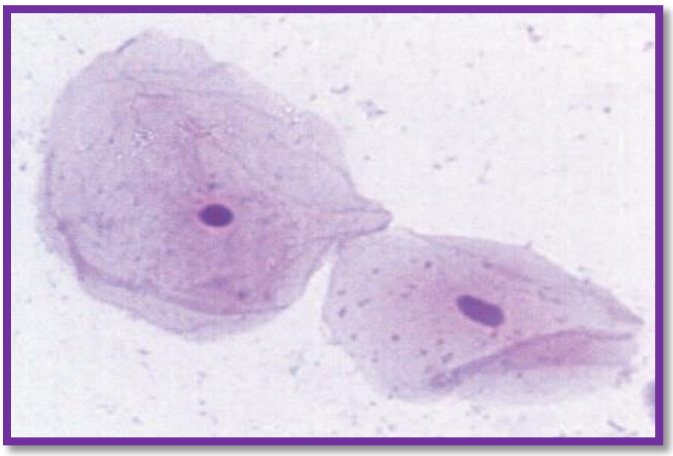
Study of living & Fixed cells دراسة الخلايا الحية والمثبتة

أولاً:الخلايا الحية: يمكن دراسة الخلايا الحية بشكل مباشر Direct من خلال تحضير مقاطع أو شرائح وقتية Temporary slides أو بالتحميل الرطب wet mount ، ويتم في هذه الطرق إستخدام صبغات تعرف بالصبغات الحية vital stains حيث إن هذه الصبغات لاتؤثر تأثيراً مباشراً في الخلية الحية ، ولكون هذه الأصباغ تؤدي الى موت الخلية إذا ماتعرضت لها لمدة طويلة ، لذا فهناك وقت كافٍ لدراسة الخلية الحية قبل موتها ومن هذه الأصباغ **Neutral red** تستخدم لصبغ السايتوبلازم وصبغة **Methylene blue** لصبغ معقد كولجي وصبغة **Janus green** لصبغ المايتوكوندريا .



***** طريقة تحضير شريحة مؤقتة لخلايا حيوانية حية مختبرياً**

1-قم بأخذ مسحة من بطانة الفم (السطح الداخلي من الخد) بواسطة اعواد تنظيف الأذن أو الاسنان

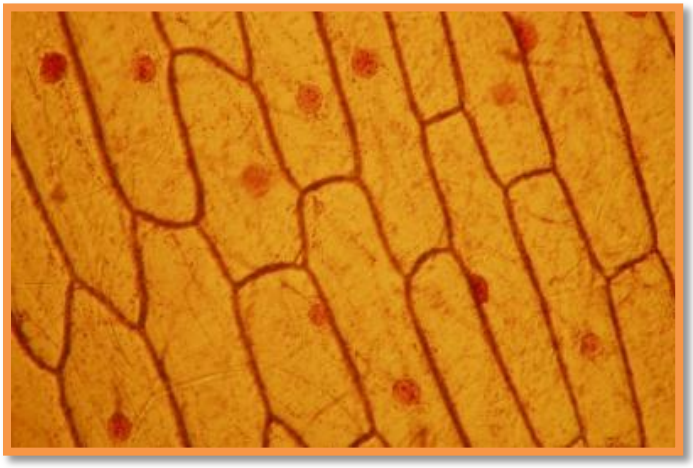
2-ضع جزء من العينة التي حصلت عليها على شريحة زجاجية نظيفة ثم ضع عليها قطرة **من صبغة Methylene blue**

3-غط الشريحة الحاوية على العينة المصبوغة بغطاء الشريحة وأفحصه تحت المجهر بإستخدام قوة التكبير الصغرى ثم الوسطى ثم الكبرى (ماذا تلاحظ؟؟)

***** طريقة تحضير شريحة مؤقتة لخلايا نباتية حية مختبرياً**

1-إقطع بصلة طولياً الى أربعة أقسام

2-ضع قطرة ماء وسط الشريحة ،إستخلص بإستخدام الملقط قطعة صغيرة من الغشاء الرقيق المبطن للسطح الداخلي للبصلة ضع الغشاء فوق قطرة الماء وافرشه بشكل جيد وسط الشريحة



3-ضع غطاء الشريحة بصورة تدريجية وتجنب تكوين فقاعة هواء، ضع قطرة من **صبغة اليود Iodine stain** مع حافة الشريحة حيث تفرش القطرة وتصطبغ العينة كلياً.

4-إفحص الشريحة بوضعها تحت المجهر بإستخدام قوة التكبير المختلفة (ماذا تلاحظ؟؟)

ثانياً: الخلايا المثبتة : تتم دراستها من خلال إستخدام طريقة التقطيع Sectioning method وتتلخص بمايلي:

1-الحصول على العينة Obtaining of the specimen : يتم إختيار العينة سواء حيوانية ام نباتية

2-تثبيت العينة Fixation : وهي الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة من اجل إخضاعها للفحوصات النسيجية والكيمونسجية ،تهدف هذه الخطوة الى المحافظة على النسيج ومحتوياته بالحالة التي كان عليها في جسم الكائن الحي أو قريبة من ذلك ،حيث تهدف هذه العملية الى إيقاف التفتت fragmentation والتفسخ degeneration الناتجة عن نشاط البكتريا والفطريات وكذلك ايقاف عملية التحلل الذاتي autolysis للنسيج بفعل الأنزيمات ومن افضل انواع المثبتات Formalin 10%, Ethyl alcohol 70% .

3-غسل العينة Washing : في هذه الخطوة يتم غسل العينة بعد التثبيت وذلك لإزالة ماتبقى من أثر المادة المثبتة على العينة

4-نزع الماء من العينة Dehydration: في هذه الخطوة يتم إحلال مادة محل الماء الموجود في النسيج **ويشترط ان تكون هذه المادة ذائبة في المحاليل والمواد المستعملة في الخطوات التالية مع ضمان عدم تشويه النسيج** .هي هذه العملية تمرر العينة في سلسلة متدرجة الإرتفاع من الكحول 70% لمدة 2min ، 100% لمدة 2min، 100%لمدة 2min .

5-ترويق العينة Clearing: في هذه الخطوة يتم إحلال مادة محل مادة نزع الماء ،حيث يسمح لشمع البرافين بالدخول الى الإنسجة حيث إن الكحول المستخدم في نزع الماء لايمتزج مع الشمع لذا تستخدم مادة مروقة تذوب في الكحول وشمع البرافين وتجعل النسيج شفافاً ومن أمثلة هذه المواد :**الزايلين والكلوروفورم والتولوين والبنزين وزيت خشب الارز** . يتم تمرير العينة بالزايلين Xylene لمدة 5min .

6-تشريب العينة Infiltration: يتم في هذه الخطوة إحلال المادة المستخدمة في الطمر مكان المادة المروقة ،ويعتبر شمع البرافين paraffin wax من أشهر المواد المستخدمة في تشريب النسيج حيث إنه **يتخلل العينة بسرعة دون إحداث ضرر في تركيبها النسيجي**،كما **يكسبها دعامة قوية لتهيئتها لعملية القطع بالمايكروتوم Microtom** كما **يساعد على حفظها في الظروف العادية لفترة طويلة دون ضرر** .تمرر العينة بالشمع لمدة 45min وبدرجة حرارة 55-60C .

7-طمر العينة Embedding: تهدف هذه الخطوة الى عمل قالب من العينة بحيث تحيط بها المادة الطامرة وتدعمها،ويعد البرافين أشهر وأكثر المواد إستخداماً في معامل كيمياء الانسجة وهوعبارة عن مادة هيدروكاربونية ممزوجة بمواد بلاستيكية.

8-التشذيب Trimming: في الخطوة السابقة تحضر القوالب الشمعية للعينة ،ولكي تصبح العينة في وضع مناسب للتقطيع بحيث تصبح اطرافها متوازية وتنطبق على حافة سكين المايكروتوم يتم تشذيبها في هذه الخطوة.

9-التقطيع Sectioning: تثبت العينة على حامل العينة في المايكروتوم الذي يكون بأنواع حسب طبيعة النموذج ونوع المادة المطمور فيها ،فهناك المشراح المنزلق sliding .M والمشراح الدوار rotary.M والمشراح الفوقي ultra .M والقطاعات الجيدة عادة تكون على شكل اشرطة Ribbons أو سلسلة من القطاعات ويفضل وضع الاشرطة هذه على صفيحة سوداء ليسهل تمييزها واخذ المناسب منها لوضعهِ على الشريحة الزجاجية .

10-صبغ القطاعات Staining: في هذه الخطوة يتم صبغ القطاعات او الأشرطة المتكونه بعد قطعها، ومدة الصبغ تعتمد على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج ،وقد يصبغ النسيج بأكثر من صبغة ،وقد يستخدم أحياناً مايسمى بالصبغ المضاد **antistaning** كإستخدام صبغة **الهيماتوكسلين لصبغ الانوية** وصبغة **الايوسين لصبغ السايتوبلازم** .

11-تحميل القطاعات Mounting: يقصد بالتحميل وضع المقطع أو النموذج المحضر على شريحة زجاجية نظيفة ثم تغطيتها بغطاء الشريحة وتكون معظم مواد التحميل أما الصمغ gum أو راتنج resin .

12-التعليم Labeling: ويقصد به وضع ورقة لاصقة على الشريحة مدون عليها ماتحتويه الشريحة بحيث يتماشى مع نظام معين في التعليم (اسم الشركة المجهزة واسم النموذج).