# الفصـــل الثانى

# 2

# الأسس النظرية للتثبيت الهستوكيميائى

***Theoritical basis of histochemical fixation***

obeikandl.com

obeikandl.com

# الفصـــل الثانى

## الأسس النظرية للتثبيت الهستوكيميائى

*Theoritical basis of histochemical fixation*

### أغراض التثبيت المستوكيميائي .

عملية تثبيت الخلايا والأنسجة عملية رئيسية لإعدادها للصباغة والفحص الميكروسكوبى. على أنه – بصورة أشمل – فإن هذه العملية تخدم أغراضاً متباينة يمكن تلخيصها فيما يلى :

### أولاً : حفظ الأنسجة : Preservation of Tissues

من الأهداف الأساسية لعملية التثبيت حفظ الخلايا والأنسجة فى حالة أقرب ما يكون ، أو طبق الأصل ، لما هو موجود داخل الجسم الحى . وفى نفس الوقت ، فإن المثبت المستخدم يجب ألا يتسبب فى إحداث أية تغيرات فى التركيب الكيميائى أو انماط تواجد المكونات الخلوية والنسيجية .

وتجدر الاشارة هنا إلى أنه حال خروج الأنسجة واستخلاصها من الجسم فإنها تتعرض إلى حالات معينة يتعين اخذها بعين الاعتبار ، منها :

( أ ) عند تركها فى الهواء ، فإنها تجف وتتكرمش ، وتحدث فيها تغيرات بكتريولوجية وتحلل ذاتى ( وذلك بسبب التفاعلات الكيميائية التى تحدث تحت تأثير إنزيمات محللة معينة متواجدة فى خلايا تلك الأنسجة ) والمعروف أن هذه الإنزيمات تؤدى دورها بصورة منتظمة ومنضبطة فى الخلايا داخل الجسم ، ولكن تعرض تلك الخلايا للهواء خارج الجسم يؤدى إلى حدوث ارتفاع غير عادى فى نشاطات تلك الإنزيمات المحللة .

( ب ) اذا وضعت تلك الأنسجة فى الماء ، فإنها سرعان ما تنتفخ وتفقد ملامحها

المميزة .

ولكى يتم تحاشى أوجه الاضرار هذه ، فإنه يتعين اتباع ما يلى :

١ – تثبيت الأنسجة بأسرع ما يمكن لمنع عمليات التحلل وغيرها .

٢ – حسن اختيار المثبتات التى تعمل على وقف التفاعلات الكيميائية التى قد تحدث تحت تأثير الإنزيمات المحللة دون أستبعاد تلك الإنزيمات أو القضاء عليها .

٣ – مراعاة ألا يتسبب المثبت المستخدم فى انتفاخ أو كرمشة الخلايا والأنسجة .

## ثانياً : منع انتشار أو فقدان المحتويات النسيجية :

**Prevention of diffusion or loss of tissue materials**

فى بعض الأحيان قد يتسبب المثبت المستخدم فى تغير نمط تواجد المواد الخلوية أو النسيجية أو فقدانها خارج الأنسجة . وهنا تجدر الإشارة إلى ما تحدثه معظم المثبتات فى نمط تواجد الجليوكوجين بصورة متجانسة فى الخلايا ، وبالتحديد الخلايا الكبدية ، حيث تفقد ذلك التواجد المنتظم وتتكتل فى مناطق معينة فى تلك الخلايا ، بينما تبقى بقية المناطق خالية تقريباً من هذه المحتويات ، وهى ظاهرة تطلق عليها " هروب الجليكوجين Glycogen Flight " وهذه بالطبع صورة زائفة أو غير حقيقية تخالف ما هو موجود أصلاً داخل الخلايا الأصلية ، ويمكن تحاشى حدوث هذه الحالة غير العادية – ولو إلى حد ما – عن طريق استخدام قطاعات ثلجية مجففة يتم تثبيتها بواسطة بخار الفورمالين ، كما وجد أيضاً أن تعريض القطاعات النسيجية – لفترة قليلة – إلى محلول مخفف من حامض الأوزميك Osmic acid قبل التثبيت بالمثبتات العادية ، قد يؤدى إلى تقليل مدى ظاهرة هروب الجليكوجين هذه .

كما أنه قد يكون المطلوب فى بعض الأحيان تحويل المكونات الخلوية إلى مركبات غير ذائبة لا تتأثر بالمحاليل الأخرى . وعندئذ يصبح من المتيسر صباغتها وتوضيحها داخل الخلايا والأنسجة . وعلى ذلك فإن اختيار المثبت المستخدم له أهميته القصوى فى تلك الحالات ، مثال ذلك ، إذا أريد الحفاظ على الدهون أو الليبيدات بصورة عامة ، فإنه يتعين استخدام مثبتات الفورمالين ( الفورمالديهيد ) أو مثبت " فلمنج بدون حامض الجليك – Flemming without acetic acid" أو محلول " ريجود – Regaud's solution أو محلول "

أوياما Aoyama " .

أما إذا استخدمت مثبتات محتوية على الكحول ، فإن ذلك سيؤدى إلى استخلاص الليبيدات من الخلايا .

## ثالثاً : تخلل المثبت فى الأنسجة : Penetration of the fixatives

تختلف المثبتات عن بعضها فى قدرتها على اختراق الأنسجة وتخللها ، كما أن ذلك يتوقف أيضاً على أنواع الانسجة المراد تثبيتها ، وهناك مثبتات معينة معروفة بسرعة تخللها للأنسجة بصورة عامة ، وذلك مثل الفورمالين بالمقارنة بمثبتات أخرى ، مثل محلول " بوان " الذى يعرف بأنه بطىء التخلل وأبطأ منه مثبت " حامض الأوزميك " . وبصورة عامة ، فإن المثبت الجيد هو الذى يتخلل الأنسجة بصورة سريعة حتى يعمل على وقف عمليات التحلل الذاتى التى قد تحدث داخل الخلايا والانسجة فى حالة بطء المثبت فى تخللها .

## رابعاً : مناسبة المثبتات للمراحل التالية لاعداد العينات :

**Preparation of material for the successive treatments**

المفروض أنه بعد تثبيت الأنسجة ، تتبع الخطوات المناسبة لإعدادها كتحضيرات شمعية أو مجمدة . فى الحالة الأولى ، تتعرض الأنسجة لمعاملتها بمواد تتسبب فى فقدان بعض محتويات هذه الأنسجة أو انسيابها خارج الخلايا ، كما يحدث فى الحالة الثانية . وعلى ذلك فإنه يتعين الحرص فى استخدام المثبت المناسب فى تلك الحالات والذى يعمل على حفظ تلك المحتويات داخل الخلايا .

ومثال ذلك استخدام مثبتات الفورمالين قبل تقطيع الأنسجة المجمدة لتوضيح الجسيمات المعروفة باسم "الليزوسومات dysosomes " الغنية بالإنزيمات .

## خامسا : تقسية الانسجة في التحضيرات الشمعية :

**Hardening of paraffin specimens**

من فوائد التثبيت تقسية الأنسجة أو جعلها صلبة متماسكة ، قبل تعرضها لخطوات الإعداد التالية ، بحيث يسهل تناول تلك الأنسجة خاصة ما كان منها سهل التفتت ، على أنه

يراعى أن إطالة مدة التثبيت تتسبب عادة فى زيادة تقسية أو جفاف العينات مما يجعل من الصعب تقطيعها .

## سادساً : تأثير التثبيت والمثبتات على عمليات الصباغة :

**Influence of fixation and fixatives on the staining procedures**

من النواحى الهامة التى يجب أخذها فى المقام الأول عند اختيار المثبت المناسب هو نوع الصباغة أو التفاعل الذى سوف تتعرض لها تلك الأنسجة المثبتة فيما بعد . فمثلا ، إذا كانت العينة فى سبيل إعدادها لتوضيح الجليكوجين مثلا ، فإن أفضل المثبتات عندئذ هى محلول " بوان " أو محلول " جندر " Bouin " or " Gendre " solutions" .

بينما لا يصلح محلول " بوان " هذا نفسه عندما يكون المطلوب معاملة هذه الأنسجة بتفاعل " فويلجين " Feulgen reaction " لتوضيح حامض دى أكسى ريبونيوكليك "DNA " ( ح د ن ) ، وذلك لأن محلول بوان سيعمل على رفع معدلات التحلل المائى فى الأنسجة إلى أكثر مما هو متطلب ، وعلى ذلك فإن الأمر يتطلب أحياناً استخدام الصبغات المطلوبة ، وهى تعمل على إيجاد ترابط وثيق بين المادة الصبغية والتراكيب المراد صباغتها . على سبيل المثال ، فإن استخدام الزئبق يرفع من كفاءة الأنسجة على الصباغة بصبغات " الكروم الثلاثية " Trichrome Stains .

## سابعاً : تجميد القطاعات النسيجية بدلاً من تثبيتها :

**Hardening of tissue sections instead op their fixation**

يتطلب الأمر فى حالة إعداد بعض التحضيرات الهستوكيميائية تجميد الأنسجة بمجرد استخلاصها من الجسم وذلك للمحافظة على كل محتوياتها الكيميائية وتسهيل تقطيعها فى الوقت المناسب .

# المثبتات الهستوكيميائية

## Histochemical Fixatives

يتناول الجزء التالى نبذة عامة عن بعض المثبتات الرئيسية التى يوصى باستخدامها فى إعداد بعض التحضيرات الهستوكيميائية .

**الفورمـــالين** : Formalin

هو محلول من غاز الفورمالديهيد Formaldehyde مذاباً فى الماء ، بنسبة ٤٠ ٪ . وقد يستخدم محلول الفورمالين بصورة منفردة أو يدخل فى تركيب بعض المثبتات المركبة ، والمعروف أن نسبة التركيز المذكورة تمثل التركيز المطلق فى هذه الحالة ، أى ١٠٠ ٪ . وعلى ذلك ، إذا أريد الحصول على تركيز مقداره ١٠ ٪ ، فإنه يؤخذ مقدار خمسة وعشرون جزاء من هذا المحلول المركز ويضاف له خمسة وسبعون من الماء المقطر .

**طبيـعة الفورمـالين :**

المعروف أن محاليل الفورمالين حمضية التفاعل وذلك بسبب تكوين حامض الفورميك "Formic Acid " بها . وفى حالة الأغراض الهستوكيميائية تستخدم محاليل منظمة " Buffer solution " مثل محلول فوسفات الصوديوم أو عن طريق وضع كمية من مسحوق الطباشير أو كربونات الكالسيوم فى الزجاجة المحتوية على الفورمالين ، على أن يتم ترشيح هذا المحلول قبيل الإستعمال ، على أنه يلاحظ أن إطالة مدة التثبيت فى الفورمالين تؤدى إلى تكون مواد صبغية من الفورمالين تجعل من الصعب صباغة التحضيرات بعد ذلك بصبغات حمضية معينة مثل صبغ الايوسين .

وبصـورة عامة ، فإن الفورمالين يستخدم عادة بتركيزات مختلفة تتراوح بين ١٠ – ٤٠ ٪، بجانب استخدام بخار الفورمالين فقط فى تثبيت بعض العينات الهستوكيميائية .

**استخدامات الفورمالين :**

يعتبر الفورمالين من أفضل المثبات بالنسبة لتوضيح الليبيدات ، وذلك لأن تلك المواد

لاتحدث فيها تغيرات ملموسة تحت تأثير الفورمالين .

وعند إضافة الكالسيوم للفورمالين فإنه يصبح مثبتاً جيداً للفسفوليبيدات ( الليبيدات الفسفورية ) . كذلك فإنه عند استخدام الفورمالين ومعه الكالسيوم أيضاً - بما يسمى "فورمالين - كالسيوم " Formol calcuim فإنه يعمل على الحفاظ بصورة كبيرة على الإنزيمات المحللة المائية Hydrolytic engyan خاصة عند استخدامها تحت درجة ٤ مئوية . على أنه يراعى فى تلك الحالات عدم إطالة فترة التثبيت أو التثبيت عند درجة الحرارة العادية لأن ذلك سيقلل من معدلات النشاطات الإنزيمية .

كذلك ، فإن استخدام الفورمالين لتثبيت التحضيرات المجمدة الجافة ، فإنه يعطى نتائج متميزة فى التحضيرات الهستوكيميائية خاصة بالنسبة للجيلكوجين والمواد المخاطية والبروتينات والأحماض النووية .

## تفاعلات الفورمالين :

تفاعلات الفورمالين عديدة ومعقدة وذلك لأنه يتفاعل مع العديد من البروتينات التى يتم ترسيبها فى الخلايا والأنسجة . وبعض هذه التفاعلات انعكاسية والبعض الاخر ليس كذلك ، وتحدث الحالات الأولى نتيجة الغسيل بالماء .

ولعل أهم تفاعلات الفورمالين هى التى تتضمن تحويل المركبات الى تحتوى على ذة هيدروجين تفاعلية الى مركب هيدروكسيلى .

( مجموعة ميثيلول $CH_2 . OH$ )

$$RH + CH_2O \rightleftharpoons R. CH_2 (OH)$$

وبالمثل ، فإن مجموعة الهيدروكسيل هى مجموعة تفاعلية أيضاً ، تتحد مع ذرة هيدروجين لتكون قنطرة أو وصلة ميثيلينية ( $CH_2$ ) تعمل على ربط الجزئيات البروتينية .

$$R. CH_2 (OH) + HR \rightleftharpoons R - CH_2 - R + H_2O$$

وهذه الوصلات الميثيلينية قابلة للتمزق بواسطة التحلل المائى ، وقد تكون وصلة

ميثيلينية بين مجموعتين متشابهتين ، مثل مجموعة امينية ($NH_2$) أو بين مجموعة أمينية ومجموعة "ببتيديد" ثنائى الببتيد ( CONH ) أو بين ($NH_2$) ومجموعة (NH) .

والمعروف أن الفورمالين يتحد – فى وسط يتراوح أسه الهيدروجينى بين ٦ – ٨ مع الكرباتين ، وهو البروتين الأساسى فى الجلد والشعر دون التأثير فى ارتباط ذرتى الكبريت (S-S) فى " السيستين Cystine " وعند وجود وسط أكثر قاعدية ، فإنه يعمل على اختزال مجموعة (S-S) الى مجموعتى كبرتيد هيدروجينى (SH) ، ويؤدى ذلك إلى تفاعله على هذه المجموعات مكونا وصلة ميثيلينية فى بعض الحالات : ( $8 - CH_2 - S$ ) وذلك مكان الارتباط أو الوصلة بين ثنائى الكبريتيد ( Disulphide link ) .

وتعتبر المجموعات التى تدخل – بصورة خاصة – فى تثبيت البروتينات هى : الببتيدات والهيدروكسيل والكاربوكسيل كذلك والمجموعات المحتوية على الكبريت .

وبالنسبة للفورمالين الذى يظل مرتبطاً بالبروتينات بعد عملية التثبيت ، فإنه يمكن استخلاصه بالغسيل بالماء الجارى لفترة قد تصل إلى ٢٤ ساعة ، إلا أنه على الرغم من ذلك ، فإن نسبة معينة من الفورمالين تظل موجودة فى تلك الأنسجة المثبتة . وعلى ذلك يتعين غسل القطاعات جيداً بالماء المقطر لإزالة ذلك الفورمالين الذى قد يكون عائقاً فى العمليات السائدة.

## مجالات أخرى لاستخدامات الفورمالين :

يرجع التعرف على خصائص الفورمالين فى حفظ المواد وتثبيتها إلى وقت مبكر عندما استخدم فى صناعة ودباغة الصوف حيث يعتبر الكولاجين والريتيكيولين من أهم مكونات الصوف . وقد أجرى الكثير من الدراسات على الفورمالين تحت ظروف هستولوجية متباينة ، على سبيل المثال ، عند معدلات مختلفة من الأس الهيدروجينى تتراوح بين ٤ – ١٠ ، وعند درجات متباينة . وقد وجد أن كمية الفورمالين التى تظل مرتبطة بالعديد من البروتينات تتناقص بشدة فى حالة ارتفاع الأس الهيدروجينى إلى معدل أعلى من ١٠ .

كما أن الفورمالين يستخدم فى الأغراض الهستولوجية والهستوكيميائية فى محاليل عازلة أو فوق نقطة التعادل ويعمل ذلك على تقوية تأثير الفورمالين . ويمكن أن يعزى ذلك إلى

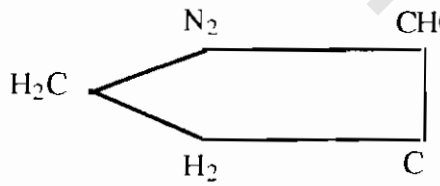
أن التركيب المتماسك للفورمالين يوجد فى الماء بصورة متميئة مثل حالة " ميثيلين جليكول $CH_2(OH)_2$ " الذى يعتبر مثبتا بالغ التأثير . ويستدل من تلك المشاهدات فى مجالات الدراسات الخلوية والهستوكيميائية ان معاملة البروتينات بالفورمالين ، والتى يعقبها الغسيل بالماء ، فانه يعمل على جعل معظم المواد النشطة فى حالة أكثر قابلية للتفاعل على أية مادة تفاعلية .

## والخلاصة :

إن تفاعلات الفورمالين بالغة التعدد والتعقيد ، لأنه يمكن أن يرتبط بالعديد من المجموعات الكيميائية حيث يعمل على إيجاد وصلات أو روابط بين هذه المجموعات ، وهذا مايقلل من كفاءة الفورمالين كمحلول أو مثبت يعمل على تركيز أو تكدس المواد فى الخلايا على الخلية ، أما المجموعات الملائمة ، فانها تشتمل على المجموعات الأمينية والبيتيدات والهيدروبسيلات والكابوكسيلات والمجموعات الكبريتيدية والهيدروجينية والحلقات الاروماتية .

### الجلوتارالديهيد : Glutaraldehyde

الجلوتارالديهيد رمزه الكيميائى $(CH_2)_3 CHO . CHO$ ويمثل نمطه التركيبى كما يلى :




ويعتبر من أفضل المثبتات بالنسب لتحضيرات الميكروسكوب الالكترونى وذلك لأن هذه المادة تعمل على الحفاظ على التركيب العام للخلايا والأنسجة مع عدم فقدان أية كمية ملموسة من الإنزيمات ، وذلك على شريطة عدم اطالة مدة التثبيت فى هذه المادة . كما وجد أنه يعطى أفضل النتائج فى حالة إنزيمات الفسفاتيز والاستيريز بصورة خاصة .

### الأسيتون : Acetone

يستخدم الأسيتون أحياناً فى بعض التحضيرات الهستوكيميائية فى القطاعات المجمدة

وذلك عند درجات حرارة تتراوح بين صفر الى - ٤° مئوية ، وكذلك فى القطاعات الشمعية المتطلبة لتوضيح نشاطات الإنزيمات المحللة المائية .

والأسيتون سريع المفعول كمثبت ولكنه يتسبب فى تجعيد أو كرمشة القطاعات وهذا يجعل استخدامه محدوداً جداً .

**الكحـــول** : Alcohol

يعتبر الكحول أفضل نسبياً من الاسيتون فى الأغراض الهستوكيميائية بالنسبة للقطاعات المجمدة وذلك لتعيين نشاطات الانزيمات حيث لوحظ أنها لا تتأثر عندما يستخدم تحت درجة ٤ م فيما عدا الاستيريز .

كذلك يستخدم الكحول عند تركيز ٨٠ ٪ لتوضح الجليكوجين ، وإن كان لا يحافظ على البنيان العام للخلايا والأنسجة . على أنه عند استخدامه فى المثبتات المركبة يرفع من كفاءة تلك المثبتات خاصة بالنسبة للبروتينات ، لكنه يتسبب فى استخلاص الليبيدات ، كما أنه يجعل من الصعب تجميد الأنسجة واعداد القطاعات الثلجية منها .

كذلك فإنه من عيوب الكحول أيضاً إتلاف الميتوكوندريا وجهاز جولجى والحبيبات الأفرازية وإذابة المواد الدهنية ، ولكنه - كما سبق القول - مفيد جداً فى تواجده فى بعض المثبتات مثل محلول ( كحول - فورمالين - حامض الخليك ) : ( AAF ) وكارنوى وجندر وغيرها .

والمعروف بصورة عامة أن كلا من الكحول والأسيتون يستخدمان بكفاءة فى ترسيب البروتينات ، كما أن لهما فاعلية واضحة فى مجال دراسة الإنزيمات هستوكيميائياً ، وعلى الرغم مما ينجم عن استخدامهما من تغيرات موروفلوجية فى اشكال الخلايا والأنسجة إلا انهما لا ينقصان من فاعلية مثل تلك الإنزيمات . إلا أنه يجب ملاحظة أن تأثيرات هاتين المادتين انعكاسية ، ومن الممكن أن تستعيد البروتينات خصائصها الاساسية عن تلك المواد .

**حامض الاوزميك** : Osmic Acid

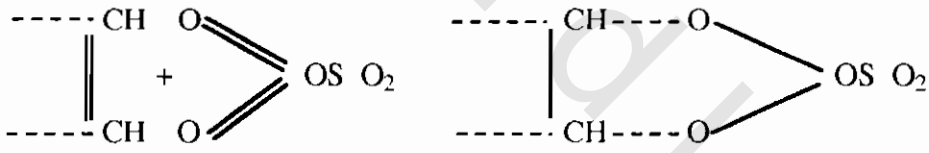
ويعرف أيضاً بأسم **رباعى اكسيد الأوزميوم** smiom tetraoxide $OsO_4$

وهو يشكل مثبتا مانعاً للتجلط ، وهو مفيد جداً فى تثبيت التراكيب المحتوية على

الليبيدات ، كما أنه متطلب بصورة أساسية فى تحضيرات الميكروسكوب الإلكترونى حيث يستخدم بتركيز ١ ٪ فى محلول منظم ، وعندئذ يعمل على بقاء الدهون فى حالة غير ذائبة . وعلم الرغم من تلك الأهمية ، بجانب تميزه فى حفظ بعض التراكيب الخلوية مثل الميتوكندريا وجهاز جولجى ، الا أنه يعيبه بطء تخلله للخلايا والأنسجة . وإذا ما تركت فيه العينات فترة طويلة فإنها تصبح جافة هشة سهلة التفتت ، وإذا تركت لفترة قصيرة ، فإن الأجزاء الداخلية من تلك العينات تبقى غير مثبتة . ولذلك يتعين أخذ هذه النواحى فى الاعتبار عند استخدامه فى التثبيت ومراعاة الفترات الملائمة بالنسبة لأنواع العينات المختلفة بجانب تأثيراته الضارة على حاستى الشم والبصر نظراً لأبخرته المتصاعدة ، بجانب أنه مادة سامة الى حد كبير ، مما يستوجب الحرص التام أثناء التعامل معه .

## تأثيرات حامض الأوزميك :

فيما يتعلق بهذه النواحى ، فقد افترض أن الدهون غير المشبعة Unsuturated Fats يمكن أن تختزل حامض الأوزميك ( رباعى اكسيد الأوزميوم ) حيث تنتج عن ذلك مركبات سوداء اللون تحتوى على عنصر الأوزميوم أو هيدروكسيد الأوزميوم ، كما أفترض أيضاً أن ذلك يحدث نتيجة أكسدة الروابط المزدوجة بين ذرات الكربون المتجاورة .




وقد لوحظ أن محلول حامض الأوزميك ( ٢٪ ) يكون مادة جيلاتينية مع الالبومين والتيبرينوجين .

## حامض البكريك : Picric Acid

يعتبر حامض البكريك من أهم المثبات وأكثرها انتشارا، وهو يعمل على تثبيت العينات بصورة جيدة مع تقسيمها وعدم حدوث كرمشة فيها وهو يستعمل عادة فى المثبتات المركبة مثل محاليل "بوان" و "جندر" ويوصى باستخدامه ( فى المثبتات المركبة ) للحفاظ على الجليكوجين بصورة خاصة ، كما أنه يعمل ايضا على ترسيب البروتينات والاتحاد مع

بعضها.

على أنه يتعين عند استخدام مثبتات حامض البكريك ، فإنه يتعين العمل على إزالة بلونه الأصفر من العينات بعد تثبيتها ، وذلك لأن بقاء الزائد منه فى العينات يعوق عملية التقطيع ويحدث نوعاً من الجذب الكهربائى بين القطاعات و الميكروتوم وسكين التقطيع .

## المثبتات المحتوية على الزئبق : Mercury - containing fixatives

تستخدم هذه المثبات بصورة خاصة فى العديد من الاغراض الهستوكيميائية والمعروف أن محلول "كلوريد الزئبق " Mercurie Cloride ، وهو الذى يستعمل فى المثبتات المركبة ، بطىء النفاذية . ولذا يتعين إعداد قطع صغيرة وغير سميكة من العينات لتثبيتها بصورة جيدة ، على أنه لا يصلح لتثبيت الجليكوجين .

وتسبب هذه المثبتات انكماشا فى الأنسجة المثبتة ، وذلك بسبب عدم استخدام املاح الزئبق منفردة فى عمليات التثبيت ، ولكنها تدخل ضمن مكونات المثبتات المركبة على الفورمالين أو حامض الخليك على سبيل المثال .

ويعيب هذه المثبتات أنه تتخلف عنها ترسيبات لعنصر الزئبق ، ولذلك يجب معاملة العينات بعد ذلك فى محلول مخفف من ايوديد البوتاسيوم Potassium iodide الذى يجب أن يزال بدوره فى محلول "ثيوكبريتات الصوديوم أو الهيبو "Soduim thiosulphate or hypo" ثم الغسيل الجيد بالماء المقطر"

## الكرومـــيوم : Chromium

تكمن أهمية محاليل الكروميوم فى قدرتها على الاتحاد بالماء مكونة مركبات معينة تتحد بدورها مع الرويتنات مثل تلك التى تنتج تحت تأثير الفورمالين .

ويعتمد تأثير الكروميوم – إلى حد كبير – على تركيز الأس الهيدروجينى للمثبت . فعلى سبيل المثال ، عندما يقع هذا التركيز بين ١ –٤ ، فان ذلك يعطى نتيجة جيدة مع الكولاجين. وبصورة عامة ، فانه يتعين ضبط هذا الأس بحيث لا يتجاوز ٢ر٩ فى حالة استخدام مثل هذه المثبتات فى الاغراض السينلوجية و الهستوكيمائية ، وعلى أية حال فانه يوصى باستخدامها لكل من الجيلكوجين و الليبيدات والأحماض النووية و الميتوكندريا .