التحضيرات المجهرية
MICRO TECHNIQUES

المصادر المعتمد عليها:

١. العطار، عدنان عبد الامير والعلاف، سهبلة محمود والمختار، كواكب عبد القادر. ١٩٨٢. التحضيرات المجهرية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. ٣٣٦ صفحة.

٢. الحاج، حميد احمد. ٢٠١٠. التحضيرات المجهرية الضوئية والتطبيق، الطبعة الاولى. دار المسيرة للنشر والتوزيع، عمان، الاردن. ١٧- ١٣٧ صفحة

٣. عبد القادر، عمر حامد محمد. ٢٠١٢. التحضيرات المجهرية. جامعة الملك سعود، كلية العلوم. ٥٦ صفحة.

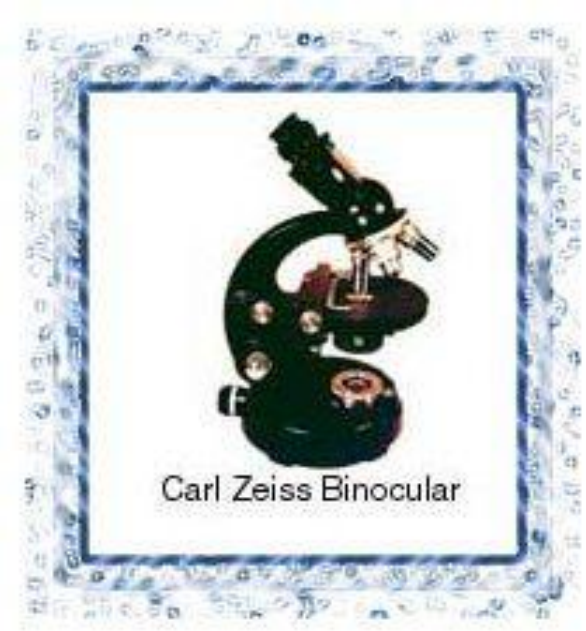
التحضيرات المجهرية :

هي تلك الخطوات التي بواسطتها يمكن دراسة التراكيب الخلوية المكونة لجسم الكائن الحي والتي لاترى بالعين المجردة اواجزاء منها او اعضاء من الجسم باستخدام اجهزة ومعدات خاصة لهذا الغرض. تقسم الى:

١. تحضيرات لا مقطعية لا يمكن عمل مقاطع فيها مثل انسجة الدم.

٢. تحضيرات مقطعية تخص المجهر الضوئي والمجهر الالكتروني.

المجهر الضوئي المركب
Compound light microscope



كيف نعرف قوة تكبير المجهر؟

- قوة تكبير العدسة العينية X قوة تكبير العدسة الشيئية
- مثال:
- اذا تم الفحص تحت عدسة شيئية ذات قوة تكبير (40X) وكانت العدسة العينية ذات قوة تكبير (10X)، فان العينة تم فحصها تحت قوة تكبير = 400X

Phase contrast microscope
مجهر الأطوار المتباينة

١. يعمل هذا المجهر على أساس أن الأجزاء المختلفة لشيء ما لها معاملات انكسار مختلفة للضوء.
٢. عند مرور الضوء في خلية مصبوغة فإن موجاته يحدث لها انكسارات وتعطي معاملات انكسار مختلفة مما يؤدي إلى حدوث التباين.
٣. عند مرور الضوء في خلية غير مصبوغة فإنه بالتحكم في العديسات وطريقة سقوط الضوء عليها يمكن الحصول على نفس الأطوار المتباينة للإنكسارات.
٤. يستعمل في علم الخلية وعلم الدم وعلم البكتريا

Dark Field microscope
مجهر الحقل المظلم

١. نوع من أنواع المجاهر الضوئية ، ولكن يتم التحكم في الضوء حيث يكون الضوء على هيئة حلقة حول الشيء المراد رؤيته
٢. مناسب لفحص الكائنات الطرية الصغيرة جدا مثل مايكروب الزهري syphlis
٣. الفرق بينه وبين مجهر متباين الأطوار أن حزمة الضوء للمجهر المظلم الحقل تكون بزاوية واحدة أما مجهر تباين الأطوار فيكون بزوايا مختلفة، وفي مجهر الحقل المظلم لا نحتاج إلى عملية صبغ وتعتمد على تفاوت الكثافات البسيط جدا في أجزاء الشيء الواحد حيث نقوم بتثبيت الشيء ونتحكم في زاوية سقوط الضوء.
٤. لا ترى الاجسام بسبب اختراق الاشعة الضوئية لها الداخلة للمجهر ولكن بسبب حيود وانعكاس الاشعة غير المباشر.يكون المكثف مكون من عدسة مفردة ذات سطحين مستويين وجوانب محدبة قليلا، ويوضع اسفل المكثف قرص اسود بحيث تستطيع حلقة من الضوء فقط الدخول حول الحافة.
٥. يكون المكثف بتقارب شديد مع السطح السفلي للشريحة الزجاجية ويجب وضع قطرة من زيت خشب الأرزوليس الهواء.
٦. ان مسار الضوء يعبر خارج فتحة العدسة الشيئية لذا تظهر الشريحة النظيفة والفارغة سوداء مظلمة.

Fluorescent microscope
المجهر الفلورسنتي

١. فحص الجزيئات الكبيرة ممكنا مثل البروتينات.
٢. يعتمد هذا المجهر على الصبغات الفوسفورية أو الفلورسينية مثل صبغات acridine orange و thioflavine- T و auramine
٣. مبدءان يقوم عليهما عمله:
أ- الجزيئات الفلورسينية تمتص الضوء بطول موجي معين وتشعه بطول موجي أكبر.
ب- عند إضاءة هذه الجزيئات الفوسفورية ومن ثم فحصها خلال مرشحات زجاجية تسمح فقط للضوء المشع من هذه الجزيئات بالمرور خلاله مما يجعل هذه الجزيئات متوهجة في خلفية مظلمة.
٤. ان الصبغات التألقية تستطيع ان تستحدث التألق في الاجسام التي لا تتألق طبيعيا وانها تزيد من تألق الاجسام التي تتألق طبيعيا مثل فيتامين A والبلاستيدات في النبات والالياف الصفر في الحيوان

مجهر الحقل المظلم

المجهر الفلورسيني

Polarizing المجهر المستقطب microscope

١. يحتوي مواشير سداسية مثبتة بكندا بلسم مصنوعة من الكالسيت تسمى مواشير نكل Nicol prisms في مسار الضوء.

٢. عادة يوجد موشوران احدهما يدعى المستقطب polorizer والاخر يدعى المحلل analyser يثبت احدهما تحت المكثف والاخر في انبوب المجهر او في العدسة العينية.

٣. يمكن ادارة الموشور المحلل وهكذا فان الاشعة النافذة من الموشور السفلي قد لا تعبر عبر المحلل فيظهر الحقل مظلم اذا كانت درجة دورانه٩٠درجة دوران اذ يكون عاموديا.

٤. ان الاجسام التي لها قوة انكسار مزدوج اي قادرة على استقطاب الضوء فعليا والتي تسمى بالمتبلورة crystalline هي التي تضاء فقط عند وضعها في هذا المجهر وان درجة اضاءتها أولمعانها يعتمد على درجة دوران المحلل ضمن ٩٠درجة، مثل الالياف النباتية كالقطن والكتان والالياف الغراوية والمادة البينية للعظم والالياف العضلية المخططة.

٥. على العكس فان الاجسام ذات قوة انكسار مفردة او غير متبلورة فانها تظهر معتمة. مثل الزجاج ومعظم الخلايا والانسجة الحيوانية

المجهر الالكتروني Electron microscope

١. يستعمل سيل من الالكترونات لانتاج تكبير عال الى حد ٢٠٠٠٠٠ مرة بينما يتحدد التكبير في المجهر الضوئي الى حوالي ١٥٠٠ مرة.

٢. يمر سيل الالكترونات المنبثقة من المدفع الالكتروني في مجال مفرغ من الهواء تماما وتكثف بواسطة عدسات المكثف الكهرومغناطيسية.

٣. يكبر الجسم بالحيود الكهرومغناطيسي والعدسات المتوسطة وتسقط صورته على شاشة بواسطة جهاز الاسقاط.

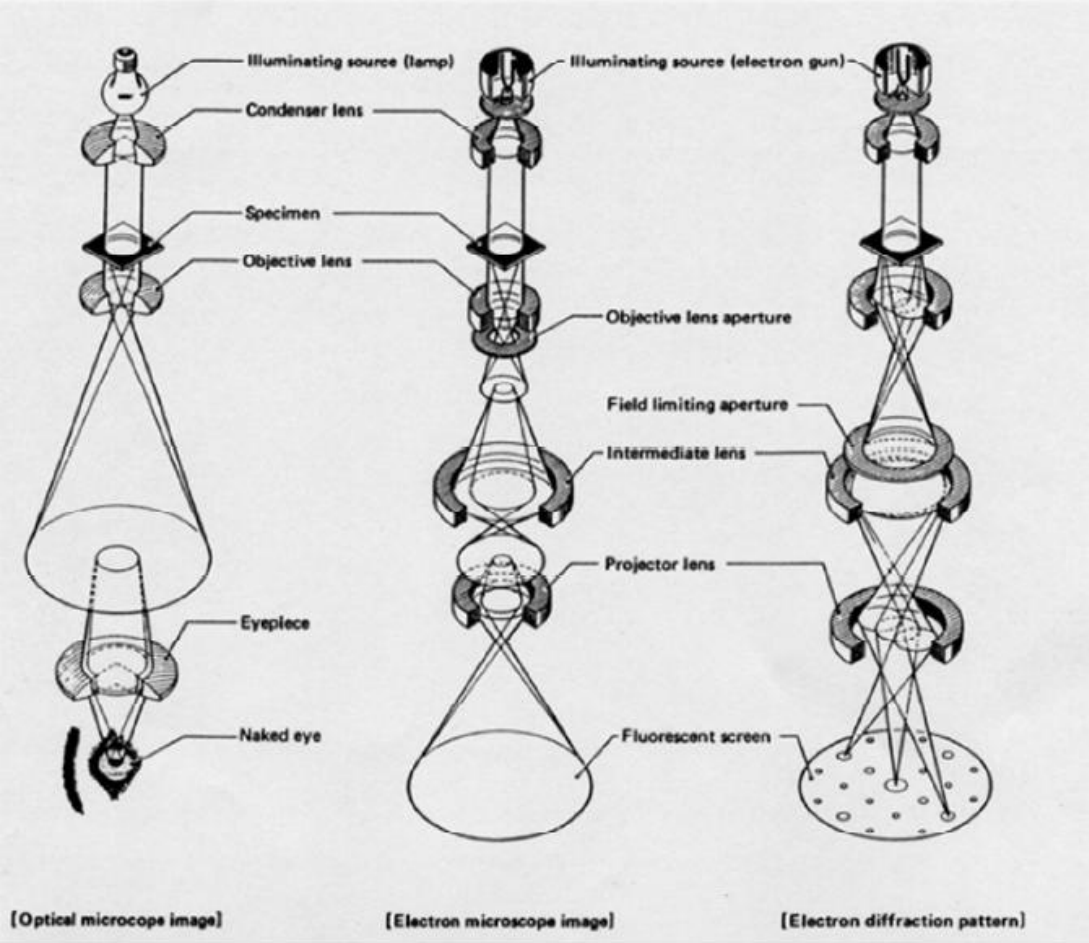
٤. الحديثة منها تربط بشاشة حاسوب ويظهر عليها كل البيانات المطلوبة.

٥. هناك نوعان:

أ- الماسح Scaning E.M. لفحص المظهر الخارجي للعينات.

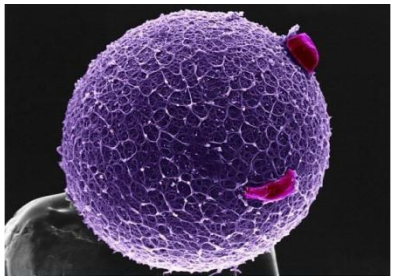
ب- النافذ Transition E.M. لفحص مقاطع الانسجة.

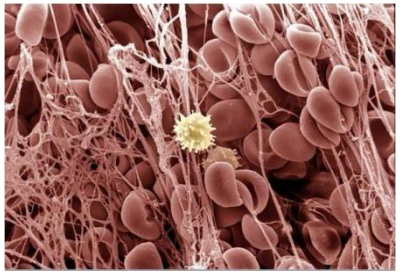
مقارنة بين المجهر الالكتروني النفاذ والمجهر الضوئي من حيث التركيب

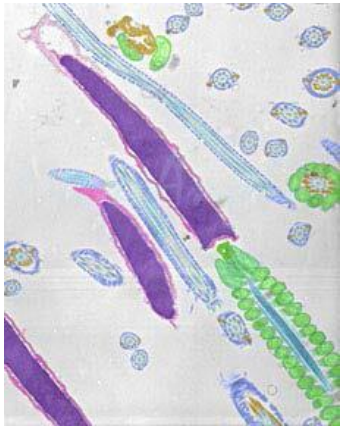


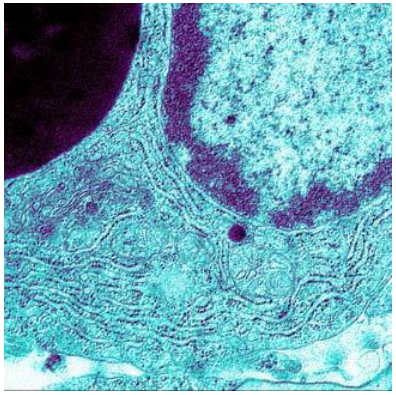
الفرق بين المجهر الالكتروني الماسح والمجهر الالكتروني النفاذ

- ١. يشبه العمود ذلك الموجود في المجهر النافذ.
- ٢. يحتوي على المواد المنتجة لأشعة الإلكترونات فقط والمستعملة لمسح العينة المراد فحصها. و تتمثل هذة المواد في بندقية الالكترونات المندفعه كما في المجهر النافذ.
- ٣.وجود العدسات المكثفة التي تعمل على تكوين حزمة ضيقة من الإلكترونات
- ٤. يصل القطر الحقيقي لبقعة المسح حوالي 5nm
- ٥. مجموعة من الملفات الحارفة مع دائرة تتسبب في جعل الشعاع يمسح العينة.
- ٦. عمود المجهر الماسح مفرغ تماما أمام مسرح العينة وملحقاته من أجهزة وإمالة العينة فتوجد عند قاعدة العمود من المجهر .
- التحميل على الحوامل : يتم تحميل العينة على الحامل المناسب تبعا لحجم العينة باستخدام الشريط الكربوني اللاصق
- التغطية : وتسمى Coating وهي تغطية العينات بجزيئات من مادة تساعد في عملية التصوير وتتم باستعمال مادة الذهب للجزيئات الكبيرة او البلاتين للجزيئات الصغيرة او الكربون للتكبير العالي.









طرق التحضيرات الاكثر شيوعا:

١. التحميل الكلي Whole mount

٢. عمل مسحات Smearing method

٣. النثر او النشر Teasing method

٤. السحق او الهرس Squashing method

٥. الطريقة المباشرة Direct method

٦. التقطيع Sectioning method

التحميل الكلي
Whole mount

- يتم وضع العينة بأكملها على الشريحة للفحص مثل الدودة الكبدية و القمل ومنها نوعان :
- ا- التحميل الكلي المؤقت الصغيرة والرقيقة وتستعمل المحاليل الملحية للحيوانية والكلسيرين للنباتية.
- ب- التحميل الكلي الدائم بعد احاطة غطاء الشريحة بالشمع الذائب او طلاء الاظافر وتستعمل الجلاتين كلسيرين او الاوساط الصمغية او الاوساط الراتنجية.

عمل مسحات Smearing Method

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

النثر 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

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.

الطريقة المباشرة Direct Method

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

➢طريقة التقطيع
Sectioning method

١. تقنية البرافين The paraffin technique (وهي الطريقة الاشهر)
٢. تقنية السلودين The celloidin technique (وهي الاكثر دقة)
٣. تقنية التجميد The freezing technique (وهي الاسرع)

تقنية البرافين

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

Fixation التثبيت

فوائد التثبيت:

١. تقوية بنية النسيج
٢. تقسيتها
٣. تقبل الصبغ
٤. تقاوم الحرارة

مواصفات المثبت الجيد:

١- سرعة نفاذه
٢- قلة تاثيره الكيميائي
٣- عدم تغيره
٤- سهولة تداوله
٥- اعتدال سعره

اسـس التثبيت

١. يغمر بمحلول ملحي في مكانه ثم ينقل الى المثبت (حيوان)، ينقل الى المثبت مباشرة (نبات).

٢. حجم المقطع المراد تثبيته (5 x5 x 5) ملم.

٣. حجم المثبت 10 -5اضعاف حجم النسيج، وبعضهم يفضل 10- 20(يجب ان يتناسب مع حجم العينة طرديا)

٤. وسم النسيج: يكتب (الوقت + التاريخ+ اسم المقطع) بالرصاص او الحبر الصيني على ورقة.

٥. تختلف مدة التثبيت حسب نوع المثبت، ولابد ان تتناسب مع حجم العينة المثبتة.

٦. 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.

طرائق التثبيت

١. **الوسائل الطبيعية:**

- بالحرارة
- بالتجفيف
- بالنتروجين السائل

٢. **الوسائل الكيميائية:**

- الفورمالدهايد
- حامض البكريك
- الكحولية
- حامض الخليك

اساليب التثبيت

١. الغمر Immersion (حيوان+ نبات)

٢. الحقن Injection (حيوان)

٣. الارواء Perfusion (حيوان)

Washing الغسل

- يجب غسل العينة بعد التثبيت و ذلك لإزالة ما تبقى من أثر المثبت على العينة. يتم الغسل بالماء او بالمحاليل منظمة (بفر) او بالكحول اثيلي، حسب نوع المثبت.

Dehydration ازالة الماء

- يتم بواسطتها إحلال مادة محل الماء الموجود في النسيج هذه المادة تذوب فيها المحاليل و المواد المستعملة في الخطوات القادمة مع عدم تشويه النسيج.
- تتم بتمرير العينة في سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من الكحول الإثيلي لمنع انكماش الأنسجة في حالة لو وضعت في كحول مطلق مباشرة.
- يفضل الكحول لأنه يمتزج بسهوله مع الماء و مع مادة الزايلول المروقة والتي بدورها تمتزج جيدا مع مادة الطمر البرافينية.

Clearing الترويق

- تجعل المروقات النسيج شفافا لانها ترفع معامل انكسار مكوناته وتزيل بعض دهنياته
- تضاف بنسبة ١٠: ١ من حجم النسيج
- اذا كانت عملية سحب الماء غير كاملة فان الانسجة تبدو معتمة

مواصفات وسط الترويق الجيد:

١. سرعة التخلص من مزيل الماء.
٢. اعتدال سعره
٣. بطيئ التطاير
٤. سرعة الترويق لاتؤثر على طبيعة النسيج

وسائط الترويق:

١. الزايلين يعتبر اكثرها شيوعا وهناك ايضا زيت خشب الارز و البنزين و زيت القرنفل و الكلوروفورم و الثولوين

Clearing Agents

Xylene

- أكثرالانواع شيوعا ويستعمل مع الانسجة الحيوانية والنباتية
- درجة غليانه ١٤٠ درجة مئوية
- مدة الترويق ١٥- ٣٠ دقيقة
- رخيص الثمن
- سريع التاثير
- يجعل النسيج شفافا
- يمكن ازالته بسرعة أثناء التشريب
- يسبب تقسية النسيج وانكماشه اذا ترك لفترة طويلة في الزايلين
- لايستخدم في ترويق الأنسجة اللمفاوية والدماغ، لانه يجعلها هشة

Cedar Wood Oil

- لايسبب تصلب الأنسجة عند أستخدمها فترة طويلة
- غالي الثمن
- درجة غليانه (١٦٥- ٢٣٧) درجة مئوية
- يتوغل بسرعة في النسيج
- يختص بترويق الأجنة
- يحتاج لمدة طويلة لاخراجه من الانسجة في فرن الشمع ويجب تغيير الشمع ٣مرات للتخلص من بقاياه.

Chloroform

- له تاثير اقل على الأنسجة
- يتبخر بسرعة في فرن الشمع
- درجة غليانه ٦١ درجة مئوية
- ممتاز للاجنة والجهاز العصبي والاعضاء اللمفاوية
- غالي الثمن نوعا ما
- لا يشتعل

Clove Oil ➢

- مروق جيد للأنسجة النباتية
- يروق المقاطع السميكة
- من مساوئ استخدامه :

١. يجعل النسيج هشا

٢. سهولة ازالته لصبغات السفرانين والهيماتوكسلين

٣. عدم أمتراجه مع كندا بلسم

- يستعمل البنزين ايضا كمروق واحيانا يتم مزج محاليل الانكاز والترويق معا منها الدايوكسان ولكنه سام ومتطاير ويقلص الانسجة اذا وضعت فيه لفترة طويلة.
- يمرر النموذج بمحاليل الانكاز والترويق بالتدريج ليحل المروق محل المنكز وذلك بنسبة ١:٣ ثم ١:١ ثم ٣:١ ثم في محلول الترويق النقي، كل تمريرة تاخذ ١- ٣ ساعات.

التشريب Infiltration

- هي عملية احلال مواد التشريب محل محاليل الترويق او محل محاليل الترويق والانكاز في حالة الامتزاج
- الغرض منها دعم وتقوية الخلايا من الداخل والخارج بحيث يصبح النسيج ذو قوام صلب، يحافظ على النسيج دون تشويهها أو تغير التركيب الخلوي فيساعد على التقطيع بسهولة دون تمزق او تهشم المقطع.
- مواد التشريب المستعملة هي البرافين و السيلويدن و الجيلاتين و الشمع المائي واللدائن
- حجم وسط التشريب يجب ان يكون حوالي عشرة اضعاف حجم النسيج
- تشرب الانسيجة التي فيها هواء كالرئة بالشمع في فرن مفرغ من الهواء حتى لا تظهر فراغات في قالب الشمع.

شمع البارافين paraffin wax

- يعتبر اكثر مواد التشريب شائعة الاستعمال
- يمتاز بان له درجة أنصهار مختلفة لذا يعتمد اختيار نوع البارافين على :

١. نوع النسيج

٢. سمك المقطع

٣. معدل درجة الحرارة الغرفة

- البارافين الطري وتكون درجة انصهاره بين ٤٥ -٥٥ درجة مئوية فيستخدم في طمر الأنسجة الرخوة وعمل المقاطع السميكة وفي الجو البارد
- البارافين الصلب تتراوح درجة انصهاره بين ٥٦ -٦٨ درجة مئوية تستخدم في الأنسجة القاسية وعمل المقاطع الرقيقة ٥ مايكروميتر وفي الجو الحار

Embedding الطمر

- بعد التشريب بالشمع يتم طمره في الشمع النقي
- ينقل النسيج اليه بحذر
- القالب الجيد يكون رائقا ومتجانسا
- ظهور جيوب هوائية في القالب غير الجيد فتبدو كنقط بيضاء تسمى هذه بظاهرة التبلور crystallization
- القالب المتبلور لا يصلح ويفضل اعادة طمره
- يطرد الهواء بصهر الجزء العلوي من القالب باداة ساخنة
- قوالب الطمر ذات حجوم مختلفة ٢٢ X ٢٢ ملم و ٢٢ X ٣٠ ملم و ٢٢ X ٤٠ ملم وجميعها بعمق ٥ ملم تصنع من الورق اللامع الخاص بالمجلات وهناك قوالب جاهزة بلاستيكية او زجاجية خاصة ولابد من دهنها بالجليسرين من الداخل قبل الطمر ليسهل رفعها.

وسائط التشريب والطمر

أ- نظير البلاستيك paraplast

- مزيج من شمع البارافين ومبلمرات البلاستيك ودرجة انصهاره بين ٥٦ و٥٧ درجة سيليزية
- مزاياه:

١. تجانس القوالب الناتجة

٢. بطء تجمده عند الطمر

٣. سهولة قطع شريط النسيج

٤. مايضيفه من سهولة في قطع القوالب الكبيرة

ب- الاصماغ الصناعية synthetic resins

- صموغ الاكريليك مثل ايثيل مثاكريليت وصموغ ايبوكسي مثل ارالدايت وصموغ البولستر خاصة في التحضيرات المجهرية الالكترونية.
- تصبح شديدة الصلابة عند التبلمر لذا تساعد في عمل مقاطع رقيقة جدا سمكها بين ٤٠٠ و٦٠٠ انجرستوم وتستعمل لمقاطع المجهر الضوئي بسمك ١ و٢ مايكرومتر
- لاتحدث تشوهات في بناء النسيج
- يتم الطمر في فرن حرارته ٦٠ و٧٠ درجة سيليزية ولمدة ٨ الى ١٢ ساعة

تقطيع وتحميل الانسجة

- **لتهيئة النسيج المطمور للتقطيع :**

١. التقليم trimming

٢. التثبيت على الحامل affixation

٣. التحضير للقطع preparation for sectioning

- **انواع المقاطع**

١. المقاطع الطولية longitudinal sectionوتكون على نوعين:

أ- سهمية sagitate اي موازية للمحور الطولي وعمودية على العرضي ويكون القطع فيها من احد جانبي العينة الى الجانب الاخر، فيتضمن المقطع جانب ظهري واخر بطني

ب- امامي او جبهي frontal اي موازية للمحور الطولي وعمودية على العرضي ويكون القطع فيها متجها من ظهرالعينة الى البطن، فيتضمن المقطع جانب ايمن واخر ايسر

٢. المقاطع العرضية عمودية على المحور الطولي للعينة وموازية للمحور العرضي.

- **خطوات التقطيع ومشاكله**

- **تحميل المقاطع:** (متطلبات وخطوات التحميل)

صبغ الانسجة

- الصبغة ضرورية لانها تزيد من الفروق في معامل انكسار مكونات الخلية والنسيج مما يؤدي الى تمايزها، ويحدث هذا نتيجة الفرق في ميل بعض مكونات الخلية او النسيج لمعظم الصبغات.
- **نظرية الصبغ:**

١. الكيميائية - ترتكز على التفاعل الكيميائي فالانسجة او المكونات اما قاعدية فهي basoophilic فتصطبغ بالصبغات الحامضية او حامضية فهي acidophilic فتصطبغ بالصبغات القاعدية.

٢. الطبيعية - ترتكز على ان الانسجة تصطبغ بوسائل طبيعية مثل الامتصاص والادمصاص والخاصية الشعرية والانتشار والاوزموزية.

العوامل المؤثرة على التصبيغ

١. قوة الصبغة
٢. سرعة تاين كل من الانسجة البروتينية والصبغات
٣. الاس الهيدروجيني لمحلول الصبغة وللانسجة البروتينية
٤. نوع المثبت
٥. نوع محلول الصبغة كحوليا ام مائيا
٦. اذا كانت الصبغة مفردة ام مزدوجة ام متعددة
٧. تركيز الصبغة في المحلول ضعيفا كان ام قويا

تصنيف الصبغات

- **تصنف حسب مصدرها:**

١. الطبيعية (Carmine & Cochineal و Haematoxylin و Orcein و Saffron و Indigo)

٢. المصنعة (مركبات عضوية تشتق من البنزين، تعمل بعد ان ترتبط حلقة البنزين لمجموعة حاملات الالوان الخاصة بالصبغة فتكون مولد الصبغة Chromogen والاخير لا يصبغ الا بعد يرتبط مع مكون اخر حامضي او قاعدي يسمى مساعد اللون Auxochromes

- **تصنف حسب حاملات الالوان Chromophore وهي مجموعة ذرية ترتبط باللون:**

١. Quinonoid dyes (Xanthene و Hematein و Thiazine)

٢. Azo- dyes

٣. Nitro- dyes

- **تصنف حسب مساعدات اللون auxochromes وهي مجموعة لها القابلية لربط الصبغة مع النسيج:**

١. (Basic fuchsin)Basic stain

٢. (Acidic fuchsin) Acidic stain

٣. (Romanovsky) Neutral stain

مرسخات الصبغة Mordant

- تساعد على تثبيت الصبغة
- المركب المكون من الصبغة والمرسخ يدعى البحيرة lake
- تستعمل الكبريتات والكلوريدات ولكن املاح الالومنيوم والحديد والنحاس اصبحت لاسباب تاريخية اكثر شيوعاً
- **طرق الاستعمال:**

١. يوضع قبل التصبيغ

٢. يخلط مع الصبغة

٣. يوضع بعد التصبيغ

- لاجل الحصول على محاليل تحتوي الصبغة والمرسخ معا ولها فعالية تستمر لمدة طويلة يجب ان تكون ذات قوة اكسدة ضئيلة وشبه معدومة لذا يفضل استعمال Ammonium alum و Potassium alum
- اما لتحضير محلول مرسخ وصبغة قصير الامد يستعمل شب الحديد Ferric alumو ferric chloride
- اغلب المرسخات تدمج مع الهيماتوكسلين

طرائق الصبغ

١. الصبغ التقدمي progressive staining
٢. الصبغ التراجعي regressive staining
٣. الصبغ المباشر Direct staining
٤. الصبغ غير المباشر Indirect staining

التحول اللوني Metachromasia

- الجزء الذي يغير اللون يدعى محول اللون Chromotrope
- يصطبغ المكون الخلوي بغير لون الصبغة المعروف
- مثل صبغة السفرانين تصيغ السايتوبلازم بلون احمر بينما ارضية الغضروف تصبح صفراء وصبغة الثايونين تصبغ الكروماتين بلون ازرق والمواد المخاطية وارضية الغضروف بلون احمر.
- صبغات اخرى المثيلين البنفسجية والازور A والازور B وهناك ازرق التولودين
- الصبغات التي لاتظهر فيها هذه الحالة تدعى الصبغات سوية اللون orthocrohmatic stain

الصبغ الحيوي Vital staining

- لاظهار بعض العضيات دون تغيير تركيبها الطبيعي والكيمياوي
- تحقن داخل الكائن الحي Intravital staining او تفصل الخلايا وتوضع داخل الصبغة Supravital staining
- تركيزها مخفف جدا وكميات قليلة حتى لايكون لها تاثير سام
- تصنف الى:

١. اصباغ قاعدية :-

أ) مجموعة الثيازين (ازرق ميثيلين وازرق تولويدين) مفيدة لصبغ الفجوات الخلوية.

ب) مجموعة اكسازين (ازرق النيل) هامة لدراسة مراحل نمو اجنة الفقاريات.

ج) مجموعة آزين (الاحمر المتعادل) لدراسة نمو اجنة الفقاريات وصبغ الفجوات الخلوية، و(اخضر جانوس) لصبغ المايتوكندريا وهي اقل الصبغات الحيوية سمية.

٢. اصباغ حامضية :- تستعمل بتركيز خفيف جدا بنسبة ١- ١٠% لصبغ اعضاء داخلية بالغمر، و ١٠% في حالة الحقن، المذيب المفضل لها هو الماء. مثل ايزارين وازرق تريبان واحمر كونغو

- هناك طريقتان للتصبيغ.
- **فوائده:**

١. اعطاء فكرة جيدة عن التركيب الخلوي
٢. اعطاء معلومات قيمة عن فسيولوجية الخلية مثل النفاذية والابتلاع والانتقال والامتصاص واخراج المواد التي تدخل الخلايا.
٣. العمل كظابط جيد للمقارنة مع مقاطع الانسجة المصبوغة بالطريقة التقليدية.

حالات صبغ العينات

١. Section staining صبغ المقاطع
٢. Whole mount staining صبغ النماذج الكاملة
٣. Smear and squash صبغ المسحات والهرسات

تغطية المقاطع ووسم الانسجة

اهمية التغطية:

١. لاظهار كافة التفاصيل
٢. لحماية التحضير
٣. التغطية تقلل من اكسدة الصبغة ومنع فسادها

مواصفات وسط التغطية

- اذا كان يمتزج مع الماء ففي هذه الحالة لاحاجة لازالة الماء من المقاطع بعد صبغها.
- اذا كان من النوع الذي لايختلط بالماء وهنا ازالة الماء من المقاطع وترويقها ذم تغطيتها، وهذا النوع هو المستخدم بشكل عام.
- يحب ان تتوفر المواصفات التالية في الوسط الجيد:

١. الامتزاج الكلي مع وسط الترويق ان وجد
٢. اقتراب معامل انكساره من معامل انكسار الزجاج
٣. عدم التفاعل مع الصبغة او مكونات النسيج
٤. عدم تشويه التراكيب المصبوغة
٥. عدم التشقق او التحبب عند جفافه
٦. عدم تلاشي الصبغة مع مرور الوقت نتيجة لاكسدته

انواع وسائط التغطية:

١. الدائمية مثل بلسم كندا Canada Balsam و كلاريت Clarite و .D.P.X

٢. المؤقتة مثل الماء والجليسيرول وهلام جليسيرول

اسس التغطية السليمة :

١. تكون الشرائح واغطيتها نظيفة

٢. كمية وسط التغطية مناسبة

٣. ازالة الماء من العينة قبل عملية التغطية اذا كان وسط التغطية لايذوب في الماء

٤. قوام الوسط يجب ان يكون مناسب لانه اذا كان كثيفا فانه يسبب تكوين فقاعات واذا كان بالغ الرقة فانه ينسحب من تحت اطراف الغطاء

٥. تتم التغطية باسرع مايمكن ولا تترك الشريحة معرضة للهواء دون تغطية

٦. تجفيف التحضير على صفيحة دافئة

خطوات التغطية السليمة :

١. يمسح حول التحضير بابرة تشريح على راسها قطنة مبللة لتنظيف الشريحة قبل التغطية

٢. يضاف وسط التغطية.

٣. يغطى بغطاء زجاجي رقيق ويوضع بحيث يلامس حافة الشريحة ويعمل معها زاوية ٤٥ درجة ثم تخفض حافة الغطاء الاخرى برفق حتى لا تتكون فقاعات هوائية.

٤. يضغط بخفة على الغطاء التشريح واذا كانت الفقاعات كثيرة فيعاد اعادة عملية التغطية، بغمس التحضير كليا في وسط الترويق حتى ينفصل الغطاء.

٥. اذا كان التحضير سميكا فنه يتوجب رفع الغطاء على حلقة من البلاستيك او انابيب شعرية.

- بعد التغطية تجفف على صفيحة دافئة عند حرارة ٤٠درجة مؤية، او فرن صهر الشمع عند حرارة ٣٥- ٤٠ درجة مؤية.

تنظيف ووسم الشرائح

١. تنظف بقطعة مبللة بمحلول كحولي ٩٥%

٢. يكتب على ورقة الوسم نوع النسيج والمثبت والصبغة وتاريخ التحضير واسم المحضر

٣. حجم الورقة ٢X٢ سم تلصق عند طرف الشريحة

٤. تخزن عاموديا في حافظات خاصة وهي علب خشبية او بلاستيكية بها اخاديد او افقيا في حافظات كارتونية، وينصح بالاخيرة.

التحضيرات المجهرية السريعة للحصول على نتائج فورية

١. المسح smearing

(الانسجة التي يصعب قطعها وخاصة سوائل الجسم مثل الدم والسائل المخي وسائل النخاع الشوكي والسائل السيلومي والبول، كما تصلح لاخذ مسحات من سطوع الاعضاء الطرية مذل المهبل وتجويف الفم وسقف الحلق فضلا عن نخاع العظام).

١. الهرس (الدعك) squashing

(للانسجة التي ليست طرية بالقدر الذي يسمح لمسحها ولاهي صلبة تكفي لقطعها دون طمر مسبق. مثل الاجزاء النامية في النباتات كالقمم النامية في الجذر والساق والمياسم والمبايض والبتلات وايضا الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة والعقد اللمفاوية والاورام الطرية ونخاع العظم والحويصلات المنوية والخصية)

١. التجميد freezing

(نعنبر اداة قيمة في حالات معينة كالتشخيص الفوري لحالات مرضية مثل الاورام وتستعمل بشكل موسع في دراسة الامراض النسيجية لانها تمكن الاطباء من التشخبص قبل اجراء العملية الجراحية)

نتمنى ان تكونوا قد استفدتم من مادة التحضيرات المجهرية واستمتعم معنا

نتمنى لكم النجاح والموفقية

د. زينب عبد عون

م.م. زينب عمران

٢٠١٦-٢٠١٧