م4: **انواع التحضيرات المجهرية :**

تتطلب الدراسات البايلوجية بصورة عامة والحيوانية بصورة خاصة انواعا مختلفة من التحضيرات الميكروسكوبية ويعتمد اختيار التحضير الميكروسكوبي على عدة اعتبارات منها : نوع الدراسة المطلوبة ونوع الحيوان الذي تجري الدراسات عليه .

ويمكن تصنيف التحضيرات الميكروسكوبية الى :

اولا: التحضيرات الكاملة Whole Mounts

وفيها يحمل الحيوان او جزء منه على الشريحة وهي تحضيرات هامة في علم الطفيليات Parasitology.

وتشمل التحضيرات الكاملة الانواع الاتية :

1ـ تحضيرات جافة : تستعمل مع العينات الصلبة , مثل الاشواك والاصداف .

2ـ تحضيرات رطبة : وتتميز الى تحضيرات مصبوغة وتحضيرات غير مصبوغة .

ثانيا : تحضيرات الخلية الحية Preparation of Living Cells

وتشمل الاوليات وبعض انسجة الحيوانات عديدة الخلايا وهذه التحضيرات هامة في الدراسات الهامة بعلم الخلية وعلم الاوليات وزراعة الانسجة .

ثالثا : السحبات Smear تستخدم عادة السحبات لتحضير عينات الدم والبراز وهي من أسرع الطرق التحضيرية الخاصة بالأنسجة الرخوة مثل الخصى الحيوانية والسوائل الحيوية مثل الدم والقشع والسائل المهبلي.

رابعا طريقة السحق أو الهرس Squashing Method : تستخدم لهرس العينات الرخوة وتحويلها من الحالة النسيجية إلى الحالة الخلوية على الشريحة الزجاجية مثل دراسة مراحل الانقسام الخلوي ومشاهدة الكروموسومات للخلايا النباتيه.

خامسا طريقة النثر أو 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.

سادسا الطريقة المباشرة Direct Method : تستخدم للدراسة السريعة للعينات الحية ولوقت قصير جدا كما في فحص الخلايا الحرشفية للفم والأميبيا والبرامسيوم.

سابعا طريقة التجميد Freezing Method : تستعمل للتشخيص الفوري في مختبرات الامراض النسجية Pathology laboratories لحالات مرضية معينة مثل الاورام .

ثامنا : القطع الميكروسكوبية Microscopical Section: او طريقة التقطيع Sectioning Method : وهي الأهم لدراسة العينات على مستواها النسيجي والخلوي والغرض منها الحصول على قطاع نسيجي رقيق جداً.ويقطع الحيوان او جزء منه الى قطع يتراوح سمكها بينμ 10-3 بجهاز يدعى Microtome وهذه التقطيعات هي الاساس الذي يبنى عليه علم الانسجة Histology و كيمياء الانسجة Histochemistry .

التحضيرات الكاملة The Whole Mounts

توفر التحضيرات الكاملة فرصة لدراسة الحيوان –كله او جزء منه – للتعرف على اجزائه التشريحية والموروفولوجية , وتتميز التحضيرات الى عدة انواع منها:

1- تحضيرات التحميل الكامل الجافة Dry Whole Mounts

وهي تستعمل للتراكيب التي تكون جافة في الاصل او يمكن تجفيفها دون اتلافها ومن امثلتها : اصداف المثقبات (الفورامنيفرا) , اشواك الاسفنج واجنحة بعض الحشرات والريش والشعر وقطاعات العظم والاسنان.

2- تحضيرات التحميل الكامل الرطبة Wet Whole Mounts

تستعمل للكائنات الحية صغيرة الحجم او الاجزاء الصغيرة من الحيوانات حتى يمكن تحميلها من الشريحة الزجاجية وفحصها. و في هذه الحالة غالبا ما تحتاج عينات اللافقاريات او يرقات الفقاريات الى التخدير او القتل قبل ان تثبت في المثبت المناسب , ويمكن ان تكون هذه التحضيرات مصبوغة او غير مصبوغة:

أ- تحضيرات التحميل الكامل غير المصبوغة :

هناك ثلاث انواع من هذه التحضيرات :

1- تحضيرات تطمر في الهواء:

قد تكون العينة شفافة وترى في الضوء المار مثل الاجنحة الغشائية للحشرات او قد تكون معتمة مثل اصداف المثقبات وقطاعات العظم وهي تدرس في الضوء المنعكس ويستحسن وضع العينات على ارضية قاتمة.

2- تحضيرات تطمر في وسط تحميل يذوب في الماء :

تستخدم في تحضيرات الديدان الاسطوانية الصغيرة او بيض الديدان حيث يتم طمرها في الكلسرين .

3- تحضيرات تطمر في وسط صمغي :

اقضل من النوع السابق مما لو كان المرغوب فيه الاحتفاظ بتحضيرات دائمة ومن المستحسن ان تجري تبييض Bleaching التي تحتوي على صبغات كثيفة حتى تصبح اكثر شفافية واذا كان المطلوب الحصول على تحضير سطح للهيكل فيجب اذابة الاجزاء الطرية من جسم الحيوان بأية مادة كيميائية مناسبة.

ب - تحضيرات التحميل الكامل المصبوغة

عادة ماتصبغ التحضيرات الخاصة بالتحميل الكامل بالكارمين او الهيماتوكسيلين او Fastgreen.

تحضير الهياكل الحيوانية :

تستخدم مجموعة من الاصباغ لصباغة العظم في وضعه الطبيعي في اجسام الحيوانات الصغيرة او اجزاء من اجسام الحيوانات الاكبر ومن اشهر هذه الصباغ صبغة Alizarin red S وتعتمد الطريقة المستخدمة على نزع جلد العينات الكبيرة او العينات كثيفة الشعر ثم تعامل العينة بمحلول مخفف نسبيا من ايدروكسيد الصوديوم لجعل العضلات شفافة (لايزيل العضلات) ولتعمل على تصبيغ المادة العظمية فقط.

تحضير وصباغة الخلايا الحية Staining of Living Cells

يعتبر فحص الخلايا والحيوانات الدقيقة وهي حية من الطرق المفيدة في دراسة هذه الخلايا والكائنات . وتشمل هذه التحضيرات غالبا الحيوانات الاولية واجنحة اللافقاريات واليرقات والحيوانات اللافقارية الصغيرة مثل الديدان المفلطحة والديدان الخيطية . وكذلك الحيوانات المنوية وبعض انواع الخلايا المعزولة . وتفحص هذه الخلايا في فترة محددة من الوقت . وعادة ماتفحص الطرز المائية من الحيوانات في الماء العذب او الماء المالح حسب طبيعة بيئتها الاصلية . اما الطرز الطفيلية والخلايا المعزولة فتفحص في محلول فسيولوجي ملحي . وعادة ما تفحص العينات دون صبغها.

الصبغات الحيوية Vital Stains

وجد ان بعض مكونات الخلايا الحية تصبغ اختياريا بصبغات معينة مما يجعلها ترى بوضوح عند فحصها بالمجهر الضوئي العادي , ومثال ذلك تصبيغ ال Mitochondria بواسطة صبغة **Janus Green** وتعرف تلك الاصباغ بالصبغات الحيوية ومن اشهرها صبغة Neutral Red و Rhodamine 123 وتسمى عملية التصبيغ هذه بالتصبيغ الحيوي **.** وهناك اسلوبان معروفان يمكن تطبيقهما في هذا الصدد :

الطريقة الاولى : وهي تكون بحقن الصبغ في الحيوان الحي ثم يجري تشريح الحيوان ويؤخذ منه العضو الذي تمت صباغته لفحصه وتسمى هذه الطريقة صباغة حيوية داخليةIntravital Staining

الطريقة الثانية : يؤخذ فيها العضو من الحيوان اولا ثم تجري عملية صباغته بعد ذلك وتسمى هذه الطريقة صباغة حيوية ظاهرية Supravital Staininig ويمكن صباغة الحيوانات وحيدة الخلية او الحيوانات الصغيرة عديدة الخلايا بغمرها في محلول التصبيغ.

تجربة التحضيرات الجافة Dry Mounts :

ناخذ جناح حشرة , ثم نضع مادة DPX على سطح السلايد ومن ثم نضع الجناح على المادة حتى تلتصق , بعدها نقوم بفحص الجناح ومشاهدة تركيبه .

تجربة تحضير وصباغة الخلايا الحية Staining of Living Cells

في هذه التجربة نقوم بفحص خلايا الWBC كريات الدم البيضاء وهي متحركة وذلك بتصبيغها بصبغة التصبيغ الحيوي Vital Satining :

تتكون الصبغة من :

Janus Green 0.2غم , **Neutral** Red 0.2غم , كحول اثيلي مطلق

طريقة تحضير الصبغة :

نؤخذ كمية لغرض تحضير عينة او عينتين مختبريا من Janus Green ولتكن 0.05غم وتذوب في 25 مل من الكحول الاثيلي , ثم ناخذ نفس الكمية من **Neutral** Red اي 0.05 غم وتذوب ايضا في 25 مل من الكحول . ثم نمزج الصبغتين مع بعض . نتركها فترة قليلة حتى تذوب الصبغتان .

طريقة الفحص:

ناخذ قطرة من الصبغة ونضعها على السلايد ونتركها حتى تجف ومن ثم ناخذ قطرة دم من وخز الابهام مثلا ونضعها على غطاء سلايد ونضع الغطاء فوق السلايد مع الضغط برفق عليه حتى لانترك اي فراغات بين السلايد والغطاء , بعدها نفحص السلايد ونلاحظ حركة الكريات البيضاء وهي تتحرك حركة اميبية او لولبية.

تحضير السحبات Smear Preparations

يجهز هذا النوع من التحضيرات بسحب العينة على الشريحة او الغطاء الزجاجي وذلك قبل عمليتي التثبيت والتصبيغ , وعادة ما تشمل هذه التحضيرات على ثلاثة انواع :

1- سحبات الاوليات الحيوانية وسحبات البرازSmears of Protozoa & Faces

2- سحبات الدم Blood Smear

3- سحبات الحيوانات المنوية Sperms Smears

وعادة ما يكون هناك نوعان من التحضيرات :

- في النوع الاول : يتم تثبيت العينة بعد ان يجف التحضير فوق الشريحة ويطلق على مثل هذا النوع بالسحبة الجافة Dry Smears

- في النوع الثاني : يتم تثبيت العينة وهي لاتزال في حالة مبللة فوق الشريحة ويطلق على مثل هذا النوع بالسحبة المبللة Wet Smears

1- سحبات الاوليات الحيوانية وسحبات البرازSmears of Protozoa & Faces يتم تحضيرها تحضيرا مبللا , حيث يتم تصبيغها بصبغة Iron Alum Hematoxylin وبوجود المثبت شودين Schaudinn .

2- سحبات الدم Blood Smear

يمكن تحضير نوعان من سحبات الدم : هما السحبات الرقيقة والسحبات السميكة , وعادة ماتحضر السحبات السميكة في اللافقريات , حيث يكون عدد كريات الدم قليلا مما يتيح فحص اكبر عدد منها , وتحضر السحبات السميكة في الفقريات عندما يراد البحث عن طفيليات الدم حيث ان السحبات السميكة تعطي فرصة اكبر لاكتشاف هذه الطفيليات و بجهد اقل مما لو حضرت سحبات رقيقة .

عند سحب الدم من احد القوارض فانه عادة ما يخدر الحيوان ثم يبتر جزء صغير من نهاية الذيل ثم يجمع الدم المنساب من الجرح.

وفي البرمائيات يستحسن تجنب اخذ الدم من مصدر سطحي بسبب وجود كمية كبيرة من الافرازات المخاطية , ولذا ينصح باخذ الدم من قلب الحيوان بعد تشريحه .

وعادة ما تصبغ سحبات الدم بصبغة Giemsa , Wright , Leishman وكما يمكن ان تصبغ ب Eosin , Hematoxylin .

ملاحظات في تصبيغ سحبات الدم :

1- التصبيغ بصبغة Wright لايحتاج الى تثبيت سحبة الدم.

2- التصبيغ بصبغة Leishma nلايحتاج الى تثبيت سحبة الدم.

3- السايتوبلازم بصبغة Leishman يظهر باللون الازرق مع ظهور حبيبات لونها مابين الاحمر والازرق اما الانوية فتاخذ اللون البنفسجي .

4- في التصبيغ ب Giemsa يكون لون السايتوبلازم قرمزيا و لو ن الانوية ازرق او بنفسجي.

5- يراعى عدم تعرض الشرائح المصبوغة بصبغات Giemsa , Wright , Leishman للضوء لفترات طويلة حتى لايؤدي ذلك الى ان تبهت الصبغة.

6- يجب تغطية السحبة بعد التصبيغ بغطاء واذا لم تغطى وفحصت بالعدسة الزيتية فيجب ازالة الزيت فوق الشريحة بوضعها في زايلول دون مسح الزيت حتى لا يتلف التحضير.

3- سحبات الحيوانات المنوية Sperms Smears

يمكن تحضير سحبة من ال Sperms بوجود مثبت شادون وصبغة Mayer`s Hematoxylin حيث تظهر انوية رؤوس الحيوانات المنوية.

الجزء العملي :

المواد والاجهزة المستعملة :-

1- سلايدات زجاجية مع اغطيتها .
2- ابر وخز معقمة Lancets .
3- كحول للتعقيم، قطن.
4- صبغة Leishman stain أو صبغة كمزا Geimsa stain أو صبغة رايت Wright stain.
5- صبغة أزرق المثيلين methylene blue .
6- مجهر ضوئي مركب .
7- عينات دم .

- طريقة المسحة Smearing Method

تستعمل هذه الطريقة للانسجة التي يصعب قطعها وخاصة سوائل الجسم كالدم والسائل المخي وسائل النخاع الشوكي والسائل السيلومي والإدرار وكذلك أجزاء بعض الأنسجة كنخاع العظم . تعمل المسحة بفرش السائل بين شريحتين أو بين شريحة وغطائها للحصول على طبقة رقيقة Thin film . ان الخطوة الاخيرة في تحضير المسحات هي صبغها ويمكن استعمال عدة صبغات تبعاً لنوع المسحة وتمثل طريقة المسحة وسيلة جيدة للتشخيص في علم الخلية التشخيصي والأمراض النسجية وهناك عدة طرق لإجراء طريقة المسحة وتعد مسحة الدم Blood smear أشهرها وكما يلي :

1- توضع قطرة الدم على الشريحة الأفقية بعد إهمال القطرة الأولى من الدم على بعد حوالي انج واحد من النهاية اليمنى للشريحة النظيفة (يجب تعقيم الأصبع قبل وبعد أخذ قطرة الدم) .
2- تمسك شريحة ثانية بصورة عمودية بحيث تعمل حافتها القصيرة زاوية مقدارها 45° مع سطح الشريحة الأفقية التي وضعت قطرة الدم عليها . تسحب الشريحة العليا قليلا باتجاه قطرة الدم بحيث تكون الحافة ملامسة بسطحها الخلفي لقطرة الدم ، عندئذ ستنتشر قطرة الدم على حافة الشريحة وفي الزاوية بينها وبين الشريحة الأفقية .

3- ادفع الشريحة العليا بالاتجاه المعاكس للجهة الموضوع عليها قطرة الدم بحيث يسحب الدم على سطح الشريحة الأفقية لتتكون مسحة الدم .ان دفع الشريحة العليا ببطء أو استعمال قطرة كبيرة من الدم يؤدي إلى تركيز كريات الدم على طول الحافات أو عند نهاية المسحة .

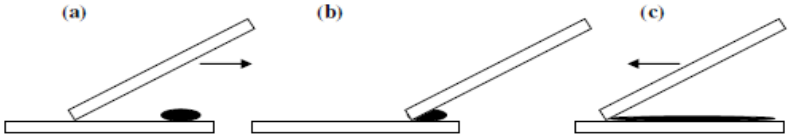


Figure 10.4. The steps for preparation of a thin blood smear

4- تترك الشريحة الحاوية على مسحة الدم لتجف في الهواء .

5- توضع الشريحة الحاوية على مسحة الدم على حامل خاص للتصبيغ فوق مغسلة المختبر.

6- توضع عدة نقاط من صبغة لشمان Leishman stain أو صبغة كمزا Geimsa stain أو صبغة رايت Wright stainعلى مسحة الدم واتركها 2-3 دقائق ثم أضف قطرات من الماء المقطر الى الصبغة ويترك خليط الماء والصبغة لمدة 10 دقائق .

7- اغسل الشريحة بماء مقطر حتى تظهر المناطق الرقيقة من المسحة بلون أحمر –وردي وتترك لتجف في الهواء .

8- افحص تحت المجهر الضوئي المركب باستعمال القوى 40X و 100X . ركز دراستك في المنطقة المسماة ذيل المسحة Smear tail حيث يكون سمك المسحة قليلاً مقارنة برأس ووسط المسحة Smear middle & head حيث يكون سمك المسحة كبيراً .

9- قارن مع الرسم والتأشير بين الأنواع الخلوية المختلفة لخلايا الدم من النواحي التالية :

أ- شكل النواة .

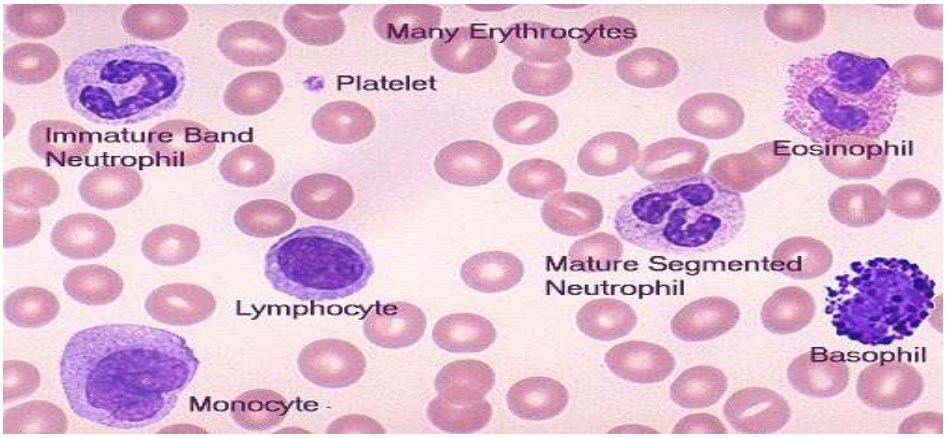
ب- وجود العضيات .

ت- وجود الحبيبات الافرازية .

ث- نوع الحبيبات الافرازية .

ج- وظائف كل نوع من خلايا الدم .

النتائج :



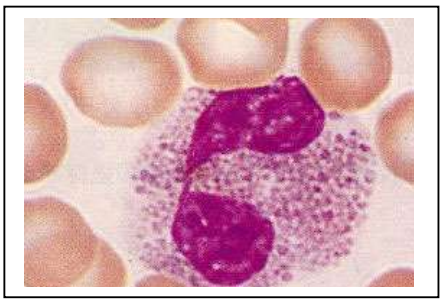
مسحة دم Blood smear

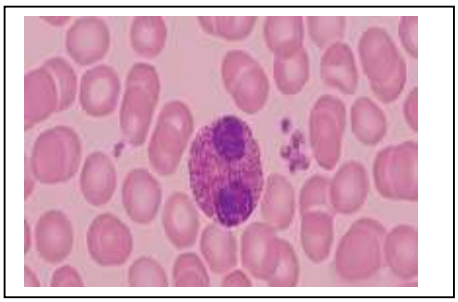
1- تظهر الكريات الحمراء(RBCs) Red blood cells or Erythrocytes بلون أحمر باهت والصفائح الدموية Platelets (thrombocytes) زرقاء الى ارجوانية .

2- تظهر خلايا الدم البيضاء (WBCs) White blood cells or leukocytes بأشكال مختلفة :

A- خلايا الدم البيضاء المحببة Granulocytes التي تحتوي حبيبات سايتوبلازمية وتشمل :

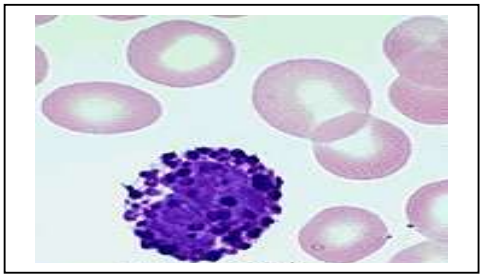
1- خلايا الدم البيضاء الحامضية Eosinophil or Acidophil :تظهر بنوى ارجوانية ثنائية الفصوص وحبيبات سايتوبلازمية برتقالية الى حمراء .



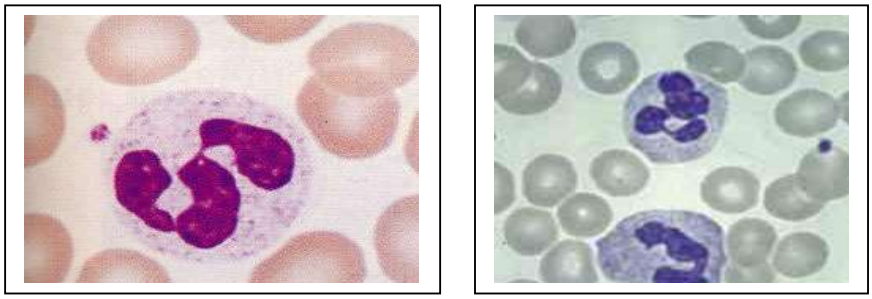


خلايا الدم البيضاء الحامضية Eosinophil or Acidophil

2- خلايا الدم البيضاء القاعدية Basophil : تظهر بنوى ارجوانية غير منتظمة الشكل او بشكل حرف S وحبيبات سايتوبلازمية زرقاء داكنة .



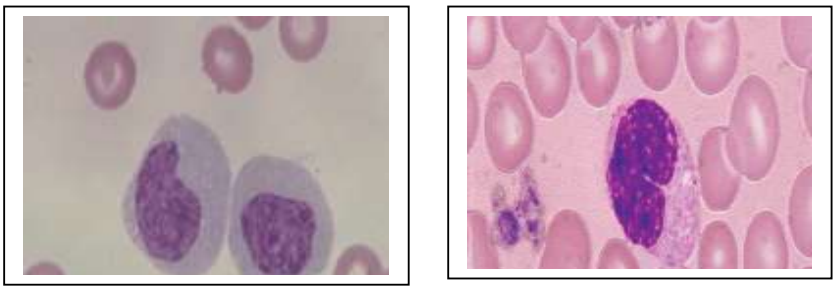
3-خلايا الدم البيضاء المتعادلة Neutrophil : تظهر بنوى ارجوانية داكنة متعددة الفصوص (3-5) فصوص وحبيبات سايتوبلازمية بلون ارجواني شاحب .



خلايا الدم البيضاء المتعادلة Neutrophil

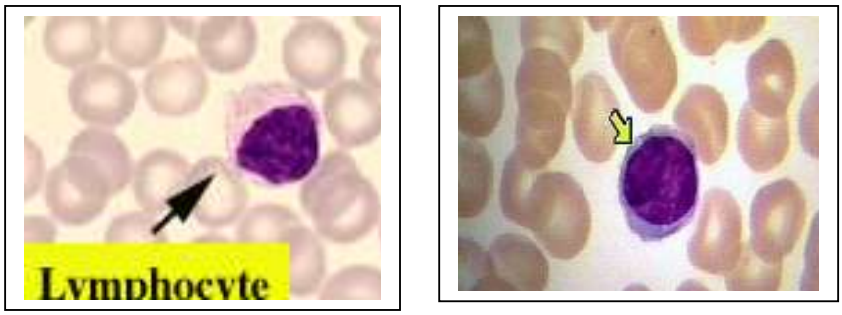
B- خلايا الدم البيضاء غير المحببة Agranulocyte لا تحتوي حبيبات سايتوبلازمية وتشمل :

1- الخلايا وحيدة النواة Monocyte : تظهر حاوية على نوى على شكل حدوة الحصان (U-Shape) وسايتوبلازم قليل .



الخلايا وحيدة النواة Monocyte

2- الخلايا اللمفاوية Lymphocyte : تظهر حاوية على نوى كروية ارجوانية وسايتوبلازم ازرق باهت.



طريقة السحق أو الهرس Squashing Method

تستعمل هذه الطريقة لعمل التحضيرات المؤقتة للأنسجة التي ليست طرية بالقدر الذي يسمح لعمل مسحة منها ولا هي صلبة بدرجة تكفي لقطعها دون طمر مسبق . من العينات التي تخضع للهرس القمم النامية في الساق والجذر والمياسم والمبايض والغدد اللعابية لذبابة الفاكهة والعقد اللمفاوية والأورام الطرية والحويصلات المنوية والبربخ وبطانة المهبل وسقف الحلق.

بصورة عامة يهرس النسيج بوضع العينة على شريحة نظيفة وتفرش تحت غطاء الشريحة بضغطها بشكل يمكّن من نشر وفرد الخلايا ومن المعتاد ان تحاط العينة بسائل مناسب قبل هرسها ويعتمد اختيار هذا السائل على طبيعة العينة والغاية من التحضير، فالقمم النامية للجذور او السيقان توضع عادة في محلول حامض الهيدروكلوريك HCL ليفكك جدران الخلايا قبل ان تصبغ بصبغة الاسيتوكارمين acetocarmine او اسيتواورسين acetoorcin . اما الهايدرا Hydra فيمكن هرسها في ماء او محلول رنجر Ringer solution لتوضيح خلاياها اللاسعة . يجب الحذر في عدم السماح للغطاء بالتحرك إطلاقاً أثناء عملية الضغط وإلا تكسرت الخلايا وتشوهت معالمها الحقيقية . إن عدم إزالة جميع الأجزاء الكبيرة سوف يساعد على تكوين الفقاعات الهوائية تحت غطاء الشريحة ، وكذلك يقلل من انبساط الخلايا على الشريحة المجهرية ، مما يؤدي إلى عدم وضوح تركيبها الداخلي بشكل جيد .الجدير بالذكر أن هذه الطريقة تعتبر من أنجح الطرق المختصة بدراسة الخلايا وبالذات دراسة مراحل الانقسام ورؤية الكروموسومات .

الجزء العملي:

المواد والاجهزة المستعملة

1- مجهر مركب
2- شرائح وأغطية
3- عيدان الاسنان toothpick او cotton swap
4- صبغة ازرق المثيلين ،قطارة

تحضير هرسة من سقف الحلق وباطن الفم:

تعد خلايا سقف الحلق وباطن الفمBuccal Cells خلايا ظهارية يمكن الحصول عليها بسهولة ويزداد وجود الانوية الصغيرةMicronucleus فيها في بعض الامراض مثل فقر الدم المنجلي Sickle cell anaemia .يمكن تحضيرها بالطريقة الاتية:-

1- ضع قطرة صغيرة من الماء المقطر وسط الشريحة.
2- حك أو كشط باطن الخد cheek بصورة دائرية بواسطة عيدان الاسنان toothpick او cotton swap بعد غسل الفم جيدا.
3- حرك نهاية عيدان الاسنان في قطرة الماء الصغيرة على الشريحة.
4- ضع قطرة من صبغة أزرق المثيلين methylene blue على السلايد ثم حرك الخلايا الظهارية المكشوطة scraped epithelial cells في الصبغة بالضغط عليها بغطاء الشريحة.
5- افحص السلايد تحت المجهرعلى قوة التكبير 40X.

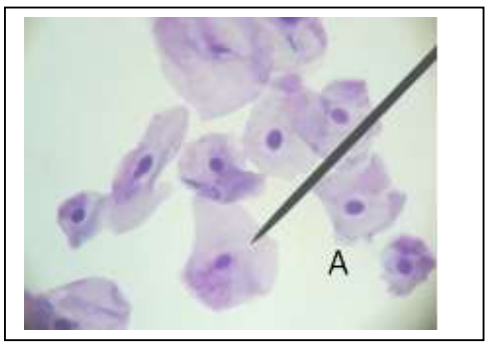
6- ارسم الخلايا الظهارية المختلفة بالتفصيل ووضح الفروقات بينها .

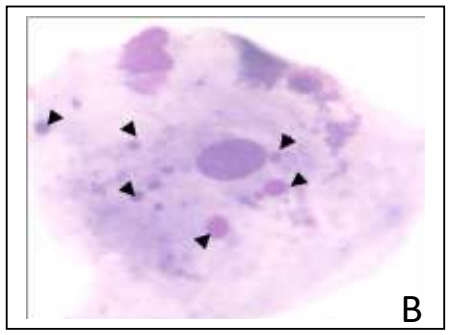
من الممكن تصبيغ بطريقة اخرى تشمل استخدام صبغة كمزا Giemsa stain لمدة 20 دقائق بعد تثبيتها بالميثانول لمدة 10 دقائق ثم تغسل بمحلول منظم(pH 6.8) ثم تجفف بالهواء .

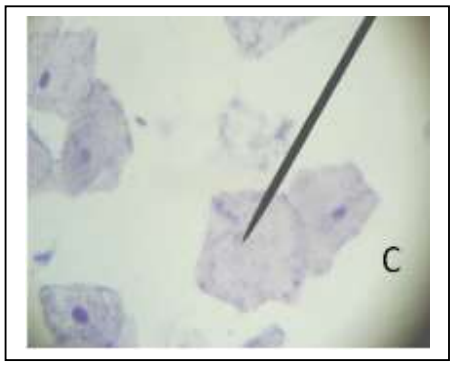
النتائج:

1- تظهر الخلايا الطبيعية ذات نواة بيضوية او دائرية مصبوغة بصورة متناسقة (شكل A).

2- بعض الخلايا تظهر حاوية على نواة رئيسية مع بعض النوى صغيرة الحجم(micronucleus(MN (شكل B خلايا ظهارية غير حاوية على نواة يطلق عليها Karyolitic cells (شكل C).







Figures showing:

(A) normal buccal cell. (B) buccal cell with micronuclei (MN). (C) un-nucleated buccal cell. :

تجربة الهرس للقمة النامية في جذر البصل للحصول على الكروموسومات او الانقسام الخلوي باستخدام صبغة Acetcarmine

نحضر صبغة Acetcarmine من : نغلي 0.5 غم من صبغة Acetarmine في محلول 45% حامض الخليك لمدة 2-4 دقيقة ثم يبرد المحلول ويرشح.

بعد ان اصبحت الصبغة جاهزة , ناخذ بصل ونغمر ساقه في الماء لتحفيز نمو الجذور وعندما يصل الجذر الى 1سم , نقطع القمة النامية للجذور root tips , توضع الصبغة على الشريحة وتوضع فوقها القمة النامية لجذر البصل وتهرس بنهاية ابرة تشريح , يتم ازالة الاجزاء التي تشاهد بالعين المجردة حتى لاتؤثر على العينة , نضع فوقها الغطاء ويضغط بالاصبع برفق حتى تنتشر العينة مع الصبغة ويتم وضع قليل من الصبغة على جوانب الغطاء لتعزيز كمية الصبغة الخارجة من تحت الغطاء بعد الضغط عليه , ثم توضع تحت المجهر وتفحص.