2- بعد معرفة تدريجات العدسة العينية لقوة معينة يتم إزالة stage micrometer يتم وضع الشريحة المراد قياس اطوال او اقطار اي جزء منها.

3- لمعرفة الطول الحقيقي للخلية يتم ضرب عدد تدريجات العدسة العينية المساوية لطول الخلية في المكافيء حسب قوة التكبير.

المواد والاجهزة المستعملة:

1- مجهر ضوئي مركب Compound light microscope .

2- ocular micrometer.

3- stage micrometer.

4- شرائح زجاجية تحتوي انواع مختلفة من الخلايا.

الجزء العملي:

1- ارسم في دفترك كلا من stage micrometer وocular micrometer .

2- احسب اطوال او اقطار أنواع مختلفة من الخلايا الحيوانية والنباتية علما ان القياسات الناتجة محسوبة بالمايكرون (مايكروميتر).

مثال :

طول خلية ما يساوي5 تدريجات من (.ocular micro) على القوة 4X فما الطول الحقيقي للخلية مقاساً بالنانومتر؟

الطول الحقيقي=عدد تدريجات العدسة العينية×المكافيء حسب قوة التكبير

$25\times5=$

$nm125000=\mu\ 125=$

م4 : آلة القطع الدقيق الميكروتوم (Microtome)

الميكروتوم : وتعني كلمة Microtome في اليونانية : Micros اي Small (صغير) و Temnein اي cut (قطع).

المشراح او المقطاع الدقيق او المايكروتوم /الة صممت خصيصا لتقطيع شرائح مجهرية يقاس سمكها بالمايكرونات (المايكرون = 1/1000 من المليمتر) . المظهر العام والقاعدة الميكانيكية المبني عليها المقطاع الدقيق لكل الانواع هي واحدة .

●ويتكون أساسا من :

1- سكين حادة تعمل على عمل قطاعات رقيقة مع امكانية التحكم في سمك القطاع 4-10 ميكرون من خلال تدريج خاص يحتوي على مؤشر لتحديد سمك القطاع.

2- حامل يثبت عليه كتلة من شمع البرافين المجهزة والتي بها العينة المراد عمل قطاعات رقيقة جدا فيها.

- **وهناك انواع تخصص كل نوع منها لتقطيع مقاطع مطمورة في الوسط الخاص لكل نوع وهي :-**

1- الميكروتوم اليدوي : عبارة عن سكين حادة تعمل على تقطيع العينات قطاعات كبيرة مثل: قطاعات الأسماك .

2- ميكروتوم كامبرج Cambridge rocking microtome : يتكون من سكين في وضع ثابت والحافة الحادة إلى أعلى أما الكتلة الشمعية متحركة في اتجاه السكين بشكل قوس دائري مجرد تحريك الميكروتوم تلتقي الكتلة الشمعية مع السكين وتنفصل القطاعات على حسب السمك المطلوب

3- الميكروتوم الدوار- الدوراني Rotary microtome

يتميز الميكروتوم الدوار بأن السكين في وضع ثابت والكتلة الشمعية تتحرك إلى أعلى وإلى أسفل في اتجاه عامودي على السكين وبمجرد تحريك الميكرتوم تلامس الكتلة الشمعية السكين وتنفصل القطاعات بحسب السمك المطلوب وهو المشراح المصمم خصيصا لتقطيع شرائح من قوالب البرافين بسمك بين 3-8 مايكرون .

مايكروتوم كامبرج

المايكروتوم الدوار

4- ميكروتوم الشرائح Sliding microtome

يتكون من سكين تتحرك في اتجاه أفقي للكتلة الشمعية , والكتلة الشمعية تكون ثابتة ومجرد التقاء السكين بالكتلة الشمعية تتكون قطاعات حسب السمك المطلوب وهو المشراح المصصصم لتقطيع شرائح من قوالب السيلويدين بسمك يتراوح بين 8-15 مايكرون.

5- Cryomicrotome : يتكون من غرفة تحوي الشرائح المنجمدة والتي تمرر في درجة حرارة منخفضة بعد الانجماد وتحت ضغط النتروجين السائل لكي يتم تهيئتها للتقطيع ومن ثم فحصها تحت المجهر.

Sliding

cryo

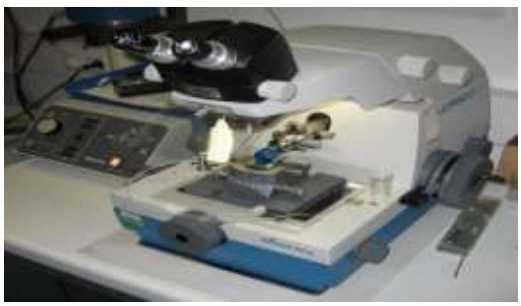
6- **الميكروتوم الفوقيUltramicrotome :** وهو مشراح خاص ودقيق جدا لقطع شرائح العينة لتهيئتها للفحص بواسطة المجهر الالكتروني . ويتراوح سمك المقاطع من 150-300 انجستروم (ويساوي 1000/1 من الميكرون) . وهذه النماذج مثبتة بطريقة خاصة ومطمورة في انواع خاصة من الاصباغ .يستخدم لعمل قطاعات رقيقة جدا خاصة بالمجهر الإلكتروني ,يتكون الميكروتوم الفوقي من سكين حادة جدا مصنوعة من الزجاج أو الألماس وذلك لعمل قطاعات رقيقة جدا سمكها من 60-100 نانوميتر , وتغمر العينات في مادة الطمر و تقطع بالسكين الزجاجية ثم تصبغ القطاعات وتفحص بالمجهر الإلكتروني.

7- **Laser microtome :** يستخدم اشعة ليزر ومع العينات والشرائع الصلبة كالعظام والاسنان وبعض الخزفيات وللحصول على شريحة بسمك 10-100 مايكرون.

8- الميكروتوم الثلجي Freezing microtome

يتميز الميكروتوم الثلجي بعدم وجود كتلة شمعية حيث استبدلت بكتلة ثلجية . وتتميز كتلة الثلج بمحافظتها على محتويات الخلية الحساسة والتي تفقد عند تحضير كتلة الشمع مثل الإنزيمات والهرمونات وغيرها.وهو المشراح الخاص بقطع شرائح من نماذج نسيجية طازجة او مثبتة وغير مطمورة في أي مادة وذلك بطريقة تجميدها ويتراوح سمكها من 10- 15 ميكرون.

يعتمد عمل الميكروتوم الثلجي على أساس التبريد السريع النسيج للعينة بواسطة غاز CO_2 في سائل الطمر غير المتبلور بالبرودة أو باستخدام وحدة تبريد. ويتكون جهاز التبريد من أنبوبة معدنية متصلة باسطوانة تحتوي على غاز CO_2 والطرف الآخر للأنبوبة يفتح على سائل الطمر الذي به العينة المراد تقطيعها , وبفتح ضابط الغاز يتجمد السائل وبه العينة فتتكون كتلة ثلجية صلبة من السهل قطعها . كما يمكن عمل قطاعات ثلجية غير مثبته في درجة حرارة منخفضة (-45°م), على ألا يزيد سمك العينة عن 3 مم. يتكون الميكروتوم الثلجي من قاعدة ثابتة تثبت عليها كتلة الثلج وسكين باردة متحركة.



الفوقي

الثلجي

خطوات استخدام الميكروتوم الثلجي :

1- نضع قطرة أو قطرتين من سائل الطمر على حامل التثليج ثم نفتح ضابط الغاز ونغلقه بالتبادل فيتجمد السائل

2- يوضع النسيج فوق السائل بشكل منظم وتكرر نفس العملية من فتح وإغلاق الغاز فيتجمد النسيج

3- نضع قطرة أو قطرتين من سائل الطمر فوق النسيج بحيث يغطي النسيج بسائل الطمر بالكامل ونكرر نفس العملية من فتح وإغلاق الغاز حتى تتكون كتلة صلبة من الثلج يسهل تقطيعها

4- تعمل قطاعات سمكها من 5-7 ميكرون

5- توضع القطاعات في محلول فسيولوجي (0.9 كلوريد صوديوم) أو ماء مقطر في طبق بتري

6- تحمل القطاعات بعد ذلك على شرائح نظيفة تكون مدهونة بزلال البيض أو الجيلاتين.

الكريوستات (آلة القطع الثلجية) Cryostat

تعتبر أجهزة الكريوستات من أشهر الأجهزة في تحضير القطاعات الثلجية وأكثرها فعالية . وجهاز الكريوستات cryostat عبارة عن ميكرتوم دوار بكامل أنظمته موضوع داخل ثلاجة ويحتوى على أنظمة خاصة ودقيقة للتبريد والقطع ومنع تكون الجليد (Defrost) كما يجب استخدام سكاكين خاصة لتحضير القطاعات الثلجية لا تكون لها حافة كبيرة لأن ذلك يسبب صعوبة في التقاط القطاع من السكينة إذا كانت العينة صغيرة .

وتتميز أجهزة الكريوستات بأنها مزودة بأنظمة تسمح بضبط درجة الحرارة المطلوبة تتراوح ما بين الصفر مئوي إلى -٥40م . ويلاحظ أن درجات الحرارة تختلف بإختلاف نوع النسيج فمثلا يفضل تحضير قطاعات ثلجية في **عينات غير مثبته** عند درجة حرارة -٥15م لكل من الطحال والكلية والخصية والكبد والدماغ والعقد اللمفاوية .في حين أن درجة الحرارة -٥25م تناسب كلا من عينات الأنسجة العضلية والجلد والغدد والعظم الهش.

أما العينات المثبته فإنه يسهل تحضير قطاعات ثلجية منها عند درجة حرارة من -٥10م إلى -٥12م , كما أنه يصعب تحضير قطاعات ثلجية أقل سمكا من 8-10 ميكرون سواء كانت العينة مثبتة أو غير مثبتة.

●أجزاء المشراح الدوار rotary microtome:

يتكون المقطاع من الاجزاء المهمة التالية :-

1. جسم المايكروتوم الذي يحتوي بداخله على ميكانيك الالة .
2. القاعدة التي يرتكز عليها جسم المايكروتوم.
3. حامل القالب ويسمى (Block Holder) وهو المحل الذي يثبت عليه القالب بعد لصقه على منصة المايكروتوم (stage) ويمكن التحكم في وضعية المنصة وامالتها الى اليسار او اليمين او للاعلى او الاسفل . وفي اكثر الالت يكون حامل القالب هو المتحرك على السكين والعكس صحيح.
4. حامل السكين knife carrier : ويتكون من مقبض لِمسك سكين المايكروتوم بزارية السكين لان قاعدة المقبض دائؤية وفي اكثر الاحيان تكون السكاكين هي الثابتة .
5. ساعة لتحديد سمك الشريحة بالمايكرونات وتتكون من قرص يُدار على الرقم الذي يُراد تقطيع سمك الشريحة بموجبه ويسمى هذا القرص (Microtome adjustment) .
6. عجلة المايكروتوم وتسمى fly wheel وتحرك باليد بواسطة مقبض handle وكل حركة كاملة تدفع الحامل الى الامام بقدر عدد المايكرونات المطلوب قطعها والمثبتة كميتها على القرص الآنف الذكر.

●العناية بالمشراح ..

على الرغم من ان هذه الالة مصنوعة من الحديد الصلب المتين لكنها تحتاج الى عناية خاصة لادامتها . ان اتباع البنود التالية يؤدي للغرض المطلوب وهي :-

أ- يزال البرافين او السيلويدين من جسم المايكروتوم واجزاءه الدقيقة بواسطة استعمال فرشاة خاصة لهذا الغرض واذا كان الشمع ملتصقا يستحسن ازالته بقطعة قماش او شاش طبي مغموس بالزايلول وبعد ذلك يجفف بقطعة اخرى جافة .

ب- يجب ان تدهن الاجزاء المتحركة منه بزيت المكائن الخاص بين فترة واخرى لضمان سهولة حركتها.

ت- التأكد من ان جميع المسامير والضابطات في مكاناتها المخصصة وضبطها اذا كانت مرتخية .

ث- بعد استعمال المايكروتوم وتنظيفه يجب ان يغطى بغطاءه الخاص لحفظه من الاتربة .

ملاحظة مهمة ..

لا يتحسن نقل الجهاز باستمرار من مكان لاخر او تحريكه بصورة مستمرة لان هذا يؤثركثيرا على توازن ودقة الالة. سكين المشراح ...تصنع سكاكين المشراح من الحديد الراقي السبيكة . وهناك عدة انواع منها وكذلك احجام مختلفة كل منها تخصص لتقطيع الشرائح المدفونة في الوسط المعين وبالامكان

اولا :تحضير مقاطع من قوالب الشمع :-

1) يثبت قالب الشمع المنحوت أي الذي له صفات المكعب او المتوازي الاضلاع على منصة المقطاع وذلك بوضع بطانة خفيفة من الشمع على المنصة وتسخينها قليلا بواسطة المبسط الساخن , ويلصق القالب على المنصة مع الاخذ بنظر الاعتبار عدم الضغط بشدة لتفادي تحطيم النسيج الذي بداخله .

2) تثبت المنصة مع القالب في مكانها المعتاد على المايكروتوم وتضبط بشكل جيد بواسطة المسمار الخاص على شرط ان يكون ضلع الاقلب موازي لقاعدة المايكروتوم .

3) تثبت السكين في حاملها جيدا مع ضبط زضعية زاوية انحناء السكين على ان لا تكون اكثر من 50 درجة .

4) تضبط الساعة المخصصة لتحديد سمك المقاطع على 20-25 مايكرون .

5) يفتح مفتاح قفل العجلة وتحرك العجلة بلطف الى ان يلامس القالب السكين . تضبط المسافة بينهما بتحريك الاقلب او السكين للامام او الخلف بحيث يلمس القالب شفرة السكين .

6) يبدأ بتحريك عجلة المقطاع بحركة منتظمة مضبوطة ويتم التخلص من الشمع الزائد على وجه القالب حتى ظهور اول مقاطع من النسيج .

7) يستحسن ان تستبدل سكين النحت بسكين اخرى خاصة للتقطيع يثبت السمك المطلوب للشريحة ويكون عادة من 4-8 مايكرون ويبدأ بتقطيع المقاطع بتحريك العجلة حركة منتظمة مضبوطة وسريعة وبايقاع واحد فاذا كانت عملية التكنيك مضبوطة وصحيحة فسوف تظهر المقاطع من الشمع على شكل شريط منتظم.

8) يرفع الشريط الشمعي بواسطة فرشاة رطبة ويوضع اما في حمام مائي ليتم بسطه او على الشرائح الزجاجية مباشرة او على ورقة لحين الابتداء بعملية لصق المقاطع على الشرائح الزجاجية .

ويستحسن ان يقطع الاشخاص المبتدئين المقاطع بسمك 14 -16 لحين ضبط العملية وبعد ذلك يبدأون باعطاء سمك اقل و اقل بالتدريج .

عملية لصق المقاطع : Mounting

ان المقاطع النسيجية التي هي الان على شكل شريط من الشمع يجب ان تلصق على الشرائح الزجاجية النظيفة في وضعية منبسطة لكي تجري عليها عملية الصبغ والعمليات الاخرى . بدون تغيير لتركيب النسيج المجهري وهناك طرق عدة لبسط ولصق هذه المقاطع وزلكن اكثرها استعمالا في مختبرات الشرائح يجرى باستعمال محلول خليط من زلال البيض والجليسرين.

- في حالة عدم النجاح في سحب الدم باستعمال الخطوات السابقة، يتم فك الرباط الضاغط و يتم سحب الإبرة

و يمكن محاولة السحب مرة ثانية في اليد الأخرى باستعمال إبرة جديدة مع ضرورة التأكد من الاختيار الجيد للوريد. يجب عدم وخز المريض أكثر من مرتين ويجب إلتزام الهدوء و عدم الإنفعال حيث أن الفشل في سحب الدم قد يحدث لأي شخص يقوم بسحب الدم, بعد ذلك تعطى إستراحة قصيرة للمريض و تتم الاستعانة بشخص لديه خبرة أكبر في السحب ولا يوجد أي حرج في ذلك فالحالة النفسية لمن يسحب الدم و حسن الحظ في اختيار الوريد المناسب تلعب دور كبير في هذا المجال.

يجب عدم السحب بسرعة وإنما يبطء بحيث تمتلئ الحقنة أولاً بأول لأن السحب بسرعة وقوة قد يجعل جدران الوريد تلتصق ببعض مما يوقف خروج الدم،كما أن السحب بسرعة يؤدي إلى تكون رغوة وإلى تحلل خلايا الدم الحمراء Hemolysis

نزع الإبرة: بعد الإنتهاء من سحب كمية الدم المطلوبة قم بما يلي على الترتيب:
أطلب من المريض بسط كفه.

فك الرباط الضاغط .

ضع قطعة قطن أو شاش جاف بجوار الإبرة و إسحب الإبرة ثم ضع القطن أو الشاش على مكان غرز الإبرة لمنع خروج الدم. يجب عدم الضغط على قطعة القطن أو الشاش إلا بعد التأكد من سحب الإبرة بالكامل.

- أطلب من المريض أن يضغط على قطعة القطن أو الشاش بدون توقف من 3 إلى 5 دقائق حتى يتوقف النزف، إذا كان المريض ضعيف و لا يستطيع الضغط بنفسه يقوم من سحب الدم أو أحد المساعدين بذلك. إذا لم يتم الضغط لوقت كافي فقد ينزف مكان الوخز مؤدياً إلى تلوث الملابس و مكان السحب بالدم.
- يجب عدم الطلب من المريض ثني كوعه كما هو شائع خطأ لأن هذا يؤدي إلى تجمع دم تحت الجلد.

- بعد فصل الإبرة عن المحقنه، يتم صب كميه الدم المناسبه في الانابيب المخصصه بيطء على جدار الانابيب بدون تكوين فقاعات { وذلك حتى لا تتكسر خلايا الدم الحمراء Hemolysis مما يؤثر على النتائج }.
- في الأنابيب التي تحتوي على مانع تجلط، يجب صب الحجم المناسب من الدم حسب العلامة الموجودة على الأنبوبة لأنها تحتوي على مانع تجلط مخصص لحجم معين من الدم.
- في الأنابيب التي لا تحتوي على مانع تجلط يجب صب كمية كافية من الدم لإجراء التحاليل المطلوبة حتى لا نضطر إلى سحب دم مرة أخرى من المريض و التأخير في ظهور النتائج.

ثانيا: سحب الدم من الشعيرات الدموية:

تستخدم هذه الطريقة لاخذ قطرات دم عن طريق وخز الاصاع او وخز حلمة الاذن في الكار او وخز كع القدم في الاطفال حديثي الولادة

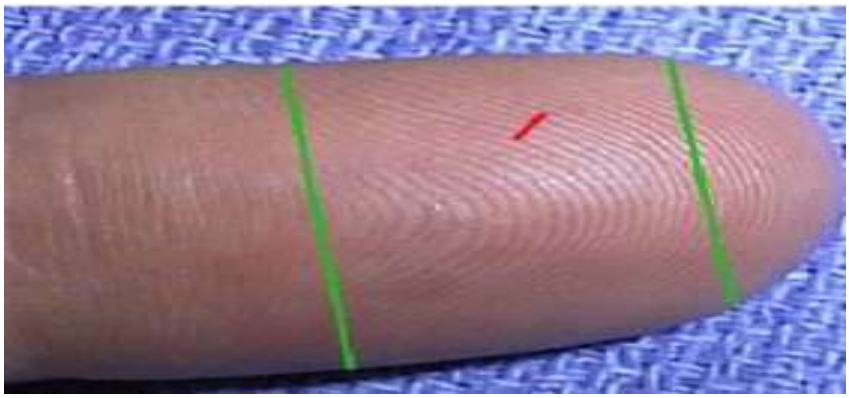
1. في الأطفال حديثي الولادة أو الأطفال الذين يبلغ عمرهم أقل من سنة الذين يصعب إيجاد وريد لديهم ليتم السحب منه وبالتالي يتم إستعمال كعب القدم.
2. عند طلب عمل بعض التحاليل التي تحتاج إلى قطرات دم قليلة من الدم مثل الهيموجلوبين و عدد كرات الدم البيضاء والحمراء والصفائح أو تعداد الدم الكامل CBC أو عمل فصيلة الدم و العد التفريقي لكرات الدم البيضاء DLC.
3. لعمل أفلام الدم لتشخيص بعض الأمراض مثل الملاريا.
4. تحليل غازات الدم من الشعيرات الدموية و كذلك البيليروبين في الأطفال حديثي الولادة.
5. تحليل البيليروبين في الأطفال حديثي الولادة.
6. إذا كان المريض سمين و يصعب إيجاد وريد.
7. المرضى الذين لديهم أوردة هشة و رفيعة و سطحية.
8. في المرضى الذين لديهم حرق أو ندبة في أماكن السحب من الوريد.
9. إذا فشلت محاولة السحب من وريد المريض عدة مرات وخصوصاً إذا كانت كمية الدم المطلوبة صغيرة جداً.
10. المرضى الذين يتم تغذيتهم عن طريق الوريد في كلا الذراعين و اليدين.
11. عند الرغبة في الاحتفاظ بالوريد لغرض إعطاء الأدوية الوريدية أو العلاج الكيماوي.
12. إذا كان التحليل يتم طلبه بشكل متكرر مثل تحليل السكر كل 6 ساعات.
13. تستخدم في إجراء بعض التحاليل بواسطة أجهزة خاصة مثل جهاز تحليل السكر المستخدم بقرب المريض.

وخز الاصبع : لوخز الاصبع يتبع الخطوات التالية:

1. تجهيز الادوات اللازمة مثل القطن والكحول والواخزة واتابيب التحليل.
2. يتم إختيار مكان الوخز في نهاية الأصابع ، غالباً الإصبع الوسطى أو البنصر . يفضل تجنب الإصبع الصغير. يجب أيضاً تجنب إصبع الإبهام و السبابة لأنها حساسة ومؤلمة.
3. يجب التأكد من أن مكان الوخز لا يوجد به التهاب أو انتفاخ.
4. ينظف المكان بقطعة القطن المبللة بالكحول ويترك بعدها حتى يجف الكحول.
5. يتم غرز الواخزة بقوة في الأصبع مع إمساك اليد و الأصبع جيداً.
6. يتم مسح أول قطرة من الدم بشاش معقم حيث أنها تحتوي على نسبة كبيرة من سوائل الجسم، { يجب عدم الضغط على الأصبع وذلك لوجود سائل نسيجي يخرج مع الدم ويؤدي إلى تخفيف الدم وبالتالي عدم دقة نتيجة التحليل} ثم نأخذ الدم ، مع العلم أن هناك أنابيب صغيرة خاصة بتجميع الدم بهذه الطريقة بها مانع للتجلط أو بدون مانع للتجلط.
7. يتم التخلص من الواخزة في وعاء خاص بالمواد الحادة غير قابل للثقب.
8. يتم كتابة كافة البيانات على الأنابيب، أما إذا كانت الأنابيب صغيرة جداً فيتم وضع الأنابيب الصغيرة داخل أنابيب أكبر ويتم الكتابة على الأنبوبة الكبيرة.

9. يتم وضع لاصق طبي لحماية الجرح من التلوث.

- يجب ألا يتم الوخز بالتوازي مع خطوط البصمات و إنما عمودي عليها. الوخز الموازي يؤدي إلى نزول الدم عبر الإصبع بدلاً من تجمع الدم لتكوين قطرة دائرية.
- يمنع وخز إصبع الأطفال الذين تقل أعمارهم عن عام لأن المسافة بين الجلد و العظم لديهم قليلة جداً مما قد يؤدي إلى جرح و إصابة العظم. لوحظ كذلك حدوث غنغرينيا و حدوث تلوث بكتيري.



وخز الجلد في منطقة بطن القدم:

نظراً لأن وخز الأصابع لا يمكن استعماله في الأطفال أقل من سنة حيث أن المسافة بين الجلد و العظم صغيرة جداً وبالتالي هناك احتمال لإصابة العظم بالواخزة ولهذا نلجأ لوخز الجلد في منطقة بطن القدم حيث يتم فقط وخز المناطق الجانبية من كعب القدم حتى لا نصيب العظم في منطقة الوسط) في المنطقة المظللة في الشكل التالي)