٣ . التجفيف (طرد الماء)

Dehydration

يجب بعد عمـلية الغسيل إزالة كل أثر للـماء وهو ما يعرف بالتجفـيف ، وتساعد هذه العملية بدورها فى الـغسيل ، وتجعل الأنسجة متماسكة ، ويحتمـل أن تصبح صلبة هشة . وتتم هذه العمـلية بمعاملة النماذج بتـركيزات متزايدة من الجوهر الكـشاف ، الذى يطرد الماء وبتركيـزات متناقصة مـــن الماء حتـى يـصل تركيز الجوهر الـكشاف إلى ١٠٠ ٪ ؛ أى التخلص تمامًا من الماء .

وهناك طريقتان لتجهيز النماذج بطـرد الماء وتحضيرها للتشريب بالشمع هما :

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

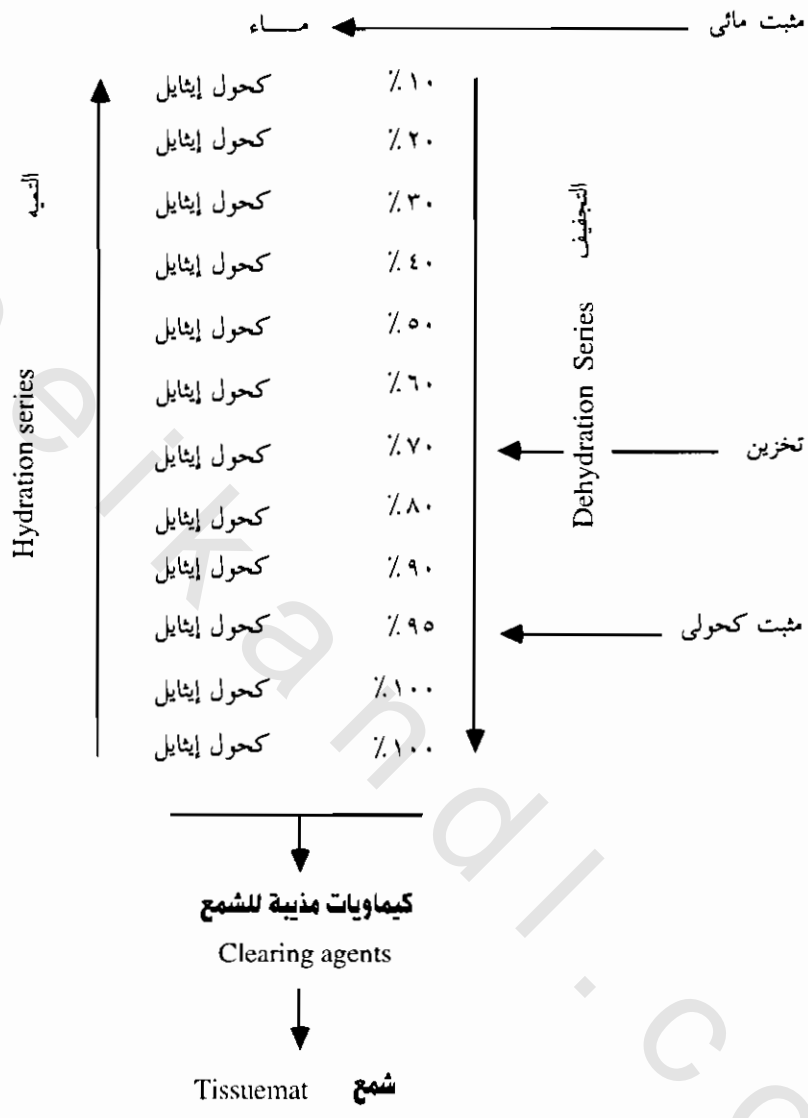
الثانية : استعمال كيماويات تطرد الماء وفى الوقت نفسه تذيب الشمع .

أمثلة للطريقة الأولى لطرد الماء :

حيث تستعمل كيماويات تطرد الماء لكن لاتـذيب الشمع مما يتطلب بعد ذلك استعمال كيماويات أخرى مذيبة للشمع .

(١) استعمال كحول الإيثايل Ethanol

وهو أهم ما يـستعمل فى هذه الـطريقة ، ويمكن أن يـحل محله كحول الأيـزوبروبيل Isopropyl alcohol ، وتتم هذه الـعملية بعمل تـركيزات من الكحول متـدرجة كالآتى : ١٠ ٪ ، ٢٠ ٪ ، ٣٠ ٪ ، ٤٠ ٪ ، ٥٠ ٪ ، ٦٠ ٪ ، ٧٠ ٪ ، ٨٠ ٪ ، ٩٠ ٪ ، ٩٥ ٪ حتى نصل إلى ١٠٠ ٪ وهو الكحول المطلق ، وقد تـكون الخطوات أكثر تقاربًا من ذلك ؛ أى بـفارق ٥ ٪ فقط بـين كل تركيز وآخـر . ويوضح المخطـط (شكل ٣ - ١) تسلسل الخطوات المتبعة فى هذه الطريقة .



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

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

obeikandl.com

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

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

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

ويجب مراعاة ما يلى :

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

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

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

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

(٢) استعمال الأسيتون Acetone

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

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

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

(٣) إستعمال الجلسرين Glycerine

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

ضع النماذج فى محلول جلسرين قوته ٥ ٪ ، ويجب أن تكون كمية السائل كافية بحيث يتبقى بعد التبخير ما يكفى من الجلسرين لتغطية النماذج ، ويمكن أن تتم العملية بوضع النماذج داخل مجفف على درجة حرارة الغرفة ، أو فى فرن درجة حرارته ٣٥ - ٤٠° م ، إذا تغير لون الجلسرين فغيره بآخر من نفس التركيز ، ولتقدير ذلك يجب أن يعين ارتفاع السائل عند الابتداء ، فإذا صار ارتفاعه نصف ما كان قبل التبخر فمعنى ذلك أن قوة تركيز الجلسرين أصبحت ١٠ ٪ وهكذا . بعد تبخر كل الماء تقريبًا تصبح النماذج متماسكة ، وبذا يمكن نقلها إلى كحول مطلق مع تغييره على الأقل مرتين ، استمر فى العملية حتى النقل إلى الشمع .

الترويق Clearing

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

وأهم هذه المذيبات ما يلى :

(أ) الزيلول Xylene (Xylol)

(ب) الكلوروفورم Chloroform

(ج) يمكن استعمال البنزين Benzene والتلوين Toluene ولكنهما لايستعملان غالبًا لانخفاض درجة غليانهما ، وبذا تصبح هناك خطورة من الاشتعال .

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

وإذا استعمل الكلوروفورم فلتكن التركيزات كالآتى :

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

أمثلة للطريقة الثانية لطرد الماء :

(١) كحول البيوتايل Butyl alcohol

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

جدول (٣ - ١) : التركيزات المستعملة من كحول البيوتايل العادى لطرد الماء من العينات النباتية خلال عملية التجفيف.

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

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

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

جدول (٣ - ٢) : التركيزات المستعملة من كحول ثلاثى البيوتايل

لطرد الماء من العينات النباتية خلال عملية التجفيف .

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

(٢) الديوكسان Dioxan

يكثر استعمال الديوكسان فى عملية التجفيف ، وهو سهل الاختلاط بكل من الماء ؛ حيث يحل محله فى الأنسجة وكذلك شمع البارافين وبالتالى يعطى نتائج تشرب طيبة ، وهو لايحدث بلزمة كالتى تحدثها الكحولات أو الأسيتون ، كما لايجعل الأنسجة هشة Brittle .

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

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

obeikandi.com