

٣ . التجفيف (طرد الماء)

Dehydration

يجب بعد عملية الغسيل إزالة كل أثر للماء وهو ما يعرف بالتجفيف ، وتساعد هذه العملية بدورها فى الغسيل ، وتجعل الأنسجة متماسكة ، ويحتمل أن تصبح صلبة هشّة . وتم هذه العملية بمعاملة النماذج بتركيزات متزايدة من الجواهر الكشاف ، الذى يطرد الماء وبتراكيزات متناقصة من الماء حتى يصل تركيز الجواهر الكشاف إلى ١٠٠ ٪ ؛ أى التخلص تماماً من الماء .

وهناك طريقتان لتجهيز النماذج بطرد الماء وتحضيرها للتشريب بالشمع

هما :

الأولى : استعمال كيمائيات لطرد الماء غير مذيبة للشمع ، ثم بعد ذلك استعمال كيمائيات أخرى مذيبة للشمع تعقب الأولى فيما يسمى بعملية الترويق Clearing .

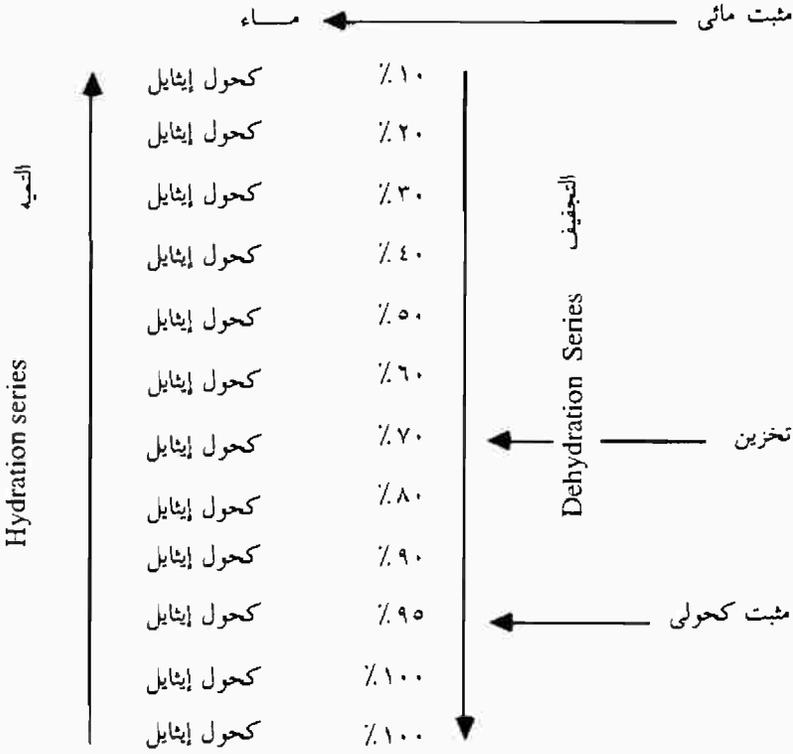
الثانية : استعمال كيمائيات تطرد الماء وفى الوقت نفسه تذيب الشمع .

أمثلة للطريقة الأولى لطرد الماء :

حيث تستعمل كيمائيات تطرد الماء لكن لاتذيب الشمع مما يتطلب بعد ذلك استعمال كيمائيات أخرى مذيبة للشمع .

(١) استعمال كحول الإيثايل Ethanol

وهو أهم ما يستعمل فى هذه الطريقة ، ويمكن أن يحل محله كحول الأيزوبروبيل Isopropyl alcohol ، وتم هذه العملية بعمل تركيزات من الكحول متدرجة كالاتى : ١٠ ٪ ، ٢٠ ٪ ، ٣٠ ٪ ، ٤٠ ٪ ، ٥٠ ٪ ، ٦٠ ٪ ، ٧٠ ٪ ، ٨٠ ٪ ، ٩٠ ٪ ، ٩٥ ٪ حتى نصل إلى ١٠٠ ٪ وهو الكحول المطلق ، وقد تكون الخطوات أكثر تقارباً من ذلك ؛ أى بفارق ٥ ٪ فقط بين كل تركيز وآخر . ويوضح المخطط (شكل ٣ - ١) تسلسل الخطوات المتبعة فى هذه الطريقة .



شكل (٣ - ١) : مخطط يوضح خطوات التجفيف بواسطة تراكيزات متدرجة من الكحول .

ويجب مراعاة تحضير هذه المحاليل حتى تكون معدة عند الطلب ، وتتم عملية الغسيل بالماء أو الكحول حسب محلول القتل المستعمل ، ويجب عند إجراء عملية طرد الماء أن نبدأ بالتركيز الذى يطابق تركيز محلول الغسيل ، فإذا غسلنا بالماء نبدأ بأول تركيز

للكحول ، وهو ٥ ٪ أو على الأكثر ١٠ ٪ ، أما إذا تم الغسيل بالكحول قوة ٥٠ ٪ إذا كان محلول القتل F.A.A. فنبداً عند التجفيف بتركيز الكحول ٧٠ ٪ .

ويجب أن تتم عملية التجفيف بسرعة ، وألا تترك النماذج لتجف خاصة في التركيزات العالية لقدرتها السريعة على التطاير ، ويجب ملاحظة أن يتم التغيير لكل أنبوبة على حدة ، والمدة التي تنقضى بين كل تركيز وآخر تتوقف على حجم وطبيعة النموذج ، وعلى مدى قابلية الجوهر الكشاف السابق معاملة النموذج به للذوبان في المحاليل المستعملة للتجفيف .

وفي حالة قمم الجذور أو الأجزاء الغضة من الأوراق يكفي ٣٠ دقيقة بين كل عملية تغيير وأخرى حتى نصل إلى تركيز ٧٠ ٪ ، ولكن إذا احتوى محلول القتل على حامض البكريك فأطل المدة إلى ساعة ، وإذا كانت النماذج خشبية صلبة ومقتولة في محلول F.A.A. فأطل المدة من ٤ - ٨ ساعات حتى نصل إلى تركيز ٨٠ ٪ ، وتضاعف المدة إذا كانت النماذج كبيرة الحجم .

ويجب مراعاة ما يلي :

(أ) ضاعف المدد السابق ذكرها بعد أن تصل إلى ٧٠ - ٨٠ ٪ كحول في التركيزات التالية لذلك .

(ب) يجب تغيير السدادات عندما تصل إلى تركيز ١٠٠ ٪ أي كحول مطلق ، وغير فيه أكثر من مرة لأنه المرحلة الأخيرة لطرد الماء .

(ج) يجب ألا تغسل النماذج أكثر من اللازم في الماء ، كما يستحسن أن تتم عملية التجفيف في تركيزات متقاربة القوة حتى لا تحدث بلزمة أو تشويه في بعض الخلايا .

(د) تلافى ترك النماذج مدد طويلة أكثر من اللازم في تركيزات الكحول العالية والحالية من الماء ، حتى لاتصير النماذج هشة أو يحدث انكماش في الأنسجة .

(٢) استعمال الأسيتون Acetone

يعتبر الأسيتون ممتازاً في إجراء عملية التجفيف ، ويوجد على حالتين : الحالة الأولى وبه نسبة بسيطة من الماء ويستعمل في تحضير التركيزات المتتالية ، أما الحالة الثانية فهو

الخالى من الماء Anhydrous وتجربى به عملية التغيير الأخريرة أكثر من مرة للتأكد من طرد الماء تمامًا كما فى حالة الكحول المطلق .

يتبع فى هذه الحالة نفس الخطوات التى اتبعت فى حالة كحول الإيثايل بتركيزاته ، ومن الممكن أن تنقل النماذج من تركيز ما للكحول إلى ما يماثله من الأستون دون حدوث أى ضرر ، كما يمكن أن تنقل النماذج المقتولة فى محاليل قتل ، لها تركيز خاص من الكحول إلى الأستون ، ذى نفس التركيز ؛ أى نفس نسبة الماء فى كل منهما .

(٣) إستعمال الجلسرين Glycerine

يستعمل الجلسرين فى تجفيف النماذج الرهيفة كالتحالب ، وارتفاع درجة غليانه تساعده على طرد الماء بواسطة التبخير ، ولذا تتم هذه العملية ببطء ، لتلافى البلمزة إلى حد كبير نتيجة للتدرج البطيء فى تركيز الجلسرين ، ويجب أن تغسل النماذج فى الماء جيداً (لأنها مقتولة فى محاليل الكروميك - خليك) وذلك لأن الجلسرين وتبخّر الماء بالتدرج لايزيل أثر البقية الباقية من محاليل القتل من الأنسجة إن وجدت .

ضع النماذج فى محلول جلسرين قوته ٥ ٪ ، ويجب أن تكون كمية السائل كافية بحيث يتبقى بعد التبخير ما يكفى من الجلسرين لتغطية النماذج ، ويمكن أن تتم العملية بوضع النماذج داخل مجفف على درجة حرارة الغرفة ، أو فى فرن درجة حرارته ٣٥ - ٥٤٠ م ، إذا تغير لون الجلسرين فغيره بآخر من نفس التركيز ، ولتقدير ذلك يجب أن يعين ارتفاع السائل عند الابتداء ، فإذا صار ارتفاعه نصف ما كان قبل التبخر فمعنى ذلك أن قوة تركيز الجلسرين أصبحت ١٠ ٪ وهكذا . بعد تبخر كل الماء تقريباً تصبح النماذج متماسكة ، وبذا يمكن نقلها إلى كحول مطلق مع تغييره على الأقل مرتين ، استمر فى العملية حتى النقل إلى الشمع .

الترويق Clearing

عقب استعمال أى من الطرق السابق ذكرها للتجفيف (كحول الإيثايل - الأستون - الجلسرين) تنقل النماذج إلى أحد مذيبات الشمع ، وتعرف هذه العملية بالترويق ؛ وذلك لأن بعض المذيبات للشمع تكسب النماذج شفافية ملحوظة .

وأهم هذه المذيبات ما يلي :

(أ) الزيلول (Xylene (Xylol)

(ب) الكلوروفورم Chloroform

(ج) يمكن استعمال البنزين Benzene والتولين Toluene ولكنهما لا يستعملان غالباً لانخفاض درجة غليانهما ، وبذا تصبح هناك خطورة من الاشتعال .

وعند استعمال الزيلول يجب أن يكون التدرج في التركيز بطيئاً في الأبحاث السيتولوجية ويوصى بعمل ١٠ تركيزات ، أما في الأغراض التشريحية فيكتفى بالتركيزات ١٠ ، ٢٥ ، ٥٠ ، ٧٥ ، ٩٠ ، ١٠٠ ٪ زيلول في كحول مطلق ، ويكفى من الزمن في كل تركيز من نصف ساعة إلى ثلاث ساعات على حسب حجم وطبيعة النموذج . ويستحسن أن تطول المدة في التركيزات العالية ، ويمكن استعمال نفس التركيزات السابقة من الزيلول في الأستون (النقى) .

وإذا استعمل الكلوروفورم فلتكن التركيزات كالآتي :

١/٣ كلوروفورم + ٢/٣ كحول مطلق ثم ٢/٣ كلوروفورم + ١/٣ كحول مطلق ثم كلوروفورم نقي ويغير مرة على الأقل . ومن مميزات الكلوروفورم أنه لا يجعل النماذج هشة كالزيلول ، ويمكن الاستعاضة عن الزيلول بالمركب ترائي كلوروايشيلين Thichloroethylene بنفس الطريقة السابقة في الزيلول . كما يمكن استعمال زيت السيدر Cedar oil ، وهو مروق ممتاز ، وتجرى العملية بصب الكحول المطلق وبه النماذج على زيت السيدر ، فتأخذ النماذج في الغوص ثم يزال الكحول بماصة ، وبعد مدة تغسل النماذج عدة مرات بالزيلول النقي .

أمثلة للطريقة الثانية لطرد الماء :

(١) كحول البيوتاييل Butyl alcohol

يستعمل في هذه الطريقة كحول البيوتاييل العادي N - Butyl alcohol أو الثلاثي Tertiary butyl alcohol - وقد أدخلت هذه الطريقة منذ زمن قريب لإجراء عملية التجفيف والتشريب بالشمع ، وعند استعمال كحول البيوتاييل العادي تعمل التركيزات الموضحة في جدول رقم (٣ - ١) .

جدول (٣ - ١) : التركيزات المستعملة من كحول البيوتاييل العادى

لطرود الماء من العينات النباتية خلال عملية التجفيف .

م	التركيز	كحول بيوتاييل عادى مل N. Butyl alcohol	كحول إيثايل ٩٥ % مل 95 % Ethanol	ماء مقطر مل Distilled water
١	٣٠ %	١٠	٢٠	٧٠
٢	٤٠ %	١٥	٢٥	٦٠
٣	٥٥ %	٢٥	٣٠	٤٥
٤	٧٠ %	٤٠	٣٠	٣٠
٥	٨٠ %	٥٥	٢٥	٢٠
٦	٩٠ %	٧٠	٢٠	١٠
٧	١٠٠ % (خليط)	٨٥	١٥	--
٨	١٠٠ % نقى	١٠٠	--	--
٩	١٠٠ % نقى	١٠٠	--	--

هذه التركيزات تعطى نتائج ممتازة فى الأغراض التشريحية والهستولوجية ، بعد الغسيل فى الماء تمرر النماذج فى تركيبات من الكحول ، حتى تصل إلى تركيز ٣٠ % كحول إيثايل ومنه تنقل إلى التركيز رقم ١ بالجدول ، وبعد الغسيل مرتين فى كحول تركيز ٥٠ % . إذا كان القتل فى F.A.A. تنقل النماذج إلى التركيز رقم ٣ بالجدول .

يعتبر بعض المشتغلين أن الكحول ثلاثى البيوتاييل Tertiary butyl alcohol (T.B.A.) أحسن الجواهر الكشافة لإجراء عملية التجفيف على الإطلاق ، وهو ذو رائحة مقبولة وغالى الثمن ؛ لذلك لا يصح استعماله فى أعمال الترويق التى لا تحتاج إلى دقة فائقة . بعد الغسيل فى الماء أو الكحول تمرر النماذج فى تركيبات من الكحول متدرجة ، حتى تصل إلى ٥٠ % كحول إيثايل ، ثم بعد ذلك تتبع الخطوات الموضحة بالجدول رقم (٣ - ٢) .

جدول (٣ - ٢) : التركيزات المستعملة من كحول ثلاثي البيوتانيل

لطرء الماء من العينات النباتية خلال عملية التجفيف .

كحول مطلق Absolute Ethanol مل	ماء مقطر Distilled water مل	كحول إيثانيل ٩٥ ٪ 95 % Ethanol مل	كحول ثلاثي T.B.A. البيوتانيل مل	درجة التركيز	م
--	٤٠	٥٠	١٠	٪ ٦٠	١
--	٣٠	٥٠	٢٠	٪ ٧٠	٢
--	١٥	٥٠	٣٥	٪ ٨٥	٣
--	--	٥٠	٥٠	٪ ١٠٠	٤
٢٥	--	--	٧٥	٪ ١٠٠	٥
--	--	--	١٠٠	٪ ١٠٠	٦
--	--	--	١٠٠	٪ ١٠٠	٧

(٢) الديوكسان Dioxan

يكثُر استعمال الديوكسان فى عملية التجفيف ، وهو سهل الاختلاط بكل من الماء ؛ حيث يحل محله فى الأنسجة وكذلك شمع البارافين وبالتالى يعطى نتائج تشرب طيبة ، وهو لا يحدث بلزمة كالتى تحدثها الكحولات أو الأستيون ، كما لا يجعل الأنسجة هشة . Brittle

وترجع أهمية الديوكسان لما يوفره من وقت ؛ إذ يمكن ترقيد الأنسجة فى الشمع بعد نحو ٤ - ٦ ساعات من التثبيت ، حيث تنقل العينات إلى الديوكسان مباشرة من محاليل بوبن أو الفورمالين ، وتجربى ثلاثة تغييرات من الديوكسان خلال ٤ ساعات ، تنقل بعدها العينات إلى شمع البارافين ، حيث يتم التغيير فيه ثلاث مرات بين المرة والأخرى حوالى ٣٠ دقيقة .

يؤخذ على الديوكسان أنه يسبب انكماشاً للأنسجة يفوق الزيلول ، كما أن الديوكسان خطر ؛ حيث تعتبر أبخرته ضارة للإنسان ؛ إذ إنها سامة للكبد ؛ ولذلك يجب استعماله داخل حجرة الأبخرة وتخزينه فى أوانٍ محكمة الغلق . وعموماً لاتوازى فائدته ما قد ينجم عنه من ضرر .