

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 سكين ثابتة حادة. أما العينات المظمورة 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

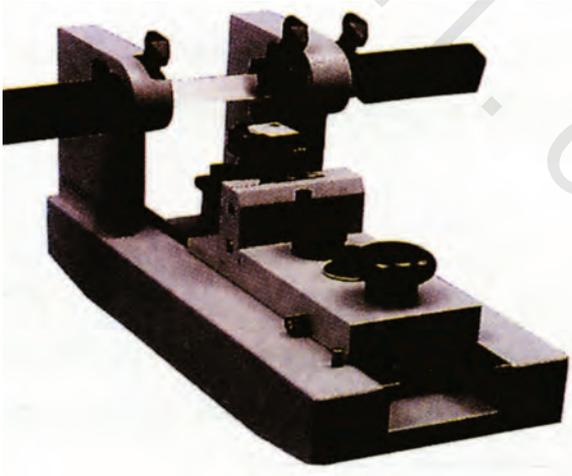
التي تحضر عادة عند سمك ٤ - ٥ ميكرومتر (الشكل رقم ٤٣).



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

الميكروتوم المنزلق

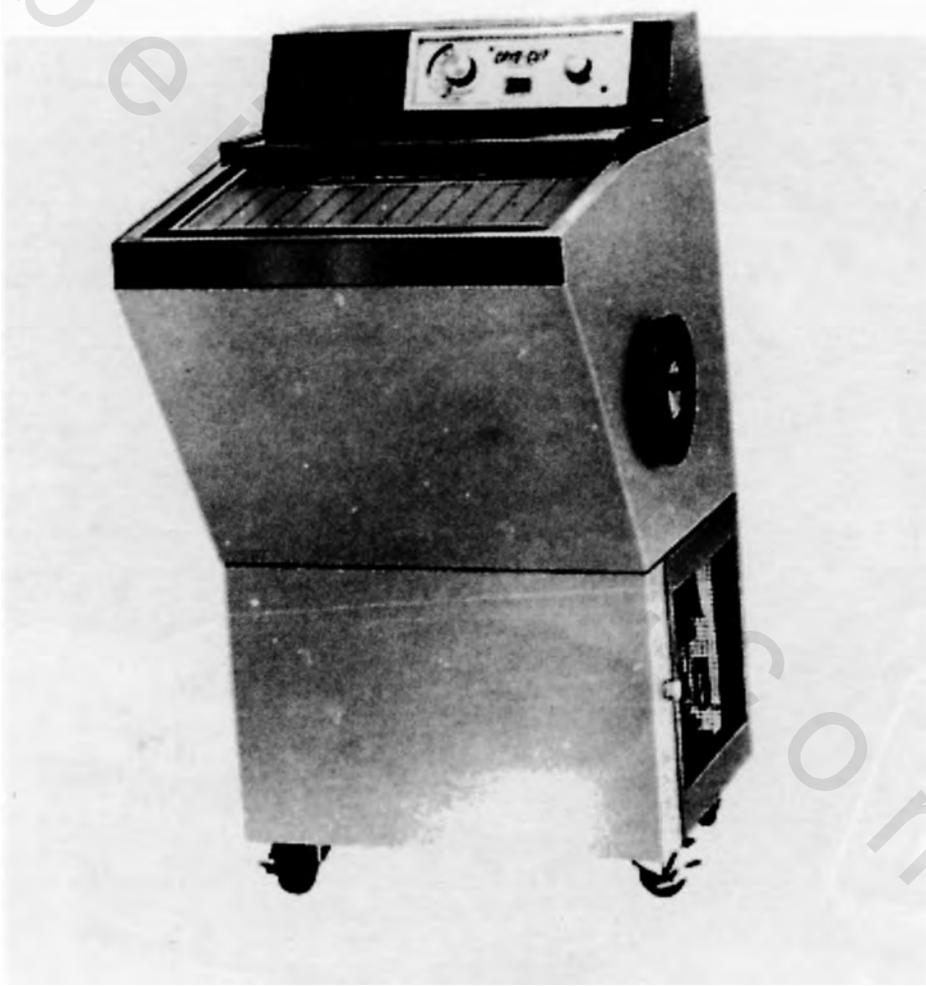
يستخدم الميكروتوم المنزلق Sliding microtome لتحضير مقاطع سلوئيدية وعادة تحضر عند سمك ١٠ - ١٥ ميكرومتر (الشكل رقم ٤٤).



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 الثبيت (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 .

يتكون الميكروتوم من أجزاء أساسية عبارة عن حامل ل قالب الخزعة النسيجية ، حامل السكين ، عجلة ذات مقبض تتحرك حركة دائرية توضع معها حامل القالب في الأمام ، إضافة إلى قرص تنظيم سمك القطاعات المراد تحضيرها ، ولا يمكن تحضير قطاعات نسيجية بواسطة الميكروتوم دون توفير سكينه خاصة لتقوم بقطع الخزعة المطمورة بالشمع البرافيني أو السلوئيدين. وقد تكون السكينه مقعرة الوجهين أو ذات وجه مقعر واحد. ولتحضير قطاعات برافينية تستخدم سكينه مقعرة الوجهين بينما تستخدم سكينه مقعرة الوجه لتحضير قطاعات سلوئيدية. هذا وإنه يجب سن السكينه باستمرار والحفاظ على حافتها ناعمة حادة خالية من التواءات. ويتم سن Stropping سكينه الميكروتوم باستخدام جهاز سن السكاكين Knife Sharpener (الشكل رقم ٤٧).



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

تثبيت القطاعات البرافينية على شرائح زجاجية

بعد عمل القطاعات بواسطة جهاز الميكروتوم فإنه يتم نقلها وتعويمها في حمام مائي دافئ لإزالة التجمعات 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 السلوثيدين Cellodin Solution Adhesive

المحلول الرئيسي

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

المحلول العملي

يحضر من المحتويات التالية:

محلول السلوثيدين 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 السلوثيدين اللاصق في لصق القطاعات تبعاً للخطوات

التالية:

- (أ) تمرر القطاعات حتى الكحول المطلق.
 (ب) يتم ترك القطاعات في محلول السلوئيدين العملي عشرين غمسة.
 (ج) 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 ١٠٠٠ سم ^٣
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 لمير 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 ٥٠ سم^٣ من ماء مقطر سبق غليه لطرد الهواء منه حتى لا يتسبب في تكون فقاعات بين القطاعات وسط الشريحة (الجدول رقم ٤).

٤ - لاصق هويت Haupt's Adhesive

يحضر هذا اللاصق من الآتي :

جيلاتين	١ جم
جليسرين	١٥ سم ^٣
ماء مقطر	١٠٠ سم ^٣
ثايمول	٠,٢ جم

يذاب الجيلاتين في الماء المقطر الدافئ ثم يضاف الثايمول والجليسرين ويرشح بعد ذلك. وعند الاستخدام يخلط ١ سم^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 الحيلة 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 الكيميائي. ويتم تثبيت القطاعات Mounting على الشرائح الزجاجية.



الشكل رقم (٤٨). صورة ضوئية لسخان الشرائح.



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

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

المسببات	المشكلة
سكينة القطع غير مثبتة بالكامل أو القالب غير مثبت تماما على حامله	القطاعات غير متجانسة
وجود خدش في حافة سكينة القطع أو وجود أوساخ أو أجزاء صلبه في الشمع أو الخزعة النسيجية.	انشطار الشريط الشمعي
قالب الشمع غير منتظم الأضلاع أو الأضلاع المتقابلة غير متوازية. عدة أسباب منها:	شريط شمعي غير مستقيم
١- تم تبريد الشمع المنصهر ببطء أثناء صب القالب الشمعي.	تجمد القطاعات
٢ - زاوية إحناء السكينة كبيرة والزاوية هنا هي الحاصلة بين محور السكينة الطولي وبين الخط الوهمي الذي يمر بموازية 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 إحناء السكينة منخفضة وتحتاج إلى ضبط وكذلك إذا كانت حرارة الغرفة مرتفعة أو الشمع المستخدم لين. عدة أسباب :	تمزق القطاعات
١ - وجود نتوءات بحافة السكين.	
٢- الشمع المستخدم غير نقي .	
- حافتا القالب الشمعي ليستا متوازيتين.	عدم القدرة بالحصول على شريط شمعي
- السكين مائل أكثر من الحاجة.	
- حافة السكين غير نظيفة.	
- القطاعات سميكة.	

تابع الجدول رقم (٤) .

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

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 غالباً تحضر إلى المعمل غير مثبتة. وعندها يجب إزالة الجلد والعصل 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 $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ مما يجعل من الصعوبة إعداد القطاعات، وقد يلحق ضرراً بسكينة الميكروتوم المستخدمة في تحضير القطاعات، ولتحضير القطاعات العظم من الأنسجة المحتوية على ترسبات كلسية لا بد من معالجتها بمحاليل معينة تعمل على نزع الكلس فتجعل النسيج مرناً 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 نزعها 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 والطر. ويكون الطمر هنا إما بشمع البرافين أو السلوثيدين 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 المعايير حيث يتم التثبيت على مرحلتين ففي المرحلة الأولى يتم تثبيت أولي لمدة ٤٨ ساعة في مثبت الفورمالين المنظم المعايير ثم يتبع ذلك المرحلة الثانية من التثبيت بعد نزع الكلس في محلول الفورمالين - كلوريد الزئبقيك الذي يتكون من الآتي :

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

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.
- وهناك 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 - براقورمالدهيد ٤٪ لمدة ٧ ساعات. ويفضل استخدام هذا المحلول في تثبيت عينات العظم المراد تحضير قطاعات منها لغرض الدراسة الإنزيمية أو الفحوصات الكيميائية النسيجية 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.

ويكل 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 المخلائية.
- ٣ - نزع الكلس بواسطة التبادل الأيوني للراتنجات.
- ٤ - نزع الكلس إلكتروليتيًا.
- ٥ - استخدام الأمواج الدقيقة Ultrasonic.

أولاً: محاليل نزع الكلس الحمضية Acid decalcifier

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 :

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

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 - ٢٥ سم ^٣
فورمالين مركز	١٠ سم ^٣
ماء مقطر أكمل حتى	١٠٠ سم ^٣

(ج) محلول ليلي fluid :

حمض المر (١.٥٪) محلول مائي	٨٥ سم ^٣
فورمالين مركز	١٠ سم ^٣
حمض الفورميك ٩٠٪	٥ سم ^٣

يضببط 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 النيتريك Nitric acid fluid :

حمض النيتريك المركز ٧٠٪	٧.٥ سم ^٣
ماء مقطر	٩٢.٥ سم ^٣

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

فورمالين مركز	١٠ سم ^٣
---------------	--------------------

ماء مقطر	٨٠ سم ^٣
حمض النيتريك مركز ٧٠٪	١٠ سم ^٣

(ج) محلول بريني fluid

حمض النيتريك ١٠٪	٤٠ سم ^٣
كحول إثيلي مطلق	٢٠ سم ^٣
حمض الكروميك ٠,٥٪	٢٠ سم ^٣

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 المخلاية

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

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 سم^٣ 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 ولي Hillemann and Lee ويتكون من

الآتي:

ثنائي صوديوم ملح EDTA . ٥.٥ جم

ماء مقطر ٩٠ سم^٣

فورمالين مركز ١٠ سم^٣

٣ - محلول شميد Schimide's solution

فورمالين مركز ١٠٠ سم^٣

خلات الصوديوم ١ جم

فرسنت ثنائي الصوديوم EDTA-disodium versenate ١٠ سم^٣

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 المخلاية يحافظ على نشاط بعض الإنزيمات كما يخلق ضرراً أقل من المحاليل المحتوية على الحموض.

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

وكما أنه لا بد من الإشارة إلى أنه بالوقت الحاضر أصبح ممكناً 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 المشروط 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^٢ 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^٢ 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 التصاعدي 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 - عائمة 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 تبديلين من كحول إثيلي (٨٠٪) لمدة ١٢ ساعة لكل تبديل.

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

٤ - تنقل العينة إلى ٤ تبديلين 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 ٢٥ م.

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 المزدوج

يستخدم الطمر المزدوج من أجل الاستفادة من ميزات كل من الشمع البرافيني والسلوئيديين 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 تبدلين آخرين من شمع البرافين المنصهر بحيث يتم تفرغ 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 الأيثيلي 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 - ٦٠م) المستخدمة في حالة القطاعات البرافينية ، وهذا من شأنه أن يقلص القطاعات النسيجية بنسبة بسيطة 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 الميثيل Methyl methacrylate عند حرارة ٤٠°م وتحت التفريغ من خلال إستخدام خليط بنسب وزنية على النحو التالي :

ميثاكريلات الميثيل 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 لظمر العينة وعمل قالب ولمدة نصف ساعة بعدها يوقف التفريغ ويغمر القالب في ماء عند حرارة ٣٠ م 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 الإمكانيات فإنها أسرع من التحضير اليدوي حيث يمكن السحق من سمك ١٥٠ ميكرومتر إلى سمك ٦٠ ميكرومتر خلال دقائق.



الشكل رقم (٥٠). صورة ضوئية لقطع نسيجي بعد نزع الكلس. صبغة الهيماتوكسيلين 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 تصاعديّة خلال فترات طويلة ثم تخللها بالشمع المنصهر لفترات طويلة أيضاً. 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 - نزع 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 التصاعديّة (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 - يصب 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 - تظمر العينة في محلول سلوئيدين ١٠٪ في صندوق ورقي داخل وعاء Bell-jar لتقليل التبخر مع مليء الصندوق لتعويض الجزء المتبخر من وقت لآخر ويقى في الصندوق لمدة ٣ أيام. وكما يجب أن يحتوي وعاء التجفيف على كلوروفورم ليعمل على تصليب السلوئيدين عن طريق البلورة.
- ١١ - يتم حفظ القالب في كحول إثيلي ٧٠٪ لمدة ٢٤ ساعة على الأقل قبل أن يبدأ بتحضير القطاعات.

تحضير القطاعات الثلجية

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 البرافينية دائما للكشف عن تفاعل الأجسام المضادة مع الأنتيجينات 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 والكيميائسي 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 لا بد 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 الطاهرة 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 الأمونيوم عند 4م في معظم الحالات ولمدة قد تصل إلى 18 ساعة. وبعد انتهاء عملية التثبيت فإنه يلزم غسل العينة بالماء الجاري جيدا وتوضع في محلول سكرور 30٪ المحتوي على 1٪ 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 أنظمتها 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 لأن 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 ٤٠ م تحت الصفر. وتختلف درجة الحرارة تبعاً لنوع النسيج فمثلاً يفضل تحضير القطاعات الثلجية من عينات غير مثبتة لكل من الطحال والكلية والخصية والكبد والدماغ والعقد اللمفاوية عند حرارة ١٥ م تحت الصفر بينما عينات الأنسجة العضلية والجلد والغدد عموماً وكذلك عينات العظم الهش عند حرارة ٢٥ م تحت الصفر. كما أن المحتوى المائي للعينة يحدد درجة الحرارة المثلى للتقطيع فمثلاً العينة التي تحتوي على كمية كبيرة من الماء يفضل تقطيعها عند درجة حرارة ١٢ - ١٥ م تحت الصفر. وكذلك كلما زاد المحتوى الدهني للنسيج تطلب ذلك درجة حرارة أكثر برودة. وعموماً فإنه يصعب تحضير قطاعات ثلجية أقل سمكاً 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^٣ مذابة في ٧٠سم^٣ 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 يشد 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 الحضان. 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 كبيراً في تحضير القطاعات حيث تحضير القطاعات 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.
١٥ م حتى - ٣٠ م	الجلد غير الدهني، اللسان، العضلات، الغدد اللبنية، الأمعاء البكرياس، البروستاتا، عنق الرحم، الرحم، البيض
- ٣٠ م حتى - ٦٠ م	جلد دهني، نسيج دهني، غدد لبنية دهنية