الفصـــل الأول

1

إعداد التحضيرات (العينات) الهستوكيميائية للفحص الميكروسكوبي

Preparation of histochemical specimens

obeikandl.com

obeikandl.com

الفصـــل الأول

إعداد التحضيرات (العينات) الهستوكيمائية* للفحص الميكروسكوبي

Preparation of histochemical specimens for microscopic examination

مقدمـــــــة :

لاشك أن الدراسات الهستوكيميائية تعتمد بصورة أساسية علي التحضيرات الميكروسكوبية التي يتم إعدادها بطرق مختلفة ؛ منها بعض الطرق المتخصصة التي يقتصر استخدامها علي هذا النوع من الدراسات فقط . وبصورة عامة ، فإنه يمكن تصنيف هذه الطرق في الأنماط الرئيسية التالية :

أ - التحضيرات الشمعية Paraffin Preparations

ب - العينات الحية Vital Specimens

جـ - التحضرات الثلجية أو المجمدة Frozen Preparations

أ - التحضيرات الشمعية Paraffin Preparations

يمكن استخدام العينات المطمورة في الشمع بالطريقة الروتينية وذلك لإعداد بعض التحضيرات في مجال كيمياء الأنسجة مثل تحضير الحمضين النووين ح د ن ، ح ر ن أو الكشف عن المواد عديدة التسكر أو بعض البروتينات . وفي هذه الطريقة تؤخذ العينة من الحيوان ، وتثبت في المثبتات العادية ثم تغسل وتجري لها عملية نزع الماء في سلسلة متصاعدة من الكحولات حتي الكحول المطلق (١٠٠٪) ثم تنتقل إلي سائل ترويق مثل الزيلول ، وبعد ذلك

* أنظر ايضا كتاب « التقانين المجهرية » تأليف البنهاوى والجنزورى ، إصدار دار المعارف عام ١٩٨٩ .

obeikandi.com

إلي الشمع المنصهر في الفرن لإجراء عملية التخلل وأخير تطمر العينة في قالب من الشمع، ثم يقطع قالب الشمع المحتوي علي العينة بواسطة الميكروتوم . وتلصق القطاعات علي شرائح زجاجية ثم تصبغ القطاعات بالطرق المطلوبة .

ومن ميزة الطريقة المذكورة إمكانية الحصول علي عدد كبير من القطاعات دون فقد أي منها وذلك بسهولة ويسر . غير أنه عند إجراء الدراسات التي تهتم بوجه خاص بالدهون في الأنسجة والخلايا فلا يمكن الاعتماد علي هذه الطريقة لأن النسيج يتعرض أثناء الإعداد للكحولات والزيلول وهي بالطبع مواد مذيبة للدهون . كما أن القطاعات الشمعية لا تصلح إذا كانت الدراسات متطلبة للكشف عن أماكن نشاطات الإنزيمات في الأنسجة والخلايا حيث أن الطمر في الشمع المنصهر يعرض النسيج لدرجات حرارة عالية نسبيا مما يعرض هذه الإنزيمات للتحلل .

وعلي هذا الأساس ، فإنه عند دراسة الدهون او الإنزيمات في الأنسجة يلجأ الباحثون إلي اعداد أنواع أخرى من التحضيرات كما سيرد ذلك في الجزء التالى .

ب - العينات الحية Vital Specimens

مفهوم هذه العينات أو التحضيرات أنها تؤخذ من أنسجة أو أعضاء حية ، وتعد للفحص الميكروسكوبى بطرق بسيطة وإن كانت تتطلب الدقة والتأني واستخدام الأدوات النظيفة المعقمة بما في ذلك الأوعية الزجاجية وأدوات التشريح والشرائح وأغطيتها وغيرها . وتبقى هذه العينات في حالتها الحية فترة مناسبة تتروح بين ساعة وساعتين تظل خلالها تؤدي أعمالها ونشاطاتها الحيوية المعتادة بما يسمح بفحصها وتصويرها فوتوغرافيا أو سينمائيا . بل إنه يمكن إجراء تجارب معينة عليها بإضافة بعض المواد إليها أو بقطع أجزاء منها أو تحريك بعض عضياتها ومكوناتها ومتابعة ما يحدث فيها أثناء ذلك أو بعد ذلك . ويستخدم لذلك الغرض جهاز التشريح اليدوى الميكروسكوبي Micromanipulator .

وهذا الجهاز عبارة عن ميكروسكوب مزدوج العينية مزود بإبر تشريحية دقيقة وشفرات حادة وحقن بالغة الدقة لتحقيق تلك الأغراض السابقة ولا شك أن لهذه الوسيلة أهمية بالغة عندما يراد تجربة ومتابعة تأثيرات بعض المواد أو العقاقير الخطيرة أو السامة علي خلايا

وأنسجة الإنسان بما لا يتيسر إجراؤه داخل الجسم .

والمعروف انه بعد الحصول علي العينات الحية المطلوبة من الجسم بالطرق المناسبة ، فإنها تقطع إلي قطع صغيرة توضع علي شرائح زجاجية معقمة عليها قطرات من المحلول الملحى الفسيولوچى المعقم أيضا ، ويجري تنسيلها أو هرسها أو فردها علي الشريحة ثم تغطيتها بالأغطية الزجاجية المعقمة وفحصها ميكروسكوبيا .

على أنه لكى يمكن مشاهدة هذه العينات ، فإن الميكروسكوب الضوئي العادي لايصلح لتلك الأغراض بسبب عدم وجود تباين بين التراكيب الخلوية والنسيجية . وعلي ذلك يتحتم فحصها باستخدام ميكروسكوب التضاد أو التباين Phase contrast microscope * الذي يعمل علي زيادة الفروق بين معدلات الانكسار الضوئية لتلك التراكيب بما يؤدي إلي حدوث تباين واضح بينها يمكن من مشاهدتها وتمييزها عن بعضها .

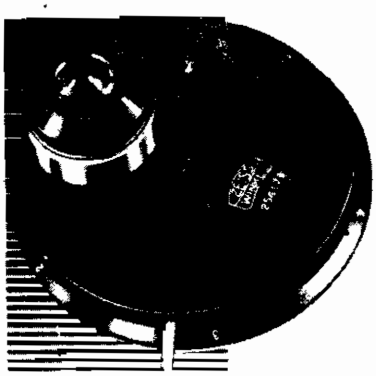
وفي أحيان أخري ، تتم صياغة هذه العينات الحية بصبغات معينة تمكن من فحصها بالميكروسكوب الضوئي العادي . وعلي ذلك يشتمل هذا النوع من التحضيرات الحية علي الأنماط التالية :

١ - تحضيرات حية غير مصبوغة Unstained vital preparations

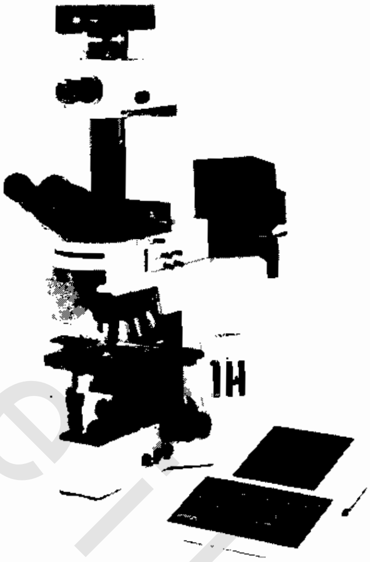
٢ - تحضيرات حية مصبوغة Stained vital preparations

* انظر كتاب « علم الخلية » للبنهاوى وزملائه (الناشر دار المعارف) عام ١٩٩١ .

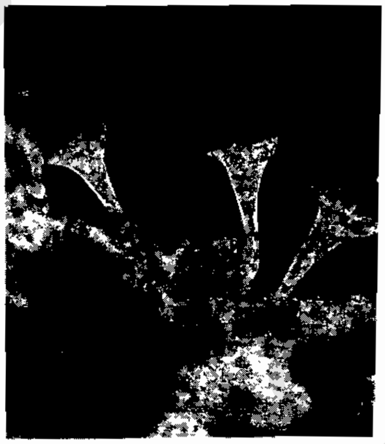
obeikandl.com



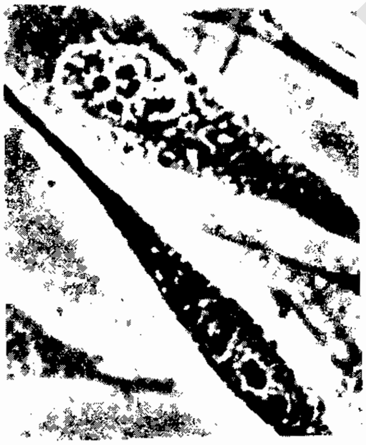
مكثف خاص بميكروسكوب
التضاد أو التباين
Ph. c. m. condenser



ميكرسكوب التضاد أو التباين
Phase contrast microscope



بعض البولبيات الحية



خلايا ليفية حية
(صورة بميكروسكوب التضاد

obeikan.com

١ - التحضيرات الحية غير المصبوغة :

وهي التي سبق عرضها وشرحها فيما سبق .

٢ - التحضيرات الحية المصبوغة :

وهي التحضيرات التي تتضمن صياغة العينات الحية بصبغات خاصة يطلق عليها "الصبغات الحيوية " Vital stains or dyes مثل أزرق الميثلين Methylene blue والأحمر المتعادل Neutral red وأخضر جانسى Janus Green وأسود جانسى Janus black واليثونين Thionin وأزرق التلودين Toluidine blue

وتذاب هذه الصبغات في محلول ملحى فسيولوجي Physiolgical saline solution تتوقف درجة تركيزه علي نوعية الحيوانات المستخدمة (فهو مثلا بنسبة ٩,٪ بالنسبة للحيونات الثديية ، ولكنه حوالي ٦٥, ٪ في حالات البرمائيات) . وتكون نسبة المادة الصبغية في هذا المحلول حوالي ٠٠٠١, ، وهي نسبة - كما هو واضح - مخففة جدا وذلك يسمح ببقاء الخلايا والأنسجة في حالة حيه لفترة تترواح بين ٣٠ - ٤٥ دقيقة، ولكن إذا طالت هذه الفترة تسببت تلك الصبغات في تسمم الخلايا وموتها .

وهناك طريقتان تتبعان عادة في هذه الحالة :

الصباغة الحيوية الداخلية : Intravital Staining

وفيها تحقن الحيوانات في تجويفها البريتوني بكمية من المحلول الصبغي حسب وزن الحيوان ، ويتم الحصول علي العينات المطلوبة من تلك الحيوانات بعد نصف ساعة تقريبا ، وتوضع هذه العينات بعد فردها أو تنسيلها أو نسرها علي شرائح زجاجية نظيفة معقمة عليها قطرات من المحلول الصبغي ، ثم تفحص مباشرة بالميكروسوب الضوئي حيث تبدو مصبوغة بالصبغ المستخدم

الصباغة الحيوية الخارجية : Supravital Staining

وفيها يتم الحصول علي العينات المطلوبة من الحيوانات وفردها أو تنسيلها أو نسرها علي شرائح زجاجية نظيفة معقمة عليها قطرات من المحلول الصبغى، يراعي أن تكون درجة

obeikandi.com

حرارته مماثلة لدرجة حرارة الجسم ويحفظ عند هذه الدرجة بضع دقائق ، ثم يتم فحصها ميكروسكوبيا . وهذه الطريقة أكثر شيوعا عن الطريقة الأولي .

وفي كلتا الحالتين ، فإن فحص مثل تلك العينات يكون أفضل جدا عند وضع مرشح حرارى ، وذلك بوضع كأس مملوء بالماء أمام المصباح الكهربائي الذي يضيء الميكروسكوب .

وفيما يلى بعض الخطوات التفصيلية لتلك التحضيرات :

- في بداية العمل يجب التأكد تماما من تنظيف الشرائح والأغطية الزجاجية تنظيفا جيدا (كيماويا) وذلك – علي سبيل المثال – بوضعها في كحول محمض يتكون من :

(١٠٠) ملليلتر كحول بتركيز (٧٠٪) + ملليلتر واحد من حامض هيدروكلوريك مركز . وبعد ذلك يتم شطف الشرائح عدة مرات (في ماء مقطر) حتي تتم إزالة آثار الكحول المحمض ، ويلى ذلك غسل الشرائح في الماء المقطر عدة مرات . وبعد فترة معينة يتم مسح الشرائح جيدا بقطعة الشاش او الحرير الناعم المعقم .

- بعد قتل الحيوان او تخديرة وتشريحه أو الحصول علي العينات منه بأية صورة أخري ، وذلك في أسرع وقت ممكن ، يتم وضعها في زجاجة ساعة أو طبق بتري به المحلول الصبغى المستخدم .

- يتم صباغة العينات وفحصها بعد معاملتها بإحدي الوسائل الآتية :

* **التنسيل (أو النسر)** : Teasing

وفي هذه الحالة ، يوضع حيز صغير من العينة علي الشريحة الزجاجية النظيفة ، عليها قطرات من المحلول الصبغى ، ويتم تنسيلها أو نسرها بإبر التشريح المعقمة حتى يصل سمكها إلي سمك الخلية الواحدة تقريبا . وهذه الطريقة ملائمة جدا المعظم الأنسجة الحيوانية خاصة العضلية والعصبية واللمفاوية وغيرها من الأنسجة المماثلة .

* **الهـــرس** : Squashing

حيث يوضع أيضا جزء صغير من العينة علي الشريحة الزجاجية التى تحمل نقطا من المحلول الصبغى ، وتتم تغطيتها بغطاء زجاجى نظيف ، ويتم الضغط عليها بأصبع الإبهام بعد

تنظيفه حتي يتم فرد العينة بطريقة مناسبة . وهي أيضا مناسبة للعديد من الأنسجة والخلايا خاصة عندما يراد فحص الكروموسومات بها .

جـ العينات (القطاعات) المجمدة
Frozen Sections

تتضمن دراسات كيمياء الأنسجة فحص بعض المكونات الكيميائية التي يصعب الحفاظ عليها وتوضيحها في التحضيرات الشمعية المعتادة ، وذلك مثل المواد الدهنية أو الليبيدية بصورة عامة ، وكذلك معظم الإنزيمات لأنها تتكسر وتضيع فاعليتها في تلك الأحوال نتيجة درجة الحرارة التي تتعرض لها أثناء إعداد مثل هذه التحضيرات . ولذلك استخدمت طرق معينة تتضمن الحفاظ علي تلك المكونات ، وتعرف هذه الطرق بالتقنيات التجميدية أو الثلجية Freezing methods . ومن أهم مميزات هذه الطرق – بجانب الحفاظ علي المركبات الكيميائية – سابقة الذكر – فإنها توفر استخدام الكيماويات المتطلبة في التحضيرات الشمعية مثل الكحول والزيلول وغيرها من المواد ، بالإضافة إلي سرعة الحصول علي القطاعات المطلوبة ؛ وكل ما هو متطلب في تلك الحالات هو سرعة تجميد العينات المطلوبة بالتبريد الشديد كهربائيا أو باستخدام غاز ثاني أكسيد الكربون . ويعني ذلك أن العينات تصبح هنا مطمورة embedded في الثلج بدلا من أن تكون مطمورة في الشمع . ويتم تقطع هذه العينات في هذه الحالة بواسطة ميكروتومات معينة يطلق عليها الميكروتومات الثلجية Freezing Microtomes والكريوسيتات : Cruostat وفيما يلي نبذة عن بعض هذه الميكروتومات .

أولا : الميكروتومات الثلجية :

* **ميكروتوم شولتز** : Schultze Microtome

قام العالم شولتز بتصميم هذا الميكروتوم لأول مرة عام ١٩٣٢ وهو ميكروتوم عادي تقريبا تم تزويده بوسائل معينة تعمل علي تجميد العينة وتبريد سكين التقطيع وذلك باستعمال قذائف متتالية من غاز ثاني أكسيد الكربون Jets of Carbon Dioxide . وكان الغرض الأساسى من ذلك إعداد قطاعات شبه متتابعة Semi-serial sections لدراسة بعض النواحي الستولوجية والهستوكيمائية .

* **ميكروتوم آدمستون وتايلور** : Adamstone and Taylor

يمثل هذا الميكروتوم تطويرا للميكروتوم السابق حيث قام هذان الباحثان بإيجاد وسيلة للتبريد المستمر للميكروتوم المستخدم وذلك بوضع قطع ثلجية بكميات مناسبة علي حاجز معين فوق سكين التقطيع وكذلك علي جانبي الميكروتوم . وكان الدافع الرئيسي وراء ذلك عزل السكين والميكروتوم ومنطقة التقطيع – بصورة عامة – عن البيئة العملية المحيطة بما قد يكون فيها من حرارة (أكثر من ١٨° مئوية) أو رطوبة مرتفعة تؤثر علي جودة القطاعات الناتجة . وفي هذه الحالة كان يتم دفع القطاعات المجمدة أو الثلجية Frozen Sections من علي سطح سكين التقطيع بواسطة ملعقة معدنية معينة بها فتاة من الثلج حتي منتصفها تقريبا ، ثم وضعها علي شرائح زجاجية بالغة النظافة . وحالما يبدأ الثلج المحيط بالقطاع في الانصهار ، ويأخذ القطاع في التمدد علي الشريحة ، تغمر الشريحة وعليها القطاع في وعاء زجاجى به محلول مثبت أومحلول تفاعلى أو كشفى .

وقد حذر هذان الباحثان من ترك القطاعات حتي تنفرد أو تتمدد أكثر مما يلزم علي الشريحة خاصة إذا كان المطلوب فحص وتوضيح البنيان الأساسي والتراكيب الرئيسية في تلك القطاعات حتي لا يحدث فيها أي تمزق أو اختلال في تلك التراكيب وتفقد ملامحها المميزة.

* **ميكروتوم آدمستون** : Adamstone

لا يكاد هذا الميكروتوم يختلف كثيرا عن الميكروتوم السابق ، إلا أن العالم آدمستون قد أدخل عليه عام ١٩٥١ تطويرا معينا متضمنا استخدام وسيلة معينة تعمل علي سرعة أخذ القطاعات من علي سكاكين التقطيع وغمرها في الحال في المحاليل المطلوبة لتحاشى أي تمزق في أجزائها . وقد أدت هذه الطريقة بالفعل إلي تحسين واضح في الأداء أمكن معه الحصول علي قطاعات أفضل مما سبق .

ملحوظة هامة :

علي الرغم من محاولات ضمان درجات الحرارة والرطوبة المناسبة للميكروتوم والمنطقة المحيطة به ، إلا أن هذه الضمانات لم تكن كافية تماما ، وعلي ذلك كان ينصح دائما

opelikanguide.com

بتخصيص حجرة خاصة أو معمل مناسب تتوفر فيها درجات الحرارة والرطوبة الملائمة أو – كان – ومازال البعض يستخدمون سقفا من السلك الشبكى عليه قطع من الثلج فوق الميكروتوم والشخص الذي يقوم باستخدامه بجانب كتلتين ثلجيتين علي جانبى هذا الشخص . ولا شك أن هذه الطريقة ليست مريحة تماما بالنسبة لمن يستخدمون تلك الطريقة ولذلك استحدث بعض التحويرات التي سيتم استعراضها فيما يلي :

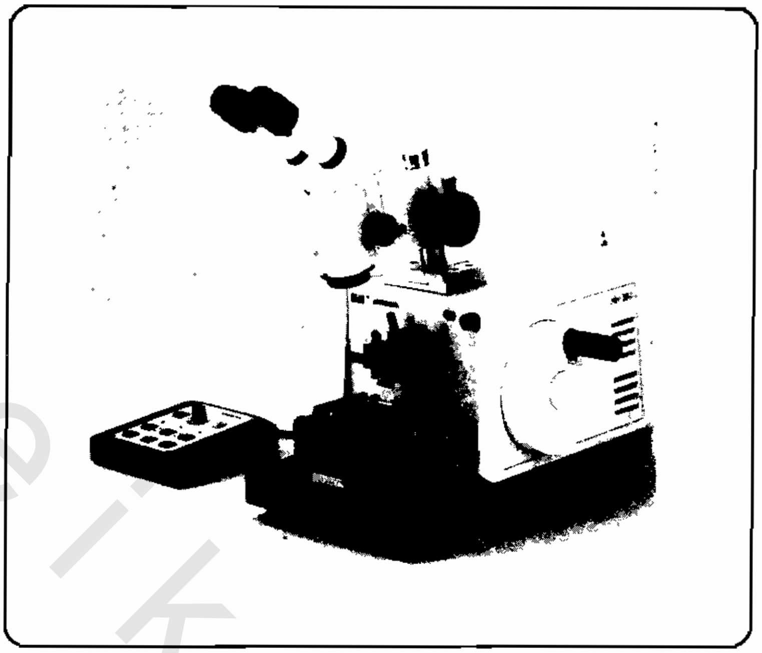
* **ميكروتوم شميزو** : Schimizo

في عام ١٩٥٦ ، قام العالم شميزو بإدخال بعض التطوير علي الوسائل السابقة ، حيث استخدام ميكروتوما انزلاقيا Sliding Microtome ، عمل علي عزله عن البيئة المحيطة عن طريق وضعه في ثلاجة منزلية Domestic refrigerator يتم فيها تبريد سكين الميكروتوم بواسطة وضع كتل من الثلج علي جانبيه – وكان حجم هذه الثلاجة خمسة أقدام تقريبا ، وقد استبدل بابها المعدني بآخر خشبى مزود بفتحتين لكل منهما قفاز (أو كم) من القماش Gloved armholes لإدخال اليدين من خلالهما عند تشغيل الميكروتوم داخل الثلاجة . وكذلك أوجدت في ذلك الباب الخشبى فتحة صغيرة لإدخال أنبوبة توصل غاز ثانى أكسيد الكربون لتجميد العينات . كما تضمن هذا الجهاز توفير إضاءة داخلية من مصدر كهربائي ، كما زود باب الجهاز بنافذة زجاجية صغيرة لمتابعة ما يتم داخله .

وفي هذه الحالة كان يتم الصاق القطاعات المجمدة الناتجة علي شرائح زجاجية نظيفة داخل الجهاز ، ثم إخراجها بعد ذلك ووضعها في الحال في المحاليل المتطلبة .

ثانيا : أجهزة الكريوستات : Cryostats

يعنى لفظ "كريوستات " أنه جهاز لحفظ درجة البرودة ، وتختلف اجهزة وطريق الكريوستات عن طريقة السكين البارد Cold knife سابقة الذكر – والتي استخدمت منها ميكروتومات لتلك التي وصفت باختصار آنفا – في أن كلا من الميكروتوم وسكين التقطيع والعينات المراد تقطيعها تكون جميعها عند درجة حرارة ثابتة تتراوح بين (-١٢ الي -٢٢° مئوية) وفي هذه الحالة يتم تقطيع تلك العينات وهي مجمدة دون الحاجة إلي إدخال مصادر تبريد خارجية . وفي هذا المجال تم تصميم العديد من أنواع الكريوستات التي مازالت تتطور



ميكروتوم ثلجى
Freezing microtome

خطوة بعد خطوة حتي وقتنا الحالى ، وفيما يلى نبذة عن بعض الأنواع :

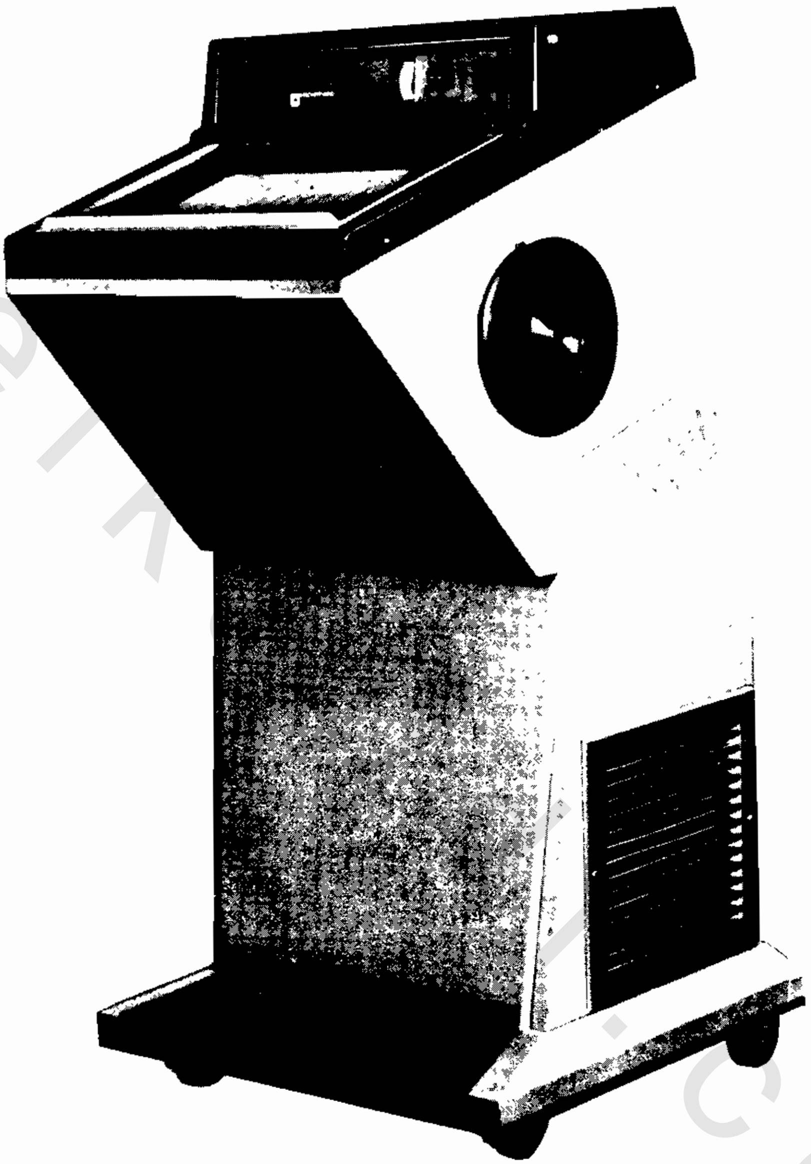
* **كريوستات لانج (١٩٤٨) :** Lang Cryostat

كان لانج " الدانماركى " أول من صمم أجهزة الكريوستات هذه وذلك بعرض إجراء بعض الدراسات والتجارب في مجال ما كان يسمى " كيمياء الأنسجة الكمية Quantitative histochemistry حيث كان يحصل علي قطاعات مجمدة أو ثلجية للفحص الهستولوجى وأخري للتحليل البيوكيميائي المذكورة .

وفي البداية كان توفير البرودة اللازمة داخل كابينة الكريوستات بواسطة كميات كبيرة من القطع الثلجية المجمدة ، لكنها سرعان ما استبدلت بالانابيب الملتفة المبردة : Refrigerating Coils .

كذلك تم وضع لوح زجاجى صغير امام حافة سكين التقطيع للعمل علي منع التفاف او

obeikandl.com



أحد أنواع الكريوستات

Cryostat

كرمشة (تجعد) القطاعات الناتجة .

* **كريوستات كونز (١٩٥١) : Coon's Cryostat**

تم انتاج هذا الجهاز علي نطاق واسع في ألمانيا ومازال مستخدما حتى الوقت الحالى خاصة بعد أن استحدثت به تعديلات معينة جعلته جهازا متميزا .

ويحتوي هذا الجهاز علي ميكروتوم من صلب لا يصدأ ، وروعى أن يتم تقليل معدلات الرطوبة الداخلية فيه إلي اقصى حد ممكن لضمان عدم حدوث أي صدأ لهذا الميكروتوم . كما روعى أيضا الحد من فتح واغلاق الكريوستات فيما عدا ما تتطلبه الحالات الضرورية . وعلى ذلك كان يتم إدخال الأيدي لتشغيل الميكروتوم خلال الفتحات القفازية التي سبقت الإشارة اليها سابقا . كذلك تم وضع الميكروتوم بطريقة خاصة تسمح بنزعه من مكانه وإعادته إليه بسهولة ويسر بعد تنظيفه وتجفيفه أو إصلاح أي خلل فيه .

كما احتفظ هذا الجهاز باللوح الزجاجى الصغير الذي يوضع أمام حافة سكين التقطيع لمنع التفاف وتجعد أو كرمشة القطاعات الناتجة .

وبالإضافة إلي ذلك تم تزويد هذا الكريوستات بمسامير محواة خاصة تستخدم في ضبط مدى ارتفاع العينة المراد تقطيعها والمسافة بينها وبين سكين التقطيع وزاوية التقطيع الملائمة .

وفيما يتعلق بمصادر التبريد أو التجميد المستخدمة في هذا الجهاز ، فإن ذلك كان يتم إما عن طريق التبريد الميكانيكي أو بإدخال غاز ثاني اكسيد الكربون من الاسطوانات الخاصة بذلك . وفي معظم الأحوال كان يتم استخدام المصدرين معا في وقت واحد ؛ المصدر الأول لتامين درجة البرودة المتطلبة داخل هذا الجهاز ، والمصدر الثاني لسرعة تثليج وتجميد العينات المراد التعامل معها وإعداد القطاعات منها .

وكانت درجات البرودة في ذلك الجهاز متراوحة بين (-١٤° الى - ١٦° مئوية) يتم ضبطها عن طريق منظم حرارى معين . غير أنه إذا أريد تقطيع العديد من العينات ، فإنه كان يتعين تخفيض درجة الحرارة حتى (-٥م° مئوية) بصفة مستمرة .

ولضمان تقليل معدلات الرطوبة أو منعها داخل الكريوستات كان يتم وضع كيس يحتوي علي " **جيلاتين السيليكا** : Silica jel" لامتصاص الرطوبة علي أن يجري استبداله بين وقت وآخر .

الأنواع الحديثة للكريوستات : Modern Cryostats

لم تعد هذه الأجهزة تنسب في الوقت الحالي إلي مصمميها بعد أن تزايدت أنواعها وكثر تداولها ، وأصبحت تقوم بتصميمها وتطويرها شركات ومؤسسات صناعية علمية منتشرة في العديد من الدول الصناعية المتقدمة . وكانت ملامح التحسين والتطوير في هذه الأجهزة مرتبطة بنواح معينة من أهمها التحكم في درجات البرودة المستخدمة وسرعة تجميد العينات والتقليل – لأقصى حد ممكن – من فتح واغلاق تلك الأجهزة . وفيما يلى بعض امثلة لذلك :

- أصبح تشغيل الميكروتوم يتم عن طريق الاحتفاظ بعجلة (ذراع) تشغيله خارج الكريوستات وبذلك ألغيت الفتحات القفازية تماما .
- يتم التبريد والتجميد داخليا بالتوصيلات الكهربائية المبردة امثلتها في ذلك مثل جهاز " التجميد العميق Deep Freezer " .
- هذا بجانب تواجد الإضاءة الداخلية الكافية واللوح الزجاجى الموضوع أمام سكين التقطيع ، ومسامير ضبط المسافات وارتفاع العينات وغيرها .
- وقد ظلت هذه الأجهزة مجالا واسعا للتحسين والتطوير حتي تم في الوقت الحالى تصنيع كريوستات كامل التشغيل الذاتى تقريبا Automatic Cryostats ، حيث لم يعد الميكروتوم مزودا بأي ذراع للتشغيل . وقد تم تزويد مثل تلك الأجهزة بالعديد من مسامير الضبط ، والتشغيل لتنظيم وتحديد درجات البرودة المتطلبة (والتي تتم كهربائيا داخل الجهاز) وكذلك درجات برودة الكابينة الداخلية وتجميد العينات وأبعاد العينات وزواياها بالنسبة لسكين التقطيع وسمك القطاعات المطلوبة وعددها أيضا .

وفي هذه الحالة يسمح بفتح الكريوستات مرة واحدة عند بدء الحاجة لاستخدامه

obeikandi.com

واعداده لذلك . وتوضع العينة علي الحامل "Holder" الخاص بذلك ثم يغلق الكريوستات . ويتم تحديد كل العوامل المتطلبة عن طريق المسامير أو الأزرار المذكورة . وحالما تصل درجات البرودة المختلفة إلي المدي المتطلب ويتم تجميد العينة إلي الحد الخاص بذلك ، تتحرك سكين التقطيع تلقائيا أو ذاتيا ، ويتحرك ذراع داخلي حاملا شريحة زجاجية نظيفة من الشرائح التي تم حفظها في مكان معين داخل هذا الجهاز – وبعد أن يلتصق القطاع بهذه الشريحة يتحرك ذلك الذراع حاملا تلك الشريحة إلي مكان مقابل يتم فيه حفظ هذه الشرائح ثم يعود ذلك الذراع إلي مكانه الأول مرة أخري ليعود بقطاع آخر يتم تخزينه بنفس الطريقة ، وهكذا حتي يتم الحصول علي العدد المطلوب من القطاعات . وبعد ذلك تتوقف السكين عن التقطيع وتحفظ الشرائح بما عليها من قطاعات في " درج صغير " أو علبة خاصة داخلة الجهاز وتظل في هذا المحيط البارد حتي يتم إخراجها والتعامل معها حسب الأعراض المطلوبة .

الطرق المثلى أو المناسبة لإعداد القطاعات المجمدة :

Optimum conditions for frozen sectioning

في أول دراسة من نوعها قام بها العالمان " تورنبرج ، ومينجس "Thornburg and Menings" عام ١٩٥٩ فيما يتعلق بتحليل عمليات إعداد القطاعات الثلجية أو المجمدة ذكرا أن الماء يمثل وسط الطمر مقابل الشمع في القطاعات العادية . وعلي ذلك ، فإن التقطيع في تلك القوالب المجمدة (المحتوية علي العينات) هو بمثابة التقطيع في الثلج .

وقد ألمح الباحثان أيضا الي أن درجات الحرارة المثلى أو الأكثر موافقة لكل من سكين التقطيع والكابينة التي يتم فيها التقطيع والنسيج المراد تقطيعه تختلف كلها حسب طبيعة هذا النسيج خاصة حسب طراوته أو قساوته . علي أنها ذكرا أيضا أن عملية التقطيع يمكن أن تتم بدرجة معقولة في حدود مدي واسع من درجات الحرارة المنخفضة .

وفيما يلى نبذة تفصيلية في هذا الخصوص :

درجة حرارة النسيج : Tissue Temperature

كما هو الحال - في كل الميكروتومات الثلجية - عندما تنخفض درجة حرارة الكتلة الثلجية (المحتوية علي النسيج) إلي أقل من - ٤٥°م ، فإن تلك الأنسجة تصبح جافة ، هشة، سهلة التفتت بما يجعلها غير صالحة للتقطيع بينما لوحظ أنه خلال درجات الحرارة التي تتراوح بين - ٤٠° ، - ١٥° مئوية (بالنسبة للنسيج) ، فإن عملية التقطيع تكون عادة سهلة ميسرة . علي أنه قد تحدث بعض المقاومة لعملية التقطيع ، بجانب بعض الكرمشة أو التجاعيد التي تظهر في القطاعات وهي علي سكين التقطيع . فإذا ما رتفعت درجة حرارة النسيج إلي مدي - ٥° م ، فانه يمكن الحصول - غالبًا - علي قطاعات رقيقة متتابعة جيدة .

وبصورة عامة ، فإنه عند توفر درجة حرارة متماثلة بالنسبة لكل من سكين التقطيع والنسيج المراد تقطيعه ، فإن الحصول علي قطاعات جيدة يمكن أن يتم خلال درجات حرارة تتراوح بين - ٣٠° الي - ١٠° مئوية .

درجة حرارة كابينة التقطيع : Chamber Temperature

لوحظ أنه عندما تتراوح درجات حرارة كابينة التقطيع بين درجة الصفر ، - ١٠° مئوية ، فإن ذلك يعتبر من أفضل ظروف التقطيع . فاذا ما انخفضت درجة الحرارة هذه إلي أقل من ١٠° مئوية فإن نوعية القطاعات الناتجة تبدأ في التدهور . وعلي ذلك فإنه روعي في معظم أنواع الكبائن أو الكريوستاتات أن تكون درجة حرارتها الداخلية مضبوطة بصورة عامة عند - ٢٠°م لضمان جودة القطاعات .

تناول القطاعات المجمدة بعد تقطيعها :

Handling of sections after cutting

تعتبر عملية تناول القطاعات الثلجية ، من سطح سكين التقطيع ، من أكثر العمليات دقة. وقد ابتدع البحاث عدة وسائل للقيام بهذه العملية بصورة ملائمة ، فيما يلى نبذة عن أكثرها ملاءمة :

* يتم التقاط القطاعات علي شرائح زجاجية دافئة أو علي الأغطية الزجاجية وغمرها

في الحال في الوسط المطلوب علي أن يكون عند درجة برودة مناسبة . وهذه أصلح الطرق لتوضيح الإنزيمات .

* تنتقل القطاعات مباشرة إلي المحلول التفاعلى Reaction meduim وذلك في حالة دراسة بعض المكونات الكيميائية النسيجية مثل البروتينات وغيرها .
* تجفيف القطاعات المجمدة " Freezing Dryiing" لاستخدامها فيما بعد للتحايل الكيميائية والبيوكيميائية .

opeikandl.com