التحضيرات المجهرية

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.

وكون هذه التقنية ذو علاقة وطيدة مع العديد من العلوم مثل علم الأمراض وعلم الأنسجة وعلم كيمياء الأنسجة وعلم الخلية وغيرها من العلوم الأخرى التي تخدمها التحضيرات المجهرية, كان لابد من تعريف بعض هذه العلوم:

علم الخلية Cytology :

وهو العلم الذي يدرس الخلايا من حيث التركيب والشكل والوظيفة.

Histology (Microscopic Anatomy): علم الأنسجة

وهو العلم الذي يدرس التراكيب المجهرية لكل من الخلايا والأنسجة والأعضاء الذي يتكون منها الكائن الحي.

علم الأمراض Pathology:

وهو العلم الذي يدرس المرض من حيث أسبابة وميكانيكية تطوره وعلاقاته وأعراضه ونتائجه.

Microtechniques (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.

وهناك طرق عديدة للتحضيرات المجهرية نذكر منها الأكثر شيوعا في الوقت الحاضر:

1) التحميل الكلي Whole mount :

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

ا- التحميل الكلي المؤقت.

ب- التحميل الكلي الدائم.

2) عمل مسحاتٍ Smearing Method:

وهي من أسرع الطرق التحضيرية الخاصة بالأنسجة الرخوة مثل الخصى الحيوانية والسوائل الحيوية مثل الدم والبلغم و السائل المهبلي.

3) النشر أو النشر Teasing 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) السحق أو الهرس Squashing Method :

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

5) الطريقة المباشرة Direct Method:

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

6) التقطيع Sectioning Method:

وهي الأهم لدراسة العينات على مستواها النسيجي و الخلوي والغرض منها الحصول على قطاع نسيجي رقيق جدا, و هناك ثلاث طرق رئيسية تستخدم لعمل المقاطع النسيجية.

1- تقنية البرافين (وهي الطريقة الأشهر) The paraffin technique 2- تقنية السللودين (وهي الأكثر دقة) The celloidin technique

3- تقنية التجميد (وهي الأسرع) The freezing technique

أولا: 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.
2- تثبيت العينة.
3- غسل العينة.
4- نزع الماء من العينة.
5- ترويق العينة.
6- تخليل أو تشريب العينة.
7- طمر العينة.
8- التشذيب
9- القطع.
10- تحميل القطاعات على الشريحة.
11- صبغ القطاعات.
12- عمل شريحة مستديمة.

و سوف نتطرق لكل خطوة بشيء من التفصيل:

Obtaining the specimen : الحصول على العينة 1.

نحصل على العينة **Biopsy** من الإنسان المريض خلال العملية الجراحية ومن الحيوان بعد قتله مباشرة

- **القتل**: هو إيقاف دائم وسريع لجميع العمليات الحيوية.
- و تتم عملية القتل بعدة وسائل (الذبح – التنخيع – ضرب مؤخرة الرأس – التخدير.)
- **الذبح**: وهي من أسهل العمليات وأسرعها وتطبيق على معظم الحيوانات الفقارية إذا استثنينا الأسماك منها وتستخدم سكين حادة جدا وتتم عملية الذبح بقطع أوردة وشرايين الرقبة مع القصبة الهوائية والبلعوم .
- **التنخيع** : ويقصد بها شل الحيوان شلا كاملا وذلك بفصل الحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي أو المخ وبذلك لا يحس الحيوان بالألم أثناء عملية التشريح وتتم عملية التخنيع بغرز إبرة التشريح الحادة فيما بين الفقرة الأو لى من الفقرات العنقية والجمجمة حتى تصل إلى الحبل الشوكي ثم تحرك هذه الإبرة يمنة ويسرة حتى نضمن الانفصال التام للحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي وكثيرا ما يطبق على الضفادع.
- **ضرب مؤخرة الرأس** : وتهدف إلى ارتجاج مخي مفاجئ بحيث يصبح الحيوان بعدها في حالة غيبوبة تامة تتم هذه العملية بالإمساك الجيد بالحيوان بحيث تكون الناحية البطنية باتجاهك مع ترك منطقة العنق والرأس حرة الحركة ثم يضرب بموخرة الرأس الخلفية ويشكل سريع ومفاجئ على أي جسم صلب الطاولة ويجب أن يتم الارتجاج المخي بضربة واحدة فقط بدون تردد أو خوف وإلا تألم الحيوان ويعرف نجاح العملية في حالة الفار بخروج الدم من فتحتي الأنف (هذه الطريقة تناسب الفئران والضفادع) .
- **التخدير**: هو إيقاف مؤقت لجميع العمليات الحيوية بإستخدام مادة مخدرة مثل: (الكلورفورم)

Fixation : التثبيت 2.

الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة من أجل إخضاعها للفحوصات النسيجية والكيميانسيجية وتهدف هذه الخطوة إلى المحافظة على النسيج و محتوياته على الحالة التي كان عليها في جسم الكائن الحي أو قريبة

من ذلك وتتم عملية التثبيت من خلال التفاعلات الكيميائية و التداخلات الفيزيائية بين المجاميع الفعالة للمثبت و المجاميع الفعالة للمواد الكيميائية الموجودة في النسيج (كربوهيدرات – بروتين – دهون – إنزيمات – أملاح معدنية–صبغات). و تقوم عملية التثبيت بإيقاف عملية التفتت والتفسخ **Disintegration** و التعفن **Putrefaction** الناتجة عن نشاط البكتيريا و الفطريات و كذلك إيقاف عملية التحلل الذاتي للنسيج بفعل الإنزيمات.

الهدف من التثبيت:

1- تخثير البروتينات **coagulation of proteins** و تحويل مكونات النسيج الذائبة إلى مواد غير قابلة للذوبان في جميع المحاليل و الأوساط الكيميائية التي سوف يتعرض لها النسيج في العمليات اللاحقة.

2- 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.

3- إعطاء النسيج قدر من الصلابة المطلوبة لتهيئته للتقطيع.

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

وحتى تتحقق الأهداف المرجوة من التثبيت المذكورة أعلاه لابد من مراعاة النقاط التالية:

- اختيار المثبت المناسب للعمل حسب الغرض من الدراسة.
- وضع العينة في المثبت مباشرة بعد أخذها من الجسم لمنع عملية التحلل والتفسخ.
- إن يكون حجم العينة صغير بحيث يسمح للمثبت بالنفاذ خلال العينة في وقت قصير (سمك العينة لا يزيد على 2–5 مم)
- إن يكون حجم المثبت عدة أضعاف حجم العينة(10–20 ضعف.)
- ضرورة التقيد بالفترة الزمنية اللازمة للتثبيت حسب المثبت المستخدم(24 ساعة على الأغلب.)
- الأخذ في الاعتبار الآثار التي سيتركها المثبت على مكونات النسيج وتركيب الخلايا بعد التثبيت.
- إذا لم يتوفر المثبت المناسب في حاله طارئة يجب وضع العينة في السائل النيتروجيني(–182 مئوية) إلى حين توفر المثبت المناسب .

- يجب غمر العينة بأكملها في المثبت وذلك برج المثبت عدة مرات بعد وضع العينة فيه حتى تتبلل جميع أسطح العينة بالمثبت.

المثبت Fixative

هو عبارة عن وسط سائل يحتوي على مواد كيميائه بعضها يعمل على تثبيت المحتوى الكيميائي للخلايا والمواد بين الخلوية عن طريق التخثير والترسيب وبعضها يعمل على معاكسة الوسط المذيب على خلايا النسيج من التشوه.

شروط المثبت الجيد:

1. يتخلل الأنسجة بسهولة وبسرعة.
2. يعمل في درجة الحرارة العادية.
3. لا يحدث ضرر بالنسيج.
4. يعمل على تيبس النسيج نوعاً ما بحيث يصبح قوامه سهل التقطيع.
5. لا يتعارض مع الصبغات المختلفة عند صبغ العينة.
6. يستمر مفعولة لمدة طويلة.
7. يقتل الجراثيم والفطريات التي تساعد على تحلل الأنسجة.
8. أن لا يترك المثبت أي آثار جانبيه سيئة أو أصباغ على النسيج.
9. أن يكون سعره مناسبا ومتوفرا باستمرار.

العوامل المؤثرة على عملية التثبيت:

1- الأس الهيدروجيني للمثبت: يجب أن يكون ما بين(6- 8)لأن زيادة الأس الهيدروجيني أو النقصان يتلف الأنسجة ويمكن الحصول على درجة الحموضة باستخدام محلول واقيBuffer.

2- درجة حرارة المكان: تزداد سرعة النفاذ بزيادة درجة حرارة المكان والعكس صحيح ألا أن الحرارة العالية تتلف الأنسجة لذا يفضل أن تكون درجة الحرارة(25) درجة مئوية.

3- تركيز المثبت وكميته: يتناسب مع حجم العينة طرديا(10-20) ضعفا.

4- مدة التثبيت: تتناسب مع حجم العينة طردياً.

أنواع وتصنيف المثبتات:

المثبتات المستخدمة في الدراسات النسيجية والكيميانسيجية كثيرة قد تربو على(650) مثبت وقد صنفت بعدة طرق نذكر منها تصنيف بيكر 1960م الذي صنف المثبتات إلى:

1- مثبتات كيماوية مخثرة للبروتين: مثل حامض البكريك (المر)، كلوريد الزئبقيك، الكحول الإثيلي، الأسيتون، ثالث كلوريد حمض الخليك.

2- مثبتات كيماوية مخثرة للبروتين: مثل الفورمالدهيد، حمض الخليك، ثنائي كرومات البوتاسيوم، ر ابع كلوريد الأوزميوم.

وهناك عدة أنظمة لتصنيف المثبتات يعتمد بعضها على:

1. طبيعة عمل المثبت.
2. استعمال المثبت .
3. الغرض من الدراسة (نسيجيه أو كيميانسيجيه.)
4. على المواد الموجودة في المثبت:

- مثبتات محتويه على مجموعات ألدهايديه مثل:مثبت الفورمالين، فورمول الكالسيوم،N.B.F وغيرها.
- مثبتات محتويه على أيونات معدنية (زئبق(مثبت زنكر،هلي،سوسا) – كروم – أوزميوم)
- مثبتات محتويه على حمض المر(مثبت روسمان، كارنوي، بوان.)
- مثبتات الكحول و الأسيتون.

تركيب المثبت:

- مثبتات بسيطة.
- مثبتات مركبة:
- مثبتات تشريح دقيق.
- مثبتات خلوية (نووية و سيتوبلازمية.)

أنواع المثبتات الجيدة: الفورمالين Formalin 10%

هو أكثر المحاليل المثبتة استعمالاً . والمركز منه عبارة عن 04 % فورمالدهيد وأحسن نسبة للفورمالين المثبت 01 % من المحلول المركز أي إضافة 10 مل من المحلول المركز إلى 90مل من الماء المقطر.

مدة تثبيت العينة من 42 12 ساعة على الأقل حسب حجم العينة.

- مميزاته :

1. رخيص الثمن.
2. لا يسبب تصلب أو انكماش للنسيج إذا تركت العينة فيه فترة طويلة.
3. يصلح كمثبت لجميع الصبغات.
4. يمكن حفظ العينة فيه مدة طويلة.
5. يمكن الاكتفاء بغسل النسيج بعد التثبيت لمدة ساعة فقط.

- عيوبه :

1. له تأثير ضار على الجلد لذلك يجب الاستعمال للقفازات.
2. يسبب بعض الالتهابات للغشاء المخاطي للأنف ولذلك يجب تهوية المكان جيداً .

- محلول زنكر Zinker Solution: تركيبه

كلوريد زئبق 5 غرام. + دايكرومات بوتاسيوم 2.5 غرام. + سلفات صوديوم 1 غرام. ويكمل إلى 100 مل ماء مقطر .ويضاف 5 مل حامض خليك ثلجي Pacial acidic acid .قبل الاستعمال مباشرة.

- مميزاته :

1. قوة حفظه للنواه.
2. يستعمل أكثر لنخاع العظام والأعضاء الدموية.

- عيوبه :

1. يجب غسل النسيج بعد التثبيت بالماء الجاري لمدة 12 ساعة.
2. لا يمكن تثبيت العينة لأكثر من 24 ساعة.

- محلول هيللي : HelleyFluid

هو أحد المحاليل المثبتة المستعملة لحفظ عينة جراحية

- تركيبه : مثل تركيب محلول زنكر ولكن هناك فرق في أن هيللي يتم إضافة 5 مل فورمالين قبل الاستعمال مباشرة.
- مميزاته : مثبت جيد للأعضاء الدموية " النخاع – الطحال"
- عيوبه : 1.يجب غسل العينة لأكثر من 24 ساعة وإلا حدث ضرر للنسيج

2. باهظ الثمن

- **محلول الكحول الايثيلي تركيز 70 Ethyl Alcohol%**
- **تركيبه:**

كحول ايثلي تركيز 96 % نأخذ منه 70 مل ويضاف 26 مل ماء مقطر.

- **إستخدامه:**

يستخدم أكثر في تثبيت عينات السوائل والمسحات.

- ***عيوبه*:**

1.غالي الثمن.

2.لا يستعمل كثيراً لضعف تخلله للأنسجة.

3.إذا تركت فيه العينة لفترة طويلة يسبب انكماش في النسيج ويعطي صلابة زائدة.

- ***Bouin* Solution محلول بوان**
- ***تركيبه:***

1. حمض البكريك (محلول مائي مشبع) 75 مل.

2. فورمالدهيد(40%) 25 مل.

3. حمض خليك ثلجي 5 مل.

4. مدة تثبيت العينة 12 ساعة على الأقل حسب حجم العينة.*

عيوبه:

1. يسبب انكماش في النسيج قليلاً.
2. وجود حمض البكريك يعطي النسيج اللون الأصفر لذلك يجب غسله في كحول % 70 لإزالة اللون الأصفر.
3. باهظ الثمن .
4. يدخل في تركيبه حمض البكريك.

مميزاته:

5. يستخدم في حالات العظام .
6. يستعمل أكثر في حفظ عينات الخصية.

- محلول حمض الاوزميك Osmic acid :

. محلول حمض الأوزميك ويستعمل بتركيز 2 % كصبغة.

مميزاته:

1. يستعمل في تثبيت العينات الدهنية .
2. مثبت وصبغة.
3. يستعمل في الأبحاث عن وجود أجسام جولوجي.

- محلول سوسا: Sossa solution عيوبه

إذا ترك النسيج لفترة طويلة أكثر من 24ساعة يتصلب.

يزيل قليل من التكلسات الموجودة في النسيج.

مميزاته:

وجود Tri Chloro Acidic Acid

- محلول كلارك Clarck مميزاته:

1. يستخدم أكثر في المسحات.
2. مثبت جيد للنواة وقوة حفظه للسيتوبلازم.

- محلول كارنوي Carnoy مميزاته:

1. مثبت سريع .لمدة 1 ساعه
2. يستخدم في تحضير العينة السريعة

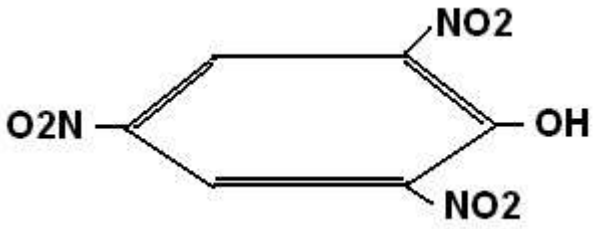
عيوبه:

غالي الثمن.

- مثبت روسمان Rossman's fixative:

من المثبتات التي تحتوي على حمض المر Picric acid

- مثبتات جيدة لتثبيت بروتينات الخلية
- تحتوي على حمض المر وهو ثلاثي نتريت الفينول



- تركيبه:
- **Rossman's fixative Absolute ethyl alcohol saturated with picric acid 90 ml + 10 ml Formalin 40% .**

عيوبه:

غالي الثمن.

3. عملية الغسل Washing :

يجب غسل العينة بعد التثبيت و ذلك لإزالة ما تبقى من أثر المثبت على العينة

العينات المثبتة في مثبت بوان بالكحول 70 % حتى يزول اللون الأصفر.

. تغسل العينات المثبتة في زنكر بالكحول 96 % مشبع باليود ومدة الغسيل تتراوح من 5 – 8 ساعات .

. العينات المثبتة في مثبت روسمان تغسل بالكحول 96 %

. العينات المثبتة في الفورمالين تغسل بماء الصنبور الجاري لمدة 24 ساعة .

4.عملية نزع الماءDehydration:

وهي الطريقة التي يتم بواسطتها إحلال مادة محل الماء الموجود في النسيج هذه المادة تذوب فيها المحاليل و المواد المستعملة في الخطوات القادمة مع عدم تشويه النسيج و 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.

الماء لا يمتزج مع شمع البرافين لذلك يجب التخلص من الماء الموجود في النسيج الخلوي حتى تسهل عملية نفاذ البرافين المصهور إلى داخل الأنسجة وتتم عملية نزع الماء بتمرير العينة على سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من محاليل الكحول الايثيلي وتتراوح المدة اللازمة لترك العينة في كل خطوة من خطوات نزع الماء في محاليل الكحول المختلفة التركيز من 30 دقيقة إلى ثلاث ساعات كحد أقصى ويفضل أن تمرر العينة في مراحلها الأخيرة من خطوات نزع الماء على محلولين منفصلين من الكحول المطلق ولمدة تتراوح من ساعتين إلى ثلاث ساعات في كل مرة وذلك لزيادة التأكيد من تمام نزع الماء من العينة .

عند تحضير سلسلة كحول متدرجة التركيز يفضل استخدام 95 % كحول ايثيلي بدلا من الكحول المطلق ومنه تعمل التركيز المطلوبة فلكي نحضر محلول بتركيز 70 % نأخذ 70 مل من محلول الكحول 95 % ونضيف إليه 25 مل من الماء المقطر ليكون التركيز النهائي من الكحول 95 % .

5. *عملية الترويق* Clearing :

العملية التي بو اسطتها يتم إحلال ماده محل مادة نزع الماء 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 (الزيلول – الكلورفورم – تولوين – بنزين– زيت خشب الأرز) .و عند استخدام الزيلول و التولوين يحدث أحيانا أن يتعكر لون محلول مادة الترويق و هذا دليل على عدم اكتمال نزع الماء من نسيج العينة في هذه الحالة يجب إرجاع العينة إلى سلسلة الكحولات للتأكد من عملية نزع الماء بشكل تام أما المدة الكافية لترك العينة في المحلول المروق فهذا يعتمد على نوع وحجم العينة فكلما زاد حجم العينة كلما زادت مدة الترويق.

الكحول لا يمتزج مع شمع البرافين لذا يعتبر محلول الزيلول من أنسب المحاليل المروقة لسهولة امتزاجه مع البرافين والكحول وهناك مواد يمكن استخدامها كمروقات مثل التولوين والبنزين والكلوروفورم ولكنها سريعة التطاير.

6. *عملية التشريب أو التخلل* Impregnation or Infiltration :

عبارة عن إحلال كامل للمادة المستخدمة في الطمر مكان المادة المروقة، 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.

ويجب أن يراعى التالي:

– أن يتم التخلل لكامل أجزاء العينة ويحل محل المادة المروقة و إلا فإن عملية تحضير القطاعات ستكون غاية في الصعوبة.

– يجب أن يكون شمع برافين التخلل تام الانصهار (درجتان أعلى من درجة الانصهار) حيث يمتاز بنفاذية أسرع.

– يعتمد ز من التخلل على سمك و حجم العينة و يفضل ألا يزيد سمكها عن(5 مم) و ألا يزيد زمن تخلل عينات العضلات و الأنسجة الضامة عن ثلاث ساعات حتى لا يتسبب في صلابتها بينما يمكن أن تترك عينات الجلد والجهاز العصبي في الشمع المنصهر حتى ست ساعات.

– يجب ألا يقل حجم الشمع إلى حجم العينة عن عشرون ضعفا.

و يمكن في تقنيات أخرى استخدام مادة السللويدين(**celloidin**) في عملية التخليل كما يجب أن يكون الطمر بنفس المادة.

7. *عملية الطمر* ***Embedding***:

وهي عملية الغرض منها عمل قالب من العينة بحيث تحيط بها المادة الطامرة وتدعمها و المواد المستخدمة على نوعين:

–بعضها يذوب في الأوساط المائية عند الحرارة المرتفعة مثل الآجار**Agar** و الجيلاتين و الشمع الكربوني **Carbowax**.

–البعض الآخر لا يذوب في الأوساط المائية مثل شمع البرافين و السللويدين و الميثاكريلات و شمع الإستر.

إلا أن البرافين أشهرها و أكثرها استخداما في معامل الأنسجة و كيمياء الأنسجة و شمع البرافين عبارة عن مادة هيدروكربونية ممزوجة بمواد بلاستيكية.

وهناك عدة أنواع من شمع البرافين تبعا لدرجة انصهاره:

- البرافين الرخو **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 أهم عامل لاختيار نوع الشمع هي حرارة الفرن التي يعمل فيها القطاعات و نوعية العينة تحت الفحص، 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.

مع العلم أن هناك أنواع جديدة من أجهزة الطمر التي تستخدم الشبكات البلاستيكية الخاصة بتمرير القطاعات ومن ثم تطمر القطاعات في النهاية في هذه الشبكات (لهذه القوالب ميكروتوم خاص ذو حامل ملائم لحجم هذه الشبكات يختلف عن الميكروتوم ذو الحامل الخاص بالقالب المعدني القديم.)

8. عملية التشذيب *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 **specimen holder** في الميكروتوم كما يجب أن يزود جهاز القطع بسكين حادة جداً ويحدد سمك القطاع المرغوب فيه(3 – 7) ميكرون للبارافين وبسمك(10 – 15) ميكرون للسللويدين، القطاعات الجيدة عادةً تكون على شكل أشرطة **Ribbons** أو سلسله من القطاعات ويفضل أن توضع هذه الأشرطة على صفيحه سوداء حتى يسهل تمييز القطاعات وأخذ المناسب منها لوضعه على الشريحة الزجاجية.

10. تحميل القطاعات *Mounting*:

يقصد بها وضع القطاع النسيجي على الشريحة الزجاجية، ويمكن أن تتم هذه العملية بإحدى طريقتين:

يوضع القطاع في حمام مائي بدرجة حرارة(40 – 45) درجة مئوية ويترك القطا ع يطفو على سطح الماء لمدة(1 – 2) دقيقه حتى ينفرد تماما ، تمرر الشريحة الزجاجية تحت هذا القطاع ويلتقط بحيث يلتصق على وسط الشريحة ، وذلك برفع الشريحة باتجاه القطاع إلى أعلى مع عدم السماح لتكون أية فقاعات هوائية ، تترك الشريحة تجف على مجفف الشرائح(45) درجة مئوية لمدة(24 ساعة) تقريباً كما يفضل أن تكون الشريحة قد دهنت بلاصق ماير(عبارة عن حجمين متساويين من مادة زلال البيض والجليسرين مع سلسلات الصوديوم) كمادة حافظة. ينقل القطاع إلى شريحة مجهريه عليها قطرة ماء ثم توضع على مجفف الشرائح وتترك حتى تتبخر القطرة المائية ويلتصق القطاع جيداً على الشريحة والمدهونة بلاصق ماير مسبقاً.

11. عملية الصبغ Staining:

يجب أن يزال شمع البرافين من القطاعات تماما باستخدام الزيلول ومن ثم يجب التخلص من الزيلول هو الآخر بالكحول المطلق، بعدها يجب نقل القطاعات إلى بيئة مشابهه للبيئة المذابة فيها الصبغة (مائية أو كحولية) فإذا كانت الصبغة مذابة في الماء مثلاً يجب تميؤ hydration القطاعات وذلك بتمريرها على سلسلة تركيزها متدرجة الانخفاض من محاليل الكحول حتى تصل إلى الماء (3 دقائق لكل مرحلة) أما إذا كانت العينة مذابة في 50% كحول فيكتفي بتمرير القطاعات في السلسلة الكحولية حتى تصل إلى 50% قبل تمريرها في محلول الصبغة.

ومدة الصبغ تعتمد على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج وقد يصبغ النسيج بأكثر من صبغه أو قد يلجأ الباحث إلى ما يسمى الصبغ المضاد كاستخدام صبغة الهيماتوكسلين لصبغ الأنوية وصبغة الأيوسين لصبغ السيتوبلازم.

بعد الانتهاء من عملية الصبغ تبدأ عملية إعداد الشريحة المجهرية للحفظ المستديم باستخدام مادة شمعية أو مادة بلاستيكية حافظه مثل مادة بلسم كندا أو مادة (D.P.X) ثم يوضع غطاء الشريحة(Cover slip) بزاوية حادة 45 درجة وبحذر شديد حتى لا تتكون فقاعات هوائية Air bubbles ، وهكذا يتم عمل ما يعرف بالشريحة المستديمة.

بعد أن تترك لتجف على مجفف الشرائح يمكن فحص القطاعات تحت المجهر.

في المختبرات الصغيرة ومختبرات أبحاث الدم التي تستخدم عينات قليلة تتم الخطوات السابقة بشكل يدوي بينما في مختبرات الأمر اض التي يتم فيها أجراء فحوصات روتينية لعينات كثيرة تتم باستخدام أجهزة حديثه منها جهاز معاملة الأنسجة الأوتوماتيكي

(Tissue Auto processor)

مميزات تقنية شمع البرافين:

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

2– تعطي سلسلة متتابعة من القطاعات تسمى أشرطةRibbons متصلة مع بعضها البعض وهذه الأشرطة مهمة للعمل البحثي.

3–تعطي قطاعات رقيقة جداً.

4– قطاعات هذه الطريقة سهلة الصبغ.

عيوبها:

– هذه الطريقة تستخدم المثبتات والفرن والتي قد تضر بالنسيج وبتفاصيل تركيب الخلايا.

– استخدام المثبتات قد يذيب المحتوى الدهني للنسيج خلال التحضير لذا لا يمكن دراسة الدهون بهذه الطريقة.

– هذه الطريقة ليست مثالية في كيمياء الأنسجة لأن الحرارة تحطم الأنزيمات مثلاً.

ثانياً: تقنية السللويدين The Celloidin Technique

تشبه الطريقة السابقة طريقة شمع البرافين إلا أنه في هذه الطريقة يتم استبدال البرافين بالسللويدين. حيث أن بعض العينات مثل عينات العظم والعين يفضل أن يعمل فيها قوالب من السللويدين المعروفة بمادة النيتروسيليلوز(nitrocellulose) وقبل الطمر يجب أن توضع العينة في خليط من ثنائي الأيثر والكحول الإثيلي بنسب متساوية ثم تنقل العينة لمدة أسبوع في كل من محاليل السللويدين(2%،4%،8%) المذاب في خليط ثنائي إثيل الإيثر والكحول المطلق على أن توضع العينة داخل المحاليل في وعاء محكم الإغلاق، ويجب أن يكون حجم المحلول على الأقل 10 أضعاف حجم العينة وأن يكون عمقه على الأقل 3 أضعاف أطول طرف للعينة. تنقل بعد ذلك العينة إلى محلول السللويدين(8%) وتترك فترة حتى تزول الفقاعات الهوائية بعدها ينفخ على العينة بشكل جزئي وتترك تحت شافطة أبخرة (Fume hood) لمدة 5 – 10 أيام حتى يسمح للتبخر إلى نصف المحلول تقريباً، بعد ذلك يعمل قالب من العينة

يحيط بها السللويدين وتنقل إلى وعاء تجفيف(Desiccator) بداخلة كلوروفورم حتى يعمل على تصليب القالب، بغد ذلك ترفع العينة من وعاء التجفيف وتلصق على حامل خشبي باستخدام سللويدين(4%) ويحفظ القالب داخل كحول إثيلي(70%) لحين البدء في عمل قطاعات منة.

ويمكن أن يستخدم نوع خاص من السللويدين ذو لزوجة أقل(Low Viscosity Nitrocellulose) ويرمز له بالرمز(L.V.N) ويستخدم في بعض الحالات الخاصة لعينات الجهاز العصبي.وتعامل العينة بنفس الطريقة باستخدام محاليل من نفس المادة بتركيز(02% ,01% ,5%) مذابة بخليط من ثنائي الأيثر والكحول الإثيلي المطلق بنسب متساوية مضافاً إليها 5.0% زيت الخروع(Castor Oil).

مميزاتها:

- تعطي مقاطع كاملة الوضوح يمكن رؤية تفاصيل الأنسجة.
- عدم استخدام الحرارة فيها يحفظ التراكيب النسيجية كما هي.
- ممكن استخدام قطع كبيرة من الأنسجة مثل استخدام العين كاملةً عيوبها:
- تحتاج إلى وقت طو يل (شهر تقريباً) لإعداد القطاع.
- لا يمكن الحصول على أشرطة من القطاعات لأنها سميكة ومنفصلة عن بعضها البعض.
- قطاع السللويدين جداً صعب في القطع والصبغ.

ثالثاً:تقنية التجميد Frozen Method

في هذه الطريقة النسيج الطري أو المثبت يجمد ويصلب ويعمل منه قطاعات بالميكر وتوم الثلجي أو ما يسمى بالكريوستات (cryostat).

مميزاتها:

طريقة سريعة وبسيطة تستخدم عادة خلال العمليات الجراحية التي تطلب تشخيص سريعا للسرطانات.

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

تستخدم في كيمياء الأنسجة لدراسة فعالية الأنزيمات الخلوية والكشف عن الدهون وتفاعل الأجسام المضادة مع الأنتيجينات .

عيوبها:

- لا تعطي سلسله من المقاطع.
- تعطي قطاعات سميك بسب صعوبة القطع و التصبيغ.

عمليه نزع الكالسيوم من النسيج Decalcification :

من المعلوم أن وجود أملاح الكالسيوم في الأنسجة تسبب تصلباً للنسيج

يتعذر معه تقطيع هذه الأنسجة بواسطة الميكروتوم لذا يجب إزالة هذه الأملاح لنتمكن من الحصول على عينة نسيجية لينة يمكن تقطيعها دون إحداث ثلمات أو أضرار في سكينة القطع.

تعريف عملية نزع الكلسيوم:هي الطريقة التي نقوم بواسطتها بإزالة ترسبات أملاح الكالسيوم من الأنسجة الغنية بها مثل العظام والأسنان.

وتتم العملية بوضع العينة في محلول نازع للكالسيوم مثل: محلول بريني، محلول حمض الفورميك المنظم، محلول جودنج و ستيورت، محلول شميدت، محلول ليلي.

التحضيرات الا مقطعية

1. شريحة مجهر ية لسحبة من دم الإنسان

الأدوات والمواد المستخدمة:

مجهر مركب – شرائح وأغطية – أدوات تشريح صبغة اليود

– مسحة طبية – قطن – ماء مقطر إبرة وخز – كحول –

لزق جروح – دم إنسان حمض خليك صبغة رأيت أو لشما

ن

الأهداف: يتوقع منك عزيزي الطالب نتيجة قيامك بالنشاط المرافق بلوغ الأهداف التالية:

1-أن تعد شريحة مجهرية لسحبة من دم الإنسان بشكل سليم للفحص .

2-أن تكون قادراً على التعامل مع المجهر المركب بشكل سليم .

3-أن تحدد أوجه الشبه والاختلاف بين الخلايا الدم الحمراء والبيضاء .

خطوات العمل :-

1. **نظف إصبع الإبهام بواسطة المسحة الطبية أو قطن مبلل بالكحول.**

أثقب الإبهام بإبرة الوخز ثم ضع الدم على طرف شريحة نظيفة.

2. **بعد الحصول على الدم نظف الإبهام بالكحول أو المسحة الطبية مرة أخرى وضع لز قة على الجرح .**
3. **ضع شريحة ثانية فوقها بحيث يكون أحد أطرافها مائلاً على الشريحة الأولى بزاوية 30 درجة مئوية.**
4. **بعد انتشار الدم على الشريحة العليا ادفع الشريحة بسرعة معتدلة في اتجاه الطرف الأخر على الشريحة الأولى.لماذا؟**
5. **دع الشريحة تجف في الهواء**
6. **. اصبغ الشريحة بصبغة رأيت أو صبغة لشما ن أو يود أو أي صبغة أخرى لفترة دقيقتين تقريباً .**
7. **أغسل الشريحة بالماء المقطر أكثر من مرة . لماذا ؟**

.....

8. **أترك الشريحة لتجف .**
9. **ضع الشريحة تحت المجهر المركب لفحصها ولاحظ:**

شكل خلايا الدم الحمراء..... .

شكل خلايا الدم البيضاء..... .

النواة ..... .

10. **ملاحظة خلايا الدم البيضاء بسهولة أكبر أضف قطرة من حمض الخليك عند طرف غطاء الشريحة.**

خلايا الدم البيضاء والحمراء

2. شريحة مجهرية للخلايا الحرشفية

الأدوات والمواد المستخدمة:

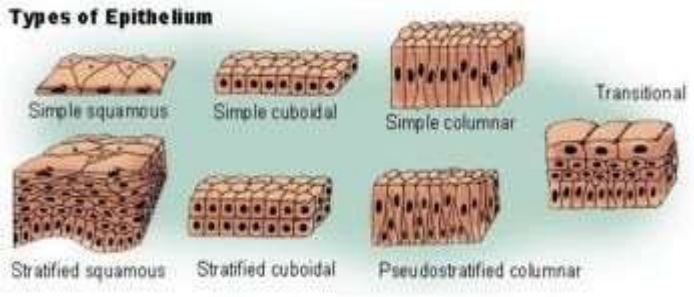
مجهر مركب – شرائح وأغطية – قضيب زجاجي – صبغة ازرق المثيلين – قطارة – ماء مقطر – فازلين – نكاشات أسنان

خطوات العمل :-

1. **ضع قطرة صغيرة من الماء المقطر وسط الشريحة.**
2. **حك و لعدة مرات بطانة التجويف الفمي بعد المضمضة بواسطة النهاية المستعرضة لنكاشة الأسنان حتي تحصل على كمية لابأس بها من الخلايا الحرشفية ويعرف ذلك بتراكم مادة بيضاء اللون على رأس النكاشة.**
3. **حرك نهاية النكاشة في قطرة الماء الصغيرة على الشريحة.**
4. **تضاف قطرة صغيرة من أزرق المثيلين.**
5. **تمزج القطرة مع قطرة الصبغة جيدا بإستخدان القضيب الزجاجي.**
6. **ضع غطاء الشريحة بالقرب من محلول العينة وبمساعدة ابرة التشريح نزل الغطاء بالتدريج حتى ينطبق على الشريحة المجهرية.**
7. **ينبسط المحلول تماما مع عدم تكون فقاعات هوائية بحيث يتناسب حجم المحلول مع غطاء الشريحة.**
8. **يفضل أن تدهن حواف غطاء الشريحة من الخارج بالفازلين غذا كان الجو حاراحارا**
9. **تفحص تحت المجهر.**

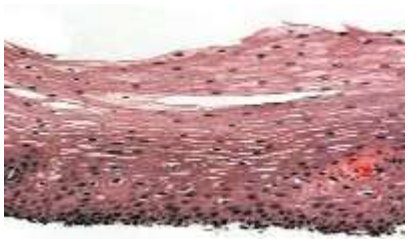
الأنسجة الطلائية الحرشفية المصففة غير الكيراتينية Stratified Squamous(non-keratinized Epithelium) تتكون الطلائية في هذه الحالة من طبقات من الخلايا فوق بعضها البعض . ويتراوح سمك أو عدد طبقات الخلايا عداوة من 5-30 طبقة. وتقع الطبقة السفلى – المسماة طبقة ملبيجي أو الطبقة الجرثومية – على غشاء قاعدي مثنى. وتتكون هذه الطبقة السفى من خلايا مكعبانية أو عمودية قصيرة ، لها أنوية كرية أو بيضاوية وسيتوبلازم محبب. ويشيع الإنقسام غير المباشر في خلايا الطبقة القاعدية ، وعلى ذلك فهي تعطي خلايا جديدة تكون الطبقات الواقعة فوقها .

أما الخلايا في الطبقات الوسطة لهذه الطلائية فهعي متعددة الأضلاع ، بينما تنضغط خلايا الطبقات السطحية ، وتصبح مفلطحة كلما إقتربت من السطح. وعلى هذا فإن الخلايا الواقعة في الطبقة العليا الحرشفية ، وتبدو أنوية هذه الخلايا مفلطحة .

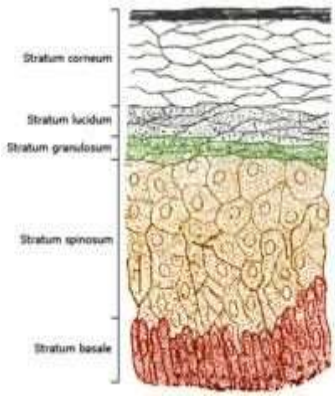


طرز تواجدها

عادة يكون هذا الطراز من الطلائيات رطبا ، ويكون بطانة مريء الثدييات ، والملتحمة Conjunctiva، والقرنية والمهبل والقناة الشرجية والجزء الطرفي في مجرى البول Urethra في الذكور . صبغة H&E لخزعة من مريء سليم تظهر النسيج الطلائي ذو الخلايا الحرشفية المصففة



مقطع في الجلد البشري يظهر سطح النسيج الطلائي الحرشفي المصفف, الذي يسمى البشرة .



الوظائف: لهذا الطراز من الطلائية وظائف الإفراز والحماية .

نسيج طلائي حرشفي مصفف كيراتيني الطلائية "الكيراتينية" الحرشفية الطلائية Stratified Epithelium (Keratinized)Squamous تماثل هذه الطلائية الطراز السابق ، فيما عدا أن الخلايا

الحرشفية السطحية تتحول إلى طبقة ميتة أو قرنية من حراشيف مفلطحة من مادة ، تعرف بإسم "كير اتين" وتتساقط هذه الطبقة الميتة على فترات ، وتحل محلها طبقة جديدة من الخلايا الواقعة أسفلها .

طرز تواجدها: تكون الطبقة الخارجية للجلد والمعروفة بإسم "البشرة "Epideris .

الوظائف: تقوم هذه الطلائية أساسا بوظيفة الحماية.

3. تحضير بعض الأوليات الطفيلية بالطريقة المباشرة

الأوليات عبارة عن كائنات حيوانية وحيدة الخلية، ويوجد انواع منها حرة المعيشة (free Living) وأنواع طفيلية المعيشة (Parasitic Living) تعتمد على غذائها إما على الحيوان أو على النبات وبعض هذه الطفيليات ضار ويسبب كثيرا من الأمراض وتحتوي امعاء البرمائيات وبالذات الضفادع على عدة اجناس من الكائنات الأولية الطفيلية التي تعتبر من انسب المصادر للدراسة لسهولة الحصول عليها:

Kingdom	Animal
Phylum	Ciliophora
Class	Ciliatea
Subclass	Rhabdophorina
Order	Hymenostomatida
Suborder	Peniculina

Kingdom	Animal
Phylum	Ciliophora
Class	Ciliatea
Subclass	Rhabdophorina
Family Trachelidae	Genus Dileptus

Family	Parameciidae
Genus	Paramecium

الأدوات والمواد المستخدمة:

ضفدعة- كأس زجاجية صغيرة- أدوات تشريح- محلول كلوريد الصوديوم5.0%- صبغة ازرق الميثيلين – فازلين- دبابيس- شرائح- اغطية شرائخ- قطارات- قضيب زجاجي- ادوات تشريح- مجهر ضوئي

طريقة العمل:

1. **أمسك الضفدعة جيدا من اطرافها الخلفية ثم اضرب بمؤخرة رأسها و بشدة على حافة الطاولة حتى تصبح في غيبوبة تامة.**
2. **تثبت الضفدعة جيدا في طبق التشريح بالدبابيس على ناحيتها الظهرية ثم يفتح التجويف البطني بسرعة وتعذل القناة الهضمية ويفصل المستقيم عن باقي الأعضاء.**
3. **يوضع المستقيم في الكأس الزجاجية بها 10 مل من محلول كلوريد الصوديوم 5.0% ويفتح المستقم بالمقص ثم يحرك جيداً في المحلول الملحي وبعدهل يبعد المستقيم ويحفظ المحلول حتي تترسب مخلفات الطعام اسفل الكأس ، توضع قطرة صغيرة من هذا المحلول الرائق في وسط الشريحة.**
4. **تضاف قطرة صغيرة جدا من صبغة ازرق الميثيلين.**

4. التحضيرات المستديمة لأجزاء كيتينية من الحشرة.

1. التخلص من الأنسجة والعضلات

يوضع الجزء المراد تحضيره في محلول صودا كاوية(10%) ويغلي لمدة 10 دقائق (أكثر أو أقل تبعا لصلابة الجزء) ولكن يراعي ألا يفقد لون الكيوتيكل.

(يمكن وضع الجزء المراد تحضيره في محلول صودا كاوية(10%) بدون غلي لكن لمدة أطول قد تصل إلي عشرة أيام).

2. تغسل العينات غسلا جيدا بالماء المقطر عدة مرات.

3. إزالة الماء من العينات:

بالإمرار في سلسلة من التركيزات المتصاعدة للكحول الإيثيلي (60–70– 80– 90– 100%) لمدة من 15 دقيقة إلي 12ساعة في كل تركيز تبعا للحجم والصلابة.

4. إذا أردنا صبغ العينات فإنها تترك في الصبغة بعد تمريرها في تركيز 70% كحول ثم تنقل لباقي التركيزات المذكورة.

5. عملية الترويق:

توضع العينة في الزيلول من 5– 10 دقيقة (يمكن أستخدام زيت القرنفل أو زيت السيدر).

6. عمليةاللصق:

توضع العينة علي شريحة نظيفة ويوضع عليها قطره من الكندابلسم ثم تغطي الشريحة بغطاءالشريحة مع تفادي دخول فقاعات الهواءتوضع الشرائح في فرن لتجف في درجة حرارة تتراوح بين 25– 35 درجة مئوية.

حشرة القراد قبل معالجتها للفحص تحت المجهر الضوئي.