

التحضيرات المجهرية

إعداد: د. إيهاب معاذ أبوريد

أستاذ مساعد بقسم العلوم الأساسية

كلية المجتمع

جامعة الباحة

## مقدمة

### الأنماط المختلفة للتحضيرات البيولوجية

تتطلب الدراسات البيولوجية بصورة عامة والحيوانية بصورة خاصة أنواعا مختلفة من التحضيرات الميكروسكوبية ، ويعتمد اختيار التحضير الميكروسكوبي على عدة اعتبارات ، منها نوع الدراسة المطلوبة ونوعية الحيوان الذي تجرى دراسته. ولكل نوع من أنواع التحضيرات اعتبارات تحدد استخدامه، ويمكن تصنيف التحضيرات الميكروسكوبية إلى الطرز الآتية:

أولاً: التحضيرات الكاملة "whole mount": وفيها يحمل الحيوان أو جزء منه على الشريحة وهى تحضيرات هامة فى مجال علم الأوليات وعلم الطفيليات. وتشتمل التحضيرات الكاملة على الأنواع الآتية:

- تحضيرات جافة: وهى تستعمل مع العينات الصلبة مثل الأشواك والأصداف.
- تحضيرات رطبة: وهى تتميز إلى تحضيرات غير مصبوغة وأخرى مصبوغة.

ثانياً: تحضيرات الخلايا الحية: وهى تشمل الأوليات وبعض أنسجة الحيوانات عديدة الخلايا. وهذه التحضيرات هامة فى الدراسات الخاصة بعلم الخلية وعلم الأوليات وزراعة الأنسجة. وتمدنا دراسات الخلايا الحية بمعلومات هامة لا يمكن أن تحصل عليها من الخلايا غير الحية.

ثالثاً: السحبات والسحقات "smears & squashes": تستعمل السحبات عادة لتحضير عينات الدم والبراز، بينما تحضر السحقات لخلايا نخاع العظم والخصية غالباً. وهذه التحضيرات هامة فى التحاليل المعملية والدراسات الخلوية وعلم الطفيليات.

رابعاً: القطاعات الميكروسكوبية "microscopical sections": وفى هذه التحضيرات ، تقطع الحيوانات أو أعضاء منها إلى قطاعات يتراوح سمكها بين ٣-١٠ ميكرون غالباً وذلك بسكين مركب على جهاز خاص يسمى الميكروتوم، وقد يقتضى ذلك طمر العينة قبل تقطيعها فى الشمع أو السيللويدن أو الجيلاتين. وفى بعض

التحضيرات تقطع العينة فى درجات حرارة منخفضة تصل إلى - ٣٠ درجة مئوية  
بجهاز يسمى الكريوستات.

وتتيح القطاعات الميكروسكوبية دراسة البناء التشريحي لتلك العينات ، وهذه  
القطاعات هي الأساس الذي يبنى عليه علم الأنسجة Histology كما تتيح بعض  
التحضيرات الخاصة معرفة البناء الداخلي للخلايا Cytology، وهناك تحضيرات  
خاصة تعد لدراسة التركيب الكيماوي للأنسجة ، وهذا موضوع علم آخر هو كيمياء  
الأنسجة Histochemistry.

## الفصل الأول

### الأجهزة والأدوات المعملية

يحتاج معمل التحضيرات المجهرية إلى مجموعة من الأجهزة والأدوات اللازمة لإعداد العينات وتجهيزها . وسنورد هنا الأجهزة والأدوات الأساسية التي لا غنى عنها لأى مشتغل بإعداد التحضيرات المجهرية.

- ١- المجهر (الميكروسكوب): وهو أداة فحص التحضير أثناء إعداده أو بعد الانتهاء منه . وسوف نتكلم عن المجهر بالتفصيل فيما بعد.
- ٢- آلة التقطيع ( الميكروتوم): وهو آلة وظيفتها تقطيع العينة إلى قطاعات رقيقة حتى يتسنى فحصها بالمجهر. وسوف نتكلم عنه فيما بعد أيضا.
- ٣- آلة التقطيع على البارد (الكريوستات):وهى عبارة عن ميكروتوم موجود فى حجرة صغيرة خاصة به تشبه الثلاجة الكهربائية . ويستخدم هذا الجهاز لإعداد بعض التحضيرات التي يلزم فيها حفظ وتقطيع النسيج فى وسط بارد أو القطاعات المجمدة حفاظا على مكونات النسيج كما هو الحال فى تحضيرات الإنزيمات مثلا.
- ٤- حضانة كهربائية: وهى تضبط عادة عند درجة حرارة ٣٧ م ويمكن استخدامها لتجفيف القطاعات الشمعية المحملة على شرائح وذلك قبل الصباغة، وكذلك تستخدم لتجفيف الشرائح بعد تحميل العينات، وبعد ٢٤ ساعة يجب إخراج الشرائح منها وحفظها فى الدولاب المخصص لذلك. كما تستخدم الحضانة لحفظ بعض المحاليل الخاصة ببعض التفاعلات فى مجال تحضيرات علم كيمياء الأنسجة .
- ٥- فرن شمع: وهو يستخدم لصهر الشمع، وتشبع العينات بالشمع قبل تقطيعها الميكروتوم، وهو يضبط عادة عند درجة ٦٠ م.
- ٦- لوح التسخين: وهو يستخدم فى عملية فرد القطاعات بالحرارة وتحميلها على الشرائح، وتعتمد درجة الحرارة التي يضبط عندها

أساسا على درجة انصهار الشمع المستعمل، وعموما تضبط حرارة لوح التسخين ما بين ٤٥-٥٥م.

٧- جهاز تقطير للمياه: يستخدم هذا الجهاز فى الحصول على المياه المقطرة الضرورية لتحضير المحاليل، ويلاحظ انه إذا ما أشير إلى الماء فى طرق التقنية المجهرية، فانه يقصد بذلك الماء المقطر، إلا إذا صرح بغير ذلك.

٨- مقياس الأس الهيدروجيني: وهو يستخدم لقياس الأس الهيدروجيني للمحاليل ، وهو هام جدا فى تحضير المحاليل اللازمة لتحضيرات كيمياء الأنسجة.

٩- ميزان عادى: وهو يستخدم للأوزان المطلوب فيها الدقة حتى الرقم العشري الأول.

١٠- ميزان كهربائي: وهو يستخدم فى الأوزان الدقيقة لأكثر من الرقم العشري الأول.

١١- الأدوات الزجاجية: وتشمل المخابير المدرجة والماصات والأقماع والكؤوس والدوارق مختلفة السعة.

١٢- أوانى الصباغة: وهى أوعية زجاجية ذات أغطية توضع فيها الشرائح لإتمام خطوات صباغة القطاعات. وبعض هذه الأوعية يتسع لشريحتين فقط، ويمكن وضع عدد من هذه الأوعية معا فى حامل من الخشب أو البلاستيك أو المعدن. وهناك أوعية زجاجية تسمى أنية كويلن تتسع ل ١٠-٢٠ شريحة مزودة بحواجز داخلية.

١٣- الشرائح الزجاجية: تحتاج التحضيرات بجميع أنواعها إلى الشرائح الزجاجية كوسيلة توضع عليها العينات ليتسنى فحصها بعد ذلك بالمجهر، وعادة فان الشريحة الزجاجية شكلها مستطيل ( ١ X ٣ بوصة) وتوضع كل ٥٠-١٠٠ شريحة معا فى علبة من الكرتون أو

البلاستيك. ويجب أن تكون الشرائح الزجاجية نظيفة تماما قبل الاستعمال.

١٤- الأغطية الزجاجية: تستخدم فى تغطية العينات على الشرائح بعد وضع مادة التحميل المناسبة. يختلف شكل الأغطية الزجاجية ما بين مربع (٢٢ x ٢٢ مم) أو مستطيل الشكل (٢٢ x ٢٦ مم، ٢٢ x ٣٢ مم، ٢٢ x ٤٢ مم). أما سمك الغطاء فهو على ٤ درجات ١٥ و.مم / ٢٠ و.مم / ٣٠ و.مم / ٥٣ و.مم والأخير يستخدم عند تحميل التحضيرات الكبيرة للتحميل الكامل.

### الميكروسكوب

يستخدم الميكروسكوب كأداة لتكبير العينات الصغيرة حتى يتسنى فحصها وتبيان تركيبها الدقيق ، وفى مجال التحضيرات المجهرية ، يستخدم الميكروسكوب فى فحص العينات بعد انتهاء إعدادها وذلك للحكم على جودة التحضير.

تركيب الميكروسكوب :

يتركب الميكروسكوب من الأجزاء التالية:(شكل ١).

(أ) الأجزاء الميكانيكية:

- ١- قاعدة الميكروسكوب: وهى جزء متين يرتكز عليه الميكروسكوب.
- ٢- العمود: وهو الجزء الذي يحمل أجزاء الميكروسكوب.
- ٣- مفصل الإمالة: وهو يمخ بإمالة الجزء العلوي من الميكروسكوب بالدرجة التي تريخ الشخص الناظر.
- ٤- منصة الميكروسكوب: وهى لوحة منبسطة بها فتحة فى مركزها لمرور الضوء ومثبت عليها مشبكان لتثبيت الشريحة على المنصة بعد فحصها.
- ٥- ذراع الميكروسكوب: وهو جزء مقوس يحمل أنبوبة الميكروسكوب.
- ٦- أنبوبة الميكروسكوب: وهى تحمل العدسات المكبرة.

٧- القطعة الأنفية: وهى قرص مستدير يحمل العدسات الشبكية ويمكن إدارته لضبط إحدى العدسات الشبكية فى مسار الضوء المار من العينة إلى أنبوبة الميكروسكوب.

٨- الضابط الكبير: ويمكن إدارته برفع وخفض أنبوبة الميكروسكوب حتى تحصل على رؤية جيدة للعينة وهو يعمل على سقطة مسننة.

٩- الضابط الدقيق: وهو يستخدم للضبط الدقيق للرؤية خاصة عند استخدام التكبير العالى.

١٠- الأنبوبة المنزلة: وهى تقع عند قمة الميكروسكوب، ويمكن بسحبها إلى أعلى زيادة المسافة بين العدسات العينية والعدسة الشبكية وهى مزودة بتدريج لحساب المسافة.

(ب) الأجزاء البصرية:

١- المرآة: تقع أسفل منصة الميكروسكوب وتستخدم لتوجيه الضوء إلى العينة المراد فحصها وللمراه سطح محدب وآخر مستو. والسطح المستوى يستخدم عمد استعمال العدسات الشبكية ذات التكبير العالى.

٢- المكثف: وهو يقع بين المرآة ومنصة الميكروسكوب ويمكن تقريبه أو إبعاده عن العينة المراد فحصها بواسطة ضابط خاص بحركة فى اتجاه رأسى ويؤدى تقريب المكثف من العينة إلى زيادة شدة الإضاءة اللازمة عند استخدام العدسات الشبكية ذات التكبير العالى.

٣- حاجز قزحى: وهو يقع عند قاعدة المكثف، ويمكن بواسطة ماسك خاص التحكم فى مدى اتساع فتحة ذلك الحاجز وبذلك يمكن التحكم فى كمية الضوء المنعكس من المرآة إلى المكثف.

٤- العدسات الشبكية: ويتراوح عددها من ٣-٥ وهى مثبتة فى القطعة الأنفية للميكروسكوب وذات قوى تكبير مختلفة. وتعمل العدسات الشبكية على تكوين صورة حقيقية للعينة داخل أنبوبة الميكروسكوب. وعادة ما يلحق بالميكروسكوب العدسات الشبكية التالية:

- عدسة شبيئية صغرى: ذات بعد بؤري ٦١ مم.
- عدسة شبيئية كبرى: ذات بعد بؤري ٤ مم.
- عدسة الغمر فى الزيت: وهى ذات بعد بؤري ٢ مم. وعند استخدامها توضع قطرة من زيت السيدر على الشريحة ثم تغمس العدسة فى الزيت، وبذلك يصبح الوسط بين العينة والعدسة زيتا وعادة ما تكون هذه العدسة ذات قوة تكبير عالية (٩٠-١٠٠).

ويلاحظ أنه كلما كانت العدسة الشبيئية ذات تكبير عالي كان جدار إطارها المعدني أطول، وأنه كلما زادت قوة تكبير العدسة المستخدمة قلت المساحة المرئية من العينة. العدسات العينية: عادة ما يزيد الميكروسكوب بعدد من العدسات العينية التي توضع إحداها عند قمة أنبوبة الميكروسكوب للاستخدام وعادة ما تبين قوة تكبير العدسة على إطارها المعدني (5x، 10x، 15 x).

قد يزود الميكروسكوب بمصدر للضوء الكهربى على شكل لمبة متصلة بسلك كهربى. وقد تكون هذه اللبة موجودة داخل حجرة صغيرة خارج الميكروسكوب أو داخله.

حساب قوة تكبير الميكروسكوب:

تحسب قوة التكبير على أساس المعادلة الآتية:

قوة تكبير الميكروسكوب = طول أنبوبة الميكروسكوب ÷ البعد البؤري للعدسة الشبيئية X قوة تكبير العدسة العينية

ويمكن إذا تجاوزنا عن الدقة المتناهية أن تحسب قوة التكبير على أساس قوة تكبير الميكروسكوب = قوة تكبير العدسة الشبيئية X قوة تكبير العدسة العينية.

ملاحظات على استخدام الميكروسكوب:

- ١- يستخدم السطح المستوى من المرآة عند استعمال المكثف لزيادة شدة الإضاءة مع استخدام قوة التكبير العالية بينما يستخدم السطح المقعر للمرآة عندما لا يكون المكثف فى وضع الاستعمال وذلك مع العدسات ذات قوة التكبير الصغرى.

- ٢- يجب فحص العينات بالميكروسكوب وكلتا العينين مفتوح.
- ٣- صورة العينة تكون مقلوبة عندما تصل إلى العينين ولذلك عندما تحرك الشريحة إلى اليمين فان العينة تتحرك إلى جهة اليسار.
- ٤- إذا كنت تستخدم إضاءة غير ضوء الشمس فلذلك ينبغي استخدام مرشح ضوئي "فلتر" أزرق اللون أسفل المكثف.
- ٥- تأكد من وجود الغطاء الزجاجي إلى أعلى عند وضع الشريحة على منصة الميكروسكوب خصوصا عند الفحص باستخدام قوة التكبير العظمى.

#### الفحص بالعدسة الزيتية:

يجب أولا تحديد المنطقة المراد فحصها بواسطة عدسة التكبير الكبرى الجافة ثم لف القطعة الأنفية لتصبح العدسة فى وضع التشغيل ثم يتم وضع قطرة من الزيت على الشريحة ويتم غمر العدسة رويدا حتى تنغمس فى قطرة الزيت. يفضل فى هذه الحالة استخدام الضابط الصغير حتى تتضح الرؤية الكاملة للعينة. يجب رفع المكثف إلى أعلى حتى يلامس أسفل الشريحة للفحص بالعدسة الزيتية.

بعد الانتهاء من الفحص يجب تنظيف العدسة الزيتية بواسطة قطعة ناعمة من القماش مبللة بمادة والزيلول ثم تجفف بقطعة من الورق الجاف.

#### الميكروتوم:

هناك بصفة عامة ثلاثة طرز من الميكروتومات وهى الميكروتوم الشمعي الميكروتوم الثلجي ميكروتوم التقطيع البارد.

أ- الميكروتوم الشمعي: صمم هذا الجهاز بواسطة العالم كمنجز سنة ١٧٧٠م وكانت يسمى بالة التقطيع وفى عام ١٨٣٩م أطلق عليه العالم تشيفاليز لقب الميكروتوم (آلة التقطيع الدقيق).

#### أنواع الميكروتوم الشمعي:

- ميكروتوم كامبردج الهزاز (شكل ٥): كان يستخدم لقطع العينات المطمورة فى الشمع منذ ١٠٠ عام وفيه يثبت السكين فى وضع رأسي ويتم تحريك القالب الشمعي فى خط منقوس أمام السكين وذلك بتحريك يد الميكروتوم فى مستوى أفقى.
- الميكروتوم الدوار: صمم هذا الطراز لأول مرة بواسطة مينوت ويستخدم لتقطيع العينات المطمورة فى الشمع وايضا فى نترات السيلولوز. ويعتمد تشغيل هذا الجهاز على إدارة عجلة الميكروتوم فى وضع رأسي . السكين فى هذا الطراز مثبت فى وضع رأسي ويتميز هذا الجهاز بسهولة تغيير زاوية ميل السكين بينما تتحرك العينة فى وضع رأسي.
- ميكروتوم الانزلاق: وهو يستخدم لتقطيع العينات المطمورة فى نترات السيلولوز ويلاحظ فيه أن السكين مثبت فى وضع أفقى مائل على اتجاه العينة وان حامل السكين مثبت على ممر خاص يتحرك عليه حامل السكين إلى الأمام والخلف وبذلك نحصل على القطاعات المطلوبة.
- الميكروتوم ذو القاعدة المنزلقة: يستخدم فى عمل قطاعات فى العينات كبيرة الحجم مثل الأجنة أو العينات الصلبة مثل العظام والأسنان. السكين فى هذا الطراز مثبت فى وضع أفقى بينما ماسك القالب الشمعي مثبت على ممر خاص يتحرك عليه هذا الماسك إلى الأمام والى الخلف أسفل مستوى السكين وبذلك نحصل على القطاعات الشمعية.
- الميكروتوم الثلجي: فى حالة الرغبة فى عدم تعريض العينات للحرارة العالية أو مذيبيات الدهون ينصح باستخدام هذا الطراز. والفكرة الأساسية فى الجهاز تعتمد على تجميد العينات قبل تقطيعها بواسطة اسطوانة مملوءة بغاز ثاني أكسيد الكربون المضغوط. توضع قطرة من الماء أسفل العينة على قرص الميكروتوم ثم تعرض للغاز حتى تتجمد. بإدارة يد الميكروتوم تتحرك السكين لتلامس العينة التي تظل ثابتة.

## سكين الميكروتوم:

يصنع سكين الميكروتوم من الصلب متوسط القساوة ويفضل السكين السميك عن السكين الرقيق، بينما حافة النصل ما تكون عادة وتدية الشكل (لعمل القطاعات الثلجية وتصلح أيضا للقطاعات الشمعية) بينما السكين ذو الحافة محدبة الوجهين فهي تستخدم مع القطاعات الشمعية أما السكينة ذات الوجه المستوي والآخر محدب فإنها تستخدم لقطاعات الشمع والسيلويدن. أما النصل ذو الناحية الرأسية والناحية المائلة المستقيمة فهي تستخدم مع العينات شديدة الصلابة مثلا العظم المتكلس أو الخشب (شكل ١١).

## الفصل الثاني

### (أ) التخصير:

فى كثير من التحضيرات يسبق الحصول على العينة تخصير الحيوان أو قتله ويراعى عدم تخصير الحيوان إذا كان الغرض من الدراسة الحصول على عينات من الخلايا أو علم كيمياء الأنسجة حيث أن طرق التخصير الكيميائية تسبب تلف فى الخلايا أو محتوياتها. ومن أهم طرق التخصير:

المادة	دواعي الاستخدام
١٠% كحول	حيوانات المياه العذبة
كلوريد ماغنسيوم (٢,٥-٧,٥%)	الحيوانات البحرية والجالسة منها
كبريتات الماغنسيوم	اللافقاريات البحرية أو البيئة العذبة
المنتول	الحيوانات الجالسة فى المياه بنوعها
بخار الايثير	الحشرات والعناكب
بلورات الكورال هيدريت	الحيوانات الهدرية والتريلاريا
دخان الطباق	الحيوانات الأولية الهدبية والسوطيات
الاختناق	البطنقديات
الكوروفورم	الثدييات كبيرة أو صغيرة الحجم

### (ب): الحصول على العينة من الحيوان:

يراعى عند تشريح الحيوان أن يتم التشريح فى محلول فسيولوجي مناسب يقلل من الخلل الذي يحدث فى النشاط الكيماوي للعضو المراد فحصه على أن يغمر هذا العضو بذلك المحلول. ومن أشهر المحاليل المستخدمة محلول رنجر وهو يتركب من:

- كلوريد صوديوم ٨٥ جم
- كلوريد بوتاسيوم ٢٥ و ٠ جم
- كلوريد كالسيوم ٢٥ و ٠ جم

- بيكربونات صوديوم ٢٥ و ٠ جم

- ماء مقطر ١٠٠٠ مللى

إذا كانت العينة ستؤخذ من حيوان متغير درجة الحرارة (أسماك-برمائيات-زواحف) يتم تقليص كمية كلوريد الصوديوم إلى ٦ و ٥ جم بدلا من ٨ و ٥ جم، ومن الممكن أن يقتصر المحلول الفسيولوجي على كلوريد الصوديوم فقط ( ٩٥ % ) فى حالة الحيوانات ثابتة درجة الحرارة مثل الثدييات.

يغسل العضو المنزوع من الحيوان يغسل فى محلول رنجر لإزالة الدم العالق به حتى لا يعوق عملية التثبيت. كما يراعى ألا يجف العضو فى الهواء بعد نزعها من الحيوان على ألا يتم الضغط على العضو عند انتزاعه حتى لا يحدث أى ضرر لأنسجته أو خلاياه.

### (ج) تثبيت العينات:

يتعرض الجزء المنزوع من جسم الحيوان إلى تحلل خلاياه وأنسجته وذلك بفعل البكتيريا أو بفعل الإنزيمات الموجودة داخل الأنسجة ولاشك أن هذا التحلل يغير من الصفات الشكلية والبنائية والكيمائية للنسيج مما يفسد الهدف من الدراسة. لهذا فان العضو بعد نزعها من الحيوان وغسله فى المحلول الفسيولوجي، يجب أن يوضع فى احد المحاليل الكيمائية التي تسمى مثبتات.

**الوظيفة:** هي مواد كيميائية تعمل على حفظ شكل الخلايا والأنسجة فى حالة اقرب ما تكون إلى الصورة الطبيعية.

### مواصفات المثبت:

١- أن يتخلل النسيج بسرعة حتى يمنع التغيرات التحليلية التي يمكن أن تحدث به.

٢- يحول المحتويات النسيجية إلى مواد غير ذائبة.

٣- يحمى النسيج من تغير الشكل كالانكماش أو التشوّه.

٤- يعطى النسيج درجة من الصلابة تسمح بالتعامل معه خلال الخطوات التالية.

٥- يحسن من معاملات انكسار الأجزاء النسيجية المختلفة ويجعلها سهلة التمييز

عند الصباغة.

أهم أنواع المثبتات شائعة الاستخدام:

١- محلول البوان :

أ- البوان المائي:

التركيب: محلول مائي مشبع من حمض البكريك ٧٥ مللي  
فورمالين ٢٥ مللي  
حمض خليك ٥ مللي

ب- البوان الكحولي:

يذاب حمض البكريك في كحول ٧٠% حتى التشبع ثم يؤخذ من المحلول المشبع ٧٥ مللي تضاف إلى بقية المكونات كما في البوان المائي. مدة التثبيت : البوان الكحولي أسرع من البوان المائي في تخلل الأنسجة والخلايا يستغرق عدة ساعات (٦-٨ ساعة)، بينما البوان المائي تستغرق حوالي يوم (٢٤ ساعة لاكتمال التثبيت) نظرا لان يذوبان حمض البكريك اكبر منها في الكحول عن الماء.

٢- الفورمالين:

- التركيب:

فورمالين ١٠ مللي  
١٠% محلول مائي من كلوريد كالسيوم لا مائي ١٠ مللي  
ماء مقطر ٨٠ مللي

دواعي الاستخدام: مثبت جيد في حالة التحضيرات الكاملة وفي تثبيت الأنسجة العصبية وحفظ المواد الدهنية. يستحسن معادلة الحمض بإضافة كمية من كربونات الصوديوم للعبوة ورج الزجاجه جيدا. مدة التثبيت: ٢٤ ساعة ولا يوجد ضرر أن تترك العينة في الفورمالين لفترة أطول.

### ٣- فورمول - خليك - كحول :

١٢-٢٠ملى	- ٩٥% كحول
١ مللي	- حمض خليك تلجي
٦ مللي	- فورما لين
٤٠ مللي	- ماء مقطر

يضاف إلى المحلول قطرات من محلول مشبع بحمض البكريك.

مدة التثبيت: تتراوح بين ١٢ - ٢٤ ساعة.

الاستخدام: مثبت جيد للديدان الخيطية.

### ٤ - فورمول كالسيوم:

١٠ملى	-محلول مائي (١٠%) من كلوريد الكالسيوم اللامائي
١٠ملى	فورما لين
٨٠ملى	ماء مقطر

يضاف إلى ذلك كمية من مسحوق كربونات الكالسيوم.

مدة التثبيت : ٢٤ ساعة يلزم بعدها غسل العينة لإزالة الزائد من الفورمالين.

الاستخدام: مثبت جيد لكل من الإنزيمات والدهون.

### ٥ - محلول كار نوى:

٦٠ملى	كحول مطلق
٣٠ملى	كلوروفورم
١٠ مللي	حمض خليك تلجي

مدة التثبيت: من ١٥ دقيقة إلى ٣ ساعات يتلوها غسل العينة فى الكحول الايثيلى

لمدة ساعتين لإزالة الكلوروفورم الزائد.

الاستخدام: مثبت جيد للأحماض النووية والبروتينات والجليكوجين.

### ٦ - فورمول كحولي:

١٠٠ مللي	٧٠% كحول ايثيلى
٥ملى	فورما لين

٥ملى

حمض خليك ثلجي

مدة التثبيت: من ساعة واحدة إلى ٢٤ ساعة.

الاستخدام: مثبت جيد للحشرات والقشريات.

٧- فورمول ملحي:

١٠٠ مللي

فورمالين

٨٥ جم

كلوريد صوديوم

٩٠٠ مللي

ماء

ينصح بوضع كمية من كربونات الكالسيوم لتعادل حمض الفورميك.

مدة التثبيت: ٢٤ ساعة على أن يغسل الفورمالين جيدا بعدها.

الاستخدام: مثبت جيد للديدان المفلطة.

## الفصل الثالث

### طرق تحضير بعض الأصباغ البيولوجية

من أشهر أنواع الصبغات المستخدمة فى التحضيرات المجهرية ما يلى:  
**أولاً: الهيماتوكسيلين:** تستخدم هذه المادة فى صباغة انويه الخلايا. وهذه المادة مستخلصة من خشب شجرة صغيرة تحمل نفس الاسم والتي توجد فى جنوب المكسيك وجاميكا. وإذا تعرضت هذه المادة للأكسدة فإنها تتحول إلى هيماتين ولأكسدتها يستخدم أي من أيودان الصوديوم أو برمنجانات الصوديوم أو أكسيد ألزئبقيك وذلك بعد إذابة أى منهم فى محلول كحولي. عند تمام عملية الأكسدة أو النضج فإن المحلول الناتج يتحول من اللون الأرجوانى إلى اللون البنفسجي الفاتح أو الزاهي ويترج فى اللون إلى الأحمر حتى يصل فى النضج إلى اللون البني الغامق وهو لون لا يصلح للاستخدام فى الصباغة واللون الأفضل هو اللون البنفسجي الفاتح.

**أنواع صبغات الهيماتوكسيلين:**

**١- إيرلش هيماتوكسيلين:**

هيماتوكسيلين	٢ جم
أمونيا ألم	٣ جم
كحول ايثيلى	١٠٠ مللى
جلسرين	١٠٠ مللى
ماء مقطر	١٠٠ مللى
حمض خليك تلجي	١٠ مللى

يذاب الهيماتوكسيلين فى الكحول ثم يضاف الحمض والجلسرين والماء. يتم نضج المحلول فى فترة تتراوح بين ٦-٧ أسابيع وإذا أريد استعمله فى الحال يضاف إليه أيودان الصوديوم (٤ و ٢ جم).

**٢- ويجرت أيرن هيماتوكسيلين:**

محلول (أ) : كلوريد الحديد	٤ مللى
ماء مقطر	٩٥ مللى

حمض هيدروكلوريك ( ٣٧ - ٣٨ % ) ١ مللى

محلول (ب): هيماتوكسيلين ١ جم

٩٥ % كحول ايثيلي ١٠٠ مللى

يتم إضافة كميات متساوية من المجموعتين أ، ب .

فى كلا النوعين يستخدم الشب المحمض فى النوع الأول والحديد فى النوع الثانى كمرسخ ودروه هو أن يربط بين مكونات النسيج والصبغ.

### اختبار صلاحية الصبغة:

١- رائحة الصبغ جيدة وتشبه رائحة الخل ولونها بنفسجى غامق- أحمر.

٢- إذا أضيفت قطرات من الصبغ إلى الماء الجارى تحول لون الصبغة إلى اللون الأزرق الغامق.

٣- عند وضع قطرات من الصبغ على ورق ترشيح فإن اللون الناتج عن انتشار الصبغة يكون كستنائى بينما الحواف بنفسجية قاتمة.

### ثانيا: الإيوسين :

أيوسين ١ جم

٧٠ % كحول ١٠٠٠ مللى

حمض خليك تلجى ٥ مللى

عند الاستعمال خذ كمية من المحلول وأضف إليها كمية مماثلة من ٧٠ % كحول ايثيلي وقطرتين من حمض الخليك. الصبغ حامضى يراعى إجراء نزع الماء من القطاعات بعد الصباغة بسرعة فى كحول ٩٥ % ثم الكحول المطلق.

### ثالثا: صبغة ليشمان:

بودرة صبغ ليشمان ٠١٥ جم

كحول ميثيلي نقى ١٠٠ مللى

لايستخدم المحلول قبل أسبوعين على أن يتم هضمه فى مكان مظلم.

### رابعا: صبغة جمسا:

صبغ جمسا ٠٥ جم

جلسرين

٣٣ملى

طريقة التحضير: يسخن المخلوط من المادتين لمدة ساعتين فى درجة حرارة ٦٠م ثم يضاف إليه ٣٣ملى كحول ميثيلى . يحفظ صبغ جمسا فى زجاجة دكنة اللون حتى لا يتلفها ضوء الشمس وعند الاستعمال يخفف الصبغ بنسبة ١:١٠ أو بإضافة محلول منظم فوسفاتي ذو أس هيدروجيني يتراوح بين ٦و٤ - ٧و٢.

#### خامسا: صبغ الكارمين:

كارمين ٤جم

ماء مقطر ١٤ملى

حمض هيدروكلوريك مركز ١ملى

يسخن المحلول برفق ويترك ليغلى لمدة ١٠ دقائق ثم يبرد فجأة ثم يضاف الي الخليط ٩٥ملى من ٨٥% كحول ايثيلى ويرج جيدا تم يرشح.

## الفصل الرابع

### التحضيرات الكاملة

#### ١- التحضيرات الجافة

هي طريقة تستعمل للتراكيب التي تكون فى الأصل جافة أو يمكن تجفيفها دون إتلافها مثل المثقبات وأشواك الإسفنج وأجنحة الحشرات والریش والشعر والأسنان.

#### - الطريقة:

أ- إذا كانت العينة شفافة: يجهز حيز يسمح بعمق مناسب لسمك العينة فوق الشريحة وذلك باستخدام قطع زجاجية صغيرة توضع فى أركان الشريحة وتلصق بمادة الكندا بلسم. تنقل العينة الجافة بواسطة ملقط أو إبرة تشريح إلى الحيز المحدد على الشريحة. تثبت العينة فوق الشريحة باستخدام مادة صمغية مثل الكندا بلسم . يغطى الحيز بالغطاء الزجاجي ويثبت بالكندا بلسم ويترك فى فرن عدة ساعات فى درجة حرارة ٦٠°م.

ب- إذا كانت العينة معتمة: يتم تجهيز الشريحة بنفس الطريقة السابقة ثم يطلى قاع الشريحة بمادة معتمة لون اسود مثلا إذا كانت العينة بيضاء اللون. تنقل العينة بعدها إلى تجويف الشريحة وتثبيت بواسطة الكندا بلسم كما سبق.

#### ٢- التحضيرات الكاملة لعينة رطبة

هي طريقة تستعمل للكائنات الحية صغيرة الحجم أو الأجزاء الصغيرة من الحيوانات حتى يمكن تحميلها على الشريحة الزجاجية وفحصها فى الضوء المار. فى هذه الحالة غالبا ما تحتاج عينات اللاقاريات أو اليرقات إلى التخدير أو القتل قبل التثبيت. ويمكن لهذه التحضيرات مصبوغة أو غير مصبوغة. فى العينات المصبوغة تجرى عملية إزالة الماء من العينة بواسطة سلسلة متصاعدة من تركيزات الكحول ثم يتم ترويق العينة بواسطة مروق كيميائي مثل والزيلول ثم

تحمل الشريحة فى وسط التحميل ، وهو عادة مادة كندا بلسم. أما العينات غير المصبوغة فهي تحمل على الشريحة فى والجلسرين أو الجلسرول جيلى.

- تثبيت الحيوانات اللافقارية بغرض التحميل الكامل
- الأوليات: يمكن تثبيت الحيوانات الأولية فى محلول بوان لمدة تتراوح بين ١٠-٤٠ دقيقة ثم تغسل فى ٧٠% كحول.
- الجوفمعويات: يفضل تثبيت العينات فى محلول بوان ساخن.
- التربلاريا والتريماتودا: تثبت العينات فى فورمول ملحي مع سبليميت ألكليك ولضمان جودة التثبيت توضع الدودة الكبدية بين شريحتين زجاجيتين يضغطان معا برباط من المطاط ويوضع الكل فى الفور مول الملحي .
- السستودا: لابد أن يحتوى المثبت على كلوريد ألزئبتيك.
- الديدان الخيطية: فى ٧٠% كحول دافئ أو (فورمالين – كحول- خليك).
- المفصليات: تثبت عادة فى الكحول أو محلول البوان أو فورمول كحولي شرط إضافة كلوريد ألزئبتيك.

#### أولاً: تحضيرات التحميل الكامل الغير مصبوغة

- تحضيرات تطمر فى الهواء:  
قد تكون العينة شفافة وترى فى لضوء المار مثل الأجنحة العشائية للحشرات أو قد تكون معتمة مثل أصداف المثقبات وقطاعات العظم وهى تدرس فى الضوء المنعكس ويستحسن وضع العينات على أرضية قاتمة.
- تحضيرات تطمر فى وسط تحميل يذوب فى الماء:  
وهى تستخدم فى تحضيرات الديدان الاسطوانية الصغيرة أو بيض الديدان حيث يتم طمرها فى والجلسرين أو الجلسرول جيلى.
- تحضيرات تطمر فى وسط صمغي:  
وهى أفضل من النوع السابق فيما لو كان المرغوب فيه الاحتفاظ بتحضيرات دائمة. ومن المستحسن أن تجرى عملية التبييض للعينات التي تحتوى على صبغات كثيفة حتى تصبح أكثر شفافية. وإذا كان المطلوب الحصول على تحضير

مسطح للهيكل فيجب إذابة الأجزاء الطرية من جسم الحيوان بأية مادة كيميائية مناسبة. ويمكن إن تطمر بعض العينات الجافة ( أشواك- شعر – ألواح هيكلية) بدون أية معاملة سابقة في الوسط الصمغي مباشرة.

توضع على العينة قطرة من الزيلول أو التريينول قبل وضع الصمغ وذلك لتجنب تكوين فقاعات هوائية حول العينة.

## الفصل الخامس

### السحبات والسحقات

#### تحضيرات السحبات:

تشتمل هذه التحضيرات على ثلاثة أنواع:

(١) سحبات الأوليات وسحبات البراز

(٢) سحبات الدم

(٣) سحبات الحيوانات المنوية

أولاً: سحبات الحيوانات الأولية وسحبات البراز:

تحضير سحبة مبللة من البراز :

١- امسك نملة بيضاء من عند منطقة الرأس أو الصدر وبالملقط ضعها على ظهرها عند منتصف الشريحة.

٢- امسك بإبرة الحلقات الثلاث الأخيرة من البطن واسحب القناة الهضمية للخرشة.

٣- أضف قطرتين من محلول ٧٥ و ٠% كلوريد الصوديوم على الأمعاء ثم افتحها لإطلاق ما بها من أوليات إلى المحلول الملحي.

٤- امسك الأمعاء بإبرة تشريح واسحب العينة فوق الشريحة.

٥- لضمان عدم هروب الحيوانات الأولية من فوق الشريحة يحبذ دهن الشريحة بمحلول ماير البيومين ثم تفرغ محتويات القناة الهضمية فوق الشريحة.

٦- اغمس الشريحة في إناء غير عميق به مثبت شودين لمدة ٢٠ دقيقة بحيث يكون السطح الذي عليه السحبة إلى أسفل.

٧- تغسل الشريحة في ٧٠% كحول لمدة ٥ دقائق لإزالة الزائد من المثبت ثم توضع الشريحة في محلول ٧٠% كحول مشبع باليود(٥مللى) + ٩٥ مللى كحول ٧٠% وتترك في المحلول لمدة ٢٠ دقيقة أخرى.

٨- تغسل الشريحة لمدة ١٥ دقيقة في ٧٠% كحول مرة ثالثة.

- ٩- مرر الشريحة فى سلسلة هابطة من الكحوليات (٨٠، ٥٠، ٧٠، ٣٠) ثم تغمس فى الماء المقطر.
- ١٠- تصبغ العينة فى الهيماتوكسيلين لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة.
- ١١- يعاد غسل الشريحة فى الماء المقطر.
- ١٢- افحص العينة تحت الميكروسكوب الضوئى حيث يتميز الأنوية باللون الأزرق الغامق.
- ١٣- انزع الماء من العينة بتمريرها فى سلسلة متصاعدة التركيزات الكحولية (٨٠، ٧٠، ٩٠، ١٠٠%) لمدة ٣ دقائق فى كل تركيز.
- ١٤- ضع العينة فى محلول زيلول ٥ دقائق للتزويق.
- ١٥- حمل العينات فى الكندا بلسم ثم غطها مباشرة بالغطاء الزجاجي وضعها فى الفرن عمده ٣٧°م حتى تجف.

### ثانيا سحبات الدم:

يمكن تحضير نوعين من سحبات الدم ، سحبة دم رقيقة عادة تجرى فى الفقاريات ومنها الإنسان وسحبة دم سميكة فى حالة عينة من دم اللافقاريات أو فى حالة التأكد من خلو الدم من الطفيليات أو الإصابة بها فى الفقاريات. تتم صبغة سحبة الدم إما بواسطة صبغة "جمسا" أو بواسطة الهيماتوكسيلين –أيوسين.

### طريقة تحضير سحبة الدم:

- ١- تحضير سحبة دم السمكة : ضع عدة قطرات من الدم على الشريحة عند مركزها ثم اسحب الدم على الشريحة بتحريك قضيب زجاجي على سطح الشريحة فى اتجاه دائري. جفف العينة فى الهواء.
- ٢- تحضير سحبة دم رقيقة:

- يتم غسل الشرائح بالماء والصابون ثم تغسل بالكحول (٩٥%) وتجفف.

- امسك بشريحة زجاجية نظيفة أخرى ثانية من طرفها وضع طرفها الآخر على سطح الشريحة الأولى بحيث تكون زاوية حادة مع الشريحة التي تحمل قطرة الدم. ادفع بالشريحة الثانية وهى فى وضع ملامس للشريحة الأولى تجاه قطرة

الدم حتى تلمسها وبذلك تقع قطرة الدم فى الزاوية الحادة بين الشريحتين . حرك الشريحة الثانية على سطح الأولى فى اتجاه عكسي فيتم سحب الدم على سطح الشريحة الأولى، ويجب أن تتم هذه العملية بسرعة كبيرة قبل أن يتجلط الدم.  
- يتم تجفيف الشريحة التي تحمل السحبة فى الهواء.  
- ثبت الدم فى الكحول الايثيلى لمدة ٥ دقائق.  
- نبدأ بعملية الصباغة.

(أ): صباغة سحبة الدم الرقيقة بصبغة "ليشمان" (راجع تركيب الصبغة):

اغمر الشريحة ببضع قطرات من الصبغة لمدة دقيقة واحدة ثم ضع على الشريحة محلولاً منظماً (Ph 6.8) وحرك الشريحة حتى يختلط المحلول جيداً بسحبة اغسل الشريحة بالماء المقطر حتى تظهر الشريحة بلون قرمزي ثم جففها فى الهواء. انزع الماء من العينة بسلسلة متصاعدة من الكحولات وروث العينة فى والزيلول وحمل الشريحة فى الكندا بلسم.

(ب): صباغة سحبة الدم الرقيقة بصبغتي هيماتوكسيلين/أيوسين :

تنقل الشريحة إلى سلسلة هابطة من الكحولات (٩٠-٨٠-٧٠-٦٠-٥٠) لمدة دقيقتان فى كل تغييره ثم ضع الشريحة فى الهيماتوكسيلين لمدة ٤٥ دقيقة. اغسل الشريحة بالماء المقطر لإزالة الزائدة من الصبغ. ضع العينة فى سلسلة متصاعدة من الكحولات ثم اصبغ فى الأيوسين لمدة ١٥ دقيقة ثم اغسل الشريحة فى كحول ٩٥% لمدة ٥ دقائق. روق العينة فى تغيير تين من والزيلول ثم حمل الشريحة فى الكندا بلسم.

### ثانياً: إعداد السحقات

طريقة إعداد سحقات القمة النامية فى جذور النباتات باستخدام الكارمين:

- بصلة واغمر ساقها فى الماء لتحفيز نمو الجذور وعندما يصل طول الجذر إلى ١ سم اقطع القمم النامية وضعها فى مثبت كارنوى لمدة ٢٤ ساعة.
- انقل جذور النبات إلى صبغ الكارمين لمدة ٥ أيام.

- انقل الجذور إلى محلول ٧٠% كحول ايثيلي كل ٢٤ ساعة لمدة ٣ أيام حتى لا يتأثر لون الكحول ولو استدعى زيادة مدة المعاملة فى الكحول عن ٣ أيام.
- انقل الجذور إلى الشريحة وضع فوقها قطرات من حمض ألكليك (٤٥%) ثم فنتها باستخدام قضيب زجاجي.
- غط الشريحة بغطائها الزجاجي ثم ضع ورقة ترشيح أعلاها مع الضغط فوقها برفق.
- سخن الشريحة على لهب هادئ حتى تلتصق العينة بالشريحة.
- ضع الشريحة فى وضع مقلوب فى طبق بترى يحتوى على ٤٠% كحول ايثيلي حتى ينفصل الغطاء عن الشريحة.
- مرر الشريحة فى سلسلة متصاعدة من الكحولات لنزع الماء ثم روق العينة بالزيتول وحمل فى الكندا بلسم.

## الفصل السادس

### تحضيرات القطاعات الشمعية والميكروسكوبية

لاغني للمهتمين بدراسة تركيب أجسام الحيوانات والنباتات عن عمل قطاعات رقيقة فيها بقصد فحص أنسجتها وخلاياها تحت المجهر الضوئي. وفى الدراسات الروتينية يطمر الحيوان (إذا كان صغيرا) أو جزء منه فى الشمع المنصهر بعد إجراء العمليات اللازمة (بروتوكول التحضيرات المجهرية) من :

١- تثبيت

٢- نزع الماء عن طريق الكحولات.

٣- تزويق العينة باستخدام مادة تذوب فى كل من الكحول والشمع مثل والزيلول .

٤- الطمر فى الشمع لتصبح العينة داخل مكعب شمعي يغلفها.

٥- التقطيع بالة الميكروتوم على سمك يتراوح بين ١ ميكرون إلى ٦ ميكرون

حسب طبيعة النسيج.

٦- تلصق القطاعات على الشريحة الزجاجية ويذاب الشمع المحيط بها بالزيلول .

٧- الصباغة عادة فى الهيماتوكسيلين /أيوسين وذلك للتمييز بين النواة

والسيتوبلازم المحيط بها داخل كل خلية.

٨- تزويق الشريحة لتسهل عبور الضوء خلال القطاع.

٩- التحميل وذلك باستخدام أى من المواد المتخصصة مثل "كندا بلسم- دى بى

اكس- الجلسرول جيلى- الاوبيرال - الخ".

- **التشريح واستئصال العينة:** تمت مناقشة هذا الجزء فى الباب الأول ولا

داعي للتكرار مرة أخرى.

١- **معاملة العينة بعد التثبيت:** يجب ازالة الزائد من المثبت داخل العينة وإلا

حصلنا على صباغة غير جيدة للقطاعات أو نشاهد رواسب بلورية فى

النسيج، وتوجد عدة طرق لمعالجة هذه المشكلة:

- **إزالة الزائد من:** مادة الفورمالين ، حمض الكروميك، بيكرومات

البوتاسيوم، حمض الاوزميك: تزال الزيادة بغسل العينة فى الماء لمدة

٢٤ ساعة وان كان المعالجة بالكحول ال هيدريت (٢٠%) لمدة ٢٤ ساعة على مرتين متتاليتين يعطى نتائج أفضل .

- إزالة الزائد من حمض البكريك: يزال الزائد من حمض البكريك بوضع العينة فى كحول ٧٠% مضافا إليه قطرات من محلول مشبع من كربونات الليثيوم لفترة حتى يزول اللون الأصفر من القطاعات.
- إذا ظهر اللون الأصفر فى القطاعات بعد الغسيل فإنه سيزول عند المعاملة بسلسلة الكحولات.

٢- نزع الماء من العينات: تحتوى معظم المثبتات على الماء لذا لزم نزع الماء من العينة قبل أن توضع فى الشمع. أما إذا كان المرغوب عمل قطاعات ثلجية فلا تجرى عملية نزع الماء.

- كيف تقوم بنزع الماء من العينة: توضع العينة فى سلسلة متصاعدة من تركيزات الكحولات (٥٠-٦٠-٧٠-٨٠-٩٠-٩٥) ثم فى النهاية تغيريتين من الكحول المطلق ، ويعتمد الوقت اللازم لوضع العينة فى كل تركيز من السلسلة على حجم ونوع العينة. وإذا كنت تريد أن تحتفظ بالعينة لفترة قبل استكمال كل البروتوكول فتحفظ العينة فى تركيز كحول ٧٠%.

٣- التزويق: هي خطوة وسيطة بين عملية نزع الماء بالكحول وعملية الطمر فى الشمع حيث أن الكحول لا يذوب فى الشمع ولذا لابد من وضع العينة فى سائل وسيط يذوب فى كليهما الكحول والشمع. ومن أشهر المواد المستعملة فى التزويق والزيلول والتلوين والبنزين وزيت السيدر وزيت القرنفل.

- إذا حدث تعكير للعينة بعد التزويق فهذا يعنى أن العينة مازالت تحتوى على ماء زائد داخل الأنسجة. ولعلاج هذه المشكلة فعليك بالرجوع تنازلياً تركيزات الكحول ثم العودة مرة أخرى تصاعدياً مع زيادة الوقت فى كل تركيز كحولي عن المرة السابقة.

٤- التشبع فى الشمع: تنقل العينة إلى الفرن عند درجة ٥٦-٦٤ م° حيث توضع بالتتابع فى ٤ أوانى زجاجية تحتوى على خليط من الشمع وسائل التزويق

وتحتوى الأوانى الثلاث الباقية على شمع منصهر. توضع العينات فى هذه الأوانى لمدة زمنية تتراوح بين ٤/١ ساعة إلى ٢ ساعة فى كل مرة.

- أنواع الشمع: شمع طرى درجة انصهاره تتراوح بين ٥٠-٥٢ م°، شمع جامد وتتراوح درجة انصهاره بين ٥٨-٦٢ م°.

٥- **الطمر فى الشمع:** يجهز حيز خارج الفرن يصب فيه الشمع أولاً ثم تلقى فيه العينة ويترك الشمع ليتجمد محتويا العينة بداخله. والحيز عبارة عن حرفي "L" يوضع احدهما عكس وضع الآخر ليشكلا مربع أو مستطيل الشكل له قاعدة وليس له غطاء ويصنع هذا الشكل من الخشب أو المعدن. فى حالة إذا ما كان الحيز معدني يراعى أن يوضع فى الفرن ليأخذ نفس درجة حرارة الشمع المنصهر حتى لا يعجل بتجمد الشمع. يملأ تجويف الحيز أولاً بالشمع ثم يتلو ذلك وضع العينة.

- قبل تقطيع العينة الميكروتوم يلزم تشذيب القالب الشمعي بإزالة الشمع الزائد عن المطلوب بحيث لا يزيد عن ٢مم من جميع الجهات فيما عدا الجهة التي سيثبت من عندها القالب فى الميكروتوم.

- ثبت القالب فى ماسك القالب الشمعي الميكروتوم وذلك بتسخين قاعدة القالب الشمعي بقضيب معدني أو قاعدة مشرط مستغنى عنهما كما توضع قطعة صغيرة من الشمع على سطح ماسك القالب الشمعي ويجرى صهرها بنفس الطريقة ثم يثبت قالب الشمع على ماسك القالب الشمعي بسرعة ثم يغمر الماسك وعليه قالب الشمع فى ماء بارد لمدة دقيقتين حتى يتجمد الشمع المستخدم فى اللصق ويثبت القالب تماما فوق سطح الماسك.

#### ٦- تقطيع العينات:

يجرى تقطيع قالب الشمع على الميكروتوم حسب مقتضيات الدراسة بعد تحديد السمك المطلوب على جهاز الميكروتوم والذي يتراوح بين ٣-٦ ميكرون. تخرج القطاعات فى تتالى تماما مثل الشريط مترابطة مع بعضها البعض.

## العيوب التي تظهر في القطاعات الشمعية وعلاجها

- ١ - القطاعات لا تلتصق لتكون شريط متصل:
  - الشمع المستخدم في الطمر من النوع الجامد.
  - درجة ميل سكين لتقطيع عالية ويتحسن ثقلها.
  - سمك القطاع كبيرا وينبغي تقليله.
  - حافة السكين العليا غير نظيفة. امسح هذا الطرف بقطعة ناعمة من القماش مبللة بالزيت.
  - درجة الحرارة في الغرفة منخفضة كثيرا عن درجة انصهار الشمع.
- ٢ - العينة تتفتت وتسقط من القالب الشمعي وذات مظهر طباشيري:
  - في هذه الحالة لم يخلل الشمع أنسجة العينة بصورة كافية أو لم يتم نزع الماء من العينة.
- ٣ - انفصال قطاع العينة عن قطاع الشمع :
  - يبرد القالب الشمعي في ماء الثلج قبل التقطيع مع إعادة الطمر ثانية في شمع له حرارة انصهار أعلى.

## الصباغة

بعد تحميل القطاعات الشمعية على الشرائح ، يجب أن تجفف في حضانة عند درجة حرارة ٣٧° ولمدة ٢٤ ساعة على الأقل. ويمكن تخزين القطاعات بعد ذلك لأية فترة دون أن تتلف بشرط حمايتها من الأتربة ورجات الحرارة المرتفعة. ولكن لا بد أن يزال الشمع أولا من القطاعات باستخدام الزيت عادة ثم تمرر بعد ذلك في سلسلة هابطة من الكحولات ( ١٠٠ و ٩٥ و ٨٠ و ٧٠ و ٦٠ و ٥٠ %) ثم الماء المقطر وذلك إذا كان الصبغ ذائبا في الماء أما إذا كان الصبغ ذائبا في تركيز معين من الكحول فيجب أن تمرر الشرائح في سلسلة حتى تصل إلى تركيز الكحول المذيب للصبغة ومنه تنقل الشرائح إلى الصبغ مباشرة.

## التمييز

يقصد بالتمييز إزالة الصبغ الزائد من القطاع ويستعان فى الحكم على درجة الصبغ باستخدام المجهر. وتتنوع محاليل التمييز حسب طريقة الصباغة ففي حالة الصباغة بالهيماتوكسيلين والايوسين الروتينية يستخدم شب الحديد فى حالة صباغة الحبيبات السبحية بطريقة هايدن هان هيماتوكسيلين. ويراعى عند فحص القطاع للحكم على مدى التمييز أن تغسل الشريحة فى الماء المقطر لإزالة محلول التمييز من القطاع حتى تقف عملية التمييز أثناء فترة فحص القطاع.

## **نزع الماء – الترويق**

**نزع الماء :** تتم عملية نزع الماء من القطاعات بتمرير الشرائح فى سلسلة متزايدة من الكحول (٣٠ و٤٠ و٥٠ و٦٠ و٧٠ و٨٠ و٩٠ و٩٥ و١٠٠%) وتترك الشرائح مدة ٣ دقائق فى كل تغييره تزداد إلى ٥ دقائق بالنسبة للكحول المطلق. **الترويق:** يتم ذلك بسائل قابل للذوبان فى كل من الكحول المطلق وصبغ التحميل ومن أشهر سوائل الترويق والزيلول. ويراعى التنبه إلى المادة المذيبة لصبغ التحميل حتى يجرى الترويق فى هذه المادة المذيبة. توضع الشرائح فى مخلوط من الكحول المطلق والزيلول ثم تغيريتين من والزيلول بمفرده، وتوضع الشرائح ٥ دقائق فى كل من التغييرات الثلاث.

## **مواد تحميل العينات والقطاعات**

هي سوائل تقترب معاملات انكسارها من معامل انكسار الزجاج (١٥ و١٨) وتوضع بين العينة الواقعة على الشريحة والغطاء الذي يغطى العينة. وهناك نوعان من مواد التحميل:

- أ- مواد تحميل صمغية للتحضيرات التي ينزع منها الماء فى الكحول وتروق فى والزيلول.
- ب- مواد تحميل مائية للتحضيرات التي يفسدها استخدام الكحول والزيلول ولذا فهي تغسل فى الماء وتحمل فى مواد تذوب الماء.

(أ): مواد تحميل الصمغية:

- ١ - كندا بلسم: معامل انكساره (١٥٢٤ و ١) ويحمل فيه بعد التزويق فى والزيلول ويجب أن يحفظ هذا الصمغ فى زجاجة داكنة اللون.
- ٢ - ايوبارال: معامل انكساره (١٤٨٣ و ١) وتمكن التحميل فيه من ٩٥% كحول مباشرة فى حالة إذا ما أريد تجنب الكحول المطلق والزيلول.
- ٣ - دى بى أكس: وتحمل العينات فيها بعد التزويق فى والزيلول وتتميز بسرعة الجفاف.

(ب): مواد التحميل المائية:

- ١ - جليسرول جيلى : ينوب ١٠ حم جيلا تين فى ٦٠ مللي من الماء فى حمام مائي ثم نضيف إلي الكأس ٧٠ مللي من والجلسرين النقي و (٠٢٥) حم من الفينول وتقلب جيدا وتحفظ فى زجاجة محكمة الغلق.
- ٢ - مادة تحميل فارانتس:

ماء مقطر	٤٠ مللي
صمغ عربي	٤٠ جم
جلسرين	٢٠ مللي
فينول احمر	٠١ جم

#### تغطية العينات

- اغسل الأغطية فى الكحول وجففها بمنشفة نظيفة خالية من الوبر.
- خذ الشريحة من سائل التزويق وتأكد من الناحية التي عليها العينة ومن المفيد أن نفعل ذلك مع كل شريحة. ضع الشريحة فى وضع افقى بحيث يكون السطح الذي عليه العينة إلى أعلى.
- ضع كمية مناسبة من مادة التحميل بواسطة قضيب زجاجي عند طرف العينة.
- امسك غطاء الشريحة من حافتيه الجانبيتين بين الإبهام والسبابة والحافة الثالثة تلامس سطح الشريحة بحيث يكون الغطاء مائلا بدرجة ٤٥ تقريبا و امسك

- بالملقط فى يدك اليمنى بالحافة الرابعة للغطاء. اجعل الغطاء يهبط تدريجيا على الشريحة حتى يستقر الغطاء فوق الشريحة دون تكون فقاعات هوائية.
- ضع الشريحة فى حضان دافئ عند  $37^{\circ}\text{C}$  لمدة يوم واحد حتى تجف مادة التحميل.
  - أزل مادة التحميل الزائدة عن حدود غطاء الشريحة باستخدام شفرة حادة ثم يمسح بقايا مادة التحميل بقطعة قماش مبللة بالزيتول.
  - تسجل بيانات الشريحة على ورق لصق على السطح العلوي للشريحة وتوضع إما يمين أو يسار العينة.