1. Obtaining the specimen : الحصول على العينة

نحصل على العينة **Biopsy** من الإنسان المريض خلال العملية الجراحية ومن الحيوان بعد قتله مباشرة

- **القتل**: هو إيقاف دائم وسريع لجميع العمليات الحيوية.
- و تتم عملية القتل بعدة وسائل (الذبح – التنخيع – ضرب مؤخرة الرأس – التخدير.)
- **الذبح**: وهي من أسهل العمليات وأسرعها وتطبيق على معظم الحيوانات الفقارية إذا استثنينا الأسماك منها وتستخدم سكين حادة جدا وتتم عملية الذبح بقطع أوردة وشرايين الرقبة مع القصبة الهوائية والبلعوم .
- **التنخيع** : ويقصد بها شل الحيوان شلا كاملا وذلك بفصل الحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي أو المخ وبذلك لا يحس الحيوان بالألم أثناء عملية التشريح وتتم عملية التنخيع بغرز إبرة التشريح الحادة فيما بين الفقرة الأو لى من الفقرات العنقية والجمجمة حتى تصل إلى الحبل الشوكي ثم تحرك هذه الإبرة يمنة ويسرة حتى نضمن الانفصال التام للحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي وكثيرا ما يطبق على الضفادع.
- **ضرب مؤخرة الرأس** : وتهدف إلى ارتجاج مخي مفاجئ بحيث يصبح الحيوان بعدها في حالة غيبوبة تامة تتم هذه العملية بالإمساك الجيد بالحيوان بحيث تكون الناحية البطنية باتجاهك مع ترك منطقة العنق والرأس حرة الحركة ثم يضرب بموخرة الرأس الخلفية ويشكل سريع ومفاجئ على أي جسم صلب الطاولة ويجب أن يتم الارتجاج المخي بضربة واحدة فقط بدون تردد أو خوف وإلا تألم الحيوان ويعرف نجاح العملية في حالة الفار بخروج الدم من فتحتي الأنف (هذه الطريقة تناسب الفئران والضفادع) .
- **التخدير**: هو إيقاف مؤقت لجميع العمليات الحيوية بإستخدام مادة مخدرة مثل: (الكلورفورم)

2. Fixation : التثبيت

الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة من أجل إخضاعها للفحوصات النسيجية والكيميانسيجية وتهدف هذه الخطوة إلى المحافظة على النسيج و محتوياته على الحالة التي كان عليها في جسم الكائن الحي أو قريبة

من ذلك وتتم عملية التثبيت من خلال التفاعلات الكيميائية و التداخلات الفيزيائية بين المجاميع الفعالة للمثبت و المجاميع الفعالة للمواد الكيميائية الموجودة في النسيج (كربوهيدرات – بروتين – دهون – إنزيمات – أملاح معدنية–صبغات). و تقوم عملية التثبيت بإيقاف عملية التفتت والتفسخ **Disintegration** و التعفن **Putrefaction** الناتجة عن نشاط البكتيريا و الفطريات و كذلك إيقاف عملية التحلل الذاتي للنسيج بفعل الإنزيمات.

الهدف من التثبيت:

1- تخثير البروتينات **coagulation of proteins** و تحويل مكونات النسيج الذائبة إلى مواد غير قابلة للذوبان في جميع المحاليل و الأوساط الكيميائية التي سوف يتعرض لها النسيج في العمليات اللاحقة.

2- الحفاظ على سلامة الخلايا من التشوه والانكماش **shrinkage** والانتفاخ **swelling** و المحافظة على ضغطها الأسموزي خلال تعرضها للمحاليل الكيميائية في عمليات نزع الماء و التخلل و الطمر.

3- إعطاء النسيج قدر من الصلابة المطلوبة لتهيئته للتقطيع.

4- تهيئة النسيج بحيث يصبح سهل الإنفاذ وقابل للتصبيغ و تمييز أجزاءه عن بعضها البعض عند الفحص تحت المجهر .

وحتى تتحقق الأهداف المرجوة من التثبيت المذكورة أعلاه لابد من مراعاة النقاط التالية:

- اختيار المثبت المناسب للعمل حسب الغرض من الدراسة.
- وضع العينة في المثبت مباشرة بعد أخذها من الجسم لمنع عملية التحلل والتفسخ.
- إن يكون حجم العينة صغير بحيث يسمح للمثبت بالنفاذ خلال العينة في وقت قصير (سمك العينة لا يزيد على 2–5 مم)
- إن يكون حجم المثبت عدة أضعاف حجم العينة(10–20 ضعف.)
- ضرورة التقيد بالفترة الزمنية اللازمة للتثبيت حسب المثبت المستخدم(24 ساعة على الأغلب.)
- الأخذ في الاعتبار الآثار التي سيتركها المثبت على مكونات النسيج وتركيب الخلايا بعد التثبيت.
- إذا لم يتوفر المثبت المناسب في حاله طارئة يجب وضع العينة في السائل النيتروجيني(–182 مئوية) إلى حين توفر المثبت المناسب .

- يجب غمر العينة بأكملها في المثبت وذلك برج المثبت عدة مرات بعد وضع العينة فيه حتى تتبلل جميع أسطح العينة بالمثبت.

المثبت Fixative

هو عبارة عن وسط سائل يحتوي على مواد كيميائه بعضها يعمل على تثبيت المحتوى الكيميائي للخلايا والمواد بين الخلوية عن طريق التخثير والترسيب وبعضها يعمل على معاكسة الوسط المذيب على خلايا النسيج من التشوه.

شروط المثبت الجيد:

1. يتخلل الأنسجة بسهولة وبسرعة.
2. يعمل في درجة الحرارة العادية.
3. لا يحدث ضرر بالنسيج.
4. يعمل على تيبس النسيج نوعاً ما بحيث يصبح قوامه سهل التقطيع.
5. لا يتعارض مع الصبغات المختلفة عند صبغ العينة.
6. يستمر مفعولة لمدة طويلة.
7. يقتل الجراثيم والفطريات التي تساعد على تحلل الأنسجة.
8. أن لا يترك المثبت أي آثار جانبيه سيئة أو أصباغ على النسيج.
9. أن يكون سعره مناسبا ومتوفرا باستمرار.

العوامل المؤثرة على عملية التثبيت:

1- الأس الهيدروجيني للمثبت: يجب أن يكون ما بين(6- 8)لأن زيادة الأس الهيدروجيني أو النقصان يتلف الأنسجة ويمكن الحصول على درجة الحموضة باستخدام محلول واقيBuffer.

2- درجة حرارة المكان: تزداد سرعة النفاذ بزيادة درجة حرارة المكان والعكس صحيح ألا أن الحرارة العالية تتلف الأنسجة لذا يفضل أن تكون درجة الحرارة(25) درجة مئوية.

3- تركيز المثبت وكميته: يتناسب مع حجم العينة طرديا(10-20) ضعفا.

4- مدة التثبيت: تتناسب مع حجم العينة طردياً.

أنواع وتصنيف المثبتات:

المثبتات المستخدمة في الدراسات النسيجية والكيميانسيجية كثيرة قد تربو على(650) مثبت وقد صنفت بعدة طرق نذكر منها تصنيف بيكر 1960م الذي صنف المثبتات إلى:

1- مثبتات كيماوية مختزة للبروتين: مثل حامض البكريك (المر)، كلوريد الزئبقيك، الكحول الإثيلي، الأسيتون، ثالث كلوريد حمض الخليك.

2- مثبتات كيماوية مختزة للبروتين: مثل الفورمالدهيد، حمض الخليك، ثنائي كرومات البوتاسيوم، ر ابع كلوريد الأوزميوم.

وهناك عدة أنظمة لتصنيف المثبتات يعتمد بعضها على:

1. طبيعة عمل المثبت.
2. استعمال المثبت .
3. الغرض من الدراسة (نسيجيه أو كيميانسيجيه.)
4. على المواد الموجودة في المثبت:

- مثبتات محتويه على مجموعات ألدهايديه مثل:مثبت الفورمالين، فورمول الكالسيوم،N.B.F وغيرها.
- مثبتات محتويه على أيونات معدنية (زئبق(مثبت زنكر،هلي،سوسا) – كروم – أوزميوم)
- مثبتات محتويه على حمض المر(مثبت روسمان، كارنوي، بوان.)
- مثبتات الكحول و الأسيتون.

تركيب المثبت:

- مثبتات بسيطة.
- مثبتات مركبة:
- مثبتات تشريح دقيق.
- مثبتات خلوية (نووية و سيتوبلازمية.)

أنواع المثبتات الجيدة: الفورمالين Formalin 10%

هو أكثر المحاليل المثبتة استعمالاً . والمركز منه عبارة عن 04 % فورمالدهيد وأحسن نسبة للفورمالين المثبت 01 % من المحلول المركز أي إضافة 10 مل من المحلول المركز إلى 90مل من الماء المقطر.

مدة تثبيت العينة من 42 12 ساعة على الأقل حسب حجم العينة.

- مميزاته :