحضير القطاعات النسيجية البرافينية على المراحل التالية :

١ - غسل الخزع النسيجية.

٢ - نزع الماء.

٣ - الترويق.

٤ - التخلل بالشمع.

٥ - الطمر بالشمع.

غسل الخزع النسيجية

تهدف عملية الغسل Washing للعينة بعد عملية التثبيت إلى التخلص من بقايا المثبت الموجود في داخل الخزعة النسيجية. تغسل معظم الخزعات بماء الحنفية أو بالماء المقطر أو المحاليل المنظمة بعد عملية التثبيت إلا أن بعض المثبتات يتم إزالتها من الخزعة النسيجية باستخدام الكحول أو الكحول المختلط مع اليود كوسيلة للغسل. وكما أن بعض المثبتات لا يلزم بعدها غسل العينة وإنما تنقل إلى محاليل الكحول لنزع الماء مباشرة.

نـــزع الـــمـــاء

يتم في هذه الخطوة نزع الماء Dehydration من الخزعة النسيجية من خلال إمرار هذه الخزعة في تراكيز تصاعدية في أحد نازعات الماء Dehydrant المناسبة، لأن الشمع البرافيني لا يختلط بالماء. يجب أن تتوفر بنازعات الماء العديد من المزايا تأتي في مقدمتها الفته للماء Hydrophilic وقدرته على استلاب الماء من الخزعة النسيجية دون إحداث تغييرات في التركيب النسيجي أو المحتوى الكيميائي لهذه الخزعة. وهنالك العديد من نازعات الماء التي تستخدم لهذا الغرض وأهمها وهي:

١ - الكحول الإثيلي. ٢ - الكحول المثيلي.

٣ - الأسيتون. ٤ - كحول الايسوبروبيل.

٥ - ثنائي ميثوكسي البروبان. ٦ - المثيل الصناعي.

١ - الإيثانول Ethanol

للإيثانول C_2H_5OH الصفات التالية:

(أ) سائل شفاف عديم اللون.

(ب) محب للماء ويذوب به مباشرة.

(جـ) مناسب لغرض المحافظة على التراكيب النسيجية.

(د) مكلف وغالي الثمن.

٢ - الميثانول Methanol

الميثانول CH_3OH له مميزات الإيثانول من حيث فعاليته في نزع الماء من الخزع النسيجية إلا أنه نادراً ما يستخدم في نزع الماء من الخزع النسيجية لغرض تحضير القطاعات البرافينية بسبب سميته.

٣ – الأسيتون Acetone

للأسيتون $CO- CH_3 - CH_3$ نفس ميزات الإيثانول من حيث أنه سائل شفاف عديم اللون، ومحب للماء، ويختلط به مباشرة ، إلا أن استخدامه محدود لغرض نزع الماء من الخزعات النسيجية للأسباب التالية :

(أ) له تأثير سريع مما يؤدي إلى هشاشة Brittleness الخزعة النسيجية إذا ما بقيت به لفترة طويلة.

(ب) يذيب الأسيتون المحتوى الدهني للخزع النسيجية بشكل أسرع مما يفعله كل من الإيثانول والميثانول.

(جـ) سريع التطاير.

(د) سريع الاشتعال.

وعادة ما يستخدم الأسيتون لغرض نزع الماء من الخزع النسيجية عندما تكون السرعة وتوفير الزمن هي العامل الأهم حيث أن الأسيتون أسرع من الإيثانول وبقية نازعات الماء من حيث المقدرة على تخلله العينة وإنجاز عملية نزع الماء.

٤ – ثنائي ميثوكسي البروبان 2 , 2 Dimethoxy Propane

يستخدم ثنائي ميثوكسي البروبان وعلى نطاق ضيق لنزع الماء من عينات البتر Amputation في مختبرات الطب الشرعي حيث يعمل على نزع الماء من خلال تفاعل كيميائي ينتج عنه ميثانول وأسيتون وبالتالي يقوم بتثبيت العينة ونزع الماء منها في آن واحد إلا أن له تأثير انكماش على الأنسجة وعادة يضاف إليه حمض الهيدروكلوريك بنسبة ٠,٥ ٪ للإسراع بعملية نزع الماء.

وفي كل الأحوال فإنه يجب التأكد من أن عملية نزع الماء من الخزع النسيجية تمت بالكامل. ويستدل على عدم إكتمال نزع الماء بظهور طبقة رقيقة من راسب أبيض

على النسيج بعد نقله إلى محول الترويق. إن عدم إتمام عملية نزع الماء بالكامل ربما كان سببها الأساسي هو احتواء الكحول المطلق على ماء يزيد عن ٢٪ ويستدل على ذلك بإضافة عدة قطرات من التلوين فإذا تعكر دل على عدم صلاحيته وإذا بقى صافياً يمكن استخدامه في عمليه نزع الماء من الخزع النسيجية.

الترويـــــق

تشتمل عملية الترويق Clearing على استبدال الكحول الإثيلي أو أي نازع للماء بالخزعة النسيجية بمادة قابلة للذوبان بالشمع البرافيني دون إحداث أي تغيير في التركيب النسيجي للعينة بهدف جعل الخزعة شفافة وتسمح بإحلال الشمع المنصهر خلالها مكان الكحول المستخدم في خطوة نزع الماء.

إما إذا كان نازع الماء يمتزج بالشمع المنصهر كالديوكسان وكحول البيوتيل فإن عملية الترويق لا ضرورة لها.

ويتوقف اختيار محلول الترويق المناسب على عدة عوامل منها :

- السرعة المراد بها إزالة الكحول أو محلول نازع الماء من الخزعة النسيجية.
- السرعة المراد بها استبدال محلول الترويق بواسطة الشمع البرافيني المنصهر.
- التأثير الذي يحدثه على التركيب والمحتوى النسيجي.
- سمية محلول الترويق المستخدم ومعدل التطاير.
- تكلفة المحلول المستخدم.

ويعطي استخدام محلول الترويق المناسب أفضل النتائج من خلال وضع العينة بالمحلول مدة أقصر زمن كافي لإنجاز عملية الترويق. وفيما يلي أشهر محاليل الترويق المستخدمة :

١ – الزايلين Xylene

يعتبر الزايلين من أشهر المحاليل المروقة للخزع النسيجية حيث أنه يعطي نتائج مرضية في الخزع النسيجية التي لا يزيد سمكها عن ٣-٤ ملم ولكنه يؤثر على التركيب النسيجي إذا ما تركت العينة به فترات أطول مما يجب.

٢ – الكلوروفورم Chloroform

الكلوروفوم أبطأ من الزايلين في تخلله للخزعة النسيجية لكنه يصلح للعينات التي يصل سمكها حتى ١٠ ملم وكما أنه يسبب صلابة الخزعة النسيجية إذا ما تركت العينة فيه فترة طويلة. ومع أن الكلورفورم غير مشتعل إلا أنه يطلق غاز الفوسجين Phosgene السام. وكما أنه يجب النظر بعين الاعتبار أنه إذا بقي في النسيج أي كمية من الكلورفورم أثناء التخلل بالشمع فإن ذلك سيؤدي إلى صعوبة بالغة في تحضير القطاعات البرافينية. ويعتبر الكلوروفورم مروقاً ممتازًا لأنسجة الجهاز العصبي والأعضاء اللمفاوية والأجنة.

٣ - البنـــزين Benzene

لا يحبذ إستخدام البنزين كمادة مروقة بسبب كونها مادة مشتعلة وكما أنها مادة مسرطنة. ويتخلل البنزين الخزع النسيجية بسرعة ولا يسبب لها ضمور أو هشاشة.

٤ – التلوين Toluene

للتلوين تأثيرات مشابهة للزايلين كمادة مروقة إضافة إلى أنه يلحق أضراراً كبيرة إذا ما تركت العينة به لفترة طويلة، وكما يجب النظر بعين الاعتبار عند استخدامه أنه مادة قابلة للاشتعال إضافة إلى أنه غالي الثمن.

٥ – زيت خشب الأرز Cedar Wood Oil

يتخلل زيت خشب الأرز الخزع النسيجية بسرعة ولا يسبب لها أي صلابة وكما أن تطايره خفيف إلا أنه غالي الثمن ويحل الشمع البرافيني المنصهر مكانه ببطء.

٦ – رابع كلوريد الكربون Carbon Tetrachloride

مع أنه يمكن استخدام رابع كلوريد الكربون كمادة مروقة إلا أنه لا ينصح باستخدامها بسبب سميتها حيث أنها تطلق غاز الفوسجين إضافة إلا أنه يسبب تليف الكبد.

٧ – الهستوكلير Histo-clear

الهستوكلير من المواد الحديثة المستخدمة في ترويق الخزعات النسيجية وينصح باستخدامها للأسباب التالية :

- غير سام.
- غير قابل للاشتعال.
- لا يطلق أبخرة متطايرة.
- غير مسبب للحساسية.

وكما أنه هنالك مادة مروقة أخرى هي الهستوسول Histo-sol شبيهة بالهستوكلير لها نفس مزاياها إضافة إلى أنها قابلة للتحلل الحيوي Biodegradable وكما أنه لا بد من الإشارة إلى أن هنالك مواد مروقة أخرى ولكنها لا تستخدم بشكل روتيني بسبب كلفتها المادية ، ومن هذه المواد سلسلات المثيل Methyl slalicylate ، اللمولين Limolene ، والكلريت Clearite.

التخلل بالشمع

الشمع البرافيني المستخدم في عملية التخلل Impregnation متنوع إلا أن جميع هذه الأنواع عبارة عن خليط من مواد هيدروكربونية. تتراوح درجة الانصهار لأنواع الشمع البرافيني ما بين ٤٠-٦٨م ويفضل استخدام الشمع ذو درجة الانصهار المنخفضة في الدول ذات الطقس البارد، ففي فرنسا مثلاً يستخدم شمع برافيني درجة انصهاره ٥٢م وهنا في المملكة العربية السعودية تفضل معامل الأنسجة استخدام الشمع البرافيني الذي ينصهر عند حرارة ٦٠ م. وفي كل الأحوال فإنه يجب أن لا تتجاوز حرارة الشمع المنصهر أكثر من درجتين لدرجة حرارة إنصهاره حيث أنه إذا تجاوزت ١٠ - ٢٠ م فإن ذلك يؤدي إلى تبخر بعض محتوياته ومن ثم تغيير بعض صفاته. وكما يجب أن لا يغيب عن البال أن جميع أنواع الشمع البرافيني والمواد المستخدمة لتخلل وطمر الخزع النسيجية تحتوي على مواد مضافة ؛ الغاية منها إكساب الشمع أو مادة التخلل مزيداً من الصلابة. ومن هذه المواد المضافة شمع النحل Beeswax و Ceresin وغيرها من المواد الأخرى التي تضاف عادة بنسبة ٠,٣ - ٠,٥٪ والتي تهدف بالأساس إلى سرعة تجميد الشمع والمادة الطامرة وإكسابه مزيداً من الصلابة.

ويتم صهر الشمع البرافيني بواسطة جهاز Wax dispenser (الشكل رقم ٤٠) وكما أنه يفضل لبعض العينات مثل خزعات الرئة أن يتم التخلل تحت التفريغ Vacuum impregnation باستخدام فرن مفرغ بحيث لا تزيد قوة التفريغ من ٤٠٠ - ٥٠٠ ملم زئبق وإلا لحق أذى كبير في العينة النسيجية. ويتم التخلل أحياناً بإستخدام مادة نظير البلاستيك Paraplast المكونة من شمع برافيني وبلمرات بلاستيكية تسهل عمليات تحضير القطاعات البرافينية. وكما يمكن استخدام مواد أخرى مثل: ميثاكرليت المثيل Methyl methacrylate الذي يستخدم بشكل أساسي لعينات العظم

غير منزوع الكلس وميثاكرليت الجلايكول Glycol methacrylate وهذه مادة شائعة الاستخدام والأرالدايت Araldite والإبون Epon تستخدم كل منها في تخلل عينات المجهر الإلكتروني. وفي كل الأحوال يجب أن لا يقل حجم وسط التخلل من ٢٥ - ٣٠ ضعفاً لحجم الخزعة النسيجية.

الشكل رقم (٤٠). صورة ضوئية لجهاز Wax dispenser المستخدم في صهر الشمع البرافيني وإبقائه عند درجة حرارة الانصهار.

يعمل التخلل لشمع البرافيني تحت ضغط منخفض على طرد الفقاعات الهوائية ومن ثم التسهيل والإسراع في عملية التخلل بالشمع. ويستخدم التخلل تحت التفريغ مع العينات التالية :

١ - الخزع النسيجية المستعجلة Urgent biopsy .

٢ - الأنسجة الصلبة Dense tissue .

٣ - الخزع النسيجية الرئوية .

٤ - الأنسجة المحتوية على كميات كبيرة من الدهون .

الشكل رقم (٤١). صورة ضوئية لجهاز معاملة الخزع النسيجية Tissue processor .

الطمر بالشمع

يستخدم في طمر العينات بالشمع Wax embedding نفس الشمع الذي استخدم في عملية التخلل السابقة لهذه الخطوة. وكما يجب التنبه إلى ضرورة أن يكون الشمع المستخدم في طمر الخزعات النسيجية نقياً وخالياً من الشوائب وأنه لا يحتوي على أية كمية من المادة التي استخدمت في عملية ترويق هذه الخزع. ويتم الطمر باستخدام قوالب ورقية أو بلاستيكية أو معدنية. كذلك من الأهمية بمكان مراعاة الوضع الذي تطمر به العينة Orientation of tissue، فعلى سبيل المثال فإن الخزع النسيجية الأنبوبية يتم وضعها وطمرها بالشمع بشكل مستعرض لتحضير قطاعات عرضية منها بينما خزع الجلد فإنها تطمر على حافتها وخزع العضلات بعضها يطمر بشكل طولي وآخر بشكل عرضي. وأثناء تحضير قالب الشمع يجب العمل بسرعة واستخدام ملقط غير حاد وينفخ على سطح الشمع حتى يتصلب بعض الشيء ثم يغمس ببطء في وعاء به ماء عند حرارة الغرفة لأن الماء البارد من شأنه التسبب في تشقق قالب الشمع. وكما أنه في بعض الأحيان يمكن وضع علامة على الجزء من الخزعة المراد إظهاره بالقطاعات من خلال وضع علامة بواسطة ربطة خيط Suture. ويفضل دهن قوالب الطمر من الداخل بطبقة خفيفة للغاية من الجليسرين. ويجب أن يتم طمر العينة بالشمع البرافيني بالسرعة الممكنة لكي لا تبرد الخزعة النسيجية وتتغلف بطبقة رقيقة من الشمع الأمر الذي من شأنه سقوط الخزعة من القالب ثم تغمس ورقة صغيرة مكتوب عليها اسم العينة بقلم الرصاص على وجه القالب.

بعد أن يتجمد الشمع حول الخزعة النسيجية على هيئة قالب فإنه يجب عمل شذف (تنظيم) له Trimming باستخدام مشرط Scalpel وذلك لإزالة الشمع الزائد حول الخزعة بالقالب الشمعي بحيث يتم الإبقاء على مسافة ٣-٤ ملم بين سطح القالب الشمعي والخزعة النسيجية. بعد ذلك يتم لصق القالب الشمعي المشذف على

حامل معدني أو خشبي أو بلاستيكي باستخدام سكينة يتم تسخينها على لهب بنزن أو باستخدام مبسط يسخن كهربائياً Electrically heated spatula.

دهن قوالب الطمر

يفضل ولغرض سهولة فصل القالب الشمعي عن جدارن قوالب الطمر دهن الجدران الداخلية بطبقة خفيفة من مادة تشكل حاجز فصل بين المادة الطامرة وسطح هذه الجدران (الشكل رقم ٤٢). وفيما يلي تركيب أحد المحاليل التي تستخدم لهذه الغاية.

الشكل رقم (٤٢). صور ضوئية لبعض قوالب الطمر.

كحول (٨٠٪) ٤٠٠ سم٣

جليسرين ٥ سم٣

ويبقى هذا المحلول صالحاً للإستخدام لمدة شهرين.

وكما يستخدم البعض الفازلين في دهن الجدران الداخلية لقوالب الطمر.

ولا بد من الإشارة إلى أن معظم المختبرات تقوم بالطمر بواسطة القوالب المعدنية وتستخدم الكبسولة البلاستيكية (الكاسيت) كغطاء للقالب الشمعي حيث تكون تلك القوالب ثابتة ودائمة، ولا يلزم معها تقليم أطراف القالب.