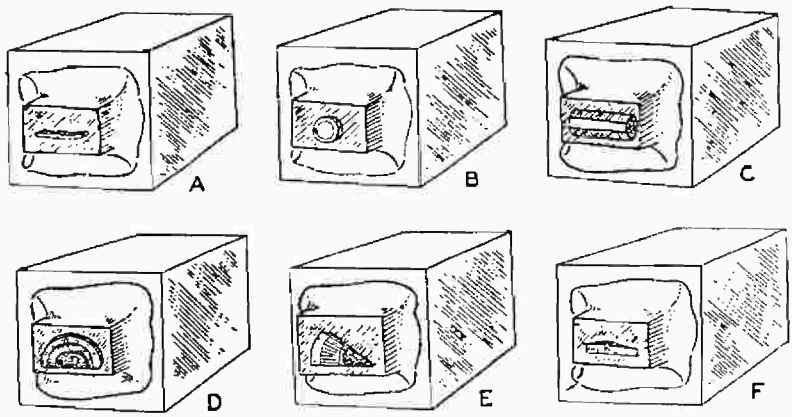
٦ . قطع العينات
Sectioning

قطع العينات النباتية المطمورة فى شمع البارافين

تجهيز القوالب للقطع بالميكروتوم :

(١) يؤخذ من قالب الشمع المحتوى على العينات النباتية قطعة صغيرة منتظمة قائمة الزوايا تحتوى على إحدى العينات، مع مراعاة وضع العينة بالنسبة لاتجاه حركة السكين حتى يتحقق الهدف المطلوب - ويوضح شكل (٦ - ١) نماذج لاوضاع العينة أثناء عملية القطع . ويجب أن يكون السطح المعد للقطع مربعاً أو مستطيلا متوازى الأضلاع قائم الزوايا حتى تحصل على شريط منتظم ومستقيم ، ويجب أن يتم التقطيع بواسطة مشرط ، سلاحه مستقيم ، والأفضل استعمال شفرات الحلاقة ، وتتم عملية التقطيع لقالب الشمع بطريقة السحب، وليس عن طريق الضغط حتى لا يتكسر قالب الشمع.



شكل (٦ - ١) : أوضاع العينات مختلفة الأشكال أثناء القطع بالميكروتوم.

A - تحميل ورقة لعمل قطاعات عرضية .

B - تحميل ساق صغيرة لعمل قطاعات عرضية .

C - تحميل ساق صغيرة لعمل قطاعات طولية .

D ، E - تحميل جزء من ساق لعمل قطاعات عرضية .

F - تحميل جزء من ساق عشبى كبير لعمل قطاعات قطرية (شعاعية) .

(ساس Sass ١٩٦١)

(٢) يترك إطار مناسب من الشمع حول النموذج (حوالى ٣ مم) ، عند تنظيم الشمع ويستحسن ترك مسافة أكبر جهة القاعدة ؛ حتى يكون هناك مجال لتحميل القطعة على حامل الميكروتوم وبذلك يمكن قطع العينة حتى نهايتها بسهولة وانتظام .

(٣) تلصق القطعة المحتوية على العينة بعد تجهيزها بتسوية سطوحها على حامل الميكروتوم المعدنى أو الخشبى أو المصنوع من البلاستيك ويتم ذلك بإذابة بعض قشور من الشمع بمشرط ساخن على سطح الحامل ، ثم تغرس القطعة فى وسط هذا الشمع المنصهر ثم تترك لتبرد فيتجمد الشمع وتلتصق القطعة بالحامل . يضاف مزيد من الشمع المنصهر حول الجزء القاعدى من القطعة لعمل دعامة لها وتأكيد تثبيتها على حامل الميكروتوم .

(٤) تنظم القطعة المحتوية على العينة بحيث تكون فى الوضع المناسب على حامل الميكروتوم ؛ تبعا للغرض من القطع إذا كان طوليا أو عرضيا .

(٥) يغمس الحامل فى ماء بارد حتى يتصلب الشمع ، ثم يوضع الحامل فى موضعه من الميكروتوم الذى يكون قد تم إعداده للعمل ، ويكون السطح المعد للقطع موازيا لحافة السكين عند وضع الحامل فى مكانه من الميكروتوم ، وبذا يمكن البدء فى عملية القطع بتحريك يد الميكروتوم أو إدارتها حسب نوع الميكروتوم المستعمل ، وذلك بعد تنظيم سمك القطاعات بواسطة الدليل الخاص الموجود بالميكروتوم ، ويكون القطع بسمك ٥ - ٢٠ ميكرون حسب النموذج [الميكرون (u) = ١ / ١٠٠٠ مم] .

(٦) تقطع العينة النباتية بهذه الطريقة فى قطاعات متسلسلة متصلة ببعضها فى شريط طويل ، يمكن فصل الشريط عن سكين القطع بفرشة صغيرة ، كلما وصل الشريط إلى الطول المناسب (نحو ٢٠ سم) . تحفظ الأشرطة منبسطة فى علب من الكرتون المبطن بورق أسود مصقول ، مع مراعاة تسلسل القطاعات .

(٧) هذه الأشرطة رقيقة جداً فيجب الاحتراس عند التعامل معها ، حتى لا تتمزق أو تلتوى على بعضها البعض فتتلف ، كما يجب عدم تعرضها للهواء أو النفخ حتى لا تتطاير تمهيداً لوضعها بعد ذلك على الشرائح .

العوامل التى تؤثر على عملية القطع Factors influencing sectioning

يتوقف نجاح عملية القطع بالميكروتوم على عدة عوامل متفاعلة مع بعضها البعض ، ومن أهم هذه العوامل مايلى :

(١) نوعية الشمع المستخدم Quality of the paraffin wax

يراعى أن تكون صلابة الشمع متناسبة مع طبيعة أنسجة العينة النباتية ، وسمك القطاعات المطلوبة ودرجة حرارة الغرفة ، ويجب أن يكون الشمع ذا قوام حبيبى دقيق جدا وخالٍ من الفقاعات والشوائب والبقع المعتمة .

(٢) التشريب النموذجى بالشمع Proper infiltration

يؤدى عدم التشريب النموذجى بالشمع إلى انفصال العينة عن الشمع وإذا ما فحصت العينة بالعدسة ترى الأنسجة مفتتة ؛ نتيجة عدم كفاية التخلل أثناء عملية التشريب بالشمع ، أو نتيجة زيادة تصلب الأنسجة مما يجعلها هشة بطبيعتها ، وقد يلاحظ انفصال القطاعات بعد القطع بعيدا عن الشمع المحيط بها ، نتيجة عدم اتصال السطوح الخارجية للعينة بصورة جيدة من الشمع المحيط بها ، وقد ينتج عدم التشريب الكافى بالشمع عن عدم تمام التجفيف أو السرعة فى إجراء عملية التشريب بالشمع .

(٣) توجيه العينة النباتية المحملة Orientation of the mounted material

يراعى أن تكون العينة النباتية فى منتصف الشمع عند القطع ، وإلا فتكون الطبقة السميكة من الشمع إلى أعلى لمقاومة الضغط الناجم عن عملية القطع ، ويراعى ألا تكون طبقة الشمع المحيطة بالعينة كبيرة ؛ حتى تكون القطاعات متقاربة ، وبالتالى يمكن الانتفاع بأكبر مساحة من الشريحة عند التحميل وفى ذلك توفير لعدد الشرائح والأغطية والشمع ، وكذلك الاقتصار فى استعمال الكيماويات المذيبة للشمع . ويراعى أن يكون سطح العينة موازيا لحافة السكينة ، ويكون وضع السكينة على زاوية قائمة مع اتجاه حركة حامل النموذج (إلا إذا كان المطلوب عمل قطاعات باتجاه خاص) ، كما يراعى زاوية الميل بين سطح السكينة المسطح وسطح العينة ، وتعرف بالتجربة .

(٤) ثبات التحميل Rigidity of mounting

يراعى أن يكون الحامل المثبت عليه العينة النباتية مثبتاً فى مكانه بالميكروتوم ، لايتحرك ، وأن تكون العينة ملتصقة ومثبتة تمامًا بالحامل ، أن يحكم القفل على السكينة حتى لاتتحرك أو تهتز أثناء التقطيع ، إذ إن أى حركة بأى من هذه المواضيع ينشأ عنها قطاعات غير متماثلة السمك ، وهذا يمكن اكتشافه فى الشريط ، ولكنه يكون أكثر وضوحاً بعد الصبغ حيث تكون القطاعات السميكة أغمق لونا من الرقيقة .

(٥) الظروف الحرارية Temperature factors

تتأثر عملية التقطيع بدرجة حرارة الغرفة والعينة النباتية والسكين ، فإذا كانت درجة حرارة إحدى هذه الأشياء مرتفعة عن اللازم . . فإن القطاعات تنضغط وتتجمع فتعجن على حافة السكين مكونة كتلة غير متميزة . وعلى العكس من ذلك إذا كانت درجة الحرارة لإحدى هذه الأشياء أقل من اللازم فإن القطاعات تلتوى أو لا تلتحم مع بعضها ، وبذلك لا يتكون الشريط المطلوب . ومن الملاحظ أن القطاعات السميكة تتحمل درجات الحرارة العالية عن القطاعات الرقيقة .

(٦) صلابة العينات النباتية Hardness or brittleness of the materials

إذا اتبعت كل الاحتياطات السابقة ، ولم يمكن الحصول على قطاعات وشرائط جيدة فقد يرجع ذلك إلى صلابة العينات ، ويمكن التغلب على ذلك بتطريتها وذلك بتسوية جهة العينة الموازية للسكين بحيث تتعرض الأنسجة ثم يوضع الحامل بما عليه من عينة نباتية فى ماء فاتر ، وتؤدى هذه المعاملة إلى تطرية العينة مما يسمح بعمل قطاعات جيدة . وقد يوضع الحامل والعينة فى كأس به ماء ثم يوضع فى فرن على درجة حرارة ٣٥ - ٤٠° م لمدة ١٢ ساعة أو أكثر تبعاً لحجم وطبيعة العينة . إذا لم تنجح هذه المعاملة فى الحصول على النتائج المرجوه فقد يرجع ذلك إلى أن العينات صلبة جداً وبذلك لا تصلح للقطع بطريقة الشمع أو أن عمليتى التجفيف والتشرب لم تتم كما يجب .

(٧) تكهرب الأشرطة

من الصعوبات التى قد تنشأ أثناء عملية القطع تكهرب الأشرطة ؛ مما يسبب اندفاعها بقوة تجاه الأدوات الأخرى فتلتصق بها أو تلتوى على بعضها مما يسبب تلفها ، ويمكن تجنب ذلك بغلى ماء فى المعمل حتى ترتفع الرطوبة إلى درجة كافية لمنع هذا التكهرب أو تقليله إلى أدنى حد ، ويمكن كذلك توصيل يد السكين بحنفية الماء بواسطة سلك .

(٨) قد يكون شريط الشمع غير مستقيم ويرجع ذلك لسبب أو أكثر مما يلى :

(أ) المنطقة المستعملة من السكين تالفة ولذا يجب تحريك السكين أو إبدالها بأخرى حادة .

(ب) السطح العلوى والسفلى للعينة غير متوازيين ولذا يجب عمل التسوية اللازمة .

(جـ) الحافة السفلية للعينة غير موازية للسكين ويلزم تنظيمها .

(د) العينة النباتية ليست فى منتصف الشمع تماما ويلزم عمل التسوية اللازمة .

(هـ) العينة نفسها غير منتظمة الشكل والحجم .

قطع العينات النباتية غير المطمورة فى شمع البارافين

أولا : القطاعات اليدوية Hand sections

يمكن عمل هذه القطاعات فى عينات نباتية حية أو محفوظة وذلك بإستعمال موسى تشريح أو شفرة حلاقة ، ويمكن بالتمرين الحصول على قطاعات رقيقة . قد تبدو هذه الطريقة دون الطرق الأخرى ولكنها تعطى تحضيرات ممتازة خاصة لدراسة الطلبة (وفى هذه الحالة يجب أن يقوم الطالب بنفسه بجمع العينات وعمل القطاعات فذلك أدعى إلى التعرف على تركيب هذه العينات حتى ولو لم تكن هذه القطاعات على جانب كبير من الجودة فذلك أفضل من فحص الشرائح المجهزة بطرق أخرى) . كما تفيد هذه الطريقة فى توفير كثير من الجهد الذى يبذله الباحث الذى يرغب فى عمل دراسة خاصة فما عليه إلا عمل دراسة شاملة للعينات ليتعرف على الصعوبات ويحدد الأجزاء الجديرة بالدراسة .

ولاشك أن الصبر والمران والمهارة الفطرية أهم ما يجب أن يتصف به الباحث حتى يتمكن من القيام بهذه العملية على الوجه الأكمل ، فالنصائح أو التوجيهات قد لا تكون ذات قيمة فى مثل هذه الأحوال .

وتجرى هذه العملية باستعمال نخاع البيلسان أو دونه ، حيث تشق قطعة من نخاع البيلسان طوليا ثم تحفر مجرى تناسب سمك العينة ، يربط النخاع والعينة بداخله ثم يوضع فى ماء فيتمدد النخاع وبذلك يغلف العينة تماما ويسهل قطعها بالموس ، ويمكن الاستعاضة عن نخاع البيلسان بجذر الجزر ويراعى أن يكون كل من الموس والعينة مبللين دائما بالماء ، تعوم القطاعات فى طبق بترى به ماء أو فى تركيز من الكحول يعادل التركيز الذى وصلت إليه العينة عند القطع ، فمثلا عند قطع عينة فى محلول F. A. A. أو غيره من محاليل القتل والتثبيت يراعى غسلها والبدء فى إجراء عملية التجفيف حتى نصل إلى ٥٠٪ أو ٧٠٪ كحول ثم تعمل القطاعات وتعوم فى التركيزات المناسبة .

إذا عملت قطاعات يدوية فى عينات حية يراعى بعد القطع قتل وتثبيت القطاعات ويستعمل لذلك محلول قتل مناسب للعينة تحت الدراسة ، ويتم القتل فى الحال غالباً إذا ما كانت القطاعات رقيقة ثم تغسل القطاعات بعد نحو ١٠ دقائق من القتل .

ويجب مراعاة فحص القطاعات قبل صبغها بعدسة جيب للتأكد من سلامتها ، وتتبع الطريقة المناسبة للصبغ سواء المفردة أو المزدوجة . إذا كانت الصبغة المفردة أو الصبغة الأولى فى حالة الصبغ المزدوج مائية يلزم أن نصل بالقطاعات إلى الماء إذا كانت قد قتلت فى الكحول أو فى محلول F. A. A. وتتبع الخطوات التالية : يضاف إلى القطاعات المختارة فى زجاجة الساعة كحول إيثايل ٥٠٪ ثم يضاف ثلث الكمية ماء ، بعد ٣ - ٥ دقائق يسكب نصف كمية السائل ويضاف كمية مساوية للمتبقى ماء ، تكرر عملية السكب والإضافة ٢ - ٣ مرات . وفى النهاية يسكب كل السائل ويضاف ماء ثم يسكب الماء وتضاف الصبغة المائية المراد استخدامها . أما إذا كانت الصبغة المراد استخدامها مذابة فى الكحول فيمكن إتباع الخطوات السابقة ، وبدلاً من إضافة الماء تضاف تركيزات متدرجة من الكحول حتى نصل إلى تركيز الصبغة .

ثانياً: القطع بواسطة الميكروتوم

(أ) القطع بواسطة الميكروتوم الثلجى Freezing microtome

تستخدم هذه الطريقة بصورة خاصة فى حالة العينات اللينة الرقيقة التى يصعب قطعها باليد أو يخشى من تلفها إذا تم تحضيرها بطريقة الشمع ، وهى طريقة سريعة يمكن بها عمل قطاعات كبيرة كاملة . والأساس فى استعمال الميكروتوم الثلجى تبريد العينة بواسطة غاز ثانى أكسيد الكربون CO_2 أو الأثير لدرجة التجمد فى محلول مناسب لا يتبلور بالتبريد ، وبالتالى تكتسب العينة صلابة يمكن بها قطعها بسهولة . والميكروتوم الثلجى معد لعمل قطاعات بسمك محدد (بالميكرون) ميكانيكيا ومزود بجهاز للتبريد يتصل من خلال أنبوبة معدنية بأسطوانة الغاز السائل CO_2 ، عند فتح صمام الغاز يندفع الغاز بقوة على درجة حرارة منخفضة جداً فيتجمد المحلول الذى يحيط بالعينة المحملة على مائدة التبريد وبذلك تتكون كتلة صلبة متماسكة يمكن قطعها بسهولة .

ويستعمل المحلول التالى عادة فى تحميل العينات :

ماء مقطر	٢٠٠ مل
صمغ عربى	٢٠ جم
فينول أو ثيمول (مادة حافظة)	١ جم

قد يستعاض عن الصمغ بالجيلاتين أو الآجار بعمل محلول نصف سائل على درجة حرارة الغرفة ويضاف إليه مادة حافظة ١,٠ ٪ فينول .

يمكن باستعمال الميكروتوم الثلجي قطع العينات النباتية الحية أو المقتولة ، تجزأ العينات إلى قطع ذات حجم مناسب وتوضع فى ماء بارد ، ثم تنقل بعد فترة مناسبة إلى محلول الصمغ العربى وتترك به فترة وجيزة يعد خلالها الميكروتوم للاستعمال ، أما إذا كانت العينات مقتولة فيتم تدريجها حتى تصل إلى الماء ثم فى محلول الصمغ العربى حتى يعد الميكروتوم كما سبق فى حالة العينات النباتية الحية .

ليس الهدف من وضع العينات النباتية فى الصمغ أن تتشربه الأنسجة تماما وإنما تغلف العينات به من جميع الجهات بطبقة منتظمة من محلول الصمغ . توضع نقطة أو اثنتين من الصمغ العربى ، يتجمد المحلول ويصير أبيض اللون ، تحمل العينة وتنظم فى الوضع المناسب مع استمرار تدفق الغاز وإضافة محلول الصمغ ، عندما تصل العينة المحملة إلى درجة صلابة مناسبة تجرى عملية القطع ، وتبرد السكين لدرجة قريبة من درجة حرارة العينة . تستقبل القطاعات فى طبق بترى أو زجاجة ساعة بنقلها من فوق السكين بواسطة فرشاة ناعمة ، يذوب الصمغ وتكون القطاعات معدة للخطوات التالية من التحضير ، يراعى أن تكون القطاعات سميكة نسبياً (٣٠ - ٤٠ ميكرون) .

(ب) القطع بواسطة الميكروتوم المنزلق Sliding microtome

تستعمل هذه الطريقة إذا لم يكن ممكناً الحصول على قطاعات كاملة بطريق القطع اليدوى وذلك فى الأنسجة البالغة أو الكبيرة الحجم .

تجهز العينة بطول ٣ سم وتثبت فى ماسك الميكروتوم بحيث يبرز منها ١ سم أعلى الحافة العلوية للماسك ، وتثبت السكين فى وضع مائل على محور الانزلاق حتى تكون مائلة بالنسبة للعينة مع مراعاة وجود مسافة بين حامل السكين وماسك العينة . يراعى أن تكون العينة والسكين مبللتين دائما بالماء ، ترفع القطاعات من فوق حافة السكين بفرشاة مبللة بالماء أيضا حيث تنقل إلى طبق بترى به ماء تختبر القطاعات بعدسة جيب ويستبعد غير الصالح منها . يتبع بعد ذلك الخطوات السابق ذكرها فى القطاعات اليدوية فيما يتعلق بالتجفيف والصبغ .

مما هو جدير بالذكر أن الميكروتوم المنزلق يستعمل أيضا فى حالة العينات المطمورة فى الشمع فى حالة صعوبة قطعها بالميكروتوم الدائرى نتيجة للصلابة الزائدة للعينة أو عندما تكون هشة سهلة التكسر حيث تثبت العينة بلصقها بعد تنظيم الشمع حولها على حامل الميكروتوم وهو على شكل متوازى المستطيلات من الخشب أو البلاستيك بحجم يناسب الماسك . تستقبل القطاعات فى طبق بترى به ماء وينتخب الصالح منها ثم يلصق على الشريحة كما هو متبع فى قطاعات الشمع وتستكمل خطوات الصبغ والحفظ المستديم .

قطع العينات النباتية المطمورة فى السللويدن

إذا كان المطلوب عمل قطاع عرضى نخرج النموذج المطلوب من السللويدن الغليظ القوام وكذلك حامل مناسب به ثقب ، ثم يوضع الفرع فى الثقب بشرط أن يبرز منه ٦ - ١٠ ملليمترات ، مع وضع قطع من عود الثقاب بين جدار الثقب والنموذج لزيادة التثبيت ثم توضع كتلة من السللويدن السميك حول الفرع على الحامل ثم توضع هذه المجموعة فى الكلورفورم لتتم عملية التصلب . أما إذا كان المطلوب عمل قطاع طولى فيوضع الفرع على كتلة غير مثقوبة ، وتحاط بالسللويدن السميك وتجرى عملية التصلب فى الكلوروفورم . إذا كانت النماذج محفوظة فى محلول حفظ (أحجام متساوية من كحول الإيثايل ٩٥ ٪ والجلسرين) تنقل إلى كحول مطلق مع تغييره مرتين على فترات من ٤ - ٨ ساعات ، هذه العملية تزيل الكمية الصغيرة من الماء التى قد توجد نتيجة الحفظ فى حالة التخزين كما أنها تقلل من درجة تصلب السللويدن ، ثم توضع النماذج فى محلول سللويدن سميك مع الحامل - بعد مرور ٢٤ ساعة تجرى عملية التثبيت كما سبق .

تتم عملية القطع بواسطة الميكروتوم المنزلق وفيه لا يتحرك النموذج وإنما السكين هى التى تتحرك - والسمك المعتاد القطع عليه هو ١٥ - ٢٠ ميكرونا ، ويجب أن تكون السكين والنموذج مبللين بكحول ٩٥ ٪ أثناء القطع وتستقبل القطاعات فى كحول ٩٥ ٪ - ويجب ضبط زاوية ميل السكين وانحرافها حتى نحصل على قطاعات غير ملتوية وغير متكسرة - ويمكن حفظ القطاعات السليمة فى محلول الجلسرين والكحول لحين صبغها .