الجامعة	الانبار
الكلية	العلوم
القسم	التقنيات الاحيائية
المرحلة	الثانية
اسم المادة باللغة العربية	انسجة وتحضيرات مجهرية
اسم المادة باللغة الانكليزية	Histology and Micro technique
اسم التدريسي	م. د. بحار مقداد عبدالله
عنوان المحاضرة باللغة العربية	التحضيرات المجهرية او التقنيات المجهرية الدقيقة
عنوان المحاضرة باللغة الإنكليزية	Microscopic preparations
رقم المحاضرة	1 و 2

- التحضيرات المجهرية او التقانات المجهرية الدقيقة Micro technique (Microscopic preparations)

يقصد بالتحضيرات المجهرية الدقيقة بأنها تلك الخطوات التي بواسطتها يمكن دراسة التراكيب الخلوية المكونة لجسم الكائن الحي والتي لا ترى بالعين المجردة أو أجزاء منها أو أعضاء من الجسم باستخدام أجهزة ومعدات خاصة لهذا الغرض.

إن عملية التحضيرات المجهرية رغم أنها غاية في التعقيد والدقة إلا أنها ذات أهمية كبيرة في الحياة العملية والبحثية والتشخيصية، فهي تعتبر الأساس الأول لتشخيص المرض لذا كانت هذه التحضيرات المجهرية ذات أهمية كبيرة في الجانب الطبي والبحثي إلى وقتنا الحاضر ، وما ابتكار الأجهزة العملاقة الخاصة لذلك مثل الميكروسكوب الإلكتروني إلا دليل على تلك الأهمية.

و تنقسم التحضيرات إلى قسمين:

1- تحضيرات لا مقطعية لا يمكن عمل مقاطع فيها مثل أنسجة الدم .
2- تحضيرات مقطعية تخص المجهر الضوئي و المجهر الإلكتروني.

اولا : التحضيرات(الطرق) اللامقطعية Non-sectioning methods

في هذه الطريقة لا تحتاج النماذج للقطع وانما تعامل بطرق مختلفة حيث ان لكل طريقة استخداماتها الخاصة ومن بين هذه الطرق :

1- **طريقة المسحات Smear method:**

وهي من اسرع الطرق التحضيرية الخاصة بالانسجة الرخوة وخاصة سوائل الجسم كالدم وسائل النخاع الشوكي والادرار والبلغم وغيرها

2- **طريقة الهرس او السحق Squash method**:

تستخدم لهرس العينات الرخوة وتحويلها من الحالة النسيجية إلى الحالة الخلوية على الشريحة الزجاجية مثل دراسة مراحل الانقسام الخلوي و مشاهدة الكروموسومات.

3- **طريقة النثر او النشرTeasing method**:

تستخدم لدراسة أجزاء من نسيج ما كالعضلة مثلا حيث تؤخذ قطعة صغيرة من العضلات ثم بواسطة إبرة تشريح يتم تفكيكها إلى الوحدات التركيبية مثل الألياف العضلية حيث يمكن لضوء الميكروسكوب أن يخترقها.

4- **طريقة التحميل الكلي Whole mounting**:

حيث يتم وضع العينة بأكملها على الشريحة للفحص مثل الدودة الكبدية و القمل و منها نوعان:

أ- التحميل الكلي المؤقت

ب- التحميل الكلي الدائم

5- الطريقة المباشرة Direct method :

تستخدم للدراسة السريعة للعينات الحية ولوقت قصير جدا كما في فحص الخلايا الحرشفية للفم و الأميبيا و البرامسيوم.

ثانيا/ التحضيرات (الطرق) المقطعية Sectioning method

في هذه الطريقة يتطلب عمل مقاطع للنماذج وبمستويات مختلفة لغرض دراستها وتكون المقاطع عرضية transverse or cross او طولية longitudinal. تعد هذه الطريقة الاهم لدراسة العينات على مستواها النسيجي والخلوي والغرض منها الحصول على مقطع نسيجي رقيق جدا. وهناك ثلاث طرق رئيسية لعمل المقاطع:

1- تقنية البرافين The Paraffin technique (وهي الطريقة الاشهر)

2- تقنية السلويدين The celloidin technique وهي الأكثر دقة

3- تقنية التجميد The freezing technique وهي الاسرع

تقنية البرافين The Paraffin technique:

وفيها يستخدم شمع البرافين المنصهر والصلب و فيما يلي الخطوات المتبعة لعمل قطاعات نسيجية و تتلخص فيما يلي:

1- **الحصول على العينة** :

من الانسان المريض خلال العملية الجراحية او من الحيوان بعد قتله

2- **التثبيت Fixation**:

تهدف الى الحفاظ على شكل وحجم وترتيب الخلايا والانسجة والانظمة النسيجية وما تحويه كما لو كانت بشكلها الطبيعي نوعا ما وتتم باستعمال محاليل كيمياوية تتفاعل مع محتويات خلايا الانسجة (كربوهيدرات ، بروتينات ، دهون ، إنزيمات ، أملاح معدنية ، صبغات) . ومن المثبتات الشائعة للفحص بالمجهر الضوئي:

- الفورمالين 10% formalin10%
- محلول زنكر zinker solution
- محلول بوين Bouin solution

الهدف من التثبيت:

أ- تخثير البروتينات protein coagulation وتحويل مكونات النسيج الذائبة الى مواد غير قابلة للذوبان في جميع المحاليل والاوساط الكيميائية التي سوف يتعرض لها النسيج في العمليات اللاحقة

ب- الحفاظ على سلامة الخلايا من التشوه والانكماش shrinkage والانتفاخ swelling و المحافظة على ضغطها الأسموزي خلال تعرضها للمحاليل الكيميائية في عمليات نزع الماء و التخلل و الطمر.

ت- إعطاء النسيج قدر من الصلابة المطلوبة لتهيئته للتقطيع.

ث- تهيئة النسيج بحيث يصبح سهل الإنفاذ وقابل للتصبيغ و تمييز أجزاءه عن بعضها البعض عند الفحص تحت المجهر .

3- الغسل Washing:

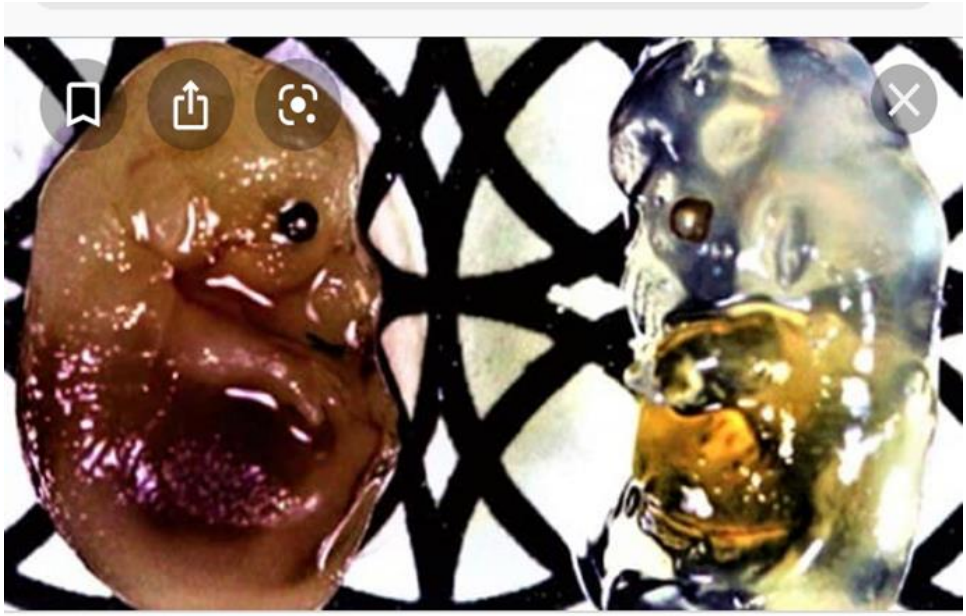
يجب غسل العينة بعد التثبيت و ذلك لإزالة ما تبقى من أثر المثبت على العينة ، وبعد الغسل يمكن حفظ الانسجة في محلول كحولي تركيزه 70% لعد اسابيع لكن الافضل اجراء عمليات ازالة الماء والترويق والتشريب مباشرة لان الحفظ لمدة طويلة يقلل من قابلية الانسجة للصبغ.

4- ازالة الماء Dehydration

تعني ازالة ماء الانسجة التي ستجري عليها عمليات التشريب والطمر في شمع البرافين لان شمع البرافين لا يختلط بالماء لذا يجب ازالة الماء المتواجد بداخل الخلايا وخارجها. **وتتم هذه الخطوة بواسطة إحلال مادة محل الماء الموجود في النسيج هذه المادة تذوب فيها المحاليل و المواد المستعملة في الخطوات القادمة مع عدم تشويه النسيج .** تتم هذه العملية بتمرير العينة في سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من الكحول الإثيلي لمنع انكماش الأنسجة في حالة لو وضعت في كحول مطلق مباشرة ويفضل الكحول لأنه يمتزج بسهوله مع الماء و مع مادة الزايلول المروقة والتي بدورها تمتزج جيدا مع مادة الطمر البرافينية.

5- عملية الترويق Clearing:

تنقل الانسجة بعد ازالة الماء منها تماما الى بيئة (او مادة) تعمل كوسيط بين الوسط المزيل للماء ووسط التشريب بالشمع ، حيث تقوم هذه العملية بالسماح لمادة شمع البرافين بالدخول إلى الأنسجة في الخطوة اللاحقة لأن الكحول المستخدم في نزع الماء لا يمتزج مع شمع البرافين لذا تستخدم ماده مروقه تذوب في الكحول وشمع البرافين وكذلك تجعل النسيج شفافا. من أمثلة المواد المروقه (الزايلول – الكلورفورم – تولوين – بنزين) .



الترويق Clearing

6- عملية التشريب Infiltration:

لتحضير الانسجة للقطع يجب اولا تشريبها بمادة مناسبة و يعتبر شمع البرافين من أشهر المواد المستخدمة في تشريب النسيج حيث أنه يتخلل العينة بسرعة دون إحداث ضرر بتركيبها النسيجي، كما أنه يكسبها دعامة قوية لتهيئتها للقطع بالميكروتوم، و يساعد على حفظها في الظروف العادية لفترة طويلة دون أي أذى.

وتتم العملية بتمرير العينة في مزيج متساوي من الشمع والمادة المروقة (1:1) ثم تنقل العينة إلى شمع البرافين المطلق المنصهر داخل الفرن و تكرر هذه العملية لعدة مرات (2-3 مرات) كل مرة لمدة نصف ساعة، كما تعتمد عدد مرات تغيير الشمع حسب نوع العينة بحيث تقل كلما كانت العينة رخوة وتزداد كلما كانت العينة صلبة.

يعتمد اختيار الشمع على ثلاثة عوامل هي :

- **نوع النسيج**: اذ يستعمل الشمع الطري في تشريب وطمر الانسجة الرخوة، بينما يستعمل الشمع الصلب للانسجة القاسية
- **سمك المقطع:** في حالة تحضير مقاطع سميكة يستعمل الشمع الطري والا فلا يتكون شريط من المقاطع ، كما ان استعمال الشمع الصلب يساعد في عمل مقاطع رقيقة
- **معدل درجة الحرارة في مكان العمل**: تؤثر درجة حرارة الجو على اختيار نوع الشمع ففي الجو الحار يستعمل الشمع الصلب وفي الجو البارد يستعمل الشمع الطري.

7- الطمر Embedding:

وهي عملية الغرض منها عمل قالب من العينة بحيث تحيط بها المادة الطامرة وتدعمها لجعلها كتلة متماسكة لكي تسهل عملية القطع وتوجد عدة انواع من المواد المستخدمة ويعد البرافين أشهرها و أكثرها استخداما و شمع البرافين عبارة عن مادة هيدروكربونية ممزوجة بمواد بلاستيكية، وهناك عدة أنواع من شمع البرافين تبعا لدرجة انصهاره:

- البرافين الرخو او الطري Soft paraffin ينصهر عند درجة حرارة 45-50 درجة مئوية
- البرافين المتوسطة medium paraffin : ينصهر عند درجة حرارة 50-55 درجة مئوية
- البرافين الصلب hard paraffin : ينصهر عند درجة حرارة 56-68 درجة مئوية

و لعمل القالب الشمعي يعبأ الشمع المنصهر داخل القالب ثم تنقل العينة باستخدام ملقط و توضع العينة بالاتجاه المرغوب به، بعدها يترك القالب على سطح ثلجي فترة قصيرة ليبرد سطحه الخارجي ، و حتى لا يلتصق الشمع بأطراف القالب المعدنية فإنه يفضل مسح قاعدته و أطرافه الداخلية بالفازلين أو الجليسرين قبل ذلك.

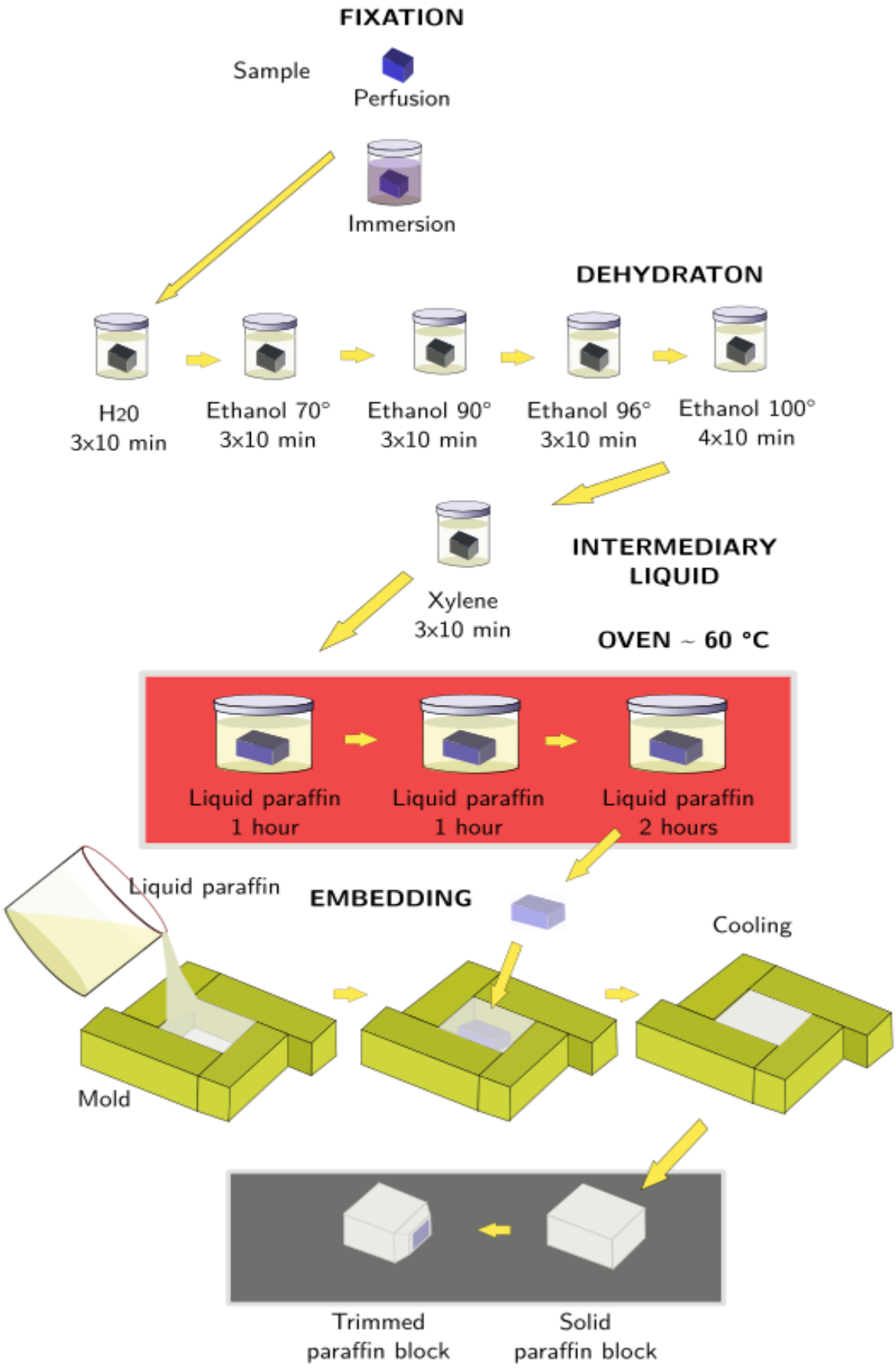
8- التشذيب او التقليم Trimming:

بعد تحضير القوالب الشمعية يستحسن تشذيبها بشفرة حادة حتى تصبح العينة في وضع مناسب للتقطيع بحيث تصبح أطرافها متوازية و يمكن أن تنطبق على حافة سكين الميكروتوم.

9- تقطيع العينة Sectioning:

تثبت العينة على حامل العينة في الميكروتوم كما يجب ان يزود جهاز القطع بسكين حادة جداً ويحدد سمك القطاع المرغوب فيه وتكون القطاعات الجيدة عادةً على شكل أشرطة Ribbons او سلسلة القطاعات ويفضل أن توضع هذه الأشرطة على صفيحه سوداء حتى يسهل تمييز

القطاعات وأخذ المناسب منها لوضعه على الشريحة الزجاجية.


FIXATION
Sample
Perfusion
Immersion
DEHYDRATON
H20
3x10 min
Ethanol 70°
3x10 min
Ethanol 90°
3x10 min
Ethanol 96°
3x10 min
Ethanol 100°
4x10 min
INTERMEDIARY
LIQUID
Xylene
3x10 min
OVEN ~ 60 °C
Liquid paraffin
1 hour
Liquid paraffin
1 hour
Liquid paraffin
2 hours
Liquid paraffin
EMBEDDING
Cooling
Mold
Trimmed
paraffin block
Solid
paraffin block

10- الصبغ Staining

تحتاج النماذج او المقاطع في معظم التحضيرات المجهرية الى الصبغ لغرض تمييز اجزائها المختلفة 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 الصبغات. ويتم اختيار الصبغة بحيث تتلاءم مع الجزء المطلوب دراسته، فاذا اريد تمييز او توضيح جزء معين من خلية او نسيج فيجب اختيار صبغة خاصة له special stain اما اذا اريد دراسة النموذج بصورة عامة فهناك العديد من الصبغات يمكن استخدامها لهذا الغرض.

عند استعمال شمع البرافين يجب ان يزال شمع البرافين من القطاعات تماما باستخدام الزايلول ومن ثم يجب التخلص من الزايلول بالكحول المطلق، بعدها تنقل القطاعات الى بيئة مشابهة للبيئة المذابة فيها الصبغة (مائية او كحولية) وتعتمد مدة الصبغ **على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج** ، وقد يصبغ النسيج بأكثر من صبغة او قد يلجا الباحث الى ما يسمى الصبغ المضاد كاستخدام صبغة الهيماتوكسلين لصبغ الانوية **(صبغة نووية)** وصبغة الايوسين لصبغ السايتوبلازم **(صبغة سايتوبلازمية).**

تصنيف الصبغات :

الصبغات عبارة عن مواد عضوية ملونة تكون في الغالب املاحا وتمتلك من الخواص بحيث تستطيع الانسجة مسكها بثبات ولا يمكن ازالتها حتى عند استخدام مذيبات نفس المادة العضوية.

أ- تقسيم الصبغات تبعا لتركيز الاس الهيدروجيني 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 والهيماتوكسيلين Haematoxylin.

2- الصبغات الحامضية Acidic stains

هي الصبغات التي تكون حاوية على جذور حامضية عضوية ملونة تتحد مع قاعدة معدنية غير ملونة للانسجة مثل صبغة الخضراء الباهتة light green وصبغة الايوسين Eosin

3- الصبغات المتعادلة Neutral stain

وتكون مركبة من صبغات حامضية وقاعدية مثل الاحمر المتعادل Neutral red

ب- تقسيم الصبغات حسب ميل اجزاء البروتوبلازم للاصطباغ بها:

1- الصبغات النووية Nuclear stains

هي الصبغات التي تميل لصبغ النواة وبما ان النواة غنية بالحوامض النووية لذا تميل للاصطباغ بالصبغات القاعدية لذا فان جميع الصبغات النووية هي صبغات قاعدية

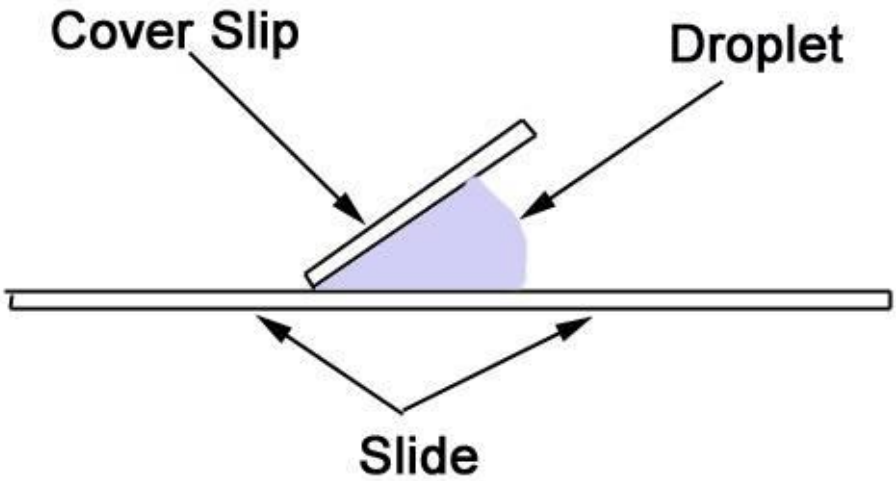
2- الصبغات السايتوبلازمية Cytoplasmic stains

هي 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

11- تحميل القطاعات Mounting:

يقصد بها وضع القطاع النسيجي على الشريحة الزجاجية واضافة مادة التحميل Mountant ثم تغطيتها بغطاء الشريحة Cover slides بزاوية حادة 45 درجة وبحذر شديد حتى لا تتكون فقاعات هوائية . ان الغرض الاساسي من التحميل هو لأجل الحفاظ على النماذج او المقاطع اطول فترة ممكنة وكذلك التخلص من الهواء والغبار بوضع غطاء الشريحة على المقاطع المحملة لأجل فحصها مجهريا.

تكون اوساط التحميل في حالة التحضيرات المؤقتة سائلة عادة لمنع الانسجة من الجفاف مثل الماء والكليسرين Glycerin والكحول اما في حالة التحضيرات الدائمية فتكون اوساط التحميل راتنجية او جيلاتينية عادة .



12- التجفيف والتنظيف والتعليم Drying, Cleaning and Labeling

ان عملية التجفيف هي اخر خطوات التحضير ويقصد بها تبخير المذيب من مادة التحميل لغرض تثبيت غطاء الشريحة بصورة محكمة ويتم ذلك بوضع الشريحة على صفيحة حارة hot plate او تركها لتجف بدرجة حرارة المختبر.

اما التنظيف فيقصد به ازالة مواد التحميل الزائدة حول غطاء الشريحة وكذلك تنظيف الشريحة نفسها مما علق بها من مواد ويتم ذلك باستخدام مواد كيمياوية اهمها الزايلين.

اما التعليم فهو وضع ورقة لاصقة على الشريحة مدون عليها معلومات عن نوع النسيج والمثبت والصبغة وتاريخ التحضير.

<u>مميزات تقنية شمع البرافين:</u>

1- هذه التقنية تأخذ وقت قصير للإعداد (ليس أكثر من يومين).

2- تعطي سلسلة متتابعة من القطاعات تسمى أشرطة Ribbons متصلة مع بعضها البعض وهذه الأشرطة مهمة للعمل البحثي.

3- تعطي قطاعات رقيقة جداً.

4- قطاعات هذه الطريقة سهلة الصبغ.