جامعة الانبار

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التحضيرات المجهرية

microscopic technique

المحاضرة الأولى

الطرق العامة في التحضيرات المجهرية

General methods in microscopic technique

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 وتستمر خلال عملية الانكاز (سحب الماء) في الكحولات.

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 يراد 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.

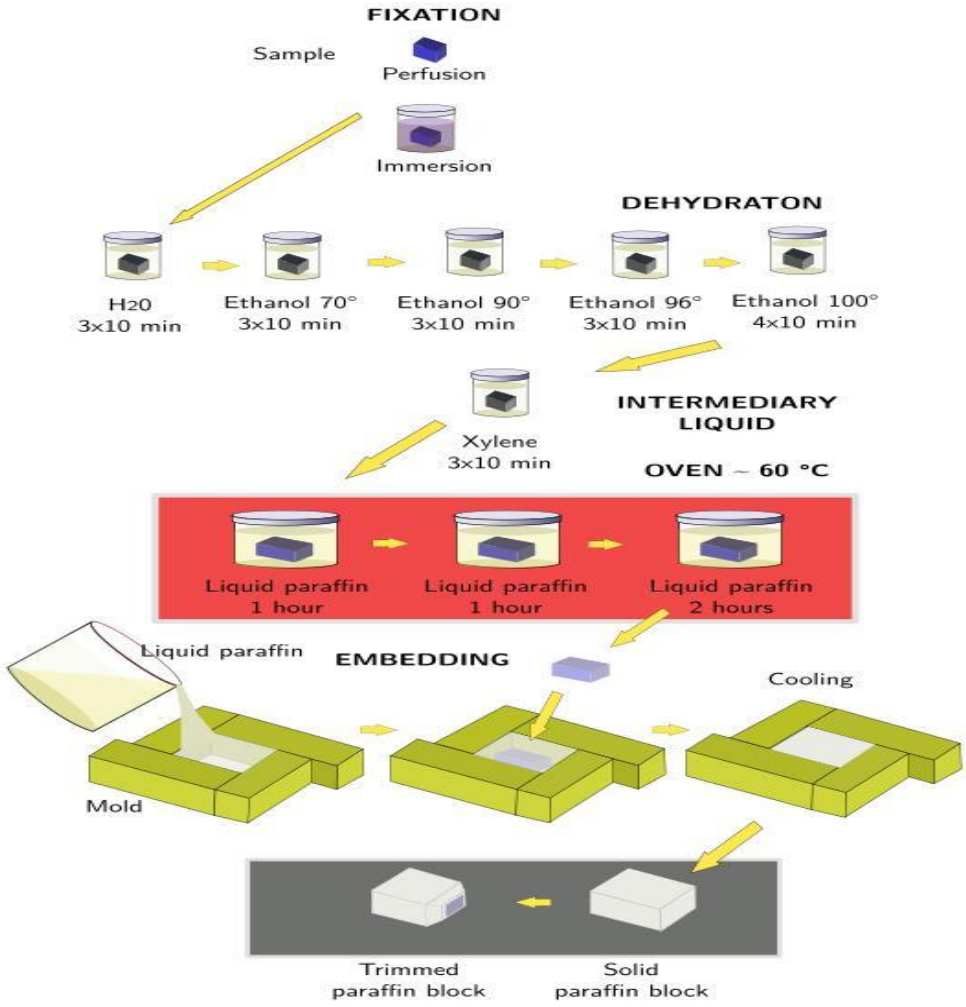
١٢ - التجفيف والتنظيف والتعليم Drying Cleaning and Labeling

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.