منتدى إقرأ الثقافي
www.iqra.ahlamontada.com

المكتبة الطبية 11

أساسيات علم التحضير النسيجي

منتدى إقرأ الثقافي
www.iqra.ahlamontada.com
للكتب (كوردى ، عربي ، فارسي)

تأليف
الاستاذ محمود محمد الطردة
الاستاذ جمال محمد عثمان
الاستاذ محمد ابو دية
الدكتور اسامة خالد الرطروط

دار الثقافة للنشر والتوزيع

بۆدابەزاندنی جۆرەها کتێب:سەردانی: (مُنتَدى إقرَأ الثَقافِي)

لتحميل انواع الكتب راجع: (مُنتَدى إقرَأ الثَقافِي)

براي دانلود كتابهاى مختلف مراجعه: (منتدى اقرأ الثقافى)

www. Iqra.ahlamontada.com

منتدى إقراء الثقافي

www.iqra.ahlamontada.com

للكتب (كوردى ,عربي ,فارسي)

أساسيات

علم التحضير النسيجي

■ تأليف الدكتور محمود محمد الطرده وآخرون
■ أساسيات علم التحضير النسيجي
■ الطبعة الاولى / الإصدار الثاني ٢٠٠٠
■ جميع حقوق التأليف والطبع والنشر محفوظة للناشر .

■ الناشر / مكتبةدار الثقافة للنشر والتوزيع
عمان- وسط البلد-ساحة الجامع الحسيني- عمارة الحجيري
هاتف وفاكس ٤٦٤٦٣٦١ ص . ب ١٥٣٢ عمان- الاردن

لا يجوز نشر أي جزء من هذا الكتاب ، أو اختزان مادته بطريقة الإسترجاع ، أو نقله على أي وجه ، أو بأية طريقة اليكترونية كانت ، أم ميكانيكية ، أم بالتصوير ، أم بالتسجيل أو بخلاف ذلك ، إلا بموافقة الناشر على هذا كتابة مقدماً .

All rights reserved. No Part of this book may be reproduced, or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, recording or by any information storage retrieval system, without the prior permission in writing of the publisher.

رقم الايداع لدى دائرة المكتبة الوطنية
(٥٣ / ١ / ١٩٩٢)

رقم التصنيف: ٦١٦.٠٧٥
المؤلف ومن هو في حكمه: محمود محمد الطرده، جمال محمد عثمان، محمد أبو ديه، أسامه خالد الرطروط
عنوان الكتاب: أساسيات علم التحضير النسيجي
الموضوع الرئيسي: ١- الدم ٢- أمراض
عمان: مكتبة دار الثقافة

تم اعداد بيانات الفهرسة الاولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

أساسيات
علم التحضير النسيجي

الأستاذ محمود محمد الطردة
الأستاذ جمال محمد عثمان
الأستاذ محمد أبو دية
الدكتور أسامة خالد الرطروط

2000

بسم الله الرحمن الرحيم

منتدى إقرأ الثقافي
www.iqra.ahlamontada.com
للكتب (كوردى , عربي , فارسي)

تقديم

يعتبر قسم الأنسجة والخلايا التقشرية، من أهم أقسام المختبر الطبي الشامل الذي يقوم بإجراء جميع الفحوصات الطبية، ولأهمية هذا القسم الكبير، واعتماد الطبيب المعالج بشكل رئيس على نتائج هذا القسم في اتخاذ القرار الحاسم في مسلك العلاج المتبع، كان من الضروري أن يكون الفنيون العاملون في هذا القسم على درجة عالية من الكفاءة والمقدرة العلمية، والخبرة العملية في التعامل مع العينات النسيجية، وتحضير الشرائح النسيجية لأغراض التشخيص المجهري.

ولذا فقد ارتئينا أن نقدم هذا الجهد المتواضع لطلبة المهن الطبية المساعدة بشكل خاص، ولفنيي المختبرات الطبية العاملين بشكل عام، إسهاماً منا في رفدهم بالمراجع العربية الميسرة في هذا الموضوع، في وقت افتقرت فيه المكتبة الطبية العربية لمثل هذا الكتاب، ونحن إذ نقدم كتابنا هذا للطلبة والفنيين والمهتمين لنرجو أن نكون قد وُفقنا في تقديم كتاب متميز ومفيد في هذا المجال، لا سيما وأننا حاولنا جهدنا أن تكون لغة الكتاب وأسلوبه من اليسر بمكان يسهل للقاريء الوصول إلى المعلومة العلمية بطريقة بعيدة عن التعقيد والتشتت، وفي الوقت نفسه فقد حرصنا كل الحرص أن يتضمن الكتاب المصطلحات العلمية باللغتين العربية والانجليزية، إيماناً منا ـ من واقع الخبرة في هذا المجال ـ أن الفني لا يمكن أن يكون ناجحاً متمكناً من عمله دون أن يكون ملماً باللغة العلمية المستعملة وهي اللغة الإنجليزية، وكذلك اكتساب المهارة العملية بجانب المعلومات النظرية الأساسية التي تمكنه من ممارسة العمل واكتساب المهارة، لذلك حاولنا أن يكون الكتاب متضمناً الطرق التحضيرية وخطوات إجرائها عملياً مع شرح بعض الخطوات بشيء من التفصيل،

ليكون القارىء أقرب ما يكون إلى واقع التطبيق منه إلى الكتاب النظري البحت.

ولا يسعنا في هذا المقام إلّا أن نتقدم بوافر الشكر وجزيل العرفان لكل من ساهم في إخراج الكتاب إلى حيز الوجود، ونخص بالذكر الأخ الزميل علي سلحب رئيس قسم الأنسجة والخلايا التقشرية في مختبرات المستشفى الإسلامي ـ عمان ـ على ما قدمه لنا من عون ومساعدة في إعداد هذا الكتاب، وفقنا الله جميعاً لما فيه الخير.

والله ولي التوفيق.

عمان ٢/١٢/١٩٩١م

المؤلفون

الوحدة الأولى

وتشمل

- تمهيد.
- أهمية علم الأنسجة.
- تحضير الشرائح النسيجية.
- التثبيت.
- الغسل.

الوحدة الأولى

تمهيد

إن الهدف الأساسي لعلم الأنسجة Histology هو دراسة التركيب الخلوي والنسيجي للكائن الحي مما يفيد في دراسة الوظائف التي تقوم بها هذه الخلايا والأنسجة في جسم الكائن الحي.

ولتسمية هذا العلم أصولٌ إغريقية، فهو مكون من كلمتين: الأولى Histos وتعني نسيج، والثانية Logia وتعني علم.

وهناك ارتباط وثيق بين علم الأنسجة Histology والذي يعنى بدراسة الخلايا والأنسجة الطبيعية Normal cells and tissues دراسة مجهرية دقيقة من حيث التركيب، والعلاقات بين أجزاء ومكونات هذه الخلايا والأنسجة؛ وبين علم الأمراض Pathology والمكون من كلمتي Pathos وتعني مرض، و Logia وتعني علم، والذي يعنى بدراسة الخلايا والأنسجة غير الطبيعية أو المريضة Abnormal cells and tissues ومعرفة أسباب وأطوار وآلية تطور المرض.

ولكي يتسنى لنا دراسة هذا العلم، لا بد لنا من التعرف إلى بعض المصطلحات العلمية المهمة في هذا الحقل:

١ـ الخلية Cell وهي وحدة البناء الأولى في الكائن الحي.
٢ـ النسيج Tissue وهو مجموعة من الخلايا المتشابهة التي تقوم بوظيفة معينة في جسم الكائن الحي، مثل النسيج العظمي.

٣ـ العضـو Organ وهـو مجموعة من الأنسجة المتشابهة أو المختلفة التي تقوم بوظيفة أو أكثر في جسم الكائن الحي؛ مثل الكبد.

٤ـ جهاز System وهو مجموعة من الأعضاء تشكل جهازاً متكاملاً يقوم بأداء وظيفة أو عدة وظائف حيوية في الجسم، مثل الجهاز الهضمي.

٥ـ كائن حي Organism وهو عبارة عن مجموعة من الأجهزة تشكل جميعاً جسم الكـائن الحي الـذي يقوم بجميع العمليات الحيوية كالتنفس والتغذية والتكاثر وإخراج الفضلات، مثل الإنسان.

ولعلك تجد من خلال هذه التعريفات أن هناك تسلسلاً تركيبياً للكائن الحي يبدأ بالخلايا Cells ، وينتهي بالكائن الحي Organism ، كالتالي:

خلايا (Cells) ← نسيج (Tissue) ← عضو (Organ)

جهاز (System) ← كائن حي (Organism) .

أهمية علم الأنسجة

تكمن أهمية علم الأنسجـة في إمكـانية التـوصـل إلى تشخيص مرضي دقيق للأمـراض التي تصيب أجزاء الكائن الحي المختلفة من خلال الدراسة المجهرية لجـزء من هذه الأنسجـة على شكـل عينة نسيجية تؤخذ من المريض أثناء العملية الجـراحية، أو على شكـل خزعة نسيجية تؤخذ من قبل الطبيب المعالج من الجزء المصاب، حيث تحضر منها شرائح رقيقة جداً Sections تدرس مجهرياً من قبل طبيب اختصاصي في علم الأمراض لتشخيصها.

وهناك نوعان من العينات النسيجية:

١ـ عينـة من كائن حي (Biopsy) وتؤخـذ من الكائن الحي أثناء حياته، إمّا على شكل خزعة نسيجية من العضو المصاب، أو على شكل استئصال كامل للعضو المصاب.

٢ـ عينة بعد الوفاة (Autopsy) وتؤخذ من الكائن الحي بعد موته، وتفيد دراستها في معرفة مسببات الوفاة، وتشخيص المرض الذي أدى إلى الوفاة.

تحضير الشرائح النسيجية

تعتمد دراسة الشرائح النسيجية على المجهر الضوئي Light microscope اعتماداً كبيراً، ولذا كان من الضروري تحضير مقاطع رقيقة من النسيج لسهولة اختراق الضوء لها وتمييز أجزاء ومكونات الخلايا تحت المجهر.

وتمر العينات النسيجية بعدد كبير من الخطوات منذ استلامها في مختبر الأنسجة حتى تسليمها لاختصاصي علم الأمراض على شكل مقاطع رقيقة مصبوغة ملصقة على شرائح زجاجية، والذي يقوم بدوره بقراءتها تحت المجهر وتشخيصها:

(١) تبدأ مراحل تحضير الشرائح النسيجية بتثبيت العينات وذلك بغمرها بمثبت مناسب عند استئصالها من جسم المريض ووضعها في وعاء زجاجي مناسب، وإرسالها للمختبر بعد كتابة اسم المريض وعمره وجنسه ونوع النسيج واسم الطبيب والقسم على ملصق خاص يلصق على الوعاء.

وعند وصول العينة إلى مختبر الأنسجة واستلامها من قبل الفني المسؤول مع النموذج الطبي المرفق مع العينة، والذي يحتوي عللى البيانات الضرورية المذكورة على الملصق، بالإضافة للتشخيص السريري للمريض حيث تبدأ المراحل العملية لتحضير الشرئح النسيجية.

(٢) يقوم الطبيب الاختصاصي في مختبر الأنسجة بملاحظة وتسجيل المشاهدات العيانية التي يلاحظها على العينة من حيث الحجم والوزن واللون والمحتوى وتثبيت هذه الملاحظات على النموذج المرفق. ثم يقوم بتقطيع العينة إلى أجزاء صغيرة مناسبة لا تزيد أطوال كل جزء عن ١٠ ملم طول و ٥ ملم عرض و ٣ ملم سمك، وإذا كانت العينة صغيرة ضمن هذه الأبعاد فلا حاجة لتقطيعها.

(٣) إذا كانت العينة من نسيج صلب كالعظام أو الأسنان أو الغدد المتكلسة فيجب أن تمر بعملية نزع الكلس Decalcification باستخدام محاليل حامضية خاصة لهذا الغرض.

(٤) بعد ذلك تمر العينات النسيجية بعدة عمليات متسلسلة تبدأ بالغسيل من بقايا محلول التثبيت Washing وتتم بالماء أو الكحول، ثم التجفيف Dehydration لإزالة الماء من النسيج؛ ثم التنقية Clearing لجعل العينة شفافة، وتتم باستخدام محاليل خاصة غالباً ما تكون شفافة متطايرة مثل الزايلين؛ ثم الإشباع Impregnation بشمع البارافين المنصهر.

(٥) تطمر العينات بقوالب مناسبة من شمع البارافين ثم تقلّم حواف القالب لتقطيعها إلى مقاطع رقيقة محتوية على مقاطع من النسيج تمهيداً لإلصاقها على الشرائح الزجاجية وصباغتها بصبغات خاصة لدراستها مجهرياً بعد تغطيتها بوسط تغطية شفاف مناسب، ثم تغطيتها بغطاء زجاجي رقيق Cover slide لقراءتها من قبل اختصاصي علم الأمراض Pathologist .

التثبيت Fixation

تعريف:

التثبيت هو عملية الحفاظ على شكل وحجم الخلايا والأنسجة والأنظمة النسيجية وجميع العناصر النووية Nuclear elements ، والسيتوبلازمية Cytoplasmic elements بحالة أقرب ما تكون إلى حالتها الطبيعية قبل التثبيت.

لذلك يجب الإسراع قدر الإمكان في إجراء عملية التثبت تفادياً لحدوث التغيرات التي تطرأ على النسيج بعد انفصاله عن جسم الكائن الحي وموت خلاياه، وهذه التغيرات تسمى: «تغيرات ما بعد الموت» Postmortem changes ، وهي:

١- إذا تركت العينات النسيجية في الهواء، فإنها تجف وتتقلص بسبب فقدانها

للمحتوى المائي بعملية التبخر Dehydration

٢ـ إذا وضعت العينات النسيجية في محلول ذو تركيز معين، فإنها سوف تخضع لظاهرة الانتفاخ الاسموزي Osmotic swelling ، أو التقلص الاسموزي Osmotic shrinkage .

٣ـ التفسخ التعفني Microbial putrefaction : وهو تحطم وتفسخ الخلايا والأنسجة بسبب انتشار وتكاثر البكتيريا والفطريات خلالها حيث تقوم البكتيريا والفطريات بإفراز خمائرها لتحلل مكونات الخلايا، وتؤدي إلى تعفنها وتحطمها.

٤ـ التحلل الذاتي Autolysis : وهو تحلل وتفسخ الخلايا بفعل الخمائر Enzymes التي تتحرر من الجسيمات الحالة Lysosomes الموجودة في سيتوبلازم الخلية بشكل طبيعي؛ حيث تبدأ هذه الجسيمات الحالة بعد موت الخلية بالانفجار وتحرير خمائرها داخل نفس الخلية مما يؤدي إلى تحلل مكونات الخلية الداخلية وتحويلها إلى وسط هلامي متجانس ليس له معالم محددة.

وهذه الخمائر والتي تعرف بمجموعة الـ Cathepsin وجدت أصلاً لبناء جزيئات البروتين من الأحماض الأمينية، وهي تقوم بعد موت الخلايا بعمل عكسي حيث تقوم بتحطيم البروتين الذي يكون معظم أجزاء الخلية وتحوله إلى أحماض أمينية.

الهدف من التثبيت:

تهدف عملية التثبيت إلى قتل الخلايا الحية وتحويلها إلى حالة الصلابة، وإيقاف تغيرات ما بعد الموت المذكورة سالفاً؛ لذلك يجب اختيار محلول يستطيع منع الجفاف أو الانتفاخ أو التقلص، وكذلك يقوم بقتل البكتيريا والفطريات ومنع انتشارها، ويوقف كذلك نشاط انزيمات التحلل الذاتي؛ ويعرف مثل هذا المحلول بالحافظ Preservative ، أمّا المحلول المثبت Fixative فهو بالإضافة لكونه محلولاً حافظاً يمتاز بخصائص إضافية تجعله قادراً على:

(١) تهيئة النسيج لمقاومة العديد من المعاملات الكيميائية اللاحقة التي قد تتلف العينات النسيجية مثل عملية التجفيف Dehydration ، أو الإشباع والطمر بشمع البارافين الساخن.

(٢) زيادة قابلية سطوح الأنسجة لتقبل الصبغات والتلون بها.

(٣) زيادة معامل الانكسار Refractive index لأجزاء الخلية مما يسهل تمايزها ووضوحها تحت المجهر Microscope .

(٤) تحويل مكونات الخلية من حالة شبه السيولة إلى حالة الصلابة دون تغيير في شكل وحجم هذه المكونات.

ولإجراء عملية التثبيت بالشكل المناسب، يجب اختيار المثبت الذي يحقق أكبر قدر من هذه الخصائص، وبشكل عام عند اختيار المثبت المناسب يجب أن يكون المحلول المثبت له القدرة على تحقيق الأهداف التالية:

(١) التغلغل السريع داخل النسيج وقتل الخلايا فوراً ولتقليل أثر تغيرات ما بعد الموت إلى أكبر حد ممكن.

(٢) أن يحافظ على العلاقات التركيبية بين أجزاء النسيج ومكونات الخلايا في صورة أقرب ما تكون إلى صورتها وهي حية.

(٣) العمل على تصلب النسيج وتحويل سيتوبلازم الخلايا من حالة شبه السيولة إلى حالة الصلابة عن طريق تخثر البروتينات المكونة للخلايا.

(٤) زيادة تقبل سطوح الأنسجة للصبغات، وذلك بإيجاد فروقات بين معاملات الانكسار لأجزاء الخلية.

إجراء التثبيت:

بعد اختيار المثبت المناسب اعتماداً على نوع النسيج المراد فحصه، تحضر

العينات النسيجية للتثبيت حسب الخطوات التالية:

١ـ تقطع العينات النسيجية إلى قطع صغيرة لا يزيد سمكها عن ٠,٥ سم للتحضير اليدوي، وعن ١ـ٣ ملم للتحضير الآلي، مما يتيح المجال للمثبت للتغلغل السريع داخل النسيج، ويفضل أن تقطع العينات بواسطة مشرط حاد، ولا يفضل استخدام المقص لأنه قد يتلف جزء من العينة نتيجة الضغط عليها.

٢ـ تشطف العينات بشكل سريع باستخدام المحلول الفسيولوجي المتعادل (0.85% Nacl) لإزالة أية آثار للدم، لأن وجود الدم على العينة قد يقلل من سرعة التثبيت، ويجب الانتباه إلى عدم جفاف العينة.

٣ـ تغمر العينة النسيجية في المثبت المناسب بعد وضعها في كبسولة مرقمة بالرقم التسلسلي للعينة، بحيث لا يقل حجم المحلول المثبت عن ١٠ـ١٥ ضعف حجم العينة؛ ثم يرج الوعاء لضمان وصول المحلول إلى جميع أجزاء سطح النسيج.

طبيعة المثبتات:

تعتبر المثبتات الكيميائية المكونة من محاليل كيميائية هي من أكثر المواد المثبتة المستخدمة في عملية التثبيت في علم الأنسجة، وقد استعملت لهذا الغرض مجموعة كبيرة جداً من المحاليل الكيميائية المثبتة، غالبيتها العظمى مكونة من أكثر من مركب كيميائي واحد، وذلك لتعذر قدرة مركب كيميائي واحد على تحقيق جميع أهداف المثبت الجيد؛ ولذا نجد أن معظم المثبتات الكيميائية مكونة من أكثر من مادة كيميائية واحدة، وذلك للاستفادة من مواصفات كل مادة لتحقيق أكبر قدرٍ ممكن من أهداف التثبيت، باستثناء بعض المثبتات التي تحقق معظم الأهداف مثل الفورمالين Formalin

تصنيف المثبتات:

لقد صُنفت المثبتات الكيميائية إلى عدة أصناف، وذلك لكثرة عددها، حيث

اعتمد تصنيف المثبتات عدة أسس نذكر أهمها:

١ ـ تصنيف المثبتات من حيث التركيب:

يعتمد هذا التصنيف على أساس تركيب المثبتات، وعدد المواد الداخلة في تركيبها، وتقسم إلى:

أ ـ مثبتات بسيطة Simple fixatives : وتتكون هذه المثبتات من مادة كيميائية واحدة محلولة في مذيبها مثل الفورمالين، والكحول، وكلوريد الزئبق.

ب ـ مثبتات مركبة Complex fixatives : وتتكون من مادتين كيميائيتين أو أكثر ممزوجة معاً لتكون محلولاً مثبتاً واحداً مثل: محلول بوين، ومحلول زنكر، ومحلول جلوترالدهايد.

٢ ـ تصنيف المثبتات من حيث آلية العمل:

يعتمد هذا التصنيف على أساس ميكانيكية عمل المثبت أو طريقة التثبيت، وتقسم إلى:

أ ـ مثبتات مخثرة للبروتين Coagulant fixing reagents : حيث تقوم هذه المثبتات بتغيير طبيعة البروتينات المكونة للأنسجة وتخثيرها لتتحول من حالة شبه السيولة إلى حالة الصلابة مثل حامض البكريك Picric acid .

ب ـ مثبتات غير مخثرة للبروتين Noncoagulant fixing reagents : وتعتمد هذه المثبتات في عملها على تغيير طبيعة البروتينات المكونة للأنسجة دون أن تقوم بتخثيرها، وغالباً ما تحتوي المثبتات الكيميائية بشكل عام على محاليل مخثرة ومحاليل غير مخثرة للبروتين في نفس الوقت.

يسمى تصنيف المثبتات إلى مخثرة وغير مخثرة للبروتين تصنيف بيكر Baker Classification ؛ نسبة إلى العالم الذي قام بتصنيفها.

ولكل صنف من هذه الأصناف حسنات وسيئات Advantages and Disadvantages هي :

ـ حسنات المثبتات المخثرة للبروتين

Advantages of coagulant fixing reagents

١ـ تزيد هذه المثبتات من ترابط الألياف البروتينية داخل النسيج لتحولها من شبكة ناعمة من الألياف إلى شبكة أكثر خشونة دون أن تؤثر على تركيب البروتين، وهذا يسهل دخول شمع البارافين داخل الخلايا وإكساب النسيج صفة الصلابة لتسهيل عملية التقطيع إلى مقاطع رقيقة.

٢ـ تقوم المثبتات المخثرة للبروتين بتقوية الروابط الكيميائية بين جزئيات البروتين مما يزيد من مقاومتها للتحطم والتلف الذي قد يحدث خلال العمليات النسيجية اللاحقة.

ـ سيئات المثبتات المخثرة للبروتين

Disadvantages of coagulant fixing regents

١ـ زيادة خشونة الشبكة البروتينية المتكونة أكثر من اللازم قد تعيق الدراسة التفصيلية لأجزاء الخلايا، لأنها قد تخفي بعض المعالم للأجزاء الصغيرة.

٢ـ تكون أشكال مصطنعة غير موجودة أصلاً في الخلايا Artifacts مما يعيق دراسة هذه الخلايا.

ـ حسنات المثبتات غير المخثرة للبروتين

Advantages of noncoagulant fixing reagents

من أهم الحسنات لهذه المثبتات.

تكون عدداً أقل من الأشكال المصطنعة Artifacts

من أهم سيئات هذه المثبتات:
عدم إكساب البروتينات الصلابة الكافية لتقطيعها بسهولة.

٣ ـ تصنيف المثبتات من حيث الجزء الذي تعمل على تثبيته في الخلية:

تسمى مجموعة المثبتات التي تستعمل لتثبيت الخلايا بالمثبتات الخلوية Cellular fixatives ، وتقسم إلى:

أ ـ مثبتات نووية Nuclear fixatives : وتعمل هذه المثبتات على تثبيت التراكيب النووية مثل: النويّة، والكروموسومات، والغشاء النووي، مثال محلول فليمنج Flemming's fluid .

ب ـ مثبتات سيتوبلازمية Cytoplasmic fixatives : وتعمل هذه المثبتات على تثبيت التراكيب السيتوبلازمية مثل: الميتوكندريا، وجهاز جولجي مثال محلول ألتمان Altman's fixative .

أهم المثبتات المستخدمة في علم الأنسجة:

إن من أهم أُسس التصنيف التي اعتمدت في تصنيف المحاليل المثبتة هو تصنيف بيكر الذي اعتمد على تصنيف المحاليل المثبتة إلى مخثرة وغير مخثرة للبروتين، وسنورد في هذا الباب أهم المحاليل المخثرة للبروتين، والمحاليل غير المخثرة للبروتين مع ذكر حسنات وسيئات كل منها، ثم نتعرض لذكر المركبات الكيميائية المثبتة حسب استخدامها بشكل روتيني أو متخصص.

أ ـ المثبتات المخثرة للبروتين:
Coagulant fixing reagents

١ ـ كلوريد الزئبق Mercuric Chloride

يستخدم هذا الملح كمثبت على شكل محلول مائي بنسبة ٧٪ أو على شكل محلول كحولي لأنه يذوب في الكحول أكثر من الماء حيث يذوب بنسبة ٣٥٪،

ويعتبر كلوريد الزئبق من المخثرات القوية للبروتين، حيث يخترق أجزاء النسيج بشكل سريع.

- حسناته:

١- تقسيته المعتدلة للنسيج مسبباً أقل قدر من الانكماش للخلايا.
٢ - تثبيت مكونات السيتوبلازم بشكل جيد وعدم إتلاف الدهون.

- سيئاته:

١- لا يمكنه تثبيت الكربوهيدرات والأحماض النووية والكروموسومات بشكل جيد.
٢- ظهور ترسبات سوداء على خلفية المقاطع النسيجية؛ والتي يمكن إزالتها بواسطة يود لوجول مع ثيوسلفات Lugol's Iodine - thiosulphate .

ملاحظة: كلوريد الزئبق مادة سامة إذا امتصت من خلال الجلد، ولذا يجب الحرص الشديد عند حملها، والتعامل معها بحذر.

٢ - حامض البكريك Picric acid

يوجد حامض البكريك على شكل بلورات صفراء اللون تذوب في الماء بنسبة ١٪ لتشكل محلولاً مشبعاً؛ لكنه يذوب في الكحول بنسبة ٩٪. وهو مثبت مخثر للبروتين، وخاصة بروتينات النواة.

- حسناته:

١ - قدرته على تثبيت الجلايكوجين.
٢ - عدم تقسيته الكبيرة للأنسجة.

- سيئاته:

١ - لا يستطيع تثبيت الكروموسومات والكربوهيدرات.

٢ـ بطء اختراقه للأنسجة وتسببه في انكماش الأنسجة بشكل كبير. ويمكن معالجة الانكماش بإضافة حامض الخليك إلى حامض البكريك كمثبت.
٣ـ إكساب اللون الأصفر الذي يمكن إزالته بغسل النسيج بكحول ٥٠ ـ ٧٠٪.

٣ ـ حامض الكروميك Chromic acid

يستخدم هذا الحامض على شكل محلول مائي بنسبة ٥, ٠ـ٢٪، وهو مخثر قوي جداً للبروتينات.

ـ حسناته:

١ـ يثبت الأحماض النووية والكروموسومات والدهون بشكل جيد.

ـ سيئاته:

١ـ لا يستطيع تثبيت الكربوهيدرات.
٢ـ يسبب تحبب السيتوبلازم مع أنه لا يثبت مكونات السيتوبلازم.

٤ ـ الكحول الإيثيلي Ethyl Alcohol (Ethanol)

يستخدم الكحول الإيثيلي كمثبت على شكل كحول مطلق Absolute أي غير مخفف.

ـ حسناته:

من أهم حسناته أنه مخثر جيد لمعظم البروتينات.

ـ سيئاته:

١ـ اختراقه المعتدل للنسيج وتسببه للانكماش الشديد والصلابة الكبيرة للنسيج.
٢ـ عدم تثبيت الأحماض النووية والجلايكوجين.

٣ـ يسبب تحبب السيتوبلازم بتكوين رواسب فيه ويحطم معظم مكونات السيتوبلازم.

ب ـ المثبتات غير المخثرة للبروتين:
Non coagulant fixing reagents

١ ـ الفورمالين (Formaldehyde) Formalin

يعتبر الفورمالين من أهم المثبتات الكيميائية المستخدمة بشكل روتيني في مختبرات الأنسجة، وهو عبارة عن غاز متطاير ينتج عن أكسدة الكحول المثيلي يذوب في الماء بسرعة حيث تصل أعلى نسبة لذوبانه في الماء ٤٠٪، ويعتبر هذا التركيز هو أعلى تركيز يمكن الحصول عليه من محلول الفورمالين، ولذا نعتبر محلول الفورمالين تركيز ٤٠٪ وكأنه تركيز مطلق ١٠٠٪ عند التحضير.

يستعمل الفورمالين تركيز ١٠٪ كمثبت حيث يتم تحضيره كالتالي:

١ـ يؤخذ ١٠ أحجام من الفورماليلن المركز (٤٠٪) على اعتبار أنه ١٠٠٪ كما مر سابقاً.

٢ـ نكمل المخبار المدرج إلى علامة ١٠٠ حجم بالماء المقطر، فنكون قد أضفنا ٩٠ حجماً من الماء لنحصل على محلول فورمالين تركيز ١٠٪.

ويمكن استخدام محلول من أملاح الفوسفات بدرجة حموضة بين (٧,٥ـ٨) لتحضير الفورمالين بدل الماء المقطر للحصول على محلول فورمالين ملطف متعادل Neutral buffered formaline. والفورمالين من المثبتات غير المخثرة للبروتين، لكنه يتحد كيميائياً مع الأحماض الأمينية المكونة للبروتين ليكون روابط كيميائية بين السلاسل البروتينية المتقابلة.

ـ حسناته:

١ـ نفاذيته السريعة للأنسجة بأقل قدر من الانكماش للخلايا.

٢ـ محافظته على الدهون دون تثبيتها.

ـ سيئاته:

١ـ لا يستطيع تثبيت الكربوهيدرات.

٢ـ يتفاعل الفورمالين غير الملطف مع الهيموجلوبين الموجود في الكريات الحمراء في العينات النسيجية المحتوية على دم مما يؤدي إلى ترسب الصبغة داخل النسيج مشوهاً للنسيج ومموهاً للتشخيص، ولمنع هذا الترسب يستعمل الفورمالين الملطف Buffered formalin

٣ـ يؤثر بخار الفورمالين على العينين والأغشية المخاطية والجهاز التنفسي إذا تعرض له الفني بشكل مباشر. ويمنع هذا الخطربتهوية المكان بشكل جيد.

٢ ـ ثنائي كرومات البوتاسيوم:
Potassium Dichromate

نستعمل هذه المادة على شكل محلول مائي بنسبة ٢,٥ـ٥٪ حيث انها لا تذوب في الكحول، وهي من المحاليل غير المخثرة للبروتين على درجة حموضة ٣,٨ـ٤,٣.

ـ حسناته:

١ـ يثبت الدهون والشحوم بشكل جيد.

٢ـ يفيد في تثبيت مركبات السيتوبلازم مثل الميتوكندريا.

ـ سيئاته:

١ـ نفاذيته للأنسجة ضعيفة.

٢ـ يجب غسل العينة منه قبل تجفيفها بالكحول لأنه يتأكسد مع الكحول.

٣ ـ حامض الخليك Acetic acid

يستخدم حامض الخليك على شكل حامض مركز بصورة حامض الخليك

الثلجي Glacial acetic acid وهو عامل غير مخثر للبروتين، ولا يتفاعل مع مكونات الخلية بصورة مباشرة.

- حسناته:

١- نفاذيته للأنسجة جيدة ولا يؤدي إلى تصلب كبير للأنسجة.
٢- يحفظ الكروموسومات بشكل جيد.
٣- يحافظ على الخلايا من الانكماش.

- سيئاته:

١- لا يستطيع تثبيت الدهون، بل يذيب معظم الدهون الموجودة في السيتوبلازم.
٢- لا يستطيع تثبيت الكربوهيدرات، وكذلك لا يؤدي إلى تحطيمها فهو ليس له أي أثر إيجابي أو سلبي على الكربوهيدرات.

٤ - رابع أوكسيد الاوزميوم:
Osmium Tetraoxide

يستخدم كمحلول مائي بنسبة ١٪، وهو غير مخثر للبروتين. ينتج عن ذوبان بلورات رابع أكسيد الاوزميوم في الماء ليتكون حامض الاوزميك وهو محلول متعادل أو حامض ضعيف جداً.

- حسناته:

١- يحافظ على النواة والسيتوبلازم بشكلها الطبيعي أكثر من أي محلول آخر.
٢- يفيد في التحضيرات المجهرية الالكترونية، حيث يحافظ على الدهون بصورة دائمة.

- سيئاته:

١- ضعيف النفاذية للأنسجة.
٢- غالي الثمن.

المركبات الكيميائية المثبتة المستخدمة بشكل اعتيادي (مثبتات عامة)

Routine fixatives

١ ـ فورمالين ملطف متعادل ١٠٪ :

10% Neutral Buffered Formalin

ويتكون المركب من :

ـ فورمالين (١٠٪) ١٠٠٠مل .

ـ فوسفات الصوديوم الثنائي القاعدة ٤ غم ($Na\ H_2PO_4,\ H_2O$)

ـ فوسفات الصوديوم الأحادي القاعدة اللامائي ٦,٥ غم ($Na_2\ HPO_4$)

يمكن ترك الأنسجة لمدة طويلة في هذا المركب دون أن يترك عليها آثاراً سلبية، لكنه يحتاج إلى مدة ٢٤ ساعة كحد أدنى للتثبت .

ـ ومن أهم حسناته :

١ـ تثبيت الشبكة الكروماتينية .

٢ ـ تثبيت معظم أنواع الأنسجة تثبيتاً منتظماً ومتساوياً .

٣ ـ يمنع تكون رواسب في الأنسجة .

٤ـ لا يسبب انكماش للخلايا بدرجة كبيرة .

ـ سيئاته :

١ـ يحتاج لوقت طويل نسبياً لتحضيره .

٢ـ بطيء النفاذية .

٣ـ له أثر سيء على الجلد والأغشية المخاطية عند التعرض لبخاره .

٤ ـ يؤدي إلى ظهور أصباغ في الأنسجة الغنية بالدم .

٢ ـ محلول بوين Bouin's solution

يفضل استخدام محلول بوين لتحضيرات الأنسجة الحيوانية بشكل عام،

وللتحضيرات الجنينية بشكل خاص، ويتكون من:

ـ حامض البكريك	٧٥ مل
ـ فورمالين (١٠٪)	٢٥ مل
ـ حامض الخليك الثلجي	٥ مل

يحتاج هذا المثبت إلى ٦ ـ ٢٤ ساعة للتثبيت، ويفضل غسل الأنسجة بكحول ٥٠٪ لإزالة اللون الأصفر الذي يتركه حامض البكريك على الأنسجة.

ـ من أهم حسنات هذا المحلول:

١ـ لا يسبب تلفاً كبيراً للأنسجة.

٢ـ مفيد في التحضيرات الجنينية وتثبيت الأجنة.

ـ ومن أهم سيئاته:

١ـ يتلف أنسجة الكلية.

٢ـ يؤدي إلى ظهور أشكال مصطنعة كثيرة في الأنسجة بسبب الانكماش الذي يحدثه حامض البكريك، مما يؤدي إلى ظهور فجوات كبيرة (Artifacts)

٣ ـ محلول زنكر Zenker's solution

يعتبر محلول زنكر من أكثر المحاليل استعمالاً للدراسات النسيجية بصورة عامة، والدراسات المرضية بصورة خاصة. ويحتاج إلى ٢٤ ساعة للتثبيت تغسل بعدها العينات بالماء الجاري لمدة ١٢ ساعة.

ـ ماء مقطر	١٠٠ مل
ـ كلوريد الزئبق	٥ غم
ـ كبريتات الصوديوم	١ غم
ـ ثنائي كرومات البوتاسيوم	٢,٥ غم
ـ حامض الخليك الثلجي	٥ مل

ـ ومن أهم حسنات هذا المحلول:

١ـ تسهيل عملية الصباغة وتقبل الصبغة من قبل النسيج.
٢ـ تثبيت النوية بشكل جيد بفعل كلوريد الزئبق.

ـ ومن أهم سيئاته:

١ـ عدم ثباته بسبب وجود حامض الخليك الثلجي. لذلك يضاف حامض الخليك الثلجي إلى بقية المكونات قبل الاستخدام مباشرة.
٢ـ نفاذية مكونات المحلول متفاوتة. لذلك يفضل أن تكون العينات صغيرة الحجم لا يتعدى سمكها عن ٣ ـ ٤ ملم للحصول على تثبيت جيد لجميع أجزاء العينة.

٤ ـ محلول هيلي Helly's solution

يمكن اعتبار محلول هيلي من المحاليل المثبتة الروتينية أو المثبتات الخاصة حيث إنه له القدرة على تثبيت مكونات السيتوبلازم بشكل جيد لاحتوائه على الفورمالين وكلوريد الزئبق، ويفيد محلول هيلي في تثبيت عينات الأعضاء المصنعة للدم مثل الطحال، والعقد الليمفاوية، ويفيد كذلك للغدد الصماء، وتستغرق مدة التثبيت من ٦ ـ ٢٤ ساعة.

يتكون محلول هيلي من:

ـ ثنائي كرومات البوتاسيوم	٢,٥ غم
ـ كلوريد الزئبق	٥ غم
ـ سلفات الصوديوم	١ غم
ـ ماء مقطر	١٠٠ مل
ـ فورمالين مركز	٥ مل

ولتشابه هذا المحلول مع محلول زنكر باستثناء وجود الفورمالين بدل حامض الخليك الثلجي نستطيع أن نعقد مقارنة بين المحلولين حيث نجد أن محلول هيلي

يكسب النسيج قساوةً أقل مما يكسبه محلول زنكر، وكذلك نجد أن سرعة النفاذية داخل النسيج لمحلول هيلي أقل من سرعة نفاذ محلول زنكر.

المركبات الكيميائية المثبتة المستخدمة بشكل متخصص (مثبتات خاصة)

١ ـ محلول كارنوي Carnoy's solution

يستخدم هذا المحلول بشكل خاص لتثبيت الأنسجة العصبية، وكذلك يفيد في تثبيت الجلايكوجين، حيث يتم التثبيت فور اختراق المحلول لأجزاء النسيج، ويتكون محلول كارنوي من:

ـ حامض الخليك الثلجي	١٠ مل
ـ كلوروفورم	٣٠ مل
ـ كحول اثيلي مطلق	٦٠ مل

تستغرق مدة التثبيت ٢٠ دقيقة إلى ٣ ساعات، ويجب أن لا تزيد مدة غمر النسيج في محلول كارنوي أكثر من اللازم لحدوث الانكماش للخلايا إذا زادت المدة.

وكذلك يفضل أن لا يزيد سمك العينة عن ٥ ملم لسهولة اختراق المحلول للعينة. تنقل العينات فوراً إلى كحول اثيلي مطلق للتخلص من الكلورفورم حيث تبدأ عملية التجفيف أثناء مرحلة التثبيت.

٢ ـ محلول جامبي Champy's solution

يستخدم هذا المحلول للأنسجة الحيوانية والنباتية أيضاً ويفيد لتثبيت الميتوكندريا وللدراسات الخلوية، ويتركب من:

ـ ثنائي كرومات البوتاسيوم تركيز ٣٪	٣٥ مل
ـ حامض الكروميك تركيز ١٪	٣٥ مل

- حامض الاوزميك تركيز ٢٪ ٢٠ مل

تتراوح مدة التثبيت من ٦ - ٢٤ ساعة، حيث تغسل العينات بالماء الجاري بعد التثبيت من ٦ - ٢٤ ساعة أيضاً.

٣ - محلول فليمنج Flemming's solution

يستخدم هذا المحلول كمثبت خلوي تقليدي يفيد في تثبيت المركبات النووية حيث يحفظ الكروموسومات بشكل جيد، ويستخدم لدراسة مراحل الانقسام الخلوي (mitosis) ويتكون من:

- رابع أكسيد الاوزميوم تركيز ٢٪ ٢٠ مل
- حامض الكروميك تركيز ١٪ ٧٥ مل
- حامض الخليك الثلجي ٥ مل

يتميز هذا المحلول بعدم ثباته وارتفاع كلفته، لذلك يفضل تحضيره قبل الاستخدام مباشرة وبكميات قليلة حسب الحاجة.

تستغرق مدة التثبيت من ١٢ - ٤٨ ساعة، ويفضل أن لا يزيد سمك العينة عن ٢ ملم لبطء اختراق المحلول للأنسجة.

تغسل العينات بالماء الجاري لمدة ٢٤ ساعة بعد التثبيت.

من سيئات استخدام محلول فليمنج عدم صباغة الأنوية بالهيماتوكسيلين بعد التثبيت، ويمكن استخدام صبغة السفرانين كصبغة بديلة.

٤ - محلول ألتمان Altman's solution

يفيد هذا المحلول في تثبيت الدهون والميتوكندريا بشكل خاص، وتستغرق مدة التثبيت حوالي ١٢ ساعة. ويتركب هذا المحلول من:

- ثنائي كرومات البوتاسيوم المائي تركيز ٥٪ ١٠ مل

- رابع اكسيد الاوزميوم المائي تركيز ٢٪ ١٠ مل

يغسل النسيج المثبت بهذا المحلول بالماء الجاري ١٢ ساعة.

أسس اختيار المثبت المناسب:

يعتمد اختيار المثبت المناسب على عدة أسس هي:

١- طبيعة الدراسة النسيجية المطلوبة؛ إذا كانت عامة للنسيج ككل أو متخصصة لجزء معين من الخلية. فللدراسة العامة نختار مثبت روتيني عام، وللدراسة المتخصصة بجزء معين نختار مثبت خاص يثبت الجزء المطلوب.

٢- صلابة النسيج؛ حيث يعتمد تغلغل المثبت داخل النسيج على صلابة النسيج، وكذلك القدرة على التثبيت ترتبط مع صلابة النسيج بعلاقة عكسية، فكلما كان النسيج صلباً كانت القدرة على التثبيت أقل، لذلك يجب اختيار المثبت ذو النفاذية العالية للنسيج الأكثر صلابة والعكس صحيح.

٣- زمن التثبيت، حيث يعتمد الوقت اللازم لغمر النسيج في المثبت على عوامل رئيسة هي:

أ - فعالية المثبت.
ب - معدل النفاذية داخل النسيج.
ج - سمك النسيج.

لذلك يجب اختيار المثبت المناسب للنسيج مع الأخذ بعين الاعتبار العوامل المذكورة سالفاً، حيث إن هناك مثبتات تقوم بالتثبيت فور ملامستها لأجزاء النسيج، وخاصة التي تحتوي على محاليل مخثرة للبروتين مثل محلول بوين لاحتوائه على حامض البكريك. وهناك مثبتات تقوم بالتثبيت بشكل تدريجي اعتماداً على مدة الغمر.

٤ ـ درجة القساوة التي يحدثها المثبت للنسيج:

حيث تعتمد درجة القساوة التي يحدثها المثبت للنسيج على نوع المثبت المستخدم. لذا يجب اختيار المثبت المناسب على أساس أن يحدث درجة قساوة معتدلة حيث إن القساوة الزائدة تصعب عملية القطع Sectioning فيما بعد، وكذلك إذا بقي النسيج بعد التثبيت ليناً بدرجة كبيرة، فإن ذلك سيشكل صعوبة في التحكم في النسيج وتقطيعه بشكل جيد.

الغسل Washing

بعد انتهاء عملية التثبيت للأنسجة الطرية؛ وانتهاء عملية نزع الكلس للأنسجة الصلبة، تمر العينات النسيجية بمرحلة الغسل، والتي تهدف إلى تحقيق فائدتين هما:

١ـ الحد من الإفراط في تثبيت العينة Overfixation تلافياً للآثار السلبية التي قد تطرأ على النسيج إذا طالت مدة التثبيت.

٢ـ منع تداخل بقايا المثبت غير المتحدة مع المواد الأخرى المستخدمة في الخطوات اللاحقة، وخاصة عملية الصبغ Staining

ويمكن استخدام عدة سوائل للغسل تعتمد على مكونات المثبت المستخدم في مرحلة التثبيت:

١) الماء الجاري Tapwater : فعند استخدام المثبتات المائية Aqueous fixatives وهي المثبتات التي يدخل الماء في تحضيرها، يجب غسل الأنسجة بماء الصنبور الجاري، وذلك بوضع العينات النسيجية المثبتة في وعاء زجاجي مناسب تحت الصنبور، وفتح تيار مائي رفيع في زاوية الوعاء ليتسنى للماء أن يبقى جارياً على النسيج للمدة المطلوبة، حيث تتناسب مدة الغسل طردياً مع قوة المثبت، ونوع المثبت، وفترة التثبيت، وحجم النسيج.

٢) **الكحول الايثيلي** Ethyl alcohol : حيث يستخدم الكحول لغسل العينات المثبتة بمثبتات غير مائية Non-aqueous fixatives ، وهي التي يدخل الكحول في تحضيرها بدل الماء حيث يتم غسل الأنسجة بتراكيز كحولية مساوية لتراكيزها في المثبت.

ويفضل أن تعامل الأنسجة بمحلول اليود المشبع في كحول ٧٠٪ بعد غسلها بالكحول في حالة استخدام مثبتات كيميائية تحتوي على مادة كلوريد الزئبق للتخلص من بقايا هذه المادة في النسيج.

الوحدة الثانية

نزع الكلس

وتشمل:

- نزع الكلس.
- طرق معرفة الانتهاء من نزع الكلس

الوحدة الثانية

نزع الكلس

وتشمل:

- نزع الكلس.
- طرق معرفة الانتهاء من نزع الكلس

الوحدة الثانية

نزع الكلس Decalcification

إن من بين العينـــات النسيجية التي يطلب تحضير شرائـــح منهـــا لتشخيص أمـراضهـا، عينـاتٌ من أنسجـة العـظام والأسنان، والغضاريف، وبعض الأنسجة والغدد المتكلسة أو المتدرنة، وجميع هذه الأنسجة ذات تركيب صلب بسبب وجود أملاح الكالسيوم بشكل رئيس وبعض العناصر الأخرى بين خلاياها وأجزائها، مما يجعل امكانية تقطيعها إلى مقاطع رقيقة لتحضير الشرائح صعباً جداً. وللتخلص من هذه العقبة في تشخيص حالات أمراض العظام والأنسجة الصلبة بشكل عام، وجد أنه من الضروري التخلص من هذه الأملاح وإزالتها من النسيج الصلب، وتحويله إلى نسيج طري يسهـل التعـامل معه كأي نسيج آخر، وهذه العملية هي ما يسمى عملية نزع الكلس (Decalcification)

محاليل نزع الكلس (Decalcifiers)

وقـد وجـد أن هذه العملية يمكن أن تتم باستخدام محاليل تتفاعل مع أملاح الكالسيوم وترسبها من بين خلايا وأجزاء النسيج، وهذه المحاليل تسمى محاليل نزع الكلس (Decalcifiers).

وقد استخدم لهذا الغرض عدة محاليل تشترك جميعها بأنها تتكون من:

أ ـ أحماض قويـــة Strong acids

ب ـ أحماض ضعيفة Weak acids

* **الأحماض القوية** **Strong acids**

من أهمها:

١ ـ حامض النيتريك Nitric acid

٢ ـ حامض الهيدروكلوريك (Hydrochloric acid (Hcl

تستعمل هذه الأحماض على شكل محاليل مخففة بنسبة ٥ ـ ١٠٪، وتمتاز بقوتها وسرعتها في نزع الكلس، ولكن إذا طالت مدة غمر النسيج بها فإن لها آثاراً سلبية على النسيج بإحداث بعض التغييرات في النسيج كاللون الأصفر الذي يكسبه حامض النيتريك للنسيج خاصة إذا كان الحامض قديم التحضير، ولتلافي هذا الأثر يستخدم حامض النيتريك الطازج أو يضاف إليه ١٪ يوريا عند تحضيره كمادة حافظة.

وتستخدم الأحماض القوية في الحالات الطارئة، وفي الحالات التي تكون فيها صلابة النسيج قليلة نسبياً.

وتستخدم الأحماض القوية كمحاليل نازعة للكلس على الأشكال التالية:

١ ـ محلول حامض النيتريك **Aqueous nitric acid**

ويتكون من:

ـ حامض النيتريك المركز (٧٠٪)	٥ ـ ١٠ مل
ـ ماء مقطر	نكمل الحجم إلى ١٠٠ مل

٢ ـ محلول بيرنييز **Perenyi's fluid**

ويتكون من:

ـ حامض النيتريك تركيز ١٠٪	٤٠ مل

- كحول اثيلي مطلق (١٠٠٪) ٣٠ مل
- حامض الفورميك تركيز ٥ , ٠٪ ٣٠ مل

وتخلط المكونات قبل الاستعمال مباشرة.

٣ - محلول حامض النيتريك - فورمالين Aqueous nitric acid - Formalin

ويتكون من:

- فورمالين (٣٧ - ٤٠٪) ١٠ مل
- ماء مقطر ٨٠ مل
- حامض النيتريك المركز (٧٠٪) ١٠ مل

* **الأحماض الضعيفة Weak acids**

ومن أهمها:

١ - حامض الفورميك Formic Acid
٢ - حامض الخليك Acetic acid
٣ - حامض البكريك Picric acid

يستخدم حامض الفورميك فقط من بين هذه المحاليل كنازع للكلس بشكل مباشر، أما حامض الخليك وحامض البكريك فهما يدخلان في تركيب بعض المحاليل المثبتة مثل محلول كارنوي Carnoy's fluid ، ومحلول هايدنهين Heidenhain's fluid ويعملان خلالهما كمحاليل نازعة للكلس بالإضافة لعملهما كمحاليل تثبيت.

ويمكن استخدام حامض الفورميك على شكل محلول بنسبة ٥ - ١٠٪ لوحده أو مضافاً إليه بعض المحاليل الأخرى كالفورمالين أو محلول منظم Buffer لتخفيف الأضرار الناجمة من أثر الحامض على النسيج.

وينصح باستعمال حامض الفورميك في الحالات غير الطارئة أو الروتينية، لأنه يحتاج إلى وقت طويل في نزع الكلس من العينات النسيجية.

ويتم تحضير حامض الفورميك بالأشكال التالية:

١ ـ محلول حامض الفورميك **Aqueous formic acid**

ويتكون من:

ـ حامض الفورميك تركيز ٩٠٪	٥ ـ ١٠ مل
ـ ماء مقطر	تكمل الحجم إلى ١٠٠ مل

٢ ـ محلول حامض الفورميك ـ فورمالين **Formic acid - Formalin**

ويتكون من:

ـ حامض الفورميك تركيز ٩٠٪	٥ ـ ١٠ مل
ـ فورمالين	٥ مل
ـ ماء مقطر	تكمل الحجم إلى ١٠٠ مل

٣ ـ محلول حامض الفورميك الملطف **Buffered formic acid**

ويتكون من:

ـ ٢٠٪ محلول سترات الصوديوم	٦٥ مل
ـ حامض الفورميك تركيز ٩٠٪	٣٥ مل

وتكون درجة الحموضة لهذا المحلول حوالي ٢,٣.

*** جهاز الشوارد لنزع الكلس** **Electrolytic method**

يستخدم جهاز الشوارد لتسريع عملية نزع الكلس باستخدام تيار كهربائي يمرر خلال محلول نزع الكلس الذي تغمر فيه العينة؛ ويتكون الجهاز من قطبين من

صفائح الكربونية: موجب وسالب، يغمسان في المحلول، وترتبط العينة بالقطب الموجب ثم يمرر التيار الكهربائي مما يجعل أيونات الكالسيوم تترسب على القطب السالب بعد تحررها من العينة بفعل المحلول، ويتكون المحلول المستخدم في هذا الجهاز من:

ـ حامض الفورميك تركيز ٩٠٪	١٠٠ مل
ـ حامض الهيدروكلوريك المركز	٨٠ مل
ـ ماء مقطر	نكمل الحجم إلى ١٠٠٠ مل

* **أسس اختيار محلول نزع الكلس:**

يعتمد اختيار محلول نزع الكلس المناسب على عدة عوامل أهمها:

١ـ درجة استعجال الحالة.

٢ـ درجة صلابة النسيج.

٣ـ طريقة الصبغ المستخدمة بعد تحضير الشرائح لتأثر الصبغة بمحلول نزع الكلس المستخدم.

* **إجراءات نزع الكلس:**

١ـ يفضل أن تكون العينة بحجم صغير يسمح لمحلول نزع الكلس بالنفاذ لجميع أجزاء النسيج. (يجب أن لا يزيد سمك العينة عن ٥ ملم).

٢ـ تعلق العينة في الثلث العلوي من المحلول.

٣ـ تغمر العينة في المحلول بهذه الطريقة لفترة من الزمن تختلف اعتماداً على عدة عوامل:

١ـ تركيز المحلول.

٢ـ درجة الحرارة.

٣ـ حجم المحلول.

٤ـ حركة العينة داخل المحلول.

وتتناسب مدة غمر العينة تناسباً عكسياً مع جميع هذه العوامل، ويفضل أن يكون حجم المحلول كبيراً بالنسبة للعينة حوالي (٢٠ ضعفاً)، ويجب تغييره يومياً.

٤ـ تفحص العينة يومياً لمعرفة درجة نزع الكلس.

٥ـ عند الانتهاء من نزع الكلس يعادل الوسط الحامضي للنسيج بإضافة قاعدة مثل كبريتات الصوديوم ٥٪.

٦ـ يغسل النسيج بالماء الجاري طوال الليل أو كحول ٩٠٪ ثم ٧٠٪ لمدة ١٢ ـ ١٨ ساعة، وذلك حسب محلول نزع الكلس المستخدم.

٧ـ متابعة المعالجة النسيجية كأي نسيج طري.

طرق معرفة الانتهاء من نزع الكلس

تستخدم عدة طرق لمعرفة درجة نزع الكلس من الأنسجة الصلبة للتأكد من انتهاء نزع الكلس تماماً من العينة قبل إتمام المعالجة النسيجية وهذه الطرق هي:

١ ـ الطريقة الكيميائية Chemical method

نستخدم في هذه الطريقة محلول الامونيا المركزة، ومحلول اكسلات الامونيوم المائية المشبعة، وتتم الطريقة الكيميائية حسب الخطوات التالية:

أ ـ نأخذ ٥ مل من محلول نزع الكلس المستخدم في أنبوب اختبار ونغمر بها ورقة عباد الشمس التي تأخذ اللون الأحمر، لأن الوسط حامضي.

ب ـ نضيف محلول الامونيا المركزة إلى الأنبوب نقطة نقطة حتى يتحول الوسط إلى وسط متعادل، ويكشف عنه بتحول لون ورقة عباد الشمس إلى اللون البنفسجي.

ج ـ نلاحظ تكون راسب هو عبارة عن هيدروكسيد الكالسيوم دلالة على عدم انتهاء عملية نزع الكلس، وإذا لم يتكون الراسب تكون العملية منتهية.

د ـ للتأكد من انتهاء نزع الكلس نضيف كمية من محلول اكسلات الأمونيوم المائية المشبعة إلى الأنبوب ونتركه لمدة نصف ساعة، ثم نلاحظ تكون الراسب، فإذا لم يتكـون تكـون عملية نزع الكلس منتهية تماماً، وإذا تكون الراسب تكون العينة بحـاجة إلى فترة إضافية في محلول نزع الكلس لإتمام العملية. وهذه الطريقة جيدة وغير مكلفة.

٢ ـ طريقة التصوير الشعاعي Radiography

وتتلخص بتصوير العينات بواسطة الأشعة السينية (X-ray) ، فإذا ظهر في صور العينات مناطق قاتمة، دل ذلك على وجود بقايا أملاح الكالسيوم في النسيج، أي أن عملية نزع الكلس لم تنته بعد، وهذه طريقة سهلة، ولكنها مكلفة.

٣ ـ طريقة الكشف بالجس أو الوخز بواسطة الإبرة Needling test

وتتم بوخز العينة من جميع الجهات بواسطة إبرة رفيعة للتأكد من تحولها إلى عينة طرية تنغرز الإبرة فيها بسهولة دلالة على انتهاء نزع الكلس، ولكن لهذه الطريقة عدة مساوىء أهمها إتلاف النسيج وأنها ليست أكيدة.

الوحدة الثالثة

المعالجة النسيجية

وتشمل:

- **التجفيف**.
- **التشفيف أو التنقية**.
- **التشريب أو الإشباع**.
- **الطمر أو الإدماج**.

الوحدة الثالثة

المعالجة النسيجية Tissue Processing

تعرف المعالجة النسيجية بأنها مجموعة عمليات متسلسلة تجرى على الأنسجة بعد تثبيتها وغسلها، وتهدف هذه العمليات إلى إمكانية وضع العينة في قالب من مادة داعمة تدعى مادة الطمر أو الإدماج، وغالباً ما تكون مادة شمعية هي البارافين Paraffin من أجل سهولة التحكم بها وتقطيعها إلى شرائح نسيجية رقيقة، ولما كانت مادة الطمر غير ذائبة في الماء المستخدم في مرحلة الغسل، كان لا بد من مرور العينة النسيجية بعدة مراحل باستخدام عدة مواد بتراكيز مختلفة لتهيئة النسيج لتقبل دخول مادة الطمر داخل النسيج والخلايا لتكسبها الدعامة اللازمة.

ويجدر الذكر هنا أن في كل مرحلة من مراحل المعالجة النسيجية تستخدم مادة أو محلول مناسب بحيث تستطيع هذه المادة تخليص النسيج من المادة المستخدمة في المرحلة السابقة وتهيئة النسيج لتقبل المادة اللاحقة، ولذا كان التسلسل ضرورياً في إجراء هذه العمليات.

وتشتمل المعالجة النسيجية على العمليات التالية بالترتيب:

١ ـ التجفيف Dehydration
٢ ـ التشفيف أو التنقية Clearing
٣ ـ التشريب أو الإشباع Infiltration
٤ ـ الطمر أو الإدماج Embedding

التجفيف Dehydration

تهدف عملية التجفيف إلى التخلص من مادة الغسل والتي غالباً ما تكون الماء الجاري، وذلك باستخدام محاليل تجفيف لها القدرة على إخراج الماء من النسيج وتهيئته لاستقبال المادة المستخدمة في مرحلة التنقية التي تلي التجفيف.

ـ محاليل التجفيف الشائعة Common dehydrating fluids

١ ـ الكحول الايثيلي Ethanol ($C_2 H_5 OH$)

الكحول الايثيلي هو سائل نقي عديم اللون قابل للاشتعال، وله رائحة مقبولة، وهو من المواد المحبة للماء Hydrophilic ويذوب في الماء والمذيبات العضوية بشكل جيد، ولذلك يستخدم كمحلول تجفيف شائع الاستخدام في علم الأنسجة إلّا أنه مكلف نوعاً ما.

٢ ـ الكحول الميثيلي Methanol (CH_3OH)

الكحول الميثيلي هو سائل نقي عديم اللون قابل للاشتعال، لكنه سام وذو رائحة مزعجة غير محببة. وهو يذوب في الماء والكحول الايثيلي ومعظم المذيبات العضوية، ولذا نادراً ما يستخدم هذا المحلول للتجفيف في الأنسجة، ولكن يمكن استخدامه بنفس طريقة الكحول الايثيلي والتي سنشرحها فيما بعد.

٣ ـ الاسيتون Acetone (CH_3COCH_3)

الاسيتون هو سائل نقي عديم اللون قابل للاشتعال أيضاً، وله رائحة قوية مميزة، يذوب في الماء والكحول الايثيلي ومعظم المذيبات العضوية، وما يميزه أنه متطاير أكثر من أي من المحاليل السابقة، وقوي المفعول كمجفف، ولكنه يكسب النسيج صلابة زائدة وجفافاً شديداً، مما يجعله غير مستعمل كمجفف روتيني في عمليات المعالجة الآلية لسرعة تطايره وتقسيته الزائدة للنسيج، ولكنه يعتبر محلول

التجفيف الأفضل عندما يراد إجراء العمليات النسيجية بسرعة للحصول على تشخيص سريع.

* كيفية إجراء عملية التجفيف:

سنشرح عملية التجفيف باستخدام الكحول الايثيلي Ethanol حيث يعتبر الكحول الايثيلي الأكثر شيوعاً من بين محاليل التجفيف.

١- يتم تحضير عدة تراكيز متسلسلة من الكحول الايثيلي تبدأ بتركيز ٧٠٪، ثم ٨٠٪، ثم ٩٦٪، ثم كحول مطلق Absolute (١٠٠٪). ويفضل أن تبدأ التراكيز بالتركيز ٣٠٪ للعينات الطرية والهشة كالعينات الجنينية.

٢- تغمر العينات النسيجية في كل تركيز مدة مناسبة من الزمن غالباً ما تكون ساعةواحدة؛ بالترتيب ابتداءً من التركيز الأقل، وانتهاءً بالتركيز المطلق، حيث تكرر الخطوة الأخيرة مرتين، أي أنه يغمر النسيج في وعائين من الكحول المطلق في كل وعاء لمدة ساعة.

ويهدف التسلسل في التركيز من الأقل إلى الأعلى إلى التخلص من المحتوى المائي للنسيج بطريقة تدريجية مع المحافظة على عدم حدوث انكماش للأنسجة والخلايا نتيجة الاختلاف في الضغط الاسموزي بين خارج وداخل الخلية أثناء الغمر حيث إنه إذا غمر النسيج في الكحول المطلق مباشرة فإن الماء سيخرج من الخلايا بشكل مفاجيء نتيجة الاختلاف الكبير في الضغط الاسموزي بين داخل وخارج الخلية.

التنقية أو التشفيف Clearing

سميت هذه العملية بالتنقية نسبة إلى مظهر النسيج بعد إجراء هذه العملية حيث يصبح أكثر شفافية ونقاءً، وتهدف عملية التنقية إلى تهيئة النسيج لتقبل ودخول مادة الطمر أو الإدماج في الخطوة اللاحقة، والتي غالباً ما تكون شمع البارافين، وحيث

إن مادة التجفيف لا تذوب في الشمع ولا تذيبه، جاءت مرحلة التنقية لتخليص النسيج من مادة التجفيف وتهيئته لدخول مادة الطمر، ولذا كان من الضروري أن تكون مادة التنقية قادرة على إذابة كل من المادة السابقة (مادة التجفيف)، والمادة اللاحقة (مادة الطمر).

هناك عدة محاليل تستخدم للتنقية تشترك جميعها في قدرتها على إذابة كل من الكحول والشمع، ولاختيار محلول التنقية المناسب نعتمد عدة أسس منها:

١ـ سرعة إزالة الكحول من النسيج.
٢ـ سهولة استبداله بمادة الإشباع والطمر (الشمع).
٣ـ تقبل الأنسجة لمادة التنقية وأن لا يكون لها أثر سلبي على النسيج.
٤ـ قابليته للاشتعال، حيث يفضل عدم استخدام المواد القابلة للاشتعال كأساس للوقاية والسلامة العامة في المختبرات.
٥ـ درجة السميّة، حيث يفضل استخدام المحاليل الأقل سمية بشكل عام.
٦ـ تكلفة وتوفر المحلول، حيث يفضل اختيار المحلول المعتدل الكلفة والمتوفر باستمرار في السوق.

* أهم المحاليل المستخدمة للتنقية:

١ ـ الزايلين Xylene

يعتبر الزايلين من محاليل التنقية الشائعة الاستخدام للأغراض الروتينية، وهو قابل للاشتعال بشدة، لذلك يعتبر على درجة من الخطورة، ولكنه يعطي شفافية جيدة للأنسجة، وهو سريع التطاير رخيص الثمن.

٢ ـ التولوين Toluene

يمتلك التولوين نفس خصائص الزايلين تقريباً، إلّا أنه أقل أثراً في تحطيم النسيج إذا طالت مدة غمر النسيج فيه، ويفيد كمحلول تنقية في طرق المعالجة

الآلية، ولكنه غالي الثمن، وقابل للاشتعال، ويصعب إزالته من النسيج أثناء مرحلة الإشباع.

٣ ـ الكلوروفورم Chloroform

يتميز الكلوروفورم كمحلول تنقية ببطء فعاليته بالنسبة للمحلولين السابقين، وكذلك بقاء أية آثار للكلوروفورم في النسيج يؤدي إلى صعوبة في التقطيع، وبالرغم من أن بخاره غير قابل للاشتعال، إلاّ أنه يحرر غازاً ساماً يسمى فوسجين (Phosgene) عند تعرض بخاره للحرارة.

٤ ـ البنزين Benzene

يمتاز البنزين بخصائص شبيهة بخصائص الزايلين من حيث سرعة التطاير، وقابليته للاشتعال، وتخلله السريع للأنسجة، إلاّ أنه لا ينصح باستخدامه بسبب بخاره السام والمسرطن.

٥ ـ زيت خشب الأرز Cedarwood oil

يعتبر زيت خشب الأرز من محاليل التنقية بطيئة الفعالية، ولكنه يمتاز بتسببه بأقل قدر من التقسية والانكماش للنسيج لذلك فهو يستخدم للأغراض العلمية والدراسات الجنينية بشكل خاص أكثر من استخدامه بشكل روتيني.

التشريب أو الإشباع Infiltration

تعرف عملية التشريب أو الإشباع بأنها عملية إدخال مادة داعمة بين خلايا النسيج لإكسابه التقوية اللازمة للعملية اللاحقة وهي الإدماج، وتستعمل لعملية الإشباع عدة مواد من أهمها مادة شمع البارافين Paraffin wax .

ـ خصائص شمع البارافين Paraffin wax properties

شمع البارافين هو عبارة عن مزيج من الهيدروكربونات الناتجة عن تفكك

الـزيوت المعـدنية، وهـو من أكثـر مواد الإشباع والإدماج شيوعاً لـسهولة استخدامه ورخص ثمنه وتوفره باستمرار.

ويوجد نوعان من شمع البارافين:

١ ـ شمع البارافين الطري Soft paraffin

تتراوح درجة انصهاره من ٥٠ ـ ٥٥°م، ويمكن استخدامه للحصول على مقاطع نسيجية سميكـة متصلة على شكل شريط نسيجي (Ribbon) ، ويستخدم الشمع الطري للأنسجة الطرية Soft tissues ، وفي الأماكن ذات الحرارة المنخفضة حيث لا يمكن استعماله في المناطق الحارة جداً.

٢ ـ شمع البارافين الصلب Hard paraffin

تتـراوح درجـة انصهـاره من ٥٦ ـ ٦٨°م، يفضـل استعمـاله عند الحاجة إلى الحصول على مقاطع رقيقة Thin sections ، وكذلك يستخدم للأنسجة الصلبة Hard tissues ، لضـرورة التجـانس بين النسيج والشمـع. وهـو النوع المفضل في المناطق الحارة لمقاومته لارتفاع درجة الحرارة.

*** إجراء عملية الإشباع:**

تتم عملية الإشباع بالخطوات التالية:

١ـ يصهـر الشمـع في وعاء مذيب الشمع وذلك برفع درجة حرارته أعلى من درجة انصهار الشمع بدرجتين تقريباً.
٢ـ يغمر النسيج في الشمع المذاب لمدة ساعة إلى ساعتين.
٣ـ ينقـل النسيج إلى وعـاء شمـع آخـر بنفس المدة السابقة لضمان تخلل الشمع المذاب بين أجزاء النسيج والخلايا.

وتتناسب مدة الغمر في وعاء الشمع المذاب طردياً مع صلابة النسيج وحجم العينة.

الطمر أو الإدماج Embedding

تعتبر عملية الإدماج آخر العمليات التي تجرى على النسيج قبل تقطيعه إلى شرائح نسيجية رقيقة. وتعرف هذه العملية بأنها تهيئة النسيج لعملية التقطيع، وذلك بوضعه داخل قالب من الشمع (Block) بهيئة مناسبة لتقطيعه إلى مقاطع نسيجية رقيقة.

تستعمل للإدماج عدة مواد من أهمها:

١ـ شمع البارافين Paraffin wax يستعمل للأغراض الروتينية.
٢ـ السلودين Cellodin يستعمل لإدماج العينات النسيجية الصلبة كالعظام والأسنان، وكذلك لشرائح الأعضاء الكاملة.
٣ـ البارابلاست Parablast للأغراض الروتينية التي تحتاج لشرائح رقيقة.
٤ـ الجيلاتين Gelatine يستخدم لإدماج العينات المقطعة بجهاز التقطيع الجليدي.

ولكل مادة من هذه المواد استخدامات خاصة، ويتم اختيار مادة الإدماج المناسبة اعتماداً على نوع النسيج، وسمك المقطع المطلوب. وسنشرح عملية الإدماج بشمع البارافين بالتفصيل، ونكتفي بذكر طرق الإدماج بالمواد الأخرى بشيء من الإيجاز.

* **إجراءات الطمر بشمع البارافين:**

١ـ يطلى القالب المعدني أو البلاستيكي أو الورقي الذي يسكب فيه الشمع بكمية قلية من مادة زيتية كالجليسرول لسهولة إخراج القالب الشمعي (Block).
٢ـ يسكب جزء من الشمع المنصهر في القالب وتثبت فيه العينة النسيجية بواسطة ملقط يسخن قبل الاستعمال، بحيث يكون سطح القطع المطلوب موازٍ لقاعدة القالب.
٣ـ يملأ القالب بالشمع المنصهر بشكل يضمن عدم تكون طبقتين من الشمع، أو

تكون فقاعات هوائية داخل الشمع، ويتم ذلك بسكب الشمع مرةً واحدة دون تردد.

٤- يبرد القالب بسرعة بالماء البارد أو بنقله إلى الصفيحة الباردة في جهاز الطمر الحديث إذا كان متوفراً.

* **الطمر أو الإدماج بالسلودين Celloidin embedding**

يستخدم السلودين كمادة إشباع وطمر للعينات الصلبة التي تحتاج لنزع الكلس كالعظام، والأسنان، والأنسجة المتكلسة؛ كما يفيد السلودين في تحضير شرائح نسيجية لأعضاء كاملة لأغراض الدراسة التشريحية. ويمتاز السلودين بعدة خصائص أهمها:

١- يستخدم للعينات الصلبة ودراسة الأجنّة والأعضاء الكاملة.
٢- يسبب بعض الانكماش للأنسجة كما أنه يتأثر بالرطوبة.
٣- لا يمكن الحصول على مقاطع رقيقة باستخدامه في الإدماج حيث يعطي مقاطع تزيد عن ٢٠ ميكرون سمكاً، وله طريقة خاصة في الإشباع.
٤- يستغرق وقتاً طويلاً في تحضير القالب.

* **اجراءات الإدماج بالسلودين:**

١- يحضر السلودين وهو عبارة عن مادة صلبة مكونة من Nitrocellulose بتذويبها بالكحول المطلق بنسبة ١ : ١.
٢- تغمر العينة بمحلول السلودين تركيز ٨٪ في القالب.
٣- تزال فقاعات الهواء من القالب باستخدام جهاز تجفيف يحتوي على بخار الإيثر.
٤- يجفف القالب باستخدام بخار الكلوروفورم حتى يصبح ذو قوام مطاطي.
٥- يغمر القالب في الكلوروفورم السائل، ثم في الكحول حتى يصبح صلباً، ثم يقطع.

- **الطمر بالبارابلاست Parablast embedding**

البـارابـلاست هو عبارة عن خليط من البارافين، ومادة بلاستيكية مرنة، درجة انصهارها ٥٦°م.

تستخدم نفس طريقة الإشباع والإدماج بالبارافين إلّا أنه يمتاز عن البارافين بأنه لا يحتاج إلى تبريد سريع للقوالب، كما أنه لا يكون بلورات، ويمتاز بدرجة مرونة عالية أكثر من شمع البارافين. ويعطي شرائح رقيقة جيدة عند التقطيع.

- **الطمر بالجيلاتين**: يستخدم الجيلاتين للمقاطع الجليدية وسيمر ذلك لاحقاً.

الوحدة الرابعة

جهاز معالجة الأنسجة

وتشمل:

- جهاز المعالجة الآلي.
- البدائل اليدوية لمعالجة الأنسجة.

الوحدة الرابعة

جهاز المعالجة الآلي Tisuue Processor

لقد أدى تطور علم الأنسجة والتحضير النسيجي كغيره من سائر العلوم إلى اختراع أجهزة آلية تساعد في الحصول على نتائج أفضل بوقت وجهد أقل في تحضير مقاطع نسيجية جيدة. ومن بين هذه الأجهزة المهمة: جهاز المعالجة الآلي Tissue Processor.

* **فوائد الجهاز:**

١ـ توفير الجهد البشري حيث يقوم الجهاز بإنجاز عمل يحتاج لعدد من الفنيين للقيام به.

٢ـ توفير الوقت حيث يمكن استغلال فترة الليل لإتمام خطوات معالجة الأنسجة بينما لا يمكن استغلالها بالطرق اليدوية العادية.

٣ـ الحصول على نتائج أكثر دقة من الطريقة اليدوية في المعالجة حيث يقوم الجهاز بنقل العينات من محلول لآخر أثناء مراحل المعالجة بطريقة آلية دقيقة لا تعتمد على ذاكرة الفني المعرضة للخطأ والنسيان.

* **تركيب الجهاز:**

يتكون الجهاز من عدة أجزاء رئيسة هي:

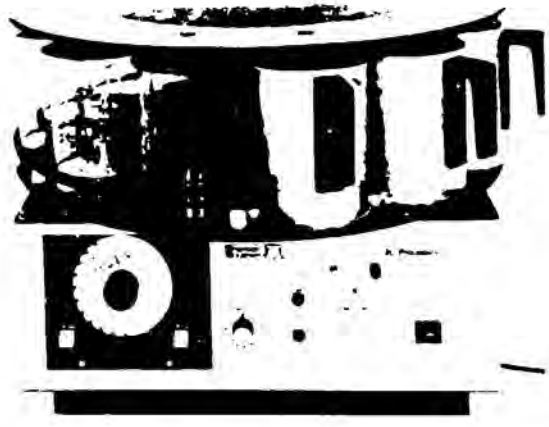
١ـ **المنضدة** Plateform ، وهي عبارة عن قرص معدني يحمل أوعية المحاليل.

٢ـ أغطية الأوعية المرتبطة بقرص دائري مطابق من حيث الحجم مع المنضدة لإغلاق الأوعية أثناء عمل الجهاز. ويحمل السلة المحتوية على العينات النسيجية والتي قد يصل عددها إلى ٦٠ عينة في وقت واحد.

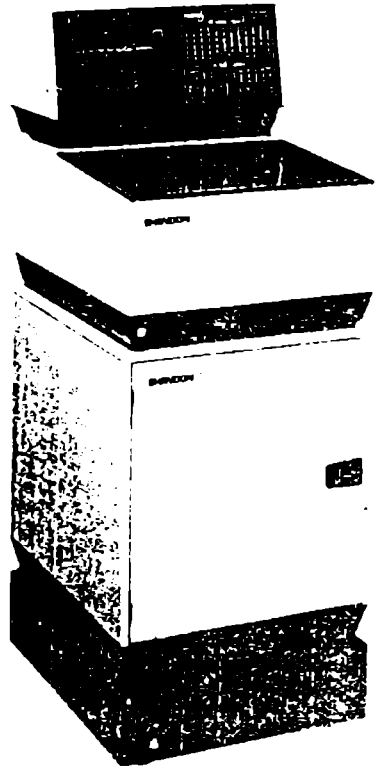
٣ـ ذراع الحركة Transfer form وهو عبارة عن ذراع متصل مع مولد الحركة في الجهاز من جهة، ومع قرص غطاء الأوعية من جهة أخرى الذي يحمل بدوره السلة المحتوية على العينات النسيجية.

٤ـ مولد الحركة الكهربائي والذي يتحكم بعمل الجهاز وآلية أدائه.

٥ـ جهاز التوقيت، وهو عبارة عن ساعة دائرية الشكل تبرمج يدوياً لجميع مراحل المعالجة من التثبيت إلى الإشباع. وقد أصبحت بعض الأجهزة الحديثة مزودة بجهاز توقيت الكتروني مرتبط بجهاز حاسوب Computer لبرمجة الجهاز.



شكل رقم (١)
جهاز المعالجة الآلي



شكل رقم (١) ب
معالج الأنسجة الآلي
الصورة من شركة :

Shandon Southern Instruments Inc., Sewickley, Pennsylvania

* **آلية عمل الجهاز:**

لجهاز المعالجة ثلاث حركات هي :

١ـ حركة الذراع للأعلى والأسفل.
٢ـ حركة دائرية.

٣ـ حركة اهتزازية خفيفة لتعريض العينات للمحاليل بشكل أكبر ومستمر خلال مراحل المعالجة.

* **طريقة التشغيل:**

١ـ تملأ الأوعية بالمحاليل اللازمة لخطوات التثبيت والمعالجة بالترتيب.

٢ـ توضع العينات في السلة المخصصة والتي تسمح بتخلل المحلول للعينات، ووضع السلة في الوعاء رقم (١) في برنامج المعالجة (المثبت).

٣ـ يبرمج الجهاز ويشغل حيث إنه بعد انتهاء زمن الخطوة الأولى يتحرك الذراع الحركة الأولى للأعلى، ويرفع السلة من الوعاء الأول ثم يدور الحركة الدائرية الثانية باتجاه عقارب الساعة، ثم ينزل للأسفل فيكون قد نقل العينات إلى المحلول الثاني في الخطوة الثانية لتبقى العينات المدة اللازمة، وخلال هذه المدة يتحرك الذراع الحركة الثالثة الاهتزازية بتعريض العينات للمحلول بشكل مستمر.

٤ـ تستمر هذه الحركات بالتسلسل حتى يصل النسيج إلى الخطوة الأخيرة في البرنامج، ثم يقف الجهاز وتخرج العينات وتطمر ثم تقطع وتصبغ.

* **طريقة برمجة الجهاز يدوياً:**

يتكون جهاز التوقيت اليدوي من ساعة دائرية مقسمة إلى ٢٤ ساعة، وكل ساعة مقسمة إلى أربعة أرباع بواسطة روافع معدنية عند كل ربع ساعة، ويخرج من مركز الساعة مؤشر تحدد بواسطته بداية المعالجة، حيث يحسب الزمن لكل خطوة، وترفع الرافعة المعدنية بين كل خطوة وأخرى، فعندما يصل المؤشر المتحرك عند الرافعة المعدنية المرفوعة يوعز للجهاز بالدوران ونقل العينات إلى المحلول التالي كما مرّ سالفاً في طريقة التشغيل.

ملاحظات :

١ـ يجب مراعاة تبديل المحاليل كل فترة من العمل وتعتمد الفترة على كثافة العمل .

٢ـ يجب ضبط درجة حرارة الشمع في مرحلة الإشباع بواسطة ضابط الحرارة .

٣ـ يجب العناية بالجهاز وصيانته وتنظيفه بشكل دوري .

* **برنامج معالجة آلي مقترح**

رقم الوعاء	نوع المحلول المستعمل	اسم المرحلة	المدة المطلوبة
١ ـ	فورمالين مثبت ١٠٪	عملية تثبيت	ساعة واحدة على الأقل (مدة انتقالية)
٢ ـ	كحول ٧٠٪	عملية تجفيف	ساعة واحدة
٣ ـ	كحول ٨٠٪	عملية تجفيف	ساعة واحدة
٤ ـ	كحول ٩٥٪	عملية تجفيف	ساعة واحدة
٥ ـ	كحول ٩٥٪	عملية تجفيف	ساعة واحدة
٦ ـ	كحول مطلق ١٠٠٪	عملية تجفيف	ساعة واحدة
٧ ـ	كحول مطلق ١٠٠٪	عملية تجفيف	ساعتين
٨ ـ	كلوروفورم	عملية تنقية	ساعتين
٩ ـ	كلوروفورم	عملية تنقية	ساعتين
١٠ ـ	شمع البارافين	عملية إشباع	ساعتين
١١ ـ	شمع البارافين	عملية إشباع	ساعتين
١٢ ـ	شمع البارافين	عملية إشباع	مدة انتقالية حتى يتم الدمج

* **برنامج معالجة يدوي مقترح:**

يمكن معالجة الأنسجة يدوياً حسب البرنامج التالي:

١ ـ غسل العينات بالماء الجاري المدة اللازمة.	غسيل
٢ ـ كحول ٨٠٪ لمدة نصف ساعة.	تجفيف
٣ ـ كحول ٩٦٪ لمدة ساعتين.	تجفيف
٤ ـ كحول ٩٦٪ لمدة ساعتين.	تجفيف
٥ ـ كحول ٩٦٪ لمدة ساعتين.	تجفيف
٦ ـ كحول مطلق ١٠٠٪ لمدة ٩ ساعات.	تجفيف
٧ ـ كحول مطلق ١٠٠٪ لمدة ساعة.	تجفيف
٨ ـ كلوروفورم لمدة ساعتين.	تنقية
٩ ـ تجفيف العينات بقطعة قماش مبللة بالكلوروفورم.	تنقية
١٠ ـ شمع البارافين السائل لمدة ساعتين.	إشباع
١١ ـ شمع البارافين السائل لمدة ساعتين على الأقل.	إشباع
١٢ ـ طمر بالبرافين.	إدماج

الوحدة الخامسة

القطع

وتشمل:

- أجهزة القطع.
- تحضير العينات لعملية القطع.
- التقليم.
- مشاكل القطع.
- تحميل المقاطع على الشرائح.
- لصق المقاطع.

الوحدة الخامسة

عملية قطع الأنسجة Microtomy

● جهاز القطع Microtome :

حتى يتم دراسة المقاطع النسيجية تحت المجهر الضوئي يجب أن تكون رقيقة، بحيث يخترقها الضوء. ويتم الحصول على المقاطع الرقيقة بواسطة جهاز يعرف بجهاز القطع Microtome

ويتركب أي جهاز تقطيع من الأجزاء التالية:
سكين القطع، حامل السكين، حامل العينة، آلة دفع العينة أو السكين أثناء القطع، آلة ضبط السمك للمقاطع.

إن أغلب الأجهزة مصنوعة بحيث تبقى السكين ثابتة، وحامل العينة هو المتحرك، إلاّ أن بعضها يكون فيه القالب ثابت والسكين هي المتحركة. ويوجد خمسة أنواع من أجهزة التقطيع تستعمل لأغراض التدريس والمختبرات الطبية والأبحاث العلمية.

● أنواع أجهزة القطع (شكل ٢):

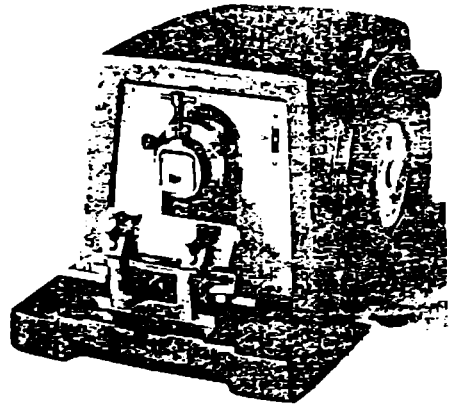
١ ـ جهاز التقطيع الهزاز Rocking microtome

جهاز بسيط سهل الصيانة والاستعمال، يستعمل لأغراض التدريس، تكون فيه السكين ثابتة وقالب النسيج هو المتحرك، ويتركب الجهاز من قاعدة حديدية تحمل

مثبتاً للسكين، وذراع متحرك يرتكز على قاعدة في الوسط، وفي طرف الذراع المقابل للسكين يوجد حامل القالب الشمعي، والطرف الآخر يستعمل كمقبض للحركة. ويلاحظ أن شريط المقاطع التي تقطع بهذا الجهاز يكون منحنياً قليلاً، وذلك بسبب تحرك العينة أمام السكين بشكل قوسي. وعند استعمال الجهاز يفضل وضعه على وسادة اسفنجية لمنع انزلاقه حيث إنه خفيف الوزن.

٢ ـ جهاز التقطيع الدوّار Rotary microtome

وهو من أكثر الأنواع شيوعاً في مختبرات الأبحاث والتحاليل الطبية، وسمي بالدوار لأن آلية الدفع فيه تدار بشكل دائري بواسطة عجل دوّار على أحد جوانب الجهاز. تكون فيه السكين ثابتة وحامل العينة هو المتحرك، ومعظم هذه الأجهزة تحتوي على غطاء معدني يحفظ الآلات الميكانيكية الموجودة بداخله من الغبار والأذى الخارجي. ويوجد ضوابط لتثبيت السكين وتحديد درجة ميلها، ويتحرك حامل القالب بجميع الاتجاهات. ونتيجة للدوران اليدوي تتحرك العينة إلى الأمام نحو السكين حسب السمك المطلوب بحيث تكون الحركة صعوداً وهبوطاً. ومن ميزاته أنه يعطي شريط متسلسل من المقاطع الجيدة.

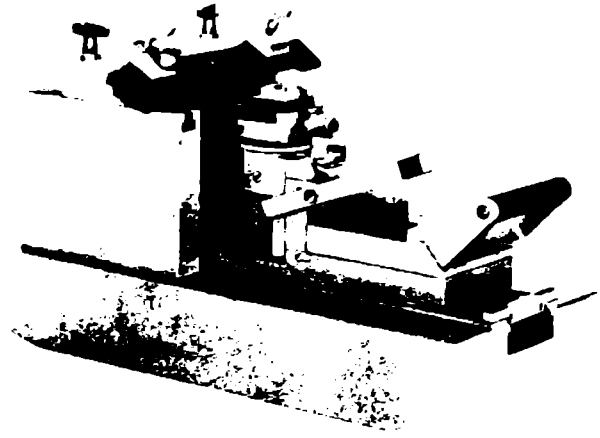


شكل رقم (٢) أ

التقطيع الدوار (الصورة من شركة American Optical)

٣ ـ جهاز التقطيع الانزلاقي Sliding microtome

وفيه تكون السكين هي المتحركة والعينة ثابتة، ويستعمل في مختبرات الأبحاث لإنتاج مقاطع نسيجية كبيرة قد تغطي عضو كامل، أو جسم كامل (كائنات صغيرة). ومن ميزاته أنه يمكن قطع الأنسجة المطمورة في وسائط البلاستيك والسيلودين والجيلاتين. وتكون فيه السكين أطول من سكاكين جهاز القطع الدوار مما يقلل الحاجة لشحذ السكاكين، وسمي بالانزلاقي لأن السكين تنزلق على قالب النسيج.



شكل رقم (٢) ب

جهاز التقطيع الانزلاقي (الصورة من شركة Leitz)

٤ ـ جهاز التقطيع الجليدي Freezing microtome

يستعمل هذا الجهاز لعمل مقاطع لأنسجة غير مثبتة أو مطمورة بهدف عمل مقاطع التشخيص المرضي النسيجي حال الحاجة إليها، وكذلك تستخدم لدراسة الدهون والأنزيمات التي تتغير حالتها عند المرور بخطوات التحضير النسيجي من التثبيت إلى الطمر. ولا يصلح هذا الجهاز لعمل مقاطع متسلسلة. وفي هذا الجهاز تكون قاعدة حمل العينة متصلة بأسطوانة ثاني أكسيد الكربون لتبريد العينة والسكين بسرعة، وذلك لتجميد العينة، وسهولة قطعها. والنوع المتقدم من هذا الجهاز يسمى

بجهـاز الكـريوستـات Cryostat حيث يزود بنظام لمنع تكون الضباب وبمصرف للثلج، وهناك أيضاً أماكن لحفظ حاملات الأنسجة وتكون درجة الحرارة في ثلاجة جهاز الكريوستات بين (-٥) إلى (-٣٠) درجة مئوية.

٥ ـ جهاز التقطيع الدقيق Ultramicrotome

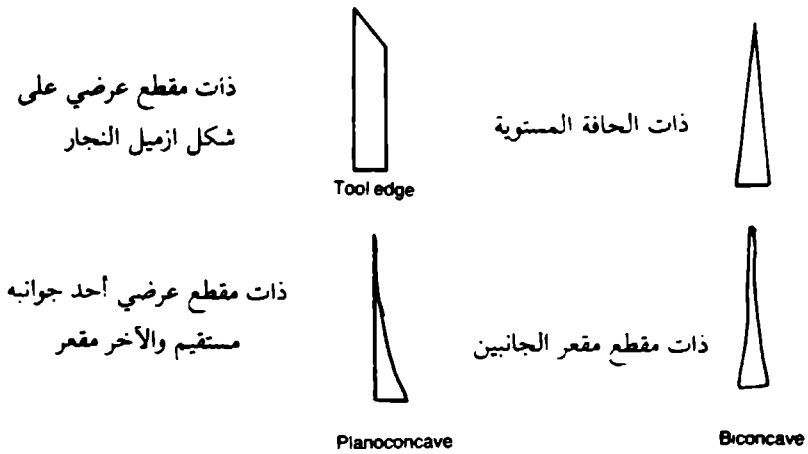
ويستعمل للدراسات المتعلقة بالمجهر الالكتروني في مختبرات الأبحاث حيث يمكن الحصـول على مقـاطـع فائقة الرقة يتراوح سمكها بين ٥٠ ـ ١٠٠ نانوميتر، ويحتاج هذا الجهاز إلى أنواع خاصة من السكاكين لقطع القوالب الصغيرة، وتكون هذه السكاكين من الزجاج أو الماس، ويعمل جهاز الدفع آلياً، ويتم القطع تحت مجهر ضوئي خاص.

*** سكاكين أجهزة القطع:**

من أهم العوامل التي يعتمد عليها في عمل مقاطع جيدة هو السكين، ويوجد أنواع مختلفة من السكاكين (شكل ٣).

أشكال السكاكين الفولاذية المستعملة

المقصود هنا شكل المقطع العرضي ،هي عديدة أهمها:



أشكال السكاكين الفولاذية

أ ـ السكاكين الفولاذية :

وهي مصنوعة من الفولاذ، وشائعة الاستعمال في التحضيرات المجهرية الضوئية، ويوجد منها عدة أشكال حسب شكل المقطع العرضي للسكين :

ـ ذات الحافة المستوية Wedge-shaped

ويكون جانبا الحد القاطع مستويين وهو شائع الاستعمال، ويستعمل لمقاطع الأنسجة المطمورة في قوالب البلاستيك أو الشمع أو العينات المجمدة.

ـ المقعرة الوجهين Biconcave

ويكون جانبا الحد القاطع مجوفان قليلاً، وتستعمل لقطع قوالب الشمع.

ـ المقعرة المستوية Plano-concave

ويكون أحد جانبي الحد القاطع مستوٍ، والآخر مجوف قليلاً، ويستعمل لقطع قوالب البلاستيك والسلويدين.

ـ سكاكين على شكل ازميل النجار Tool Edge

ويستعمل لقطع الأنسجة الصلبة المتكلسة، ولا تستعمل في الأعمال اليومية.

ب ـ السكاكين الزجاجية Glass knives

تستعمل للحصول على مقاطع رقيقة جداً من القوالب الشمعية، ويمكن استعمالها في المبشرة الجليدية لنفس الغرض، وتستعمل أيضاً في التحضيرات المجهرية الالكترونية.

جـ ـ السكاكين الماسية Diamond knives

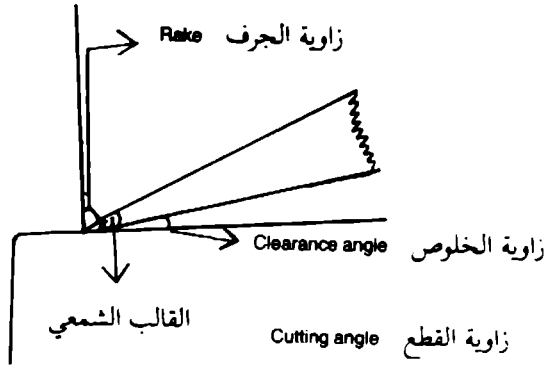
وهي سكاكين غالية الثمن، وتستعمل للتحضيرات المجهرية الالكترونية.

د ـ سكاكين تستخدم مرة واحدة Disposable knives

وتستعمل هذه السكاكين لمرة واحدة فقط، وتعطي مقاطع رقيقة جداً، ولا تحتاج إلى شحذ.

* الحد القاطع للسكين وزوايا القطع:

يعرف الحد القاطع للسكين على أنه مكان التقاء سطحي السكين في زاوية (تقارب ١٤°)، وتدعى هذه الزاوية بزاوية حد السكين Cutting Angle . أمّا الزاوية التي تمثل نقطة التقاء حد السكين القاطع مع سطح القالب (من أسفل حد السكين) فتعرف بزاوية الخلوص Clearance Angle (تقارب ٥ ـ ١٠°)، فإذا كانت هذه الزاوية كبيرة فسيحدث تجعد للمقاطع وتلتف على شكل أسطواني، أمّا إذا كانت صغيرة، فإن المقاطع ستلتصق على أعلى القالب بدلاً من انزلاقها على سطح السكين الحر. وهناك زاوية أخرى تعرف بزاوية الانحدار أو الجرف Rake Angle ، وهي الزاوية بين حد السكين القاطع وقالب الشمع (من أعلى حد السكين) (شكل ٤).



شكل رقم (٤)
زوايا القطع

ويستحسن أن تكون قاعدة السكين عريضة لضمان القوة والصلابة عند القطع، وكذلك يكون لها طولاً معقولاً للحد القاطع. وتنظف السكين قبل وبعد الاستعمال بفرشاة شعر الجمل، أو قطنة مبللة بالزايلين، ويكون التنظيف من القاعدة إلى الحد القاطع وليس العكس. كما أن لمس الحد القاطع بواسطة أشياء صلبة كالمشرط يعرضها للتلف. وتحفظ السكاكين عادة في علب خاصة ونظيفة. ويمكن ملاحظة الثلمات في السكين بفحصها تحت المجهر التشريحي.

* شحذ السكاكين Knives sharpening

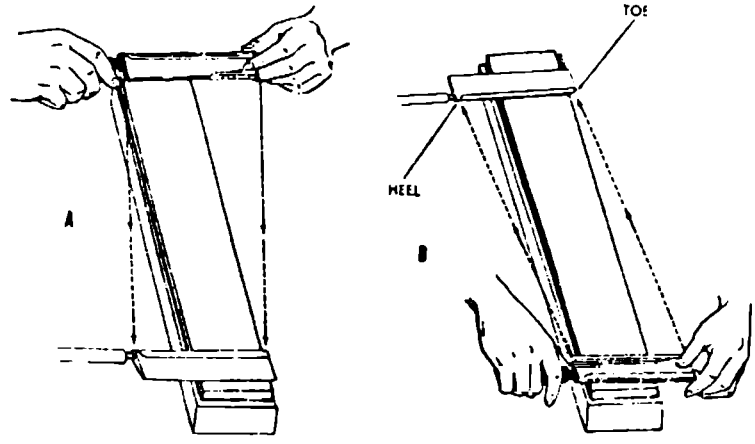
نتيجة للاستعمال المتكرر للسكاكين، فإنها تصبح غير حادة، وقد تتثلم. لذا نلجأ إلى عملية الشحذ لإزالة آثار التثلم، وبذلك نجعل حد السكين القاطع حاد تماماً. ويمكن شحذ السكاكين الكليلة بطريقتين هما السن والصقل.

أ ـ عملية السن Honing

تستعمل عندما يكون الحد القاطع للسكين عريضاً وبه ثلمات كبيرة ومتعددة، والمسن هو حجر صخري خاص يكون على عدة أنواع حسب طبيعة الصخر، فمنه حجر الكاربورانـدوم Carborundum ، ومنه أيضاً الرخام البلجيكي الأسود Yellow Belgium Stone ، والأخير هو أفضل الأنواع وأغلاها ثمناً لاحتوائه على أوكسيد الحديديك الذي يعد أجود مكونات حجر المسن، وكلما كان حجر المسن خشناً كلما كان أكثر صلابة لحد السكاكين.

وإذا لم تتوفر أحجار المسن يمكن استخدام قطع من زجاج البلور Plate glass بحافات مشطبة (غير حادة) بحيث يكون طولها يزيد عن طول السكين بحوالي ٥ سم، وتستعمل هنا مادة حاكة وهي مسحوق أوكسيد الألمنيوم، التي تختلف في حجم جزيئاتها، فعند الجلخ يستخدم حبيبات حك بحجم ٢٠ ميكرون، وعند التلميع بحجم ٤ ميكرونات.

وكلما كانت الثلمات أكثر، كلما تطلب ذلك حبيبات أكبر حجماً أو مسن أخشن مما يوفر الوقت والجهد. وقبل البدء باستعمال حجر المسن يجب طلاء سطحه بمادة زيتية مثل زيت الزيتون، أو زيت الخروع. وتكون عملية السن بمسك السكين من مقبضها ووضعها بصورة مسطحة ومائلة قليلاً على أحد طرفي المسن، ويجب أن يكون ضغط السكين على المسن متساوياً من جميع الأطراف، ثم نسحب السكين على المسن بحيث تكون حافتها الحادة متجهة إلى الأمام، وقاعدتها مبتعدة عن نهاية المسن، وعند وصول النهاية الأخرى تقلب السكين على سطحها الآخر، وتسحب بنفس الطريقة إلى النهاية الأخرى (١٠ ـ ٢٠ مرة)، وبعد الانتهاء من عملية السن، تمسح السكين والمسن بقطعة من الشاش المبلل بالزايلين، ويحفظ كل في محفظته الخاصة (شكل ٥أ).



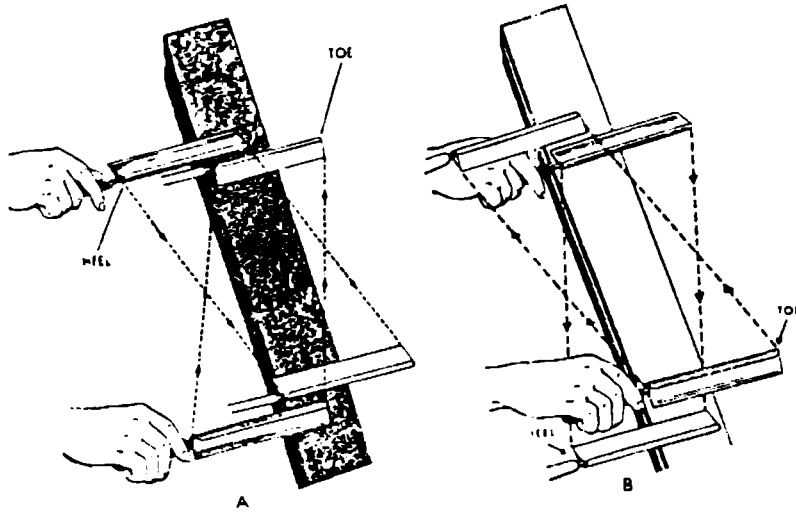
شكل رقم (٥) أ
طريقة سن السكين يدوياً

HONING

ب ـ عملية الصقل (Stropping)

بعد عملية السن تختفي الثلمات، ويمكن فحص ذلك تحت المجهر التشريحي، ثم يتبع ذلك عملية تلميع وصقل حد السكين باستعمال المشحذ

الجلدي Razor strop الـذي يصنـع من منـطقـة الردفين لجلد الحصان. ويكون الجلد معلقاً أو مثبتاً على قاعدة صلبة، وتكون عملية الصقل بأن ينظف الجلد ويشبع بمـادة زيتية (زيت الخـروع)، ويتم تحريك السكين بطريقة مماثلة لعملية السن، ولكن باتجاه معاكس حيث يكون حدها القاطع إلى الخلف، والقاعدة إلى الأمام. وتستمر العملية حوالي (٢٠ ـ ٣٠ مسحة)، ثم تنظف السكين والحزام الجلدي لإزالة الأوسـاخ وحبيبـات الكاربـوراندوم التي قد تكون عالقة، ثم توضع السكين في صندوق خاص (شكل ٥ب).



شكل رقم (٥) ب

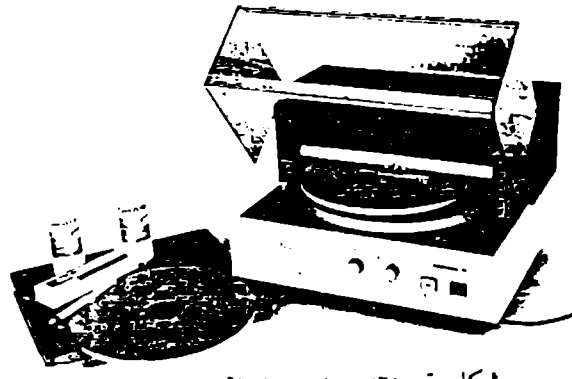
طريقة صقل السكاكين يدوياً

STROPPING

* جهاز الشحذ الآلي Automatic knife sharpner

ويوفـر هذا الجهـاز الـوقت والجهـد، لذا لا غنى عنـه في مختبر التحضيرات النسيجية. وهو عبارة عن قرص زجاجي سميك موضوع بصورة أفقية، ويدور بسرعة معينـة، وتمسـك السكين بمـاسكـة معينة لترتد بصورة طليقة على سطح القرص، ويوضع على القرص مادة حاكة مثل أوكسيد الألمنيوم مع زيت مثل زيت الخروع، وتتحرك إلى الأمام ثم إلى الخلف أثناء دوران القرص الزجاجي، وتنقلب السكين من

فترة لأخرى على فترات متساوية لكي يتساوى الحد القاطع من الجانبين.



شكل رقم (٦) المشحذ الآلي

تحضير العينات لعملية القطع

ويعتمد الحصول على مقاطع جيدة على عدة عوامل منها ما هو قبل عملية القطع، ومنها ما هو أثناء عملية القطع:

١ـ أن تكون العينات النسيجية قد مرت على جميع مراحل المعالجة بطريقة سليمة ولمدة كافية، وأن تكون المحاليل المستعملة بحالة مناسبة للمعالجة، وأن تكون الأنسجة الصلبة قد مرت في محاليل نزع الكلس.

٢ـ تقليم القالب الشمعي Trimming : ويهدف من هذه الخطوة الحصول على مقاطع متسلسلة Serial sections وسهلة العزل عن بعضها البعض، ولوضع مقاطع أكثر على الشريحة الواحدة، وكذلك فهي توفر الوقت والجهد والمواد.

ويقصد بها إزالة الشمع الزائد حول العينة المطمورة حتى يتم الحصول على قالب مربع أو مستطيل حافته العليا والسفلى متوازية، ويكون النسيج بعد عملية التقليم ظاهراً وجاهزاً لعملية القطع. وتتم عملية التقليم بواسطة مبسط ساخن Spatula (وهنا يجب توخي الحذر من وصول المبسط للعينة النسيجية)، أو باستخدام شفرة حادة، وكذلك يمكن الاستفادة من ظاهرة زيادة السمك على الجهاز لحين الوصول لبداية العينة.

٣ـ **جودة جهاز القطع وحدة السكين**: ولعل الفشل في عمل مقاطع جيدة يعود أولاً وأخيراً إلى سكاكين غير حادة على شرط أن تكون مرحلة الإشباع بالبرافين قد جرت بصورة متقنة.

٤ـ **ميل السكين**: يجب أن تكون إمالةِ السكين نحو قالب الشمع مناسبة، فإذا كانت الإمالة كبيرة، فإن السكين ستكشط القطع كالإزميل ولا تقطع، أما إذا كانت الإمالة غير كافية، فإن سطح القالب الشمعي سيكون مضغوطاً إلى مؤخرة السكين، الأمر الذي سيؤدي إلى الحصول على مقاطع ثخينة.

٥ـ **سرعة القطع**: حتى نحصل على مقاطع ذات سمك متماثل يجب أن تكون سرعة القطع منتظمة، ويكون القطع في الأنسجة الرخوة (كالمخ) التي تطمر بوسط طري بطيئاً لأن السرعة تؤدي إلى ضغط المقاطع.

٦ـ **درجة حرارة مكان العمل**: إذا كانت منخفضة، فإن المقاطع ستتلف، ولا يتكون شريط، ويعالج ذلك إمّا بالنفخ على السكين، أو بالعمل قرب لهب. ويؤدي ارتفاع الحرارة عن الحد الملائم إلى طراوة الشمع مما يصعب الحصول على مقاطع رقيقة، ويعالج ذلك بتبريد السكين أو القالب بقطع ثلجية.

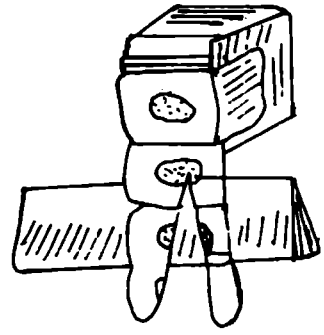
مشاكل عملية التقطيع (أسبابها وحلولها)

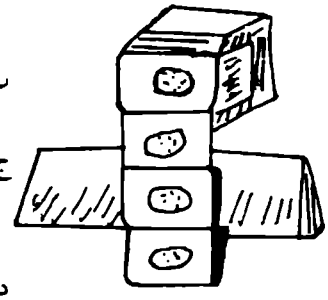
إن الصعوبات في الحصول على مقاطع جيدة قد تكون أسبابها خطأً (أو أخطاء) حصلت أثناء تحضير قالب الشمع، ومنها ما يلي:

١ـ النقص في عملية التجفيف.
٢ـ النقص في عملية التنقية (التشفيف).
٣ـ النقص أو الزيادة في عملية الإشباع بشمع البرافين.

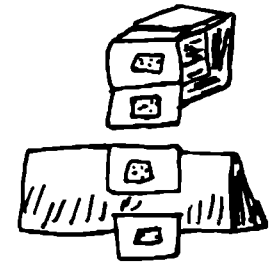
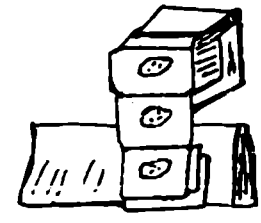
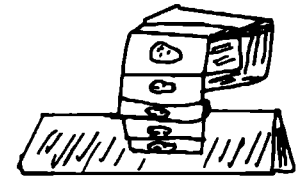
وفيما يلي شرح لأهم المشاكل التي تواجه الفني أو الطالب في مختبر التحضيرات النسيجية خلال التقطيع.

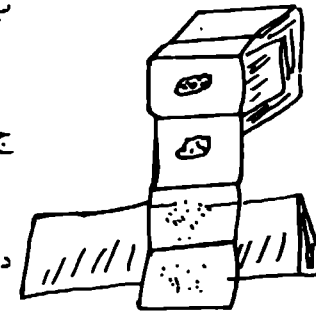
المشكلة	السبب	العلاج
١ . انشقاق المقاطع طولياً	أ . وجود ثلمات في حد السكين القاطع .	أ . تغيير مكان السكين أو شحذها .
	ب . وسط الطمر يحتوي على شوائب صلبة .	ب . إعادة الطمر في شمع نقي .
	جـ . وجود تكلسات في النسيج .	جـ . إزالة الكلس من النسيج .
	د . وجود بلورات وشوائب على حد السكين .	د . تنظيف حافة السكين بالزايلين .
٢ . عدم تماثل سمك المقاطع .	أ . عدم ثبات القالب والسكين .	أ . شد الأزرار لتثبيت القالب والسكين .
	ب . جهاز التغذية غير مضبوط .	ب . صيانة الجهاز .
	ج . انحناء السكين زائد (زاوية الخلوص قليلة) .	ج . تقليل انحناء السكين .
	د . السكين مثلمة .	د . شحذ السكين .





٣ . التفاف المقاطع إلى أعلى على السكين .	أ . الشمع صلب وغير مناسب السمك والحرارة .	أ . تقليل سمك المقاطع ، رفع حرارة السكين أو القالب ، غمر القالب في شمع طري .
	ب . السكين غير حادة .	ب . تغيير السكين أو شحذه .
	ج . انحناء السكين زائد .	ج . تقليل انحناء السكين (زيادة زاوية الخلوص) .
٤ . عرض المقطع أقل من عرض القالب .	أ . الحد القاطع عريض جداً .	أ . شحذ السكين بطريقة صحيحة .
	ب . انحناء السكين زائد .	ب . تقليل انحناء السكين .
٥ . تكون شريط متسلسل ملتوٍ .	أ . عدم تساوي حدة السكين .	أ . شحذ السكين جيداً .
	ب . عدم توازي حافتي القالب العليا مع السفلى .	ب . إعادة التقليم .
	ج . سخونة أحد جانبي القالب أكثر من الآخر .	ج . تبريد القالب في الثلج .
	د . حواف القالب غير متوازية مع السكين .	د . تعديل موقع السكين ليصبح موازٍ للقالب .

٦ . عدم تكون شريط متسلسل من المقاطع .	أ . الشمع صلب بالنسبة للنسيج والظروف المحيطه .	أ . النفخ على سطح القالب أو إعادة الطمر في شمع طري .
	ب . عدم توازي حافتي القالب العليا والسفلى .	ب . إعادة التقليم .
	ج . وجود شوائب على سطح وحد السكين .	ج . تنظيف السكين بالزايلين .
٧ . التصاق المقاطع بالقالب الشمعي .	أ . زاوية الخلوص قليلة .	أ . زيادة زاوية الخلوص (تقليل انحناء السكين) .
	ب . وجود شوائب على طرف السكين أو القالب .	ب . تنظيف السكين وإزالة الشوائب على القالب باستعمال شفره .
	ج . الشريط مشحون بالكهرباء الساكنة .	ج . إيصال المبشرة بقطب أرضي أو تأين الهواء المحيط بواسطة اللهب .
٨ . انضغاط المقاطع .	أ . سكين غير حادة ، شمع دافىء .	أ . إعادة الشحذ ، تغيير مكان القطع ، تبريد القالب .
	ب . شمع طري لا يناسب السمك المرغوب .	ب إعادة الطمر في شمع قاسي - زيادة السمك

٩. إحداث صوت أثناء التقطيع.	أ. قساوة زائدة للنسيج.	أ + ب. يصعب العلاج (نقع النسيج بالماء لمدة كافية).
	ب. تعريض النسيج للكحول لمدة أطول من اللازم.	
	ج. وجود بلورات أو كلس في النسيج.	ج + د. استخدام عينة جديدة و/ أو استبدال المحاليل وسط الطمر.
	د. وجود شوائب في الشمع.	
١٠. تفتيت المقاطع النسيجية أثناء القطع.	أ. إزالة الماء و/ أو التشريب غير كافي.	أ. إعادة إزالة الماء و/ أو التشريب.
	ب. زيادة مدة التشريب (طبخ النسيج).	ب. لا علاج. عمل عينة أخرى.
	ج. حدادة الشمع عند التشريب كانت عالية.	ج. لا علاج. عمل عينة أخرى.
	د. الشمع طري لا يناسب العينة.	د. بتبريد القالب بالثلج أو إعادة الطمر بشمع طري.

تحميل المقاطع على الشرائح Mounting of sections

وهي عملية وضع وفرد الشرائط النسيجية على الشرائح الزجاجية لتكون جاهزة لعملية الصباغة إذا ما أُريد تأخير عملية التحميل، فإنه يجب وضع شرائط المقاطع في صندوق ورقي واسع وغير عميق إلى حين تحميلها، ويجب هنا تغطية الصندوق لإبعاد الغبار عن المقاطع، كما يجب أن يكون اتجاه الشرائط وتسلسلها صحيحاً إذا ما أُريد الحصول على مقاطع متسلسلة. وقبل عملية التحميل يجب توفر الأدوات والمواد التالية:

- صفيحة ساخنة أو حمام مائي، فرشاة شعر الجمل Camel hair brush أو ملقط حاد، شريحة زجاجية نظيفة، حامل شرائح، مادة لاصقة، ماء مقطر دافىء.

ملاحظة: يجب استعمال شرائح زجاجية نظيفة تماماً وخاصة من آثار المواد الزيتية، وإذا كانت غير نظيفة يجب غسلها بالكحول ٩٥٪ ومسحها بواسطة الشاش النظيف، ويتم استخدام قلم ماسي أو قلم رصاصي (إذا كانت الشريحة مصنفرة)، وذلك لوسم الشرائح.

أوساط اللصق Section adhesives

إن وضع المقاطع على الشرائح بدون وسط لاصق يعرضها للسقوط أثناء عملية الصبغ خصوصاً في الحالات التالية:

أ. استخدام مثبتات مخرجة للبروتين (مثبت بوان).
ب. الأنسجة التي تحوي دم متخثر أو عظام.

لذا، ينصح باستعمال أوساط اللصق بشكل روتيني في جميع الحالات للتأكد من لصق المقاطع، وهذه الأوساط هي:

١. زلال البيض مع الجليسرول Mayer's adhesive (لاصق ماير):

ويتكون من:

- زلال البيض - ٥٠ مل
- جليسرول - ٥٠ مل

يمزج المحلول جيداً، ويرشح خلال عدة طبقات من الشاش ثم يضاف حوالي ١٠٠ ملغم، من بلورات الثايمول Thymol وذلك كمطهر لمنع نمو الفطريات عليه.

٢. وسائط أخرى:

ويستخدم كوسائط:

- المصل الطازج Fresh serum وحبيبات النشا مع Hcl والجيلاتين.

ب - عملية لصق المقاطع:

وتتم بطريقتين:

١ - طريقة التعويم في الحمام المائي The water bath method

ويستخدم هنا حمام مائي ذو درجة حرارة تكون أقل ١٠ درجات من درجة ذوبان الشمع (٤٠° - ٤٥°). ومن الأفضل غليان الماء قبل الاستعمال، وذلك بهدف التخلص من فقاعات الهواء المذاب في الماء، والذي قد يستقر تحت المقاطع، ويسبب سقوطها عن الشرائح في خطوات لاحقة. ويتم أخذ المقاطع عن السكين باستخدام ملقط حاد أو فرشاة شعر الجمل، وتُعوَّم على سطح الماء. وعندما يفرش المقطع على سطح الماء، ندخل شريحة نظيفة داخل الماء بزاوية مناسبة تحت المقطع، وتسحب بسرعة ملائمة بعد التصاق المقطع في وسطها، ويمكن الاستعانة بإبرة تشريح طويلة لوضع المقطع على الشريحة في مكانه المناسب.

٢ - طريقة الصفيحة الساخنة The hot plate method

توضع شريحة زجاجية نظيفة على صفيحة ساخنة، ويوضع على الشريحة ماء مقطر، وبالاستعانة بفرشاة شعر الجمل، يحمل مقطع أو شريط من المقاطع ليوضع

على سطح نقطة الماء. وتتم عملية فرد المقطع بإمساك طرفي المقطع بين طرفي إبرتي التشريح ومدها على الشريحة (يجب الانتباه حتى لا تتمزق المقاطع).

جـ ـ عملية تجفيف المقاطع من الماء بعد وضعها على الشرائح:

إن تجفيف المقاطع بعد عملية اللصق هي من العمليات التي يجب أن تتم بصورة جيدة، وذلك لأن بقاء أي أثر قليل من الماء يسبب سقوط المقاطع خلال عملية الصبغ، ويسحب الماء الزائد باستعمال ورق ترشيح ثم تجفف المقاطع بإحدى الطرق التالية:

(أ) توضع في حاضنة بدرجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة، وهذه أفضل الطرق خصوصاً عند التعامل مع الأنسجة العصبية التي تتمزق بالحرارة العالية.

(ب) توضع في فرن بدرجة حرارة ٤٥ ـ ٥٠°م لمدة ٣٠ دقيقة ـ ساعة واحدة.

(ج) توضع على صفيحة ساخنة (٤٥°م) لمدة $\frac{1}{2}$ ساعة ـ ساعة واحدة.

الوحدة السادسة

الصباغة

وتشمل:

- نظرية الصباغة.
- تصنيف الصبغات.
- طرق الصباغة.
- تغطية المقاطع.
- أوساط التغطية.
- طريقة التغطية.

الوحدة السادسة

صباغة الأنسجة The staining of tissues

* الغاية من الصباغة Purpose of staining

لو حاولنا وضع شريحة محملة بالمقاطع النسيجية تحت المجهر، فإننا لن نستطيع دراستها نسيجياً، وذلك لعدم القدرة على تمييز مكونات المقاطع عن بعضها. ورغم أن هناك اختلاف في معامل انكسار مكونات النسيج للضوء، إلّا أنه لا يكفي لتمييزها عن بعضها. وحتى نتمكن من دراسة المقاطع دراسة نسيجية، لا بد من استخدام الصباغ التي تزيد الفروق بين معاملات انكسار المكونات للضوء، فتظهر بشكل أوضح تحت المجهر.

نظرية الصباغة Theory of staining

العديد من النظريات وضعت لتفسير ظاهرة اختلاف ميل التراكيب النسيجية للتلون بصبغة معينة، وقد دمجت هذه النظريات في مجموعتين من العوامل:

أ ـ العوامل الفيزيائية Physical factors ، وتشمل:

ـ الخاصية الاسموزية Osmosis : وهي قدرة نفاذ الصبغة إلى النسيج اعتماداً على تركيز الأملاح والأيونات فيه.

ـ الخاصية الشعرية Capillarity : وهي قدرة تدفق الصبغة في قنوات الأنسجة الضيقة.

ـ الامتصاص Absorption : وهو قدرة امتصاص الأنسجة عن طريق الثقوب والمسامات.

ـ الامتصاص الاختياري Selective Absorption : وهو ميل محتويات النسيج للالتصاق بأيونات صبغية محددة توجد في الصبغة، ويعد من أكثر العوامل تأثيراً في عملية الصباغة.

ب ـ العوامل الكيميائية Chemical factors

وتعتمد هذه النظرية على اختلاف أجزاء الخلايا الحية في تركيبها الكيماوي، مما يجعلها حامضية (كالنواة)، أو قاعدية (كالسيتوبلازم).

وكذلك الأصباغ منها ما هو حامضي Acidic (يحوي حامضاً ملوناً)، ومنها ما هو قاعدي Basic (يحوي شقاً قاعدياً ملوناً)، ومنها ما هو متعادل Neutral (يحضر من مزج صبغة حامضية مع صبغة قاعدية).

فالأجزاء النسيجية القاعدية تميل للتفاعل مع الصباغ الحامضية (Acidophilic محبة للحامض)، والأجزاء الحامضية تميل للتفاعل مع الصباغ القاعدية (Basophilic محبة للقاعدة).

وحديثاً، استطاع العلماء أن يستنتجوا أن كلا العاملين (الفيزيائي والكيميائي) يلعبان دوراً في تحديد درجة ميل مكونات النسيج المختلفة لأخذ أو رفض الصبغة، وبالتالي التلون بألوان مختلفة.

تصنيف الصباغ Classification of dyes

وتستخدم عدة معايير لتصنيف الصباغ منها: مصدر الصبغة، وطبيعة مساعد اللون، وتطبيقاتها العملية.

تقسم الصباغ حسب مصدرها إلى قسمين: طبيعية ومصنعة.

أ ـ الصباغ الطبيعية Natural dyes

ويكون مصدر هذه الصبغة إمّا حيوانياً أو نباتياً:

١ ـ الهيماتوكسلين Haematoxylin

وتستخدم كصبغة لصبغ الأنوية باللون الأزرق، وهي من أكثر الأصباغ شيوعاً، وتستخلص من خشب شجرة بقولية تزرع في أمريكا الجنوبية والوسطى وهي *Haematoxylon Campechianum* ، ويتم استخلاص الصبغة بمعاملة الجذوع بالإيثر ثم تجفف وتذوب في الماء ثم تصفى وتبلور، وبهذه الحالة تكون الصبغة ضعيفة الميل للارتباط بالأنسجة، لذا لا بد من إضافة المرسخات Mordants .

وكذلك لا بد لهذه الصبغة من عملية الأكسدة التي يتم خلالها تحول الهيماتوكسلين إلى هيماتين Haematein الذي يقوم بالصباغة. وتكون الأكسدة على نوعين:

ـ **أكسدة طبيعية**: وتتم بوسط كحولي أو مائي، ويعرض المحلول للهواء وأشعة الشمس، وتستغرق مدة طويلة تصل إلى عدة شهور، وتسمى العملية بالتعتيق Ripening .

ـ **أكسدة صناعية**: وتتم بإضافة عوامل أكسدة قوية مثل فوق أكسيد الهيدروجين (H2O2) ، أكسيد الزئبق (HgO) ، أيودات البوتاسيوم (KIO4) ، وبيرمنجنات البوتاسيوم (kmno4) ، وتكون الأكسدة هنا سريعة.

ومن المهم هنا إضافة الكمية المناسبة من المؤكسد، وكلما قلت الكمية مع المحافظة على نوعية الصبغ كلما زاد عمر الصبغة. وفيما يلي الكميات الصحيحة للمؤكسد لكل ١ غم من صبغة الهيماتوكسلين:

المؤكسد	كمية المؤكسد/١غم صبغة
HGO	٠,٥ غم
KIO4	٠,٠٥ غم
H2O2	٢ مل
KMNO4	٠,١٧٥ غم

٢ ـ صبغة القرمز ومشتقاته Cochineal and its derivatives

وهي أحد الصباغ القديمة التي تستخلص من جسم إناث حشرة صغيرة تعيش على نبات الصبار، وتسمى *Coccus cacti* حيث تجمع هذه الحشرات وتجفف، ويستخلص القرمز على شكل مسحوق ليس له أي ميل لتلوين الأنسجة إلّا إذا أُضيف له مرسخ مثل شب الحديد أو الألمنيوم، وهو صبغة جيدة للنواة.

وإذا غلي القرمز مع ملح الشب (المرسخ) ينتج راسباً غير ذائب في الماء يسمى الكارمين Carmine الذي يعالج بحامض الأسيتيك لإعطاء Aceto carmine ويستخدم كصبغة نووية فعالة لصباغة الأنسجة الحيوانية. وإذا عولج بحامض البكريك Pircric acid لإعطاء Picro carmine يستخدم لصباغة الأنسجة العصبية.

٣ ـ الأورسين Orcein

وهي صبغة نباتية تستخرج من الأشنات Lichens بواسطة معالجتها بالأمونيا والهواء، ويكون لونها بنفسجي وتستخدم بشكل أساسي لصباغة الألياف المرنة.

٤ ـ السافرون Saffron

وتستخرج من مياسم أزهار نباتات الزعفران *Crocus sativus* ليست شائعة الاستعمال في الأنسجة ولكنها تدمج مع صبغة أخرى لصباغة الأنسجة الضامة.

* مرسخات الصبغة Mordants

إنّ معظم الأصباغ تحتاج إلى مثبت أو مرسخ الصبغة وخاصة صبغة الهيماتوكسلين.

وهي عبارة عن مواد تربط بين الصبغة والنسيج مكونة تفاعلاً صبغياً بينهما فتكون النتيجة زيادة فعالية الصبغة لتلوين بعض أجزاء الأنسجة أكثر من غيرها. وغالباً ما تكون هذه المواد أملاحاً أو هيدروكسيدات لمعادن مثل الألمنيوم والحديد والنحاس،

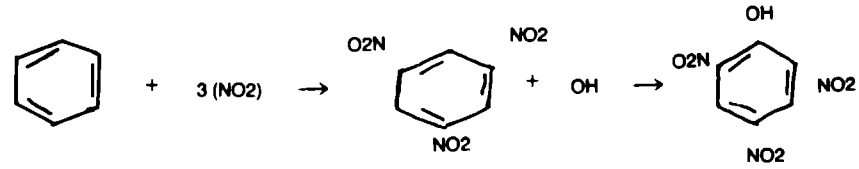
وقد تكون أيضاً كبريتات أو كلوريدات. كما أن بعض المواد المثبتة هي مواد مرسخة للصبغة أيضاً مثل ثاني كرومات البوتاسيوم وكلوريد الزئبق في محلول زنكر.

والمرسخات التي تستعمل مع صبغة الهيماتوكسلين هي شب الأمونيا الذي يعطي أنوية زرقاء لامعة، وشب البوتاسيوم الذي يعطي أنوية بنفسجية وشب الحديد الذي يعطي أنوية زرقاء مسودة.

ب ـ الصباغ المصنعة Synthetic dyes

وهي صباغ مشتقة من مادة البنزين (C6H6). والبنزين بصورته البسيطة يمتصه الطيف الضوئي في مجال الأشعة فوق البنفسجية، ولكن إضافة مواد تسمى حاملات الألوان Chromophores تؤدي إلى تحريك مجال الامتصاص إلى الضوء المرئي عن طريق إعطاء لون. وحلقة البنزين مع حامل اللون يكونان مولد اللون Chromagen. ومن الأمثلة على حاملات الألوان:

مجموعات (NO2)، فإضافة ثلاثة منها تعطي مولد اللون Trinitrobenzen، وهذا المركب بهذه الحالة لا يعتبر صبغة حيث يكون ارتباطه بالنسيج ضعيفاً يزول بسهولة. ولذا تضاف مادة أخرى تسمى مساعد اللون Auxochrome مثل مجموعات الهيدروكسيل (-OH)، الأمين (-NH2)، الكاربوكسيل (-COOH)، السلفونيك (-SO3). وحامض البكريك هو صبغة مضاف إليها (-OH) كمساعد لون، ويتفاعل مع المكونات النسيجية القاعدية لتشكيل الملح.



حلقة بنزين — حامل اللون — مولد اللون — مساعد اللون — حامض البكريك (الصبغة المصنعة)

وعنـد التعـامـل مع الصباغ يجب أخذ الحيطة والحذر من استنشاق مسحوق الصبغة وتجنب لمسها للجلد، وإذا حصل يجب غسلها فوراً قبل أن تمتص من قبل الجلد.

ويمكن تقسيم الصباغ حسب طبيعة مساعد اللون (حامضي أو قاعدي أو متعادل):

أ ـ أصباغ قاعدية Basic dyes

تتفـاعـل هذه الأصباغ مع مكونات الخلية الحامضية كالنواة، ويحمل مساعد اللون فيها شحنة موجبة ($NH3^+$ i.e.) . أما مولد اللون فيكون على شكل كبريتات أو كلوريدات. ومن أمثلتهـا صبغـة أزرق الميثلين Methylene blue ، والفـوكسين القاعدي Basic Fuchsin

ب ـ أصباغ حامضية Acidic dyes

وتصبـغ المكـونـات القاعدية كالسيتوبلازم، ويحمل مساعد اللون فيها شحنة سالبـة (COO^-) ، وتـوجـد على شكـل أملاح الصوديوم أو الكالسيوم، ومن أمثلتها الفوكسين الحامضي Acidic Fuchsin .

جـ ـ الأصباغ المتعادلة Neutral dyes

وتصبغ مكونات الخلايا القاعدية والحامضية معاً. وتتكون من خليط من صبغة حامضية وصبغة قاعدية، فيكون الناتج صبغة متعادلة قليلة الذوبان في الماء، ولكنها تذوب في الكحـول مثـل صبغة ليشمان Leishman's stain التي تستعمل لصباغة خلايا الدم.

طرق الصباغة والعمليات الصبغية المختلفة

١ ـ الصبغات النسيجية والصبغات الخلوية:

ـ الصبغات النسيجية Micro-anatomical stains وتستعمل لصباغة الأنسجة، وتهدف

إلى التفريق بين الأنسجة المختلفة التي تتواجد مع بعضها في نفس المقطع.

- الصبغات الخلوية Cytological stains وهي صباغ تستخدم لتوضيح التراكيب الدقيقة للخلايا مثل النواة والسيتوبلازم، ولا يهدف منها التفريق بين الأنسجة.

٢ - الصبغ المباشر والصبغ غير المباشر:

- الصبغ المباشر Direct staining وهي حالة لا تحتاج فيها الصباغ إلىمرسخات لتربطها بالأنسجة، بل ترتبط بالأنسجة مباشرة، وعادة ما تكون كحولية أو مائية مثل أزرق المثيلين Methylene blue ، والأيوسين Eosine
- الصبغ غير المباشر Indirect staining وهي حالة تحتاج فيها الصباغ إلى مرسخات Mordants تربطها بالصبغة. وقد تدمج الصبغة مع المرسخ عند الصبغ مثل هيماتوكسلين ايرلخ، أو يستعمل المرسخ منفصلاً مثل هيماتوكسلين هايدنهين.

٣ - الصبغ التقدمي والتراجعي:

- الصبغ التقدمي Progressive staining وهي الحالة التي تقوم بها الصباغ بتلوين تراكيب الأنسجة بترتيب محدد كل على حدة وعلى مراحل، لذا يجب فحص الشريحة تحت المجهر بين الحين والآخر لمراقبة انتهاء عملية الصبغ اللازمة، وبالتالي إزالة الشرائح من محاليل الصبغ، ومثال ذلك أصباغ السيتوبلازم.
- الصبغ التراجعي Regressive staining وهنا تتصبغ جميع تراكيب النسيج مع بعضها البعض، لذا عادة ما يصبغ النسيج بشكل زائد عما هو مطلوب، ثم يستعمل محلول التمييز لإزالة الصبغة الزائدة، ومثال ذلك أصباغ النواة.

* **عملية التمييز:**

وتفيد هذه العملية في التخلص من الصبغة الزائدة، وعادة ما يكون وسط التمييز حامضياً إذا كانت الصبغة قاعدية (أصباغ النواة) والعكس صحيح.

ويستخدم الكحول الحامضي لأصباغ الهيماتوكسلين الذي يتكون من كحول إيثيلي Acid-alcohol 70% مضافاً إليه حامض الخليك 1% أو حامض النيتريك المركز 5%

* ظاهرة التحول اللوني Metachromacy

تتلون بعض الأنسجة أو التراكيب بلون يختلف عن لون الصبغة المستعملة، وتسمى هذه الظاهرة بظاهرة التحول اللوني الذي قد ينتج عن عاملين: أولهما هو طبيعة التركيب النسيجي، وثانيهما هو التركيب الكيميائي للصبغة. ومن الأنسجة المحولة للألوان: الغضاريف، الأنسجة الضامة، والنسيج الطلائي المخاطي. ومن الصباغ التي تُظهر تحولاً لونياً صبغة الميثيل Methyl violet

٤ ـ الصبغ الحيوي Vital staining

ويهدف من هذه الصباغ إظهار التراكيب لخلايا الجسم والأنسجة بشكلها الطبيعي ودون قتلها، وتستعمل هذه الصباغ لإعطاء معلومات عن الخواص الفسيولوجية للخلايا الحية: كالنفاذية، والابتلاع، والامتصاص، وإخراج المواد. وكذلك تفيد لمعرفة تأثير الأصباغ الأخرى غير الحيوية على التراكيب النسيجية. وتستعمل الأصباغ الحيوية بتراكيز قليلة جداً.

وهناك وسيلتين للصبغ الحيوي:

١ـ حقن الصبغة داخل الخلايا Intravital staining

٢ـ أخذ قطعة من نسيج حي ووضعها في محلول الصبغة Supravital staining وهنا توضع العينة داخل قطرة من الصبغة الحيوية على شريحة زجاجية، ثم تغطي بغطاء زجاجي، وتترك لوقت مناسب. وقد بينت الدراسات أن الصبغ الحيوي يتم في ثلاث مراحل:

١ ـ امتصاص الخلايا للصبغة.

٢ ـ توزيع الصبغة داخل الخلايا.

٣ ـ تجمع الصبغة في أماكن مختارة ومحددة تبعاً للتركيب الكيميائي للخلايا والأنسجة. ومن الأمثلة على الصباغ الحيوية:

١ـ أصباغ حامضية مثل Congo Red

٢ـ أصباغ قاعدية Janus green, Mentral Red, Toluidene blue - Methylene blue (وهي أقل الأصباغ الحيوية سمية، وتصبغ الميتوكندريا).

* **الأصباغ وطرق تحضيرها:**

تقسم الأصباغ من ناحية دورها في صباغة أجزاء الخلية إلى نوعين أساسيين:

أ ـ أصباغ الأنوية وأهمها:

ـ الهيماتوكسلين Haematoxylin

وتصبغ الأنوية بلون بنفسجي أو أزرق، وهناك نماذج مختلفة من هذه الصبغة تعتمد على طريقة التحضير.

١ ـ هيماتوكسلين هاريس Harris Haematoxylin

ـ بلورات هيماتوكسلين	١ غم
ـ إيثانول ١٠٠٪	١٠ مل
ـ شب الأمونيوم أو البوتاسيوم	٢٠ غم
ـ ماء مقطر	٢٠٠ مل
ـ أكسيد الزئبق	٠,٥ غم

يذاب الهيماتوكسلين في الايثانول والشبة في الماء بواسطة الغلي، ثم يخلط المحلولان ويستمر الغلي لمدة دقيقة فقط، ثم يرفع عن النار ويضاف أكسيد الزئبق بحذر، ويبرد محلول الصبغة ثم يضاف قليل من حامض الخليك الثلجي لتحسين

الصبغة، وترشح الصبغة ويسجل عليها تاريخ التحضير.

٣ ـ هيماتوكسلين ماير Mayer's Haematoxylin

ـ شب الأمونيوم	٥٠ غم
ـ هيدرات الكلور Chloral hydrate	٥٠ غم
ـ بلورات هيماتوكسلين	١ غم
ـ حامض السيتريك	١ غم
ـ ايودات الصوديوم	٠,٢ غم
ـ ماء مقطر	١٠٠٠ مل

أذب الهيماتوكسلين في الماء وباستخدام لهب هادىء، وأضف أيودات الصوديوم والشب، حرك على فترات، ثم أذب حامض النيتريك وهيدرات الكلور، وسجل تاريخ التحضير على الصبغة.

ب ـ صبغات السيتوبلازم:

وأهمها:

١ ـ الأيوسين Eosin

وهي مجموعة صباغ تصبغ السيتوبلازم باللون الأحمر، ومنها Phloxin , Eosin B Eosin Y. ، وقد تحضر في الكحول أو الماء.

ـ الأيوسين الكحولي

ـ بلورات ايوسين	١ غم
ـ ماء مقطر	٢٠ مل
ـ كحول مطلق أو ٩٥٪	٨٠ مل
ـ حامض الخليك الثلجي	٠,٥ مل

- الايوسين المائي :

- بلورات ايوسين	١ غم
- ماء مقطر	١٠٠ مل
- فورمالدهيد ٤٠٪	٠,٢٥ مل (يمنع نمو الفطريات).

* **الخطوات العملية للصباغة بطريقة الهيماتوكسلين - أيوسين**

Haematoxylin and Eosin Technique

١- عملية إزالة شمع البرافين.

توضع الشرائح المحملة بالمقاطع بجرار الزايلين مرتين متتاليتين مدة كل مرة دقيقتان.

٢- عملية إضافة الماء إلى النسيج.

توضع الشرائح في جرة كحول مطلق، ثم كحول ٩٥٪، ٧٠٪، ٥٠٪، ثم بالماء ومدة كل خطوة دقيقتان.

٣- صبغة الهيماتوكسلين.

- توضع الشرائح في حرة صبغة هيماتوكسلين هاريس لمدة ١٥ دقيقة.
- تغسل الشرائح بماء الصنبور الجاري لإزالة الصبغة الزائدة.

٤- عملية التمييز.

- توضع الشرائح في محلول التمييز Acid - alcohol لمدة ٣ ثوان لإزالة الصبغة الزائدة في النسيج، وتفحص الشرائح تحت المجهر، فإذا كانت الصبغة أكثر من اللازم، ترجع الشرائح لمحلول التمييز مرة أخرى، وإذا كانت أقل من اللازم، فإن الشرائح تعاد ثانية لمحلول الصبغة لمدة ٥ دقائق.
- تغسل الشرائح بماء الصنبور الجاري لإزالة آثار الكحول الحامضي. وكذلك لتغيير لون المقاطع إلى اللون الأزرق (يعمل الماء كمحلول قاعدي).

٥- صبغة الأيوسين.

- توضع الشرائح في صبغة الأيوسين المائية لمدة ٣ دقائق.

٦- عملية نزع الماء من النسيج.

- توضع الشرائح في جرار يحوي الماء (٣ دقائق)، ايثانول ٧٠٪ (دقيقة واحدة)، ايثانول ٩٥٪ (دقيقة واحدة)، الايثانول المطلق مرتين كل مرة دقيقة واحدة.

٧- ترويق المقاطع بالزايلين.

- تروق المقاطع بالزايلين مرتين متتاليتين مدة كل مرة ٣ دقائق.

٨- عملية تغطية المقاطع.

- تغطى المقاطع بالوسط المناسب وبغطاء زجاجي مناسب.

النتيجة: تظهر النواة زرقاء اللون والسيتوبلازم بظلال اللون الأحمر وتظهر الغضاريف وترسبات الكالسيوم بلون أزرق غامق.

* جهاز الصبغ الذاتي Automatic stainer

وهو جهاز يوفر الوقت والجهد حيث يتم صباغة العديد من الشرائح بشكل اتوماتيكي. ويتكون الجهاز من منضدتين دائريتين مثبت عليهما أحواض للصبغ، ومن ذراع يقوم بتحريك سلة الشرائح من حوض لآخر، وكذلك مزود الجهاز بآلة برمجة حيث يقوم الفني ببرمجة الجهاز حسب الوقت اللازم لكل حوض.

* تلوين مقاطع الأنسجة بالأصباغ الخاصة:

١ - صبغة الألياف الشبكية Reticulin fibers

توجد الألياف الشبكية في الكبد والطحال والكلية. وتفيد هذه الصبغة في تمييز الألياف الشبكية عن بقية الخلية، وعن ألياف الكولاجين، كما وتفيد في تشخيص بعض الأمراض السرطانية مثل Lymphoma ، وتساعد في تشخيص بعض أمراض

الكلية، وتستخدم طريقة Gordon and Sweet كصبغة للألياف الشبكية كالتالي:

المحلول الأول:

محلول مائي من بيرمنجنات البوتاسيوم (٠,٥٪)	٩٥ مل
حامض الكبريتيك (٣٪)	٥ مل

المحلول الثاني:

حامض الأوكزاليك	١ غم
ماء مقطر	١٠٠ مل

المحلول الثالث:

شب الحديد	٢,٥ غم
ماء مقطر	١٠٠ مل

المحلول الرابع:

نترات الفضة (محلول مائي ١٠,٢٪	٥ مل
هيدروكسيد الصوديوم (محلول مائي ٣,١٪	٥ مل
الأمونيا والماء المقطر	

يضاف محلول الامونيا قطرة بعد قطرة إلى محلول نترات الفضة، ونستمر في إضافة الامونيا حتى يتكون الراسب الذي سرعان ما يذوب. ثم يضاف محلول هيدروكسيد الصوديوم، فإذا تكون راسب يضاف محلول امونيا قطرة بعد قطرة إلى أن يختفي الراسب، ثم يخفف المحلول بالماء المقطر حتى حجم ٥٠ مل، ويكون جاهزاً للاستعمال.

المحلول الخامس: الفورمالين (محلول مائي ١٠٪).

المحلول السادس: كلوريد الذهب (محلول مائي ٠,٠٢٪).

المحلول السابع: ثيوسلفات الصوديوم (محلول مائي ٥٪).

المحلول الثامن: صبغة السفرانين (محلول مائي ٠,٠٥ ٪).

طريقة الصباغة:

ملاحظة: يجب إزالة الشمع من جميع المقاطع التي حضرت بطريقة شمع البرافين بواسطة الزايلين، ثم تستعمل الكحولات التنازلية لإيصال الماء للمقاطع.

١ـ توضع المقاطع في الماء.
٢ـ توضع المقاطع في المحلول الأول لمدة ١ ـ ٥ دقائق.
٣ـ تغسل المقاطع بالماء العادي.
٤ـ توضع المقاطع في المحلول الثاني لمدة ٣ـ٥ دقائق.
٥ـ تغسل المقاطع بالماء العادي عدة مرات ثم تغسل بالماء المقطر عدة مرات.
٦ـ ضع على المقطع مرسخ الصبغة، وهو محلول الشب الحديدي (المحلول الثالث)، ولمدة تتراوح بين ١٠ دقائق ـ ساعة.
٧ـ اغسل بالماء المقطر عدة مرات.
٨ـ ضع على المقطع محلول الفضة (المحلول الرابع) لمدة ٤ ـ ٣٠ ثانية.
٩ـ اغسل بالماء المقطر عدة مرات ثم في محلول الفورمالين ثم بالماء المقطر مرة أخرى.
١٠ـ ثم يوضع على المقاطع محلول كلوريد الذهب (المحلول السادس) لمدة ١ ـ ٢ دقيقة، وذلك لإيضاح أجزاء الأنسجة.
١١ـ تغسل المقاطع بالماء المقطر.
١٢ـ اغسل المقطع بمحلول ثيوسلفات الصوديوم لمدة ٥ دقائق واغسلها بالماء.
١٣ـ اصبغ بصبغة النواة (السفرانين) لمدة ١ ـ ٣ دقائق.
١٤ـ جفف المقطع بالكحولات التصاعدية ثم يستعمل الزايلين للتنقية، ويستعمل بلسم كندا لإلصاق غطاء الشريحة.

النتيجة:

تتلون الألياف الشبكية Reticulin fibers باللون الأسود والأنوية باللون الأحمر الفاتح.

٢ ـ صبغة الألياف المرنة Elastic fibers

تعتبر الأنسجة المرنة من الأنسجة الضامة التي تكثر فيها الألياف المرنة. ويستخدم الفورمالين لغرض تثبيت هذه الأنسجة، ويمكن استخدام محلول زنكر. وتسمي هذه الطريقة بطريقة فيرهوف Verhoeff's method

المحلول الأول:

هيماتوكسلين	٥ غم
كحول مطلق	١٠٠ مل

المحلول الثاني:

كلوريد الحديديك	١٠ غم
ماء مقطر	١٠٠ مل

المحلول الثالث:

بلورات اليود	١ غم
يوديد البوتاسيوم	٢ غم
ماء مقطر	١٠٠ مل

محلول الصبغ: ويحضر من المحاليل الثلاثة:

المحلول الأول	٢٠ مل
المحلول الثاني	٨ مل
المحلول الثالث	٨ مل

طريقة الصباغة:

١ـ تغمر المقاطع بالزايلين ثم الكحولات التنازلية لإيصال الماء للمقاطع.
٢ـ توضع المقاطع بمحلول صبغة الهيماتوكسلين لمدة ٢٠ ـ ٣٠ دقيقة.
٣ـ يوضع المحلول المائي لكلوريد الحديديك (٢٪) لتفريق أو تمييز الصبغة لمدة ١٠ ـ ٣٠ ثانية ثم تغسل المقاطع بالماء العادي.
٤ـ تفحص المقاطع تحت المجهر، فإذا كان تفريق الصبغة أكثر من اللازم يعاد الصبغ بمحلول الصبغة مرة ثانية.
٥ـ تغسل المقاطع بالماء العادي، وثم بالكحول (٩٥٪) لإزالة اليود من المقاطع لمدة ٥ دقائق، ثم تغسل بالماء العادي لمدة ٥ دقائق.
٦ـ توضع المقاطع بصبغة الايوسين لمدة مناسبة، ثم تغسل بالماء وتجفف بالكحول بتراكيز تصاعدية، وتروق بالزايلين، وتغطى ببلسم كندا.

النتيجة: تتلون الألياف المرنة باللون الأسود وبقية الألياف والأنسجة الأخرى باللون الأحمر.

٣ ـ صبغة التمييز الثلاثية Weigret-Verhoeff-Masson's Trichome

وتفيد هذه الصبغة في تشخيص التغيرات المرضية في الألياف المرنة، والعضلات والنسيج الضام، وتتكون الصبغة من عدة محاليل:

المحلول الأول:

محلول بوين Bouin's solution

محلول حامض البكريك المشبع	٢٥ مل
محلول حامض البكريك المشبع	٧٥ مل
فورمالين (٣٧ ـ ٤٠٪)	٥ مل

المحلول الثاني:

صبغة فيرهوف للألياف المرنة، وتحضر كما ورد سابقاً، ويجب أن تستخدم

هذه الصبغة خلال ٢٤ ساعة لإعطاء أفضل النتائج.

المحلول الثالث:

صبغة هيماتوكسلين الحديد، وتتكون من محلولين بأحجام متساوية:

أ. يذاب ١ غم هيماتوكسلين في ١٠٠ مل من كحول (٩٥٪).

ب. يضاف ٤ مل من كلوريد الحديديك (٢٩٪) إلى ٩٥ مل من الماء المقطر، و ١ مل من حامض الهيدروكوريك المركز.

المحلول الرابع:

الفوكسين الحامضي:

الفوكسين الحامضي	١٠ مل
حامض الخليك	١ مل

المحلول الخامس:

الصبغة الخضراء Light Green Stain

صبغة خضراء	٥ غم
ماء مقطر	٢٥٠ مل

يسخن المزيج حتى يذوب، ثم يبرد ويضاف إليه حامض الخليك ٢ مل.

طريقة الصباغة:

١ـ يزال الشمع من المقاطع ثم يستعمل تدرج كحولي للوصول للماء المقطر.

٢ـ توضع المقاطع في محلول بوين مدة ساعة كاملة على درجة حرارة ٥٦°م، أو طوال اليوم في درجة حرارة الغرفة.

٣ـ تغسل المقاطع بالماء الجاري حتى يختفي اللون الأصفر.

٤ـ توضع المقاطع في صبغة هيماتوكسلين الحديد لمدة ١٠ دقائق.

٥ـ تغسل في الماء الجاري مدة ٣ دقائق، وتفحص تحت الميكروسكوب حيث

يجب أن تظهر صبغة النواة بلون أزرق مسود.

٦ـ توضع المقاطع في صبغة فيرهوف لمدة ١٥ دقيقة، وتغسل مرة واحدة في ماء مقطر.

٧ـ توضع المقاطع في محلول كلوريد الحديديك ٢٪ لمدة ٣٠ ـ ٦٠ دقيقة كعملية تمييز.

٨ـ تغسل الشرائح بالماء المقطر مرة واحدة فقط وبعد ذلك تفحص تحت المجهر للتأكد من أن صبغة الألياف المرنة جيده.

٩ـ توضع المقاطع في محلول ثيوسلفات الصوديوم (٥٪) الطازج لمدة ٣ دقائق، وتغسل في ماء جاري لمدة ٣ ـ ٥ دقائق.

١٠ـ تصبغ المقاطع في صبغة الفوكسين الحامضي لمدة ١٠ دقائق، وتغسل في ماء مقطر.

١١ـ توضع الشرائح في حامض الفوسفوتنجستك مدة ١٠ دقائق.

١٢ـ تصبغ الشرائح في الصبغة الخضراء لمدة ٣ دقائق، ومن ثم تغمس عدة مرات في حامض الاسيتيك (١٪).

١٣ـ يزال الماء من المقاطع تدريجياً، ثم تروق في الزايلين، وبعد ذلك تغطى بوسط التغطية.

النتيجة: تصبغ الألياف المرنة باللون الأسود المزرق إلى أسود، ويصبغ سيتوبلازم حلايا العضلات باللون الأحمر والكلاجين باللون الأخضر، والنواة باللون الأسود المزرق.

٤ ـ صبغة الحديد Pearl's Iron Stain

وتفيد هذه الصبغة في تشخيص تجمعات أملاح الحديد في الأنسجة (Haemosiderin)، حيث تزداد في حالة مرض Haemosiderosis (زيادة الحديد في الأنسجة)، ومرض Haemochromatosis (مرض الصباغ الدموي). وهنا يفضل استخدام الفورمالين كمثبت للأنسجة لإعطاء أفضل النتائج.

المحلول الأول:

Potassium ferrocyanide (محلول مائي ٢٪)	٢٠ مل
حامض الهيدروكلوريك (محلول مائي ٢٪)	٢٠ مل

المحلول الثاني:

صبغة الأحمر المتعادل Neutral Red (محلول مائي ١٪)

طريقة الصباغة:

١- يزال الشمع بالزايلين ثم يستعمل تدرج كحولي للوصول للماء المقطر.
٢- تنقل المقاطع إلى المحلول الأول (تحضير طازج) لمدة ٣٠ - ٦٠ دقيقة.
٣- تغسل المقاطع بالماء المقطر.
٤- تصبغ المقاطع بالمحلول الثاني لمدة ٣ دقائق ثم تغسل بالماء المقطر.
٥- تجفف المقاطع باستخدام كحول تصاعدي ثم تروق بالزايلين وتغطى ببلسم كندا.

النتيجة: تظهر أنوية الخلايا باللون الأحمر وأيونات الحديد باللون الأزرق.

٥ - صبغة المخاط Mucin Stain

- صبغة ميوسيكارمين Southgate's Mucicarmine

وتستخدم هذه الصبغة للكشف عن المخاط الذي يفرز من قبل الخلايا الطلائية "Epithelial cells" ، وتساعد في تشخيص مرض السرطان الغدي المفرز للمخاط، كما في الامعاء الغليظة والأمعاء الدقيقية.

المحلول الأول:

كارمين	١ غم

هيدروكسيد الالمنيوم	١ غم
كلوريد الالمنيوم	٠,٥ غم
ايثانول ٥٠٪	١٠٠ مل

تضاف المواد وتغلى في حمام مائي لمدة ٣ دقائق ثم يبرد المحلول ويرشح ويخزن في مكان بارد.

المحلول الثاني:

هيماتوكسلين ماير، ويحضر كما ورد سابقاً.

طريقة الصباغة:

١- يزال الشمع بالزايلين ويدخل الماء للخلايا.
٢- تصبغ المقاطع بالمحلول الثاني لمدة ٤ دقائق.
٣- تفحص الشريحة تحت المجهر، وتوضع في محلول التمييز إن كان هناك حاجة لذلك، ثم تغسل في ماء جاري.
٤- تصبغ المقاطع بصبغة الكارمين المخفف (يخفف المحلول الأول بنسبة ١ : ٥ في الماء المقطر لمدة ٣٠ - ٤٥ دقيقة.
٥- تغسل المقاطع بالماء المقطر.
٦- تجفف المقاطع بالكحول تصاعدياً وتروق بالزايلين وتغطى ببلسم كندا.

النتيجة: يظهر المخاط باللون الأحمر وأنوية الخلايا باللون الأزرق.

٦- صبغة PAS (Periodic Acid Schiff reaction)

تستخدم هذه الصبغة بشكل واسع في مختبرات الأنسجة، وفي هذا التفاعل يتم أكسدة مجموعة الكربوهيدرات إلى الدهيدات Aldehydes بواسطة Periodic acid وتتلون مركبات الالدهايد بمعاملتها بمحلول شيف. وتستخدم للكشف عن الفطريات والخلايا المخاطية في الغدة النخامية، والمواد المخاطية المتعادلة، وبعض المواد المخاطية الحامضية، وكذلك يتم الكشف عن السكريات المتعددة

Polysacchorides ، والسكريات المتعددة المخاطية Mucopolysaccharides ، والبروتين المخاطي Mucoproteins ، والدهن المخاطي Mucolipids ، والدهن السكري Glycolipids .

تتكون الصبغة من:

١ـ المحلول الأول:

Periodic acid	١ غم
ماء مقطر	١٠٠ مل

٢ـ المحلول الثاني (محلول شيف) Schiff Solution

فوكسين قاعدي	١ غم
ماء مقطر	٢٠٠ مل
حامض هيدروكلوريك	٢٠ مل
(٩٨,٣ مل Hcl لكل ١ ليتر ماء مقطر)	
ثنائي سلفات الصوديوم	١ غم
مسحوق الفحم القاصر Charcoal	٠,٥ غم

ويحضر محلول شيف بتسخين الماء إلى درجة الغليان، ويضاف له مادة الفوكسين القاعدي، وبعد الذوبان يبرد المحلول إلى درجة ٥٠°م، ثم يضاف إليه حامض الهيدروكلوريك، ويبرد لدرجة الغرفة، ثم يضاف ثنائي سلفات الصوديوم ويترك المحلول في الظلام لمدة ٢٤ ـ ٤٨ ساعة حتى يصبح لون المحلول قشي Straw colored ، ثم يضاف محلول الفحم القاصر ويحرك المحلول لمدة ١ ـ ٢ دقيقة، ثم يرشح ويحفظ في عبوات غير منفذة للضوء وفي الثلاجة.

المحلول الثالث: محلول حامض الكبريتوز Sulphuric acid

ملح الصوديوم ثنائي الكبريت (١٠٪)	٦ مل

(Sodium metabisulphite)

حامض الهيدروكلوريك (Hcl)	٥ مل
ماء مقطر	١٠٠ مل

المحلول الرابع: صبغة هيماتوكسلين هاريس:

وتحضر كما ورد سابقاً.

طريقة الصباغة:

١ـ تغمر المقاطع بالزايلين، ثم تراكيز تنازلية من الكحول.

٢ـ توضع الشرائح في محلول رقم ١ لمدة ٥ دقائق.

٣ـ تغسل الشرائح بالماء ثم بالماء المقطر.

٤ـ توضع الشرائح في محلول شيف لمدة ٥ دقائق.

٥ـ تمرر الشرائح ثلاث مرات في محلول حامض الكبريتوز مدة كل مرة ٢ دقيقة.

٦ـ تغسل الشرائح بالماء الجاري.

٧ـ تصبغ المقاطع بصبغة هيماتوكسلين هاريس لمدة ٣٠ ثانية.

٨ـ تغسل المقاطع بالماء حتى تبدو مزرقة، وقد تغسل في محلول ماء الأمونيا (٣ نقاط من هيدروكسيد الامونيا المركز، و ٥٠ مل ماء الصنبور.

٩ـ تجفف المقاطع بالكحول تصاعدياً، وتروق بالزايلين، وتغطى ببلسم كندا.

النتيجة: تظهر الأنوية بلون أزرق، ويظهر الجلايكوجين والمخاط بلون وردي.

ملاحظة:

١ ـ وهنا لا بد من استخدام شرائح مرجعية تحوي جلايكوجين، ومصبوغة بطريقة PAS لغاية المقارنة.

٢ ـ وكذلك يمكن استخدام فحص انزيم الدياسيتز Diastaze (انزيم يحلل الجلايكوجين) حيث إن معالجة المقاطع بالدياسيتز تؤكد وجود الجلايكوجين إذا فقد اللون الوردي.

٧ ـ صبغة المادة المشبهة بالنشا Amyloid Stain

تفيد هذه الصبغة في تشخيص بعض الأمراض المرتبطة بتراكم المادة المشبهة بالنشا في الأنسجة والتي توجد على نوعين:

أ ـ **مادة مشبهة بالنشا ابتدائية (Primary Amyloid)** ، وهو يصيب عضواً واحداً مثل اللسان أو القلب أو الجلد أو الرئتين، وهو مجهول السبب.

ب ـ **مادة مشبهة بالنشا ثانوية (Secondary Amyloid)** : وفي هذا النوع تتراكم المادة النشوية بين خلايا الأنسجة كحالة مرضية نتيجة لأمراض أخرى مثل الالتهابات المزمنة كالتهاب العظام ومرض السل، وأكثر الأعضاء التي تتعرض لتراكم هذه المادة هي الطحال والكبد والكليتين والقلب والغدة الكظرية.

المحلول الأول:

صبغة الكونغو الحمراء Congo Red (0.5%) في محلول الكحول الايثيلي (٥٠٪).

المحلول الثاني:

هيدروكسيد البوتاسيوم (٢ , ٠٪) في محلول الكحول الايثيلي (٨٠٪).

المحلول الثالث:

صبغة هيماتوكسلين ماير: تحضر كما ورد سابقاً.

طريقة الصباغة:

١ـ اغسل المقاطع بالزايلين لإزالة الشمع ثم بالكحولات التنازلية إلى تركيز ٧٠٪.
٢ـ اصبغ المقطع بصبغة الكونغو الحمراء لمدة خمس دقائق.
٣ـ استعمل خليط الكحول وهيدروكسيد البوتاسيوم لتمييز الصبغة لمدة ١ ـ ٣ دقائق.
٤ـ اغسل المقاطع بالماء العادي لمدة ٢ ـ ٣ دقائق.

٥ـ اغسل المقاطع بالماء المقطر.

٦ـ ضع المقاطع في صبغة الهيماتوكسلين لمدة ١ ـ ٢ دقيقة.

٧ـ اغسل المقاطع بالماء العادي حتى يتحول لونها إلى أزرق.

٨ـ جفف المقاطع بالكحول المطلق، وروقها بالزايلين، واستعمل بلسم كندا للتغطية.

النتيجة: تتلون المادة المشبهة بالنشا باللون الأحمر الفاتح إلى الأحمر الغامق، وتتلون أنوية الخلايا باللون الأزرق.

٨ ـ صبغة الدهون المتعادلة Neutral Fats

وتستخدم هذه الصبغة للكشف عن حالات مرضية تتعلق بتغيرات في الأنسجة الدهنية أو إفرازات غير عادية للدهون كما في حالة الأورام الدهنية، وسرطان الدهن، والورم الدهني المخاطي، وأمراض الكبد الدهنية.

وفي هذه الصبغة لا يمكن تمرير المقاطع بالخطوات التقليدية التي تذيب الدهون. لذا عادة ما تستخدم طريقة التجميد السريع في هذه التحضيرات.

المحلول الأول:

ويحضر من:

أ ـ ستة أحجام من محلول صبغة Oil Red في الأيسوبروبانول Isopropanol:

Oil Red	٠,٥ غم
Isopropanol	١٠٠ مل

ب ـ أربعة أحجام من الماء المقطر:

يخفف محلول أ في الماء المقطر ثم يترك لمدة ١٠ دقائق، ويرشح خلال ورق ترشيح، يبقى الراشح ثابتاً لعدة ساعات.

المحلول الثاني:

هيماتوكسلين ماير: ويحضر كما ورد سابقاً.

طريقة الصباغة:

١ـ تغسل المقاطع المجمدة بالماء المقطر.
٢ـ تصبغ المقاطع بصبغة المحلول الأول لمدة ١٠ دقائق.
٣ـ تغسل المقاطع بالماء المقطر.
٤ـ توضع المقاطع في صبغة المحلول الثاني لمدة ١ـ٢ دقيقة.
٥ـ تغسل المقاطع تحت الماء الجاري حتى يصبح لونها أزرق ويخفف الماء الزائد.
٦ـ تغطى المقاطع باستخدام لاصق هلام الجليسرين Glycerine Jelly

النتيجة: تظهر الدهون بلون أحمر وأنوية الخلايا بلون أزرق.

تغطية المقاطع Mounting of Sections

بعد تلوين المقاطع النسيجية المثبتة على الشرائح الزجاجية يجب أن تغطى بأغطية زجاجية Coverslips ، وذلك لحماية المقاطع المصبوغة التي تكون شديدة وسريعة التهتك نتيجة للاحتكاك بالعوامل الخارجية، وأيضاً لمنع فساد الصبغة من التأكسد. وعند التغطية يجب استعمال أوساط أو مواد خاصة لإلصاق هذه الأغطية على الشرائح. ومن مميزات وسط التغطية الجيد ما يلي:

١ ـ يجب أن تجفف وتتصلب بسرعة نسبياً.
٢ـ يجب أن تحافظ على الأصباغ، وأن لا تتحول إلى مادة حامضية التفاعل مع الزمن حتى لا تؤثر على أصباغ الأنيلين (الأيوسين والهيماتوكسلين).
٣ـ يجب أن لا تتكون فيها شقوق أو حبيبات.
٤ـ يجب أن يكون معامل انكسارها للضوء قريب من معامل انكسار الزجاج، وذلك

لرؤية مكونات النسيج بشكل أفضل.

٥ـ الامتزاج الكامل مع وسط الترويق.

أوساط التغطية

تقسم أوساط التغطية إلى نوعين:

١ـ أوساط مائية Aqueous media : وهي أوساط تستخدم للتحضيرات المؤقتة غالباً، وقد تستعمل للمقاطع المحضرة بطريقة التجميد كتحضيرات دائمة. ومن أمثلتها الصمغ العربي، والجيلاتين.

٢ ـ أوساط راتنجية Resinous media : وقد تكون هذه مواد طبيعية مثل بلسم كندا Canada balsam أو مواد صناعية مثل DPX

وتقسم أيضاً وسائط التغطية إلى قسمين حسب طريقة التحضير، وهي أوساط دائمة أو مؤقتة.

١ـ الأوساط الدائمة Permanent media

وهي أوساط تستخدم لتغطية المقاطع النسيجية بشكل دائم، ومنها ما يلي:

أ ـ بلسم كندا Canada balsam

وهي مادة طبيعية تفرز من سيقان نبات البلسم *Abies balsam* ، وقد تكون لزجة طبيعياً أو جافة تذاب في الزايلين، وهي شائعة الاستعمال. ومن ميزات هذا الوسط:

١ـ معامل انكساره ١,٥٢، وهو قريب جداً من معامل انكسار الزجاج.

٢ـ يذوب في الزايلين بسهولة.

٣ـ شفاف ولا لون له ولا يتشقق أو يتحبب.

ومن عيوبه أنه يسبب شحوباً لكثير من الصبغات لأنه يصبح حامضياً مع الزمن،

وكذلك يعمل اسوداداً للمقاطع.

ويحضر بطريقتين:

الطريقة الأولى: البلسم المتعادل Neutral Balsam

يذاب البلسم في الزايلين بنسبة ٤٠ ـ ٥٠٪، ويضاف حامض السالسيليك Salicylic acid بشكل زائد مع التحريك الجيد، ثم يترك المحلول ليترسب ويؤخذ الطافي في عبوات خاصة يكتب عليها تاريخ التحضير ويترك الراسب.

الطريقة الثانية: البلسم الحامضي Acid Balsam

يذاب البلسم في الزايلين بنسبة ٤٠ ـ ٥٠٪ ويضاف حامض السالسيليك Salicylic acid بشكل زائد مع التحريك الجيد، ثم يترك المحلول ليترسب، ويؤخذ الطافي في عبوات خاصة يكتب عليها تاريخ التحضير، ويترك الراسب.

ب ـ كير كباتريك D.P.X. (Distrene - Plasticizer - Zylene)

وهو من الأوساط الصناعية الشائعة الاستعمال.

ومن ميزاته أنه شفاف ويجف بسرعة، ويساعد على حفظ الصبغة، وكذلك معامل انكساره ١,٥٢ ويتكون من:

١٠ غم	Distrene (80)
٥ مل	Dibutylphthalate
٣٥ مل	Xylene

يمزج الملوّن Dibutylphthalate مع الزايلين، ويخلط جيداً، ثم يذاب الدسترين، ويسجل تاريخ التحضير.

ومن الأوساط الأخرى الكلارايت Clarite (معامل انكساره ١,٥٤). وشراب نواة الذرة Karo corn syrup (معامل انكساره ١,٤٧).

٢ ـ الأوساط المؤقتة Temporary media

وتفيد هذه الأوساط في التحضيرات السريعة، وكذلك في التحضيرات التي تظهر الدهون حيث تتأثر في الأوساط الراتنجية، وتحتاج إلى أوساط مائية، ومن هذه الأوساط:

أ. **الماء**: ويستخدم في التحضيرات الرطبة Wet mounts ، وهو شفاف لا لون له ولكنه سريع الجفاف.

ب. **الجليسرول Glycerol** : وقد يكون شبه دائم إذا أُحكم إغلاق حواف غطاء الشريحة بواسطة شمع البرافين، أو طلاء الأظافر، أو مادة بلاستيكية أخرى. وتخفيف الجليسرول بقليل من الماء يحسن الرؤيا.

ج. **هلام الجليسرول Glycerol Jelly** : يذاب هذا الوسط قبل استعماله بالماء، ومن عيوبه شحوب الصبغة مع الزمن وتغلق حواف الشريحة ليصبح التحضير شبه دائم.

طريقة التغطية Method of mounting sections

١ـ تحضير غطاء شريحة Cover slip نظيف وذو حجم مناسب لعدد المقاطع على الشريحة.

٢ـ يزال الزايلين الزائد على الشريحة بواسطة قطعة شاش نظيفة، وأمّا المقاطع فيزال عنها الزايلين الزائد بتحريك الشريحة بقوة في الهواء مع المحافظة على عدم لمس المقاطع.

٣ـ يوضع قطرة من اللاصق على المقطع ثم تقلب الشريحة رأساً على عقب بحيث يكون المقطع إلى الأسفل حتى يلامس اللاصق غطاء الشريحة، وحالاً عندما يبدأ الوسط اللاصق بالانتشار بين الغطاء والشريحة، ترجع الشريحة إلى الوضع

الطبيعي، ويمكن تعديل الغطاء الزجاجي بواسطة قضيب زجاجي رفيع.

٤ـ توضع الشرائح الزجاجية المغطاة في فرن شمع البرافين لمدة ١٢ ـ ١٨ ساعة، أما مقاطع الجهاز العصبي فتوضع في حاضنة بدرجة ٣٧°م لمدة ١٢ ساعة.

ملاحظة: إن وجود بقايا زايلين على المقاطع عند التغطية يؤدي إلى ذوبانه مع وسط التغطية وتكوين فقاعات هواء تحت الغطاء الزجاجي مما يفسد التحضير. وإذا لوحظ وجود فقاعات هوائية يجب إرجاع التحضير إلى الزايلين حتى يسقط الغطاء ومن ثم تعاد عملية التغطية من جديد.

* **تنظيف ووسم وخزن الشرائح الجاهزة:**

ينصح بإزالة المواد المصبوغة حول المقاطع النسيجية قبل عملية التغطية باستخدام إبرة تشريح ملفوف على طرفها قطنة مبللة بالزايلين.

كما ويجب إزالة الوسط اللاصق الزائد خارج أغطية الشرائح بواسطة شفرة حادة، ثم يمسح الباقي بواسطة قطنة مبللة بالزايلين مع أخذ الحذر حول حواف الغطاء لئلا يذوب الوسط اللاصق تحت الغطاء.

ويمكن استعمال الكحول ٩٥٪ حول حواف الغطاء لإزالة آثار مادة التغطية، وبعد ذلك تغسل الشرائح في محلول الصابون لمدة قليلة، ثم تلمع بقطعة شاش نظيفة.

عملية وسم الشرائح ضرورية جداً لئلا يحدث التباس بين الشرائح، وتتم بطريقتين حسب نوع الشريحة:

أ. **الشرائح المسنفرة**: وهذه الشرائح أحد طرفيها مسنفر يمكن الكتابة عليها بقلم الرصاص أو الحبر الصيني.

ب. **شرائح عادية**: وهنا يوضع ورقة وسم على أحد طرفي الشريحة المعلومات التي

تكتب على الشريحة هي : اسم المريض أو رقمه، نوع النسيج ، اسم المثبت والصبغة، وتاريخ تحضير الشريحة .

تخـزن الشـرائـح الجـاهزة في علب خاصة متنوعة قد تكون أفقية توضع فيها الشرائح أفقياً، أو عمودياً تحتوي على أخاديد خاصة تركب فيها الشريحة عمودياً، وقد يطال عمر التخزين بإغلاق الغطاء للشريحة بمادة دهان ملونة من نوع خاص.

الوحدة السابعة

المقاطع الجليدية والتجميد الجاف

وتشمل:

- تحضير المقاطع الجليدية.
- التجميد الجاف.

الوحدة السابعة

المقاطع الجليدية والتجميد الجاف
Frozen sections and freez drying

لقد تبين لنا مما سبق أن عملية تحضير الشرائح النسيجية بهدف تشخيصها تستغرق وقتاً طويلاً نسبياً ما بين عمليات التثبيت والمعالجة والطمر والصبغ؛ ولما كانت هناك حاجة ماسة للحصول على شرائح نسيجية محضرة خلال فترة قصيرة جداً في الحالات الطارئة أثناء إجراء العمليات الجراحية، حيث يحتاج الطبيب الجراح إلى تقرير يشخص حالة النسيج المأخوذ من المريض اثناء الجراحة ليتخذ القرار الحاسم باستئصال العضو المصاب، أو اتخاذ أي إجراء علاجي سريع آخر، لذلك كان لا بد من تطوير تقنية نسيجية تلبي هذه الحاجة، وكانت هذه التقنية هي عملية القطع الجليدي.

وتعرف عملية التقطيع الجليدي بأنها عملية تحضير مقاطع نسيجية في ظروف معينة من أهمها درجة الحرارة المنخفضة جداً، وغالباً ما تكون عدة درجات تحت الصفر.

ولقد استعملت هذه التقنية النسيجية أيضاً للتحضيرات النسيجية التي تتعارض مع الطريقة الروتينية التي تعلمناها سابقاً، كدراسة بعض مكونات الأنسجة والخلايا التي قد تختفي وتذوب أثناء العمليات النسيجية التي تجرى في درجات حرارة عالية كالإشباع والطمر. وأهم هذه المواد هي الأنزيمات والدهون في بعض الحالات

المـرضية التي ترتفـع فيها نسبة الأنزيمات والدهون في الخلايا كالأورام الدهنية Lipoma ، وبعض أمراض الكبد والكلى .

مما سبق يمكن تلخيص أهمية التجميد السريع بعدة نقاط أهمها :

١ـ تحضير شرائـح نسيجية ودراستهـا في الحـالات الـطارئـة اثناء إجراء العمليات الجـراحية ، حيث يمكن الحصـول على شرائـح جاهزة ، وتشخيصها خلال فترة قصيرة جداً لا تتعدى ١٠ دقائق .

٢ـ دراسة الأنزيمات والدهون في بعض الحالات المرضية .

٣ـ تحضير شرائـح نسيجية من الأنسجة الطرية الهشة كالجهاز العصبي ، والتي لا يمكن تحضيرهـا بالـطرق النسيجية الـروتينية المـطولة ، حيث يمكن أن يتحطم النسيج أثناء خطوات المعالجة .

* **نظرية التجميد والقطع الجليدي :**

عنـد استئصال جزء من النسيج كعينة نسيجية Biopsy وتجميدها بشكل سريع مفـاجيء ، فإن المحتوى المائي للنسيج سيتحول إلى جليد ، مما يكسب الدعامة والصـلابـة الـلازمتين للتحكم به وتقطيعه إلى مقاطع رقيقة ، وهذا يغني عن إجراء عملية الطمر بالشمع ، وكذلك فإن عملية التجميد تعتبر طريقة فعالة من طرق التثبيت ومنع تغيرات ما بعد الموت التي قد تحدث للنسيج ، مما يغني عن مرحلة التثبيت ، والتي تستغرق وقتاً طويلاً في الغالب . ولما استطعنا أن نستغني عن مرحلة التثبيت نكـون قد اختصـرنا عمليات المعالجة أيضاً ، وبذلك يمكن الحصول على مقاطع نسيجية وتحضير شرائـح سريعة تصبغ بطرق مختصرة أيضاً خلال فترة زمنية قياسية محققة الأهداف المذكورة سابقاً .

وقـد وجـد أن هنـاك علاقـة طردية بين برودة النسيج وصلابته ، حيث إنه كلما

خفضت درجة حرارة النسيج، كلما أمكن الحصول على مقاطع أفضل منه، ولكن اختيار حرارة التقطيع المناسبة يعتمد على نوع النسيج، وبشكل عام، فإن درجة حرارة التقطيع لمعظم الأنسجة غير المثبتة والخالية من الدهون تراوح حول - ٢٠°م. ويمكن تحضير بعض الأنسجة المثبتة بطريقة القطع الجليدي بدرجة - ١٠°م.

تحضير المقاطع الجليدية

١ - الأجهزة المستخدمة:

تستخدم في هذه التقنية عدة أنواع من أجهزة القطع.

أ - جهاز القطع الجليدي Freezing microtome

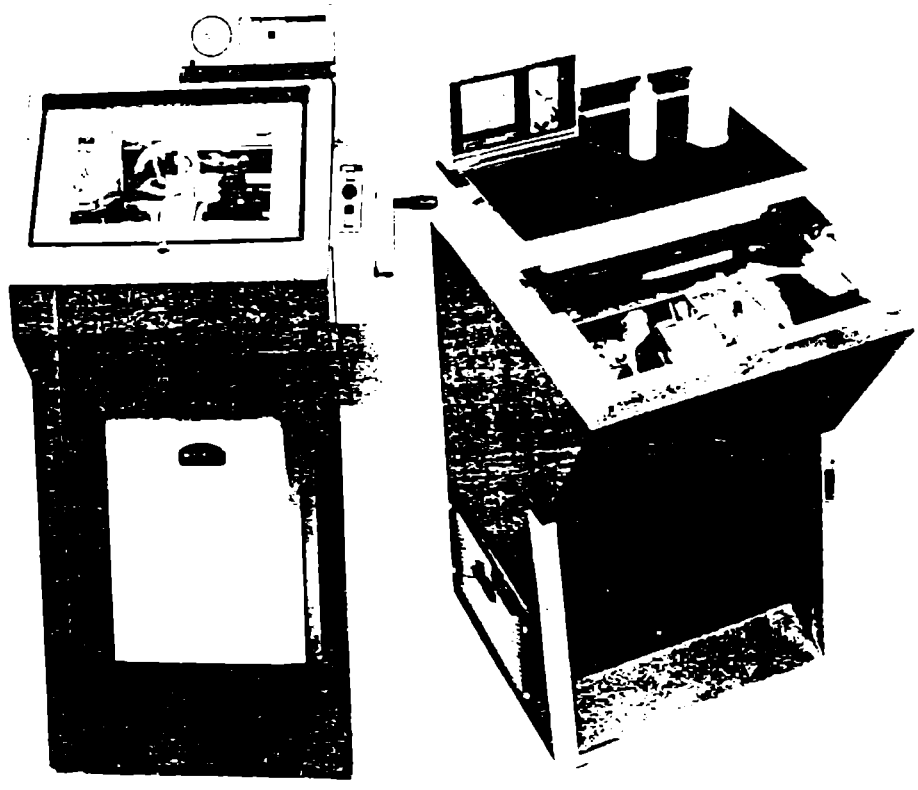
وقد مر معنا سابقاً بعض خصائص هذا الجهاز، فهو لا يعطي مقاطع متسلسلة على شكل شريط نسيجي Ribbon ، ويعتمد مبدأ هذا الجهاز على أن السكين عادة هي التي تمر على سطح القالب وتأخذ المقطع منه بعكس جهاز القطع الدوار، والذي يعتمد على مبدأ ثبات السكين وحركة القالب.

وجهاز القطع الجليدي مزود بأسطوانة غاز CO2 المضغوط على شكل سائل لتبريد منطقة القطع بشكل مستمر.

وهناك أجهزة قطع جليدي مزودة بوحدة قياس حراري Thermomodule كبديل لغاز ثاني أكسيد الكربون المضغوط، وهذه الوحدة تعتمد على استخدام تيار كهربائي مباشر لتبريد منطقة القطع.

ب - جهاز القطع منتظم البرودة Cryostat

وهذا الجهاز هو عبارة عن جهاز قطع جليدي مطور يتكون من غرفة مبردة



شكل رقم (٧)

أشكال جهاز كريوستات Cryostat

كهربائياً تحتوي على جهاز القطع بداخلها، وغالباً ما يكون من النوع الدوار، ويتم التحكم بالجهاز من خارج الغرفة. وقد كان أول جهاز Cryostat استحدث على يد البريطاني Pearse سنة ١٩٥٤م، وتتراوح درجة حرارة جهاز Cryostat بين -٥ — -٣٠٠م.

٢ ـ سكين القطع:

تستخدم سكاكين القطع ذات الشكل الاسفيني مستوية الحافة والمصنوعة من الكوبالت لقدرتها على مقاومة صلابة النسيج ومقاومة الصدأ والتآكل.

٣ ـ سمك المقاطع:

لا يمكن الحصول على مقاطع جليدية يقل سمكها عن ٥ ميكرون في الغالب باستخدام القطع الجليدي، وجهاز القطع الجليدي المزود بأسطوانة CO2 لا يعطي مقاطع يقل سمكها عن ١٥ ميكرون، وتكون المقاطع غير متصلة.

* **تحضير المقاطع الجليدية في الحالات الطارئة:**

يتم تحضير المقاطع الجليدية في الحالات الطارئة دون الحاجة إلى أيٍّ من عمليات التثبيت أو المعالجة كما مرّ سابقاً، ولكن تؤخذ العينة من المريض، وتبرد بأقصى سرعة ممكنة، ثم تقطع بواسطة جهاز القطع الجليدي، أو جهاز Cryostat ، ثم تصبغ هذه المقاطع وتفحص مجهرياً من قبل الطبيب المختص في علم الأمراض، وتتم هذه العملية خلال وقت لا يتعدى ١٠ دقائق.

* **تحضير المقاطع الجليدية في الحالات غير الطارئة:**

ذكرنا فيما سبق أن تقنية القطع الجليدي يمكن استخدامها لدراسه بعض مكونات الأنسجة التي يمكن أن تختفي أو تذوب في المعالجة النسيجية العادية كالأنزيمات والدهون. وهذه التحضيرات النسيجية تمر بمرحلة تثبيت وطمر باستخدام مثبت خاص ومادة طمر خاصة أيضاً.

* **المثبت المستخدم:**

يستخدم لهذا الغرض مثبت الفورمالين الكلسي ١٠٪ (10% Formalcalcium) ، ويتكون من:

فورمالين	١٠٠ مل
ماء مقطر	٩٠٠ مل
كلوريد الكالسيوم ١٠٪	١٠٠ مل

وتتم عملية التثبيت على درجة حرارة ٤°م، وتصل مدة التثبيت إلى ١٨ ساعة.

* **مادة الطمر:**

يستخدم لطمر هذه الأنسجة مادة الجيلاتين على شكل محلول جليسرين - جيلاتين. ويتكون من:

جيلاتين	١٦ غم
جليسرين	١٥ غم
ماء مقطر	٧٠ مل
ثايمول	قطعة صغيرة كمادة حافظة من التعفن

يُحفظ هذا المحلول على درجة حرارة ٤°م ويسخن عند الاستخدام في حمام الماء حتى يتحول إلى حالة السيولة.

* **طريقة الطمر بالجيلاتين:**

١- يثبت النسيج في الفورمالين الكلسي ١٠٪.
٢- يغسل النسيج في الماء الجاري لمدة ١٢ ساعة.
٣- يغمر النسيج في محلول جليسرين - جيلاتين لمدة ٦ ساعات على درجة حرارة ٣٧°م.
٤- يطمر النسيج في محلول جليسرين - جيلاتين ثم يبرد حتى يتصلب في الثلاجة.
٥- يقلم القالب بالطرق المعروفة.
٦- يحفظ القالب في مثبت الفورمالين الكلسي ١٠٪ حتى يكتسب صلابة أكثر.

٧ـ يقطع النسيج إلى مقاطع رقيقة تصبغ بطرق سريعة مختصرة، ثم تقرأ تحت المجهر.

* **صبغ المقاطع الجليدية:**

لقد أوضحنا أن تحضير المقاطع الجليدية من تقطيع وصباغة يتم خلال فترة قصيرة جداً لذلك لا بد وأن تكون عملية الصباغة أيضاً مختصرة وسريعة.

* **صبغ المقاطع الجليدية:**

لقد أوضحنا أن تحضير المقاطع الجليدية من تقطيع وصباغة يتم خلال فترة قصيرة جداً لذلك لا بد وأن تكون عملية الصباغة أيضاً مختصرة وسريعة.

* **إجراءات الصبغ:**

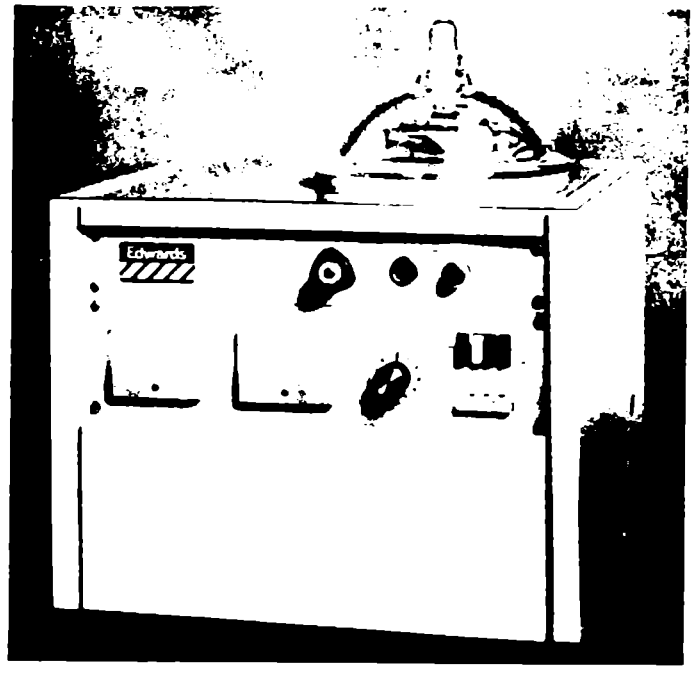
١ـ تثبت المقاطع الجليدية في الفورمالين ١٠٪ لمدة ٦ ـ ٣٠ ثانية على درجة حرارة الغرفة.
٢ـ تغسل في كحول ٧٠٪.
٣ـ تغسل في الماء الجاري.
٤ـ تغطى الشريحة أو تغمر في صبغة هيماتوكسيلين هاريس لمدة دقيقة.
٥ـ غسيل في الماء للتخلص من الصبغة الزائدة.
٦ـ تغمس المقاطع في محلول التمييز وهو ٠,٥٪ كحول حامضي عدة غمسات.
٧ـ غسيل بالماء العادي.
٨ـ يوضح اللون الأزرق بغمر الشرائح في محلول كربونات الليثيوم.
٩ـ غسيل مرتان في الماء الجاري.
١٠ـ تغمر المقاطع في صبغة الايوسين الكحولية ١٪ لمدة ٢ ـ ١٠ ثوان.
١١ـ تغمر المقاطع في محلول الايثانول ٩٥٪ مرتين، كل مرة عدة غمسات.

١٢ـ تجفف المقاطع باستخدام كحول مطلق مرتين عدة غمسات كل مرة.

١٣ـ تروق المقاطع في الزايلين مرتين.

١٤ـ تغطى المقاطع بوسط تغطية مناسب مثل بلسم كندا.

التجميد الجاف Freez drying



شكل رقم (٨) أ

جهاز التجميد الجاف

Fig.5.5 The Speedivac-Pearse freeze dryer

Reproduced by courtesy of Edwards High Vacuum Ltd.

شكل رقم (٨) ب

جهاز تجميد جاف

Fig. 5.6 The vapour trap in a thermoelectric freeze dryer

Phosphorus pentoxide acts as a chemical trap for the water molecules passing form the tissue

تعتبر عملية التجميد الجاف Freez drying من الطرق النسيجية السريعة جداً **في تحضير المقاطع النسيجية في بعض الحالات الطارئة، أو في تحضيرات دراسة** بعض الانـزيمـات، وتتلخص هذه الـطريقـة بالتجميد المفاجيء الفوري للنسيج باستخدام غاز النيتروجين المضغوط على درجات حرارة تصل إلى - ١٦٠°م. ثم يتم تنظيف وتنقية النسيج من بلورات الجليد المتكونة باستخدام جهاز الشفط (Vaccum)

على درجـات حرارة تصل إلى - ٤٠°م، ثم تنقل المقاطع إلى جو الغرفة ودرجة حرارة الغرفة، حيث تثبت ببخار الفورمالين، أو تطمر بوسط طمر مناسب، ثم تقطع وتصبغ.

الوحدة الثامنة

علم الخلايا التقشرية

وتشمل:

- أنواع العينات وجمعها.
- عينات النسائية.
- عينات التجاويف والقنوات.
- العينات المسحوبة.
- تحضير شرائح نسيجية مختلفة من العينات المذكورة.

الوحدة الثامنة

علم الخلايا التقشرية Cytology

يعرف علم الخلايا التقشرية بأنه دراسة الخلايا المتقشرة في الأحوال الطبيعية، أو في حال تجميعها من مواقعها المختلفة.

وتكمن أهمية هذا العلم في أن التغيرات التي تظهر في الخلايا السطحية للأنسجة هي انعكاس للتغيرات التي تحدث في الأنسجة التحتية.

أنواع العينات وجمعها Specimen's collection

١ ـ عينات النسائية أو عينات قناة التكاثر الأنثوية
(Gynaecological Cytology)

أو **(Female Reproductive Tract)** وتشمل ما يلي:

أ ـ شرائح عنق الرحم (Cervical Smear)
ب ـ الشرائح المهبلية (Vaginal Smear)

٢ ـ عينات التجاويف والقنوات: وتشتمل على ما يلي:

أ ـ التجويف الفمي (Buccal Cavity)
ب ـ الجهاز التنفسي (Respiratory Tract)
ج ـ التجاويف البطنية (Peritoneal Cavity)
د ـ التجاويف الصدرية (Pleural Cavity)
هـ ـ الجهاز البولي (Urinary Tract)
و ـ التجويف المخي الشوكي (Cerebro Spinal Fluid)

ز ـ خراج الثدي (Breast Discharge)

ح ـ عينات المعدة والجهاز الهضمي G.I. and Gastric Cytology

٣ ـ العينات المسحوبة Aspirates

وهي العينات التي يتم أخذها من مواقع متعددة مثل: الغدد، والكبد، والعقد اللمفاوية وغيرها.

* عينات النسائية Gynaecological Cytology

تعتبر العينات التي تؤخذ من جهاز التكاثر الأنثوي ذات أهمية كبيرة في تشخيص الأمراض والاضطرابات الهرمونية التي قد تصيبه، وكذلك في الكشف المبكر عن سرطانات هذا الجهاز مما يساعد بشكل رئيس في تحديد إمكانية العلاج. ودراسة هذه العينات تشتمل على ما يلي:

١ ـ دراسة الأورام السرطانية Detection of malignancy

٢ ـ دراسة التغيرات الهرمونية Hormonal Study

٣ ـ دراسة الالتهابات Identification of infections

* طريقة أخذ العينات Collection of material

تؤخذ هذه العينات بواسطة الطبيب الاختصاصي (Clinician)، ويستعمل الطبيب في هذه العملية أداة تسمى Spacula حيث يحركها داخل عنق الرحم Cervix حركة دائرية ٣٦٠° حتى تكون العينة ممثلة لأكبر قدر ممكن من مساحة عنق الرحم، ثم تلطّخ هذه العينة المأخوذة على شرائح زجاجية بأسرع وقت ممكن وبطريقة مناسبة. وبنفس القدر من السرعة توضع الشرائح الملطخة في محلول مثبت حتى لا تجف الخلايا وتصبح غير مفيدة في عملية التشخيص.

* التثبيت Fixation

هناك عدد من المثبتات التي تستعمل في تثبيت الخلايا التقشرية بشكل عام، وأكثر هذه المثبتات استعمالاً هو الكحول الاثيلي، تركيز ٩٥٪، ويمكن إضافة حامض الخليك تركيز ٣٪، مما يساعد في تثبيت الأنوية، ولتسهيل عملية نقل العينات يستعمل مثبت على شكل Spray يحتوي على Poly ethylene glycol المذاب في الكحول الاثيلي Ethanol

* الصباغة Staining

١- تعتبر صبغة Papanicolaou هي الصبغة الروتينية المستعملة في عينات النسائية خاصة، وعينات الخلايا التقشرية عامة، وتكمن أهميتها في هذه العينات في قدرتها على تمييز الخلايا في مراحل نضجها المختلفة، حيث تشتمل هذه الصبغة على ثلاث صبغات أساسية، وهي تصبغ السيتوبلازم والنواة، وتعكس دراسة مراحل نضج الخلايا مفيد في تحديد المستويات الهرمونية.

٢- صبغة هيماتوكسيلين - ايوسين: تعتبر عند بعض اختصاصي علم الأمراض Pathologists من الصبغات المفيدة لدراسة الخلايا التقشرية كما تستخدم في عينات الأنسجة.

* تحضير صبغة Papanicoloau

تتكون صبغة Papanicoloau من الصبغات التالية:

١ - هيماتوكسيلين هاريس بدون إضافة حامض الخليك.
٢ - صبغة Orange G.6 وتتكون من:
أ- ٠,٥ غم من صبغة Orange G.6 (مسحوق) تذاب في ١٠٠ مل من الكحول الاثيلي تركيز ٩٥٪.
٠,٠١٥٪ غم حامض الفسفوتنجستيك (Eosin-Azura 50) (Phosphotengstic acid)

٣ـ صبغة (EA 50) (Eosin-Azure 50) : وتحضر هذه الصبغة من المواد التالية :

أ ـ ١ , ٠ غم من صبغة (Light green) يذاب في ١٠٠ سم٣ من الكحول الاثيلي تركيز ٩٥٪ .

ب ـ ٥ , ٠ غم من صبغة (Bismark brown) يذاب في ١٠٠ سم٣ من الكحول الاثيلي تركيز ٩٥٪ .

ج ـ ٥ , ٠ غم من (Eosin yellowish) يذاب في ١٠٠ سم٣ من الكحول الاثيلي تركيز ٩٥٪ .

ويتم تحضير هذه الصبغة من المواد السابقة بالنسب التالية :

٤٥ سم٣ من المادة أ + ١٠ سم٣ من المادة ب + ٤٥ سم٣ من المادة جـ . ويضاف لهذه الخلطة المادتين التاليتين :

١ ـ ٢ , ٠ غم من حامض الفسفوتنجستك .

٢ ـ نقطة واحدة من كربونات الليثيوم المشبعة بالماء .

* طريقة الصبغ :

١ـ إخراج الشرائح من المثبت (٩٥٪ كحول اثيلي) .

٢ـ غسل الشرائح بالماء .

٣ـ تغمر الشرائح في صبغة الهيماتوكسيلين لمدة نصف دقيقة إلى دقيقة .

٤ـ غسيل جيد بالماء .

٥ـ غسيل الشرائح بالكحول الاثيلي تركيز ٩٥٪ .

٦ـ تعالج الشرائح بغمرها في محلول الامونيا تركيز ١٪ مذابة في كحول اثيلي ٩٥٪ لمدة دقيقة .

٧ـ غسيل بالكحول الاثيلي ٩٥٪ .

٨ـ تصبغ بصبغة (O.G.6) لمدة ٩٠ ثانية .

٩ـ غسيل بالكحول الاثيلي ٩٥٪ في وعائين .

١٠ـ تصبغ بصبغة (EA 50) لمدة ٩٠ ثانية.
١١ـ غسيل بالكحول الاثيلي ٩٥٪ في وعائين متتاليين.
١٢ـ غسيل بالكحول المطلق (Absolute) في وعائين متتاليين.
١٣ـ تنقية باستخدام الزايلين (Xylene) في وعائين متتاليين.
١٤ـ تغطية وحفظ Mounting

* **نتائج الصبغة:**

النواة	تصبغ بلون أزرق
سيتوبلازم الخلايا السطحية	تصبغ بلون زهري
الخلايا المحبة للحامض ((Eosinophils)	تصبغ بلون أحمر
الخلايا المحبة للقاعدة (Basophilis)	تصبغ بلون أزرق مخضر
الكريات الحمراء	تصبغ بلون أحمر برتقالي

٢ ـ عينات التجاويف والقنوات وأهمها:

أ ـ التجويف الفمي (Buccal Cavity)

تساعد العينات التي تؤخذ من هذا التجويف في تشخيص: الالتهابات والسرطانات التي تصيب بعض أجزاء الفم.

أما الفحص الأكثر شهرةً والذي يتم الحصول على عيناته من التجويف الفمي فهو: دراسة الكروموسومات الذي يسمى (Buccal smear) حيث يتم أخذ عينة من الخلايا الطلائية بواسطة ضاغطة اللسان (Tounge depresser) ونشرها على شرائح ووضعها مباشرة في المثبت (الكحول الاثيلي ٩٥٪).

ودراسة هذه الخلايا تهدف إلى التأكد من وجود الكروموسوم الانثوي الثالث والعشرين (××)، حيث يظهر الكروموسوم على شكل تجمع كروماتيني على السطح الداخلي للغشاء النووي، ويسمى هذا الكروموسوم في هذه الحالة (barr

(body) ، والأنثى السويّة يجب أن تحتوي خلايا أنسجتها على هذا الجسيم بالشكل الـذي ذكـر، وعـدم وجـوده أو وجود أكثر من واحد من هذه الجسيمات في الخلية الواحدة يعني أن هناك عيباً خلقياً قد أصاب هذه الأنثى. أمّا الرجل السوي، فخلاياه لا تحتوي على هذا الجسيم، أما إذا وجد مثل هذا الكروموسوم في خلايا الرجل، فهذا يعني أن الرجل من حيث الطراز الشكلي هو رجل، أما من حيث الطراز الجيني فهـو أنثى. وهـذا يعني أنـه ليس رجـلاً وليس امرأة، ويكون عنده ٤٧ كروموسوم، ويكون زوج الكروموسومات الأخير على الشكل (XXY) .

الصبغات المستخدمة في فحص Buccal smear عديدة من أهمها صبغة Papanicolaou ، أو صبغة (Aceto orcien) ، وهذه الصبغة يمكن أن تكون دائمة (Permenent) ، أو مؤقتة (Wet preperation) .

ب ـ عينات الجهاز التنفسي Respiratory Tract

تكمن أهمية هذه العينات في تشخيص ما يلي :

أ ـ سرطانات الأجزاء السفلية من الجهاز التنفسي.
ب ـ تشخيص الالتهابات الفيروسية والفطرية.

والعينات التي تؤخذ من الجهاز التنفسي هي :

١ ـ البلغم Sputum
٢ ـ الغسيل القصبي Broonchial wash

١ ـ البلغم Sputum

يجب أن تكـون عينـة البلغم المـأخـوذة صباحية حتى لا تكون مختلطة ببقايا الطعام، وتؤخذ لهذا الغرض ثلاث عينات على مدار ثلاثة أيام متتالية. ومن شروط العينة أيضاً أن لا تؤخذ قبل مضي أسبوعين على الأقل على عملية تنظير القصبات

(Bronchoscopy) حتى لا تكون محتوية على خلايا التهابية تتساقط نتيجة عملية التنظير مما يموه التشخيص.

تحضر العينة فور أخذها من المريض بأسرع وقت ممكن، ويمكن أن تحفظ في الثلاجة على درجة ٤°م.

* تحضير عينة البلغم:

١- يجب أن يرتدي الفاحص قفازات طبية لليدين، ويرتدي قناع للفم (Mask)، خصوصاً في الحالات التي يتوقع أن يكون المريض مصاباً بالسل الرئوي.

٢- توضع عينة البلغم في طبق بتري (Petri dish) وبواسطة ملقطين يتم انتقاء الجزء الأكثر كثافة في العينة.

٢ - الغسيل القصبي Bronchial wash

ويتم أخذ هذه العينة عن طريق إدخال كمية من المحلول الملحي Normal saline في جهاز التنظير، ثم يعاد سحبها عدة مرات على منطقة الشك، وتكون هذه العينة مليئة بالخلايا.

* تحضير العينة:

فصل العينة بواسطة جهاز الطرد المركزي حيث يتكون في الأنبوب ثلاث طبقات هي:

أ - طبقة سطحية رقيقة.
ب - طبقة المحلول الملحي.
ج - طبقة المخاط المختلط بالدم وبخلايا القصبات.

تؤخذ الطبقة الأولى، ويحضر منها شريحة أو أكثر حسب الحاجة، ثم تسكب طبقة المحلول الملحي خارجاً، ثم تحضر الشرائح المطلوبة من الطبقة الثالثة. وفي

العادة تؤخذ شريحتان من كل من الطبقة الأولى والثالثة وتوضع على الفور في المثبت (كحول اثيلي ٩٥٪)، ويمكن أن توضع اثنتان في المثبت وتترك اثنتان حتى تجف بالهواء خصوصاً إذا كانت الشريحة محضرة من أجل عمل صبغة (Ziehl-Neelsen) للبحث عن جرثومة السل Mycobacterium Tuberculosis .

ويجب أن تستعمل القفازات والقناع لكل عينات الجهاز التنفسي.

● **الصباغة:**

الصبغة المعتمدة هي صبغة Papanicolaou أو صبغة (H.E.) وقد سبق ذكرهما.

جـ ـ السوائل البطنية والصدرية (الاستسقاء)
(Pleural, Ascitic and Peritonial fluids)

تعتبر دراسة هذه السوائل ذات أهمية كبيرة في تشخيص كثير من السرطانات المتكاثرة، أو التي تنشأ في هذه التجاويف أصلاً، وحتى يتم الوصول إلى التشخيص الأدق، يجب أن يكون التعامل مع العينة كما يلي:

أولاً: يجب أن تكون العينة طازجة (Fresh) ، ومرفقة بنموذج يحتوي على المعلومات الضرورية والمفيدة للتشخيص.

ثانياً: تجمع العينة في وعاء نظيف يحتوي على كمية كافية من مادة (Heparin) لمنع التجلط، وترسل العينة فوراً إلى المختبر. ويمكن حفظ العينة في الثلاجة (٤°م)، ولا يجوز أن يضاف إليها أي نوع من المثبتات.

ثالثاً: بعد وصول العينة للمختبر تثبت العينة بالمثبت المناسب وهو كحول اثيلي ٩٥٪، ثم تبدأ عملية التحضير للشرائح، ومن الجدير بالذكر أن العينة يجب أن تعامل بعناية فائقة مهما كان حجمها.

* **تحضير العينات:**

١ـ تسجيل وقت وصول العينة وكمية السوائل، وقياس الوزن النوعي (Specific gravity) ، ودرجة الحموضة (PH) ، وكتابة الوصف المظهري للعينة من حيث درجة النقاء واحتوائها على دم أو مخاط أو غيره.

٢ـ لتأكيد عملية منع التجلط تضاف ٥ سم^{٣}من مادة (Heparin) لكل ١٠٠ سم^{٣}من السوائل. وإذا كانت العينة قد تجلطت قبل وصولها للمختبر تؤخذ الجلطة وتوضع في الفورمالين وتعامل معاملة العينات النسيجية.

هذه الشرائط هي أنسب الأجزاء التي تؤخذ للدراسة، أمّا إذا لم تكن مثل هذه الشرائط موجودة تؤخذ عينة عشوائية.

وفي حالة العينة المختلطة بالدم، يجب تجنب الدم ما أمكن.

وفي الحالة التي تكون فيها عينة البلغم متعفنة، يفضل أن تؤخذ المنطقة الأقل تعفناً.

* **التخلص من المخاط** (Mucolysis)

تجرى هذه العملية للتخلص من المخاط وتركيز خلايا العينة بأقصى مستوى ممكن، ويتم ذلك عن طريق تحلل المخاط، ومن ثم فصل العينة بواسطة جهاز الطرد المركزي.

يعتبر حامض الهيدروكلوريك (Hcl) تركيز ٨٪ من أهم المواد المستخدمة لهذه الغاية. ويتم إضافته إلى كمية مكافئة من البلغم، وتترك العينة لمدة ١٢ ساعة أو أكثر على درجة حرارة الغرفة (٢٥°م)، ثم تجري لها عملية غسيل لأكثر من مرة بالمحلول الملحي المتعادل، ثم تحضر الشرائح المطلوبة وتوضع في المثبت.

* **التثبيت:**

تتم عملية التثبيت بواسطة حامض الخليك ٣٪ في الكحول الاثيلي ٩٥٪

حيث تترك الشرائح مدة نصف ساعة.

* **الصباغة:**

الصبغة المعتمدة لعينة البلغم هي صبغة Papanicolaou بنفس الطريقة التي تستخدم لعينات مسحة عنق الرحم.

ويمكن استخدام صبغة هيماتوكسيلين - ايوسين (H.E.Stain)

٣- فصل العينة، وذلك بوضعها في أنابيب مخبرية بلاستيكية حجم ١٠ سم³ أو أكثر ووضعها في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة ٥ دقائق بسرعة ٢٥٠٠ دورة/دقيقة. ويحذر استعمال الفرامل (Brake) في جهاز الطرد المركزي.

٤- بعد انتهاء الفصل تتكون طبقتان: طبقة السوائل العائمة، وطبقة الرواسب. أما السوائل، فتسحب بواسطة شفاط أو حقنة. أما الرواسب فتؤخذ ويضاف إليها كمية من المحلول الملحي أو بعض السائل الطافي إذا كان صافياً، والوزن النوعي له أقل من ١,٠١٥ ثم يحرك الأنبوب ويعاد فصله مرة أخرى.

٥- يفصل السائل العائم عن الرواسب ويؤخذ الراسب الذي يحتوي على الخلايا المراد دراستها، ثم تفرد هذه الخلايا على الشرائح الزجاجية، ويجب أن تكون اللطاخة الخلوية مناسبة من حيث الكثافة حيث تنقل فوراً إلى المثبت (كحول اثيلي ٩٥٪)، وهناك بعض الحالات التي يفضل فيها أن تمسح الشرائح بمادة إلصاق هي (Egg albumin) حتى يزيد التصاق الخلايا بالشريحة.

٦- تحضر في العادة شريحتان على الأقل، ويمكن أن تحضر شريحتان إضافيتان لأغراض الصبغات الخاصة، وشريحتان تجففان بالهواء.

* **الصباغة:**

الصبغة المستعملة هي صبغة Papanicolaou التي سبق ذكرها.

د ـ الجهاز البولي والتناسلي:

دراسة خلايا البول ذات أهمية كبيرة في تشخيص العديد من سرطانات الجهاز البولي والتناسلي، وتكمن هذه الأهمية في إمكانية تشخيص سرطانات هذه الأعضاء قبل أن تكون عملية التنظير قادرة على الكشف عن هذه الأورام، ودراسة خلايا البول ذات أهمية خاصة في تشخيص الالتهابات الفيروسية أيضاً.

* تحضير العينة والشرائح:

ليس للعينة الصباحية قيمة تشخيصية في هذه الحالة، لأن العينة الصباحية تكون متجمعة في المثانة لعدة ساعات، وهذا يؤدي إلى تحلل هذه الخلايا لأن البول محلول غير متعادل (حامضي).

العينة المناسبة هي العينة الثانية، حيث يجب أن تحضر هذه العينة وتحوّل إلى شرائح مثبتة خلال أقل من ساعة للحصول على أقل قدر ممكن من التحلل في الخلايا تفصل العينة بجهاز الطرد المركزي على سرعة ٢٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة عشر دقائق يسكب السائل وتبقى الرواسب حيث يضاف إليها قليلاً من البروتين، ثم توضع في جهاز الطرد الخلوي (Cyto spine) أو تحضر الشرائح مباشرة وتوضع في المثبت (كحول اثيلي ٩٥٪).

تحضر شريحة أو أكثر وتترك لتجف في الهواء دون مثبت، وتصبغ بصبغة رايت (Wright stain) أو جيمسا (Giemsa stain)، أما بقية الشرائح فتصبغ بصبغة Papanicolaou التي سبق ذكرها.

والحالات الطبيعية لخلايا البول التقشرية هي مجموعة الخلايا المنحدرة من المثانة ومن بقية المجاري البولية أو الخلايا الطلائية للمهبل في النساء بالإضافة إلى الخلايا الالتهابية والبكتيرية والأملاح.

هـ ـ السائل المخي الشوكي (C.S.F.) Cerebro Spinal Fluid

إن الحصول على عينة من هذا السائل الثمين، هو في غاية الخطورة والصعوبة بنفس الوقت حيث تؤخذ العينة من قبل الطبيب المتمرس على سحبها، ولذلك يجب التعامل مع العينة في المختبر بقدر كبير من العناية والحرص مهما قلت كميتها، ويستخدم في العادة جهاز الطرد الخلوي (Cyto spine) لتجميع العينة في أقل مساحة ممكنة، وفي حالة اختلاط العينة بالدم أو عندما تكون كثيفة، فإنه من غير الضروري استخدام جهاز الطرد الخلوي، ويمكن الاكتفاء بفصلها بجهاز الطرد المركزي العادي على سرعة ١٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة خمس دقائق.

تتحلل الخلايا المتواجدة في هذا السائل في الحالات الطبيعية والمرضية بشكل سريع، لذلك يجب أن تحضر العينة وتحول إلى شرائح حال وصولها للمختبر بعد تسجيل كمية العينة ولونها ودرجة الصفاء أو العكورة.

في العادة، يحضر نوعان من الشرائح، شرائح تثبت في الكحول الاثيلي ٩٥٪، وأخرى تجفف في الهواء، تصبغ الأولى بصبغة Papanicolaou ، والثانية بصبغة رايت Wright أو May-Grainwald Giemsa ، ويمكن أن يكون من المفيد صباغة إحدى هذه الشرائح بصبغة جرام (Gram) في حالات التهاب السحايا البكتيري.

و ـ عينات المعدة والجهاز الهضمي:

يمكن الحصول على عينات خلوية لدراستها من المريء والمعدة أو الأمعاء الغليظة، وذلك بواسطة جهاز التنظير، وتكون هذه العينات على ثلاثة أشكال.

١ـ الغسيل المعوي Gastric lavage

٢ ـ اللمسة المباشرة من الخزعة Touch or direct smear

٣ ـ فرشاة جهاز التنظير Brushing method

الغسيل المعوي بواسطة إدخال ٢٠٠ ـ ٣٠٠ ملم من المحلول الملحي المتعادل وشفطها عند المنطقة المصابة (Lesion) ، ويتم هذا بجهاز التنظير، حيث تعالج هذه العينة بنفس الطريقة في حالة الغسيل القصبي التي سبق ذكرها.

المسحة أو اللمسة المباشرة من الخزعة تتم بأن تؤخذ الخزعة مباشرة بعد إخراجها من جهاز التنظير، وتمسح على شرائح زجاجية توضع مباشرة في المثبت، ويمكن أن تترك شريحة أو أكثر لتجف بالهواء، وتصبغ بصبغة رايت (Wright) أو (May-Granwald Giemsa) .

أما العينة التي تؤخذ من فرشاة جهاز التنظير، فهي تعتبر أفضل من العينات السابقة، لأنها أقل عرضة للتحلل، والعينة التي تؤخذ من الفرشاة يمكن عمل عدة شرائح منها تثبت بالكحول الاثيلي أو تجفف بالهواء، حيث تصبغ الشرائح المثبتة بصبغة Papanicolaou والمجففة بالهواء بصبغة رايت (Wright) أو جيمسا (Giemsa)

ز ـ عينات الثدي (عمل حلمة الثدي) Nipple discharge

تعتبر أية سوائل يمكن أن تخرج من الثدي غير الحليب الطبيعي هي عينة مرضية، ويجب أن تعامل على هذا الأساس، ودراستها بالشكل المطلوب. وتحضر عينات الثدي بأن يؤخذ العمل (الخرّاج) على الشرائح الزجاجية مباشرة بالضغط على حلمة الثدي من قبل الطبيب، وتوضع الشرائح في المثبت (كحول اثيلي ٩٥٪)، وإذا كانت الكمية كبيرة توضع في زجاجة أو أنبوب توضع في الثلاجة.

تصبغ الشرائح عادة بصبغة Papanicolaou ، وإذا كانت هناك ضرورة لعمل صبغات خاصة فيجب أن يؤخذ بعين الاعتبار نوع المثبت الذي يلزم لذلك. أما في حالات التكيسات التي تصيب الثدي فسوف يرد ذكرها في الفقرة القادمة، وهي فقرة العينات المسحوبة أو الخزعات المسحوبة.

٣ ـ الخلايا التقشرية للخزعات المسحوبة
(Aspiration biopsy cytology)

تؤخذ هذه العينات بواسطة الحقنة الناعمة التي تدخل في الأعضاء المراد دراسة الأورام أو الأكياس المتكونة فيها، وتعتبر هذه الطريقة في تحصيل العينات ذات أهمية كبيرة في الوصول إلى تشخيص سريع ودقيق للأعضاء التالية بشكل خاص:

١ ـ الثدي Breast

٢ ـ الغدد اللعابية Salivary glands

٣ ـ الغدة الدرقية Thyroid gland

٤ـ العقد الليمفاوية Lymph nodes

٥ ـ الكبد Liver

٦ ـ الرئتين Lungs

يقوم الطبيب اختصاصي الخلايا التقشرية بالتعاون مع اختصاصي الأشعة بتحصيل العينة، ويتم تحديد المنطقة التي ستؤخذ منها العينة بواسطة جهاز الأمواج الصوتية Ultra sound في حالة الأعضاء الداخلية بالذات كالغدة الدرقية والكبد وغدة البروستاتا وغيرها، أمّا الأعضاء الظاهرة مثل العقد الليمفاوية، والغدد اللعابية وغيرها، فيمكن سحب العينة بدون استخدام جهاز Ultra sound ، وتكون العينات المأخوذة على شكلين:

١ـ عينة قليلة من السائل المختلط بالدم وتكون في حالة الأورام غير المتكيّسة.

٢ـ سوائل الأكياس (Cystic fluid)

يتم فرد جميع العينة المسحوبة من الأورام غير المتكيسة على شرائح، وغالباً ما تحتوي هذه العينات على قليلٍ من الدم على شكل نقاط دموية. وتعامل هذه الشرائح بالمثبت المستخدم، وهو الكحول الاثيلي ٩٥٪، أو تترك لتجف بالهواء.

يفضل الكثير من الاختصاصيين الشرائح المجففة بالهواء والمصبوغة بصبغة (May-Granwold Giemsa) . أما الشرائح المثبتة فتصبغ بصبغة Papanicolaou .

أما السوائل المسحوبة من الأكياس فتعامل معاملة السوائل التي ورد ذكرها في موضوع الاستسقاءات حيث تفصل هذه السوائل بواسطة جهاز الطرد المركزي أو بواسطة جهاز الطرد الخلوي، وتحضر منها شرائح بنفس الطريقة التي ذكرت سابقاً، كما يمكن أن تحضر قوالب خلوية (Cell block) من الرواسب بعد عملية الفصل. وذلك بأن يضاف إلى هذه الرواسب كمية قليلة من البلازما، وكمية من مادة (Thromboplastin) كي تتحول إلى جلطة ثم تعامل معاملة عينات الأنسجة.

المراجع

References

المراجع العربية

١ ـ الدكتور عبد الرحيم عطرة (١٩٨٦م) المقاطع النسيجية المرضية (لطلبة معاهد الصحة العالية)، المؤسسة العامة للتعليم والتدريب الصحي، وزارة الصحة ـ العراق، ص٢١٧ .

٢ ـ الدكتور حميد أحمد الحاج (١٩٨٢م)، المباديء الأساسية للتحضير المجهري الضوئي، دار جون وايلي وأبنائه ـ نيويورك، ص١٣٧ .

٣ ـ الدكتور رمسيس لطفي والدكتور حميد الحاج (١٩٨٤م)، دليل مختبر التحضير المجهري الضوئي، دار جون وايلي وأبنائه، نيويورك، ص١٨١ .

٤ ـ الدكتور كواكب عبد القادر المختار والدكتورة سهيلة محمود العلاف والدكتور عدنان عبد الأمير العطار (١٩٨٢م)، التحضيرات المجهرية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ـ الجمهورية العراقية .

المراجع الاجنبية

1 - John D. Bancroft and Alan Stevens (1982). Theory and Practice of Histological Techniques, 2nd edition. Churchil Livingstone, London and New York.

2 - Compendium on Diagnostic Cytology. George L. Wied (1974).

3 - Gretchen L. Humason (1979). Animal Tissue Techniques, 4th edition.

4 - Bloom, W. and Fawcett, D.W. (1968). A Textbook of Histology, 9th edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia.

5 - Histology and Cytology, An AVI Series, AVI Publishing Company.

6 - Leopold G. Koss (1979). Diagnostic Cytology and its Histo Pathogenic Basis, 3rd edition, T.B. Lippincott Company.

7 - Baker, F.J, and Silverstone, R.E (1982). Introduction to Medical Laboratory Technology, The English Language Book Society and Butterworth Scientific, London, p.p. 290-426.

8 - Medical Laboratory Technology. Mathew Joseph Lynch (1976).

الفهرس

الموضوع	الصفحة
نقديم	٥
الوحدة الأولى	٧
تمهيد	٩
أهمية علم الأنسجة	١٠
تحضير الشرائح النسيجية	١١
التثبيت	١٢
الغسل	٣٠
الوحدة الثانية	٣٣
نزع الكلس	٣٥
طرق معرفة الانتهاء من نزع الكلس	٤٠
الوحدة الثالثة: المعالجة النسيجية	٤٣
التجفيف	٤٦
التشفيف أو التنقية	٤٧
التشريب أو الإشباع	٤٩
الطمر أو الإدماج	٥١

الوحدة الرابعة: جهاز معالجة الأنسجة ٥٥

جهاز المعالجة الآلي ٥٧

البدائل اليدوية لمعالجة الأنسجة ٦٢

الوحدة الخامسة: القطع ٦٣

أجهزة القطع ٦٥

تحضير العينات لعملية القطع ٧٤

التقليم ٧٤

مشاكل القطع ٧٥

تحميل المقاطع على الشرائح ٨٠

لصق المقاطع ٨٠

الوحدة السادسة: الصباغة ٨٣

نظرية الصباغة ٨٣

تصنيف الصبغات ٨٦

طرق الصباغة ٩٠

تغطية المقاطع ١٠٩

أوساط التغطية ١١٠

طريقة التغطية ١١٢

الوحدة السابعة:

المقاطع الجليدية والتجميد الجاف ١١٥

تحضير المقاطع الجليدية ١١٩

التجميد الجاف ١٢٤

الوحدة الثامنة :

علم الخلايا التقشرية **١٢٧**
أنواع العينات وحجمها **١٢٩**
عينات النسائية **١٣٠**
عينات التجاويف والقنوات **١٣٣**
العينات المسحوبة **١٣٤**
نحضير شرائح نسيجية مختلفة من العينات المذكورة **١٣٩**
قائمة المراجع **١٤٥**
المراجع العربية **١٤٥**
المراجع الأجنبية **١٤٧**
الفهرس **١٤٩**