التقنيات النسيجية

Histological techniques

كلية التـربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

المستوى الاول (A) – المحاضرة الخامسة

2020-2019

د. هبة عباس جاسم

المصادر:

1- المطار ، عدنان عبد الامير، العلاف، سهيلة محمود و المختار، كواكب عبد القادر (1982) التحضيرات المجهرية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – الجمهورية العراقية.

2- الرطوط، اسامة خالد؛ عثمان، جمال محمد؛ الطردة، محمود محمد و أبو دية، محمد (2009) اساسيات علم التحضير النسيجي. دار الثقافة- المملكة الاردنية.

3- شاهين، جميل نعمان (2006) دليل العمل في مختبر الاحياء. دار عالم الثقافة، المملكة الاردنية.

4- المشني، يوسف حسني و فطاير، عبد الرحمن (2000) الكفايات العملية لفنيو المختبرات الطبية. دار المستقبل- المملكة الاردنية.

5- عبد القادر ، عمر (2012) التحضيرات المجهرية.

https://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/lthdyrt_lmjhry_ljz_lthny.pdf

الطرق العامة في التحضيرات المجهرية

General methods in microscopic technique

طريقة التحضيرات المقطعية Sectioning methods

الخطوات المتبعة لعمل مقاطع نسيجية محملة على شرائح زجاجية:

ثانيا: التثبيت Fixation

تعد عملية التثبيت من الخطوات الاولى في تحضير الانسجة من اجل اخضاعها للفحوصات النسيجية والكيمونسيجية. يقصد **بالتثبيت** هو عملية الحفاظ على شكل وحجم الخلايا والانسجة والانظمة النسيجية وجميع العناصر النووية Nuclear elements والسايتوبلازمية Cytoplasmic element بحالة اقرب ما تكون الى الحالة التي كان عليها في جسم الكائن الحي او قريبة من ذلك.

تتم عملية التثبيت من خلال التفاعلات الكيميائية والتداخلات الفيزيائية بين المجاميع الفعالة للمثبت والمجاميع الفعالة للمواد الكيميائية الموجودة في النسيج (كربوهدرات – بروتين – دهون – انزيمات- املاح معدنية – صبغات) وتقوم عملية التثبيت بايقاف عملية التفتت والتفسخ Disintegration والتعفن Putrefaction الناتجة عن نشاط البكتريا والفطريات وكذلك ايقاف عملية التحلل الذاتي للنسيج بفعل الانزيمات.

الهدف من التثبيت:

1- اعطاء النسيج قدر من الصلابة المطلوبة لتهيئته للتقطيع.

2- تعديل معامل الانكسار لبعض مكونات النسيج بحيث يسهل التميز بينهما.

3- جعل النسيج اكثر مقاومة للحرارة اثناء تعرضه للشمع الساخن.

4- تهيئة النسيج بحيث يصبح سهل النفاذ وقابل للتصبيغ وتمييز اجزاءه عن بعضها البعض عند الفحص تحت المجهر.

5- تخثير البروتينات Coagulation of proteins وتحويل مكونات النسيج الذائبة الى مواد غير قابلة للذوبان في جميع المحاليل والاوساط الكيميائية التي سوف يتعرض لها النسيج في العمليات الاحقة.

6- الحفاظ على سلامة خلايا النسيج من التشوه والانكماش Shrinkage والانتفاخ Swelling والمحافظة على ضغطها الازموزي خلال تعرضها للمحاليل الكيميائية في عمليات نزع الماء او التشرب بالشمع والطمر.

وحتى تتحقق الاهداف المرجوة من التثبيت لابد من مراعات النقاط التالية:

1- اختيار المثبت المناسب للعمل حسب الغرض من الدراسة.

2- وضع العينة في المثبت مباشرة بعد اخذها من الجسم لمنع عملية التحلل والتفسخ.

3- ان يكون حجم المثبت عدة اضعاف حجم العينة (10-20 ضعف).

4- ضرورة التقيد بالفترة الزمنية اللازمة للتثبيت حسب المثبت المستخدم.

5- ان يكون حجم العينة صغير بحيث يسمح للمثبت بالنفاذ خلال العينة في وقت قصير (سمك العينة لا يزيد على 2-5 ملم)

6- الاخذ في الاعتبار الاثار التي سيتركها المثبت على مكونات النسيج وتركيب الخلايا بعد التثبيت.

7- اذا لم يتوفر المثبت المناسب في حالة طارئة يجب وضع العينة في السائل النيتروجيني الى حين توفر المثبت المناسب.

8- يجب غمر العينة باكملها في المثبت وذلك برج المثبت عدة مرات بعد وضع العينة فيه حتى تتبلل جميع اسطح العينة بالمثبت.

المثبت Fixative

هو عبارة عن وسط سائل يحتوي على مواد كيميائية بعضها يعمل على تثبيت المحتوى الكيميائي للخلايا والمواد بين الخلوية عن طريق التخثير والترسيب والمحافظة على خلايا النسيج من التشوه.

من المثبتات الشائعة للفحص بالمجهر الضوئي :

- الفورمالين Formalin 10%
- محلول زنكر Zinker solution
- محلول بوان او بوين Bouin solution
- محلول كارنوي Carnoy

من المثبتات الشائعة للفحص بالمجهر الالكتروني:

- محلول الكلوترالديهايد Gluteraldehyde
- رابع اوكسيد الازميوم Osmium tetraoxide

شروط المثبت الجيد:

1- يتخلل الانسجة بسهولة وبسرعة.
2- يعمل في درجة الحرارة العادية.
3- لا يحدث ضرر بالنسيج.
4- يعمل على تيبس النسيج نوعاما بحيث يصبح قوامه سهل التقطيع.
5- لا يتعارض مع الصبغات المختلفة عند صبغ العينة.
6- يستمر مفعوله لمدة طويلة.
7- يقتل الجراثيم والفطريات التي تساعد على تحلل الانسجة.
8- ان لا يترك المثبت اي اثار جانبية سيئة او اصباغ على النسيج.
9- ان يكون سعره مناسبا ومتوفرا باستمرار.

العوامل المؤثرة على عملية التثبيت

1- **الاس الهيدروجيني (pH)** :للمثبت يجب ان يكون ما بين 6-8 لان زيادة الاس الهيدروجيني او النقصان يتلف الانسجة ويمكن الحصول على درجة الحموضة باستخدام محلول منظم Buffer.

2- **درجة حرارة المكان :** تزداد سرعة التفاذ بزيادة درجة حرارة المكان والعكس صحيح الا ان الحرارة العالية تتلف الانسجة لذا يفضل ان تكون درجة الحرارة (25) درجة مئوية.

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

4- **مدة التثبيت:** وتتناسب مع حجم العينة طرديا ويجب مراعاة نوع النثبت.

خطوات التثبيت هي:

1- تقطيع العينة النسيجية الى قطع صغيرة.
2- غسل العينة باستخدام المحلول الفسيولوجي المتعادل لازالة اثار الدم.
3- تغمر عينة النسيج في المثبت المناسب وترج لضمان وصول المحلول.

أنواع وتصنيف المثبتات Types and classifications of fixatives

المثبتات المستخدمة في الدراسات النسيجية والكيمونسيجية كثيرة قد تربو على 650 مثبت، وقد صنفت بعدة طرق نذكر منها:

1) تصنيف بيكر 1960 م الذي صنف المثبتات من حيث آلية العمل الى :

أ- المثبتات المجلطة (المخثرة) Coagulant Fixatives

هي المثبتات التي تقوم بتجليط البروتين بتحويله من الشكل الاسفنجي المتجانس الى الشكل الشبكي بحيث يسمح للشمع بالتغلغل واكتساب النسيج الصلابة الكافية لقطع المقاطع بالاظافة الى تقوية الروابط البروتينية والمحافظة عليها من التكسر ، الا انه يعطي بعض التراكيب الغير حقيقية (خادعة) للعين المثبتة به، مثل حامض البكريك Picric acid.

ب- المثبتات غيير المجلطة Non-coagulant Fixatives

هي المثبتات التي لا تقوم بتجليط البروتين ولكنها تثبته بشكله الطبيعي وبحالة غير ذائبة insoluble ، وهي بذلك لا تعطي القوة الكافية للانسجة المثبتة لمقاومة الشمع اثناء طمرها فيه، وهذا النوع يعطي اقل ما يمكن من التراكيب غي الحقيقية (الخادعة)، مثل الفورمالين Formalin.

2) تصنيف المثبات من حيث الجزء الذي تعمل على تثبيته في الخلية:

أ- **مثبتات نووية Nuclear fixative** محلول فلمنك Flemming's fluid تعمل على تثبيت التراكيب النووية مثل النوية، الكروموسومات، الغشاء النووي

ب- **مثبتات ساتوبلازمية Cytoplasmic fixative** مثل الفورمالين Formalin حيث يعمل على تثبيت التراكيب السايتوبلازمية مثل المايتوكوندريا و جهاز كولجي.

3) تصنف المثبتات من حيث التركيب الى:

أ- **مثبتات بسيطة Simple fixative** تتكون من مادة كيميائية واحدة مثل الفورمالين Formalin.

ب- **مثبتات مركبة Complex fixative** تتكون من مادتين كيميائيتين او اكثر ممزوجة معا مثل محلول بوين و محلول زنكر Zenker's fluid .

عند اختيار المثبت يجب الاخذ بنظر الاعتبار ما يلي:

1- يجب تثبيت العينة بعد جمعها باسرع وقت ممكن وذلك لمنع التغيرات التي تحدث بعد الموت ، او حفظها مبردة لوقت قصير لحين التثبيت.

2- لغرض الحصول على افضل النتائج لعملية تثبيت العينة يجب اختيار خليط من المحاليل المثبتة بحيث يكون واحد او اكثر مجلط وواحد او اكثر غير مجلط وذلك لغرض اداء مهمتين في ان واحد.

3- يجب اختيار المثبت الملائم لكل دراسة ، وذلك لان لكل مثبت مساوءه ومحاسنه، مثلا:

الفورمالديهايد يثبت السايتوبلازم من جهة لكنه يمنع تغلغل الشمع من جهة اخرى.

حامض البكريك Picric acid يجلط السايتوبلازم ويسمح للشمع بالتغلغل الا انه يجعل النسيج ليناً يصعب قطعه بالمايكروتوم.

تصنيف المثبتات يعتمد على:

1- طبيعة عمل المثبت.

2- استعمال المثبت.

3- الغرض من الدراسة (نسيجية او كيمونسيجية).

4- على المواد الموجودة في المثبت.

أنواع المثبتات الشائعة الاستعمال:

الفورمالين Formalin

هو اكثر المحاليل المثبتة استعمالا. المحلول المركز منه عبارة عن 40 % فورمالدهيد ، واحسن نسبة للفورمالين المثبت 10 % من المحلول المركز اي اضافة 10 مل من المحلول المركز الى 90 مل من الماء المقطر.

مدة تثبيت العينة من 12-24 ساعة على الاقل حسب حجم العينة.

مميزاته:

1- رخيص الثمن.
2- لا يسبب تصلب او انكماش للنسيج اذا تركت العينة فيه فترة طويلة.
3- يصلح كمثبت لجميع الصبغات.
4- يمكن حفظ العينة فيه مدة طويلة.
5- يمكن الاكتفاء بغسل النسيج بعد التثبيت لمدة ساعة فقط.

عيوبه:

1- له تاثير ضار على الجلد لذلك يجب استعمال القفازات عند التعامل معه.
2- يسبب بعض الالتهابات للغشاء المخاطي للانف ولذلك يجب تهوية المكان جيدا.

محلول كارنوي Carnoy's fluid

يستخدم هذا المحلول لتثبيت الانسجة الحيوانية بصورة عامة و لتثبيت الكلايكوجين والانسجة العصبية بصورة خاصة.

تركيبه:

1- 60 مل من كحول مطلق.
2- 30 مل من كلوروفور.
3- 10 مل من حامض الخليك الثلجي.

مميزاته :

1- مثبت سريع ، يعمل خلال ساعة واحدة.
2- يستخدم في تحضير العينة السريعة.

عيوبه:

1- غالي الثمن.

محلول زنكر Zenker's fluid

يعتبر محلول زنكر من اكثر المحاليل استعمالا للدراسات النسيجية بصورة عامة والمرضية بصورة خاصة.

تركيبه:

5 غم كلوريد الزئبق.

2.5 غم دايكرومات بوتاسيوم

1 غم سلفات الصوديوم

يكمل الى 100 مل ماء مقطر.

يضاف 5 مل حامض الخليك الثلجي Acetic acid قبل الاستعمال مباشرة.

مميزاته:

1- قوة حفظه للنواة.
2- يستعمل غالبا لتثبيت نخاع العظم والاعضاء الدموية.
3- سرعة معتدلة في التغلغل.

عيوبه:

1- يجب غسل النسيج بعد التثبيت بالماء الجاري لمدة 12 ساعة.
2- لا يمكن تثبيت العينة لاكثر من 24 ساعة.