التقنيات النسيجية

Histological techniques

كلية التـربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

المستوى الاول (A) – المحاضرة السابعة

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

طريقة التحضيرات المقطعية Sectioning methods

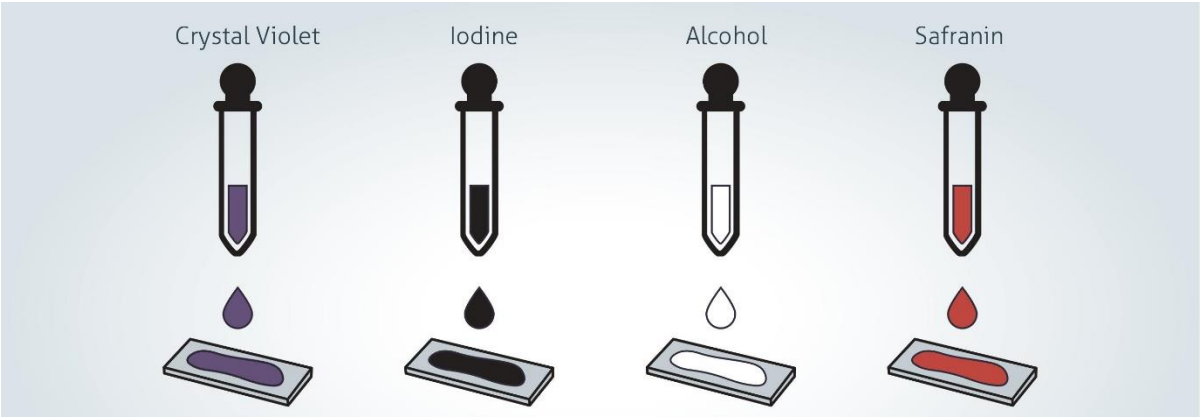
عاشرا: عملية التصبيغ Staining

عملية التصبيغ مرحلة حاسمة جدا في التحضير المجهري، وذلك لانه بدون تصبيغ مناسب للانسجة فانه يصعب تمييز مكوناتها وبالتالي تفقد عملية التحضير اهميتها لان عملية التصبيغ تزيد من الفروق في معامل انكسار مكونات النسيج والخلية مما يؤدي الى تمايزها ويحدث هذا نتيجة الفرق في ميل بعض مكونات الخلية او النسيج لمعظم الصيغات ، توجد نظريتان لتفسير صبغ الانسجة هي:

1- **النظرية الكيميائية:** تنص على " ان الصبغ عبارة عن تفاعل كيمياوي يعتمد على تكوين مادة ملحية بين الشق الموجب cation او الشق السالب anion للصبغة وبين مجموعات كيمياوية معينة في الخلية او النسيج" وعلى هذا الاساس تكون الانسجة اما محبة للحامض acidophilic وتحتوي مجموعات قاعدية وفي هذه الحالة تتفاعل مع الصبغ الحامضي او محبة للقاعدة basophilic وتحتوي مجموعات حامضية تتفاعل مع الصبغة القاعدية.

2- **النظرية الطبيعية :** ترتكز هذه النظرية على افتراضات تنص على " ان التصبيغ يتم بوسائل طبيعية مثل الامتصاص والادمصاص والخاصية الشعرية والانتشار والتنافذ"

ان الفكرة السائدة في الوقت الحاضر هو ان الصبغ ينتج عن عمليات كيميائية وطبيعية في آن واحد.



تصنيف الصبغات Classification of Stains

أ- تقسم الصبغات تبعا لتركيز الاس الهايدروجيني للصبغة:

1- الصبغات القاعدية Basic stains:

وذلك عندما تكون الصبغة حاوية على قاعدة عضوية ملونة تتحد مع الجذور الحامضية غير الملونة للانسجة كجذر الخلات او الكلوريدات او الكبريتات ومن امثلتها صبغة السفرانين Safranin والهيماتوكسلين Haematoxylin.

2- الصبغة الحامضيةAcidic stains :

هي تلك الصبغات التي تكون حاوية على جذور حامضية عضوية ملونة تتحد من قاعدة معدني Metallic base غير ملونة للانسجة مثل صبغة الخضراء الباهتة Light green وصبغة الايوسين Eosin.

3- الصبغات المتعادلة Neutral stains

وتكون مركبة من صبغات حامضية وقاعدية مثل الاحمر المتعادل Neutral red.

ب- تقسم الصبغات حسب ميل اجزاء البروتوبلازم للاصطباغ بها:

1- **الصبغات النووية Nuclear stains:** وهي تلك الصبغات التي تميل لصبغ النواة ، وبما ان النواة غنية بالحوامض النووية لذا تميل للاصطباغ بالصبغات القاعدية ، لذا جميع الصبغات النووية هي صبغات قاعدية.

2- الصبغات السايتوبلازمية Cytoplasmic stains:

هي تلك الصبغات التي تميل لصبغ السايتوبلازم ، ونظرا لكون السايتوبلازم ذو طبيعة اكثر قاعدية، لذا فانه يميل للاصطباغ بالصبغات الحامضية اي ان الصبغات السايتوبلازمية هي صبغات حامضية.

عند استعمال شمع البرافين يجب ان يزال شمع البرافين من القطاعات تماما باستخدام الزايلول ومن ثم يجب التخلص من الزيلول بالكحول المطلق، بعدها يجب نقل القطاعات الى بيئة مشابهة للبيئة المذابة فيها الصبغة (مائية او كحولية). ومدة الصبغ تعتمد على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج وقد يصبغ النسيج باكثر من صبغة او قد يلجا الباجث الى ما يسمى الصبغ المضاد كاستخدام صبغة الهيماتوكسيلين لصبغ الانوية (صبغة نووية) وصبغة الايوسين لصبغ السايتةبلازم (صبغة سايتوبلازمية) . من الصبغات المستعملة في صبغ عينات المجهر الالكتروني صبغة خلات اليورانيل Uranyl acetate وصبغة سترات الرصاص Lead citrate.

Good general stain for animal tissues

stain	solvent	effect
Pico carmine	water	Nucleus-red Cytoplasm-yellow
Borax carmine	alcohol	Nucleus-pink
Delafield haematoxylin	alcohol	Nucleus - blue
Haemalum	water	Nucleus - blue
Eosin Y	Water or alcohol	Cytoplasm - pink

Common double stains

Animal tissues
- Borax carmine and eosin Y
- Haematoxylin and eosin Y
- Haematoxylin and van Geison stain

Plant tissues
- Haematoxylin and eosin
- Safranin and light green
- Safranin and haematoxylin

احد عشر: تحميل القطاعات Mounting

يقصد بها وضع القطاع النسيجي على الشريحة الزجاجية ، تتم هذه العملية بعد الانتهاء من عملية الصبغ اذ تبدا عملية اعداد الشريحة المجهرية للحفظ المستديم باستخدام مادة شمعية او مادة بلاستيكية حافظة مثل مادة بلسم كندا Canada balsam او مادة D.B.X ثم غطاء الشريحة Coverslip بزاوية حادة 45 درجة وبحذر شديد حتى لا تتكون فقاعات هوائية Air bubbles وهكذا يتم عمل ما يعرف بالشريحة المستديمة permanent slide .

بعد ان تترك لتجف على مجفف الشرائح يمكن فحص القطاعات تحت المجهر . ان الغرض من تغطية الشرائح لتسهيل دراستها تحت المجهر لان التحضيرات المصبوغة وغير المغطاة لا تظهر الا قليلا من التفاصيل لكون معامل انكسار كل من زجاج الشريحة ومكونات النسيج مختلفة تماما وتتحسن امكانية رؤية مكونات النسيج اذا غطيت بمدة شفافة يكون معامل انكسارها قريبا من معامل انكسار الزجاج. كما ان الغطاء يحمي التحضير وخاصة المقاطع من التهتك والازالة من على الشريحة كما يقلل الغطاء من اكسدة الصبغة وبالتالي يمنع فسادها. ويمكن ان تكون وسائط التغطية دائمية مثل مادة بلسم كندا او مؤقت مثل الكليسرول glycerol.

اثنا عشر: تنظيف ووسم (تعليم) الشرائح Cleaning & Labelling

تنظف الشرائح ويزال وسط التحميل الزائد من حول جوانب الغطاء وبالنسبة لتعليم الشريحة وتوضع ورقة مناسبة على طرف الشريحة يكتب عليها معلومات عن نوع النسيج والمثبت والصبغة وتاريخ التحضير.

ملاحظة: تتم الخطوات السابقة بشكل يدوي بينما في مختبرات الأمراض التي يتم فيها اجراء فحوصات روتينية لعينات كثيرة تتم باستخدام أجهزة حديثة منها جهاز معاملة الانسجة الأوتاماتيكي Tissue Auto processor.

تقنية التجميد Freezing Method

تستعمل طريقة التجميد في حالتين حيث لا يصح معها اتباع طريقة التقطيع العادية السابقة الذكر، وهما:

1- عندما تكون السرعة ضرورية في الحصول على مقاطع للتشخيص في المستشفيات.

2- عندما يراد تحضير مقاطع حاوية على بعض العناصر كالدهون Fats والانزيمات Enzymes ، والتي تذوب بالكحولات او بالمذيبات او الحرارة.

في هذه الطريقة النسيج الطري او المثبت يجمد ويصلب ويعمل منه قطاعات بالميكروتوم الثلجي او ما يسمى بالكريوستات Cryostat.

مميزاتها :

1- طريقة سريعة وبسيطة تستخدم عادة خلال العمليات الجراحية التي تتطلب تشخيص سريع للسرطانات.

2- المواد الكيميائية الموجودة في النسيج لا تتغير بسبب عدم استخدام الحرارة.

3- تستخدم في كيمياء الانسجة لدراسة فعالية الانزيمات الخلوية والكشف عن الدهون التي تذوب في الكحول والزايلين وتفاعل الاجسام المضادة مع الانتيجينات.

عيوبها:

1- لا تعطي مقاطع متسلسلة.

2- تعطي قطاعات سميكة بسبب صعوبة القطع والتصبيغ.

3- تشوه المقاطع نتيجة التجميد والقطع.

الجزء العملي

المواد والاجهزة المستعمله:

أ- انسجة ماخوذة مباشرة من الكائن الحي

ب- فورمالين 10%

ت- كحول: ايثانول و زايلول

ث- شمع برافين

ج- فرن كهربائي

ح- جهاز التقطيع Microtome

خ- شرائح زجاجية واغطيتها

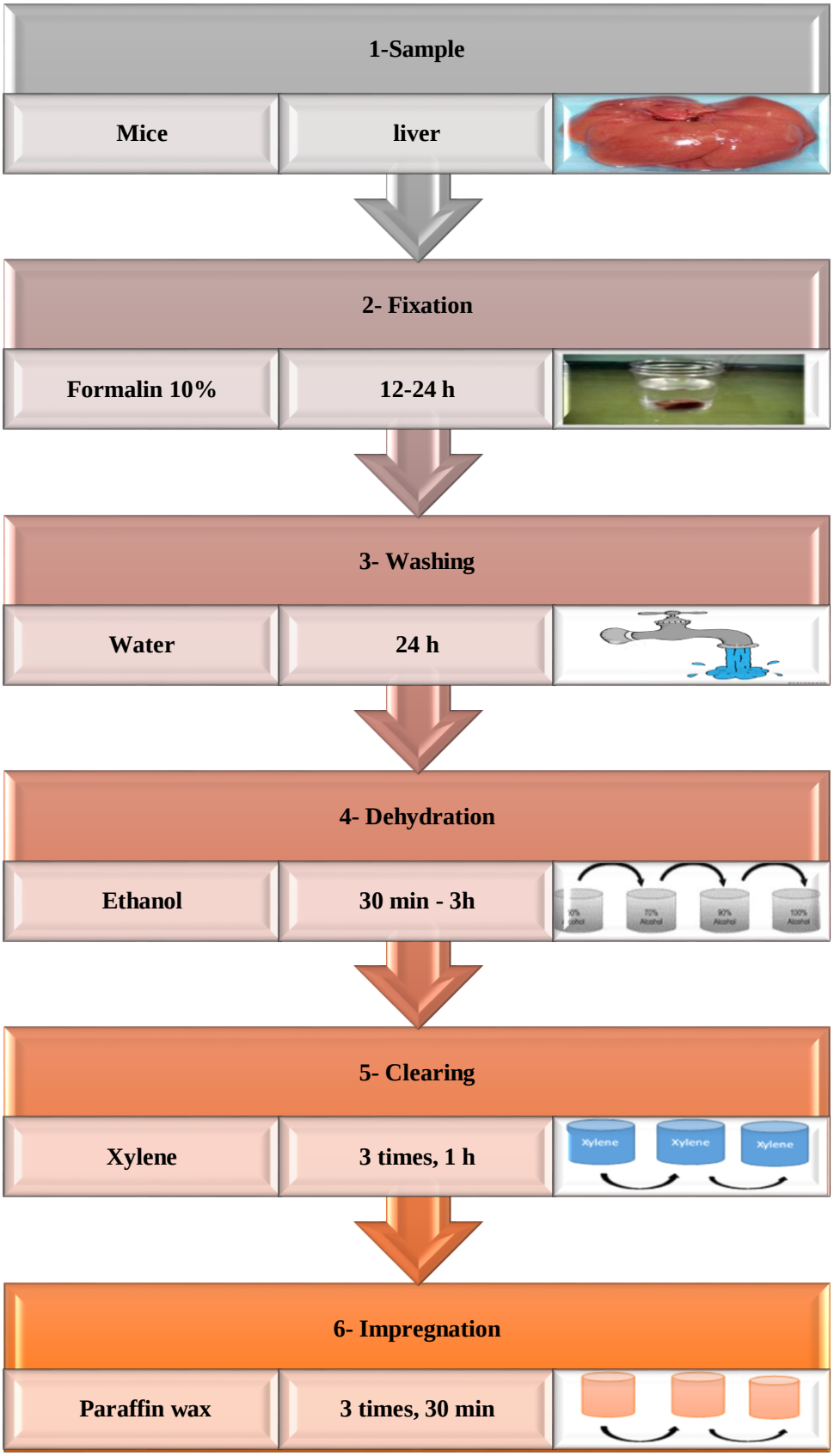
د- صفيحة تسخين

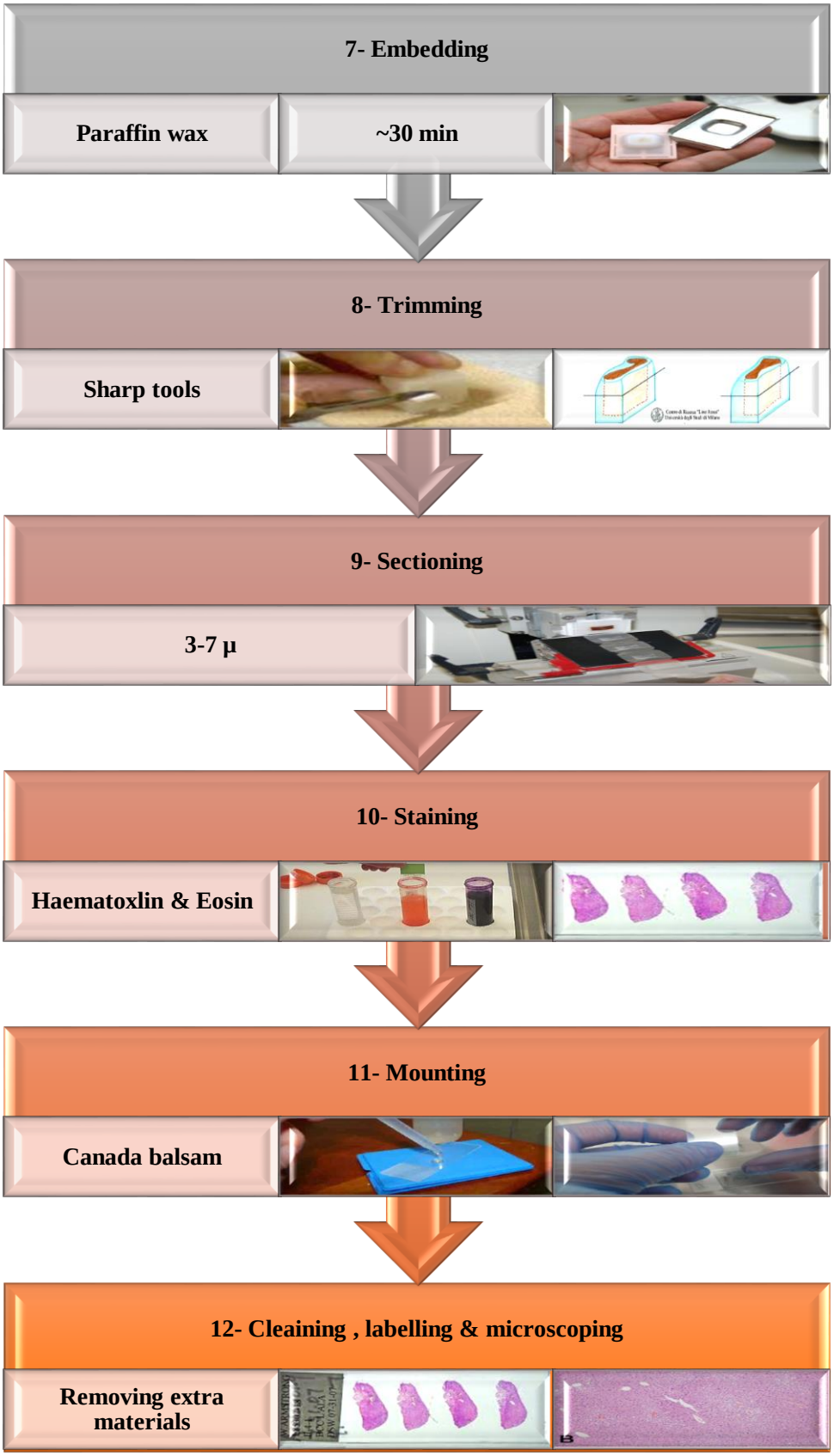
ذ- صبغات : هيماتوكسلين، ايوسين

ر- اح ماير (1 البومين: 1 كليسرول)، كندا بلسم

طريقة العمل:

لتحضير شريحة زجاجية لعينة مقطعية ماخوذة من الفأر، نحتاج لاجراء عدة عمليات متسلسلة كما موضحة في الشكل التالي:


1-Sample
Mice
liver
2- Fixation
Formalin 10%
12-24 h
3- Washing
Water
24 h
4- Dehydration
Ethanol
30 min - 3h
5- Clearing
Xylene
3 times, 1 h
Xylene
Xylene
Xylene
6- Impregnation
Paraffin wax
3 times, 30 min


7- Embedding
Paraffin wax
~30 min
8- Trimming
Sharp tools
9- Sectioning
3-7 µ
10- Staining
Haematoxlin & Eosin
11- Mounting
Canada balsam
12- Cleaining , labelling & microscoping
Removing extra materials

مقارنة بين العمليات المختلفة لتحضير العينات للفحص بالمجهر الضوئي والالكتروني

	Light Microscope	Electron Microscope
Sample size	1 cm^3	1 mm
Fixative	Formaldehyde	Glutaradehyde
Post-fixation	None	Osimium tetroxide
Dehydration	Graded alcohol	Alcohole or Acetone
Clearing agent	Xylem or Toluene	Propylene oxide
Embedding material	Paraffin	Various plastics
Section thickness	5-10 µm	60-90 nm
Stains	Colored dyes	Heavy metals