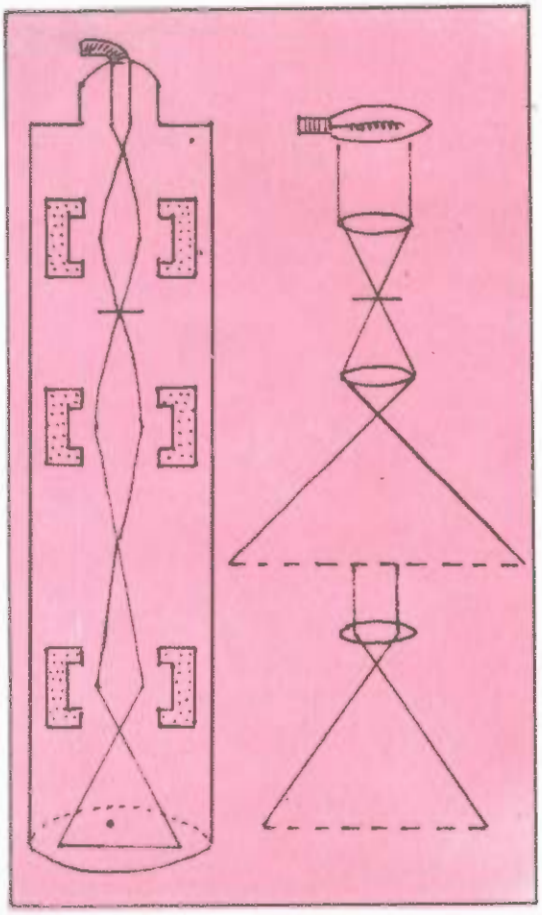
الفصل الثاني

المجاهر

Microscopes



الفصـــل الثـــانى
المجـــاهـــر
Microscopes

ليس من الممكن دراسة الأنسجة والخلايا بالعين المجردة. وذلك لأن الخلايا فى معظمها صغيرة جدا ومعامل انكسار محتوياتها كثير التقارب مما يجعلها شفافة تقريبا. ولذلك فقد تأخر ظهور علم الأنسجة والخلايا الى مابعد ظهور المجاهر فى النصف الثانى من القرن السابع عشر وكذلك التقدم فى اكتشاف واستعمال الصبغات التى بها أمكن تمييز محتويات الأنسجة والخلايا.

ويوجد فى الوقت الحاضر أنواع مختلفة من المجاهر، فهناك المجهر الضوئى وتحوراته. وهى مجاهر يستخدم فيها الضوء المرئى كمصدر للاضاءة. وهناك أيضا المجاهر الالكترونية التى يستخدم فيها فيض من الالكترونات كمصدر للاضاءة.

المجهر الضوئى Light Microscope

يتركب المجهر الضوئى من عدد من العدسات فى أوضاع متناسبة يقوم بواسطتها بتكوين صورة واضحة ومكبرة للأجسام مستعملاً الضوء المرئى الذى يبلغ متوسط طول موجته حوالى ٥ر٠ من الميكرون أو ٥٠٠ نانومتر (المليمتر = ١٠٠٠ ميكرون، والميكرون = ١٠٠٠ نانومتر). وللمجهر ـ أيا كان نوعه ـ وظيفتان رئيسيتان هما : التوضيح Resolution والتكبير Magnification .

ويتركب المجهر الضوئى من مجموعة من العدسات الشيئية المسئولة عن عملية التوضيح ومجموعة من العدسات العينية التى تقوم بتكبير الصورة التى وُضّحت وكُبّرت بواسطة العدسات الشيئية. ذلك علاوة على مجموعة من العدسات التى تكون المكثف والذى يقوم بتجميع الأشعة الضوئية فى نقطة على الجسم المراد تكبيره.

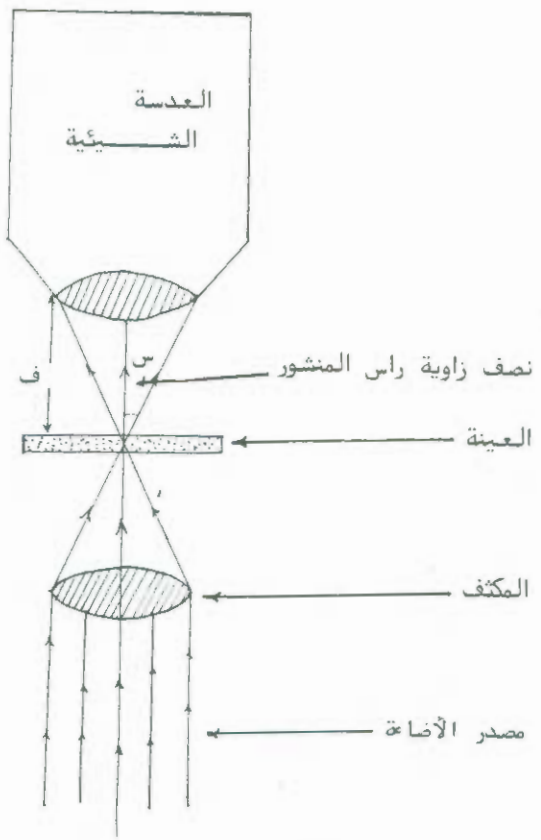
حـد التوضيـح Limit of Resolution

ان مقدرة المجهر على توضيح وتكبير الأشياء الصغيرة ليست بغير حدود. فهذه المقدرة تعتمد على عاملين أساسيين هما :

١ ـ طول موجة الضوء المستعمل « λ » فكلما قصرت طول موجة الضوء كلما زادت قدرة المجهر على التوضيح وقل حد توضيحه. ومن المعروف ان الضوء المرئى يتكون من عدد من الألوان لكل منها طول موجى خاص. فاللون الأحمر أطولها (٧٠٠ نانومتر)، والبنفسجى أقصرها (٣٠٠ نانومتر) ويقع اللون الأزرق

متوسطا بينهما بطول موجى حوالى ٥٠٠ نانومتر. والضوء الأبيض هو خليط من الألوان المرئية وله متوسط طول موجى ٥٠٠ نانومتر تقريبا.

٢ - القيمة الرقمية لفتحة العدسة الشيئية (Numerical Aperture (N.A. ولكل عدسة شيئية قيمة رقمية تعبر عن كمية الضوء التى تدخل من فتحتها والتى تكون منشورا قمته عند الجسم المرئى وقاعدته فتحة العدسة الشيئية. وتعتمد القيمة الرقيمة (N.A.) للعدسة الشيئية على مقدار زاوية رأس المنشور (س فى شكل٢).



شكل (٢) مسار الأشعة في شيئية المجهر الضوئي

فكلما قلت المسافة «ف» بين الجسم والعدسة كلما زادت زاوية رأس المنشور. ولترجمة قيمة الزاوية بالأرقام فقد اعُتبر جيب نصف زاوية رأس المنشور «حاس» هو المقدار العددى لكمية الضوء الصادر من الجسم والتى تدخل الى العدسة.

وتزداد قيمة جاس كلما قلت المسافة «ف» حتى تقترب من ١ صحيح عندما تقترب «ف» من الصفر. وتكون الزاوية «س» فى هذه الحالة تقريبا ٩٠°.

كما تعتمد كمية الضوء الداخلة الى العدسة الشيئية على معامل انكسار الوسط الذى يمر فيه الضوء. وكلما اقترب معامل انكسار الوسط من معامل انكسار الزجاج كلما قلت كمية الضوء المشتت وكلما زادت القيمة الرقمية N.A. للعدسة الشيئية.

وتمثل المعادلة التالية القيمة الرقمية .N.A للعدسة الزيتية للمجهر الضوئى ، وهى أقوى العدسات توضيحا فى هذا المجهر.

N.A. = حاس × ك

(حيث ك معامل انكسار الزيت)

وبالتعويض تكون القيمة الرقمية للعدسة الزيتية ٩ر٠ × ٦ر١ أى ٤ر١ .

وحيث أن حد التوضيح للعدسة الشيئية يتناسب طرديا مع الطول الموجى λ للضوء وعكسيا مع .N.A

$$\therefore \text{حد التوضيح} = \frac{\text{ث} \times \lambda}{\text{N.A.}} \quad \text{حيث ث ثابت التوضيح}$$

وباستعمال الضوء الأبيض (أو الأزرق) حيث λ = ٥٠٠ نانومتر.

واستعمال العدسة الزيتية حيث .N.A = ١ر٤ وحيث ثابت التوضيح ٦١ر٠ وبالتعويض بهذه القيم فى المعادلة السابقة :

$$\text{حد التوضيح للعدسة الشيئية الزيتية} = \frac{٦١ر٠ \times ٥٠٠}{١ر٤} = ٢٢٠ \text{ نانومتر (٢٢ر٠ من الميكرون)}$$

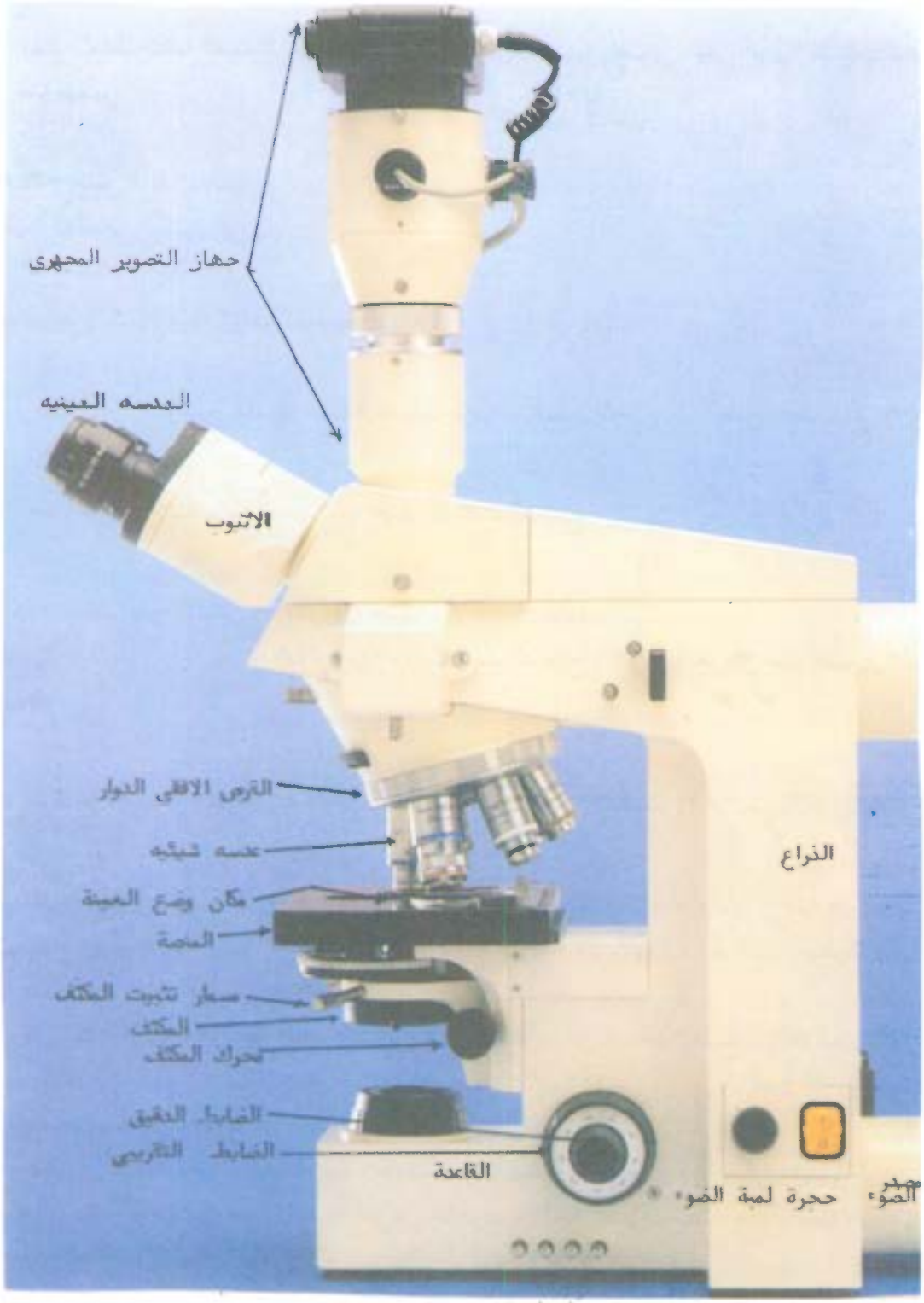
ومن المعروف أن حد توضيح العين البشرية السليمة المجردة هو حوالى ١٠٠ ميكرون (١ر٠مم) حيث لايمكن للانسان ان يرى الأجسام التى تكون أقطارها أقل من ١٠٠ ميكرون ولايمكنه ايضا تمييز الخطوط أو النقاط التى تفصلها مسافات أقل من هذا الحد.

وعلى ذلك يكون حد توضيح المجهر الضوئى ٤٠٠ مرة تقريبا أقل من حد توضيح (رؤية) العين المجردة. وبمعنى آخر، فان مقدرة التوضيح للمجهر الضوئى تكون أكبر ٤٠٠ مرة من مقدرة العين المجردة ويلاحظ أن قدرة التوضيح هى معكوس حد التوضيح.

ويمكن الآن تعريف حد التوضيح بأنه «أقل مسافة بين نقطتين أو خطين عندها يمكن رؤيتهما متميزين». أى أن أى خطين أو نقطتين تفصلهما مسافة أقل من حد توضيح المجهر تظهران خطاً واحداً أو نقطة واحدة.

التكـــبير Magnification

التكبير هو الوظيفة الثانية التى يقوم بها أى مجهر. فالعدسة الشيئية تقوم بتوضيح الأجسام الصغيرة ثم تكبيرها حتى يمكن للعين البشرية أن تراها. أى تكبرها حتى تصل الى حد رؤية العين. ولذلك فان الحد الأدنى للتكبير لأية عدسة شيئية يساوى حد رؤية العين مقسوما على حد توضيح تلك العدسة.



شكل (٣) المجهر الضوئي العادى

ففى حالة العدسة الزيتية يكون التكبير الأدنى هو $\frac{١٠٠}{٠٫٢٢}$ = ٤٠٠ مرة تقريبا .

وتقوم العدسات العينية باضافة قدر من التكبير حتى يمكن للعين أن ترى الصورة بوضوح أكثر. ويسمى التكبير الذى يزيد عن مائة ضعف القيمة الرقمية لأية عدسة بأنه تكبير أجوف ـ Empty magnification أى تكبير غير مصحوب بتوضيح اضافى .

المجهر المميّز Phase Contrast Microscope

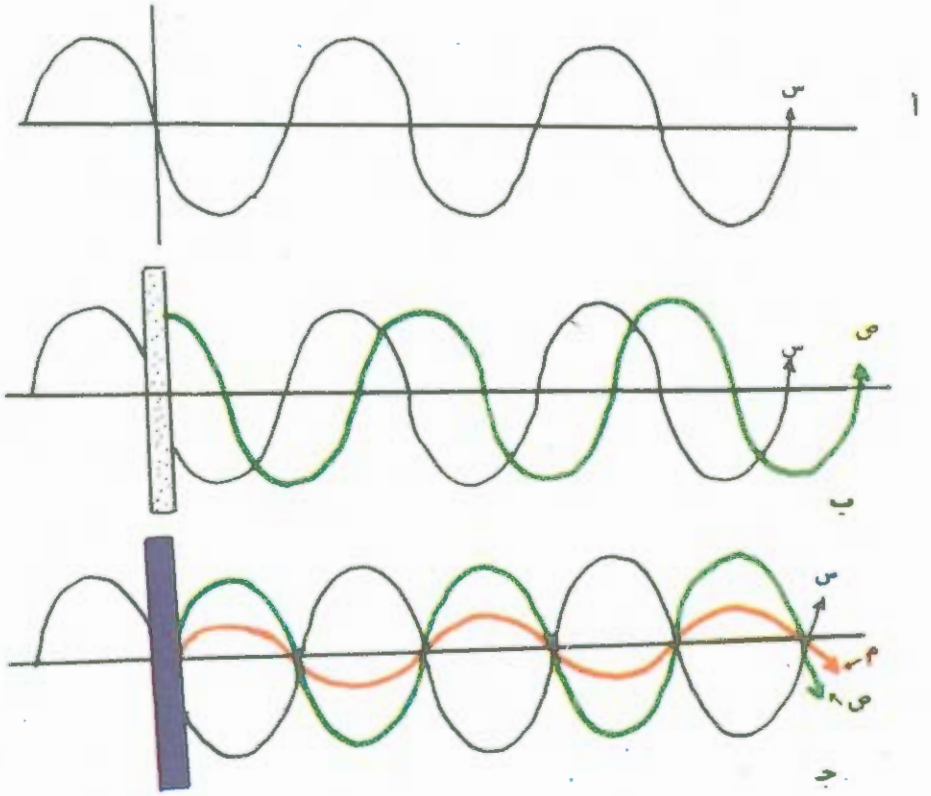
بالرغم من أن محتويات الخلايا تكون شفافة تقريبا، الا أنها تقوم باحداث تغيير فى موجات الضوء النافذ منها، الا ان هذا التغيير لايكون كافيا لتمكين العين من التمييز بين هذه المحتويات.

ويقوم المجهر المميّز بتضخيم التغيير الذى تحدثه محتويات الخلايا والأنسجة ليصبح كافيا لاحداث فرق واضح فى مدى اضاءة أو عتامة هذه المحتويات مقارنة بما حولها. ويبين شكل (٤) مايحدث لشعاع ضوئى ينفذ من ثلاث مواد تختلف فى مدى نفاذيتها للضوء.

فى الحالة «أ» ـ حيث الجسم شفاف تقريبا وتماثل كثافته كثافة الوسط المحيط به ـ تنفذ منه الأشعة مع حدوث تأخير قليل جداً لايمكن تمييزه عن الأشعة المارة فى الوسط المحيط.

فى الحالة «ب» ـ حيث الجسم أكثر كثافة ـ حدث تأخير للأشعة التى مرت به ممثلة بالشعاع ص بالمقارنة بالأشعة التى مرت بالوسط والممثلة بالشعاع س.

فى الحالة «جـ»، تم استعمال المجهر المميّز الذى تسبب فى تأخير الأشعة بمقدار ربع طول موجة أخرى عما كان عليه الحال فى الحالة «ب». وينتج عن ذلك شعاع «م» له نفس طول الموجة الأصلية س، ولكنه أقل عمقا ولذلك فان الجسم يظهر داكنا بالمقارنة للوسط المحيط به والذى يظهر أكثر اضاءة.



شكل (٤) مسار الضوء في ثلاثة أجسام مختلفة الكثافة . الشرح التفصيلي في سياق الموضوع

وتدرك العين البشرية الاختلاف فى طول موجات الضوء على صورة الألوان المختلفة بينما تدرك الاختلاف فى ارتفاع الموجات على صورة دكانة الأجسام (أى بياضها وسوادها).

ويزداد تأخر موجات الضوء بازدياد معامل انكسار المواد بالمقارنة بمعامل انكسار المادة المحيطة بها. ولايختلف المجهر المميز عن المجهر الضوئى العادى الا فى وجود قرصين فى مسار الضوء، أحدهما فى مستوى تحت المكثف والآخر فى مستوى البؤرة الخلفية للعدسة الشيئية. ووظيفة هذين القرصين هى زيادة التأخر فى الموجات الصادرة من محتويات الخلية فتزداد دكونة وتصبح مرئية بوضوح.

ويساعد المجهر المميز فى دراسة الخلايا الحية دون الحاجة الى تثبيتها وصباغتها. وبذلك يمكن مشاهدة الانقسام الخلوى وحركة الكروموسومات وتكون المغزل الميتوزى وذلك فى مزارع الأنسجة Tissue cultures

وهناك أنواع أخرى من المجاهر التى تشبه المجهر الضوئى أيضا ولكن مع تحورات بسيطة. وكلها تساعد على دراسة الخلايا والكائنات الدقيقة وهى حية وتعمل هذه المجاهر بنفس فكرة المجهر المميّز مع بعض الاختلافات.

ومن هـذه المجـاهـر :

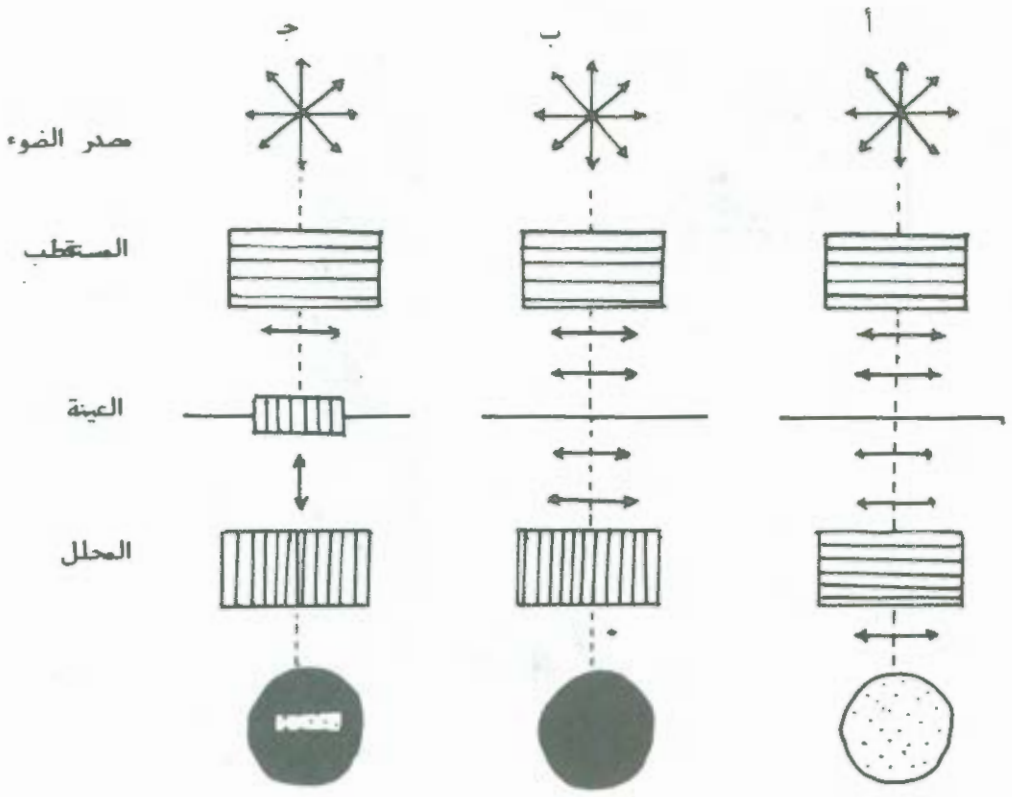
المجهر التداخلى Interference Microscope ويساعد على رؤية الخلايا وقد انعكست منها ألوان مختلفة وكأنها مصبوغة. وبواسطته يمكن قياس سمك محتويات الخلية.

المجهر ذو المجال المظلم Dark Field Microscope ويساعد على رؤية الكائنات الدقيقة والمكونات الصغيرة للخلايا التى تصغر عن حد توضيح المجهر الضوئى العادى. وذلك لأن هذه الأشياء ترى بانعكاس أشعة تسقط على الأجسام المرئية من حواف المكثف (الذى تم طلاؤه بطلاء داكن فيما عدا حوافه) فلا يدخل منها الى العدسة الشيئية سوى ماينعكس على الأجسام السابحة فى المادة الشفافة المحيطة وبذلك تظهر هذه الأجسام مضيئة فى وسط داكن.

المجهر المستقطب Polaryzing Microscope ويساعد على دراسة المكونات الخلوية والنسيجية التى تتميز بخاصية تحوير الضوء المستقطب. ويشبه هذا المجهر المجهر الضوئى العادى إلا أنه قد وضع فيه مستقطب Polarizer عند المكثف، ومحلل Analyzer بعد العدسات الشيئية (شكل ٥).

ويقوم المستقطب بتغيير الضوء العادى الذى يتذبذب فى جميع الاتجاهات فيجعله يتذبذب فى اتجاهين فقط وعندئذ يسمى بالضوء المستقطب، ويظهر للعين خافتا مقارنا بالضوء العادى. وعندما يمر الضوء المستقطب من المحلل يختفى تماما ويظهر حقل الرؤية فى المجهر حينئذ مظلما.

واذا وضعت العينة المراد دراستها فى مسار الضوء المستقطب فان مكوناتها ذات القدرة على تعديل الضوء المستقطب (وتسمى مزدوجة الانكسار Birefringent) تقوم باعادة الضوء المستقطب الى حالته الطبيعية بينما لاتقوم المكونات الأخرى بذلك. وبمرور الضوء بعد ذلك من خلال المحلل تنفذ منه الأشعة التى مرت بالمكونات المزدوجة الانكسار فتظهر مضيئة بينما الوسط المحيط بها يبقى مظلما.



شكل (٥) مسار الضوء في المجهر المستقطب

أ- المستقطب في نفس اتجاه المحلل وبدون عينة. قللت اضاءة الحقل.

ب - المستقطب في عكس اتجاه المحلل وبدون عينة. أصبح حقل الرؤية مظلماً.

جـ - المستقطب في عكس اتجاه المحلل مع وجود عينة مزدوجة الانكسار. تظهر صورة العينة مضيئة بينما باقي حقل الرؤية يظل مظلماً.

المجهر الالكتروني Electron Microscope (E.M.)

بعد ان وصل حد التوضيح فى المجهر الضوئى الى أقل قدر ممكن وهو ١ر٠ من الميكرون (وذلك فى المجهر الذى تستعمل فيه الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجى الذى يصل الى ٢ر٠ من الميكرون) صار من الضرورى البحث عن جهاز جديد يكون مصدر الضوء فيه أشعة ذات طول موجى قصير، فكانت الالكترونات هى الضالة المنشودة.

شكل (٦) المجهر الالكتروني "Jeol"
أ ـ النافذ
ب ـ الماسح

ومن المعلوم انه عندما يمر تيار كهربى ذو جهد عال فى سلك رفيع من التنجستون فانه ينطلق من هذا السلك فيض من الالكترونات المسرّعة ذات الطول الموجى القصير جدا. وكلما زاد جهد التيار الكهربى المار فى السلك كلما تسرّعت الالكترونات اكثر وقصُرت موجتها كما يتضح من المعادلة الآتية :

$$\text{طول الموجة (بالنانومتر)} = \frac{\text{ثابت (وهو ٢٢ر١)}}{\text{الجذر التربيعي للجهد بالفولت}} \quad \cdots\cdots (٢)$$

ولقد تم تصميم عدة أنواع من المجاهر الالكترونية التى يستعمل فيها فيض من الالكترونات الذى يمكن التحكم فى طول موجته وقوة نفاذيته يمر فى فراغ كامل بين مجالات كهرومغناطيسية تعمل عمل العدسات ويمكن التحكم فى قوتها بتغيير شدة التيار الكهربى المار بها فتكون صورة واضحة ومكبرة جداً للعينة.

وتنطبق معادلة حد التوضيح التى ذكرت من قبل عند الحديث عن المجهر الضوئى على المجهر الالكترونى أيضا.

فعندما يستخدم تيار كهربى ذو جهد فى حدود ٢٠٠ ٠٠٠ فولت فان طول موجة الالكترونات الناتجة من ذلك محسوبة بواسطة المعادلة السابقة (٢) يكون ٠ر٠٠٢٧ نانومتر.

$$\text{حد التوضيح فى هذه الحالة} = \frac{\text{٠ر٦١} \times \text{١}}{\text{N.A.}} = \frac{\text{٠ر٦١} \times \text{٠ر٠٠٢٧}}{\text{٠ر١٠}} = \text{٠ر١٦ نانومتر تقريبا}$$

ويلاحظ ان المقدار الرقمى للعدسات الشيئية المغناطيسية صغير جدا مقارنا بالمقدار الرقمى للعدسات الزجاجية.

وعلى ذلك فان المجهر الالكترونى يمكنه توضيح الأجسام التى يصل قطرها الى حوالى ٠ر١ نانومتر ويكون بذلك قادرا على تكبير هذه الأجسام الى حوالى ٥٠٠ر٠٠٠ مرة وأكثر.

وهناك ثلاثة أنواع من المجاهر الالكترونية :

١ - **المجهر الالكترونى النافذ** Transmision E.M. (TEM) وفيه تنفذ الالكترونات خلال العينة المدروسة فتتكون لمحتوياتها صورة واضحة ومكبرة على شاشة قاعدة المجهر.

٢ - **المجهر النافذ ذو الجهد العالى** High Voltage E.M. (HVEM) ويستعمل فيه تيار كهربى قد يصل جهده الى مليون فولت. وينتج عن هذا التيار العالى الجهد فيض من الالكترونات فائق السرعة ذو مقدرة فائقة على النفاذ خلال المواد المدروسة دون أن يتسبب فى رفع درجة حرارتها. وذلك يتيح امكانية دراسة خلايا كاملة دون الحاجة الى شرائح دقيقة جدا كما تستدعى الضرورة عند تحضير العينات للمجهر النافذ العادى.

كما يتيح المجهر العالى الجهد أيضا الفرصة لتصوير العينات بأبعادها الثلاثة (مجسمة)، وقد يتيح أيضا الفرصة لدراسة الخلايا الحية فى مزارعها محققا بذلك حلما طالما راود البيولوجيين.

٣ - **المجهر الالكترونى الماسح** Scanning E.M. (SEM) . ويمكن باستخدامه دراسة أسطح الأجسام بعد طلائها بمواد معدنية عاكسة للالكترونات مثل البلاتين والفضة والذهب ويقوم شعاع الكترونى بمسح سطح العينة ذهابا وإيابا وينعكس الى جهاز يشبه مُرسل التليفاز مكوّنا صورة واضحة ومكبرة لسطح العينة على شاشة تليفازية (شكل ٦ب).