التحضيرات المجهريه ب207

م1: التحضيرات المجهريه:

يقصد بها الخطوات الواجب إتباعها أثناء إعداد العينة للدراسة كطريقة الحصول على العينة ومعالجتها بالمواد الكيميائية و الأصباغ حتى يصبح من السهل دراسة مكوناتها التركيبية بواسطة المجاهر الضوئية أو الالكترونية.

شروط الامان الواجب اتباعها في المختبرات :

1- ارتداء صدرية المختبروالقفازات والنظاره الواقيه للعين .

2- غير مسموح بالاكل والشرب والتدخين .

3- تنسيق العمل داخل المختبر بين العمل الاساسي والضروري وغير الضروري .

4- اعادة جميع المواد والمحاليل والاواني بعد الانتهاء من العمل الى اماكنها .

5- نقل المجاهر بعناية من اماكنها .

6- التاكد من اطفاء الغاز وشمعات النار بعد الانتهاء من العمل بالمختبر .

7- غسل اليدين بالماء والصابون ثم التعقيم بعد الانتهاء من العمل بالمختبر .

الادوات الضرورية الواجب توفرها في المختبر :

الصداري , القفازات , غسول العين , صيدلية اسعافات اولية , مطافيء حريق .

الاجهزة والمعدات المختبرية المستخدمة في التحضيرات المختبرية :

1- Microscope : المجاهر :اداة فحص العينات .

2- Microtome : وهو الة وظيفتها تقطيع العينة الى قطعات رقيقة .

3- حاضنة كهربائية Incubator : تستخدم لتجفيف القطعات الشمعية المحملة على شرائح وذلك قبل الصباغة وكذلك تستخدم لتجفيف الشرائح وكذلك لحفظ المحاليل الخاصة ببعض التفاعلات في مجال كيمياء الانسجة .

4- جهاز الطرد المركزي 5- ميزان كهربائي 6- محرار

7- زجاجيات : مثل Reagent Bottle , اواني صباغة, Cylinder قطارات , Beaker , Pipettes , Funnels

8 - micropipettes 9- شرائح زجاجية Glass Slides وغطاء الشريحه Cover Glass.

10- شفرات وملاقط 12- سرنجات Needles 13- مصادر حرارية مثل Burner , Hotplate , Water bath

الإسعافات الأولية في حوادث المختبر

يمكن أن تنجم الحوادث في المعامل الطبية للأسباب الآتية :

1- الأحماض والقلويات التي تتطاير علي العين أو الجلد أو تبتلع بالفم عند سحب المحاليل بالماصة .

2- المواد السامة . 3- الحرارة الناتجة من لهب مفتوح 4-الزجاج المكسور وما يحدثه من جروح .

5-الصدمات الكهربائية وغيرها . 6- المواد والابخره المستنشقه.

مواد يجب توافرها في صندوق الإسعاف الأولي :

كربونات صوديوم 5 % , بيكربونات صوديوم 2% وتعبأ في زجاجة بقطارة , حامض خليك 5 %

محلول الصابون المسحوق 5 جم في لتر ماء , قطن وشاش طبي , ميكروكروم

صبغة يود , كحول إيثيلي , امونيا 1%

1- حروق الأحماض :

أ- بالنسبة للجلد :يغسل فورا بماء جاري ثم يغمر الجلد بقطن مبلل بمحلول كربونات الصوديوم 5 %.ب- بالنسبة للعين : تغسل العين جيدا بالماء بكميات كبيرة وماء جاري مستمر ويقطر 4 قطرات من محلول بيكربونات الصوديوم 2% ثم يستدعي الطبيب أو يحول المصاب إليه .

ج- ابتلاع الأحماض (مثل حمض الكبريتيك أو الهيدروكلوريك :) : يستدعي الطبيب فورا . يسقي المصاب بعضا من محلول الصابون 5% أو يعطي للمصاب عدد 2 بيضة نيئة مخلوطتين مع 500 مل3 ماء أو لبن . يسقي المصاب من 3 إلي 4 أكواب ماء .

-2حروق القلويات (مثل الصودا الكاوية المركزة): في جميع الأحوال يتم غسل مكان الإصابة بالماء فورا بكميات كبيرة .

أ- الجلد :يغسل الجزء المصاب بالماء المستمر ثم يغطي الجلد بقطن مشبع بحمض الخليك بتركيز 5% أو الخل العادي .

ب- العين : تغسل جيدا بالماء بحيث يدخل الماء في العين من جميع الزوايا ثم تغسل العين بحمض البوريك ثم يتم تحويله إلي طبيب عيون مختص .

ج- ابتلاع القلويات :

يستدعي الطبيب فورا ., يسقي المصاب محلولا من الخل المخفف 1:3 أو عصير ليمون . يسقي المصاب من 4:3 أكواب ماء . يجب الاعتناء بالشفتين بوضع بعض من حمض الخليك تركيز 5 .%

-3الحروق الناتجة من الحرارة :

أ- الحروق الشديدة : يستدعي الإسعاف فورا . يتم وضع المصاب علي الأرض مع ملاحظة عدم نزع ملابسه عنه . يتم استدعاء طبيب الوحدة فورا ويتم حقنه بمخدر عام المورفين .

ب- الحروق الصغيرة : يغمر الجزء المحترق بالماء البارد أو المثلج لتخفيف الألم .يوضع الميكروكروم علي الحروق . توضع ضمادات من الشاش بدون شد . يحول للطبيب لاستكمال العلاج .

4- الإصابات التي يسببها الزجاج المكسور :

أ- الزجاج النظيف :يطهر الجلد بصبغة اليود 2% ويغطي بأي شريط لاصق معقم .إذا كان هناك نزف يوقف بالضغط عليه ويعرض المصاب علي الطبيب .

ب- الزجاج الملوث بمزارع بكتيرية : -يطهر الجرح وما حوله بصبغة اليود أو أي مطهر آخر -2 .يغسل جيدا بالماء والصابون . يبلل ثانية بصبغة اليود ويحول المصاب إلي الطبيب

5- الصدمة الكهربائية : يفضل التيار الكهربائي . يستدعي الطبيب . يبدأ في إجراء التنفس الصناعي علي الفور مع تدليك القلب إذا لزم الأمر.

6- المواد المستنشقة : –استدع سيارة الإسعاف فورا. البس الملابس الواقية و كمامات التنفس المناسبة. قم بأبعاد المصاب عن منطقة الإصابة و ضعه في منطقة تتجدد بها الهواء دائما. أعطه الأوكسجين و ذلك من خلال كمامة التنفس. أبق المصاب مستريحا و في حالة ظهور أية بوادر توقف للتنفس ابدأ فورا بالقيام بالتنفس الاصطناعي. عالج المصاب من الصدمات و أبق المصاب دافئا. لاحظ بأن أعراض التسمم بغاز أول أكسيد الكربون بكميات خفيفة تشابه أعراض التسمم ا لغذائي.

وحدات القياس المختلفه:

الحجم:

ا لتر= 1000 ملي لتر , ا ملي لتر= 100 مايكروليتر

الطول:

1 متر= 100 سم , سنتمتر= 10 ملي متر , ملي متر= 1000 مايكرومتر

مايكرومتر=10^{-6} متر نانوميتر= 10^{-9} متر , انكستروم = 10^{-10} متر

بيكوميتر= 10^{-12} متر

الوزن:

كيلوغرام= 1000 غرام , غرام= 1000 ملي غرام , ملي غرام = 10^{-3} غرام

مايكروغرام= 10^{-6}غرام

الحراره : الدرجه السيليزيه c (المئويه) والفهرنهايتيه f

C=5/9 *(f-32)

F =9/5*c=32

م2: المجهر Microscope

المِجهَر(الميكروسكوب): هو جهاز لتكبير الأجسام الصغيرة التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة أو لإظهار التفاصيل الدقيقة للأشياء من أجل اكتشاف تكوينها و دراستها. ، و العلم المهتم بإستكشاف الأجسام الصغيرة أو التفاصيل الدقيقة للأشياء بواسطة هذه الأجهزة يسمي علم المجهريات. و كلمة "مجهرية" أو "مجهري" تستخدم لوصف الشيء الذي لا يمكن رؤيته إلا بمساعدة المجهر. والمجهر أحد الأجهزة الأوسع استخداماً في علم الأحياء، يستخدمه علماء الأحياء لدراسة الكائنات الحية والخلايا وأجزائها الصغيرة التي لا يمكن رؤيتها بالعين المجردة.

1-مجهر المجال المظلم Dark field microscope

يستخدم هذا النوع لدراسة العينات الحية غير المصبوغة، إما لأن الصبغ يؤثر في مكونات العينة ويفقدها وضوحها، أو لغرض دراسة الكائنات في صورتها الحية.بحيث لايصل أي ضوء للعين الا في الجسم الموجود على مسرح المجهر وتكون ارضية الشريحة معتمة تماما ويتركب هذا المجهر من نفس الأجزاء الموجودة في مجهر المجال المضيء باستثناء نوع المكثف ومن الحالات التي يستخدم فيها هذا المجهر فحص بكتريا *Spirochetes* الدقيقة جدًا، والنوع *Treponema pallidum* المسببة لمرض الـ Syphilis.

2- المجهر المتالق Fluorescence microscop

يعتمد مبدا عمله على اساس امتصاص الطاقة من قبل أي جسم يؤدي الى تحويل هذه الطاقة الى ضوء يتالق فله القدرة على امتصاص أشعة الضوء ذات الموجات القصيرة غير المرئية، ثم تطلق أشعة ضوئية ذات موجات أطول ولونًا مميزًا، وتسمى هذه الظاهرة الظاهرة الفلورسينية Fluorescence.

م.المتالق

م.فوق البنفسجيه

3-مجهر الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet microscope

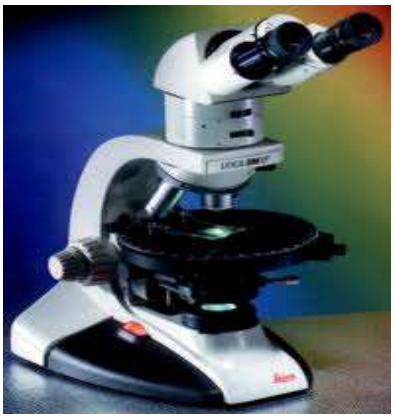
وهو مجهر تتكون أجزاؤه الرئيسية من نفس أجزاء المجهر الضوئي العادي باستثناء بعض الاختلافات مثل:

1-يستعمل فيها أشعة الضوء فوق البنفسجية القصيرة غير المرئية لإضاءة الجسم المفحوص بدلا من أشعة الضوء العادي

2-يستعمل عدسات من الكوارتز بدلا من عدسات الزجاج العادي، لأن الكوارتز لا يمتص الأشعة فوق البنفسجية عكس العدسات الزجاجية.

3-نظرا لأن هذه الأشعة غير مرئية فإن المجهر يزود بكاميرا للتصوير الفوتوغرافي تصور العينة، ومن ثم تتم دراستها. ويستعمل هذا المجهر للحصول على تكبيرات عالية مقارنة بالمجهر العادي، نظرا لقصر طول موجات الضوء المستعمل.

4-المجهر المستقطب Polarizing microscope



يستخدم المجهر المستقطب للتميز بين المواد ذات قوة انكسار مزدوجة حيث تغير اتجاه تذبذب الشعاع الضوئي عند فحصها وبعض هذا الضوء يمر من خلال الموشور المحلل مسببا اضاءة الجسم ضد ارضية معتمة ومن امثلة المواد ذات قوة انكسار مزدوجة الالياف النباتية مثل القطن والكتان والالياف الغراوية و المادة البينية للعظم والالياف العضلية المخططة وكذلك يمكن تمييز مواد ذات قوة انكسار واحدة مثل الزجاج وبلورات معينة ومعظم الخلايا الانسجة الحيوانية.

5-مجهر تباين الأطوار Phase contrast microscope : وهو مجهر ضوئي عادى مزود بمكثف خاص يعمل على التمييز بين مكونات الخلية الميكروبية المفحوصة غير المصبوغة) والتي لا يستطيع المجهر الضوئي تمييزها.

6- المجهر التشريحي Stereo "Dissecting" microscope

لهذا المجهر عدسة أو عدستان من العدسات العينية وعدسة شيئية مختلفة التكبيرات ويستعمل هذا المجهر لفحص الحيوانات والنباتات الصغيرة وأجزائها التي لا نستطيع مشاهدتها بوضوح بالعين المجردة ولا حاجه إلى عمل مقاطع رقيقه في الكائن الحي ، ويتراوح مدى تكبيره من 6 -50 مرة

7-المجهر الإلكتروني Electron microscope

يستخدم للحصول على تفاصيل دقيقة ومفيدة جدا للعينة المفحوصة، مقارنة مع ما هو متاح بالمجهر الضوئي نتيجة لاستعمال موجات إلكترونية ذات أطوال قصيرة جدا، بدلا من موجات الضوء العادي، فى إضاءة الجسم المفحوص، مما يعطى قدرا أكبر من قوة التمييز باستعمال المجهر الضوئي حيث يمكن الوصول إلى تكبيرات تزيد عن مليون مرة. إذا قمنا بتكبير الصورة الفوتوغرافية الناتجة عن المجهر الإلكتروني.

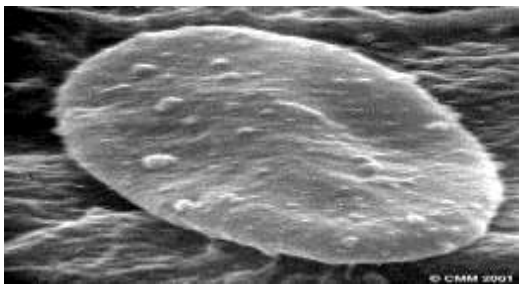
1-المجهر الالكتروني النافذ Transmission Electron

microscope(TEM) يستخدم لدراسة المحتويات الداخلية للخلية.

2- المجهر الالكتروني الماسح scanning electron microscope(SEM)

يستخدم لدراسة السطح الخارجي للخلية.

ان استعمال سيل او تيار من الالكترونات والتي لها طول موجة قصير جداً تمكن من الحصول على قدرة تمييز عالية جداً وبهذا فان المجهر الالكتروني له قدرة او قوة تمييز عالية تصل الى حوالي 10-20 انكستروم مع قوة تكبير عالية تصل الى 50 الف او اكثر. يستخدم تيار كهربائي بقوة الاف الفولتات عوضاً عن الضوء المستخدم في المجهر الضوئي ويكون طول موجة شعاع الالكترونات قصيراً جداً لذلك يستطيع تحطيم اي شئ يوضع مقابل هذه الالكترونات ولهذا لا تستخدم عدسات زجاجية بل تستخدم ملفات كهربائية مغناطيسية Electromagnetic fields تقوم مقام العدسات الزجاجية.



8- المجهر العارض Projection Microscope

كثير الاستخدام في المختبر داخل الفصول الدراسية تستخدم لإسقاط و إبراز صورة مشرقة واضحة للعينات البيولوجية على شاشة كبيرة .

9- مجهر مقلوب لزراعة الأنسجة inverted microscope

يُعتبر مجهراً ضوئياً اعتيادياً ولكنه مصمم بشكل خاص ليؤدي غرضاً خاصاً .وهو يناسب دراسة الخلايا والأنسجة المزروعة وهي ما زالت في أطباق ودوارق الزراعة. وقد قدم هذا المجهر خدمة عظيمة للمهتمين بعلوم الحياة ، إذ مكنهم من مشاهدة ومتابعة ما يحدث من تطورات وتغيرات للخلية وهي تباشر نشاطها الحيوي كالانقسام و التغذية و النمو.إن المسافة بين العدسة الشيئية والعدسة العينية في هذا المجهر تكون دائماً صغيرة في حدود (2-4) مم فقط،ولهذا يستحيل فحص الخلايا أو الأنسجة وهي مازالت في محاليلها بل يجب تثبيتها وعمل ما يُعرف بالشريحة المجهرية (Microscope slides)والتي لا يزيد سماكتها عن2مم. و يعتمد هذا المجهر على جعل الضوء اللازم لإضاءة العينة يسقط عليها من الأعلى، أما العدسة الشيئية اللازمة للتكبير والتمييز فتكون من أسفل مسرح المجهر.وبالإمكان زيادة شدة الإضاءة حسب الحاجة. ولهذا المجهر أهمية خاصة؛ إذ أصبح بإمكاننا معرفة ما يجري داخل الخلية الحية من نشاطات حيوية وبالذات الحركية منها،مما أسهم في تطور علم بيولوجيا الخلية تطوراً ملحوظاً.

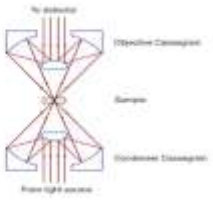
العارض

المقلوب

10- مجهر الاشعة السينية X-ray microscopy

يعتمد على الطول الموجي للضوء. وقد تم تطوير المجهر الإلكتروني منذ 1930 التي تستخدم أشعة الإلكترون بدلا من الضوء. رغم أنه أقل شيوعا، تم أيضا الأشعة السينية المجهري وضعت منذ أواخر 1940. القرار من الأشعة السينية المجهري تقع بين أن من المجهر الضوئي والمجهر الإلكتروني.

11-مجهر الاشعة تحت الحمراء Infrared microscopy : مجهر يستخدم الأشعة تحت الحمراء , ويستخدم في معرفة مدى تاثر الاورام والخلايا السرطانية بالاشعة تحت الحمراء.



12-المجهر الضوئي : مجهر المجال المضيء Bright field microscope

فى هذا النوع من المجاهر الحقل الميكروسكوبي مضيئًا إضاءة كاملة، وبقية الأجسام المفحوصة تبدو داكنة أو مصبوغة. ويصل أقصى تكبير إلى 1000مرة يعتبر المجهر الضوئي من أكثر الأدوات استخداما والتي لاغنى عنها فى مختبرات الميكروبيولوجي، وتوجد عدة أنواع منه، لكل نوع منها خصائص تمكنه من الوصول لتكبيرات معينة، ولدراسة أجزاء خاصة أو أنواع خاصة فى الميكروبات، ومن هذه الأنواع فمجهر الحقل المضيء هو عبارة عن مجهر مركب Compound ويتكون من نوعين من العدسات: العدسة العينية Ocular Lens، والعدسة الشيئية Objective Lens ويستخدم أشعة الضوء المرئي كمصدر لإضاءة الجسم المفحوص، ويمكننا بواسطة هذا النوع من المجاهر دراسة كائنات متناهية الصغر إضافة إلى دراسة بعض تفاصيلها الدقيقة أحيانًا. ونحصل على هذه التكبيرات عندما تمر أشعة الضوء (من مصدر الإضاءة) خلال المكثف Condenser الذي يوجهها بدوره لكي تسقط على الجسم المفحوص. وتمر الأشعة من خلال الجسم المفحوص لكي تدخل إلى العدسة الشيئية والتي تكبر العينة ثم تعمل العدسة العينية مرة أخرى على مضاعفة هذا التكبير لكي نصل إلى التكبير النهائي.

يحسب التكبير النهائي للمجهر بضرب: تكبير (قوة) العدسة العينية × تكبير (قوة) العدسة الشيئية. وتتكون أغلب المجاهر المستعملة فى مختبرات الميكروبيولوجي من ثلاثة عدسات شيئيه هي 10، 40، 100. اما العدسة العينية فتبلغ قوتها 10 مرات. لذلك فللحصول على التكبير النهائي نضرب 10 أو 40 أو 100 × 10 فيكون تكبير العدسة الصغرى 100 والكبرى 400 والزيتية 1000.

يتركب الميكروسكوب الضوئي من عدة أجزاء ميكانيكية وأخرى ضوئية كما يلي:

أولا: الأجزاء الميكانيكية:

- القاعدة Base: وهو الجزء الذي يرتكز عليه الجهاز ويأخذ أشكال مختلفة حسب الشركة المنتجة.
- الذراع Arm: هو الجزء الذي يحمل أنبوبة الميكروسكوب ويتصل بالمسرح, والضوابط.
- المسرح Stage: هو جزء قابل للحركة في أكثر من اتجاه عن طريق ضوابط جانبية, وتثبت عليه الشريحة الميكروسكوبية عن طريق الماسك Holder.
- الضوابط Adjustments وهى نوعين:
  - ضابط تقريبي Coarse Adjustment: يستعمل لإظهار الصورة.
  - ضابط تقريبي: Fin Adjustment : يستعمل لضبط البعد البؤري بدقة.

ثانيا: الأجزاء البصرية:

- الجزء العيني Eye piece للميكروسكوب, يتكون من:

1. العدسة العينية Ocular lens : وهى مثبتة في اعلي أنبوبة الميكروسكوب ،يتراوح تكبيرها من 6-10 مرات,
2. الجزء الأنفي Nose piece للميكروسكوب, يتكون من:

العدسات الشيئية Objective lenses : وهى مثبته في الجزء السفلى من أنبوبة الميكروسكوب بالقرب من المسرح, على قرص دائري متحرك.

ويوجد ثلاثة أنواع من العدسات الشيئية:

- العدسة الصغرى Low power قوة تكبيرها 4-10x .
- العدسة الكبرى High power قوة تكبيرها 40x .

- العدسة الزيتية Oil lens: قوة تكبيرها 100x.(تستعمل لفحص البكتيريا) مع إضافة زيت يسمى السيدر Immersion oil , والغرض الأساسي من استعمال نقطة الزيت هو زيادة الإضاءة.

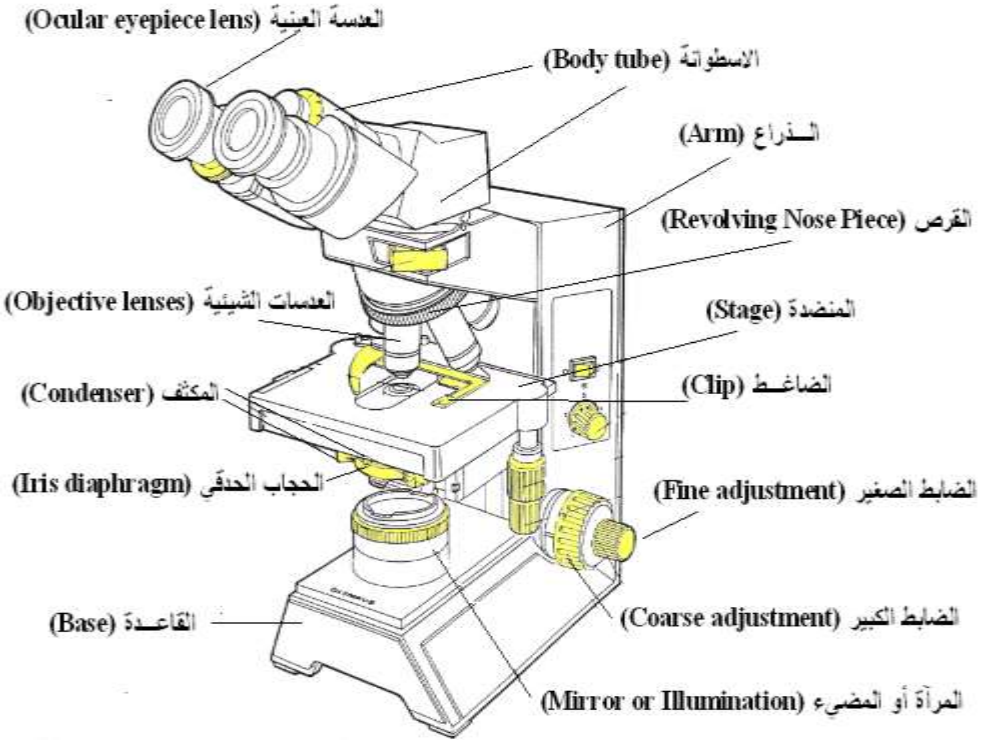
3. المكثف Condenser : يوجد المكثف أسفل المسرح.

يتركب من مجموعة من العدسات مرتبة بطريقة خاصة, تعمل على تجميع الأشعة الضوئية.

يمكن التحكم فيه بواسطة ضابط جانبي, لإدخال اكبر كمية من الإضاءة على العينة أو لتقليل كمية الإضاءة.فكلما زاد تكبير العدسة الشيئية, نحتاج كمية إضاءة اكبر فيضبط على أعلى أوضاعه.

4- المرآة Mirror: توجد أسفل المكثف, تعمل على توجيه الإضاءة إلى المكثف.

5- مصدر الإضاءة Light source : مصباح لإصدار الضوء, ويمكن التحكم في شدته.



الحفاظ على المجهر:

- لا تلمس العدسات بأصابعك حتى لا تعلوها سحابة تمنع وضوح الرؤية. وإذا اتسخت امسحها برفق بالورق الخاص بتنظيف العدسات.
- لا تترك الشريحة على المسرح بعد الانتهاء من فحصها.
- امسح الزيت من على العدسة الزيتية بعد الاستعمال بواسطة الورق الخاص بتنظيف العدسات, إذا جف الزيت استخدم الورق المبلل قليلا بالزيلول, مع مراعاة عدم الإكثار منه لأنه قد يتسبب بإذابة المواد اللاصقة للعدسات.
- يجب الاحتفاظ بالمسرح نظيفا وجافا على الدوام.
- احمل المجهر بعناية عند نقله من مكان لآخر, ضع إحدى يديك أسفل القاعدة وباليد الأخرى امسك ذراع المجهر.
- عند عدم استعمال المجهر, احتفظ به مغطى.
- طريقة فحص الغشاء باستعمال العدسة الزيتية:

1-توضع الشريحة على مسرح الميكروسكوب.
2- يضبط الضوء بالاستعانة بالعدسة الشيئية الصغرى والمكثف حتى يشاهد المجال الميكروسكوبي ومنطقة الغشاء مضاء إضاءة عالية ومتجانسة.
3-توضع نقطة زيت سيدر oilعلى الغشاء ثم تحرك القطعة الأنفية لوضع العدسة الزيتية في وضع الاستعمال ويدار الضابط الكبير حتى تنغمس العدسة في نقطة الزيت وتلامس سطح الشريحة ، يجب أن لا يدار الضابط بسرعة حتى لا تنكسر الشريحة . ونقوم بهذه الخطوة ونحن نراقب الشريحة والعدسة الزيتية من الخارج.
4-ننظر من خلال العدسة العينية ونحرك الضابط الدقيق لرفع أنبوبة الميكروسكوب إلى أعلى حتى نرى الخلايا البكتيرية بوضوح

مقارنة بين المجهر الالكتروني والضوئي

	المجهر الالكتروني	المجهر الضوئي
1	لا تستعمل عدسات زجاجية بل عدسات مغناطيسية او ملفات مغناطيسية.	تستعمل عدسات زجاجية
2	يحتوي على انبوبة مفرغة من الهواء حيث ان الالكترونات لا تستطيع السير في الهواء	يوجد في انبوبة المجهر هواء
3	يكون طول الموجة قصيرا جدا	يكون طول الموجة 400 ملي مايكرون.
4	قوة التمييز عالية جدا 10-20	يكون قوة تمييز 2و0 مايكرون
5	يكون سمك العينة حوالي 300	يكون سم العينة 4 مايكرون او اكثر
6	يجب ان تكون العينة المراد فحصها جافة (خلايا ميتة)	تكون العينة المراد فحصها جافة (ميتة) او غير جافة (خلايا حية)

مقارنة بين الأنواع المختلفة من المجاهر

نوع المجهر	قوة التكبير	مظهر العينة	الأستخدام
الحقل المضيء	1000- 2000	مصبوغة أو غير مصبوغة ، يتم صبغ الخلايا البكتيرية ويظهر لون الصبغ .	مشاهدة شكل البكتيريا، الفطريات، الأعفان، الطحالب، البروتوزوا.
الحقل المظلم	1000- 2000	عادة تكون العينة غير مصبوغة وتظهر مضيئة في حقل مظلم .	مشاهدة الكائنات الحية الدقيقة على سبيل المثال : البكتيريا.
الفلورسينتي	1000-2000	مناطق ملونة وساطعة للصبغة الفلوريسينية.	تقنيات تشخيصية تفيد في تعريف الكائنات الحية الدقيقة.
متابين الأطوار	1000-2000	درجات مختلفة من المناطق الداكنة.	لفحص تراكيب خلايا الكائنات الحية.
الألكتروني	10^5	مناطق ساطعة على الشاشة الفلورسينية.	فحص عينات صغيرة جداً ، مثل الفيروس ، والتراكيب الدقيقة للخلايا.

توجد مبادئ اساسية لعمل المجهر الضوئي منها ما يلي:

1- التباين Contrast .

2- قوة التكبير Magnification power .

3- قوة أو قدرة التمييزResolution power .

*التباين Contrast

من اجل ملاحظة الخلايا بواسطة المجهر يجب ان تحدث ظاهرة تدعى التباين أو الاختلاف في شدة الضوء ويقاس التباين حسب المعادلة:

$$\text{Contrast} = \frac{\text{Background light intensity} - \text{object light intensity}}{\text{Background light intensity}}$$

- اذا كان contrast يساوي صفر فلا يمكن رؤية الجسم.
- اذا كان contrast يساوي كمية موجبة يمكن رؤية الجسم.
- اذا كان contrast يساوي كمية سالبة فلا نستطيع رؤية الجسم لأنه معتم.

*قوة التكبير magnification power

هي خاصية زيادة سطح الجسم او تكبير الجسم وتختلف حسب نوعية المجهر وتتراوح من10-1000 مرة للمجهر الضوئي و 10-50 الف واكثر للمجهر الالكتروني . تقاس قوة تكبير المجهر الضوئي حسب المعادلة :

Magnification power (X) = Magnification power of objective lens × Magnification of eye lens

ملاحظة :

$1\ m = 1000\ mm$

$1mm = 1000\ micron\ (\mu)$

$1\ \mu = 1000\ m\mu = 1000\ nanometer\ (nm) = 10^{-9}$

$1\ m\mu(nm) = 10\ Angstrom\ (A^{\circ})$

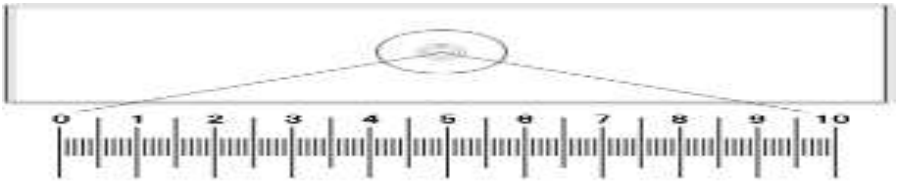
$1\ A^{\circ} = 10^{-8}\ cm = 10^{-10}\ m$

القياسات المجهرية Microscopic Measurements

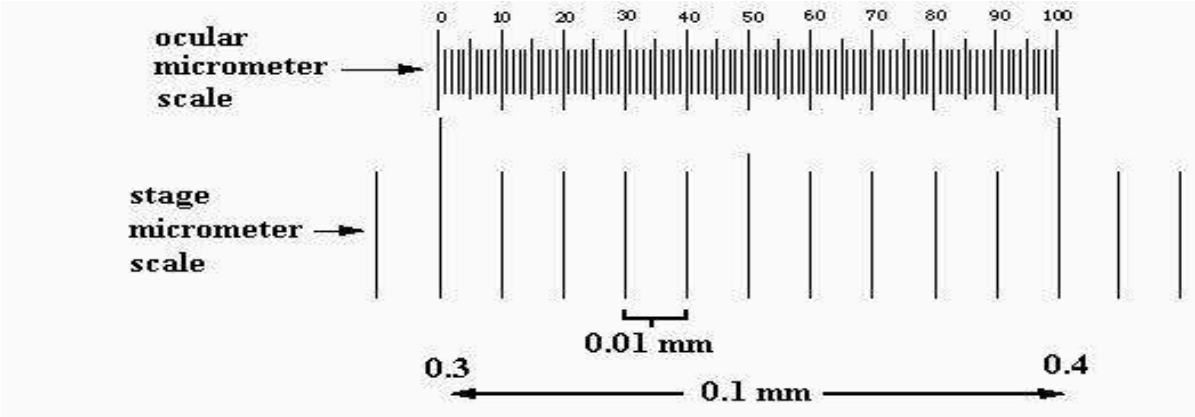
ان قياس اطوال أو اقطار الخلايا بالمجهر يعتمد على توفر الاتي:

1- الشريحة الزجاجية stage micrometer وهي سلايد(شريحة) زجاجية تحتوي على مقياس يعادل 10 ملم ومقسم إلى 100 قسم ثانوي لذا كل تدريجة (قسم ثانوي) تساوي10mm/100 = 0.1 ملم(شكل 2).

شكل 2: الشريحة الزجاجية stage micrometer



2- العدسة العينية ocular micrometer وهي عدسة عينية تحتوي على مقياس خاص scale مقسم إلى عدد من الوحدات الثانوية وعادة تكون اصغر من تدريجات شريحة المنصةstage micrometer .وتعتمد عدد تدريجات العدسة العينية على قوة التكبير وعادة كل وحدة من stage micrometer تساوي 10 وحدات من ocular micrometer.



ولغرض قياس أطوال الخلايا يجب تطبيق الخطوات التالية:

1- معايرة العدسة العينية وتتم كالاتي:

أ- توضع stage micrometer على منصة المجهر stage.

ب - توضع العدسة العينية ocular micrometer في موضعها داخل العدسة العينية للمجهر eye lens.

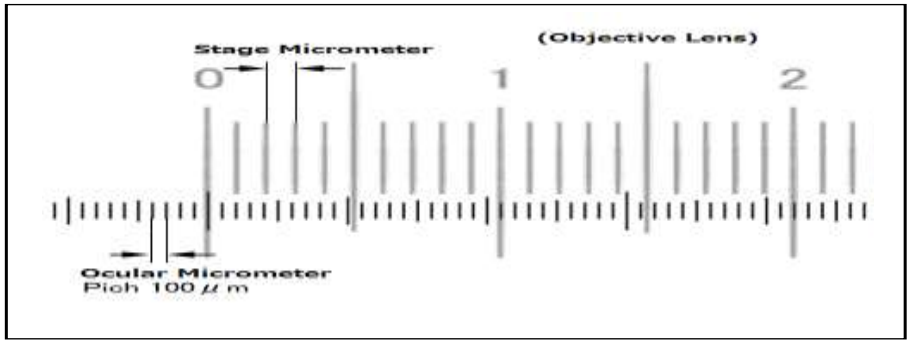
ج- يضبط المقياسين بحيث يكون احد القياسين فوق الآخر من بداية المقياس بحيث يتم تطابق تدريجات ocular micrometer مع تدريجات stage micrometer (على الصفر) لقوة تكبير معينة.

د- يتم حساب تدريجات العدسة العينية لاستخراج مكافئ ال ocular (Ocular equivalent)

حسب قوة التكبير من خلال المعادلة الآتية:

$$\text{Ocular micrometer divisions} = \frac{\text{No.of divisions of stage micrometer}}{\text{No.of divisions of ocular micrometer}} \times 100$$

يختلف المكافيء حسب قوى التكبير المختلفة فمثلا مكافيء قوة تكبير العدسة الشيئية 4 =25 من خلال تطبيق المعادلة السابقة.



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.

<u>المواد والاجهزة المستعملة:</u>

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 و ocular micrometer .

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

<u>مثال :</u>

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

$=25\times5$

$=125$ µ $=125000$nm

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

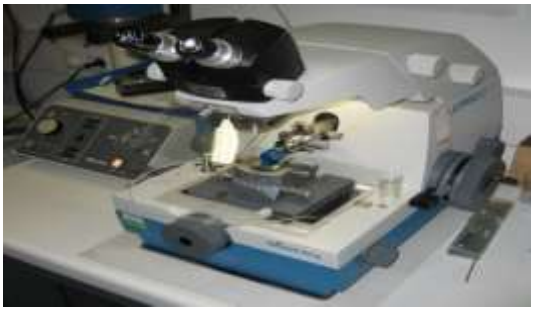
6- **الميكروتوم الفوقيUltramicrotome :** وهو مشراح خاص ودقيق جدا لقطع شرائح العينة لتهيئتها للفحص بواسطة المجهر الالكتروني . ويتراوح سمك المقاطع من 150-300 انجستروم (ويساوي 1000/1 من الميكرون) . وهذه النماذج مثبتة بطريقة خاصة ومطمورة في انواع خاصة من الاصباغ .يستخدم لعمل قطاعات رقيقة جدا خاصة بالمجهر 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 ياستخدام 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 (-45م), 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 -40ْم . ويلاحظ أن درجات الحرارة تختلف بإختلاف نوع النسيج فمثلا يفضل تحضير قطاعات ثلجية في **عينات غير مثبته** عند درجة حرارة -15ْم لكل من الطحال والكلية والخصية والكبد والدماغ والعقد اللمفاوية .في حين أن درجة الحرارة -25ْم تناسب كلا من عينات الأنسجة العضلية والجلد والغدد والعظم الهش.

أما العينات المثبته فإنه يسهل تحضير قطاعات ثلجية منها عند درجة حرارة من -10ْم إلى -12ْم , 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 دائوية 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.

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 :

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

2- 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 تللك 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 .

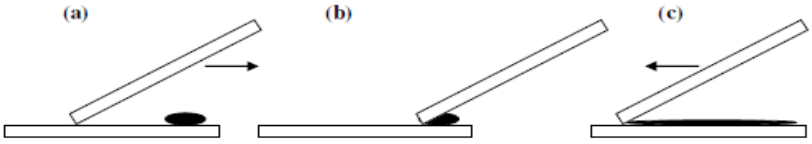


Figure 10.4. The steps for preparation of a thin blood smear

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 .

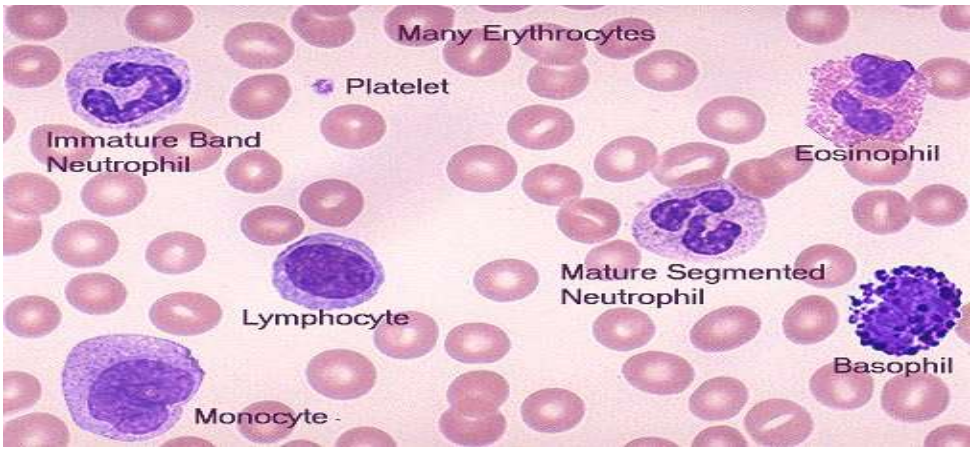
ب- وجود العضيات .

ت- وجود الحبيبات الافرازية .

ث- نوع الحبيبات الافرازية .

ج- وظائف كل نوع من خلايا الدم .

النتائج :



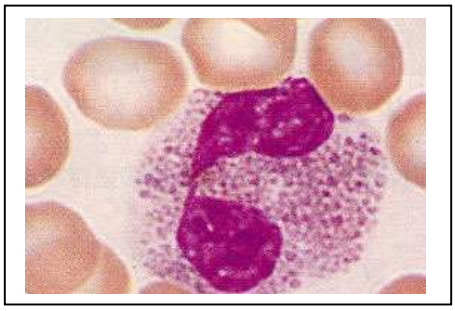
مسحة دم Blood smear

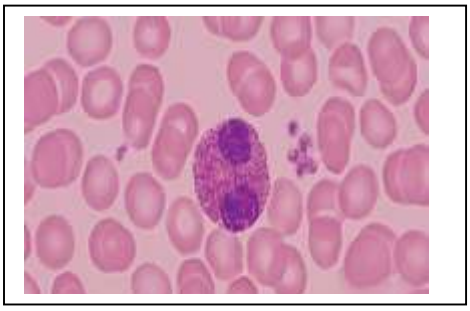
1- تظهر الكريات الحمراء(RBCs) Red blood cells or Erythrocytes بلون أحمر باهت والصفائح الدموية Platelets (thrombocytes) زرقاء الى ارجوانية .

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

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

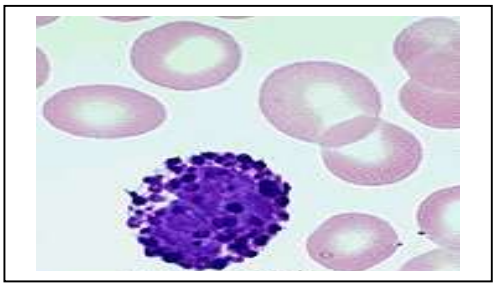
1- خلايا الدم البيضاء الحامضية Eosinophil or Acidophil :تظهر بنوى ارجوانية ثنائية الفصوص وحبيبات سايتوبلازمية برتقالية الى حمراء .



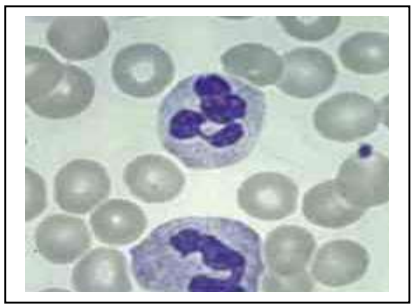


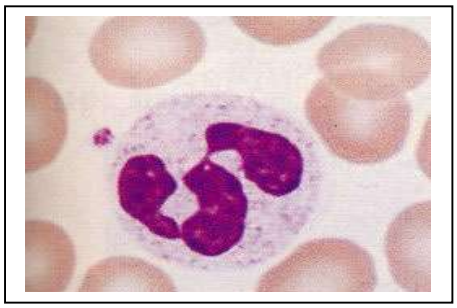
خلايا الدم البيضاء الحامضية Eosinophil or Acidophil

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 .

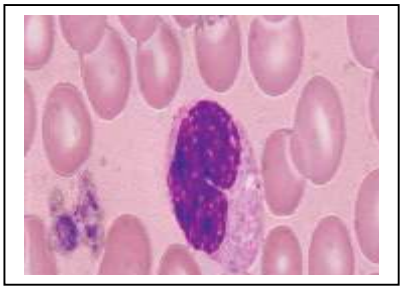


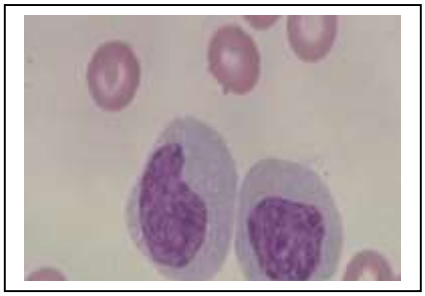


خلايا الدم البيضاء المتعادلة Neutrophil

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

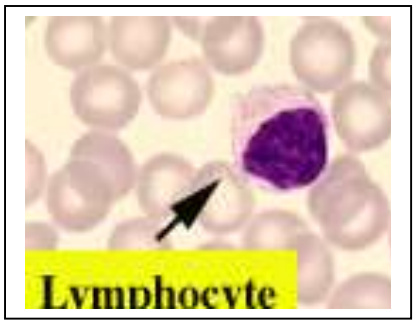
1- الخلايا وحيدة النواة Monocyte : تظهر حاوية على نوى على شكل حدوة الحصان (U-Shape) وسايتوبلازم قليل .





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.

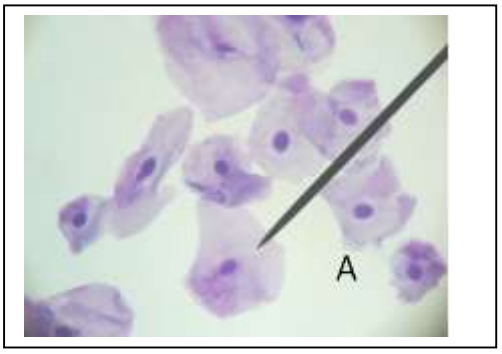
6- ارسم الخلايا الظهارية المختلفة بالتفصيل ووضح الفروقات بينها .

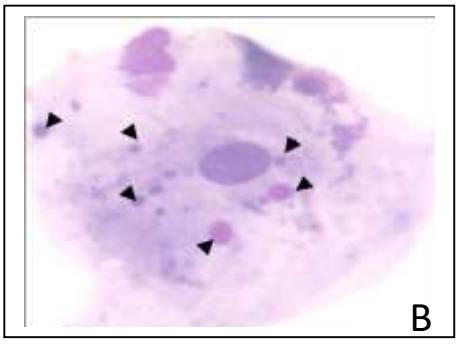
من الممكن تصبيغ بطريقة اخرى تشمل استخدام صبغة كمزا Giemsa stain لمدة 20 دقائق بعد تثبيتها بالميثانول لمدة 10 دقائق ثم تغسل بمحلول منظم(pH 6.8) ثم تجفف بالهواء .

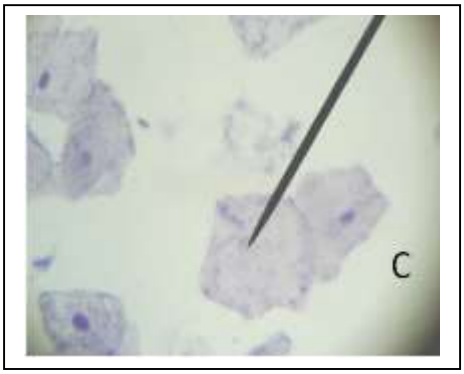
النتائج:

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.

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 العينةSampling(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- **Alcohol 10%** : 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 .

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

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.

المثبت Fixative

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 - طريقة تحضير المحلول الفسلجي الخاص بالثدييات :

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 - 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 الغسلWashing

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 (ethyl alchohol)ethanol 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 الترويقClearing:

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) للسللويدين(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 المستديم 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

سحب الدم Phlebotomy

في تحضير سحبة الدم اول الخطوات هي وخز الاصبع للحصول على قطرات دم ليتم وضعها على الشريحة ثم سحبها هذا في حالة عينة واحدة او صغيرة , اما في حالة العينة الكبيرة او عدة عينات لغرض عمل سحبة دم او نحتاج دم لعدة تحضيرات اخرى فان القطرة من وخز الاصبع او ماتسمى سحب الدم الشعيري غير كافية وكذلك تتعرض للتجلط , لذا يجب سحب دم من مصدر اخر وهو الوريد , ويسمى سحب الدم بPhlebotomy وهناك خطوات لكيفية وخز الاصبع ولكيفية سحب الدم من الوريد.

اولا : سحب الدم من الوريد:

المستلزمات المطلوبة لسحب الدم من الوريد:

- ☑ كرسي سحب الدم Phlebotomy chair : يحتوي على مساند في كلا الجانبين لتسهيل سحب الدم من كلا اليدين. هذا الكرسي يسهل عملية سحب الدم و يساعد على عدم سقوط المريض في حالة إغماءه.
- ☑ كحول طبي Alcohol بتركيز 70 %
- ☑ قطن طبي Cotton أو شاش جاف Gauze مربعات حجم (X2 inch2)
- ☑ قفازات الطبية Gloves : يجب أن تكون بمقاسات مختلفة لتلائم حجم يد كل العاملين. نظراً لوجود بعض الأشخاص الذين لديهم حساسية من مادة اللاتكس Latex الموجودة في المطاط في القفازات، يفضل استعمال قفازات خالية من مادة اللاتكس (Latex free gloves)
- ☑ الرباط الضاغط Tourniquet : يجب تنظيفه دورياً بواسطة الكحول و هناك أنواع منه تستعمل لمرة واحدة.
- ☑ إبرة مناسبة Needle تلائم حجم الوريد و حجم الدم المطلوب سحبه، يقاس قطر الإبرة بالعيار = Gauge G

و يتم إختيار حجم الإبرة كالتالي:

- يتم إختيار الإبرة عيار رقم 21 G21)) و التي يبلغ قطرها 0.8 ملليمتر للبالغين.
- يتم إختيار الإبرة رقم 23 G23)) و التي يبلغ قطرها حوالي 0.6 ملليمتر للأطفال و كذلك للأوردة الرفيعة والصعبة في البالغين مثل الأوردة الموجودة في ظهر اليد.
- يتم إختيار الإبرة رقم 22 G22)) و التي يبلغ قطرها 0.7 ملليمتر للأطفال الأكبر سناً أو للأوردة الرفيعة والصعبة.
- لاحظ أنه كلما زاد قطر الإبرة قل رقمها أي أن الإبرة رقم 25 هي أصغر إبرة و تستخدم للحقن العضلية بينما الحقنة رقم 16 هي أكبر حقنة و تستخدم لسحب الدم من المتبرعين بالدم.
- إستخدام حقنة أرفع من اللازم قد يؤدي إلى تكسر الدم Hemolysis
- الإبر عيار 19G و 20G لا تستخدم لسحب الدم.
- الإبر عيار 16G - 18G تستخدم لسحب الدم من المتبرعين بالدم.

☑ محقنة بلاستيكية تستعمل لمرة واحدة Disposable syringe ذات حجم مناسب لحجم الدم المطلوب لإجراء التحاليل، 2.5 مل أو 5 مل أو 10 مل . تتكون المحقنة من إسطوانة بلاستيكية مدرجة و يوجد بداخلها مكبس يستخدم لسحب الدم.

☑ شريط طبي لاصق Plaster

☑ وعاء خاص بالتخلص من الإبر المستعملة غير قابل للثقب.

☑ أنابيب متعددة الأنواع حسب نوع التحليل المطلوب.

☑ خطاط خاص بالكتابة على الأنابيب Permanent marker لكتابة اسم و رقم و بيانات المريض.

خطوات سحب الدم من الوريد:

1. قم بتحية المريض و قدم نفسك إليه و طمأنه

غسل اليدين و إرتداء القفازات :

يجب غسل اليدين أولاً ثم يتم إرتداء قفازات طبية Gloves لتجنب خطر العدوى.

يتم تغيير القفازات بين كل مريض و الآخر.

يجب غسل اليدين بعد نزع القفازات بعد السحب من آخر مريض.

2- تأكد من هوية المريض على نموذج طلب التحليل

غسل اليدين و إرتداء القفازات :

يجب غسل اليدين أولاً ثم يتم إرتداء قفازات طبية Gloves لتجنب خطر العدوى.

يتم تغيير القفازات بين كل مريض و الآخر.

يجب غسل اليدين بعد نزع القفازات بعد السحب من آخر مريض.

وضعية المريض:

1) إذا كان المريض يستطيع المشي: يطلب منه أن يجلس على مقعد مريح مخصص لسحب الدم . يضع المريض يده على مسند للكرسي أو طاولة أو مكتب بحيث تكون يده مستقيمة من الكتف إلى المعصم وراحة الكف إلى الأعلى كما في الشكل التالي. يجب ألا يكون مفصل الكوع منثني. يمنع سحب الدم لأي مريض وهو واقف مهما كانت الأسباب خوفاً من حدوث إغماء.

Fig. 9.8: Taking blood from a patient in the laboratory

2) إذا كان المريض في السرير : أطلب من المريض أن يتحرك إلى حافة السرير حتى يسهل أخذ عينة من ذراعه و يطلب منه مد يده بحيث تكون اليد مستقيمة و راحة الكف إلى الأعلى كما في الشكل التالي:

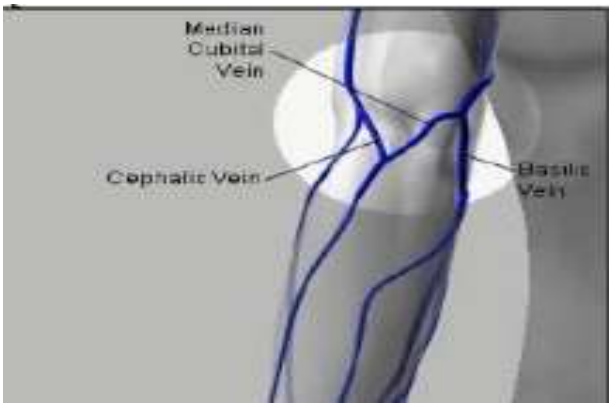
4. تحضير جميع مستلزمات السحب:

على طاولة أو مكتب يجب التأكد من توفر جميع المستلزمات التي نحتاجها لسحب الدم قبل بدء السحب مثل:

- الكحول تركيز 70% أو مسحات الكحول Alcohol swabs
- قطع من الشاش الجاف أو كرات من القطن.
- الرباط الضاغط.
- أنابيب التحليل المناسبة حسب نوع التحاليل المطلوبة للمريض.
- المحقنة والإبرة.
- يتم معرفة التحاليل المطلوبة لإختيار الأنابيب المناسبة و كذلك حجم الحقنة المناسب لحجم الدم الذي سيتم سحبه .
- الشريط الطبي اللاصق.

5. البحث عن وريد مناسب للسحب :

المكان الأفضل: أفضل مكان للسحب من الوريد هو في مقدمة المرفق (الكوع) حيث أن الأوردة في هذا المكان كبيرة و قريبة من السطح ولا تتحرك كثيراً و يفضل السحب من الأوردة التي تشكل حرف Y



اماكن اخرى بديله: احيانا يكون من الصعب إيجاد وريد مناسب في مقدمه المرفق، عندها يتم فحص مقدمه المرفق في اليد الأخرى للبحث عن وريد مناسب و إذا لم نجد فيمكن عندها السحب من الأوردة الموجودة في مقدمة الذراع أو خلف مفصل الرسغ أو في ظهر الكف إلا أن هذه المناطق مؤلمة أكثر و أكثر عرضة لتكوين تجمع دموي تحت الجلد

Hematoma

طريقة اختيار الوريد:

- يتم اختيار الوريد المناسب عن طريق لمسه و جسه بأصبع السبابة **Index finger** عدة مرات حيث يتم معرفة مكانه وعمقه و اتجاهه وفي حالة عدم وضوح الأوردة يتم توضيحها أكثر بإحدى الوسائل التالية:
  - الطرق على مكان السحب بأصبعين عدة مرات.
  - عمل تدليك لأوردة اليد من الرسغ في اتجاه الكوع.
  - وضع قطعة شاش أو قماش بها ماء دافئ لمدة 5 دقائق.
  - قبض وبسط أصابع اليد عدة مرات.
- إذا لم تجد وريد مناسب و واضح، لا تحاول سحب الدم إعتماداً على الحظ و إنما حاول البحث أكثر عن وريد مناسب في مكان آخر، و يمكن الاستعانة بزميل لديه خبرة أكبر في البحث عن وريد مناسب.
- يجب تجنب السحب من الأماكن التالية:
  - أي مكان به تجمع دموي **Hematoma**
  - أي مكان به احمرار أو التهاب
  - أي مكان به ندبة قديمة **scar** ناتجة عن حرق أو جرح أو جراحة سابقة.
  - من الذراع في نفس الجهة التي تم منها إستئصال الثدي لإحتمال وجود إحتقان بالأوعية الليمفاوية.
  - من مكان ربط الشريان بالوريد **Fistula** التي يتم عملها للمرضى الذين يجرى لهم عملية غسيل كلوي.
  - يجب تجنب السحب قدر الإمكان من نفس اليد التي يتم فيها تغذية المريض عن طريق الوريد بأي نوع من السوائل حيث أن ذلك قد يؤدى إلى نتائج تحاليل خاطئة لاحتواء هذه المحاليل على بعض المواد مثل

الجلوكوز والصوديوم و البوتاسيوم و إنما يجب السحب من اليد الأخرى إن أمكن

.

6. لف الرباط الضاغط:

- الغرض من لف الرباط الضاغط هو قفل تدفق الدم عبر الوريد مما يؤدي إلى إحتقان الوريد و هذا يجعل الوريد أكثر وضوحاً. قد يكون الوريد واضح حتى بدون رباط ضاغط, عندها لاداعي لهذه الخطوة.
- يجب عدم الضغط بشدة أكثر من اللازم حتى لا يتوقف تدفق الدم عبر الشرايين .
- يتم لف الرباط المطاطي الضاغط Tourniquet فوق مكان السحب بمسافة حوالي 7 – 10 سم لجعل الأوردة أكثر بروزاً و وضوحاً.
- يتم ربط الرباط الضاغط بطريقة معينة لضمان سهولة فكه بعد الانتهاء من السحب.
- يمكن استعمال جهاز قياس ضغط الدم بدلاً من الرباط الضاغط وذلك برفع الضغط فيه إلى قراءة الضغط الانبساطي للمريض Diastolic Blood pressure ، هذا الضغط يسمح بدخول الدم عبر الشرايين و لا يسمح بخروج الدم عبر الأوردة وبالتالي تبقى الأوردة ممتلئة بالدم وعند الانتهاء من السحب يتم إنزال الضغط إلى النهاية قبل سحب الإبرة من المريض.
- أطلب من المريض فتح و قفل يده عدة مرات حتى يتجمع الدم في الوريد و تظهر الأوردة بوضوح.
- إبحث عن وريد مناسب و تعرف على عمقه و إتجاهه و قم بحفظ مكانه بالضبط بالمقارنة بأي شيء موجود في المكان مثل وريد سطحي أو نمش أو خال أو طوية جلد.
- بعد اختيار الوريد المناسب و معرفة عمق و اتجاه الوريد فك الرباط الضاغط و أطلب من المريض فتح قبضة يده وعقم مكان السحب ثم أعد لف الرباط الضاغط من جديد.

تعقيم مكان السحب:

- قم بتعقيم منطقة السحب بكحول تركيزه 70 % بعمل دوائر تبدأ من المركز وتتجه إلى الخارج.
- التعقيم مهم جداً و بشكل خاص عند سحب عينة لعمل مزرعة للدم Blood culture ففي حالة عدم التعقيم الجيد قد تتلوث العينة بالبكتيريا الموجودة على سطح الجلد.
- يجب ترك الكحول حتى يجف بالهواء لمدة حوالي 30 – 60 ثانية أو يتم تجفيفه بقطعة قطن أو شاش جاف و معقم ، إذا لم تنتظر حتى يجف الكحول فإن ذلك يؤدي إلى تحلل للخلايا الحمراء Hemolysis الذي يؤثر على دقة النتائج كما أنه يسبب ألم أكثر للمريض أثناء وخز الإبرة.
- تجنب لمس مكان الوخز بعد تعقيمه وفي حالة الاضطرار لذلك يجب تعقيم المكان الذي ستلمس به مكان الوخز فوق القفاز بالكحول أولاً و لكن يفضل تعقيم مكان الوخز مرة أخرى.
- عند سحب الدم لمعرفة تركيز الكحول في الدم أو اشتباه وجود سموم في الدم، يجب عدم تعقيم منطقة السحب بالكحول خوفاً من تلوث عينة الدم بالكحول مما يؤثر على دقة النتيجة و يتم بدلاً من ذلك استعمال مواد تعقيم لا تحتوي على كحول مثل Betadine أو Povidone - Iodine

- بعد إعادة لف الرباط الضاغط ، أطلب من المريض قبض كفه و لا تطلب منه قبض و بسط كف اليد بشكل متكرر لأن هذا يؤثر على دقة بعض النتائج و خصوصاً يؤدي إلى زيادة تركيز البوتاسيوم في الدم .

غرز الإبرة والبدء في سحب عينة الدم:

-

يمكن جس مكان الوريد بعد تعقيم مكان الوخز و بعد وضع الرباط الضاغط لإعادة التأكد من مكان الوريد بواسطة أصبع السبابة في اليد الغير مسيطرة (اليد اليسرى لمن يستعمل اليد اليمنى و اليد اليمنى لمن يستعمل اليد اليسرى) و لكن يجب تعقيم مكان غرز الإبرة بعد ذلك.

إفتح المحقنة والإبرة أمام المريض حتى يطمئن نفسياً أن المواد المستعملة نظيفة ومعقمة ولم تستعمل سابقاً.
ثبت الإبرة على المحقنة وتأكد من عمل المحقنة بتحريك المكبس عدة مرات وهذا يساعد أيضاً على سهولة حركة المكبس أثناء سحب الدم.
ثبت الوريد بواسطة إصبع الإبهام أو الإبهام مع السبابة في اليد الغير مسيطرة عن طريق جذب الجلد بالأصابع من تحت مكان الوخز أو من تحت وفوق حتى لا يتحرك الوريد من مكانه أثناء السحب.
باستعمال اليد المسيطرة The dominant hand ثبت إصبع السبابة على قاعدة الإبرة
إغرز الإبرة بزاوية حادة (حوالي 15 درجة) و في نفس إتجاه سريان الدم في الوريد على أن تكون فتحة سن الإبرة للأعلى حتى لا يحدث تجمع للدم تحت الجلد و يجب كذلك أن تكون الأرقام على الحقنة من أعلى حتى نعرف كمية الدم المسحوب. غرز الإبرة يجب أن يكون بنعومة و سرعة في نفس الوقت للتقليل من الألم. عندما يكون الوريد عميق قد نضطر لغرز الإبرة بزاوية أعمق قد تصل إلى 30 درجة.
عند غرز الإبرة تخترق طبقات الجلد أولاً فنحس ببعض المقاومة و عند دخول الإبرة داخل الوريد نحس بنقص في مقاومة حركة الإبرة ونرى أول قطرة من الدم في الجزء البلاستيكي في قاعدة الإبرة و ندفع بالإبرة لمسافة 1 – 1.5 سنتيمتر في إتجاه الوريد ثم نبدأ بسحب الدم باليد الأخرى مع تثبيت الإبرة جيداً.

في حالة عدم خروج دم يتم إتباع ما يلي:

- إذا لم تلاحظ تدفق للدم إلى المحقنة قم بتغيير وضع الإبرة، فإذا كانت الإبرة بعيدة عن مكان الوريد أو قد إخترقت الوريد ثم خرجت من الجدار الآخر للوريد يتم سحب الإبرة إلى مستوى الجلد و لكن ليس خارج الجلد و يتم جس الوريد للتأكد من موضعه ثم يتم إعادة توجيهها إلى الوريد بشكل صحيح. و إذا كانت الإبرة لم تخترق الوريد بعد، قم بتقديم الإبرة أكثر باتجاه الوريد. قم بتدوير الإبرة نصف دائرة.

- إذا لم ينجح هذا يجب عدم محاولة تحريك الإبرة بشكل عشوائي في كل مكان للبحث عن الوريد حيث أن هذا قد يؤدي إلى إصابة أعصاب أو شرايين بالمنطقة و إنما يتم فك الرباط الضاغط و يتم سحب الإبرة و يتم إعادة خطوات السحب مرة أخرى في اليد الأخرى.
- فك الرباط الضاغط ، حيث إنه قد يكون تم ربطه بقوة أكثر من اللازم مما منع تدفق الدم بالكامل.

- 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 ببطء 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 ببطء 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

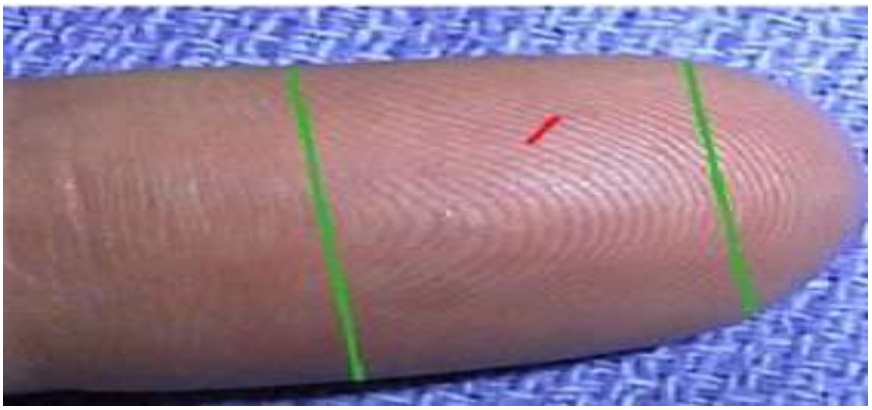
1. في الأطفال حديثي الولادة أو الأطفال الذين يبلغ عمرهم أقل من سنة الذين يصعب إيجاد وريد لديهم ليتم السحب منه وبالتالي يتم إستعمال كعب القدم.
2. عند طلب عمل بعض التحاليل التي تحتاج إلى قطرات دم قليلة من الدم مثل الهيموجلوبين و عدد كرات الدم البيضاء والحمراء والصفائح أو تعداد الدم الكامل CBC أو عمل فصيلة 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 وانابيب 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)