جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic techniques

المحاضرة الأولى

الطرق العامة في التحضيرات المجهرية

General methods in microscopic techniques

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

كلية العلوم قسم علوم الحياة مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الأولى

الطرق العامة في التحضيرات المجهرية

General methods in microscopic technique

بصورة عامة هناك طريقتين أساسيتين للتحضيرات المجهرية:

١. الطريقة المقطعية Sectioning method
٢. الطريقة اللامقطعية Nonsectioning method

١. الطريقة المقطعية : Sectioning method

في هذه الطريقة يتطلب عمل مقاطع للنماذج ومستويات مختلفة لغرض دراستها كأن تكون هذه المقاطع عرضية transverse or cross أو طولية longitudinal ويمكن عمل هذه المقاطع بالطرق التالية:

أ -طريقة القطع اليدوي الحر Free hand sectioning method.

وتتلخص هذه الطريقة بمسك النموذج باليد وامرار أداة القطع عليه دون الاستعانة بأجهزة قطع معينة.

ب -طريقة القطع بالمشارح (الميكروتومات) Microtome sectioning method.

في هذه الطريقة تستخدم أجهزة خاصة لقطع المقاطع تعرف بالمشارح (الميكروتومات) microtomes حيث يختص كل منها بنوع أو أكثر من التحضيرات وهذه الأنواع هي:

أ -المشراح اليدوي (الميكروتوم اليدوي) Hand microtome
ب -المشراح الدوار (الميكروتوم الدوار) Rotary microtome
ت -المشراح المنزلق (الميكروتوم المتزلق) Sliding microtome
ث -المشراح المجمد (الميكروتوم المجمد) Freezing microtome
ج -المشراح الفوقي (الميكروتوم الفوقي) Ultra microtome

٢. الطريقة اللامقطعية : Nonsectioning Method

في هذه الطريقة لا تحتاج النماذج للقطع بل تعامل بطرق مختلفة حيث ان لكل طريقة استخداماتها الخاصة ومن بين هذه الطرق هي:

أ -طريقة المسح Smear method

ب -طريقة السحق أو الهرس Squash method

ت -طريقة التفكيك بالنقع Maceration method

ث -طريقة الطبع Printing method

ج -طريقة النشر او الفرش Spreading method

ح -طريقة الترويق (التوضيح) Clearing method

خ -طريقة التحميل الكلي Whole mount method

خطوات تحضير شريحة مجهرية

١ -التخدير Anesthetization

هو أول خطوات التحضير وخصوصا بالنسبة للنماذج الحيوانية القابلة للتقلص فيما لو ثبتت بصورة مباشرة، لذا يجب معاملتها بالمخدر لغرض اكساب النموذج الارتخاء الكافي وعدم تشوهه اثناء التثبيت، وهناك العديد من المحاليل والطرق المستخدمة لهذا الغرض ومن بينها الكلوروفورم والايثر chloroform and ether.

٢ -القتل والتثبيت والتصليد Killing, Fixing and Hardening

القتل killing هو ايقاف دائمي وسريع لجميع الفعاليات الحيوية للكائن الحي، اما التثبيت fixing فهو عملية الحفاظ على شكل وحجم وترتيب الخلايا والأنسجة والأنظمة النسيجية وما تحويه كما لو كانت بشكلها الطبيعي نوعا ما وتتم باستعمال محاليل كيمياوية تتفاعل مع محتويات خلايا النسيج بحيث تعطي تمايزا ضوئيا لخلايا النسيج أو الأنسجة المختلفة أثناء فحصها وتهيئة الأنسجة لتقبل المعالجات بالمحاليل اللاحقة، اما التصليد hardlening فهو

عملية اكساب النموذج المتانة الضرورية لقطع مقاطع رقيقة جدا وكذلك لمقاومة اوساط الطمر embedding media وتقوم معظم المثبتات بعملية التصليد.

٣ -الغسل Washing

بالرغم من أن قسماً من المثبتات هي محاليل جيدة لحفظ النماذج ألا انه يجب إزالة معظمها لمنع الإفراط في التثبيت وللتخلص مما تتركه من مواد كالبلورات وغيرها، حيث أن بقاء قسما منها داخل النماذج يؤثر على سير خطوات العمل اللاحقة وخاصة عملية التصبيغ staining لذا يجب غسل المادة غسلا جيدا بماء الحنفية الجاري أو الماء المقطر اذا كان المثبت المستخدم مائيا aqueous Fixative أو بالكحول وبنفس التركيز اذا كان المثبت كحولياً alcoholic fixative.

٤ -الحفظ Preservation

أن معظم محاليل الحفظ تكون عادة من مادة واحدة مخففة بالماء وتقوم هذه المحاليل بنفس وظائف المادة المثبتة حيث تحافظ على جميع تراكيب المادة بشكلها الطبيعي عندما يراد حفظها لفترات زمنية قصيرة أو طويلة ويستغني عن هذه الخطوة عندما تحضر النماذج مباشرة بعد عملية التثبيت.

٥ - الانكاز (سحب الماء) Dehydration

لأجل تحضير معظم النماذج يجب سحب الماء من انسجتها بصورة كاملة وذلك لأن بقاء أي أثر للماء داخل النماذج سوف يمنع تشرب النماذج بمواد التشريب، وهناك العديد من محاليل الانكاز منها الكحول الإثيلي والمستخدم بصورة شائعة. في تحضيرات خاصة لا تحتاج النماذج لسحب مائها خاصة عندما براد فحصها بصورة كاملة وهي مغمورة في وسط مائي أو جيلاتيني أو في الشمع المائي Water wax أو عند فحص المقاطع بصورة مباشرة بعد عملية القطع خاصة بعد التجميد Freezing.

٦ -الترويق (التوضيح) Clearing

يقصد بالترويق عملية جعل النموذج أو المقطع رائقا (شفافا) وخاليا من الشوائب كذلك لازالة محاليل الانكاز في حالة الطمر بالشمع البارافيني. ويتم ذلك باستخدام محاليل كيمياوية بعد عملية الانكاز وكذلك بعد عملية الصبغ ومن محاليل الترويق الشائعة الاستعمال الزايلين xylen وزيت القرنفل Clove oil.

٧ - التشريب (التشبيع) Infiltration

لغرض عمل مقاطع رقيقة thin sections أو شرائح slices لنماذج معينة يجب اختيار وسط medium معين للتغلغل بين خلايا النموذج وذلك لاكسابه الصلابة الكافية لمقاومة اوساط الطمر embedding media وكذلك لتسهيل عملية القطع ويتم اختيار الوسط بحيث يتلاءم مع طبيعة النموذج المحضر وكذلك مع اداة القطع المستخدمة ومن بين هذه الأوساط شمع البارافين paraffin wax والجيلاتين gelatin.

٨ -الطمر Embedding

تحتاج النماذج في التحضيرات المقطعية إلى تغليفها أو احاطتها بأوساط معينة وذلك لجعلها كتلة متماسكة لكي تسهل عملية القطع، وقد تكون هذه الأوساط مشابهة لوسط التشريب أو مختلفة عنه ومن الأوساط المستخدمة هي شمع البارافين paraffin wax وبعض اللدائن plastic والجيلاتين.

٩ -القطع Sectioning

القطع عملية قص شرائح رقيقة وبسمك يتراوح بين ١- ٥٠ µ وذلك باستخدام أجهزة ميكانيكية أو يدوية تدعى المشارح microtomes ويعتمد نوع المشارح المستخدمة على طبيعة النماذج المراد فحصها وكذلك على نوع الوسط المطمورة فيه فمثلا النماذج المجمدة frozen material تقطع بالمشراح المجمد freezing microtome والنماذج المطمورة بالسيلويدن (النتروسليلوز) تقطع بالمشراح المنزلق sliding microtome أو المشراح الدوار rotary microtome والنماذج المطمورة بالشمع البارافيني بالمشراح الدوار اما المطمورة باللدائن فتقطع

بالمشراح الفوقي Ultra microtome او المشراح الدوار اما المشراح اليدوي فيستعمل القطع بعض النماذج المطمورة وغير المطمورة في وسط معين.

١٠ - الصبغ Staining

تحتاج النماذج أو المقاطع في معظم التحضيرات المجهرية إلى الصبغ لغرض تمييز اجزائها المختلفة، ويتم اختيار الصبغة بحيث تتلائم مع الجزء المطلوب دراسته فاذا اريد تمييز أو توضيح جزء معين من خلية أو نسيج فيجب اختيار صبغة خاصة له special stain اما اذا اريد دراسة النموذج بصورة عامة فهناك العديد من الصبغات يمكن استخدامها لهذا الغرض.

١١ - التحميل Mounting

يقصد بالتحميل وضع المقطع أو النموذج على شريحة زجاجية نظيفة واضافة مادة التحميل mountant ثم تغطيتها بغطاء الشريحة Cover slide ويعتمد اختيار مادة التحميل على معامل انكسارها وعلى نوع المواد التي استعملت في الخطوات السابقة وتكون معظم مواد التحميل من الصمغ gum أو الراتنج resin.

١٢ - التجفيف والتنظيف والتعليم Drying Cleaning and Labeling

أن عملية التجفيف هي آخر خطوات التحضير ويقصد بها تبخير المذيب من مادة التحميل لغرض تثبيت غطاء الشريحة بصورة محكمة ويتم ذلك بوضع الشريحة على صفيحة حارة hot plate أو تركها لتجف بدرجة حرارة المختبر. اما التنظيف فيقصد به ازالة مواد التحميل الزائدة حول غطاء الشريحة وكذلك تنظيف الشريحة ذلك باستخدام مواد كيمياوية أهمها الزايلين، أما التعليم فهو وضع ورقة لاصقة على الشريحة مدون عليها ما تحتويه بحيث تتماشى مع نظام معين في التعليم.

الشريحة المجهرية:

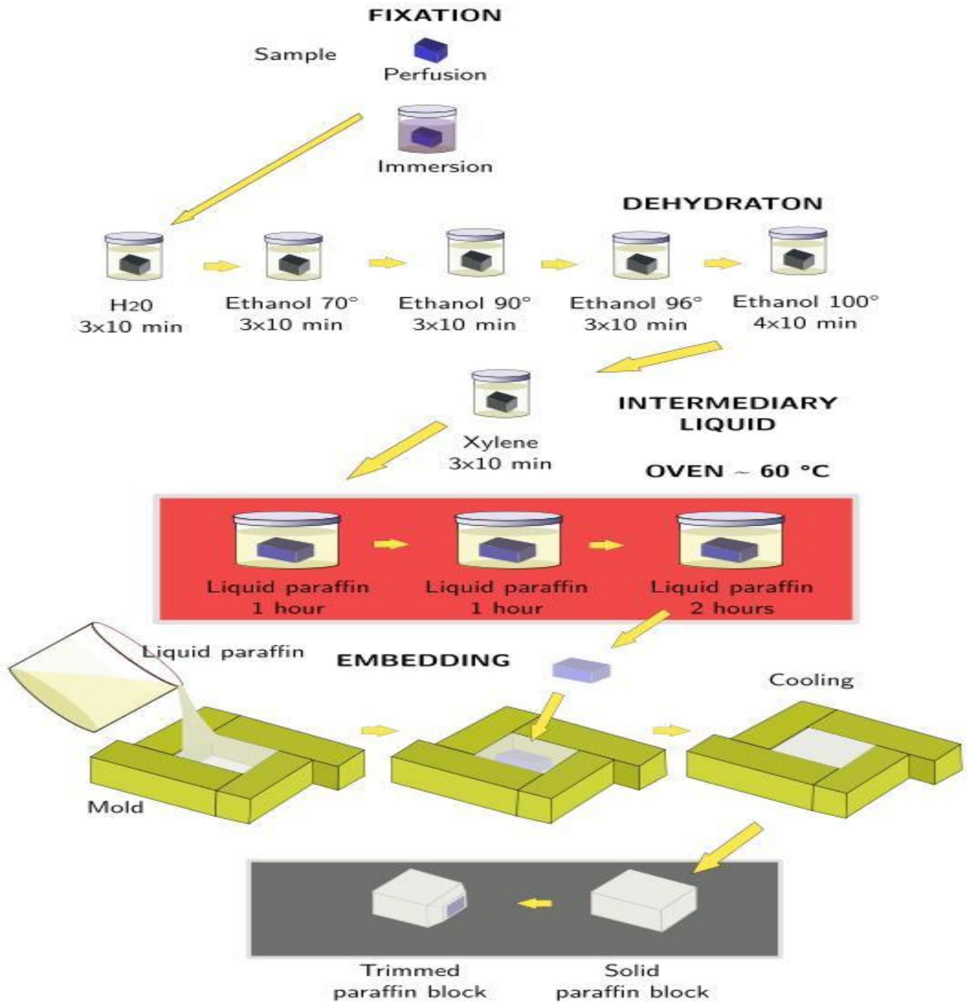
يجب أن تتوفر في الشريحة المجهرية شروط معينة لكي تستطيع الحكم عليها بالنجاح أو الفشل. وأهم هذه الشروط:

١. أن يحتفظ النسيج المعين بتركيبه الذي كان عليه اثناء الحياة ولحظة اقتطاعه قدر الامكان.

٢. اختيار طريقة عمل الشريحة المجهرية حسب الإمكانيات الموجودة وتفادي الطرق المعقدة او التي لا تتوفر لها المواد الكيمياوية اللازمة.

٣. اختيار الصبغة باتقان لكي تفي بغرض دراسة تراكيب النسيج المختلفة.

٤. العناية التامة باقتطاع النموذج النسيجي الذي سيعطي صورة الحالة المرضية او الطبيعية للشخص المريض.



المصادر Reference

١ -العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمودالعلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.

٢ -الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.

٣ -نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.

4- Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الثانية

التخدير القتل التثبيت والتصلد

Anesthetization, Killing, Fixing and Hardening

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الثانية

التخدير القتل التثبيت والتصلد

Anesthetization, Killing, Fixing and Hardening

التخدير Anesthetization

عند تحضير النماذج الكاملة whole mount أو المقاطع sections لبعض الحيوانات خاصة اللافقرية منها invertebrates التي تميل الى التقلص أو سحب مجساتها tentacles أو لواحقها الاخرى appendages أو أن تتكور ball up عند تثبيتها يجب تخديرها قبل عملية التثبيت للمحافظة على شكل الحيوان، كذلك تستخدم عملية التخدير عندما يراد تحضير عضو او جزء من عضو او نسيج لحيوان كبير تفاديا للتشوه الذي قد يحدث لها في حالة قتل الحيوان دون تخديره ومن الطرق والمواد المستخدمة لهذا الغرض نذكر منها ما يلي:

١. الكلوروفورم Chloroform

تستخدم هذه المادة لتخدير انواع مختلفة من الحيوانات وبطرق متنوعة فمثلا عندما يراد تخدير الحيوانات المائية aquatic animals توضع بضع قطرات على سطح الماء أو بضع قطرات في قناني خاصة عند تخدير الحشرات insects والعنكبوتيات Arachnids.

٢. الايثر والكحول Ether and alcohol

يستخدم كل منها بصورة خاصة لتخدير حيوانات المياه العذبة fresh water animals والديدان الأرضية earth worms وتتم عملية التخدير باضافة الكحول إلى الماء بصورة تدريجية بواسطة أنبوب يمكن السيطرة عليه إلى أن يصبح تركيز الكحول حوالى ١٠٪ كذلك يستخدم الايثر كالكلوروفورم في تخدير الحشرات.

٣. كلوريد المغنيسيوم أو كبريتات المغنيسيوم Magnesium chloride or magnesium sulfate

يستخدم كل منهما بصورة ناجحة لتخدير الكثير من الحيوانات مثل شقائق البحر Sea Anemones والمرجان Coral والديدان الحلقية Annelids والغلاليات Tunicates وبعض من الحيوانات الرخوية أو النواعم Mollusca.

وتتم العملية بوضع بلورات كبريتات المغنيسيوم في كيس وتعليقها بحيث تمس سطح الماء الحاوي على الحيوانات ثم يسحب الماء بصورة تدريجية الى ان يكتمل التخدير اي عندما لا يبدي الحيوان أي حركة عند لمسه أو وخزه بعدها يسحب الماء بحيث يبقى جزءا قليلا يغطي الحيوانات ثم يضاف المثبت وعند تصلد الحيوانات جزئيا تنقل إلى مثبت جديد fresh fixative، ويمكن أن تتم عملية التخدير ايضا بوضع الحيوانات في محلول لهذه المواد بتركيز ٣٣٪.

٤. الكوكايين Cocaine

يستخدم لتخدير الحيوانات الهدبية Ciliates و الدولابيات Rotifers والحيوانات الحزازية Bryozoa والهايدرا Hydra وبعض الديدان worms والنواعم أو الرخويات Mollusca ويتم التخدير باضافة ١٪ من المحلول الى القناني الحاوية على الحيوانات ثم تراقب حركتها وبعدها تثبت .

٥. المنثول Menthol

يستخدم للحيوانات صعبة التخدير كالحيوانات البحرية الثابتة sessile marine animals وحيوانات امعائية الجوف Coelentrates وبعض الحزازيات والهدريات Hydroids وكذلك الأسماك المفلطحة Flukes وذلك بنثر المنثول على سطح الماء ويمكن الحصول على افضل النتائج عند مزج 45 غم من المنثول مع 55 غم من مائيات الكلور chloral hydrate حيث يطحن ويمزج سوية مع قليل من الماء ويقطر على سطح الماء وتحتاج الحيوانات الكبيرة للتخدير حوالي ١٢ ساعة. كذلك يمكن استخدام مائيات الكلور لوحده في التخدير عند نثره على سطح الماء الحاوي على الحيوانات كالديدان الحلقية والكأسية والنواعم والحيوانات الحزازية وقسم من الديدان المسطحة ذات الأهداب Turbellaria.

٦. الكلوريتون Chloretone

يستعمل الكلوريتون لتخدير بعض الحيوانات وذلك بوضع الحيوانات في محلول ٠.٣٣٪ إلى ٢٪ وتعتمد مدة التخدير على نوع الحيوان وتركيز المحلول فمثلا عند تخدير الضفدعة frog لأجل دراسة الدورة الدموية في الصفاق web توضع في محلول ٢٪ ولمدة ٤ – ٨ دقائق بعدها تغلف بقطعة قماش مشبعة بالمحلول الى أن يبدو على الحيوان الارتخاء الكامل ثم يفحص الصفاق تحت المجهر.

٧. الخنق Asphyxiation

تستخدم هذه الطريقة مع بعض الحيوانات خاصة القواقع Snails وتتم بوضع الحيوان في قنينة ماء مغلي بعد تبريده ثم يحكم سد القنينة.

٨. التبريد Cooling

تتم عملية التخدير بالتبريد الجزئي لبعض الحيوانات كالأسماك fishes والديدان الشريطية Tapeworms وذلك بوضع الحيوانات في جليد مملح أو ماء مثلج أو داخل ردهات المجمدات إلى أن ترتخي الحيوانات بعدها تنقل إلى ماء فاتر ثم تثبت.

القتل Killing

يعرف القتل بأنه عملية إيقاف دائمي وسريع لجميع الفعاليات الحيوية للكائنات، ويظهر من التعريف بأن عملية القتل ليست مهمة جدا إلا أن الحقيقة تظهر عكس ذلك حيث أن لعملية القتل أهمية كبيرة جدا تعتمد عليها جميع الخطوات المقبلة، فمثلا عندما يراد دراسة الخلية النطفية spermatocyte لحشرة مستقيمة الأجنحة Orthoptera فعند قتل الحشرة بواسطة التخدير يظهر سايتوبلازم الخلية بشكله الشبكي الدقيق وتظهر الكروموسومات واضحة ومتباعدة اما اذا قتلت الحشرة بالسيانيد cyanide فان السايتوبلازم يظهر بشكل حبيبي والكروموسومات تكون متقاربة وغير واضحة المعالم اضافة لذلك تظهر الياف المغزل spindle fibers اقصر مما هي عليه.

التثبيت والتصلد Fixing And Hardening

تكون معظم المواد المستخدمة للقتل مثبتة في نفس الوقت ولكن يجب أن نعلم بأن عملية القتل والتثبيت هما عمليتين مختلفتين, التثبيت هو عملية الحفاظ على شكل وحجم الخلايا والأنسجة والأنظمة النسيجية وجميع العناصر النووية nuclear elements والسايتوبلازمية cytoplasmic كا لو كانت بشكلها الطبيعي نوعا ما قبل التثبيت، لذلك يجب الإسراع في تثبيتها أو حفظها لفترة قصيرة في جهاز تبريد قبل التثبيت تفاديا لحدوث التغيرات في تركيبها بعد الموت post – mortal changes و هذه التغيرات هي:

١. عند ترك النماذج في الهواء تجف وتتقلص بسبب فقدانها الماء بعملية التبخير.
٢. اذا تركت في محلول ذو تركيز معين فسوف تخضع لظاهرة الانتفاخ أو التقلص الأزموزي Osmotic swelling or shrinkage.
٣. تبدأ البكتريا بالتكاثر وبالتالي تحطم الخلايا والأنسجة وتعرف هذه العملية بالتعفن putrefaction.
٤. بعد موت الخلايا تبدأ بعض الأنزيمات والمعروفة باسم مجموعة الـ cathepsin بعملها العكسي فهي بدلا من قيامها ببناء جزيئات البروتين من الحوامض الأمينية تقوم بتكسير جزيئات البروتين وتحوله الى حوامضه الأمينية وتعرف هذه العملية باسم التحلل الذاتي autolysis.

فوائد التثبيت:

١. إبقاء محتويات النسيج على حالها من حيث موقعها وطبيعتها وحجمها، وذلك بتقوية بنية النسيج، مما يمكن من عمل تحضيرات دائمة منه.
٢. تقوية الأنسجة بتقسيتها، لتصمد أمام العمليات التالية كالقطع بأقل قدر من التشوه.
٣. تحسين قدرة أجزاء النسيج على تقبل الصبغ.
٤. جعل مركبات النسيج تقاوم الحرارة العالية، عند الطمر في الشمع وتخلله لها.

مواصفات المثبت الجيد:

١. سرعة النفاذ إلى داخل النسيج.
٢. قلة التأثير الكيماوي والفيزيائي على مكونات النسيج.
٣. عدم تغير تركيبه مع الزمن.
٤. سهولة التداول.
٥. اعتدال السعر.

طرائق التثبيت:

يتم التثبيت إما بوسائل طبيعية أو كيميائية.

التثبيت بالوسائل الطبيعية يندرج تحت هذا النوع استخدام وسائل الحرارة، والتجفيف عند درجة الحرارة العادية.

١. التثبيت بالحرارة.

ترتكز هذه الطريقة على كون البروتينات تتخثر بالحرارة، وعيبها الوحيد هو تكون اشكال مصطنعة artifacts داخل الأنسجة.

٢. التثبيت بالتجفيف عند درجة الحرارة العادية.

تفيد هذه الطريقة عند تحضير مسحات الدم، أو نخاع العظم، ولكن استعمالها محدود، ويحتاج الأمر عادة إلى مثبت آخر عند الصبغ.

٣. التثبيت بالنيتروجين السائل.

في هذه الطريقة يقطع النسيج قطعاً صغيرة، تجمد في النيتروجين السائل (-١٦٠°س)، ثم تجفف في جهاز خاص، وتطمر حالا في شمع البرافين. هذه الطريقة مفيدة في إظهار الإنزيمات والدهون في المقاطع، و بها يتجنب استعمال المواد الكيمياوية فتبقى مكونات النسيج على حالها ولكن يؤخذ عليها صغر حجم العينات وتكون بلورات الجليد فيها.

٤. التثبيت بالوسائل الكيميائية.

لعل أهم ميزة للمثبتات الكيماوية هي قدرتها على تثبيت الأنسجة بكفاءة عالية. ولكن لا يعتمد مثبت واحد لتثبيت الخلايا او مكونات النسيج، وهذا هو سبب وجود عدد كبير من الصيغ الكيماوية للمثبتات المستعملة في التحضيرات المجهرية. وكما سنبين لاحقا فإن معظم المثبتات تحضر من أكثر من مكون واحد، لينسنى الاستفادة من الخواص التي يتمتع بها كل مكون. والمثبتات الكيماوية إما أن تخثر البروتين Coagulant fixatives وهي التي تقوم بتحويل البروتين من الشكل الاسفنجي المتجانس homogenous spongy الى الشكل الشبكي بحيث تسمح للشمع بالتغلغل واكساب النسيج الصلابة الكافية لقطع المقاطع وهي تحافظ على هيكلية الخلايا بحيث يسهل اختراقها من وسط التشريب، غير أنها تحطم بعض العضيات، مثل الميتوكوندريا وكذلك تعطي هذه المثبتات بعض التراكيب غير الحقيقية (الخادعة) artifacts للمادة المثبتة، ومن هذه المثبتات حامض البكريك وكلوريد الزئبق والكحول الإيثيلي، والأسيتون، وإما أن لا تخثر البروتين Non coagulant fixatives وهي لاتخثر البروتين وتحول السيتوبلازم إلى مادة هلامية غير مترسبة وهي بذلك لا تعطي القوة الكافية للانسجة المثبتة لمقاومة الشمع اثناء طمرها فيه وتكون فيها العضيات محفوظة بشكل جيد، ولكن لا يخترقها وسط التشريب بسهولة وهي تعطي اقل ما يمكن من التراكيب الخادعة ، ومن هذه المثبتات، الفورملدهايد وحامض الخليك وثنائي كرومات البوتاسيوم، ورابع أكسيد الأوزميوم وعلى هذا الأساس، فإن المثبتات الجيدة تحتوي مكونات مخثرة واخرى غير مخثرة بحيث تجمع فوائد النوعين.

عند تثبيت المواد يجب اتباع والأخذ بنظر الاعتبار ما يلي:

١. يجب تثبيت المادة بعد جمعها وبأسرع وقت ممكن وذلك لمنع تغيرات بعد الموت، أو حفظها في الثلاجة لوقت قصير لحين تثبيتها.
٢. لأجل الحصول على أفضل النتائج يجب اختيار خليط من المحاليل المثبتة بحيث يكون واحدة أو أكثر مخثرة وواحد أو أكثر غير مخثرة وذلك لغرض أداء مهمتين في آن واحد.
٣. يجب اختيار المثبت الملائم لكل دراسة معينة وذلك لأن لكل مثبت له مساوءه ومحاسنه فمثلا الفورمالديهايد يثبت السايتوبلازم من جهة لكنه يمنع تغلغل الشمع من جهة اخرى

كذلك هو رديء التثبيت للكروماتين chromatin ويجعل وسط السايتوبلازم قاعدي. أما حامض البكريك picric acid فهو يجلط السايتوبلازم ويسمح للشمع بالتغلغل الا انه يجعل النسيج لينا يصعب قطعه بالمشراح الدوار rotary microtome وهو جيد لتثبيت الكروماتين ويجعل وسط السايتوبلازم حامضي.

٤. أن بعض المثبتات تعمل على زيادة تقبل سطوح المواد للصبغات (مرسخات) بينما البعض الآخر يعمل على عرقلة عملية الصبغ بصبغات معينة لذلك يجب اختيار مثبت خاص اذا اريد الصبغ بصبغة معينة، علما بأن هناك بعض المثبتات يمكن اعتبارها عامة وتستخدم مع أغلب الصبغات.

٥. يجب أن تكون قنينة التثبيت واسعة بحيث يمكن وضع النموذج المراد تثبيته فيها بسهولة كذلك يجب أن يكون حجم المادة المثبتة من ١ الى ٢٠ مرة بقدر حجم النموذج وذلك لمنع الالتفاف أو الانحناء من ناحية وعدم تخفيف المثبت من ناحية اخرى.

٦. يجب عدم ترك النموذج في المثبت اكثر من الوقت اللازم حيث أن مدة التثبيت تعتمد وتتناسب عكسيا مع شدة نفاذه داخل الأنسجة وعلى تركيزه ودرجة حرارته وطرديا مع سمك وصلابة النموذج.

٧. يجب تقطيع المادة المراد تثبيتها بين ٢-٦ ملم سمكا وذلك للسماح للمثبت بالتغلغل في الوقت المحدد أما إذا اريد تحضير عضو أو جزء كبير من عضو فيجب عمل شق incision للسماح للمثبت بالتغلغل.

المصادر Reference

١- العطار, عدنان عبد الامير وسهيلة محمودالعلاف وكواكب عبد القادر المختار, التحضيرات المجهرية, مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي, جامعة بغداد, ١٩٨٢.

٢- الحاج, حميد احمد, التحضيرات المجهرية الضوئية, دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة, عمان, ٢٠١٥.

٣- نوري, ماجدة عبد الرضا, علم تقنية الشرائح المجهرية, مطبعة التعليم العالي في الموصل, ١٩٨٩.

4- Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الثالثة

المثبتات

Fixatives

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الثالثة

المثبتات Fixatives

من أهم المحاليل المستعملة في مختبرات التحضير المجهري تلك المعنية بتثبيت الأنسجة. ومن هذه المحاليل: الفورمالين، ومثبتات حمض البكريك، والمثبتات المعدنية، والمثبتات الكحولية، ومثبتات أخرى من أبرزها رابع أوكسيد الأزميوم.

فيما يلي عرض لتركيب وتحضير أكثر محاليل التثبيت أستعمالاً في التحضيرات المجهرية الأساسية.

١. مثبتات الفورمالين Formalin Fixatives

هذه مثبتات عامة جيدة، وتتوفر بعدة صيغ منها:

أ- الفورمالين حسب صيغة بيكر (١٩٤٤) Baker.

فورمالين مركز Concentrated Formalin	١٠ مل
كلوريد الكالسيوم Calcium Chloride	١ غم
ماء مقطر Distilled Water	١٠٠ مل

يمكن حفظ النسيج بهذا المثبت لمدة غير محدودة. ويتم غسل المثبت بالماء.

ب- الفورمالين حسب صيغة بيكر (١٩٥٨) Baker.

فورمالين مركز Concentrated Formalin	١٠ مل
كلوريد الكالسيوم (محلول مائي بتركيز ١٠٪) Calcium Chloride	١٠ مل
ماء مقطر Distilled Water	٨٠ مل

ملاحظة:

١. إذا ترك الفورمالين على الرف لمدة طويلة فإنه يتبلمر ويكون راسبا أبيض يدعى برافورمالديهايد Paraformaldehyde، ويمكن إزالة هذا الراسب بالترشيح.

٢. عند تثبيت أنسجة غنية بالدم، مثل الكبد والطحال، بالفورمالين، تظهر بقع سوداء أو بنية في هذه الأنسجة ويمكن إزالة هذه البقع بوضع الأنسجة المثبتة بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم ١٪ محضر بكحول إيثيلي تركيزه ٨٠٪ لمدة ٣٠ دقيقة.

٢. مثبتات حمض البكريك Picric Acid Fixatives.

يستعمل حمض البكريك في عدة محاليل تثبيت، وهو معروف بتفاعله مع الهستونات والبروتينات القاعدية ليكون أملاح البكريت Picrates البلورية نتيجة تفاعله مع الأحماض الأمينية. وعند استعمال هذه المثبتات، تأخذ الأنسجة لونا أصفر يجب التخلص منه. وبشكل عام، فإن هذه المثبتات مفيدة في تثبيت مواقع الجلايكوجين في الأنسجة، ومن أكثرها استعمالا: مثبت بوان Bouin's Fixative الذي يحضر كالتالي:

محلول حمض بكريك مائي مشبع aqueous picric acid saturated ٧٥ مل

فورمالين مركز Concentrated Formalin ٢٥ مل

حمض خليك ثلجي Glacial Acetic Aacid ٥ مل

مثبت عام جيد، وخاصة للجلايكوجين وللنواة، مدة التثبيت هي من ٦ إلى ٢٤ ساعة، ويمكن حفظ النسيج بهذا المثبت لعدة أسابيع دون ضمور. تجدر الإشارة إلى أن غرام واحد من حمض البكريك يشبع ٧٥ مل من الماء. يغسل المثبت بعد انتهاء مدة التثبيت بمحلول كحول إيثيلي تركيزه ٥٠٪، عدة مرات حتى يزول اللون الأصفر إلى حد كبير. ويمكن تسهيل إزالة هذا اللون من المقاطع وذلك بوضع الشرائح الحاملة للمقاطع بمحلول كحول إيثيلي تركيزه ٧٠٪ مضافا اليه بضع قطرات من محلول كاربونات الليثيوم المشبع.

٣. المثبتات المعدنية Metallic Fixatives

تحتوي هذه المثبتات كلوريد الزئبق mercuric chloride الذي يخترق الأنسجة ببطء، ويسبب انكماشها. وبشكل عام، فان الأنسجة المثبتة بهذه المحاليل تحتوي ترسبات سوداء من الزئبق، يمكن ازالتها من المقاطع بتمريرها بمحلول يود كحولي، ومن فوائد استعمال هذه المثبتات قوة صبغها لنوى الخلايا، ومن اكثرها شيوعا: مثبت زنكر zenker's Fixative الذي يحضر كالتالي:

ثنائي كرومات البوتاسيوم	Potassium Dichromate	٢.٥ غم
كلوريد الزئبق	Mercuric Chloride	٤ غم
ماء مقطر	Distilled Water	٩٥ مل
حمض خليك ثلجي	Glacial Acetic Acid	٥ مل

تتراوح مدة التثبيت بين ٤ و ١٨ ساعة، ويغسل النسيج تحت ماء جار لمدة تتراوح بين ٨ و١٢ ساعة.

ملاحظة:

١. يسبب كلوريد الزئبق الموجود في هذا المثبت راسبا يتخذ شكل إبر، ويمكن إزالة هذا الراسب بوضع المقاطع بمحلول يود مشبع في كحول إيثيلي تركيزه ٧٠٪.

٢. يحضر المثبت قبل الاستعمال بفترة وجيزة نظرا لعدم ثباته، وللتسهيل يمكن مزج المكونات الثلاثة الأولى وخزن المثبت في هذه الصورة الثابتة على الا يضاف حمض الخليك إلا قبل الاستعمال مباشرة.

٤. المثبتات الكحولية Alcoholic Fixatives

لا يستعمل الكحول المطلق كمثبت على الرغم من كونه مثبت جيد لتثبيت الجلايكوجين. ونظرا لأن الكحول يسبب انكماش الأنسجة فإن مادة أخرى مثل حمض الخليك الثلجي تضاف له حتى تقلل من ذلك الانكماش.

للمثبتات الكحولية سرعة نفاذية جيدة، ولذلك فهي تستعمل لتسريع معالجة الأنسجة في التحضيرات المجهرية الروتينية. وإذا ما أريد دراسة الأحماض النووية في المقاطع الشمعية فإن المثبت الكحولي المفضل هو مثبت كارنوي كذلك فإن المثبت جيد لحفظ الخلايا العصبية وخاصة حبيبات نسل Nissl bodies. ويمثل مثبت كارنوي Carnoy's Fixative أبرز المثبتات الكحولية ويحضر كالتالي:

حمض خليك ثلجي	Glacial Acetic Acid	١٠ مل
كحول إيثيلى مطلق	Absolute Ethyl Alcohol	٦٠ مل
كلورفورم	Chloroforme	٣٠ مل

من فوائد استعمال مثبت كارنوي سرعة اختراقه للأنسجة، وعدم الحاجة لعمليتي الغسيل وإزالة الماء، ولذلك فهو يستعمل عند معالجة عينات الخزعة biopsy، حيث تثبت الأنسجة بمحلول كارنوي لمدة ساعة ثم تنقل إلى كحول مطلق مباشرة، ثم تنقل إلى مزيج من الكحول والكلوروفورم بنسبة ١ : ١ ثم تروق وتستكمل بقية الخطوات من تشريب وطمر وقطع وصبغ.

ومن المثبتات الاخرى شائعة الاستعمال

محلول الفورمالين وحامض الخليك والكحول الإثيلي Formalin – Acetic acid – Alcohol (F. A. A).

يعتبر هذا المثبت من اكثر المحاليل استعمالا خصوصا للنماذج النباتية مثلها عندما يراد دراستها مظهريا وتشريحيًا كذلك لحفظ النماذج لفترات طويلة شرط أن يبدل المحلول كل ثلاثة أو ستة أشهر ولا يفضل استعماله لتثبيت الكروموسومات ان مدة التثبيت هي ١٨ ساعة ويحضر بمزج :

٩٠ سم^{3} من الكحول الإثيلي تركيز ٥٠ % أو ٧٠ %

٥ سم^{3} حامض الخليك

٥ سم^{3} فورمالين .

يستعمل كحول تركيز ٥٠ % للنباتات العطرية والرقيقة بينما يستعمل كحول ٧٠ % للنباتات الصلبة . بعد التثبيت يجب غسل النموذج المثبت ثلاث مرات بكحول تركيز ٥٠ % أو ٧٠ %

محلول ألن Allen's fluid

يستخدم هذا المثبت لمعظم الأنسجة النباتية خاصة البراعم الزهرية ويحضر بمزج

٧٥ سم^{3} محلول مائي مشبع لحامض البكريك

٢٥سم^{3} من الفورمالين

٥ سم^{3} من حامض الخليك الثلجي

١.٥ سم^{3} من حامض الكروميك

٢ غم من اليوريا

أن المدة اللازمة للتثبيت تتراوح بين ٤ – ١٦ ساعة بعدها تغمر النماذج في كحول ٧٠ % ويبدل الكحول من وقت لآخر إلى أن يزول اللون الأصفر لحامض البكريك ويتميز هذا المثبت بسرعة تلفه ، لذا ينصح بتحضيره فقط وقت استخدامه

محلول جامبي Champy's Fluid

يستعمل هذا المثبت لجميع تحضيرات الانسجة النباتية والحيوانية كذلك لتثبيت المايتوكوندريا و للدراسات الخلوية ويحضر بمزج :

٣٥سم^{٣} من ثاني كرومات البوتاسيوم تركيز ٣ %

٣٥سم^{٣} من حامض الكروميك تركيز ١ %

٢٠سم^{٣} من حامض الأوزميك تركيز ٢ %

أن المدة اللازمة للتثبيت تتراوح بين ٦ – ٢٤ ساعة بعدها تغسل النماذج بالماء الجاري ولنفس فترة التثبيت .

محلول كلينبرج Kleinenbery's fluid

يستخدم هذا المثبت لتحضيرات الأجنة الحيوانية والأحياء البحرية والحيوانات المفصلية والكايتينية ويحضر بمزج :

١٠٠سم^{٣} من حامض الكبريتيك تركيز ١ %

٤٩ سم^{٣} من محلول مائي مشبع لحامض البكريك .

ان الوقت اللازم للتثبيت يتناسب طرديا مع حجم وصلابة النموذج ويمتاز هذا المحلول بسرعة نفاذيته . بعد التثبيت ينقل إلى كحول دافيء تركيز ٧٠ % ثم إلى سلسلة تصاعدية من الكحول

محلول فليمنك Flemming's fluid .

يستخدم هذا المثبت للأنسجة النباتية والحيوانية خاصة الصغيرة جدا والتي لا يتجاوز سمكها بضع صفوف من الخلايا ولا ينصح استعماله للنماذج الكبيرة وذلك لبطء نفاذية هذا المحلول داخل الأنسجة كذلك يستخدم للدراسات الخلوية ولتحضيرات الشحوم ويمكن تحضيره بمزج كل من محلول (أ) مع محلول (ب) قبل ا الاستعمال مباشرة .

محلول (أ) يتكون من :

٣٠ سم^{3} من حامض الكروميك تركيز ١ %

٢ سم^{3} من حامض الخليك الثلجي

محلول (ب) يتكون من

٨ سم^{3} من حامض الأوزميك تركيز ٢ %

أن مدة التثبيت تتراوح بين ١– ٢٤ ساعة وتعتمد على نوع النموذج المراد تثبيته فمثلا لتثبيت المايتوكوندريا تحتاج ساعة واحدة . بعد التثبيت يغسل النموذج بماء جار لمدة ٢٤ ساعة.

أساليب التثبيت

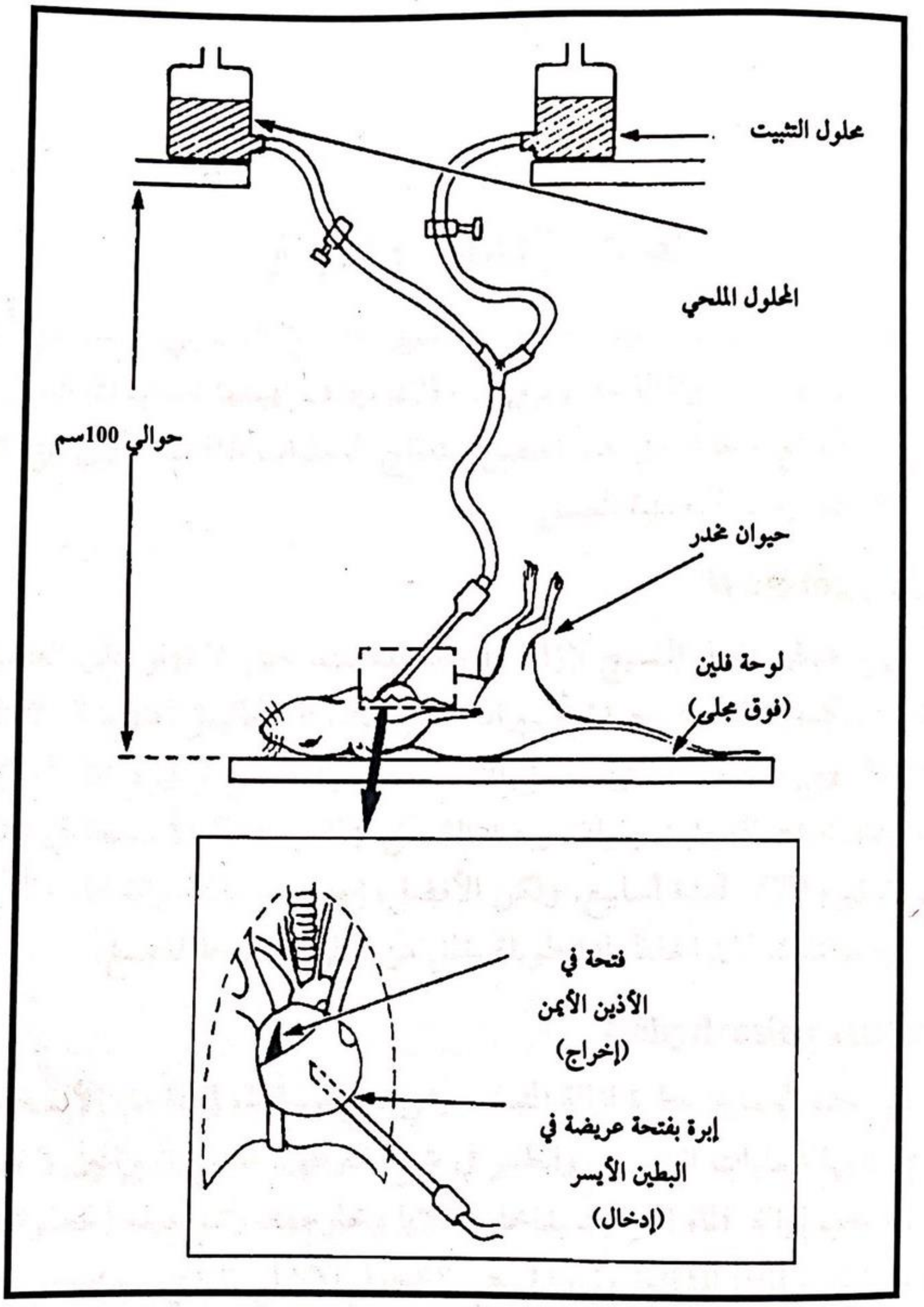
يمكن إجراء التثبيت بالوسائل الكيماوية بأساليب مختلفة، منها التثبيت بالأبخرة حيث يخضع التحضير المجهري لأبخرة المثبت، وفي هذه الطريقة تحمل العينة على شريحة وبعد تجفيفها، يعرض وجه الشريحة الحامل للعينة إلى بخار المثبت، وذلك بوضع ذلك الوجه فوق عبوة مناسبة تحتوي المثبت. وتساعد هذه الطريقة في دراسة الخلايا المعزولة ومن أهم الأبخرة غاز رابع أكسيد الأوزميوم والفورملدهايد.

أما التثبيت بالسوائل، فيتضمن استعمال المثبتات في حالتها السائلة بالأساليب التالية:

١. الغمر Immersion هذه طريقة شائعة جداً، وفيها توضع الأنسجة في المثبت، بحيث يكون حجم المثبت أكبر من حجم النسيج بمقدار ٥–١٠ مرات. ويجب أن يحيط المثبت بالنسيج من جميع النواحي، ولذلك ينصح بوضع قطعة قطن في أسفل إناء الغمر قبل المثبت، ثم تضاف الأنسجة. وفي حالة الأنسجة التي تغطيها طبقة مخاطية أو دم متخثر يظل تثبيتها ناقصاً، إذا لم تحرر مما يغطيها قبل غمرها في المثبت. أما إذا كان في النسيج فجوات هوائية أو غازات كما في الرئة فيوضع إناء الغمر والمثبت في جهاز تفريغ الهواء لإزالة الغازات من النسيج.

٢. الحقن Injection في هذه الطريقة، يحقن المثبت في جوف الحيوان المراد تثبيته كله، والذي يكون عادة صغيراً. ويتبع الحقن غمر الحيوان في مثبت معين وتستعمل هذه الطريقة في حفظ عينات المتاحف الحيوانية وفي مختبرات تشريح الحيوان بمثبتات مثل الكحول أو الفورمالين.

٣. الإرواء Perfusion في هذه الطريقة، تثبت الأنسجة بضخ المثبت بالدورة الدموية. وهي مفيدة في حفظ الأعضاء التي تحتاج إلى سرعة في التثبيت، ولكن يصعب الوصول إليها بسرعة. كما تفيد في تثبيت الأعضاء الكبيرة، التي لا يسمح حجمها بغمرها. ومن النماذج على ذلك الجهاز العصبي المركزي، والأذن الداخلية للثدييات. في هذه الطريقة يخدر الحيوان المخبري (مثل الجرذ) ويدخل المحلول الملحي حوالي ٥٠-١٠٠ مل إلى البطين الأيسر عبر قني إرواء Perfusion Canula، بحيث يخرج السائل من شق في الأذين الأيمن، وذلك حتى يصبح السائل الخارج رائقاً. بعد ذلك يدخل المثبت بنفس الطريقة ويتم الإرواء حتى يصبح الحيوان المخبري قاسياً. وأخيرة يستخرج العضو المعني ويعالج بالطريقة التقليدية. يستخدم في هذه الطريقة حوالي ١٠٠ مل من المثبت، وتستغرق العملية حوالي ١٥ دقيقة.



شكل 1: تثبيت حيوان مخدر بالإرواء من البطين الأيسر إلى الأذين الأيمن بمر المحلول الملحي أولاً حتى يصبح المحلول الخارج رائقاً، وبعد ذلك يُروى جسم الحيوان بالمثبت حتى يصبح الحيوان قاسياً. ويستعمل عادة 100 مل من المحلول الملحي لجرذ وزنه 200–300 غم، وتستغرق هذه الطريقة حوالي 15 دقيقة.

المصادر Reference

١- العطار, عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار, التحضيرات المجهرية, مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي, جامعة بغداد, ١٩٨٢.

٢- الحاج, حميد احمد, التحضيرات المجهرية الضوئية, دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة, عمان, ٢٠١٥.

٣- نوري, ماجدة عبد الرضا, علم تقنية الشرائح المجهرية, مطبعة التعليم العالي في الموصل, ١٩٨٩.

4- Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الرابعة

إزالة الكالسيوم، الغسل، الحفظ والانكاز

Decalcification, Washing, Preservation and Dehydration.

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الرابعة

إزالة الكالسيوم، الغسل، الحفظ والانكاز

Decalcification, Washing, Preservation and Dehydration.

إزالة الكالسيوم Decalcification

تصبح بعض النماذج صلبة جدا بعد عملية التثبيت مما يصعب عمل مقاطع لها وسبب ذلك يرجع إلى وجود املاح الكالسيوم بشكل رواسب او صفائح. آن ازالة الكالسيوم باستخدام الحوامض ليس سهلا ، وذلك لأن الحوامض تحلل البروتين لذا يجب اضافة مواد أخرى المحلول الحامض لمنع تحلل البروتين . ومن بين المحاليل شائعة الاستعمال لهذا الغرض هي :

محلول هوك Haug's solution ويحضر بمزج :

٧٠ سم^3 كحول تركيز ٩٥ %

٣٠ سم^3 ماء مقطر

١ غم فلوروكلوسينول

٥ سم^3 حامض النتريك

تغسل النماذج في ماء دافيء جاري ثم تعلق في المحلول الى أن تبدو عليها الطراوة عند وخزها أن طريقة الوخز قد تتلف النماذج في بعض الأحيان لذا يفضل استخدام الفحص التالي للتأكد من إزالة جميع أملاح الكالسيوم ، يضاف ١ سم^3 من محلول اوكزالات الصوديوم أو الأمونيا تركيز ٥ % إلى ٥ سم^3 من المحلول الحاوي على النماذج، يترك مدة ٥ دقائق ثم يراقب المحلول ففي حالة تكون رواسب تعني ان عملية الازالة غير مكتملة بعد اما اذا بقى المحلول رائقاً فأن ذلك يعني اكتمال عملية ازالة الكلس.

بالاضافة الى الطريقة اعلاه المستخدمة في ازالة املاح الكالسيوم هناك طرق عديدة أخرى يمكن استخدامها لازالة هذه الأملاح ومن بين هذه الطرق نذكر ما يلي :

١. طريقة التحلل الكهربائي Electrolysis method

ان الأساس في هذه الطريقة هو ميل ايون الكالسيوم إلى القطب السالب فعند تعليق العظام بواسطة سلك من البلاتين platinum في القطب الموجب و امرار تيار كهربائي فان ايون الكالسيوم يتحرر من العظام نحو القطب السالب.

٢. اضافة محاليل ازالة الكلس الى المثبتات.

يستخدم لهذا الغرض العديد من المحاليل تمزج مع المثبتات نذكر منها محلول للي Lillie's solution والذي يتكون من :

٨٥ سم^{٣} من حامض البكريك المائي تركيز ١-٢ %

١٠سم^{٣} فورمالين

٥ سم^{٣} حامض الفورميك المائي تركيز ٩٠ - ٩٥ % تترك النماذج في المحلول مدة ٢,١ يوم.

٣. اضافة محاليل ازالة الكلس إلى محاليل الانكاز .

يضاف محلول جنكن Jenkin's solution إلى محاليل الانكاز حيث يتألف من :

٧٣ سم^{٣} من الكحول المطلق

١٠ سم^{٣} ماء مقطر

١٠ سم^{٣} كلوروفورم

٣ سم^{٣} حامض الخليك الثلجي

٤ سم^{٣} حامض الهيدروكلوريك المركز

إزالة السليكا Desilicidation

يجب ازالة الجزء الصلد من الأنسجة المحتوية على السليكا قبل أن تقطع تلك الأنسجة ويستعمل لهذا الغرض حامض الهيدروفلوريك hydrofluoric acid . يمتاز هذا المحلول في مهاجمته للأغشية المخاطية لذلك فان استعماله يكون مصحوبا بالخطورة للمشتغل به . يضاف المحلول قطرة فقطرة إلى النسيج الذي يوضع مسبقا في وعاء مغلف بشمع البارافين لأن الحامض يهاجم الزجاج .

الغسل Washing

بعد الانتهاء من عملية التثبيت يجب غسل المادة جيدا لازالة بقايا المثبت وذلك لسببين اولها للحد من الافراط في تثبيت المادة overfixing والثاني لمنع تداخل بقايا المثبت غير المتحدة مع المواد الأخرى المستخدمة في الخطوات اللاحقة للتحضير وخاصة في عملية الصبغ. أن السوائل الواجب استخدامها للغسل تعتمد كليا على مكونات المثبت نفسه فعند استخدام المثبتات المائية aqueous fixatives يجب غسل النموذج المثبت بماء الحنفية الجاري وتتناسب مدة الغسل طرديا مع قوة المثبت وفترة التثبيت كذلك على حجم النموذج وعدد القطع المثبتة اضافة لذلك تحتاج عملية الغسل بالماء وقتا أطول إذا كان أحد مكونات المثبت مادة غير ذائبة Insoluble.

اما اذا استخدمت مثبتات غير مائية non – aqueous fixatives فيجب الغسل بالكحولات وبنفس تراكيزها في المثبت فمثلا عند استعمال مثبت (فورمالين – حامض الخليك – كحول اثيلي F , A. A.) يجب غسل المادة بالكحول كذلك عند التثبيت بمحلول بوين يجب غسل المادة بكحول تركيز ٥٠ % وذلك لأن غسله بالماء الجاري سوف يزيل قسما من البكريك الذائب . ومما تجدر الاشارة اليه انه عندما يراد قطع مقاطع باستخدام المشراح المجمد يجب تجنب الغسل بالكحولات وذلك لأن الكحولات تمنع عملية الانجماد . اضافة لما ذكر اعلاه هناك بعض المثبتات تحتاج إلى معاملات اضافية بعد الغسل فمثلا عند استعمال مثبت يدخل في تركيبه كلوريد الزئبقيك فان هذا المثبت سوف يترك بلورات ابرية داخل النموذج المثبت ربما تكون من كلوريد الزئبقوز مما يؤثر على عملية القطع sectioning لذا يتوجب ازالة البلورات من النموذج بواسطة اضافة كميات كافية من اليود الى سلسلة تراكيز الكحولات المستخدمة في عملية

الانكاز بحيث يكون لون هذه التراكيز الكحولية بني غامق بعدها يجب غسل المادة عدة مرات بكحول ٧٠% او ٨٠% الى ان يزول لون اليود.

الحفظ Preservation

عند تحضيرنا للنماذج أو المقاطع نحتاج في بعض الأحيان التوقف عند مرحلة معينة ولفترات طويلة أو قصيرة لسبب أو لآخر كأن يكون الوقت غير كافي للاستمرار بعملية التحضير وهذا يتطلب منا اختيار محلول مناسب بحيث يحافظ على النماذج أو المقاطع بشكلها الطبيعي دون أن يطرأ عليها أي تغيير ويعرف مثل هذا المحلول بالحافظ . ان لهذا الحافظ خاصية منع الجفاف والتقلص أو الانتفاخ كذلك يقوم بقتل البكتريا والفطريات ويوقف نشاط انزيمات التحلل الذاتي . وهناك العديد من محاليل الحفظ والقسم الأكبر منها مثبتات وبصورة عامة يمكن تقسيمها إلى ثلاثة أقسام هي :

١. الحفظ بالكحولات Preservation in alcohols

من المحاليل الشائعة للحفظ هي الكحولات حيث توضع النماذج في أنابيب أو قناني زجاجية صغيرة vials بعد تعليمها واحكام سد فوهتها وختمها بالشمع الذائب بعد ملئها بكحول ٧٠ % أو ٨٠ % ويجب تجنب سد فوهة الأنابيب الزجاجية باغطية فلينية وذلك لأن الكحولات تحلل المادة الدباغية tannin الداخلة في تركيب جدران الفلين وبالتالي تؤثر على محلول الحفظ وعلى المادة المحفوظة . وتستخدم هذه الأنابيب عادة لحفظ النماذج صغيرة الحجم وعند وجود عدد كبير من النماذج الصغيرة تقسم على عدة أنابيب وتوضع داخل قناني زجاجية واسعة بحيث يمكن سد فوهتها بسهولة.

٢. الحفظ بالمثبتات Preservation in fixatives

يوجد العديد من المثبتات التي تستخدم لغرض حفظ النماذج لفترات متفاوتة ومن المثبتات الشائعة :

أ. خليط فورمالين–حامض الخليك–كحول اثيلي (Formalin–acetic acid–alcohol F.A.A).

ب. محلول الكحول المفرمل Formal – alcohol

ت. الفورمالين المتعادل Neutral Formalin

ث. محلول بوين Bouin's fluid

ج. محلول گلسن Gilson's fluid

٣. الحفظ بشمع البارافين Preservation in Paraffin wax

في حالة اتباع طريقة شمع البارافين في تحضير المقاطع وعند توفر الوقت الكافي لإيصال المقاطع الى مرحلة الطمر embedding فتكون مادة الطمر هذه من أفضل المواد الحافظة لفترة طويلة شرط خزنها في درجات حرارة واطئة.

الانكاز Dehydration

عند تثبيت النماذج بالمثبتات المائية aqueous fixatives أو غير المائية – non aqueous fixatives تكون النماذج حاوية على كمية كبيرة من الماء في الحالة الأولى وقليلة في الحالة الثانية، وبالنظر لتأثير الماء السلبي في كلا الحالتين على العمليات التي تلي التثبيت لذا يتطلب ازالة جميع اثاره من النماذج واستبداله أو احلاله بمحاليل أخرى ويطلق على هذه العملية بالانكاز (سحب الماء) dehydration وذلك للأسباب التالية :

١. كثير من الصبغات التي تستخدم لتمييز اجزاء النموذج المحضر لا تذوب في الماء ولكنها تذوب في الكحولات .
٢. عدم امتزاج الماء مع شمع البارافين المستعمل في تشريب وطمر النموذج
٣. عدم امتزاج الماء مع اوساط التحميل الراتنجية resinous media.

ويعتبر الكحول من محاليل الانكاز شائعة الاستعمال وعند استخدام الكحول الإثيلي في عملية الاحلال محل الماء يجب أن تجري العملية بصورة تدريجية وذلك لأن سرعة انتشار الكحول داخل النموذج تكون شديدة قد تؤثر أو تتلف انسجته لذا يفضل اتباع احدى هاتين الطريقتين :

١. امرار النموذج على تراكيز تصاعدية من الكحول alcoholic series هي ٣٠ و ٥٠ و ٧٠ و ٨٠ و ٩٥ % ثم الى كحول مطلق ١٠٠ % ويفضل أن يبدل الأخير مرتين. تعتمد الفترة الزمنية اللازمة للانكاز على حجم وطبيعة ومحتوى النموذج المراد انكازه.

٢. زيادة تركيز الكحول وذلك باضافة كميات قليلة من الكحول تركيز ٩٥% وبصورة تدريجية إلى الماء الحاوي على النموذج ويفضل رج المحلول اثناء عملية الاضافة كذلك يستحسن سكب جزء من المحلول الحاوي على النموذج واضافة كحول ٩٥ % محله لغرض زيادة التركيز الى ان يصل تركيز الكحول الى ٩٥ % ثم الى كحول مطلق لاتمام عملية الانكاز. يترك النموذج في الكحول المطلق فترة معينة تعتمد على حجم وطبيعة النموذج نفسه مع مراعاة ان بقاءه في الكحول المطلق لفترة طويلة قد يسبب تصلده أو انكماشه.

ومن المحاليل الأخرى الشائعة والمستخدمة للانكاز الاسيتون والكحول المثيلي وثالث مثيلات الفوسفور.

ملاحظات هامة

١. يوضع النسيج في كل محلول لفترة تتراوح بين ساعة وساعتين ، وللتأكد من إزالة الماء من النسيج يستعمل تغييرين من الكحول المطلق.
٢. يجب عدم ترك النسيج في كحول ٩٥ % أو كحول مطلق لأكثر من ساعتين في كل تركيز ، لأن ذلك يؤدي إلى تقسيته.
٣. إذا اقتضت الظروف وقف عملية إزالة الماء ، فإن تركيز الكحول المفضل التخزين الأنسجة فيه هو ٧٠ ٪.

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.
٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.
٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.

Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية
microscopic technique
المحاضرة الخامسة
الترويق والتشريب
Clearing and Infiltration

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

كلية العلوم قسم علوم الحياة   مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الخامسة

الترويق والتشريب Clearing and Infiltration

الترويق Clearing

يقصد بالترويق عملية ازالة محلول الانكاز من أنسجة النموذج الذي تم انكازه واستبداله بمحاليل تمتزج مع شمع البارافين والأوساط الراتنجية وذلك للأسباب التالية :

١ - عدم امتزاج الكحول مع شمع البارافين والأوساط الراتنجية.
٢ - معظم محاليل الانكاز تكون ذات معامل انكسار واطيء فتكون النماذج أو المقاطع المشربة بها غير شفافة وغير واضحة لذا يتوجب احلالها بمحاليل الترويق clearing solutions والتي تمتاز بما يلي :

١ - قابليتها للامتزاج مع محاليل الانكاز من جهة ومع الأوساط الراتنجية وشمع البارافين من جهة اخرى.
٢ - اغلب محاليل الترويق تكون ذات معامل انكسار عالي فتظهر النماذج المشربة بها أكثر شفافية ووضوحا لدى فحصها مجهريا.

وسائط الترويق Clearing Agents

تتوفر عدة وسائط لترويق الأنسجة بعد إزالة الماء منها، وفي جميع الحالات يراعى عند اختيار الوسط المناسب ما يلي :

أ. سهولة امتزاجه بوسط إزالة الماء.
ب. عدم تطايره بسرعة.
ت. سرعة الترويق دون التأثير على النسيج.
ث. اعتدال سعره.
ج. سلامة تداوله.

ومن وسائط الترويق شائعة الاستعمال ما يلي :

١. زايلين (الزايلول) Xylene (Xylol)

هذا الوسط شائع الاستعمال في مختبرات التحضير المجهري، وعلى الرغم من أنه يسبب انكماش النسيج ويجعله هشاً إذا ما ترك فيه لمدة طويلة ، إلا أنه يظل من افضل وسائط الترويق، ذلك أن إضفاءه الشفافية على النسيج يعطي فكرة جيدة عن إتمام عملية الترويق. بالإضافة إلى ذلك فإن الزايلين لا يتطاير بسرعة ويمكن إخراجه من الانسجة اثناء التشريب بسرعة معقولة وللتغلب على احتمال عدم إزالة الماء من النسيج بشكل مطلق فإنه يفضل إضافة كمية من الفينول إلى الزايلين حتى لا تؤثر بقايا الماء على الخطوات التالية ويقترح أن يكون الفينول بالنسبة التالية:

زايلين Xylene ٧٠ مل

فينول Phenol ٣٠ مل

ومن الجدير ذكره ان الزايلين لا يصلح لترويق أنسجة المخ و الأنسجة الليمفاوية لأنه يجعلها هشة.

٢. كلوروفورم Chloroform

يعتبر من أفضل وسائط الترويق للاستعمالات العامة، نظرا لأنه لا يقسي الأنسجة كثيراً، ولذلك فانه يفضل في ترويق الأجنة والأنسجة العصبية والعظمية. غير أن الكلوروفورم بطيء في ترويق الأنسجة مقارنة بالزايلين.

٣. زيت خشب الأرز Cedar wood Oil

نظراً لأن هذا المروق يسبب أقل قدر من إنكماش وتقسية الأنسجة، مقارنة بغيره من وسائط الترويق، فإنه يعتبر الوسط المميز لترويق الأنسجة الحيوانية وخاصة الأجنة. غير أن ارتفاع سعره ، وضعف امتزاجه مع بلسم كندا يحدان من استعماله كوسط روتيني.

٤. زيت القرنفل Clove Oil

يعتبر مروقاً مثالياً للأنسجة النباتية، ومن أبرز ميزاته قدرته على إزالة الماء بحيث يمكن نقل الأنسجة إليه من الكحول ٩٥ ٪، وكذلك قدرته على ترويق المقاطع السميكة. أما أبرز مساوئ استعماله فإنها تتمثل في جعل الأنسجة هشة نوعا ما، وإزالته لصبغات مثل السفرانين والهيماتوكسلين من الأنسجة، وكذلك عدم امتزاجه ببلسم كندا الأمر الذي يستدعي وضع الأنسجة في الزايلين قبل نقلها الى وسط التغطية المذكور.

تجرى عملية الترويق بإضافة المحلول المروق إلى الكحول المطلق بصورة تدريجية وتركه فترة زمنية تعتمد على نوع المروق وعلى سمك وكثافة النموذج إلى أن يتم تشربه بالمحلول وإحلاله محل المنكز dehydrant او بإمرار النموذج في مزيج من المحلول المنكز والمروق بنسبة ٣-١ اثم ١- ١ ثم في ١-٣ وأخيرا على محلول مروق نقي ويترك ١-٣ ساعة في كل مزيج. ومما تجدر الإشارة إليه أن في بعض التحضيرات قد يستغني عن عملية الانكاز والترويق وذلك عندما يراد فحص النماذج بصورة مباشرة سواء كانت بشكلها الكامل in toto أو بشكل مقاطع sections وهي مغمورة في وسطها المائي أو عندما تنقل الى اوساط التحميل mounting media التي تمتاز بقابلية امتزاجها مع الماء مثل صمغ الكلورال gum chloral وجيلاتين الكليسرين glycerine jelly والشمع المائي water wax.

ملاحظات هامة:

١. يفضل إجراء عملية الترويق بوضع الحجم المناسب من وسط الترويق بأنبوب صغير، ثم تضاف اليه العينة بواسطة فرشاة أو ملقط .

٢. يتفاوت وقت الترويق من نسيج لأخر، ويصعب تحديد فترة مناسبة له. ويمكن القول أن ترويق أنسجة عامة بالزايلين، مثلا يتطلب تغيير وسط الترويق مرتين، بحيث تتراوح فترة كل مرة بين ساعة وساعتين. غير أن الفترة الاجمالية تختلف من نسيج لآخر. أما بالنسبة للمقاطع، فإنها تروق مرتين ايضاً، تتروح فترة كل منهما بين ثلاث وست دقائق.

التشريب Infiltration

التشريب هو عملية إحلال مواد التشريب محل محاليل الترويق أو محل محاليل الانكاز والترويق وذلك لغرض إكساب النماذج المحضرة الصلابة اللازمة لمقاومة أوساط الطمر وكذلك لتسهيل عملية القطع، وتعتمد مادة التشريب المختارة اعتمادا كبيرا على طبيعة المادة المحضرة وعلى سمك ومساحة المقاطع المطلوبة كذلك على نوع أداة القطع المراد استخدامها. فمثلا لدى قطع مقاطع ذات مساحات سطحية صغيرة وسمك معتدل يتراوح بين ٥–١٥ مايكرون لمادة صلبة نوعا ما وقليلة الانكماش يفضل استخدام شمع البارافين لتشريب النموذج لغرض قطعه بالمشراح الدوار Rotary microtome.

وقبل بدء عملية التشريب، يوضع النسيج في وعاء زجاجي صغير يسمى صحن سيراكوز Syracuse dish يحتوي خليطاً من سائل الترويق والشمع المنصهر بنسبة ١ : ١ ، لكي يتاح للشمع تخلل النسيج ، بامتزاجه مع وسط الترويق الموجود بين الخلايا، ثم ينقل النسيج الى وسط التشريب فقط. ويملا الشمع جميع فراغات الخلايا وفجواتها عند وضع الأنسجة بوسط شمع ثلاث مرات، تتراوح مدة كل منها بين ساعة ونصف الساعة، وفي فرن عند درجة حرارة مناسبة (٥٠–٥٥ ° س). أي أن الشمع سيملأ الخلايا من الداخل، ويدعمها ويقويها من الداخل والخارج ، وهكذا تغدو الأنسجة صلبة القوام، مما يسمح بعمل مقاطع رقيقة منها، دون تشويهها أو تغيير بنيانها الخلوي، يكون حجم وسط التشريب، حوالي عشرة أضعاف حجم النسيج، وتشرب الأنسجة التي تحوي هواء كالرئة بالشمع في فرن مفرغ من الهواء، حتى لا تظهر فراغات في قالب الشمع.

وتبعاً لنوع مادة التشريب يمكن تقسيم التشريب الى ما يأتي:

١. التشريب بشمع البارافين Infiltration with paraffin

نظراً لاختلاف درجات الانصهار melting points لشمع البارافين لذا عند اختيار الشمع يجب الأخذ بنظر الاعتبار ما يلي:

أ. طبيعة النموذج المشرب.

أن طبيعة النموذج المشرب تتناسب طرديا مع درجة انصهار شمع البارافين المختار أي عندما يكون النموذج المشرب صلباً أو صلباً نوعا ما يجب اختيار شمع درجة انصهاره عالية تتراوح بين ٦٠ – ٦٦ درجة مئوية للحالة الأولى وبين ٥٦ – ٥٨ درجة مئوية للحالة الثانية، أما عندما يكون النموذج المشرب طرياً أو غاية في الطراوة فيجب اختيار شمع ذو درجة انصهار واطئة بحيث تتراوح بين ٥٣ – ٥٥ درجة مئوية للحالة الأولى وبين ٥٠ – ٥٢ درجة مئوية للحالة الثانية.

ب. سمك المقاطع المطلوبة.

يتناسب سمك المقطع عكسيا مع طبيعة شمع البارافين المختار لذا يفضل اختيار الشمع الصلب للمقاطع الرقيقة والشمع الطري للمقاطع السميكة وبخلاف ذلك لا يمكن الحصول على شريط مستمر من المقاطع فمثلا عندما يطلب قطع مقاطع تزيد على ٧ مايكرون سمكا يفضل اختيار الشمع الطري أي درجة انصهاره بين ٥٠ – ٥٥ درجة مئوية أما إذا طلب قطع مقاطع تتراوح بين٥–٧ مايكرون سمكا يفضل استخدام شمع تتراوح درجة انصهاره بين ٥٦ – ٥٨ درجة مئوية أما اذا كان السمك اقل من ٥ مايكرون فيستخدم شمع تتراوح درجة انصهاره بين ٦٠ – ٦٦ درجة مئوية.

ج. درجة حرارة المختبر.

ان درجة حرارة المختبر عند قطع المقاطع تتناسب طردياً مع درجة انصهار الشمع المختار أي يجب اختيار شمع درجة انصهاره عالية (صلب) للتشريب عندما تكون درجة حرارة المختبر عالية وشمع درجة انصهاره واطئة (طري) عندما تكون درجة حرارة المختبر واطئة. ونظرا لكون الشمع صلبا في درجات الحرارة الاعتيادية لذا يتطلب تحويله الى سائل لغرض تغلغله بين خلايا الأنسجة وإحلاله محل محاليل الترويق.

٢. التشريب بالسيلويدن (النتروسليلوز) أو السليلوز المنترت Infiltration with celloidin (Nitrocellulose)

تتبع هذه الطريقة عندما يراد قطع مقاطع ذات مساحات سطحية كبيرة وبسمك يزيد على ٢٠ مايكرون في نموذج طري نوعا ما ودون أن يحصل له انكماش أو تمزيق كذلك الحصول على أقل قدر ممكن من التراكيب غير الحقيقية (الخادعة) ويفضل قطعه بالمشراح المنزلق sliding microtome أو بالمشراح الدوار.

٣. التشريب بالجيلاتين Infiltration with gelatin

تستخدم طريقة التشريب بالجيلاتين عندما يراد تحضير مقاطع لأنسجة مفككة وسهلة التفتت loose friable tissues وذلك لأن التشريب بالجيلاتين لا يحتاج لعملية الانكاز مسبقا كذلك يعمل الجيلاتين على تماسك خلايا النسيج ومنعها من التفكك خلال عملية القطع. ولدى تشريب النماذج بالجيلاتين خاصة لدى قطعها بالمشراح المجمد تغسل النماذج جيدا بواسطة ماء الحنفية الجاري وتترك فيه لمدة يوم كامل ثم تنقع في ١٠% جيلاتين لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة ٣٧ مئوي (ويحضر محلول الجيلاتين باذابة ١٠ غم من الجيلاتين في ماء مقطر مضافا اليه ٠,٥ % من بلورات الفينول لمنع نمو الفطريات) تنقل بعدها الى جيلاتين تركيز ٢٠ % وتترك مدة ٢٤ ساعة إلى أن يتم ان التشريب.

٤. التشريب بالشمع المائي Infiltration with water wax

ان عملية التشريب بالشمع المائي قليلة الاستخدام وذلك لما لهذه الطريقة من تطبيقات خاصة ومحدودة حيث تستخدم فقط لتحضير محتويات الأنسجة التي تذوب في المحاليل المستخدمة في طريقة شمع البارافين أو السيلويدن. ومن الشموع المائية المستخدمة هو الكلايكول متعدد الاثلين polyethylene – glycol.

٥. التشريب باللدائن Infiltration with plastics.

لعهد قريب كانت طريقة التشريب باللدائن plastics والتي تتصلد لدى بلمرتها مقتصرة على الفحص بالمجهر الإلكتروني وتقطع النماذج الصغيرة المصلدة بواسطة المشراح الفوقي ultra

وبسمك يقل عن ١ مايكرون باستخدام السكاكين الزجاجية أو الماسية diamond microtome knives حيث يصعب بهذه الطريقة قطع مقاطع سميكة نوعا ما وفحصها بالمجهر الضوئي ، ولكن أدخلت حديثا العديد من التحويرات على طريقة التشريب والطمر باللدائن بحيث يمكن قطع النماذج الصغيرة بالمشراح الدوار وبسمك يتراوح بين ١- ١٥ مايكرون وفحصها بالمجهر الضوئي ومن بين هذه الطرق طريقة كاثي Cathey's method حيث تتلخص بما يلي:

١. تثبت النماذج بإحدى المثبتات وليكن محلول بوين.
٢. الانكاز بواسطة الكحول الاثيلي تركيز ٧٠% لمدة ١٢ ساعة ثم ثلاث تحويلات في الاسيتون ساعة واحدة لكل مرة.
٣. تشرب النماذج ولمدة ساعتين في محلول (١) والمؤلف من مزج ١٠٠ سم^{3} من methyl methacrylate (المجفف بواسطة رجه مع كبريتات الصوديوم وترشيحه) مع ٠,٨ غم من benzol peroxide كعامل مساعد.
٤. تترك النماذج لمدة ساعتين في محلول (٢) والمؤلف من مزج ٦ غم polyethylen glycol distearate ذو الوزن الجزيئي ١٥٤٠ مع ٤ سم^{3} من dibutyl phthalate مع ٢٧ سم^{3} من محلول (١). بعد اكتمال التشريب تنقل النماذج الى اوساط الطمر.

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.
٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.
٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.
4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة السادسة

الطمر

Embedding

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة السادسة

الطمر Embedding

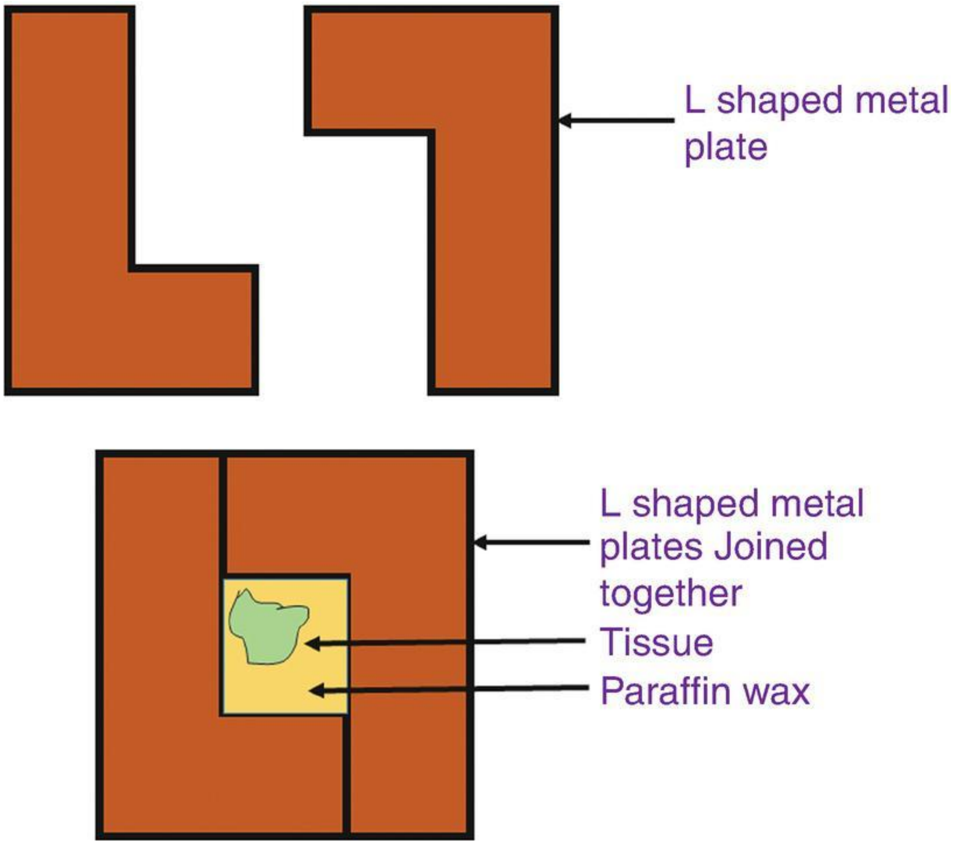
يعرف الطمر بأنه عملية إحاطة أو تغليف واختراق أوساط الطمر للنماذج المشربة بها وذلك لتصليدها وجعلها كتلة متماسكة لغرض قطعها و يعتمد مدى اختراق وسط الطمر أساسا على نوع المثبت المستخدم، ففي حالة المثبتات المخثرة التي تعمل على تحويل بروتين الخلية من الشكل المتجانس الى الشكل الشبكي الذي يسمح لأوساط الطمر بالاختراق لمسافات معينة، أما في حالة المثبتات غير المخثرة التي تثبت بروتين الخلية بشكله الطبيعي المتجانس فهي لا تسمح لأوساط الطمر بالاختراق ونتيجة لذلك تكون الأنسجة المطمورة جافة ومتفتتة وغير مسندة بصورة جيدة وغالبا ما تتشقق وتتناثر أثناء قطعها. غالبا وليس دائما تشرب النماذج وتطمر بنفس الوسط وتدعى هذه العملية بالطمر البسيط simple embedding أما إذا شربت بوسط وطمرت بأخر فيطلق على هذا النوع من الطمر بالطمر المزدوج double embedding كأن يكون التشريب بالسيلويدن والطمر بشمع البرافين.

تمتاز جميع اوساط الطمر بصورة عامة السريعة على التحول بسهولة من الحالة السائلة liquid state إلى الحالة الصلبة و ذلك اما بعملية التبريد كما في حالة الطمر بشمع البارافين والشمع المائي أو بالتبخير كما في حالة الطمر بالسيلويدن والجيلاتين أو بعملية البلمره polymerization كما في حالة الطمر باللدائن.

تجرى عملية الطمر Embedding بعد تشريب النسيج جيدا بالشمع، اذ يطمر بعد ذلك في شمع نقي لتحضيره للقطع وتتم الخطوة الأولى، بصب الشمع المنصهر في قالب مناسب، ثم ينقل النسيج إلى الشمع، باستعمال ملقط غير حاد، ويحبذ العمل بسرعة، لتجنب تصلب الشمع قبل ضبط وضع النسيج. بعد ذلك يبرد وعاء الشمع والنسيج بسرعة و يتم ذلك بالنفخ على سطح الشمع حتى يتصلب نوعا ما، ثم يغمس القالب ببطء في وعاء به ماء عند درجة حرارة الغرفة. ويسبب الماء تحت درجة ١٠ س ، تقلصاً وربما تشققاً لقالب الشمع. يبدو قالب الشمع الجيد رائقاً

ومتجانساً، ويؤدي الطمر غير الجيد إلى ظهور جيوب هوائية في قالب الشمع تبدو كنقط بيضاء، وتسمى هذه الظاهرة التبلور Crystallization. ويمكن طرد الهواء بصهر الجزء العلوي من القالب بأداة ساخنة قليلا. وللقوالب المتبلورة مشاكل عند القطع يتم علاجها بإعادة الطمر. ويمكن حفظ قوالب الشمع في مكان بارد لمدة طويلة.

تصنع قوالب الطمر من المعدن وغالبا ما تصنع القوالب المعدنية من النحاس الأصفر، بشكل قطعتان (على شكل حرف L بالانجليزية بمقاس ١,٥سم x ٢,٥ سم)، و قطعة ثالثة هي القاعدة المعدنية التي تكون اما مربعة او مدورة الشكل.



وقد تكون القوالب من البلاستيك على قاعدة من صلب لا يصدا، تدهن بالجليسرين قبل صب الشمع فيها. أما قوالب الطمر الورقية فيمكن عملها من قطعة مستطيلة من ورق عادي، او من ورق مقوى بعض الشيء، يتم تشكيلها على هيئة وعاء كالعلبة ومیزة هذه القوالب هي كونها

رخيصة ويمكن كتابة بيانات هامة عليها. إضافة إلى ما تقدم توجد قوالب طمر تصنع من البلاستيك بثلاثة حجوم (٢٢x٢٢ مم و ٢٢ x ٣٠ مم و ٢٢ x٤٠ مم وجميعها بعمق ٥ مم)، وتمتاز بسهولة فكها عن بعضها. كذلك يمكن استعمال صحون زجاجية غير عميقة وصحون سيراكوز كقوالب طمر وفي جميع الحالات، تدهن قوالب الطمر بالجليسرين من الداخل حتى يسهل رفع قالب الشمع منها.

الطمر بشمع البرافين Embedding in Paraffin wax

يعتبر البارافين قديما وحديثا من أكثر الأوساط الشائعة الاستخدام في الطمر وذلك للميزات التالية:

أ - يمكن الاحتفاظ أو خزن النماذج المطمورة بشمع البارافين في أماكن جافة لفترات غير محدودة.

ب - يمكن الحصول على أي سمك للمقاطع تبدأ من ٢ مايكرون فما فوق

ت - يمكن الحصول على شريط ribbon حاوي على سلسلة من المقاطع المتصلة مع بعضها البعض.

ث - سهولة تثبيت ولصق شريط الشمع على الشرائح الزجاجية وسهولة ازالته منها قبل عملية الصبغ.

ج - يمكن الحصول على الشمع بسهولة وبدرجات انصهار مختلفة بحيث تتلائم مع طبيعة النماذج وسمك المقاطع و اداة القطع و ظروف القطع.

ح - يمكن شراءه بأسعار زهيدة.

خ - أن عملية الطمر فيه بسيطة وسريعة نوعا ما.

اما أهم مساوئه فهو حصول تقلص طفيف للنماذج المطمورة فيه عند تجمده.

آن شمع البارافين هو أحد مشتقات البترول الخام حيث يتألف من سلسلة طويلة مشبعة لهايدروكاربون الميثان. أن الشمع التجاري يتألف من خليط من جزيئات ذات أوزان جزيئية مختلفة اما الشمع المستخدم في التحضيرات المجهرية فيذوب بدرجات حرارية تتراوح بين ٥٢ – ٦٦ درجة مئوية وقد اقترح بأن عدد ذرات الكاربون للشمع المستخدم في التحضيرات المجهرية لا يزيد على ٣٠ ذرة وذلك لأن الشمع ذو الصيغة ، $CH_3(CH_2)_{28} CH_3$ يذوب في درجة حرارة ٦٦ مئوي . ولدى طمر النماذج في شمع البارافين تبدأ الأوساط السابقة للشمع بالخروج من الأنسجة لتحل محلها جزيئات الشمع بالانتشار الى الداخل . وتتوقف جودة الطمر على سرعة خروج الأوساط السابقة فعندما تكون سرعة الخروج أكبر من سرعة الاحلال بالشمع يحدث انكماش لخلايا الأنسجة المطمورة . اما اذا كانت سرعة الخروج بطيئة جدا فان الطمر يكون غير كامل incomplete .

الطريقة :

١ -بعد خطوات إزالة الماء بوساطة سلسلة الكحول الإيثيلي (على سبيل المثال) متزايد التركيز ، يوضع النسيج في سائل الترويق الذي هو احد مذيبات شمع البرافين كالزايلين أو الكلوروفورم أو زيت خشب الأرز .

٢ - يشرب النسيج بشمع البرافين السائل في فرن مناسب عند حرارة تتراوح بين ٥٠-٥٥°س وتعتمد مدة التشريب وعدد تغييرات الحمام الشمعي على حجم العينة وقوام النسيج نفسه . أما اختيار شمع البرافين الذي تكون له درجة انصهار معينة فيعتمد على معدل درجة الحرارة في مكان العمل وعلى طبيعة النسيج موضع الدراسة ، وكذلك على سمك المقاطع المطلوبة.

٣ -بعد إتمام عملية التشريب يسمح للشمع بالتجميد ليكون كتلة حول النسيج يمكن تحضير مقاطع منها . وتمثل هذه الخطوة عملية الطمر التي يمكن سرد خطواتها فيما يلي:

أ -تطلى سطوح قوالب الطمر الزجاجية أو المعدنية طلياً خفيفاً بالجليسرين لمنع الشمع من الالتصاق بها عند تجمده.

ب يملا القالب إلى ما قبل حافته العليا بشمع البرافين المنصهر النقي المرشح الذي لم يسبق استخدامه في التشريب) والذي يكون قد سبق تسخينه قليلا على لهب بنزن Bunsen burner ، ويعمل على التخلص من أية فقاقيع هوائية بوساطة لهب صغير.

٤ - تحمل العينة برفق وذلك باستخدام ملقط دافيء (ولكنه ليس ساخنا جدا) ثم تنقل العينة إلى الشمع الذي صب في القالب ويضبط اتجاهها في الوضع المطلوب .

٥ -. توضع ورقة وسم قرب العينة بحيث تلتصق بالسطح الداخل لجانب القالب.

٦ -بعد أن يتجمد سطح الشمع ، تسرع عملية التجمد بغمر القالب في ماء بارد او وضعه في الثلاجة وذلك لمنع تكوين بلورات كبيرة في قالب الشمع وتترك كتلة الشمع لمدة ١٥ دقيقة على الأقل في الماء البارد أما إذا كان حجمها كبيرا فقد يحتاج الأمر إلى تركها ساعة كاملة لإتمام التجمد .

٧ -عندما تتجمد الكتلة تماما يجب إخراجها من القالب ، وقد يحدث هذا تلقائيا إذا كان الجليسرين قد استخدم في تشحيم جوانب القالب . وإذا لم يحدث تلقائيا فإن طرقة خفيفة على قاعدة القالب تكفي لفصل كتلة الشمع عنه.

٨ -إذا تعذر إجراء عملية القطع عقب الطمر مباشرة فيمكن تخزين قالب الشمع ، وذلك في مكان بارد لحين توفر الظروف المناسبة للقيام بعملية التقطيع.

الطمر في الجيلاتين Embedding in Gelatin

تستخدم هذه الطريقة في الحالات التي يراد فيها تجنب تعريض الأنسجة لعمليات ازالة الماء وللمحاليل المذيبة للدهون ، وكذلك في الحالات التي يرغب فيها تجنب تعريض الانسجة لدرجات حرارة عالية حرصا على ما فيها من إنزيمات او مركبات أخرى تتأثر بالحرارة ويراد إظهارها. يعتبر الجيلاتين كيمياويا شكلا محورا للغراء collagen (المادة البروتينية التي تمتاز باحتوائها على نسب عالية من الحوامض الأمينية كالكلايسين والبرولين و هيدروكسي برولين والتي لا تذوب في الماء والموجودة في النسيج الضام والعظام) ولدى تبريد الجيلاتين السائل لغرض تصلده تبدأ جزيئاته بالاتحاد مع بعضها البعض بواسطة رابطة هايدروجينية بين مجاميع الببتيدات للجزيئات المفصولة وتكون هذه الرابطة حساسة للحرارة ، ففي درجة حرارة اقل من ٢٠ مئوي يكون الجيلاتين صلب وفي درجة أعلى من ٣٧ مئوي يكون سائلا وعند الاحتفاظ بالجيلاتين لفترة طويلة في درجة حرارة أعلى من ٦٠ مئوي خاصة بعد غليه فأنه يفقد قدرته على

التصلد عند تبريده وذلك لما لدرجة الحرارة من تأثير على تقصير سلسلة البروتين المكونة له . كذلك ينصح بعدم اذابة الجيلاتين المستخدم للطمر مرات عديدة قبل الاستعمال لأن ذلك يزيد من طراوته ، أن التبريد البسيط للجيلاتين يكسب الأنسجة المطمورة فيه صلابه تكفي لقطعها ولكن المقاطع تكون ذات قوام لزج ، لذا يتطلب تصلده اكثر وذلك بالتبخير البطيء . أن الطريقة الاعتيادية المستخدمة للتصليد مبنية على اساس ربط جزئيات الجيلاتين مع بعضها البعض بثبات اكثر ويتم ذلك بأضافة بعض المثبتات اليه كالفورمالديهايد حيث يقوم بتكوين اصرة المثلين بين سلاسل البروتين اضافة إلى الأواصر التساهمية الهايدروجينية التي تربط الحوامض الأمينية مع بعضها البعض وبذلك يكون الجيلاتين اصلد فيصعب اذابته بالحرارة ، وللتغلب على الزوجة المقاطع تضاف أملاح الالمنيوم التي تعمل على تثبيت الجيلاتين وازالة لزوجته ، بالاضافة إلى طريقة التصليد المذكورة أعلاه هناك طريقة ثانية تستخدم بصورة عامة لنفس الغرض وذلك بتجميد الماء الموجود في الجيلاتين بواسطة امرار غاز ثاني أوكسيد الكاربون وتحت درجات حرارية واطئة على قوالب الجيلاتين ، بعدها تقطع المقاطع بأستخدام المشراح المجمد.

يمكن اعتبار الجيلاتين من أوساط الطمر الجيدة وذلك للميزات التالية :

أ . لا تحتاج النماذج عند طمرها بالجيلاتين الى عملية الانكاز وبذلك تقل احتمالية تشويه النموذج الذي تسببه محاليل الانكاز .

ب . يستخدم الجيلاتين لطمر معظم الأنسجة الدهنية lipids المثبتة وغير المثبتة .

ج- يمكن بسهولة قطع مقاطع ذات مساحات سطحية كبيرة .

ء- سهولة وسرعة الطمر بالجيلاتين .

هـ- الجيلاتين وسط جيد لطمر النماذج ذات الأنسجة المفككة وسهلة التفتت اثناء قطعها بالمشراح .

اما من اهم مساويء الجيلاتين فهي :

أ ـ صعوبة ازالة الجيلاتين من الأنسجة المشربة به .

ب . قابلية الجيلاتين للاصطباغ بالصبغات الحامضية والقاعدية وبالتالي تكون التحضيرات غير واضحة .

ج . لا يمكن الاعتماد عليه في قطع مقاطع تقل عن ٥ مايكرون سمكاً .

د . لا يمكن الحصول على شريط مستمر عند قطع المقاطع .

هـ . يجب استخدام مثبتات خاصة لدى الطمر بالجيلاتين مثل الفورمالديهايد او المثبتات التي لا تذيب الدهون.

الطريقة:

المحاليل اللازمة

١. مثبت فورمالين كالسيوم Formalin Calcium.

٢. وسط الطمر ويتكون من

ا-مسحوق جيلاتين Gelatin ١٥ غم.

ب . جليسرين Glycerine ١٥ مل.

ج- ماء مقطر Distilled Water ٧٠ مل.

ء- ثايمول Thymol بلورة صغيرة

٣. محلول ٣٥-٤٠ ٪ فورمالدهايد Formaldehyde ٢٠ مل.

١. ثبت قطعا صغيرة من النسيج لمدة ١٠-١٥ ساعة في مثبت الفورمالين كالسيوم عند درجة ٤° س.

٢. . اغسل في ماء جار لمدة ٣٠ دقيقة

٣. . ضع النسيج في وسط الطمر داخل الفرن عند درجة ٣٧ س لمدة ساعة.

٤. . اقطع كتلة من الجيلاتين حول النسيج وبردها بسرعة .

٥. . جمد كتلة الجيلاتين المحتوية على النسيج بوضعها في محلول ٣٥-٤٠ % فورمالديهايد.
٦. . اقطع بأستعمال جهاز القطع المجمد ويمكن تخزين المقاطع عند درجة ٤ ^{o}س.

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.
٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.
٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.
4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة السابعة

عمل المقاطع وأجهزة القطع

Section Making and Microtomes

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرةالسابعة

عمل المقاطع وأجهزة القطع Section making and Microtomes

بعد الانتهاء من عملية الطمر ، لا بد من إجراء بعض الخطوات لتهيئة النسيج المطمور لعملية التقطيع . وأولى هذه الخطوات هي التقليم ، ثم التثبيت على حامل معدني او خشبي أو بلاستيكي ، يلي ذلك تحضير جهاز التقطيع بهدف الحصول على مقاطع بسمك ٧-١٠ ميكرومترات .

١. التقليم Trimming

بعد الحصول على قوالب شمعية جيدة تحتوي على النسيج المطلوب ، يتم تقليمها بإزالة الشمع الزائد من حول النسيج والإبقاء على محيط شمعي بحدود ٢-٣ ملم حوله ، ويتم ذلك باستعمال شفرة حادة . والأمر الهام في عملية التقليم أن تكون حافتا القالب العليا والسفلى متوازيتين ، لأن ذلك يسمح بالحصول على شريط مقاطع مستقيم . وبخلاف ذلك فإن عدم التقليم السليم يؤدي إلى تكوين شريط ملتو ، وهذا أمر غير مرغوب عند دراسة مقاطع متسلسلة من عينة ما . كما أن التقليم الجيد يساعد على وضع أكبر عدد من المقاطع على الشريحة الواحدة ، وهذا ما يوفر الوقت والمواد في العمليات اللاحقة .

٢. التحضير للقطع Preparation for Sectioning

بعد تثبيت قالب الشمع على حامل مناسب ، يصبح التجهيز لعملية القطع أمراً مطلوباً . والمقصود بالتحضير للقطع هو مراعاة الأمور التالية :

١.أن يكون جهاز التقطيع نظيفاً ، وإذا وجدت أية بقايا لمقاطع شمعية فإنه يجب إزالتها بفرشاة مناسبة مبلولة بالزايلين .

٢. أن يكون جهاز التقطيع خالياً من أية مشاكل ميكانيكية ، وإذا كان الجهاز من النوع الدوار ، فيجب التأكد من أن الدولاب اليدوي سلس في حركته . فإذا كان قاسية فإنه يتوجب تزييته ، كذلك يلزم التأكد بأن آلية دفع قالب الشمع نحو السكين تعمل بشكل سليم ، وإذا كان حامل القالب مدفوعا إلى أبعد مدى ، فإنه يجب إرجاعه إلى الخلف كي لا تضطر أن تفعل ذلك أثناء القطع ، الأمر الذي يؤدي إلى رفع السكين من مكانه وإعادة ترتيب وضع العينة في الجهاز مرة ثانية وفي ذلك هدر للوقت .

٣.أن تكون سكين القطع نظيفة وحادة ، ومثبتة بإحكام في مكانها الصحيح وبالزاوية المناسبة لعملية القطع ، إذ يجب إمالة السكين حتى يلامس حدها القاطع وجه قالب الشمع بالقدر المناسب .

٤.أن يكون قالب الشمع مثبتاً على الحامل بشكل جيد ، وأن يكون الحامل مثبتاً بأحكام في مكانه الصحيح من جهاز التقطيع.

٥.توفر الاشياء التالية ملقط او حامل للمقاطع, علب ورقية لحفظ المقاطع, قنينة زايلين او كلوروفورم ، فرشاة صغيرة ، ومحارم ورقية .

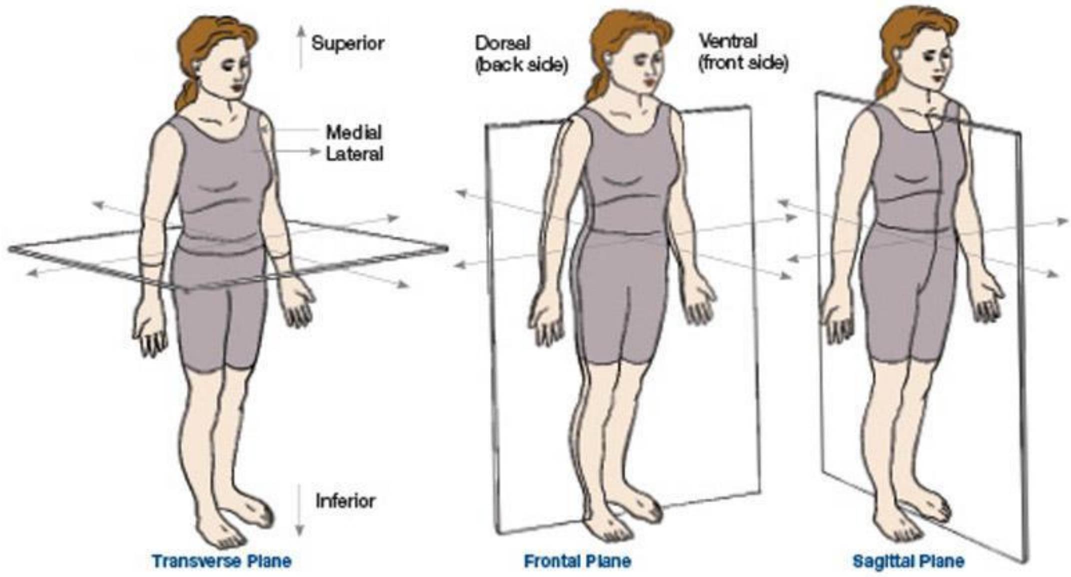
عمل المقاطع Section Making

المقطع هو شريحة رقيقة تقطع من مادة مأخوذة من كائن لغرض دراسة تركيب او ترتيب الخلايا المكونة لها والتي لا يمكن دراستها من فحص النموذج كاملاً, تكون المقاطع اما عرضية او طولية.

١.**المقاطع الطولية Longitudinal Sections** تكون المقاطع من هذا النوع إما سهمية Sagittal ، ويكون مستوى القطع موازياً للمحور الطولي للعينة ويتضمن الجهة الظهرية والجهة البطنية ، أو أمامية (جبهية) Frontal ويكون مستوى القطع فيها موازياً للمحور الطولي أيضا و يتضمن الجانب الأيمن والجانب الأيسر من العينة.

٢.**المقاطع العرضية Transverse (Cross) Sections** تكون هذه المقاطع عمودية بالنسبة للمحور الطولي للعينة. اما المقاطع التي تؤخذ في الاعضاء النباتية الأسطوانية الشكل

كالساق والجذر مثلا فتكون بأحد مستويين هما العرضي transverse والطولي longitudinal ويكون هذا الأخير موازياً للمحور الطولي وهو إما أن يكون قطرية radial او مماسيا tangential . أن الغرض الرئيسي من القطع بهذه المستويات هو الحصول على فكرة واضحة عن التركيب الاجمالي للنموذج تحت الدراسة بابعاده الثلاثة عن طريق فحص تلك المقاطع.



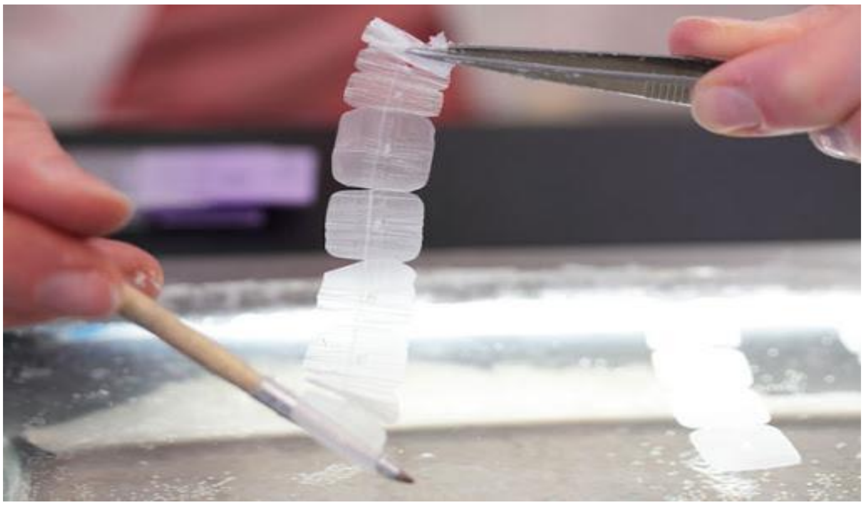
اجهزة القطع Microtomes

تشكل أجهزة التقطيع عماد مختبر التحضير المجهري ومختبر الأمراض النسيجية ، وتشترك جميع أنواع أجهزة التقطيع بثلاث آليات ، وهي : آلية ضبط سمك المقاطع ، وآلية حمل و تثبيت السكين والية تثبيت القالب الحامل للعينة . ومن أجهزة التقطيع تتوفر الأنواع التالية :

١- جهاز التقطيع الدوار Rotary Microtome

أكثر الأنواع شيوعا ، اخترع عام ١٨٨٥ ، ويسمى بالدوار لأن جهاز الدفع فيه يغذى بعجل دوار يوجد عند أحد جوانب الجهاز ويدار آلياً أو باليد . ويكون جهاز تغذية الدفع عادة مغطى لحمايته . ويعطى هذا النوع نتائج جيدة وهو يستخدم في عمل مقاطع الشمع المتسلسلة ويختلف عن المشراح الانزلاقي بكون السكين تبقى ثابتة في مكانها

اثناء عملية القطع بينما يتحرك حامل النموذج الى الاعلى والاسفل امام السطح القاطع للسكين.تبقى الشرائح المتعاقبة من شمع البرافين متصلة مع بعضها مكونة شريطاً ribbon توجد فيه المقاطع بنظام متسلسل وبالفحص المجهري للمقاطع المتسلسلة يصبح بالامكان تصور الشكل الاجمالي الخارجي او التركيب الداخلي للكائن, العضو, النسيج, الخلية المفردة او حتى احد العضيات داخل الخلية.



٢-المشراح الانزلاقي Sliding Microtome

يقتصر استعمال هذا النوع من المشارح على قطع المواد الصلبة جدا التي لا يمكن قطعها بالمشراح الدوار كبعض أنواع الخشب التي تقطع دون طمرها ، كا يستعمل ايضا لقطع مواد اخرى صلبة تطمر في مادة اللدن plastic او السيلويدن وهو ذو فائدة كبيرة في قطع الأجسام الكبيرة الصلبة كالعيون والعظام و الغضاريف وكذلك في الحالات التي يراد فيها التقليل من تقلص وانكماش النسيج . في هذا النوع من المشارح يبقى النموذج ثابتا في محله عادة أثناء عملية القطع بينما تنزلق حاملة السكين في مسار دقيق ومحكم . يزود المشراح بجهاز تلقيم او تغذية يدوي او ذاتي الحركة automatic ، يدفع هذا الجهاز النسيج او النموذج المراد قطعه إلى أعلى بين ضربات القطع للسكين . في هذا الجهاز يمكن الحصول على مقاطع رقيقة لا يتجاوز سمكها ٢ مايكرون او سميكة قد يصل سمكها بين ١٠-٢٠ مايكرون عادة.

٣-جهاز التقطيع الجليدي Freezing Microtome

ويسمى جهاز التقطيع الإكلينيكي ،وهو نوع صغير من المشراح الانزلاقي الذي يبقى فيه النموذج ثابتاً في مكانه بينما تتحرك السكين مارة به فتقشر شرائح منه ويستعمل لعمل مقاطع لأنسجة غير مثبتة أو مطمورة ، وفيه تكون قاعدة حمل العينة متصلة باسطوانة ثاني أكسيد

الكربون ، لتبريد العينة والسكين بسرعة. وهذا الجهاز مفيد جدا لعمل مقاطع التشخيص المرضي حال الحاجة إليها ، وفي دراسة إنزيمات الأنسجة ودهونها ولكنه لا يصلح العمل مقاطع متسلسلة . وجهاز الكربوستات Cryostat هو نوع متقدم من جهاز التقطيع الجليدي ، وهو شائع الاستعمال في مختبرات الأنسجة المرضية Pathology Laboratories.

المشراح الفوقي (الدقيق) Ultra Microtome

اخترع في نهاية الأربعينات من القرن الماضي ، ويتوفر في مختبرات البحث ، حيث تجري الدراسات بالمجهر الإلكتروني ، ويستعمل لعمل مقاطع فائقة الدقة ، يتروح سمكها بين ٥٠ و ١٠٠ نانومترا تكون ارق بحوالي ٤٠ مرة من المقاطع التي تقطع بالمشارح الاعتيادية، ويختلف عن الأنواع التقليدية بما يلي :

أ.يحتاج إلى أنواع خاصة من السكاكين (زجاج أو ماس) ليقطع قوالب الطمر الصغيرة (٢x٣ ملم) .

ب.جهاز التغذية فيه يعمل إما آلياً أو بالتمدد الحراري ، وهو مبني عادة على نظام إلكتروني . تستعمل أجهزة التقطيع الدقيق في البحوث التي تتعامل مع الأنسجة والخلايا والجراثيم

والفيروسات وتلك التي تتطلب معرفة التركيب الدقيق ultra structure للخلايا ، وكذلك دراسة بنية الجسيمات أو الجزئيات الخلوية الكبيرة .

المصادر Reference

١. العطار, عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار, التحضيرات المجهرية, مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي, جامعة بغداد, ١٩٨٢.

٢. الحاج, حميد احمد, التحضيرات المجهرية الضوئية, دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة, عمان, ٢٠١٥.

٣. نوري, ماجدة عبد الرضا, علم تقنية الشرائح المجهرية, مطبعة التعليم العالي في الموصل, ١٩٨٩.

4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الثامنة

مشاكل التقطيع و لصق المقاطع

Cutting disturbances and Affixing sections

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

كلية العلوم قسم علوم الحياة　　　　　**مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان**

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الثامنة

مشاكل التقطيع و لصق المقاطع Cutting disturbances and Affixing sections

على الرغم من كل الترتيبات اللازمة للقيام بعملية التقطيع ، فقد تحدث مشاكل أثناء هذه العملية نتيجة أسباب قد تكون خارجة عن إرادة الطالب . وفيما يلي استعراض لأبرز هذه المشاكل ، وأسبابها ، والحلول المقترحة لها:

المشكلة	السبب	العلاج
١-التفاف المقاطع إلى اعلى و عدم تكون شريط	١-الشمع صلب ٢-السكين باردة ٣-ميل السكين زائدة	١-طمر القالب بشمع طري ٢-تدفئة السكين ٣-تقليل ميل السكين
٢- التواء شريط المقاطع	١- عدم توازي سطحي القالب السفلي والعلوي ٢- سخونة أحد جانبي القالب أكثر من الجانب الاخر ٣-عدم تساوي حدة السكين	١-اعادة تقليم القالب ليصبح متوازي الحواف ٢-تبريد القالب ٣- تغيير مكان القطع على السكين بتحريكها أو إعادة شحذها
٣- انشقاق المقاطع طوليا	١- وجود ثلمات في حد السكين ٢-وجود فضلات على حد السكين ٣-وجود فضلات او اجزاء صلبة في النسيج او الشمع	١-تغيير مكان القطع ٢-تنظيف حافة السكين ٣-اعادة الطمر بأستعمال شمع مرشح
٤- عدم انتظام سمك المقاطع	١-عدم تثبيت السكين وقالب الشمع	١-احكام تثبيت السكين وقالب الشمع

	٢–عدم ضبط الية الدفع في جهاز التقطيع	٢–تزييت اجزاء جهاز التقطيع او تغييرها
٥–وجود اجزاء سميكة واخرى رقيقة في كل مقطع	اهتزاز حافة السكين نتيجة ميلها الزائد	تقليل ميل السكين
٦–التصاق المقاطع بقالب الشمع	١–شحن قالب الشمع بكهرباء ساكنة ٢–وجود شظايا من الشمع على حافة السكين او الطرف العلوي لقالب الشمع	١–زيادة رطوبة مكان القطع وتفريغ شحنات الكهرباء الساكنة بأستعمال مصباح بنزن ٢–تنظيف حافة السكين وطرف قالب الشمع
٧–وجود ثقوب بالمقاطع	وجود فقاعات هوائية بقالب الشمع	اعادة الطمر
٨–سماع صوت معدني اثناء القطع	١–قساوة النسيج ٢–وجود بلورات في النسيج ٣–تعرض النسيج للكحول لمدة طويلة ٤–بطء التقطيع	الحل غير ممكن زيادة السرعة
٩–عدم تكون شريط رغم جودة المقاطع	١–الشمع بارد او صلب ٢–عدم موازاة حافة القالب لحافة السكين ٣–المقاطع غليظة	١–تدفئة السكين والطمر بشمع طري ٢–الموازاة بين حافة السكين وحافة قالب الشمع ٣–تقليل سمك المقطع
١٠–تساقط النسيج من قالب الشمع	عدم اكتمال ازالة الماء والتشريب	اعادة ازالة الماء والتشريب
١١–تفتت النسيج في مقاطع الشمع	فترة التشريب اطول من اللازم ودرجة حرارة وسط التشريب عالية	لا يوجد حل

لصق المقاطع Affixing Section

أن المقاطع النسيجية التي هي الآن على شكل شريط من الشمع يجب أن تلصق على الشرائح الزجاجية في وضعية منبسطة لكي تجرى عليها عملية الصبغ والعمليات الأخرى بدون

أن يتغير تركيب النسيج المجهري، ولكي تتم عملية لصق المقاطع بالطريقة السليمة يجب مراعاة الأمور التالية :

١- أن تكون الشرائح الزجاجية نظيفة ، وذلك باستعمال الكحول أو الزايلين . وإذا لم تستعمل شرائح نظيفة فإن ذلك يؤدي إلى احتمال سقوط المقاطع عنها أثناء عملية الصبغ .

٢- أن يتوفر وسط تحميل مناسب ، ويعمل هذا الوسط على التصاق المقاطع بالشرائح . ومن الوسائط المستعملة بياض البيض المضاف إليه جليسرول Glycerol ومطهر ثايمول Thymol.

٣- توفر ماء مقطر ، وصفيحة ساخنة (درجة حرارتها ٣٥-٤٠ ° س) وفرشاة شعر الجمل وحامل مقاطع وورق ترشيح . وبعد توفر هذه المواد يجب تحديد موقع المقطع على الشريحة بحيث يكون مركزياً.

ومن الطرق المتبعة في لصق المقاطع:

١-بواسطة استعمال الحمام المائي (water – bath): وهو عبارة عن حوض ماء مركب على سخانة خاصة وفيه ضابط للحرارة . يسخن الحمام بدرجة حرارة أقل بدرجتين مئويتين عن درجة حرارة انصهار الشمع المستعمل في صب القالب تختار المقاطع الجيدة وتقطع بواسطة المشرط وترفع بواسطة فرشاة ناعمة وتترك على وجه الماء بواسطة ملامسة شريط الشمع له وبفعل حرارة الماء المعتدلة الملائمة للشمع سوف يبسطه ساحباً معه المقطع النسيجي المتجعد من كلا الطرفين . يغمس طرف الشريحة الزجاجية الممسوحة بالزلال في الماء ويلتقط طرف الشمع من المقطع بواسطة ابرة التشريح و بلطف وخفة تسحب الزجاجة من الماء مع الاحتفاظ بالإبرة ماسكة طرف الشمع في المقطع ، ترج الزجاجة قليلا للتخلص من الماء الزائد وبذلك نحصل على شريحة زجاجية مع مقطع نسيجي عليها بشكل منبسط مضبوط . يستحسن سحب المقطع إلى منتصف الشريحة الزجاجية لتسهيل عملية الفحص وتعليم الشريحة .

١- **بواسطة استعمال السخانة Hot Plate:** تؤخذ المقاطع مباشرة من المشراح بواسطة فرشاة وتوضع على شريحة زجاجية مغطاة بطبقة رقيقة من زلال البيض مع الجليسرين ومكتوب عليها بواسطة القلم ماسي رقم او رمز المقطع . يقطر على المقطع بضع

نقاط من الماء المقطر و توضع الشريحة مع المقطع والماء على السخانة التي بدورها تكون مضبوطة حرارتها على درجة حرارية أقل بدرجتين مئويتين من درجة حرارة انصهار الشمع تترك لفترة إلى أن يسخن قليلا الماء الموجود على الشريحة وبمساعدة ابرتي تشريح يمسك اطار الشمع المحيط بالنسيج ويساعد قليلا في تبسيط وتقويم الشريحة وبعد ذلك يسحب الماء الزائد بواسطة ورقة الترشيح .

٢ -**بواسطة استعمال المصباح الكحولي (Alcoholic – burner):** وهنا لا يستعمل زلال البيض كلاصق وانما بدلا عنه كحول ذو تركيز ٣٠ ٪ فقط تؤخذ الشرائح الزجاجية النظيفة جدا كالمعتاد ويقطر عليها بضع قطرات من كحول ٣٠% وتوضع فوقه المقاطع النسيجية و بسرعة يجري بسطها وتقويمها بمساعدة لهب المصباح الكحولي الخفيف ويسحب بعد ذلك السائل الزائد بورقة ترشيح.

المواد اللاصقة شائعة الاستعمال

١-زلال ماير Mayer's albumine

يعتبر زلال ماير من أكثر محاليل اللصق المستخدمة خصوصا لمقاطع الشمع حيث تمسح الشريحة بطبقة خفيفة ثم يضاف ٢-٣ قطرة من الماء المقطر أو كحول ٧٠ % ثم يوضع شريط الشمع على الشريحة بحيث يكون وجهه اللماع على الشريحة ثم يسمح للشريط بالتمدد وذلك بوضعه على صفيحة ساخنة بدرجة حرارة ٤٠ – ٤٥ مئوي بعد ذلك يسكب أو يسحب الماء الزائد بواسطة ورق النشاف وتترك لتجف مدة ٤-٦ ساعة. يحضر زلال ماير بمزج ٥٠ سم^{٣} من زلال البيض مع ٥٠ سم^{٣} من الكليسرين واضافة ١ غم من سيليسلات الصوديوم لمنع نمو الفطريات . يرشح الخليط بواسطة قماش من الشاش ثم يستخدم.

٢-جيلاتين هوبت Haupt's gelatin

يستعمل للصق المقاطع المفككة والمجمدة والتي يصعب لصقها بزلال ماير حيث تمسح الشريحة بالجيلاتين ثم يضاف ٢-٣ قطرة من الفورمالين تركيز ٢ % وذلك لتصليد الجيلاتين وتثبيت المقاطع في محلها . (يحضر جيلاتين هوبت باذابة ١ غم من الجيلاتين في ١٠٠ سم^{٣}

من الماء المقطر بدرجة ٣٠ مئوية ثم يضاف ٢ غم من بلورات الفينول مع ١٥ سم^{٣} من الكليسرين) .

٣-جيلاتين ويفر Weaver's gelatin

يفضل استخدام جيلاتين ويفر للمقاطع الكبيرة صعبة اللصق حيث تفيض الشريحة بجيلاتين ويفر ويوضع شريط الشمع ثم يسمح له بالتمدد ويجفف كما في طريقة زلال ماير . يحضر جيلاتين ويفر بمزج حجم واحد من محلول (أ) مع تسعة حجوم من محلول (ب) .

محلول (أ) يتألف من :

اغم جيلاتين

غم بروبيونات الكالسيوم Calcium propionate

١ سم^{٣} روكل roccal (benzalkonium chloride) لمنع نمو البكتريا .

١٠٠ سم^{٣} ماء مقطر .

محلول (ب) ويتألف من :

١ غم شب الكروم

٩٠ سم^{٣} ماء مقطر

١٠ سم^{٣} فورمالين

٣ -محلول بلانك وماك كارذي Blank and Mc Carthy solution

يستخدم هذا المحلول للصق المقاطع المطمورة بالشمع المائي حيث توضع المقاطع طافية على المحلول وتمسك الشريحة الزجاجية تحتها وترفع الى الأعلى حاملة معها الشريط . ترتب المقاطع وتميل الشريحة لينساب الماء الزائد بعدها تترك لتجف بعيدا عن الغبار .

يحضر هذا المحلول باذابة :

٠,٢ غم ثانى كرومات البوتاسيوم

٠,٢ غم جيلاتين في ١٠٠٠ سم ماء مقطر يغلى المحلول ثم يرشح ويستخدم .

٥ – لاصق كريفز وطلاء زمرمان Gravis adhesive and Zimmerman's lacquer

يستخدم المحلولان في لصق المقاطع المجمدة حيث يستعمل محلول كريفز كا يستعمل الماء في طريقة زلال ماير ثم يسحب الماء الزائد أو الفائض ويضاف بضع قطرات من الكحول المطلق تترك ثوان معدودة ثم يسحب الكحول الزائد بعدها توضع ورقة مسح العدسات على المقاطع ويضغط عليها بالأصبع . تغمر الشريحة في الكحول المطلق ثم يسحب الكحول وتغمر في محلول زمرمان الذي يتبخر من على السطح تاركا طبقة من غلاف يثبت المقاطع على الشريحة . يحضر المحلولان كما يلي

أ – لاصق كريفز

١٠٠ سم³ ماء مقطر

٠,١ غم آكار

٠,١ كافور caphor

يذاب الاكار في الماء المغلي ثم يرشح ويضاف ٠,١ غم من الكافور الى المزيج .

ب – طلاء زمرمان

٥٠ سم³ كحول مطلق

٥٠ سم³ الايثر اللامائي anhydrous ether

٠,٥غم بارلودن parlodin

٠,١غم صمغ الماستيك gum mastic

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.

٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.

٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.

4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة التاسعة

الصبغات وطرائق التصبيغ

Stains and Staining

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

كلية العلوم قسم علوم الحياة مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة التاسعة

الصبغات وطرائق التصبيغ Stains and Staining

اذا فحصت المقاطع قبل صبغها فلا يتضح منها الا تفاصيل قليلة بأستثناء النواة وحدود الخلية، أن الغرض من الصبغ هو جعل اجزاء الخلايا او الأنسجة اكثر وضوحا . فعند فحص النماذج او المقاطع المثبتة غير المصبوغة فان الاجزاء التي يمكن تمييزها عن بعضها البعض هي التي تكون ذات معاملات انكسار مختلفة . اما الاجزاء التي تكون ذات معاملات انكسار متشابهة فلا يمكن تمييزها . ولكن بعد صبغها بصبغة واحدة أو أكثر فان لون الصبغة سوف يزيد في تمييز الأجزاء ذات الانكسارات المختلفة ، كذلك تقوم الصبغات بتلوين الاجزاء ذات الانكسارات المتشابهة بألوان مختلفة أو بدرجات متفاوتة اللون لنفس الصبغة وذلك بسبب اختلاف المكونات الكيميائية أو الفيزيائية لتلك الأجزاء وبالتالي تظهر اكثر وضوحا.

نظريات الصبغ

قدمت نظريتان لتفسير قواعد صبغ الأنسجة :

١-**النظرية الكيماوية** أعلنها ايرلخ Ehrilch عام ١٨٨٠ وتقول أن الصبغ عبارة عن تفاعل كيماوي يعتمد على تكوين مادة ملحية بين الشق الموجب Cation أو الشق السالب Anion للصبغة وبين مجموعات كيمياوية معينة في الخلية او النسيج وعلى هذا الاساس تكون الأنسجة إما محبات للحامض Acidophilic وتحتوي مجموعات قاعدية ، وفي هذه الحالة تتفاعل مع الصبغ الحامضي ، أو تكون محبات للقاعدة Basophillic وتحتوي مجموعات حامضية تتفاعل مع الصبغات القاعدية .

٢-**النظرية الطبيعية** ترتكز هذه النظرية على افتراضات تقول بأن الصبغ يتم بوسائل طبيعية مثل الامتصاص ، والإدمصاص ، والخاصية الشعرية والانتشار والأوزموزية . والشعور السائد في الوقت الحاضر هو أن الصبغ ينتج عن عمليات كيماوية وطبيعية في آن واحد .

العوامل المؤثرة على طبيعة الصبغ

١ -قوة الصبغة

٢ - سرعة تأين كل من الأنسجة البروتينية والصبغات .

٣ -الأس الهايدروجيني (pH) لمحلول الصبغة وكذلك للأنسجة البروتينية

٤ - نوع المثبت المستخدم

٥ -٥- نوع محلول الصبغة كحوليا أم مائيا

٦ -اذا كانت الصبغة مفردة single أم مزدوجة double او متعددة multiple

٧ -تركيز الصبغة في المحلول ضعيفا كان أم قوياً .

تصنيف الصبغات Classification of Stains

الصبغات عبارة عن مواد عضوية ملونة تكون في الغالب املاحا ، وتمتلك من الخواص بحيث تستطيع الأنسجة مسكها بثبات ولا يمكن ازالتها منها حتى عند استخدام مذيبات نفس المادة العضوية . ان جميع الصبغات يجب أن تكون حاوية على مجموعتين أساسيتين هما :

١- مجموعة ذرية مرتبطة باللون تدعي حاملات اللون chromophores

٢ - مجموعة لها القابلية على ربط المركبات الكيميائية للصبغات مع الأنسجة وتعرف ماسكات اللون auxochromes .

وتقسم الصبغات بطرق مختلفة تبعا للأسس المعتمدة في التقسيم وفيما يلي بعض النماذج من تقسيم الصبغات :

اولاً - تقسم الصبغات تبعا لتركيز الأس الهايدروجيني للصبغة وعلى هذا الاساس يمكن تميز ثلاثة أنواع منها :

١-**الصبغات القاعدية basic stains** وذلك عندما تكون الصبغة حاوية على قاعدة عضوية ملونة تتحد مع الجذور الحامضية غير الملونة للأنسجة كجذر الخلات او الكلوريدات أو الكبريتات . هذه الصبغات اما ان تذوب في الماء أو في الكحولات أو بكليها ومن أمثلتها صبغة السفرانين O (Safranin O) وصبغة الهيماتوكسلين haematoxylin.

٢-**الصبغات الحامضية acid stains** هي تلك الصبغات التي تكون حاوية على جذور حامضية عضوية ملونة تتحد مع قاعدة معدنية metalic base غير ملونة للأنسجة وتكون عادة من الصوديوم او البوتاسيوم . هذه الصبغات ايضا اما ان تذوب في الماء او الكحولات او بكليها ومن امثلتها الصبغة الخضراء الباهتة .S.F المصفرة light green S.F. yellowish وصبغة الإيوسين Y eosin Y.

٣-**الصبغات المتعادلة neutral stains** وتكون مركبه من صبغات حامضية وقاعدية والتي تكون فيها كل من الأيونات الموجبة والسالبة حاوية على مجاميع من حاملات اللون chromophores . تذوب هذه الصبغات عادة في الكحولات وربما تذوب في الماء وكثيرا ما تكون محاليل غروية ومن امثلتها الأحمر المتعادل neutral red.

ثانياً- تقسيم الصبغات حسب طبيعة حاملات اللون

لا يعتمد هذا التقسيم على لون حاملات اللون بل يعتمد على مدى تشابه التركيب الكيميائي لها وتقسيمها إلى مجاميع عديدة أهمها :

١. مجموعة صبغات النايتروزو nitroso stains ومن امثلتها صبغة اخضر النفثول B (naphthol green B)
٢. مجموعة صبغات النايترو nitro stains ومن امثلتها صبغة اصفر النفثول S (naphthol yellow S) .
٣. مجموعة صبغات الأزو azo stains ومن أمثلتها الصبغة البرتقالية G(orange G).
٤. مجموعة صبغات الميثان ارايل aryl methane ومن امثلتها صبغة الاخضر الثابت F.C.F (fast green F.C.F)

٥. مجموعة صبغات الاكردين acridine ومن امثلتها صبغة برتقالي الاكردين acridine orange.

٦. مجموعة صبغات الزانثين xanthen ومن امثلتها الايوسين eosin.

٧. مجموعة صبغات كينون – أمين quinine–imine ومن امثلتها صبغة السفرانين O (Safranin O).

ثالثاً– تقسيم الصبغات حسب ميل اجزاء البروتوبلازم للاصطباغ بها لذلك يمكن تمييز نوعين من الصبغات :

١. **الصبغات النووية nuclear stains** هي تلك الصبغات التي تميل لصبغ النواة وبما أن النواة غنية بالحوامض النووية لذا تميل للاصطباغ بالصبغات القاعدية basic stains . توصف النواة وجميع اجزاء الخلية ذات الطبيعة الحامضية بأنها سريعة الميل للاصطباغ بالصبغات القاعدية وتدعى بالاجزاء القعدة basophil ولدى معاملة هذه الأجزاء بصبغات قاعدية فان الحوامض سوف تتحد مع الاجزاء القاعدية الملونة للصبغات مكونة أملاحاً ملونة غير ذائبة لذا فان الصبغات النووية هي صبغات قاعدية .

٢. **الصبغات السايتوبلازمية cytoplasmic stains** هي تلك الصبغات التي تميل لصبغ السايتوبلازم و نظراً لكون السايتوبلازم ذو طبيعة قاعدية لذا فأنه يميل للاصطباغ بالصبغات الحامضية . وتوصف جميع الاجزاء السايتوبلازمية ذات الطبيعة القاعدية بأنها سريعة الاصطباغ بالصبغات الحامضية وتدعى بالاجزاء الحمضة acidophil . عند معاملة هذه الاجزاء بالصبغات الحامضية فان الاجزاء القاعدية منها سوف تتحد مع الجذور الحامضية الملونة للصبغة لتكوين أملاح ملونة غير ذائبة . ومن هنا يمكن القول بأن الصبغات السايتوبلازمية هي صبغات حامضية.

رابعاً– تصنيف الصبغات حسب مصدرها

١.الصبغات الطبيعية Natural Dyes

يتم الحصول على الصبغات الطبيعية ، كما يدل اسمها ، إما من مصدر حيواني او نباتي وتستعمل خمسة أنواع من الصبغات الطبيعية في التحضيرات المجهرية بشكل واسع وهي : قرمز Cochineal وكارمين Carmine وهيماتوكسلين Hematoxylin وأورسين Orcein ، و سافرون Saffron .

أ.القرمز والكارمن Cochineal & Carmine : تستخرج هذه الصبغات من جسم حشرة صغيرة اسمها *Coccus Cacti* تعيش على نبات الصبار ، وتوجد الصبغة على شكل رحيق أرجواني في إناث هذه الحشرة . فإذا جمعت الإناث وجففت ، فإن القرمز ينتج على شكل مسحوق ، وان لم يضاف مرسخ Mondant للصبغة ، كالحديد أو الألومنيوم ، فلا يكون للقرمز اي ميل للأنسجة . وشب القرمز Alum Cochineal صبغة جيدة للنواة . وغلي القرمز مع ملح الشب ينتج راسبا لا يذوب في الماء يدعى كارمين carmine . ولا يستعمل هذا الراسب كصبغة إلا بعد اذابته بمحلول حامض الخليك Acetic Acid حيث يتكون كارمين خليك Acetocarmine الذي يستعمل كصبغة شائعة للنواة .

ب. الهيماتوكسلين Hematoxylin : هذه الصبغة واحدة من أكثر الصبغات شيوعا في التحضيرات المجهرية ، وتستخرج من خشب شجرة بقولية صغيرة اسمها *Hematorylin campechianum* تزرع في امريكا الجنوبية والوسطى . وتستخلص الصبغة بمعاملة الجذوع ب الإيثر Ether ، ثم تجفف وتذوب في الماء ، وبعد ذلك تصفى وتبلور . ولأن هذه الخطوات طويلة ومكلفة ، يعتبر الهيماتوكسلين من الصبغات غالية الثمن . ولا يستعمل هيماتوكسلين كصبغة نظرا لعدم ميله للأنسجة ، إلا بعد أكسدته ليكون هيماتين Hematein . ونتيجة لهذه الأكسدة فإن الهيماتوكسلين يفقد ذرتي هيدروجين. تكون أكسدة الهيماتوكسلين طبيعية وتتم بوسط كحولي أو مائي ، وتستغرق من ثلاثة إلى أربعة أشهر ، وتسمى هذه العملية التعتيق Ripening . ويمكن أن تتم هذه الأكسدة صناعياً وبسرعة وذلك بإضافة عوامل أكسدة مثل فوق اكسيد الهيدروم H_2O_2 ، وأكسيد الزئبق HgO ، وايودات البوتاسيوم KIO_4 ، وبيرمنجنات البوتاسيوم KMNO4 .

ج.اورسين Orcein : تستخلص من أشن (lichen) يسمى *Rocella* ويحضر بغلي الأشن في الماء ، مما يسبب انفساخ حامض ليكانوريك Locanoric acid إلى اورسينول Orceinol

الذي يكون الأورسين عند إضافة الأمونيا بوجود الاوكسجين الجوي وتصبغ هذه الصبغة الالياف المرنة elastic fiber في الانسجة الضامة.

ء.سفرون Saffron : يستخلص من مياسم نبات الزعفران Crocus .

هـ.نيلة Indigo : تستخرج من نباتات تنتمي للجنس Indigofera

٢.الصبغات المصنعة Synthetic Dyes

هذه مركبات عضوية تشتق من البنزين ، وقد اصبحت متوفرة في منتصف القرن التاسع عشر عندما وجد بيركن Perkin طريقة لعمل صبغات الأنيلين . ولعمل صبغة مشتقة من البنزين فإنه يجب ربط مجموعات كيماوية معينة تسمي حاملات الألوان Chromophores بحلقة البنزين . وتكون حلقة البنزين وحامل اللون مادة تدعى مولد اللون Chromogen . تجدر الإشارة هنا إلى أن مولد اللون لا يقوم بدور الصبغة وليس له أية قابلية لصبغ النسيج ولكي يقوم بهذا الدور ، يجب أن يحتوي مولد اللون مكونا قاعدياً وآخر حامضياً ، ويكون له بالتالي قدرة على تكوين ملح . وتدعى مجموعات الشق الكيماوي التي تضيف هذه الخاصية لمولد اللون مساعدات اللون Auxochromes ، ومنها : مجموعات هيدروكسيل OH− وأمينو NH2− ، و كاربوكسيل COOH− ، وسلفونيك SO− .

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.
٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.
٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.
4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة العاشرة

الصبغ

Staining

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

كلية العلوم قسم علوم الحياة   مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة العاشرة

الصبغ Staining

مرسخ الألوان (مثبت الألوان) Mordant

يظهر ما تقدم بأن عملية الصبغ سواء كانت ظاهرة فيزيائية أو عملية كيميائية أو ظاهرة كيميائية فيزيائية فان لون الصبغات يتحد بصورة مباشرة مع اجزاء الأنسجة او الخلايا وهذا ما يحدث فعلا مع معظم الصبغات الا ان هناك بعض الصبغات لا يمكنها الاتحاد بثبات وبصورة مباشرة مع اجزاء الأنسجة او الخلايا الا بوجود بعض المواد الوسطية وعادة تكون أملاح معدنية مثل أملاح الألمنيوم Al والكروم Cr والحديد Fe والباريوم Ba والبوتاسيوم K والاوزميوم Os والتي تعمل على زيادة اتحاد الوان الصبغات بالانسجة ويطلق على مثل هذه المواد بمرسخات الألوان mordants وعلى العملية بالترسيخ mordanting . عند معاملة الانسجة او الخلايا بمرسخات الألوان فسوف تتحد مع اجزاء الأنسجة او الخلايا من جهة وكذلك يعتقد بأن الوان الصبغات تمدص adsorb على سطوح المرسخات من جهة أخرى وبذلك يكون عمل المرسخ وسط بين لون الصبغات والأنسجة المصبوغة .

هناك ثلاث طرق لمعاملة الأنسجة بالمرسخات :

١. معاملة الأنسجة بمرسخات الألوان قبل عملية الصبغ ، وتتم باضافة المرسخ الى المثبت fixative المستخدم فمثلا تكون الوان صبغات الأنيلين واضحة جدا عندما تكون الأنسجة مثبتة بمثبت يدخل في تركيبه واحدا من المرسخات ، كالاوزميوم أو البكريك .

٢. معاملة الأنسجة بالمرسخات وذلك بمزجه مع الصبغة كما في حالة استخدام شب الحديد iron alum كمرسخ لصبغة هيماتوكسين هايدنهين Heidenhain's haematoxylin.

٣. معاملة الأنسجة بمرسخات الألوان بعد عملية الصبغ وهذه المعاملة قليلة الاستخدام كما في حالة استخدام اليود كمرسخ لألوان صبغات الانيلين حيث يفضل استخدامه عندما تكون الصبغد داخل الانسجة.

تخصص الصبغات وطرق الصبغ Specificity and methods of staining

تمتاز بعض الصبغات بتأثيرها الخاص حيث تصبغ فقط انسجة معينة أو أجزاءها وتعرف هذه الظاهرة بالتخصص specificity ومن أمثلة الصبغات المتخصصة specific هي صبغة ويكرت Weigert حيث تصبغ فقط الالياف الصفر المطاطة بلون ازرق الى اسود كذلك تقوم كل من صبغة الفلوروكلوسينول phloroglucinol وصبغة كلوريد الأنيلين بصبغ جميع الأنسجة الملكننة بلون احمر براق في الصبغة الاولى وبلون اصفر براق في الصبغة الثانية ، كما يصبغ محلول شولتز Schultze السليلوز بلون أزرق . بصرف النظر عن الصبغ التخصصي الذي يستخدم لاغراض معينة هناك طرق عامة للصبغ والتي تشكل جزءا من التحضيرات التخصصية وهي :

١.**الصبغ المتزايد Progressive staining** تعتمد طريقة الصبغ المتزايد على حقيقة أن بعض الصبغات كصبغة الكارمين carmine وصبغة الهيماتوكسلين haematoxylin تصبغان اولا النواة ثم بعدها السايتوبلازم ويتم ذلك بوضع الانسجة في محلول مخفف للصبغة ثم توضع بعدها في زجاجة ساعة وتفحص وتراقب تحت القوة الصغرى للمجهر الى ان يتم الحصول على شدة اللون المطلوب لصبغ النواة اولا ثم بعدها يصبغ السايتوبلازم، تستخدم هذه الطريقة لجميع الصبغات السايتوبلازمية وكذلك مع الصبغات المضادة counter stains . يفضل اتباع هذه الطريقة في الصبغ مع الطلبة المبتدئين وذلك لسهولتها.

٢. **الصبغ المتناكص (المتناقص) Regressive staining** تتلخص هذه الطريقة بوضع الأنسجة المراد صبغها في محاليل الصبغ الاساسية stock solutions المركزة الى ان يتم الحصول على افراط في الصبغ overstain لأجزاء الأنسجة ثم بعدها تبدأ عملية التمييز differentiation او ازالة الصبغات الزائدة باستخدام عوامل معينة . تستخدم هذه الطريقة لجميع

الصبغات النووية ولا يفضل اتباعها للمبتدئين وذلك لصعوبة الحكم على شدة التمييز المطلوب اثناء فحص اجزاء الأنسجة تحت المجهر .

٣. **الصبغ الصبغ المضاد Counterstaining** غالبا ما تستخدم ظاهرة الصبغ التخصصي في عمليات الصبغ المضاد counterstain وذلك عندما يصبغ جزء من نسيج او خلية بصيغة ملائمة ثم تصبغ بعدها الأجزاء الأخرى باستخدام صبغات ذات الوان مضادة ، ويجب أن نعلم بأن معظم عمليات الصبغ المضاد تتضمن احلال الصبغات الواحدة محل الاخرى في المواقع الأكثر ملائمة لها . فمثلا عند صبغ نسيج ما بصبغة السفرانين O اولا فان الصبغة سوف تصبغ جميع اجزاء الأنسجة بلون احمر ، وعند استخدام الصبغة الثانية المضادة ولتكن صبغة هيماتوكسلين ديلافيلد والتي تصبغ ايضا جميع اجزاء الأنسجة فإن الصبغتين تعملان مع بعضهما البعض وبطريقة الأزاحة التفاضلية differential displacement الى ان يتم في النهاية صبغ جميع الأجزاء السليلوزية بلون الصبغة المضادة وهي صبغة الهيماتوكسلين الزرقاء.

٤. **الصبغ المباشر Direct Staining** هذه هي الحالة التي يكون فيها صبغ الأنسجة كاف عندما توضع في محلول مائي او كحولي من الصبغة مثل أزرق ميثلين أو إيوسين دون الحاجة إلى وسيط.

٥. **الصبغ غير المباشر Indirect Staining** لا تصطبغ الأنسجة بكثير من الصبغات إلا بوجود وسيط يسمى المرسخ Mordant كما في الهيماتوكسين . وتستعمل الصبغة والمرسخ معا كما في هيماتوكسلين إيرليخ ، حيث يضاف إليه شب البوتاسيوم ، أو يستعمل المرسخ منفصلا عن الصبغة ، كما في هيماتوكسلين هايدنهين ، حيث يمرر النسيج أولا في شب الحديد.

التمييز Differentiation

يقصد بالتمييز زيادة التفريق في شدة درجات الصبغ لاجزاء الخلايا او الأنسجة المختلفة وكذلك لازالة الصبغات الزائدة و يجري التمييز عادة خلال عملية الصبغ المتناقص ومن اكثر

العوامل المستخدمة في التمييز هو الكحول المحمض acid alcohol والمحضر من ٧٠ % كحول مضافا اليه ١ % حامض الخليك او ٠,٥ % م للخلا حامض النتريك او الهايدروكلوريك المركز، ان الكحول المحمض ليس هو الوحيد المستخدم في التمييز بل تستخدم في بعض الاحيان عوامل مميزة تختلف باختلاف الصبغات فمثلا يستخدم زيت القرنفل clove oil لتمييز صبغة البنفسجي البلوري crystal violet و محلول شب الحديد iron-alum لتمييز صبغة الهيماتوكسلين الحديدية iron haematoxylin. تتم عملية التمييز بوضع النماذج في زجاجة ساعة مملوءة بالمحلول المميز الى ان يتم الحصول على افضل لون للصبغة ، أما في حالة المقاطع الملصوقة على الشرائح فيمكن امرارها في قناتي كوبلن مملوءة بالمحلول المميز وتفحص المقاطع بين حين وآخر تحت القوة الصغرى للمجهر ، بعدها تغسل ب ٧٠ % كحول ثم تصبغ بالصبغة المضادة اذا دعت الحاجة لذلك ثم يجرى الانكاز في كحول ٩٦% و ١٠٠% ثم تروق وتحمل.

التحول اللوني Metachromasia

تمتاز بعض الصبغات القاعدية بقدرتها على صبغ التركيب الخلوية والنسيجية المختلفة بألوان مختلفة وبنفس الصبغة وتعرف مثل هذه الحالة بظاهرة التبدل اللوني metachromasia وتعتبر هذه من الظواهر المهمة في الدراسات النسيجية ، فمثلا صبغة السفرانين تصبغ السايتوبلازم بدرجات مختلفة من اللون الأحمر وتصبغ أرضية الغضاريف cartilage matrix بلون أصفر ، كذلك صبغة الثايونين thionin تصبغ الكروماتين بلون ازرق وتصبغ المواد المخاطية mucus وارضية الغضاريف وحبيبات الخلايا البدينة mast cells بلون احمر ، وتفسير ذلك هو ان الصبغة في محلولها المائي تظهر لونين الأول لونها الاعتيادي الأزرق والثاني اللون المتبدل الأحمر metachromatic red ، يوجد هذان اللونان معا ويكون اللون الأحمر بشكل مبلمر للون الأزرق . يظهر اللون الأزرق عند زيادة درجات الحرارة او خفض الأس الهايدروجيني او تقليل تركيز الصبغة او اضافة الاملاح او الكحول ، بينما يظهر اللون الأحمر عند انخفاض درجات الحرارة أو زيادة الأس الهايدروجيني او زيادة تركيز الصبغة كذلك وجود بعض الأملاح العضوية للكبريت التي لها اوزان جزيئية عالية تزيد في ظهور اللون الأحمر فالمادة المخاطية وارضية الغضاريف والمواد الحبيبية للخلايا البدينة مثلا تمتلك هذه الطبيعة

لذلك فهي تظهر التبدل اللوني، ومن الصبغات الاخرى التي تمتاز بهذه الظاهرة هي صبغة المثيلين البنفسجية وصبغة الأزور A (azure A) والأزور B (azure B) وصبغة أزرق التولودين toluidine blue . أن أكثرية الصبغات لا تظهر التبدل اللوني بل تصبغ بصورة مباشرة وبنفس لون صبغها وتعرف مثل هذه الصبغات بالصبغات سوية اللون orthochromatic. يجب أن نذكر هنا بأن ظاهرة التبدل اللوني metachroming يجب أن تميز عن ظاهرة تعدد الألوان polychroming حيث أن الأخيرة تظهر تعدداً في الوان الصبغة وبصورة تلقائية spontaneously فمثلا صبغة أزرق المثيلين في المحلول تتأكسد إلى واحد أو أكثر من مركبات المثيل ذات درجات تنازلية في التميثل methylation لذلك يطلق على مجاميع ازرق المثيلين بأزرق المثيلين المتعددة الألوان polychrome methylene blue.

حالات صبغ العينات

تصبغ العينات البيولوجية كمقاطع ، أو كنماذج كاملة ، أو كمسحات او هرسات .

١. **صبغ المقاطع Section Staining** هذه طريقة تقليدية لصبغ التحضيرات المجهرية ، وتستعمل لصبغ مقاطع من أنسجة نباتية أو حيوانية . وعادة ما يزال البرافين من المقاطع باستخدام الزايلين ، ثم يزال الزايلين باستخدام كحول مطلق . وتمرر الشرائح الحاملة للمقاطع بعد ذلك في تدرج كحولي هابط حتى تصل إلى تركيز كحولي مساو لقوة تركيز الكحول الذي تكون الصبغة مذابة فيه . أما إذا كانت الصبغة مذابة أصلا في الماء فلا بد من تمرير الشرائح هبوطا في التدرج الكحولي الكامل (مطلق ، ثم ٩٥ ٪ و ٧٠ ٪ و ٥٠ ٪ و ٣٠ %) ثم تنقل الشرائح إلى ماء مقطر وذلك قبل نقلها إلى محلول الصبغ المائي .

٢. **صبغ النماذج الكاملة Whole Mount Staining** تستخدم هذه الطريقة لصبغ النماذج الكاملة التي قد تكون حيوانات مجهرية أو اجزاء نباتية أو أجنة صغيرة ، ولكن نادرا ما يكون توزيع الصبغ متساوياً في مختلف اجزاء العينة . وتستخدم هذه الطريقة لصبغ الأجنة قبل تحضير مقاطع منها حتى يسهل تمييزها في قالب الشمع ، وتجري جميع عمليات الصبغ وما يتبعها في صحن زجاجي صغير او صحن سيراكوز Syracuse dish وبطبيعة الحال تكون العنيات المصبوغة كنماذج كاملة غير معرضة لعمليات التشريب والطمر والقطع .

٣. **صبغ المسحات والهرسات Smear & Squash Staining** تشبه هذه الطريقة تلك التي تستخدم في صبغ المقاطع ، ولكن لا توجد حاجة لأزالة الشمع لأنه ليس موجودة على الشرائح أصلا . وإذا اريد جعل هذه التحضيرات دائمة فإنه يجب تجفيف العينات المصبوغة وترويقها وتغطيتها ببلسم كندا ثم بالغطاء الزجاجي . ومن العينات التي تصبغ كمسحات : البول والدم وسقف الحلق . ومن أمثلة العينات التي تصبغ كهرسات الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة والقمم النامية من جذور وسيقان النبات .

بعض الصبغات المختارة، طرق تحضيرها واستعمالها:

أ. الصبغات المفردة Single stains مثل

١.صبغة بوراكس – كارمين borax–Carmine من الصبغات المتعادلة neutral stain التي تستخدم بصورة عامة لصبغ المقاطع وكذلك النماذج الكاملة الصغيرة حيوانية كانت أم نباتية مثل جنين الدجاج chick embryo والعضلات muscles وطحلب fucus وتحضر هذه الصبغة من : ٤ غم من مسحوق البوركس + ٣ غم من صبغة الكارمين +١٠٠سم^3 ماء مقطر يسخن المزيج ثم يضاف ١٠٠ سم^3 كحول ٧٠ % يترك لمدة يومين ثم يرشح المحلول .

٢.السفرانين O (Safranin O) من الصبغات القاعدية المهمة جدا وخصوصا بالنسبة للأنسجة النباتية حيث تصبغ جميع الاجزاء الملكننة والمسوبرة والمكيتنة والكروموسومات والنواة والاجسام المركزية والفطريات والصفائح المنخلية والأوعية الخشبية وكذلك تصبغ الأنسجة الحيوانية حيث تصبغ الألياف المرنة والحيوانات وحيدة الخلية والخلايا النطفية. تحضر هذه الصبغة من اذابة : ١ غم من الصبغة في ١٠٠ سم^3 من كحول مطلق تخفف بالماء المقطر بنسبة ١:١قبل استعمالها للصبغ، تعتمد فترة الصبغ على طبيعة النماذج وتتراوح بين ٢–٤٨ ساعة.

ب. الصبغات المزدوجة مثل

صبغة مان Mann's stain من الصبغات المزدوجة الجيدة والتي تستخدم بصورة عامة لصبغ المقاطع تحضر هذه الصبغة بمزج :

٣٥ سم^3 من ازرق المثيل تركيز ١ %

٣٥سم^3 من الأيوسين Y المصفر تركيز ١ %

١٠٠سم^{3} ماء مقطر

ت. الصبغات الثلاثية Triple stains

ومن أمثلتها صبغة مالوري الثلاثية Mallory's triple stain آن صبغة مالوري الثلاثية تعطي نتائج جيدة خاصة بعد تثبيت النماذج في محلول زنكز وتنكز في الكحولات وهي جيدة لصبغ كل من الاسكارس والغضاريف والانسجة الرابطة بلون ازرق والسايتوبلازم والأمعاء والغدد اللمفاوية والاعصاب ونوى الخلايا والمبايض والبنكرياس والغدد النخامية والغدد اللعابية والخصى والغدد الدرقية بلون احمر. تحضر المحاليل الثلاثة التالية كالآتي :

محلول (أ) ويحضر من : ٠,١ غم من صبغة فيوكسن الحامضية

١٠٠ سم^{3} ماء مقطر

محلول (ب) ويتألف من : ١٠٠ سم^{3} من حامض المولبيديك الفوسفوري Phospho – molybdic acid

محلول (ج) يتكون من : ٠,٥ غم من صبغة ازرق الأنيلين

٢ غم من الصبغة البرتقالية G

٢ غم حامض الاوكزاليك

١٠٠ سم^{3} ماء مقطر

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.

٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.

٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.

4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الحادية عشر

التحميل واوساطه

MOUNTS AND MOUNTANTS

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الحادية عشر

التحميل وأوساطه MOUNTS AND MOUNTANTS

ان الغرض الأساسي من التحميل هو لأجل الحفاظ على النماذج او المقاطع اطول مدة ممكنة وكذلك للتخلص من الهواء والغبار بوضع غطاء الشريحة على المقاطع المحملة لأجل فحصها مجهرية . تختلف اوساط التحميل باختلاف طرق التحضير وكذلك باختلاف معامل انكسار خلايا الأنسجة بعد تثبيتها وترويقها ، ويفضل اختيار وسط التحميل بحيث يقترب معامل انكساره من معامل انكسار الزجاج والذي يبلغ حوالي ١,٥٤ . تكون اوساط التحمل في حالة التحضيرات المؤقتة سائلة عادة لمنع الأنسجة من الجفاف اما في حالة التحضيرات الدائمية فتكون أوساط التحميل جيلاتينية gelatinous او راتنجية resinous.

ويمتاز وسط التحميل الجيد بما يأتي:

أ.الامتزاج الكلي مع وسط الترويق (إن كانت هناك حاجة للترويق) .

ب . اقتراب معامل انكساره من معامل انكسار الزجاج .

ت. عدم التفاعل مع الصبغة أو مكونات النسيج

ث. عدم تشويه التراكيب المصبوغة

ج.عدم التشقق أو التحبب عند جفافه

ح. عدم تلاشي الصبغة مع مرور الوقت نتيجة لأكسدته

بصورة عامة يمكن تقسيم اوساط التحميل mountants إلى نوعين :

١ -اوساط تحميل تمتزج مع الماء بحيث يمكن نقل النماذج اليها بصورة مباشرة .

٢ -أوساط تحميل لا تمتزج مع الماء لذلك تحتاج النماذج لعملية الانكاز والترويق قبل التحميل .

أوساط التحميل المؤقتة Temporary mounting media

تستخدم هذه الأوساط بصورة خاصة لجميع النماذج الصغيرة والرقيقة التي تتلف من كثرة المعاملات اللاحقة . وعند التحميل بهذه الأوساط لا تحتاج النماذج لعملية الانكاز والترويق بل يجب غمرها في الماء المقطر قبل تحميلها ومن بين هذه الاوساط:

١-المحاليل الملحية Normal solution

تستعمل محاليل ملح الطعام لتحميل النماذج الحيوانية بتراكيز مختلفة تبعاً لنوع النموذج والنسيج المراد تحميله بصورة مؤقتة فمثلا يحضر محلول كلوريد الصوديوم بتراكيز ٠,٩ % لتحميل انسجة الثديات عدا انسجة الدم

٠,٧٥% لتحميل انسجة الطيور وانسجة اللافقريات

٠,٦٤ % لتحميل انسجة البرمائيات

٠,٦ % لتحميل الفقريات الأخرى

اما بالنسبة لتحميل الحشرات فيستخدم محلول ملحي مؤلف من

٠,٠٢ غم كلوريد الكالسيوم و ٠,٧ غم كلوريد الصوديوم مع ١٠٠سم^{٣} من الماء المقطر .

٢-الكليسرين Glycerin

يحضر الكليسيرين بنسب وطرق مختلفة تعتمد على نوع المادة المحملة ولكن بصورة عامة يحضر لتحميل النماذج الحيوانية و بمزج:٥٠ سم^{٣} من الكليسرين مع ٥٠ سم^{٣} من الماء المقطر واضافة ١ سم^{٣} من محلول الثايمول المركز . و يحضر الكليسرين لتحميل النماذج

النباتية خاصة بعد صبغها بصبغة ازرق الانيلين وحامض البكريك بمزج : ٥٠ سم^{3} من الكليسرين مع ٥٠ سم^{3} من الماء المقطر ثم يضاف ٥سم^{3} من حامض الهيدروكلوريك المركز.

٣-الكحول Alcohol

يستخدم الكحول بتركيز ٣٠ % لتحميل النماذج النباتية عادة لدى فحصها مجهرياً .

اوساط التحميل الدائمية Permanent mounting media.

١. **جيلاتين الكليسرين Glycerin jelly** يستخدم جيلاتين الكليسرين في التحميلات الدائمية ولكن بعد الانتهاء من التحميل يجب احاطة غطاء الشريحة بالشمع الذائب او بطلاء الاظافر وذلك للحفاظ على محاليل التحميل من التبخر وكذلك لطرد الهواء .

يحضر جيلاتين الكليسرين من:

١٠ غم جيلاتين +٦٠ سم^{3} ماء مقطر . يترك المزيج لمدة ساعتين ثم يضاف ٧٠ سم^{3} من الكليسرين و ٠,٢٥ غم من بلورات الفينول . يسخن المزيج ويرج لمدة ١٥ دقيقة إلى أن تختفي قطع الفينول

٢.**الأوساط الصمغية Gum media** يوجد نوعان من الأوساط الصمغية

أ- تلك التي تكون ذات معامل انكسار واطىء حيث تظهر النماذج المحملة فيها غير شفافة ومن امثلتها

١. وسط فارانت Farrant's medium والذي يحضر بمزج

٤٠ سم^{3} من الماء المقطر

٤٠ غم من صمغ نبات الأكاسيا.

٢٠سم^{3} من الكليسرين

٠,١ غم من الفينول

٢.وسط كري و ويز Gray and Wess's medium. ويحضر بمزج

٢ غم من كحول متعدد الفينيل

٧سم^{3} من الأسيتون المركز تركيز ٧٠ %

٥سم^{3} من الكليسرين

٥ سم^{3} من حامض اللبنيك lactic acid

١٠سم^{3} من الماء .

ب. تلك التي تكون ذات معامل انكسار عال حيث تظهر النماذج فيها شفافة . ومنها وسط بيرليز Berlese medium ويحضر من :

١٠ سم^{3} من الماء

٣سم^{3} حامض الخليك الثلجي

٥سم^{3} من الدكستروز

٨ غم من صمغ الأكاسيا

٧٥ غم الكلورال المائي

٣. الكحول متعدد الفينيل – الفينول اللبني vinyl alcohol – lacto – phenol

يستخدم هذا الوسط لتحميل الحشرات ويرقاتها ويكون هذا المزيج شبه سائل ويبلغ معامل انكساره حوالي ١,٤٥ ويتحضر من :

٢٥ سم^{3} من حامض اللبنيك

٢٢ غم من الفينول

٥٦ سم٣ كحول متعدد الفينيل . تذاب بلورات الفينول في الحامض ثم يضاف الكحول متعدد الفينيل اليه يبرد المزيج ثم يرج وبعدها يسخن في حمام مائي إلى أن يصبح المحلول رائقاً

٤.**الاوساط الراتنجية Resinous media** يوجد نوعان من اوساط التحميل الراتنجية :

أ- أوساط يمكن نقل النماذج اليها مباشرة من الكحولات ويطلق عليها أوساط التحميل المتعادلة Neutral mounting media وتستخدم بصورة واسعة لتحميل مسحات الدم التي تتأثر عادة بحموضة أوساط التحميل الأخرى كبلسم كندا . ومن أشهر أوساط التحميل المتعادلة هو اليوبرال euparal الذي يمتاز اضافة لكونه وسط تحميل فهو يعمل كمروق ايضا كا يمكن تحميل النماذج أو المقاطع فيه وهي غير تامة الانكاز .

ب - أوساط لا يمكن التحميل بها الا بعد انكاز النماذج وترويقها ومن بينها بلسم كندا ، وهو أحد إفرازات نبات *Albies balsamea* ويمكن الحصول عليه تجارياً بشكلين :

١ -البلسم الطبيعي natural balsam وهو مادة لزجة سميكة القوام وتستعمل للتحميلات الكاملة wholemounts.
٢ -البلسم الجاف dry balsam ويكون بشكل صلب بعد ازالة التربنتين منه يذاب البلسم الجاف في الزابلين لتحميل المقاطع عادة ويحضر باذابة :
٦٠ غم من البلسم الجاف في ٤٠ غم من الزايلين.
ولهذا الوسط عدة فوائد ، هي :

أ.له معامل انكسار ١,٢٥ وهو قريب جدا من معامل انكسار الزجاج

ب.شفاف ولا لون له عند تجفيفه .

ج. يجف بدون تحبب .

ء. يذوب بسهولة في الزايلين .

غير أن لهذا الوسط سلبية تتمثل بزيادة دكانته بمرور الزمن ، إضافة إلى أنه يصبح حامضياً نظرا لأكسدته الوسط الزايلين ، مما يسبب الشحوب التدريجي لعدة صبغات.

٥.الأوساط الراتنجية الصناعية Synthetic resinous media

يوجد العديد من هذه الأوساط التي تستخدم في التحميل ومنها :

أ. (D.P.X) Distreme – Plasticitet – Xylene

وهو من الأوساط الصناعية المتعادلة الذي يبقى عديم اللون لسنين طويلة وهو منافس لوسط بلسم كندا في كثير من مختبرات التحضير المجهري وذلك بسبب شفافيته وسرعة جفافه واعتدال سعره وعدم تأثيره على الصبغ.

ب. الراتنج متعدد الاستعمالات Polyester resin

يستخدم هذا الوسط لتحميل النماذج بصورة كاملة وكذلك للمقاطع و يمتاز بسرعة تصلده كليا خلال أسبوع كما انه يمسك غطاء الشريحة في مكانه دون ان يتحرك عند تحميل النماذج الكاملة به كما يحدث عند التحميل باسم كندا.

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.

٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.

٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.

4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الثانية عشر

التحميل الكلي

Whole Mount

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

كلية العلوم قسم علوم الحياة   مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الثانية عشر

التحميل الكلي Whole Mount

هناك العديد من المواد والنماذج التي يمكن دراستها بصورة امثل عندما تحمل كاملة دون قطعها . من النماذج النباتية التي تحمل كاملة الطحالب والفطريات الخيطية والطحالب شبه الثالوسية المسطحة flat thalloid algae والاجسام الثالوسية الأولية prothalia للسراخس والحزازيات الرهيفة والقائمة واجزاء من بشرة الورقة المحتوية على الثغور وأحيانا على الزوائد او الغدد ، كما يمكن تحميل بثرات السرخسيات fern sori والأزهار الصغيرة وحبوب اللقاح . أما النماذج الحيوانية التي تحمل كاملة فهي الابتدائيات والهدبيات والمفصليات الصغيرة والديدان المسطحة وغيرها اضافة الى بعض التراكيب الصلبة كالشعر وحراشف الأسماك وغيرها.

تفيد التحميلات الكلية في اظهار كثير من ملامح وطبيعة اعضاء النموذج التي لا يمكن اظهارها بطرق القطع . ففي التحضيرات الجيدة للأجسام الأولية للسراخس مثلا يمكن تتبع نشوء الانثيريديا والاركيكونيا بسهولة أكثر مما في حالة المقاطع كما أن طريقة التحميل الكلي تعتبر الوسيلة الوحيدة التي يمكن بواسطتها حفظ الشكل الجذاب لبعض النباتات الرهيفة كالطحالب الحمر مثلا . والتحميلات الكلية نوعان :

١.تحميلات كلية مؤقتة وشبه دائمية Temporary and semipermanent whole mounts وفيها يكون وسط التحميل قابلا للامتزاج بالماء كالاوساط الصمغية التي توضع فيها النماذج مباشرة

٢.تحميلات كلية دائمية Permanent whole mounts وفيها يكون وسط التحميل راتنجيا يتطلب تهيئة النماذج بطريقة مطولة

تحميلات الكلية المؤقتة وشبه الدائمية

أن ابسط التحضيرات واكثرها شيوعا تلك التي يكون فيها وسط التحميل قابلا للامتزاج بالماء كالاوساط الصمغية gum media وان كثيرا من النماذج البسيطة كحراشف الأسماك وشعر الحيوانات يمكن تحميلها في الأوساط المائية بطريقة اسهل واسرع من تحميلها في الأوساط الراتنجية ، تحضر التحميلات الكلية المؤقتة للنماذج الصغيرة كالبراميسيوم بالاوساط المائية بطريقة بسيطة عادة وذلك بأخذ قطرة من السائل الذي يحتوي على النماذج ووضعها على شريحة زجاجية وتغطيتها بغطاء الشريحة ، ولفحص تحميلات الكائنات الحية الدقيقة السريعة الحركة تتبع وسائل عديدة للتقليل من سرعة حركتها ومن ابسط هذه الطرق هي وضع قطعة صغيرة من ورق تنظيف العدسات فوق الشريحة الزجاجية ثم وضع قطرة من الوسط الحاوي على النموذج المراد فحصه فوقها وعند تغطيتها بغطاء الشريحة تتكون ردهات صغيرة بين الورق تحجز الحيوانات الصغيرة فتبطأ حركتها، ومن الوسائل الاخرى المتبعة ايضا مزج المنقوع او الوسط الحاوي على النماذج بحجم مساو له من الاكار بتركيز ٠,٥ % فيزيد في كثافة قوام المنقوع وتبطأ حركة اغلب الكائنات فيه ، وقد يستخدم ال carboxymethyl celluons لنفس العرض ايضا.

ان التحملات المائية تجف عادة اثناء الفحص الطويل مما يسبب تلف النموذج المفحوص لذلك يستحسن تحميل النموذج بمحلول ١٠ % كليسرين ثم تضاف كميات اخرى من الكليسرين تحت حافة غطاء الشريحة الزجاجي كلما تبخر قسم من الماء إلى ان تتوقف عملية التبخر وبذلك يصبح المستحضر قابلا للخزن لمدة غير محدودة من الزمن بشرط أن يحفظ بوضع أفقي ويعامل بعناية ، يمكن تقليل عملية تبخر الماء بعمل دائرة او مربع صغير من جيلاتين البترول petroleum jelly في وسط الشريحة الزجاجية قبل وضع القطرة الحاوية على النموذج في مكانها ثم يضغط غطاء الشريحة برفق فوقها الى ان يلتصق بجيلاتين البترول فيصبح النموذج ووسط التحميل معزولين عن الهواء . من النماذج الحيوانية التي تحمل بالاوساط المائية الابتدائيات وكثير من اللافقريات الصغيرة خاصة المفصليات ، ومما يجدر ذكره ان تحميل اللافقريات الصغيرة بهذه الأوساط قد لا يعطي نتائج مرضية دائما ذلك لأن معامل انكسار تلك الحيوانات قد يصبح في النهاية مساوياً لمعامل انكسار وسط التحميل وبذلك يصعب تمييز

النموذج ، يستخدم في التحميل الكلي للنماذج النباتية كالطحالب والفطريات و الاجسام الأولية للسرخسيات مجموعة من المحاليل يدخل في تركيبها الفينول (حامض الكاربوليك carbolic acid) وحامض اللبنيك lactic acid لما تتميز به هذه المركبات من خواص للحفظ والعمل على الانتفاخ . من تلك المحاليل الفينول اللبني lactophenol و فينول – كليسرين phenol – glecerin.

ان افضل الأصباغ المستخدمة في صبغ الطحالب الخيطية والفطريات هي اصباغ الهيماتوكسلين ذاتية الترسيخ self – mordanting hematoxylins والهيماتوكسلين الحديدي iron hematoxylin.

التحميلات الدائمية Permanent mounts

تعتبر الشرائح الدائمية المصبوغة والمحملة بوسط صلب افضل بكثير من التحضيرات اللينة المؤقتة وشبه الدائمية . تستعمل الأوساط الراتنجية في التحميل الكلي للنماذج لجعلها اكثر شفافية نتيجة لزيادة معامل انكسارها عندما تتشرب بمادة الراتنج ، والراتنج لا يمتزج بالماء عادة لذا يجب انكاز النموذج ومن ثم ترويقه بمروق قابل للامتزاج بالراتنج . وتتضمن عملية تحضير الشرائح الدائمية الخطوات التالية : –

١.التخدير وتثبيت النماذج

قبل تثبيت النماذج الحيوانية الحية يجب تخديرها اولاً منعا للانكماش العضلي الذي قد يصاحب عملية التثبيت ، ويجب أن تتم عملية التخدير ببطء وذلك بزيادة نسبة العامل المخدر تدريجيا ولا يضاف المثبت الا بعد ان تتوقف حركة الحيوان تماماً ، لا تحتاج النماذج النباتية إلى تخدير بل تثبت مباشرة في احد المثبتات المناسبة .

٢.اختيار الصبغة المناسبة

تغسل النماذج بالماء للتخلص من محاليل التثبيت أو الحفظ تمهيدا لصبغها تستعمل صبغة الكارمين مع اللافقريات الصغيرة ويرقاتها وتجري عملية الصبغ بالطريقة المتناقصة وذلك بفرط صبغها ثم تمييزها بالكحول المحمض لازالة الصبغة الزائدة . أما النماذج الكبيرة كاللافقريات

الكبيرة فيستحسن صيغه بالطريقة المتزايدة وذلك بتعريضها لمحلول ضعيف للصبغة لفترة معينة ولا تحتاج لعملية تمييز . تصبغ اجنة الفقريات بصبغة الهيماتوكسلين بصورة افضل من صبغها بصبغة الكارمين . أما مع النماذج النباتية كالطحالب والفطريات فقد تستعمل صبغة السفر انين أو اصباغ الهيماتوكسلين ذاتية التثبيت self – mordanting heamatoxylins للحصول على افضل النتائج وتكون الطريقة كالآتي :

أ.توضع النماذج في محلول الصبغة لمدة ٠,٥–١ ساعة حتى تصطبغ بشدة

ب. تغسل بالماء المقطر حتى يصبح ماء الغسل خاليا من اللون

ج.يوضع النموذج في اناء قليل العمق ويغطى بحامض الهيدروكلوريك تركيز ٠,١ % ويرج الاناء برفق لازالة الصبغة .

ء.يسكب الحامض ويشطف النموذج بماء الحنفية ويفحص تحت المجهر .

هـ.تعاد عملية ازالة الصبغة بالحامض حتى تبقى النوى والبايرنويدات فقط سود – زرق blue – black بعدها يغسل النموذج جيدا بماء الحنفية .

٣– الانكاز والترويق

توضع النماذج الحيوانية او النباتية مصبوغة ام غير مصبوغة اما في ماء مقطر او ٧٠ % كحول تبعا لنوع المعاملة السابقة لهذه الخطوة . يجري الانكار بالكحول الإثيلي بتراكيز متدرجة في القوة تصاعديا وقد جرت العادة أن تبدأ العملية من تركيز ٣٠ % ثم ٥٠ % ثم ٧٠ % ثم ٩٥ % ثم كحول مطلق ويمكن حذف التركيزين الأول والثاني والانتقال مباشرة من الماء إلى ٧٠ % كحول إلا اذا كانت النماذج رهيفة . يجب ان تكون عملية الانكاز تامة قبل الترويق والا تعرض النموذج للتلف عند تحميله بالوسط الراتنجي لذا يجب أن تبقى حتى اصغر النماذج في الكحول المطلق مدة لا تقل عن ٢٤ ساعه قبل اية محاولة لترويقها . يجب ان يكون العامل المروق قابل للامتزاج مع كل من الكحول والوسط الراتنجي المستعمل في التحميل كالزيوت الاساسية التي تكون مثالية لهذا الغرض فهي تكسب النموذج درجة من الشفافية مساوية لما يكسبه له الراتنج المستعمل في التحميل . يعتبر زيت التربينول terpineol افضل هذه الزيوت

لأنه يمتزج بسرعة الكحول تركيز ٩٠ % مما يساعد على ازالة اي اثر للماء الذي قد يتبقى في النموذج اذا كانت عملية الانكاز غير تامة ، كما انه لا يجعل النماذج هشة وله رائحة عطرة خفيفة . أما زيت القرنفل الذي يشيع استعماله لترويق التحميلات الكاملة فله رائحة قوية جدا ويجعل النماذج هشة لذلك يصعب الحصول على تحميلات كلية للمفصليات الصغيرة مثلا دون أن تتكسر بعض لواحقها اذا ما روقت بهذا العامل.

٤ -التحميل بالراتنج

يدل مصطلح الراتنج resin على بلسم كندا وعدد من الراتنجات الصناعية المستعملة في التحميل . من السهل جدا تحميل النموذج ببلسم كندا والتحميل الكلي الجيد يجب أن يكون رائقا كالزجاج وهذا لا يكون الا اذا كان انكازه تاما ومروقا في زيت التربينول او زيت القرنفل قبل تحميله بالراتنج لذلك فان اولى خطوات التحميل ببلسم كندا هي التأكد من أن النموذج الموجود في الزيت الأساسي رائقا كالزجاج أما الخطوة التالية فهي استعمال بلسم كندا الطبيعي وليس البلسم المذاب في الزايلين الذي يستعمل لتحميل المقاطع عادة . يكون البلسم الطبيعي كا هو مناسب جدا للتحميل الكامل ويمكن تسخينه برفق اذا كان قوامه غليظا حتى يصبح بالقوام المطلوب . يحمل النموذج بوضعه في قطرة من البلسم على شريحة نظيفة ويخفض غطاء الشريحة فوقها أفقيا الى أن يلامس وسط الغطاء القطرة ثم يترك الغطاء حراً ليأخذ مكانه تدريجيا او ان يضغط عليه برفق حتى يلامس الجزء العلوي من النموذج وبهذه الطريقة يمكن ابقاء النموذج في مكانه في وسط غطاء الشريحة.

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.
٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.
٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.
4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.

جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الثالثة عشر

طرائق المسح،الهرس والتجميد

Smearing, Squashing and Freezing Methods

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

كلية العلوم قسم علوم الحياة مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة

المحاضرة الثالثة عشر

طرائق المسح والهرس والتجميد Smearing, Squashing and Freezing Methods

تستعمل هذه الطرائق في التحضيرات المجهرية السريعة للحصول على نتائج فورية ، وهي مفيدة جدا في البحوث والدراسات المختصة بعلم الخلية والأمراض النسيجية والأحياء الدقيقة .

١.المسح Smearing

تستعمل هذه الطريقة للأنسجة التي يصعب قطعها ، وخاصة سوائل الجسم كالدم والسائل المخي وسائل النخاع الشوكي والبول ، كما تصلح لأخذ مسحات من سطوح الأعضاء الطرية الرطبة مثل تجويف الفم وسقف الحلق إضافة إلى نخاع العظام .

تعمل المسحة بفرش السائل بين شريحتين أو بين شريحة وغطائها للحصول على طبقة رقيقة . وهنالك طرائق عدة لإجراء عملية المسح لعل مسحة الدم كثرها شيوعا اذ توضع قطرة دم على الشريحة الأفقية وتسحب قليلا بالشريحة العليا باتجاه اليمين ثم يسحب الدم بواسطة الشريحة العليا باتجاه اليسار ثم تثبت المسحة باستخدام مثبت مناسب ، وتحرك الشريحة في الهواء حتى تجف وتستعمل هذه الطريقة لمسحات البكتيريا و كريات الدم الحمراء والبيضاء، اما الانواع الاخرى من المسحات فتثبت قبل تجفيفها ، وذلك باستعمال بخار المثبت كحامض الأوزميك أو الفورمالين ، إذ تقلب الشريحة التي تحمل المادة المفروشة فوق صحن بتري Petri Dish او سيراكوز Syracuse يحتوي المثبت لمدة ٣-٥ دقائق.

في الحالات التي تكون فيها المادة المفروشة على الشريحة مخاطية أو بروتينية كمسحات المهبل أو البروستاتا أو تلك المأخوذة من الفم فإنه يمكن غسلها بعد تثبيتها اما المسحات التي لا تحتوي على بروتين كالبول فإنه يمكن ترسيبها بالطرد المركزي ، ثم تمسح على شريحة عليها بياض البيض ويمكن تثبيت المادة المراد مسحها بالفورمالين ، ثم ترسب بالطرد المركزي ، ويعلق

الراسب في محلول ملحي مضاف له نقطتين من الألبومين لكل ١٥ مل من المحلول ثم تمسح على الشرائح وتجفف.

ان الخطوة الأخيرة في تحضير المسحات هي صبغها ، ويمكن استعمال عدة صبغات تبعا لنوع المسحة . فمسحات الدم تصبغ بمخلوط من أزرق ميثيلين وإيوسين ، وهذا المخلوط يعمل كمثبت وصابغ في نفس الوقت ، ثم يزال الماء من التحضير باستعمال تدرج كحولي صاعد ، وبعد ذلك يروق وتغطى الشريحة .

ويمثل المسح وسيلة جيدة للتشخيص في علم الخلية التشخيصي والأمراض النسيجية . فتحضير المسحات من الإفرازات أو الكشطات أو السوائل تساعد على تشخيص الحالات المرضية ، لأن فحص هذه التحضيرات يعطي فكرة جيدة عن إصابات الأنسجة أو عمل الغدد الصماء أو أنواع تفاعلات الانسجة كذلك تستعمل هذه الطريقة بشكل روتيني في مختبرات الاحياء الدقيقة.

٢. الهرس (الدعك) Squashing

هذه طريقة أخرى لعمل التحضيرات المؤقتة للأنسجة التي ليست طرية بالقدر الذي يسمح لمسحها ، ولا هي صلبة بدرجة تكفي لقطعها دون طمر مسبق . ومن العينات التي تخضع للهرس الأجزاء النامية في النباتات كالقمم النامية في الساق والجذر ، والمياسم والمبايض ، و الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة ، والعقد الليمفاوية ، والأورام الطرية ، ونخاع العظم والحويصلات المنوية والخصية .

يهرس النسيج بوضع العينة على شريحة نظيفة وتفرش تحت غطاء الشريحة بضغط يمكن من نشر وفرد الخلايا . ومن المعتاد أن تحاط العينة بسائل مناسب قبل هرسها ، ويعتمد اختيار هذا السائل على طبيعة العينة والغاية من التحضير فالقمم النامية للجذور أو السيقان والأوراق توضع عادة في محلول حامض الهيدروكلوريك HCl ليفكك جدر الخلايا قبل أن تصبغ باسيتوكارمين Acetocarmine أو أسيتواورسين Acetoorcein .

تناسب طريقة الهرس لإظهار دراسة الكروموسومات ، ذلك أن السيتوبلازم يتهتك أثناء التحضير ، وبذلك تختلف طريقة الهرس عن المسح التي تحافظ على البنيان السيتوبلازمي

والنووي معا . وتعامل العينات الطازجة قبل هرسها إما بالماء المقطر أو بمحلول منخفض الضغط الأوزموزي من سترات الصوديوم ٠,٣٧ % حيث تتفكك الخلايا وتتضح الكروموسومات فيسهل عدها . وتصبغ الهرسات إما بأسيتوكارمين أو اسيتو أورسين ، فيسهل تصوير وتنميط الكروموسومات Karyotyping .

يمكن تحويل الهرسات المؤقتة إلى دائمة بوضع الشريحة على قالب من الجليد الجاف المدة ٥ دقائق حتى يكتسي غطاء الشريحة بالجليد ، لأن استعمال أي طريقة أخرى كمحاولة إزالة الماء وإظهار النسيج ستؤدي إلى رفع المادة المهروسة مع غطاء الشريحة عند محاولة فكها وعادة توضع شفرة بين الشريحة والغطاء ثم يرفع الغطاء . ويمكن فصل غطاء الشريحة بوضع التحضير في إناء يحوي كحول إيثيلي تركيزه ٧٠ ٪ ، ثم تمرر العينة بتدرج كحولي صاعد ، ثم تروق وأخيرا تغطى بوسط مثل بسلم كندا وتجفف.

٣.التجميد Freezing

تمثل طريقة التجميد أداة قيمة في حالات معينة كالتشخيص الفوري لحالات مرضية مثل الاورام وكذلك تستعمل هذه الطريقة بشكل موسع في مختبرات الأمراض النسيجية Pathology Laboratories ، لأنها تمكن الأطباء من التشخيص السريع قبل إجراء العمليات الجراحية . إضافة لذلك فإن لها فوائد كثيرة منها :

أ.إظهار الإنزيمات في العينات البيولوجية لأن العينات التي تحضر بهذه الطريقة لا تتعرض لدرجات حرارة عالية مثلما يحدث أثناء التشريب في التحضيرات المجهرية

ب. إظهار الدهون التي غالبا ما تذوب في الكحول أو مذيبات الشمع مثل الزايلين

ج. توفير الوقت بتجنب كثير من العمليات كإزالة الماء والتشريب والطمر .

ء.استعمالها في تحضيرات الانسجة العصبية

مقابل ذلك يوجد لهذه الطريقة بعض السلبيات أهمها :

أ.عدم التمكن من عمل مقاطع متسلسلة .

ب.التسبب في تشويه الأنسجة أثناء قطعها نتيجة لعدم طمرها .

ج.عدم وضوح الصبغة بدرجة مناسبة كما في العينات المثبتة والمحضرة بطريقة الشمع .

عندما يراد فحص المقاطع للتشخيص الفوري ، تؤخذ عينة من النسيج وتسمى خزعة Biopsy وتغسل في محلول ملحي وتوضع على لوحة التجميد في جهاز يسمى كريوستات Cryostat وتجمد العينة و تقطع . أما إذا لم تكن هناك حاجة ملحة للنتائج فإن النسيج يثبت في فورملين تركيزه ١٠ ٪ .

تعمل أجهزة الكريوستات الحديثة بسهولة ، وهي مقاومة للصدأ لكون الحجرة مصنوعة من صلب لا يصدأ ، ومزودة بنظام لمنع تكون الضباب وبمصرف للثلج الذائب بعد العمل وبأماكن لحفظ ٤-٦ حاملات انسجة وتتراوح الحرارة في ثلاجة الجهاز من ١٠ إلى ٣٠ ° س تحت الصفر .

المصادر Reference

١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.

٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.

٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.

4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.