الفصل الخامس

تحضير القطاعات النسيجية

تحضير القطاعات البرافينية

سيتم في هذا الفصل التطرق إلى تقنية تحضير كل من القطاعات البرافينية والقطاعات الثلجية.

يتم تحضير القطاعات البرافينية Sectioning بواسطة جهاز الميكروتوم Microtome وهو عبارة عن جهاز يعمل على تحريك قالب شمعي به خزعة نسيجية باتجاه سكينة ثابتة حادة. أما العينات المطمورة بواسطة الإيبون Epon والأرالدايت Araldite تستخدم لها سكاكين زجاجية أو سكاكين ألماسية حيث يمكن بواسطتها تحضير قطاعات تقل عن سمك ١ ميكرومتر.

وهنالك العديد من أجهزة الميكروتوم التي تستخدم في تحضير القطاعات البرافينية وهي :

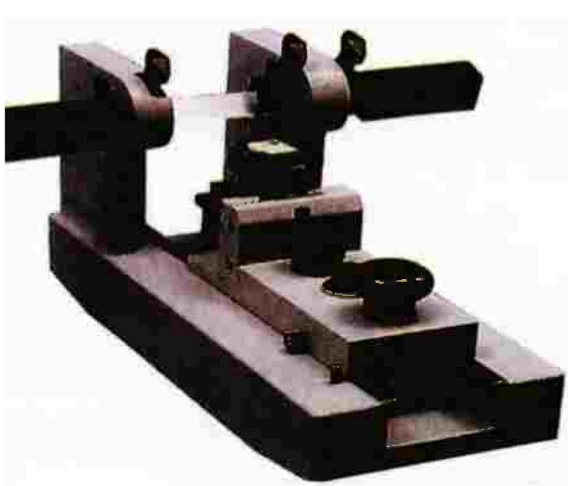
الميكروتوم الدوار

يستخدم الميكروتوم الدوار Rotary microtome في تحضير القطاعات البرافينية التي تحضر عادة عند سمك ٤ - ٥ ميكرومتر (الشكل رقم ٤٣).

الشكل رقم (٤٣). صورة ضوئية لجهاز للميكروتوم الدوار.

الميكروتوم المنزلق

يستخدم الميكروتـو المنزلق Sliding microtome لتحضير قطاعـات سلوئيدية وعادة تحضر عند سمك ١٠ - ١٥ ميكرومتر (الشكل رقم ٤٤).



الشكل رقم (٤٤). صورة ضوئية للميكروتوم المنزلق .

ميكروتوم التقطيع الثلجي

يستخدم ميكروتوم التقطيع الثلجي Freezing microtome لتحضير قطاعات نسيجية من خزع يتم تبريدها وتحضير قطاعات سمكها ما بين ٨-١٠ ميكرومتر دون إخضاعها لعملية التثبيت (الشكل رقم ٤٥).

الشكل رقم (٤٥) . صورة ضوئية لميكروتوم التقطيع الثلجي.

ميكروتوم التقطيع الدقيق

يستخدم ميكروتوم التقطيع الدقيق Ultra - microtome لتحضير قطاعات المجهر الالكتروني وعند سمك ١٢٠ - ٣٠٠ أنجستروم (الشكل رقم ٤٦).

الشكل رقم (٤٦). صورة ضوئية لميكروتوم التقطيع الدقيق .

يتكـون الميكروتـوم مـن أجـزاء أساسـية عبـارة عـن حـامل لقـالب الخزعـة النسيجية، حامل السكين، عجلة ذات مقبض تتحرك حركة دائرية توضع معـها حـامل القالب في الأمام، إضافة إلى قرص تنظيم سمك القطاعات المراد تحضيرهـا، ولا يمكن تحضـير قطاعـات نسيجية بواسطة الميكروتـوم دون توفير سكينة خاصـة لتقـوم بقطـع الخزعة المطمورة بالشمع البرافيني أو السلوئيدين. وقد تكون السكينة مقعرة الوجهين أو ذات وجه مقعر واحد. ولتحضير قطاعـات برافينية تستخدم سكينة مقعـرة الوجـهين بينمـا تستخدم سـكينة مقعـرة الوجه لتحضير قطاعـات سـلوئيدية. هـذا وإنه يجب سـن السـكينة باستمرار والحفـاظ على حافتها ناعمـة حـادة خالية مـن النتوءات. ويتم سـن Stropping سكينة الميكروتوم باستخدام جهاز سن السكاكين Knife Sharpener (الشكل رقم٤٧).

الشكل رقم (٤٧). صورة ضوئية لأحد الأجهزة الأتوماتيكية المستخدمة في سن السكاكين الخاصة بجـهاز الميكروتوم.

تثبيت القطاعات البرافينية على شرائح زجاجيــة

بعد عمل القطاعات بواسطة جهاز الميكروتوم فإنه يتم نقلها وتعويمها في حمام مائي دافيء لإزالة التجعدات ثم بعد ذلك يتم رفعها بواسطة شرائح زجاجية نظيفة وتركها على سخان الشرائح Slide warmer لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة، مع النظر بعين الاعتبار أن الحرارة المرتفعة قد تؤدي إلى تدمير الطبيعة الأنتجينية مما يتعذر معه استخدامها في الدراسات المناعية. ويمكن الاستعاضة عن تسخين الشرائح المحملة بالقطاعات عن طريق استخدام شرائح مغطاة بمادة لاصقة Glue-Coated . وفيما يلي بعض المحاليل اللاصقة للقطاعات النسيجية :

١- لاصق السلوئيدين Cellodin Solution Adhesive

المحلول الرئيسي

يذاب ٢٨ جم من البارلوديون Parlodion في ١٢٥ سم^{٣} من كحول اثيلي مطلق في وعاء محكم الإغلاق ويترك أسبوع في مكان معتم.

المحلول العملي

يحضر من المحتويات التالية :

محلول السلوئيدين الرئيسي .... ٥ سم^{٣}

كحول إثيلي مطلق. .... ٥٦ سم^{٣}

أثير .... ٥٦ سم^{٣}

يخزن هذا اللاصق في وعاء في مكان معتم. وتجدر الإشارة إلى أن مادة البارلوديون تصبح قابلة للانفجار إذا ما أصبحت جافة داكنة.

ويتم استخدام محلول السلوئيدين اللاصق في لصق القطاعات تبعاً للخطوات التالية :

(أ) تمرر القطاعات حتى الكحول المطلق.

(ب) يتم ترك القطاعات في محلول السلوئيدين العملي عشرين غمسة.

(جـ) يتم ترك القطاعات حتى تجف.

(د) تنقل القطاعات إلى كحول (٧٠٪) لمدة دقيقة من أجل تصلب السلوئيدين.

(هـ) تنقل الشرائح إلى الماء المقطر ثم تصبغ حسب الرغبة.

٢ - لاصق شبة الكروم Chrome Alum Adhesive

يحضر هذا اللاصق من المكونات التالية:

جيلاتين .... ١٠ جم

ماء مقطر ١٠٠٠سم٣

كبريتات البوتاسيوم والكروم .... ٥ جم

ثايمول .... عدة بلورات

يذاب الجيلاتين في ماء مقطر ساخن ثم تضاف كبريتات البوتاسيوم والكروم وبلورات الثايمول. يخزن هذا المحلول في الثلاجة أو عند حرارة الغرفة.

ويستخدم هذا المحلول للصق القطاعات البرافينية أو الثلجية حيث يتم غمس الشرائح في المحلول لعدة دقائق ثم تجفف بعدها وتحفظ في علب الشرائح لوقت الاستخدام.

٣- لاصق زلال البيض لماير Mayer`s Egg-albumin

تخلط مقادير متساوية من زلال البيض والجليسرين بشكل جيد ثم ترشح ويضاف إليه عدة بلورات من الثايمول ثم يخزن في وعاء زجاجي محكم الاستخدام.

وعند الاستخدام يؤخذ ١ سم^٣ من هذا المحلول ويضاف إلى ٥٠سم^٣ من ماء مقطر سبق غليه لطرد الهواء منه حتى لا يتسبب في تكون فقاعات بين القطاعات وسط الشريحة (الجدول رقم ٤).

٤ – لاصق هوبت Haupt`s Adhesive

يحضر هذا اللاصق من الآتي :

جيلاتين ١جم

جليسرين .... ١٥ سم^٣

ماء مقطر .... ١٠٠ سم^٣

ثايمول .... ٠,٢ جم

يذاب الجيلاتين في الماء المقطر الدافيء ثم يضاف الثايمول والجليسرين ويرشح بعد ذلك. وعند الاستخدام يخلط ١سم^٣ من هذا اللاصق مع ٥٠ سم^٣ من فورمالين (٢٪) حيث يساعد الفورمالين على مزيد من اللصق.

وقبل البدء بتحضير القطاعات النسيجية فإنه تنقل قليل من المادة اللاصقة إلى كل من الشرائح المراد تثبيت القطاعات عليها وتنشر على سطح الشريحة بشكل متساوي بواسطة الإبهام بعد تنظيفه بالكحول لتفادي تشكيل طبقات الإصبع على الشرائح الزجاجية ثم يتم تجفيفها على جهاز سخان الشرائح (الشكل رقم ٤٨) لكي يتم لصق القطاعات بشكل محكم وحمايتها من السقوط أثناء عملية الصبغ، وكما يجب أخذ الحيطة بعدم تكون فقاعات هوائية بين القطاعات الزجاجية وسطوح الشرائح الزجاجية ، ويستحسن التقاط المقاطع النسيجية بسرعة من الحمام المائي (الشكل رقم ٤٩) وأن لا تبقى فيه مدة طويلة ويتم تجفيف القطاعات مباشرة ؛ لأن وجود الماء على القطاعات النسيجية يؤدي إلى انتفاخ بعض الأنسجة ويؤثر على محتواها الكيميانسيجي. ويتم تثبيت القطاعات Mounting على الشرائح الزجاجية.

الشكل رقم (٤٨). صورة ضوئية لسخان الشرائح.

الشكل رقم (٤٩). صورة ضوئية للحمام المائي الخاص بتعويم القطاعات البرافينية .

الجدول رقم (٤) . بعض المشاكل التي تظهر أثناء تحضير القطاعات النسيجية ومسبباتها .

المشكلة	المسببات
القطاعات غير متجانسة	سكينة القطع غير مثبتة بالكامل أو القالب غير مثبت تماما على حامله
انشطار الشريط الشمعي	وجود خدش في حافة سكينة القطع أو وجود أوساخ أو أجزاء صلبه في الشمع أو الخزعة النسيجية.
شريط شمعي غير مستقيم	قالب الشمع غير منتظم الأضلاع أو الأضلاع المتقابلة غير متوازية.
تجعد القطاعات	عدة أسباب منها : ١- تم تبريد الشمع المنصهر ببطء أثناء صب القالب الشمعي. ٢ - زاوية إنحناء السكينة كبيرة والزاوية هنا هي الحاصلة بين محور السكينة الطولي وبين الخط الوهمي الذي يمر بموازاة حركة القالب. وتتراوح الزاوية ما بين ٢٠ -٥٦ درجة ويعتمد ذلك على نوع العينة وسمك القالب فكلما كان القالب أرق قلت الزاوية.
سقوط القطاعات النسيجية من الشمع المحيط بها	تبريد العينة وإحاطتها بالشمع البرافيني المتجمد أثناء نقل العينة من الشمع المنصهر وتحضير القالب الشمعي. وكما يمكن حصول نفس المشكلة إذا ما تمت عملية تحضير القالب باستخدام شمع بارد على وشك التجمد أو إذا كان الشمع أكثر سخونة من المطلوب أثناء التخلل.
صعوبة عمل قطاعات نسيجية	عدم التخلص من الكحول أثناء عملية الترويق.
التفاف القطاعات على حافة السكين	زاوية انحناء السكينة منخفضة وتحتاج إلى ضبط وكذلك إذا كانت حرارة الغرفة مرتفعة أو الشمع المستخدم لين.
تمزق القطاعات	عدة أسباب : ١ - وجود نتوءات بحافة السكين. ٢- الشمع المستخدم غير نقي .
عدم القدرة بالحصول على شريط شمعي	- حافتا القالب الشمعي ليستا متوازيتين. - السكين مائل أكثر من الحاجة. - حافة السكين غير نظيفة. - القطاعات سميكة.

تابع الجدول رقم (٤) .

المشكلة	المسببات
ساحة القطاعات أقل من واجهة القالب الشمعي	- السكين مائلة كثيرا إلى الأمام. - السكين غير مشحوذه بالشكل الجيد.
التصاق القطاعات بالقالب الشمعي	- الشمع المستخدم من النوع اللين. - حرارة الغرفة مرتفعة. - السكين غير مائلة بالقدر الكافي. - وجود شظايا من الشمع على طرف السكين أو الطرف العلوي للقالب.
تفتيت العينة وسقوطها من القالب	- نزع الماء غير مكتمل. - التخلل بالشمع غير كافي.
تتطاير القطاعات والتصاقها بالأشياء المحيطة	- تولد الكهرباء الساكنة. - عدم وجود أي رطوبة في جو غرفة التقطيع.

تحضير قطاعات نسيجية من العظم

يتكون العظم سواء كان صلبا أو إسفنجيا من ألياف غروية، وأملاح كالسيوم، وخلايا عظمية. وتشتمل خلايا العظم على ثلاث أنواع من الخلايا هي: الخلايا بانية العظم Osteoblasts والخلايا العظمية Osteocytes والخلايا هالكة العظم Osteoclasts. ويمكن ادراج العينات التي يلزم نزع كلسها إلى أربع مجموعات:

١ -عينات عظم لغرض تشخيص وجود أورام أو التهابات أو غير ذلك وهذه العينات يتم معاملتها بنفس طرق معاملة عينات الأنسجة الأخرى باستثناء نزع الكلس أولا من أجل تسهيل عملية تحضير قطاعات نسيجية منها.

٢ -عينات عظم لغرض تشخيص الأمراض الأيضية وبالعادة تؤخذ العينة من عظمة قذال الحرقفة Iliac crest.

٣ - عينات العظم المبتور Amputation specimens والتي تم بترها بسبب وجود ورم مؤكد أو حالات النغل Gangrene وهذه العينة غالبا تحضر إلى المعمل غير مثبتة. وعندها يجب إزالة الجلد والعضل منها ثم نشر الجزء المعتقد أنه يساعد بالتشخيص ثم يبدأ بالتثبيت قبل الشروع بعملية نزع الكلس.

٤ - عينات تكلست بسبب ترسب أملاح الكالسيوم عليها.

يترسب الكالسيوم في بعض الأنسجة على هيئة هيدروكسيل الأبتيت [Hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] مما يجعل من الصعوبة إعداد قطاعات، وقد يلحق ضررا بسكينة الميكروتوم المستخدمة في تحضير القطاعات، ولتحضير قطاعات العظم من الأنسجة المحتوية على ترسبات كلسية لا بد من معالجتها بمحاليل معينة تعمل على نزع الكلس فتجعل النسيج مرنا يسهل تحضير القطاعات منه.

إن المحاليل المستخدمة في نزع الكلس من الأنسجة على نوعين بعضها يحتوي على حمض يعمل على التفاعل مع الكالسيوم وترسيبه من النسيج على هيئة أملاح والبعض الآخر يحتوي على عوامل مخلابية Chelating agent تعمل على الاتحاد مع الكالسيوم بواسطة روابط مشاركة ومن ثم نزعه من النسيج. إضافة إلى ذلك تحتوي المحاليل المستخدمة لنزع الكالسيوم على مواد أخرى بعضها يعمل على تثبيت النسيج والبعض الآخر يقلل من الانكماش والتشويه لخلايا النسيج بسبب الحموض والمواد الفعالة في هذه المحاليل. كما قد يضاف إلى بعض هذه المحاليل مواد تساعد على الحفاظ على رقم هيدروجيني معين حتى تتم عملية نزع الكلس بسرعة وبأقل أضرار ممكنة للنسيج.

والحموض المستخدمة على نوعين بعضها شديد الحموضة مثل حمض الهيدروكلوريك، وحمض النيتريك وبعضها ضعيف الحموضة مثل حمض الفورميك، وحمض الخليك، وحمض الكروميك، وحمض المر. وفي العادة تحتوي

المحاليل المستخدمة لنزع الكلس من النسيج على حمض شديد الحموضة وآخر ضعيف الحموضة إضافة إلى مواد أخرى.

يمكن تحضير قطاعات نسيجية من الخزع المتكلسة أو من العظم من خلال معاملة العينة بالطريقة الروتينية من حيث نزع الماء والترويق والتخلل بالشمع والطمر. ويكون الطمر هنا إما بشمع البرافين أو السلوئيدين Celloidin أو الطمر المضاعف Double embedding أو الطمر بواسطة الميثاكرليت Methacrylate. ولا بد قبل الشروع بهذه الخطوات من نزع الكلس من العينة.

نزع الكلس من النسيج

قبل الشروع في نزع الكالسيوم من العينة يجب أن يتم تثبيتها بالشكل الصحيح. وأفضل المثبتات لعينات العظم هو مثبت الفورمالين المنظم المعاير حيث يتم التثبيت على مرحلتين ففي المرحلة الأولى يتم تثبيت أولي لمدة ٤٨ ساعة في مثبت الفورمالين المنظم المعاير ثم يتبع ذلك المرحلة الثانية من التثبيت بعد نزع الكلس في محلول الفورمالين - كلوريد الزئبقيك الذي يتكون من الآتي :

كلوريد الزئبقيك	٦ جم
ماء مقطر	٩٠ سم^{٣}
خلات الصوديوم	١,٢٥ جم
فورمالين مركز	١٠ سم^{٣}

يضاف الفورمالين في النهاية مع النظر بعين الاعتبار إزالة ترسبات الزئبق من القطاعات قبل الشروع بصبغها على النحو التالي :

- تمرر القطاعات حتى الماء المقطر.

- تنقل القطاعات إلى كحول إثيلي ٧٠٪ يحتوي على بلورات من اليود لمدة ٥ - ١٠ دقائق.
- تغمس القطاعات بالماء ثم تنقل إلى محلول ثيوكبريتات الصوديوم (٥٪) حتى يزول لون اليود.
- تغسل القطاعات بالماء الجاري ثم تخضع لطريقة الصبغ المطلوبة.

وهنالك محاليل أخرى تستخدم لتثبيت عينات العظم منها:

١ - كحول إثيلي ٤٠٪ لمدة ٣ ساعات تنقل بعدها العينة إلى كحول إثيلي ٧٠٪ ولمدة ٧ أيام بحيث يتم تغيير الكحول يوميا.

٢ - برافورمالدهيد ٤٪ لمدة ٧ ساعات. ويفضل استخدام هذا المحلول في تثبيت عينات العظم المراد تحضير قطاعات منها لغرض الدراسة الإنزيمية أو الفحوصات الكيميانسيجية المناعية.

٣ - جلوترلدهيد ٢,٥٪ مذاب في ٠.٠٥ مول/لتر من منظم الفوسفات الملحي ويحتوي على سكروز ٠,١٪.

وهنا لا بد من التأكيد على أهمية نشر عينة العظم الكبيرة إلى شرائح غير سميكة لإنجاز عملية التثبيت والعمليات اللاحقة من أجل تحضير قطاعات نسيجية بالشكل الصحيح. ويتم اختيار محلول نزع الكلس على أساس الآتي:

١ - ضرورة الحالة المستعجلة للتشخيص.

٢ - درجة التكلس.

٣ - الهدف من التشخيص هل لغرض تحديد ورم أو لغرض شرعي أو غير ذلك.

٤ - المراحل التالية لعملية نزع الكلس خاصة الأصباغ التي ستخضع لها القطاعات.

وبكل الأحوال فإنه يجب عمل تثبيت أولي Initial fixation قبل الشروع بعملية التثبيت ولكن بنفس الوقت يجب تجنب إحداث نزع مفرط للكلس Over-decalcification .

محاليل نزع الكلس من النسيج

ويمكن إجمال محاليل نزع الكلس في المجموعات التالية:

١ - محاليل نزع الكلس الحمضية.

٢ - محاليل نزع الكلس المخلابية.

٣ - نزع الكلس بواسطة التبادل الأيوني للراتنجات.

٤ - نزع الكلس إلكتروليتيا.

٥ - استخدام الأمواج الدقيقة Ultrasonic.

أولا: محاليل نزع الكلس الحمضية Acid decalicfier

محاليل نزع الكلس الحمضية على نوعين، محاليل حموض ضعيفة، ومحاليل حموض قوية.

١- محاليل الحموض الضعيفة لنزع الكلس Weak acid decalcifier

ويستخدم هنا كل من حمض الفورميك وحمض الكروميك وحمض الخليك وحمض البكريك، وتستخدم للحالات غير المستعجلة ومن أمثلة هذه المحاليل:

(أ) محلول حمض الفورميك المنظم Buffered formic acid fluid :

حمض الفورميك (٩٠٪)	١٢٥ سم^{٣}
ماء مقطر	٣٧٥ سم^{٣}
فورمات الصوديوم (HCOONa)	١٧ جم

ويعتبر هذا المحلول من أفضل المحاليل المستخدمة لنزع الكالسيوم وكما يمكن حفظه لفترة طويلة دون أن تتأثر فعاليته.

(ب) **محلول جودنك وستيورت Gooding and Stewart's fluid** :

حمض الفورميك	٥ - ٢٥سم^{٣}
فورمالين مركز	١٠ سم^{٣}
ماء مقطر أكمل حتى	١٠٠ سم^{٣}

(جـ) **محلول ليلي fluid** :

حمض المر (١,٥٪) محلول مائي	٨٥ سم^{٣}
فورمالين مركز	١٠ سم^{٣}
حمض الفورميك ٩٠٪	٥ سم^{٣}

يضبط الرقم الهيدروجيني لهذا المحلول ما بين ٧ - ٩

٢ - محاليل الحموض القوية لنزع الكلس Strong acid decalcifier

تستخدم هنا حموض قوية مثل حمض النيتريك وحمض الهيدروكلوريك ويتم نزع الكلس بهذه المحاليل للعينات التي يراد نزع كلسها بالسرعة الممكنة حيث عامل الزمن مهم خاصة في معامل الأنسجة المرضية لغرض التشخيص.

(أ) **محلول حمض النتيريك Nitirc acid fluid** :

حمض النيتريك المركز ٧٠٪	٧,٥ سم^{٣}
ماء مقطر	٩٢,٥ سم^{٣}

(ب) **محلول الفورمالين - حمض النتيريك Formalin-nitric acid fluid** :

فورمالين مركز	١٠ سم^{٣}

ماء مقطر	٨٠ سم٣
حمض النيتريك مركز ٧٠٪	١٠ سم٣

(جـ) **محلول بريني fluid**

حمض النيتريك ١٠٪	٤٠ سم٣
كحول إثيلي مطلق	٢٠ سم٣
حمض الكروميك ٠,٥٪	٢٠ سم٣

يحضر هذا المحلول قبل الإستخدام مباشرة ويستخدم للعينات التي بها كميات قليلة من الكلس او عينات عظم صغيرة. يتحول لون هذا المحلول إلى الأزرق أثناء عملية نزع الكالسيوم بسبب اختزال أيونات ثنائي الكرومات بواسطة الكحول الإثيلي.

ثانياً : محاليل نزع الكلس بالعوامل المخلابية

وفيما يلي بعض الأمثلة على هذه المجموعة من محاليل نزع الكلس المخلابية :

١ - محلول إثيلين ثنائي الصوديوم رابع خلات ثنائي الأمين

أذب ٧,٥ جم من إثيلين ثنائي الصوديوم رابع خلات ثنائي الأمين Ethylene disodium diamine tetracetate والتي يرمز لها بالرمز EDTA في ١٠٠ سم٣ من الماء المقطر. أضبط المحلول عند الرقم الهيدروجيني = ٦ باستخدام هيدروكسيل الصوديوم ٤٪.

يمتاز هذا المحلول بأن تأثيره البطيء يستغرق عدة أسابيع لكنه لا يلحق أي ضرر بأنسجة العينة. يجب أن يحضر هذا المحلول قبل الاستخدام مباشرة وأن يتم استبداله كل أربعة أيام وأن تغسل العينة جيداً بعد إنتهاء عملية نزع الكالسيوم قبل البدء بعملية نزع الماء حيث أن مركب EDTA لا يذوب بالكحول.

٢ – محلول EDTA – الفورمالين EDTA-formalin fluid

يعرف هذا المحلول أيضاً بمحلول هلمان و لي Hillemann and Lee ويتكون من الآتي:

ثنائي صوديوم ملح EDTA.	٥.٥ جم
ماء مقطر	٩٠ سم^3
فورمالين مركز	١٠ سم^3

٣ – محلول شميد Schmide's solution

فورمالين مركز	١٠٠ سم^3
خلات الصوديوم	١ جم
فرسنات ثنائي الصوديوم EDTA-disodium versenate	١٠ سم^3

هناك عوامل متعددة تؤثر في عملية نزع الكلس منها: نوع المحلول المستخدم ودرجة الحرارة ، ورج العينة أثناء نزع الكلس، وحجم المحلول المستخدم، وكذلك حجم العينة. ويفضل أن تتم عملية نزع الكلس عند درجة حرارة ٢٥م مع رج مستمر وتغيير المحلول بين فترة وأخرى وأن لا يقل حجم المحلول على عشرين ضعفاً بالنسبة لحجم العينة. كما يجب التنبه إلى أن عملية نزع الكلس تلحق عيوباً في النسيج أهمها تحلل الحموض النووية مما يجعل عملية صبغ الكروماتين غاية في الصعوبة وكما يصبح النسيج سريع الصبغ بصبغة الإيوسين وتصبغ محتويات النسيج بلون أحمر فاقع دون وجود درجات من التمييز بين هذه المحتويات. كما تعمل المحاليل المستخدمة في نزع الكلس على تثبيط نشاط معظم الإنزيمات. إلا أن استخدام المحاليل المحتوية على العوامل المخلابية يحافظ على نشاط بعض الإنزيمات كما يحلق ضرراً أقل من المحاليل المحتوية على الحموض.

تجدر الإشارة إلى أنه إضافة إلى استخدام المحاليل المحتوية على الحموض أو العوامل المخلابية في نزع الكلس من النسيج، فهناك طرق أخرى وإن كانت أقل استخداماً منها استخدام التبادل الأيوني للراتنجات Ion exchange resins وكذلك نزع الكلس إلكتروليتاً Electrolytic decalcification باستخدام أقطاب موجبة وأخرى سالبة ضمن محاليل تحتوي على العينة مما يسمح بتحرك أيونات الكالسيوم الموجبة إلى القطب السالب وبذلك ينزع الكلس من النسيج.

وكما أنه لا بد من الإشارة إلى أنه بالوقت الحاضر أصبح ممكنا نزع الكلس باستخدام أمواج الميكرويف Microwave decalcification من خلال استخدام أحد محاليل نزع الكلس للحموض الضعيفة تحت تأثير الأمواج الدقيقة حيث يمكن إنجاز عملية نزع الكلس خلال وقت قصير.

ويمكن الاستدلال على استكمال عملية نزع الكلس من النسيج عندما تصبح سهلة القطع بواسطة المشرط لكن لا يمكن فعل ذلك مع العينات الصغيرة خاصة تلك التي تخص المرضى في مختبرات الأنسجة المرضية وعندها لا بد من استخدام طرق كيميائية للتأكيد من إزالة الكلس بالكامل من النسيج. ومن هذه الطرق طريقة أكزلات الكالسيوم Calcium oxalate التي تتم على النحو التالي:

تأخذ ٥ سم^{3} من المحلول الذي استخدم في نزع الكلس من العينة ثم تضاف إليه عدة نقاط من الأمونيا حتى يصبح المحلول قلوياً (الرقم الهيدروجيني أكثر من ٧). ثم يضاف إليه ٥ سم^{3} من محلول أكزلات الأمونيوم ٥٪ ويترك لمدة نصف ساعة، فإذا تكون راسب أبيض أو تعكر المحلول دل ذلك على أن عملية نزع الكلس لم تكتمل بسبب تكون أكزلات الكالسيوم. وعندئذ لا بد من إعادة العينة إلى المحول وتغييره لفترة إضافية وتكرر عملية الكشف حتى يتم التأكد من إزالة الكلس تماماً ويمكن معرفة ذلك بعدم تكون عكارة أو راسب أبيض وبقاء المحلول صافياً بعد الكشف. وتجدر الإشارة

إلى أنه يجب تغيير المحلول أثناء عملية إزالة الكلس مرة كل ٢٤ - ٤٨ ساعة. كما ويجب غسل العينة جيدا بعد استكمال نزع الكلس وقبل البدء بعملية نزع الماء باستخدام تراكيز الكحول التصاعدية وذلك للتخلص من بقايا المحلول الحمضي حيث بقاء الحموضة في النسيج من شأنه أن يؤثر على عملية الصبغ وكما أن بعض المواد المستخدمة في المحاليل لا تذوب في الكحول ولا بد من نزعها من النسيج جيدا قبل البدء بعملية نزع الماء ويمكن إزالة حموضة المحلول من العينة بوضعها في محلول كبريتات الصوديوم (٥٪) لمدة ٦ - ١٢ ساعة قبل البدء بنزع الماء.

ويعتمد معدل نزع الكلس من العينة على مجموعة من العوامل أهمها :

١ - تركيز المادة الفعالة في نزع الكلس في المحلول المستخدم.

٢ - درجة الحرارة لمحلول نزع الكلس : والحرارة المثلى لنزع الكلس هي ٢٥°م.

٣ - رج العينة.

٤ - حجم محلول نزع الكلس الذي يجب أن لا يقل عن ٢٠ ضعف لحجم العينة.

٥ - سمك العينة المراد نزع كلسها.

٦ - عائمية Suspension العينة في محلول نزع الكلس.

نزع الماء من عينة العظم

يتم نزع الماء من عينة العظم تبعا للخطوات التالية :

١ - اغمس العينة في ٤ تباديل من محلول منظم الفوسفات الملحي بمعدل ١٥ دقيقة لكل تبديل ثم تنقل إلى كحول إثيلي (٥٠٪) لمدة ١٢ ساعة يتبعه كحول إثيلي (٧٠٪) لمدة ١٢ ساعة أخرى.

٢ - تنقل العينة إلى تبدلين من كحول إثيلي (٨٠٪) لمدة ١٢ ساعة لكل تبديل.

٣ - تنقل العينة إلى تبدلين كحول إثيلي (٩٦٪) لمدة ١٢ ساعة لكل تبديل.

٤ - تنقل العينة إلى ٤ تباديل من كحول إثيلي مطلق بمعدل ١٢ ساعة لكل تبديل.

ويجب الأخذ بالاعتبار أن هذه الفترات الزمنية خاصة بعينات العظم الكبيرة بينما في حالة عينات العظم الصغيرة مثل عظمة قذال الحرقفة يمكن استبدال زمن ساعتين لكل ١٢ ساعة من الخطوات المذكورة أعلاه. هذا ومن الأهمية بمكان أن يتم نزع الماء باستخدام التفريغ وعند حرارة ٢٥م.

ترويق عينة العظم

يتم عادة ترويق عينة العظم بإمرارها بتبديلين من الزايلين بمعدل ١٢ ساعة لكل تبديل إذا كانت العينة كبيرة وبمعدل ساعتين لكل تبديل إذا كانت العينة صغيرة.

الطمر المـــزدوج

يستخدم الطمر المزدوج من أجل الاستفادة من ميزات كل من الشمع البرافيني والسلوئيدين معا كمواد طامرة ويستخدم الطمر المضاعف لعينات العظم والأنسجة الثابتة بشكل أساسي على النحو التالي:

١ - التثبيت على مرحلتين الأولى باستخدام الفورمالين المنظم المتعادل لمدة ٤٨ ساعة يليها مرحلة أخرى باستخدام مثبت الفورمالين وكلوريد الزئبقيك لمدة ٢٤ ساعة.

٣ - تنقل العينة إلى كحول إثيلي (٧٠٪) لمدة ٨ ساعات.

٣ - تنقل العينة إلى كحول إثيلي (٩٠٪) لمدة ٨ ساعات.

٤ - تنقل العينة إلى كحول مطلق لمدة ٢٤ ساعة. وأحيانا قد يلزم ترك العينة في الكحول المطلق حتى ٧٢ ساعة لضمان تشبع كامل بالمادة الطامرة.

٥ - تنقل العينة إلى محلول سولوئيدين (١٪) مذاب في خليط من الكحول والأثير لمدة ١٦ ساعة وفي وعاء ذو غطاء محكم لمنع التبخر.

٦ - تنقل العينة إلى الكلوروفورم لمدة ١٦ ساعة.

٧ - تنقل العينة إلى شمع البرافين المنصهر لمدة ١٦ ساعة.

٨ - تنقل العينة إلى تبديلين أخريين من شمع البرافين المنصهر بحيث يتم تفريغ الهواء أثناء كل تبديل قبل عملية الطمر.

والسلوئيدين وسط طمر جيد وهو عبارة عن نترات السليلوز النقية تطلق عليه بعض الشركات المصنعة اسم البارالويدين Paralodion . يذوب السلوئيدين في كل من الكحول الأثيلي والأثير.

وكما يفيد الطمر بالسلوئيدين العديد من الأمور التي تساعد في الحصول على قطاعات نسيجية واحدة . ومن هذه المزايا :

(أ) يتم التخلل والطمر بالسلوئيدين عند درجة حرارة الغرفة وليس حرارة الفرن (٥٥ - ٦٠°م) المستخدمة في حالة القطاعات البرافينية ، وهذا من شأنه أن يقلص القطاعات النسيجية بنسبة بسيطه للغاية مقارنة مع التقلص الذي يحدث في حالة الطمر بالشمع البرافيني المنصهر.

(ب) يمكن باستخدام طمر الخزع بالسلوئيدين الحصول على نماذج كبيرة من القطاعات النسيجية الأمر المتعذر عليه في حالة استخدام الطمر بالشمع البرافيني.

ومع هذا فلا يخلو الطمر بالسلوئيدين من بعض العيوب مثل طول الفترة الذي يستغرقها مقارنة مع الطمر بالشمع البرافيني ، وكما لا يمكن الحصول على قطاعات

رقيقة مقارنة مع ما يمكن الحصول عليه حال استخدام الشمع البرافيني مما يصعب معه دراسة أجزاء الخلية الدقيقة.

وكما يمكن طمر عينات العظم باستخدام ميثاكريلات المثيل Methyl methacrylate عند حرارة ٤°م وتحت التفريغ من خلال إستخدام خليط بنسب وزنية على النحو التالي:

ميثاكريلات المثيل ٩٤٪ وملدن (٥٪) ومنشط (١٪) حيث تغمر العينة لمدة ساعتين ثم يستبدل بتبديل آخر من نفس المحلول لمدة ١٢ ساعة للعينات الصغيرة ولمدة ٤٨ ساعة للعينات الكبيرة. بعد ذلك يتم استخدام نفس المحلول وتحت التفريغ عند حرارة ٣٠ م لطمر العينة وعمل قالب ولمدة نصف ساعة بعدها يوقف التفريغ ويغمر القالب في ماء عند حرارة ٣٠م لمدة ١٢ - ٢٤ ساعة للتأكد من إتمام عملية البلمرة Polymerization. ولا بد من الإشارة إلى أن من عيوب هذه الطريقة احتمال انكماش الأنسجة.

طريقة السحق

يتم تحضير قطاعات من العظم تبعا للخطوات التالية:

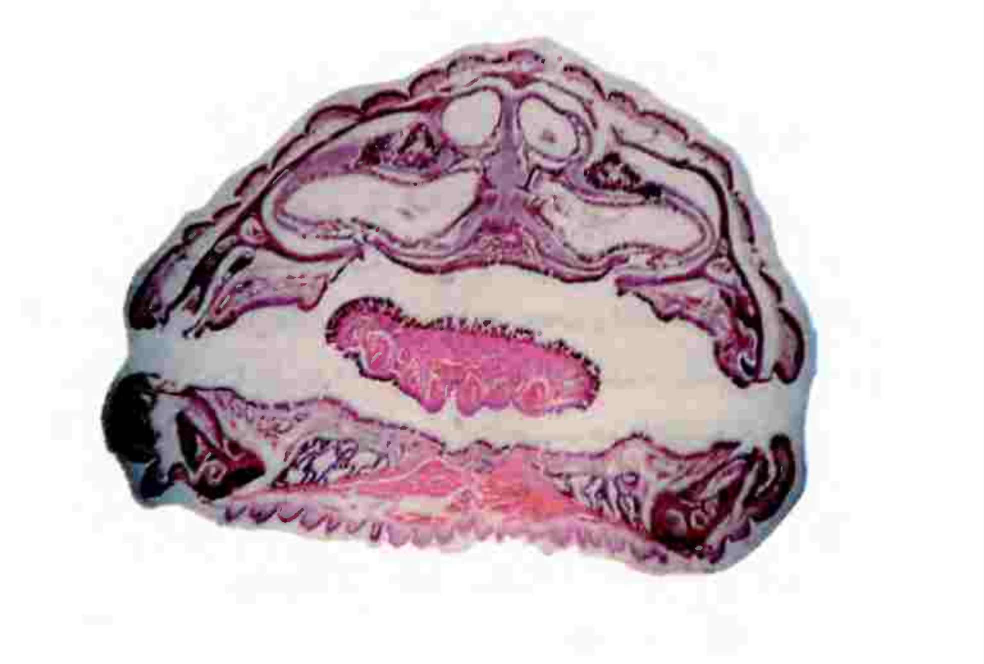
١ - يوضع معلق أو عجينة المادة الكاشطة Abrasive من نوع كاربيد السيلكون وقطر جسيماته ما بين ٦٠ - ٧٠ ميكرومتر المعروف كاربورندم - ٢٣٠ إف Carborundum-230 F على سطح زجاجي ناعم.

٢ - توضع شريحة العظم ثم تدار على السطح المغطى بالمعلق بشكل دائري على كل السطح الزجاجي.

٣ - يتم قلب قطاع العظم من فترة وأخرى مع الاستمرار بالحركة الدائرية.

ويمكن استبدال حركة اليد باستخدام أدوات تتكون بالأساس من سطحي زجاج يدوران فوق بعضهما البعض مع إمكانية ضغط وتنظيم المسافة بينهما وبالتأكيد

إذا توفرت هذه الإمكانية فإنها أسرع من التحضير اليدوي حيث يمكن السحق من سمك ١٥٠ ميكرومتر إلى سمك ٦٠ ميكرومتر خلال دقائق.



الشكل رقم (٥٠). صورة ضوئية لقطاع نسيجي بعد نزع الكلس. صبغة الهيماتوكسلين والإيوسين.

تحضير قطاعات نسيجية من العين

تحضير قطاعات نسيجية من العين باستخدام الطمر بشمع البرافين له العديد من العيوب أهمها انفصال طبقات العين عن بعضها البعض خاصة طبقة الشبكية (Retina) أثناء التثبيت وتحضير القطاعات. وربما كان من الأفضل الحصول على نتائج أفضل من خلال استخدام الطمر المزدوج لشمع البرافين والسلوئيدين. وكما لا بد من الإشارة إلى ضرورة عملية تثبيت العينة مباشرة بعد نزعها من الجسم وذلك لمنع جفاف القرنية وللحد من التغيرات في الشبكية بعد نزع العين من الجسم. وفي حالة ضرورة

استخدام الطمر بالشمع البرافيني وحده فإنه يجب نزع الماء بعد عملية التثبيت من خلال امرار العينة بتراكيز كحول تصاعدية خلال فترات طويلة ثم تخللها بالشمع المنصهر لفترات طويلة أيضا. وإذا كان المراد تحضير قطاعات من جدار العين فأفضل وسيلة لذلك هو قطع جدار العين ثم وضعه داخل خزعة كبدية على هيئة ساندوتش وتربط بخيط ثم يتم تثبيتها ومعاملتها وجدار العين داخل ساندوتش الخزعة الكبدية، تطمر بعدها عينة العين وحدها سواء بالشمع البرافيني أو باستخدام الطمر المزدوج. وتساعد هذه الطريقة على منع فصل الطبقات النسيجية المكونة لجدار العين.

وفيما يلي خطوات تحضير قطاعات من العين بواسطة الطمر المزدوج:

١ - تنزع العين من الجسم وتنقل مباشرة إلى مثبت الفورمالين المنظم المتعادل لمدة ٢٤ ساعة.

٢ - تغسل العينة بالماء الجاري عدة ساعات.

٣ - تمرر العينة بتراكيز الكحول التصاعدية (٧٠٪ ، ٨٠٪ ، ٩٠٪ ، ٩٦٪، كحول مطلق لمدة ٢ - ٣ ساعات لكل تبديل.

٤ - تنقل العينة إلى خليط كحول مطلق مع أثير بنسبة (١ : ١) لمدة ٢ - ٣ ساعات.

٥ - تنقل العينة إلى محلول سلوئيدين ٢ ٪ مذاب في كحول مطلق وأثير بنسبة (١ : ١) ليوم كامل على الأقل.

٦ - يصلب السلوئيدين بواسطة الكلوروفورم.

٧ - تمرر العينة في شمع برافيني منصهر عدة تبديلات بمعدل ساعتين لكل تبديل.

٨ - يعمل للعينة قالب شمعي تعمل منه قطاعات عند سمك ٥ - ١٠ ميكرومتر.

كما يمكن استخدام الطمر بالسلوئيدين لوحده تبعا للخطوات التالية :

١ - تثبت العينة في مثبت فورمالين فسيولوجي لمدة ٢٤ ساعة.

٢ - تغسل العينة بالماء الجاري لمدة ١٢ ساعة.

٤ - تنقل العينة إلى كحول إثيلي ٧٠٪ لمدة ٨ ساعات.

٤ - تنقل العينة إلى كحول إثيلي ٨٥٪ لمدة ١٢ ساعة.

٥ - تنقل العينة إلى كحول مطلق لمدة ٤ ساعات.

٦ - تنقل العينة إلى خليط من كحول مطلق وأثير (١ : ١) لمدة ١٢ ساعة.

٨ - تنقل العينة إلى محلول سلوئيدين ٢٪ لمدة ٣ أيام.

٩ - تنقل العينة إلى محلول سلوئيدين ٦٪ لمدة ٧ أيام.

٩ - تنقل العينة إلى محلول سلوئيدين ١٠٪ لمدة ٧ أيام.

١٠- تطمر العينة في محلول سلوئيدين ١٠٪ في صندوق ورقي داخل وعاء Bell-jar لتقليل التبخر مع مليء الصندوق لتعويض الجزء المتبخر من وقت لآخر ويبقى في الصندوق لمدة ٣ أيام. وكما يجب أن يحتوي وعاء التجفيف على كلوروفورم ليعمل على تصليب السلوئيدين عن طريق البلمرة.

١١- يتم حفظ القالب في كحول إثيلي ٧٠٪ لمدة ٢٤ ساعة على الأقل قبل أن يبدأ بتحضير القطاعات.

تحضير القطاعات الثلجيـــة

إن لتحضير القطاعات الثلجية أهمية كبيرة في تقنيات الأنسجة حيث لا يمكن الكشف عن الكثير من المحتويات الكيميائية للنسيج باستخدام القطاعات البرافينية بسبب تأثر هذه المحتويات بالمحاليل المستخدمة ودرجات الحرارة المرتفعة أثناء المراحل المتعددة لتحضير هذه القطاعات، فمثلا لا يمكن الكشف على المواد الدهنية لأنها تذوب بتأثير الحرارة المستخدمة في صهر الشمع البرافيني المستخدم كما يعمل كل من

الكلوروفورم والزايلين على تثبيط معظم الإنزيمات ويفقد بعضها النشاط الكامل كما هو الحال عند الكشف عن الإنزيمات نازعة الهيدروجين. كذلك لا تصلح القطاعات البرافنية دائما للكشف عن تفاعل الأجسام المضادة مع الأنتيجنات ولا بد أحيانا من استخدام قطاعات ثلجية غير مثبتة حديثة التحضير إضافة إلى ذلك تلعب القطاعات الثلجية غير المثبتة حديثة التحضير دورا كبيرا في اختصار الزمن اللازم في إعداد القطاعات البرافينية لدراسة التركيب النسيجي والكيميانسيجي لأنسجة بعض الأورام في مختبرات الأنسجة المرضية في المستشفيات حيث يتم تحضير القطاعات الثلجية أثناء العملية الجراحية بجوار غرفة العمليات لإظهار النتيجة بالسرعة الممكنة والتي يتقرر بناء عليها مسار العملية بعد ذلك.

ولتحضير قطاعات ثلجية فإنه لابد من عمل قالب متجمد من العينة المراد دراستها وإحاطتها بمادة تكسبها قوة وصلابة وتساعد على لصقها على حامل خاص. ومبدأ عمل القطاعات الثلجية يعتمد على تحويل الماء إلى ثلج يعمل عمل المادة الطامرة والمخللة للعينة وفي معظم الأحيان فإنه يفضل تحضير قطاعات ثلجية من عينة طازجة وغير مثبتة خاصة عند الكشف عن الإنزيمات وبالذات الإنزيمات الهاضمة إلا أنه في بعض الحالات يلزم تثبيت العينة قبل تحضير القطاعات الثلجية منها. وإذا لزم تثبيت العينة قبل تحضير القطاعات الثلجية منها فإنه يجب تجنب استخدام المثبتات المحتوية على الكحول والزئبق وثنائي الكرومات لأنها تجعل العينة هشة ويصعب معها تحضير القطاعات الثلجية ويفضل استخدام كل من مثبت فورمول الكالسيوم ومثبت فورمالين بروميد الأمنيوم عند ٤م في معظم الحالات ولمدة قد تصل إلى ١٨ ساعة. وبعد انتهاء عملية التثبيت فإنه يلزم غسل العينة بالماء الجاري جيدا وتوضع في محلول سكرور ٣٠٪ المحتوي على ١٪ من صمغ شجرة السنط (الأكاشيا Acacia).

وتستخدم أجهزة متعددة في تحضير القطاعات الثلجية أشهرها وأكثرها فاعلية ميكروتوم التقطيع الثلجي. وجهاز الكريوستات Cryostat عبارة عن ميكروتوم بكامل أنظمته داخل ثلاجة ويحتوي على أنظمة خاصة ودقيقة للتبريد والقطع ومنع تكون الجليد Defrost . كما يجب استخدام سكاكين خاصة لتحضير القطاعات الثلجية لا تكون لها حافة Facet كبيرة لآن ذلك يسبب صعوبة في التقاط القطاع من السكينة إذا كانت العينة صغيرة كما تتوقف عملية تحضير القطاعات الثلجية بنجاح إلى حد كبير على ضغط الصفيحة مضادة الالتفاف Anti-roll plate والتي يجب ضبطها بحيث تكون موازية لحافة السكين وتكاد تلتصق بها. وكذلك من الأهمية بمكان ضبط درجة الحرارة المناسبة لتحضير القطاعات حيث أن أجهزة الكريوستات مزودة بأنظمة تسمح بضبط درجة الحرارة المرغوب بها حتى ٤٠م تحت الصفر. وتختلف درجة الحرارة تبعا لنوع النسيج فمثلا يفضل تحضير القطاعات الثلجية من عينات غير مثبتة لكل من الطحال والكلية والخصية والكبد والدماغ والعقد اللمفاوية عند حراراة ١٥م تحت الصفر بينما عينات الأنسجة العضلية والجلد والغدد عموما وكذلك عينات العظم الهش عند حرارة ٢٥م تحت آلصفر. كما أن المحتوى المائي للعينة يحدد درجة الحرارة المثلى للتقطيع فمثلا العينة التي تحتوي على كمية كبيرة من الماء يفضل تقطيعها عند درجة حرارة ١٢ - ١٥م تحت الصفر. وكذلك كلما زاد المحتوى الدهني للنسيج تطلب ذلك درجة حرارة أكثر برودة. وعموما فإنه يصعب تحضير قطاعات ثلجية أقل سمكا من ٨ - ١٠ ميكرومتر سواء كانت العينة مثبتة أو غير مثبتة. وكما أنه يجب أن لا يغيب عن البال أن تحضير قوالب مبردة من العينة يجب أن يتم بسرعة حيث أن التجميد البطيء للعينة يؤدي إلى تكوين بلورات ثلجية كبيرة الحجم داخل الأنسجة مما يسبب تهشم وانسياب محتواها الكيميائي. وكثير ما تستخدم معامل كيمياء الأنسجة والأنسجة

المرضية سائل النيتروجين -١٩٠م تحت الصفر لهذا الغرض إلا أنه لا يصلح للعينات المتناهية في الصغر، كما تستخدم بعض المعامل لتجميد العينة وعمل قوالب منها رشوشات الإيروسول Aerosol sprays وهذه متوفرة بشكل تجاري ولكن لا ينصح استخدامها لعينات الأنسجة العضلية. كما أن البعض يعمل على تعفير العينة بالنشا قبل تجميدها مع الأخذ بالاعتبار تجنب ذلك عند الكشف عن محتوى العينة من الجلايكوجين، والبروتينات، والدهون الجلايكولية. وتستخدم مواد عديدة لطمر العينة بعد تجميدها وذلك لعمل قالب ومن ثم تثبيتها على الحامل الخاص بالعينة ومن هذه المواد جلاتين ١٢٪ أو استخدام محلول الجلاتين والجليسرين (جلاتين ١٦ جم، جليسرين ١٥ سم^{3} مذابة في ٧٠سم^{3} ماء مقطر ويضاف إليها بلورة من الثايمول) حيث يحفظ هذا المحلول عند درجة ٤ م ويصهر قبل الاستخدام مباشرة. وتوضع العينة في هذا المحلول ٥ - ٨ ساعات وعند درجة ٣٧ م ثم تنقل العينة بالمحلول نفسه إلى الثلاجة ويعمل منها قالب ثم يشذف ويوضع في مثبت فورمول الكالسيوم ١٠٪ عند درجة حرارة ٤م حتى يكتسب القالب مزيدا من الصلابة ويمكن أن يحفظ في الثلاجة عدة أيام لحين الاستخدام. كما أنه يمكن حفظ القالب لمدة اسبوعين عند حرارة ٢٠ م تحت الصفر بعد لفه مع الحامل المثبت عليه بواسطة فلم برافيني.

تجدر الإشارة إلى أن القطاعات الثلجية المحضرة من عينات سبق تثبيتها يصعب التقاطها بواسطة الشريحة من على السكينة وفي كثير من الأحيان فإنها تسقط وتطفو في محاليل الحضن. ولتجنب ذلك فإنه يجب غمس الشرائح قبل استخدامها بمحلول جلاتين ١٪ يحتوي على ٢٪ فورمالين، حيث تترك الشرائح بشكل أفقي بعد غمسها عند درجة حرارة ٣٧°م وحتى يسهل التقاط القطاع بواسطة الشريحة من على سكينة الكريوستات فإنه يفضل أن لا تكون الشرائح غاية في البرودة وأن يكون الفرق بين

درجة حرارة الشرائح ودرجة حرارة القطاعات لا يقل عن ٤٥ م. كما أن السرعة التي تدار بها يد ميكروتوم التقطيع الثلجي تلعب دور كبيرا في تحضير القطاعات حيث تحضير قطاعات من عينات صلبه يتطلب السرعة ما أمكن بينما عينات الأنسجة اللينة تحتاج إلى سرعة أقل.

وفيما يلي درجات الحرارة المفضلة للأنسجة المختلفة لتحضير القطاعات الثلجية

درجة الحرارة	نوع العينة
صفر حتى ١٥ م	الدماغ، العقد اللمفاوية، الغدة الدرقية ، الكبد، الكلية ، الطحال، بطانة الرحم ، نخاع العظم، الخصية.
- ١٥م حتى - ٣٠م	الجلد غير الدهني، اللسان ، العضلات ، الغدد اللبنية ، الأمعاء البنكرياس ، البروستاتا ، عنق الرحم ، الرحم ، المبيض
- ٣٠م حتى -٦٠م	جلد دهني ، نسيج دهني، غدد لبنية دهنية