التحضيرات المجهرية الضوئية

منتدى إقرأ الثقافي

OPTICAL LABORATORY PREPARATIONS

www.iqra.ahlamontada.com

النظرية والتطبيق

الأستاذ الدكتور
حميد أحمد الحاج

لمزيد من الكتب وفي جميع المجالات

زوروا

منتدى إقرأ الثقافي

الموقع: http://iqra.ahlamontada.com/

فيسبوك:

https://www.facebook.com/iqra.ahlamontada/

بسم الله الرحمن الرحيم

التحضيرات المجهرية الضوئية

OPTICAL LABORATORY PREPARATIONS

النظرية والتطبيق

رقـــــم التصـــنيف 542.1
المؤلف ومن هو في حكمه حميد أحمد الحاج
عنـــــوان الكـــــتاب التحضيرات المجهرية الضوئية
رقـــــم الإيـــــداع 2009/9/4062
الـــواصـــفـــات المختبرات/ المجهرية/ البيولوجيا
بـــيانـــات الـــنشـــر عمان - دار المسيرة للنشر والتوزيع

تم إعداد بيانات الفهرسة والتصنيف الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

حقوق الطبع محفوظة للناشر

جميع حقوق الملكية الأدبية والفنية محفوظة لدار المسيرة للنشر والتوزيع عمان – الأردن ويحظر طبع أو تصوير أو ترجمة أو إعادة تنضيد الكتاب كاملاً أو مجزاً أو تسجيله على اشرطة كاسيت او إدخاله على الكمبيوتر أو برمجته على إسطوانات ضوئية إلا بموافقة الناشر خطياً

Copyright © All rights reserved

No part of this publication may be translated, reproduced, distributed in any form or by any means,or stored in a data base or retrieval system , without the prior written permisson of the publisher

الطبعـــة الأولـــى 2010م – 1431هـ
الطبعـــة الثانية 2012م – 1433هـ
الطبعـــة الثالثة 2015م – 1436هـ

دار المسيرة
للنشر والتوزيع والطباعة
شركة جمال أحمد محمد حيف وإخوانه

عنوان الدار

الرئيسي : عمان - العبدلي - مقابل البنك العربي هاتف : 5627049 6 962+ فاكس : 5627059 6 962+
الفرع : عمان - ساحة المسجد الحسيني - سوق البتراء هاتف : 4640950 6 962+ فاكس : 4617640 6 962+
صندوق بريد 7218 عمان - 11118 الأردن

E-mail: Info@massira.jo . Website: www.massira.jo

التصميم والاخراج بالدار - دائرة الانتاج

التحضيرات المجهرية الضوئية

OPTICAL LABORATORY PREPARATIONS

النظرية والتطبيق

الأستاذ الدكتور
حميد أحمد الحاج

الإهداء

إلى روح أمي ... وإلى روح أبي... أساس وجودي

إلى زوجتي ... شريكة حياتي

إلى أولادي: أحمد- أمجد- أمين- أشرف- أكرم... امتداد حياتي

وإلى الأحفاد: زين- حميد- أدم

وإلى القادمين منهم بإذن الله

إلى أهلي وأقاربي...

إلى المؤمنين بتعريب العلوم...

مع محبتي وتقديري

الفهرس

المقدمة 11
تمهيد 13

الجزء الأول
(الأسس النظرية)

الفصل الأول: التثبيت 17
1. فوائد التثبيت 17
2. مواصفات المثبت الجيد 17
3. أسس التثبيت 18
4. طرائق التثبيت 19
5. أساليب التثبيت 23
الفصل الثاني: الغسل وإزالة الماء والترويق 27
1. الغسل 27
2. إزالة الماء 27
3. الترويق 29
الفصل الثالث: التشريب والطمر 33
1. التشريب 33
2. الطمر 34
3. وسائط التشريب والطمر 36
الفصل الرابع: تقطيع وتحميل الأنسجة 37
1. التقليم 37
2. التثبيت على الحامل 38
3. التحضير للقطع 39
4. أنواع المقاطع 41

5. خطوات التقطيع 42
6. مشاكل التقطيع 43
7. تحميل المقاطع 45
الفصل الخامس: صبغ الأنسجة 49
1. نظرية الصبغ 49
2. تصنيف الصبغات 50
3. مرسخات الصبغة 58
4. طرائق الصبغ 59
5. التمييز 60
6. التحوّل اللوني 61
7. الصبغ الحيوي 61
8. حالات صبغ العينات 63
الفصل السادس: تغطية المقاطع ووسم الشرائح 65
1. أهمية تغطية الشرائح 65
2. مواصفات وسط التغطية 65
3. أنواع وسائط التغطية 66
4. طريقة تغطية المقاطع 68
5. تنظيف ووسم الشرائح 70
الفصل السابع: طرائق المسح والهرس والتجميد 71
1. المسح 71
2. الهرس (الدعك) 73
3. التجميد 74
الفصل الثامن: النماذج الكاملة 77
1. النماذج الكاملة المؤقتة 77
2. النماذج الكاملة المستديمة 78

الجزء الثاني
(التطبيقات)

الفصل التاسع: الأدوات والزجاجيات 83
1. أدوات التشريح 83
2. قوالب الطمر 84
3. حوامل قوالب الشمع 85
4. الزجاجيات 86
5. علب الشرائح 92
6. أدوات متفرقة 93
الفصل العاشر: الأجهزة اللازمة في التحضير المجهري 95
1. أجهزة التقطيع 95
2. سكاكين أجهزة التقطيع 99
3. أفران صهر الشمع 104
4. مناضد تدفئة الشرائح 105
5. الأجهزة المتخصصة 106
الفصل الحادي عشر: المثبتات 111
1. مثبتات الفورمالين 111
2. مثبتات حمض البكريك 112
3. المثبتات المعدنية 113
4. المثبتات الكحولية 113
الفصل الثاني عشر: مزيلات الماء ووسائط الترويق 115
1. مزيلات الماء 115
2. وسائط الترويق 117
الفصل الثالث عشر: وسائط التشريب والطمر 121
1. الماء 121
2. الجيلاتين 122
3. شمع البرافين 123

الفصل الرابع عشر: محاليل الصبغ والتمييز 125
1. الصبغات النووية 125
2. الصبغات السيتوبلازمية 129
3. صبغات النماذج الكاملة 130
4. الصبغات الحيوية 132
5. محاليل التمييز 132
الفصل الخامس عشر: وسائط لصق وتغطية المقاطع 133
1. وسائط لصق المقاطع 133
2. وسائط تغطية الشرائح 135
الفصل السادس عشر: تحضير مسحة دم إنسان 139
1. مكونات الدم الخلوية 139
2. صبغات الدم المتعادلة 141
3. المحاليل والأدوات اللازمة 142
4. تحضير مسحة الدم 143
5. صبغ المسحة وتغطيتها 143
6. النتيجة 145
الفصل السابع عشر: تحضير هرسة من الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة 147
1. المحاليل والأدوات اللازمة 147
2. تحضير الهرسة 148
3. النتيجة 150
الفصل الثامن عشر: تحضير هرسة من قمة جذر البصل 153
1. المحاليل والمواد اللازمة 154
2. تحضير الهرسة وصبغها 154
الفصل التاسع عشر: تحضير نماذج كاملة 159
1. تحضير نموذج كامل من طفيل تريماتودي 159
2. تحضير نموذج كامل من جنين دجاج 162

الفصل العشرون: تحضير مقاطع من أنسجة حيوانية 167
1. التجهيز للتثبيت 167
2. المحاليل والوسائط اللازمة 168
3. الأدوات والزجاجيات والأجهزة 168
4. الحصول على العضو المراد تثبيته 168
5. معالجة النسيج حتى التقطيع 170
6. صبغ المقاطع 174
الفصل الحادي والعشرون: تحضير مقاطع من أنسجة نباتية 201
1. المحاليل والوساط اللازمة 202
2. الأدوات والزجاجيات والأجهزة 202
3. الطريقة 202
4. النتيجة 203
الفصل الثاني والعشرون: تحضير مقاطع متسلسلة 209
1. لوزام التحضير 211
2. الطريقة 211
3. النتيجة 212
الملاحق 215
ملحق 1 الأوزان الذرية 215
ملحق 2 محاليل ذات استعمال عام 216
ملحق 3 تحضير محاليل أحادية العيارية 218
ملحق 4 إعادة صبغة شرائح بهتت صبغتها 219
مسرد المصطلحات 221
المراجع 237

المقدمة

يُتوقع من الطلبة الذين يدرسون مادة التحضير المجهري، إعداد شرائح مجهرية تساعد في دراسة الخلايا والأنسجة والأعضاء. ويمكن إتمام هذا، بأربع طرائق تحضير رئيسية هي: **التقطيع** Sectioning **والمسح أو الفرش** Smearing **والهرس أو الدعك** Squashing **والتحضيرات الكاملة** Whole Mounts. وسنوجز فيما يلي هذه الطرائق الأربعة، ومن ثم سيتم تفصيلها بشكل موسع في فصول لاحقة.

1. **التقطيع Sectioning**: في هذه الطريقة يتم قطع الأنسجة، إلى مقاطع رقيقة جداً (μm10). ولكون كثير من الأنسجة النباتية والحيوانية طرية يصعب قطعها، فيجب أن تقسّى قبل عملية القطع، وذلك بتثبيت النسيج بمواد كيماوية مناسبة لحفظه.

   ولتحضير النسيج للقطع يجب غسل **المثبت** Fixative عنه، ثم **إزالة الماء** Dehydration منه، **وترويقه** Clearing، **وطمره** Embedding في الشمع ليتشربه خلال خلاياه. وهكذا يعمل الشمع كدعامة داخل النسيج، تُمكّن من قطعه إلى مقاطع يصل سمكها إلى عشرة ميكرومترات. وبعدها، توضع المقاطع على شرائح مجهرية، وتصبغ وتغطى بأغطية زجاجية رقيقة. وفي الحالات الطارئة، التي يُحتاج فيها إلى شرائح بسرعة، كما في الدراسات المرضية، يمكن الاستغناء عن كل ما سبق ذكره في تحضير المقاطع، بتجميد النسيج الذي يسمى **خزعة** biopsy ثم قطعه وصبغه في الحال.

   والمقاطع تكون إما **طولية** Longitudinal **أو عرضية** Transverse (Cross)، **أو جبهية** (أمامية) Frontal.

2. **المسح أو الفرش Smearing**: في هذه الطريقة، يمسح السائل، كالدم أو البول، أو مزرعة البكتيريا، أو مسحة من الحنجرة أو المهبل، ويفرش كطبقة

رقيقة على شريحة زجاجية، ويمكن عمل ذلك من الأنسجة الرخوة الطازجة، كالنخاع الشوكي والحويصلات المنوية. وتصبغ المسحات وتجفف في الهواء ثم تغطى.

3. **الهرس أو الدعك Squashing**: بعض الأنسجة ليست رخوة بدرجة تكفي لفرشها على الشرائح، وليست قاسية بما فيه الكفاية، ليتسنى قطعها دون طمرها في الشمع. لذا، فإن الهرس هو الطريقة المثلى لتحضيرها، وذلك بفصل الخلايا عن بعضها، عبر تفكيك المادة بين الخلوية. وفي العادة، تعمل تحضيرات دائمة أو مؤقتة بهذه الطريقة.

ومن الأنسجة التي تحضر بهذه الطريقة، الأنسجة النباتية كالقمة النامية للساق والجذر والمبايض والبتلات. ومن الأنسجة الحيوانية الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة *Drosophila Melanogaster*.

4. **النماذج الكاملة Whole Mounts**: في هذه الطريقة توضع العينة كاملة، إذا كانت صغيرة وشفافة بشكل يسمح بوضعها على شريحة، وتجري عليها عليمات التثبيت، وإزالة الماء، والترويق والصبغ والتغطية كما في المقاطع. وهذه الطريقة مفيدة في تحضير الكائنات الأولية أو الطفيليات أو الأجنة الصغيرة. وإذا كانت العينة كبيرة الحجم، فيؤخذ قسم منا يتناسب وحجم الحيّز المتاح على الشريحة.

سنعالج في الجزء الأول من هذا الكتاب الأسس النظرية لخطوات تحضير الشرائح المجهرية. أما في الجزء الثاني، فستتعامل مع التطبيقات العملية في هذا المجال.

تمهيد

يسرني أن أقدم هذا الكتاب كمرجع جديد في مجال التحضيرات المجهرية الضوئية لاستخدامه من قبل الطلبة الذين يتخصصون في التحاليل الطبية أو في العلوم البيولوجية والزراعية. ولقد أخرجت الكتاب بهذه الطريقة وبهذا المضمون بعد مراجعة خبرتي السابقة في تأليف كتاب « المبادئ الأساسية للتحضير المجهري الضوئي» وكتاب «دليل مختبر التحضير المجهري الضوئي» (مع الزميل أ.د. رمسيس لطفي) في مطلع الثمانينات، إضافة إلى خبرتي العملية الطويلة في تعليم هذه المادة لطلبة التحاليل الطبية والعلوم الحياتية في عدة جامعات لمدة تزيد عن عشرين عاماً. كذلك، فإن ملاحظات أفواج الطلبة الذين علمتهم هذه المادة شكلت عنصراً إيجابياً في هذا الاتجاه.

يمتاز هذا الكتاب بسمات أبرزها التداخل السلس والتكامل الواضح بين الأسس النظرية والتطبيقات العملية لمادة التحضيرات المجهرية الضوئية. إضافة إلى ذلك، فإنني عززت الفصل المتعلق بالتطبيقات العملية بأشكال مختلفة، وخاصة في موضوع تحضير مقاطع من أنسجة حيوانية، إذ زوّد هذا الفصل بثلاثين شكلاً ملوناً تغطي أعضاء ثديية مختلفة. وراعيت نفس التوجه بالنسبة للفصول المتعلقة بالأنسجة النباتية والنماذج الكاملة. علاوة على ذلك، فإن الكتاب يشمل ملاحق مختلفة، ومن أهمها تلك المتعلقة بالشركات المعنية بتوريد الأجهزة والتجهيزات اللازمة لتأسيس مختبرات تحضير مجهري ضوئي.

ويتطلب التعليم الجيد لمادة هذا الكتاب معرفة معقولة بالأسس النظرية والخلفية العلمية المناسبة عن التحضيرات المختلفة، وخاصة فيما يتعلق بالأنسجة الحيوانية والنباتية، إن الهدف الأكبر في هذه المادة هو اكتساب المهارات العلمية لتحضير شرائح محملة بأنواع مختلفة من التحضيرات المجهرية الجيدة، إضافة إلى فهم محتوى تلك التحضيرات وتقييم مستواها.

لقد حرصت عند إعداد هذا الكتاب أن يكون معيناً لخريج تخصص التحاليل الطبية بحيث يؤهله للعمل في مختبرات **الأنسجة المعتلّة (pathology laboratories)**. وبنفس الحرص، راعيت أن يكون هذا المرجع مرتكزاً يستند إليه خريج العلوم الحياتية أو التحاليل الطبية أو الزراعية فيما لو عمل في حقل التدريس أو أكمل دراساته العليا في مجالات العلوم الحيوانية أو النباتية. ولتحقيق الطموحات المرجوة من تعليم هذه المادة، أقترح أن يخصص لها محاضرتين، وأن يكرس لها ما بين أربع وست ساعات أسبوعياً، كما وأقترح أن تعلم هذه المادة في السنة الجامعية الثالثة.

إنني أقدم هذا الجهد المتواضع كمساهمة في إثراء المكتبة العلمية العربية التي تكاد تخلو من هذا النوع من المراجع، وإنني إذ أؤمن بأن أي مؤلَّف لا يمكن أن يخلو من أية هفوات أو سلبيات، فإنني لأتمنى على الزملاء والطلاب المعنيون بتعليم وتعلم هذه المادة أن يقدموا أية ملاحظات أو اقتراحات تساعد في تحسين هذا الكتاب في طبعة قادمة بعون الله. وأود في هذا المقام تقديم شكري للناشر السادة دار المسيرة لما قدموه من إمكانيات لإخراج الكتاب بهذا الشكل.

المؤلف

الجزء الأول

الأسس النظرية

الفصل الأول: التثبيت
الفصل الثاني: الغسل وإزالة الماء والترويق
الفصل الثالث: التشريب والطمر
الفصل الرابع: تقطيع وتحميل الأنسجة
الفصل الخامس: صبغ الأنسجة
الفصل السادس: تغطية المقاطع ووسم الشرائح
الفصل السابع: طرائق المسح والفهرس والتجميد
الفصل الثامن: النماذج الكاملة

الفصل الأول

التثبيـــت

عندما يعزل النسيج عن الجسم، أو يقطع عنه الدم، فإنه يأخذ في التحلل، وقد يعود ذلك إلى عوامل بكتيرية، أو إلى **التحلل الذاتي** autolysis، بفعل إنزيمات الأنسجة نفسها وانقطاع الأكسجين عنها، وتراكم الفضلات كثاني أكسيد الكربون. ويحدث هذا لكل أنسجة الجسم بعد الموت، مما يؤدي إلى تفكك بروتينات الخلايا وبالتالي تميّعها.

ولما كانت غاية التحضير المجهري الضوئي، هي الحصول على مقاطع من نسيج معين بحالة مشابهة للوضع الطبيعي، فإن من الضروري حفظ هذا النسيج بأسرع ما يمكن بعد إخراجه من الجسم. ويتم هذا بعملية تسمى **التثبيت** fixation التي تؤدي، بالإضافة إلى إيقاف التحلل أو تأثير البكتيريا، إلى الفوائد التالية:

1. فوائد التثبيت

1. إبقاء محتويات النسيج على حالها من حيث موقعها وطبيعتها وحجمها، وذلك بتقوية بُنية النسيج، مما يمكّن من عمل تحضيرات دائمة منه.
2. تقوية الأنسجة بتقسيتها، لتصمد أمام العمليات التالية كالقطع بأقل قدر من التشوه.
3. تحسين قدرة أجزاء النسيج على تقبل الصبغ.
4. جعل مركبات النسيج تقاوم الحرارة العالية، عند الطمر في الشمع وتخلله لها.

2. مواصفات المثبت الجيد

ولكي يكون المثبت جيداً يجب أن يتميز بالمواصفات التالية:

1. سرعة النفاذ إلى داخل النسيج.
2. قلة التأثير الكيماوي والفيزيائي على مكونات النسيج.
3. عدم تغير تركيبه مع الزمن.
4. سهولة التداول.
5. اعتدال السعر.

وإذا لم يكن التثبيت جيداً، فإنه يؤدي إلى ظهور **أشكال مصطنعة** artifacts ولا يمكن علاج نتائجه، وعليه فإن الاهتمام بالتثبيت، يعتبر أمراً حيوياً في تحضير العينات.

3. أسس التثبيت

1.3 الحصول على النسيج

بعد قتل الحيوان أو الحصول على العضو المعني، يثبت النسيج المطلوب في مكانه في الجسم، بغمره بمحلول ملحي، ثم ينقل إلى وعاء يحتوي المثبت، وهناك يقطع إلى قطع صغيرة بحجم 5×5×5 ملم بشفرة حادة، وأخيراً ينقل بطريقة ملائمة، إلى قنينة صغيرة vial تحتوي المثبت ويترك فيها المدة المقررة. وعند نقل النسيج إلى القنينة يراعى عدم تعريضه لأي ضغط (بواسطة ملقط) أو ثقوب (بواسطة إبرة تشريح) لأن ذلك يغير بنيته.

2.3 حجم النسيج

حتى يتم نفاذ المثبت أو تسربه إلى داخل النسيج بسرعة، يجب أن لا يزيد حجم النسيج عن 5×5×5 ملم، لأنه إذا زاد الحجم كثيراً، فإن المثبت لا يصل داخل النسيج بسرعة، وقد يؤدي ذلك إلى حدوث تغيرات في بنيته.

3.3 حجم المثبت

يكون حجم المثبت عادة 5-10 أضعاف حجم النسيج. ولكن يستثنى من ذلك بعض المثبتات مرتفعة الثمن، مثل **رابع أكسد الأوزميوم** osmium tetroxide.

4.3 وسم الأنسجة

لتجنب اختلاط الأنسجة مع بعضها خلال العمل، يوضع مع كل نسيج ورقة صغيرة يكتب عليها اسم النسيج، ووقت وتاريخ التثبيت، وتكتب هذه المعلومات إما بقلم رصاص أو بالحبر الصيني، وتعتبر هذه العملية غاية في الأهمية في حالة الدراسات المرضية.

5.3 مدة التثبيت

تختلف مدة التثبيت حسب نوع المثبت. فعند التثبيت بمحلول **فورملين** Formalin تركيزه 10٪، يمكن إبقاء النسيج من 12 ساعة حتى بضعة أسابيع، أما في مثبت **فلمنج** Flemming فلا تزيد هذه المدة عن 24 ساعة، وعند استعمال مثبت **كارنوي** Carnoy تتراوح فترة التثبيت من 3-6 ساعات فقط.

4. طرائق التثبيت

يتم التثبيت إما بوسائل طبيعية او كيميائية .

1.4 التثبيت بالوسائل الطبيعية

يندرج تحت هذا النوع استخدام وسائل الحرارة، والتجفيف عند درجة الحرارة العادية، أو المنخفضة، والتجميد. وسنعالج كل طريقة على حدة:

1.1.4 التثبيت بالحرارة

ترتكز هذه الطريقة على كون البروتينات تتخثر بالحرارة، وعيبها الوحيد هو تكون **أشكال مصطنعة** artifacts داخل الأنسجة.

2.1.4 التثبيت بالتجفيف عند درجة الحرارة العادية

تفيد هذه الطريقة عند تحضير مسحات الدم، أو نخاع العظم، ولكن استعمالها محدود، ويحتاج الأمر عادة إلى مثبت آخر عند الصبغ.

3.1.4 التثبيت بالنيتروجين السائل

في هذه الطريقة يقطع النسيج قطعاً صغيرة، تجمد في النيتروجين السائل (-160°س)، ثم تجفّف في جهاز خاص، وتطمر حالاً في شمع البرافين. هذه الطريقة مفيدة في إظهار الإنزيمات والدهون في المقاطع، و بها يُتجنب استعمال المواد

الكيماوية، فتبقى مكونات النسيج على حالها، ولكن يؤخذ عليها، صغر حجم العينات، وتكون بلورات الجليد فيها.

2.4 التثبيت بالوسائل الكيميائية

لعل أهم ميزة للمثبتات الكيماوية هي قدرتها على تثبيت الأنسجة بكفاءة عالية. ولكن لا يعتمد مثبت واحد لتثبيت الخلايا أو مكونات النسيج، وهذا هو سبب وجود عدد كبير من الصيغ الكيماوية للمثبتات المستعملة في التحضيرات المجهرية. وكما سنبيّن لاحقاً فإن معظم المثبتات تحضر من أكثر من مكون واحد، ليتسنى الاستفادة من الخواص التي يتمتع بها كل مكوّن.

والمثبتات الكيماوية إما أن تخثر البروتين وتحافظ على هيكلية الخلايا بحيث يسهل اختراقها من وسط التشريب، غير أنها تحطم بعض العضيات، مثل الميتوكوندريا. ومن هذه المثبتات حامض البكريك وكلوريد الزئبق والكحول الإيثيلي، والأسيتون ، وإما أن لا تخثر البروتين وتحول السيتوبلازم إلى مادة هلامية غير مترسبة تكون فيها العضيات محفوظة بشكل جيد، ولكن لا يخترقها وسط التشريب بسهولة، ومن هذه المثبتات، الفورملدهايد وحامض الخليك وثنائي كرومات البوتاسيوم، ورابع أكسيد الأوزميوم.

وعلى هذا الأساس، فإن المثبتات الجيدة تحتوي مكونات مخثرة وأخرى غير مخثرة بحيث تجمع فوائد النوعين. ونستعرض فيما يلي أكثر المثبتات شيوعاً:

1.2.4 الفورملدهايد(Formaldehyde (CHOH)

يتوفر الفورملدهايد تجارياً كغاز مذاب في الماء إلى درجة الإشباع، بنسبة تتراوح من 30-40٪ من وزن المحلول. ويعتبر هذا المحلول المشبع فورملين 100٪. وعند استعماله كمثبت، يؤخذ حجم واحد من فورملدهايد ويضاف له تسعة أضعافه من الماء، لنحصل على محول 10٪ فورملين. ويتعكر محلول الفورملين لدى حفظه على الرفوف لفترة طويلة، وخاصة عند درجات الحرارة المنخفظة، ويتكون راسب أبيض يدعى **بارافورمالدهايد** Paraformaldehyde نتيجة تبلمر الفورملين، ويمكن تصفيته بالترشيح. ويتفاعل الفورملين مع مجموعات $NH = C = NH_2$ و $O = C - NH$ و SH- و OH– في البروتينات المختلفة، وينتج عن ذلك تكوين جسور ميثلين التي تعطى ثباتاً للجزئيات البروتينية في الأنسجة.

ولاستعمال الفورملين كثير من الفوائد، منها ثباته، وسهولة تحضيره ورخص ثمنه، وقدرته على النفاذ السريع، واعتدال تقسيته للأنسجة، ومحافظته على بناء الخلية، وهو يعتبر أحسن مثبت للأنسجة العصبية. ولكن يؤخذ على استعماله بعض العيوب، كتأثير بخاره على العينين والجهاز التنفسي، ويمكن تقليل ذلك بتهوية مكان العمل. كما أنه يسبب التهابات جلدية لدى بعض الناس، مما يوجب لبس قفازات مطاطية عند استعماله. أما عيبه فهو أنه يسبب ظهور بقع بنية مسودة في الأنسجة الغنية بالدم كالطحال والكبد. ويمكن التخلص من هذه البقع إذا عولجت المقاطع بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز 1٪ محضّر بكحول تركيزه 80٪.

تحضر مثبتات الفورملين بعدة طرائق، ولكن أحسنها هي الصيغة التي اقترحها ليلي Lillie عام 1948، لأنها تعطي مثبتاً متعادلاً ومتوافقاً مع ضغط الخلايا الأسموزي، وهي كما يلي:

أ. ماء مقطر distilled water.....900 مل

ب. فوسفات الصوديوم

ثنائي الهيدروجين (غير مائي) NaH2PO4.....3.5 غم

ج. فوسفات ثنائي الصوديوم

أحادي الهيدروجين (غير مائي) Na2HPO4.....6.5 غم

د. فورملين formalin.....100 مل

ويمكن حفظ الأنسجة في هذا المثبت لمدة غير محدودة وتغسل بالماء بعد تثبيتها.

2.2.4 مثبتات حامض البكريك Picric Acid Fixatives

حامض البكريك (ثلاثي نيتروفينول) Trinitrophenol، أحد المثبتات الشائعة، وهو يثبت الأنسجة عن طريق تكوينه روابط بين جزئيات البروتين الليفية. ومثبت بوان Bouin شائع الاستعمال، هو أحد هذه المثبتات، وصيغته هي:

محلول حامض البكريك المائي المشبع .....75 مل
saturated aqueous picric acid

فورملين مركز concentrated formalin.....25 مل

حامض خليك ثلجي glacial acetic acid.....5مل

من فوائد استعمال حامض البكريك: ثباته واعتداله تقسيته للأنسجة، وقدرته على تحسين صبغ سيتوبلازم الخلايا، ويساعد في إظهار الجلايكوجين بوضوح. كما أنه يصبغ الأنسجة بلون أصفر، وهذا مفيد في الأنسجة صغيرة الحجم. وحتى لا يتدخل هذا اللون بعملية الصبغ، فإنه يتوجب التخلص منه وذلك بوضع العينة المثبتة بكحول تركيزه 70٪ ومضافاً إليه بضع قطرات من محلول مشبع من كربونات الليثيوم Li2CO3. ولسرعة تخلله الأنسجة، فإنه يسبب لها بعض الانكماش، ويمكن التعويض عن الانكماش المذكور بإضافة حامض خليك ثلجي.

ومن عيوب هذا المثبت أنه يسبب تحللاً كاملاً أو جزئياً لكريات الدم الحمراء، كما أنه يفكك الأحماض النووية، فيمنع تفاعل فولجين Feulgen وهو أيضاً رديء في تثبيت كلية الثدييات.

تثبت الأنسجة في محلول بوان لمدة 12-24 ساعة، ويجب غسلها بمحلول كحول إثيلي تركيزه 70٪. مرتين أو ثلاثة، حتى تتخثر أملاح البكريتات Picrates التي تتكون نتيجة تفاعل حامض البكريك مع المجموعات القاعدية في بروتينات الأنسجة.

3.2.4 المثبتات الكحولية Alcoholic Fixatives

يغير الكحول طبيعة بروتينات الخلايا نتيجة تفكيك روابط الهيدروجين، وتسبب تركيزاته المنخفضة تفكك الخلايا. ومن عيوب الكحول كمثبت، تسببه في انكماش الأنسجة وتقسيتها. والمثبت المعروف من هذا النوع هو محلول كارنوي ذو الصيغة التالية:

كحول الايثيل المطلق Absolute Ethyl Alcohol.....60مل

كلورفروم Chloroform.....3مل

حامض خليك ثلجي Glacial Acetic Acid.....10مل

ومن فوائد استعمال هذا المثبت: قدرته على تثبيت الأنسجة بسرعة. وتوضيح الجلايكوجين و أجسام نسل Nissl Bodies (في الخلايا العصبية)، أما إذا تركت فيه العينات لمدة طويلة، فإنها تأخذ في الانكماش.

تتراوح مدة التثبيت في محلول كارنوي بين 3-6 ساعات. وبعد التثبيت يجب غسل الأنسجة في الكحول المطلق لمدة ساعتين، للتخلص من الكلوروفوم.

4.2.4 حامض الخليك Acetic Acid (CH_3 COOH)

يسبب هذا المثبت انتفاخ الأنسجة، لذا يدخل في تركيب كثير من المثبتات، ليكون عاملاً معوضاً للانكماش الذي يتأتى من استعمال مثبتات مثل الكحول أو حامض البكريك. ولا يثبت حامض الخليك بروتينات الأنسجة، غير أنه يخثر كروماتين النوى، ولذلك فهو يدخل في تركيب المثبتات التي تحافظ على بُنية الكروموسومات.

5. أساليب التثبيت

يمكن إجراء التثبيت بالوسائل الكيماوية بأساليب مختلفة، منها التثبيت بالأبخرة، حيث يخضع التحضير المجهري لأبخرة المثبت، وفي هذه الطريقة تحمل العينة على شريحة وبعد تجفيفها، يعرض وجه الشريحة الحامل للعينة إلى بخار المثبت، وذلك بوضع ذلك الوجه فوق عبوة مناسبة تحتوي المثبت. وتساعد هذه الطريقة في دراسة الخلايا المعزولة. ومن أهم الأبخرة غاز رابع أكسيد الأوزميوم والفورملدهايد.

أما التثبيت بالسوائل، فيتضمن استعمال المثبتات في حالتها السائلة بالأساليب التالية:

1.5 الغمر Immersion

هذه طريقة شائعة جداً، وفيها توضع الأنسجة في المثبت، بحيث يكون حجم المثبت أكبر من حجم النسيج بمقدار 5-10 مرات. ويجب أن يحيط المثبت بالنسيج من جميع النواحي، ولذلك ينصح بوضع قطعة قطن في أسفل إناء الغمر قبل المثبت، ثم تضاف الأنسجة. وفي حالة الأنسجة التي تغطيها طبقة مخاطية، أو دم متخثر، يظل تثبيتها ناقصاً، إذا لم تحرّر مما يغطيها قبل غمرها في المثبت. أما إذا كان في النسيج فجوات هوائية، أو غازات كما في الرئة فيوضع إناء الغمر والمثبت في جهاز تفريغ الهواء لإزالة الغازات من النسيج.

2.5 الحقن Injection

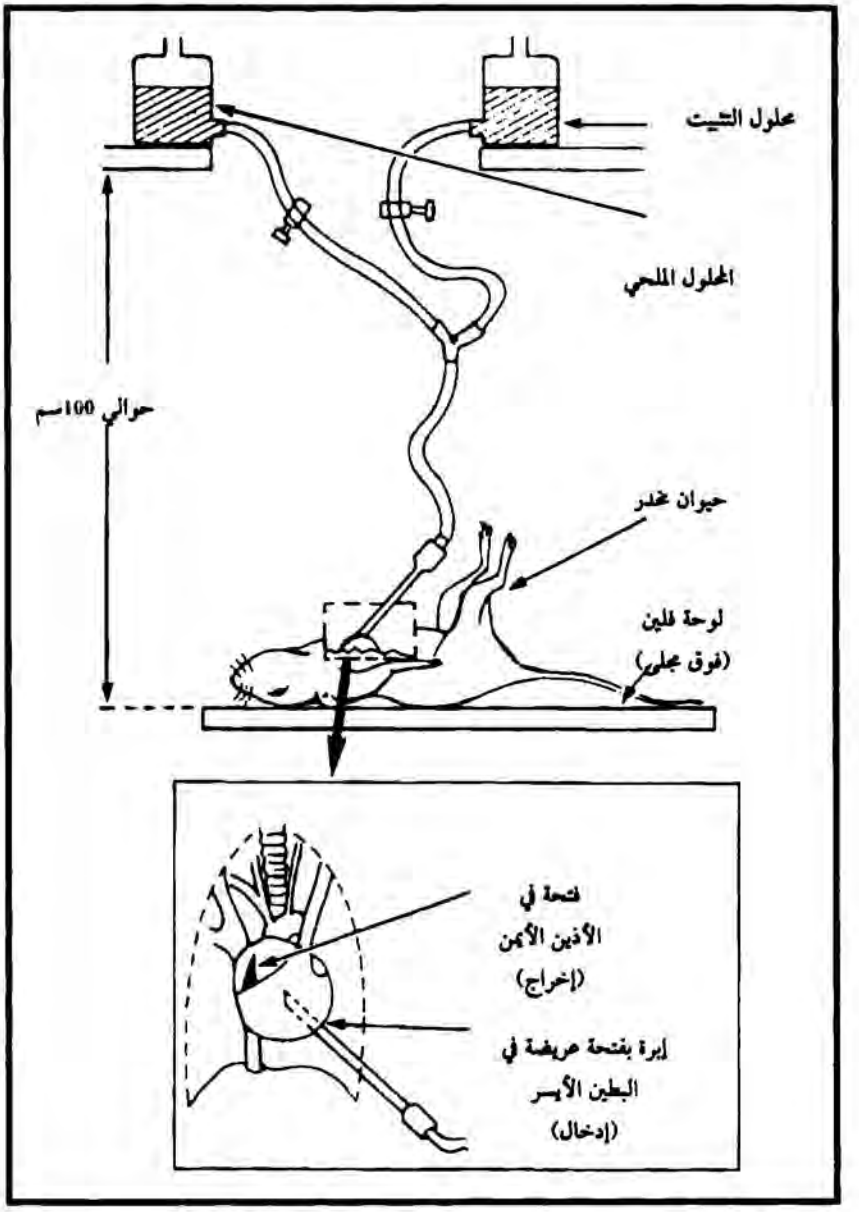
في هذه الطريقة، يحقن المثبت في جوف الحيوان المراد تثبيته كله، والذي يكون عادة صغيراً. ويتبع الحقن غمر الحيوان في مثبت معين. وتستعمل هذه الطريقة في حفظ عينات المتاحف الحيوانية وفي مختبرات تشريح الحيوان بمثبتات مثل الكحول أو الفورملين.

3.5 الإرواء Perfusion

في هذه الطريقة، تثبت الأنسجة بضخ المثبت بالدورة الدموية. وهي مفيدة في حفظ الأعضاء التي تحتاج إلى سرعة في التثبيت، ولكن يصعب الوصول إليها بسرعة.

كما تفيد في تثبيت الأعضاء الكبيرة، التي لا يسمح حجمها بغمرها. ومن النماذج على ذلك الجهاز العصبي المركزي، والأذن الداخلية للثدييات.

في هذه الطريقة، يخدّر الحيوان المخبري (مثل الجرذ) ويدخل المحلول الملحي (حوالي 50-100مل) إلى البطين الأيسر عبر قَنيّ إرواء Perfusion Canula، بحيث يخرج السائل من شق في الأذين الأيمن (شكل1)، وذلك حتى يصبح السائل الخارج رائقاً. بعد ذلك، يدخل المثبت، بنفس الطريقة، ويتم الإرواء حتى يصبح الحيوان المخبري قاسياً. وأخيراً يستخرج العضو المعني ويعالج بالطريقة التقليدية. يستخدم في هذه الطريقة حوالي 100 مل من المثبت، وتستغرق العملية حوالي 15 دقيقة.



شكل 1: تثبيت حيوان مخدر بالإرواء من البطين الأيسر إلى الأذين الأيمن

يمر المحلول الملحي أولاً حتى يصبح المحلول الخارج رائقاً، وبعد ذلك يُروى جسم الحيوان بالمثبت حتى يصبح الحيوان قاسياً. ويستعمل عادة 100 مل من المحلول الملحي لجرذ وزنه 200-300 غم، وتستغرق هذه الطريقة حوالي 15 دقيقة.

الفصل الثاني

الغسل وإزالة الماء والترويق

ذكرنا سابقاً أن الأنسجة المعدّة للتحضير المجهري الضوئي، تثبت أولاً ثم تتعرض لعمليات غسل وإزالة ماء وترويق، وذلك بهدف تهيئتها لعمليات التشريب والطمر، ثم القطع لاحقاً. وفي هذا الفصل سنعالج العمليات الثلاث الأولى التي تلي مرحلة التثبيت، وسنبدأ بعملية الغسل.

1. الغسل Washing

تجري عملية غسل النسيج لإزالة أية بقايا للمثبت، حتى لا تؤثر على العمليات اللاحقة. ويكون الغسل بعدة تغييرات من الماء، أو المحاليل المنظمة Buffer Solutions. وفي حالات أخرى، تغسل الأنسجة بكحول إيثيلي تركيزه 50٪ أو 70٪، وخاصة عند استعمال مثبت بوان. وبعد الغسل، يمكن حفظ الأنسجة في محلول كحولي تركيزه 70٪، لعدة أسابيع. ولكن الأفضل، إجراء عمليات إزالة الماء والترويق والتشريب مباشرة، لأن الحفظ لمدة طويلة يقلل من قابلية الأنسجة للصبغ.

2. إزالة الماء Dehydration

تلي هذه العملية خطوة إزالة المثبت، وهي تعني ببساطة، إزالة ماء الأنسجة التي ستجري عليها عمليات التشريب والطمر في شمع البرافين. فشمع البرافين لا يختلط بالماء، لذا يجب إزالة الماء المتواجد بداخل الخلايا وخارجها، وتتم هذه الخطوة بمادة تختلط مع الماء. والمادة الشائعة والجيدة، هي الكحول الإيثيلي الذي يستعمل بشكل متدرج (30٪، 70٪، 95٪، ثم 100٪).

يعتبر التدرج في إزالة الماء ضروري جداً، لأن نقل النسيج من الماء إلى محلول كحولي تركيزه 95٪ مثلاً، يؤدي إلى تشويه النسيج، وضمور فجواته نتيجة لانتشار الكحول

الفجائي فيه. ويفضل بعض الفنيين استعمال سلسلة أكثر تدرجاً من الكحول (15٪، 40٪، 75٪، 95٪ ثم 100٪).

تعتمد خطة إزالة الماء من النسيج، على نوع المثبت المستعمل. فمثلاً إذا كان النسيج مثبتاً بالفورملين، فيجب غسله بالماء، ليتبع ذلك تعرض النسيج لتدرج كحولي صاعد يبدأ بتركيز 30٪ وينتهي بتركيز 100٪. أما إذا كان النسيج مثبتاً بمحلول كحولي (تركيزه 70٪، مثلاً)، فينقل النسيج رأساً إلى كحول 90٪-95٪. ويفضل أن تتم الإزالة النهائية للماء باستعمال كحول 100٪، مرتين على الأقل.

1.2 المدة اللازمة لإزالة الماء

تعتمد هذه المدة، على حجم ونوع العينة قبل قطعها، وتتراوح ما بين 2/ 1-1 ساعة لكل خطوة. ويجب إجراء خطوة الكحول المطلق مرتين، للتأكد من الإزالة الكلية للماء. أما إزالة الماء من المقاطع فإنها تستغرق دقيقتين لكل خطوة. وتجدر الإشارة إلى عدم ترك عيّنات الأنسجة (وليس المقاطع) مدة طويلة في كحول 95٪ أو 100٪ حتى لا تصبح قاسية ويصعب قطعها. غير أنه يمكن ترك العينات بكحول تركيزه 70٪ لفترة طويلة دون تأثير كبير على الأنسجة وذلك لعدم تأثر اسموزّية الأنسجة بهذا المحلول.

2.2 تحضير تركيزات كحولية

بسبب ارتفاع سعر الكحول المطلق، فإن كحول 95٪ يستعمل عادة لعمل التركيزات المنخفضة. فمثلاً لعمل كحول تركيزه 75٪، يؤخذ 75 مل كحول 95٪ ويضاف إليها 20 مل ماء مقطر. ويمكن اعتماد الصيغة التالية لإعداد تركيزات الكحول:

لتحضير محلول تركيز (س٪) من تركيز (ع٪)، خذ حجم (س) مل من محلول ذو التركيز (ع٪) وأضف له ماءً بحجم يساوي الفرق بين التركيزين س و ع. فمثلاً، إذا طلب تحضير محلول كحولي تركيزه 50٪ (س) من محلول كحولي تركيزه 70٪ (ع)، خذ 50 مل من الكحول الأول (س) وأضف له 20 مل (70-20) من الماء.

3.2 مزيلات الماء الأخرى

هناك مزيلات ماء أخرى، يمكن استعمالها كبديل للكحول، مثل **أسيتون** Acetone، فهو رخيص الثمن، ولكنه متطاير وسريع الاشتعال. **وديوكسان** Dioxane مثال آخر، ويمتاز بكونه يمتزج مع الماء والكحول، والزايلين والبرافين وبلسم كندا. لذا يمكن نقل الأنسجة من أي مثبت إلى ديوكسان مباشرة، لكنه سام ولا ينصح به للاستعمالات العادية. ويجب أن تتصف كل مزيلات الماء بامتزاجها مع الماء ومحاليل الترويق.

ملاحظات:

1. لا يبقى أي مزيل للماء مركزاً، إذا تركت الأوعية التي تحويه غير مغلقة بإحكام. لذا يجب إجراء الخطوات النهائية في أوعية صغيرة مغلقة. ويستدل على عدم اكتمال إزالة الماء من الأنسجة بظهور طبقة رقيقة من راسب أبيض عليها عند وضعها في محاليل الترويق.
2. يمكن أن يحتوي الكحول المطلق نسبة 2٪ ماء، وللتأكد من عدم احتوائه أكثر من ذلك، يضاف إليه بضع قطرات من زايلين Xylene أو تلوين Toluene، فإذا تعكر فإنه يحوي أكثر من 2٪، أما إذا بقي صافياً فيمكن اعتباره مطلقاً.

3. الترويق Clearing

تنقل الأنسجة بعد إزالة الماء منها تماماً إلى بيئة تعمل كوسيط بين الوسط المزيل للماء، ووسط التشريب بالشمع. وهذه العملية ضرورية إذا كان مزيل الماء كالكحول لا يمتزج بالشمع. أما إذا كان مزيل الماء يمتزج بالشمع، كما في **ديوكسان** Doxane و **بيوتانول** Butanol فإن عملية الترويق لا ضرورة لها.

تجعل المروقات النسيج شفافاً، لأنها ترفع معامل انكسار مكوناته، وتزيل بعض دهنياته وهي تضاف بنسبة 1:10 من حجم النسيج. ويؤدي الترويق غير الكامل إلى تعثر عملية القطع، كما في حالة عدم اكتمال إزالة الماء؛ وتبدو الأنسجة غير تامة الترويق معتمة، وتظهر لوناً كالحليب، وفي هذه الحالة يجب إعادة عملية إزالة الماء قبل إجراء الترويق. وإذا كانت عملية إزالة الماء كاملة، فيكفي تغيير المرّوق مرتين تتراوح

مدة كل منهما بين نصف الساعة والساعة حسب حجم ونوع النسيج. وتروّق عينات الأنسجة قبل قطعها مرتين ، مدة كل منها حوالي 15-30 دقيقة وتروّق المقاطع مرتين، تتراوح مدة كل منها بين 3 و 5 دقائق.

1.3 مواصفات وسط الترويق الجيد

توجد عدة أنواع من وسائط الترويق، ويتميز الجيد منها بالصفات التالية:

1. سرعة التخلص من مزيل الماء.
2. بطء التطاير.
3. سرعة الترويق دون التأثير على النسيج.
4. اعتدال السعر.

2.3 وسائط الترويق Clearing Agents

على الرغم من وجود عدة وسائط ترويق، إلا أن الزايلين يعتبر أكثرها شيوعاً وذلك بسبب اعتدال سعره وأدائه لعملية الترويق بشكل مرض. ومن وسائط الترويق الأخرى: زيت خشب الأرز، والبنزين، والكلورفورم، والثولوين.

1.2.3 الزايلين (الزيلول) Xylene (Xylol)

شائع الاستعمال في الترويق. درجة غليانه حوالي 140°س، رخيص الثمن، وسريع التأثير، ويجعل الأنسجة شفافة، كما يمكن إزالته بسهولة أثناء التشريب. ولهذا الوسط بعض العيوب، إذ يسبب انكماش الأنسجة وتقسيتها إذا تركت فيه لمدة طويلة (تحتاج الأنسجة صغيرة الحجم التي يبلغ سمكها 3ملم، مدة ترويق تتراوح بين 15 و 30 دقيقة). كما أنه لا يصلح لترويق أنسجة المخ والأنسجة الليمفاوية، لأنه يجعلها هشة.

2.2.3 زيت خشب الأرز Cedar Wood Oil

تستعمل الأنواع الخفيفة منه لأغراض الترويق، وتتراوح درجة غليانه بين 165 و 237°س. لا يسبب للأنسجة أية تقسية، حتى لو تركت فيه لمدة طويلة، كما أنه يتخللها بسرعة. هذا الوسط مرتفع الثمن، ويحتاج لمدة طويلة لإخراجه من الأنسجة في فرن الشمع، ويجب تغيير الشمع 3 مرات للتخلص من بقاياه.

3.2.3 الكلوروفورم Chloroform

درجة غليانه 61°س، وله تاثير أقل على الأنسجة، من حيث الانكماش أو التقسية إذا قورن بالزايلين. يعتبر مرّوقاً ممتازاً للأجنة والجهاز العصبي والأعضاء الليمفاوية، كما أنه يتبخّر بسرعة في فرن الشمع، ولا يشتعل ولكنه غالي الثمن نوعاً ما.

الفصل الثالث

التشريب والطمر

كانت غاية جميع العمليات التي عالجناها في الفصلين السابقين، هي إعداد الأنسجة لعملية التشريب، ومن ثم طمرها في شمع البرافين، لتحضير مقاطع رقيقة منها، لأن الأنسجة الحيوانية رخوة، يصعب قطعها إلى مقاطع (حوالي 10 ميكرومترات) لدراستها، دون وسط صلت يدعمها من الداخل والخارج.

1. التشريب Infiltration

لتحضير الأنسجة للقطع، يجب أولاً تشريبها بمادة مناسبة، وهي في العادة شمع البرافين، بعد أن تكون الأنسجة قد رّوقت تماماً. وقبل بدء عملية التشريب، يوضع النسيج في وعاء زجاجي صغير يسمى **صحن سيراكوز** Syracuse dish يحتوي خليطاً من سائل الترويق والشمع المنصهر بنسبة 1:1، لكي يتاح للشمع تخلل النسيج، بامتزاجه مع وسط الترويق الموجود بين الخلايا، ثم ينقل النسيج الى وسط التشريب فقط. ويملأ الشمع جميع فراغات الخلايا وفجواتها، عند وضع الأنسجة بوسط شمع منصهر ثلاث مرات، تتراوح مدة كل منها بين ساعة ونصف الساعة، وفي فرن عند درجة حرارة مناسبة (50-55°س). أي أن الشمع سيملأ الخلايا من الداخل، ويدعمها ويقويها من الداخل والخارج عند اكتمال عملية الطمر، وهكذا تغدو الأنسجة صلبة القوام، مما يسمح بعمل مقاطع رقيقة منها، دون تشويهها أو تغيير بنيانها الخلوي.

ورغم توفر أنواع عديدة من وسائط التشريب والطمر، إلا أن الشمع يعتبر أكثرها شيوعاً. استعمل الشمع لهذه الغاية أول مرة عام 1869، وهو هيدروكربون ذو درجات انصهار مختلفة. وهو إما طري تتراوح درجة انصهاره بين 45 و 55°س، وإما

صلب تتراوح درجة انصهاره بين 56 و 68°س. ويعتمد اختيار الشمع على ثلاثة عوامل هي: نوع النسيج، وسمك المقطع، ثم معدل درجة الحرارة في مكان العمل.

يستعمل الشمع الطري عادة في تشريب وطمر الأنسجة الرخوة، بينما يستعمل الشمع الصلب للأنسجة القاسية. وفي حالة تحضير مقاطع سميكة، يستعمل الشمع الطري، وإلا فلا يتكون **شريط** Ribbon من المقاطع. كما أن استعمال الشمع الصلب، (درجة انصهاره 60 إلى 68°س) يساعد في عمل مقاطع رقيقة، بسمك أقل من خمسة ميكرومترات. وتؤثر درجة حرارة الجو على اختيار نوع الشمع، ففي الجو الحار يستعمل الشمع الصلب، وفي الجو البارد يستعمل الشمع الطري.

يكون حجم وسط التشريب، حوالي عشرة أضعاف حجم النسيج، وتشرب الأنسجة التي تحوي هواء كالرئة، بالشمع في فرن مفرغ من الهواء، حتى لا تظهر فراغات في قالب الشمع.

2. الطمر Embedding

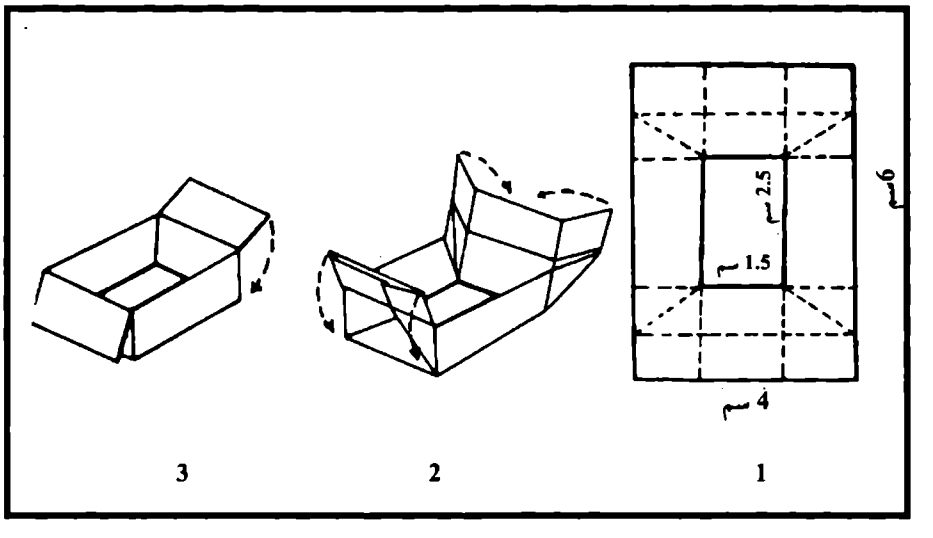
بعد تشريب النسيج جيداً بشمع البرافين، فإنه يطمر في شمع نقي لتحضيره للقطع. وتتم الخطوة الأولى، بصب الشمع المنصهر في قالب مناسب، ثم ينقل النسيج إلى الشمع، باستعمال ملقط غير حاد، ويجبذ العمل بسرعة، لتجنب تصلب الشمع قبل ضبط وضع النسيج. بعد ذلك يبرد وعاء الشمع والنسيج بسرعة، ويتم ذلك بالنفخ على سطح الشمع حتى يتصلب نوعاً ما، ثم يغمس القالب ببطء في وعاء به ماء عند درجة حرارة الغرفة. ويسبب الماء تحت درجة 10س، تقلصاً وربما تشققاً لقالب الشمع.

يبدو قالب الشمع الجيد رائقاً ومتجانساً، ويؤدي الطمر غير الجيد إلى ظهور جيوب هوائية في قالب الشمع تبدو كنقط بيضاء، وتسمى هذه الظاهرة **التبلور** Crystallization. ويمكن طرد الهواء، بصهر الجزء العلوي من القالب بأداة ساخنة قليلاً. وللقوالب المتبلورة مشاكل عند القطع، يتم علاجها بإعادة الطمر. ويمكن حفظ قوالب الشمع في مكان بارد لمدة طويلة.

تصنع قوالب الطمر من المعدن وغالباً ما تصنع القوالب المعدنة من النحاص الأصفر، تُكوّن قطعتان منه (على شكل حرف L بالانجليزية بمقاس 2.5×1.5سم)، عند وضعهما على قطعة زجاج، وعاء لاستقبال الشمع وطمر النسيج. وقد تكون القوالب من البلاستيك على قاعدة من صلب لا يصدأ، تدهن بالجليسرين قبل صب الشمع فيها.

أما قوالب الطمر الورقية فيمكن عملها من قطعة مستطيلة من ورق عادي، أو من ورق مقوى بعض الشيء، يتم تشكيلها على هيئة وعاء كالعلبة. ويبين الشكل (1) الخطوات التي يمكن اتباعها لعمل ذلك الوعاء أو «القالب». وميزة هذه القوالب هي كونها رخيصة، ويمكن كتابة بيانات هامة عليها.

إضافة إلى ما تقدم، توجد قوالب طمر تصنع من البلاستيك بثلاثة حجوم (22×22مم و 22 × 30مم و 22 × 40 مم وجميعها بعمق 5مم)، وتمتاز بسهولة فكها عن بعضها. كذلك، يمكن استعمال صحون زجاجية غير عميقة وصحون سيراكوز كقوالب طمر. وفي جميع الحالات، تدهن قوالب الطمر بالجليسرين من الداخل حتى يسهل رفع قالب الشمع منها.



شكل 1: طريقة صنع قالب طمر من الورق

بعد انتهاء عملية الطمر، يمكن حفظ قوالب الشمع في أماكن باردة لمدة طويلة تمتد شهوراً بل سنوات. ويفضل أن يكون تخزين هذه القوالب في وعاء محكم الغطاء.

3. وسائط التشريب والطمر

إضافة إلى الشمع، تتوافر في بعض مختبرات التحضيرات المجهرية وسائط أخرى لإجراء عمليتي التشريب والطمر، ومن هذه الوسائط:

1.3 نظير البلاستيك Paraplast

هذا الوسط مزيج من شمع البرافين ومبلمرات البلاستيك. تتراوح درجة انصهاره بين 56 و 57°س، ويمتاز بعدة مزايا عن وسائط الطمر الأخرى وهي:

1. تجانس القوالب الناتجة.
2. بطء تجمده عند الطمر.
3. سهولة قطع شريط النسيج.
4. ما يضفيه من سهولة في قطع القوالب الكبيرة.

2.3 الأصماغ الصناعية Synthetic Resins

استعملت صموغ **أكريليك** Acrylic، مثال **إيثيل ميثاكريليت** Ethyl Methacrylate وصموغ Epoxy، مثل **أرالدايت** Araldite، وصموغ بوليستر Polyester في عمليات التشريب والطمر، خاصة في التحضيرات المجهرية الإلكترونية. ونظراً لأن هذه الصموغ تصبح شديدة الصلابة عندما تتبلمر، فإنها تساعد على عمل مقاطع رقيقة جداً يتراوح سمكها بين 400 و 600 أنجستروم (A°)، وكذلك تستعمل هذه الوسائط لعمل مقاطع للدراسة بالمجهر الضوئي، بسمك 1 إلى 2 ميكرومترا، وخاصة في الأنسجة الصلبة كالعظام غير المتكلسة. وميزة هذه الصموغ، أنها لا تحدث أية تشوهات في بناء النسيج، وقد استعملت لأول مرة عام 1949م.

يتكون صمغ الطمر الصناعي عادة من 4 مكونات هي: الصمغ ذاته، ثم **معامل تقسية** Hardner، **ومسارع تجفيف** Accelerator، وأخيراً **معامل ملدّن** Plasticizer. ويكون التشريب في الأنسجة بهذه الصموغ عند درجة الحرارة العادية. أما طمرها، فيجري في فرن تتراوح حرارته بين 60 و 70°س، ولمدة تمتد من 8 إلى 12 ساعة.

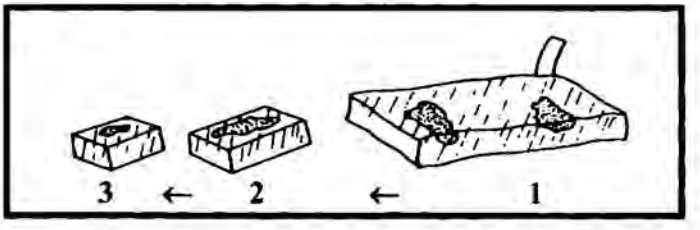
الفصل الرابع

تقطيـــع وتحميـــل الأنسجـــة

بعد الانتهاء من عملية الطمر، لا بد من إجراء بعض الخطوات لتهيئة النسيج المطمور لعملية التقطيع. وأولى هذه الخطوات هي التقليم، ثم التثبيت على حامل معدني أو خشبي أو بلاستيكي، يلي ذلك تحضير جهاز التقطيع بهدف الحصول على مقاطع بسمك 7-10 ميكرومترات.

1. التقليم Trimming

بعد الحصول على قوالب شمعية جيدة تحتوي على النسيج المطلوب، يتم تقليمها بإزالة الشمع الزائد من حول النسيج والإبقاء على محيط شمعي بحدود 2-3 ملم حوله، ويتم ذلك باستعمال شفرة حادة. والأمر الهام في عملية التقليم أن تكون حافتا القالب العلوي والسفلي متوازيتين، لأن ذلك يسمح بالحصول على شريط مقاطع مستقيم. وبخلاف ذلك فإن عدم التقليم السليم يؤدي إلى تكوين شريط ملتوٍ، وهذا أمر غير مرغوب عند دراسة مقاطع متسلسلة من عينة ما. كما أن التقليم الجيد يساعد على وضع أكبر عدد من المقاطع على الشريحة الواحدة، وهذا ما يوفر الوقت والمواد في العمليات اللاحقة. ويبين شكل 1 قالباً شمعياً قبل وبعد التقليم.

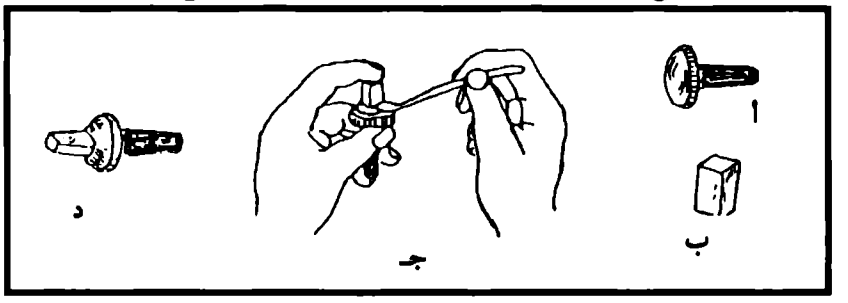


شكل 1: تقليم قالب الشمع

2. التثبيت على الحامل Affixation

بعد تقليم قالب الشمع المحيط بالنسيج إلى الحجم والشكل المناسبين، فإنه يتوجب تثبيت هذا القالب على حامل معدني أو خشبي أو بلاستيكي، ثم يوضع هذا الحامل في جهاز التقطيع وتصبح عملية التقطيع ممكنة.

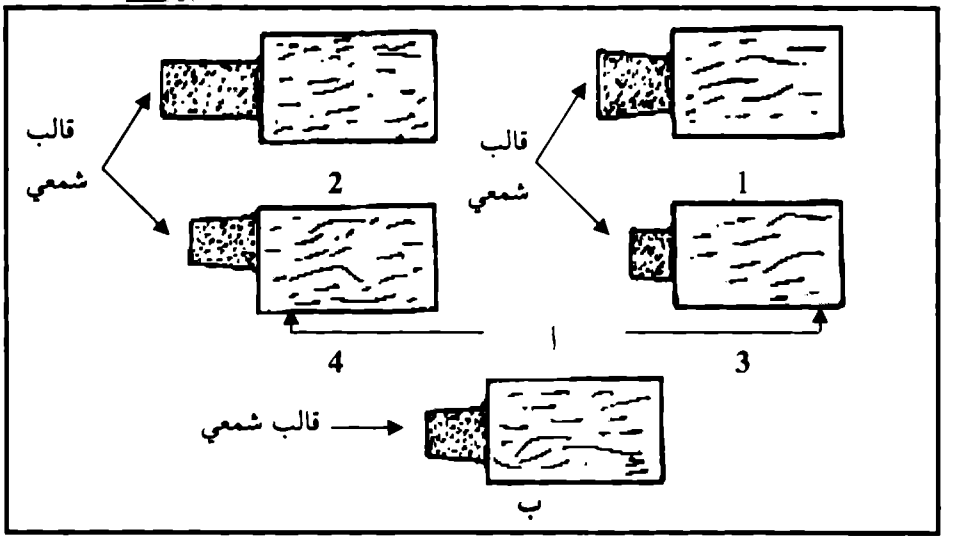
يثبت قالب الشمع على الحامل بإدخال مبسط ساخن بين قالب الشمع والحامل، ثم يسحب المبسط بعد انصهار الشمع من قاعدة القالب، ويضغط قالب الشمع على الحامل (شكل2). بعد ذلك يمكن صهر شمع إضافي حول قاعدة القالب، إذ أن ذلك يعطي دعماً جيداً للقالب أثناء القطع. ويبين الشكل 2 طريقة تثبيت قالب الشمع.



شكل 2: طريقة تثبيت قالب الشمع

أ. حامل معدني ؛ ب. قالب شمعي يحتوي النسيج؛ ج. تثبيت قالب الشمع على الحامل المعدني بالمبسط؛ د. قالب الشمع مثبت على الحامل المعدني.

بالإضافة إلى أهمية تثبيت قالب الشمع بالأسلوب المناسب، فإنه يجب التأكيد على شكل وحجم قالب الشمع بعد التثبيت، بحيث تكون القاعدة أعرض من القمة. كذلك يجب أن تكون المسافة بين القاعدة والقمة مقبولة، إذ أنه كلما زادت هذه المسافة، كلما ضعف دعم قالب الشمع، الأمر الذي يزيد من إمكانية كسر عنق القالب أثناء القطع. ويبين شكل 3 الحجم والشكل المناسبين لقالب الشمع بعد تثبيته.



شكل 3: الشكل والحجم المناسبين لقالب الشمع على الحامل

أ. أوضاع خاطئة؛ 1. القمة عريضة؛ 2. القالب طويل؛ 3. القالب قصير؛ 4. القالب غير متوسط؛ ب. الوضع الصحيح.

3. التحضير للقطع Preparation for Sectionimg

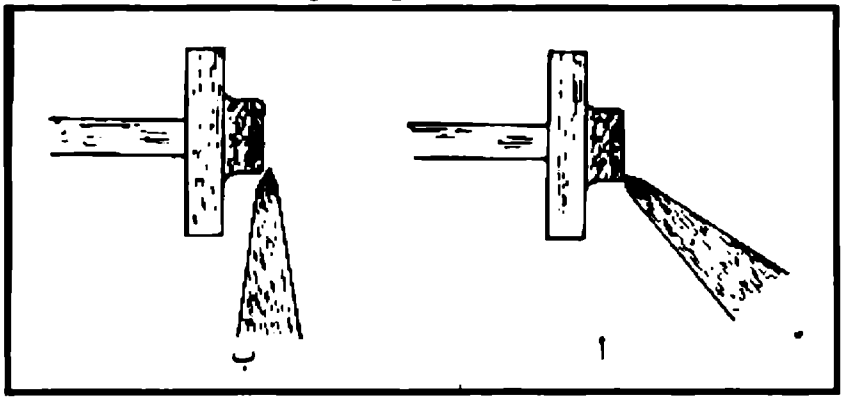
بعد تثبيت قالب الشمع على حامل مناسب، يصبح التجهيز لعملية القطع أمراً مطلوباً. والمقصود بالتحضير للقطع هو مراعاة الأمور التالية:

أ. أن يكون جهاز التقطيع نظيفاً، وإذا وجدت أية بقايا لمقاطع شمعية فإنه يجب إزالتها بفرشاة مناسبة مبلولة بالزايلين.

ب. أن يكون جهاز التقطيع خالياً من أية مشاكل ميكانيكية، وإذا كان الجهاز من النوع الدوار، فيجب التأكد من أن الدولاب البدوي سلس في حركته. فإذا كان قاسياً فإنه يتوجب تزييته، كذلك يلزم التأكد بأن آلية دفع قالب الشمع نحو السكين تعمل بشكل سليم، وإذا كان حامل القالب مدفوعاً إلى أبعد مدى، فإنه يجب إرجاعه إلى الخلف كي لا تضطر أن تفعل ذلك أثناء القطع، الأمر الذي يؤدي إلى رفع السكين من مكانه وإعادة ترتيب وضع العينة في الجهاز مرة ثانية، وفي ذلك هدر للوقت.

ج. قبل تثبيت السكين وحامل قالب الشمع في جهاز التقطيع يجب أن يكون الدولاب اليدوي محبوساً، لأن ذلك يعطي أماناً للطالب وللفني بحيث يتجنب أي جرح من السكين.

د. أن تكون سكين القطع نظيفة وحادة، ومثبتة بإحكام في مكانها الصحيح وبالزاوية المناسبة لعملية القطع، إذ يجب إمالة السكين حتى يلامس حدها القاطع وجه قالب الشمع بالقدر المناسب. فإذا كانت الإمالة كبيرة (الشكل 4أ) فإن السكين ستكشط المقطع كالإزميل ولا تقطعه، وإذا كانت الإمالة غير كافية (شكل 4ب) فإن سطح قالب الشمع سيكون مضغوطاً إلى مؤخرة السكين، الأمر الذي سيؤدي إلى قطع مقاطع سميكة.



شكل 4: تأثير إمالة السكين على المقطع.
أ. إمالة كبيرة؛ ب. إمالة غير كافية.

ه. أن يكون قالب الشمع مثبتاً على الحامل بشكل جيد، وأن يكون الحامل مثبتاً بإحكام في مكانه الصحيح من جهاز التقطيع. ويؤدي عدم تحقيق هذين الأمرين على النحو المناسب إلى مشاكل في التقطيع منها إمكانية فقدان قالب الشمع، والحصول على مقاطع تتفاوت في سماكتها.

و. توفر الأشياء التالية: ملقط أو حامل للمقاطع، علب ورقية لحفظ المقاطع، قنينة زايلين أو كلوروفورم، فرشاة صغيرة، ومحارم ورقية.

4. أنواع المقاطع Types of Sections

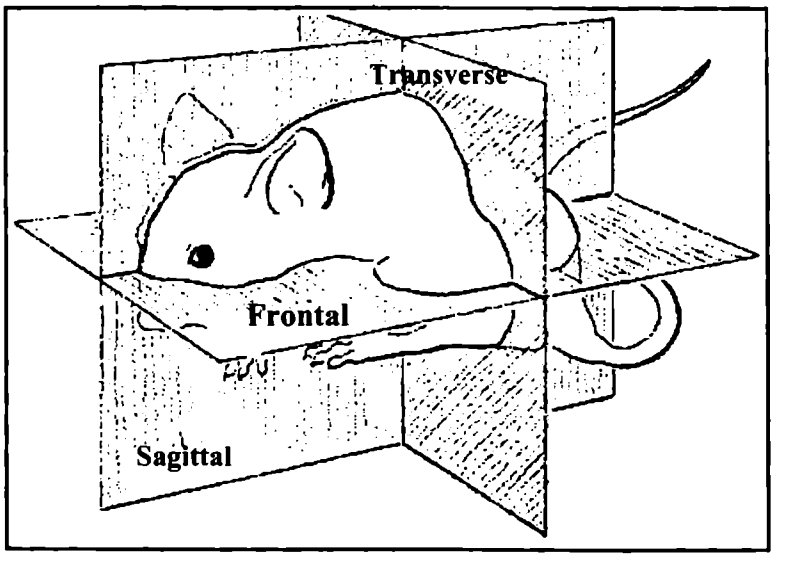
قبل الشروع بعملية التقطيع، يتوجب على طالب التحضير المجهري أو فني المختبر معرفة نوع المقاطع المراد تحضيرها، وكذلك معرفة الحاجة إلى تحميلها على الشرائح إما منفردة أو متسلسلة. ومن حيث النوع، تكون المقاطع إما طولية أو عرضية.

1.4 المقاطع الطولية Longitudinal Sections

تكون المقاطع من هذا النوع إما **سهمية** Sagittal، وتكون موازية للمحور الطولي للعينة وعمودية على محورها العرضي، ويكون القطع فيها من أحد جانبي العينة إلى الجانب الآخر، ويتضمن المقطع الجانب الظهري والجانب البطني للعينة، أو **أمامية (جبهية)** Frontal ويكون القطع فيها متجهاً من الظهر إلى البطن، أو العكس، موازياً للمحور الطولي أيضاً، أي أن كل مقطع يتضمن الجانب الأيمن والجانب الأيسر من العينة (شكل 5).

2.4 المقاطع العرضية Transverse (Cross) Sections

تكون هذه المقاطع عمودية بالنسبة للمحور الطولي للعينة، ويكون اتجاه القطع من الرأس إلى الذيل (شكل 5).



شكل 5: أنواع المقاطع

5. خطوات التقطيع

بعد التأكد من الأمور المذكورة سابقاً، يمكن للطالب البدء بعملية التقطيع، وذلك بإتباع الخطوات التالية:

أ. فك حبس الدولاب اليدوي لجهاز التقطيع الدوار، وتقريب السكين باتجاه قالب الشمع أو العكس بحيث تكون المسافة بينهما حوالي 2ملم. بعد ذلك يعاد تثبيت السكين وقالب الشمع بشكل محكم وتبدأ عملية القطع بعد تعيين سمك المقطع الذي يقترح أن يكون 10 ميكرومترات.

ب. بعد الحصول على عدة مقاطع يجب التأكد بأنها تحتوي النسيج. عندئذ، ترفع المقاطع من على السكين بواسطة رافع مقاطع، أو فرشاة رسم، أو ملقط وتوضع داخل علبة ورقية (15×10×2سم) لحفظها لحين تحميلها على شرائح فيما بعد.

أذا كان الهدف من القطع هو الحصول على أية مقاطع من العينة بغض النظر عن موضعها في النسيج أو تسلسلها، فإنه لا توجد حاجة للحصول على شرائط من المقاطع، وكذلك فإن المقاطع توضع في العلبة الورقية دون الاهتمام بترتيبها. ولكن الأمر يختلف كلياً إذا كان المراد هو الحصول على مقاطع متسلسلة، إذ أنه من الطبيعي في هذه الحالة ترقيم الشرائط بالتسلسل الصحيح، وكذلك تبيان اتجاهها. وهنا، يفضل أن تكون الشرائط ذات طول موحد (10سم)، وأن تحفظ في العلبة بحيث يكون سطحها المصقول إلى أسفل. ويمكن أن تكون المقاطع عرضية، أو طولية.

ج. إضافة إلى ذلك، يجب أن تكون سرعة القطع منتظمة. وفي الحالات التي تكون فيها الأنسجة رخوة يفضل أن تكون السرعة بطيئة، بينما يفضل زيادة السرعة للحصول على أشرطة من المقاطع. وبالنسبة لدرجة حرارة مكان القطع، فإنه يفضل أن تكون بحدود 20°س، لأن المقاطع تلتف على نفسها إذا كانت الحرارة منخفضة، ويمكن التغلب على هذه المشكلة باستعمال مصدر حراري يوضع بالقرب من جهاز التقطيع أو بتدفئة السكين. أما إذا كانت درجة الحرارة مرتفعة، فإن المقاطع تتميع، وبالتالي

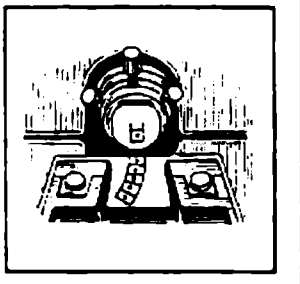
يصعب الحصول على مقاطع رقيقة. وتحل هذه المشكلة بتبريد السكين أو قالب الشمع بقطعة ثلج.

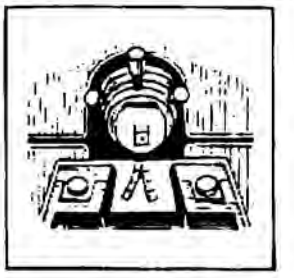
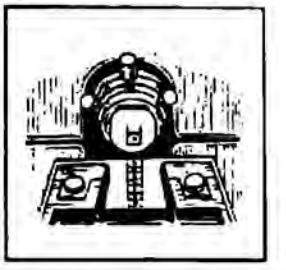
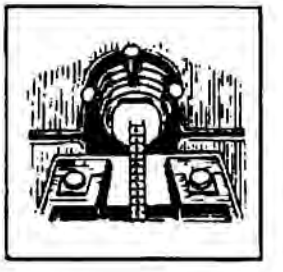
د. بعد الانتهاء من عملية القطع، أو عندما تدعو الحاجة إلى وقف تلك العملية بشكل مؤقت، فإنه يجب إخراج السكين من مكانها في جهاز التقطيع، وتنظيفها بالزايلين أو الكلوروفورم، بفرشاة رسم، ويكون اتجاه التنظيف من قاعدة السكين إلى حدها القاطع، مع تحاشي احتكاك جزء الفرشاة المعدني بحد السكين القاطع، لأن ذلك يؤدي إلى تهشيم هذا الحد، الأمر الذي ستنتج عنه مشاكل في القطع.

6. مشاكل التقطيع

على الرغم من كل الترتيبات اللازمة للقيام بعملية التقطيع، فقد تحدث مشاكل أثناء هذه العملية نتيجة أسباب قد تكون خارجة عن إرادة الطالب. وفيما يلي استعراض لأبرز هذه المشاكل، وأسبابها، والحلول المقترحة لها، كما هي مبينة في جدول (1).

جدول 1. المشاكل المتوقعة أثناء تقطيع الأنسجة وأسبابها وعلاجها

المشكلة	السبب	العلاج
1. التفاف المقاطع إلى أعلى وعدم تكون شريط.	أ. الشمع صلب ب. السكين باردة ج. ميل السكين زائدة	أ. طمر القالب بشمع طري. ب. تدفئة السكين ج. تقليل ميل السكين
2. التواء شريط المقاطع 	أ. عدم توازي سطحي القالب السفلي والعلوي ب. سخونة أحد جاني القالب أكثر من الجانب الآخر ج. عدم تساوي حدة السكين	أ. إعادة تقليل القالب ليصبح متوازي الحواف ب. تبريد القالب ج. تغيير مكان القطع على السكين بتحريكها أو إعادة شحذها.

المشكلة	السبب	العلاج
3. انشقاق المقاطع طولياً 	أ. وجود ثلمات في حد السكين. ب. وجود فضلات على حد السكين. ج. وجود فضلات أو أجزاء صلبة في النسيج أو الشمع	أ. تغيير مكان القطع ب. تنظيف حافة السكين. ج. إعادة الطمر باستعمال شمع مرشح
4. عدم انتظام سمك المقاطع 	أ. عدم تثبيت السكين وقالب الشمع ب. عدم ضبط آلية الدفع في جهاز التقطيع	أ. إحكام تثبيت السكين وقالب الشمع ب. تزييت أجزاء جهاز التقطيع أو تغييرها
5. وجود أجزاء سميكة وأخرى رقيقة في كل مقطع	اهتزاز حافة السكين نتيجة ميلها الزائد	تقليل ميل السكين
6. التصاق المقاطع بقالب الشمع 	أ. شحن قالب الشمع بكهرباء ساكنة ب. وجود شظايا من الشمع على حافة السكين أو الطرف العلوي لقالب الشمع ج. صغر زاوية الخلوص	أ. زيادة رطوبة مكان القطع وتفريغ شحنات الكهرباء الساكنة باستعمال مصباح بنسن Bunsen ب. تنظيف حافة السكين وطرف قالب الشمع ج. زيادة زاوية الخلوص
7. وجود ثقوب بالمقاطع	وجود فقاعات هواء بقالب الشمع	إعادة الطمر

المشكلة	السبب	العلاج
8. سماع صوت معدني أثناء القطع	أ. قساوة النسيج ب. وجود بلورات في النسيج ج. تعرض النسيج لمدة طويلة للكحول د. بطء التقطيع	الحل ليس سهلاً، إلا إذا كان السبب هو بطء سرعة التقطيع، وفي هذه الحالة يكمن الحل في زيادة سرعة القطع
9. عدم تكون شريط رغم جودة المقاطع	أ. الشمع بارد أو صلب ب. عدم موازاة حافة القالب لحافة السكين ج. المقاطع غليظة	أ. تدفئة السكين والطمر بشمع طري ب. الموازاة بين حافة السكين وحافة قالب الشمع ج. تقليل سمك المقطع
10. تساقط النسيج من قالب الشمع	عدم اكتمال إزالة الماء والتشريب	إعادة إزالة الماء والتشريب
11. تفتت النسيج في مقطع الشمع	فترة التشريب أطول من اللازم ودرجة حرارة وسط التشريب عالية	نظراً لأن النسيج يكون «مطبوخاً» في هذه الحالة، فإنه قد فات الأوان لأي حل

7. تحميل المقاطع

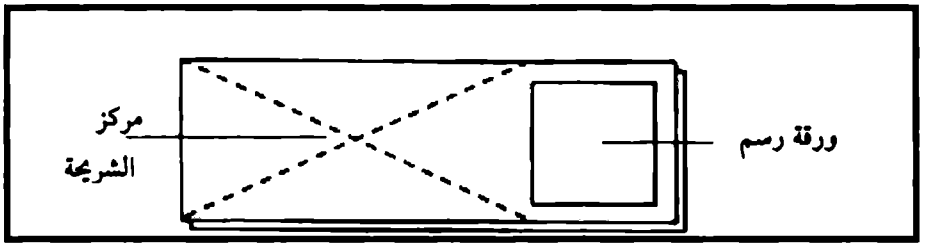
1.7 متطلبات التحميل

بعد الحصول على العدد المناسب من المقاطع المفردة أو المتسلسلة، تحمل المقاطع على شرائح زجاجية تبلغ 7.5 سم طولاً و 2.5 سم عرضاً. ولكي تتم عملية تحميل المقاطع بالطريقة السليمة يجب مراعاة الأمور التالية:

أ. أن تكون الشرائح الزجاجية نظيفة، وذلك باستعمال الكحول أو الزايلين. وإذا لم تستعمل شرائح نظيفة فإن ذلك يؤدي إلى احتمال سقوط المقاطع عنها أثناء عملية الصبغ.

ب. أن يتوفر وسط تحميل مناسب، ويعمل هذا الوسط على التصاق المقاطع بالشرائح. ومن والوسائط المستعملة بياض البيض المضاف إليه **جليسرول** Glycerol ومطهر **ثايمول** Thymol. وسنعالج هذا الموضوع في الجزء الثاني من هذا الكتاب فيما بعد.

ج. توفر ماء مقطر، وصفيحة ساخنة (درجة حرارتها 35-40° س) وفرشاة شعر الجمل، وحامل مقاطع، وورق ترشيح. وبعد توفر هذه المواد يجب تحديد موقع المقطع على الشريحة بحيث يكون مركزياً. ويمكن اعتماد (شكل6) لتحديد مركز الشريحة.



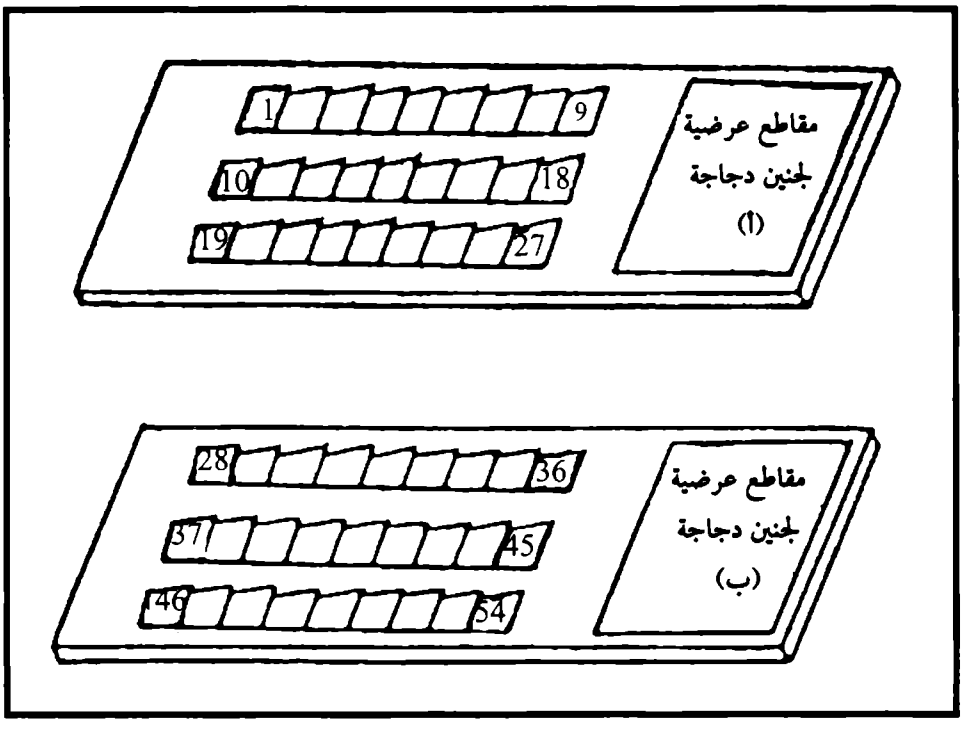
شكل 6: تحديد مركز الشريحة

2.7 خطوات التحميل

أ. تتمثل الخطوة الأولى في التحميل بمسح العدد المطلوب من الشرائح النظيفة بكمية قليلة جداً من وسط التحميل، ويكون ذلك برأس السبابة، وتوضع بضع قطرات من الماء المقطر على الشريحة، ثم تضاف المقاطع، بحيث يكون سطحها اللامع إلى أسفل.

ب. لكي تفرد المقاطع، توضع الشرائح على صفيحة ساخنة (درجة حرارتها بين 35° و 40°س)، ويمسك بطرفي المقطع أو الشريط بإبرتين ليتمدد باتجاه طرفَيّ الشريحة ولكن بحرص، حتى لا تتمزق المقاطع. ويمكن تسهيل فرد المقاطع بسحب الماء الزائد من تحتها بورقة ترشيح.

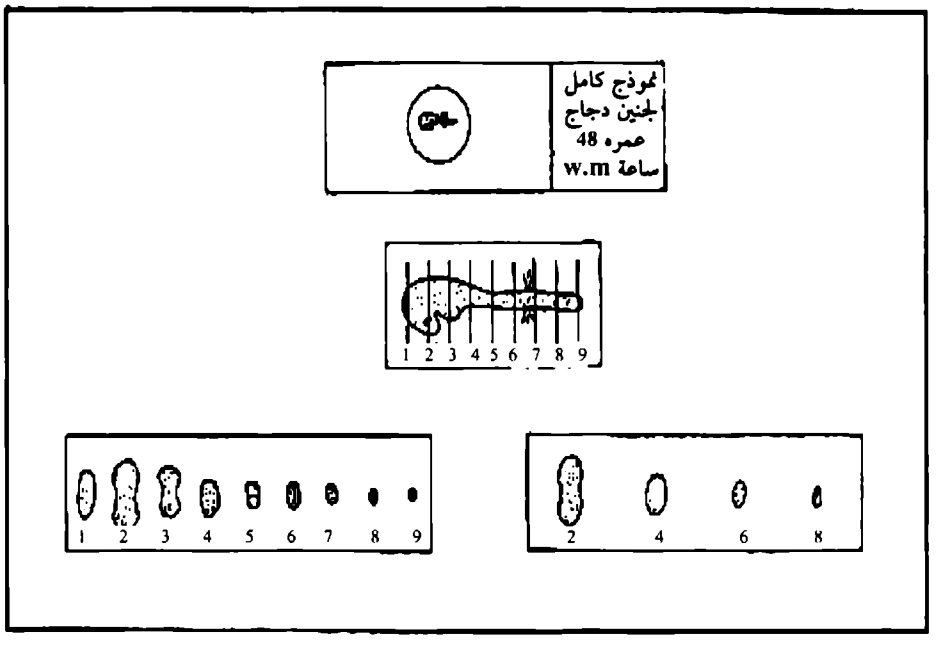
ج. عند وضع عدد من الأشرطة على شريحة، فإنه يتوجب تحديد عدد المقاطع في كل شريط، بحيث يحافظ على نفس العدد في جميع الأشرطة. ويجب أن تكون الأشرطة مستقيمة وبتسلسل صحيح، ويتم ذلك بترقيمها ومعرفة اتجاهها. ويبين الشكل 7 ترتيب مقاطع متسلسلة على شريحتين.



شكل 7: ترتيب المقاطع المتسلسلة على الشرائح

ملاحظة

عند التعامل مع أشرطة من المقاطع، فإن هذه الأخيرة تحمل على الشرائح إما **مختارة** Representative لمنطقة أو تركيب معين، أو **متسلسلة** Serial بحيث توضع كل المقاطع الناتجة عن عملية التقطيع على الشرائح (شكل 8). وسواء أكانت المقاطع المحملة على الشرائح من النوع المختار أو المتسلسل، فإن تلك التي تقطع أولاً توضع على الجزء العلوي الأيسر من الشريحة، وتحمّل المقاطع وكأنها أسطر في فقرة مكتوبة باللغة الإنجليزية، بالتسلسل الصحيح (شكل 7).



شكل 8: طرائق وضع المقاطع على الشريحة

د. بعد تحميل المقاطع على الشرائح، وسحب الماء من حولها ومن تحتها يجب تجفيفها. وينصح بأن يتم ذلك عند درجة حرارة مناسبة (30°-35°س) لئلا يدخل الهواء بين المقاطع والشرائح، الأمر الذي يسبب سقوط المقاطع أثناء علمية الصبغ، والشيء المتبع هو أن يتم التجفيف على صفيحة دافئة، أو في فرن عند درجة الحرارة المقترحة (30°-35°س).

ه. بعد الانتهاء من تجفيف المقاطع، توضع أوراق وسم عند طرف الشرائح لتبين نوع النسيج والمثبت. ويمكن أن يكون ذلك بالكتابة بقلم رصاص على طرف الشريحة إذا كان مسنفراً، أو بقلم شمعي أو ماسي. عندئذ تكون المقاطع جاهزة لعملية الصبغ.

الفصل الخامس

صبـــغ الأنسجـــة

إذا فحصت المقاطع قبل صبغها فإنه لا يتضح منها إلا تفاصيل قليلة باستثناء النواة وحدود الخلية. وعملية الصبغ هي التي تزيد من الفروق في معامل انكسار مكونات الخلية والنسيج مما يؤدي إلى تمايزها، ويحدث هذا نتيجة الفرق في ميل بعض مكونات الخلية أو النسيج لمعظم الصبغات.

بدأ تطبيق استعمال الصبغات التجارية في التحضيرات النسيجية المجهرية في النصف الثاني من القرن التاسع عشر، ولم يطرأ إلا تعديل طفيف على الطرائق المستعملة منذ ذلك الحين. ويعزى أول استعمال لصبغ النواة إلى **جيرلاخ** Gerlach عام 1858، عندما حاول صبغ الخلايا العصبية. وفي عام 1865، نجح بومر Bohmer في دمج **هيماتوكسلين** Hematoxylin مع الشبّ Alum B لصبغ النواة، وأخيراً طورت أصباغ **أنيلين** Aniline للأغراض الصناعية. وما زالت الأصباغ القديمة مستعملة حتى الآن. وما معظم طرائق الصبغ المتبعة اليوم إلا تعديل وتطوير للطرائق التقليدية، عدا طرائق الكيمياء النسيجية فإنها حديثة نوعاً ما.

1. نظرية الصبغ

قدمت نظريتان لتفسير قواعد صبغ الأنسجة: واحدة كيماوية وأخرى طبيعية.

1.1 النظرية الكيماوية

أعلنها **أيرلخ** Ehrilch عام 1880 وتقول أن الصبغ عبارة عن تفاعل كيماوي يعتمد على تكوين مادة ملحية بين **الشق الموجب** Cation أو **الشق السالب** Anion للصبغة، وبين مجموعات كيماوية معينة في الخلية أو النسيج. وعلى هذا الأساس تكون الأنسجة إما **محبات للحامض** Acidophillic وتحتوي مجموعات قاعدية، وفي

هذه الحالة تتفاعل مع الصبغ الحامضي، أو تكون **محبات للقاعدة** Basophillic وتحتوي مجموعات حامضية تتفاعل مع الصبغات القاعدية.

2.1 النظرية الطبيعية

ترتكز هذه النظرية على افتراضات تقول بأن الصبغ يتم بوسائل طبيعية مثل الامتصاص، والادمصاص، والخاصية الشعرية والانتشار والاسموزية. والشعور السائد في الوقت الحاضر هو أن الصبغ ينتج عن عمليات كيماوية وطبيعية في آن واحد.

2. تصنيف الصبغات Classification of Dyes

هناك عدة أسس لتصنيف الصبغات منها: مصدر الصبغات وتفاعلها أو ميلها للنسيج، أو تطبيقاتها العملية. فبالنسبة لمصدر أو أصل الصبغة فإنه يمكن تقسيم الصبغات إلى **طبيعية** Natural و **مصنعة** Synthetic، وسنشرح كل صنف على حدة.

1.2 تصنيف الصبغات حسب مصدرها

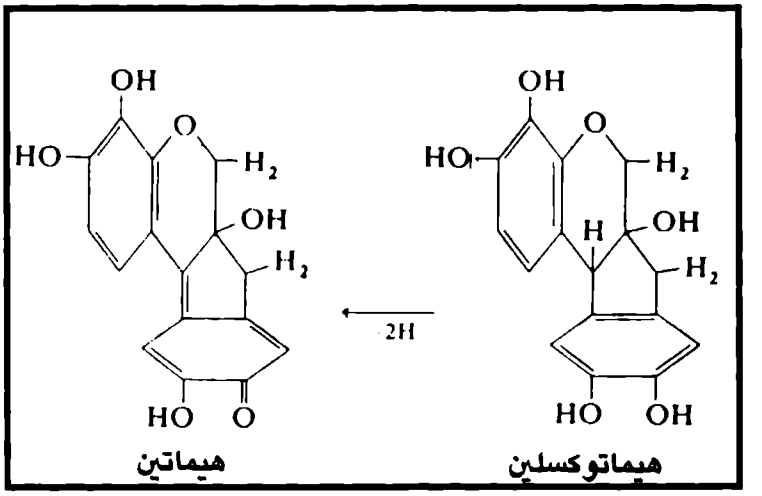
1.1.2 الصبغات الطبيعية Natural Dyes

يحصل على الصبغات الطبيعية، كما يدل اسمها، إما من مصدر حيواني أو نباتي، وتستعمل خمسة أنواع من الصبغات الطبيعية في التحضيرات المجهرية بشكل واسع وهي: **قرمز** Cochineal **وكارمين** Carmine **وهيماتوكسلين** Hematoxylin، **وأورسين** Orcein، و **سافرون** Saffron.

أ. **القرمز والكارمن Cochineal & Carmine**: تستخرج هذه الصبغات من جسم حشرة صغيرة اسمها *Coccus Cacti* تعيش على نبات الصبار، وتوجد الصبغة على شكل رحيق أرجواني في إناث هذه الحشرة. فإذا جمعت الإناث وجففت، فإن القرمز ينتج على شكل مسحوق، وما لم يضاف **مرسخ** Mordant للصبغة، كالحديد أو الألومنيوم، فلا يكون للقرمز أي ميل للأنسجة. **وشب القرمز** Alum Cochineal صبغة جيدة للنواة. وغلي القرمز مع ملح الشب ينتج راسباً لا يذوب في الماء يدعى **كارمين**

Carmine. ولا يستعمل هذا الراسب كصبغة إلا بعد اذابته بمحلول **حامض الخليك** Acetic Acid حيث يتكون **كارمين خليك** Acetocarmine الذي يستعمل كصبغة شائعة للنواة.

ب. **الهيماتوكسلين Hematoxylin**: هذه الصبغة واحدة من أكثر الصبغات شيوعاً في التحضيرات المجهرية، وتستخرج من خشب شجرة بقولية صغيرة اسمها *Hematoxylin campechianum* تزرع في أمريكا الجنوبية والوسطى. وتستخلص الصبغة بمعاملة الجذوع بـ **الإيثر** Ether، ثم تجفف وتذوب في الماء، وبعد ذلك تصفى وتبلور. ولأن هذه الخطوات طويلة ومكلفة، يعتبر الهيماتوكسلين من الصبغات غالية الثمن. ولا يستعمل هيماتوكسلين كصبغة نظراً لعدم ميله للأنسجة، إلا بعد أكسدته ليكوّن **هيماتين** Hematein. ونتيجة لهذه الأكسدة فإن الهيماتوكسلين يفقد ذرتي هيدروجين (الشكل 1).



شكل 1: أكسدة هيماتوكسلين إلى هيماتين

تكون أكسدة الهيماتوكسلين طبيعية وتتم بوسط كحولي أو مائي، وتستغرق من ثلاثة إلى أربعة أشهر، وتسمى هذه العملية **التعتيق** Ripening. ويمكن أن تتم هذه الأكسدة صناعياً، وبسرعة، وذلك بإضافة عوامل أكسدة مثل **فوق أكسيد الهيدروجين** H_2O_2، **وأكسيد الزئبق** HgO، **وأيودات البوتاسيوم** KIO_4، **وبيرمنجنات البوتاسيوم** $KMNO_4$. وصبغة الهيماتوكسلين المعتق هي عبارة عن خليط من الهيماتوكسلين، والهيماتين، ونواتج أكسدة الهيماتوكسلين. وفي حالة الأكسدة الصناعية، فإنه يجب عدم المبالغة فيها، إذ أن ذلك يؤدي إلى تكوين مركبات عديمة الفائدة. ولهذا فإنه يجب إضافة الكمية الصحيحة من عامل الأكسدة. فكلما قلت الكمية مع المحافظة على نوعية الصبغ، كلما زاد «عمر» الصبغة. ويبين الجدول التالي أنواع وكميات المؤكسدات المستعملة لتعتيق الهيماتوكسلين.

كمية الهيماتوكسلين	عامل الأكسدة	كمية عامل الأكسدة
1.0 غم	HgO	.5000 غم
1.0 غم	KIO_4	.0500 غم
1.0 غم	H_2O_2	.0002 مل
1.0 غم	$KMnO_4$	.1750 غم

ملاحظة:

يحضر الهيماتوكسلين حسب صيغ مختلفة، وتسمى كلية صيغة باسم أول من ثبّت استعمالها، وعليه يمكن تحضير صبغة هيماثوكسلين حسب صيغة **إيرلخ** Ehrlich، أو **ماير** Mayer، أو **جِل** Gill. والشيء المشترك بين هذه الصيغ هو احتوائها على مسحوق الصبغة، ومادة مذيبة، ووسط مرسخ مثل شب الأمونيا أو شب البوتاسيوم. وستناول هذه الصيغ في فصل لاحق.

2.1.2 صبغات طبيعية أخرى

ج. **أورسين** Orcein: تستخلص من أشن (lichen) يسمى *Rocella* ويحضر بغلي الأشن في الماء، مما يسبب انفساخ **حامض ليكانوريك** Lecanoric acid إلى **أورسينول** Orceinol الذي يكوّن الأورسين عند إضافة الأمونيا بوجود

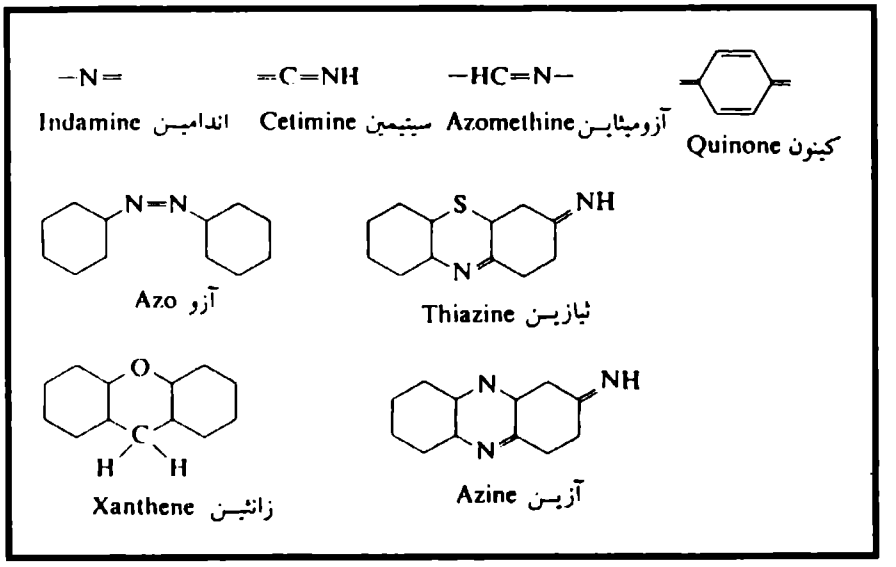
الأكسجين الجوي. وتصبغ هذه الصبغة الألياف المرنة elastic fibers في الأنسجة الضامة.

د. **سفرون** Saffron: يستخلص من مياسم نبات الزعفران Crocus.

ه. **نيلة** Indigo: تستخرج نباتات تنتمي للجنس Indigofera.

3.1.2 الصبغات المصنعة Synthetic Dyes

هذه مركبات عضوية تشتق من البنزين، وقد أصبحت متوفرة في منتصف القرن التاسع عشر عندما وجد **بيركن** Perkin طريقة لعمل صبغات الأنيلين. ولعمل صبغة مشتقة من البنزين فإنه يجب ربط مجموعات كيماوية معينة تسمى **حاملات الألوان** Chromophores (شكل2) بحلقة البنزين. وتكوّن حلقة البنزين وحامل اللون مادة تدعى **مولد اللون** Chromogen. تجدر الإشارة هنا إلى أن مولد اللون لا يقوم بدور الصبغة وليس له أية قابلية للنسيج. ولكي يقوم بهذا الدور، يجب أن يحتوي مولد اللون مكوناً قاعدياً وآخر حامضياً، ويكون له بالتالي قدرة على تكوين ملح. وتدعى مجموعات الشق الكيماوي التي تضيف هذه الخاصية لمولد اللون مساعدات اللون Auxochromes، ومنها: مجموعات **هيدروكسيل** OH- و**أمينو** NH_2-، و **كاربوكسيل** COOH-، و**سلفونيك** SO_3. وتعتبر الصيغة الكيماوية لمساعدات اللون احدى الأسس التي تصنف الصبغات على أساسها، وسنناقش هذا الأمر لاحقاً.



شكل 2: الصيغة البنائية لحاملات الألوان

2.2 تصنيف الصبغات حسب حاملات الألوان

تصنف الصبغات على هذا الأساس إلى تلك التي تحتوي **كينونويد** Quinonoid، **وآزو** Azo، **ونيترو** Nitro. ونعالج فيما يلي هذه الصبغات.

1.2.2 صبغات الكينونويد Quinonoid Dyes

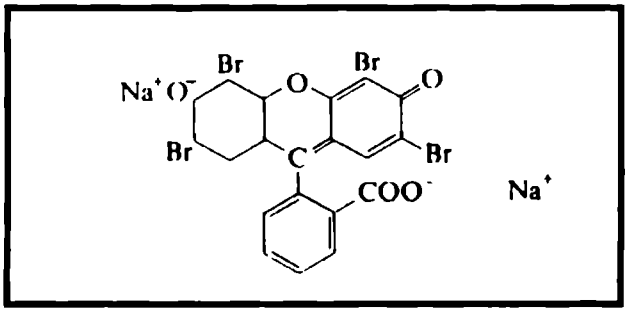
ينتمي لهذه المجموعة أنواع أهمها: صبغات **هيماتين** Hematein ، و **زانثين** Xanthene، **وثيازين** Thiazine. ونستعرض فيما يلي أهم صبغات كل نوع:

أ. صبغات هيماتين Hematein Dyes

هذه مجموعة صغيرة من الأصباغ المستخرجة من نبات بقلي يدعى *Hematoxylon Campechianum* كما ذكرنا سابقاً. لون هذا النوع أحمر إلى بني، وبوساطة مرسخ صبغة، يصبح من أهم الأصباغ في التحضيرات المجهرية الضوئية. والهيماتين هو الحالة المؤكسدة للهيماتوكسلين الذي لا يعتبر صبغاً، كما أشرنا إلى ذلك سابقاً.

ب. صبغات زانثين Xanthene Dyes

في هذه الأصباغ يربط عنصرا الكربون والأكسجين بين حلقتين. وتمثل الصبغة السيتوبلازمية **إيوسين** Eosin، (شكل3) أحد الأمثلة عن هذه المجموعة التي يشير اسمها إلى اللون الوردي.



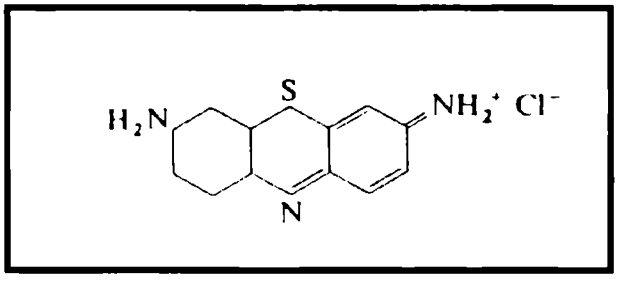
شكل 3: صبغة إيوسين واي

ونظراً لأن صبغة إيوسين هي أكثر الصبغات السيتوبلازمية شيوعاً، فإنه يجدر التحدث عنها بشيء من التفصيل. لمجموعة إيوسين تنتمي صبغات **إيوسين واي** Eosin Y، **وإيوسين ب** Eosin B، و **فلوكسين** Phloxin. ويعتبر إيوسين واي أكثر هذه الأنواع استعمالاً، وهو يذوب في الماء بنسبة 44٪، ويذوب في الكحول الإيثيلي بنسبة 2٪. ويمكن تحضير محاليل مائية من هذه الصبغة بتركيز 1٪.

يستعمل محلول الأيوسين المائي بتركيز 1٪ وتتراوح فترة الصبغ فيه بين 1/4 -3 دقائق. أما محلول الصبغة الكحولي فيستعمل بنسبة 1٪، ويحضر بإذابة 1 غم من الصبغة في كل 20 مل ماء مقطر، ثم يضاف 80 مل من كحول مطلق أو كحول 95٪. وبإضافة 0.2 مل من حامض الخليك الثلجي لكل 100 مل محلول الصبغة المائي أو 0.5 مل من هذا الحامض لكل 100 مل من محلول الصبغة الكحولي يكون الصبغ بالإيوسين أكثر قوة. ولمنع نمو العفن في هذه المحاليل يضاف 0.25 مل من فورملدهايد 40٪ لكل 100٪ مل من المحلول.

ج. صبغات ثيازين Thiazine Dyes

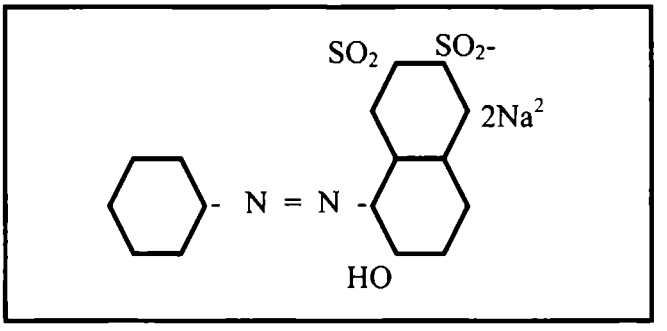
في هذه المجموعة يربط عنصراً الكبريت والنيتروجين بين حلقتين. وصبغة **ثيونين** Thionine هي أبسطها (شكل4). وبشكل عام، هذه المجموعة هامة في صبغ البروتينات النووية. والعديد من هذه الأصباغ محّولة للألوان، أي أنها تلون النسيج بألوان مختلفة عن لون الصبغة نفسها. وتعتبر صبغة **أزور ب** Azure B مثال آخر على هذه المجموعة.



شكل 4: صبغة ثيونين

2.2.2 صبغات الآزو Azo-Dyes

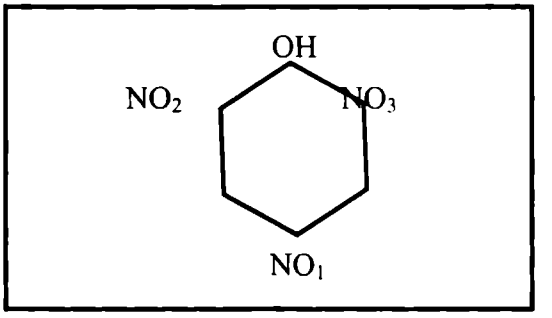
هذه مجموعة صغيرة ومنها **أحمر كونغو** Congo Red، **وأزرق تريبان** Trpan Blue **وأورانج جي** Orange G، **وأخضر جانوس** Janus Green، وهي تصبغ السيتوبلازم. وحامل الصبغة هنا هو مجموعة –N = N–، ويشير الاسم إلى ذرتي النتروجين التي تربط بين حلقتين. وقد تحتوي أصباغ من هذا النوع على مجموعة –N=N– واحدة أو أكثر (شكل5).



شكل 5: صبغة أورانج جي

3.2.2 صبغات النيترو Nitro-Dyes

هذه أصغر مجموعة ومنها حامض البكريك أي ثلاثي نيتروفينول (شكل6). وحامض البكريك هو أحد المكونات الأساسية لمثبت بوان.



شكل 6: ثلاثي نيتروفينول

3.2 تصنيف الصبغات حسب مساعدات الألوان

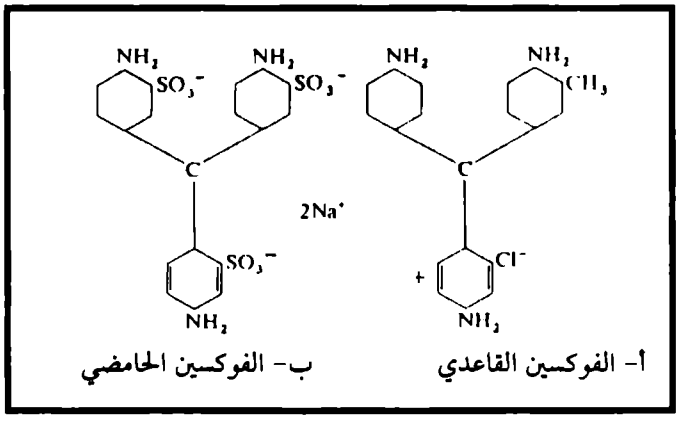
إضافة إلى تصنيف الصبغات حسب الأسس السابقة، فإنها تصنّف حسب مساعدات الألوان إلى قاعدية، وحامضية ومتعادلة.

1.3.2 أصباغ قاعدية Basic Stains

يحمل مساعد اللون فيها شحنة موجبة، وتباع هذه الأصباغ على شكل كبريتات أو كلوريدات، ومثال عليها **فوكسين القاعدي** Basic Fuchsin، الذي يتكون من قاعدة **روزأنيلين** Rosaniline ملونة وشق كلور(شكل 7) أ وتلوّن هذه الصبغة مكونات الخلية الحامضية كالنواة.

2.3.2 أصباغ حامضية Acidic Stains

يحمل مساعد اللون فيها شحنة سالبة. وتتوفر هذه الأصباغ كأملاح صوديوم أو كالسيوم، ومثالها **فوكسين الحامضي** Acidic Fuchsin، وهو ملح صوديوم لمشتق من روزأنيلين حامض الكبريت (الشكل 7ب)، وهو يصبغ المكونات القاعدية من الخلية كالسيتوبلازم.



أ- الفوكسين القاعدي ب- الفوكسين الحامضي

شكل 7: صبغات مصنفة حسب مساعدات الألوان

3.3.2 أصباغ متعادلة (حيادية) Neutral Stains

تنتج هذه الأصباغ عن تفاعل صبغ حامضي وآخر قاعدي، وهي غالباً لا تذوب أو هي ضئيلة الذوبان في الماء، بل تذوب في مذيبات عضوية، ومثال عليها صبغات **رومانوفسكي** Romanovsky التي تستعمل لصبغ الدم، وهي تنتج من تفاعل **إيوسين** Eosin و **أزرق ميثيلين** Methylene Blue. وتصبغ هذه الأصباغ مكونات الخلية المحبة للقاعدة وتلك المحبة للحمض.

3. مرسِّخات الصبغة Mordants

تساعد هذه المواد في تثبيت الصبغة بالأنسجة، وهي ضرورية في حالة الهيماتوكسلين. وغالباً ما تكّون هذه المواد أملاحاً أو هيدروكسيدات لمعادن ثنائية أو ثلاثية التكافؤ، وتتفاعل كهيدروكسيدات مع الصبغة بأخذ ذرة الهيدروجين منها. ويرتبط معقد المرسِّخ والصبغة بمجموعات الفوسفات للأحماض النووية للأنسجة، ويسمى المركب المكون من الصبغة والمرسخ **البحيرة** Lake. وتستعمل الكبريتات والكلوريدات كمرسِّخات، لكن أملاح الألومنيوم والحديد والنحاس أصبحت لأسباب تاريخية أكثر المرسخات شيوعاً.

تستعمل المرسخات بثلاث طرائق، هي:

أ. وضع النسيج بالمرسِّخ قبل اجراء عملية الصبغ.

ب. خلط المرسِّخ بمحلول الصبغة ووضع الشرائح بالخليط المذكور.

ج. وضع النسيج بالمرسِّخ بعد اجراء عملية الصبغ (وهذه حالة نادرة).

ومن أجل الحصول على محاليل تحتوي الصبغة والمرسِّخ، ولها فعالية لمدة طويلة، يجب استعمال مرسِّخات ذات قوة أكسدة ضئيلة بل وحتى معدومة، ومن هذه المرسخات: **شب الأمونيا** Ammonium Alum، **وشب البوتاسيوم** Potassium Alum. أما إذا كان الهدف تحضير خليط من المرسخ والصبغة صالح الاستعمال لفترة قصيرة، فيمكن استعمال مرسخات مثل **شب الحديد** Ferric Alum **وكلوريد الحديد** Ferric Chloride. أخيراً، تجدر الإشارة إلى أن معظم المرسخات تدمج في محاليل الهيماتوكسلين، بيد أن بعض أنواع الهيماتوكسلين، مثل **هيماتوكسلين هايدنهين الحديدي** Heidenhains Iron Hematoxylin يتطلب غمر المقاطع في المرسخ قبل نقلها إلى محلول الصبغة.

4. طرائق الصبغ Methods of Staining

توجد عدة طرائق لصبغ التحضيرات المجهرية، وهي: الصبغ التقدمي، والصبغ التراجعي والصبغ المباشر، والصبغ غير المباشر. ونستعرض فيما يلي هذه الطرائق:

1.4 الصبغ التقدمي Progressive Staining

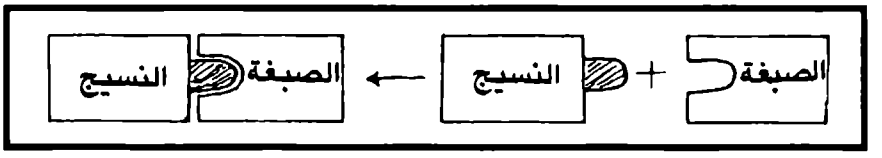
في هذه الطريقة تفحص المقاطع بين حين وآخر، حتى إذا ما تبين أن مكوناتها قد التقطت القدر الكافي من الصبغ، تستخرج من محلول الصبغة. وتستعمل صبغات السيتوبلازم تقدمياً.

2.4 الصبغ التراجعي Regressive Staining

في هذه الطريقة يُغالى في صبغ النسيج، أي يصبغ النسيج بقدر أكثر مما هومطلوب في الخطوة الأولى، ثم تزال الصبغة الزائدة عن الحاجة باستعمال عوامل مناسبة تسمى **عوامل التمييز** Differentiating Agents. وتستعمل صبغات النواة تراجعياً.

3.4 الصبغ المباشر Direct Staining

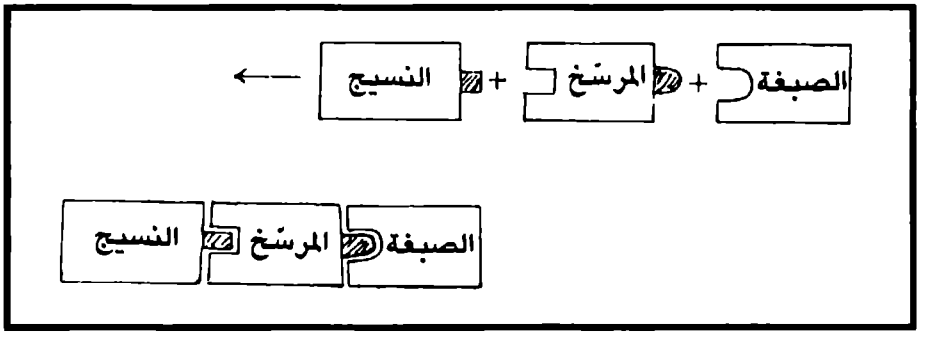
هذه هي الحالة التي يكون فيها صبغ الأنسجة كاف عندما توضع في محلول مائي أو كحولي من الصبغة مثل أزرق ميثلين، أو إيوسين، دون الحاجة إلى وسيط (شكل 8).



شكل 8: الصبغ المباشر

4.4 الصبغ غير المباشر Indirect Staining

لا تصطبغ الأنسجة بكثير من الصبغات إلا بوجود وسيط يسمى المرسخ Mordant كما في الهيماتوكسين. وتستعمل الصبغة والمرسخ معاً، كما في هيماتوكسلين إيرليخ، حيث يضاف إليه شب البوتاسيوم، أو يستعمل المرسخ منفصلاً عن الصبغة، كما في هيماتوكسلين هايدنهين، حيث يمرر النسيج أولاً في شب الحديد (شكل 9).



شكل 9: الصبغ غير المباشر

5. التمييز Differentiation

يقصد بهذه العملية التخلص من الصبغة الزائدة، وبهذا فهي متصلة بالصبغ التراجعي. وخير مثال على عوامل التمييز الجيدة هو الكحول الحامضي

الذي يزيل الهيماتوكسلين الزائد، ويتألف هذا الوسط من كحول إيثيلي تركيزه 70٪ مضافاً إلى حامض خليك 1٪ أو حامض نيتريك مركز. وبشكل عام، يكون وسط التمييز حامضياً إذا كانت الصبغة قاعدية والعكس صحيح. ونظراً لأن انتقائية الأنسجة للصبغات القاعدية أو الحامضية ليس مطلقة، فإن عملية التمييز تعتبر أمراً ضرورياً.

من ناحية ثانية، يمكن الاستفادة من خاصية التمييز لإزالة الصبغة الباهتة من الشرائح القديمة، إذ باستعمال وسط تمييز مناسب، تزال الصبغة القديمة كلياً ويتم اعادة صبغ تلك الشرائح.

6. التحول اللوني Metachromasy

تلون الأصباغ الأنسجة في كثير من الحالات بظلال ألوانها، ولكن هناك حالات تلون فيها أصباغ معينة مكونات النسيج بألوان تختلف عن لون محلول الصبغة نفسه. وقد لوحظت هذه الظاهرة أول مرة عام 1875 من قبل **جيركنز** Jurgens وسماها **التحول اللوني** Metachromasia. ويسمى جزء النسيج الذي يغير لون الصبغة **محوّل اللون** Chromotrope. ومن الأنسجة المحوّلة للألوان: الغضروف، والنسيج الضام، والنسيج الطلائي المخاطي، وحبيبات الخلايا الصارية Mast cells. وتنتمي الأصباغ المحولة للون إما لمجموعة **ثيازين** Thiazine مثل **أزرق تولويدين** Toluidine Blue، و **ثيونين** Thionine، أو لمجموعة الأصباغ الأزوتية، مثل **بنفسج ميثيل**Methyl Violet .

7. الصبغ الحيوي Vital Staining

يستعمل الصبغ الحيوي الذي استخدم لأول مرة حوالي عام 1900، لإظهار بعض العضيات أو المكونات الخلوية دون تغيير تركيبها الطبيعي أو الكيمائي، أي دون التسبب بموتها، كما يحصل عند صبغ الخلايا بالطرائق المشار إليها آنفاً. ويمكن صبغ الخلايا الحية بحقن الصبغة داخل الكائن الحي Intravital Staining، أو بوساطة فصل الخلايا ووضعها في محلول الصبغة Supravital Staining. وبشكل عام فإن الصبغات

الحيوية تستعمل بتركيز مخفف جداً وبكميات قليلة حتى لا يكون لها أثر سام على الخلايا والأنسجة. وللصبغ الحيوي عدة فوائد أهمها:

أ. إعطاء فكرة جيدة عن التركيب الخلوي.

ب. إعطاء معلومات قيمة عن فسيولوجية الخلية، كالتغذية، والابتلاع، والانتقال، والامتصاص، وإخراج المواد التي تدخل الخلايا.

ج. العمل كضابط جيد للمقارنة مع مقاطع الأنسجة المصبوغة بالطريقة التقليدية.

1.7 تصنيف الأصباغ الحيوية

تصنف الأصباغ الحيوية إلى حامضية، وقاعدية.

1.1.7 الأصباغ الحامضية

تستخدم هذه الأصباغ بتركيز خفيف جداً (واحد في الألف) لفحص عينات على شرائح مباشرة، أو بنسبة 1-10٪ لصبغ أعضاء داخلية بالغمر، وفي حالة حقن هذه الأصباغ تستعمل بتركيز حوالي 10٪. والمذيب المفضل لهذه الأصباغ هو الماء المعدني، أو **محلول رنجر** Ringer's Solution. ومن أمثلة هذه الأصباغ: **أليزارين** Alizarin، أزرق تريبان Trypan Blue، **وأحمر كونغو** Congo Red.

2.1.7 الأصباغ القاعدية

تقسم هذه الأصباغ للمجموعات التالية:

أ. مجموعة **ثيازين** Thiazines ومنها **أزرق ميثلين** Methylene Blue، **وأزرق تولويدين** Toluidene Blue. وهذه الأصباغ مفيدة لصبغ الفجوات الخلوية.

ب. مجموعة **أكسازين** Oxazines، ومنها **أزرق النيل** Nile Blue، وهي صبغة هامة في دراسة مراحل النمو والتحركات الخلوية في أجنة الفقاريات.

ج. مجموعة **آزين** Azines، ومنها **الأحمر المتعادل** Neutral Red الذي يستعمل في دراسة مراحل نمو أجنة الفقاريات، وفي صبغ الفجوات الخلوية، وكذلك

أخضر جانوس Janus Green الذي يعتبر صبغة تقليدية لصبغ الميتوكوندريا. وهذه الصبغة أقل الصبغات الحيوية سمية.

2.7 طرائق الصبغ الحيوي

توجد طريقتان للصبغ الحيوي، تتمثل الأولى بوضع العينة داخل قطرة من الصبغة الحيوية على شريحة زجاجية، ثم تغطى بغطاء زجاجي، وتفحص بعد مرور الوقت المناسب للصبغ. وهذه الطريقة مفيدة لصبغ خلايا منفصلة.

أما الطريقة الثانية فتعتمد على وضع العينة داخل قطرة سائل فسيولوجي Saline أو سائل كحولي على شريحة فيها منخفض. وقبل جفاف هذه القطرة تضاف قطرة من الصبغة اللازمة لفترة مناسبة تسمح بتخلل الصبغة إلى داخل الخلايا.

8. حالات صبغ العينات

تصبغ العينات البيولوجية كمقاطع، أو كنماذج كاملة، أو كمسحات أو هرسات.

1.8 صبغ المقاطع Section Staining

هذه طريقة تقليدية لصبغ التحضيرات المجهرية، وتستعمل لصبغ مقاطع من أنسجة نباتية أو حيوانية. وعادة ما يزال البرافين من المقاطع باستخدام الزايلين، ثم يزال الزايلين باستخدام كحول مطلق. وتمرر الشرائح الحاملة للمقاطع بعد ذلك في تدرج كحولي هابط حتى تصل إلى تركيز كحولي مساو لقوة تركيز الكحول الذي تكون الصبغة مذابة فيه. أما إذا كانت الصبغة مذابة أصلاً في الماء فلا بد من تمرير الشرائح هبوطاً في التدرج الكحولي الكامل (مطلق، ثم 95٪ و 70٪و 50٪ و 30٪) ثم تنقل الشرائح إلى ماء مقطر وذلك قبل نقلها إلى محلول الصبغ المائي.

2.8 صبغ النماذج الكاملة Whole Mount Staining

تستخدم هذه الطريقة لصبغ النماذج الكاملة التي قد تكون حيوانات مجهرية أو أجزاء نباتية أو أجنة صغيرة، ولكن نادراً ما يكون توزيع الصبغ متساوياً في مختلف أجزاء العينة. وتستخدم هذه الطريقة لصبغ الأجنة قبل تحضير مقاطع منها حتى يسهل تمييزها في قالب الشمع. وتجري جميع عمليات الصبغ وما يتبعها في صحن زجاجي

صغير أو **صحن سيراكوز** Syracuse dish. وبطبيعة الحال، تكون العنيات المصبوغة كنماذج كاملة غير معرضة لعمليات التشريب والطمر والقطع.

3.8 صبغ المسحات والهرسات Smear & Squash Staining

تشبه هذه الطريقة تلك التي تستخدم في صبغ المقاطع، ولكن لا توجد حاجة لإزالة الشمع لأنه ليس موجوداً على الشرائح أصلاً. وإذا أريد جعل هذه التحضيرات دائمة فإنه يجب تجفيف العينات المصبوغة وترويقها وتغطيتها ببلسم كندا ثم بالغطاء الزجاجي. ومن العينات التي تصبغ كمسحات: البول، والدم، وبطانة المهبل وسقف الحلق. ومن أمثلة العينات التي تصبغ كهرسات الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة والخصية والمبيض والقمم النامية من جذور وسيقان النبات.

الفصل السادس

تغطية المقاطع ووسم الشرائح

بعد صبغ المقاطع، لا بد من تغطيتها بوسط مناسب وغطاء زجاجي رقيق. وبعد تجفيف الشرائح، لا بد من تنظيفها ووسمها. ونعالج فيما يلي أهمية التغطية، ووسائط التغطية، إضافة إلى أهمية وكيفية وسم الشرائح.

1. أهمية تغطية الشرائح

تغطى الشرائح التي تحمل مقاطع أو مسحات أو هرسات أو تحضيرات كاملة بأغطية زجاجية رقيقة، وذلك لتسهيل دراستها تحت المجهر، لأن التحضيرات المصبوغة وغير المغطاة لا تظهر إلا قليلاً من التفاصيل. وتتحسن إمكانية رؤية مكونات التحضير إذا غطيت بمادة شفافة يكون معامل انكسارها قريباً من معامل انكسار الزجاج. كما أن الغطاء يحمي التحضير، وخاصة المقاطع، التي هي عادة شديدة الرهافة، من التهتك والإزالة من على الشريحة نتيجة للاحتكاك بأشياء مختلفة. كذلك يقلل الغطاء من أكسدة الصبغة وبالتالي يمنع فسادها.

2. مواصفات وسط التغطية

يكون وسط التغطية إمّا من النوع الذي يمتزج بالماء، وفي هذه الحالة لا تكون إزالة الماء من المقاطع بعد صبغها ضرورية، أو من النوع الذي لا يختلط بالماء، وهنا يجب إزالة الماء من المقاطع وترويقها ثم تغطيتها. والنوع الثاني هو المستخدم بشكل عام، ويجب أن تتوفر فيه المواصفات التالية:

أ. الامتزاج الكلي مع وسط الترويق (إن كانت هناك حاجة للترويق).

ب. اقتراب معامل انكساره من معامل انكسار الزجاج.

ج. عدم التفاعل مع الصبغة أو مكونات النسيج.

د. عدم تشويه التراكيب المصبوغة.

ه. عدم التشقق أو التحبب عند جفافه.

و. عدم تلاشي الصبغة مع مرور الوقت نتيجة لأكسدته.

3. أنواع وسائط التغطية

تكون وسائط التغطية إما دائمة أو مؤقتة. تتوفر من النوع الأول وسائط مثل بلسم كندا وكلا رايت. ومن النوع الثاني يمكن استعمال الماء، والجليسرول وهلام الجليسرين.

1.3 وسائط التغطية الدائمة

هذه صموغ إما طبيعية أو صناعية ومن أهمها بلسم كندا، وكلارايت Clarite، D.P.X.

1.1.3 بلسم كندا Canada Balsam

هذه مادة طبيعية تفرز من بثور في سيقان نبات **البلسم** *Albies Balsamea*، ويمكن الحصول عليها كمادة طبيعية لزجة تستخدم في التحضيرات الكاملة، أو تكون جافة تذاب في الزايلين لتغطية المقاطع.

ولهذا الوسط عدة فوائد، هي:

أ. له معامل انكسار 1.25 وهو قريب جداً من معامل انكسار الزجاج.

ب. شفاف ولا لون له عند تجفيفه.

ج. يجف بدون تحبب.

د. يذوب بسهولة في الزايلين.

غير أن لهذا الوسط سلبية تتمثل بزيادة دكانته بمرور الزمن، إضافة إلى أنه يصبح حامضياً نظراً لأكسدته لوسط الزايلين، مما يسبب الشحوب التدريجي لعدة صبغات.

2.1.3 كلارايت Clarite

أصبح هذا الوسط شائع الاستعمال. معامل انكساره 1.54 ويستعمل كمحلول في الزايلين بنسبة 60٪.

D.P.X 3.1.3

يتكون هذا الوسط من خليط من **ديسترين** Distrene و **ملدّن** Plasticizer و زايلين Xylene، وهو عديم اللون، ويجف بسرعة، ويساعد على حفظ صبغة الشريحة، ومعامل انكساره 1.25. ونظراً لميزات هذا الوسط، فإنه أصبح شائعاً جداً في مختبرات التحضير المجهري وحل محل وسط بلسم كندا.

2.3 وسائط التغطية المؤقتة

لا يكون التحضير الدائم في بعض التحضيرات المجهرية ضرورياً، إما لأن التحضير هو للاستعمال المؤقت، أو أن وسائط التغطية تذيب بعض مكونات الخلايا كالدهون. والوسائط المستعملة للتغطية المؤقتة تشمل الماء والجليسرول وهلام الجليسرين.

1.2.3 الماء

يستعمل في الغالب لعمل **التحضيرات المبتلة** Wet Mounts. ولكونه شفافاً فإنه يتيح رؤيا جيدة، ولكن جفافه سريع ولا يتيح استعمال العدسة الزيتية.

2.2.3 جليسرول Glycerol

وسط جيد للتحضيرات المؤقتة، وإذا أحكم إغلاق حواف غطاء الشريحة جيداً فإنه يعتبر وسطاً شبه دائم، وتخفيفه بقليل من الماء يحسن من الرؤيا.

3.2.3 هلام جليسرول Glycerol Jelly

يجف هذا الوسط سريعاً، ولكنه قد يحفظ المواد المصبوغة لعدة سنوات إذا أحكم إغلاق حواف غطاء الشريحة جيداً. ومن عيوب استعماله شحوب الصبغات بمرور الزمن.

4. طريقة تغطية المقاطع

1.4 اساس التغطية السليمة

للحصول على شرائح مغطاة بشكل جيد يجب مراعاة ما يلي:

أ. أن تكون الشرائح وأغطيتها نظيفة قبل بدء العملية.

ب. أن تكون كمية وسط التغطية مناسبة، فالكمية القليلة لا تغطي كل التحضير، والكثيرة تنزّ من تحت الغطاء، الأمر الذي يربك عملية تنظيف الشريحة والغطاء فيما بعد.

ج. أن يسبق عملية التغطية إزالة كاملة للماء إذ كان وسط التغطية غير قابل للامتزاج بالماء، وإلا فإن التحضير يبدو محلباً.

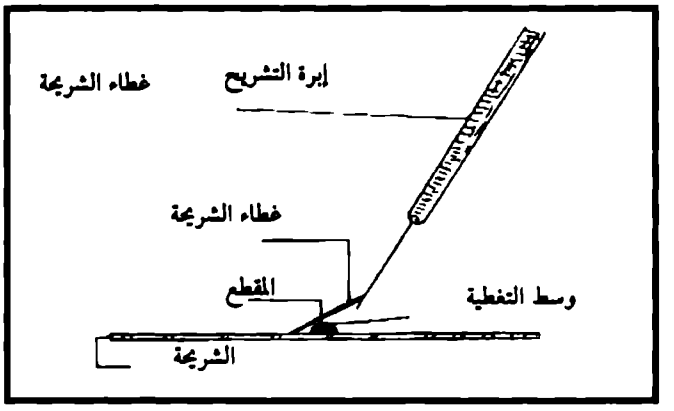
د. أن يكون قوام وسط التغطية مناسباً، لأنه إذا كان كثيفاً فإنه يسبب تكوين فقاعات هوائية، وإذا كان بالغ الرقة فإنه ينسحب من تحت أطراف الغطاء.

ه. أن تتم التغطية بأسرع ما يمكن، وعدم ترك الشريحة معرّضة للهواء دون تغطية.

و. تجفيف التحضير على صفيحة دافئة.

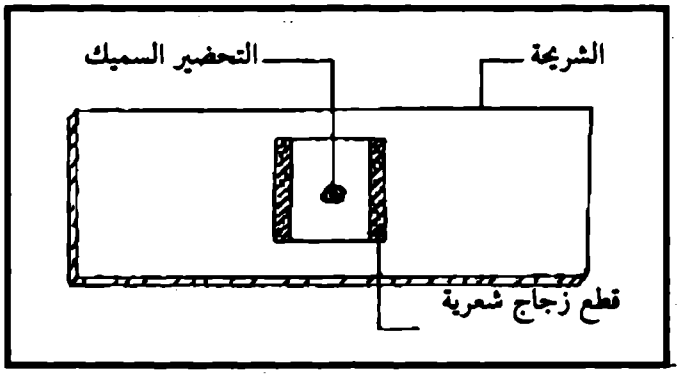
2.4 خطوات التغطية السليمة

بعد ترويق المقاطع المصبوغة، يمسح حول التحضير بإبرة تشريح على رأسها قطنة مبللة لإزالة المروّق الزائد ولتنظيف الشريحة قبل تغطيتها. وبعد ذلك تضاف الكمية المناسبة من وسط التغطية فوق التحضير، ويغطى التحضير بغطاء زجاجي رقيق (22×22 ملم) يوضع بحيث يلامس حافة الشريحة ويعمل معها زاوية 45° (شكل1)، ثم تخفض حافة الغطاء الأخرى برفق حتى لا تتكون فقاعات هوائية.



شكل 1: طريقة تغطية المقطع على الشريحة

وإذا تكونت فقاعات هوائية، فيمكن التخلص منها بالضغط الخفيف على الغطاء بإبرة تشريح. وتقتضي كثرة الفقاعات إعادة عملية التغطية وذلك بغمس التحضير كلياً وفي وسط الترويق حتى ينفصل الغطاء على الشريحة. وفي الحالات التي يكون فيها التحضير سميكاً، كأن يكون لجنين دجاجة مثلاً، فإنه يتوجب رفع الغطاء على حلقة من البلاستيك أو أنابيب شعرية (شكل2).



شكل 2: رفع الغطاء في التحضير السميك

بعد إتمام عملية التغطية، لابد من تجفيف الشرائح، وذلك بوضعها على صفيحة دافئة عند حرارة 40°س، أو في فرن صهر الشمع (عند حرارة 35-40°س) لمدة ساعتين. ويمكن أن يتم التجفيف بترك الشرائح عند حرارة الغرفة لمدة ثلاثة أيام. وفي كل الحالات تبقى الشرائح بوضع أفقي خلال تجفيفها وإلا تنزلق أغطية المقاطع إلى

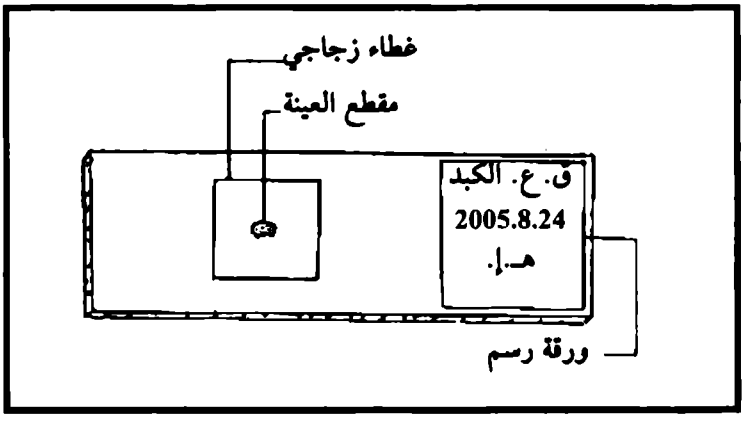
حافة الشرائح عند وضعها عمودياً، وقد ينتج عن ذلك تهتك بعض المقاطع. لذلك، يجب أن لا يبدأ تنظيف الشرائح إلا بعد إنجاز عملية التجفيف.

5. تنظيف ووسم الشرائح Cleaning and labeling of slides

تنظف الشرائح ويوضع عليها ورق وسم بعد إتمام تحضيرها. ويمكن إزالة وسط التحميل الزائد من حول جوانب الغطاء بواسطة شفرة. وتزال آثار وسط التغطية بقطعة مبللة بكحول 95٪، ويجب تجنب الزايلين في هذه الحالة لأنه يطرّي غطاء الشريحة.

وبالنسبة لوسم الشريحة، فإن وضع ورقة مناسبة عند طرف الشريحة يعتبر أمراً هاماً، إذ يكتب عليها معلومات عن نوع النسيج والمثبت والصبغة، وتاريخ التحضير، واسم المحضّر. وتكون مقاييس ورقة الوسم 2×2 سم (شكل3).

وفي النهاية تخزن الشرائح في حافظات خاصة، إما عمودياً في علب خشبية أو بلاستيكية بها أخاديد، أو أفقياً في حافظات كرتونية. وينصح بالتخزين الأفقي للتحضيرات الكاملة.



شكل 3: طريقة وضع ورقة الوسم

الفصل السابع

طرائق المسح والهرس والتجميد

تستعمل هذه الطرائق في التحضيرات المجهرية السريعة للحصول على نتائج فورية، وهي مفيدة جداً في البحوث والدراسات المختصة بعلم الخلية والأمراض النسيجية والأحياء الدقيقة.

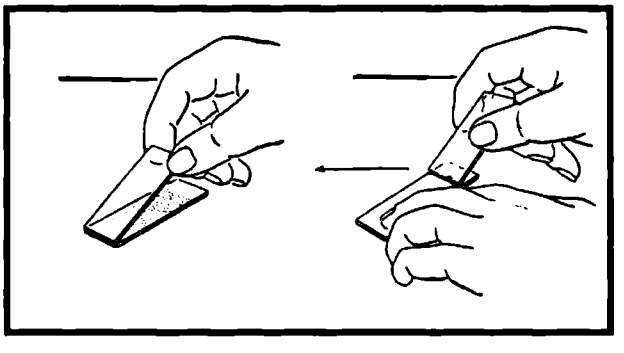
1. المسح Smearing

تستعمل هذه الطريقة للأنسجة التي يصعب قطعها، وخاصة سوائل الجسم، كالدم والسائل المخي، وسائل النخاع الشوكي، والسائل السيلومي والبول، كما تصلح لأخذ مسحات من سطوح الأعضاء الطرية الرطبة كالمهبل وتجويف الفم وسقف الحلق، إضافة الى نخاع كنخاع العظام.

تعمل المسحة بفرش السائل بين شريحتين أو بين شريحة وغطائها للحصول على طبقة رقيقة. وهنالك طرائق عدة لإجراء عملية المسح، لعل مسحة الدم أكثرها شيوعاً، ويبين الشكل (1) طريقة عملها:

أ. توضع قطرة دم على الشريحة الأفقية وتسحب قليلاً بالشريحة العليا باتجاه اليمين.

ب. يسحب الدم بواسطة الشريحة العليا باتجاه اليسار.



شكل 1: طريقة عمل مسحة الدم

ج. تثبت المسحة بعد عملها باستخدام مثبت مناسب، وتحرك الشريحة في الهواء حتى تجف.

وتستعمل هذه الطريقة لمسحات البكتيريا وكريات الدم الحمراء والبيضاء. أما الأنواع الأخرى من المسحات فتثبت قبل تجفيفها، وذلك باستعمال بخار المثبت كحامض الأوزميك أو الفورملين، إذ تقلب الشريحة التي تحمل المادة المفروشة إلى أسفل فوق **صحن بتري** Petri Dish أو **سيراكوز** Syracuse يحتوي المثبت لمدة 3-5 دقائق.

في الحالات التي تكون فيها المادة المفروشة على الشريحة مخاطية أو بروتينية، كمسحات المهبل أو البروستاتا أو تلك المأخوذة من الفم فإنه يمكن غسلها بعد تثبيتها. أما المسحات التي لا تحتوي على بروتين، كالبول، فإنه يمكن ترسيبها بالطرد المركزي، ثم تمسح على شريحة عليها **بياض البيض** Egg Albumen. ويمكن تثبيت المادة المراد مسحها بفورملين، ثم ترسب بالطرد المركزي، ويعلق الراسب في محلول ملحي مضاف له نقطتين من الألبومين لكل 15 مل من المحلول، ثم تمسح على الشرائح وتجفف، ومن ثم تصبغ.

د. الخطوة الأخيرة في تحضير المسحات هي صبغها، ويمكن استعمال عدة صبغات تبعاً لنوع المسحة. فمسحات الدم تصبغ بمخلوط من أزرق ميثيلين وإيوسين، وهذا المخلوط يعمل كمثبت وصابغ في نفس الوقت، ثم يزال الماء من التحضير باستعمال تدرج كحولي صاعد، وبعد ذلك يروّق وتغطى الشريحة.

ويمثل المسح وسيلة جيدة للتشخيص في علم الخلية التشخيصي والأمراض النسيجية. فتحضير المسحات من الإفرازات أو الزفرات أو الكشطات أو السوائل تساعد على تشخيص الحالات المرضية، لأن فحص هذه التحضيرات يعطي فكرة جيدة عن إصابات الأنسجة أو عمل الغدد الصماء أو أنواع تفاعلات الأنسجة، كذلك تستعمل هذه الطريقة بشكل روتيني في مختبرات الأحياء الدقيقة.

2. الهرس (الدعك) Squashing

هذه طريقة أخرى لعمل التحضيرات المؤقتة للأنسجة التي ليست طرية بالقدر الذي يسمح لمسحها، ولا هي صلبة بدرجة تكفي لقطعها دون طمر مسبق. ومن العينات التي تخضع للهرس الأجزاء النامية في النباتات كالقمم النامية في الساق والجذر، والمياسم والمبايض والبتلات، ثم الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة، والعقد الليمفاوية، والأورام الطرية، ونخاع العظم والحويصلات المنوية والخصية.

يهرس النسيج بوضع العينة على شريحة نظيفة وتفرش تحت غطاء الشريحة، بضغط يمكّن من نشر وفرد الخلايا. ومن المعتاد أن تحاط العينة بسائل مناسب قبل هرسها، ويعتمد اختيار هذا السائل على طبيعة العينة والغاية من التحضير. فالقمم النامية للجذور أو السيقان والأوراق توضع عادة في محلول حامض الهيدروكلوريك HCl ليفكك جدر الخلايا قبل أن تصبغ بـ **أسيتوكارمين** Acetocarmine أو **أسيتوأورسين** Acetoorcein.

تناسب طريقة الهرس لإظهار دراسة الكروموسومات، ذلك أن السيتوبلازم يتهتك أثناء التحضير، وبذلك تختلف طريقة الهرس عن المسح التي تحافظ على البنيان السيتوبلازمي والنووي معاً. وتعامل العينات الطازجة قبل هرسها إما بالماء المقطر أو بمحلول منخفض الضغط الأسموزي من سترات الصوديوم (0.37)٪ حيث تتفكك الخلايا وتتضح الكروموسومات فيسهل عدها. وتصبغ الهرسات إما بأسيتوكارمين أو أسيتوأورسين، فيسهل تصوير **وتنميط الكروموسومات** Karyotyping.

يمكن تحويل الهرسات المؤقتة إلى دائمة بوضع الشريحة على قالب من الجليد الجاف لمدة 5 دقائق حتى يكتسي غطاء الشريحة بالجليد، لأن استعمال أي طريقة أخرى كمحاولة إزالة الماء وإظهار النسيج ستؤدي إلى رفع المادة المهروسة مع غطاء الشريحة عند محاولة فكها. وعادة توضع شفرة بين الشريحة والغطاء ثم يرفع الغطاء. ويمكن فصل غطاء الشريحة بوضع التحضير في إناء يحوي كحول إيثيلي تركيزه 70٪، ثم تمرر العينة بتدرج كحولي صاعد، ثم تروّق وأخيراً تغطى بوسط مثل بسلم كندا وتجفف.

3. التجميد Freezing

تمثل طريقة التجميد أداة قيمة في حالات معينة كالتشخيص الفوري لحالات مرضية مثل الأورام. وكذلك تستعمل هذه الطريقة بشكل موسع في مختبرات الأمراض النسيجية Pathology Laboratories، لأنها تمكن الأطباء من التشخيص السريع قبل إجراء العمليات الجراحية. إضافة لذلك فإن لها فوائد كثيرة منها:

أ. إظهار الإنزيمات في العينات البيولوجية لأن العينات التي تحضّر بهذه الطريقة لا تتعرض لدرجات حرارة عالية مثلما يحدث أثناء التشريب في التحضيرات المجهرية العادية.

ب. إظهار الدهون التي غالباً ما تذوب في الكحول أو مذيبات الشمع، مثل زايلين.

ج. الاستعمال في تحضيرات الأنسجة العصبية.

د. توفير الوقت بتجنب كثير من العمليات كإزالة الماء والتشريب والطمر.

مقابل ذلك يوجد لهذه الطريقة بعض السلبيّات أهمها:

أ. عدم التمكن من عمل مقاطع متسلسلة.

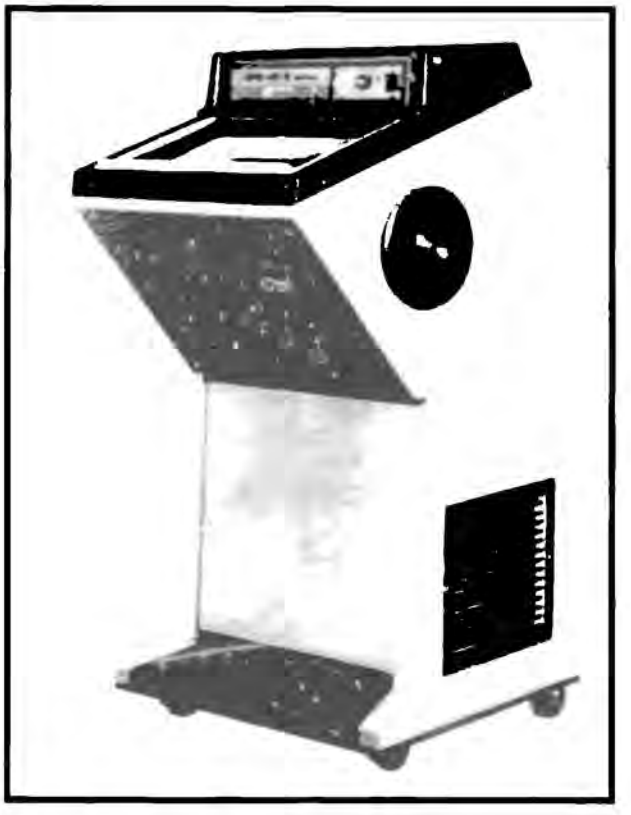
ب. التسبب في تشويه الأنسجة أثناء قطعها نتيجة لعدم طمرها.

ج. عدم وضوح الصبغة بدرجة مناسبة كما في العينات المثبتة والمحضرة بطريقة الشمع.

عندما يراد فحص المقاطع للتشخيص الفوري، تؤخذ عينّة من النسيج وتسمى خزعة Biopsy وتغسل في محلول ملحي وتوضع على لوحة التجميد في جهاز يسمى كريوستات Cryostat (شكل 2) ، وتجمد العينّةوتقطع. أما إذا لم تكن هناك حاجة ملحة للنتائج فإن النسيج يثبت في فورملين تركيزه 10٪.

تعمل أجهزة الكريوستات الحديثة بسهولة، وهي مقاومة للصدأ لكون الحجرة مصنوعة من صلب لا يصدأ، ومزودة بنظام لمنع تكون الضباب وبمصرف للثلج الذائب بعد العمل، وبأماكن لحفظ 4-6 حاملات أنسجة. وتتراوح الحرارة في ثلاجة الجهاز من 10 إلى 30°س تحت الصفر.

للقطع بجهاز الكريوستات توضع الأنسجة بمقاس 2-4 ملم على حامل مناسب، بعد إحاطتها بمادة خاصة مناسبة، وفي مكان خاص لتتجمد خلال دقائق قليلة، ثم يثبت حامل العينة في جهاز القطع، وتعين درجة ميل السكين وسمك المقاطع ويبدأ بالعمل. وبضبط صحيح وأناة وصبر ومعرفة جيدة بالعملية يمكن الحصول على مقاطع ممتازة، تنزلق تحت لوحة بلاستيك شفافة مانعة لإلتفاف المقاطع، وذلك لضمان بقاء المقاطع مسطحة.



شكل 2: جهاز الكريوستات

تجمع المقاطع المجمدة على شرائح نظيفة بإنزال الشريحة على المقطع بعد إبعاد صفيحة منع الإلتفاف، التي تعاد إلى مكانها لعمل مقاطع جديدة. وتثبت المقاطع على الشرائح بتحريكها في الهواء أو تثبيتها في مخلوط من 15 مل من فورملدهايد تركيزه 90٪ و 85 مل من كحول تركيزه 95٪ لمدة دقيقتين، كما يمكن استعمال الأسيتون. ثم تصبغ المقاطع بهيماتوكسلين وأيوسين بالطريقة التقليدية. وبعد إزالة الماء من المقاطع، تروّق ثم تغطى بوسط مناسب وبغطاء زجاجي. بعد ذلك تجفف الشرائح وتنظف وتدرس لتشخيص الحالة.

الفصل الثامن

النمـــاذج الكاملـــة

النماذج الكاملة whole mounts هي تحضيرات مجهرية إما لكائنات متكاملة، أو لأجزاء منها تكون صغيرة وشفافة بحيث يمكن دراستها بشكل عام بدون الحاجة الى دراسة تركيبها بالتفصيل. ويعتبر تحضير النماذج الكاملة أسهل من التحضيرات المجهرية الأخرى، وذلك بسبب السهولة النسبية للخطوات المتبعة في التحضير. وتشكل الشرائح التي تحمل نماذج كاملة جزءاً رئيساً من مقتنيات مختبرات الطفيليات والأجنّة والحيوانات اللافقارية، والنباتات اللاوعائية، وتكون هذه النماذج إما مؤقتة أو مستديمة.

1. النماذج الكاملة المؤقتة

تحضرّ النماذج المؤقتة من أجل الدراسة الآنية بالمجهر الضوئي. وبشكل عام، لا يفحص أي كائن موجود على شريحة دون أن يغطى بغطاء زجاجي رقيق، يؤدي استعماله إلى منع تكثف الماء على عدسات المجهر، إضافة إلى تسطيح العينة.

عند تحضير نماذج مؤقتة تضاف نقطة من سائل يحتوي على العينات المراد فحصها على شريحة، ثم يضاف غطاء زجاجي. وإذا لم يمنع تبخر الماء فإن التحضير سيجف ويشوّه تركيب العينة. ويمكن تحاشي ذلك بعمل حلقة من مادة هلام البترول في وسط الشريحة، يضاف إليها فيما بعد نقطة من السائل الذي يحتوي على العينة. وبعد ذلك يضاف الغطاء الزجاجي ويضغط فوق الحلقة ليلتصق بهلام البترول.

وفي الحالات التي يكون فيها الكائن الحي سريع الحركة، كما هي الحال في الحيوان الأولي **براميسيوم** Paramecium يكون من المفيد إبطاء حركة هذا الكائن بإضافة حجم من 5٪ **آجار** Ager يساوي حجم النقطة المضافة للشريحة. وكذلك يمكن استعمال 1٪ من مادة Carboxymethyl Cellulose لتحقيق نفس الهدف.

2. النماذج الكاملة المستديمة

كما ذكرنا سابقاً فإن تحضير النماذج الكاملة أمر بسيط يستغرق إعداده وقتاً قصيراً، يقل عن ساعة، وتخدم هذه التحضيرات هدفاً ما لفترة وجيزة. أما إذا كان الهدف من تحضير النماذج الكاملة هو جعلها أكثر استدامة للرجوع إليها فيما بعد، فإن أمر تغييرها إلى تحضيرات دائمة يعتبر شيئاً حيوياً. وفي هذه الحالة تثبت العينة أولاً، ثم تغسل وتصبغ ويزال الماء منها، وتروّق، ثم يضاف إليها وسط تغطية صمغي مثل بلسم كندا. ويمكن استعمال وسط للتغطية قابل للامتزاج بالماء، وفي هذه الحالة يضاف الوسط للعينة مباشرة بعد تثبيتها وغسلها.

وبشكل عام، يمكن القول بأن الوسائط الصمغية تجعل التحضير أكثر استدامة مقارنة بتلك التي تغطى بوسائط تمتزج بالماء. ويحقق استعمال الوسائط الصمغية أمرين: تغطية وحماية النماذج المصبوغة، وجعلها أكثر شفافية. وتأتي هذه الشفافية نتيجة ازدياد معامل انكسار العينة المصبوغة عندما تطمر بالوسط الصمغي. ونظراً لأن هذه الوسائط لا تمتزج بالماء، فإن إزالة الماء من العينات يعتبر أمراً ضرورياً.

1.2 معاملة الكائنات المتحركة

في حالات معينة، كما في معظم اللافقاريات، تكون العينات المراد تحضير نماذج كاملة ودائمة منها سريعة الحركة. ولذلك فإن تثبيتها قبل إبطاء حركتها سيغير من شكلها الطبيعي وبالتالي يجعل تحضير النماذج عديم الفائدة. ويتطلب تحضير نماذج كاملة وجيدة منها استعمال مواد مخدرة تجعل هذه الكائنات غير قادة على الانقباض العضلي. وللمحافظة على شكل العينة، تجرى عملية التخدير بَبُطء، بحيث يضاف القليل من المادة المخدرة أولاً، ثم يضاف المزيد منها تدريجياً. أما عملية التثبيت فإنها تتم عندما تتوقف حركة العينة. ولعله من المفيد أن نذكر شيئاً من عوامل التخدير الرئيسة التي تبطئ حركة العينات اللافقارية لكي يمكن تحضير نماذج دائمة منها.

2.2 عوامل التخدير

من أكثر عوامل التخدير شيوعاً في معاملة اللافقاريات الدقيقة قبل تثبيتها لتحضير نماذج كاملة منها: **سلفات المغنيسيوم** Magnesium Sulfate، و **كوكايين**

Cocaine، و **منثول** Menthol، و**كلورفورم** Chloroform، و **إيثر** Ether إضافة إلى **الكحول** Alcohol. ويستخدم التبريد أيضاً لإحداث نفس الأثر. وفيما يلي شرح موجز عن كل من هذه العوامل:

1.2.2 سلفات المغنيسيوم

تستعمل هذه المادة بنجاح في تخدير **شقائق النعمان البحرية** Sea Anemones، **والحيوانات المرجانية** Corals، **والديدان الحلقية** Annelides، وغيرها. وعادة، توضع كمية من بلورات هذه المادة في جراب يكون معلقاً فوق السائل الذي يحتوي على هذه اللافقاريات وملامساً له. وعندما تخدر هذه الكائنات، يسحب الماء الذي يغطيها بحيث تبقى أقل كمية منه، ثم يضاف المثبت. بعد ذلك تنقل العينات إلى وعاء جديد مضاف إليه مثبت طازج، ثم تستكمل خطوات الغسل والصبغ وإزالة الماء والترويق والتغطية والتجفيف.

2.2.2 الكوكايين

يستعمل في تخدير اللافقاريات التالية: **الهدبيات** Ciliates، **والدوّارات** Rotifers **والهيدرا** Hydra **والحيوانات الطحلبية الحزازية** Bryozoans وبعض الديدان. يضاف 1 مل من محلول مائي لهذه المادة بتركيز 10٪ إلى 100 مل من الماء الذي يحوي الحيوانات. وتثبت الحيوانات بعد توقف انقباضها، ثم تستكمل بقية الخطوات من غسل وصبغ حتى التغطية والتجفيف.

3.2.2 المنثول

هذا المخدر فعال لتخدير **الحيوانات البحرية المقعدة** Sessile، وكذلك **اللاسعات** (الجوفمعويات) Cnidarians (Coelenterates) و **الحيوانات الحزازية** Bryozoans **والديدان العريضة** Flukes، ويضاف هذا المخدر بعد سحق بلوراته في قليل من الماء. وتثبت الحيوانات بعد أن تتوقف عن الانقباض، ثم تستكمل بقية الخطوات.

4.2.2 الكلوروفورم والإيثر

يمكن إضافة هذين المخدرين على سطح الماء الذي يحتوي الحيوانات البحرية. ويستعملان كذلك في تخدير **الحشرات** و **العنكبوتيات** arachnids.

5.2.2 الكحول

يضاف هذا المخدر بشكل متدرج بحيث يصبح تركيزه في الماء حوالي 10٪. وهو فعال جداً في تخدير ديدان الأرض، والحيوانات الدقيقة التي تعيش في الماء العذب.

6.2.2 التبريد

توضع الحيوانات الدقيقة في حجرة التجميد في الثلاجة، أو في مزيج من الملح والثلج. وهذه الوسيلة مفيدة في معالجة الديدان الشريطية Tapeworms. وبعد نقل الحيوانات إلى ماء فاتر تثبت بالوسط المناسب ثم تستكمل بقية الخطوات اللازمة لتحضير نماذج كاملة.

ومن أجل تحضير نماذج كاملة جيدة وشفافة، تستعمل أصباغ الكارمين في الحالات التالية: الجوفمعويات، الحيوانات الحزازية والديدان المفلطحة والشريطية والحلقيات الصغيرة وغيرها.

يلاحظ بأن التأكيد فيما سبق كان على اللافقاريات، والسبب في ذلك يعود إلى أن هناك أعداد كبيرة من أنواع مختلفة لهذه الكائنات الحية، تنتشر في بيئات مختلفة، ولقسم لا بأس به منها أجسام صغيرة تكون غالباً شفافة، الأمر الذي يسمح بتحضير نماذج كاملة منها تفيد في التدريس والأبحاث.

أما بالنسبة للفقاريات، فإنه يمكن تحضير نماذج كاملة من بعض أجزائها الصغيرة. وكذلك يمكن تحضير نماذج من أجنّتها. ويعتبر شيوع النماذج الكاملة من أجنة البرمائيات والطيور والزواحف والمراحل الأولية من أجنة الثدييات دليلاً عن أهمية هذه التحضيرات في التدريس. وبشكل عام، فإن الطرائق التقليدية في معاملة الأنسجة، من حيث تثبيتها، وإزالة الماء منها، وترويقها، وصبغها وتغطيتها، تستعمل في تحضير النماذج الكاملة لأجزاء ولأجنّة الفقاريات.

الجزء الثاني

التطبيقات

الفصل التاسع: الأدوات والزجاجيات

الفصل العاشر: الأجهزة اللازمة في التحضير المجهري

الفصل الحادي عشر: المثبتات

الفصل الثاني عشر: مزيلات الماء ووسائط الترويق

الفصل الثالث عشر: وسائط التشريب والطمر

الفصل الرابع عشر: محاليل الصبغ والتمييز

الفصل الخامس عشر: وسائط لصق وتغطية المقاطع

الفصل السادس عشر: تحضير مسحة دم إنسان

الفصل السابع عشر: تحضير هرسة من الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة

الفصل الثامن عشر: تحضير هرسة من قمة جذر البصل

الفصل التاسع عشر: تحضير نماذج كاملة

الفصل العشرون: تحضير مقاطع من أنسجة حيوانية

الفصل الحادي والعشرون: تحضير مقاطع من أنسجة نباتية

الفصل الثاني والعشرون: تحضير مقاطع متسلسلة

الفصل التاسع

الأدوات والزجاجيـــات

تتطلب العمليات المختلفة في التحضيرات المجهرية الضوئية عدة أدوات وأجهزة ومحاليل ووسائط قبل تحضير شرائح جاهزة منها. إضافة إلى ذلك، لابد من توفر أنواع متخصصة من الزجاجيات والمواد المتفرقة حتى تبلغ تلك العمليات مداها.

في هذا الفصل سنستعرض أدوات التشريح اللازمة في مختبر التحضير المجهـري. كذلك، سنتعامل مع قوالب الطمر وحوامل قوالب الـشمع، والزجاجيـات والأدوات المختلفة التي يجب توفرها في هذا المختبر.

1. ادوات التشريح Dissecting Tools

من مجموعات أدوات التشريح اللازمة للتحـضير المجهـري نـذكر هنـا العناصـر الأساسية وهي كما يلي، ومبينة في شكل (1).

أ. مقص تشريح عريض Dissecting Scissors (broad)

ب. مقص تشريح رفيع Dissecting Scissors (pointed)

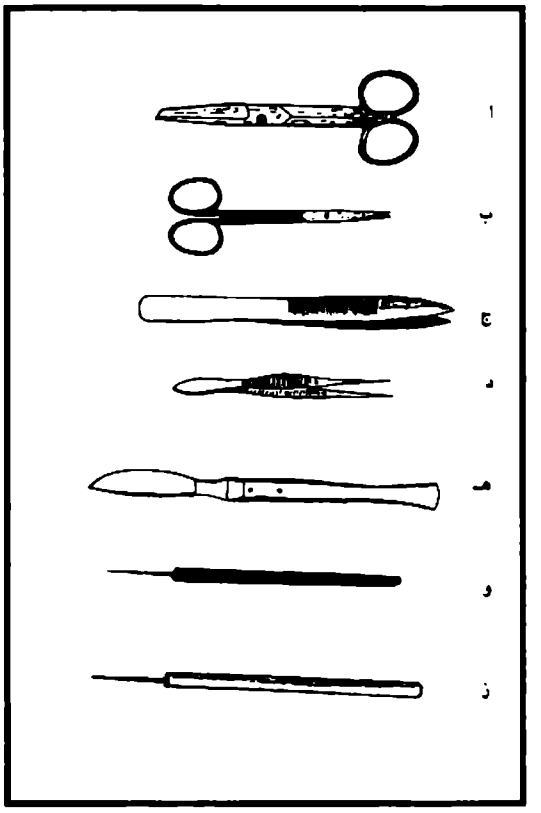
ج. ملقط عريض الطرف (كبير) Forceps (large)

د. ملقط رفيع الطرف Forceps (small)

ه. مشرط Scalpel

و. مسبار Probe

ز. إبرة تشريح Dissecting Needle



شكل 1: أدوات التشريح المستعملة في مختبرات التقانة المجهرية

أ. مقص تشريح عريض؛ ب. مقص تشريح رفيع؛ ج. ملقط عريض الطرف (كبير)؛ د.ملقط رفيع الطرف؛ هـ.مشرط؛ و.مسبار؛ ز. إبرة تشريح.

2. قوالب الطمر Embedding Moulds

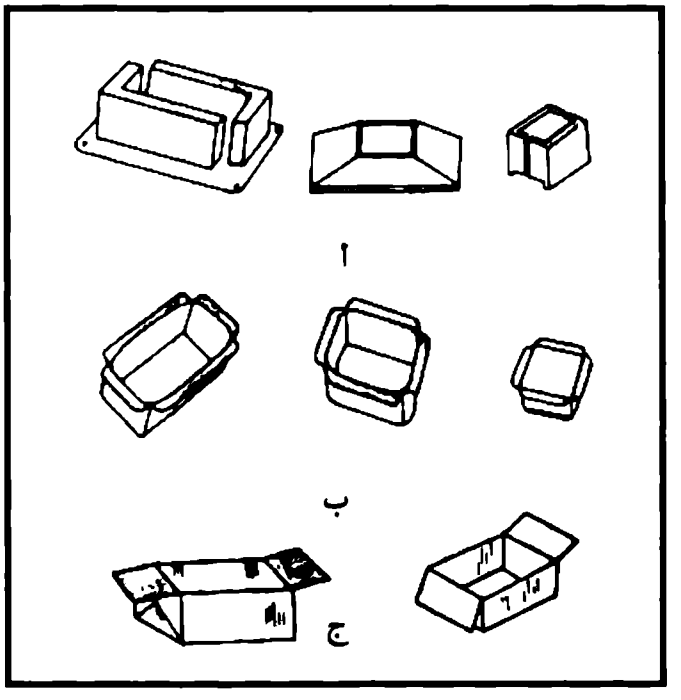
هناك عدة أنواع من هذه القوالب يظهر بعضها في شكل (2).

أ. قوالب معدنية على شكل حرف L، ويستعمل منها اثنان فوق لوح زجاجي صغير لعمل قالب طمر. ويتوفر هذا النوع بأشكال مختلفة.

ب. قوالب بلاستيكية، تتوفر بأحجام وأشكال مختلفة.

ج. قوالب ورقية.

كذلك يمكن استعمال **صحون بتري** Petri Dishes، **وصحون سيراكوز** Syracuse Dishes، وصحون صغيرة من الخزف الصيني. وفي جميع الحالات، يطلى داخل القالب بالجليسرين قبل إجراء عملية الطمر، حتى يسهل إزالة قالب الشمع بعد انتهاء الطمر.

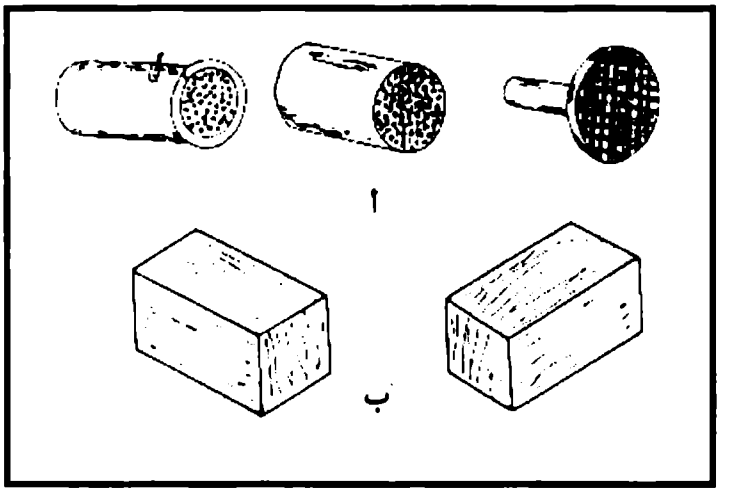


شكل 2: أنواع قوالب الطمر

أ.النوع المعدني؛ ب.النوع البلاستيكي؛ جـ. النوع الورقي.

3. حوامل قوالب الشمع Paraffin Block Holders

هذه أدوات تحمل أو تثبت عليها قوالب الشمع لأغراض التقطيع وهناك عدة أنواع، يظهر منها أكثر نوعين شيوعاً في شكل 3.



شكل 3: حوامل قوالب الشمع

أ. الحوامل المعدنية؛ ب. الحوامل الخشبية.

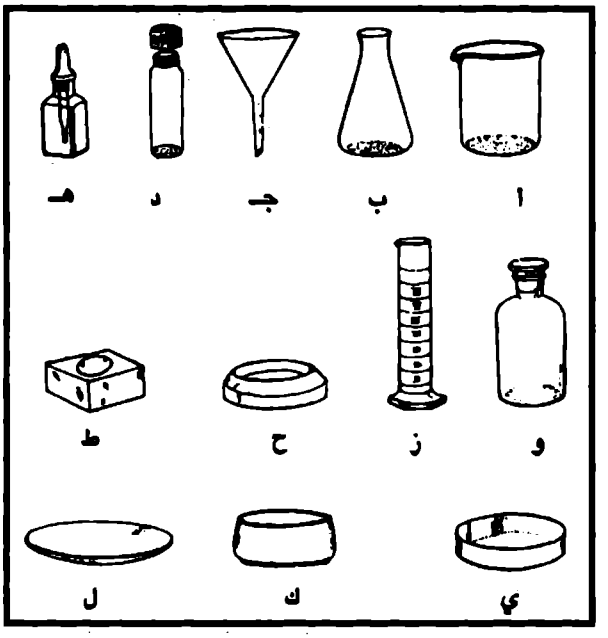
أ. **حوامل معدنية**: وتتكون من قرص معدني سميك له ساق تدخل في مكان مناسب بجهاز التقطيع. وهي تشترى عادة من الشركة المنتجة لجهاز التقطيع وتختلف أشكالها باختلاف نوع جهاز التقطيع المستخدم.

ب. **حوامل خشبية**: ويمكن تصنيعها بتكاليف قليلة من أخشاب قاسية ويكون طول القطعة الخشبية عادة 2-3 سم وعرضها 1-2 سم وسمكها اسم، ومن مزايا القوالب الخشبية سهولة الصاق ورقة وسم عليها.

ج. **حوامل بلاستيكية**: بأحجام مختلفة.

4. الزجاجيات Glassware

بالإضافة إلى ما ذكر فإن العامل في مجال التحضير المجهري يحتاج إلى أدوات بسيطة، لها دور كبير في تحضير المحاليل اللازمة أو تنفيذ بعض الخطوات أثناء تحضير الشرائح المجهرية، ومن هذه الأدوات: الزجاجيات العامة (شكل4)، والشرائح، وأغطية الشرائح، وجرار الصبغ.



شكل 4: الأدوات الزجاجية المستعملة في مختبرات التقانة المجهرية

أ.س؛ ب. دورق؛ ج. قمع؛ د.قنينة عينات؛ ه. قنينة قطارة؛ و.زجاجة محاليل؛ ز. مخبار مدرج؛ ح.صحن سيراكوز؛ ط. صحن أجنة؛ ي.صحن بتري؛ ك.زبدية؛ ل.زجاجة ساعة.

1.4 الزجاجيات العامة

أهم هذه الزجاجيات، هي:

أ. **كأس** Beaker: ذو سعة تتراوح بين 100 و 200 مل.

ب. **دورق** Flask: ذو سعة تتراوح بين 100 و 250 مل.

ج. **قمع** Funnel: زجاجي أو بلاستيكي.

د. **قنينة عينات** Vials: ذات سعة 10-20 مل وتستعمل لإجراء عملية التثبيت.

ه. **قنينة قطارة** Dropping Bottle: ذات سعة 20-30 مل، لحفظ الماء المقطر أو بياض البيض أو بعض محاليل الصبغ المختارة.

و. **زجاجة محاليل** Reagent Bottle: لحفظ محاليل التثبيت أو الكحولات أو أية محاليل أخرى، وتتراوح سعتها بين 250 و 500 مل.

ز. **مخبار مدرج** Graduated Cylinder: لقياس أحجام السوائل اللازمة، وهو بحجم 25 أو 50 أو 100مل.

ح. **صحن سيراكوز** Syracuse Dish: يستخدم لإجراء عملية التشريب، أو لإجراء عمليات تحضير نماذج كاملة من أجنة مختلفة.

ط. **صحن أجنة** Embryological Dish: يستعمل لنفس الغرض المشار إليه في بند ح.

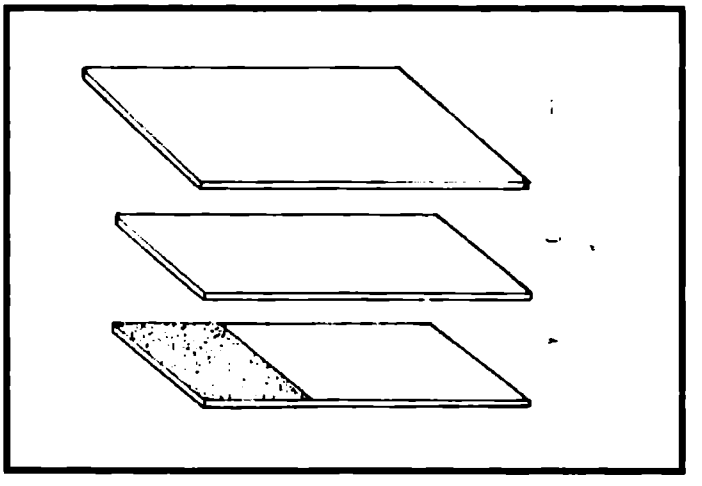
ي. **صحن بتري** Petri Dish: للقيام ببعض خطوات التحضير مثل التشريب أو في معالجة أجنة.

ك. **زبدية** Finger Bowl: ذات سعة حوالي 200 مل، تستعمل في عزل أجنة الدجاج.

ل. **زجاجة ساعة** Watch Glass: تستعمل في خطوات مثل التشريب أو بعض مراحل تحضير الأجنة.

2.4 الشرائح المجهرية Microscope Slides

تستعمل لتحميل المقاطع والتحضيرات الكاملة وهي تصنع عادة من زجاج ولها الأبعاد التالية: 1×25×75 مم أو 1×37×75 مم أو 1×50×75 مم. والحجم الأول هو أكثرها شيوعاً، أما الحجمان الآخران فيستخدمان عادة في بعض أنواع التحضيرات الجنينية أو التحضيرات الكاملة لكائنات كبيرة نسبياً (شكل 5).



شكل 5:أنواع الشرائح المجهرية

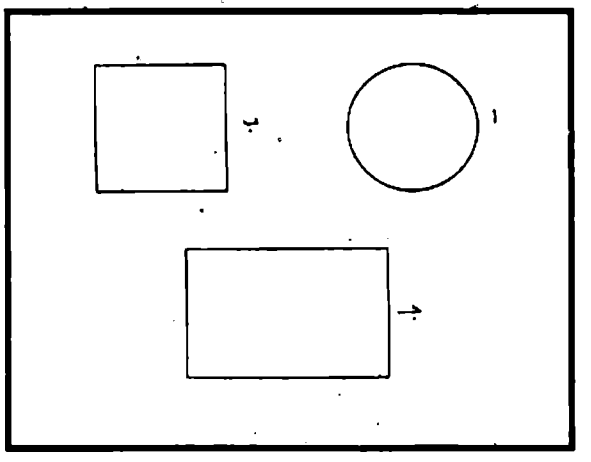
أ.شريحة كبيرة مقاس 1×75×37 مم للعينات الكبيرة؛ ب. شريحة عادية مقاس 1×75×25 مم؛ ج. شريحة عادية مسنفرة.

3.4 أغطية الشرائح Cover Slips

تصنع هذه الأغطية من الزجاج بأحجام وسماكات مختلفة. فمن حيث السمك يشار إليها بالرموز التالية:

الأغطية رقم 0	وسمكها 0.085-0.13 مم
الأغطية رقم 1	وسمكها 0.13-0.16 مم
الأغطية رقم 2	وسمكها 0.19-0.25 مم

يناسب سمك الأغطية رقم 1 لتغطية معظم المقاطع. ولكن في حالة المقاطع بالغة الرقة والتي يلزم فحصها بالعدسة الزيتية فلا بد من استعمال أغطية رقم 0. أما من ناحية الشكل فتكون الأغطية الزجاجية إما مستديرة أو مربعة أو مستطيلة (شكل6). ويترواح قطر الأغطية المستديرة بين 18 و 25 مم، بينما يترواح طول ضلع المربعة منها ما بين 18 و 25 مم أيضاً، أما المستطيلة فيكون بُعديها 35×50 ملم أو 45×50 ملم. ويحدد سعر الأغطية بالوزن وهي تباع عادة في علب صغيرة.



شكل 6: أنواع أغطية الشرائح

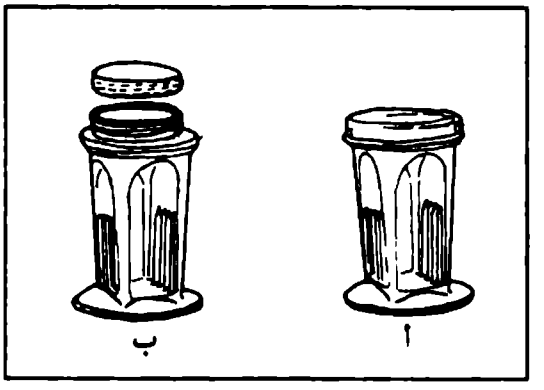
أ. مستدير؛ ب.مربع؛ ج.مستطيل.

4.4 جرار صبغ الشرائح Staining Jars

توجد منها عدة أنواع يستخدم كل منها لغرض خاص أو لصبغ أعداد معينة من الشرائح.

1.4.4 جرار كوبلين Coplin Jars

هذه أوعية مصنوعة من الزجاج تبرز داخلها وعلى طول جوانبها حزوز من الجدار الداخلي بينها ثلمات حيث توضع الشرائح. وتتسع كل قنينة لخمس شرائح أبعادها 25 ×75 مم تقف على حوافها الصغيرة في وضع قائم. ويمكن وضع عشر شرائح معاً إذا وضعت كل شريحتين معاً ظهراً لظهر. وحلق القنينة أوسع قليلاً من طرفها القاعدي ولها أغطية زجاجية غير محكمة (شكل7أ)، أو أغطية بلاستيكية محوّاة (شكل7ب)، وهذه الأخيرة أفضل.

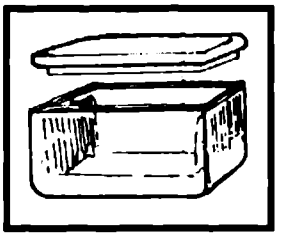


شكل 7: نوعان من جرار الصبغ

أ. جرة كوبلين (غطاء زجاجي)؛ ب. جرة كوبلين (غطاء بلاستيكي محوّى).

2.4.4 صناديق الصبغ Staining Boxes

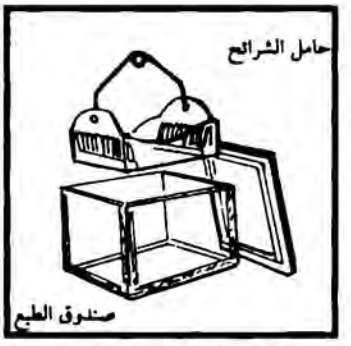
وهي أيضاً مصنوعة من الزجاج ولها حزوز زجاجية وثلمات، وتتسع لعشر شرائح تقف على حوافها الطويلة في وضع قائم، ولها أغطية زجاجية غير محكمة (شكل8).



شكل 8: صندوق صبغ

3.4.4 مجموعة الصبغ Staining Assembly

يطلق هذا الاسم عادة على صندوق زجاجي أو معدني مزود بصينية مصنوعة من نفس مادة الصندوق ويمكن رفعها وإخراجها من الصندوق (شكل 9). وتحمل هذه الصينية الشرائح التي تكون قائمة على جوانبها الطويلة. ويكون الصندوق عميقاً بما يكفي لصبغ شرائح عادية، ويمكن استعمالها أيضاً لصبغ شرائح اصغر حجماً. وتتسع الصناديق الزجاجية لعشر شرائح.



شكل 9: مجموعة الصبغ

5. علب الشرائح Slide Boxes

تصنع من الخشب أو البلاستيك القاسي، وتتوفر بأحجام متباينة، وأكثرها شيوعاً هي تلك التي تتسع لـ 25 أو 50 أو 100 شريحة. وتتعرض الصناديق الخشبية للانبعاج، كما أن أبعادها لا تكون دقيقة عادة، فقد تكون أوسع أو أضيق مما يلزم. وصناديق البلاستيك أفضل إذا تكون مواضع حفظ الشرائح فيها أدق في أبعادها كما أن أغطيتها تكون أكثر إحكاماً (شكل10).

شكل 10: علبة شرائح خشبية

وهناك صوان أخرى مصنوعة من الخشب أو الورق المقوى أو المعدن وتوضع فيها الشرائح في وضع أفقي وليس في وضع قائم (شكل11). وكذلك فإن هذا النوع يفضل في حفظ شرائح العينات الكاملة التي تستخدم فيها كمية كبيرة من وسط التحميل ويخشى من تحرك الغطاء فوق العينة إذا ما وضعت الشرائح بوضع قائم.

شكل 11: صينية شرائح من ورق مقوى

6. ادوات متفرقة Miscellaneous Tools

تساعد هذه الأدوات في إتمام العمل في مختبرات التحضير المجهري ولا يستغنى عنها، وأهمها (شكل12):

أ. **رافع مقاطع** Section Lifter: وهي أداة تفيد في حمل المقاطع.

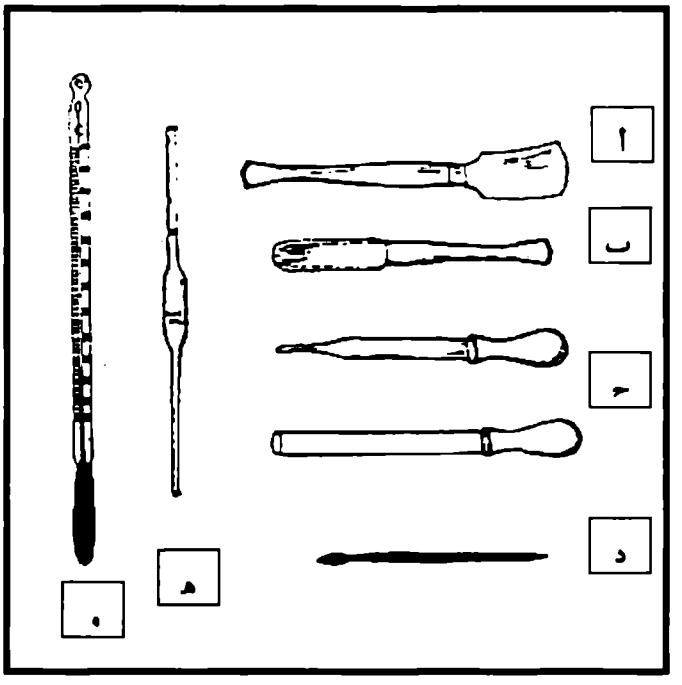
ب. مبسط Spatula: ويستعمل لنقل المواد الكيماوية الصلبة عند نقلها من آنيتها إلى الميزان.

ج. **قطارة طبية** Medicine Dropper: وهي نوعان: رفيعة وتستعمل لنقل محاليل كيماوية أو محاليل الصبغ بكميات قليلة، أو واسعة وتستخدم لنقل بعض المقاطع او الأجنة من السوائل.

د. **فرشاة شعر الجمل** Camel Hair Brush: ولها استعمالات عدة كإزالة المقاطع أو الشمع عن السكين أو حمل المقاطع أو التنظيف أو غير ذلك.

ه. **ماصّة** Pipette: هي أداة زجاجية تستعمل لنقل السوائل بكميات قليلة معروفة الحجم.

و. **ميزان حرارة** Thermometer: ويستعمل لقياس حرارة الأفران أو مناضد التدفئة أو السوائل.



شكل 12: الأدوات المتفرقة المستعملة في مختبرات التحضير المجهري
أ.رافع مقاطع؛ ب. مبسط؛ج1. قطارة رفيعة؛ ج2 قطارة عريضة؛
د. فرشاة شعر جمل؛ هـ. ماصة؛ و.ميزان حرارة.

الفصل العاشر

الأجهزة اللازمة في التحضير المجهري

تحتوي مختبرات التحضير المجهري والأمراض النسيجية مجموعة من الأجهزة التي لا يمكن الاستغناء عنها. ومن هذه الأجهزة تلك المستخدمة في تقطيع الأنسجة وأجهزة شحذ سكاكين القطع، وأفران صهر الشمع، ومناضد تدفئة الشرائح وموّزعات الشمع، ومعالجات الأنسجة الآلية وأجهزة الصبغ الذاتي.

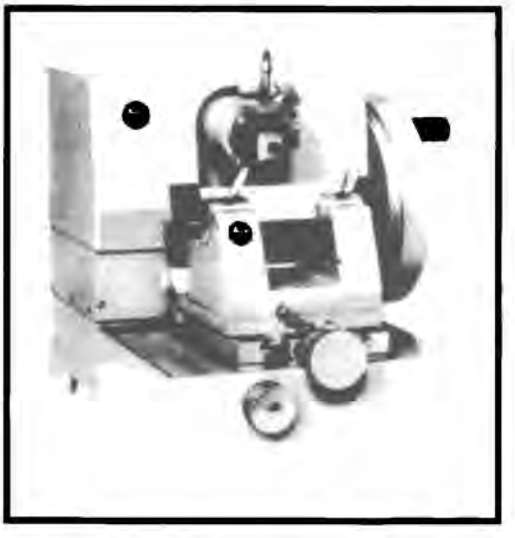
في هذا الفصل، سنتعامل مع معظم هذه الأجهزة عن كثب، وسنتطرق إلى بعض الأدوات المرتبطة بعمل هذه الأجهزة، وخاصة تلك المعنية بالتقطيع.

1. أجهزة التقطيع Microtomes

تشكل أجهزة التقطيع عماد مختبر التحضير المجهري الضوئي ومختبر الأمراض النسيجية، وتشترك جميع أنواع أجهزة التقطيع بثلاث آليات، وهي: آلية ضبط سمك المقاطع، وآلية حمل وتثبيت السكين وآلية تثبيت القالب الحامل للعينة. ومن أجهزة التقطيع تتوفر الأنواع التالية: الدوّار والدقيق والثلجي.

1.1 جهاز التقطيع الدوار Rotary Microtome

وهو أكثر الأنواع شيوعاً، اخترع عام 1885، ويسمى بالدوار لأن جهاز الدفع فيه يغذّى بعجل دوّار يوجد عند أحد جوانب الجهاز ويدار آلياً أو باليد. ويكون جهاز تغذية الدفع عادة مغطى لحمايته. ويعطى هذا النوع نتائج جيدة وهو يستخدم في عمل مقاطع الشمع المتسلسلة (شكل1).



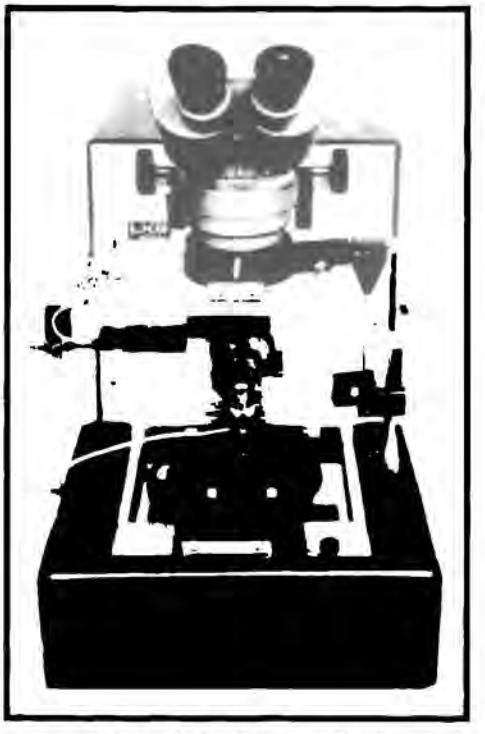
شكل 1: جهاز التقطيع الدوار

2.1 جهاز التقطيع الدقيق Ultra-Microtome

اخترع في نهاية الأربعينات من القرن الماضي، ويتوفر في مختبرات البحث، حيث تجري الدراسات بالمجهر الإلكتروني، ويستعمل لعمل مقاطع فائقة الدقة، يتراوح سمكها بين 50 و 100 نانومترا، ويختلف عن الأنواع التقليدية بما يلي:

1. يحتاج إلى أنواع خاصة من السكاكين (زجاج أو ماس) ليقطع قوالب الطمر الصغيرة (2×3 ملم).
2. جهاز التغذية فيه يعمل إما آلياً أو بالتمدد الحراري، وهو مبني عادة على نظام إلكتروني.

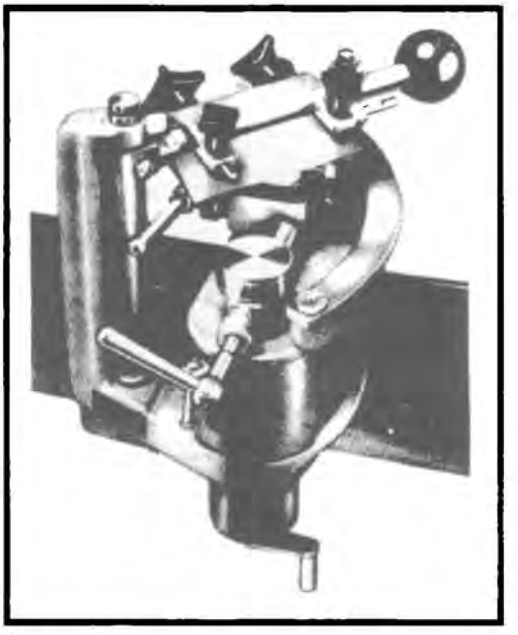
تستعمل أجهزة التقطيع الدقيق في البحوث التي تتعامل مع الأنسجة والخلايا والجراثيم والفيروسات وتلك التي تتطلب معرفة **التركيب الدقيق** ultrastructure للخلايا، وكذلك دراسة بنية الجسيمات أو الجزئيات الخلوية الكبيرة. ويبين الشكل (2) جهاز تقطيع دقيق.



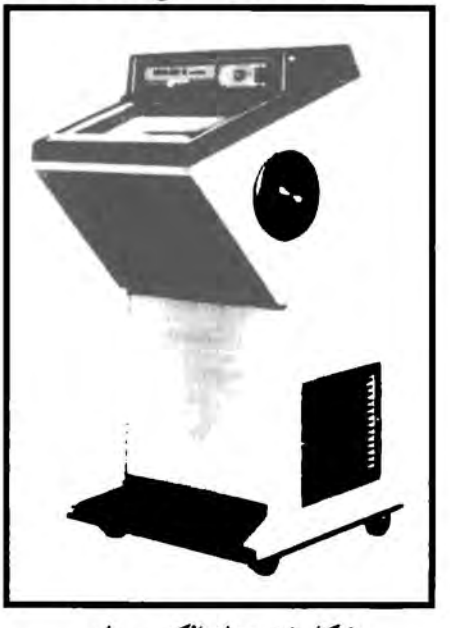
الشكل 2: جهاز تقطيع دقيق

3.1 جهاز التقطيع الجليدي Freezing Microtome

ويسمى جهاز التقطيع الإكلينيكي، ويستعمل لعمل مقاطع لأنسجة غير مثبتة أو مطمورة، وفيه تكون قاعدة حمل العينة، متصلة بأسطوانة ثاني أكسيد الكربون، لتبريد العينة والسكين بسرعة (شكل3). وهذا الجهاز مفيد جداً لعمل مقاطع التشخيص المرضي حال الحاجة إليها، وفي دراسة إنزيمات الأنسجة ودهونها، ولكنه لا يصلح لعمل مقاطع متسلسلة. وجهاز **الكريوستات** Cryostat (شكل4)، هو نوع متقدم من جهاز التقطيع الجليدي، وهو شائع الاستعمال في **مختبرات الأنسجة المعتلة** Pathology Laboratories.



شكل 3: جهاز التقطيع الجليدي



شكل 4: جهاز الكريوستات

2. سكاكين أجهزة التقطيع Microtome Knives

يعتمد انتاج مقاطع جيدة على عدد من العوامل، لعل أهمها السكين. فبغض النظر عن تعقيد جهاز القطع أو بساطته، أو عمليات تحضير النسيج قبل القطع فالناتج سيكون مقاطع رديئة، إذا لم يكن حد السكين حاداً.

تصنع سكاكين التقطيع من فولاذ ذي درجة عالية من الجودة يكون من الليونة بحيث يمكن شحذه لتصبح حافته بالغة الحدّة، ويكون من الصلابة بحيث تقاوم تلك الحافة الحادة الاحتكاك بالنسيج المطمور فلا تتكسر.

1.2 انواع سكاكين أجهزة التقطيع

تكون هذه السكاكين إما ذات حافة مستوية، أو مقعرة الوجهين أو مقعرة ومستوية.

أ. ذات الحافة المستوية Plane-edge type

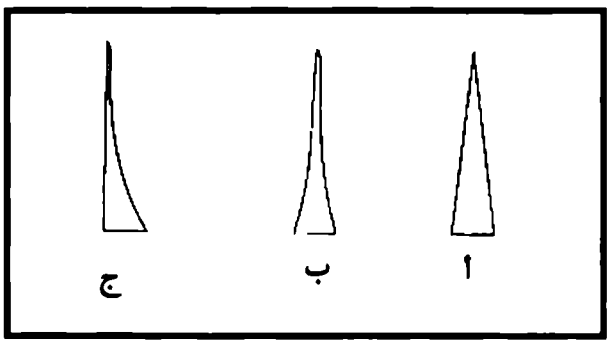
تستعمل لقطع الأنسجة المطمورة في قوالب البلاستيك، أو الشمع أو العينات المجمدة (شكل 5أ).

ب. مقعرة الوجهين Bioconcave Type

تسمى أيضاً مقعّرة الجانبين، وتستعمل للقطع من قوالب الشمع (شكل 5ب).

ج.المقعرة المستوية Plane-Concave Type

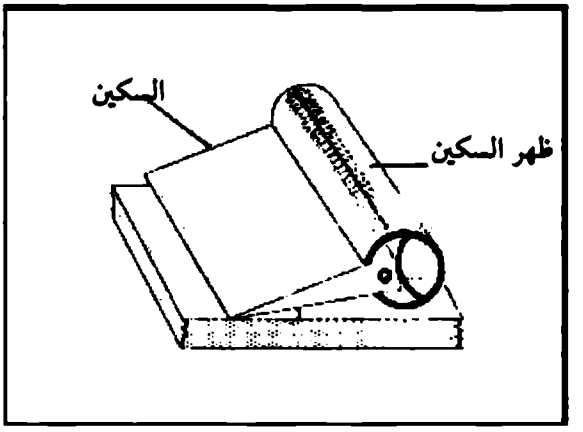
وتسمى أيضاً مجوفة الجانب، وتستعمل لقطع قوالب البلاستيك والسلويدين (شكل 5جـ).



شكل 5: أنواع سكاكين أجهزة التقطيع

أ. ذات الحافة المستوية؛ ب.مقعرة الوجهين؛ ج.المقعرة المستوية.

تشترى السكاكين عادة من نفس الشركات التي تصنع أجهزة التقطيع. وتكون كل سكين مزودة «بظهر» هو عبارة عن أنبوب مفتوح من الصلب تنزلق فيه السكين فيحيط بقاعدتها السميكة (الشكل6). والظهر هام في عملية شحذ السكين باليد إذ أنه يحدد الزاوية التي تستقر بها حافة السكين على سطح الحجر أو الصفيحة الشاحذة.



شكل 6: السكين وظهرها

بالنسبة للتحضيرات المجهرية الالكترونية، تصنع السكين من الماس، ويكون حدّها القاطع بحدود 2-3 ملم، وهي باهظة الثمن، وقد يصل ذلك لحوالي 2000 دولاراً.

2.2 العناية بسكاكين التقطيع

تنظف السكاكين قبل الاستعمال، إما بفرشاة من شعر الجمل، أو خرقة ناعمة مغموسة بالزايلين، ويبدأ بالتنظيف، من ناحية القاعدة إلى الحافة، وليس العكس. ولمس الأشياء الصلبة، كالمشرط أو رافع المقاطع للحد القاطع يتلفه بسهولة. ولعله من المفيد فحص طرف السكين تحت مجهر التشريح، لملاحظة النتوءات والتسننات فيه، والابتعاد عنها عند قطع الأنسجة. وعند الانتهاء من استخدام السكين، تراعى الأمور التالية:

أ. تنظيف السكين بوسط مناسب، مثل زايلين، وذلك باستعمال فرشاة شعر الجمل، كم أشرنا إلى ذلك سابقاً.

ب. إزالة آثار الزايلين بخرقة ناعمة.

ج. تجفيف السكين عند حرارة الغرفة.

د. حفظ السكين في علبة خاصة بحيث يوجه الطرف الحاد إلى أسفل.

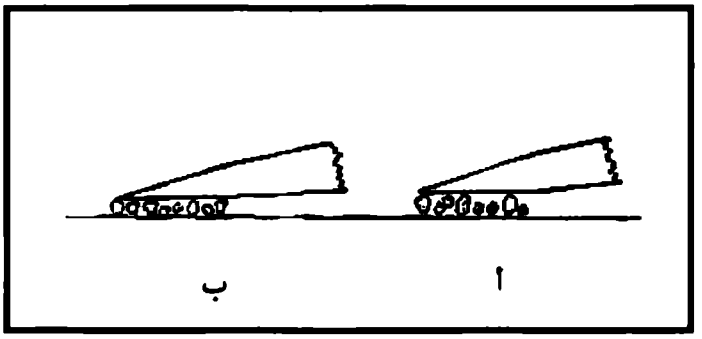
3.2 شحذ السكاكين وتجليخها Knives Sharpening

تغدو حواف السكاكين القاطعة بعد الاستعمال المستمر كليلة وغير حادة، وقد يؤدي لذلك أيضاً سوء الاستعمال، فتصبح غير صالحة، لما فيها من ثلمات وتسننات. ويمكن شحذ السكاكين الكليلة بطريقتين: التجليخ أو السن، والصقل، وذلك إما يدوياً أو آلياً.

1.3.2 التجليخ أو السن Honing

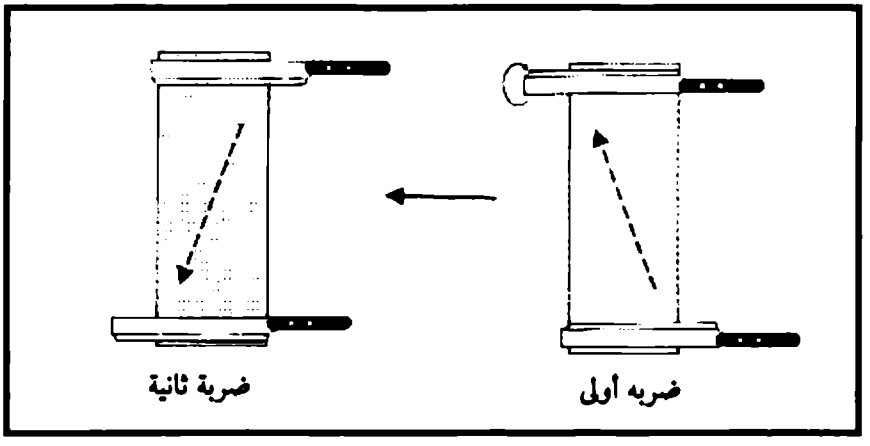
تكون هذه الطريقة ضرورية، عندما يصبح الحد القاطع للسكين عريضاً، وبه ثلمات كثيرة. وحجر الجلخ، عبارة عن قطعة مستطيلة من مادة حاكة، مثل كربوراندم Carborundum، أو لوحة من الزجاج، طولها 35 سم، وعرضها 25 سم، توضع عليها المادة الحاكة، التي هي أكسيد الألومنيوم معلقاً في الماء. ويستعمل الزيت كمخفف للاحتكاك.

للجلخ، تستعمل طبقة حبيبات حك شبه متجانسة يبلغ قطرها حوالي 20 ميكرومترا. وإذا كانت الثلمات الموجودة على حد السكين عميقة، فإن معدل حجم هذه الحبيبات يزاد، أي يستعمل حاكّ خشن (الشكل 7)، مما يوفر الوقت والجهد في الشحذ، وعندما تقل الثلمات يستعمل حاك ناعم، ويكون اتجاه التجليخ كما مبين في الشكل (8). ويجب تنظيف السكين، بعد كل عملية إنتقال، من الحاك الخشن إلى الناعم، وكذلك ينظف حجر الجلخ.



شكل 7: حبيبات حك سكين القطع

أ. تجانس قليل عند بدء التجليخ؛ ب.تجانس كثير بعد التجليخ الأولي.



شكل 8: تجليخ السكين. لاحظ اتجاه «الضربة» الأولى والثانية

2.3.2 الصقل Stropping

يكون السكين بعد الجلخ على الحجر خالياً من الثلمات، ويجب التأكد من ذلك بفحص السكين بالمجهر التشريحي. ويتبع الجلخ عملية أخرى تدعى الصقل، حيث تستعمل حبيبات حك دقيقة يبلغ قطرها حوالي خمسة ميكرومترات. وبعد انتهاء عملية الصقل يدهن طرف السكين الحاد بالزيت لمنع الصدأ، وتعلق السكين في علبة خاصة، ولا تلقى على أحد جانبيها.

تجدر الإشارة إلى أن عملية شحذ السكين قد تستغرق عدة دقائق أو أكثر ويعتمد ذلك على حالة السكين.

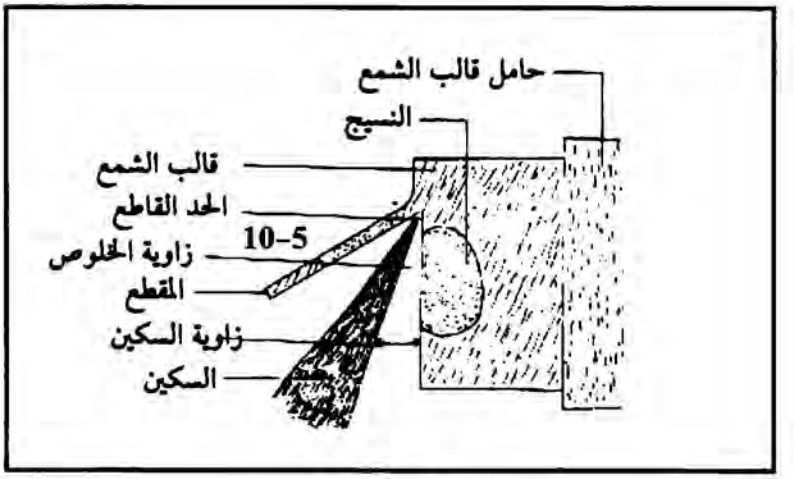
3.3.2 شحذ السكاكين آلياً Automatic Knife Sharpening

ظلت السكاكين تشحذ لمدة طويلة على مشحذ جلدي أو على حجر الجلخ. ولكن لصعوبة العملية وإحتياج إتقانها إلى جهد كبير من قبل العاملين في التحضير المجهري أستعيض عن ذلك بجهاز آلي لشحذ السكاكين الكليلة بدقة وسرعة بحيث يكن حجر الجلخ فيه من الزجاج المسنفر توضع عليه **مادة حاكّة** Abrasive (شكل 9). وتتوفر من هذا الجهاز أنواع عديدة: منها ما تتحرك فيه السكين على حجر الجلخ ومنها ما تكون فيه السكين ثابتة وحجر الجلخ متحركا

شكل 9: جهاز شحذ السكاكين

4.2 زاوية السكين Knife Angle

يجب تثبيت السكين في مكانها، بشكل جيد قبل البدء بالقطع، ثم تحدد الزاوية المناسبة للعمل، بحيث يميل حد السكين، بزاوية تجعل الحد القاطع غير مواز لقالب الشمع. تسمى الزاوية التي تترك بين حد السكين القاطع، وبين قالب الشمع، **زاوية الخلوص** Clearance Angle، التي يجب أن تكون أقل ما يمكن (5-10درجات)، لأنها إذا كانت كبيرة فإن المقطع الناتج سيتجعد، ويلتف على شكل اسطواني، وإذا كانت صغيرة، فإن المقاطع ستلتصق على أعلى قالب الشمع، بدلاً من أن تنزلق على السطح الحر للسكين (شكل 10).



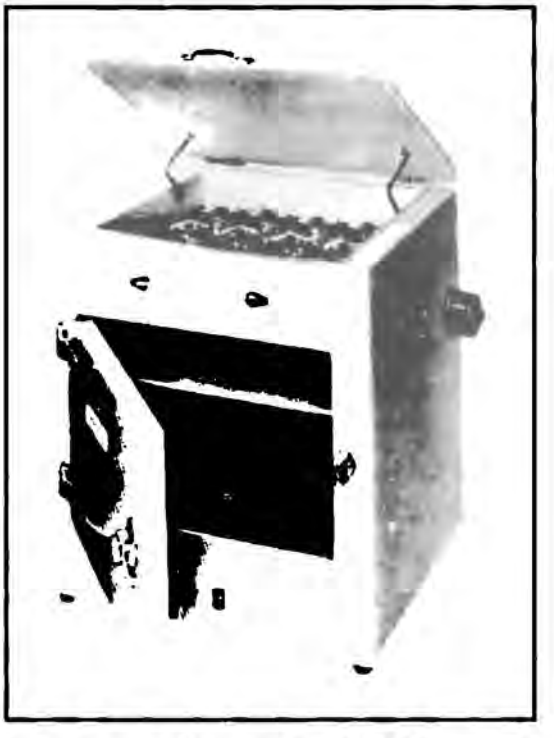
شكل 10: زاوية السكين

3. أفران صهر الشمع Paraffin Ovens

تنتج شركات عديدة أنواعاً من أفران الشمع تختلف بعضها عن بعض في تفاصيل بسيطة ولكن المبدأ التصميمي واحد فيها جميعاً. فهذه الأفران عبارة عن خزانات تسخن كهربائياً ويمكن ضبط درجة حرارتها عند مدى يتراوح بين 37° و 100°س، وذلك بوساطة ضابط يتحكم في قوة التيار الكهربائي الواصل إليها (شكل 11). وتحتوي جدر الفرن على مادة عازلة تعين على تثبيت درجة حرارته. وأهم ما يجب التأكد منه هو ثبات درجة حرارة الفرن حول الدرجة المرغوبة والتي يضبط عليها، حتى لا ترتفع إلى مستوى يؤدي إلى «طبخ» العينة التي يجري تشريبها بالشمع المنصهر.

ومن أنواع أفران الشمع ما هو مقسم أفقياً إلى بضع حجرات أصغر تكون لكل منها درجة حرارة تختلف عن تلك التي تليها إلى أسفل (45°س،50°س، 60°س مثلاً). وميزة هذا النوع أنه يمكن إجراء مرحلة التشريب فيه بخلط الشمع ووسط الترويق في الحجرة العلوية عند درجة حرارة أقل من درجة انصهار الشمع، وذلك قبل نقله إلى الشمع المنصهر النقي في الحجرة الوسطى أو السفلية. كما أنه يتيح إجراء عمليات تشريب متباينة باستخدام أكثر من نوع واحد من الشمع تختلف في درجة انصهارها وذلك لتتناسب مع قساوة أو ليونة النسيج المراد طمره.

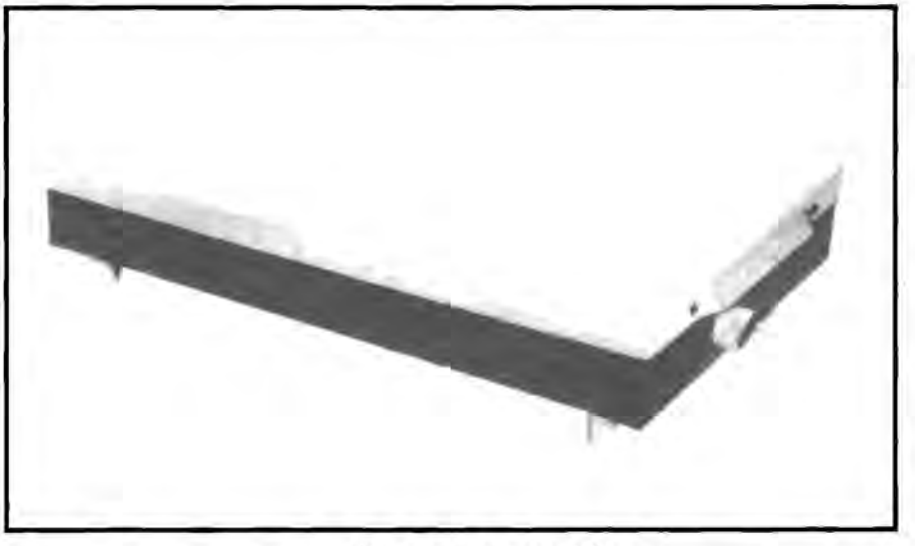
وهناك أنواع من أفران الشمع يمكن إفراغها من الهواء بايصالها بمضخة تفريغ وهي مفيدة جداً في حالة تشريب أنسجة محتوية على هواء كالرئتين مثلاً، إذ يسهل تفريغ هواء هذه الأنسجة ليحل الشمع محله.



شكل 11: فرن صهر الشمع

4. مناضد تدفئة الشرائح Warming Tables

تستخدم هذه الأجهزة في بسط المقاطع وتجفيفها، وهناك عدة نماذج منها. وهي عبارة عن صفيحة من المعدن توجد تحتها عناصر تسخين كهربائية مع منظم يعطي درجة حرارة ثابتة بحدود 35-40°س (شكل 12).



شكل 12: منضدة تدفئة الشرائح

5. الأجهزة المتخصصة

أظهرت في العقود الأخيرة أجهزة تسهّل عمل تحضيرات مجهرية على نطاق واسع بطريقة آلية ودون الحاجة إلى عدد كبير من العاملين الفنيين. ولا ننصح باستخدام هذه الأجهزة في تدريب طلاب التحضير المجهري الضوئي إلا في مراحل متأخرة من تدريبهم، وتستخدم هذه الأجهزة في المختبرات الطبية التي يحتاج الأمر فيها إلى سرعة تحضير أعداد كبيرة من الشرائح، أو في مختبرات الشركات المتخصصة في تحضير وبيع الشرائح المجهرية الجاهزة بالجملة.

وعليه فإن طالب التحضير المجهري الضوئي المبتدئ نادراً ما يستعمل هذه الأجهزة، ولكن حرصنا على ذكرها في هذا الكتاب جاء زيادة لفائدة الطالب وتوسيع مداركه في هذا المجال. وأهم هذه الأجهزة هي: موّزع الشمع، ومعالج الأنسجة الآلي وجهاز الصبغ الذاتي (الأتوماتيكي).

1.5 موزّع الشمع Wax Dispenser

وهو حمام شمعي مغلق له صنبور، يوضع شمع البرافين فيه ويجري تسخينه بالكهرباء إلى درجة انصهار الشمع مع المحافظة على تلك الدرجة بحدود 50-55°س

(شكل 13). وعادة ما يتسع الوعاء لعدة ليترات من الشمع المنصهر، ويمكن فتح الصنبور وغلقه بسهولة عند تداول الشمع. وميزته أن يسهل العمل في توفير وتوزيع كميات كبيرة من الشمع.

شكل 13: وعاء توزيع الشمع

2.5 معالج الأنسجة الآلي Automatic Tissue Processor

يقوم هذا الجهاز بجميع العمليات التي تجري على الأنسجة، بدءاً من تثبيتها، وحتى عملية التشريب. والجهاز عبارة عن منضدة دائرية بها ثقوب واسعة (فتحات) وماسكات خاصة، تمسك الكؤوس التي توضع فيها المحاليل المستعملة، وحمامان يوضع فيهما شمع البرافين المنصهر، ويتسع كل كأس لحوالي ليتر واحد من كل محلول (شكل 14).

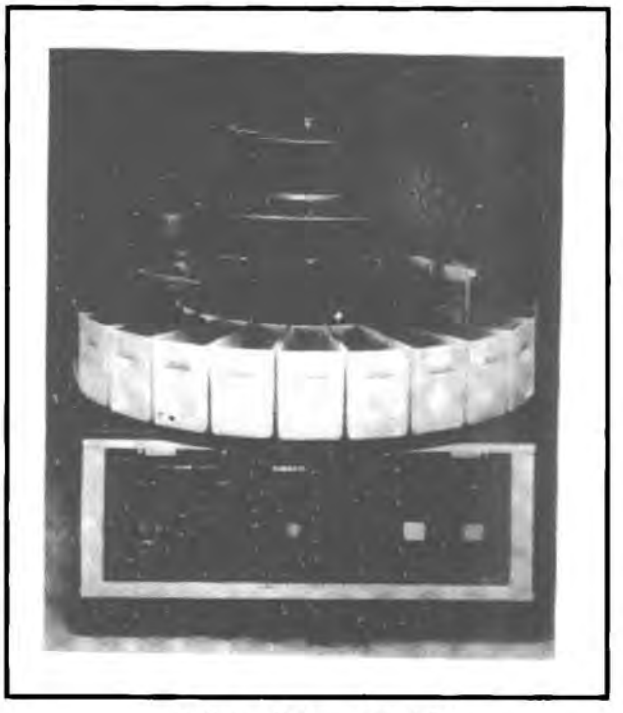
شكل 14: معالج الأنسجة الآلي

توضع الأنسجة في سلة خاصة لها حجرات عديدة، تعلق في ذراع الجهاز الذي يقوم عن طريق آلية خاصة بتحريك سلة الأنسجة في المحلول صعوداً ونزولاً، وابقائها في كل محلول المدة المقررة له حسب برنامج محدد بساعة خاصة في أسفل الجهاز، ومن ثم نقلها إلى بقية المحاليل حسب البرنامج المشار إليه، إلى أن تصل إلى حمامي الشمع لإجراء عملية التشريب في كل حمام على حدة عند درجة حرارة انصهار الشمع. أي أنه يمكن وضع برنامج الجهاز على مدى 24 ساعة وتركه ومغادرة المكان ليقوم هو بالعمل المطلوب بشكل آلي.

3.5 جهاز الصبغ الذاتي Automatic Stainer

يتكون هذا الجهاز من منضدتين دائريتين بهما أماكن خاصة لتثبيت أحواض الصبغ عليها، بحيث تحوي العدد المطلوب من هذه الأحواض، التي لا يزيد عددها على عشرين حوضاً. وللجهاز حامل شرائح خاص، به شقوق لاحتضان الشرائح منفصلة عن بعضها، ويقوم ذراع الجهاز بإجراء عملية التحريك برفع وخفض حامل الشرائح مرات عديدة في المحاليل الموضوعة في الأحواض، حسب المدة المقررة في البرنامج المعد للجهاز، ومن ثم نقلها وحسب البرنامج أيضاً، خلال المحاليل كلها،

حتى تخرج الشرائح من آخر حوض مصبوغة جاهزة لوضع وسط التحميل عليها ومن ثم تغطيتها بالأغطية الزجاجية المناسبة (شكل 15).



شكل 15: جهاز الصبغ الذاتي

الفصل الحادي عشر

المثبتات

من أهم المحاليل المستعملة في مختبرات التحضير المجهري تلك المعنية بتثبيت الأنسجة. ومن هذه المحاليل: الفورمالين، ومثبتات حمض البكريك، والمثبتات المعدنية، والمثبتات الكحولية، ومثبتات أخرى من أبرزها رابع أكسيد الأزميوم.

فيما يلي عرض لتركيب وتحضير أكثر محاليل التثبيت استعمالاً في التحضيرات المجهرية الأساسية.

1. مثبتات الفورمالين Formalin Fixatives

هذه مثبتات عامة جيدة، وتتوفر بعدة صيغ، منها:

1.1 الفورمالين- حسب صيغة بيكر Baker (1944)

فورمالين مركز Concentrated Formalin..... 10مل

كلوريد الكالسيوم Calcium Chloride .....1.0 غم

ماء مقطر Distilled Water ..... 100 مل

يمكن حفظ النسيج بهذا المثبت لمدة غير محدودة. ويتم غسل المثبت بالماء.

2.1 الفورمالين- حسب صيغة بيكر Baker (1958)

فورمالين مركز Concentrated Formalin 10مل

كلوريد الكالسيوم (محلول مائي بتركيز 10٪) Calcium Chloride ... 10 مل

ماء مقطر Distilled Water .....80 مل

يمكن حفظ النسيج بهذا المثبت لمدة غير محدودة، ويتم غسل المثبت بالماء.

ملاحظة:

1. إذا ترك الفورمالين على الرف لمدة طويلة فإنه يتبلمر ويكون راسباً أبيض يدعى **برافورملديهايد** Paraformaldehyde، ويمكن إزالة هذا الراسب بالترشيح.
2. عند تثبيت أنسجة غنية بالدم، مثل الكبد والطحال، بالفورمالين، تظهر بقع سوداء أو بنية في هذه الأنسجة. ويمكن إزالة هذه البقع بوضع الأنسجة المثبتة بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم 1٪ محضر بكحول إيثيلي تركيزه 80 ٪ لمدة 30 دقيقة.

2. مثبتات حمض البكريك Picric Acid Fixatives

يستعمل حمض البكريك في عدة محاليل تثبيت، وهو معروف بتفاعله مع الهستونات والبروتينات القاعدية ليكون أملاح **البكريت** Picrates البلورية نتيجة تفاعله مع الأحماض الأمينية. وعند استعمال هذه المثبتات، تأخذ الأنسجة لوناً أصفر يجب التخلص منه، كما سنشير لذلك لاحقاً. وبشكل عام، فإن هذه المثبتات مفيدة في تثبيت مواقع الجلايكوجين في الأنسجة، ومن أكثرها استعمالاً: **مثبت بوان Bouin's Fixative** الذي يحضر كالتالي:

محلول حمض بكريك مائي مشبع..... 75 مل
saturated aqueous picric acid
فورمالين مركز Concentrated Formalin ..... 25 مل
حمض خليك ثلجي Glacial Acetic Aacid ..... 5 مل

مثبت عام جيد، وخاصة للجلايكوجين وللنواة، وهو ثابت لمدة طويلة. مدة التثبيت هي من 6 إلى 24 ساعة، ويمكن حفظ النسيج بهذا المثبت لعدة أسابيع دون ضمور. تجدر الاشارة إلى أن غرام واحد من حمض البكريك يشبع 75 مل من الماء.

يغسل المثبت بعد انتهاء مدة التثبيت بمحلول كحول إيثيلي تركيزه 50٪، عدة مرات حتى يزول اللون الأصفر إلى حد كبير. ويمكن تسهيل إزالة هذا اللون من المقاطع وذلك بوضع الشرائح الحاملة للمقاطع بمحلول كحول إيثيلي تركيزه 70٪ مضافاً اليه بضع قطرات من محلول **كربونات الليثيوم** lithium carbonate المشبع.

3. المثبتات المعدنية Metallic Fixatives

تحتوي هذه المثبتات كلوريد الزئبق mercuric chloride الذي يخترق الأنسجة ببطء، ويسبب انكماشها. وبشكل عام، فان الأنسجة المثبتة بهذه المحاليل تحتوي ترسبات سوداء من الزئبق، يمكن ازالتها من المقاطع بتمريرها بمحلول يود كحولي، كما سنشير إلى ذلك لاحقاً. ومن فوائد استعمال هذه المثبتات قوة صبغها لنوى الخلايا، ومن اكثرها شيوعاً: **مثبت زنكر Zenker's Fixative** الذي يحضر كالتالي:

ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium Dichromate..... 2.5 غم

كلوريد الزئبق Mercuric Chloride ..... 4 غم

ماء مقطر Distilled Water ..... 95 مل

حمض خليك ثلجي Glacial Acetic Acid..... 5 مل

تتراوح مدة التثبيت بين 4 و 18 ساعة، ويغسل النسيج تحت ماء جار لمدة تتراوح بين 8 و 12 ساعة.

ملاحظة:

1. يسبب كلوريد الزئبق الموجود في هذا المثبت راسباً يتخذ شكل إبر، ويمكن إزالة هذا الراسب بوضع المقاطع بمحلول يود مشبع في كحول إيثيلي تركيزه 70٪ .
2. يحضر المثبت قبل الاستعمال بفترة وجيزة نظراً لعدم ثباته، وللتسهيل يمكن مزج المكونات الثلاثة الأولى وخزن المثبت في هذه الصورة الثابتة على **ألا يضاف حمض الخليك إلا قبل الاستعمال مباشرة.**

4. المثبتات الكحولية Alcoholic Fixatives

لا يستعمل الكحول المطلق كمثبت، على الرغم من الاشارة إلى استعماله كمثبت جيد لتثبيت الجلايكوجين. ونظراً لأن الكحول يسبب انكماش الأنسجة، فإن مادة أخرى مثل حمض الخليك الثلجي تضاف له حتى تقلل من ذلك الانكماش.

للمثبتات الكحولية سرعة نفاذية جيدة، ولذلك فهي تستعمل لتسريع معالجة الأنسجة في التحضيرات المجهرية الروتينية. وإذا ما أريد دراسة الأحماض النووية في المقاطع الشمعية، فإن المثبت الكحولي المفضل هو مثبت كارنوي. كذلك، فإن هذا المثبت جيد لحفظ الخلايا العصبية وخاصة حبيبات نسل Nissl bodies. ويمثل مثبت كارنوي **Carnoy's Fixative** أبرز المثبتات الكحولية: ويحضر كالتالي:

حمض خليك ثلجي Glacial Acetic Acid ..... 10 مل

كحول إيثيلى مطلق Absolute Ethyl Alcohol ..... 60 مل

كلورفورم Chloroforme 30مل

من فوائد استعمال مثبت كارنوي سرعة اختراقه للأنسجة، وعدم الحاجة لعمليتي الغسيل وإزالة الماء، ولذلك فهو يستعمل عند معالجة عينات الخزعة biopsy ، حيث تثبت الأنسجة بمحلول كارنوي لمدة ساعة ثم تنقل إلى كحول مطلق مباشرة، ثم تنقل إلى مزيج من الكحول والكلوروفورم بنسبة 1:1 ثم تروق وتستكمل بقية الخطوات من تشريب وطمر وقطع وصبغ.

الفصل الثاني عشر

مزيلات الماء ووسائط الترويق

بعد تثبيت الأنسجة وغسلها لا بد من إزالة الماء منها وترويقها تمهيداً لتشريبها وطمرها بالشمع. ومن أجل ذلك تستعمل محاليل مزيلة للماء مثل الكحول والأسيتون، يتبعها وضع الأنسجة في مروقات أبرزها **زايلين** Xylene .

1. مزيلات الماء Dehydrants

تتوفر عدة وسائط لإزالة الماء من الأنسجة بعد غسلها بالوسط المناسب. ومن هذه الوسائط الكحول الأيثيلي، والكحول الميثيلي والأسيتون. وكما هو معروف تتم عملية إزالة الماء من الأنسجة بشكل متدرج، ويتطلب هذا الأمر تحضير تركيزات مختلفة من الوسط المختار لهذه الغاية.

لقد اخترنا الكحول الإيثيلي كوسط مناسب لإزالة ماء، وإذا لم يتوفر فإنه يمكن استعمال الكحول الميثيلي. ويفضل عدم استعمال الأسيتون بسبب سرعة تطايره. ولعمل تركيزات مختلفة من الكحول الإيثيلي يستعمل الكحول ذو التركيز 95٪ كمصدر مناسب، وذلك لرخص ثمنه وسهولة الحصول عليه، مقارنة بالكحول المطلق. ويمكن إتباع إحدى الطريقتين التاليتين لتحضير التركيز المطلوب.

1.1 تحضير محاليل إزالة الماء

1.1.1 الطريقة الأولى

أ. يؤخذ حجم من الكحول ذي التركيز العالي (95٪ مثلاً) يعادل قيمة التركيز المطلوب (70٪ مثلاً)، ويوضع في مخبار مدرج.

ب. تطرح قيمة التركيز المطلوب من قيمة التركيز العالي، وتضاف قيمة الفرق كماء مقطر إلى الكحول في المخبار المدرج.

مثال:

قيمة التركيز العالي..... 95٪

قيمة التركيز المطلوب ..... 70٪

حجم الكحول المطلوب .....190 مل

الحل:

1. يوضع 70 مل من الكحول 95٪ في مخبار مدرج.
2. يضاف 25 مل ماء مقطر (95-70) إلى المخبار المدرج أعلاه. وبذا يمكن الحصول على 95 مل من كحول تركيزه 70٪.

واضح أن الكمية المطلوبة هي ضعف هذا الحجم. لذا، يؤخذ 140 (70×2) مل من الكحول 95٪ ويضاف إليه 50 (25×2) مل ماء مقطر في مخبار مدرج.

2.1.1 الطريقة الثانية

تعتمد هذه الطريقة على المعادلة التالية:

ت1 × ح1 = ت2 × ح2 ، حيث ترمز هذه الحروف والأرقام إلى:

ت1= قيمة التركيز العالية = 95٪

ت2= قيمة التركيز المطلوب = 70٪

ح1= حجم الكحول ذي التركيز العالي، وهو المطلوب معرفته.

ح2= حجم الكحول ذي التركيز المطلوب، وهو 190 مل.

وإذا ما وضعت هذه الأرقام في أماكنها المناسبة في المعادلة المذكورة فإننا نحصل على:

95 × ح1 = 70 × 190

ولذا، فإن حجم الكحول ذي التركيز الأعلى اللازم هو:

$$\frac{70\times190}{95} = 140 \text{ مل}$$

ويكون حجم الماء المطلوب إضافته 190 – 140 = 50 مل. ويمكن استعمال إحدى الطريقتين لتحضير تركيزات مختلفة لأي مزيل للماء.

2.1 طريقة إزالة الماء

مهما كان الوسط الذي يستعمل لإزالة الماء من النسيج بعد تثبيته وغسله، يجب أن تتم هذه الإزالة بطريقة متدرجة، ومن أجل ذلك يستعمل تدرج كحولي (أو غيره) يبدأ بتركيز 30٪ وينتهي بكحول مطلق. وتعتمد البداية في عملية إزالة الماء على نوع المثبت. ويبين الجدول التالي ملخصاً لبرنامج إزالة الماء بشكل عام.

نوع المثبت	وسط الغسيل	تدرج وسط إزالة الماء (٪)
المثبتات المائية	ماء	100،100،100 ، 95 ، 70 ، 50 ، 30
المثبتات الكحولية	50-70٪ كحول	100،100 ، 95

ملاحظات هامة

1. يوضع النسيج في كل محلول لفترة تتراوح بين ساعة وساعتين، وللتأكد من إزالة الماء من النسيج يستعمل تغييرين من الكحول المطلق.
2. يجب عدم ترك النسيج في كحول 95٪ أو كحول مطلق لأكثر من ساعتين في كل تركيز، لأن ذلك يؤدي إلى تقسيته.
3. إذا اقتضت الظروف وقف عملية إزالة الماء، فإن تركيز الكحول المفضل لتخزين الأنسجة فيه هو 70٪.

2. وسائط الترويق Clearing Agents

تتوفر عدة وسائط لترويق الأنسجة بعد إزالة الماء منها، وفي جميع الحالات يراعى عند اختيار الوسط المناسب:

أ. قدرته على إزالة الشمع عند درجة حرارة الغرفة.
ب. سهولة امتزاجه بوسط إزالة الماء.
ج. عدم تطايره بسرعة.
د. سهولة التخلص منه في فرن الشمع.
ه. اعتدال سعره، وسلامة تداوله.

ومن وسائط الترويق شائعة الاستعمال ما يلي:

1.2 زايلين Xylene

هذا الوسط شائع الاستعمال في مختبرات التحضير المجهري، وعلى الرغم من أنه يسبب انكماش النسيج ويجعله هشاً إذا ما ترك فيه لمدة طويلة، إلا أنه يظل من أفضل وسائط الترويق، ذلك أن إضفاءه الشفافية عل النسيج يعطي فكرة جيدة عن إتمام عملية الترويق. بالإضافة إلى ذلك فإن الزايلين لا يتطاير بسرعة ويمكن إخراجه من الأنسجة أثناء التشريب بسرعة معقولة. وللتغلب على احتمال عدم إزالة الماء من النسيج بشكل مطلق، فإنه يفضل إضافة كمية من الفينول إلى الزايلين حتى لا تؤثر بقايا الماء على الخطوات التالية. ويقترح أن يكون الفينول بالنسبة التالية:

زايلين Xylene ..... 70 مل

فينول Phenol..... 30 غم

2.2 كلوروفورم Chloroform

يعتبر من أفضل وسائط الترويق للاستعمالات العامة، نظراً لأنه لا يقسّي الأنسجة كثيراً، ولذلك فانه يفضل في ترويق الأجنة والأنسجة المعتلة وخاصة العصبية والعظمية. غير أن الكلوروفورم بطيء في ترويق الأنسجة مقارنة بالزايلين.

3.2 زيت خشب الأرز Cedarwood Oil

نظراً لأن هذا المروق يسبب أقل قدر من إنكماش وتقسية الأنسجة، مقارنة بغيره من وسائط الترويق، فإنه يعتبر الوسط المميز لترويق الأنسجة الحيوانية وخاصة الأجنة. غير أن ارتفاع سعره، وضعف امتزاجه مع بلسم كندا يحدان من استعماله كوسط روتيني.

4.2 زيت القرنفل Clove Oil

يعتبر مروقاً مثالياً للأنسجة النباتية، ومن أبرز ميزاته قدرته على إزالة الماء، بحيث يمكن نقل الأنسجة إليه من الكحول 95٪، وكذلك قدرته على ترويق المقاطع السميكة. أما أبرز مساوئ استعماله فإنها تتمثل في جعل الأنسجة هشة نوعاً ما، وإزالته لصبغات مثل الصفرانين والهيماتوكسلين من الأنسجة، وكذلك عدم

امتزاجه ببلسم كندا، الأمر الذي يستدعي وضع الأنسجة في الزايلين قبل نقلها إلى وسط التغطية المذكور.

ملاحظات هامة:

1. يفضل إجراء عملية الترويق بوضع الحجم المناسب من وسط الترويق بأنبوب صغير، ثم تضاف اليه العينة بواسطة فرشاة أو ملقط.
2. يتفاوت وقت الترويق من نسيج لآخر، ويصعب تحديد فترة مناسبة له. ويمكن القول أن ترويق أنسجة عامة بالزايلين، مثلاً، يتطلب تغيير وسط الترويق مرتين، بحيث تتراوح فترة كل مرة بين ساعة وساعتين. غير أن الفترة الاجمالية تختلف من نسيج لآخر. أما بالنسبة للمقاطع، فإنها تروق مرتين أيضاً، تتراوح فترة كل منهما بين ثلاث وست دقائق.

الفصل الثالث عشر

وسائـــط التشريـــب والطمـــر

لما كـانت مـعظم الأنسـجة الحيوانية وبعض الأنسجة النباتية لينة رهيفة فإنه من المتـعذر عمل مقاطع رقيقة منها إلا إذا دعّمت أو قويت بمـادة تتخللـها وتحـيط بهـا. هذه هي وظيـفـة وسـائط الطمر، فـهي عبارة عن مـواد تكـون في إحـدى حـالاتها صلبـة القوام بحيث يمكـن لـسكين حـاد أن يقطعهـا إلى مقـاطع رقيقـة لا تتهتـك أو تتفتت. ولكي تتم هذه العملية على نحو مرض لا بد أن يكون قـوام النـسيج وقـوام وسط الطمر متجانسين تماماً. وهذا لا يتأتى إلا إذا تخلـل وسـط الطمـر كـل خـلايا النسـيج وجميع أجـزائه وحـيزاته بين الخلويـة، أي أن يكـون النـسيج متـشرباً بوسـط الطمر.

مما تقدم يتضح أن هناك شرطاً يجب توفره في وسـط الطمـر وهـو التحـول مـن السـيـولة إلى الصـلابة تحت ظروف في مـتناول اليـد. ففـي مرحلـة التـشريب يكـون الوسط سائلا، وبانتهاء هذه المرحلة يجري تغيير الظروف الفيزيائية أو الكيميائية بحيث يصبح الوسط صلباً ويضفي على النسيج الدعامة المطلوبة. ومن وسـائط الطمـر الـتي ينطبـق عليها هذا الشـرط المـاء و **الجيلاتين** Gelatin و**السيلويدين** Celloidin وشـمع البرافين والأجار وأنواع من البلاستيك تستخدم في دراسات المجـهر الالكتروني.

1. الماء

يسـتـخدم الماء بهذه الـصفة لعمـل قطاعـات مـن أنـسجة مثبتـة أو غـير مثبتـة وخـاصـة فـي حـالات الفحـص المجهـري الـسريع للتحقـق مـن حـالات مرَضـية في المسـتشـفيـات. ونظراً لأن الماء يكوّن جانباً كبيراً مـن المـادة الحيـة فـان نـسبته تكـون عاليـة في النسيج المراد قطعه. ويحرص في هذه الحالة على عدم إزالة الماء من النسيج.

الطريقة

أ. ضع قطعة النسيج المراد قطعها على الحامل الخاص بجهاز التقطيع الجليدي وأحطها بنقطة من الماء.

ب. أطلق غاز ثاني أكسيد الكربون السائل من الأنبوبة الخاصة به والمتصلة بحامل ليتجمد الماء الموجود داخل النسيج وحوله.

ج. حرك سكين جهاز التقطيع (الميكروتوم) حركات منتظمة بعد ضبط مقياس هذا الجهاز عند سمك المقاطع المطلوب.

د. اجمع المقاطع من فوق حافة السكين بوساطة فرشاة ناعمة وأنقلها إلى شريحة زجاجية مغطاة بمادة لاصقة كبياض البيض.

ه. اصبغ بالصبغة المناسبة حسب الغرض المطلوب.

2. الجيلاتين Gelatin

تستخدم هذه الطريقة في الحالات التي يراد فيها تجنب تعريض الأنسجة لعمليات إزالة الماء وللمحاليل المذيبة للدهون، وكذلك في الحالات التي يرغب فيها تجنب تعريض الأنسجة لدرجات حرارة عالية حرصاً على ما فيها من إنزيمات أو مركبات أخرى تتأثر بالحرارة ويراد إظهارها.

أ. المحاليل اللازمة

1. مثبت فورمالين كالسيوم Formalin Calcium .
2. وسط الطمر ويتكون من:
   - أ. مسحوق جيلاتين Gelatin ..... 15 غم
   - ب. جليسرين Glycerine ..... 15 مل
   - ج. ماء مقطر Distilled Water .....70 مل
   - د. ثايمول Thymol..... ..... بلورة صغيرة
3. محلول 35-40٪ فورمالدهايد Formaldehyde..... 20 مل

ب. الطريقة

1. ثبت قطعا صغيرة من النسيج لمدة 10-15 ساعة في مثبت الفورمالين كالسيوم عند درجة 4° س.

2. اغسل في ماء جار لمدة 30 دقيقة.
3. ضع النسيج في وسط الطمر داخل الفرن عند درجة 37° س لمدة ساعة.
4. اقطع كتلة من الجيلاتين حول النسيج وبرّدها بسرعة.
5. جمّد كتلة الجيلاتين المحتوية على النسيج بوضعها في محلو 35-40 ٪ فورمالدهايد.
6. اقطع باستعمال جهاز القطع الجليدي مباشرة، ويمكن تخزين المقاطع عند درجة 4°س.

3. شمع البرافين Paraffin Wax

شمع البرافين التجاري عبارة عن خليط من **الهيدروكربونات الأليفاتية** aliphatic hydrocarbons ذات المعادلة العامة $C_nH_{2n}+2$ حيث تكون n عادة بين 21 و 34 . وهذه التباينات وكذلك وجود مقادير متفاوتة من الشوائب هي المسؤولة عن اختلاف العينات التجارية بعضها عن بعض. فحتى البرافين الذي يباع للاستعمال في الدراسات النسيجية هو خليط تقع درجة انصهاره في مدى يبلغ 54 ± 2°س. وفي معظم الحالات تدعو الضرورة إلى ترشيح شمع البرافين التجاري المنصهر قبل استخدامه ويمكن إجراء ذلك في فرن عند درجة حرارة مناسبة وباستخدام ورق ترشيح عادي.

ويختلط شمع البرافين بالمواد التالية: الإيثير والأنيلين والجازولين والديوكسان والبيوتانول والكلوروفورم وزيت خشب الأرز.

يتضح مما سبق ذكره أن الطريقة العامة للطمر تعتمد على صفات الشمع المذكورة أعلاه. فنفاذ وسط الطمر بشكل كامل إلى داخل الأنسجة يعتمد على إزالة الماء تماما ثم التشريب بوساطة سائل يختلط بشمع البرافين اختلاطا تاما، يلي ذلك التشريب بشمع البرافين المنصهر، ثم الطمر وتشكيل كتلة الشمع حول النسيج.

الطريقة:

1. بعد خطوات إزالة الماء بوساطة سلسلة الكحول الإيثيلي (على سبيل المثال) متزايد التركيز، يوضع النسيج في سائل الترويق الذي هو أحد مذيبات شمع البرافين كالزايلين أو الكلوروفورم أو زيت خشب الأرز.

2. يشرّب النسيج بشمع البرافين السائل في فرن مناسب عند حرارة تتراوح بين 50 و 55 °س. وتعتمد مدة التشريب وعدد تغييرات الحمام الشمعي على حجم العينة وقوام النسيج نفسه. أما اختيار شمع البرافين الذي تكون له درجة انصهار معينة فيعتمد على معدل درجة الحرارة في مكان العمل، وعلى طبيعة النسيج موضع الدراسة، وكذلك على سمك المقاطع المطلوبة.
3. بعد إتمام عملية التشريب يسمح للشمع بالتجميد ليكوّن كتلة حول النسيج يمكن تحضير مقاطع منها. وتمثل هذه الخطوة عملية الطمر التي يمكن سرد خطواتها فيما يلي:

أ. تُطلى سطوح قوالب الطمر الزجاجية أو المعدنية طلياً خفيفاً بالجليسرين لمنع الشمع من الالتصاق بها عند تجمده.

ب. يملأ القالب إلى ما قبل حافته العليا بشمع البرافين المنصهر النقي المرشح (الذي لم يسبق استخدامه في التشريب) والذي يكون قد سبق تسخينه قليلا على لهب بنسين Bunsen hurner، ويعمل على التخلص من أية فقاقيع هوائية بوساطة لهب صغير أو مبسط ساخن.

4. تُحمل العينة برفق وذلك باستخدام ملقط دافىء (ولكنه ليس ساخنا جدا) ثم تنقل العينة إلى الشمع الذي صب في القالب ويضبط اتجاهها في الوضع المطلوب.
5. توضع ورقة وسم قرب العينة بحيث تلتصق بالسطح الداخل لجانب القالب.
6. بعد أن يتجمد سطح الشمع، تسرّع عملية التجمد بغمر القالب في ماء بارد أو وضعه في الثلاجة وذلك لمنع تكوين بلورات كبيرة في قالب الشمع. وتترك كتلة الشمع لمدة 15 دقيقة عل الأقل في الماء البارد. أما إذا كان حجمها كبيرا فقد يحتاج الأمر إلى تركها ساعة كاملة لإتمام التجمد.
7. عندما تتجمد الكتلة تماما يجب إخراجها من القالب، وقد يحدث هذا تلقائيا إذا كان الجليسرين قد استخدم في تشحيم جوانب القالب. وإذا لم يحدث تلقائيا فإن طرقة خفيفة عل قاعدة القالب تكفي لفصل كتلة الشمع عنه.
8. إذا تعذر إجراء عملية القطع عقب الطمر مباشرة فيمكن تخزين قالب الشمع، وذلك في مكان بارد لحين توفر الظروف المناسبة للقيام بعملية التقطيع.

الفصل الرابع عشر

محاليـــل الصبـــغ والتمييـــز

تستـعـمل في مختبرات التحضير المجهري والأمراض النـسيجية عـدة أنـواع مـن محاليـل الـصـبـغ، يـسـتخـدم بعـضها لـصبـغ النـواة ومنهـا هيماتوكـسلين ويسـتـعـمل البعـض الآخـر لـصبـغ الـسيتوبلازم ومـن أكثرهـا شـيوعاً صبغـة إيوسين. ونستعرض فيما يلي مكونـات وكيفيـة تحـضير أبـرز الـصبغات النوويـة والسـيتوبلازميـة، إضافة إلى أبـرز محاليل التمييز التـي تزيل الصبـغ الزائد.

1. الصبغات النووية Nuclear Stains

1.1 هيماتوكسلين Hematoxylin

تعـتبر صـبغة هيماتوكسلين أكثـر الأصـباغ النوويـة اسـتعمالا في مختـبرات الأمراض النسيجيـة والبيولوجيا العامة. توجـد عـدة صـيغ مـن هـذه الـصبغـة، تشترك جميعها بوجـود واحـد أو أكثـر مـن المكونـات التاليـة إضـافة إلى صبغـة هيماتوكسلين نفسها.

أ. **شب Alum**، وهو مثبت للصـبغـة، ومن أكثر الشبّـات استعمالا شـب البوتاسيوم أو شـب الألمنيوم.

ب. **حمض Acid**، وهذا يساعد في تحسين عملية الصبغ.

ج. **جليسرول Glycerol**، ويسـاعـد في إبطاء عمليـة الأكسـدة ويطيل عمر الصبغة.

د. **عامـل أكـسدة Oxidizing Agent**، ويـساعد في تحـويل هيماتوكـسلين الى هيماتين.

وأطلق عل هذه الصيغ أسماء الرواد الأوائل الذين استعملوها.

1.1.1 هيماتوكسلين إرلخ Ehrlich's Hematoxylin

أ. المكونات

هيماتوكسلين Hematoxylin..... 16غم

كحول إيثيلي Ethyl Alcohol ..... 480 مل

شب البوتاسيوم Potassium Alum ..... 48 غم

ماء مقطر Distilled Water ..... 240 مل

جليسرول Glycerol ..... 240 مل

حمض خليك ثلجي Glacial Acetic Acid ..... 24 مل

ب. خطوات التحضير

1. أذب الهيماتوكسلين في الكحول على نار هادئة (عند حرارة 50 - 55°س).
2. أذب الشب في الماء المقطر على لهب بنسن، ثم أضف الجليسرول، حيث يكون هذا المحلول دافئاً. بعد ذلك، اترك هذا الخليط ليبرد.
3. أضف محلول الهيماتوكسلين (المحضر في الخطوة 1) بأحجام قليلة الى محلول الشب (المحضر في الخطوة 2)، واخلطهما جيداً.
4. أضف حمض الخليك الثلجي، واخلط جيداً.
5. احكم اغلاق الوعاء المحتوي عل التحضير بسدادة قطنية واترك المحلول ليتأكسد بتعريضه للهواء. تستغرق عملية الأكسدة 6 أسابيع كحد أدنى، وبطبيعة الحال فإن ترك المحلول لمدة أطول يساعد في الانضاج الأفضل.
6. رشح المحلول قبل الاستعمال

ملاحظة:

1. عند الحاجة الملحة الى محلول الصبغة، يمكن أكسدة صبغة الهيماتوكسلين باضافة 0.1 غم من أيودات الصوديوم لكل 100 مل من المحلول، ثم تخلط المواد جيداً وتترك لمدة ساعة أو ساعتين قبل الاستعمال.
2. تستعمل هذه الصبغة تراجعياً.
3. يتراوح الوقت اللازم لصبغ الأنسجة بين 3- 9 دقائق.

2.1.1 هيماتوكسلين هارس Harris's Hematoxylin

أ. المكونات

هيماتوكسلين Hematoxylin ..... 5.0 غم

كحول إيثيلي Ethyl Alcohol ..... 50.0 مل

شب البوتاسيوم Potassium Alum ..... 100 غم

ماء مقطر Distilled Water ..... 950 مل

أكسيد الزئبق Mercuric Oxide ..... 2.5 غم

حمض خليك ثلجي Glacial Acetic Acid ..... 40.0 مل

ب. خطوات التحضير

1. أذب الهيماتوكسلين في الكحول عل نار هادئة (عند حرارة 50-55°س).
2. أذب الشب في الماء المقطر على لهب بنسن، وحرك الخليط باستمرار.
3. أضف محلول الهيماتوكسلين الكحولي (المحضر بخطوة 1) إلى محلول الشب المائي الدافىء (المحضر بخطوة 2)، واخلطهما جيداً وباستمرار فوق لهب بنسن حتى الغليان.
4. أبعد الخليط عن لهب بنسن، وأضف أكسيد الزئبق ثم بّرد الخليط في حمام ماء بارد.
5. أضف حمض الخليك الثلجي، ورشح الخليط قبل الاستعمال.

ملاحظة:

1. تستعمل هذه الصبغة تراجعياً.
2. يتراوح الوقت اللازم لصبغ الأنسجة بين 4 و 25 دقيقة.

3.1.1 هيماتوكسلين ماير Mayer's Hematoxylin

أ. المكونات

بلورات هيماتوكسلين Hematoxylin ..... 1.0 غم

ماء مقطر Distilled Water ..... 1000 مل

أيودات الصوديوم Sodium Iodate ..... 0.2 غم

شب البوتاسيوم Potassium Alum..... 50.0 غم

حمض الستريك Citric Acid..... 1.0 مل

هيدرات الكلور Chloral Hydrate..... 50 مل

ب. خطوات التحضير

1. أذب الهيماتوكسلين وشب البوتاسيوم وأيودات الصوديوم في الماء المقطر، واترك الخليط حتى صباح اليوم التالي عند حرارة الغرفة.
2. أضف هيدرات الكلور وحمض السيتريك الى الخليط المحضر أعلاه.
3. اخلط المحتويات السابقة جيداً ودعها تغلي لمدة 5 دقائق.
4. برّد الخليط ثم رشّحه.

بذلك يكون جاهزاً للاستعمال، ولا يحتاج لإعادة ترشيح.

ملاحظة:

1. تستعمل هذه الصبغة تقدمياً.
2. تتراوح مدة صبغ الأنسجة بين 2 و 4 دقائق.

2.1 كارمين الخلي Aceto Carmine

إضافة إلى استعماله لصبغ النواة، فإن هذا المحلول يستعمل لصبغ الديدان المفلطحة.

أ. المكونات

حمض الخليك Acetic Acid (45٪)..... 100 مل

كارمين Carmine..... 10 غم

ب. طريقة التحضير

1. أضف محلول الصبغة الى حمض الخليك واغل الخليط لمدة 4 دقائق، ثم برده ورشحه.
2. جفف الناتج (الراشح) ويسمى كارمين الحامضي acidified carmine على ورق ترشيح.

3. خذ الراشح والمواد التالية، ثم اخلطها جيداً وسخّنها حتى تذوب:

كارمين الحامضي Acidified Carmine 1.0غم

شب البوتاسيوم Potassium Alum ..... 10 غم

ماء مقطر Distilled Water ..... 200 مل

4. رشح الخليط، وأضف بلورات قليلة من **ثايمول** Thymol لمنع نمو العفن.

3.1 صفرانين Safranin

يستعمل هذا المحلول لصبغ نوى الخلايا النباتية بلون أحمر، ويستخدم مع صبغة مقابلة تسمى **أخضر سريع** Fast Green. ويمكن استعمال هذا المحلول لإظهار الألياف المرنة، وألياف **لجنين** lignin والأوعية الخشبية، حيث تظهر كلها بلون أحمر.

أ. المكونات

صفرانين Safranin ..... 1.0 غم

كحول إيثيلي Ethyl Alcohol (70٪)..... 99 مل

ب. طريقة التحضير

اخلط جيدا ورشح الخليط قبل الاستعمال.

2. الصبغات السيتوبلازميه Cytoplasmic Stains

تشكل الصبغات السيتوبلازمية **صبغات مقابلة** counterstains للصبغات النووية بحيث تبرز مكونات الأنسجة بدرجة جيدة. من هذه الأصباغ إيوسين، وأرانج ج، وأخضر سريع.

1.2 إيوسين Eosin

أ. إيوسين كحولي، ويتكون من:

إيوسين واي Eosin Y..... 1.0 غم

كحول إيثيلي Ethyl Alcohol (75٪)..... 99 مل

حامض خليك ثلجي Glacial Acetic Acid ..... 0.2 مل

ب. إيوسين مائي، ويتكون من:

إيوسين واي Eosin Y ..... 1.0 غم

ماء مقطر Distilled Water..... 99 مل

حامض خليك ثلجي Glacial Acetic Acid..... 0.5 مل

ملاحظة:

1. يساعد حامض الخليك (10٪) في جعل الصبغ أكثر قوة.
2. لمنع نمو العفن، يضاف 0.25 مل من فورملين (10٪) لكل 100 مل من محلول الصبغة.
3. تزال الصبغة من المقاطع عند تمرير الشرائح بمحلول كحول تركيزه 70٪ أو 95٪. لذلك يفضل زيادة وقت صبغ الأنسجة بهذه الصبغة.
4. يزال الماء من المقاطع بتمرير الشرائح بكحول تركيزه 95٪و100٪ لمدة دقيقة واحدة.

2.2 أورانج ج Orange G

أ. المكونات

أورانج ج Orange G ..... 1.0 غم

حمض فوسفوتنجستيك Phosphotungstic Acid ..... 5 غم

كحول إيثيلي مطلق Ethyl Alcohol..... 100 مل

3.2 اخضر سريع Fast Green

أخضر سريع Fast Green..... 0.5 غم

زيت القرنفل Clove Oil..... 50 مل

كحول إيثيلي مطلق (100٪) Ethyl Alcohol ..... 50 مل

3. صبغات النماذج الكاملة Whole Mount Stains

1.3 صبغة كارمالم كيركباتريك Kirkpatrick's Carmalum

تستعمل هذه الصبغة في تحضير نماذج كاملة من ديدان **الترماتودا** Trematoda و السستودا Cestoda .

أ. المكونات

كارمين أو كوتشينيل Carmine (Cochineal) ..... 25 غم

حامض خليك ثلجي Glacial Acetic Acid 25غم

شب البوتاسيوم Potassium Alum .....25 غم

ماء مقطر Distilled Water ..... 1000 مل

ب. طريقة التحضير

1. اسحق الكارمين أو الكوتشينيل في هاون بشكل جيد، ثم أضف حمض الخليك الثلجي و 100 مل من الماء المقطر، واتركها لمدة 20 دقيقة ثم إغلها برفق.
2. أذب شب البوتاسيوم في 500 مل ماء، وأضف اليه الكارمن أو الكوتشينيل بعد تبريده.
3. إغل المزيج برفق لمدة ساعة، ثم بّرده، ورشحه، وبعد ذلك أضف غرام واحد من الثايمول لمنع نمو الفطريات.

يمكن أن يبقى المحلول صالحاً لمدة عام.

2.3 بوراكس كارمين Borax Carmine

هي صبغة جيدة لعينات صغيرة، حيوانية كانت أم نباتية، وكذلك لأجنة الطيور والزواحف، ولبعض الديدان، والأوليات.

أ. المكونات

بوراكس Borax ..... 4.0 غم

كارمين Carmine..... 3.0 غم

ماء مقطر Distilled Water..... 100 مل

ب. طريقة التحضير

1. سخن هذه المكونات لمدة 30 دقيقة، ثم أضف لها بعد أن تبرد 100 مل من الكحول الإيثيلي.
2. أترك الخليط لمدة يومين، ثم رشحه.

عند توفر مسحوق بوراكس كارمين فإنه يمكن تحضيره كمحلول كما يلي:

مسحوق بوراكس كارمين Borax Carmine..... 3 غم

كحول إيثيلي (٪30) Ethyl Alcohol ..... 100 مل

أترك المحلول لمدة يومين، ثم رشحه.

4. الصبغات الحيوية Vital Stains

اخضر جانوس Janus Green

يستعمل لصبغ الميتوكوندريا، وهو يتكون من:

أخضر جانوس (مسحوق) Janus Green..... 0.1 غم

محلول ملحي للثدييات Saline Sol. (Mammalian) ..... 1000 مل

5. محاليل التمييز Differentiating Solutions

تستعمل هذه المحاليل عند إجراء الصبغ التراجعي، وذلك لإزالة الصبغة الزائدة في الأنسجة الحيوانية أو النباتية. ومن أبرز أنواع هذه المحاليل الكحول الحامضي وخليط زيت القرنفل والكحول والزايلين.

1.5 الكحول الحامضي Acid Alcohol

كحول إيثيل ٪70 Ethyl Alcohol ..... 100 مل

حمض هيدروكلوريك مركز HCl (Conc.)..... 0.5 مل

يستعمل لإزالة الصبغة الزائدة في الأنسجة الحيوانية.

2.5 زيت القرنفل- كحول- زايلين Clove Oil - Alcohol - Xylene

زيت القرنفل Clove Oil..... 50 مل

كحول إيثيلى مطلق Ethyl Alcohol ..... 25 مل

زايلين Xylene ..... 25 مل

يستعمل لإزالة الصبغة الزائدة في الأنسجة النباتية.

الفصل الخامس عشر

وسائـط لصـق وتغطيـة المقاطـع

بعـد الحـصول علـى مقـاطع مـن الأنـسجة المثبتـة والمطمـورة، يحتـاج طالـب التحـضير المجهري إلى لصق تلك المقاطع على شرائح زجاجية بوسط مناسـب. وبعـد الانتهاء من صبغ المقـاطع، وإزالـة المـاء منهـا وترويقهـا، لا بـد مـن تغطيتهـا بوسـط عضـوي ثم بأغطية زجاجية حتى تبقى تلك المقاطع سـليمة ودائمـة. في هـذا الفـصل سنعالج وسائط اللصق والتغطية.

1. وسائط لصق المقاطع Adhesives

بعد الحـصـول على مقاطع مناسبة من الأنسجة المـراد دراسـتها، فإنهـا تحـمل على شرائح زجـاجية نظيفة تكون ممسوحة بطبقة رقيقة جداً من وسط لاصق يسـاعد على تثبيت المقاطع على الشرائح وعدم سقوطها في مراحل تالية. ولتحقيق هذا الهدف تتوفر عدة وسائط منها:

1.1 لاصق بياض البيض

أ. المكونات

يحضر من بياض بيض جاف كما يلي:

مسحوق ألبومين Albumen ..... 5.0 غم

كلوريد الصوديوم Sodium Chloride ..... 0.5 غم

ماء مقطر Distilled Water..... 100 مل

ب. طريقة التحضير

1. اخلط المواد أعلاه ثم رشح الخليط وأضف 50 مل من الجليسرين إلى 50 مـل من الراشح.

2. أضف بضع بلورات من الثايمول لمنع نمو الفطريات.

2.1 بياض البيض- طريقة ماير Mayer's Albumen

أ. المكونات

بياض البيض Egg Albumen..... 50 مل

جليسرول Glycerol..... 50 مل

ثايمول Thymol.....1.0 غم

ب. طريقة التحضير

1. رج بياض البيض مع نقاط قليلة من حمض الخليك المخفف.
2. أضف المكونات الأخرى، ورجها جيداً.

3.1 لاصق لاند Land's Adhesive

أ. المكونات

محلول أ

صمغ عربي Arabic Gum..... 0.5 غم

ماء مقطر Distilled Water.....50 مل

محلول ب

ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium Dichromate..... 0.5 غم

ماء مقطر Distilled Water..... 100 مل

طريقة التحضير

1. إمسح الشريحة بقطرات من محلول "أ" ثم أضف عدد مماثل من القطرات من محلول "ب".
2. انقل المقاطع إلى الشرائح ثم دعها تتمدد على صفيحة دافئة.

يمكن إسراع تجفيف المقاطع بإزالة السائل الزائد بورقة ترشيح.

2. وسائط تغطية الشرائح Mounting Media

بعد صبغ الشرائح يتوجب تغطيتها بوسط مناسب، ثم بغطاء زجاجي حتى يمكن فحص الشريحة تحت المجهر، وكذلك لحفظ التحضير أطول فترة ممكنة وتكون وسائط التغطية إما مائية، أو عضوية. وتتوفر هذه الوسائط إما جاهزة، أو يمكن تحضيرها في المختبر إذا ما استدعت الظروف ذلك. وسنورد فيما يلي أبرز هذه الوسائط.

1.2 الوسائط المائية Aqueous Media

1.1.2 وسط هلام جليسرين Glycerine Jelly

أ. المكونات

جيلاتين Gelatin ..... 10.0 غم

ماء مقطر Distilled Water ..... 60 مل

جليسرين Glycerine ..... 70 مل

بلورات فينول Phenol Crystals ..... 0.25 غم

ب. طريقة التحضير

1. أذب الجيلاتين في الماء عند درجة حرارة 37°س في فرن أو في حمام مائي.
2. أضف المكونات الأخرى واخلطها جيداً. ويمكن تخزين هذا الوسط لحين الاستعمال، حيث يلزم حينئذ تسخين الوسط على صفيحة دافئة.

ملاحظة:

1. بعض صفات هذا الوسط، مثل الحاجة الى تسخينه قبل الاستعمال، وتسببه في تخفيف قوة الصبغ مع الوقت، وكذلك عدم تجمده بشكل جيد بعد التغطية، جعلته قليل الاستعمال.
2. يتوفر هذا الوسط جاهزاً من بعض الشركات.

2.1.2 وسط أباثي Apathy's Medium

أ. المكونات

بلورات صمغ عربي نقي Arabic Gum Crystals..... 50 غم

قَطْر سكر قصب نقي Cane Sugar Syrup.....50 غم

ماء مقطر Distilled Water..... 60 مل

ثايمول Thymol..... 0.05 مل

ب. طريقة التحضير

1. أذب هذه المكونات بوعاء مناسب وذلك بتسخينها عند درجة حرارة خفيفة.
2. احفظ الوسط بوعاء محكم الغطاء.

ميزات هذا الوسط، مثل تصلبه بعد التغطية، وكذلك ارتفاع معامل انكساره مقارنة بوسائط مائية أخرى، جعلته شائع الاستعمال.

3.1.2 وسط برليس Berlese's Medium

أ. المكونات

قَطْر الجلوكوز Glucose Syrup ..... 10 مل

(يحضر بإضافة 5 غم جلوكوز إلى 5 مل ماء مقطر)

صمغ عربي Arabic Gum ..... 15 مل

ماء مقطر Distilled Water ..... 20 مل

هيدرات الكلور Chlorol Hydrate ..... 75 مل

ب. طريقة التحضير

1. أذب الصمغ العربي في الماء المقطر.
2. أضف قطر الجلوكوز ومن ثم هيدرات الكلور لحد التشبع.
3. سخن الخليط ببطء، وحركه جيداً.
4. رشح الخليط من خلال كمية قليلة من **الصوف الزجاجي** glass wool.

ملاحظة :

1. يمكن تحويل التحضيرات التي تغطى بأوساط مائية إلى تحضيرات دائمة وذلك بقفل الغطاء الزجاجي بوسط مثل .D.P.X أو بطلاء الأظافر.
2. هذا الوسط جيد لتغطية الحشرات الصغيرة والطفيليات.

2.2 الوسائط العضوية Organic Media

تتوفر أنواع عديدة من الوسائط العضوية بشكل جاهز، ونظراً لأن بلسم كندا يعتبر وسطاً شائع الاستعمال، فإنه ربما يكون مفيداً ذكر طريقة تحضيره في حال عدم توفره جاهزاً.

1.2.2 بلسم كندا Canada Balsam

1. أذب الصمغ الطبيعي (بلسم كندا) بالزايلين، بنسبة 60٪ ، وذلك بتسخين الخليط في فرن شمع (عند حرارة 40 – 45 °س).
2. رشح الخليط بعد إذابة الصمغ، واحفظ الراشح بقنينة داكنة ومحكمة الغطاء.

ملاحظة:

لجعل وسط البلسم متعادلاً يفضل إضافة كمية قليلة من كربونات الكالسيوم. كما يجب عدم تعريض وسط بلسم كندا للضوء لأن ذلك يضعف الصبغة مع الوقت.

D.P.X. 2.2.2

يتوفر هذا الوسط جاهزاً، وهو منافس لوسط بلسم كندا في كثير من مختبرات التحضير المجهري، وذلك بسبب شفافيته، وسرعة جفافه، واعتدال سعره، وعدم تاثيره على الصبغ.

الفصل السادس عشر

تحضير مسحة دم إنسان

يعتبر تحضير مسحة من دم الإنسان أمرا روتينيا في مختبر الأمراض النسيجية. والمبدأ الأساسي في هذا التحضير هو مسح عينة من دم الإنسان على شريحة نظيفة، ثم تجفيفها في الهواء، وبعد ذلك صبغها. ومن فوائد هذه الطريقة المجهرية سرعة الانجاز في إعطاء معلومات أساسية عن المريض. وبإجراء تعديلات بسيطة على الطريقة المبينة أدناه يمكن عمل تحضيرات من أي سائل في الجسم، أو من أسطح أعضاء رطبة مثل المهبل أو سقف الحلق.

1. مكونات الدم الخلوية Cellular Components of Blood

يتكون الدم من سائل البلازما الذي يحمل خلايا وقطع سيتوبلازمية. وتكون المكونات الخلوية إما **خلايا حمراء** Erythrocytes أو **خلايا بيضاء** Leukocytes. والخلايا الحمراء لا تحتوي نوى أو أية عضيات أخرى، وهي بذلك مؤهلة لحمل كمية كبيرة من الهيموجلوبين.

الخلايا البيضاء منوّاة، وتنقسم إلى قسمين أساسيين، هما: الحبيبي granular و **اللاحبيبي** agranular. وتشمل الخلايا الحبيبية الأنواع الثلاثة التالية:

أ. **حامضية الأصطباغ** Eosinophils وسميت كذلك بسبب ميلها للأصباغ الحامضية، ولها نوى ثنائية الفص وحبيبات برتقالية.

ب. **قاعدية الاصطباغ** Basophils وتميل للأصباغ القاعدية، ولها نواة عل هيئة S وحبيبات زرقاء داكنة.

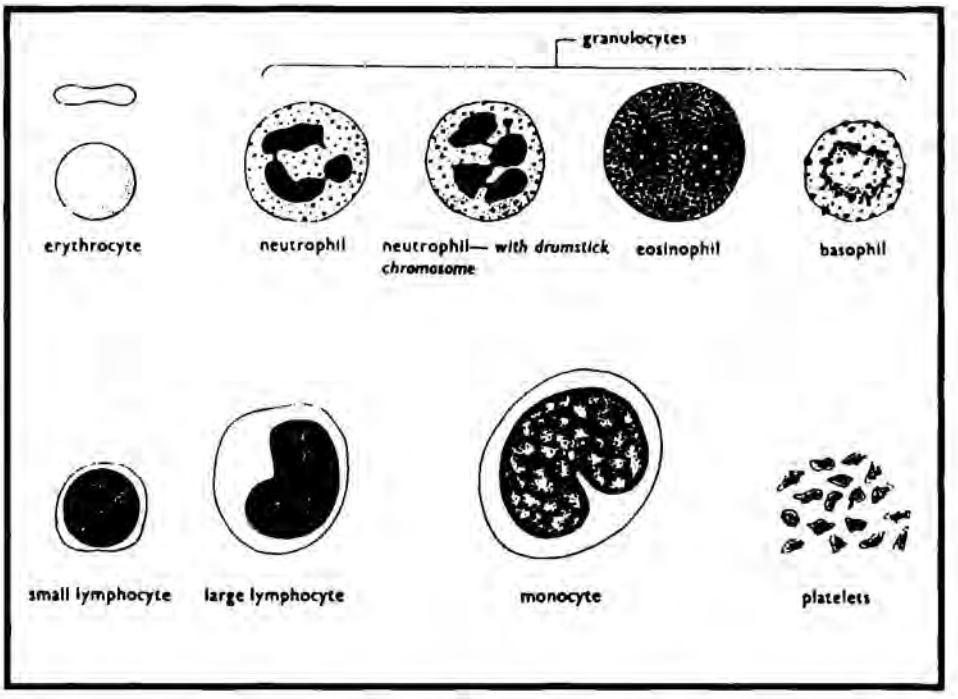
ج. **المتعادلة** Neutrophils ولها نوى بعدة فصوص وحبيبات أرجوانية شاحبة (شكل 1).

أما الخلايا البيضاء اللاحبيبية فتشمل:

أ. **الخلايا اللمفاوية** Lymphocytes ولها نوى كروية زرقاء وسيتوبلازم قليل.

ب. **الخلايا الأحادية** Monocytes . ولها نوى على شكل حدوة الحصان وسيتوبلازم قليل (شكل 1).

وبالنسبة للقطع السيتوبلازمية، فهي الصفائح الدموية blood platelets (شكل 1).



شكل 1: مكونات مسحة دم إنسان

وعند الحديث عن مسحة الدم تجدر الإشارة إلى الصبغات المتعادلة التي تستعمل لصبغ هذه المسحة، ثم سنتطرق إلى المحاليل والأدوات اللازمة لنصل بعد ذلك إلى طريقة تحضير المسحة ثم صبغها.

2. صبغات الدم المتعادلة Neutral Blood Stains

التعامل مع مسحات الدم يعني التعامل مع صبغات متعادلة، وقد أشرنا إلى هذه الصبغات في الفصل الخامس. وللتذكير نقول أن هذه الصبغات تتكون من صبغة حامضية (مثل **إيوسين** eosin) وأخرى قاعدية (مثل **أزرق ميثيلين** methylene blue)، لتتكون صبغة جديدة تعطي ألواناً عدة للأنسجة المصبوغة. وتعتبر **صبغة رومانوفسكي** Romanovsky's Stain مثالا بارزا على الصبغات المتعادلة.

نتيجة لخلط صبغة إيوسين مع أزرق ميثيلين يتكون راسب يحتوي أيونات سالبة وأخرى موجبة من الصبغتين، ويكون هذا الراسب قليل الذوبان في الماء إلا أنه سريع الذوبان في الكحول. ولإطلاق الأيونات الملونة من المحلول الكحولي للراسب، يتوجب خلط هذا المحلول مع الماء فوراً. وكما ذكرنا سابقاً تسمى الصبغة الناتجة باسم العالم الروسي Romanovsky الذي كان أول من استعملها عام 1891. تجدر الإشارة الى أن صبغات رومانوفسكي تتوفر بشكل جاهز وتعتبر أكثر وثوقية من تلك التي تصنع في المختبر من مكوناتها الأساسية. وتعتبر درجة حموضة pH هذه الصبغات وكذلك الماء الذي يستعمل لشطف الشرائح أمرين هامين في تقرير جودة التحضير.

تتفاعل خلايا الدم البيضاء مع صبغة رومانوفسكي ويظهر ذلك باختلاف ألوان نوى وحبيبات خلايا الدم البيضاء، وسنشير الى ذلك في النتائج. أما خلايا الدم الحمراء، فتأخذ لون إيوسين (وردي)، وتبين درجة الصبغ كمية الهيموجلوبين في تلك الخلايا. كذلك، تأخذ خلايا الدم البيضاء المعتلة ألواناً خاصة بها، وتظهر نوى الطفيليات بلون أحمر فاقع.

يشار إلى صبغات رومانوفسكي بأسماء مختلفة، مثل **صبغة رايت** Wright's stain **وصبغة ليشمان** Leishman's stain **وصبغة جيمسا** Giemsa's stain. وتختلف هذه الصبغات باختلاف كميات مكوناتها الأساسية. أخيراً، تجدر الإشارة إلى أن صبغات رومانوفسكي تعمل كمثبتات (بسبب احتوائها على الكحول) وكمواد ملونة.

3. المحاليل والأدوات اللازمة

1.3 المحاليل

1.1.3 محلول الصبغة: صبغة رايت Wright's stain

أ. المكونات

صبغة رايت (مسحوق) Wright's Stain (powder)..... 0.1 غم

كحول ميثيل Methyl Alcohol ..... 60 مل

ب. طريقة التحضير

1. اسحق الصبغة بهاون حتى تذوب كلياً بالكحول.
2. رج المحلول جيداً واتركه لمدة يومين.
3. ضع الصبغة في قنينة محكمة الغطاء. عند الاستعمال رشح المحلول.

ملاحظة

يتوفر محلول هذه الصبغة جاهزاً.

2.1.3 المحلول المنظم

1. فوسفات الصوديوم ثنائي الهيدروجين NaH_2PO_4

2.76 غم / 100 مل ماء مقطر ..... 68 مل

2. فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين Na_2HPO_4

5 36.غم / 100 مل ماء مقطر .....23 مل

2.3 الأدوات

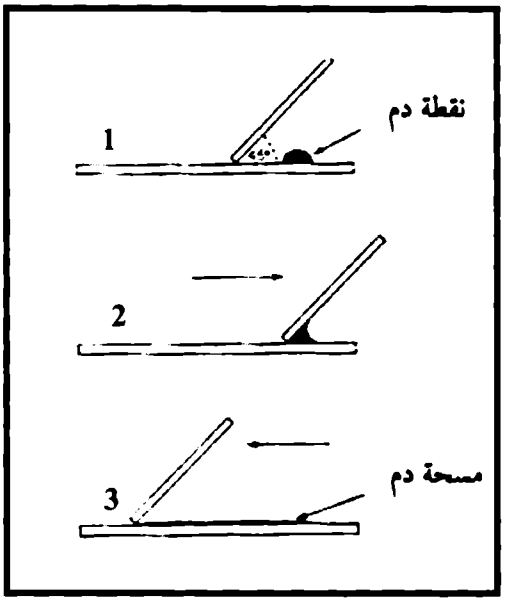
1. شرائح، أغطية زجاجية.
2. مباضع معقمة
3. حاملة شرائح.
4. قطن.
5. مجهر ضوئي مركب.

4. تحضير مسحة الدم

1. نظف عدة شرائح بمسحوق تنظيف، وتأكد بأنها خالية من أية شوائب، ثم اشطفها بماء مقطر، وأخيراً بكحول إيثيلي تركيزه 95 ٪ أو أسيتون.
2. امسح طرف إصبعك بقطعة قطن مبللة بكحول تركيزه 70٪.
3. إنخس طرف الإصبع بمبضع معقم. تخلص من المبضع بكيس خاص، ولا تسمح لأحد باستعماله.
4. إمسح النقطة الأولى من الدم، وضع النقطة التي تليها على طرف شريحة نظيفة (شكل 2)، ثم عقم الجرح بكحول إيثيلي تركيزه 70٪ وضع عليه ضمادة طبية.
5. إمسك بشريحة ثانية بحيث تعمل حافتها القصيرة مع سطح الشريحة التي تحمل نقطة الدم زاوية 45°، وبحيث تكون تلك الحافة ملامسة، بسطحها الخلفي لنقطة الدم (شكل 2). عندئذ ستنتشر نقطة الدم على حافة الشريحة الثانية وفي الزاوية بينها وبين الشريحة الأولى.
6. ادفع بالشريحة العليا باتجاه السهم (الشكل 2) بحيث يسحب الدم على سطح الشريحة السفلى لتتكون مسحة الدم.
7. حرّك شريحة المسحة بالهواء لتجف.

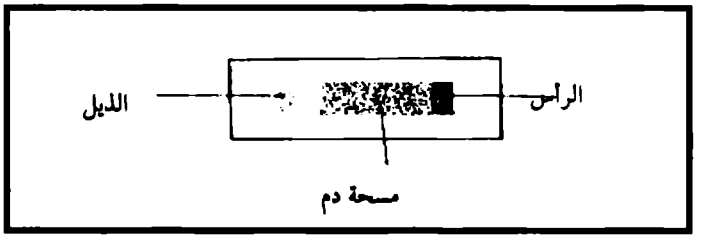
5. صبغ المسحة وتغطيتها

1. ضع الشريحة الحاملة لمسحة الدم على حامل خاص فوق مغسلة المختبر.
2. ضع حوالي 15 نقاط من محلول الصبغة على مسحة الدم، واتركها لمدة دقيقة واحدة حتى تثبت خلايا الدم بالكحول.



شكل 2: طريقة عمل مسحه الدم

3. أضف 15 نقاط من محلول المنظم لمحلول الصبغة واخلطهما جيداً. اترك الخليط على المسحة لمدة 3- 5 دقائق.
4. أشطف الشريحة بماء مقطر حتى تظهر المناطق الرقيقة من المسحة بلون أحمر- وردي.
5. تخلص من الماء الزائد بورقة ترشيح ودع المسحة تجف بتحريكها في الهواء.
6. أزل الماء من المسحة كلياً بتمريرها بكحول مطلق مرتين ولمدة دقيقة كل مرة.
7. روّق التحضير بتمريره بزايلين مرتين، ولمدة دقيقة كل مرة، ثم غط التحضير بغطاء زجاجي نظيف.
8. إفحص التحضير بعدسة زيتية.
9. ميّز مكونات المسحة، مستعيناً بالمعلومات المبينة في شكل 1، وركز دراستك في المنطقة المسماة ذيل المسحة حيث يكون سمك المسحة قليلاً (شكل 3).



شكل 3: توزيع مسحة الدم عل الشريحة

6. النتيجة

أ. تظهر الكريات الحمراء بلون أحمر باهت، وتظهر الخلايا الليمفاوية بنوى أرجوانية وسيتوبلازم أزرق باهت.

ب. تظهر الكريات **البيضاء الحامضية** eosinophils بنوى أرجوانية ثنائية الفصوص، وحبيبات سيتوبلازمية برتقالية إلى حمراء.

ج. تظهر الكريات **البيضاء القاعدية** basophils بنوى أرجوانية غير واضحة، على هيئة حرف S، وحبيبات سيتوبلازمية زرقاء داكنة.

د. تظهر الكريات **البيضاء المتعادلة** neutrophils بنوى أرجوانية داكنة متعددة الفصوص، وحبيبات سيتوبلازمية بلون أرجواني شاحب.

ه. تظهر الصفائح الدموية زرقاء إلى أرجوانية.

إرجع إلى الشكل 1 الذي يبين مكونات مسحة الدم.

الفصل السابع عشر

تحضير هرسة من الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة

تحتوي خلايا الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة Drosophila melanogaster كروموسومات عملاقة تسمح دراستها بمعرفة تركيب الكروموسومات بشكل جيد. وفي هذه الغدد لا تنقسم الخلايا، وإنما تزداد حجماً وبذلك تكبر نواها وتتضخم كروموسوماتها.

توجد الكروموسومات العملاقة في الغدد اللعابية للحشرات ومنها ثنائية الأجنحة ممثلة بذبابة الفاكهة. تصل هذه الكروموسومات أقصى حجمها إلى ما قبل مرحلة **الخادرة** Pupa، وهي مسؤولة عن عمليات النسخ اللازمة لتصنيع بروتينات تساعد في تعلق الخادرات مع الوسط الذي تعيش عليه، إضافة إلى إنزيمات هاضمة خلال نمو اليرقة.

في هذا التحضير، سندرس مورفولوجية الكروموسومات العملاقة في ذبابة الفاكهة وذلك بتجهيز شريحة تحمل هرسة من الغدد اللعابية ليرقات هذه الذبابة.

1. المحاليل والأدوات اللازمة

1.1 المحاليل

1. محلول كلوريد الصوديوم 0.7٪.
2. محلول صبغة الكارمين الخليّ: انظر ص 175.

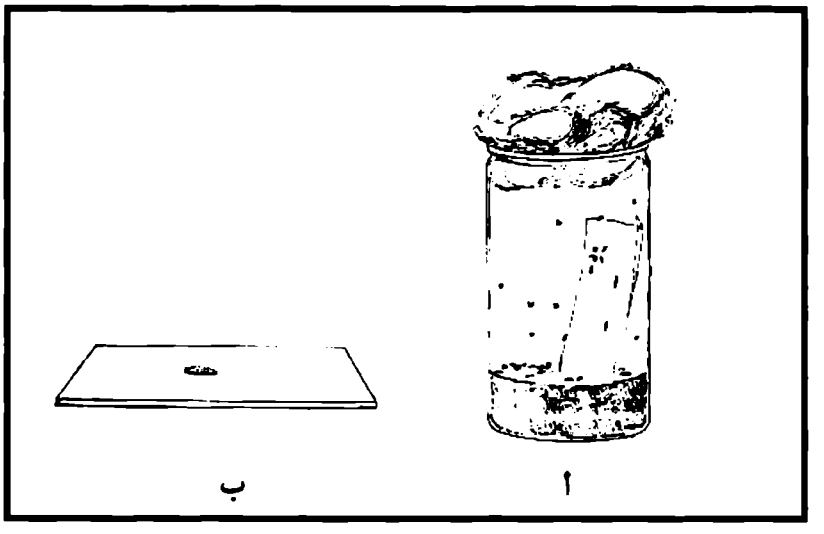
2.1 الأدوات

1. مجهر تشريحي.
2. مستنبت ذبابة الفاكهة يحتوي يرقات.
3. ملقط.

4. إبرة تشريح.
5. شرائح مجهرية.
6. أغطية زجاجية.
7. ورق ترشيح.

2. تحضير الهرسة

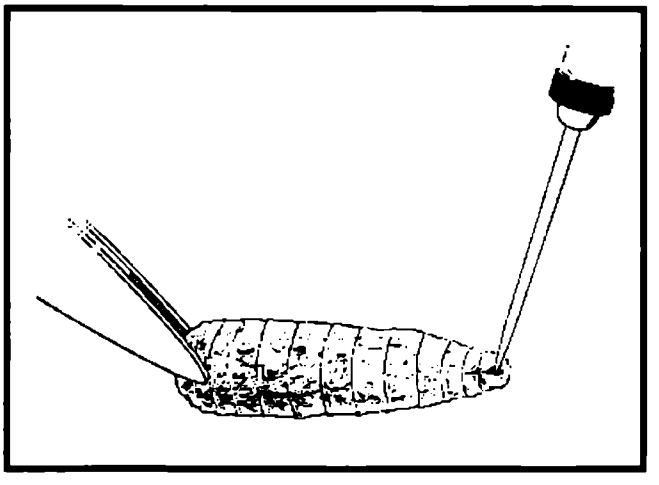
1. افحص مستنبت لذبابة الفاكهة ولاحظ اليرقات Larvae التي تشبه الديدان (شكل 1أ). اختر يرقة كبيرة تزحف ببطء إلى أعلى جدار وعاء الاستنبات.
2. انقل اليرقة بملقط غير حاد، وضعها على شريحة نظيفة عليها قطرات من محلول كلوريد الصوديوم (0.7٪) (شكل 1ب).



شكل 1: مستنبت ذبابة الفاكهة

أ. قنينة تحتوي يرقات مختلفة؛ ب. يرقة على سطح شريحة.

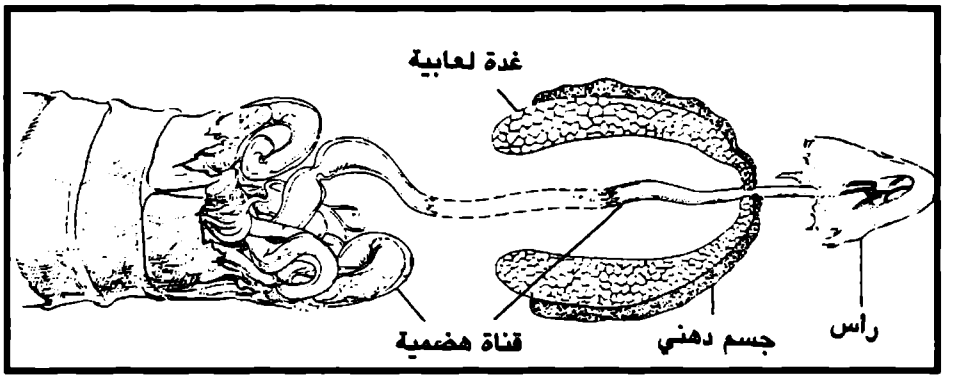
3. افحص اليرقة تحت المجهر التشريحي، وتبين بأن لها مؤخرة عريضة ورأس مستدب يحتوي أجزاء سوداء من الفم (شكل 2) للحصول على الغدد اللعابية، يجب إزالة الرأس عن بقية جسم اليرقة، وذلك بمسك الطرف الخلفي لليرقة بملقط عريض، وسحب منطقة الرأس بإبرة تشريح باتجاه اليمين (شكل2). في هذه الحالة، سوف تتلوى اليرقة، وقد تحتاج لعدة محاولات قبل الحصول على الغدد اللعابية.



شكل 2: سحب رأس اليرقة عن جسمها

4. لاحظ أن الغدد اللعابية تتصل بأجزاء الفم وبأجسام دهنية. تخلص من هذه الأجسام ومن أجزاء الفم واترك الغدد اللعابية فقط. تبين أن الغدد اللعابية تأخذ شكل عناقيد شفافة (شكل 3).
5. أزل المحلول الملحي الزائد عن الشريحة وذلك باستعمال قطعة صغيرة من ورق الترشيح. حاذر من لمس الغدد بورقة الترشيح حتى لا تلتصق بها.
6. أضف عشرة نقاط من محلول الصبغة (**كارمين الخلي** Acetocarmine) وأصبغ الغدد لمدة 5 دقائق.
7. ضع غطاءاً زجاجياً فوق التحضير، ثم ضع فوق الغطاء ثنيتين أو ثلاث من ورق الترشيح، ثم اضغط بإبهامك عليها.

8. افحص التحضير بالمجهر الضوئي المركب. إذا حضّرت هرسة الغدد اللعابية بطريقة جيدة فستبدو نوى الخلايا بعيدة عن بعضها. وإذا كان الصبغ جيداً، وباستعمال العدسة الزيتية، فستتمكن من رؤية حزم عرضية على طول الكروموسومات.



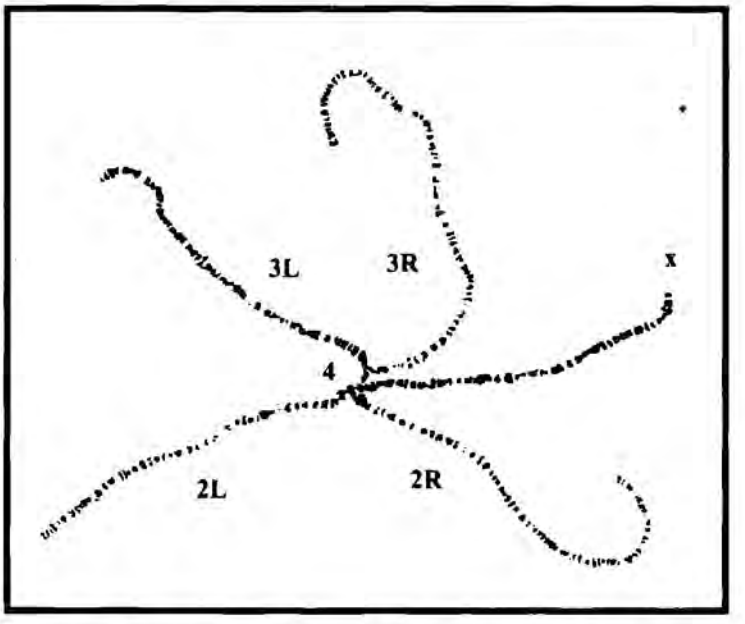
شكل 3: مظهر الغدد اللعابية بعد سحبها

أنظر الشكل 4 لمقارنة نوعية تحضيرك مع التحضير النموذجي المبين في هذا الشكل.

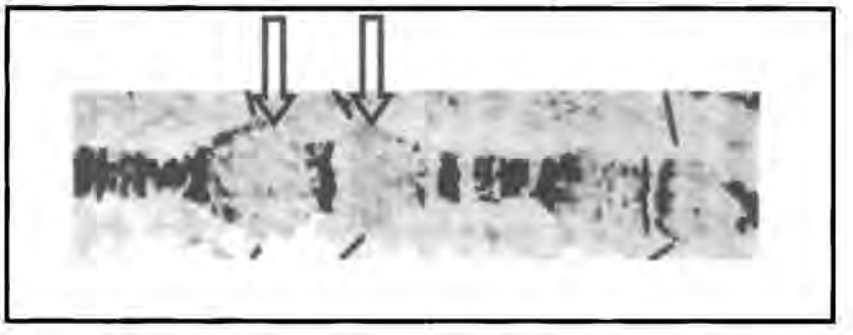
3. النتيجة

تظهر الكروموسومات العملاقة كخيوط ملتوية تظهر فيها حزم حمراء داكنة الاصطباغ تنفصل عن بعضها بحزم فاتحة تمثل جزيئات DNA (شكل4).

لاحظ **الانتفاخ الكروموسومي** Chromosome Puff (شكل5) الذي يمثل موضع نشاط جيني خاص، حيث يتم تصنيع نسخ من mRNA ترسل إلى سيتوبلازم الخلايا لتصنع مادة بروتينية محددة تلعب دوراً هاماً أثناء النمو.



شكل 4: الكروموسومات العملاقة في الغدد اللعابية لذبابة الفاكهة.
لاحظ ذراعين لكل من كروموسوم 2 و 3، واحد أيمن (2R و 3R)
وآخر أيسر (2L و 3 L)



شكل 5: جزء من كروموسوم غدة لعابية وتظهر
فيه منطقة انتفاخ كروموسومي (سهم)

الفصل الثامن عشر

تحضير هرسة من قمة جذر البصل

تمتلك القمم النامية في جذور وسيقان النبات، وكذلك براعم الأزهار والأوراق الناشئة نسبة مرتفعة من الخلايا التي تمر بـ **الانقسام المتساوي** Mitosis، وذلك كمؤشر على نشاطها وانخراطها القوي في نمو الأعضاء النباتية. ولدراسة الانقسام في الأنسجة المذكورة يمكن اللجوء إلى طريقة الشمع التقليدية التي ينتهي فيها المطاف بتحضير مقاطع مصبوغة. غير أن هذه الطريقة تستغرق وقتاً طويلاً (من يومين إلى ثلاثة أيام)، إضافة للحاجة إلى مواد وأدوات كثيرة. والطريقة البديلة، السهلة والقصيرة، تكون بتحضير **هرسات** Squashes من **الأنسجة المرستيمية** Meristematic Tissues الطرية.

إضافة إلى كونها سهلة وسريعة، فإن لتحضير الهرسة ميزتين على طريقة الشمع، هما:

1. ظهور الخلايا بشكل كامل، بما فيها النوى والكروموسومات، وهذا أمر لا يتحقق دائماً في المقاطع حيث أن المقطع قد لا يمر في النواة.
2. تسطيح الخلايا دون انفجارها، وهذا ما يسمح بانتشار الكروموسومات وسهولة ملاحظتها.

في هذا التحضير، سنستخدم القمم النامية لجذور البصل لدراسة المراحل المختلفة في الانقسام المتساوي. ويمكن إجراء نفس الخطوات وتحقيق نفس الأهداف باستخدام بذور نامية ظهرت فيها بدايات الجذور، أو استعمال قمم نامية من سيقان أو براعم زهرية.

1. المحاليل والمواد اللازمة

1.1 المحاليل

1. كحول إيثيلي Ethyl Alcohol (تركيزه 70٪).
2. حمض هيدروكلوريك HCl (يحضر بإضافة 10 مل من حمض HCl المركّز إلى 30 مل من كحول تركيزه 95٪).
3. كارمين خلّي Aceto Carmine (انظر ص 175).

2.1 المواد

1. بصل.
2. كأس زجاجية 50 مل.
3. أنابيب اختبار.
4. قطارة.
5. شرائح زجاجية.
6. أغطية شرائح.
7. حمام مائي.
8. مجهر ضوئي مركب.

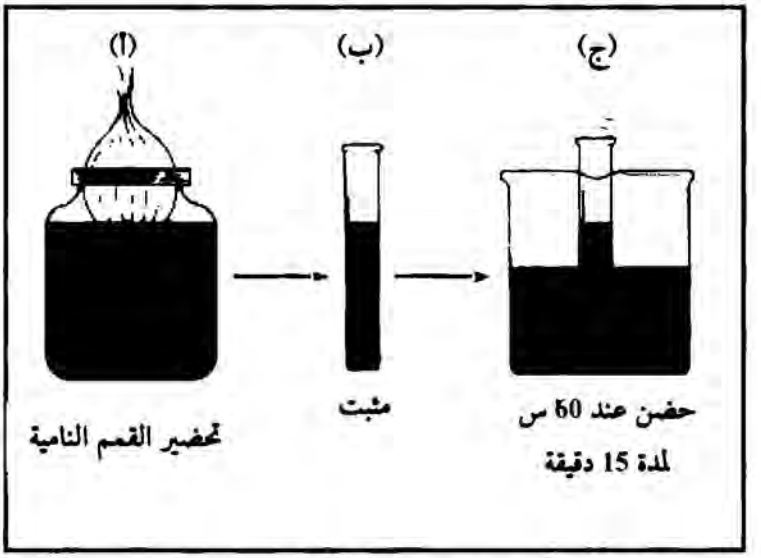
2. تحضير الهرسة وصبغها

1. خذ بصلة واقطع جذورها الجافة بشفرة حادة.
2. ضع البصلة على فوهة كأس زجاجية ممتلئة بالماء، يكون قطر فوهتها أصغر من قطر البصلة. راعي انغماس منطقة الجذور فقط في الماء (شكل 1أ).
3. بعد يومين أو ثلاثة لاحظ بدايات الجذور الجديدة التي تظهر بلون أبيض وتحمل في نهاياتها مناطق صفراء.

للحصول على عينة غنية بالانقسام الخلوي، اقطع بشفرة حادة قمم الجذور الصفراء، وبطول لا يزيد عن 2 ملم. قم بهذا العمل حوالي منتصف النهار، حيث يكون الانقسام الخلوي نشطاً جداً.

4. احصل على 4 قمم نامية، واقطع كلاً منها طولياً، وضعها في أنبوب اختبار (أو صحن صغير) يحتوي كحول إيثيلي (70٪) (شكل 1ب)، ثم انقل الأنبوب إلى حمام مائي عند حرارة 60°س ولمدة 15 دقيقة (شكل 1ج).

ما أهمية هذه الخطوة؟



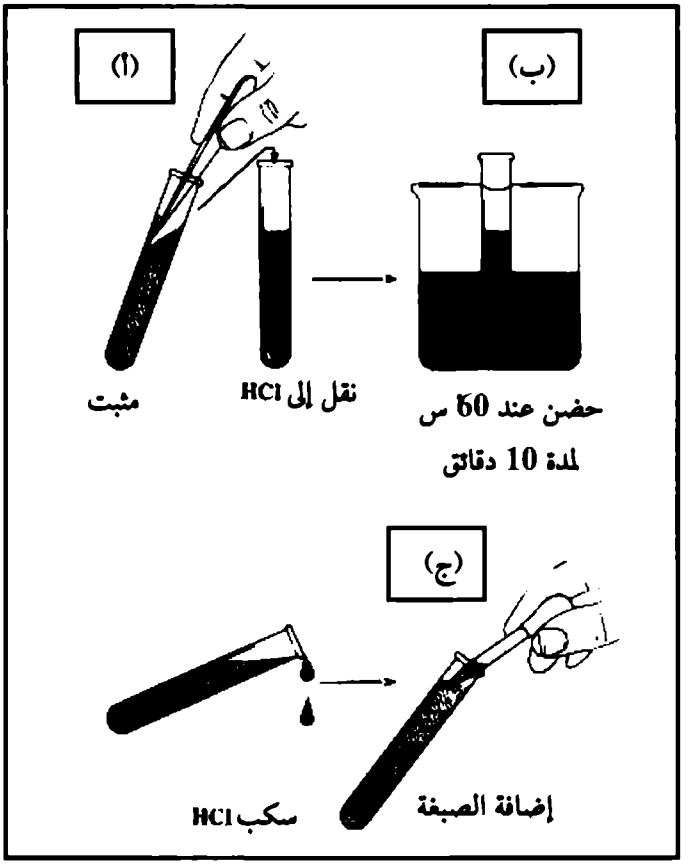
شكل 1: تحضير وتثبيت القمم النامية في جذور البصل

5. انقل قطع القمم النامية إلى أنبوب يحتوي حمض هيدروكلوريك (شكل 2أ) ثم انقل الأنبوب ومحتوياته إلى حمام مائي عند حرارة 60°س (شكل2ب) ولمدة 10 دقائق. ما أهمية هذه الخطوة؟

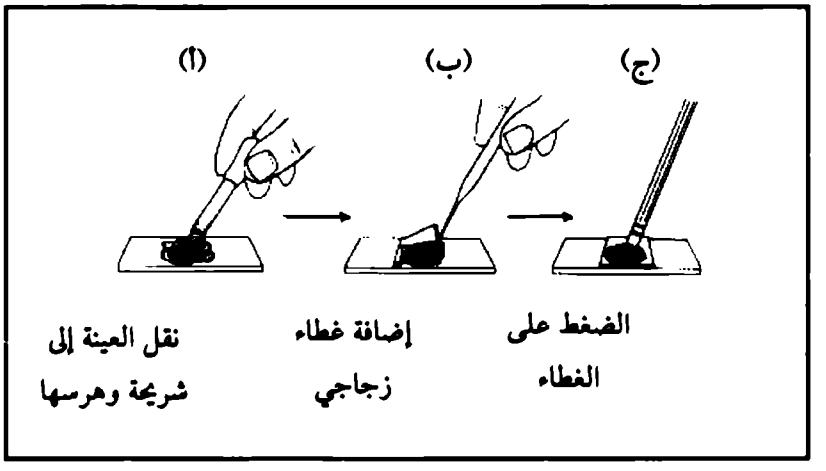
6. اسكب محلول حمض الهيدروكلوريك، وأضف للجذور محلول صبغة الكارمين الخلي. اترك الجذور في هذا المحلول لمدة 15-20 دقيقة (شكل 2 ج).

7. انقل قمة جذر إلى شريحة نظيفة. راعي أن تكون القمّة مغمورة بمحلول الصبغة لأن ذلك هام لإجراء عملية الهرس بدون فقاعات هواء تحت الغطاء الزجاجي (شكل3أ).

8. غط القمة بغطاء زجاجي نظيف، وأنزله برفق لتحاشي ظهور فقاعات هوائية (شكل3ب). ما أهمية ذلك؟



شكل 2: تفكيك خلايا قمم جذور البصل وصبغها



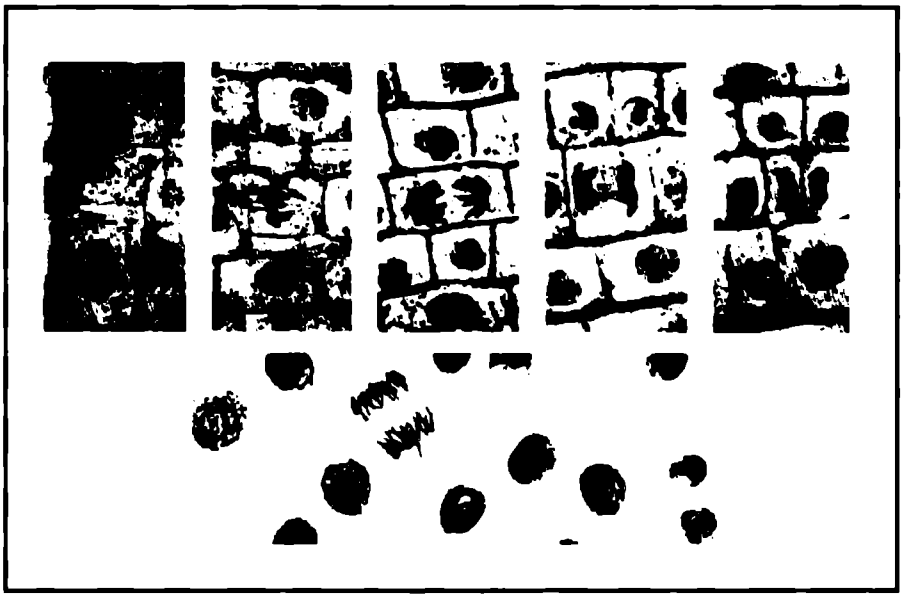
شكل 3: نقل قمم جذور البصل بعد صبغها إلى شرائح وتغطيتها

9. اضغط على الغطاء الزجاجي بمؤخرة قلم رصاص أو بالطرف الخشبي المسطح لإبرة التشريح حتى تنفرد خلايا القمة (شكل 3ج).
10. افحص التحضير بالعدسة الشيئية الصغرى، ثم الوسطى والكبرى. تأكد من نظافة العدسات قبل استعمالها. كذلك اضبط إضاءة المجهر حتى تشاهد مراحل الانقسام بوضوح. راعي أن تكون درجة الإضاءة مناسبة مع قوة تكبير العدسة.

استعن بالشكل 4 لملاحظة مراحل الانقسام في خلايا القمة النامية.

ملاحظة:

يعتبر تحضير الهرسة أمراً مؤقتاً، وإذا ما أريد تحويلها إلى تحضير دائم يتوجب إزالة الغطاء الزجاجي وذلك بوضع الشريحة على قطعة ثلج حتى تتجمد. بعد دقائق، يمكن إزالة الغطاء الزجاجي وذلك برفعه بشفرة توضع تحت أحد طرفي الغطاء. بعد ذلك يزال الماء من الشريحة باستعمال تدرج كحولي صاعد ثم تروّق بالزايلين، وتغطى بوسط مناسب، ثم تجفف وتدرس بالمجهر الضوئي.



شكل 4: أ. صور لمراحل الانقسام الخلوي في قمة جذر نامية كما تظهر في مقطع طولي.
ب. منظر لبعض مراحل الانقسام الخلوي في قمة جذر نامية كما تظهر في هرسة.

الفصل التاسع عشر

تحضير نماذج كاملة

يعتبر تحضير نماذج كاملة من عينات بيولوجية مختلفة أمراً مفيداً جداً في علوم بيولوجية مثل الطفيليات، والأجنة، واللافقاريات، والنباتات اللاوعائية، ذلك أن دراسة تحضير كامل يسمح بتصنيف طفيليات، مثلاً، أو بتحديد مراحل نمو جنين معين. ولذا، فإنه يجب أن تكون العينات عند تحضيرها طازجة ومسطحة. إن مراعاة هذين الأمرين يمنع إدخال أية أشكال مصطنعة على التحضير، كما يساعد في المحافظة على المواقع الصحيحة لمكونات العينة.

ونظراً لإستحالة استعراض كل الطرائق المعروفة لتحضير نماذج كاملة من عينات بيولوجية مختلفة، لأن ذلك يخرج عن هدف هذا الكتاب، فإننا سنورد طرائق مختارة لتحضير نماذج كاملة من طفيليات، وأجنّة، تاركين سرد غيرها من الطرائق لمراجع أخرى.

1. تحضير نموذج كامل من طفيل تريماتودي Trematode

1.1 المحاليل اللازمة

1. محلول التثبيت: فورمالين ملحي
2. محلول الصبغة: كارمالم كيركباتريك Kirkpatrick's Carmalum
3. تدرج كحولي: 50٪، 70٪، 95٪، 100٪.
4. زايلين.
5. محلول تمييز.

2.1 الأدوات والزجاجيات اللازمة

1. شرائح.
2. أغطية زجاجية.
3. أربطة مطاطية.
4. وسط تغطية الشرائح.
5. مجهر ضوئي.

3.1 الطريقة

1. احصل على طفيليات تريماتودية من رئة، أو كبد، أو مثانة ضفدع أو أي حيوان فقاري مخبري، بعد تخديره وتشريحه. احفظ العينات في وعاء يحتوي على محلول فسيولوجي عند درجة حرارة 37°س.
2. اغسل العينات جيداً بمحلول ملحي، وتخلص من آثار الدم. بعد ذلك خدّر الطفيليات بوضع بلورات من المنثول في المحلول الملحي الدافئ لمدة نصف ساعة، حتى تخف حركة الديدان.
3. حضّر شريحتين من الزجاج بحيث يضاف لسطح الشريحة السفلى ورقتي ترشيح مشبعتين بالمثبت.
4. أنقل طفيلاً مخدراً إلى سطح ورقتي الترشيح، ثم أضف إليه ورقة ترشيح أخرى مشبعة بالمثبت، ثم أضف إلى سطح هذه الورقة شريحة زجاجية عليا.
5. ضع ربطتي مطاط أو لاقط على طرفي التحضير المشار إليه للمساعدة في جعل الطفيل منبسطاً ومن ثم أنقل التحضير إلى وعاء يحتوي على محلول التثبيت، واتركه لمدة 24 ساعة.
6. انقل الطفيل، دون الشريحتين، إلى كحول 70٪.
7. اغسل التحضير بكحول 70٪ عدة مرات.
8. استبدل الكحول 70٪ بمحلول الصبغة، واترك العينة فيه لمدة 12 ساعة.

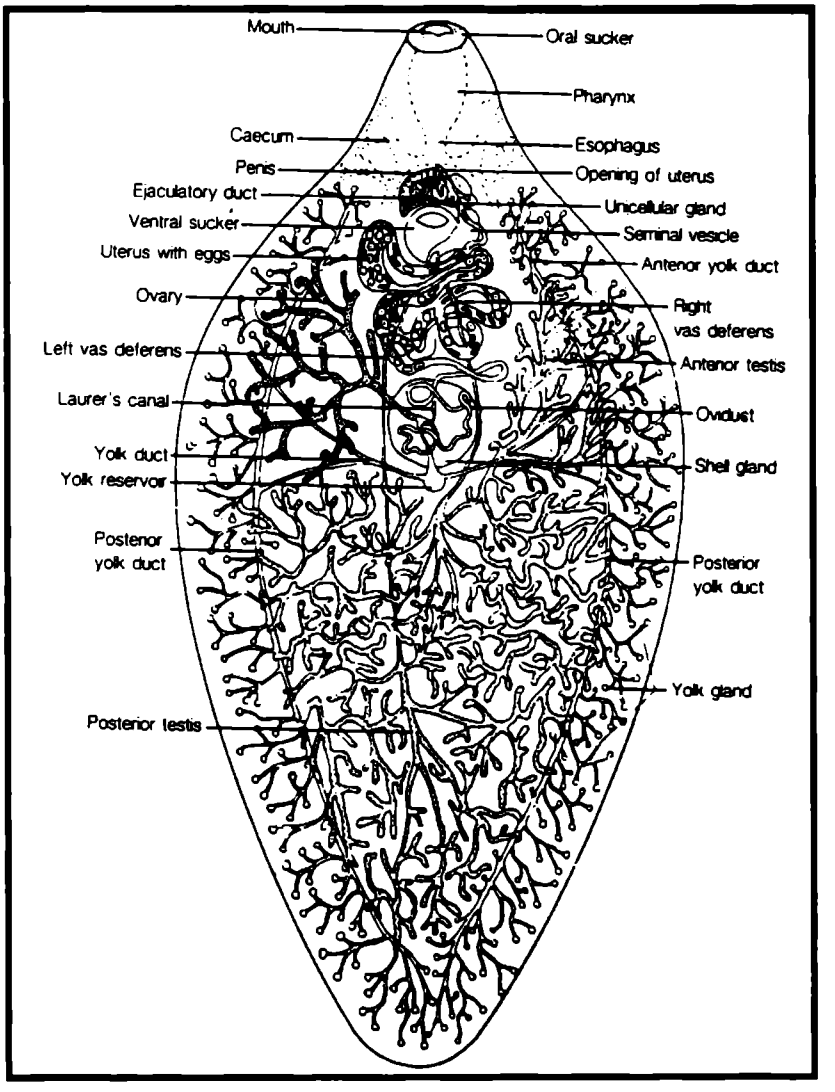
9. استبدل محلول الصبغة بمحلول التمييز (الكحول الحامضي)، واترك العينة فيه للوقت اللازم لإظهار الدرجة المناسبة من الصبغ.
10. أزل الماء باستبدال محلول التمييز بكحول 70٪، ثم بكحول 95٪، ثم بكحول مطلق مرتين، لمدة ساعة في كل مرحلة.
11. روّق العينات بالزايلين للفترة المناسبة، ثم انقلها إلى شرائح نظيفة، وغطها ببلسم كندا وبغطاء مناسب.
12. جفف التحضير، ثم ادرسه تحت المجهر الضوئي.

4.1 النتيجة

يصبغ الطفيل بلون أحمر، وتأخذ الأعضاء الداخلية ظلالاً من اللون الأحمر. أنظر الشكل 1 حتى تستطيع تمييز مكونات الطفيل التريماتودي.

ملاحظات:

1. في الحالات التي يكون فيها الطفيل سميكاً، فإنه يتوجب وضع شعيرات زجاجية أو حلقة بلاستيكية تحت الغطاء الزجاجي.
2. في حالة تحضير نموذج كامل لطفيل مفلطح صغير ورقيق، فإنه يمكن جعله مسطحاً على شريحة بإضافة غطاء زجاجي على سطحه.
3. تفيد الطريقة المذكورة أعلاه في تحضير طفيليات شريطية، وكذلك فهي مفيدة في تحضير نماذج كاملة من يرقات طفيليات مفلطحة أو شريطية.



شكل 1: رسم لطفيل ترماتودي يسمى وشيعة (وريقة) الكبد Liver Fluke

2. تحضير نموذج كامل من جنين الدجاج

كما ذكرنا سابقاً، فإن تحضير نماذج كاملة من أجنة الطيور يفيد في دراسة مراحل النمو المختلفة لهذه الأجنة. ولذا، فإنه لا يخلو أي مختبر في علم الأجنة من نماذج كاملة لمراحل نمو متعددة. وسنستعرض فيما يلي متطلبات تحضير مثل هذه النماذج.

1.2 الحصول على بيض ملقّح

يمكن الحصول على بيض ملقّح من أية مزرعة محلية، ولا يفيد البيض المتوفر في السوق لأنه غير ملقّح. ولا شك بأن استعمال بيض طازج يعطي نتائج أفضل من حيث عمر الجنين وحالته الصحية، وإذا ما اضطر العاملون في المختبر إلى تخزين البيض لحين استعماله، فإنه يجب أن يتم التخزين عند درجة حرارة بحدود 15°س.

2.2 معاملة البيض الملقّح

يوضع البيض الملقّح بحاضنة عند درجة حرارة تتراوح بين 37°س و 39°س لفترة يحددها مرشد المختبر. ويقترح أن تكون هذه الفترة 33-36 ساعة أو 48-52 ساعة.

وللحصول على الجنين بالعمر المطلوب، يضاف 3-4 ساعات إلى هذا العمر، ذلك أن نمو الجنين لا يبدأ مباشرة بعد وضع البويضة المخصبة بالحاضنة، وإنما بعد مرور 3-4 ساعات، وهي الفترة اللازمة لتأقلم البويضة مع درجة الحرارة الجديدة (37°س).

3.2 المحاليل والوسائط اللازمة

1. محلول رنجر الملحي.
2. محلول التثبيت: يمكن استعمال مثبت بوان.
3. محلول الصبغة: بوراكس كارمين.
4. تدرج كحولي: 30٪، 50٪، 70٪، 95٪، 100٪.
5. زايلين.
6. وسط تغطية التحضير.

4.2 الأدوات والزجاجيات اللازمة

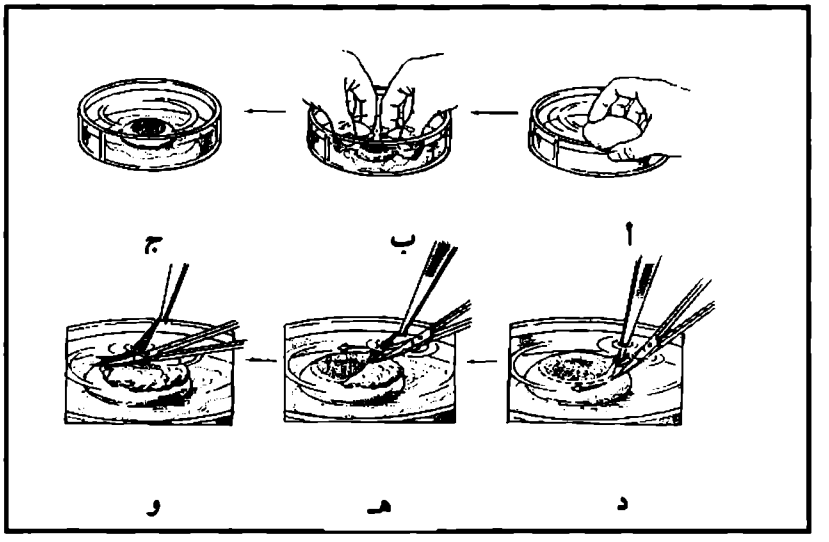
1. ملقط.
2. مقص.
3. صحن سيراكوز.
4. قطارة ذات فم واسع.
5. قطارة عادية.

6. زبدية سعتها 250 مل.

5.2 الطريقة

1. بعد مضي الفترة المناسبة على حضانة البيض الملقّح، امسك البيضة بيد واكسر القشرة من جانبها العريض بواسطة يد مقص، بشكل دائري باستخدام المقص في اليد الأخرى، قص القشرة لتفتح كوة دائرية فيها تسمح بخروج كرة الملح.
2. أزل قطعة القشرة المقصوصة، واسحب بياض البيض بملقط بحيث لا يبقى منه سوى أقل كمية ممكنة.
3. أنقل الجزء المتبقي من القشرة وما تحتويه من مح وجنين إلى زبدية تحتوي حوالي 200 مل من محلول رنجر للطيور، بحيث تقترب فتحة القشرة من سطح المحلول الملحي، ثم اقلب القشرة بحيث تكون الفتحة مواجهة لسطح المحلول ودع كرة المح تهبط في المحلول بلطف.
4. لاحظ القرص الأبيض الموجود على سطح المح، فهذا القرص يحتوي على الجنين المراد عزله عن المح. ولعزل الجنين، أمسك بحبل الألبومين الملتوي الموجود حول المح بملقط، وقص حول القرص الأبيض بمقص صغير (شكل 2). حاذر أن يضيع الجنين في المح.
5. دع القرص الجنيني يهبط في المحلول الملحي، ثم انقله بقطارة ذات فم واسع إلى صحن سيراكوز فيه محلول ملحي. عندئذ، حرّر الجنين من غشائه المحي حتى لا يؤثر وجوده على وضوح معالمه. ويمكن أن يتم ذلك بمسك طرف هذا الغشاء وتحريكه يميناً ويساراً عدة مرات حتى يتحرر منه الجنين.
6. غيّر المحلول المحلي مرتين أو أكثر بقطارة عادية وذلك بهدف تنظيف الجنين من حبيبات المح.
7. لجعل الجنين منبسطاً، أزل السائل الزائد من حوله، وإذا ما انثنى أحد أجزاء الجنين فإنه يمكن معالجة ذلك بإضافة بضعة ملليترات من المحلول الملحي ومن ثم يتخلص من الثني بملقط.

8. بعد انبساط الجنين، أزل من حوله معظم المحلول المحلي، وأضف إليه المثبت، بحيث تصب نقاط من المثبت على المحور الجنيني أولاً، ومن ثم على أطرافه. عندئذٍ قلّم الأجزاء الزائدة من الجنين بمشرط حاد وثبته لفترة تتراوح بين نصف ساعة وعدة ساعات.
9. أزل المثبت واغسل الجنين بكحول 70٪ (إذا كان المثبت محلول بوان) عدة مرات حتى يزول اللون الأصفر، ثم استبدل الكحول 70٪ بكحول 30٪. وإذا كان الجنين مثبتاً بمحلول فورملين، فيغسل الجنين بكحول 30٪ مباشرة بعد إزالة المثبت.
10. استبدل الكحول 30٪ بمحلول الصبغة لمدة تتراوح بين 15 و 30 دقيقة.
11. أزل الماء من التحضير باستعمال تدرج كحولي صاعد (من 30٪ إلى 100٪)، ومن ثم روّق الجنين بزايلين مرتين، مدة كل منهما 5-10 دقائق.

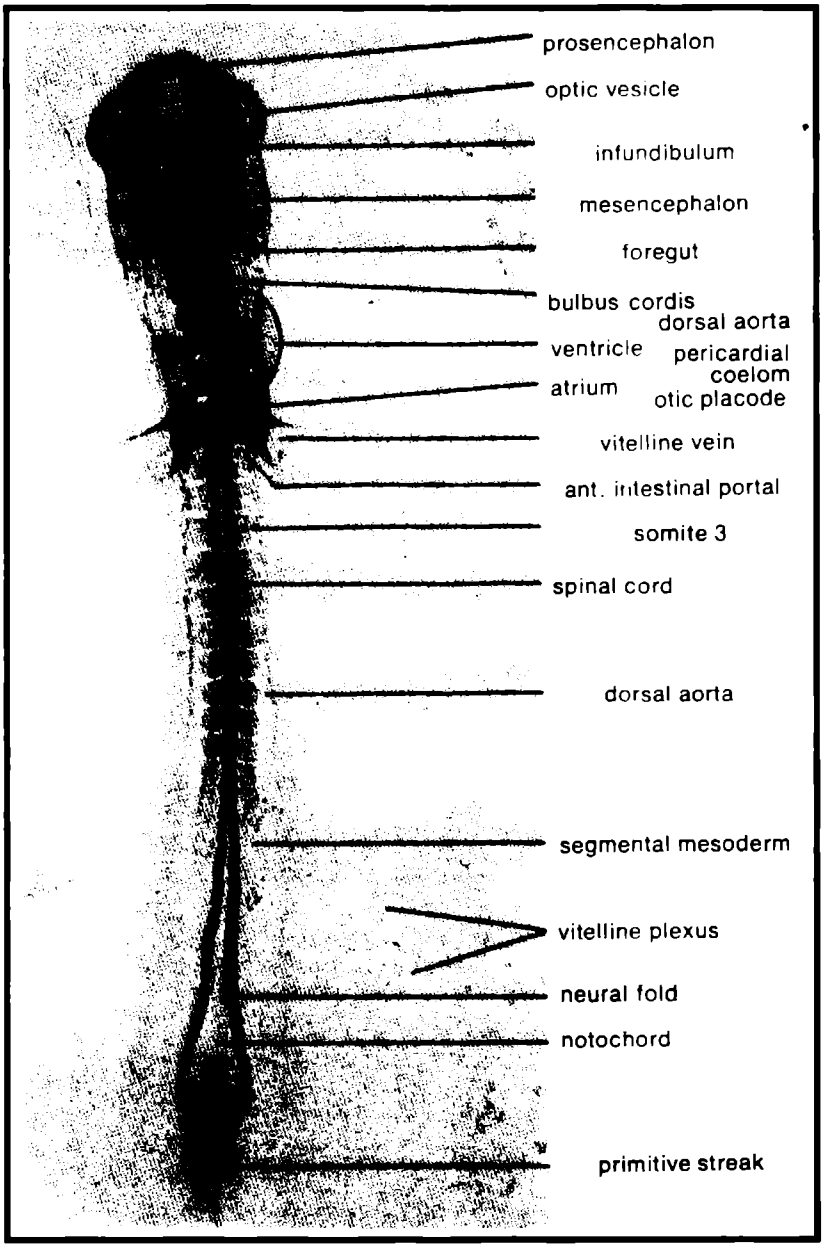


شكل 2: طريقة عزل جنين دجاجة

12. انقل الجنين إلى شريحة نظيفة وغطه ببلسم كندا، ومن ثم بغطاء زجاجي مناسب. إذا كان التحضير سميكاً، فإنه يلزم وضع شعيرات زجاجية تحت الغطاء.
13. جفف التحضير على صفيحة دافئة (عند حرارة 35-40°س) لفترة مناسبة، ثم نظفه وادرسه بالمجهر الضوئي.

4.2.2 النتيجة

أنظر الشكل 3 لمعرفة المكونات الأساسية لجنين دجاج بعمر 33-36 ساعة.



شكل 3: صورة لجنين دجاج عمره 33-36 ساعة

الفصل العشرون

تحضير مقاطع من أنسجة حيوانية

يعتبر الفأر أو الجرذ حيواناً مخبرياً جيداً لتحضير مقاطع من أعضاء مختلفة، وإذا تعذر الحصول على أعداد كافية من هذين الحيوانين، فيمكن استعمال الدجاجة أو الأرنب كبديلين مناسبين. وبشكل عام، فإن تحضير المقاطع باستعمال الشمع كوسط تشريب وطمر، ثم صبغ المقاطع بصبغتي هيماتوكسين ماير وإيوسين يشكلان أساسين شائعين جداً في مختبرات التقانة المجهرية. وسنستعمل صبغة هيماتوكسين ماير لأنها لا تحتاج إلى التمييز باستعمال كحول حامضي ومن ثم غسل الشرائح بماء جار لمدة 15 دقيقة. كذلك تبقى الصبغة صالحة لعدة سنوات دون أن تبهت، ويمكن أن بتقى الشرائح في هذه الصبغة لعدة ساعات دون إفراط في تلوين الأنسجة.

1. التجهيز للتثبيت

من أجل الحصول على نتائج جيدة لا بد من مراعاة الأمور التالية:

1. معرفة العضو المقرر تحضير مقاطع منه، وذلك بالرجوع إلى مرجع مناسب.
2. تجهيز أدوات التشريح.
3. تحضير المحاليل اللازمة قبل الشروع بالعمل.
4. تحضير الزجاجيات اللازمة، مع التأكيد على نظافتها.
5. تجهيز مكان العمل من حيث النظافة والاتساع.
6. التخطيط للعمل ووضع برنامج يبين خطوات العمل والوقت اللازم لكل خطوة.
7. العمل بسرعة مناسبة.

2. المحاليل والوسائط اللازمة

1. محلول التثبيت: فورمالين أو بوان.
2. هيماتوكسلين ماير.
3. إيوسين كحولي.
4. تدرج كحولي: 30٪، 50٪، 70٪، 95٪، 100٪.
5. وسط ترويق: زايلين أو زيت خشب الأرز.
6. وسط تشريب وطمر: شمع البرافين.
7. وسط لصق المقاطع.
8. وسط تغطية الشرائح.

3. الأدوات والزجاجيات والأجهزة

1. أدوات التشريح.
2. شرائح وأغطية زجاجية.
3. جرار صبغ.
4. صفيحة دافئة.
5. فرن صهر شمع.
6. جهاز تقطيع وسكين قطع.
7. قوالب طمر وحاملات قوالب.
8. مجهر ضوئي.

4. الحصول على العضو المراد تثبيته

1. احصل على الحيوان المقرر استعماله من قبل المدرس أو الفني، واقتل الحيوان بسرعة وبإنسانية، وذلك بوضعه في وعاء زجاجي واسع له غطاء محكم، ويكون في أرضيته محارم ورقية مشبعة بـ **إيثر** Ether أو **كلوروفروم** Chloroform.

2. عند توقف الحيوان عن التنفس، أخرجه من الوعاء الزجاجي وضعه على لوحة تشريح بحيث يكون البطن إلى أعلى. رّطب جسم الحيوان، وخاصة بطنة بكمية قليلة من الماء.
3. امسك الجلد في الجزء السفلي الأوسط من البطن بملقط، ثم اقطع بمقص حاد تلك المنطقة باتجاه أمامي وحتى ما بعد القفص الصدري. راعي أن يكون القص سطحياً، بحيث يمر من خلال عضلات البطن دون تخريب للأعضاء الداخلية.
4. حرّر الأعضاء الداخلية، وإذا كانت مغطاة بالدم، اغسلها بمحلول فسيولوجي أو محلول متظم وذلك قبل نقلها إلى وعاء مناسب لتثبيتها.
5. بعد معرفتك موضع وشكل العضو المقرر لك، انقل هذا العضو (إذا كان صغيراً بحجم 7×7×7 ملم) أو جزءاً منه (إذا كان حجم العضو أكبر من 7×7×7 ملم) إلى قنينة بسعة 5-10مل تحتوي ما لا يقل 5 مل من محلول التثبيت. قم بهذه الخطوة بحذر شديد، بحيث لا تنقل العضو بإبرة تشريح، ولا تضغط عليه بملقط حاد. كي لا تشوه بنية النسيج.

ملاحظة:

- إذا كان نسيجك ذات نشاط أيضي كبير ويحتوي على منسوب مرتفع من الإنزيمات، أو إذا كان النسيج عضواً تناسلياً، فإن مثل هذه الأنسجة تتعرض لتهتك سريع بعد إزالتها من جسم الحيوان المستخدم للعمل. لذا، يتوجب معالجة هذه الأنسجة بالسرعة القصوى للتخفيف من تأثير التحلل الذاتي.
- إذا كان العضو المقرر أنبوبي الشكل، فيفضل أن تكون المقاطع المحضرة فيه عرضية، ومن الأعضاء التي يستحسن الحصول على مقاطع عرضية منها. الاثني عشر، المريء، القولون، الحالب، القصبة الهوائية، البربخ، قناة المبيض. ويراعى أن تكون هذه الأعضاء خالية من أية شوائب، وخاصة إذا كانت تلك الأعضاء من الجهاز الهضمي. ولتحقيق ذلك تغسل الأعضاء من الداخل بسائل ملحي (0.7٪ كلوريد الصوديوم).

- إذا كان العضو المقرر طرياً جداً، مثل الخصية، فضعه مباشرة بالمثبت، وبعد خمس دقائق يتقسى، وعندئذ يقطع إلى قطع بالحجم المطلوب.
- إذا كان العضو غنياً بالدم، مثل الكبد والطحال والقلب، اغسله جيداً، بعد نقله إلى صحن بتري، بمحلول فسيولوجي عدة مرات، ثم استبدل المحلول الفسيولوجي بالمثبت، ثم اقطعه إلى قطع مناسبة الحجم.
- إذا كان حجم العضو كبيراً (أكثر من 7×7×7 ملم)، راعي أن تكون قطعه المختلفة محتوية على محيط العضو وجزءاً من داخله.
- إذا طلب منك تثبيت النسيج المقرر لك بأكثر من مثبت، تأكد من كتابة البيانات اللازمة على ورق وسم وتثبيتها على الأوعية الزجاجية التي ستعالج فيها الأنسجة. إن هذا الأمر هام جداً لمنع حدوث أي خلط للأنسجة.

اكتب البيانات بقلم رصاص أو بحبر صيني. لا تستعمل الحبر الجاف أو السائل.

6. اختر 4-5 قطع من كل عضو، وعالجها بنفس الوعاء، حتى تبلغ مرحلة التشريب.

ملاحظة:

- لا تخلط عينات من أنسجة مختلفة في نفس الوعاء.
- راعي أن تكون جميع الأوعية المستعملة نظيفة جداً، وأن تكون المحاليل معروفة من حيث التركيب وتاريخ التحضير.

5. معالجة النسيج حتى التقطيع

بعد الحصول على النسيج المقرر، وأخذ الملاحظات الواردة سابقاً بعين الاعتبار، اتبع الخطوات التالية:

1. ثبت 4-5 قطع من النسيج المقرر في وسط تثبيت مناسب، وقد يكون ذلك محلول فورمالين أو مثبت بوان. وكما ذكرنا في الفصل الأول فإن وقت التثبيت يعتمد على نوع وحجم النسيج ونوع المثبت. وبشكل عام، ولمعظم الأنسجة باستثناء القاسية، منها كالجلد، وشبه الصلبة أو الصلبة كالغضروف والعظم، فإن وقت التثبيت في الفورمالين يتراوح بين 6 و 12 ساعة، ويمكن ترك الأنسجة فيه لمدة طويلة (عدة

أشهر) دون أي تأثير سلبي على النسيج. أما إذا استعمل مثبت بوان، فتتروح فترة التثبيت بين 8 و 24 ساعة، ويمكن ترك الأنسجة فيه لعدة أسابيع.

2. اغسل الأنسجة المثبتة في الفورمالين بالماء ثلاث مرات، مدة كل منها 1/ 2-1ساعة، ويكون ذلك باخراج المثبت من القنينة التي تم التثبيت فيها، واحلال الماء محله. أما الأنسجة المثبتة بمحلول بوان، فتغسل 3-5 مرات بكحول تركيزه 70٪، حتى يزول اللون الأصفر من الأنسجة.
3. أزل الماء من الأنسجة المثبتة بفورمالين، باحلال تدرج كحولي صاعد (35٪، 50٪، 70٪، 95٪، 100٪، 100٪) محل الماء. تكون فترة بقاء الأنسجة في كل محلول 1-2 ساعة. وللتأكد من إزالة الماء بشكل جيد، استعمل تغييرين من كحول 100٪، مدة كل منهما ساعة واحدة.

ملاحظة:

- لا تترك الأنسجة في كحول 95٪ أو 100٪ لأكثر من ساعين، وإلا فإن الأنسجة تتقسى. وفي الحالات الإضطرارية، يمكن ترك الأنسجة في كحول تركيزه 70٪ لساعات طويلة، بل أيام.
- أزل الماء من الأنسجة التي تثبت بمحلول بوان، والتي غسلت بكحول تركيزه 70٪، بحيث تنقل الآن إلى كحول 95٪، ثم إلى كحول مطلق مرتين، كما أشرنا سابقاً، وتراعى نفس الفترات الزمنية المشار إليها آنفاً.

4. روّق الأنسجة بخليط من الكحول المطلق ووسط الترويق (بنسبة 1:1) ولمدة 1-2 ساعة، ثم اترك الأنسجة في وسط ترويق مطلق لمدة 2-3 ساعات. يكون وسط الترويق إما زايلين أوزيت خشب الأرز، وإذا استعمل الأخير، فيمكن ترك الأنسجة فيه لعدة ساعات، بل ولعدة أيام دون أي تقسية للأنسجة. حاذر من ترك الأنسجة في الزايلين لأكثر من الوقت المقترح، لأن ذلك يؤدي إلى تقسيتها.
5. شرّب الأنسجة بخليط من وسط الترويق (زايلين) ووسط التشريب المنصهر (الشمع) بنسبة 1:1، واترك الأنسجة في هذا الخليط على صفيحة دافئة أو داخل فرن عند درجة حرارة 45-50°م لمدة 2-1-1 ساعة.

6. انقل الأنسجة إلى وسط تشريب طازج داخل صحن سيراكوز (أو كأس صغيرة)، واترك التحضير داخل فرن شمع عند حرارة 50-55°م لمدة ساعتين.
7. استبدل الشمع السابق بشمع جديد مرشح، واترك الأنسجة فيه لمدة ساعتين عند حرارة 50-55°م.

ملاحظة:

- كما في كل خطوة سابقة، فإن الفترة الزمنية اللازمة للتشريب، تعتمد على حجم ونوع النسيج. فكلما كان حجم النسيج كبيراً، وكلما كان النسيج قاسياً، كلما كانت الحاجة لفترة تشريب أطول. فالجلد مثلاً، يحتاج لفترة تشريب قد تصل إلى 18-24 ساعة، والقصبة الهوائية تحتاج إلى فترة تتراوح 8-12 ساعة. أما معظم الأعضاء فتحتاج إلى فترة تشريب تتراوح بين 4-5 ساعات.
- حاذر من ترك النسيج في فرن صهر الشمع لفترة أطول من اللازم، لأن ذلك يؤدي إلى تقسية النسيج، وإلى تفتت محتوياته.

8. حضّر قوالب ورقية لإجراء الطمر، أو استعمل قوالب جاهزة وامسح الأسطح الداخلية لهذه القوالب بالجليسرين واسكب بداخلها شمعاً دافئاً. حاذر صب الشمع على دفعتين. أطمر الأنسجة وذلك بنقلها إلى قوالب ورقية (أو إلى أي قالب آخر، كما أشرنا إلى ذلك سابقاً).
   - برّد أسفل القالب الشمعي في صحن بتري يحتوي ماءاً بارداً، ويمكن أن يحتوي الصحن مكعبات ثلج. أبق على سطح الشمع دافئاً، وإذا ما حدث أي تجمد للشمع فيمكنك صهره بتحريكه بملقط دافئ.
   - انقل الأنسجة بأداة دافئة، مثل ملقط غير حاد. حاذر الضغط على النسيج إذ يكون في هذه المرحلة هشاً جداً.
9. ضع النسيج عند إحدى طرفي القالب، ووجّهه بالاتجاه الصحيح حتى تحصل على نوع المقطع المطلوب، وهذا الأمر هام جداً بالنسبة للأعضاء الأنبوبية، مثل

المريء والاثني عشر. إذا كان قالب الشمع يتسع لأكثر من قطعتين من النسيج، فيمكن وضع قطعة واحدة عند كل طرف من القالب.

10. برِّد سطح الشمع بالنفخ عليه بلطف. ضع إشارة على قالب الطمر لتبين موقع النسيج.
    - عند تكوّن ما يشبه الزَبَدْ على السطح، أغمر القالب بلطف في الماء البارد، ثم برّد القالب تحت ماء جار وبارد (او بداخل ثلاجة).

11. أخرج قالب الشمع، من حاملة، وقلّم هذا القالب بإزالة الشمع الزائد من حول النسيج. راعي أن يبقى قدر كاف من الشمع حول النسيج، وخاصة عند الجهة التي ستثبت على القالب الخشبي أو المعدني.

ملاحظة:

- ضع كمية قليلة من الشمع على سطح حامل قالب الشمع، وأصهر هذه الكمية وقاعدة قالب الشمع بأداة دافئة، حتى يصار إلى تثبيت قالب الشمع على الحامل. اضغط على قالب الشمع حتى يزيد التماسك بينه وبين الحامل.
- قلّم الشمع الزائد بشكل نهائي، وراعي أن يكون النسيج محاطاً بما لا يقل عن 2.0 ملم من الشمع من كل الجهات. كذلك، تأكد بأن يكون السطحين العلوي والسفلي للقالب الشمعي ومتوازين.

12. ثبت حامل قالب الشمع داخل جهاز التقطيع، واضبط سمك المقاطع بحوالي 10 ميكرومترا. تأكد بأن السكين مثبت، وبأن جهاز التقطيع يعمل بشكل جيد وبأنه مهيأ للتقطيع في بداية الدورة. ارجع لفني المختبر إذا واجهت صعوبة في معرفة هذه البداية.

13. احصل على المقاطع، وضعها على ورق نظيف داخل علبة ورقية مناسبة، أبعادها 15×10×2سم. إذا لم تسمح الظروف باستمرار العمل، فيمكنك ترك المقاطع في هذه العلبة لعدة أيام أو أسابيع.

14. حمّل المقاطع على شرائح نظيفة وممسوحة بوسط لصق مناسب. اترك حيزاً مناسباً لورقة الوسم. عند الطرف الأيسر للشريحة راعي أن تكون المقاطع في وسط الشريحة. بإمكانك العودة للفصل السادس لمراجعة كيفية إجراء ذلك.

راعي أن تكون المقاطع منفردة بشكل جيد وخالية من أية انثناءات. ارجع للفصل الرابع بشأن ذلك. بإمكانك وضع أكثر من مقطع على الشريحة الواحدة.

15. جفّف الشرائح بوضعها على صفيحة دافئة عند حرارة 40°س، لمدة ساعة، قبل بدء عملية الصبغ. إذا لم تكن مستعداً لعملية الصبغ، فيمكنك تخزين الشرائح في علبة مناسبة بعيداً عن الغبار، وتكون فترة التخزين غير محددة.

6. صبغ المقاطع

كما ذكرنا في بداية هذا الفصل، فإن المقاطع المحضرة من الأنسجة ستصبغ بمحلولي هيماتوكسلين لصبغ النواة بلون أزرق، وإيوسين لصبغ السيتوبلازم بلون برتقالي إلى وري.

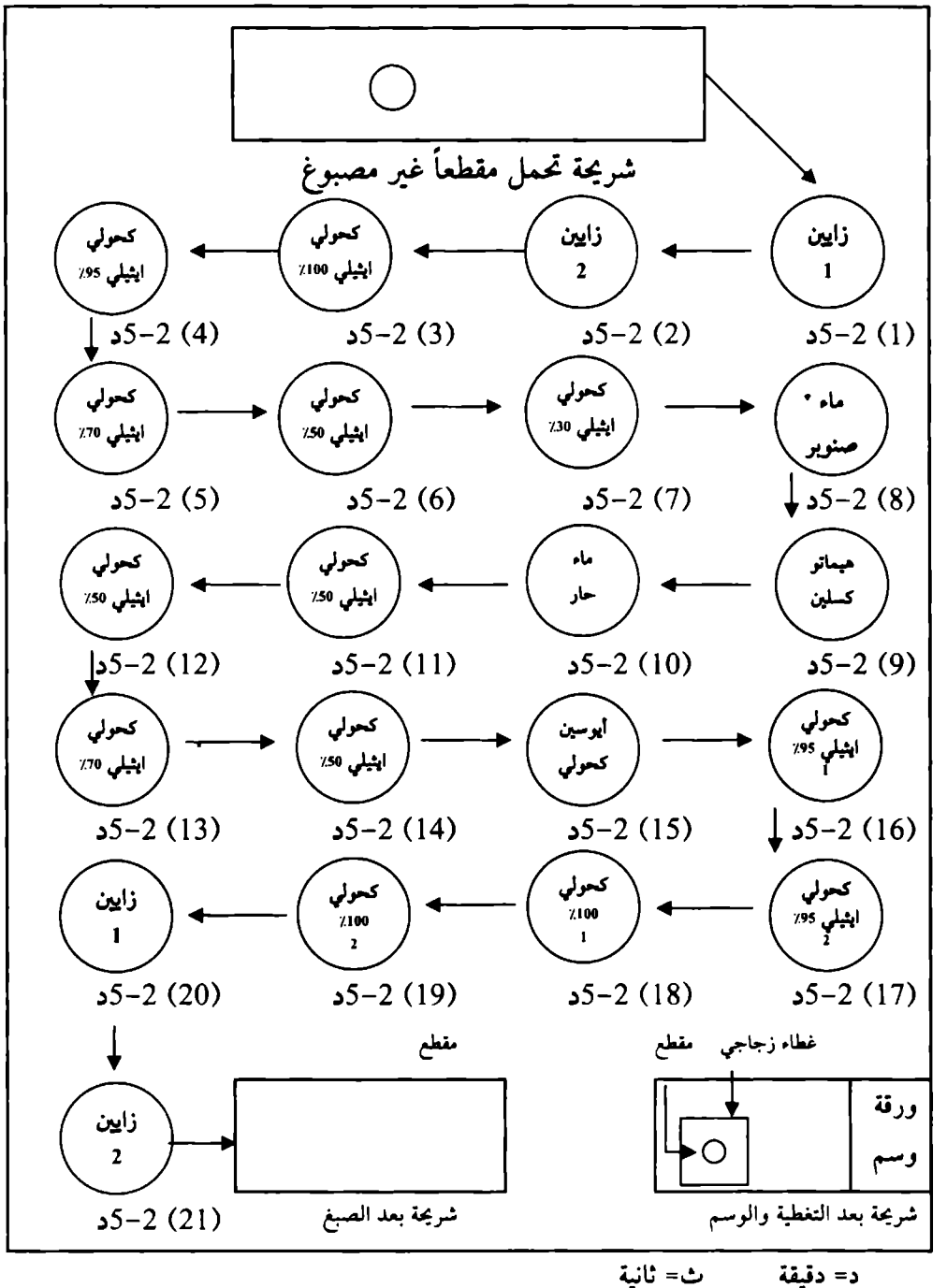
ولتحقيق هذا الهدف اتبع الخطوات التالية، وانظر للشكل 1.

1. ضع الشرائح المحملة بالمقاطع بالزايلين الأول والثاني، لفترة دقيقتين لكل منهما، وذلك لإزالة الشمع.
2. مرر الشرائح بكحول مطلق، واتركها لمدة دقيقتين، ثم انقل المقاطع إلى كحول 95٪، ثم كحول 70٪، لمدة دقيقتين لكل منهما.

ملاحظة:

- إذا ثبتت الأنسجة بمثبت بوان، فإنه يتوجب إزالة اللون الأصفر من المقاطع وذلك بتمريرها بمحلول كحول إيثيلي 70٪ مضافاً إليه بضع قطرات من محلول كربونات الليثيوم المشبع.

3. انقل الشرائح إلى كحول 50٪، ثم إلى كحول 30٪، ثم إلى ماء صنبور لمدة دقيقتين لكل مرحلة.
4. أصبغ الشرائح بـ **هيماتوكسلين** ماير لمدة 10-15 دقيقة، وبعد ذلك أشطف الشرائح بماء صنوبر جار لمدة دقيقتين. في هذه المرحلة تصبغ النوى بلون أزرق.
5. مرر الشرائح بالتدرج الكحولي التالي 30٪، 50٪، 70٪، 95٪ بحيث تبقى لمدة دقيقتين في كل تركيز.



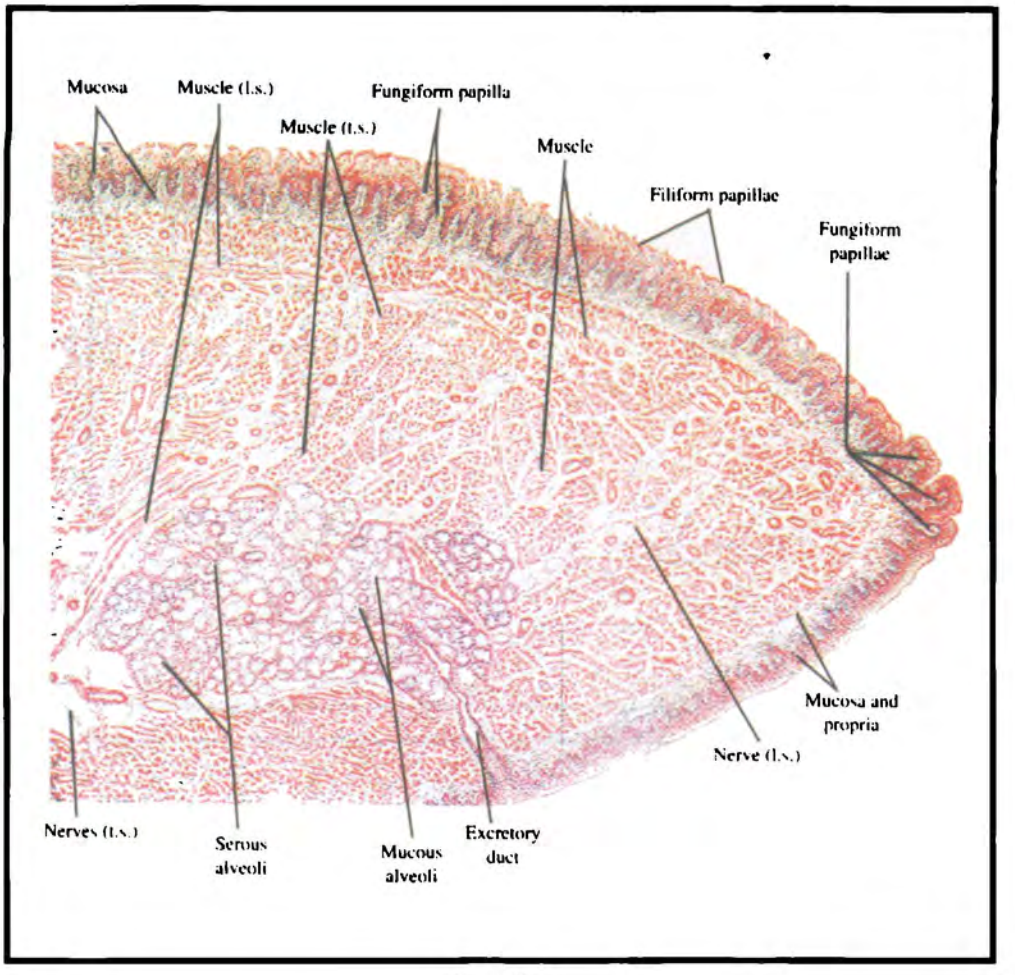
د= دقيقة ث= ثانية

شكل 1: تسلسل خطوات الصبغ بطريقة هيماتوكسلين-إيوسين

6. أنقل الشرائح إلى جرة صبغ تحتوي إيوسين كحولي، واتركها لفترة تتراوح بين 15 ثانية ودقيقة.
7. أنقل الشرائح إلى كحول 95٪ لإزالة الإيوسين الزائد، ثم إلى كحول 95٪ مرة أخرى، لمدة دقيقتين في كل تغيير.
8. بعد ذلك مرر الشرائح في جرتي كحول مطلق لمدة دقيقتين في كل جرة.
9. روّق الشرائح بنقلها إلى جرتي زايلين بحيث تبقى لمدة 5 دقائق في كل جرة.
10. بعد إزالة الزايلين الزائد بورقة ترشيح، غط الشرائح ببلسم كندا وبالغطاء المناسب.
11. جفف الشرائح على منضدة تسخين عند حرارة 35-450°س، ثم نظفها وأوسمها، وادرسها تحت المجهر الضوئي.

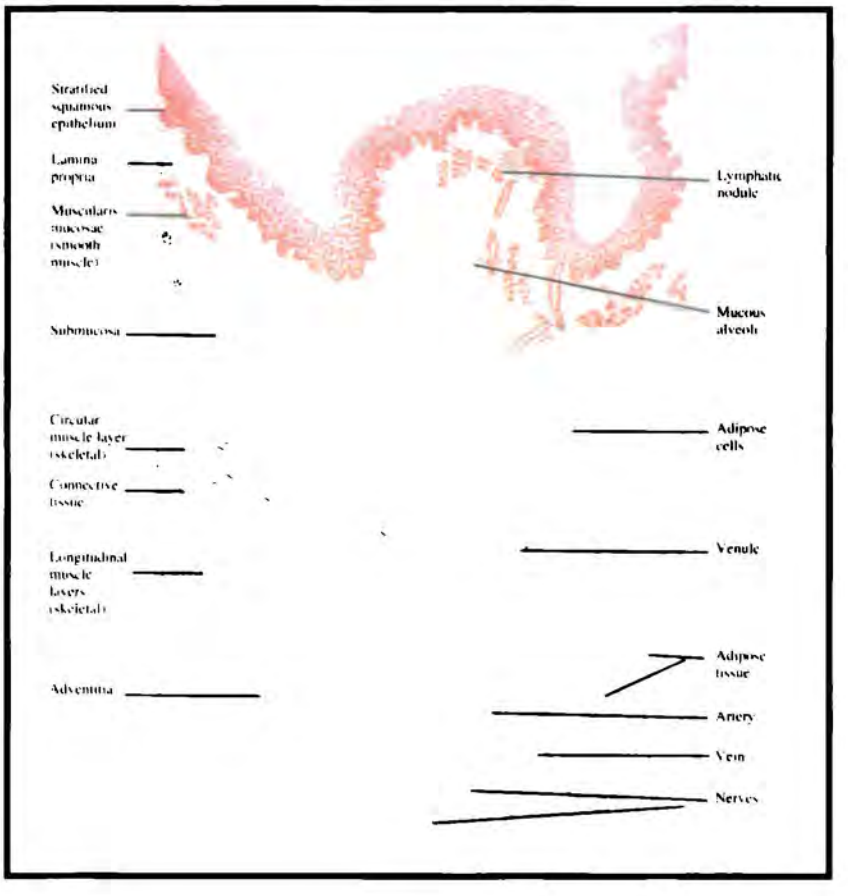
ملاحظة هامة:

1. يقترح استعمال الأعضاء التالية: 1. اللسان، 2. المريء، 3. المعدة، 4. الاثني عشر، 5. اللفائفي، 6. القولون، 7. الكبد، 8. البنكرياس، 9. الكلية، 10. الحالب، 11. المثانة البولية، 12. الخصية، 13. البربخ، 14. المبيض، 15. قناة المبيض، 16. الرحم، 17. القصبة الهوائية، 18.الرئة، 19. الغدة الكظرية، 20. الغدة الدرقية، 21. الغدة النكفية، 22. الأبهر، 23. الوريد الأجوف العلوي، 24. صيوان الأذن الخارجية، 25. الجلد، 26. الشفة، 27. نسيج دهني، 28. نسيج عضلي هيكلي، 29. نسيج عضلي أملس، 30. نسيج عضلي قلبي، 31. عصب، 32. الحبل الشوكي.
2. أنظر الأشكال 2-25 لتعرف المكونات النسيجية للأعضاء المقررة لك.
3. ارجع إلى كتاب «علم الأنسجة» لمعرفة المزيد من المعلومات عن هذه الأعضاء أو غيرها.



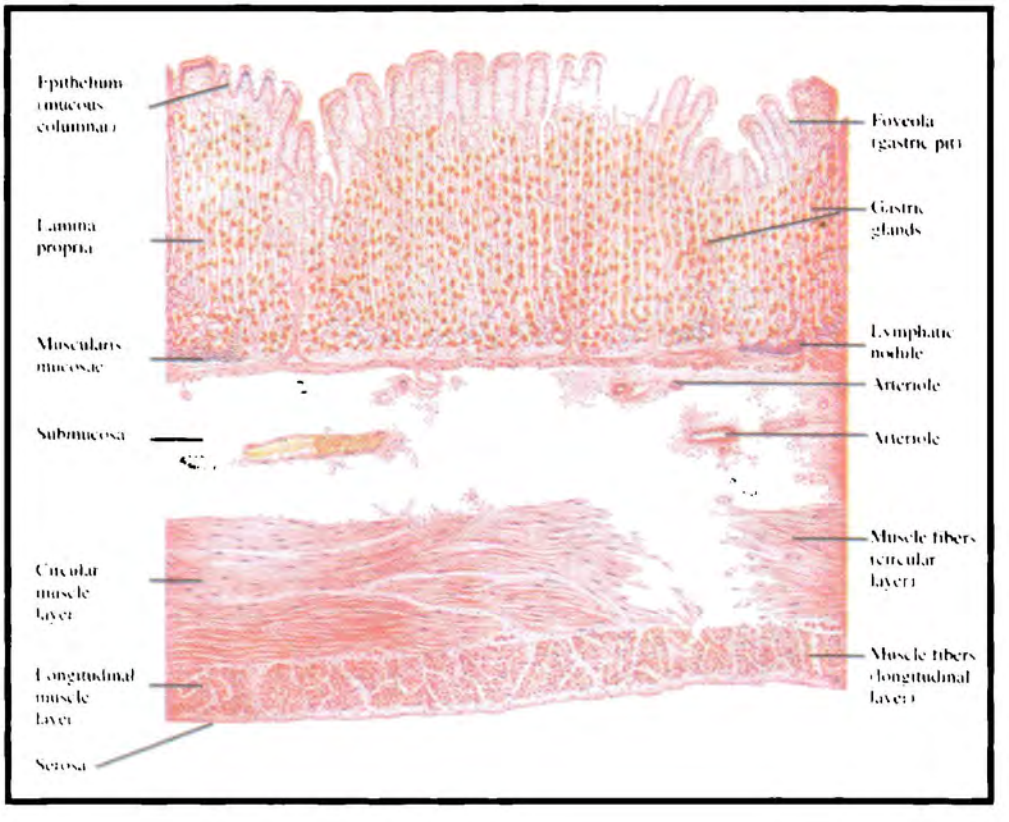
الشكل 2

مقطع طولي في مقدمة اللسان (Di Fiore, 1995)



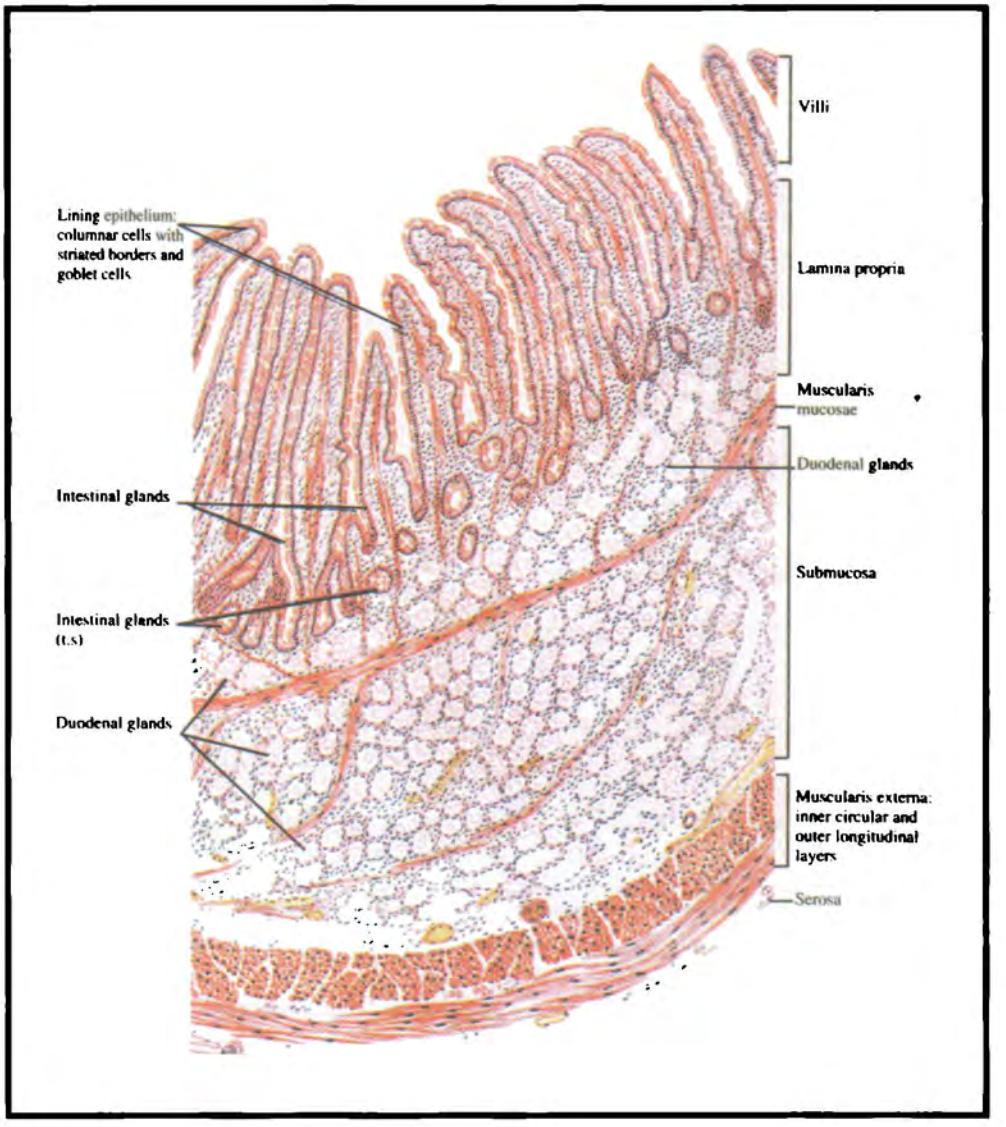
الشكل 3

مقطع عرضي في جزء ممن جدار المريء (Di Fiore, 1995)



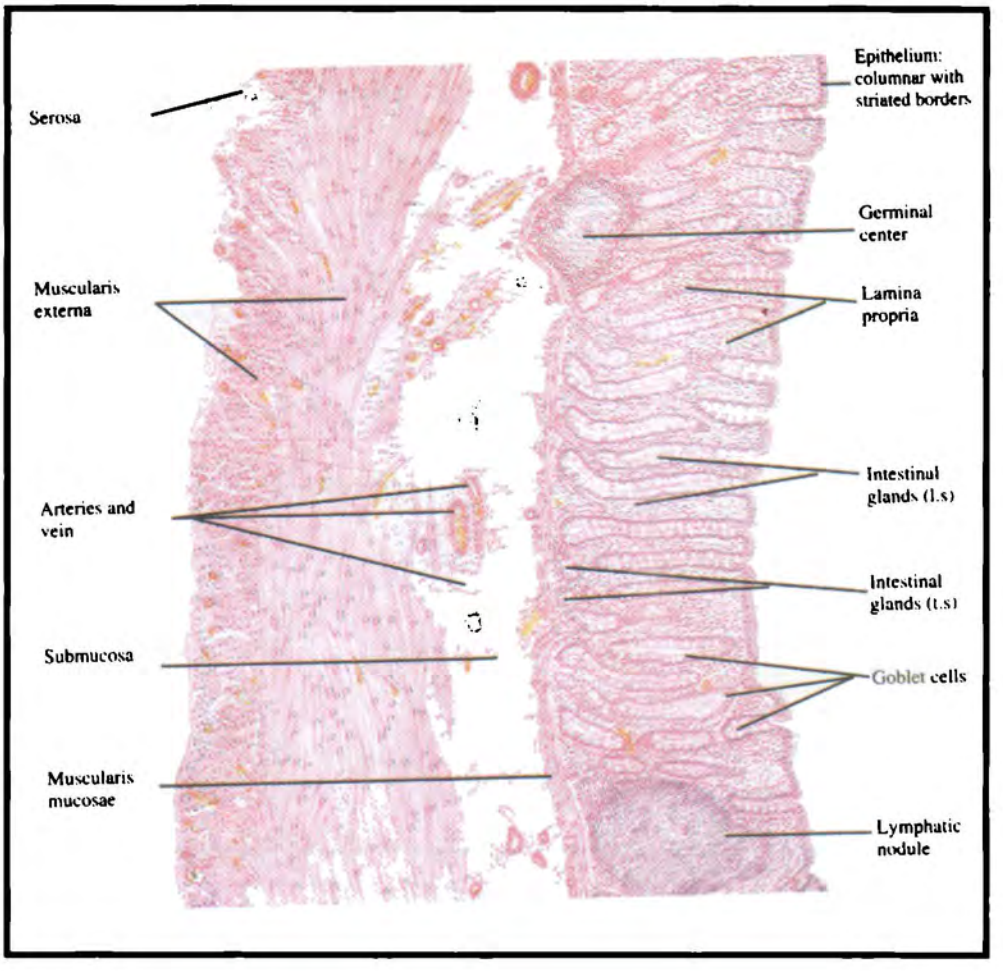
الشكل 4

مقطع عرضي في جزء من جدار قاع المعدة (Di Fiore, 1995)



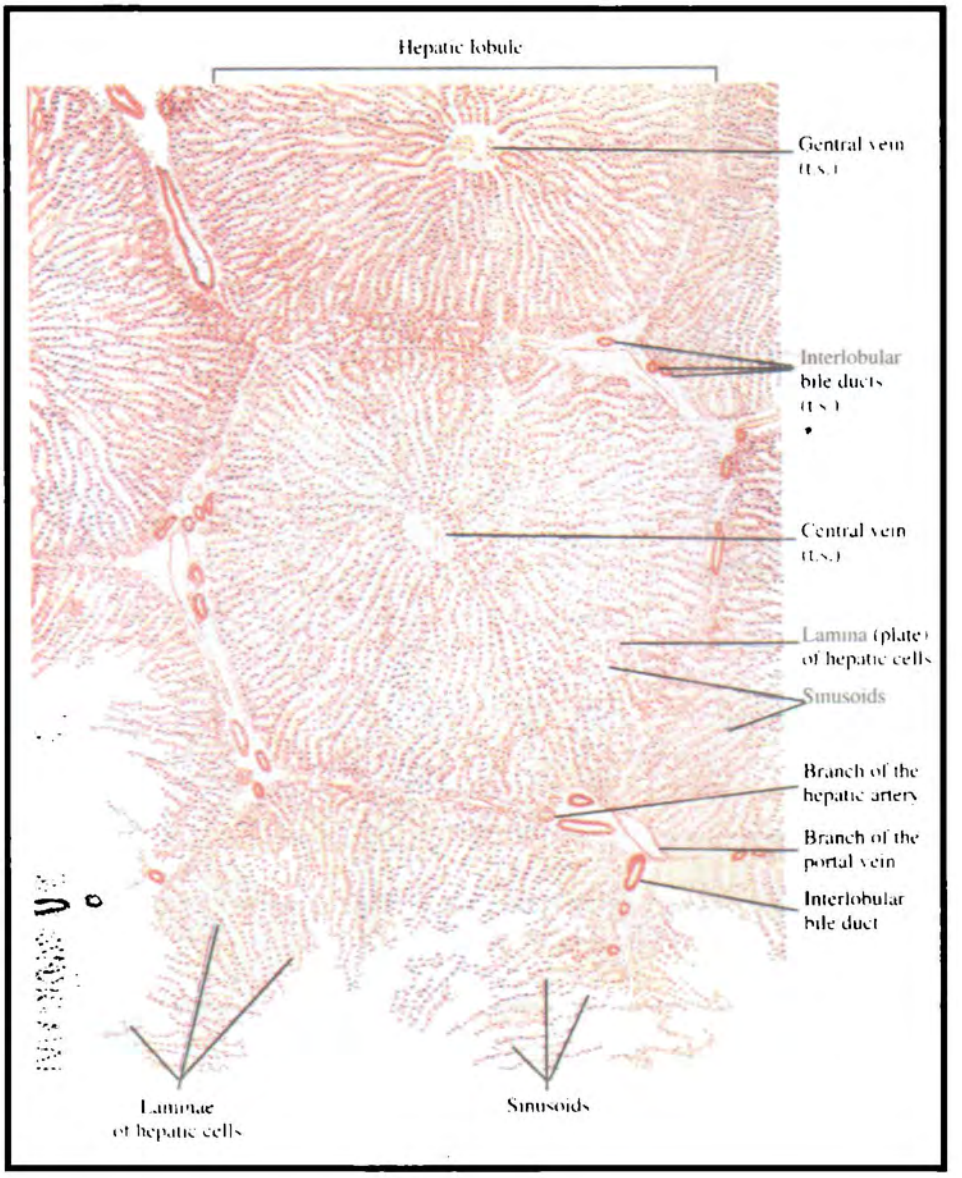
الشكل5

مقطع عرضي في جزء من جدارالإثنا عشر (Di Fiore, 1995)



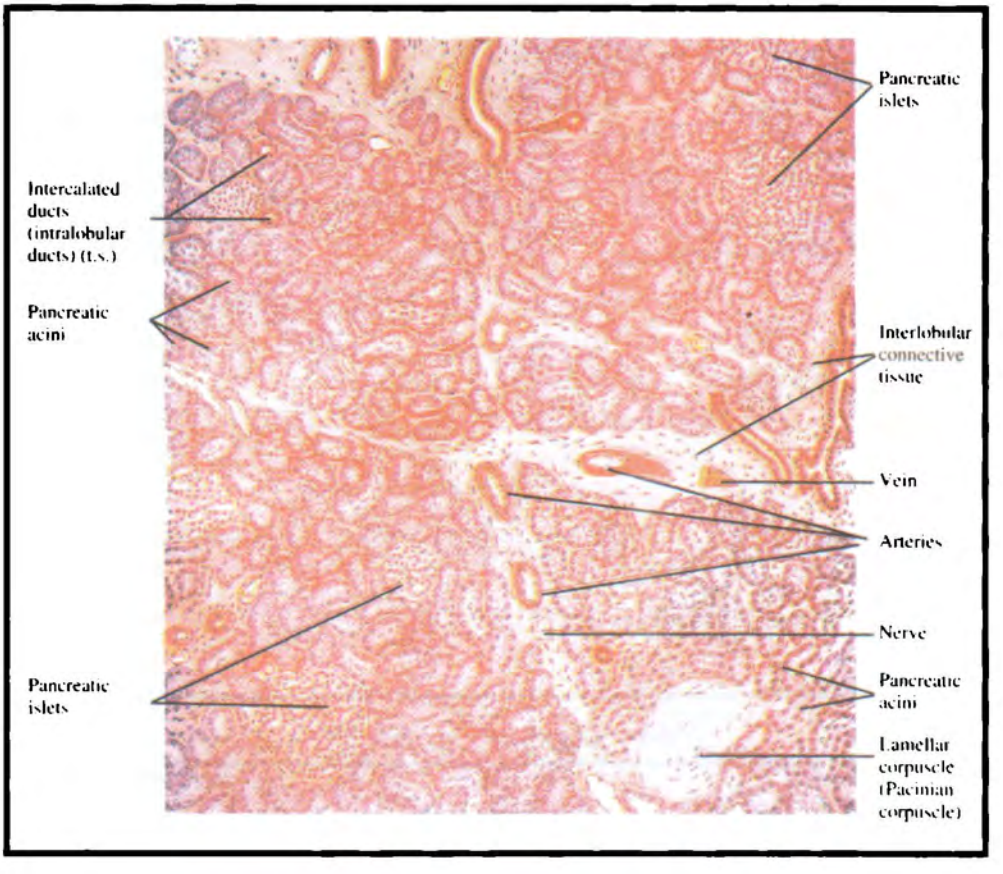
الشكل 6

مقطع عرضي في جزء من جدار القولون (Di Fiore, 1995)



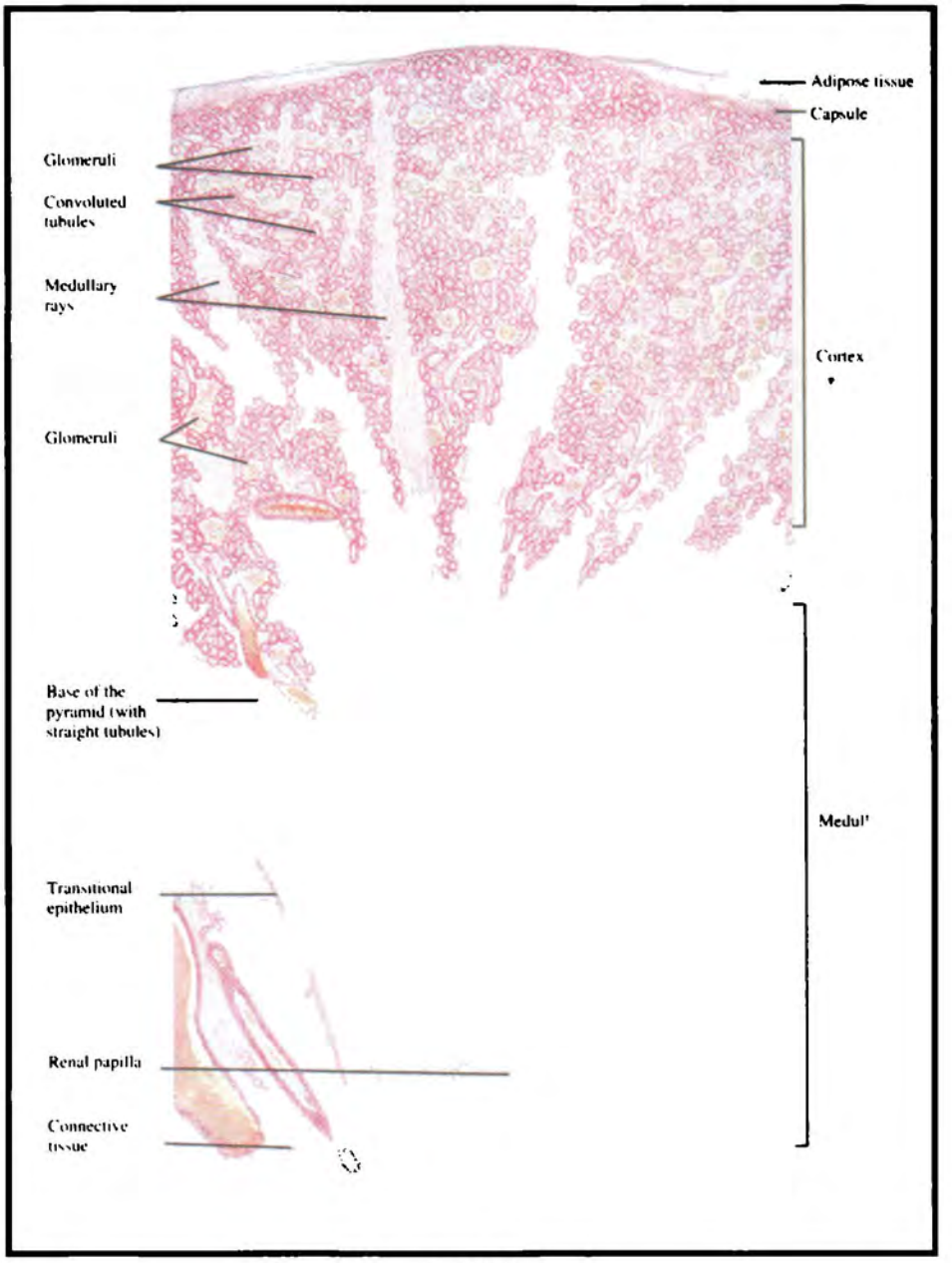
الشكل 7

مقطع عرضي في جزء من جدار الكبد (Di Fiore, 1995)



الشكل 8

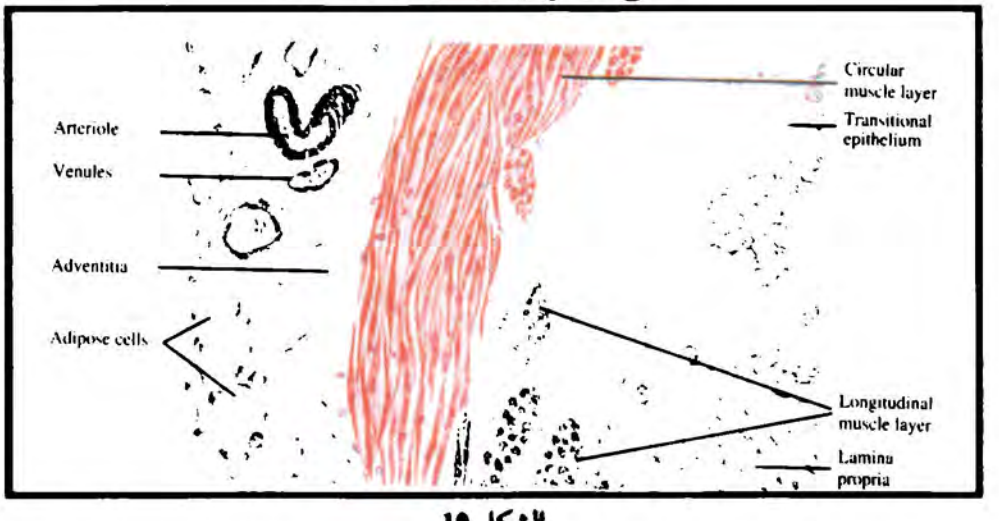
مقطع عرضي في جزء من جدار البنكرياس (Di Fiore, 1995)



الشكل 9

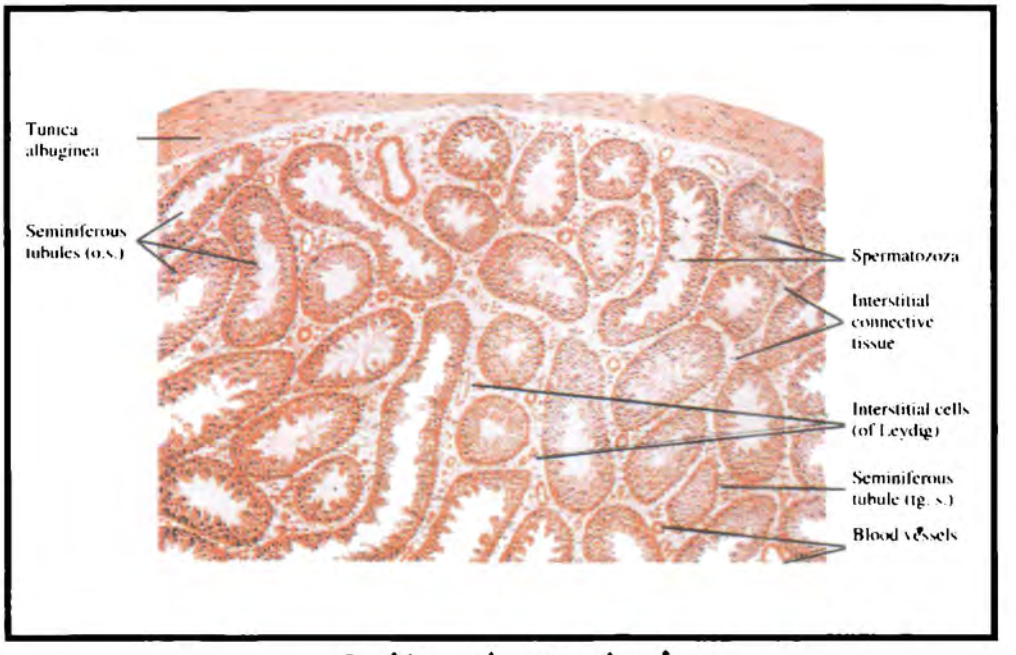
مقطع عرضي في جزء من جدار الكلية (Di Fiore, 1995)

أ. مقطع عرضي في جزء من جدار الحالب

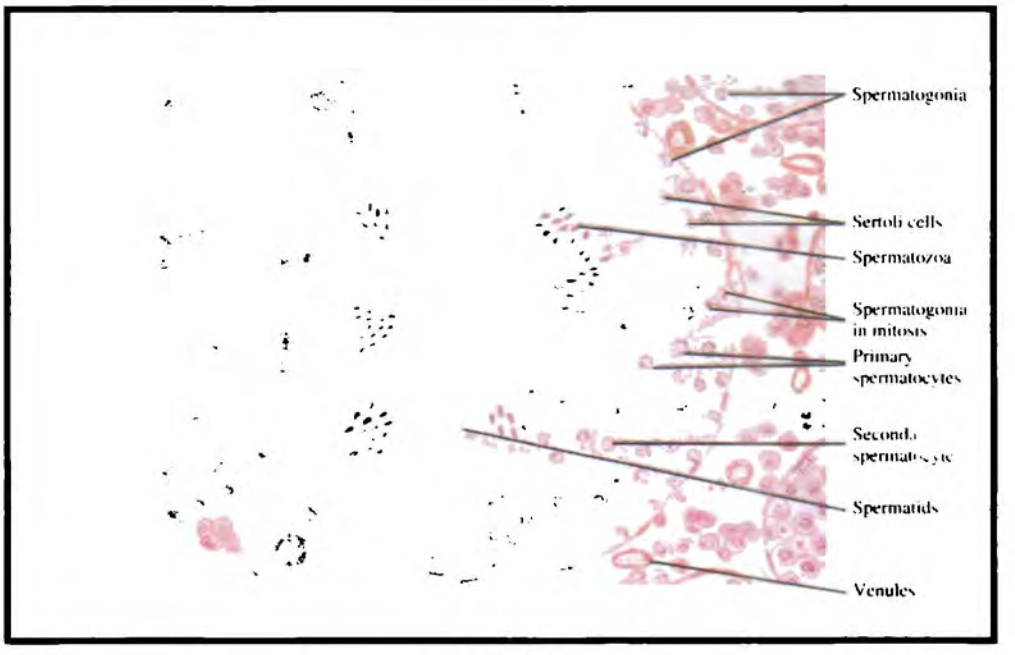


الشكل 10

ب مقطع عرضي مكبر لجزء من جدار الحالب (Di Fiore, 1995)

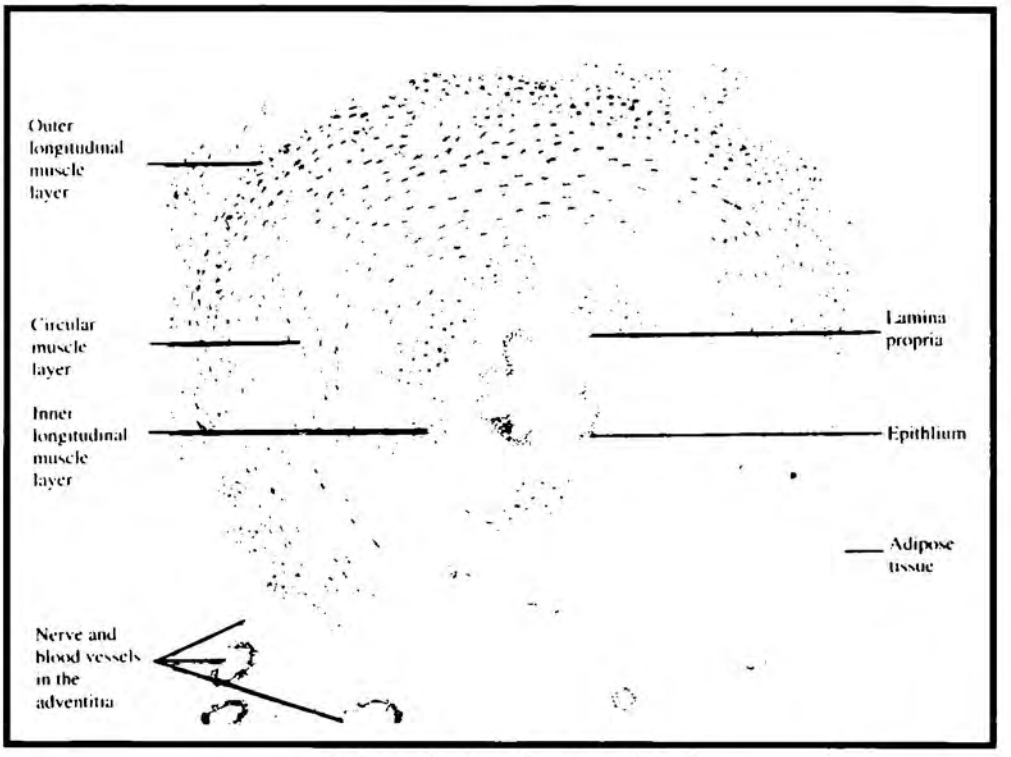


أ. مقطع عرضي لجزء من الخصية

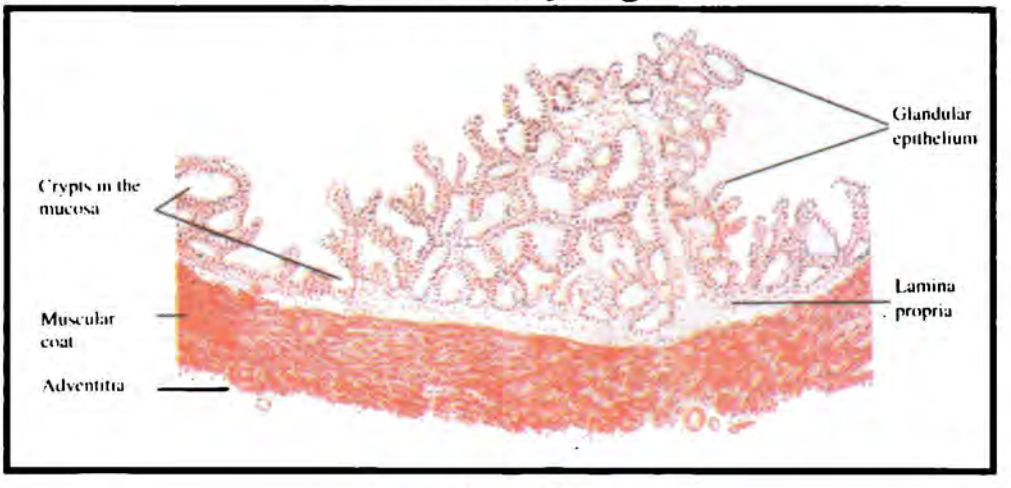


الشكل 11

ب مقطع عرضي مكبر لأنبوب منوي (Di Fiore, 1995)

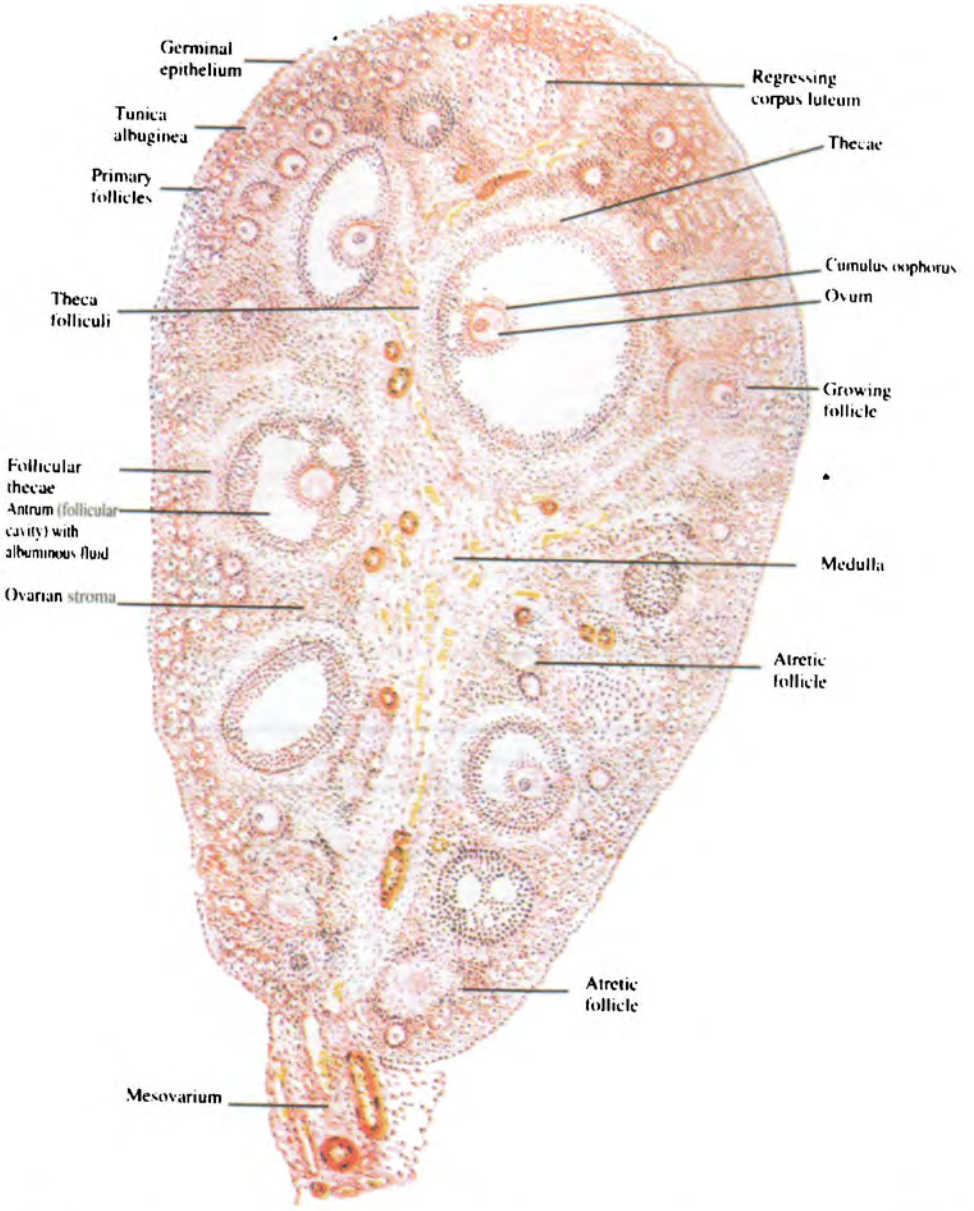


أ. مقطع عرضي في جدار الوعاء الناقل



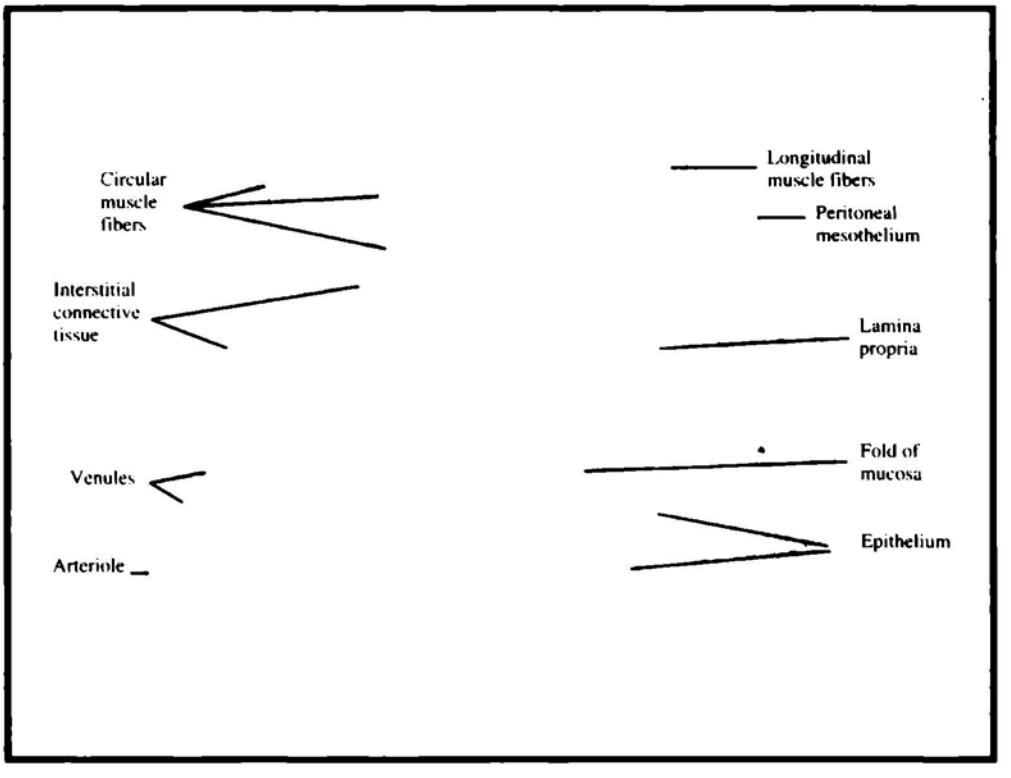
الشكل 12

ب مقطع عرضي في الحوصلة المنوية (Di Fiore, 1995)



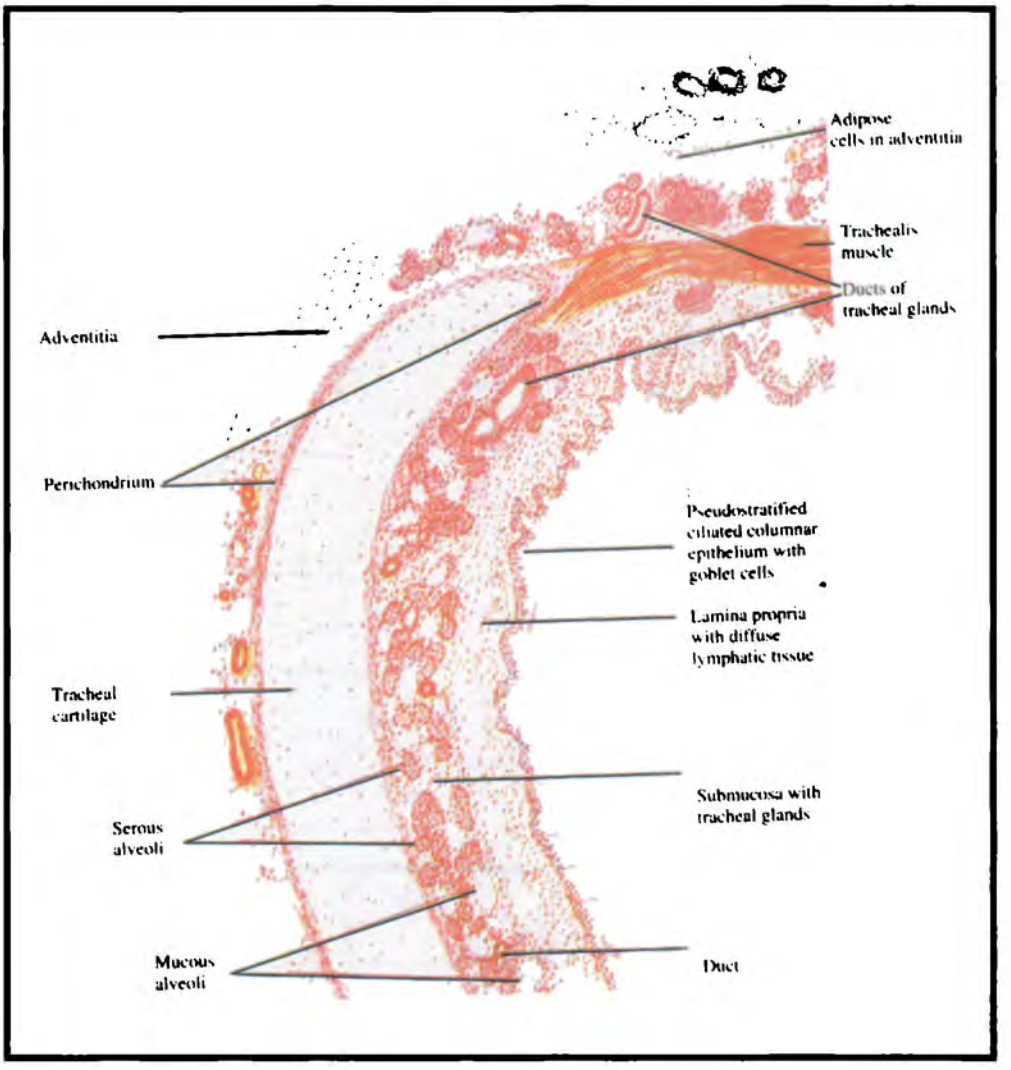
الشكل 13

مقطع طولي في المبيض (Di Fiore, 1995)



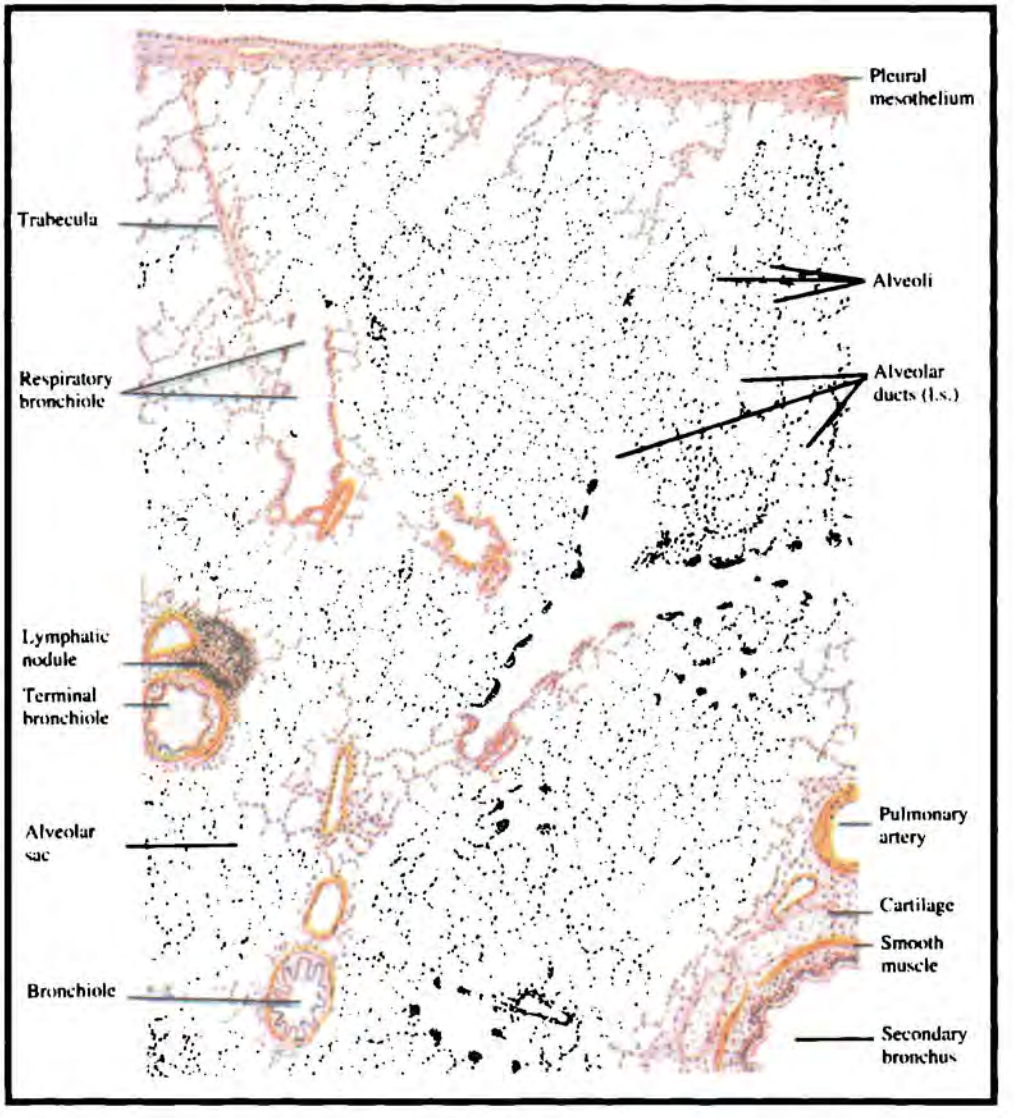
الشكل 14

مقطع عرضي في جدار قناة المبيض



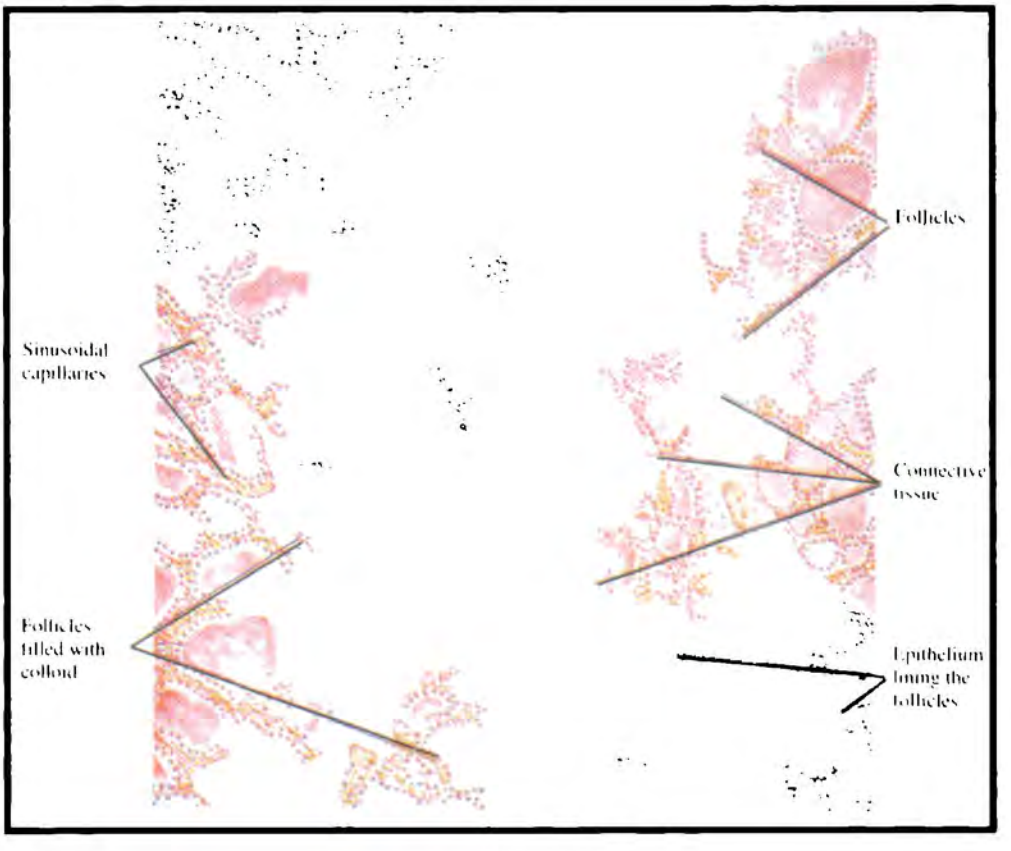
الشكل 15

مقطع عرضي في جدار القصبة الهوائية (Di Fiore, 1995)



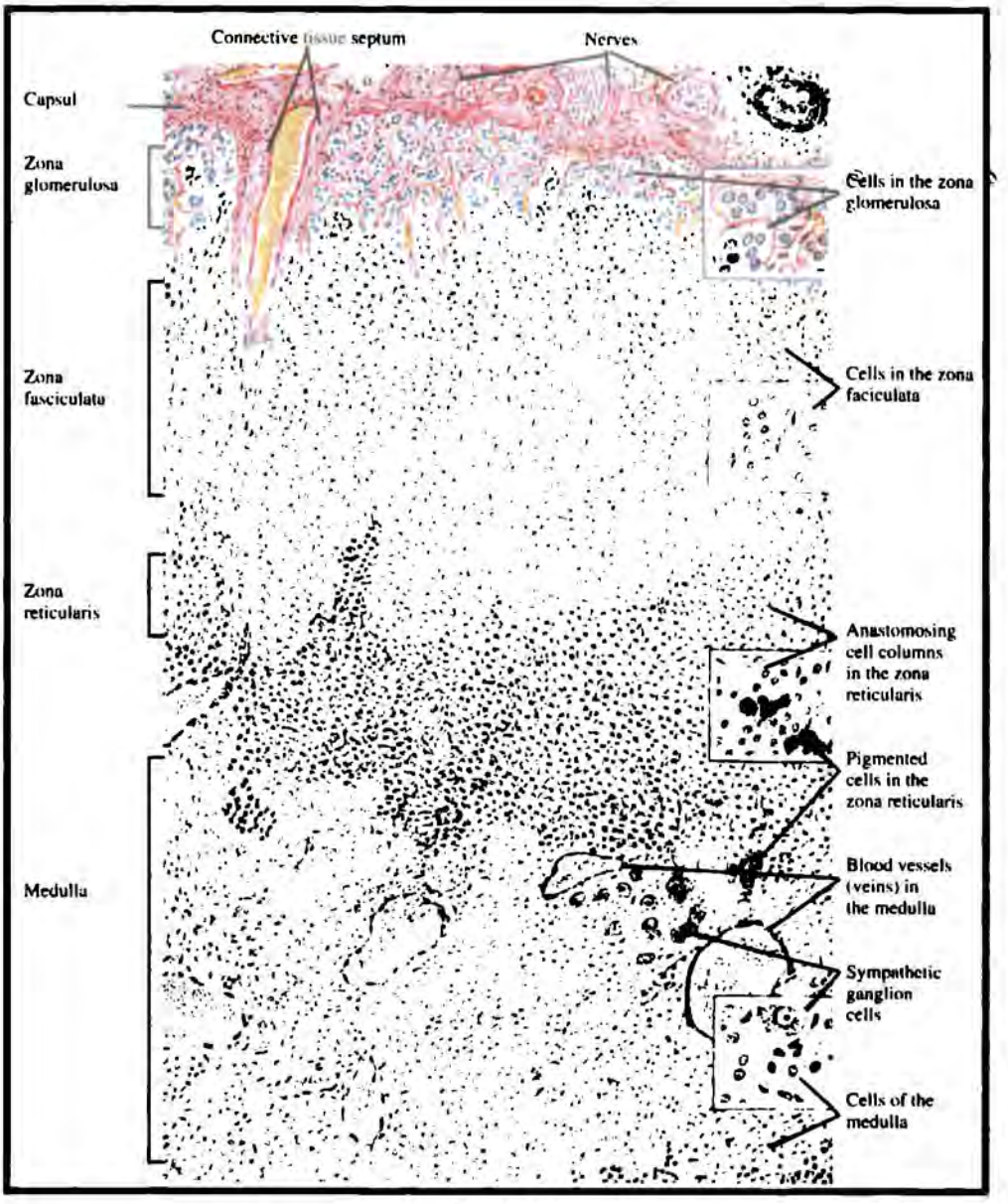
الشكل 16

مقطع عرضي في جزء من جدار الرئة (Di Fiore, 1995)



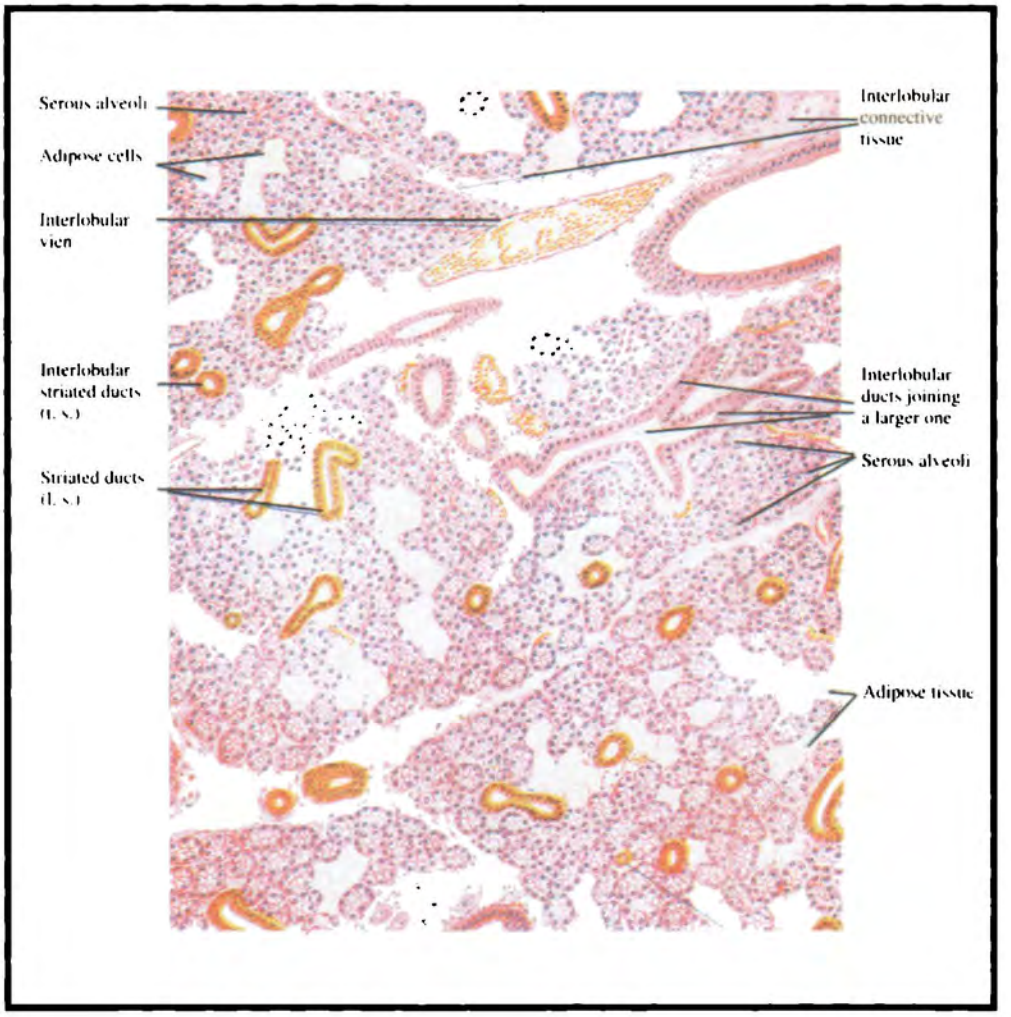
الشكل 17

مقطع عرضي في الغدة الدرقية (Di Fiore, 1995)



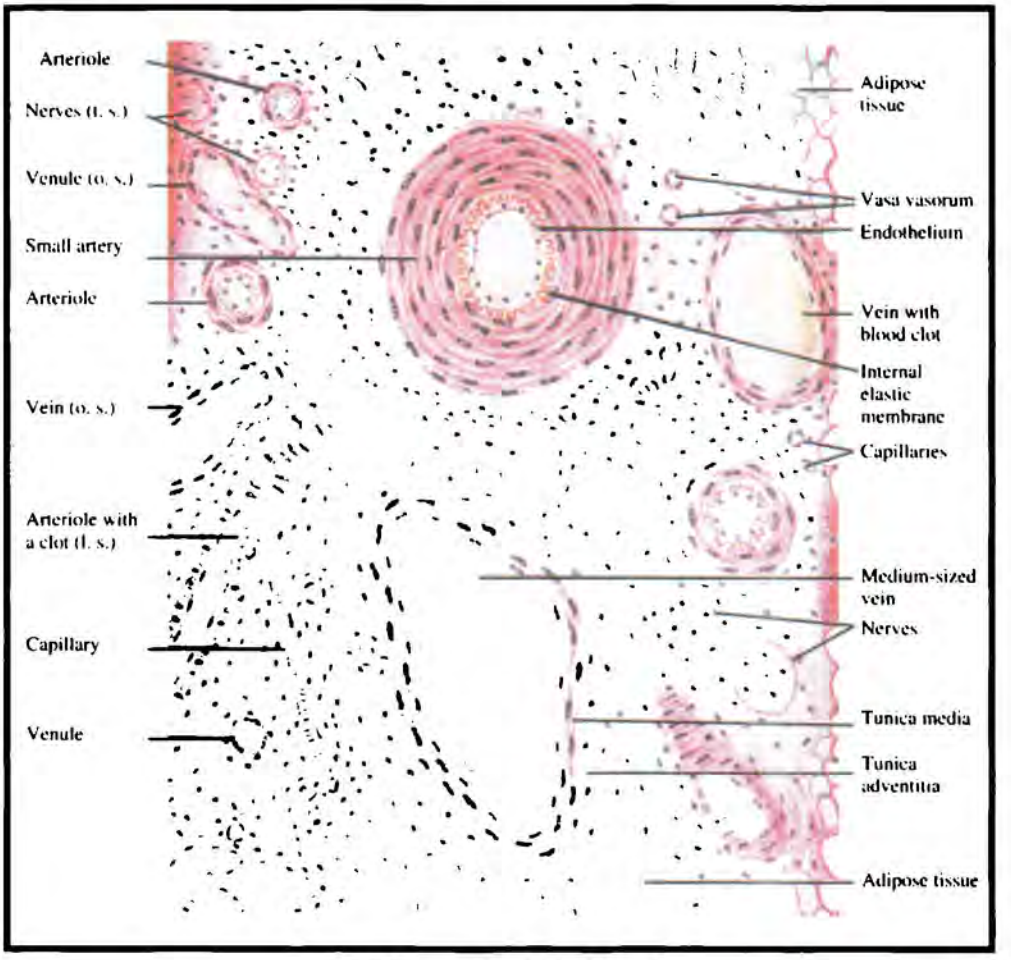
الشكل 18

مقطع عرضي في الغدة الكظرية (Di Fiore, 1995)



الشكل 19

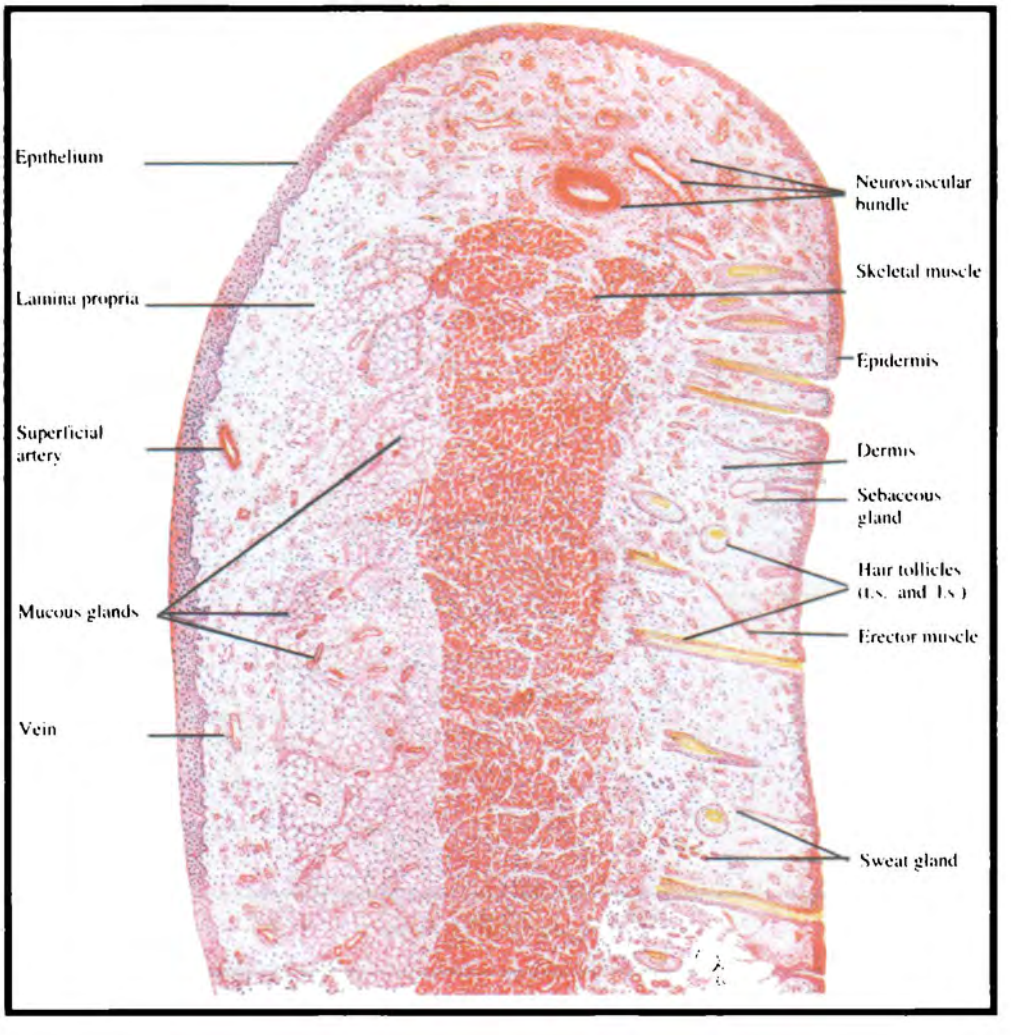
مقطع عرضي في الغدة النكفية (Di Fiore, 1995)



أ. مقاطع في أوعية دموية مختلفة

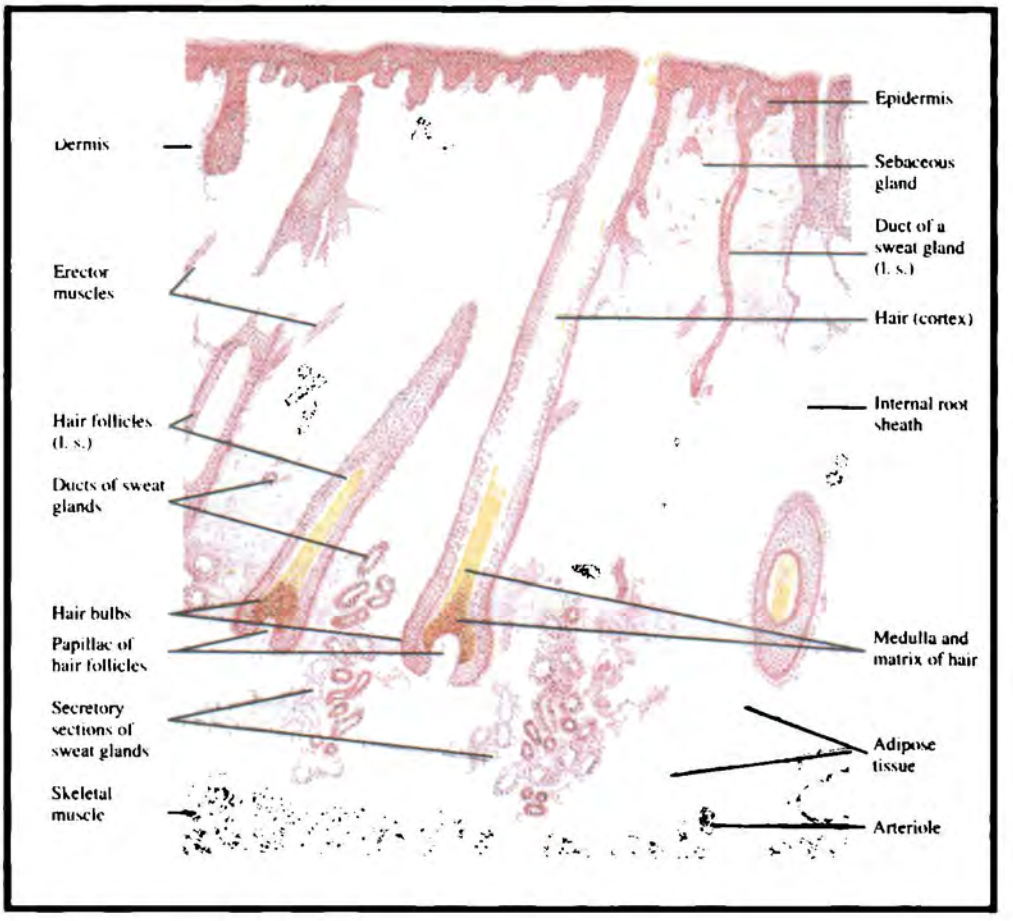
الشكل 20

ب مقطع عرضي في جدار وريد كبير (Di Fiore, 1995)



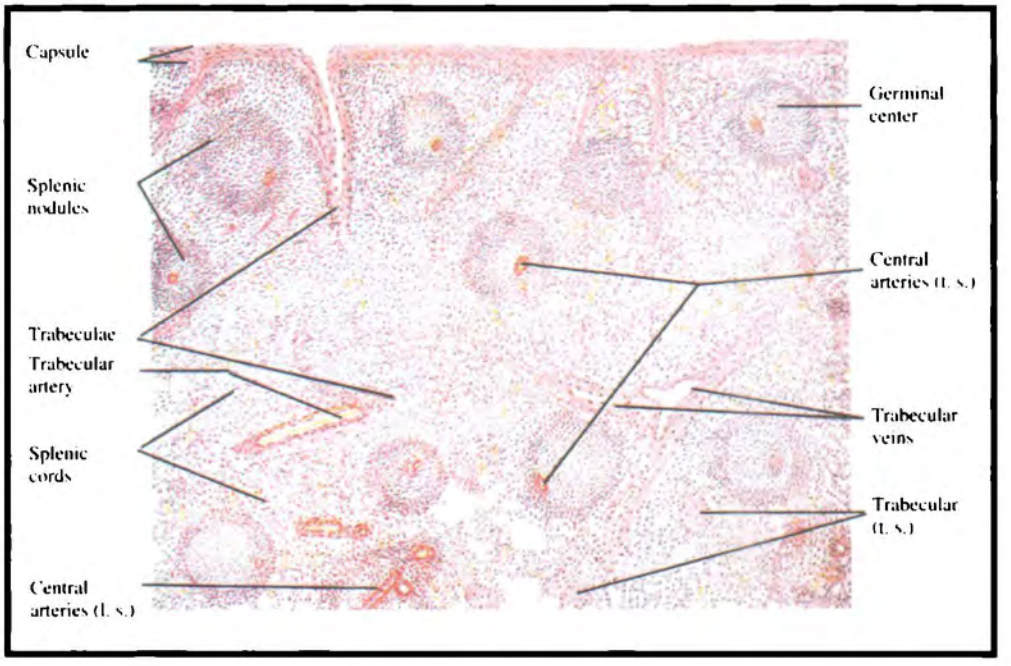
الشكل 21

مقطع طولي في شفة (Di Fiore, 1995)



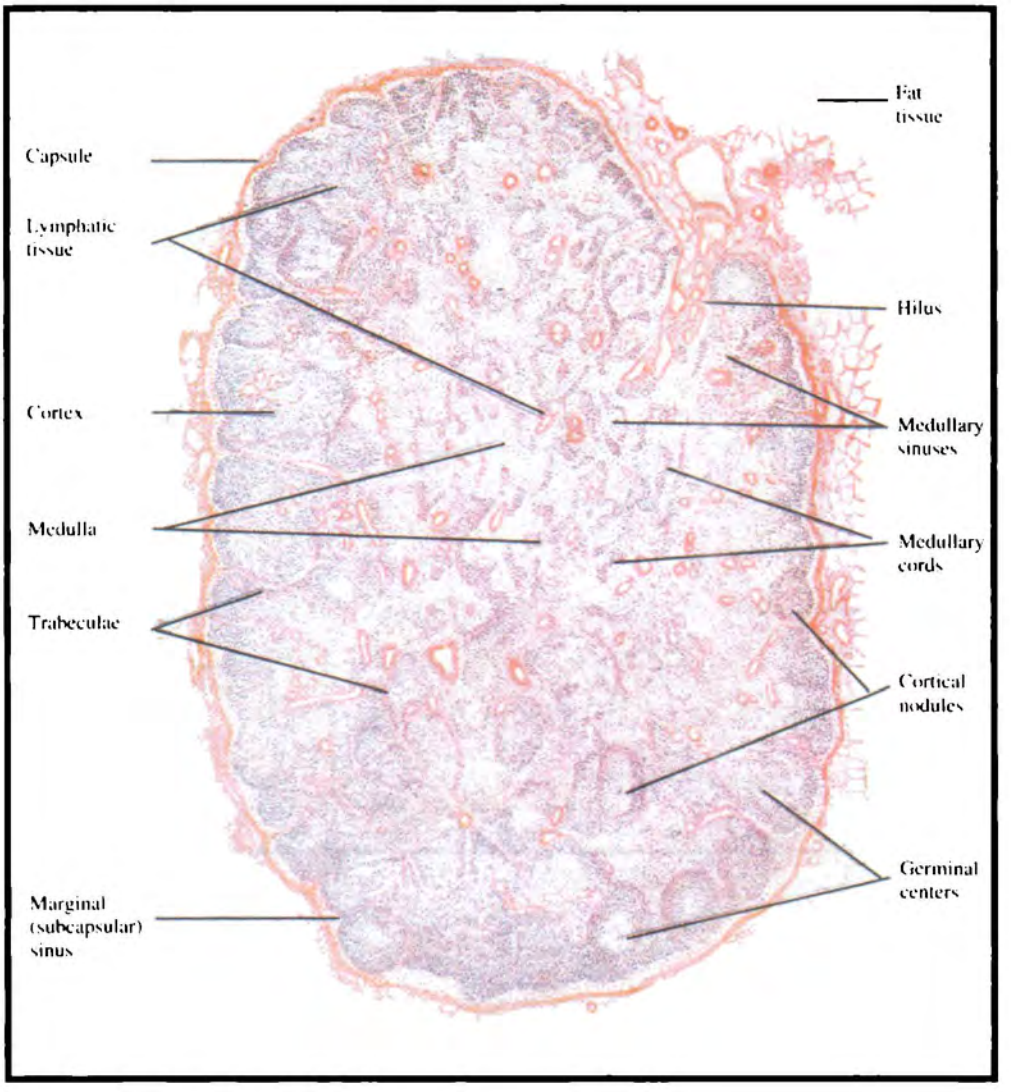
الشكل 22

مقطع في الجلد (Di Fiore, 1995)



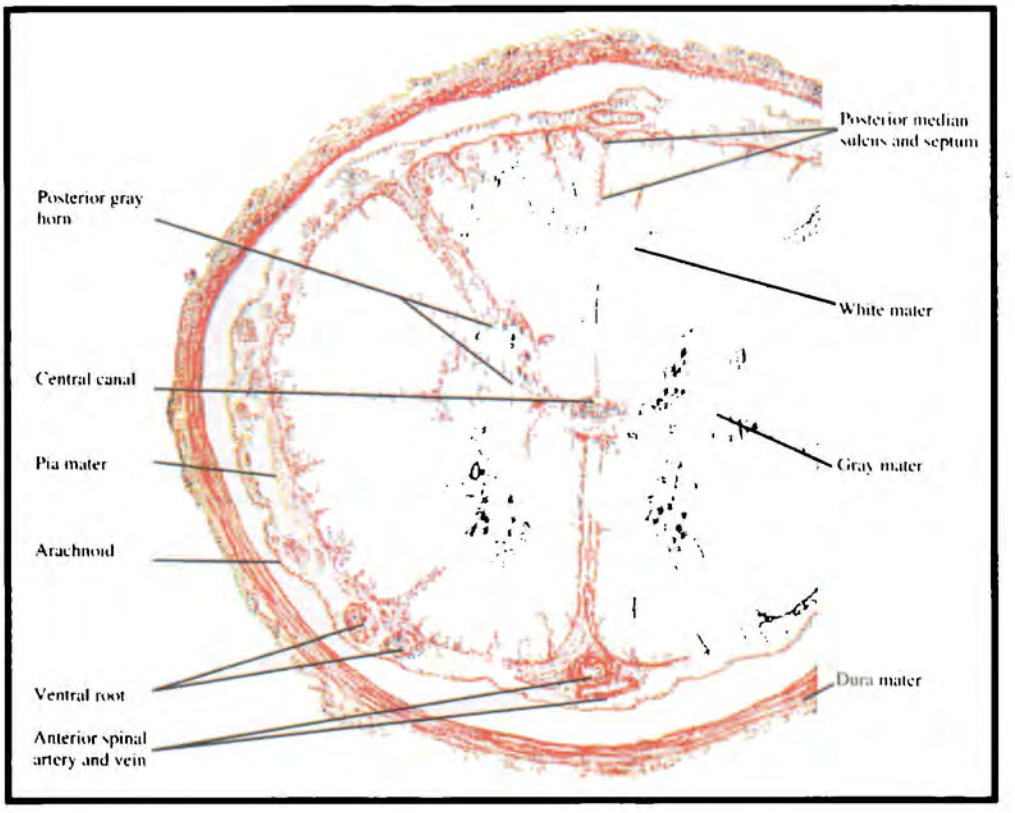
الشكل 23

مقطع في الطحال (Di Fiore, 1995)



الشكل 24

مقطع في عقدة لمفاوية (Di Fiore, 1995)



الشكل 25

مقطع عرضي في الحبل الشوكي (Di Fiore, 1995)

الفصل الحادي و العشرون

تحضير مقاطع من أنسجة نباتية

بعد أن تعرضنا إلى متطلبات وخطوات تحضير مقاطع من أنسجة حيوانية، نجد مناسباً الآن استعراض متطلبات وخطوات تحضير مقاطع من أنسجة نباتية. وقبل أن نخوض في غمار هذا الموضوع فإننا نورد الملاحظة التي بُنيت على خبرة طويلة في هذا المجال، وهي أن الطلبة الذين يرغبون التخصص في التحاليل الطبية لا يشعرون بحماس تجاه تحضير مقاطع نباتية، ذلك أن عملهم مستقبلاً سيكون معنياً بأنسجة الإنسان. وعلى الرغم من أن هذا الشعور مبرّر جزئياً، إلا أن التعامل مع الأنسجة النباتية له إيجابيات من أهمها تعزيز خبرة التعامل مع الأنسجة القاسية (ومن أبرز أمثلتها الأنسجة النباتية) لأنه من حيث الجوهر، تشكل هذه الخبرة تكراراً لخطوات تحضير المقاطع من الأنسجة الحيوانية باستثناء الوقت المقرر لكل خطوة، إذ يكون أطول في حال الأنسجة النباتية بسبب قساوتها نتيجة وجود الجدر الخلوية. وبالنسبة لطلبة العلوم الحياتية والزراعية، فإن هذا الموضوع يعتبر أساسياً جداً في مجالات التعليم والتعلم والبحث في مختبرات مختلفة.

تطبق هذه التحضيرات على جميع أنواع الأعضاء النباتية، كالجذر والساق والورقة، ويفضل استعمال الأعضاء الطرية أو حديثة النمو. وفي الحالات التي يكون فيها الوقت اللازم للتحضير ضيقاً، فإننا ننصح باستعمال أعضاء نباتية من بادرات نباتية، لأنها تمتاز بطراوتها، وفي هذا توفير للوقت، وخاصة أثناء عملية التشريب. ومن أفضل العينات النباتية المستعملة بشكل تقليدي لتحضير مقاطع منها القمم النامية لجذور البصل. فهذه الأنسجة طرية، وبتحضير مقاطع طولية منها يمكننا مشاهدة مراحل الانقسام المتساوي في الخلايا النباتية دون عناء يذكر.

1. المحاليل والوسائط اللازمة

1. محلول التثبيت: فورمالين – حمض خليك- كحول Fomalin Acetic Acid Alcohol F.AA.
2. محلول صبغة صفرانين Safranin:.
3. محلول صبغة الأخضر السريع Fast Green: .
4. محلول التمييز: Differentiating..
5. تدرج كحولي إيثيلي: 30٪، 50٪، 70٪، 95٪، 100٪.
6. وسط ترويق: زايلين.
7. وسط تشريب وطمر.
8. وسط لصق و وسط تغطية.

2. الأدوات والزجاجيات والأجهزة

ارجع للفصل المتعلق بتحضير مقاطع من أنسجة حيوانية.

3. الطريقة

1. ثبت أجزاء النبات اللازمة (جذر، ساق، ورقة) بمثبت FAA لمدة 12-24 ساعة، وكما هي الحال في الأنسجة الحيوانية، فإنه يفضل أن لا تزيد أبعاد قطعة النسيج عن 5×5×5 ملم.
2. اغسل الأنسجة مرتين بكحول إيثيلي 50٪، بحيث تكون مدة كل غسلة 8-12 ساعة.
3. أزل الماء من الأنسجة وذلك بتمريرها بتدرج كحولي صاعد (70٪، 95٪، 100٪)، مرتين لكل تركيز، مدة كل منها 2-4 ساعات.
4. روّق الأنسجة وذلك بنقلها إلى تغييرين من الزايلين، مدة كل منهما حوالي ساعتين.
5. ابدأ عملية التشريب بوضع الأنسجة بصحن سيراكوز يحتوي على مزيج من الزايلين والشمع بنسبة 1:1 لفترة 6ساعات. بعد ذلك أبدل هذا المزيج بشمع برافين ثلاث مرات، بحيث تكون فترة كل مرة 20-30 ساعة.

6. أطمر الأنسجة بشمع برافين طازج بقوالب ورقية، ثم قلّم قالب الشمع، وثبته على حامل مناسب، واقطع مقاطع بسمك 10 ميكرومترات، ثم حمّل المقاطع على شرائح ممسوحة ببياض البيض والجليسرين، ومضافاً إليها قطرات من ماء دافئ حتى تنفرد المقاطع. بعد ذلك جفف المقاطع على صفيحة دافئة.

ملاحظة:

- يفضل أن تكون مقاطع الجذر والساق والورقة عرضية، لدراسة التركيب النسيجي لهذه الأعضاء، وبالإمكان تحضير مقاطع طولية من قمة جذر نامية لدراسة مراحل الانقسام الحلوي.

7. ضع الشرائح بالزايلين لإزالة الشمع، ثم مرر الشرائح بتدرج كحول هابط (100٪، 90٪، 70٪، 50٪) بحيث تمكث الشرائح فترة 5-10 دقائق بكل محلول.
8. أنقل الشرائح إلى صبغة الصفرانين، واتركها لمدة 8-12 ساعة.
9. أشطف الشرائح ماء مقطر عدة مرات لإزالة الصفرانين الزائد، ثم انقلها إلى كحول إيثيلي 70٪ مضافاً إليه قطرتين من HCI مركز لإزالة الصبغة غير المخصصة. افعل ذلك مرتين.
10. انقل الشرائح إلى كحول 95٪ واتركها فيه لمدة 15 ثانية، ثم انقلها إلى كحول مطلق مرتين، لفترة 15 ثانية في كل مرة.
11. إصبغ الشرائح بنقلها لجرة صبغ تحتوي أخضر سريع، واتركها لمدة دقيقة إلى أربع دقائق.
12. انقل الشرائح بعد ذلك إلى تغييرين من محلول التمييز لفترة 10 دقائق في كل منهما.
13. مرّر الشرائح بثلاثة تغييرات من زايلين، بحيث تبقى 10 دقائق في كل تغيير.
14. غط الشرائح ببلسم كندا وغطاء مناسب، وجففها على منضدة تسخين، ثم نظفها وادرسها بالمجهر الضوئي.

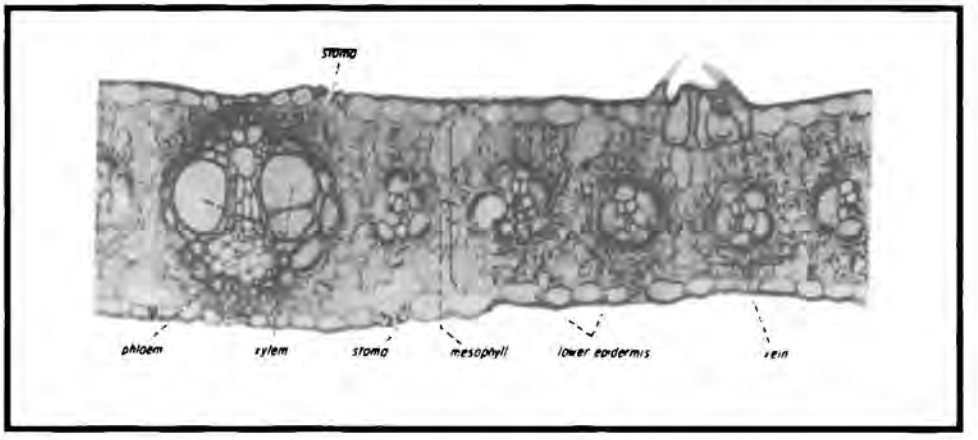
4. النتيجة:

أنظر إلى الأشكال 1-6 لمعرفة مكونات العضو النباتي المقرر لك.

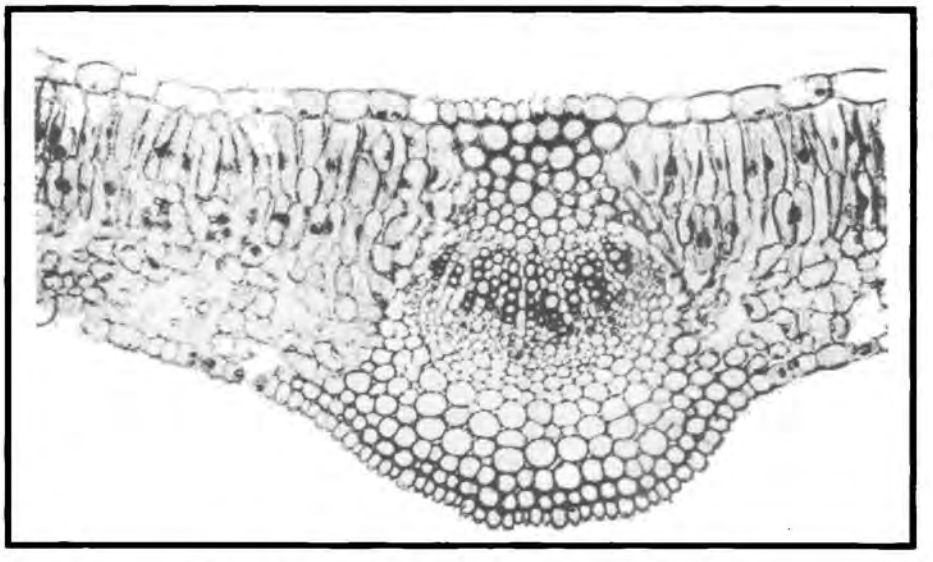
كذلك ننصح بالرجوع إلى كتاب يعالج «تشريح النبات» لمعرفة المزيد من المعلومات عن الأعضاء النباتية المقررة لك.

ملاحظات:

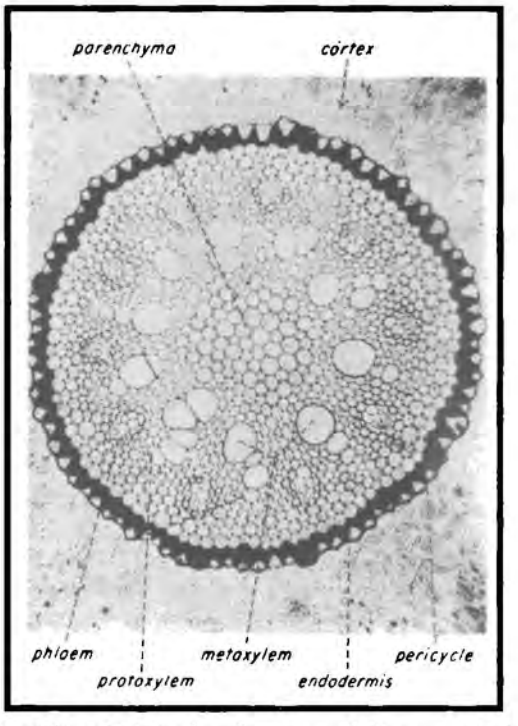
1. يجب استعمال شفرات حادة للحصول على أجزاء من الأعضاء النباتية دون تمزق لأطرافها.
2. يجب تحديد نوع المقطع المطلوب، لأن ذلك هام في تحديد توجيه العينة أثناء عملية الطمر. وبشكل عام، تفضّل المقاطع العرضية، باستثناء القمم النامية لجذور البصل حيث يطلب عادة تحضير مقاطع طولية لإظهار مراحل الإنقسام المتساوي.
3. يجب أن تكون الأنسجة عند قاع أي وعاء وخاصة مع نهاية عمليات التثبيت والغسل وإزالة الماء والترويق والتشريب. وبعكس ذلك، فإن ظهور الأنسجة طافية في المحاليل والوسائط المستعملة خلال الخطوات المذكورة يعني أن تلك الخطوات لم تتم بشكل صحيح.
4. كي تقوّم تحضيراتك، ارجع للأشكال المبينة تالياً، والتي تظهر التركيب المجهري للأعضاء النباتية.



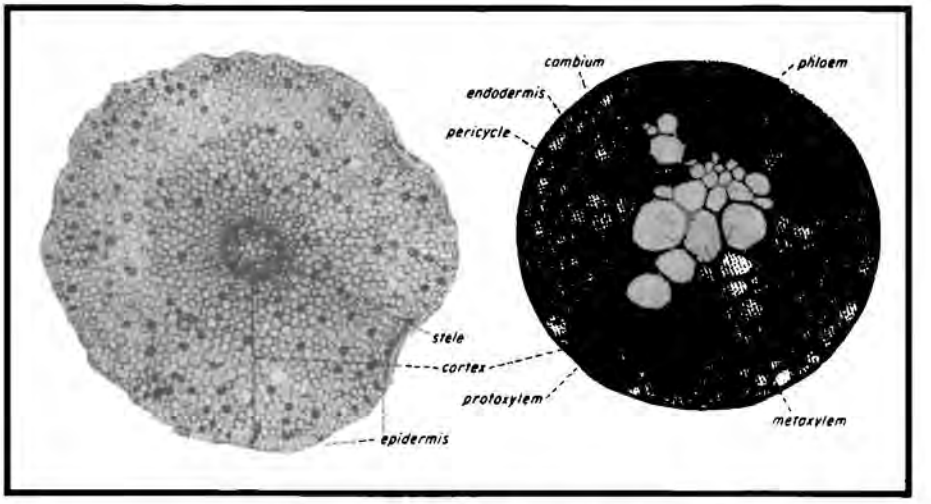
شكل 1: صورة لمقطع عرضي في ورقة نبتة ذات فلقة واحدة



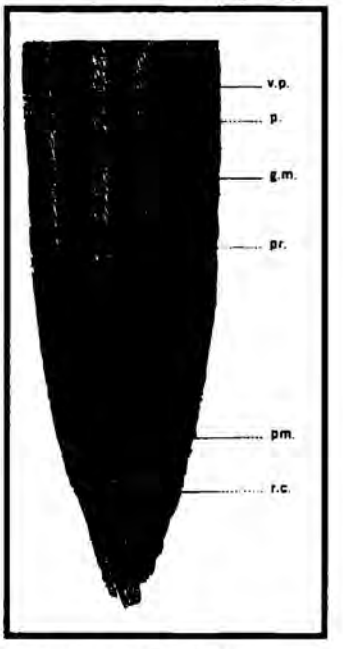
شكل 2: صورة لمقطع عرضي في ورقة نبتة ذات فلقتين



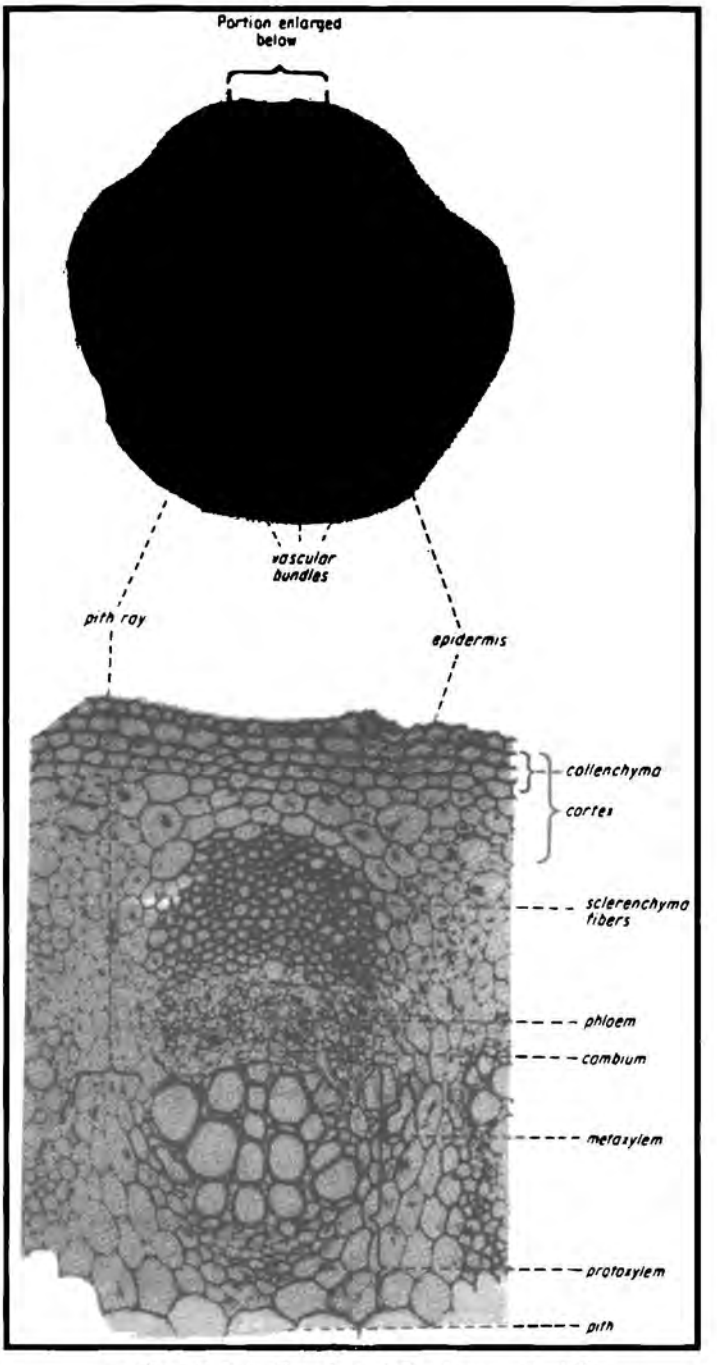
شكل 3: صورة لمقطع عرضي في جذر نبتة ذات فلقة واحدة



شكل (4) صورة لمقطع عرضي في جذر نبتة ذات فلقتين
أ. مقطع كلّي. ب.الجزء الأوسط مكبراً.

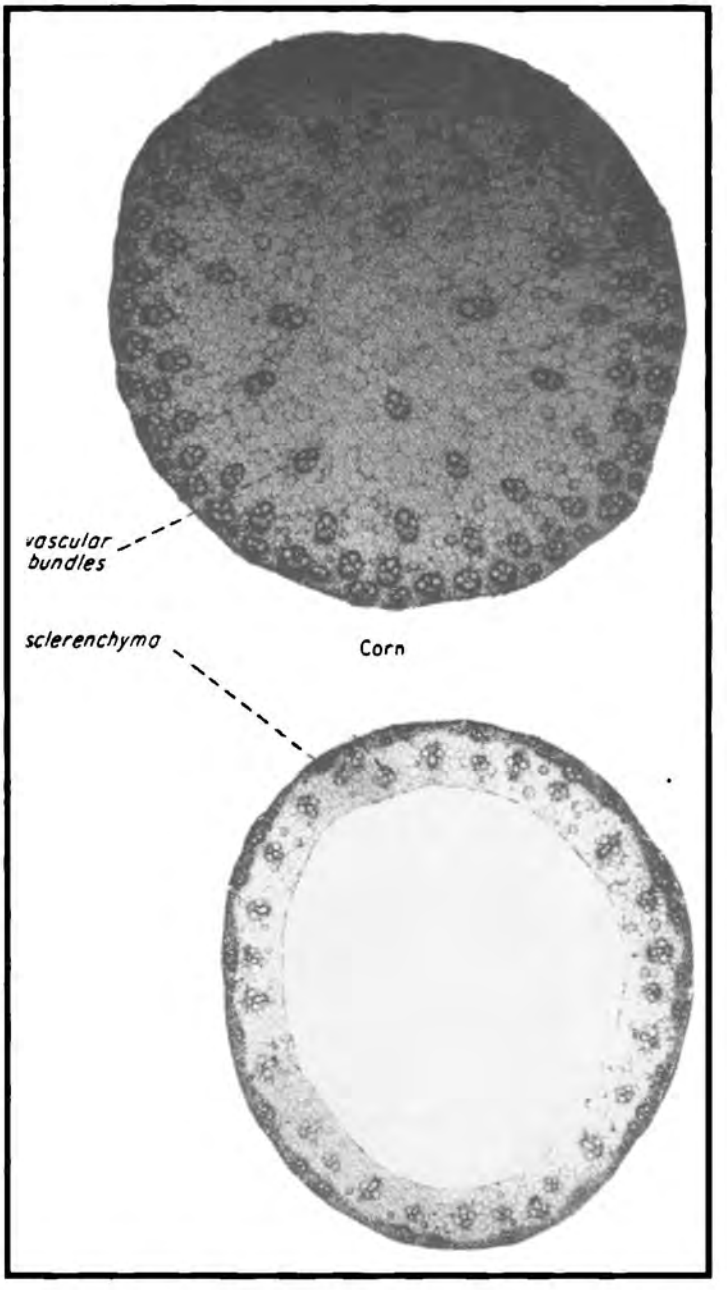


شكل 5: صورة لمقطع طولي في قمة جذر نامية
g.m. = نسيج مرستيمي؛ p. = أدمة أولية؛ p.m.= مرستيم أولي؛ p.r.= كامبيوم أولي؛
v.p.= أوعية خشبية؛ r.c.= غطاء الجذر



شكل 6: صورتان لمقطعين في ساق نبتة ذات فلقتين

أ. مقطع كلّي؛ ب. جزء مكبر من محيط الساق.



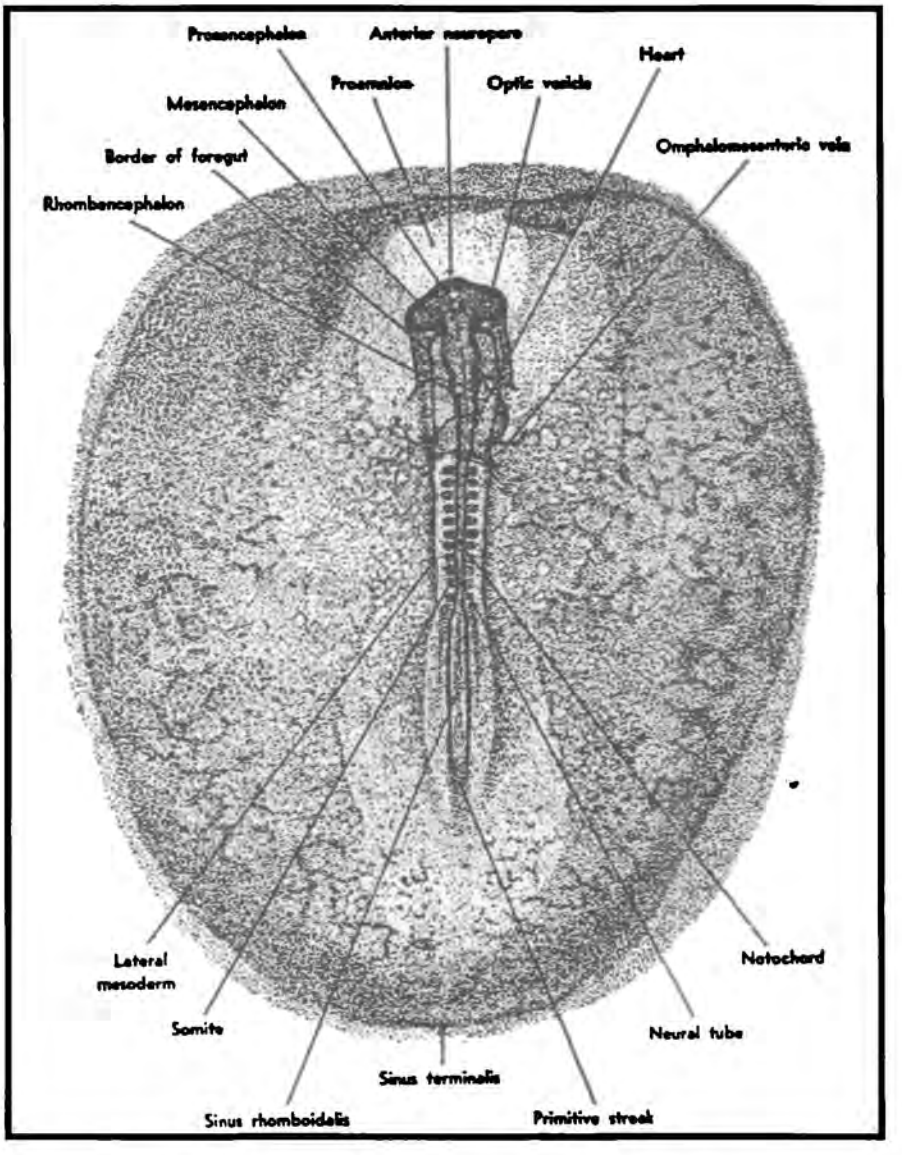
شكل 7: صورتان لمقطعين عرضيين في ساقي نبتتين من ذوات الفلقة الواحدة
أ. في الذرة. ب. في القمح.

الفصل الثاني والعشرون

تحضيـــر مقاطع متسلسلة

يعتبر تحضير مقاطع متسلسلة من عينة بيولوجية امراً مطلوباً لاستكمال دراسة نفس العينة بعد دراستها كنموذج كامل. إن تحضير النموذج الكامل يعطي فكرة عن مورفولوجية العينة، أما دراسة تكوينها الداخلي بشكل متدرج من الأمام الى الخلف، او من الظهر الى البطن، او من جنب لآخر، فإنه يتطلب الحصول على مقاطع متسلسلة من تلك العينة. وفي علم الأجنة، يعتبر توفير مقاطع متسلسلة لمرحلة جنينية معينة أمراً لا بد منه.

المثال الذي سنأخذه هنا هو تحضير مقاطع عرضية متسلسلة من جنين دجاج، عمره 33-36 ساعة (شكل 1). وبالنسبة للحصول على البيض، وكيفية معاملته، وكذلك بالنسبة للأدوات والوسائط والأجهزة والزجاجيات اللازمة، فإنها نفس تلك التي تستعمل لتحضير نماذج كاملة وتحضر مقاطع من أنسجة حيوانية. أما بالنسبة للمحاليل اللازمة، فإنه بالإضافة الى محلول تثبيت، يحتاج محضر المقاطع الى محلولي صبغتين هما هيماتوكسلين وإيوسين اللذان يستعملان في صبغ أنسجة حيوانية مختلفة.



شكل 1: رسم لنموذج كامل لجنين دجاج بعمر 36 ساعة

1. لوازم التحضير

2. الطريقة

1. قم بالخطوات أ الى ط التي ذكرت لتحضير نماذج كاملة من جنين الدجاج.
2. اغسل الجنين بكحول 70٪ عدة مرات حتى يزول اللون الأصفر منه.
3. استبدل الكحول 70٪ بصبغة إيوسين حتى يأخذ الجنين الصبغة. وتعتبر هذه الخطوة هامة حتى يمكن تمييز الجنين عن الشمع المحيط به فيما بعد.
4. استبدل الإيوسين بكحول 95٪، ثم بكحول مطلق، وزايلين، مرتين في كل وسط، بحيث تكون فترة كل تغيير 10-15 دقيقة.
5. ابدأ عملية التشريب وذلك بغمر الجنين في خليط من حجمين متساويين من الشمع المنصهر والزايلين لمدة 20 دقيقة.
6. استبدل خليط البرافين-الزايلين الشمع منصهر طازج ومرشح. افعل ذلك مرتين، فترة كل منهما 30-45 دقيقة.
7. اطمر الجنين بشمع طازج، مراعياً وضع الجنين بالنسبة لقالب الطمر بحيث تكتب على قالب الطمر الورقي اتجاه رأس الجنين. وتحديد وضع الجنين هام جداً لمعرفة التسلسل الصحيح للمقاطع.
8. ثبت قالب الشمع على حامل مناسب، مراعياً الأمور الأساسية في التحضير لعملية القطع.
9. اقطع الجنين الى مقاطع بسمك 15 ميكرومتراً، واحصل على شرائط من المقاطع ذات طول مناسب.
10. حمل المقاطع على شرائح نظيفة يكون تسلسلها معروفاً وذلك بترقيمها بقلم شمعي. اترك المساحة المناسبة على طرف كل شريحة لورقة الوسم.

ملاحظات:

- يمكن تحميل المقاطع على شرائح نظيفة ومتسلسلة أولاً بأول.

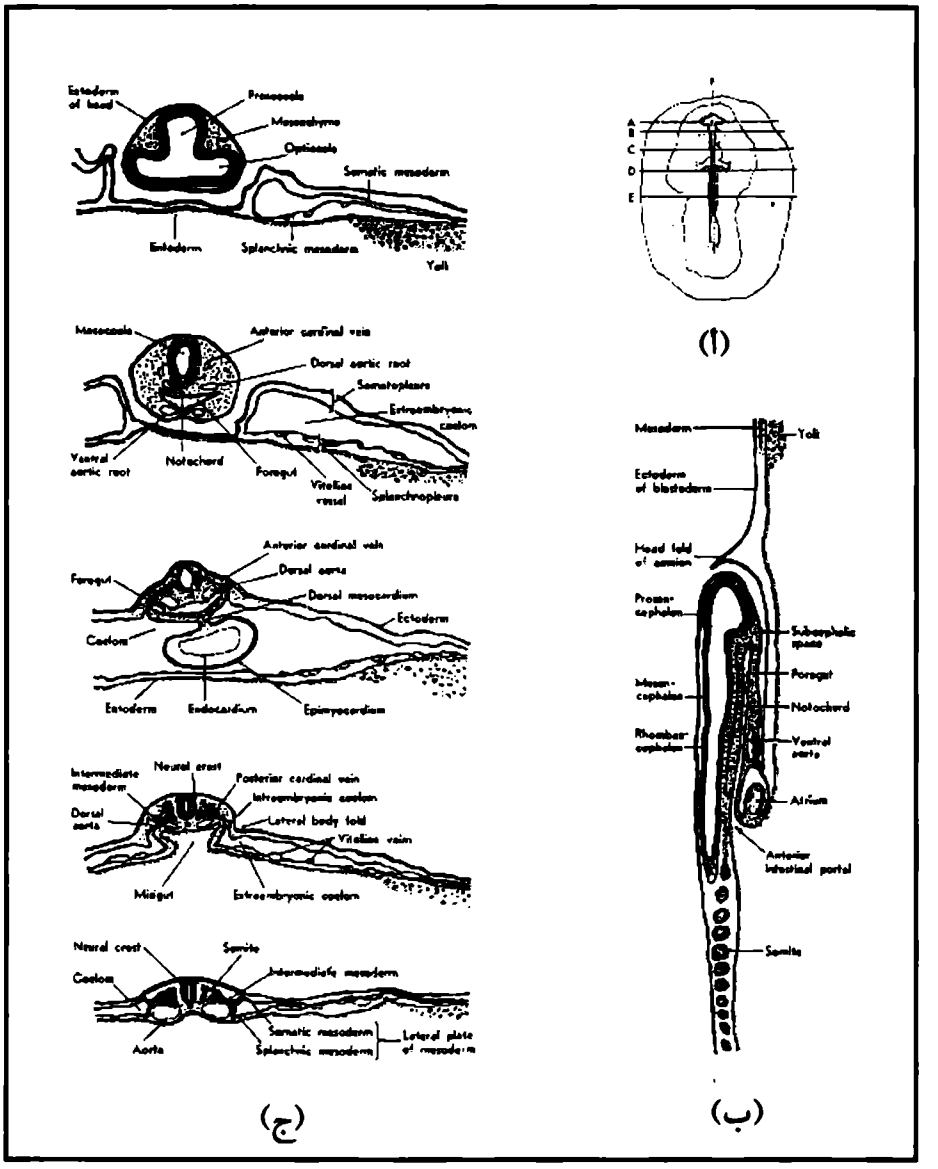
- إذا لم تسمح الظروف بتحميل المقاطع بعد قطعها، فإنه يمكن تخزينها في علب خشبية او ورقية مناسبة في مكان مناسب وعند درجة حرارة لا تتجاوز 35° س.
- إذا ما خزنت شرائط المقاطع فإنه يجب مراعاة تسلسلها الصحيح ووضع أرقام مقابل كل منها واسهم تبين ذلك التسلسل.

11. جفف الشرائح على صفيحة دافئة تزيد درجة حرارتها عن 35° س لعدة دقائق.
12. حضّر لعملية صبغ الشرائح وذلك بإزالة الشمع أولاً بتمرير الشرائح بالزايلين، ثم أزل الزايلين منها وذلك بتمريرها بتدرج كحولي هابط (100٪ وحتى 30٪).
13. أصبغ الشرائح بهيماتوكسلين لمدة 2-5 دقائق، ثم اغسلها تحت ماء جار ثم مرر الشرائح بتدرج كحولي تصاعدي حتى كحول 70٪، وبعد ذلك بصبغة إيوسين، تماماً كما فعلت عند صبغ أنسجة حيوانية.
14. إزل الماء من الأنسجة كلياً بتمرير الشرائح بكحول 95٪ ثم بكحول مطلق، مرتين في كل تركيز، ولمدة دقيقتين كل مره.
15. روّق المقاطع، ثم غطها ببلسم كندا وغطاء زجاجي.
16. جفف الشرائح على صفيحة دافئة، ثم نظفها واخزنها في مكان مناسب.

3. النتيجة

أ. ارجع للشكل 2 ولاحظ المقاطع المختلفة، واعرف مستوى القطع للحصول على تلك المقاطع.

ب. اربط شكل ومكونات الجنين المستعمل لتحضير المقاطع المتسلسلة وهذه المقاطع، وذلك بالرجوع الى شكل 1 لنموذج كامل لهذا الجنين.



شكل 2: رسوم تبين نموذجاً كاملاً لجنين دجاج عمره 33-36 ساعة (أ)، ومقطعاً سهمياً وسطياً (ب)، ومقاطع مختارة عند مستوى الدماغ الأمامي (ج)، والمعي الأمامي (د)، والقلب (هـ)، والمعي الأوسط (و)، ونهاية محور الجنين (ز).

ملحق (1)

الأوزان الذرية Atomic Weights

فيما يلي جدول بالأوزان الذرية للعناصر الأكثر شيوعاً في المركبات التي تستعمل في التحضير المجهري، وهي مرتبة أبجدياً باللغة الانجليزية .

الاسم بالعربية	الاسم بالانجليزية	الرمز	الوزن الذري
الومنيوم	Aluminum	Al	27
باريوم	Barium	Ba	137
بروم	Bromine	Br	80
كادميوم	Cadmium	Cd	112
كالسيوم	Calcium	Ca	40
كربون	Carbon	C	12
كلور	Chlorine	Cl	35.5
كروم	Chromium	Cr	52
كوبالت	Cobalt	Co	59
نحاس	Copper	Cu	64
ذهب	Gold	Au	197
هيدروجين	Hydrogen	H	01
يود	Iodine	I	127
حديد	Iron	Fe	56
رصاص	Lead	Pb	207
ليثيوم	Lithium	Li	07
مغنيسيوم	Magnesium	Mg	24
منجنيز	Manganese	Mn	55
زئبق	Mercury	Hg	201
ازوت (نيتروجين)	Nitrogen	N	14
أوزميوم	Osnium	Os	190
اكسجين	Oxygen	O	16
فوسفور	Phosphorous	P	31
بوتاسيوم	Potassium	K	39
فضه	Silver	Ag	108
صوديوم	Sodium	Na	23
كبريت	Sulphur	S	32
يورانيوم	Uranium	U	238
خارصين	Zinc	Zn	65

ملحق (2)

محاليل ذات استعمال عام

1. كحول حامضي Acid Alcohol (محلول تمييز)

كحول إيثيلي (70٪) ethyl alcohol 100.0مل

حمض فيدروكلوريك مركز HCl (concentrated) ..... 1.0 مل

2. كحول قاعدي Alkaline Alcohol

كحول إيثيلي (70٪) ethyl alcohol 100.0مل

حمض فيدروكلوريك مركز ammonia (concentrated) ..... 1.0 مل

3. محلول تنظيف الزجاجيات

أ. محلول مركز

ثنائي كرومات البوتاسيوم potassium dichromate ..... 20.0 غم

ماء مقطر distilled water ..... 200.0 مل

أذب ثنائي كرومات البوتاسيوم بالماء، وبعد أن يبرد، أضف

حمض الكبريتيك المركز H_2SO_4 (concentrated) ..... 1.0 مل

ب. محلول مخفف

ثنائي كرومات البوتاسيوم 2٪ potassium dichromate ..... 9 أجزاء

حمض الكبريتيك H_2SO_4 ..... 1 جزء

4. محلول لوجول Lugol Solution

محلول لوجول مركز

بلورات يود iodine crystals 10غم

يوديد بوتاسيوم potassium iodide ..... 2.0 غم

ماء مقطر distilled water ..... 12.0 مل

5. محلول لوجول حسب صيغة وايجرت Weigert variation

بلورات يود iodine crystals ..... 1.0 غم

يوديد بوتاسيوم potassium iodide ..... 2.0 غم

ماء مقطر distilled water 100.0مل

6. محلول لوجول حسب صيغة جرام Gram variation

بلورات يود iodine crystals 10غم

يوديد بوتاسيوم potassium iodide ..... 2.0 غم

ماء مقطر distilled water 300.0مل

في جميع الحالات، أذب يوديد البوتاسيوم أولاً، وبعد ذلك يذوب اليود في المحلول بسرعة.

ملحق (3)

تحضير محاليل أحادية العيارية

1 ع* (1N)= وزن مكافئ في لتر محلول

المادة	الرمز الكيماوي	الحجم المأخوذ منها	حجم الماء المقطر
حامض الخليك	CH_3COOH	57 مل	943 مل
هيدروكسيد الأمونيوم	NH_4OH	56 مل	944 مل
حامض الهيدروكلوريك	HCl	86 مل	914 مل
حامض النيتريك	HNO_3	64 مل	936 مل
حامض الكبريتيك	H_2SO_4	27 مل	973 مل

(*) ع= عياري

ملحق (4)

إعادة صبغ شرائح بهتت صبغتها

كثيراً ما يحدث أن تبهت ألوان من التحضيرات التي تختزن لمدة طويلة او إذا عرضت لضوء ساطع مراراً وتكراراً. ونستعمل الطريقة التالية لإزالة الأصباغ من مثل هذه التحضيرات تمهيداً لإعادة صبغتها من جديد.

الطريقة

1. إزل الغطاء الزجاجي بنقع الشرائح في الزايلين حتى ينزلق الغطاء عنها، وأحذر أن تستعمل الضغط في إزاحة الغطاء، فإن هذا يؤدي الى تمزق المقطع. قد تستغرق هذه الخطوة يوماً او أكثر.
2. استمر في نقع الشريحة في الزايلين حتى تتخلص من وسط التغطية (بلسم كندا، مثلاً).
3. مر الشرائح في تدرج هابط من الكحول (100٪-70٪، 50٪) ثم ضع الشرائح بالماء.
4. عالج الشرائح بمحلول تركيزه 0.5٪ من برمنجنات البوتاسيوم (0.5 غم/ في 100 مل ماء) لمدة 5 دقائق
5. إغسل في ماء جار لمدة 5 دقائق.
6. بيض بواسطة 0.5٪ حمض الأوكساليك تركيز 0.5٪ (0.5غم/ 100 مل ماء) حتى يصبح المقطع عديم اللون. وتستغرق هذه العملية حوالي 1-2 دقيقة. وإذا ظلت الصبغة القديمة عالقة بالمقطع فأعد الخطوات 4 و 5 و6 مرة ثانية.
7. إغسل جيداً في ماء جار لمدة 5 دقائق او أكثر.
8. أعد صبغ المقطع مستخدماً محاليل مخففة من الأصباغ المناسبة، او اجعل مدة الصبغ اقصر مما هو معتاد. وهذا الاحتياط واجب لأن برمنجنات البوتاسيوم وحمض الأوكساليك تجعل الأنسجة حساسة على نحو خاص لصبغات الهيماتوكسيلين وانيلين النووية.

مسرد المصطلحات

Dictionary

A

Acidic stains	أصباغ حامضية
Acidophilic	محب للحامض
Artifacts	أشكال مصطنعة
Autolysis	تحلل ذاتي
Auxochromes	مساعدات اللون

B

Basic stains	اصباغ قاعدية
Basophilic	محب للقاعدة
Bulk staining	صبغ كلي

C

Carbowax	شمع كربوني
Clearing	ترويق
Clearing Agents	وسائط ترويق
Clearance Angle	زاوية الخلوص
Chromogen	مولد اللون
Chromophore	حامل اللون
Crystallization	تبلور الكريوستات
Cryostat	كريوستات

D

Dehydration	إزالة الماء
Dehydrants	مزيلات الماء
Differentiation	تمييز
Direct staining	صبغ مباشر
Dye	صبغة

E

Embedding	طمر

	F
Fixation	تثبيت
Fixative	مثبت
Freezing method	طريقة التجميد
Freezing microtome	جهاز التقطيع الجليدي
	G
Gelatine	الجيلاتين
	H
Histochemistry	الكيمياء النسيجية
Honing	تجليخ او سن
	I
Immersion	غمر
Indirect Staining	صبغ غيرمباشر
Infiltration	تشريب او تخلل
Injection	حقن
Intravital Staining	الصبغ الحيوي الداخلي
	K
Knife Angle	زاوية القطع
	M
Metachromy	تحول لوني
Microtechnique	علم التحضير المجهري
Microtome	جهاز التقطيع
Microtomy	عملية التقطيع
Mordant	مرسح الصبغة
Mounting	تحميل (تغطية)
Mounting medium	وسيط التحميل
	N
Neutral stains	أصباغ حيادية
	P
Paraffin wax	شمع البرافين

Paraplast	نظير البلاستيك
Perfusion	إرواء
Progressive staining	صبغ تقدمي
R	
Regressive staining	صبغ تراجعي
Rocking microtome	جهاز التقطيع الهزاز
Rotary microtome	جهاز التقطيع الدوار
Ribbon	شريط من المقاطع
S	
Sealing	إغلاق (قفل)
Sectioning	تقطيع
Sections	مقاطع
Sledge microtome	جهاز التقطيع المزلاجي
Sliding microtome	جهاز التقطيع الإنزلاقي
Smearing	مسح او فرش
Squashing	هرس او دعك
Staining	صبغ
Stroppin	صقل
Supravital Staining	الصبغ الحيوي الخارجي
T	
Trimming	تقليم
U	
Ultramicrotome	جهاز التقطيع الدقيق
V	
Vital Staining	صبغ حيوي
W	
Washing	غسل
Whole mounts	نماذج كاملة

مسرد المصطلحات

Glossary

أ

إزالة الماء **Dehydration**

الخطوة الثانية بعد تثبيت الأنسجة، ويقصد منها إزالة الماء وذلك لتهيئة النسيج للمعاملة في وسط عضوي مثل الشمع. وتتم هذه العملية بمحاليل مثل الكحول والأسيتون.

ازرق تولويدين **Toluidene Blue**

صبغ يتميز بالقدرة على التحول اللوني للأنسجة المصبوغة به.

اشكال مصطنعة **Artifacts**

أشكال غير حقيقية تظهر في تحضير مجهري نتيجة سوء تثبيت النسيج او صبغه او قطعه.

اصباغ حامضية **Acidic Stains**

الأصباغ التي يحمل مساعد اللون فيها شحنة سالبة، وتوجد في شكل أملاح صوديوم او كالسيوم، وهي تصبغ مكونات الخلية القاعدية كالسيتوبلازم ومثال عليها acid fuchsin.

اصباغ قاعدية **Basic Stains**

الأصباغ التي يحمل مساعد اللون فيها شحنة موجبة وتوجد في شكل كبريتات او كلوريدات وهي تصبغ مكونات الخلية الحامضية كالنواة ومثالها basic fuchsin.

اصباغ متعادلة او حيادية Neutral Stains

أصباغ تنتج عن تفاعل صبغ حامضي وآخر قاعدي، وهي تصبغ نواة الخلية وسيتوبلازمها وتعتبر صبغة رومانوفسكي Romanovsky مثالاً معروفاً لصبغ مسحة الدم.

اكسيد الأوزميوم (رابع) **Osmium Tetroxide**

مثبت قليل الاستعمال في التحضيرات المجهرية الضوئية، وذلك بسبب ارتفاع سعره، إلا أنه شائع الاستعمال كمثبت تقليدي في التحضيرات المجهرية الإلكترونية وهو مثبت جيد للدهنيات.

إغلاق (قفل) **Sealing**

وضع مادة عازلة حول الغطاء الزجاجي المغطي لمقطع مصبوغ على شريحة زجاجية، وذلك بهدف إطالة عمر التحضير وحمايته من المؤثرات الخارجية .

اورسين **Orcein**

صبغة طبيعية تستخرج من أشن Rocella وهي صبغة تقليدية للألياف المرنة في النسيج الضام.

إيوسين **Eosin**

صبغة سيتوبلازمية مصنعة تنتمي لصبغات الزائثين، وتستعمل إما كصبغة كحولية بنسبة 2٪ ، او كصبغة مائية بنسبة 1٪.

ب

ب.ا.س. (طريقة) **P.A.S.**

طريقة نسيجية كيماوية لإظهار الادة الخلالية في الغضروف والغشاء القاعدي ومولد الهلام، والجلايكوجين.

بست كارمين (طريقة) **Best's Carmine Method**

طريقة نسيجية كيماوية لإظهار الجلايكوجين في الخلايا.

بكريك (حامض) **Picric Acid**

مثبت شائع، يستعمل كأحد المكونات الأساسية لمثبت بوان Bouin. ومن فوائده ثباته وقدرته على تحسين صبغة السيتوبلازم وصبغة الأنسجة المثبتة باللون الأصفر، غير أنه يسبب إنكماش الأنسجة.

بلسم كندا **Canada Balsam**

وسط تقليدي لتغطية الشرائح بعد صبغها.

بنزين **Benzene**

وسط ترويق يتخلل الأنسجة وثمنه معقول، إلا أن سرعة اشتعاله وبخاره السام يحد من إستعماله في التحضيرات المجهرية.

بوان (مثبت) **Bouin Fixative**

من مثبتات حامض البكريك، يصبغ الأنسجة بلون أصفر ويحسن صبغ السيتوبلازم. تثبت الأنسجة فيه 12-24 ساعة ثم تغسل 2-3 مرات بمحلول 70٪ كحول إيثلي.

ت

تبلور **Crystallization**

ظاهرة تنتج عن وجود جيوب هوائية في الشمع بعد عملية الطمر مما يؤدي الى مشاكل عند قطع الأنسجة.

تثبيت **Fixation**

عملية وضع النسيج بمحلول يساعد على حفظ مكوناته بحالة مشابهة للوضع الطبيعي، وهي مفيدة لتهيئة النسيج للعمليات اللاحقة مثل إزالة الماء والصبغ والتقطيع.

تجليخ (سن) **Honing**

طريقة لشحذ حد السكين عندما تكثر فيه الأثلام

التجميد (طريقة) **Freezing Method**

طريقة هامة جداً في التحضير المجهري عند الحاجة لتشخيص المشاكل الجراحية بسرعة إذا تختصر الوقت بتجميد النسيج فوراً. وتسمح هذه الطريقة بإظهار الإنزيمات والدهون في الأنسجة وذلك بالحيلولة دون تعريضها لدرجات حرارة عالية او للكحول.

التحضير المجهري (علم) **Microtechnique**

علم يعالج موضوع تحضير شرائح زجاجية من أنسجة نباتية او حيوانية بهدف التعليم او البحث.

تحلل ذاتي **Autolysis**

تفكك مكونات نسيج ما بواسطة إنزيماته

تحميل **Mounting**

وضع المقاطع على شرائح زجاجية.

التحميل (وسط) **Mounting Medium**

مادة تضاف الى المقاطع بعد صبغها ليمكن فيما بعد تغطية المقاطع بغطاء زجاجي، ويمثل بلسم كندا أحد أكثر هذه الوسائط شيوعاً.

تشريب او تخلل **Infiltration**

خطوة تلي عملية الترويق يتم خلالها وضع النسيج المروق في وسط شمعي منصهر عند درجة حرارة 52-58° س ولمدة ساعة أو أكثر (حسب نوع النسيج)، بحيث ينفذ الشمع المنصهر الى الخلايا والحيز بين الخلوي الأمر الذي يساعد على إعطاء الدعم للنسيج بعد انتهاء عملية طمره بالشمع.

تقطيع **Sectioning**

عملية قطع النسيج المثبت والمطمور لمقاطع رقيقة يمكن إلصاقها على شرائح بحيث يتخللها الضوء وتفحص بالمجهر بعد صبغها.

التقطيع (جهاز) **Microtome**

جهاز يسمح بقطع النسيج المحضر حتى مرحلة الطمر الى مقاطع رقيقة، ومن أهم مكوناته نظام لدفع العينة الى الأمام، وحامل لسكين القطع، وحامل للعينة المراد قطعها. ويتوفر هذا الجهاز بعدة أنواع: الدوار، الجليدي والدقيق.

التقطيع **Microtomy**

عملية قطع الأنسجة المطمورة الى رقائق ذات سمك يسمح بدراستها بالمجهر الضوئي ويكون ذلك بواسطة جهاز التقطيع Microtome.

جهاز التقطيع الجليدي **Freezing Microtome**

جهاز تقطيع يستعمل في مختبرات الأمراض النسيجية وفيه تقطع العينات بعد تجميدها دون الحاجة الى عملية تثبيت. وتكون قاعدة حمل العينة متصلة بإسطوانة ثاني اكسيد الكربون.

جهاز التقطيع الدوار **Rotary Microtome**

جهاز تقطيع شائع جداً، وسمي كذلك لوجود عجلة دوارة عند أحد جانبي الجهاز تتحكم بتغذية جهاز تحريك العينة باتجاه السكين.

تقليم **Trimming**

إزالة الشمع الزائد والمحيط بنسيج مطمور بحيث يوفر ذلك الوقت اللازم لقطع النسيج. وكذلك يوفر عدد الشرائح اللازمة لحمل المقاطع.

توضيح او ترويق **Clearing**

خطوة في التحضير المجهري تلي خطوة إزالة الماء من الأنسجة يقصد منها تهيئة النسيج لعملية التشريب (التخلل).

الترويق (وسائط) **Clearing Agents**

محاليل تستعمل في عملية الترويق، منها الزايلول، البنزين، التولوين والكلوروفورم.

تمييز **Differentiation**

عملية يقصد منها التخلص من الصبغة الزائدة، ولذا فإنها متصلة بالصبغ التراجعي ويعتبر الكحول الحامضي أحد أبرز وسائط التمييز.

تولويدين الأزرق **Toluidene Blue**

صبغة تتميز بالقدرة على التحول اللوني للأنسجة المصبوغة بها.

ج

جليسرول **Glycerol**

وسط تغطية للتحضيرات المجهولة المؤقتة

جيلاتين **Gelatin**

وسط تشريب وطمر للأنسجة المروقة، وهو مفيد لأن باستعماله يمكن تحاشي تعريض الأنسجة للكحول الذي يذيب الدهنيات.

ح

حقن **Injection**

طريقة لتثبيت الأنسجة بواسطة حقن المثبت بجوف حيوان صغير.

حامض الخليك **Acetic Acid**

مثبت يدخل في تركيب كثير من المثبتات مثل مثبت بوان بحيث يستعمل كعامل مضاد للانكماش.

ز

زاوية الخلوص **Clearance Angle**

الزاوية الموجودة بين حد السكين وبين قالب الشمع وهي تتراوح بين 5 و10 درجات.

زاوية القطع **Knife angle**

الزاوية التي تحدد ميل السكين بحيث يكون الحد القاطع غير مواز لقالب الشمع.

زيت خشب الأرز **Cedar Wood Oil**

وسط ترويق جيد لأنه يتخلل الأنسجة بسرعة ولا يسبب لها إنكماشاً. ولكن ارتفاع ثمنه يكاد يقصر استعماله على أغراض البحث فقط.

الزايلين **Xylene**

وسط تقليدي لترويق الأنسجة المزال منها الماء وهو رخيص الثمن وسهل الإزالة من الأنسجة.

س

سلويدين **Celloidin**

وسط طمر للأنسجة المروقة وهو لا يتخلل الأنسجة وإنما يحيط بها.

ش

شريط **Ribbon**

سلسلة من المقاطع التي تنتج عن عملية التقطيع. ويكون وضع الشريط الناتج عن تقطيع نسيج او جنين ما بالترتيب الصحيح هاماً في معرفة تسلسل المعلومات التي يمكن الحصول عليها من هذه العينات .

شمع البرافين **Paraffin Wax**

هو شمع شائع الاستعمال في عمليات التشريب والطمر وهو نوعان: طري وصلت وتتراوح درجة انصيهاره بين 52-58°م.

ص

صبغ **Staining**

خطوة في التحضير المجهري تلي تحميل المقاطع على الشرائح الزجاجية ويقصد منها إدخال فروق في الطول الموجي للضوء النافذ من المكونات المختلفة للنسيج المدروس، الأمر الذي يؤدي الى تمايزها وسهولة دراستها.

صبغة **Dye**

مادة إما طبيعية أو مصنعة تعطي الأنسجة لوناً معيناً بعد معالجة هذه المادة كيميائياً.

صبغ تراجعي **Regressive Staining**

طريقة تصبغ بها مكونات النسيج أولاً ثم تزال الصبغة الزائدة، وهي شائعة الاستعمال، وتصبغ النواة عادة بهذه الطريقة.

صبغ تقدمي **Progressive Staining**

طريقة تصبغ بها مكونات النسيج بالتدريج، ويصبغ السيتوبلازم عادة بهذه الطريقة.

صبغ حيوي **Vital Staining**

صبغ العينات البيولوجية بحيث تبقى حية، وهذا عكس ما يتم في الصبغ التقليدي. وتسمح هذه الطريقة بدراسة النشاطات الحيوية الخلوية، ويعتبر اخضر جانوس أحد الصبغات الحيوية الشائعة.

صبغ حيوي داخلي **Intravital Staining**

طريقة صبغ حيوي تتم بحقن الصبغة داخل الكائن الحي بحيث يمكن معرفة النشاطات الخلوية.

صبغ مباشر **Direct Staining**

طريقة صبغ تتم بوضع النسيج في محلول مائي او كحولي من الصبغة دون الحاجة الى وسيط.

صبغ غير مباشر **Indirect Staining**

عملية صبغ تتم باستعمال وسيط يسمى مرسخ الصبغة ويكون الوسيط منفصلاً او مضافاً لمحلول الصبغ.

صبغ كلي **Bulk Staining**

طريقة صبغ الحيوان بأكمله او عضو كامل منه دون تقطيعه خاصة في حالة الأوليات والقشريات والأجنة الصغيرة.

صبغات الآزوت **Azo-Dyes**

صبغات يكون حامل الصبغة فيها مجموعة -N=N- ومثال عليها اخضر جانوس Janus Green المعروف بصبغة للميتوكودريا.

صبغات الكوينونويد **Quinonoid Dyes**

صبغات مصنعة تحتوي على حامل اللون quinoid، منها صبغات هيماتين hematein dyes ، وصبغات أنثراكوينويد anthraquinoid dyes، وصبغات

زانثين xanthenes ومنها صبغة إيوسين شائعة الاستعمال، وكذلك صبغات ثيازين thiazine dyes الهامة في صبغ البروتينات النووية.

صبغات النيترو **Nitro Dyes**

صبغات يكون حامل اللون فيها مجموعة NO_2– ويعتبر البكريك (ثلاثي نيترو الفينول) مثالاً عليها.

صقل **Stropping**

عملية يراد منها تلميع حد السكين بعد تجليخه وذلك بإستعمال مشحذ جلدي.

ط

طمر **Embedding**

عملية إحاطة النسيج المتشرب بالشمع المنصهر بقالب شمع جامد، وهي خطوة لا بد منها لتقطيع النسيج الى مقاطع رقيقة.

غ

غسل **Washing**

مرحلة من مراحل التحضير المجهري يقصد منها إزالة بقايا المثبت حتى لا تؤثر على العمليات اللاحقة مثل الصبغ، وهي تتم بواسطة محاليل مثل الماء او الكحول.

ف

فولجين (طريقة) Feulgen's method

طريقة نسيجية كيماوية لإظهار الـ DNA في الخلايا.

فورملدهايد **Formaldehyde**

مثبت تقليدي يتوفر تجارياً كغاز مذاب في الماء بدرجة تشبع تتراوح بين 30 و 40٪ . ويعتبر محلول المشبع منه كفورملين 100٪ . وهذا المثبت شائع

الإستعمال لثباته وسهولة تحضيره واعتدال ثمنه وقدرته على النفاذ السريع الى الأنسجة.

ق

قرمز **Cochineal**

صبغة طبيعية تستخرج من جسم حشرة Coccus cacti التي تعيش على نبات الصبار وهي صبغة جيدة للنواة، ومنها تستخرج صبغة acetocarmine شائعة الإستعمال كصبغة نووية.

ك

كارنوي (محلول) **Carnoy's fluid**

من المثبتات الكحولية، جيد لتوضيح الجلايكوجين. مدة التثبيت فيه من 3 الى 6 ساعات وبعد ذلك تغسل الأنسجة بكحول مطلق لفترة تتراوح بين ساعتين وثلاث ساعات.

الكحول **Alcohol**

وسط تثبيت وإزالة ماء، ويستعمل بتركيز مطلق كأحد مكونات مثبت كارنوي الذي يثبت الأنسجة الصغيرة بشكل جيد.

كلارايت **Clarite**

وسط تغطية للشرائح.

كلوروفورم **Chloroform**

وسط ترويق جيد للأجنة والجهاز العصبي يتبخر بسرعة في فرن الشمع ، وهو مرتفع السعر.

ل

اللون (حامل) **Chromophore**

مجموعات كيماوية ملونة تضاف الى حلقة البنزين، منها الكوينون، الآزين والثيازين.

اللون(مولد) **Chromogen**

مركب مكون من حلقة بنزين وحامل اللون، وهو لا يصبغ الأنسجة إلا بعد إضافة مساعد لون له.

لون (تحول) **Metachromy**

ظهور ألوان في بعض مكونات النسيج تختلف عن لون محلول الصبغة المستخدم، وتعتمد هذه الظاهرة على طبيعة الصبغة وخصائص مكونات النسيج، ومن الأصباغ المحولة للون صبغة ثيونين.

م

مرسخ الصبغة **Mordant**

مادة وسيطة بين النسيج والصبغة تساعد على ترسيخ الصبغة بمكونات النسيج، ومثال على ذلك شب البوتاسيوم وشب الحديد.

محب للحامض **Acidophillic**

وصف يطلق على مكونات خلوية تحتوى مجموعات قاعدية وبالتالي فإنها تثبت الصبغ الحامضي، ويعتبر السيتوبلازم مثالاً على ذلك.

مثبت **Fixative**

محلول يسمح بالمحافظة على مكونات النسيج من حيث محتوياتها وترتيبها الموقعي وذلك بمنع التحلل الذاتي للنسيج، وكذلك منع التحلل الناجم عن عوامل بكتيرية.

مزيلات الماء **Dehydrants**

محاليل تستعمل لإزالة آثار الماء من الأنسجة المثبتة، مثال الكحول والأسيتون.

مساعدات اللون **Auxochromes**

مجموعات كيماوية تضاف الى مولد اللون ليتمكن من صبغ الأنسجة، ومن هذه المجموعات $-COOH, -NH_2, -OH$

مسح (فرش) **Smearing**

طريقة تحضير شريحة مؤقتة او مستديمة من سائل حيوي (كالدم) وذلك بفرش المادة المعنية على الشريحة لتكوين طبقة رقيقة تصبغ فيما بعد.

ن

نظير البلاستيك **Paraplast**

وسط تشريب وطمر وهو عبارة عن خليط من الشمع ومبلمرات البلاستيك يساعد استعماله في الحصول على مقاطع بسهوله.

نماذج كاملة Whole Mounts

تحضيرات لكائنات مجهرية ورقيقة كالأجنة الصغيرة والأوليات والطفيليات. وفي هذه التحضيرات تجري عمليات التثبيت وإزالة الماء والترويق والصبغ والتغطية.

هـ

هرس (دعك) **Squashing**

طريقة تحضير شريحة مؤقتة او مستديمة من مادة بيولوجية ليست رخوة بما يكفي لفرشها على الشريحة وليست قاسية بما يكفي ليتسنى قطعها وفي هذه الطريقة تفصل خلايا النسيج عن بعضها بمعاملة النسيج بمادة مناسبة ومن ثم يضغط على الغطاء الزجاجي.

هيماتوكسلين **Hematoxylin**

صبغة طبيعية تستخرج من خشب شجرة بقولية Campechianum وهذه الصبغة شهيرة كإحدى الصبغات النووية التقليدية، وهي متوفرة بعدة صبغ مثل صيغة Harris وصيغة Haidenhain وصيغة Ehrlich.

المراجع

المراجع العربية :

1. أبو زنادة، ع.ج. ومحمود ، م.ح. ن 1980 . المجهر والبنيات الدقيقة. جامعة الرياض – الرياض.
2. الحاج، حميد، أ. 1982، المبادئ الأساسية للتحضير المجهري الضوئي. جون وايلي- نيويورك.
3. لطفي ، رمسيس، والحاج، حميد. 1984. دليل مختبر التحضير المجهري الضوئي. جون وايلي، نيويورك.
4. عبد السلام ، أ. ل. 1967. الميكروتكنيك الحديث. القاهرة –دار النهضة العربية.

المراجع الأجنبية :

1. Baker, J.R. 1954. Cytological Technique, Methuen , London.
2. Bancroft, J. and Cook, H. 1998. Manual of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London.
3. Bancroft, J. and Stevens, A. 2002. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London.
4. Carleton, H.H., and Leech, E.H. 1994. Histological Technique. Oxford University Press, New York.
5. Humason, G.L. 1998. Animal Tissue Techniquse, W.H. Freeman, San Francisco.
6. Kiernan, J. 2005. Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice. Pergamon Press. Oxford.