الفصل الثالث

التثبيت

عملية التثبيت Fixation هي الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة من أجل إخضاعها للدراسة النسيجية والكيميانسيجية وتهدف إلى المحافظة على التركيب النسيجي والمحتوى الكيميائي لخلايا النسيج وتأمين سلامة الخلايا من التشوه والانكماش خلال تعرضها للمحاليل الكيميائية ودرجة الحرارة المرتفعة أثناء التخلل والطمر بالشمع. وكما تهدف عملية التثبيت إلى إيقاف عمليات التعفن والتفسخ التي تنتج عن نشاط البكتيريا والتحلل الذاتي Autolysis للنسيج بفعل بعض الإنزيمات الهاضمة التي تحتويها الأنسجة. كذلك تساعد عملية التثبيت على المحافظة على المكونات الكيميائية للنسيج وتحويلها إلى مواد غير قابلة للذوبان في جميع المحاليل والأوساط الكيميائية التي ستتعرض لها الأنسجة أثناء الفحوصات الكيميانسيجية من خلال تهيئة النسيج بحيث يصبح سهل الإنفاذ وقابلاً للتلوين بالصبغات المختلفة.

والمثبت وسط سائل يحتوي على مواد كيميائية بعضها يعمل على تثبيت المحتوي الكيميائي للخلايا وللمواد بين الخلوية عن طريق التخثر أو الترسيب وبعضها يعمل على معاكسة تأثير الوسط المذيب على خلايا النسيج من انكماش Shrinkage وانتفاخ Swelling والمحافظة على ضغطها الأسموزي. في الوقت الذي تعمل به مكونات المثبت

على تثبيت المحتوى الكيميائي للنسيج فإن بعضها قد يتسبب في تحطيم العضيات السيتوبلازمية من ميتوكوندريا، وأجسام جولجي، وحبيبات إفرازية وغير ذلك كما أن البعض يعمل على تحويل السيتوبلازم إلى وسط هلامي غير ذائب.

يتخلل المثبت أجزاء النسيج فيعمل على تثبيت كل (أو) بعض من محتوياته من المواد الكيميائية من خلال تكوين أنواع مختلفة معها من الروابط منها ما هو على شكل تصالبي أو قنطري أو غير ذلك. ومن حيث تنوع المواد الكيميائية داخل النسيج التي تشتمل على بروتينات ودهون وكربوهيدرات وحموض نووية وصبغيات وأملاح عضوية وغير عضوية فإنه من الأهمية بمكان اختيار المثبت الذي يفي بالغرض المستخدم من أجله. والمثبت الجيد هو الذي يمتاز بالصفات التالية:

١ - أن يكون سريع النفاذ خلال العينة وأن يعمل على نقل الوسط المذيب مع المواد الكيميائية الذائبة فيه إلى داخل خلايا النسيج.

٢ - أن يعمل على تحويل المادة الكيميائية المراد الكشف عنها إلى مادة غير قابلة للذوبان وأن يمنعها من الانسياب أو الانتشار من مكانها في النسيج.

٣ - أن يعمل على حماية النسيج من الانكماش والانتفاخ والتشوه أثناء عملية التثبيت، وأن يجعله قادراً على تحمل العمليات التي تلي عملية التثبيت من نزع للماء وترويق وطمر بالشمع وكذلك التلوين بالأصباغ.

٤ - أن لا يعوق عملية فحص النسيج، وأجزائه ومكوناته المختلفة، وأن يجعله قابلاً للفحص المجهري، وعملية الانعكاس البصري Optical contrast.

ويمكن إيجاز أهداف عملية التثبيت بالآتي:

(أ) إيقاف التحلل الذاتي لأنسجة العينة.

(ب) إيقاف النشاط البكتيري حالاً.

(جـ) المحافظة على التركيب النسيجي.

(د) المحافظة على المحتوى الكيميانسيجي دون إحداث زيادة أو نقصان أو تغيير في الموقع.

(هـ) المحافظة على محتوى النسيج من أنتجينات ومضادات الأجسام.

ولا بد من الإشارة إلى أن التثبيت ونوعه مرتبط بالعمليات التي ستتعرض لها الخزعة النسيجية، وبناء على ذلك فإنه يمكن تصنيف عمليات التثبيت إلى الأنواع التالية :-

١ - تثبيت لغرض المحافظة على التركيب النسيجي.

٢ - تثبيت لغرض المحافظة على المحتوى الكيميائي للأنسجة.

٣ - تثبيت لغرض تفاعلات كيميانسيجية مناعية Immunohistochemistry .

٤ - تثبيت لغرض الدراسة الدقيقة من خلال تقنية المجهر الالكتروني.

تصنيف المثبتات

يمكن تصنيف المثبتات تبعاً لميكانيكية فعاليتها إلى خمس مجموعات :

أولاً : مثبتات الألدهيدات

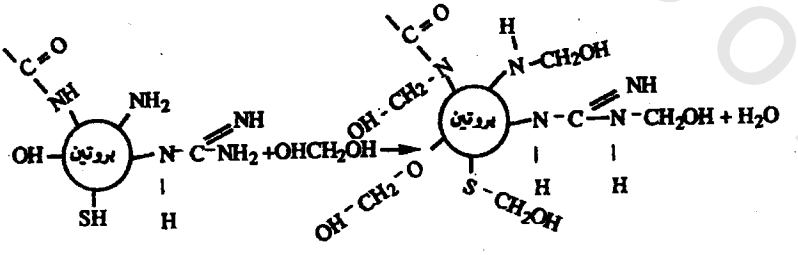
تشمل الألدهيدات Aldelydes كل من محاليل الفورمالدهيد (الفورمالين) والجلوترلدهيد Glutraldehyde والأكرولين Acrolein والجلايكسال Glyoxal . تعمل هذه المثبتات من خلال تكوين روابط قنطرية Cross-linkage مع بروتينات النسيج وبالذات مع مجموعات اللايسين. إن الروابط القنطرية الناتجة لا تؤثر على الصفات الأنتجينية في النسيج لذلك يمكن استخدام القطاعات المثبتة للتقنيات المناعية Immunoperoxidase.

١ – مثبتات الفورمالين Formalin fixatives

تعتبر مثبتات الفورمالين من أهم المثبتات المستخدمة في الدراسات النسيجية والكيميانسيجية لما تمتاز به من فعالية في تثبيت أجزاء النسيج كما أنه يمكن أن تحفظ بها العينات لمدة طويلة دون أن يلحق بها تلف كبير من انكماش وتصلب للنسيج وغير ذلك. إضافة إلى أنها من أرخص المثبتات وأكثرها شيوعاً في مختبرات التقنية النسيجية.

والفورمالين عبارة عن محلول مشبع من المثيلين المميء Methylene hydrate يتكون من إذابة غاز الفورمالدهيد Formaldehyde في الماء فيحصل على تركيز قدره ٣٧ - ٤٠٪ من الفورمالدهيد. ويتكون المثيلين المميء تبعاً للمعادلة التالية : -

يعمل الفورمالين على تثبيت بروتين الخلية من خلال تكوين روابط تصالبية بالتفاعل مع عدد من المجموعات الفعالة في جزئيات البروتينات كالمجموعات الأمينية الأولية ومجموعات الجواندين Guanidyl ومجموعة السلفوهيدرل SH والمجموعات الأميدية والهيدروكسيلية وغير ذلك كما توضحه المعادلة التالية :



كما تعمل مثبتات الفورمالين على ربط جزئيات البروتين بعضها ببعض عن طريق تكوين قناطر مثلينية Protein - CH_2- Protein وكذلك تساعد مثبتات الفورمالين على تثبيت الدهون خاصة إذ ما احتوت هذه المثبتات على أيونات الكالسيوم التي تساعد على الحد من قابلية الدهون الفوسفاتية من الذوبان في الوسط المائي. كما أنه يمكن الكشف عن معظم المواد المخاطية بعد استخدام مثبتات الفورمالين ما عدا النشا الحيواني (الجلايكوجين) الذي يذوب معظمه عند استخدام هذه المثبتات.

وبالرغم من المزايا الحسنة العديدة لمثبتات الفورمالين إلا أن لها بعض العيوب والمساوئ حيث أن بقاء النسيج بها لمدة طويلة يعمل على عدم إظهار أنوية الخلايا ومكوناتها بوضوح خاصة بالأنسجة كثيرة الخلايا التي تفتقر للمادة الخلالية ويؤدي إلى ترسيب صبغيات بنية في الوسط الحمضي لهذه المثبتات، وتعرف هذه بصبغيات الفورمالين Formalin pigments وهي عبارة عن الهيماتين الذي ينتج بسبب التحلل الحمضي للهيموجلوبين. هذا إضافة إلى أن لمثبات الفورمالين رائحة حادة منفرة قد تسبب بعض الأضرار للأشخاص الذين يتعرضون لها لمدة طويلة. وكما أن مثبتات الفورمالين تؤثر وبشكل كبير على المواقع الأنتجينية بالنسيج.

وفيما يلي بعض الأمثلة لمثبتات الفورمالين:

(أ) **مثبت الفورمالين المنظم المتعادل Neutral buffered formalin** : يفيد هذا المثبت في تثبيت معظم أعضاء الجسم فهو مثبت عام، مدة التثبيت فيه تتراوح ما بين ٢٤ إلى ٤٨ ساعة. أما تركيبه فهو كالتالي:

فورمالين مركز	١٠٠ سم^3
فوسفات الصوديوم الأحادية ، أحادي التميء	٤ جم
فوسفات الصوديوم الثنائية غير المميئة	٦,٥ جم

ماء مقطر	٩٠٠ سم٣

ويصلح هذا المثبت لتحضير قطاعات نسيجية لكل من العين، الكبد، والرئة والخصية، والعقد اللمفاوية.

(ب) مثبت فورمول - الكالسيوم Formol-calcium fixative : هذا المثبت من أفضل المثبتات المستخدمة لتثبيت الدهون خاصة الدهون الفوسفاتية. مدة التثبيت تتراوح من ٢٤ إلى ٤٨ ساعة وتركيبه كما يلي: -

كلوريد الكالسيوم (أو خلات الكالسيوم)	٧ جم
فورمالين مركز	١٠٠ سم٣
ماء مقطر	٩٠٠ سم٣

(جـ) مثبت الفورمالين الملحي Formal saline fixative : مدة التثبيت أيضاً تتراوح من ٢٤ إلى ٤٨ ساعة، وتركيب هذا المثبت كالتالي:

كلوريد الصوديوم	٩ جم
فورمالين مركز	١٠٠ سم٣
ماء مقطر	٩٠٠ سم٣

(د) مثبت فورمالين – بروميد النشادري Formalin-ammonium bromide fixative : يمتاز هذا المثبت بقدرته الفائقة على تثبيت أنسجة المخ ومدة التثبيت فيه تتراوح ما بين ٢٤ إلى ٤٨ ساعة. يتركب هذا المثبت من الآتي: -

بروميد الأمونيوم	٢٠ جم

obeikandl.com

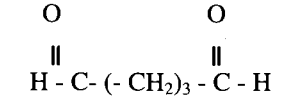
فورمالين مركز	١٥٠ سم^{٣}
ماء مقطر	٨٥٠ سم^{٣}

وتستخدم عدة محاليل لإزالة صبغيات الفورمالين المترسبة في القطاعات النسيجية منها:

- محلول الأمونيا الكحولي (١سم^{٣} أمونيا في كحول إثيلي ٧٥٪).
- محلول فروكـي Verocay المكـون مـن هيدروكسيل البوتاسيوم (١٪) في كحـول إثيلي ٨٠٪).
- محلول حمض البكريك الكحولي لبريت Barrett`s alcoholic picric acid حيث تمرر القطاعات في محلول حمض البكريك المشبع لمدة نصف ساعة ثم تغسل بالكحول المطلق لإزالة حمض البكريك.

٢ – مثبتات الجلوترلدهيد

يستخدم مركب الجلوترلدهيد Glutraldehyde بشكل شائع في تثبيت الأنسجة لدراستها بالمجهر الالكتروني كمثبتات أولية Primary fixatives. حيث أنها تعمل على المحافظة على التفاصيل الدقيقة للسيتوبلازم والنواة. يعمل الجلوترلدهيد على تثبيت بروتين الخلية من خلال نشاط مجموعة الألدهيد بنفس ميكانيكية تفاعل هذه المجموعة في الفورمالدهيد المستخدم في مثبتات الفورمالين، ولكن بسبب احتواء مركب الجلوترلدهيد على مجموعتين من الألدهيد فإن لها القدرة على تكوين روابط قنطرية Cross linkage مع بروتين النسيج أكثر استقراراً من تلك التي تتكـون مـع مجموعـة الألدهيـد في مركـب الفورمالين.



ومن مساوئ استخدام الجلوترلدهيد في تثبيت الأنسجة للدراسة الكيميانسيجية أنه عوضاً على تسببه في تصلب النسيج بحيث يصعب معه تحضير قطاعات جيدة فإن هناك احتمال لإعطاء نتائج خاطئة لبعض الفحوصات الكيميانسيجية بسبب احتمالية أن تبقى أحد مجموعات الألدهيد حرة ومن ثم تتفاعل مع كاشف شيفSchiff reagent بعد أكسدتها بحمض البيريوديك عند الكشف عن النشا الحيواني بطريقة حمض البريوديك - شيف Periodic acid - Schiff التي يرمز لها بالرمز (PAS) أو عند الكشف عن الحمض النووي الرايبوزي منقوص الأكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) بواسطة تفاعل فولجين Feuglen reaction . وكما أن مثبتات الجلوترلدهيد تعمل على تدمير رابطة آلفا التسلسلية للبروتين وبالتالي فإن القطاعات المثبتة بها لا تصلح للدراسات المناعية النسيجية وتستخدم هذه المثبتات في صورة مخففة ٢٪. وسنتطرق إلى أشهرها عند الحديث عن المثبتات المستخدمة لتثبيت عينات المجهر الإلكتروني وكذلك عند استخدامها في تثبيت الإنزيمات.

ثانياً :مثبتات الزئبق

يستخدم كلوريد الزئبقيك في بعض المحاليل المثبتة ومع أنها تتخلل الخزعة النسيجية ببطء وتسبب صلابة بالخزعة النسيجية إلا أنها ذات تأثير سريع وتحافظ بشكل ممتاز على تفاصيل الأنوية. ومن أشهر المثبتات المحتوية على كلوريد الزئبقيك كل من مثبت زنكر، ومثبت هلي، ومثبت سوسا حيث تستخدم هذه المثبتات بشكل أساسي في تثبيت الخزع الإندوثيلية الشبكية الدموية Haematopoietic and reticuloendothelial. وكما لا بد من النظر بعين الاعتبار بأن مركبات الزئبق من المواد الخطرة ويجب التعامل معها في منتهى الحذر.

تمتاز المثبتات المحتوية على كلوريـد الزئبقيك بفاعليتها الخاصة بتوضيح مكونات النواة والسيتوبلازم خاصة عنـد اسـتخدامها في تثبيـت نخـاع العظـم Bone marrow ومكونات الدم. يتفاعل كلوريد الزئبقيك مع بعض المجموعات الفعالة في البروتينات خاصة مجموعة الأمين ومجموعة السلفوهيدرل ومن ثم تكوين روابط تصالبية بين جزئيات البروتينات كما توضح المعادلات التالية :

$$2\ R - NH2 + HgCl_2 \rightarrow R\text{-}\ NH - Hg - NH - R$$
$$2\ R - SH + HgCl_2 \rightarrow R - S - Hg - S - R$$

ومن مساوئ استخدام المثبتات المحتوية على كلوريـد الزئبقيك أنها تسبب تصلب النسيج إذا استخدمت لمدة طويلة وتكون رواسب بلورية صفراء يعتقـد أنـها مكونـة بالأساس من كلوريد الزئبقوز Hg_2Cl_2 .

ومن المثبتات التي تحتوي على كلوريد الزئبقيك ما يلي :

١ – مثبت زنكر Zenker's fixative

يتكون هذا المثبت مما يلي :

كلوريد الزئبقيك	٥٠ جم
ثاني كرومات البوتاسيوم	٢٥ جم
كبرتيات الصوديوم	١٠ جم
ماء مقطر	٩٥٠ سم^3
حمض الخليك الثلجي	٥٠ سم^3

٢ – مثبت هلي Helly's fixative

يعتبر هذا المثبت تحويراً لمحلول زنكر وذلك بإضافة الفورمالين بدلاً من حمض الخليك الثلجي. ويفيد هذا المثبت في دراسة عينات نخاع العظام والطحال والغدد اللمفاوية والغدة النخامية والبنكرياس وتتراوح مدة التثبيت فيه من ٦ إلى ٢٤ ساعة.

٣ – مثبت سوسا Susa's fixative

وهذا المثبت فعال بسبب سرعة نفاذة دون أن يجعل النسيج في حالة صلبة، ومدة التثبيت فيه من ٣ إلى ٢٤ ساعة وبعد انتهاء هذه الفترة تنقل العينة إلى كحول ٧٠٪ ويحضر محلول سوسا من الآتي:

كلوريد الزئبقيك	٤٥ جم
كلوريد الصوديوم	٥ جم
حمض الخليك ثلاثي الكلور Trichloroacetic acid	٢٠ سم^3
حمض الخليك الثلجي	٤٠ سم^3
فورمالين	٢٠٠ سم^3
ماء مقطر	٧٦٠ سم^3

إزالة ترسبات الزئبق

تزال ترسبات الزئبق من القطاعات خاصة بعد استخدام مثبتات أيون الزئبق باستخدام عدد من المحاليل أشهرها محلول لوغول اليودي Lugol`s iodine solution.

يحضر هذا المحلول من المحتويات التالية:

يوديد البوتاسيوم	٢ جم
يود (بلورات)	١ جم
ماء مقطر	١٠٠ سم^3

obeikandl.com

يذاب يوديد البوتاسيوم في كمية قليلة من الماء المقطر بعدها يضاف اليود حيث يذوب مباشرة وتضاف بقية الماء المقطر ويخزن المحلول في وعاء داكن.

وتزال ترسبات الزئبق من خلال امرار القطاعات حتى الماء المقطر ثم توضع في هذا المحلول لمدة ٥ دقائق بعدها تغسل في الماء الجاري قبل أن تنقل إلى محلول ثيوكبرتيات الصوديوم (٥٪) لإزالة لون اليود.

ثالثاً : مثبتات الكحول

مثبتات الكحول سواء منها الميثيلية أو الإيثيلية تقوم بعملية التثبيت من خلال مسخ البروتين Denaturation من خلال كسر روابط الهيدروجين مما ينتج عنه صلابة وهشاشة بالنسيج لذلك لا يوصى بإستخدامها للخزعات النسيجية وإنما للمسحات الخلوية حيث لها تأثير سريع وتعمل على توضيح مكونات الأنوية وكما أنه يوصى بمثبتات الكحول لغرض تثبيت الجلايكوجين. تعمل محاليل مكونات الكحول والأسيتون على تخثير الخلايا عن طريق نزع الماء من جزيئات البروتين ومن ثم تحطيم الروابط الهيدروجينية بها. للكحول مقدرة على تثبيت النشاء الحيواني أيضاً بينما الأسيتون يثبت البروتينات ولا يثبت النشا الحيواني. وتستخدم هذه المثبتات في تثبيت المسحات الخلوية مثل مسحات بابنكولا Papanicolaou smears ، ومسحات الحيوانات المنوية، وجسم بار Barr body ، والمسحات الأخرى التي تستخدم في دراسات علم أمراض الخلايا Cytopathology .ومن مساوئ استخدام مثبتات الكحول والأسيتون أنها تعمل على ترسيب الحموض النووية وعلى استخلاص الدهون من الخلايا والأنسجة ولكنها لا تؤثر على المواد الكربوهيدراتية. وكما أنها تعمل على تصلب العينة إذا استخدمت لفترة طويلة. ويستخدم الأسيتون اللآ مائي ومحاليل الكحول في تثبيت كثير من الإنزيمات في القطاعات الثلجية بعد تحضيرها مباشرة. وكذلك تستخدم

كمثبت روتيني مرادف لمثبتات الفورمالين في تثبيت المسحات الخلوية التي تحضر من عنق الرحم أو تجويف الفم وفي تثبيت الطبع الخلوية Cytological imprints بعد استئصال بعض الأعضاء من الجسم مثل العقد اللمفاوية والكبد والطحال وغير ذلك. ومن أشهر مثبتات الكحول مثبت كارنوي.

مثبت كارنوي : Carnoy`s fixative

يحضر هذا المثبت من الآتي :

كحول مطلق	٦٠ سم^{٣}
كلوروفورم	٣٠ سم^{٣}
حمض الخليك الثلجي	١٠ سم^{٣}

ينفع هذا المثبت في تثبيت حبيبات نسل في الخلايا العصبية ومدة التثبيت ما بين ٢ إلى ٦ ساعات تغسل بعدها العينة في كحول مطلق.

رابعاً : مثبتات المركبات المؤكسدة

تعمل مثبتات المركبات المؤكسدة Oxidizing agent على تكوين روابط قنطرية مع جزئيات البروتين للنسيج لكنها بنفس الوقت تنزع طبيعة البروتين. وأهم المركبات المؤكسدة المستخدمة في المحاليل المثبتة كل من مركبات البيرمنغنات وثنائي الكرومات ورابع أكسيد الأوزميوم. وتستخدم مثبتات المركبات المؤكسدة على نطاق ضيق في مختبرات الأنسجة المرضية.

(أ) مثبتات الكروم Chromium fixatives

يذوب ثالث أكسيد الكروم CrO_3 في الماء ليكون حمض ثنائي الكروميك Dichromic acid المتأين تبعاً للمعادلة التالية :

$$2\,CrO_3 + H_2O \rightarrow H_2Cr_2O_7 \rightleftharpoons 2H^+ + Cr_2O_7^{--}$$

ويعتقد أن ميكانيكية التثبيت بواسطة أملاح الكروم تتم من خلال تكوين روابط تناسقية Co-ordinate linkage مع ذرات الأكسجين والنيتروجين الموجودة في المجموعات الهيدروكسيلية، والكربوكسيلية ، والأمينية لجزيئات النسيج كما تتفاعل أيونات الكروم مع الدهون الفوسفاتية فتحولها إلى مواد غير قابلة للذوبان في المحاليل غير المستقطبة Non-polar solvents لذلك تستخدم أملاح الكروم خاصة ثاني كرومات البوتاسيوم $K_2Cr_2O_7$ في المحاليل التي تعمل على تثبيت البروتينات والدهون الفوسفاتية ولكنها تعمل على تحلل الحموض النووية خاصة الحمض النووي الرايبوزي منقوص الأكسجين. ومن أشهر المثبتات المحتوية على أيونات الكروم والمستخدمة في تثبيت الأنسجة الحيوانية كل من مثبت زنكر، ومثبت هلي التي تمت الإشارة إليهما سابقاً، وكذلك مثبت أورث.

مثبت أورث : Orth`s fixative

يحضر هذا المثبت من الآتي :

ثنائي كرومات البوتاسيوم ..... ٢,٥ جم

كبريتات الصوديوم . ..... ١ جم

ماء مقطر . ..... ١٠٠ جم^3

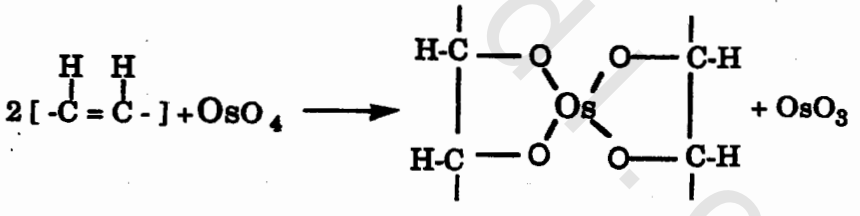
يجب أن يحضر هذا المثبت مباشرة قبل الاستخدام ومدة التثبيت ما بين ٢٤ إلى ٢٨ ساعة.

تجدر الإشارة إلى أنه يجب غسل العينة بعد تثبيتها بأحد المثبتات المحتوية على أيونات الكروم بشكل جيد ولمدة ٢ - ٤ ساعات قبل أن يتم نقلها إلى الكحول الإثيلي

لإكمال عملية نزع الماء وذلك لأن أيونات الكروم تتفاعل مع الكحول الإثيلي مكونة راسباً أخضر في النسيج وهو عبارة عن هيدروكسيل الكروم $Cr(OH)_3$.

(ب) مثبتات الأوزميوم Osmium fixatives

تستخدم المثبتات المحتوية على رابع أكسيد الأوزميوم OsO_4 Osmium tetroxide كمثبت ثانوي Secondary fixative في تثبيت الأنسجة المراد دراسة تركيبها الدقيق بعد تثبيتها أولياً بمثبت الجلوترلدهيد المذاب في أحد المحاليل المنظمة. ولا تستخدم هذه المثبتات لتثبيت البروتينات أو الكربوهيدرات حيث أنها تعمل على تحطيمها ولكنها تعمل على تثبيت الدهون غير المشبعة بسبب قدرتها على تكوين روابط تصالبية مع الروابط غير المشبعة بالدهون كما توضحه المعادلة التالية :



ومن مساوئ استخدام مثبتات رابع أكسيد الأوزميوم أنه لا ينفذ خلال النسيج لأكثر من مليمتر واحد وبذلك فهو لا يصلح إلا لتثبيت القوالب النسيجية المتناهية في الصغر، أضف إلى ذلك غلاء ثمنه وخطورة استخدامه حيث أن له القدرة على تثبيت طلائية القرنية والجلد والجهاز التنفسي، لذا يجب التعامل معه في غاية الحذر وأن يتم تحضير هذه المثبتات تحت غرف شفط للهواء وأن تحفظ مخلفاتها في أوعية خاصة مغلقة وأن تتخذ إجراءات سلامة دقيقة للتخلص منها وعدم التعرض بأية حال من الأحوال

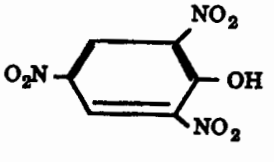
إلى أبخرة رابع أكسيد الأوزميوم. وتجدر الإشارة إلى أن رابع أكسيد الأوزميوم من أفضل المثبتات المستخدمة لدراسة خلايا أنسجة اللافقاريات.

خامساً: مثبتات حمض المر (حمض البكريك)

تحتوي مثبتات البكرات Picrates على حمض البكريك المعروف بحمض المر ولا تعرف بالضبط ميكانيكية تفاعل حمض المر في إنجاز التثبيت ولكنها تمتاز بالمحافظة على إظهار محتويات الأنوية بشكل واضح للغاية .

حمض البكريك (حمض المر Picric acid) عبارة عن ثلاثي نيتريت الفينول . ويعتقد أن لهذا الحمض القدرة على تثبيت بروتينات الخلية من خلال تخثيرها بسبب تكوين أملاح ما بين مجموعات النيتريت في هذا الحمض والمجموعات القاعدية في جزئيات البروتين. ومن أشهر المثبتات المحتوية على حمض المر كل من مثبت بوين ، ومثبت جندر ، ومثبت روسمان والفرق بين كل من مثبت بوين وجندر أن محلول جندر عبارة عن وسط كحولي بينما محلول بوين يحتوي على وسط مائي. ويستخدم كل من مثبت جندر (بوين الكحولي) ومثبت روسمان لتثبيت النشا الحيواني لأنه سريع الذوبان في الوسط المائي.

(التركيب البنائي لحمض المر)



وتجدر الإشارة إلى أن المثبتات المحتوية على حمض المر لا يمكن استخدامها لتثبيت الحموض النووية لأنها كما ذكرنا سابقاً تعمل على تحللها وعلى انكماش خلايا النسيج لذا يضاف لهذه المثبات حمض الخليك الثلجي ليعاكس انكماش الخلايا.

وحمض المر مادة صفراء صلبة وخطرة قابلة للانفجارعند جفافها، لذا فإنه يجب حفظها دائماً تحت الماء بحيث يعلو الماء حمض المر على الأقل بـ ٢ سم. وكما أن حمض المر يصبغ أي شي يصل إليه بلون أصفر. وفيما يلي بعض مثبتات حمض المر الشائعة والمستخدمة في كيمياء الأنسجة:

مثبت روسمان Rossman's fixative

كحول إثيلي مطلق (مشبع بحمض المر)	٩٠ سم٣
فورمالين مركز	١٠ سم٣

مدة التثبيت : ١٢ إلى ٢٤ ساعة بعدها تغسل العينة عدة ساعات في كحول إثيلي (٩٥٪)

مثبت جندر Gendre's fixative

كحول إثيلي ٩٠٪ (مشبع بحمض المر)	٨٠ سم٣
فورمالين مركز	١٥ سم٣
حمض الخليك الثلجي	٥ سم٣

مدة التثبيت : ٤ إلى ٦ ساعات

مثبت بوين Bouin's fixative

محلول مائي مشبع بحمض المر	٧٥ سم٣
فورمالين مركز	٢٥ سم٣
حمض الخليك الثلجي	٥ سم٣

مدة التثبيت : ٥ إلى ١٨ ساعة بعدها تنقل العينة إلى ٧٠٪ كحول.

هذا ويساعد مثبت بوين على الحفاظ على تفاصيل تركيب النواة خاصة في دراسة التركيب النسيجي للخصية لمعرفة حالات غياب الحيوانات المنوية Azoospermia ولحالة إنتاج عدد قليل من الحيوانات المنوية (أوليغوسبيرميا) Oligozoospermia .

obeikandl.com

ولإزالة اللون الأصفر الذي اكتسبه النسيج بسبب حمض المر فإنه يتم إمـرار العينـة بعد تثبيتها على كحول (٧٠٪) مضافاً إليه قطرات من محلول كربونات الليثيوم (٠,٢٥٪) أو تنقل العينة إلى كحول (٥٠٪) لمدة ٤ إلى ٦ ساعات مع الحرص على تغيير الكحـول كلما تغير لونه حتى يتم تخليص النسيج من اللون الأصفر الناتج من ترسب حمض المر.

ويتم التثبيت بأساليب مختلفـة عـن طريـق الغمـر Immersion أو الحقـن Injection أو النثر Perfusion بالمثبتات السائلة إضافـة إلى التثبيـت بـالأبخرة حيـث تتعـرض العينـة لأبخـرة المثبت خاصة عند دراسة المسحات الخلوية مثل استخدام أبخرة الفورمالدهيد ورابع أكسيد الأوزميوم.

التثبيت باستخدام أجهزة الأمواج الدقيقة

تستخدم أجهزة الأمواج الدقيقـة في تثبيـت الخـزع النسيجية لغـرض توفـير عـامل الزمـن إضافـة إلى أن هـذه الوسـيلة تسـاعد في المحافظـة علـى الـتراكيب الدقيقـة للخلايـا والأنسجة والتي تتأثر بالمثبتات الكيميائية وكذلك لغرض الدراسـات الكيميامناعيـة. ويتـم التثبيت باستخدام أجهزة الأمواج الدقيقة ضمن الظروف التالية :

١ - يتم التثبيت خلال فترة قصيرة ما بين ثواني وحتى عدة دقائق.

٢ - يتم التثبيت عند درجة حرارة ما بين ٤٥ إلى٥٥م.

٣ - يتم التثبيت من خلال غمس العينة في المحلول الفسيولوجي أو أحد المثبتـات الكيميائية.

٤ - يفضل استخدام أوعية لا يزيد قطرها عن ٣,٥سم وارتفاعها عن ١سم.

العوامل المؤثرة على التثبيت

١ - المثبت المستخدم

تتم عملية التثبيت على الوجه الصحيح في ظرف الرقم الهيدروجيني المتعادل لمحلول التثبيت ما بين ٦ إلى ٨ حيث أن ذلك من شأنه منع حيود الرقم الهيدروجيني للمثبت نحو الحموضة. إن حموضة محلول التثبيت تساعد على ترسيب صبغيات الفورمالين الهيمية وهي بنية اللون في الأنسجة. ومن المواد المستخدمة في تنظيم محاليل التثبيت كل من الفوسفات، وثاني الكربونات، والفورنال والكاكودوليت.

٢ - قوة التخلل

تختلف قوة التخلل Penetration لمحلول التثبيت للخزعة النسيجية من مثبت لآخر، فمثبتات الفورمالين والكحول أفضل المثبتات من حيث التخلل بينما مثبات الجلوترلدهيد أسؤها أما مثبتات الزئبق فذات مقدرة وسطية ، وربما أفضل وسيلة لتجاوز هذه العقبة هو استخدام خزعات نسيجية قليلة السمك لا يزيد سمكها عن ٣ ملم.

وتعتمد قوة التخلل إلى حد ما على تركيز المثبت وكذلك على سرعته في اختراق أنسجة العينة.

٣ - حجم المثبت

لحجم المثبت أهمية كبيرة ويجب أن لا تقل نسبة حجم المثبت إلى حجم الخزعة النسيجية عن ١٥ إلى ٢٠ ضعف، وربما كان أفضل وسيلة لإنجاز عملية التثبيت هو تغيير المثبت المستخدم بين فترة وأخرى وربما تحريك العينة أو رجها بالمثبت يساعد في ذلك أيضا. وكما هو معروف فإن حوالي ٨٥ إلى ٩٠٪ من وزن الخزعة النسيجية عبارة عن سائل، لذلك فإنه عند وضعها في مثبت من نفس حجمها فإن هذا من شأنها

تخفيف تركيز المثبت إلى حوالي النصف ومن ثم إضعاف عملية التثبيت. وبكل الأحوال يجب أن توضع العينة والمثبت في وعاء كبير لا يقل حجمه عن ٥٠ ضعف حجم العينة مع رج العينة ومنع التصاق أحد أطراف العينة بسطح الوعاء لذا يفضل وضع المثبت اولاً وقبل العينة ومن ثم رجها.

٤ – درجة الحرارة

تعمل درجة الحرارة المرتفعة على تسريع عملية التثبيت بشرط أن لا تؤدي إلى طبخ الخزعة النسيجية. يجب أن يتم التثبيت ضمن درجة الحرارة المثلى التي تحقق الهدف من عملية التثبيت. وبالنسبة للخزع النسيجية المراد تثبيتها لغرض الدراسة النسيجية فإن درجة الحرارة المثلى هي ٢٥م بينما درجة الحرارة المثلى للخزع النسيجية التي يتم تثبيتها لغرض الدراسة الدقيقة بواسطة المجهر الالكتروني هي ٣-٤م.

٥ – تركيز المثبت

تعمل زيادة تركيز المادة الفعالة في المثبت على إحداث عيوب تقنية Artefacts لذا يجب أن لا يزيد المثبت عن نسبته المعروفة فالفورمالين لا يزيد عن ١٠٪ والجلوترلدهيد ما بين ٢ إلى ٢,٥٪.

٦ – سرعة نقل العينة من الجسم إلى المثبت

يجب نقل الخزعة النسيجية إلى المثبت مباشرة بعد نزعها من الجسم. إن بقاء العينة فترة طويلة بعد نزعها من الجسم يعرضها إلى الجفاف ومن ثم تدمير التركيب النسيجي وعضيات السيتوبلازم وانكماش في النواة. ويمكن غمر العينة لفترة قصيرة بالمحلول الفسيولوجي لفترة قصيرة قبل نقلها إلى المثبت لمنع جفافها.

وكما لا بد من الإشارة إلى تأثير الأدوات المستخدمة في نزع العينة من الجسم وطريقة استخدامها مثل الملاقط الحادة التي تعمل على سحق وتمزيق العينة خاصة إذا كانت صغيرة أو في حالة استخدام سكاكين كهربائية ساخنة وهذا من شأنه حرق جزء من العينة أو وضع العينة على سطح جاف قبل نقلها إلى محلول التثبيت.

وفي كل الأحوال فإنه يجب أن لا يغيب عن البال أنه لا يمكن استخدام محاليل أخرى غير المثبتات لنقل العينة إلى المعمل مثل استخدام المحلول الفسيولوجي أو الماء أو المحاليل المنظمة لأن هذا من شأنه السماح بعملية التحلل الذاتي Autolysis للنسيج وتكوين عيوب انكماش أو انتفاخ لمكونات النسيج التي ستظهر في القطاعات النسيجية التي يعتمد عليها في التشخيص.

٧ – زمن التثبيت

يجب إبقاء الخزعة النسيجية الوقت الكافي لإنجاز عملية التثبيت بالكامل وهذا يعتمد على عدة عوامل منها نوع المثبت المستخدم وكذلك حجم العينة. فمثلاً مثبت الفورمالين المنظم المعاير شائع الاستخدام يتخلل العينة بمعدل ٠,٥ ملم بالساعة بينما المثبتات الحمضية أو القاعدية فإنها تتخلل العينة بشكل أسرع. لذلك فإن مثبتات الفورمالين يلزمها ٢٤ ساعة على الأقل لإنجاز عملية التثبيت بشكل تام مع أن بعض المختبرات توصي ببقاء العينة حتى ٤٠ ساعة في مثبت الفورمالين المنظم المعاير للحصول على أفضل النتائج، وإذا كان عامل الزمن لا يسمح فإنه يفضل استخدام مثبات الفورمالين الكحولية أو مثبت الفورمالين الخارصيني Zinc formalin أو مثبت الفورمالين الخارصيني الكحولي Alcoholic zinc formalin.

وتجدر الإشارة إلى أن العديد من المختبرات ولغرض اختصار عامل الزمن تستخدم أجهزة الأمواج الدقيقة Microwave حيث يمكن إنجاز عملية التثبيت خلال دقائق. وكما أنه لا بد من الإشارة إلى أن سمك العينة هو العامل الأهم لإنجاز عملية التثبيت بأفضل صورها وأنه في حالة تجاوز سمك العينة عن ٤ ملم فإنه لا يمكن إتمام التثبيت دون بعض الخسارة بغض النظر عن زمن التثبيت. وكما يجب أن لا يغيب عن البال أن أي من هذه العوامل سيلحق الضرر بعضيات الخلايا والتراكيب النسيجية.

٨ - أزمولية محلول التثبيت

تؤثر أزمولية Osmolality المثبت بشكل كبير على تركيب الأنسجة حيث أن المثبتات مرتفعة الضغط الأسموزي Hypertonic تسبب إنكماش الخلايا بينما تسبب المثبتات متعادلة الضغط الأسموزي Isotonic انتفاخ الخلايا بعض الشيء ولكن أقل مما تحدثه المثبتات منخفضة الضغط الأسموزي Hypotonic. وقد أثبتت التجارب أنه يمكن الحصول على أفضل النتائج للتثبيت من خلال استخدام مثبتات يكون ضغطها الأسموزي مرتفع بعض الشيء ويتراوح ما بين ٤٠٠ إلى ٤٥٠ mosm مع العلم أن الضغط الأسموزي للمحلول المتعادل هو ٣٤٠ mosm .

يمكن إجمال استخدام أهم المثبتات شائعة الاستخدام بالجدول رقم (١):

جدول (١) . بعض المثبتات الشائعة وإستخداماتها

المثبت	استخدامه
الفورمالين المنظم المتعادل (١٠٪)	المثبت الروتيني في مختبرات الأنسجة المرضية والطب الشرعي.
مثبت زنكر	يوصي به للأنسجة الشبكية الإندوثيلية Reticulo endothelial tissues والعقد اللمفاوية والطحال، والغدة الزعترية (الثايمس) ونخاع العظم.

تابع جدول (١) .

المثبت	استخدامه
مثبت بوين	يوصي به لتثبيت الخصية ، القناة الهضمية والغدد الصماء.
مثبت الجلوترلدهيد	تثبيت عينات المجهر الإلكتروني
مثبت الفورمالين الخارصيني (يتكون من فورمالين ١٠٪ يحتوي على ١٪ كبرتيات الخارصين سباعية التميوء)	من أفضل المثبتات التي تحافظ على مضادات الأجسام بالأنسجة لذا ينصح بهذا المثبت في الدراسات المناعية.
الكحول الإثيلي	تثبيت المسحات الخلوية وكذلك في تثبيت القطاعات الثلجية
مثبت هلي	تثبيت عينات نخاع العظم والطحال والعقد اللمفاوية والغدة النخامية والبنكرياس.
مثبت روسمان	تثبيت الجلايكوجين
مثبت جندر	تثبيت الجلايكوجين
مثبت كارنوي	تثبيت الأنسجة العصبية وتثبيت الجلايكوجين.
مثبت الفتمان	تثبيت الدهون
مثبت رابع اكسيد الأوزميوم	تثبيت الدهون خاصة غير المشبعة
مثبت التمان	تثبيت البروتينات
الكحول الإثيلي	تثبيت الإنزيمات

ويوضح كل من الجدول رقم (٢) والجدول رقم (٣) عيوب المثبتات شائعة الاستخدام وأشهر المثبات المستخدمة في الكشف عن المحتوى الكيميائي على التوالي:

جدول رقم (٢). عيوب بعض المثبتات شائعة الاستخدام.

المثبت	العيوب
مثبتات الفورمالين	له رائحة نفاذة للغاية لذا يجب التعامل معه بحذر شديد. وكما أنه يسبب حساسية للعديد من العاملين في المختبرات التي تستخدم مادة الفورمالين.

تابع – جدول رقم (٢).

المثبت	العيوب
مثبت زنكر	١ - ينتج عـن إسـتخدامه ترسـبات زئبـق سـوداء في النسـيج لـذا وجـب معالجـة ذلـك بمـا يعـرف Dezenkerization لإزالة هذه الترسياب. ٢ - يسبب صلابة للخزع النسيجية المثبتة. ٣ - خطورة الزئبق صحياً.
مثبتات الكحول	١ - تسبب انكمـاش للخزعـة النسـيجية خاصـة إذا زادت مدة التثبيت. ٢ - تـؤدي إلى سـهولة تكسـر العينـة بسـبب صلابتـها وفقدانها للمرونة.
مثبت الجلوترلدهيد	تدمر طبيعة بروتـين النسـيج لـذا لا يمكـن اسـتخدام القطاعـات في الدراسـات المناعية. كمـا قـد تتسـبب في نتـائج سـلبية أو إيجابيـة خاطئـة لبعـض التفـاعلات الكيميانسيجية.
مثبتات حمض البكريك	يصبغ كل ما يقع عليه بلون أصفر

جدول رقم (٣). المثبتات المستخدمة في الكشف عن المحتوي الكيميائي للأنسـجة في مختـبرات التقنيـة النسيجية الخلوية

المحتوى الكيميائي	المثبتات المستخدمة
النشاء الحيواني	مثبت جندر (بوين الكحولي)
	مثبت روسمان
	مثبت كارنوي
المواد المخاطية	مثبت ليلي Lillie`s fixative
	مثبت تحت خلات الإيثانول الخلي Ethanol acetic subacetate
	مثبت نيوكومر المعدل Modified new Comer's fixative

تابع – جدول رقم (٣).

المحتوى الكيميائي	المثبتات المستخدمة
المواد الدهنية	مثبت الفتمان Elftman's fixative
	مثبت فورمول الكالسيوم
	مثبت أورث
	مثبت فلمنج Flemming's fixative
	مثبت شامبي Champy's fixative
	مثبت لويسكي - بيكر Lewitsky -Baker's fixative
المواد البروتينية	مثبت الفورمالين المنظم المتعادل
	مثبتات الجلوترلدهيد
	مثبت التمان Altman's fixative
	مثبت سوسا
	مثبت كارنوي
	مثبت زنكر
الحموض النووية	مثبت ليلي ، مثبت كارنوي
عينات المجهر الالكتروني	١ - محلول جلوترلدهيد ١,٥ - ٢٪ في منظم الفوسفات.
	٢ - رابع أكسيد الأوزميوم ١-٢٪ في منظم الفوسفات أو الكاكودوليت.
	٣- مثبت كارنوفسكي Karnovsky's fixative
	٤ - خليط الجلوترلدهيد والأوزميوم (١,٢٥ - ٢٪) بنسبة (١ : ١).

obeikandl.com