الفصل الثاني: طرق دراسة الخلية
الحصة التوجيهية رقم 2: تقنيات تحضير المقاطع النسيجية

1- تحضير المقاطع للملاحظة بالمجهر الضوئي [شكل 1]

يتم تحضير المقاطع الرقيقة في عدة خطوات:

أ) أخذ العينة (Prélèvement)

- يجب أخذ العينة من العضو بعناية لتجنب تمزق خلايا الأنسجة.
- بمجرد الحصول على هذه العينة، يجب غمرها مباشرة في حجم كبير من سائل التثبيت لمنع التحلل الذاتي للخلايا.

ب) التثبيت (Fixation)

- هو قتل الخلايا بفعل عوامل كيميائية أو فيزيائية مع الإحتفاظ ببنيتها التي كانت عليها وهي حية.
- يمكن أن يتم عن طريق سائل التثبيت أو عن طريق التجميد. سوائل التثبيت الأكثر استعمالا هي الفورمول و سائل بوين Bouin (خليط من الفورمول وحمض البيكريك).
- تختلف مدة التثبيت وحجم المثبت المستخدم حسب حجم العينات. يوصى بحجم من المثبت يساوي 5 أضعاف حجم العينة.
- الهدف من التثبيت هو الحفاظ على البنيات و تصلب الأنسجة.

ج) نزع ماء (Déshydratation)

- إزالة الماء الموجود في العينة و استبداله بالإيثانول.
- يتم إزالة الماء عن طريق تمرير العينة في حمامات كحول ذات تراكيز متزايدة (من كحول ذي 50° إلى كحول مطلق 100°).
- تعتبر هذه الخطوة تحضيرا لعملية التضمين، لأن البارافين كاره للماء.

د) التشريب (Imprégnation)

- الإيثانول غير قابل للامتزاج مع البارافين، لذلك يتم استبداله بمحلول قابل للامتزاج مع البارافين.
- يتم إزالة الإيثانول عن طريق تمرير العينة في حمامات الزيلين أو التولوين، وذلك لإزالة آثار الكحول المطلق.
- الزيلين أو التولوين، مذيب وسيط مناسب للمبادلات الغشائية بين الكحول ↔ التولوين من جهة والتولوين ↔ البارافين من ناحية أخرى.

.

ه) التضمين أو الطمر (Inclusion ou enrobage)

- وسط الطمر المستعمل هو شمع البارافين.
- غمر العينة في البرافين السائل محفوظ في حضانة مضبوطة على درجة 56°م
- بعد 4 ساعات من التضمين، يُسكب البارافين السائل في قالب معدني صغير "قضبان Leuckart". بعد التبريد، نحصل على كتلة صلبة من البرافين تحوي بداخلها العينة المأخوذة
- الهدف من الطمر هو جعل العينة صلبة تسمح بإنجاز مقاطع رقيقة و منتظمة

و) إنجاز المقطع النسيجية

- تقطع كتلة البرافين بواسطة المقطاع المجهري (microtome) الذي يسمح بالحصول على شرائح رقيقة يتراوح سمكها بين 2 إلى 5 ميكرون مرتبة في سلسلة منتظمة على شكل شرائط.
- يتم جمع المقاطع على شرائح زجاجية.

ز) نزع البرافين (Déparaffinage)

- توضع الشرائح الزجاجية على صفيحة ساخنة plaque chauffante (عند 45-60°م) لمدة 15 دقيقة، من أجل إذابة البرافين.
- ينزع البرافين بتمرير الشرائح في حمامات التولوين (toluène) أو الزيلين (xylène).

UFMC - SNV-TC-1ère LMD-2023-2024

ح) إعادة الماء (Réhydratation)

- يسمح إعادة الماء بإزالة البارافين الداخل خلوي عن طريق غمر الشرائح في حمامات كحول ذات درجات متناقصة (من كحول مطلق ذي 100° إلى كحول ذي 50°) ، ثم غمرها في الماء المقطر.

ط) التلوين (Coloration)

- تسمح عملية التلوين برفع التباين الذي يؤدي إلى التمييز بين المكونات الخلوية المختلفة.
- يتم التلوين بإستعمال أنواع مختلفة من الملونات. تستخدم الملونات المناسبة للدراسة.

ى) التركيب والملاحظة المجهرية (Montage et observation microscopique)

- يتم تثبيت المقاطع الملونة بين الشريحة والساترة بإستخدام الراتنج الصناعي "بلسم كندا" الذي يكون معامل انكساره قريبًا من ذلك الخاص بالزجاج. بذلك يتم الحصول على محضر نسيجي جاهز لفحصه بالمجهر الضوئي.

2- تحضير المقاطع للملاحظة بالمجهر الإلكتروني [شكل 2]

تسلسل المعالجة مشابه لما تم عرضه في الفحص بالمجهر الضوئي.

.

أ) التثبيت (Fixation)

- يتم عادة بإستعمال glutaraldéhyde، يليه تثبيت لاحق بحمض الأوسميك (رباعي أكسيد الأوزميوم OsO4).

ب) نزع الماء (Déshydratation)

- يتم تمرير العينات في تراكيز متزايدة من الإيثانول ثم في أكسيد البروبيلين.

ج) التضمين أو الطمر (Inclusion ou enrobage)

- يتم تضمين العينات في مادة صمغية résine (araldite) التي تسمح للعينة بالتصلب عن طريق البلمرة.

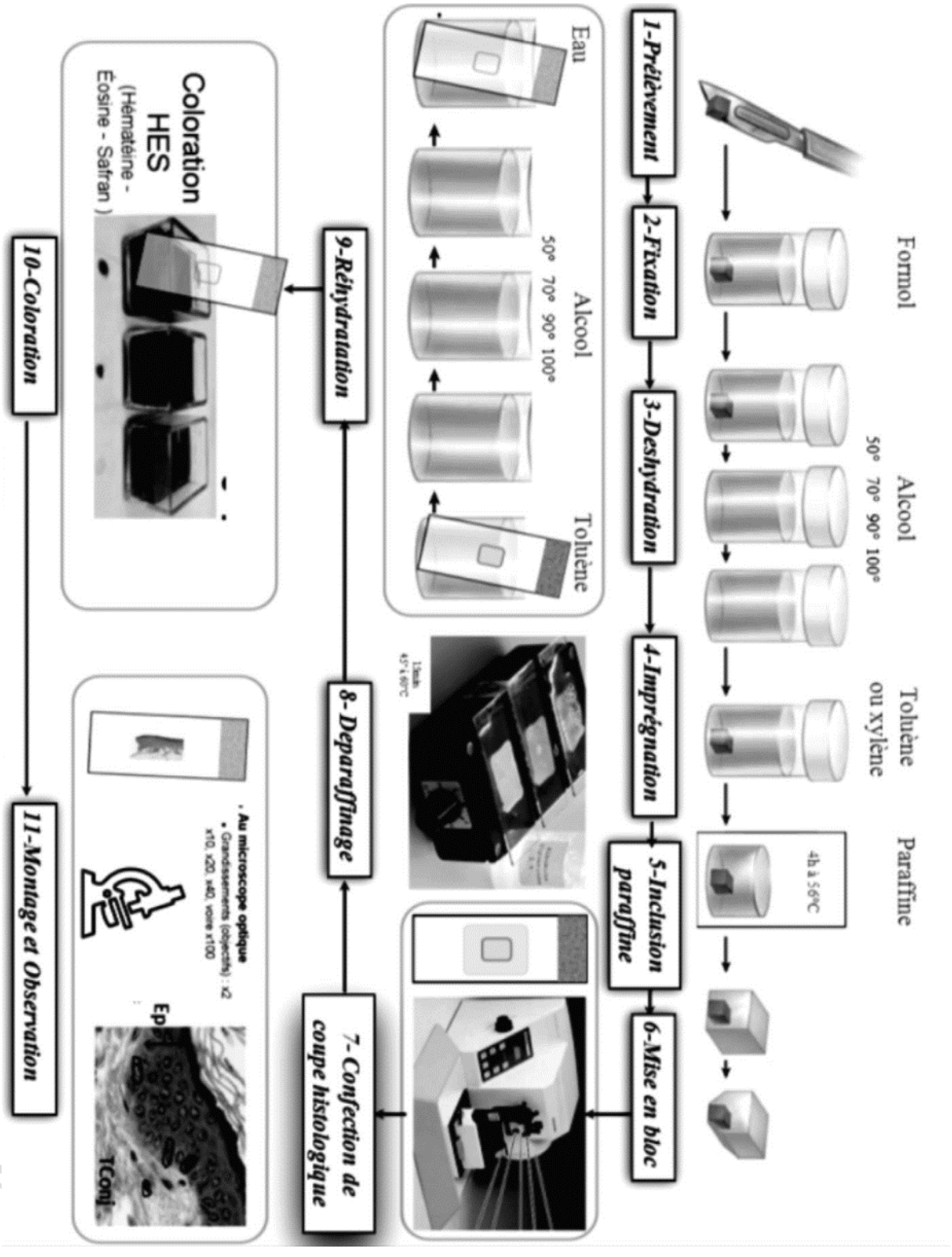
د) القطع (Coupe)

- يتم قطع كتل résine التي تحتوي على العينة بإستخدام ما فوق المقطاع المجهري (Ultramicrotome) المزود بسكين زجاجي أو ماسي يسمح بالحصول على مقاطع فائقة الدقة يبلغ سمكها حوالي 80 نانومتر.

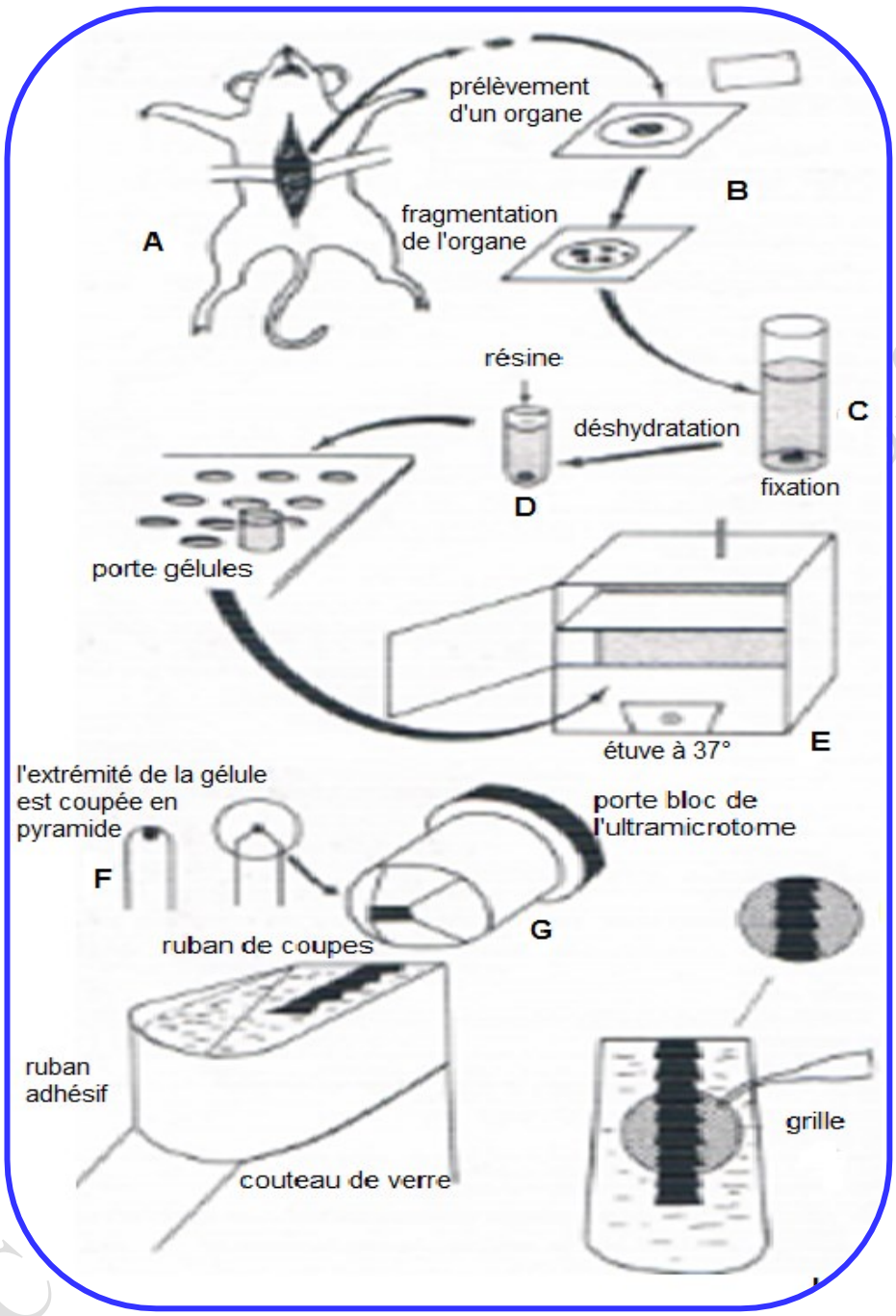
هـ) التباين (Contraste)

- وضع المقاطع الخلوية على شبكة نحاسية.
- غمر الشبكة في محلول من المعادن الثقيلة (أسيتات اليورانيل و سيترات الرصاص) لتغميق البنيات الخلوية وزيادة التباين.
- يتم بعد ذلك إدخال الشبكة في المجهر الإلكتروني النافذ (MET) للفحص.

UFMC - SNV-TC - 1ère LMD - 2023-2024



شكل 1 : تحضير المقاطع للفحص بالمجهر الضوئي



شكل 2 : تحضير المقاطع للفحص بالمجهر الإلكتروني النافذ (MET)

UFMC 2024