الفصل الثالث

التحضيرات المجهرية

Microscopical Preparations

الفصـــل الثـالث
التحضيرات المجهـرية
Microscopical Preparations

من الطبيعى أن يتمنى البيولوجيون أن تتاح لهم فرصة دراسة الخلايا والأنسجة وهى حية ليتمكنوا من الـوقـوف على تركيبها وأنشطتها وطرق عملها أثناء حياتها. الا ان هذا المطلب صعب المنال. لأن الخلايا والأنسجة تبدأ فى التحلل بمجرد أن تنفصل عن جسم الكائن للأسباب التالية :

١ ـ انقــطاع مد الاكسيجــين عن النسيج مما يسبب تكسر أغشية الأجســام المحللة أو الليســوسـومـات Lysosomes فتنـطلق منهـا الانـزيمات الهـاضمة لتحلّل الخلايا فيما يسمى بعملية التحلل الذاتى Autolysis .

٢ ـ تبخر الماء من الأنسجة مما يسبب جفافها.

٣ ـ تكالب الكائنات الدقيقة مثل البكتيريا على الأنسجة فتصاب بالتعفن.

وفى محاولات للحفاظ على الخلايا حية بعد فصلها من الكائن الحى، قام العلماء بزرع الخلايا والأنسجة بعـد تهيئـة كافّة الظروف المشابهة لظروف البيئة الداخلية للكائن من درجة حرارة ورقم هيدروجينى، مع امدادها بكل حاجاتها من مواد غذائية وأكسيجين، كل ذلك فى جو معقم بعيد عن الميكروبات الضارة.

وقـد أمكن زراعة العديد من أنواع الخلايا والحفاظ عليها فى مزارع متوالية جيلا بعد جيل فيما يسمى بالخطوط الخلوية Cell lines وذلك لعدة سنوات.

وقد أتاحت زراعة الخلايا دراسة الجوانب التركيبية والوظيفية المختلفة لهذه الخلايا باستخدام بعض المجاهر المميّزة وذات الحقل المظلم. ومن الجوانب التى أفادت فيها زراعة الخلايا والأنسجة الى حد كبير الدراسات الوراثية والتميّزية والنموّية.

ومن عيوب زراعة الخلايا أنها تصاب ببعض التشوهات مثل صغر الحجم وتعدد المجموعات الجينية Polyploidy ، هذا بالاضافة الى أن سمك الخلية لايسمح بدراسة تفاصيل عضياتها.

من أجل ذلك تعامل الخلايا والأنسجة معاملات خاصة من أجل تحضير عينات قابلة للدراسة التفصيلية وذلك باستعمال مواد مثبتة Fixatives تحافظ على الخلايا فى حالة قريبة الشبة من الحالة الحية.

التثبيـــت Fixation

هى طريقة لتوقيف العمليات الحيوية بمجرد فصل الخلايا عن الكائن وذلك بوضعها فى مواد مثبتة، على ألا تتسبب هذه المثبتات فى احداث تغييرات جوهرية فى تركيب الخلايا والأنسجة.

ويقوم المثبت فى الواقع بالتأثير على بروتينات الخلية، فيحوّلها الى مواد غير قابلة للذوبان فى المحاليل التى تستعمل فى خطوات التحضير التالية ؛ ويتـم ذلك بطـريقـتين :

أ ـ الترسيب : وذلك بتحويل البروتينات الجلوبيولينية السيتوبلازمية القابلة للذوبان الى بروتينات غير قابلة للذوبان فتترسب على هيئة ألياف دقيقة . ومن أمثلة المثبتات المرسبة للبروتينات : الكحولات ، وبعض الاملاح مثل كلوريد الزئبق ، والأحماض مثل حمض البكريك Picric acid وحمض الخليك Acetic acid .

ب ـ عدم الترسيب : وذلك بتحويل البروتينات الى مركبات حبيبية صغيرة جدا غير قابلة للذوبان ولكن بدون ترسيبها . ومن المثبتات غير الترسيبية : الالدهيدات مثل الفورمالدهيد والجلوتيرالدهيد ، ورابع أكسيد الأزميوم Osmium tetroxide والأخير من المثبتات الأساسية لتحضير العينات للمجهر الالكترونى . وذلك لان معدن الازميوم الثقيل يترسب على الأغشية الخلوية فيجعلها متميّزة وذلك علاوة على عمل هذا المركب كمثبت فعال .

ولكل نوع من المثبتات ميزاته التى تجعله مفضلا حسب المستهدف من التحضيرات . وفى الغالب يستعمل خليط من مواد مرسبة وأخرى غير مرسبة وذلك للحصول على أفضل النتائج .

بعد انتهاء عملية التثبيت ، تمرّر العينات فى محاليل مختلفة حتى تصل الى مرحلة التقطيع وذلك حسب الخطوات التالية :

١ ـ الغَسْل Washing ويكون بالماء أو بغيره من مواد لإزالة بقايا مواد التثبيت حتى لاتتفاعل مع المواد المستعملة فى المراحل التالية .

٢ ـ التجفيف Dehydration وذلك بتمرير العينات فى تركيزات متصاعدة من الكحول الإثيلى الذى يقوم بسحب الماء تدريجيا من الخلايا . وعند نهاية هذه الخطوة يكون الكحول قد حل تماما محل الماء الموجود فى الخلايا والأنسجة .

٣ ـ الترويق Clearing وذلك بوضع العينات فى مادة مروّقة لتحل محل الكحول وتقوم على جعل العينات رائقة أو شفافة . ومن المواد المروّقة : الزيلين ، والتلوين ، والبنزين ، وبعض الزيوت الخاصة مثل زيت خشب الأرز Cedar-wood oil .

٤ ـ التشريب Imprignation وذلك باستعمال الشمع المنصهر عند درجة ٦٠° وبذلك يحل الشمع السائل محل المروّقات ، وتصبح مكونات الخلايا والأنسجة محاطة تماما بالشمع المنصهر بدلا من الماء وفى حالة تكون أقرب الى حالتها وهى حية .

٥ ـ الطمر Embedding وذلك بنقل العينات الى شمع نقى منصهر الذي يترك ليبرد فيتحوّل الى كتلة صلبة تحتوى على العينة بداخلها .

التقطيع Microtomy

تثبت قوالب الشمع التى تحتوى بداخلها على العينات فى جهاز خاص يسمى المقطّع الدقيق أو الميكروتوم Microtome (شكل ٧) ثم يتم عمل قطاعات رقيقة بسمك يتناسب مع الغرض من التحضيرات .

فاذا كان الغرض من التحضيرات دراسة المكونات النسيجية من خلايا ومواد خلالية ، فيجب ان تكون القطاعات بسمك خلية واحدة من هذا النسيج . وحيث أن معظم الخلايا تكون بسمك ١٠ ميكرونات تقريبا ، فان السمك المناسب لمثل هذه التحضيرات يكون فى حدود ٨ ـ ١٠ ميكرونات . وفى هذه الحالة نضمن

شكل (٧) المقطعات الدقيقة أ- المقطع الشمعي ب- المقطع فائق الدقة

الا نرى صفوفا من الخلايا المتراصة فوق بعضها بل يكون القطاع عبارة عن صف واحد من الخلايا.

أما اذا كان النسيج يحتوى على خلايا أسمك من ١٠ ميكرونات (مثل النسيج العصبى حيث يبلغ سمك الخلايا العصبية ٤٠ ميكروناً أو أكثر) فمن الضرورى أن تكون القطاعات بسمك يتناسب مع سمك الخلايا، حتى يمكن دراسة هذه الخلايا وتفرعاتها فى وقت واحد.

وعندما يكون الهدف من التحضيرات هو دراسة عضيات الخلايا ومحتوياتها الأخرى، فانه يكون من المناسب عمل قطاعات أرق من سمك الخلايا، فقد يبلغ سمك مثل هذه القطاعات ميكرونا واحدا.

ولان دراسة الخلايا بالمجهر الالكترونى تستدعى عمل قطاعات قد يصل سمكهاالى أقل من ٠٫٠٢ من الميكرون (٢٠ نانومتر) حتى يمكن لفيض الالكترونات ان ينفذ خلالها، فان مادة بلاستيكية خاصة تستعمل للطمر بدلا من الشمع. كما يستعمل جهاز تقطيع خاص أكثر دقة من ذلك المستعمل فى تقطيع القوالب الشمعية ويسمى المقطع فائق الدقة (ألْتراتوم) Ultratome (شكل ٧ب).

الصبــاغة Staining

هى وسيلة لزيادة مقدار التضاد Contrast بين المكونات المختلفة للخلايا والأنسجة، والتى تكون عادة شبه شفافه وهناك عدة طرق لزيادة التضاد فى التحضيرات المجهرية هى :

١ - باستعمال مجاهر خاصة مثل المجهر المميّز Phase contrast microscope فانه يمكن تمييز مكونات الخلايا حسب كثافتها ومقدار معامل انكسارها.

٢ - باستعمال بعض أملاح الفضة. حيث تقوم بعض مكونات الخلية (مثل أجسام جولجى والليفات الدقيقة) أو المواد الخلالية (مثل الألياف الشبكية) بترسيب معدن الفضة فيها وبذلك تتميز عما حولها من تراكيب بسبب دكانتها.

٣ - بإستعمال الصبغات Dyes والألوان Colors وهى مواد لها خاصية امتصاص بعض مكونات الوان

الطيف والسماح بانعكاس البعض الآخر الذى يجعلها مرئية بلون خاص مميز. وتعتمد هذه الخاصية على وجود روابط مزدوجة بالتبادل مع روابط منفردة فى جزيئات المادة مما يتيح للالكترونات التذبذب بينها.

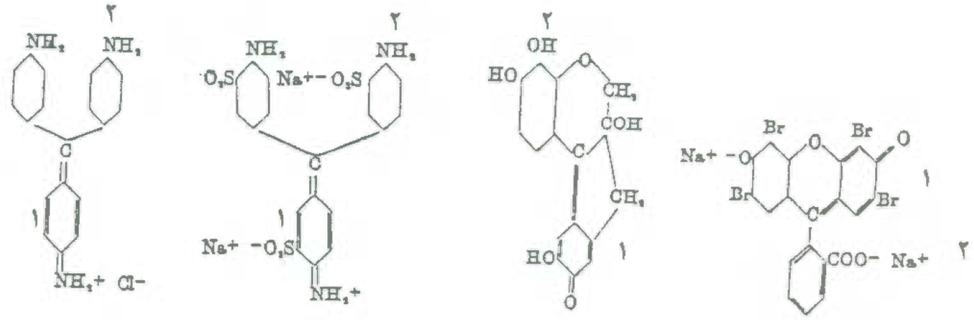
وتتميز الصبغات بوجود مجموعات نشطة فى جزيئاتها مما يجعلها قادرة على الاتحاد مع المادة المصطبغة ولاتنفصل عنها بسهولة. أما المواد الملونة فلا يوجد على جزيئاتها مجموعات نشطة ولذلك فهى لاتتفاعل مع المادة التى تلونها ولكن ترتبط بها بوسائل فيزيقية كالادمصاص Adsorption أو الذوبان. ولذلك فانه بالامكان ازالتها بسهولة.

وتقسم الصبغات حسب طبيعة المجموعات النشطة الموجودة عليها الى الأنواع التالية :

١ ـ صبغات حامضية، وهى التى تحتوى على مجموعات الكربكسليك COOH- أو الكبريتات SO4- أو الفوسفات PO4- ويقوم هذا النوع من الصبغات بصباغة مكونات الخلايا والأنسجة ذات الطبيعة القاعدية، والتى تسمى تبعا لذلك مكونات حامضية الاصطباغ Acidophilic

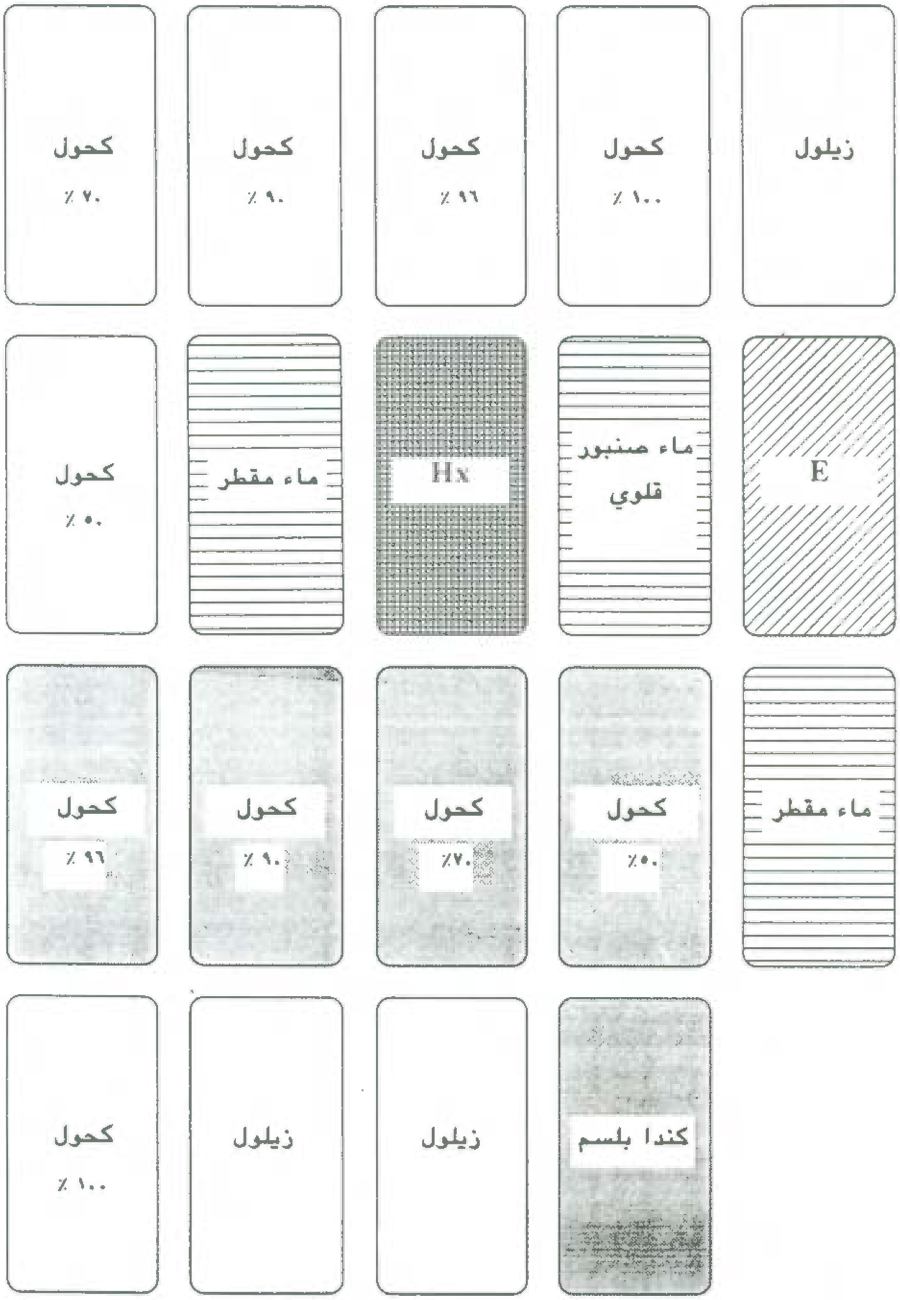
٢ ـ صبغات قاعدية، وتحتوى على مجموعات الهيدروكسيل OH- أو الأمين NH2- . ويقوم هذا النوع من الصبغات بصباغة مكونات الخلايا والأنسجة ذات الطبيعة الحامضية مثل الأحماض النووية والمواد المخاطية الحامضية وتسمى هذه المواد بقاعدية الاصطباغ Basophilic ومن أمثلة الصبغات الحامضية مادة الإيوسين ومن الصبغات القاعدية مادة الهيماتوكسلين.

وهناك بعض مكونات الخلايا والأنسجة التى تصطبغ بكل من الصبغات الحامضية والقاعدية ولذلك فهى تسمى متعادلة الاصطباغ Neutrophilic ومن أمثلتها حبيبات الخلايا الدموية البيض المتعادلة الاصطباغ.



الفوكسين القاعدى — basic fuchsin
الفوكسين الحامضى — acid fuchsin
الايوسين — eosin
الهيماتوكسلين المؤكسد — haematin

١ـ الجزء المسبب للّون chromophore   ٢ـ الجزء المثبت للّون auxochrome



شكل (٨) بطارية لصباغة عينة شمعية بالهيماتوكسلين (Hx) والايوسين (E)

طرق الكيمياء النسيجية Histochemical Methods

هى طرق تعتمد على استعمال بعض التفاعلات المعروفة للكشف عن بعض المكونات الكيميائية للأنسجة وتحديد موقعها بدقة فى الخلايا أو فى الأنسجة.

وهناك شروط هامة يجب أن تراعى عند استعمال طرق الكيمياء النسيجية هى :

أ - أن يكون التفاعل المستعمل يتصف بخصوصية Specificity عالية نحو المادة المطلوب الكشف عنها ومعرفة موقعها بالتحديد.

ب - أن يكون التفاعل حساسا للمقادير الصغيرة لانه يستعمل على قطاعات رقيقة ولذلك فهى تحتوى على كميات ضئيلة من المواد المراد الكشف عنها.

جـ - ألا تكون المواد المستعملة كاوية أو حارقة، كالقلويات والأحماض القوية حتى لاتتسبب فى تآكل الأنسجة وتحطيمها.

د - ألا يكون من نواتج التفاعل بللورات كبيرة تتسبب فى تمزق الخلايا.

هـ - أن يكون ناتج التفاعل مرئيا، كأن يكون ملوّناً أو قابلاً للتلوين أو أن يكون بالامكان رؤيته بأحد المجاهر الخاصة كالمجهر المستقطب أو المجهر الالكترونى.

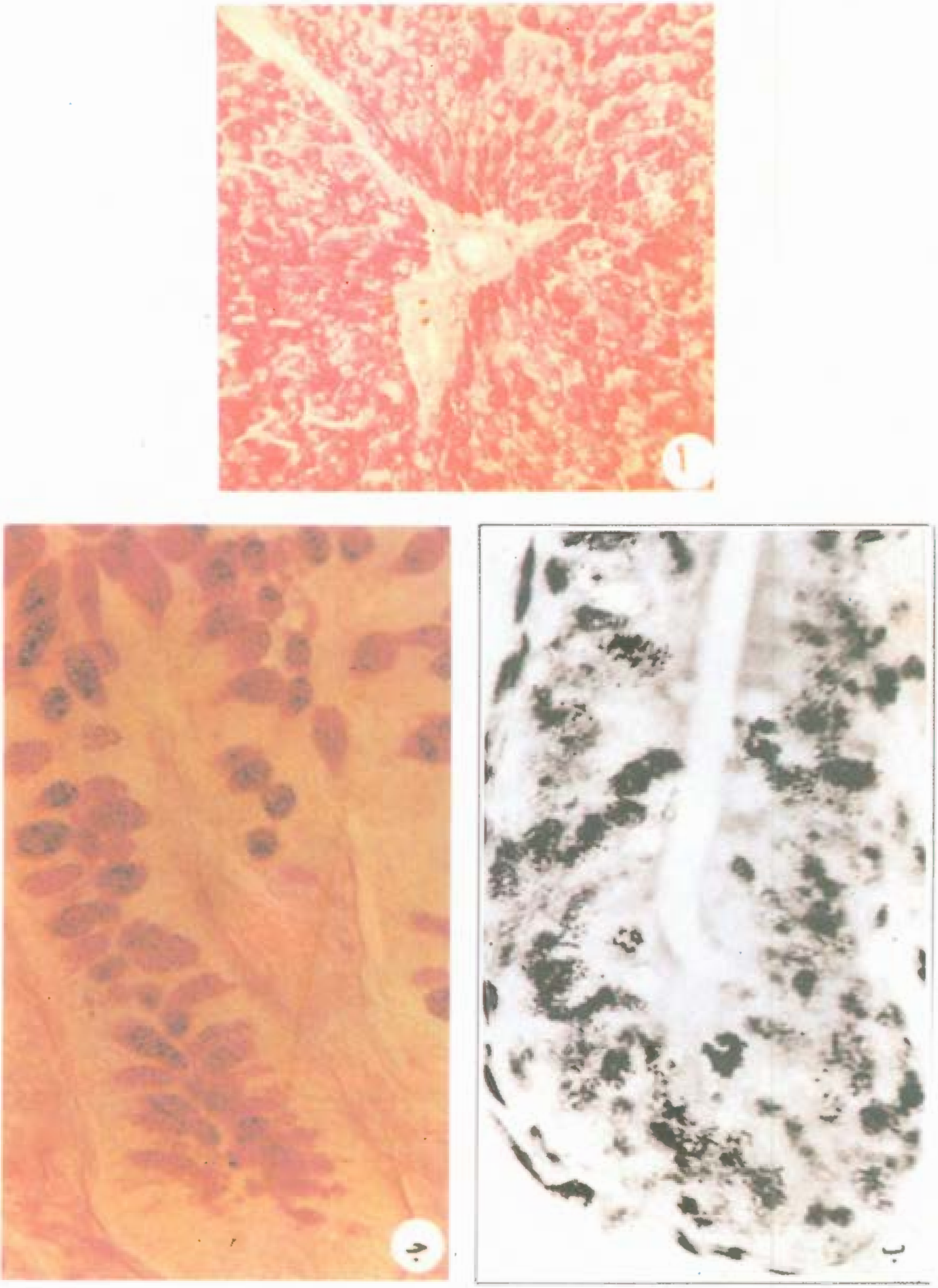
وتنقسم طرق الكيمياء النسيجية الى طرق كيميائية وأخرى فيزيقية.

- أما الطرق الكيميائية فهى التى تستعمل فيها تفاعلات معروفة لاظهار مواد خاصة كما يحدث عند الكشف عن الانزيمات باستعمال ركائزها الخاصة، وكذلك الكشف عن مجموعات الألدهيد فى المكونات الخلوية والبينخلوية باستعمال محلول «شيف» Schiff's solution (شكل ٩أ ، جـ).
- وأما الطرق الفيزيقية فهى التى لاتتضمن أية تفاعلات كيميائية، مثل الكشف عن المواد المتبلورة فى الأنسجة باستعمال المجهر المستقطب، ومشاهدة بعض المواد باستعمال الأشعة فوق البنفسجية التى تقوم هذه المواد بامتصاصها ثم تعطى ألوانا فلوريسية خاصة. وهذه المواد التى تشع ألوانا فلوريسية تسمى ذاتية الفلوريسية (ذاتية الاستشعاع) Autoflourescent

ومن طرق الكيمياء النسيجية الفيزيقية مايلى :

١ - طرق تعتمد على ذوبان بعض الصبغات فى المواد المراد الكشف عنها بمعدل أعلى من معدل ذوبانها فى محاليلها. ومن أمثلة ذلك صبغات «سودان» Sudan stains التى تذوب فى الدهون (السائلة) بمعدل أعلى من معدل ذوبانها فى الكحول. فاذا وضع محلول كحولى لصبغة سودان على عينة بها دهون سائلة، انتقلت صبغة سودان من الكحول الى الدهن مضفية عليه لونها الذى قد يكون برتقاليا أو أزرقا داكنا.

٢ - طرق تعتمد على استعمال الظاهرة المناعية Immunohistochemistry (شكل ١٠) وهى تعتمد على مفهوم أن الأجسام المضادة Antibodies ترتبط فقط بالأجسام الأصلية التى تكونت ضدها بخصوصية عالية فمثلا اذا تم ربط مادة مستشعة (فلوريسية) بالأجسام المضادة التى تكونت ضد مادة المايوسين Myosin (وهو بروتين العضلين الموجود فى الخلايا العضلية) وتم وضع المركب الناتج على عينة ما، فان المركب المستشع يرتبط فقط بالميوسين الذى بذلك يمكن اظهاره دون غيره من المواد وتحديد موضعه فى



شكل (٩) أمثلة من الطرق الكيمياء نسيجية

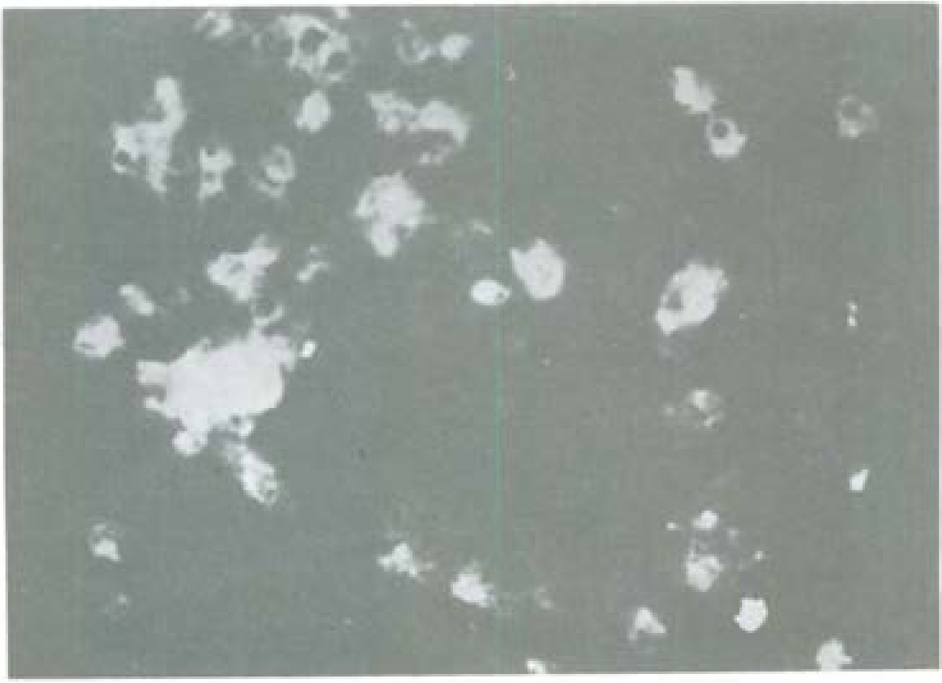
أ ـ حبيبات النشا الحيواني في خلايا الكبد (اللون الأحمر الأرجواني)

ب ـ DNA في خلايا بطانة الامعاء الدقيقة (الحبيبات الداكنة).

جـ ـ المواد المخاطية في الخلايا الكأسية في بطانة الامعاء الدقيقة (اللون الاحمر الأرجواني).

العينة. وبالامكان استعمال هذه الوسيلة لاظهار أية مادة مادام فى الامكان تكوين أجسام مضادة لها (شكل ١٠).

٣ ـ طرق تعتمـد على التسجيل الاشعـاعى الـذاتى Autoradiography وتعتمد هذه الطريقة على أن الكائنات الحية لاتميز بين العناصر ونظائرها المشعة أثناء عملياتها الحيوية فاذا تناول كائن مادة تحتوى على ثيميدين به هيدروجين مشع (تريشيوم) وذلك ضمن غذائه، فسرعان مايدخل الثيميدين المشع فى تركيب مادة الـ DNA فقط وبذلك يصبح الحمض النووى بدوره مشعا، وباستعمال معلّق يحتوى على أملاح الفضة يمكن الكشف عن هذا الـ DNA المشع فى الأنسجة لهذا الكائن، حيث تترسب أملاح الفضة على شكل حبيبات دقيقة فى موضع الاشعاع (شكل ٩ب).



شكل (١٠) الكشف عن المادة المضادة (IgG) في خلايا الكبد باستعمال طريقة الظاهرة المناعية