الفصل الثانى

التخدير والتثبيت
Narcotization and Fixation

(أ) التخدير:

فى كثير من التحضيرات، يسبق الحصول على العينة تخدير الحيوان أو قتله ويراعى عادة عدم تخدير الحيوان فيما إذا كان من المرغوب فيه إعداد تحضيرات دقيقة فى مجالى علم الخلية وعلم كيمياء الأنسجة حيث أن المواد المخدرة تسبب تغيرا فى بعض التراكيب. أما التحضيرات المجهزة للفحص العام أو الفحص النسيجى للدراسات الروتينية فلا ضرر من تخدير الحيوان قبل التعامل معه أو أخذ عينة منه بغرض التحميل الكامل أو التقطيع. وفيما يلى بعض طرق التخدير:

١ - ١٠ ٪ كحول Alcohl 10%: وينصح به لحيوانات الماء العذب وعلى وجه الخصوص مع الهيدرا والتربللاريا. ويضاف الكحول إلى الماء الذى يعيش فيه الحيوان تدريجيا.

٢ - كلوريد الماغنسيوم Magnesium Chloride: يستعمل مع الحيوانات البحرية بما فيها الطرز الجالسة مثل الشعاعيات Actinozoa. كما يمكن حقن الحيوانات به. وهو يحضر عادة بتركيز ٧,٥٪. وفى حالة استعماله مع حيوانات الماء العذب يحضر بتركيز ٢,٥٪.

٣ - كبريتات الماغنسيوم Magnesium Sulphate: وهو صالح لتخدير كثير من طرز الحيوانات اللافقارية التى تعيش فى الماء المالح أو الماء العذب. وتضاف منه بلورات إلى المياه التى يعيش فيها الحيوان.

٤ - المنتول Mentol: ينصح به مع الحيوانات الجالسة سواء ما يعيش منها فى الماء العذب أو المالح. وينفذ ذلك بترك الحيوان فى ماء نظيف فى مكان هادئ وبارد تحت ضوء خافت. وهذه الظروف تسمح للحيوان بالتمدد بعد فترة وعند ذلك تضاف بلورات المنتول.

٥ - بخار الإثير Ether Vapours: يستخدم مع الحشرات والعناكب وكذلك مع الفقاريات الأرضية.

٦ - الكلورال هيدريت Chloral Hydrate: ويوصى به مع الحيوانات الهدبية والتربللأريا. وتضاف بلورات منه إلى الماء الذى يعيش فيه الحيوان.

٧ - دخان الطباق Tobacco Smoke: وهو يستخدم بكفاءة مع الحيوانات الأولية المهدبة مثل البرامسيوم وكذلك مع السوطيات والهيدرا. وفى هذه الحالات تقلب شريحة عليها الحيوان فى قطرة ماء على فم أنبوبة تحوى دخان الطباق. وعادة ما يتم التخدير فى مدى دقيقة واحدة.

٨ - كلوريتون Chloretone: (اسيتون + كلوروفورم).

وينصح به مع اللافقاريات بصفة عامة.

٩ – الاختناق **Asphyxiation**: وتستعمل هذه الطريقة مع البطنقدميات Snails حيث تغلى كمية من الماء لطرد الهواء ثم يغلق الوعاء جيدا، وبعد أن يبرد توضع فيه القواقع.

١٠ – فى حالة الحيوانات الثديية كبيرة الحجم، مثل الكلاب والقطط، من المستحسن تخدير الحيوان بواسطة الأثير أو الكلوروفورم ثم ذبح الحيوان وهو مخدر. أما الثدييات صغيرة الحجم فإنه من الممكن قتل الحيوان فى حجرة غاز الفحم (أول أكسيد الكربون) أو عن طريق ذبحه مباشرة أو عن طريق إحداث خلع بين الفقرات العنقية.. إلا أن الطريقة الأخيرة لا تستخدم عادة فيما إذا كانت ستجرى دراسات دقيقة على الجهاز العصبى. وفى حالة البرمائيات، يمكن تخدير الحيوان أو قتله بصدمة على الرأس بقوة على حافة منضدة أو بتنخيعه (أى ادخال ابرة تشريح فيما بين العمود الفقرى والجمجمة لإتلاف المخ). أو أن تخدر باستخدام الكلوروفورم. وفى جميع هذه الحالات لا يصح تحضير عينات من الجهاز العصبى إذ يحدث به الكثير من التغيرات نتيجة استخدام هذه الأساليب. وإذا كان من المرغوب فيه عمل تحضيرات من الجهاز العصبى فيمكن قطع رأس الحيوان بواسطة مقص قوى، وهى نفس الطريقة التى تستخدم مع السحالى.

(ب) الحصول على العينة من الحيوان Separation of material:

يراعى عند تشريح الحيوان لأخذ جزء منه أن يتم التشريح فى محلول فسيولوجى مناسب يقلل من الخلل الذى يحدث فى طبيعة النشاط الكيماوى للعضو عند التشريح أو أن يصب كمية من هذا المحلول فوق منطقة الجزء المراد الحصول عليه إذا لم يكن من الممكن إجراء التشريح نفسه فى المحلول المشار إليه. ومن أشهر المحاليل الفسيولوجية: محلول رنجر Ringer's Solution وهو يتركب مما يلى:

(إذا كانت العينة لحيوان من مجموعة ثابتى درجة الحرارة Homiothermal (hot blooded animals) مثل الطيور والثدييات)

كلوريد صوديوم	Sodium Chloride	٨,٥	جم
كلوريد بوتاسيوم	Potassium Chloride	٠,٢٥	جم
كلوريد كالسيوم	Calcium Chloride	٠,٢٥	جم
بيكربونات الصوديوم	Sodium Bicarbonate	٠,٢٥	جم
ماء مقطر	Distilled Water	١٠٠٠	سم^3

ويراعى تقليل كمية كلوريد الصوديوم إلى ٦,٥ جم فيما لو كانت العينة ستؤخذ من حيوان من مجموعة متغيرى درجة الحرارة Poikelothermal (cold-blooded animals) (أسماك – برمائيات – زواحف) ويمكن الاقتصار على استخدام محلول من كلوريد الصوديوم فقط فى الماء المقطر بديلا عن محلول رنجر بحيث يكون تركيزه ٠,٧٥٪ فى حالة اللافقاريات والفقاريات متغيرة درجة الحرارة، ٠,٩٠٪ فى حالة الفقاريات ثابتة درجة الحرارة. ويراعى عند نزع العضو من الحيوان الاعتبارات الآتية:

١ – يجب نزع العضو من جسم الحيوان وغسله فى المحلول الفسيولوجى لإزالة الدم العالق به لأن الدم يعيق عملية التثبيت.

٢ – ألا يعرض العضو الا لأقل ضغط عليه عند الإمساك به فمن الممكن أن يحدث الإمساك العنيف للعضو بواسطة الملقط أو الإمساك به لفترات طويلة تغيرات واضرارا بالأنسجة والخلايا والعضيات الخلوية.

٣ – ألا يسمح أبدا بجفاف العضو فى الهواء.

٤ – أن يستخدم مشرط و موسى حاد لقطع العضو إلى أجزاء صغيرة مناسبة ذات أسطح مستوية لا يزيد سمك أى جزء فيها عن $\frac{1}{2}$ سم فى المتوسط.

(جـ) تثبيت العينات Fixation:

يتعرض العضو المنزوع من جسم الحيوان إلى تحلل خلاياه وأنسجته وذلك بفعل البكتريا أو بفعل الانزيمات الموجودة داخل الأنسجة ولاشك أن مثل هذا التحلل يغير من الصفات الشكلية والبنائية والكيناوية للنسيج مما يفسد الهدف من الدراسة. ولهذا فإن العضو بعد نزعه من الحيوان وغسله فى المحلول الفسيولوجى، يجب أن يوضع فى أحد المحاليل الكيماوية التى تسمى مثبتات Fixatives وهى تعمل على أن تثبت الخلايا والأنسجة فى حالة أقرب إلى الحالة الحية. والمثبتات أنواع كثيرة، منها بوان – زنكر أستك – زنكر فورمول – كارنوى – سوزا وغيرها (صفحة ٤١)، لكل منها ميزات وعيوب. وعادة يختار المثبت الذى يلائم طبيعة الدراسة المطلوبة. والمثبت الجيد هو الذى يحقق الأهداف الآتية:

١ – أن يتخلل النسيج بسرعة حتى يمنع التغيرات التحللية التى يمكن أن تحدث به. ويعتمد ذلك على مكونات المثبت، فالفورمالين يتخلل النسيج بسرعة أكثر من الكحول الإثيلى. أما حمض الأوزميك فهو بطىء التخلل.

٢ – يحول المحتويات النسيجية إلى مواد غير ذائبة.

٣ – يحمى النسيج من الانكماش أوالتشوه خلال العمليات اللاحقة من نزع الماء والطمر والتقطيع.

٤ – يعطى النسيج درجة من الصلابة تسمح بالتعامل معه فى الخطوات اللاحقة.

٥ – يحسن من معاملات انكسار الأجزاء النسيجية المختلفة ويجعلها سهلة التمييز عند الصباغة.

ويعتمد وقت التثبيت على عدة عوامل، منها نوع النسيج وسمك العينة، بل أن عمر الحيوان المأخوذ منه العينة يؤثر أيضا فى الوقت اللازم للتثبيت حيث أنه قد وجد أن الأنسجة والأعضاء المأخوذة من أجنة الحيوانات تحتاج إلى وقت أقل فى التثبيت عن نفس الأنسجة والأعضاء المأخوذة من الحيوانات اليافعة. على أن أهم عامل يحدد الوقت اللازم للتثبيت هو نوع المثبت نفسه، فمثلا محلول بوان يحتاج إلى ٢٤ ساعة بينما يحتاج محلول كارنوى إلى ٣ ساعات عادة.

ويجب عند إجراء التثبيت مراعاة الاعتبارات الآتية:

١ – وضع النسيج بسرعة فى المثبت.

٢ – استخدام كمية مناسبة من المثبت لا تقل عن ٢٠ ضعف حجم قطع النسيج المستخدم للدراسة. ويستحسن استخدام زجاجات بحجم ١٠٠ سم^{٣} ذات فوهة واسعة لهذا الغرض، وأن تغلق هذه الزجاجات جيدا حتى لا يتبخر المثبت أو يتلوث ويجب ألا تستعمل سدادات من المطاط إذا كان المثبت محتويا على الكحول منعا من ذوبان المطاط وتلف المثبت.

٣ – رج زجاجة المثبت عدة مرات أثناء فترة التثبيت ضمانا لتخلل المثبت لجميع أجزاء قطعة النسيج، ويستحسن وضع قطعة من الصوف الزجاجى فى قاع زجاجة الثبيت حتى ترقد العينة عليها بدلا من قاع الزجاجة مما يضمن تخلل المثبت للعينة من جميع أسطحها.

وعادة ما يتركب المثبت من عدة مواد كيماوية (فيما عدا الكحول والفورمالين، فان أى منهما منفردا يصلح كمثبت). وعادة ما تكون للمواد المكونة للمثبت بعض العيوب، تحسنها ميزات المواد الأخرى الداخلة فى تكوين المثبت.

ومعظم المثبتات تسمى باسم من اقترح تركيبها مثل زكر وبوان. أما مثبت Susa فقد سماه الباحث هيدن هان Heidenhain بأخذ أول حرفين من كلمتى Sublimate بمعنى كلوريد زئبقيك و saure بمعنى حمض.

وفيما يلى نبذة عن بعض المثبتات المستخدمة مرتبة حسب الحروف الهجائية:

مثبت ألتمان Altimann's fixative:

٥٪ محلول مائى من بيكرومات البوتاسيوم Potassium bichromate	١٠ سم^{٣}
٢٪ محلول مائى من حمض الأوزميك Osmic acid	١٠٠ سم^{٣}

وهو مثبت جيد للدهون والحبيبات السبحية (الميتوكوندريا). ويلاحظ أنه غالى التكلفة بسبب احتوائه على حمض الأوزميك. كما أن هذا المثبت غير جيد فى تخلله للأنسجة بجانب انه يجعل الأنسجة هشة مما يسبب فى صعوبة تقطيعها بالميكروتوم بعد ذلك. ومدة التثبيت ١٢ ساعة عادة. ويجب بعد ذلك غسل العينة جيدا بالماء لإزالة الزائد من حمض الاوزميك.

محلول أورث Orth's fluid:

فورمالين Formalin	١٠ سم^{٣}
محلول موللر (بيكرومات البوتاسيوم ٢,٥ جم + كبريتات الصوديوم ١ جم + ماء مقطر ١٠٠ سم^{٣})	١٠٠ سم^{٣}

Muller's fluid (potassium dichromate, 2.5 gm., sodium sulphate, 1 gm., distilled water, 100 ml)

ويحضر محلول أورث قبل الاستعمال مباشرة، وينصح باستعمال هذا المثبت مع الحبيبات السبحية (الميتوكوندريا)، وعند إجراء تفاعل الكرومافين Chromaffin reaction.

وتتراوح مدة التثبيت من ٢٤–٤٨ ساعة، يلى ذلك غسل العينة بالماء الجارى لمدة ١٢ ساعة.

مثبت أياما Aoyama fixative:

كلوريد الكادميوم	Cadmium chloride	١ جم
فورمالين	Formalin	١٥ سم٣
ماء مقطر	Distilled water	٨٥ سم٣

وهو مثبت جيد لجهاز جولجى فى الخلايا الحيوانية، ومدة التثبيت ٢–٣ ساعة، وبعد ذلك يجب غسل الفورمالين الزائد من العينة بالماء.

محلول بوان Bouin fluid:

محلول مائى مشبع من حمض البكريك	Saturated aqueous solution of picric acid	٧٥ سم٣
فورمالين	Formalin	٢٥ سم٣
حمض خليك	Acetic acid	٥ سم٣

ويطلق على هذا المحلول اسم «البوان المائى Aqueous Bouin أما إذا اريد تحضير «بوان كحولى» Alcoholic Bouin فإن محلول مشبع لحمض البكريك فى ٧٠٪ كحول يحل محل المحلول المائى المشبع بحمض البكريك. ويلاحظ أن تركيز حمض البكريك فى البوان الكحولى يكون أكثر مما هو فى البوان المائى حيث أن حمض البكريك يذوب فى الكحول بدرجة أكبر من ذوبانه فى الماء. ويعتبر محلول بوان من أشهر المثبتات للأنسجة، كما يستخدم للكشف عن الجليكوجين، ولكن لا ينصح باستخدامه لحفظ مادة ح د ن DNA لأنه يسبب تكسر جزيئاتها كما لا ينصح به لإظهار المحتويات السيتوبلازمية بسبب احتوائه على حمض الخليك. ومدة التثبيت هى ٢٤ ساعة. ويسبب حمض البكريك تلون العينة باللون الأصفر الذى يجب إزالته من النسيج قبل الصباغة.

مثبت تشامبى Champy fixative:

٣٪ محلول مائى من بيكرومات البوتاسيوم	Potassium bichromate	٧ سم٣
١٪ محلول مائى من حمض كروميك	Chromic acid	٧ سم٣
٢٪ محلول مائى من حمض الأوزميك	Osmic acid	٤ سم٣

وهو يحضر قبل الاستعمال مباشرة، ويعتبر مثبتا جيدا للحبيبات السبحية (الميتوكوندريا) والدهون والحيوانات الأولية وينصح باستعمال قطع صغيرة جدا من النسيج حيث أن قدرته على التخلل محدودة. وهو مثبت مكلف ماليا بسبب احتوائه على حمض الأوزميك. ويراعى غسل العينة بالماء بعد التثبت.

محلول جندر Gendre's fluid:

كحول إثيلى مشبع بحمض الكبريك		٨٠ سم٣
Ethyl alcohol saturated with picric acid		
فورمالين	Formalin	١٥ سم٣
حمض خليك ثلجى	Glacial acetic acid	٥ سم٣

وهو مثبت جيد للجليكوجين. ومدة التثبيت ٢٤ ساعة.

ويجب إزالة حمض البكريك والفورمالين الزائدين من العينة.

مثبت دافانو Dafano fixative:

نيترات الكوبالت	Cobalt nitrate	١ جم
فورمالين	Formalin	١٥ سم٣
مـاء مقطـر	Distilled water	١٠٠ سم٣

وهو مثبت جيد لجهاز جولجى، ويراعى غسل العينة بعد التثبيت.

رابع أكسيد الأوزميوم Osmium tetroxide:

يستخدم محلول ٢٪ من رابع اكسيد الأمزميوم لتثبيت الحيوانات الأولية. كما يمكن استخدام بخار هذه المادة لنفس الغرض بأن يقلب غطاء شريحة عليه العينة فوق زجاجـة رابع اكسيـد الأوزميوم ويوضع الكل فى كأس تجنبا لتأثير البخار على الأعين.

مثبت رامون ياكاهال Ramon Y Cajal:

وهو يتكون من:

١٪ نيترات اليورانيل	Uranyl nitrate	٨٥ سم٣
فورمالين	Formalin	١٥ سم٣

ويفضل البعض عدم إضافة الفورمالين إلا قبيل الاستعمال.

وهو يستخدم مع جهاز جولجى عادة.

مثبت روثمـان Rossman fixative:

كحول مطلق مشبع بحمض اليكريك		٩٠ سم٣
Picric acid Saturated alcohol		
فورمالين	Formalin	١٠ سم٣

وهو مناسب لتوضيح الجليكوجين. وتتراوح مدة التثبيت بين ١٢-٢٤ ساعـة وتغسل بعـده العينات فى ٩٥٪ كحول.

obeikandi.com

مثبت ريجو Regaud's fixative :

٣٪ بيكرومات البوتاسيوم	Potassium bichromate	٤٠ سم٣
فورمالين	Formalin	١٠ سم٣

وهما يضافا إلى بعضها قبل الاستعمال مباشرة. وهو مثبت جيد للحبيبات السبحية (الميتوكوندريا) والدهون، ولكنه قد يسبب جفاف العينة. مدة التثبيت ٢٤ ساعة ويجب غسل الزائد من بيكرومات البوتاسيوم والفورمالين من العينة.

محلول زنكر (زنكر أسيتيك) Zenker solution (Zenker acetic) :

كلوريد زئبقيك	Mercuric chloride	٥ جم
بيكرومات البوتاسيوم	Potassium bichromate	٢,٥ جم
سلفات الصوديوم	Sodium sulphate	١ جم
مـاء مقطـر	Distilled water	١٠٠ سم٣

يضاف إلى ذلك ٥ سم٣ حمض خليك Acetic acid قبل الاستعمال مباشرة. وهو مثبت ممتاز للأنسجة بصورة عامة ولكنه لا يحفظ خلايا الدم الحمراء بصورة جيدة. ومدة التثبيت ٢٤ ساعة. ويجب إزالة الزيادة من بيكرومات البوتاسيوم وكلوريد الزئبقيك من النسيج بعد التثبيت.

محلول زنكر فورمال (هيلى) Helly's fluid (Zenker formal) :

وتركيبه مثل محلول زنكر أستيك إلا أنه بدلا من حمض الخليك فإنه يضاف فورمالين قبل الاستعمال مباشرة. وسبب عدم إضافة الفورمالين إلى المحلول الأساسى الذى يخزن هو أن الفورمالين يختزل البيكرومات وبذلك يصبح المثبت غير صالح للاستخدام، ومدة التثبيت ٢٤ ساعة. ويجب إزالة الزائد من كلوريد الزئبقيك وبيكرومات البوتاسيوم بعد التثبيت.

سبلمت أستيك Sublimate Acetic :

كلوريد زئبقيك مشبع فى محلول ملحى فسيولوجى	Saturated solution of mercuric chloride in physiological saline	١٠٠ سم٣
حمض خليك ثلجى	Glacial acetic acid	٥ سم٣

وهو مثبت جيد للديدان المفلطحة لإعدادها للتحميل الكامل.

مثبت سميث Smith fixative :

بيكرومات البوتاسيوم	Potassium bichromate	٥,٥ جم
فورمالين	Formalin	١٠ سم٣

مـاء مقطر	Distilled water	٨٧,٥ سم٣
حمض خليك ثلجي	Glacial acetic acid	٢,٥ سم٣

وهو يحضر قبل الاستعمال مباشرة حيث أن الفورمالين والبيكرومات يفسد كل منهما الآخر. هذا المثبت جيد للعينات الغنية بالمح. ومدة التثبيت ٢٤ ساعة يتبعها غسيل فى الماء الجارى لمدة ١٢ ساعة ثم توضع العينات فى ٤٪ فورمالين لمدة ١٢-٤٨ ساعة ثم تجرى عملية نزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول الإثيلى حتى ٩٥ ٪ ثم ضع العينة فى بنزوات المثيل Methyl benzoate أو سلسلات المثيل Methyl salicylate ثم روق فى البنزين أوزيت السيدار.

مثبت سنا Sinha fixative:

حمض بكريك مشبع فى ٩٠٪ كحول	90% alc. Saturated with Picricaid	٧٥ سم٣
فورمالين	Formalin	٢٥ سم٣
حمض نيتريك مركز	Conc nitric acid	٥,٥ جم

وينصح باستعمال هذا المثبت مع الحشرات حيث أنه يعمل على تليين الأجزاء الجامدة مع عدم الإضرار بالأحشاء الداخلية، وبعده تنقل العينات إلى ٩٥ ٪ كحول.

محلول سوزا Susa fluid (هايدن هان):

كلوريد الزئبقيك	Mercuric chloride	٤٥ جم
كلوريد صوديوم	Sodium chloride	٥ جم
ثلاثى كلور حمض الخليك	Trichloroacetic acid	٢٠ جم
حمض الخليك	Acetic acid	٤٠ سم٣
فورمالين	Formalin	٢٠٠ سم٣
مـاء مقطر	Distilled water	٨٠٠ سم٣

وهو مثبت جيد ذو درجة عالية من القدرة على تخلل الأنسجة، كما أنه لا يسبب جفاف العينة، ولكنه لا يحفظ خلايا الدم الحمراء بصورة جيدة، كذلك لا ينصح باستعماله مع طريقة فاريجرت لصباغة الألياف المرنة، ومدة التثبيت ٢٤ ساعة، ويجب إزالة كلوريد الزئبقيك من النسيج.

مثبت شاودن Schaudinn's fluid:

محلول مائى مشبع من كلوريد الزئبقيك	Saturated aqueous solution of mercuric chloride	٦٦ سم٣
٩٥٪ كحول	Ethyl Alcohol (95%)	٣٣ سم٣
حمض خليك ثلجى	Glacial acetic acid	٥ سم٣

يستعمل هذا المثبت لتثبيت الحيوانات الأولية وتمتد مدة التثبيت من ١٥ - ٢٠ دقيقة. وهو لا يصلح لتثبيت الأنسجة.

محلول فلمنج Flemming fluid:

١٪ حمض كروميك	Chromic acid	١٥ سم٣
٢٪ رابع أكسيد الأزميوم	Osmium tetroxide	٤ سم٣
حمض خليك ثلجى	Glacial acetic acid	١ سم٣

ويستحسن تحضيره قبل الاستعمال مباشرة، وتستعمل معه قطعة صغيرة جدا من النسيج حيث أن قوة تخلله ضعيفة، وهو يستعمل بصفة خاصة مع الحيوانات الأولية وفى الدراسات الخلوية ولكنه غالى الثمن.

فلمنج بدون حمض خليك (جاتنبى)

Flemming without acetic (F.W.A.) (Gatenby):

١٪ حمض كروميك	Chromic acid	١٥ سم٣
٢٪ رابع أكسيد الأوزميوم	OsO_4	٤ سم٣

ويضاف إلى ذلك ٥ سم٣ من ١٥٪ كلوريد صوديوم فى حالة اللافقاريات البحرية أو ١ سم٣ من ١٥٪ كلوريد صوديوم فى الحيوانات الأخرى. ويحضر هذا المثبت قبل الاستعمال مباشرة وهو مثبت ممتاز للسيتوبلازم ولكنه غالى الثمن.

ومدة التثبيت حوالى ٢٤ ساعة، ويراعى أن تكون قطعة النسيج المراد تثبيتها صغيرة الحجم (لا يزيد قطرها عن ٥ مم) وتغسل العينات لفترة تتراوح بين ٢–٥ ساعات فى الماء الجارى.

الفورمالين Formalin:

فورمالين	Formalin	١٠ سم٣
١٠٪ محلول مائى من كلوريد كالسيوم لا مائية	Aqueous solution of anhydrous calcium chloride	١٠ سم٣
مـاء مقطر	Distilled water	٨٠ سم٣

يستخدم الفورمالين منفردا كمثبت فى تحضيرات التحميل الكامل وفى تثبيت الأنسجة العصبية وحفظ المواد الدهنية، ولكن لا ينصح باستخدام الفورمالين منفردا كمثبت للأنسجة أو المواد الأخرى. وعادة ما تحتوى عبوات الفورمالين على كميات من حامض الفورميك Formic acid، ولذا يستحسن معادلة هذا الحمض بإضافة كمية من كربونات الكالسيوم إلى العبوة ورج الزجاجة جيدا. وعند الاستعمال، ترشح كمية الفورمالين المطلوبة. والفورمالين عبارة عن ٣٨ – ٤٠٪ محلول مائى من غاز الفورمالدهيد Formaldehyde. وعند تحضير ١٠٪ فورمالين، نأخذ ١٠ سم٣ من الفورمالين وتضيف إليها ٩٠ سم٣ ماء مقطر. وبذلك يحتوى المحلول المحضر على ٤٪ فورمالدهيد. ومدة التثبيت فى الفورمالين ٢٤ ساعة عادة إلاّ أنه لا يوجد ضرر من ترك العينة فى الفورمالين لمدة أطول ويمكن تخزين العينة بعد ذلك فى ٥٪ فورمالين حتى استكمال خطوات العمل.

١٠٪ فورمالين متعادل منظم Neutral buffered formalin:

فورمالين	Formalin	١٥ سم٣
فوسفات صوديوم ثنائى الهيدروجين		٤ جم
	Sodium dihydrogen orthophosphate $NaH_2PO_4 . H_2O$	
فوسفات صوديوم أحادى الهيدروجين		٦,٥ جم
	Disodium hydrogen orthophosphate, anhydrous Na_2HPO_4	
مـاء		٩٠٠ سم٣

وهو مثبت جيد للدهون وأملاح الكالسيوم. ويجب غسل الفورمالين الزائد من العينة.

مثبت فورمالين - خليك - كحول:

٩٥٪ كحول	95% Ethyl Alcohol	١٢-٢٠ سم٣
حمض خليك ثلجى	Glacial Acetic Acid	١ سم٣
فورمالين	Formalin	٦ سم٣
مـاء مقـطر	Distilled Water	٤٠ سم٣

ويضاف إلى ذلك بضع قطرات من محلول مائى مشبع بحمض البكريك. وهو مثبت ممتاز للديدان الخيطية.

فورمول سبلمت Formol sublimate:

محلول مائى مشبع من كلوريد الزئبقيك		٩٠٠ سم٣
	Saturated Aqueous solution of mercuric chloride	
فورمالين	Formalin	١٠٠ سم٣

وهو مثبت جيد للألياف الشبكية ولكن لا ينصح باستعماله مع الألياف العصبية، وتتراوح مدة التثبيت فيه من ١٢-٢٤ ساعة، ويراعى إزالة الزائد من المثبت بعد ذلك.

فورمول كالسيوم Formol Calcium:

١٠٪ محلول مائى من كلوريد الكالسيوم لا مائية		١٠ سم٣
	Anhy. Calcium chloride	
فورمالين	Formalin	١٠ سم٣
مـاء مقطر	Distilled water	٨٠ سم٣

ويضاف إلى ذلك كمية من مسحوق كربونات الكالسيوم $CaCO_3$ وهو مثبت جيد للحبيبات السبحية (الميتوكوندريا) والدهون وبعض الإنزيمات. ومدة التثبيت ٢٤ ساعة يليها غسيل لإزالة الزائد من الفورمالين فى النسيج.

obeikandl.com

فورمول كحولى Formol Alcohol:

٧٠٪ كحول اثيلى	Ethyl Alcohol (70%)	١٠٠ سم^٣
فورمالين	Formalin	٥ سم^٣
حمض هليك ثلجى	Glacial acetic acid	٥ سم^٣

وهو مثبت جيد للحشرات والقشريات، وتتراوح مدة التثبيت بين ساعة واحدة إلى ٢٤ ساعة تنقل بعدها العينات إلى ٨٥٪ كحول.

١٠٪ فورمول ملحى Formol Saline:

فورمالين	Formalin	١٠٠ سم^٣
كلوريد الصوديوم	Sodium Chloride	٨,٥ جم
مـاء	Water	٩٠٠ سم^٣

وينصح بوضع كمية من كربونات الكالسيوم لتعادل حمض الفورميك الناتج عن الفورمالين وهو مثبت جيد لكثير من المركبات الكيماوية فى الأنسجة والديدان المفلطحة. ومدة التثبيت ٢٤ ساعة تقريبا. ويجب غسل الفورمالين الزائد من العينة بعد التثبيت.

محلول كارنوى Carnoy's fluid:

كحول مطلق	Absolute Ethyl Alcohol	٦٠ سم^٣
كلوروفورم	Chloroform	٣٠ سم^٣
حمض خليك ثلجى	Glacial Acetic Acid	١٠ سم^٣

وقد يحضر من كحول إثيلى مطلق وحمض خليك ثلجى فقط بنسبة ٣ : ١ غير أن إضافة الكلوروفورم تسرع وتزيد من فاعلية المثبت. ويحضر المثبت قبل الاستعمال مباشرة ومدة التثبيت من $\frac{١}{٤}$ – ٣ ساعات يتلوها غسيل للعينة فى الكحول الإثيلى المطلق لمدة ساعتين لإزالة الكلوروفورم إن وجد. ويعتبر محلول كارنوى مثبتا جيدا للأحماض النووية والبروتينات وأجسام نسل والجليكوجين، ولكنه لا يثبت خلايا الدم الحمراء بصورة جيدة.

الكحول Alcohol:

يستخدم الكحول الإثيلى منفردا فى حالة ما إذا أريد تجنب المثبتات الأخرى لأى سبب من الأسباب كما يستخدم عندما تكون المادة المراد فحصها فى النسيج تذوب فى الماء (مثل الجليكوجين) مما يحتم استخدام مثبت لا يحتوى على الماء. ومدة التثبيت حوالى ٢٤ ساعة عادة إلّا أن العيب الأساسى عند استعمال الكحول هو أنه يسبب بعض الانكماش والجفاف للأنسجة. ويفضل استخدام ٧٠٪ كحول ساخن لتثبيت الديدان الخيطية الصغيرة. كما يستخدم الكحول المثيلى لتثبيت سحبات الدم كما سبقت الإشارة

مثبت كوبش Kopsch:

وهو يتكون من:

٣,٥٪ بيكرومات البوتاسيوم	Potassium bichromate	٤ سم٣
فورمالين (متعادل)	Formalin	١ سم٣

ويلاحظ أن الفورمالين يضاف قبل الاستعمال مباشرة. ويستخدم هذا المثبت مع جهاز جولجي.

مثبت مان Mann fixative:

١٪ رابع أكسيد الأوزميوم	Osmium tetroxide	٥ سم٣
محلول كلوريد زئبقيك مشبع فى ٠,٧٥ كلوريد صوديوم	75% Sodium Cloride Saturated with Mercuric Cloride	١٠ سم٣
ماء مقطر	Distilled Water	٥ سم٣

وهو يحضر أيضا قبل الاستعمال مباشرة. ويستخدم فى تحضيرات جهاز جولجى والحبيبات السبحية.

مثبت ناسونوف Nassonov Fixative:

وهو يتكون من:

٢٪ رابع أكسيد الاوزميوم	Osmium Tetroxide	٤ سم٣
١٪ ثالث أكسيد الكروم	Chromium Trioxide	٨ سم٣
٣٪ بيكرومات البوتاسيوم	Potassium Bichromate	٨ سم٣

ويلاحظ أنه من الأفضل تحضيره قبل الاستخدام مباشرة. ويستخدم هذا المثبت مع جهاز جولجى.

مثبت هولاند Hollande's Fluid:

اطحن ٢,٥ جم خلات النحاس Cupper acetate، ٤ جم حمض بكريك Pecric acid فى ١٠٠ سم٣ من الماء المقطر ثم أضف ١٠ سم٣ فورمالين، ١,٥ سم٣ حمض خليك ثلجى. هذا المثبت محور من محلول بوان ويستعمل لتثبيت سحبات الحيوانات الأولية.

مثبت هيللى Helly's Fluid:

انظر زنكر فورمول Zenker formol (صفحة ٤٤).

obeikandl.com