كلية العلوم

القسم : علم الحياة

السنة : الثالثة

المادة : كيمياء النسج الحيوانية

المحاضرة : الثانية/عملي/

{{ مكتبة A to Z }}

Facebook Group : مكتبة A to Z

2025

كلية العلوم ، كلية الصيدلة ، الهندسة التقنية

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر (What's app-Telegram) على الرقم 0931497960

التقانات المجهرية لدراسة الانسجة الحيوانية

1- الأجهزة والأدوات المخبرية . ادوات التشريح: نستخدم في تحضير الشرائح المجهرية الادوات التالية: مقص تشريح عريض - ملقط كبير - ملقط رفيع – مشرط - ابرة تشريح

2- التخدير والتثبيت .

3- تحضير القطاعات المجهرية .

4- تلوين المحضرات النسيجية .

5- قوالب الطمر:

قوالب معدنية بشكل حرف ل تستعمل فوق لوح زجاجي . قوالب بلاستيكية

قوالب ورقية يطلى القالب بالغليسيرين لتسهيل الازالة

6- حوامل قوالب الشمع: تثبت عليها القوالب و لها عدة اشكال:

حوامل معدنية مكونة من قرص سميك و له ساق تثبت على الجهاز

حوامل خشبية بقياس 4-3-2 سم وسطحها يجب ان يكون خشنا ليسهل نفاذ الشمع و يكون التثبيت قويا

7- الزجاجيات: بيشر 100-200 مل– دورق 100-250 مل- قمع زجاجي- قنينة عينات 10-20 مل- قنينة بقطارة 20-30 مل- مقياس مدرج 25-50-100 مل

8- الشرائح المجهرية: تستعمل لتحميل المقاطع بابعاد 1-25-75 مم و هو الاكثر شيوعا

ساترات الشرائح: تكون بسماكات مختلفة 0.13-0.16 مم لها شكل مربع او مستطيل

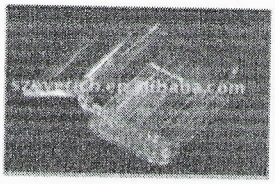
9- ادوات الصبغ الزجاجية:

1-جرار كوبلن مصنوعة من الزجاج و تحوي اثلام من الداخل لوضع الشرائح ضمنها و تتسع لعشرة شرائح مع غطاء محكم

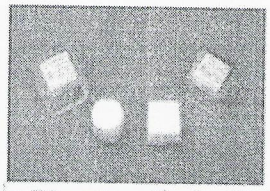
2-صندوق الصبغ تشبه السابقة و لكن شكلها مستطيل و الغطاء متحرك

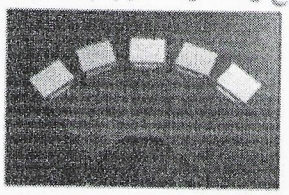
3-مجموعة الصبغ زجاجية على شكل سلة مفتوحة من الطرفين يمكن وضع الشرائح فيها ثم تغمر في وعاء زجاجي مربع الشكل (حوض يحوي الملون).

١١- أحواض التلوين Staining jars :

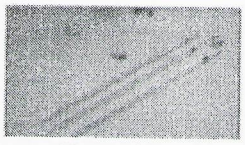


١٢- الشرائح والساترات الزجاجية Glass slides & cover

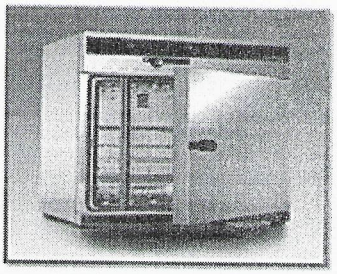


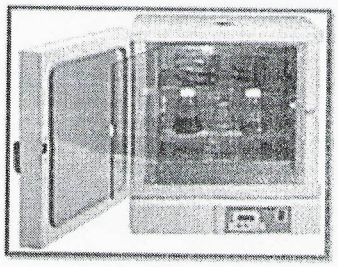


١٣- زجاجات Reagent bottle، كؤوس Beakers، ماصات Pipettes وأقماع



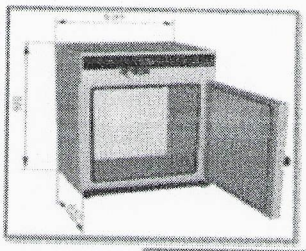
- **علب الشرائح:**
- **تصنع من الخشب او البلاستيك القاسي و باحجام مختلفة تتسع 25-50-100 شريحة بداخلها**
- **ادوات اخرى: رافع مقاطع لحمل المقطع و نقله وقطارة طبية لنقل المحاليل او الملون**
- **فرشاة شعر الجمل للتنظيف وميزان حرارة**





١- حضانة كهربائية Incubator :

- تضبط عند درجة حرارة ٣٧ °م .
- تستخدم لتجفيف القطاعات الشمعية على الشرائح .
- تستخدم لتجفيف الشرائح بعد تحميل العينات .
- تستخدم لحفظ بعض المحاليل الخاصة بتفاعلات كيمياء الأنسجة .

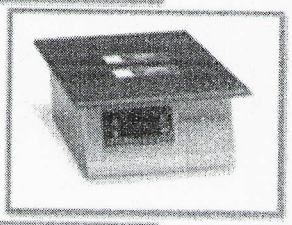


٢- فرن شمع Paraffin oven:

-يستخدم لصهر الشمع .

- يستخدم لعملية تشبيع العينات بالشمع .

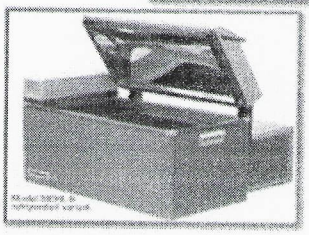
- يضبط عند درجة حرارة ٦٠ °م .



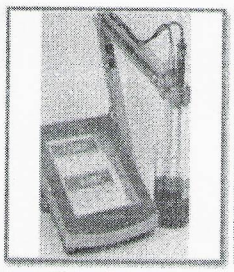
٣- لوح تسخين Hot plate :

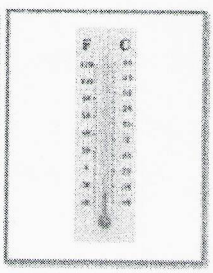
-يستخدم لفرد القطاعات بالحرارة وتحميلها على الشرائح .

- يضبط عند درجة حرارة ٤٥ - ٥٥ °م .



٤- الحمام المائي water bath :



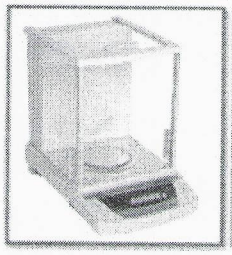


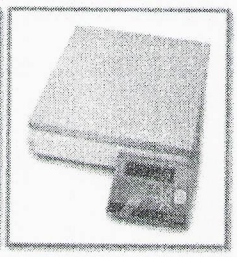
٧- مقياس الأس الهيدروجيني pH-meter

-يستخدم لقياس الأس الهيدروجيني للمحاليل .

٨- مقياس للحرارة Thermometer :

-يستخدم لقياس درجة حرارة المحاليل .





٩- ميزان عادي Balance :

- يستخدم للأوزان حتى الرقم العشري الأول

١٠- ميزان كهربائي Electrical balance:

-يستخدم للأوزان الأكثر من الرقم العشري

المـــيكروتـــوم Microtome او المقطاع المجهري:

عبارة عن جهاز يعمل على تحريك قالب شمعي فيه عينة النسيج باتجاه سكينة ثابتة حادة . وتكمن وظيـفـتـــه في تقطيع العينة إلى قطاعات رقيقة نفاذة للضوء ليتم فحصها تحت المجهر .

- الـعينات المطمورة بالشمع البـرافيـني تستخدم سكـيـنة حديد حـــادة او شغرات.
- الـــعينات المطمورة بالسيللودين سكـيـنة من الألـمـاس القطاع سمكـه 1 ميكـــرومـتر .

أنواع الميكروتومات :

1- الميكروتوم الدوار Rotary microtome .
2- الميكروتوم المنزلق Sliding microtome .
3- ميكروتوم التقطيع الثلجي Freezing microtome او الكريوستات
4- ميكروتوم التقطيع الدقيق Ultra microtome

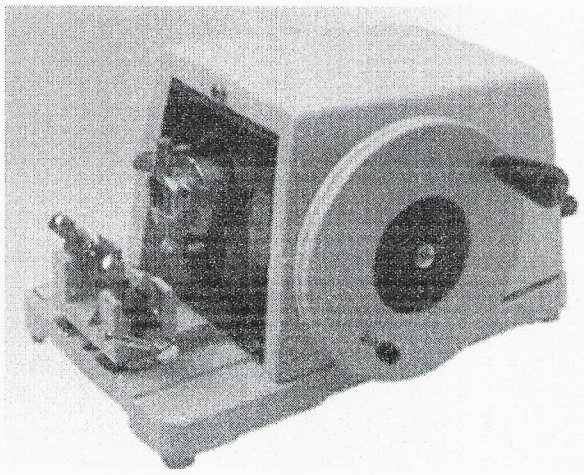
اقسام الميكروتوم

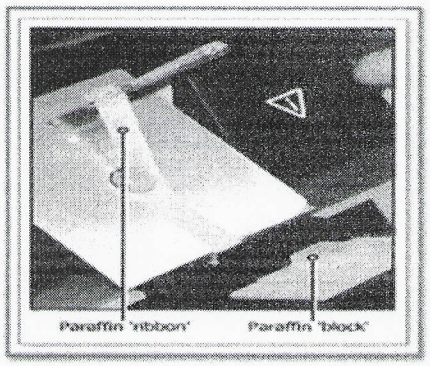
1- جسم الميكروتوم ويحوي بداخله على مسننات الحركة.
2- قاعدة يرتكز بها على الطاولة.
3- حامل القالب(حامل البلوك) وهو المكان الذي يثبت فيه قالب البارافين، ويكون متحركاً.
4- حامل السكين الذي تثبت عليه السكين، ويمكن التحكم بزاوية ميلان السكين والتي تعادل 45 درجة، وهنا تكون السكين ثابتة، ويمكن لهذا الحامل أن يتحرك على مزلاج خاص

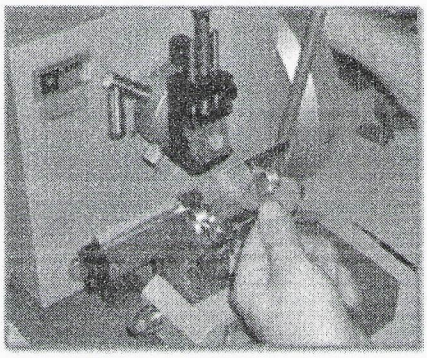
5- عداد رقمي لتحديد سماكة المقطع المطلوب الحصول عليه، وهو مدرج من 0-50 ميكروناً(µ).
6- عجلة جانبية تتوضع على الجهة اليمنى تحمل مقبضاً و تدار بواسطة اليد. وكل حركة دائرية تدفع حامل القالب إلى الأمام بضعة ميكرونات تساوي عدد الميكرونات المثبتة على العداد الرقمي.
7- خطاف أمان يوجد على عجلة التدوير. يقوم بتثبيت حركة الميكروتوم.
8- ذراع جانبية على الجهة اليسرى لتقريب حامل البلوك و تبعيده.

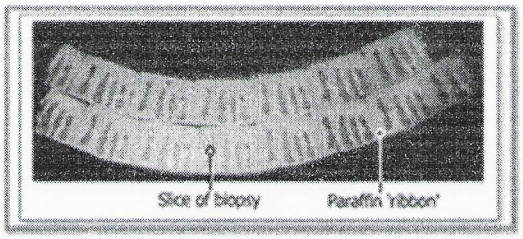
- جهاز التقطيع الدوار(Rotary microtome):

الجهاز الاكثر شيوعا اخترع عام 1885 يسمى دوار لان جهاز الدفع فيه يغذى بدولاب دوار على جانب الجهاز ويعمل جهاز التقطيع الدوار بوجود الجزء الأساسي الذي يقوم بالدوران المتقدم الدقيق للعجلة اليدوية بـ 360˚ و ذلك بتحريك العينة شاقوليا مرورا بسطح القطع والعودة إلى وضع الوثبة. ويمكن أن يكون جهاز التقطيع الدوار يدوي(يدار بشكل كامل بالعامل الميكانيكي) أو نصف آلي او آلي بشكل كامل(محركين ويقودان على حد سواء التقدم الدقيق أو الخشن). **يستخدم في تحضير القطاعات الشمعية البرافينية بسمك من 4-5 ميكرومتر و السكين مصنوعة من الفولاذ .**









الخطوات المتبعة لعمل مقاطع نسيجية محملة على شرائح زجاجية :

1- الحصول على العينة ثم تثبيت العينةFixation

3- غسل العينةWashing

4- نزع الماء من العينة Dehydration

5- ترويق العينة Clearing

6- تشرب العينة Infiltration

7- طمر العينةEmbedding

8- التشذيبTrimming

9- القطعSectioning

10 - صبغ القطاعات Staining

11- تغطية الشرائح Mounting والحصول على شريحة دائمة.

12- تنظيف ووسم(تعليم) الشرائح

- **تخدير حيوانات التجارب:**

للحصول على عينات طازجة من الأنسجة الحيوانية لابد من تخدير الحيوان المراد دراسة أنسجته، وتختلف مواد التخدير باختلاف الوسط الذي تعيش فيه هذه الكائنات:

1- **الحيوانات المائية:** يتم تخديرها بغمر الحيوان في المحلول الفيزيولوجي (Holtfreter) المضاف إليه كمية صغيرة من المادة المخدرة Ms222.

2- **الحيوانات البرمائية:** يتم تخديرها بحقنها داخل البرتوان بمحلول Uretrhane(%10) أو إذابة مادة الكلورتون (Chloretone) بنسبة 3000/1 ماء (20-30ملغرام من Urethane لكل 10 غرام من وزن الحيوان الحي أو 0.5-2 سنتيمتر مكعب من المحلول).

3- **الحيوانات الأرضية:** يتم تخديرها باستخدام قطنة مبللة بالكلوروفورم أو بحقن هذه المادة في العضل.

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 : 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 بإستخدام مادة مخدرة مثل :الكلورفورم

2- التثبيت Fixation:

الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة من أجل إخضاعها للفحوصات النسيجية والكيميا نسيجية 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 المجموعات الفعالة للمثبت والمجموعات الفعالة للمواد الكيميائية الموجودة في النسيج(كربوهيدرات – بروتين – دهون – إنزيمات - أملاح معدنية-صبغات) و تقوم عملية التثبيت الناتجة بإيقاف عملية التفتت والتفسخ Disintegrationوالتعفن 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 الخلايا من الانتفاخ او الانكماش عند تعرضها لعمليات تالية 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 .

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 Bouin Solution ، محلول كارنوي Carnoy ، ومن المثبتات الشائعة للفحص بالمجهرالالكتروني : محلول الكلوترالديهيد Gluteraldehyde ورابع اوكسيد الازميوم Osmium tetraoxide .

صفات المثبت الجيد:

1- يتخلل الأنسجة بسهولة وبسرعة.
2- يعمل في درجة الحرارة العادية.
3- لا يحدث ضرر بالنسيج.
4- يقسي 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 على النسيج.
9- أن يكون سعره مناسبا ومتوفرا باستمرار.

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 تتروا ح من5- 8 ساعات . العينات المثبتة في مثبت روسمان تغسل بالكحول 96% . 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 ethanol(ethyl alchohol) 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%) وتتروا ح 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.

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(3-2 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

تشكل طريقة التقطيع المرحلة الأهم لدراسة العينات على مستواها النسيجي والخلوي والغرض منها الحصول على مقاطع نسيجية رقيقة جدا,ويعرف المقطع Section بأنه شريحة رقيقة تقطع من جزء مأخوذ من كائن حي لغرض دراسة تركيب او ترتيب الخلايا المكونة لها.

طرق القطع Method of sectioning فتشمل طريقتين :

أ- القطع اليدوي Hand sectioning

يستخدم القطع باليد الحرة باستعمال سكين خاص او شفرة للحصول على مقاطع سميكة نوعا ما .

ب- القطع الآلي Mechanical sectioning

يستخدم جهاز المشراح او المقطاع المجهري Microtome لقطع العينات(القالب البرافيني).

يتطلب تقطيع العينات المطمورة بالبارافين القيام بتوفير المواد التالية:

1-حمام تطويف مائي [Floatation(water) bath]:

يستخدم الحمام المائي المراقب بميزان حرارة من أجل تطويف شريط النسيج بعد التقطيع ويجب أن تكون درجة حرارة حمام الماء أقل بعشرة درجات من درجة انصهار البارافين. وهنا يتوجب الحذر من تشكل الفقاعات الهوائية و منع ظهورها باستخدام ماء مقطر في الحمام و يمكن أن يضاف كحول أو قطرة صغيرة من مطهر إلى الماء لخفض التوتر السطحي .

2-فرن تجفيف الشرائح أو صفيحة ساخنة(slide drying oven or hot plate): يستخدم أفران التجفيف التي تحفظ الهواء الساخن و الذي بدورانه حول الشرائح يجففها ،مع ضبط الحرارة التي تقترب من نقطة انصهار البارافين. اذ ان ارتفاع حرارة الفرن يمكن أن يؤدي إلى تخريب الخلايا، كما يجب مراقبة ا لحرارة باستمرار خاصة في الأنسجة الرقيقة (ويفضل درجة حرارة 37 م لمدة 24 سا).

3-ابرة مدببة الرأس او إبرة تمشيط و هي تساعد في إبعاد و الغاء الطيات والفقاعات التي يمكن أن تتشكل خلال تطويف المقاطع . وتساعد في نقل المقاطع

4- فرشاة شعر الجمل أو السمور و ملاقط - مشرط - حامل شرائح - قلم رصاص أو حبر مقاوم- صفائح زجاجية نظيفة :يستخدم عادة شرائح بقياس 76× 25 ملم من اجل المحضرات التقليدية المألوفة وتفضل سماكة من 0.1 إلى 1.2 ملم.

5-مواد لصق المقاطع (section adhesives):

قبل لصق المقاطع يشترط أن تستخدم شرائح نظيفة وتكون المقاطع على نحو ملائم ومجففة ويجب أن لا تحدث مشكلة فصل المقاطع عن الشرائح خلال الصبغ. يمكن أن تخفف المواد اللاصقة من مشكلة سقوط المقاطع النسيجية من على الشريحة . من المواد اللاصقة المستعملة زلال البيض والجيلاتين والنشاء و لكن غالبا تساعد هذه المواد على نمو البكتريا و الان تستخدم مواد كيميائية لاصقة اخرى منها:

-بولي-ال-لايزين(poly-L-lysine): يمدد من اجل الاستعمال بنسبة 1 / 10 من الماء المقطر وتطلى الشرائح بالمحلول الممدد ويترك ليجف.

الإجراءات العملية الواجب معرفتها عند استخدام أجهزة التقطيع:

الخبرة العملية هي الطريق الأفضل للحصول على نتائج ملموسة لابد من القيام بالتالي:

1-ضبط جهاز التقطيع : تعتبر صيانة جهاز التقطيع لإنتاج شرائح نوعية امر لا بد منه .و يجب أن تنفذ الصيانة الدورية للمقطاع التي قد تكون بشكل يومي اوأسبوعي اوفصلي. يتم وضع الحمام المائي و المقطع على طاولة بشكل يتناسب مع وضعية الجلوس لتقليل الإجهاد والتوتر على الرقبة والمناكب. تشحذ الشفرة جيدا و يضبط حامل الشفرة لجعل زاوية الخلاص بالشكل الأمثل. تثبت الملازم والبراغي بشكل قوي ومتين.

2-التقطيع (sectioning):

تقليم القالب النسيجي :يمكن أن يسطح قالب البارافين أويقطع بشكل مستوي باستخدام سكين حتى المسافة 30 15 – ملم والتشذيب الشديد والعنيف يسبب شقوق و تكسر في القالب. ويجب الانتباه الى أن القالب مثبت بإحكام في مكان التثبيت و انه قد سحب إلى حد لا يؤدي إلى تلامس مع الشفرة عند الدورة الاولى.يمكن أن تنسق القوالب على وسيلة تبريد لكل من النسيج والبارافين مانحة لهما تماسكا متماثلا. التسرب الزائد للماء يعمل على تمدد وتخرب المقطع النسيجي. يجب أن تقطع العينة بسماكة 3 -4 ميكرومتر

يفضل تسخين وجه القالب . يعطي تمدد القالب مقطع أسمك و يسمح بمقاطع متعاقبة لتشكل شريط. بعد تقطيع القالب بالكامل تحفظ الشرائط في علب للاستعمال لاحقا.

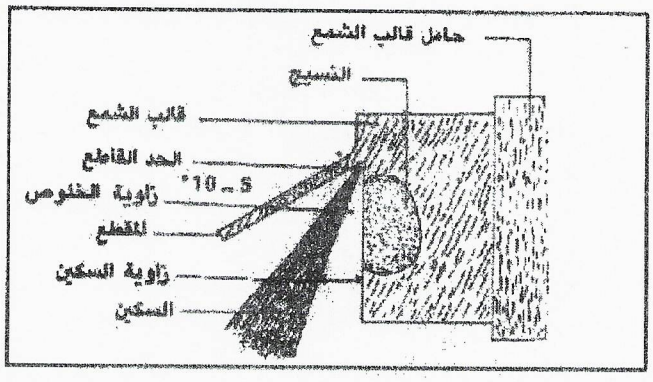
4-2- عملية التقطيع :

1- أوقف حركة العجلة الجانبية باستعمال مسمار الأمان.

2- ثبت قالب البارافين المشذب في مكانه على حامل القطع.

3 – ثبت السكين في مكانها على حامل السكين و اضبط درجة ميلانها. وتجدر الإشارة إلى أن زاوية ميلان السكين عن الحامل تكون بحدود 45 درجة، أما زاوية ميلان شفرة السكين عن القالب أو ميلان الشفرة فتكون بحدود 5-15 درجة، وتسمى هذه الدرجة بدرجة الخلوص (شكل- 12).

4-اضبط عداد القطع على درجة كبيرة و لتكن 15- 20 ميكروناً، في البداية.



5- ابعد مسمار الأمان من مكانه وابدأ بتدوير عجلة الميكروتوم باتجاه عقارب الساعة، فيقترب حامل القطع من السكين، تابع التقطيع حتى ظهور العينة.

6- ثبت عداد القطع على الدرجة المطلوبة و لتكن 5-6 ميكرون.

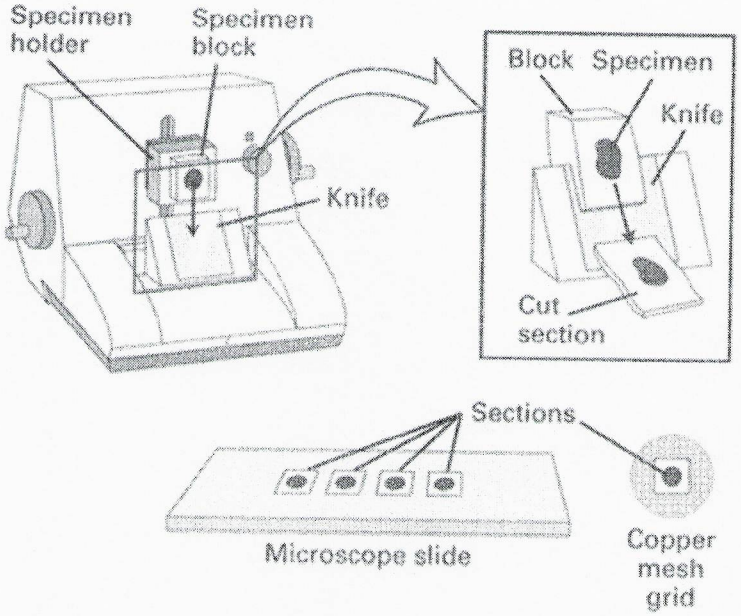
7- ابدأ بالقطع مرة أخرى، بتحريك العجلة حركة دورانية منتظمة، فتظهر المقاطع على السكين بشكل شريط متسلسل. ولاحظ أن للشريط المتسلسل وجهان : وجه لامع مصقول للأسفل من جهة السكين، ووجه ناشف من الأعلى.

8- أوقف الحركة وثبت مسمار الأمان في مكانه. إرفع شريط مقاطع البارافين المتسلسلة بواسطة فرشاة ناعمة ورطبة من طرفيه وبهدوء، وضعه جانباً على قطعة كرتون قائمة اللون، بحيث يكون وجهه اللامع للأسفل. وانتبه إلى عدم نفث الهواء قريباً من الشريط كي لا تتطاير المقاطع. (شكل- 13).

9- إذا كان الهدف من التقطيع هو الحصول على مقاطع متسلسلة (كما هو الحال في تقطيع الأجنة) فيجب الحفاظ على تسلسل المقاطع وترقيمها إن لزم الأمر وخاصة عند حفظها في علبة كرتونية لحين اللصق. أما إذا كان الهدف دراسة مقاطع لا على التعيين (كما هو الحال في دراسة المقاطع النسيجية)، فإنه ليس من الضروري الحفاظ على تسلسل المقاطع.

ملاحظة :

في المقطاع الحديث يوجد حامل للشفرات يتم تركيب شفرة خاصة عليه بدلاً من حامل السكين ، ويتم تبديل الشفرة من فترة لأخرى. وهذا يوفر الجهد و الوقت في عملية شحذ السكين.



عملية الصبغ(التلوين) Staining

الغرض من الصبغ : إن الغرض من الصبغ هو جعل أجزاء الخلايا أو الأنسجة أكثر وضوحا ، وللصبغ نظريات عدة كانت محل جدل بين العلماء ، حيث كان التساؤل : هل هي ظاهرة فيزيائية بحته أم ظاهرة كيميائية بحته أو هي ظاهرة تعتمد على الظواهر الكيميائية الفيزيائية ؟. عملية التلوين مرحلة حاسمة جدا في التحضير المجهري ذلك لانه بدون صبغ مناسب للانسجة فانه يصعب تمييز مكوناتها وبالتالي تفقد عملية التحضير اهميتها لان عملية التلوين تزيد من الفروق في معامل انكسار مكونات النسيج والخلية مما يؤدي الى تمايزها .

عند استعمال شمع البرافين يجب أن يزال شمع البرافين من القطاعات تماما باستخدام الزايلول ومن ثم يجب التخلص من الزايلول 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 وصبغة الأيوسين لصبغ السيتوبلازم .

ستر(اوتغطية) المقاطع :

تتم هذه العملية بعد الانتهاء من عملية الصبغ اذ تبدأ عملية إعداد الشريحة المجهرية للحـفظ الدائم باستخدام مادة شمعية أو مادة بلاستيكية حافظه مثل مادة بلسم كندا Canada balsam أو مادة(D.P.X) ثم يوضع غطاء الشريحة(Cover) بزاوية حادة 45 درجة وبحذر شديد حتى لا تتكون فقاعات هوائيةAir bubbles وهكذا يتم عمل ما يعرف بالشريحة الدائمة. 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 لا تظهر الا قليلا 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 دائمة مثل مادة بلسم كندا .

تنظف الشرائح ويزال التلوين الزائد من حول جوانب الغطاء وتوضع ورقة مناسبة على طرف الشريحة يكتب عليها معلومات عن النسيج والمثبت والصبغة .

تقنية التجميدfreezing method

في هذه الطريقة تجمد العينة(تثبيت بالتجميد) ويعمل منها قطاعات بالميكروتوم الثلجي أو ما يسمى بالكريوستات (cryostat). ميزاتها:

1-طريقة سريعة تستخدم عادة خلال العمليات الجراحية التي تطلب تشخيص سريع للسرطانات.

2-المواد الكيميائية الموجودة في النسيج لا تتغير بسبب عدم استخدام الحرارة.

3-تستخدم في كيمياء الأنسجة للكشف عن فعالية الأنزيمات الخلوية والكشف عن الدهون التي تذوب في الكحول والزايلين .

من عيوبها انها لا تعطي سلسله من المقاطع . كما انها تعطي قطاعات سميكة بسب صعوبة القطع .

مكتبة A to Z