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 (Sampling)

- 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 و حجم 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 (Dehydration)

- 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 paraffin كاره للماء.

د) التشريب أو الترويق (Impregnation or Clearing)

- الإيثانول غير قابل للامتزاج مع البارافين، لذلك يتم إستبداله بمحلول قابل للامتزاج مع البارافين.
- يتم إزالة الإيثانول عن طريق تمرير العينة في حمامات الزيلين Xylene أو التولوين Toluene ، وذلك لإزالة آثار الكحول المطلق.
- الزيلين أو التولوين، مذيب وسيط قابل للامتزاج مع كل من الكحول و البارافين. فهو يعمل على إزالة الكحول من الأنسجة وجعلها شفافة، مما يسهل اختراق شمع البارافين.

ه) التضمين أو الطمر (Inclusion or embedding)

- 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) التقطيع (Sectioning or microtomy)

- 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 البرافيين (Deparaffinization)

- توضع الشرائح الزجاجية على صفيحة ساخنة hot plate (عند 45-60°م) لمدة 15 دقيقة، من أجل إذابة البرافين.
- ينزع البرافين بتمرير الشرائح في حمامات التولوين (Toluene) أو الزيلين (Xylene).

UFMC - SNV-TC - 1ère LMD - 2024-2025

ح) إعادة الماء (Rehydration)

- 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 (Staining)

- 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) التحميل (Mounting)

- بعد نزع الماء (بتمرير العينات في حمامات كحول بدرجات متزايدة ثم حمامات التلوين Toluene)، تثبت المقاطع الملونة بين الشريحة والساترة بإستخدام الراتنج الصناعي "بلسم كندا Canada balsam" الذي يكون معامل انكساره قريبًا من ذلك الخاص بالزجاج. بذلك يتم الحصول على محضر نسيجي جاهز لفحصه بالمجهر الضوئي.

شاهد الفيديو عبر هذا الرابط:
https://www.youtube.com/watch?v=glgxx6_J6V0&feature=youtu.be

2- تحضير المقاطع للملاحظة بالمجهر الإلكتروني النافذ (TEM) [شكل 2]

تسلسل المعالجة مشابه لما تم عرضه في الفحص بالمجهر الضوئي.

.

أ) التثبيت (Fixation)

- يتم عادة بإستعمال Glutaradehyde ، يليه تثبيت لاحق بحمض الأوسميك osmic acid (رباعي أكسيد الأوزميوم Osmium tetroxide).

ب) نزع الماء (Dehydration)

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

ج) التضمين أو الطمر (Inclusion or embedding)

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

د) القطع Sectioning (microtomy)

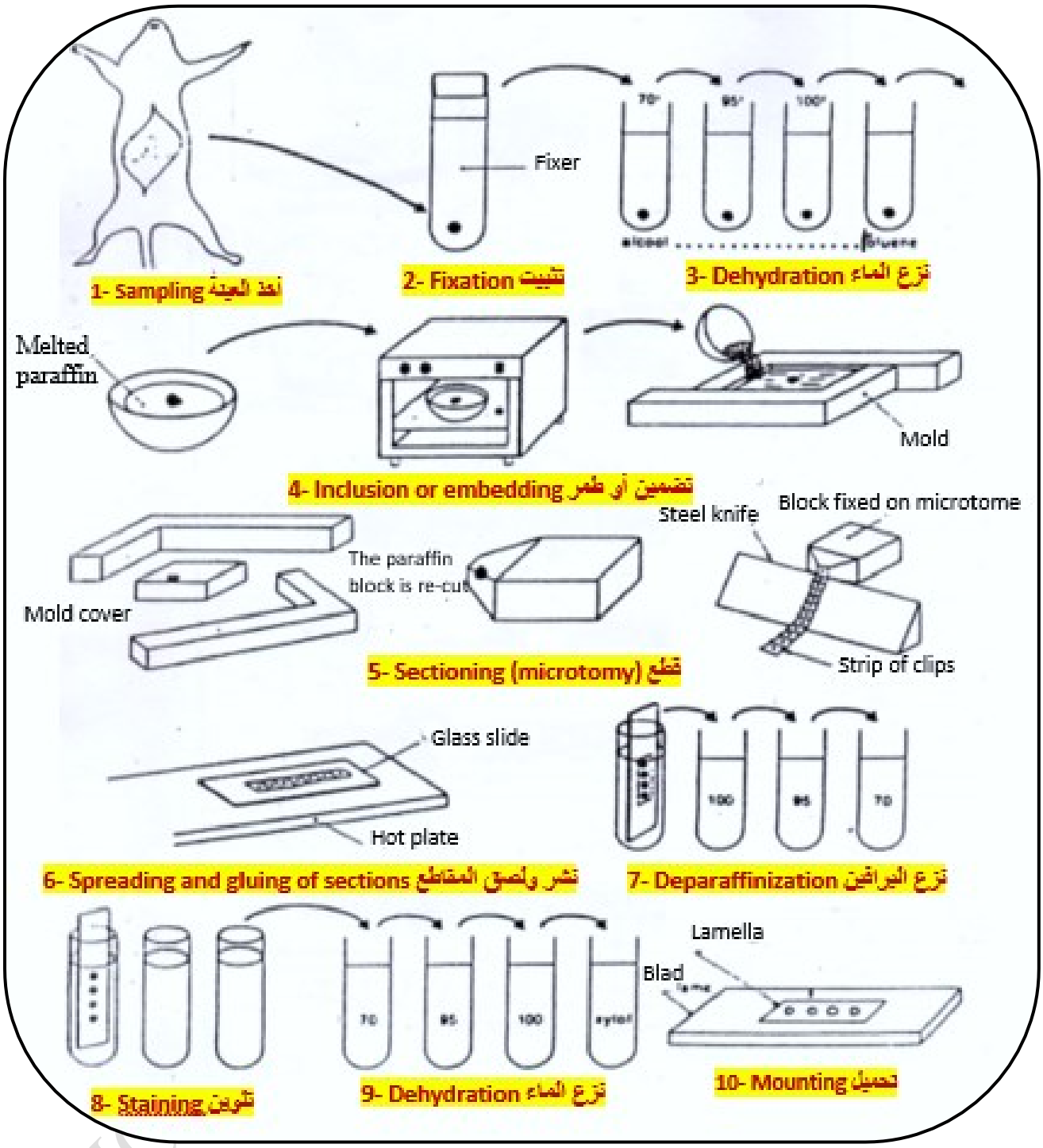
- يتم قطع كتل resin التي تحتوي على العينة بإستخدام ما فوق المقطاع المجهري (Ultramicrotome) المزود بسكين زجاجي أو ماسي يسمح بالحصول على مقاطع فائقة الدقة يبلغ سمكها حوالي 80 نانومتر.

هـ) التباين (Contrast)

- 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 (TEM) للفحص.

شاهد الفيديو عبر هذا الرابط:
https://www.youtube.com/watch?v=7-Mr19fKIu4

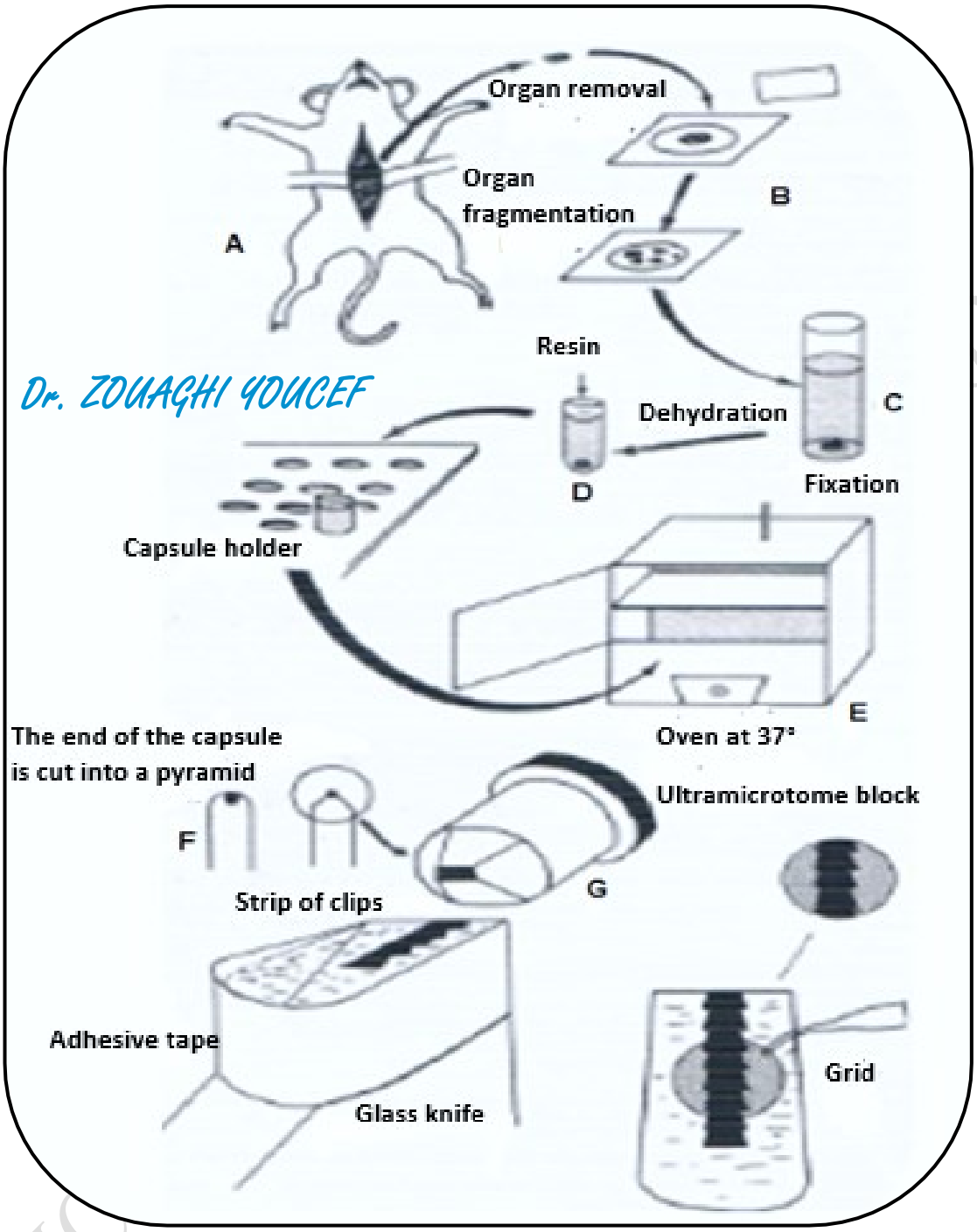
UFMC - SNV - TC-1ère LMD - 2024-2025



شكل 1 : تحضير المقاطع للفحص بالمجهر الضوئي

Preparing sections for observation with an optical microscope

UFMC



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

Preparing sections for examination by transmission electron microscopy (TEM)