٥ . الميكروتومات

Microtomes

عرفت أجهزة تقطيع العينات لأول مرة خلال النصف الثانى من القرن الثامن عشر ، وكان يطلق عليها آلة التقطيع cutting machine ، وفى عام ١٨٣٩ أطلق شيفاليه (Chevalier) عليها لفظ ميكروتوم Microtome أى آلة القطع الدقيق . ولقد أدخلت على الميكروتومات عديداً من التعديلات كانت فى البداية تتناسب مع المجهر الضوئى حيث كانت تعطى قطاعات حتى سمك ٥ ميكرون تقريبا ، إلا أن هذه القطاعات وإن كانت تتناسب مع الفحص بالمجهر الضوئى إلا إنها تعتبر سميكة جدا للفحص بالمجهر الإلكترونى ، وفى الخمسينات من القرن العشرين تطورت الأشكال والطرز المختلفة للميكروتومات مما ساعد على ظهور أنواع منها تتمكن من عمل قطاعات رقيقة جدا (أقل من نصف ميكرون) تتناسب مع الفحص بالمجهر الإلكترونى .

توجد طرز مختلفة من الميكروتومات مثل الميكروتوم الدوار Rotary microtome والميكروتوم المنزلق Sliding microtome والميكروتوم الثلجى Freezing microtome والكريوستات Cryostate والميكروتوم الفائق Ultra microtome ، ويختلف استخدام كل منها تبعا للنموذج وحالته والشخص ومهارته ونوعية الدراسة . ويستعمل النوع الدوار للعينات المطمورة فى شمع البارافين ، أما المنزلق فيستعمل للعينات الحية الصلبة المقتولة ، وغير المقتولة ، أو المطمورة فى الشمع أو السللويدن ، أما النوع الثلجى فيستعمل فى حالة العينات الحية المقتولة ، وغير المقتولة وخاصة الرهيف منها ، والتى يصعب قطعها باليد أو يخشى من تلفها إذا تم تحضيرها بطريقة الشمع ، ولقد تم تطوير الكريوستات لعمل قطاعات سريعة رقيقة مفككة لاستخدامها فى دراسة كيمياء الأنسجة ؛ حيث تقطع العينات بعد تجميدها دون تعريضها لدرجات حرارة عالية أو مذيبات الدهون . كما تم تصميم الميكروتوم الفائق لعمل قطاعات رقيقة جدا أقل من نصف ميكرون تناسب الفحص بالمجهر الإلكترونى .

أولاً: الميكروتوم الدوار لقطاعات شمع البارافين

Rotary microtome for paraffin sections

تعمل معظم الميكروتومات الدوارة بطريقة متشابهة حيث تتحرك العينة المثبتة جيدا فى الماسك عبر حافة السكينة الثابتة ، ويكون التقدم محكمًا بحركة الوتد خلال مسطح مائل أو بواسطة حبل عمود الإدارة ، ويتم التحكم فى السمك عادة مقدرا بالميكرون بداية من ١ ميكرون . ويجب حفظ الميكروتوم نظيفًا دائمًا ، ويراعى تزييته بانتظام ويتسبب أى تآكل فى الأجزاء فى خلل فى حركته وينتج عنه قطاعات تالفة . وسكينة الميكروتوم Microtome knife ذات نصل حاد ، وللاحتفاظ بحافة حادة للنصل يراعى تكرار عملية السن على فترات مناسبة ، ويجدر بالإشارة أن النصل إذا تلف يصعب إصلاحه ، لذلك اتجهت بعض المعامل إلى إنتاج أمواس (شفرات حلاقة) ومواسك خاصة لاستعمال الطلبة لفترة قصيرة يتم بعدها التخلص منها .

بالإضافة إلى الميكروتوم والسكين يتطلب الأمر توفر الأدوات التالية :

(١) فرشة رسم صغيرة A small paint brush .

(٢) عدد من الملاقط Forceps .

(٣) العديد من المسطحات المستوية Several flat لاستقبال شرائط الشمع بعد التقطيع .

(٤) علب كرتون من الورق المقوى Cardboard boxes لحفظ شرائط الشمع قبل تحميلها على الشرائح .

(٥) زجاجة كلوروفورم صغيرة A small bottle of chloroform .

(٦) فرشاة رسم $\frac{1}{2}$ بوصة A $\frac{1}{2}$ - inch paint brush لإستخدامها فى إزالة أشرطة الشمع الزائدة وغير المرغوب فيها .

الإرشادات الاساسية للميكروتوم الدوار

Basic directions for the rotary microtome

(١) يجب أن يكون الميكروتوم نظيفاً عند البدء فى العمل . ويراعى التخلص من كل شرائط الشمع الموجودة بالفرشاة . اختبر أداء عجلة اليد ، إذا كانت صعبة الحركة فيجب

تزييتها ثم نظف الأجـزاء الداخلية للآلة ، واطمئن على ميكانيـكية التشغيل . إذا كان ماسك الحركة عند نهايته فيجب إرجاعه بالكامل مع ضبط الميكانيكية.

(٢) ثبت عجلة اليد أو اتركها فى الوضع الذى يكون عنده الماسك فى أعلى وضع .

(٣) ثبت العينـة بماسك القالب الشمعى ثـم اضبط السطح المربع لقالـب الشمع (الذى به العينة) رأسيا وأفـقيا بحيث تكون حافتاه العلـوية والسفلية موازيتين لبعـضهما البعض وتكونا موازيتين لقاعدة الميكروتوم ، ويجب أن يكون معلوماً أن الدقة فى ضبط القالب فى بداية العمل هامة جداً لنجاح عملية القطع .

(٤) امـسح نصل سكين الميكـروتوم بعناية بالكلوروفورم لتنظيف حافـته . ثم ثبته فى ماسك النصل (أو الماسك وبداخله شفرة الحلاقة) . اختبر بعناية زاوية النصل وثبات وضعه فـى الماســك والمســافة بين قالب الشمع وماسك القالب ، وزاوية خط المركز للنصل (شكل ٥ - ٨) والتى فى مواجهة القالب يجب أن تكون حوالى ٢٠° .

(٥) يجب أن تكون الحافة العلوية والسفلية لقالب الشمع متوازيتين مع بعضهما البعض ومع حافة السكينـة . وإذا كان من الضرورى إعادة ضبط قالب الشمـع فيجب أن يتم ذلك بحرص ؛ حيث إن تهذيـب القالب يتم بواسطة شفرة الحلاقة . فلا تـسمح للشفرة أن تلامس حافة نصل السكين حتى لا تتعرض أصابعك للإصابة حيث يكون النصل حادًا جدا .

(٦) افتح عـجلة اليـد واخفض قالـب الشمع حـتى يصبـح وجهه فى مـستوى حافـة نصل الميكروتوم . افتح النصل وحركه ببطء فى مواجهة القالب وأوقفه دون أن يلامس وجه القالب ثم أعد قفل نصل السكين جيدا فى مكانه .

(٧) اضبـط مقياس سمك التقطيـع حسب الرغبة ، يفضل البـدء عند سمك ١٠ ميكرون . عند استـعمال ميكروتـوم له عجلات مسـننة Ratchet wheels تقوم بتحـديد سمك القطاع ، لا تضبط السمك فى منتصف التدريج . اضبطه دائما عند وقفة كاملة (تكة) لتجنب تلف الأسنان .

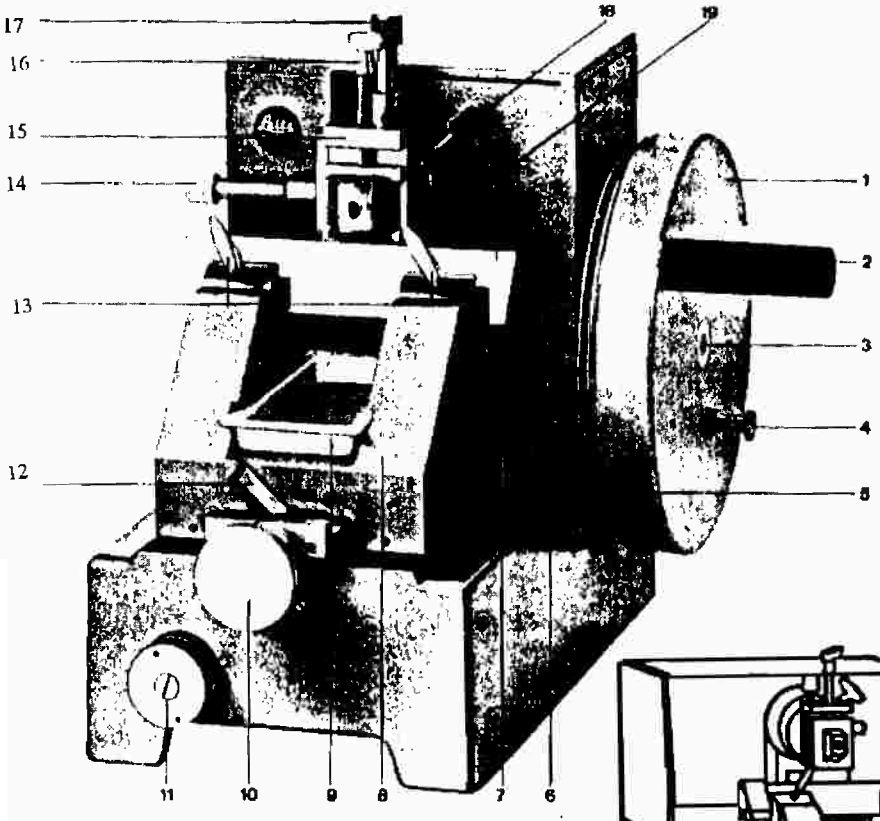
(٨) يراعى تحريك عجلة اليد بصورة منتظـمة ، اسمح لحوالى ١٠ سم من شريط الشمع بأن تتحرك أسفل النصل حتى يبدأ الشريط فـى الانحناء لأعلى بالقرب من حافة النصل ،

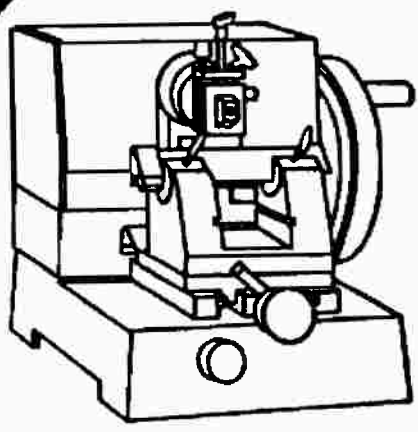
عند هذه النقطة ضع الملقط أو إبرة التشريح أسفل الشريط وهو لا يزال ملامسا لحافة النصل . امسك الشريط لأعلى مع عدم وضع أى ثقل عند مكان ملامسته للنصل ثم افصل الشريط بعد ذلك عند الحافة القاطعة أو أترك قدرًا ضئيلاً من الشريط لدى حافة النصل ؛ حتى يسهل قطع الشريط وهذه العملية تحتاج إلى بعض التدريب ، استمر فى تحريك عجلة اليد بإيقاع منتظم .

(٩) عندما يصل طول الشريط إلى حوالى ٢٠ سم افصله بفرشاة رسم من حافة النصل وذلك بحركة متجهة لأعلى . يجب ملاحظة أن استمرار احتكاك شعر فرشاة الرسم بحافة النصل يؤدى إلى تلف الحافة لذلك يجب أن تمرر الفرشاة بسرعة بعيدا عن الحافة القاطعة للنصل . ضع الشريط المتحصل عليه فى العلبة (من الورق المقوى) الخاصة بحفظ الشرائط .

(١٠) عند الانتهاء من عملية القطع أو ترك الميكروتوم لأى سبب ينزع نصل السكين ويوضع فى الصندوق الخاص به . من المعروف أن معظم حوادث المعامل تكون نتيجة الإهمال فى التعامل مع نصل السكين .

ويصمم الميكروتوم الدوار (شكل ٥ - ١ و ٥ - ٢) بطريقة تسمح مع كل لفة لعجلته أن يندفع القالب الشمعى تجاه حافة السكين بمسافة عدة ميكرونات حسب ما تحدده بواسطة ضابط الميكرونات (ضابط السمك) ، وبذلك فإن السكين مع لف عجلة الميكروتوم تقطع قطاعات شمعية بالسمك المطلوب وذلك من الوجه الأمامى للقالب الشمعى . ومن المفترض أن الحرارة الناشئة عن عملية التقطيع تعمل على التصاق القطاعات الشمعية المتتالية ؛ بحيث تكون الحافة العلوية للقطاع السابق ملتصقة مع الحافة السفلية للقطاع اللاحق ، وبذلك يتكون شريط من القطاعات الشمعية يحتوى كل منها على قطاع من العينة المطمورة داخل القالب الشمعى - وتجمع شرائط الشمع من على السكين بواسطة فرشاة ، وتنقل إلى علبة الحفظ أبعادها ٢٠ × ٤٠ سم وذات ارتفاع ٤سم ، ويراعى تزويد العلبة بالبيانات اللازمة عن العينة ويستحسن وضع فرخ من الورق الأسود فى قاع العلبة لبسط شرائط الشمع عليه . ويراعى وضع شرائط الشمع بالترتيب ؛ بحيث يوضع أول القطاعات فى الركن الأيمن العلوى للعلبة ثم تتوالى الشرائط الشمعية بنظام معلوم ، مع ملاحظة أن يكون السطح غير اللامع لشريط الشمع إلى أعلى والسطح اللامع إلى أسفل ، وإذا ما كان لصق القطاعات





(1) عجلة الإدارة .

(2) ماسك .

(3) مسمار تثبيت .

(4) مسمار التحكم فى حركة العجلة .

(5) مجرى سير الحركة الآلية .

(6) سلك نقل الحركة الآلية .

(7) زاوية الميل .

(8) ماسك السكين .

(9) حوض القطاعات .

(10) التحكم فى حركة ماسك السكين .

(11) ضبط سمك القطاعات .

(12) إحكام ماسك السكين .

(13) ضبط زاوية ميل السكين .

(14) ضبط وضع ماسك العينة رأسيا .

(15) إحكام ماسك العينة .

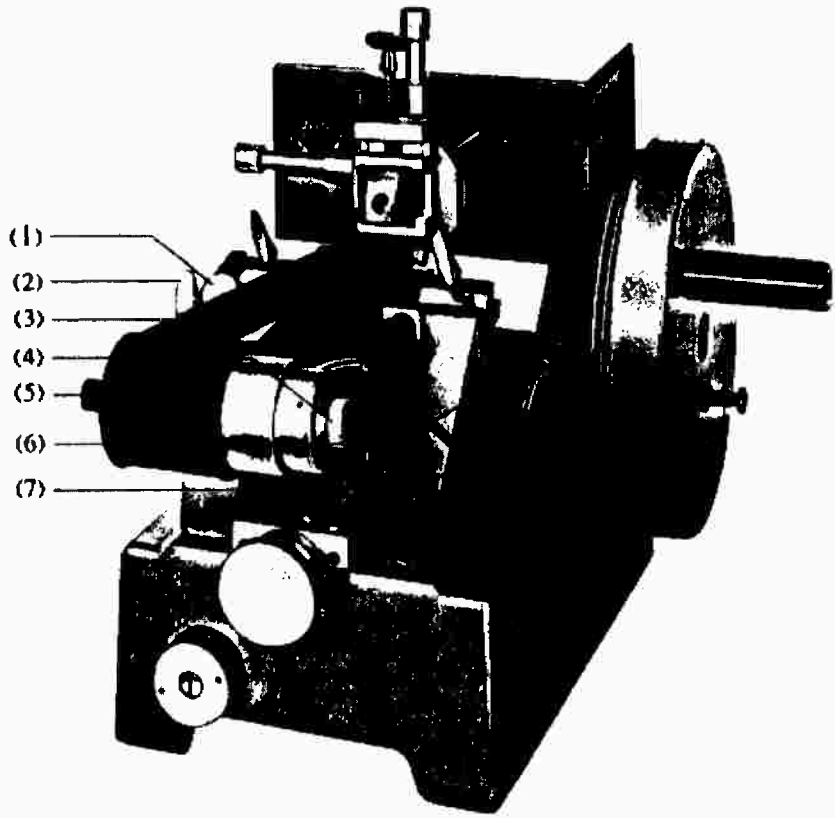
(16) تحميل العينة .

(17) ضبط وضع ماسك العينة أفقيا .

(18) تحريك ماسك العينة إلى الأمام .

(19) السكين .

شكل (٥-١) : الميكروتوم الدوار.



(1) مسمار لربط السير الناقل الأوتوماتيكى بسكين الميكروتوم .

(2) صمولة لتحميل السير الناقل الأوتوماتيكى على قالب السكين.

(3) السير الناقل الأوتوماتيكى .

(4) قطعة مستديرة لتنظيم سرعة السير الناقل .

(5) قطعة مستديرة لإدارة السير الناقل يدويا .

(6) قطعة مستديرة لربط السير الناقل الأوتوماتيكى .

(7) سلك الالتواء للسير الناقل الأوتوماتيكى .

شكل (٥-٢) : ميكروتوم دوار مزود بسير ناقل لشريط الشمع .

الشمعية على الشرائح الزجاجية سوف يجرى فى وقت لاحق تغطى علب شرائط الشمع لحمايتها من الاتربة ، مع حفظها فى مكان بارد حتى لا تلتصق القطاعات الشمعية بالورق الموضوع فى قاع العلبة .

مشكلات عملية القطع بالميكروتوم الدوار والحلول المقترحة

Sectioning problems and possible remedies

حصر ريتشاردز (Richards) ١٩٥٩ المشاكل المصاحبة لعملية القطع والحلول الممكنة فيما يأتى :

(١) إذا كان الشريط ملتويًا وغير مستقيم Crooked :

(أ) الحافة العليا والسفلى للقالب غير متوازيتين لبعضهما البعض أو لحافة السكينة ، يراعى عمل التسوية اللازمة .

(ب) ربما تكون حافة السكينة غير منتظمة . جرب جزءًا آخر من حافة السكينة أو استبدل السكين بأخرى حادة .

(٢) إذا لم يتكون الشريط لانفصال القطاعات :

(أ) حافة النصل تالمة - اشحذها .

(ب) هناك خطأ فى ميل السكينة . اضبط زاوية الميل .

(جـ) الحافة العليا والسفلى لوجه قالب الشمع مفتتة أو متكسرة Crumbled أو مستديرة Rounded ، فيلزم إعادة تسويتها بشفرة حادة .

(٣) إذا كانت القطاعات الناتجة منضغطة أو ملتفة Compressed or Folded :

(أ) حافة النصل تالمة - اشحذها .

(ب) زاوية السكينة قريبة جدا من الوضع الرأسى . استخدم زاوية أكبر .

(جـ) يعوق الشمع السكين - يراعى تنظيف الحافة بالكلوروفورم .

(د) القطاعات رقيقة جدا ، يلزم زيادة سمك التقطيع .

(هـ) الشمع طرى جدا لأن الحجرة دافئة . يبرد النصل بإمرار مكعبات من الثلج عليه ، أحيانا قد يفيد تمرير مكعب من الثلج فى اتجاه معاكس لوجه قالب الشمع .

(و) قد يوجد بالشمع آثار من الزيلول . يلزم إعادة عملية الطمر .

(٤) إذا كانت العينة مفتتة أو تسقط من شريط الشمع :

(أ) قد يرجع ذلك إلى عدم التجفيف والترويق الجيد للنسيج فيلزم انصهار الشمع وإعادة التجفيف والترويق .

(ب) إذا كانت العينة صلبة جدا ومتماسكة فيجب عمل التطرية اللازمة بنقع قالب الشمع فى الماء أو فى كحول الإيثايل ٧٠٪ .

(جـ) مكثت العينة فى فرن الشمع لمدة طويلة وتحت درجة حرارة عالية ، فى هذه الحالة يجب التخلص منها لعدم صلاحيتها .

(د) العينة صلبة جدا بالنسبة لطريقة الشمع كما هو الحال فى العينات الخشبية مثلا ، فيلزم تجربة طريقة الطمر فى السللويدن .

(٥) إذا كان الشريط ينفصل باستمرار أو يتجزأ رأسياً :

(أ) يرجع ذلك لوجود ذرات من التراب عالقة بحافة السكينة أو على سطح قالب الشمع فيلزم تنظيف حافة السكينة بعناية بالكلوروفورم .

(ب) أو قد يكون الجزء المستخدم من الفصل غير حاد ، جرب جزءاً آخر من حافة السكينة أو استخدمها أو استبدلها بأخرى حادة .

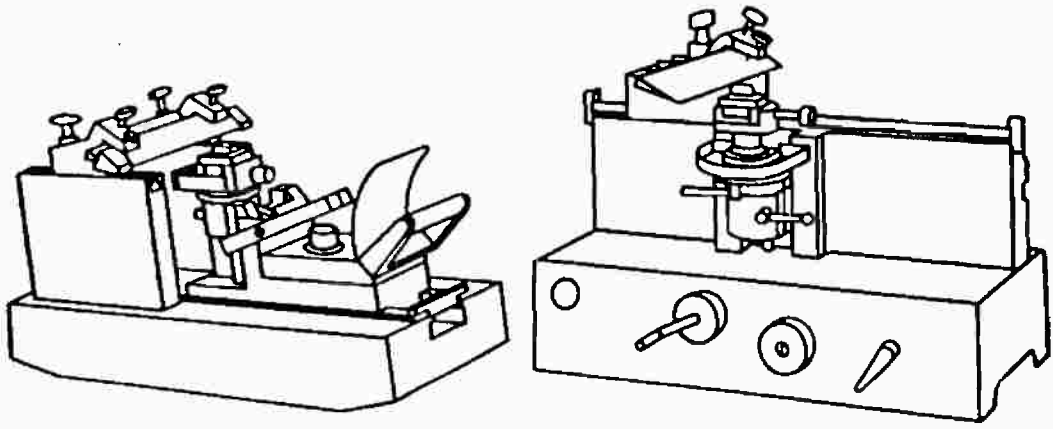
(٦) إذا كان شريط الشمع يلتف حول إصبعك أو حول فصل السكين أو أى شئ آخر ، فإن المشكلة تكمن فى تكهرب الأشرطة والتى غالبا ما توجد فى الحجرات شديدة الجفاف . ولعلاج ذلك ضع إناءً به ماء يغلى باستمرار قريباً منك ، أو قم بعمل القطاعات فى ساعات الصباح أو اعمل أشرطة قصيرة أو قم بتوصيل يد السكين بصنوبر ماء بواسطة سلك .

ثانياً : الميكروتوم المنزلق لقطاعات السللويدن

Sliding microtome for celloidin sections

يستعمل الطمر فى السللويدن فى حالة النماذج الكبيرة أو شديدة الصلابة ، وعلى ذلك فالميكروتوم المستخدم فى قطاعات السللويدن عادة ما يكون كبير الحجم وله قاعدة ثقيلة .

ويعتبر الميكروتوم المنزلق (شكل ٥ - ٣) هو الجهاز الذى يشيع استخدامه فى إعداد قطاعات السللويدن حيث يكون القالب فى هذا النوع ثابتا بينما يتحرك النصل الثقيل بزاوية خلال سطح القالب . ويجب على من يعمل على هذا النوع من الميكروتومات أن يأخذ حذره من النصل المتحرك فقد يتسبب فى حدوث أضرار خطيرة ، ولهذا السبب غالبا ما يزود معمل الميكروتكنيك بميكروتوم دوار متين ذى نصل مثبت فى وضع أفقى وماسك القالب هو الذى يتحرك أفقيا تحت حافة النصل .



انزلاق السكين　　انزلاق القاعدة

شكل (٥ - ٣) : الميكروتوم المنزلق

تحفظ قوالب السللويدن فى ٧٠٪ كحول إيثايل ولا يجب أن تتعرض للجفاف ومن المعروف أن كحول الإيثايل المستخدم فى القطع وأثر الانزلاق للأسطح الموجهة للآلة القاطعة يمكن أن يتسبب فى تآكل هذه الأجزاء من الميكروتوم ويتسبب فى تلفه بسرعة ، ولذلك يجب الحرص الشديد والعناية التامة فى تنظيف وتزييت كل الأسطح المنزلقة . ويجب أثناء عملية القطع أن يطفو ماسك السكين على فيلم من الزيت ، وبعد الانتهاء من عملية القطع يجب مسح وتجفيف وإعادة تزييت كل الأسطح .

ويحتاج العمل إلى توفر فرشاة رسم صغيرة لالتقاط القطاعات من على حافة السكينة

وكأس به ٧٠٪ كحول إيثايل وعدد من الأطباق البترى تحتوى على ٧٠٪ كحول إيثايل توضع بها القطاعات .

ويجدر بالإشارة أن الميكروتوم المنزلق يستخدم أيضا فى عمل قطاعات بالعينات الصلبة التى تطمر فى شمع البارافين كما هو الحال فى الجذر أو الساق الذى حدث بهما نموًا ثانوياً ؛ حيث تستقبل القطاعات فرادى فى طبق بترى به ماء دافئ تمهيداً للصقها بعد ذلك على شرائح ، ثم تتبع الخطوات المعتادة بعد ذلك .

الإرشادات الاساسية للميكروتوم المنزلق

Basic directions for the sliding microtome

(١) ضع القاعدة المثبت عليها قالب السللويدن فى ماسك القالب . أترك بضعة ملليمترات من القاعدة معرضة فوق جانبى الماسك ، حتى لا يتسبب الضغط الواقع على الجانبين (فكى الماسك) فى انفصال قالب السللويدن.

(٢) اضبط السطح الأفقى لقالب السللويدن ، ثم اخفض القالب بواسطة آلية التقدم لتقليل ارتفاعه وبذلك يصبح القالب غير معرض للخطر ثم تأكد من ضبط السكين . دائما ضع القالب أولاً قبل وضع السكين فى ماسك السكينة . ويجب أن يظل قالب السللويدن مبللاً بـ ٧٠٪ كحول إيثايل بواسطة فرشاة الرسم .

(٣) ادفع ماسك السكينة للخلف بحيث تصبح السكينة بعيدة عن القالب . بعد تثبيت السكينة جيدا فى الماسك اضبطها رأسيا على زاوية مقدارها ١٥° . أما الزاوية الأفقية للسكينة فتعتمد بدرجة كبيرة على العينة فمثلا بالنسبة لقطاعات الأفرع ابدأ بزاوية ٣٠° أو ٤٠° بين حافة السكينة واتجاه حركة ماسك السكينة (يجب على كل شخص أن يكتشف بنفسه أفضل طريقة للضبط بالنسبة له وهذه تتأتى بالمران والخبرة) . وبما أن وضع السكين يكون بزاوية أفقية بالنسبة لقالب السللويدن فإنها سوف تصطدم بركن القالب قبل أن تقطع العينة إلى شرائح ، والسكين هو الجزء المتحرك فى عملية القطع بالميكروتوم المنزلق لذلك يجب أخذ الحذر الشديد لتجنب انزلاق أو تلف القالب أو حدوث ضرر لأصبعك .

(٤) اجذب السكينة مباشرة فى مواجهة القالب ، واضبط سطح القالب بحيث يكون أفقيا

وموازيا لحافة النصل ، وبالتقدم اليدوى أرفع سطح القالب حتى يتلامس فيلم كحول الإيثايل الموجود على سطح القالب مع حافة السكين .

(٥) اضبط التدريج على ٣٠ ميكرون . حرك السكينة للخلف ولأعلى بحركة ثابتة ، وبعد كل حركة للسكين يبلل سطح القالب وحافة السكينة بـ ٧٠٪ كحول إيثايل .

(٦) بعد أن تعمل السكينة قطاعًا كاملاً بسمك ٣٠ ميكرون ، اضبط آلية التقدم للسمك المطلوب .

(٧) يجب أن يرفع كل قطاع من على حافة السكينة بواسطة فرشاة رسم ، ثم ينقل مباشرة إلى طبق بترى يحتوى على ٧٠٪ كحول إيثايل . ويجب أن يبلل سطح القالب وحافة السكينة بالكحول قبل عمل القطاع التالى .

(٨) فى حالة الرغبة فى حفظ القطاعات مرتبة ، يوضع كل قطاع فى طبق ستندر (Stender dish) على قرص من الورق يمكن ترقيمه .

(٩) بعد الانتهاء من عملية القطع ، انزع السكين وجففها بحرص ، ثم ضع قالب السللويدن فى وعاء يحتوى على ٧٠٪ كحول إيثايل ، ثم امسح الميكروتوم بعناية ، وأعد تزييت كل الأسطح .

(١٠) تصبغ القطاعات على حدة قبل تحميلها على الشريحة والصبغة المستعملة فى قطاعات السللويدن ، هى Delafield's Hematoxylin and Eosin Y .

مشكلات عملية القطع بالميكروتوم المنزلق والحلول المقترحة

Sectioning problems and possible remedies (Richards, 1959)

(١) إذا كانت القطاعات بها خدوش أو تنفصل عن السللويدن :

(أ) السكينة تالمة - حرك حافة السكينة أو اشحذها .

(ب) توجد جزيئات من التراب فى قالب السللويدن - رشح محلول Parlodion قبل استعماله ثانية.

(٢) إذا كانت القطاعات تسقط من قالب السللويدن :

(أ) قد يرجع ذلك إلى عدم كفاية التجفيف والتشريب - أذب السللويدن وأعد الخطوات من جديد .

(ب) السللويدن طرى جدا - حاول تجميده فى الكلوروفورم .

(٣) إذا كانت القطاعات غير منتظمة السمك :

(أ) مازال أحد ضوابط الميكروتوم غير مثبت جيدا - أعد ربط كل المسامير واختبر ثبات قالب السللويدن على قاعدته .

(ب) يتحرك ماسك السكينة حركة غير منتظمة - حرك السكينة بانتظام ، اترك السكينة تقوم بعملية القطع .

(جـ) زاوية ميل السكين ضعيفة جدا - استخدم زاوية أكبر .

(د) قالب السللويدن جاف - انقعه فى ٧٠٪ كحول إيثايل ، واحرص على أن يظل مبللاً دائمًا عند إجراء عملية القطع .

(هـ) السكينة تالفة - جرب جزءًا آخر من حافة النصل أو اشحذها أو استبدلها بأخرى حادة .

ثالثا: ميكروتومات القطاعات المثلجة (المبردة)

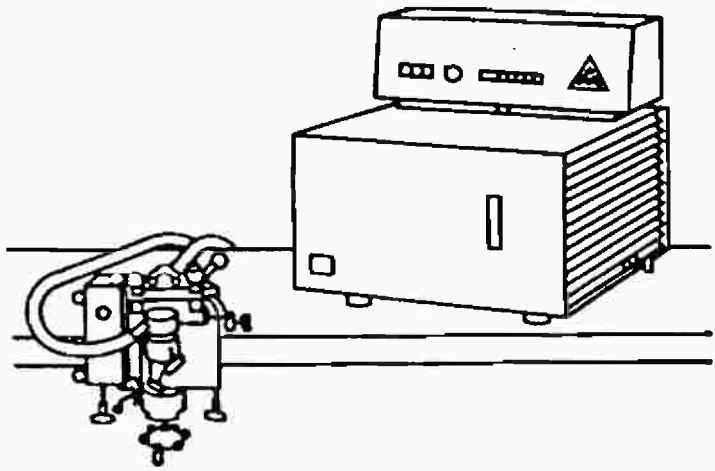
Microtomes for frozen sections

(أ) الميكروتوم الثلجى Freezing microtome

الميكروتوم الثلجى الإكلينيكى Clinical Freezing Microtome ميكروتوم بسيط (شكل ٥ - ٤) ، يمكن تثبيته على مائدة ومزود بجهاز للتبريد بغاز ثانى أكسيد الكربون CO_2 . وهو أساسا ميكروتوم منزلق وفيه يتحرك النصل بشكل حلقة أو قوس عبر النسيج المبرد الموجود على مائدة التبريد الثابتة ، ويتم تشغيله أوتوماتيكيا أو يدويا ، وترفع مائدة التبريد بعد كل دورة للسكينة . من المعروف أن الميكروتومات المنزلقة الخاصة بالسللويدن يمكن تزويدها أيضا بأجهزة تبريد وتعتبر ميكروتومات ثلجية ممتازة . وجهاز التبريد عادة عبارة عن غرفة معدنية مجوفة تتصل بأسطوانة بها غاز ثانى أكسيد الكربون حيث يتم التبريد بإطلاق الغاز على هيئة دفعات قصيرة داخل الغرفة ، ويُبرد تمدد الغاز الغرفة بسرعة ويجمد

العينة الموضوعة على مائد التبريد . ويوجد الآن عديد من موائد التبريد الكهربى الحرارى (التى تعتمد على تأثير Peltier) ، يمكن التحكم فى كل من التبريد والتسخين بسهولة تامة . وتتلاءم هذه الموائد بسهولة شديدة مع أى من الميكروتومات المنزلقة .

ويتطلب العمل وجود فرشاة رسم صغيرة ، وعدد من الملاقط ، وزجاجة تنقيط للماء المقطر .



شكل (٥ - ٤) : الميكروتوم الثلجى مزود بجهاز تبريد.

الإرشادات الأساسية للميكروتوم الثلجى الإكلينيكى

Basic directions for clinical freezing microtome

(١) افحص الميكروتوم لتتأكد من تزييته جيداً وأن كل المسامير محكمة وأن الأجزاء تتحرك بحرية وأن صمام أسطوانة غاز ثانى أكسيد الكربون يُفتح ويُغلق بسهولة.

(٢) ضع ورقة ترشيح مربعة صغيرة (أكبر قليلا من القالب) على قمة مائدة التبريد وشبعها بقطرة ماء .

(٣) ضع العينة المطمورة فى قالب الجيلاتين على ورقة الترشيح وأضف نقطة أخرى من الماء . ويجب أن يُكوّن الماء دعامة عند قاعدة القالب ، ولكن يجب ألا يزيد حول

أجزاء القالب حتى يسهل القطع ؛ حيث أن الثلج الناتج عن زيادة كمية الماء سوف يصطدم بالسكينة ويتسبب فى قطاعات غير منتظمة .

(٤) اضبط ارتفاع القالب حتى يصبح أسفل مستوى السكينة بمقدار $\frac{1}{2}$ سم أطلق غاز CO_2 على هيئة دفعات قصيرة حتى يتم تبريد العينة . امسك القالب الموجود على مائدة التبريد بواسطة ملقط لأسفل حتى تبدأ القاعدة فى التجمد .

(٥) عند تجمد القالب اضبط السكين فوق القالب فينحرف الغاز فوق قمة القالب وتتم عملية التجمد بسرعة . ويؤدى هذا أيضا إلى تبريد السكين .

(٦) عند التشغيل ارفع القالب ، وعندئذ يمكن للسكينة أن تعمل قطاعات بسمك ١٥ ميكرون . وتحدد الخبرة درجة الحرارة المثلى للقطع ، وسوف تتفتت القطاعات إذا كان القالب باردًا جدا أو تذوب داخل المادة اللزجة إذا كان القالب طريًا جدا . وتتطلب طريقة العمل التبريد المتوالى للقالب بدفعات الغاز وسرعة القطع لعدد من القطاعات عندما يكون القالب معرضًا لدرجة الحرارة المطلوبة .

(٧) ارفع القطاعات من على حافة السكينة بفرشاة رسم صغيرة ، أو بواسطة طرف إصبعك الصغير ، ثم ضع القطاعات فى طبق به ماء مقطر .

(٨) يمكن التعامل مع قطاعات الأنسجة المطمورة فى الجيلاتين بسهولة بواسطة ساق زجاجية صغيرة ملتوية على شكل عصا الجولف . وتصبغ القطاعات بواسطة صبغة Sudan Black B وتحمَّل فى غروى الجلسرين .

مشكلات القطع بالميكروتوم الثلجى والحلول المقترحة

Sectioning problems and possible remedies (Richards, 1959)

(١) إذا كانت القطاعات مفتتة :

(أ) القالب لم يتم تجميده كما يجب - إسرع وقت التجميد عن طريق إطلاق الغاز فى دفعات أطول .

(ب) السكينة تالمة - اشحذها أو استبدلها بأخرى حادة .

(جـ) السكينة دافئة - بردها ، غلّف السكينة بثلج جاف بواسطة شريط شفاف (مصنوع من السليلوز) .

(٢) إذا كانت القطاعات متباينة السمك :

(أ) السكينة تالفة - اشحذها .

(ب) بعض مسامير الميكروتوم أو الضوابط مفكوكة - اربط كل مسامير الضبط .

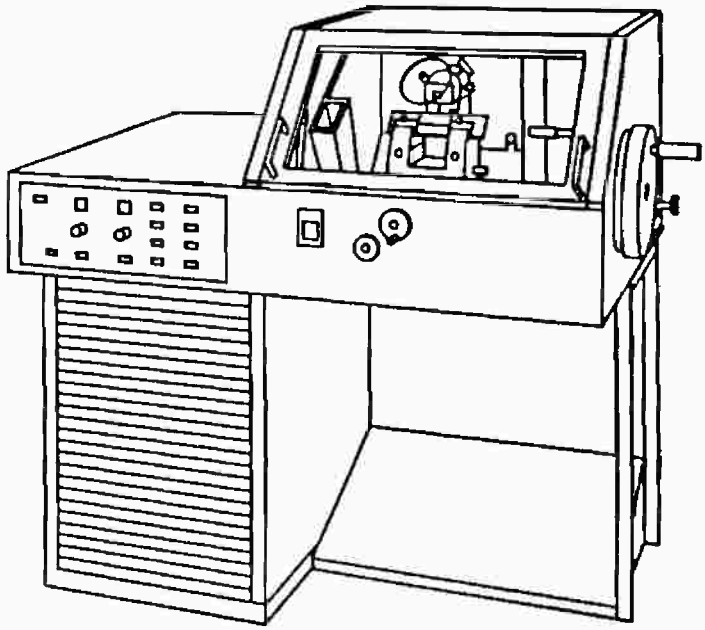
(جـ) قد يكون الميكروتوم به عيوب فيجب إصلاحه (صيانة الميكروتوم هامة جدا) .

(د) ينفصل القالب عن مائدة التبريد - أذبه ثم أعد تجميده .

(ب) ميكروتوم الكريوستات Cryostat microtome

يصمم الكريوستات (شكل ٥ -٥) لعمل قطاعات سريعة رقيقة ومفككة لاستخدامها فى دراسات كيمياء الأنسجة ولفحص الأنسجة المستأصلة أثناء العمليات الجراحية . وهو أساساً ميكروتوم دوار موضوع داخل حجرة مبردة ، حيث يمكن من خلاله ضبط درجات الحرارة المثلى لعدد كبير من الأنسجة . تعتمد القطاعات الجيدة على مدى حدة السكينة وسرعة تجمد الأنسجة على درجة الحرارة المثلى . يلاحظ أن عديداً من الأنسجة سوف يتمزق أثناء عملية القطع إلا إذا كانت مدعمة بقالب ، ويمكن طمر الأنسجة فى الجيلاتين أو يتم إحاطتها بالصمغ العربى أثناء عملية التجميد . وللحصول على أفضل النتائج اطمر النسيج بالكامل فى مركب OCT (Lab - Tec, Westmont, Illinois) أثناء التجميد ، ويجب أن تكون عملية التجميد سريعة جدا لتجنب تكوين بللورات كبيرة من الثلج . يجب أن تستكمل مراحل التجميد السريع للكريوستات المتاح تجاريا باستعمال رقائق من الثلج الجاف أو دفعات قصيرة لغاز ثانى أكسيد الكربون أو غاز النيريون الناتج من عبوة الضغط .

ويحتاج العمل لوجود فرشاة رسم وزوجين من الملاقط (أحدهم يوضع فى غرفة التبريد) ونظراً لأن خطوات الصبغ سريعة جدا فيجب أن تُعد محاليل الصبغ مقدما فى أطباق كولومبيا Columbia dishes وذلك للأغطية أو فى أوانى الصبغ Coplin jars وذلك للشرائح .



شكل (٥ - ٥) : ميكروتوم الكريوستات.

الإرشادات الاساسية للميكروتوم الكريوستات

Basic directions for cryostat microtome

(١) تثبت درجة الحرارة فى غرفة التبريد عند ٢٠° م . توضع مواسك العينة والملاقط الإضافية وصندوق السكين والنصل بداخل غرفة التبريد لتبريدهم .

(٢) تثبت الأنسجة المفككة مباشرة على مواسك العينة . يرفع ماسك العينة ويسخن سطحه المعاكس لاتجاه يدك ، ويجب أن تكون يديك جافة حتى لا تلتصق بالمعدات الباردة . ضع طبقة رقيقة من مركب OCT عند درجة الحرارة المناسبة على سطح النسيج ثم اطمر النسيج فى مركب لزج ، أضف المزيد من المركب حتى يصبح النسيج مُغطى . يبرد الماسك بطريقة التجميد السريع فيتجمد النسيج بسرعة وانتظام ، أو باستخدام دفعات قصيرة ناتجة عن عبوة ضغط الفريون ، وذلك بتعريضها فوق قمة النسيج .

(٣) ضع السكينة المبردة فى ماسك السكينة ثم اضبط الزاوية على ١٠° . يمكن الحصول على القطاعات الأرفع من ١٠ ميكرون إذا كانت قطع الثلج الجاف مثبتة على السكينة لتبريدها .

(٤) اضبط زاوية سطح ماسك العينة وهى أصغر من تلك المستخدمة فى ميكروتوم البارافين. تأكد من أن السطح موازيا للسكينة فلا يرتطم الماسك المعدنى بحافة السكينة ويكسرها. إذا وجد جهاز مضاد للالتفاف Antiroll يجب ضبطه بحرص ، أما إذا لم يكن موجوداً فإن كل قطاع يجب توجيهه بفرشاة رسم لمنع تجعده .

(٥) ادفع عجلة الحركة بشدة أثناء الدوران لأسفل On the downstroke .

(٦) انقل كل قطاع برفعه بجهاز مضاد الالتفاف Antiroll ، ثم المس القطاع بالسطح المستوى لغطاء الشريحة ، يذوب الثلج ويلتصق القطاع فى الحال بغطاء الشريحة ويمكن وضعه فى مثبت . بعض الأنسجة مثل العضلات والتى لا تلتصق بسهولة بغطاء الشريحة يجب تجفيفها لمدة ٣٠ ثانية عند درجة حرارة الغرفة قبل تثبيتها .

(٧) يمكن استعمال طريقة صبغ Delafield's Hematoxylin and Eosin Y .

مشكلات القطع بميكروتوم الكريوستات والحلول المقترحة

Sectioning problems and possible remedies

(١) إذا كانت القطاعات تنهار أو تسقط Collapse من على حافة النصل :

(أ) النسيج أو السكينة أو الاثنين معا لم يتم تبريدها كما يجب - انتظر حتى يتم تبريدهما فى غرفة التبريد المغلقة .

(ب) السكينة تالمة - اشحذها .

(٢) إذا كانت القطاعات مفتتة :

القطاعات باردة جدا - أعد ضبط درجة حرارة غرفة التبريد .

(٣) إذا كانت القطاعات ممزقة أو متباينة السمك :

(أ) السكينة تالمة - اشحذها .

(ب) الميكروتوم مستهلك - يجب عمل الصيانة اللازمة لإصلاحه .

(جـ) السكينة غير نظيفة - نظفها .

(د) النسيج غير مبرد جيدا - أفحص الثرموستات .

رابعاً: الميكروتوم الفائق لقطاعات المجهر الإلكترونى

Ultra microtome for electron microscope sections

اعتمدت الدراسات الخاصة بالمجهر الإلكترونى فى الأربعينات من القرن العشرين على الاستفادة من المناطق الرقيقة التى توجد على أطراف القطاعات المستدقة ذات الشكل الوتدى باستخدام الميكروتوم القياسى ، لكن غالبا ما كان القطاع سميكا بدرجة لا تسمح باختراق الإلكترونات بالقدر الكافى ، كما أن الأطراف الرقيقة كانت صغيرة المساحة ولا تكفى للحصول على معلومات وافية .

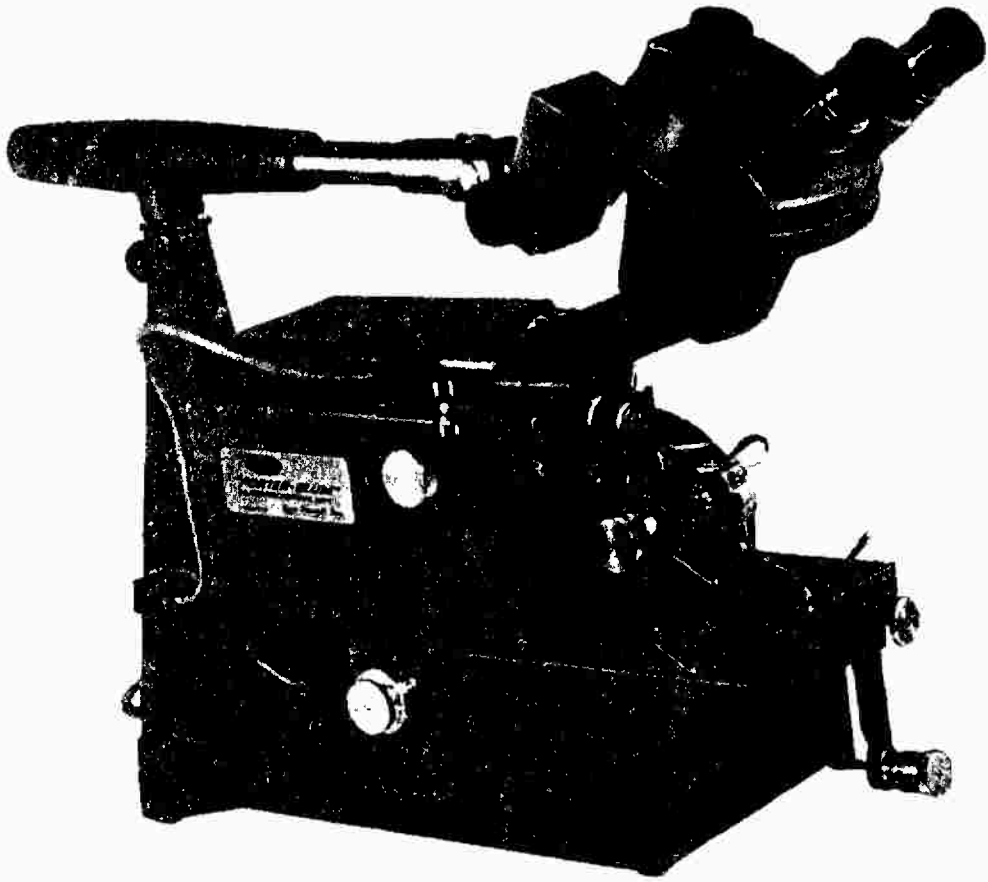
كانت المحاولات الأولى لإنتاج قطاعات كاملة رقيقة تناسب المجهر الإلكترونى بتصميم الميكروتوم الزائد السرعة ، والذى قد تصل عدد القطاعات الناتجة عنه إلى أكثر من ٤٠٠٠٠ قطاع فى الدقيقة الواحدة ، لكن المشكلات التى صاحبته لم تشجع على استمرار العمل به .

ولقد كان الافتقار إلى بيئة تحميل مناسبة من أهم العوائق التى صاحبت تجهيز العينات فيما مضى ، فلم يكن شمع البارافين صلباً بدرجة تناسب التحضيرات المطلوبة للفحص بالمجهر الإلكترونى .

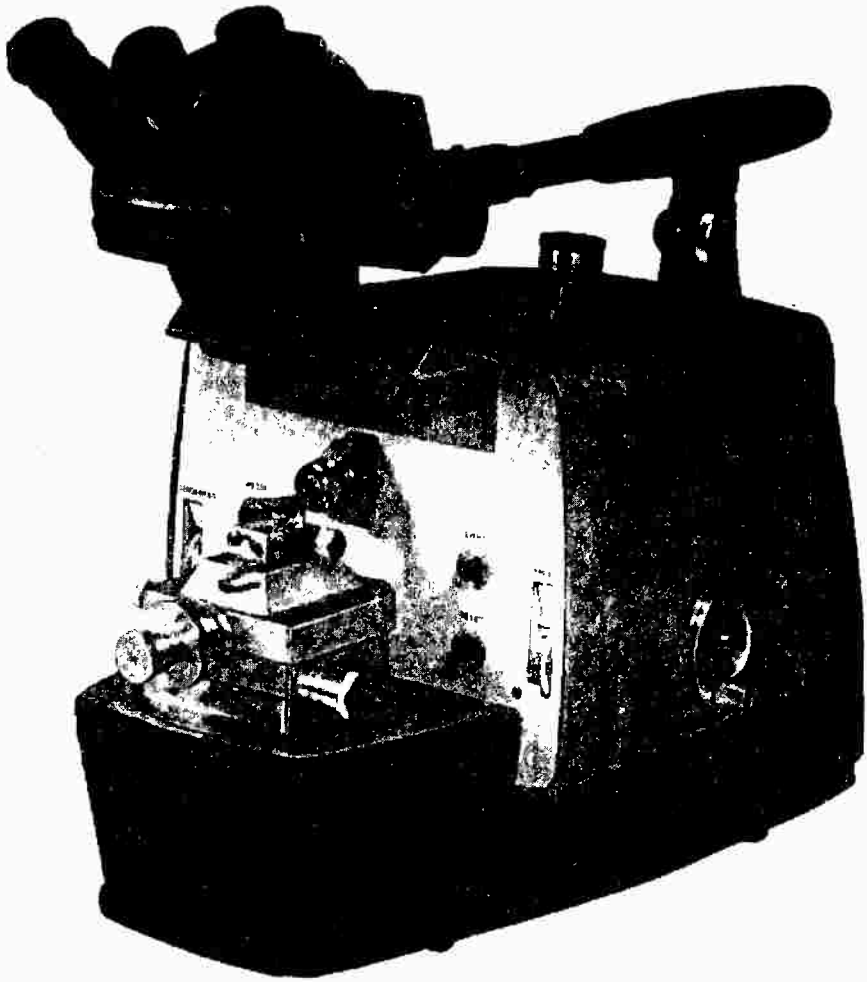
حاول البعض فى بداية الأمر تصميم ميكروتوم توضع العينة به على حامل على هيئة قرص يتحرك دائريا للتغلب على مشكلة احتكاك العينة بالسكين فى رحلة العودة ، ولقد قدمت المصانع عديداً من أشكال الميكروتومات ، منها على سبيل المثال طراز يعطى فى ذات الشريط قطاعات ذات سمك يناسب الفحص بالمجهر الإلكترونى ، وأخرى تناسب الفحص بالمجهر الضوئى ، وذلك يتيح الفرصة لإجراء مقارنة للقطاعات المتجاورة باستخدام كل من المجهر الإلكترونى والضوئى .

ولقد استخدمت السكين الزجاجية عام ١٩٥٠ بدلا عن السكين المعدنية ذات حافة النصل الحادة ، وحل محلها بعد ذلك السكين الماسية .

يوضح كل من الشكل (٥ - ٦) و الشكل (٥ - ٧) الميكروتومات الفائقة طرازى MT-1 و MT - 2 وهى تعتبر أجهزة قطع متقدمة تمكن الشخص ذا الخبرة القليلة نسبيا من عمل قطاعات لكل من المجهر الضوئى والإلكترونى . ومن مميزات هذه الميكروتومات أن المجرى الجانبى للسكين يكون أثناء حركة القطع مجهزاً لعمل قطاعات سميكة ورقيقة بالتبادل دون إيقاف لخطوات القطع أو إعادة ضبط التدريج .



شكل (٥ - ٦) : الميكروتوم الفائق طراز MT-1 مزود بمجهر مزدوج العدسات ومصدر إضاءة.

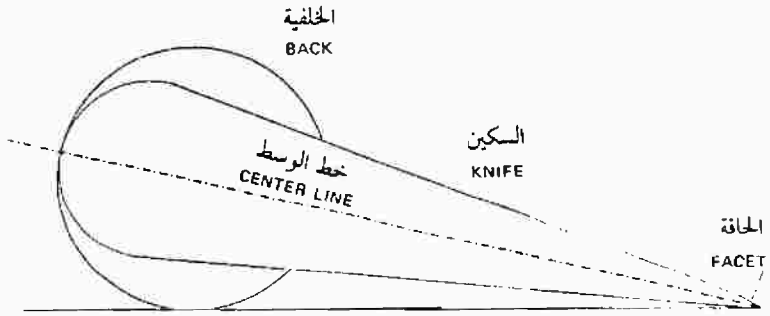


شكل (٥ - ٧) : الميكروتوم الفائق طراز MT-2 مزود بمجهر مزدوج العدسات ومصدر إضاءة.

سكين الميكروتوم Microtome knife

تصنع سكين الميكروتوم من صلب على درجة عالية من الجودة لين Soft بالدرجة التى تسمح بسنه إلى حافة حادة جدا ، وصلد Hard بالدرجة التى تحافظ على حدة الحافة خلال احتكاكها بشمع البارافين وما به من أنسجة مطمورة . لا تصنع سكين الميكروتوم من الصلب غير القابل للصدأ لذلك يجب العناية بها حتى نتحاشى حدوث أى صدأ . فإذا ما صدأت حافة السكين تكونت بها نقر وتصبح عديمة الفائدة . وبطبيعة الحالة فإن السكين المستعملة مع الميكروتوم الثلجى تكون أكثر عرضة للتلف نتيجة للصدأ .

عادة ما تزود سكين الميكروتوم بخلفية Back على هيئة أنبوبة من الصلب تنزلق على الجهة الخلفية من السكين حيث تتحكم فى زاوية ميل السكين المطلوبة عند وضعها على حجر السن .



شكل (٥ - ٨) : شكل تخطيطى لقطاع عرضى بسكين الميكروتوم (ويلى willey ١٩٧١).

تحدد زاوية ميل السكين أثناء السن الزاوية بين سطحى الحافة Facet وبالتالى نوعية القطع - تزود كل سكين تسن يدويا بخلفية خاصة بها - ولا تتطلب السكين التى تسن آليا أى خلفية حيث تكون زاوية ميل السكين ثابتة بجهاز السن - ولا يجوز فى المرات المتتالية سن ذات السكين بالأسلوبين لاختلاف زاوية الميل فى كل منهما ، لذلك يثبت سن كل سكين إما يدويا أو آليا . لا تختبر حدة السكين بقطع شعرة أو خيط ، وإلا تعاد عملية السن مرة أخرى .

يمكن للمبتدئ الاستعاضة عن السكين بشفرة حلاقة مثبتة بماسك خاص وتبدل الشفرة بغيرها عندما تصير الحافة غير حادة Dull أو منقرة Nicked وتفضل الشفرات السميكة نوعا ما للحصول على نتائج أفضل .

تفحص حافة السكين بالمجهر الضوئي - ضع السكين على حامل خشبي بحيث تكون مائلة بزاوية قدرها ٢٠° على أن تكون الحافة إلى أعلى - ضع السكين على مائدة المجهروافحص الحافة بالعدسة الشيئية قوة ١٠ واحترس أن تلامس العدسة حافة السكين - استخدم ضوءاً ساقطًا ، ترى حافة السكين الحادة على هيئة خط دقيق ومستقيم من ضوء منعكس . تعكس السكين غير الحادة ضوءاً أكثر وتكون الحافة منشارية الشكل يتخللها النقر .

يراعى عند إتمام عملية القطع بالميكروتوم نزع السكين (أو الشفرة) وتجفيفها جيداً - والسن إن لزم الأمر - تطلى السكين بطبقة شحم أو فازلين لحمايتها من الرطوبة أثناء الحفظ حتى لا تصدأ - كما يراعى أيضا نظافة الميكروتوم ووضع غطاء عليه حتى لا يتعرض للأتربة .