

اهم الطرق للحصول على العينة من الكائن الحيواني

1. الذبح
2. التخنيع
3. الضرب على مؤخرة الرأس
4. التخدير

الذبح

أسهل العمليات وأسرعها على الحيوانات الفقارية

شروطها:

1. الإمساك الجيد بالحيوان
2. استعمال سكين أو شفرة حادة جدا
3. تتم عملية الذبح بقطع أوردة وشرابين الرقبة مع القصبة الهوائية والبلعوم

التخنيع

شل الحيوان شلا كاملا وذلك بفصل الحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي أو المخ

تتم هذه الطريقة:

1. بغرز ابرة التشریح الحادة فيما بين الفقرة الأولى من الفقرات العنقية والجمجمة حتى تصل إلى الحبل الشوكي
2. تحرك هذه الأبرة يمنة ويسرة حتى نضمن الانفصال التام للحبل الشوكي عن الجهاز العصبي
3. تطبق هذه الطريقة على: الضفادع والغزلان

الضرب على مؤخرة الرأس

تتم بعمل ارتجاج مغي مفاجئ وبشكل سريع بحيث يصبح الحيوان بعدها في حالة غيبوبة تامة

تناسب الحيوانات الصغيرة مثل الضفادع والفئران

التخدير

1. يجب أن يقوم بها مؤهلون
2. يعتمد نوع المخدر على طبيعة البحث ونوع الحيوان
3. يفضل عدم استعمالها في الدراسات الخلوية
4. تستعمل في حالة دراسة كيفية قيام الأعضاء بوظيفتها والدراسات النسيجية

تثبيت العينة

الهدف من التثبيت هو المحافظة على طبيعة التراكيب النسيجية والخلوية إلى أكبر قدر ممكن على طبيعتها الأصلية والحد من التغيرات التي تحصل بعد الوفاة .

- لا يوجد مثبت مثالي يناسب جميع الدراسات بل تحدد الدراسة نوع المثبت
- يجب تصغير حجم العينة المراد تثبيتها (2-4 ملم) فقط
- كمية المثبت أكبر من 20 مرة من العينة المثبتة

س: ماذا يحدث لقطعة نسيجية عزلت من كائن حي أو كائن حديث الوفاة ولم تحظ بعناية خاصة؟

- تفقد الكثير من محتواها المائي بفعل الهواء وتنكمش وتتغير
- تنكمش أو تنتفخ حسب طبيعة الضغط الاسموزي للمحلول
- تتعرض لخطر البكتيريا
- تتحلل تلقائي لاحتوائها على الإنزيمات المحللة

المثبت : محلول حافظ يمتاز بقدرته على منع الانتفاخ أو الانكماش و يقتل البكتيريا و يكبح عمل إنزيمات التحليل الذاتي و يقوي الأنسجة حتى تصبح قابلة للطمر والتقطيع و يزيد من سرعة التفاعل النسيجي مع الاصباغ.

شروط المثبت

1. أن يكون سريع النفاذية خلال أجزاء العينة
2. أن يحول المواد البروتينية الذائبة إلى مواد غير ذائبة
3. أن تكون له القدرة على منع عمليات التحلل البكتيري والتحلل الخلوي الذاتي
4. ألا يسبب للخلايا أي تشوه

اكثـر المثبتات استخداما

مثبت كلارك

كحول إيثيلي+حمض الخليك الثلجي 1:3

ما الفائدة من خلط الكحول الإيثيلي مع حمض الخليك؟

استعمالاته :

الدراسات التشريحية والنسجية

الدراسات السيتولوجية

طريق تحضير العينات النسجية

1. قتل الحيوان والحصول على العينة
2. تثبيت العينة
3. غسل العينة
4. نزع الماء من العينة
5. ترويق العينة
6. تخليل العينة
7. طمر العينة
8. تقطيع العينة
9. تحميل العينة
10. عملية صبغ العينة
11. عمل الشريحة المستديمة

غسل العينة

بعد التثبيت لا بد من التخلص من آثار المثبت المتبقية في العينة عملية الغسل تعتمد على نوع المثبت

نزع الماء من العينة

تتم عملية النزع بتمرير العينة على سلسلة متدرجة في التراكيز من محاليل الكحول الإيثيلي

السبب: حتى يسهل عملية نفاذ البرافين المصهور إلى داخل الأنسجة وذلك لأن الماء لا يمتزج مع مادة شمع البرافين شائعة الاستعمال في عمليات الطمر

ماهي المادة المستخدمة في عملية نزع الماء من العينة وسبب استخدامها؟

مادة الكحول الإيثيلي لأنه يمتزج بسهولة مع الماء ومع مادة الزيلول المروقة والتي تمتزج جيدا مع مادة الطمر البرافينية

ترويق العينة

نزع الكحولات المستخدمة في عمليات نزع الماء بواسطة مادة مروقة تحل مكان الكحول لتسهل نفاذ مادة الطمر البرافينية

من انسب محاليل الترويق مادة الزيلول لسهولة أمتزاجها مع البرافين والكحول معا

تخليل العينة

تشبيح العينة بالبرافين وذلك بتمرير العينة على مزيج متساو من الزيلول والبرافين ثم تنقل في شمع البرافين المنصهر داخل الفرن

وضح العوامل التي يعتمد عليها عدد مرات تغيير الشمع؟

تعتمد على نوع العينة بحيث تقل كلما كانت العينة رخوة وتزداد كلما كانت العينة صلبة

شمع البرافين المثالي هو المنصهر والمحفوظ لمدة اسبوع في فرن ساخن درجة حرارته أعلى قليلا من درجة انصهار الشمع

طمر العينة

1. تتم بوضع قالب الطمر على لوح زجاجي رقيق ثم يسكب شمع البرافين المنصهر في هذا القالب

2. توضع العينة مباشرة بملقط دافئ وسط الشمع المنصهر

3. تحرك العينة بإبرة تشريح ساخنة

4. النفخ المستمر على سطح العينة حتى تتكون طبقة متجمدة على سطح القالب

5. يغمر القالب بماء بارد (10-15 درجة مئوية) حتى يتصلب البرافين

تقطيع العينة

تقطيع العينة: تحويلها إلى قطاعات رقيقة جدا بأجهزه خاصة للقطع تسمى الميكروتومات

أهميتها:

دراسة العينة على مستواها النسيجي وذلك بتحويلها إلى شرائح شفافة حتى يتمكن الضوء المرور خلالها ويتراوح سمكها من 5-7 ميكرومتر



خطوات تقطيع العينة:

1. تشذيب قالب البرافين بشفرة حادة
2. تثبيت العينة جيدا على حامل العينة في الميكروتوم
3. تزويد جهاز القطع بسكين حادة
4. تحديد سمك القطاع 5-7 ميكرومتر
5. توضع القطاعات (الاشرطة) على صفيحة سوداء حتى يسهل تمييز القطاعات
6. يوضع القطاع على الشريحة المجهرية

تحميل العينات

وضع القطع النسيجي على الشريحة المجهرية

1. يوضع القطع في حمام مائي 40-45 درجة مئوية ويترك يطفو على سطح الماء لمدة 1-2 دقيقة حتى ينفرد تماما ثم تمرر الشريحة تحت هذا القطاع وتترك لتجف
2. تنقل القطع مباشرة إلى شريحة مجهرية عليها قطرة من الماء المقطر ثم توضع على مجفف
3. يجب دهن الشريحة المجهرية مسبقا بلاصق ماير حتى تزيد من نسبة التصاق القطع على الشريحة مما يضمن عدم سقوط القطع أثناء عمليات الصبغ

التصبغ

1. إذابة الشمع عن القطع النسيجية تماما بالزيتول
2. التخلص من الزيتول بالكحول المطلق
3. نقل القطع إلى بيئة مشابهة للبيئة المداية فيها الصبغة
4. غمر القطع في محلول الصبغة

أنواع الصبغات هي الهيماتوكسلين والسفرانين والاخضر السريع

عمل الشريحة المستدامة

التحضير المستديم : يعتمد على استخلاص أي نسبة رطوبة من العينة وصبغها بالصبغ المناسب ثم ترويقها وأخيرا تحميلها في وسط مناسب ولصق غطاء الشريحة على التحضير بلبسم ذو معامل انكسار يقارب معامل انكسار الزجاج حتى لا يحدث تداخل يعوق الرؤية

توضع التحضيرات بعد ذلك في أفران تجفيف خاصة ثم تدون بيانات كل عينة على أحد أركان الشريحة وتحفظ في علب حفظ الشرائح مرقمة ومرتبة ونقل المقطع من الزايلين إلى بلسم كندا وتغطيته بغطاء الشريحة

خطوات عمل الشريحة المستدامة

1. التخلص من الماء والكحول في القطاع
2. نقل القطاع على محلول نقي من الزيلول
3. إضافة قطرة من محلول بلسم كندا المذاب بالزيلول
4. يوضع غطاء للشريحة ويحذر شديد
5. تترك الشريحة 24 ساعة على مجفف الشرائح حتى يتم تجفيف مادة بلسم كندا تماما