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

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 واطىء 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، تتراوح 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

microtome وبسمك يقل عن ١ مايكرون باستخدام السكاكين الزجاجية أو الماسية diamond 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^{٣} 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^{٣} من dibutyl phthalate مع ٢٧ سم^{٣} 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.