التقانات المجهرية لدراسة الخلايا:

طريقة التقطيع Sectioning Method

وهي الأهم لدراسة العينات على مستواها النسجي والخلوي والغرض منها الحصول

على مقطع نسيجي رقيق جدا,ويعرف المقطع Section بأنه شريحة رقيقة تقطع من جزء مأخوذ من كائن حي لغرض دراسة تركيب او ترتيب الخلايا المكونة لها. اما طرق القطع فتتم بواسطة المايكروتوم.

و فيما يلي الخطوات المتبعة لعمل مقاطع نسيجية محملة على شرائح زجاجية :

1- الحصول على العينة(Sampling(Obtaining the specimen

2- تثبيت العينةFixation

3- غسل العينةWashing

4- نزع الماء من العينة Dehydration

5- ترويق العينة Clearing

6- تخليل أو تشرب العينة Infiltration

7- طمر العينةEmbedding

8- التشذيبTrimming

9- القطعSectioning

10 - صبغ القطاعات Staining

11- تغطية الشرائح Mounting لعمل شريحة مستديمةPermanent slide.

12- تنظيف ووسم(تعليم) الشرائح Cleaning &Labelling

1-الحصول على العينة

نحصل على العينة اما بشكل خزعة Biopsy من الإنسان المريض خلال العملية الجراحية ومن الحيوان بعد قتله مباشرة .يعرف القتل بأنه إيقاف دائم وسريع لجميع العمليات الحيوية . و تتم عملية القتل بعدة وسائل منها –التنخيع – ضرب مؤخرة الرأس– التخدير.

التنخيع Spinal dislocation: ويقصد بها شل الحيوان شلا كاملا وذلك بفصل الحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي أو المخ وبذلك لا يحس الحيوان بالألم أثناء عملية التشريح وكثيرا ما يطبق على الضفادع.

ضرب مؤخرة الرأس : وتهدف إلى ارتجاج مخي مفاجئ بحيث يصبح الحيوان بعدها في حالة غيبوبة.

التخدير :هو إيقاف مؤقت لجميع العمليات الحيوية, في كثير من التحضيرات يسبق الحصول على العينة تخدير الحيوان او قتله ويراعى عادة عدم تخدير الحيوان فيما اذا كان من المرغوب فيه اعداد تحضيرات دقيقة في مجال علم الخلية Cytology

وعلم كيمياء الانسجة Histochemistry , حيث ان المواد المخدرة تسبب تغيير في بعض التراكيب . **وفي ما يلي بعض طرق التخدير :**

1- **10% Alcohol** : وينصح به لحيوانات المياه العذبة وخاصة الهيدرا Hydra , يضاف الكحول الى الماء الذي يعيش فيه الحيوان تدريجيا .

2- **كبريتات المغنيسيوم Magnesium Sulphat** : صالح لتخدير الكثير من الحيوانات اللافقارية التي تعيش في الماء المالح والعذب . تضاف بلورات منه الى الماء الذي تعيش فيه الحيوانات .

3- **بخار الايثر Ether vapors** : يستخدم مع الحشرات والعناكب.

4- **الاختناق Asphyxiation** : وتستخدم هذه الطريقة مع Snails القواقع , حيث تغلى كمية من الماء لطرد الهواء ثم يغلق الوعاء جيدا, بعد ان يبرد يوضع فيه القوقع.

5- في الحيوانات الثدية مثل الكلاب والقطط يستحسن استخدام الايثر او الكلوروفورم ثم ذبح الحيوان وهو مخدر , اما الثدييات صغيرة الحجم يستحسن استخدام طريقة الذبح المباشر او طريقة احداث خلع بين الفقرات العنقية ولكن هذه الطريقة لا تستخدم اذا كانت الدراسة حول الجهاز العصبي , كذلك يمكن تخدير الحيوان او قتله بصدمة على الراس بقوة على حافة المنضدة او بادخال ابرة التشريح فيما بين العمود الفقري والجمجمة لاتلاف المخ , كذلك يمكن استخدام الايثر والكلوروفورم .

الحصول على العينة من الحيوان Separation of Material

يراعى عند تشريح حيوان لاخذ جزء منه ان يتم التشريح في محلول مناسب يقلل من الخلل الذي يحدث في طبيعة النشاط للعضو عند التشريح او ان يصب كمية من هذا المحلول فوق منطقة الجزء المراد الحصول عليه , ومن اشهر المحاليل الفسيولوجية محلول رنجر Ringer`s Solution , **ويتركب هذا المحلول من :**

كلوريد الصوديوم NaCl 0.03 غم , كلوريد البوتاسيوم KCl 0.025 غم , ماء مقطر 100 مل .

ومن اجل استعمال المحلول لانسجة حيوانات ذوات الدم الحار , يضاف الى المحلول كلوريد الصوديوم NaCl وبنسبة 0.09 غم.

ويمكن الاقتصار على استخدام محلول كلوريد الصوديوم مع الماء المقطر مع الحيوانات المتغيرة الحرارة (اسماك , برمائيات , زواحف) وبتركيز (كلوريد الصوديوم 6.4 غم و ماء مقطر 1000 مل) . ويراعى عند نزع العضو من الحيوان الاعتبارات التالية :

1- يجب نزع العضو من جسم الحيوان وغسله في المحلول الفسلجي لازالة الدم العالق به لان الدم يعيق عملية التثبيت .

2- يجب ان يعرض العضو لاقل ضغط عليه عند الامساك به , فمن الممكن ان يحدث الامساك العنيف للعضو بواسطة الملقط اضرار بالانسجة والخلايا .

3- لايسمح ابدا بجفاف العضو في الهواء.

4- ان يستخدم مشرط حاد لقطع العضو الى اجزاء صغيرة مناسبة لايزيد سمك اي جزء فيها عن $\frac{1}{2}$ سم .

2-التثبيت fixation:

الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة من أجل إخضاعها للفحوصات النسجية والكيميانسجية وتهدف هذه الخطوة إلى المحافظة على النسيج ومحتوياته على الحالة التي كان عليها في جسم الكائن الحي أو قريبة من ذلك وتتم عملية التثبيت من خلال التفاعلات الكيميائية والتداخلات الفيزيائية بين المجاميع الفعالة للمثبت والمجاميع الفعالة للمواد الكيميائية الموجودة في النسيج(كربوهيدرات – بروتين – دهون – إنزيمات - أملاح معدنية-صبغات) و تقوم عملية التثبيت الناتجة بإيقاف عملية التفتت والتفسخ Disintegration والتعفن Putrefaction الناتجة عن نشاط البكتيريا والفطريات وكذلك إيقاف عملية التحلل الذاتي للنسيج بفعل الإنزيمات. هذا بالاضافة الى فوائد اخرى ابرزها :-

1- تقسية الانسجة لتصمد امام العمليات التالية وخاصة القطع بأقل قدر من التشوه .
2- حفظ خلايا النسيج من الانتفاخ او الانكماش عند تعرضها لعمليات تالية مثل مثل ازالة الماء والتشرب بالشمع .
3- تحسين قدرة اجزاء النسيج على تقبل الصبغ بشكل أفضل .
4- تعديل معامل الانكسار لبعض مكونات النسيج بحيث يسهل التمييز بينها .
5- جعل النسيج اكثر مقاومة للحرارة اثناء تعرضه للشمع الساخن .

<u>وحتى تتحقق الأهداف المرجوة من التثبيت لابد من مراعاة النقاط التالية:</u>

1-اختيار المثبت المناسب للعمل حسب الغرض من الدراسة.

2-وضع العينة في المثبت مباشرة بعد أخذها من الجسم لمنع عملية التحلل والتفسخ.

3-إن يكون حجم العينة صغير بحيث يسمح للمثبت بالنفاذ خلال العينة في وقت قصير(سمك -العينة لا يزيد على2 -5 ملم) ويجب ان لا يستخدم سدادات من المطاط اذا كان المثبت محتويا على الكحول منعا من ذوبان المطاط وتلف المثبت.

4- إن يكون حجم المثبت عدة أضعاف حجم العينة (10-20 ضعف).

5- ضرورة التقيد بالفترة الزمنية اللازمة للتثبيت حسب المثبت المستخدم

6- الأخذ في الاعتبار الآثار التي سيتركها المثبت على مكونات النسيج وتركيب الخلايا بعد التثبيت.

7 -إذا لم يتوفر المثبت المناسب في حاله طارئة يجب وضع العينة في السائل النيتروجيني إلى حين توفر المثبت المناسب.

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

<u>المثبت Fixative</u>

هو عبارة عن وسط سائل يحتوي على مواد كيميائية بعضها يعمل على تثبيت المحتوى الكيميائي للخلايا والمواد بين الخلوية عن طريق التخثير والترسيب والمحافظة على خلايا النسيج من التشوه. من المثبتات الشائعة للفحص بالمجهر الضوئي : الفورمالين Formalin 10% ، محلول زنكر Zinker Solution ، محلول بوان او بوين Bouin Solution ، محلول كارنوي Carnoy ، ومن المثبتات الشائعة للفحص بالمجهرالالكتروني : محلول الكلوترالديهايد Gluteraldehyde ورابع اوكسيد الازميوم Osmium tetraoxide .

شروط المثبت الجيد:

1- يتخلل الأنسجة بسهولة وبسرعة.

2- يعمل في درجة الحرارة العادية.

3- لا يحدث ضرر بالنسيج.

4- يعمل على تيبس النسيج نوعا 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 منظم Buffer.

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 طرديا ويجب مراعاة نوع المثبت .

وفيما يلي بعض المثبتات:

1- محلول بوان Bouin Fluid 2- محلول جندر Genders Fluid

3- مثبت دافانو Dafano Fixative 4- محلول فلمنج Flemming Fluid

5- الفورمالين Formalin 6- الكحول Alcohol

طريقة تحضير الفورمالين الملحي :

فورمالين مركز Concentrated Formalin	10 مل
كلوريد الصوديوم NaCl	0.85 غم
ماء مقطر	90 مل

الكحول Alcohol

يستخدم الكحول الاثيلي منفردا , والعيب الاساسي عند استخدام الكحول هو انه يسبب انكماش وجفاف للانسجة . ويفضل استخدام 70% كحول ساخن لتثبيت الديدان الخيطية , ويستخدم الكحول المثيلي لتثبيت سحبات الدم.

تجارب في تثبيت العينات

أ- طريقة جمع عينات النباتات وتثبيتها :

1- اخذ عينة من الحقل مثلا ساق او اوراق

2- يقطع النموذج بمسافة 1 سم

3- يوضع النموذج في المثبت FAA (Formaldehyde Acetic Acid) , وطريقة التحضير :يؤخذ 5مل من الفورمالديهايد formaldehyde ثم يضاف اليه 5مل من حامض Acetic Acid ويكمل المحلول الى 90مل من الكحول .

ب ـ طريقة تحضير المحلول الفسلجي الخاص باللبائن :

يؤخذ 9غم من كلوريد الصوديوم NaCl ويضاف له 1000 مل من الماء المقطر , ويمكن اخذ كمية اقل من المادتين لغرض تحضيرها في المختبر لتثبيت عينة او عينتين .

ج ـ طريقة تحضير مثبت عينات الحيوان :

يؤخذ حجم واحد من formaldehyde ويضاف الى تسعة اضعاف من الماء , وبذلك نحصل على محلول تركيزه 10% , وكذلك يستخدم كمحلول حفظ .

3- عملية الغسل Washing

يجب غسل العينة بعد التثبيت و ذلك لإزالة ما تبقى من أثر المثبت على العينة .مثلاً العينات المثبتة في مثبت بوان يغسل بالكحول % 70 حتى يزول اللون الأصفر .تغسل العينات المثبتة في زنكر بالكحول % 96 مشبع باليود ومدة الغسيل تتروح من5- 8 ساعات . العينات المثبتة في مثبت روسمان تغسل بالكحول96% . العينات المثبتة في الفورمالين تغسل بماء الصنبور الجاري لمدة 24 ساعة.

4- عملية نزع الماء(الانكاز) Dehydration:

وهي الطريقة التي يتم بواسطتها إحلال مادة محل الماء الموجود في النسيج هذه المادة تذوب فيها المحاليل والمواد المستعملة في الخطوات القادمة مع عدم تشويه النسيج وتتم هذه العملية بتمرير العينة في سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من الكحول الإثيلي ethanol(ethyl alchohol) لمنع انكماش الأنسجة في حالة لو وضعت في كحول مطلق مباشرة ويفضل الكحول لأنه يمتزج بسهوله مع الماء ومع مادة الزايلول(الزايلينxylene) المروقة والتي بدورها تمتزج جيدا مع مادة الطمر البرافينية.

لا يمتزج الماء 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(50% ،70%، 90% ، 100%) وتتروح المدة اللازمة لترك العينة في كل خطوة من خطوات نزع الماء في محاليل الكحول المختلفة التركيز من 30 دقيقة إلى ثلاث ساعات .

5- عملية الترويق Clearing:

هي العملية التي بواسطتها 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 (الزايلول – الكلورفورم – تولوين – بنزين – زيت خشب الأرز) وعند استخدام الزايلول والتولوين يحدث أحيانا أن يتعكر لون محلول مادة الترويق وهذا 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.

لا يمتزج الكحول 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 التشرب أو التخلل Impregnation or Infiltration .

عبارة عن إحلال كامل للمادة المستخدمة في الطمر مكان المادة المروقة، ويعتبر 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، ويساعد 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 وتكرر هذه العملية لعدة مرات(2-3 مرات) وكل مرة لمدة نصف ساعة، كما تعتمد عدد مرات تغيير الشمع حسب نوع العينة بحيث تقل كلما كانت العينة رخوة وتزداد كلما كانت العينة صلبة. من الامثلة على اوساط التشرب شمع البرافين Paraffin wax بينما تستعمل اللدائن البلاستيكية مثل Araldite في عملية التشرب للنماذج المحضرة للفص=حص بالمجهر الالكتروني .

7- عملية الطمر Embedding

وهي عملية الغرض منها عمل قالب من العينة بحيث تحيط بها المادة الطامرة وتدعمها لتتكوّن طبقة متماسكة من كليهما لتكون جاهزة للتقطيع بثبات اثناء مرورها على سكينة التقطيع وفي الغالب تكون المواد المستخدمة للطمر هي نفس المادة المستخدمة في عملية التشرب . توضع العينة باستخدام ملقط و توضع العينة بالاتجاه المرغوب به، بعدها يترك القالب على سطح ثلجي فترة قصيرة ليبرد سطحه استعداداً للتقطيع .

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 جدا ويحدد سمك القطاع المرغوب فيه(3-7 ميكرون) للبارافين وبسمك (10-15 ميكرون) للسلloيدين(تستعمل سكاكين زجاجية glass knives لقطع مقاطع المجهر الالكتروني وتحمل على مشبك نحاسي grid ، القطاعات الجيدة عادة 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- عملية الصبغ Staining

عملية التصبيغ مرحلة حاسمة جدا في التحضير المجهري ذلك لانه بدون صبغ مناسب للانسجة فانه يصعب تمييز مكوناتها وبالتالي تفقد عملية التحضير اهميتها 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 .توجد نظريتان لتفسير صبغ الانسجة هي :

1- النظرية الكيمياوية : تنص على " ان الصبغ عبارة عن تفاعل كيمياوي يعتمد على تكوين مادة ملحية بين الشق الموجب cation أو الشق السالب anion للصبغة وبين مجموعات كيمياوية معينة في الخلية او النسيج" وعلى هذا الاساس تكون الانسجة اما محبات للحامض acidphilic وتحتوي مجموعات قاعدية وفي هذه الحالة تتفاعل مع الصبغ الحامضي او محبات للقاعدة basophilic وتحتوي مجموعات حامضية تتفاعل مع الصبغة القاعدية .

2- النظرية الطبيعية : ترتكز هذه النظرية على افتراضات تنص على " ان التصبيغ يتم بوسائل طبيعية مثل الامتصاص والادمصاص والخاصية الشعرية والانتشار والتنافذ.

ان الفكرة السائدة في الوقت الحاضر هو ان الصبغ ينتج عن عمليات كيمياوية وطبيعية في ان واحد .

تصنف الصبغات حسب مصدرها الى :

1- الصبغات الطبيعية Natural Dyes :

يحصل عليها اما من مصدر حيواني او نباتي , ومن امثلتها : Saffron , Carmine , Hematoxylin , Orcein

الصبغات المصنعة Synthetic Dyes :

هي مركبات عضوية تشتق من البنزين ,ولعمل صبغة مشتقة من البنزين فانه يجب ربط مجموعات كيمياوية معينة تسمى حاملات الالوان Chromophores بحلقة البنزين وتكون حلقة البنزين وحامل اللون مادة تدعى مولد اللون Chromogen ومولد اللون لا يقوم بدور الصبغة ولكي يقوم بهذا الدور يجب ان يحتوي مولد اللون مكونا قاعديا واخر حامضيا وتدعى المجموعات التي تضيف هذه الخاصية لمولد اللون بمساعدات اللون Auxochromes ومن امثلة هذه الصبغات :
Nitro , Hematein Dyes , Azo Dyes , Eosin

تصنيف الصبغات Classification of stains

أ- تقسيم الصبغات تبعا لتركيز الاس الهايدروجيني 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 والهيماتوكسلين Haematoxylin .

2- الصبغات الحامضية acidic stains هي تلك الصبغات التي تكون حاوية على جذور حامضية عضوية ملونة تتحد مع قاعة معدنية metallic base غيرملونة للانسجة مثل صبغة الخضراء الباهتة Light green وصبغة الايوسين Eosin.

3- الصبغات المتعادلة neutral stains 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 تلك 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 تلك الصبغات التي تميل لصبغ السايتوبلازم ونظرا لكون السايتوبلازم ذو طبيعة اكثر قاعدية لذا فانه يميل يميل للاصطباغ بالصبغات الحامضية أي ان الصبغات السايتوبلازمية هي صبغات حامضية .

حالات صبغ العينات

1- صبغ المقاطع Section Staining: لتصبيغ مقاطع من انسجة نباتية او حيوانية بعد تقطيعها على شكل مقاطع بجهاز المايكروتوم في قوالب شمع البرافين .

2- صبغ المقاطع الكاملة Whole Mount Staining :

لتصبيغ النماذج الكاملة ,قد تكون حيوانات مجهرية او اجزاء نباتية او اجنة صغيرة , اي تصبغ المقاطع الكاملة قبل وضعها في قالب شمع البرافين اي قبل تقطيعها .

3- صبغ المسحات والهرسات Smear & Squash Staining :

تشبه حالة صبغ المقاطع ولكن هنا لايحتاج الى ازالة الشمع , كصبغ الخصية والمبيض والقمم النامية من الجذور والسيقان .

طرق تحضير الاصباغ البايلوجية Preperation of some Biological Stain

1- Hematoxylen

يعتبر من اكثر الصبغات استعمالا وتوجد عدة صبغات من هذه الصبغة تشترك جميعها بوجود واحد او اكثر من المكونات التالية اضافة الى صبغة ال Hematoxylen **:**

ا- شب alum وهو مثبت للصبغة

ب - حامض acid يساعد على تحسين الصبغة

ج - كليسرول Glycerol يساعد في ابطاء عملية الاكسدة ويطيل عمر الصبغة

د - عامل اكسدة Oxidizing يساعد في تحويل Hematoxylen الى هيماتين

وهناك عدة تحضيرات من هذه الصبغة :

1- Delavield`s Hematoxylin  2- Ehrlich Hematoxylin  3- Harr`s Hematoxylin 4- Mayer`s Hematoxylin

طريقة تحضير Ehrlich Hematoxylin:

Hematoxylin 2 غم , امونيا 3 غم , كحول اثيلي 100 مل , جلسرين 100مل , ماء مقطر 100 مل , حامض الخليك الثلجي 10 مل

ذوب الهيماتوكسلين في الكحول ثم اضف الحامض والكلسرين والماء , ويتم نضج هذا المحلول بعد فترة من 6- 8 اسابيع.

طريقة اختبار صلاحية محاليل Hematoxylin :

اضف عدة قطرات من محلول الهيموتوكسلين الى ماء الحنفية فاذا تحول بالحال الى اللون البنفسجي يميل الى الزرقة يعني ان الصبغة صالحة للاستعمال.

2- Eosin

يحضر من Eosin 1غم , 70% كحول 1000 مل , حامض الخليك الثلجي 5 مل

عند الاستعمال خذ كمية من المحلول واضف اليها كمية مماثلة من 70% كحول وقطرتين من حامض الخليك .

3- Safranin

يحضر من ذوبان 1غم من Safranin في 100 مل من كحول اثيلي.

الصبغات الشائعة :

صبغ الانسجة الحيوانية : Hematoxylin لصبغ الانوية

Eosin لصبغ السايتوبلازم

صبغ الانسجة النباتية : Safranin لصبغ الانوية

Fastgreen لصبغ السايتوبلازم

اوعية التصبيغ: وهي اوعية زجاجية او بلاستيكية او خشبية تستخدم لتصبيغ النماذج فيها او لحفظ الشرائح لاستخدامها وفحصها لاحقا.

انواعها :

1- جرارت كوبلن Coplin Jars : مصنوعة من الزجاج عمودية الشكل تحوي في داخلها حواجز او حزوز لحفظ الشرائح بوضع عمودي وتسع من 5-10 شرائح وتغطى باغطية زجاجية او مطاطية.

2- صناديق الصبغ Staining Box : مصنوعة من الزجاج توضع فيها الشرائح بشكل افقي ولها حزوز في الداخل لحفظ الشرائح ولها اغطية زجاجية , تستخدم لصبغ الشرائح داخلها .

3- علب الشرائح Slides Boxes: من الخشب او البلاستك , تتسع ل 25,50,100 شريحة توضع فيها الشرائح بشكل افقي.

عند استعمال شمع البرافين يجب أن يزال شمع البرافين من القطاعات تماما باستخدام الزايلول ومن ثم يجب التخلص من الزيلول هو الآخر بالكحول المطلق، بعدها يجب نقل القطاعات إلى بيئة مشابهه للبيئة المذابة فيها الصبغة(مائية أو كحولية). 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(صبغة نووية) وصبغة الأيوسين لصبغ السيتوبلازم (صبغة سايتوبلازمية). من الصبغات المستعملة في صبغ عينات المجهر الالكتروني صبغة خلات اليورانيل Uranyl acetate وصبغة سترات الرصاص Lead citrate .

11- تحميل القطاعات Mounting:

يقصد بها وضع القطاع النسيجي على الشريحة الزجاجية، و تم هذه العملية بعد الانتهاء من عملية الصبغ اذ تبدأ عملية إعداد الشريحة المجهرية للحـفظ المستـديم باستخدام مادة شمعية أو مادة بلاستيكية حافظه مثل مادة بلسم كندا Canada balsam أو مادة(D.P.X) ثم يوضع غطاء الشريحة(Cover slip) بزاوية حادة 45 درجة وبحذر شديد حتى لا تتكون فقاعات هوائيةAir bubbles وهكذا يتم عمل ما يعرف بالشريحة المستديمة permanent slide . بعد أن تترك لتجف على مجفف الشرائح يمكن فحص القطاعات تحت المجهر. ان الغرض من تغطية الشرائح لتسهيل دراستها تحت المجهر لأن التحضيرات المصبوغة وغير المغطاة لاتظهر الاقليلا من التفاصيل لكون معامل انكسار كل من زجاج الشريحة ومكونات النسيج مختلفة تماماً وتتحسن امكانية رؤية مكونات النسيج اذا غطيت بمادة شفافة يكون معامل انكسارها قريبا من معامل انكسار الزجاج . كما ان الغطاء يحمي التحضير وخاصة المقاطع من التهتك والازالة من على الشريحة كما يقلل الغطاء من اكسدة الصبغة وبالتالي يمنع فسادها. ويكمن ان تكون وسائط التغطية دائمية مثل مادة بلسم كندا او مؤقتة مثل الجليسرول glycerol.

مواصفات وسط التغطية :

1- معامل انكساره قريب من معامل انكسار الزجاج.

2- عدم التفاعل مع مكونات النسيج والصبغة.

3- عدم تشويه التراكيب المصبوغة.

4- عدم التشتت او التحبب عند جفافه.

5- عدم تلاشي الصبغة مع مرور الوقت نتيجة لاكسدته

12- تنظيف ووسم(تعليم) الشرائح Cleaning &Labelling

تنظف الشرائح ويزال وسط التحميل الزائد من حول جوانب الغطاء وبالنسبة لتعليم الشريحة توضع ورقة مناسبة على طرف الشريحة يكتب عليها معلومات عن نوع النسيج والمثبت والصبغة وتاريخ التحضير .

تتم الخطوات السابقة بشكل يدوي بينما في مختبرات الأمراض التي يتم فيها أجراء فحوصات روتينية لعينـات كثيرة تتـم باستـخدام أجـهزة حديثـة منها جهاز معاملة الأنسجة الأوتوماتيكي Tissue Auto processor .

- تقنية التجميدfreezing method

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

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

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

3- تستخدم في كيمياء الأنسجة لدراسة فعالية الأنزيمات الخلوية والكشف عن الدهون التي تذوب في الكحول والزايلين وتفاعل الأجسام المضادة مع الأنتيجينات.

عيوبها:

1- لا تعطي سلسله من المقاطع .

2- تعطي قطاعات سميك بسب صعوبة القطع و التصبيغ .

الجزء العملي :

المواد والاجهزة المستعملة:

انسجة مأخوذة مباشرة من الكائن الحي، فورمالين 10%،ايثانول ، زايلين ،شمع برافين،فرن كهربائي ،مايكروتوم ،شرائح زجاجية واغطيتها ،صفيحة تسخين ،هيماتوكسلين ،ايوسين ،محلول ماير(1 البومين : 1 كليسرول) ،كندا بلسم.

1- حضر شريحة حاوية على مقاطع لأنسجة حيوانية أو نباتية.

2- ارسم في دفترك كل مرحلة على حدة.

مقارنة بين العمليات المختلفة لتحضير العينات للفحص بالمجهر الضوئي والالكتروني

Table	microscope Light	Electron microscope
Sample Size	1 cm_3	1 mm_3
Fixative	Formaldehyde	Glutaradehyde
Post-Fixation	None	Osmium Tetroxide
Dehydration	Graded Alcohol	Alcohol or Acetone
Clearing Agent	Xylol/Toluene	Propylene Oxide
Embedding Material	Praffin	Various Plastics
Section Thickness	5-10µ	60-90 nm
Stains	Colored dyes	Heavy Metals