الفصل الثاني:

تقنية المجهر الضوئي
TECHNIQUES OF LIGHT MICROSCOPE

- طريقة التحضير المباشر.
- طريقة تحضير السحبات.
- طريقة الهرس.
- طريقة تحضير القطاعات.

obeikandl.com

obeikandl.com

تمهيد

قد تكون العينة المدروسة عبارة عن كائن حي كامل، وقد تكون جزءاً من جسم الكائن الحي. وقد يختلف الهدف من الفحص من عينة لأخرى؛ لذلك وجدت عدة طرق لتحضير العينات، أهم هذه الطرق وأكثرها شيوعاً:

- طريقة التحضير المباشر لعينات كاملة Direct preparation technique.
- طريقة تحضير السحبات (الأغشية) Smear preparation technique.
- طريقة الهرس أو التمزيق Squashing technique.
- طريقة تحضير القطاعات Sections preparation technique.

طريقة التحضير المباشر
DIRECT PREPARATION TECHNIQUE

تستخدم هذه الطريقة للدراسة السريعة للعينات الحية الكاملة مثل الكائنات الحية الدقيقة كالبكتيريا bacteria والفطريات fungi وبعض الكائنات الحية الأولية Protozoa مثل الأميبا Amoeba واليوجلينا Euglena والبراميسيوم Paramecium وكذلك تستخدم هذه الطريقة في الفحص الظاهري للحيوانات والحشرات الصغيرة small insects.

تتم هذه العملية بوضع هذه العينات أو معلق منها suspension على شريحة زجاجية نظيفة، وقد يكون ذلك بعد تثبيتها بمواد كيميائية fixatives حتى تحتفظ بشكلها كما كانت حية، ثم تغسل من المثبت بالماء، ثم يزال الماء بالكحول (% 70)، وقد تصبغ أو لا تصبغ، ثم تفحص بالمجهر.

ويتم عمل فيلم البكتيريا بوضع قطرة من معلق البكتيريا bacterial suspension المعزولة في المختبر أو معلق العينة الباثولوجية pathological specimen التي تحتوي على البكتيريا (وخاصة للحالات المرضية التي تتطلب التشخيص ووصف العلاج بسرعة) في منتصف شريحة زجاجية نظيفة سبق تعريضها للهب لإزالة أي آثار للشحوم قد تكون عالقة بها، ثم نشر هذه القطرة بحركة دائرية في منتصف الشريحة بواسطة إبرة التلقيح. تترك الشريحة لتجف في الهواء فيتكون عليها غشاء بكتيري جاهز للصباغة مع مراعاة اختيار الصبغة المناسبة للبكتيريا المدروسة والعينة المعزولة منها. فمثلاً الأفلام المحضرة من عينة بصاق sputum لمريض يعاني من التهاب رئوي أو

مصاب بميكروب الدرن يجب صبغه بصبغة زيل نيلسون Zeil-Nelsen stain، أما الأفلام المحضرة من معظم مزارع بكتيريا المعزولة في المختبر من عينات مثل البول والبراز والدم والصديد والجروح والبكتيريا المعزولة من المواد الغذائية والهواء وغير ذلك كلها يمكن صبغها بصبغة جرام Gram stain وهي الصبغة الأكثر استخداماً في صبغ البكتيريا.

وتصبغ أفلام البكتيريا بمكونات صبغة جرام حسب الترتيب التالي (شكل ١٨):

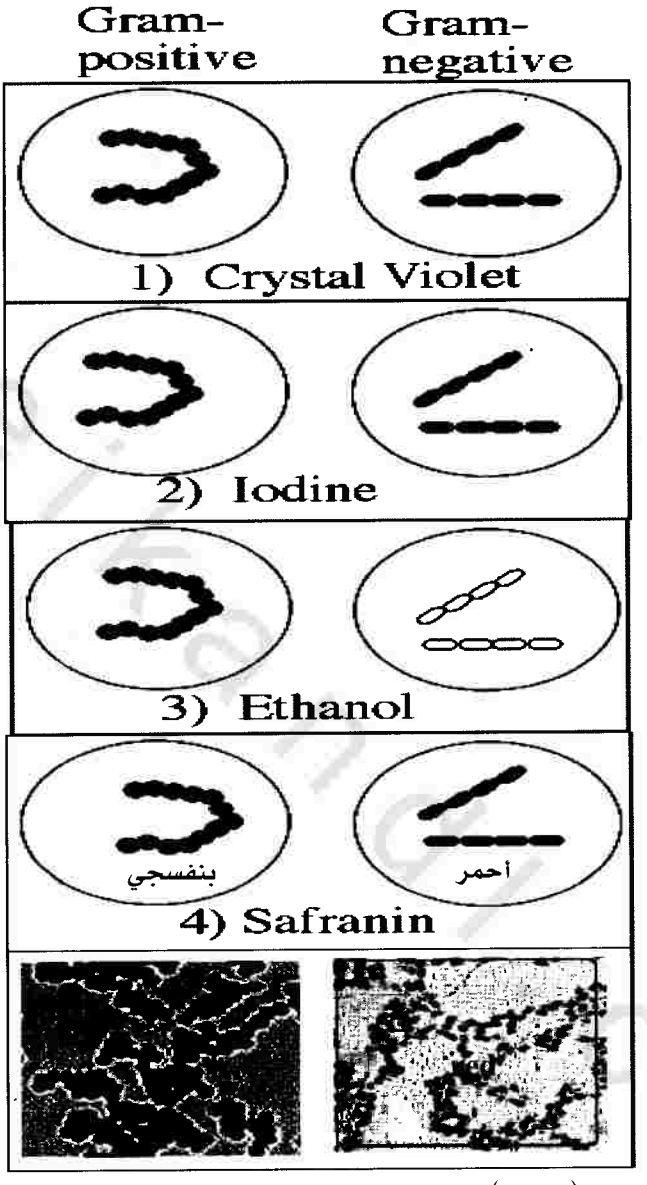
١. الصبغ بصبغة الكريستال البنفسجية.

٢. غمر الفيلم باليود.

٣. وضع قطرات من الكحول.

٤. الصبغ بصبغة السفرانين (حمراء اللون)

ثم تصنف البكتيريا حسب استجابتها لهذه الصبغة إلى بكتيريا موجبة لصبغة جرام (Gr + ve bacteria) وهي تظهر باللون البنفسجي عند فحصها بالعدسة الزيتية تحت المجهر، وبكتيريا سالبة لصبغة جرام (Gr – ve bacteria) وهي تظهر باللون الأحمر عند الفحص تحت المجهر.



(شكل١٨) خطوات صبغ الفيلم البكتيري بصبغة جرام

لاحظ ظهور البكتيريا السالبة لصبغة جرام باللون الأحمر والبكتيريا الموجبة باللون البنفسجي

طريقة تحضير السحبات (الأغشية)
SMEAR PREPARATION TECHNIQUE

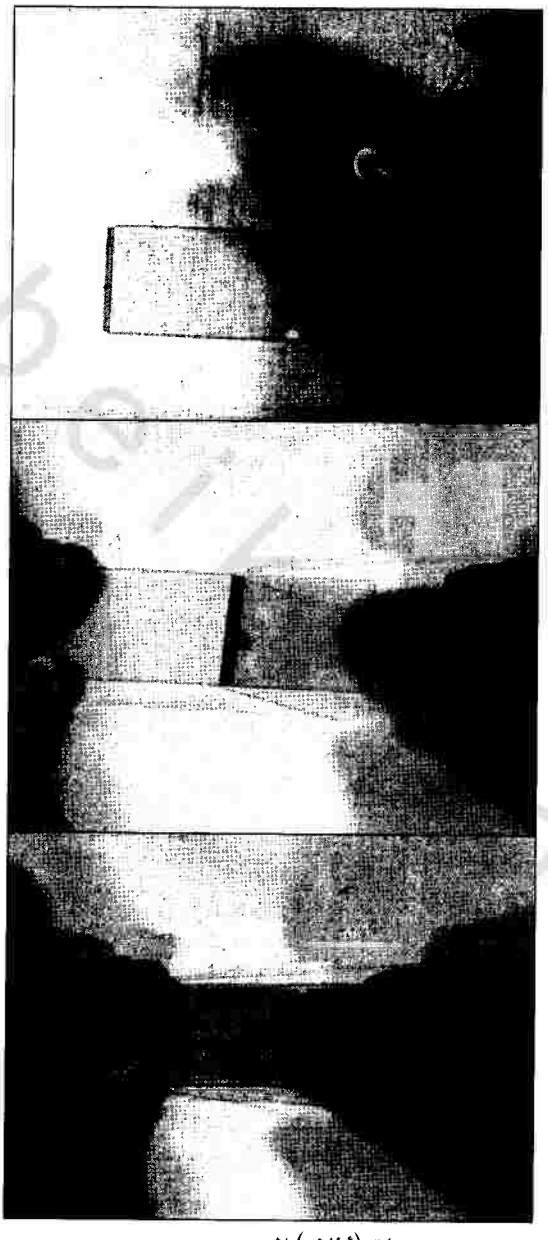
هذه الطريقة مناسبة جداً لفحص بعض السوائل الحيوية body fluids مثل الدم blood وسائل النخاع الشوكي cerebrospinal fluid (C.S.F) وكذلك فحص السائل المنوي seminal fluids.

وينتم عمل أفلام (سحبات) الدم blood films أو النخاع الشوكي (شكل ١٩) بوضع قطرة من العينة على مقربة من طرف الشريحة الزجاجية ثم تسحب هذه القطرة على كامل الشريحة بواسطة شريحة أخرى نميلها عليها بزاوية30° تقريباً وبسرعة معتدلة، فيتكون غشاء (فيلم) رقيق من العينة على الشريحة، يترك ليجف في الهواء ثم يثبت بقطرة من الكحول الميثيلي methanol أو الكحول الإيثيلي ethanol ثم يصبغ بالصبغة المناسبة مثل صبغة جيمزا Giemsa أو ليشمان Leishman أو صبغة رايت Wright ويمكن استخدام صبغة الهيماتوكسلين والإيوسين.

عند إجراء هذه الطريقة يجب وضع النقاط التالية في الاعتبار:

- يمكن عمل الفيلم بوضع قطرة من دم الحيوان في المختبر مباشرة على الشريحة الزجاجية، أما في حالة العينات المأخوذة خارج المختبر أو تلك التي تحتاج لفحوصات أخرى فإنه يلزم سحبها في أنابيب تحتوي على مواد مانعة للتجلط anticoagulant ويفضل الهيبارين heparin.

- في حالة فحص دم اللافقاريات يفضل أن يكون فيلم الدم سميكاً؛ لأن عدد كريات الدم blood corpuscles فيها قليل. كما يفضل تحضير الأفلام السميكة أيضاً في الفقاريات عندما يراد البحث عن طفيليات الدم blood parasites؛ وذلك لتتوفر فرص أكبر لاكتشاف هذه الطفيليات بجهد ووقت أقل.
- عند جمع الدم من القوارض يفضل تخدير الحيوان ثم يبتر جزء صغير من نهاية الذيل ثم يجمع الدم المنساب من الجرح. كما يمكن جمع الدم من الوعاء الدموي المغذي للعين بواسطة أنبوبة شعرية.
- بالنسبة للبرمائيات يفضل تجنب سحب الدم من مصدر سطحي بسبب وجود كمية كبيرة من الإفرازات المخاطية على سطح الجلد، ولذلك ينصح بأخذ الدم من قلب الحيوان بعد تشريحه.

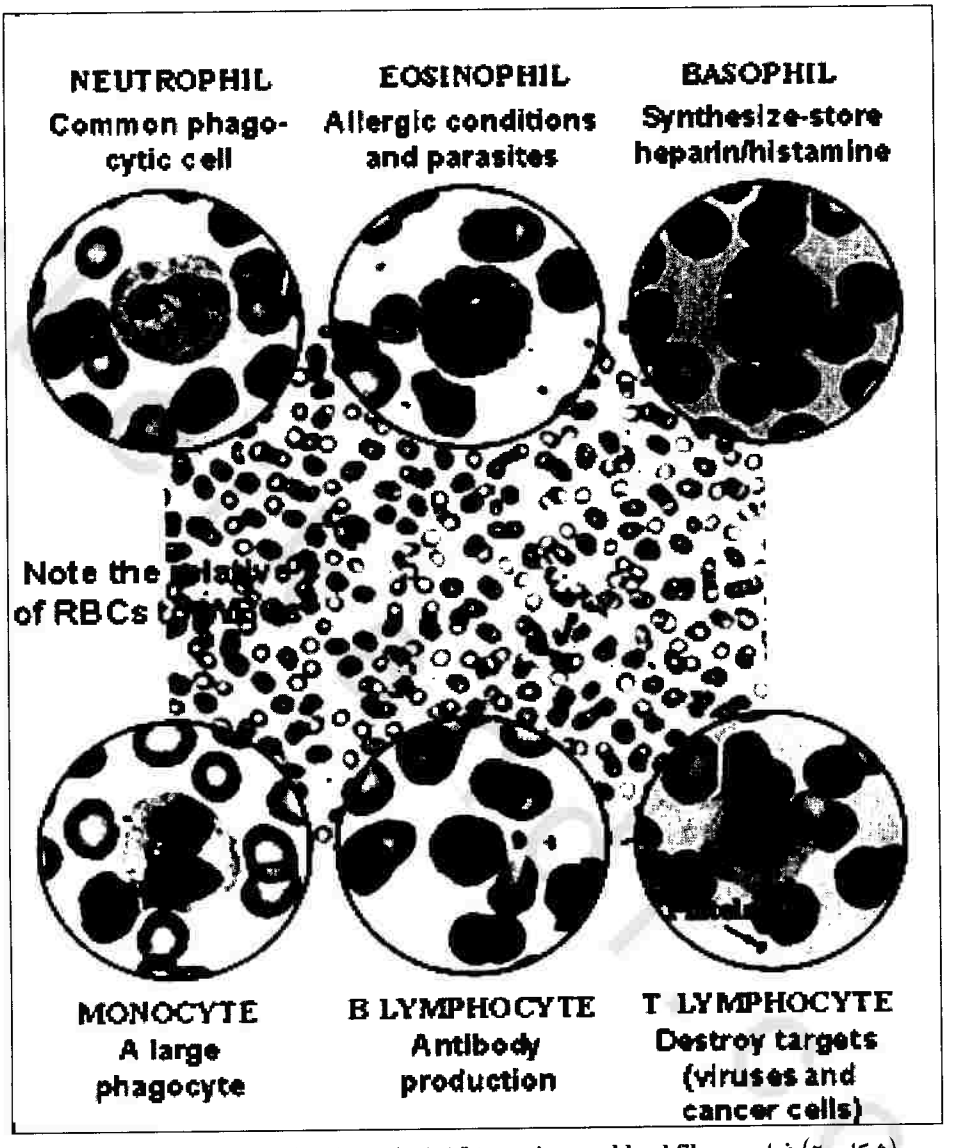


توضع قطرة الدم بواسطة أنبوبة شعرية في الثلث الأول من شريحة الفحص الزجاجية.

تسحب القطرة للخلف قليلا بواسطة شريحة زجاجية نظيفة (شريحة السحب) حتى تتوزع بعرض خط التماس بين الشريحتين

تدفع شريحة السحب للأمام فيتكون غشاء رقيق من الدم على شريحة الفحص.

(شكل ١٩) خطوات تحضير مسحات (أفلام) الدم



(شكل ٢٠) فيلم دم blood film مصبوغ بصبغة ليشمان وتظهر فيه كريات الدم الحمراء erythrocytes والأنواع المختلفة لكريات الدم البيضاء leukocytes في حقول مختلفة

طريقة الهرس
SQUASHING TECHNIQUE

في هذه الطريقة يتم فصل أنسجة العينة tissues بعضها عن بعض مباشرة على شريحة مجهرية عليها محلول الصبغة وذلك باستخدام إبرة تشريح needle، فتتحول العينة من الحالة النسيجية إلى الحالة الخلوية، حينئذ يتم التخلص من الأجزاء التي ترى بالعين المجردة ثم تغطى العينة بغطاء الشريحة cover slip بطريقة سليمة تضمن عدم تكون فقاعات هوائية. هذه الطريقة تناسب دراسة التركيب الداخلي للخلايا intracellular structures وفحص الأطوار التي تمر بها الخلية في أثناء الانقسام الخلوي cell division.

طريقة تحضير القطاعات
SECTIONS PREPARATION TECHNIQUE

إن معظم العينات النسيجية (الهستولوجية) histological samples يمكن تحضيرها بهذه الطريقة وذلك لدراستها على شكل قطاعات رقيقة بالمجهر الضوئي. ولكن قبل عملية التقطيع لابد أن تثبت العينة بطريقة تحفظ عليها شكلها الذي كانت عليه في أثناء حياتها قدر الإمكان، كما يجب أن تعامل معاملة خاصة حتى تصبح على درجة من الصلابة تمكننا من تقطيعها.

وتوجد عدة طرق لتحضير القطاعات، أهم هذه الطرق:

- **طريقة الشمع Paraffin technique.**
- **طريقة التجميد technique Freezing.**
- **طريقة السليودين Celloidin technique.**

طريقة تحضير قطاعات الشمع
Paraffin sections technique

هذه الطريقة هي الأهم والأكثر استخداماً لتحضير القطاعات وتجهيزها للفحص بالمجهر الضوئي. وفيما يلي العمليات الرئيسية التي تمر بها العينة حتى يتم عمل القطاعات الرقيقة منها وتحميلها على الشريحة المجهرية ثم صبغها:

١. الحصول على النسيج obtaining the tissue.
٢. تثبيت النسيج fixation of the tissue.
٣. غسل النسيج (من آثار المثبت) rinse.
٤. نزع الماء من النسيج (الإنكاز) dehydration.
٥. ترويق النسيج clearing of the tissue.
٦. تشريب أو تخليل النسيج impregnation with soft paraffin.
٧. طمر النسيج embedding.
٨. تقطيع النسيج sectioning.
٩. تحميل القطاعات على الشريحة mounting of sections.
١٠. تجهيز القطاع لعملية الصبغ preparations for staining.

أولاً: الحصول على النسيج Obtaining the tissue

العينة أو قطعة النسيج يجب أن يراعى فيها شرطان أساسيان:

الشرط الأول: أن تكون صغيرة الحجم (2 cm على الأكثر) حتى نضمن وصول المثبت fixative إلى عمق العينة، فكلما صغر حجم العينة المثبتة كانت عملية التثبيت أنسب وأدق وقل الوقت اللازم للتثبيت.

والشرط الثاني: أن تؤخذ العينة مباشرة بعد الوفاة قبل حدوث التحللات الذاتية autolysis أو الرمية rotting ثم تحفظ في المثبت المناسب فوراً.

ثانياً: تثبيت النسيج Fixation of the tissue:

الغرض من تثبيت النسيج هو إيقاف العمليات الحيوية وحفظ العينات بشكلها الطبيعي، كما تهدف هذه العملية إلى تصلب العينات لتكون أكثر ثباتاً وصموداً في أثناء التقطيع. لابد أن تكون عملية التثبيت سريعة؛ لذلك فإن المحلول المثبت يحتوى على مادة لها خاصية التثبيت السريع مثل الكحول. ويجب الأخذ في الاعتبار أن تكون كمية المثبت أكبر من حجم العينة بعشرة أمثال تقريباً.

من المعروف أن الخلايا الحية تحتوى على العديد من الإنزيمات enzymes مثل proteases - aminopeptidases - carboxypeptidases وهذه الإنزيمات تحلل الخلايا بعد موتها فيما يعرف بالتحلل الذاتى autolysis، كذلك فإن الكائنات الدقيقة الرمية saprophytes تهاجم هذه الخلايا الميتة وتؤدي إلى تحللها فيما يعرف بالتحلل الرمي (تعفن) rotting، لذلك فإن من أهم صفات المثبت الجيد هو حفظ الخلايا ومنع هذه التحللات.

قد تؤثر المثبتات على حجم الخلايا إما بالزيادة swelling أو بالنقصان shrinking فالكحول الإيثيلى المطلق absolute ethanol يسبب انكماشاً ملحوظاً للنسيج، بينما حامض الخليك acetic acid يسبب الانتفاخ الملحوظ، لكي نتجنب حدوث هذه التغير في الحجم يضاف للمثبت محلول ملحي saline (0.85 % Na Cl) ضغطة الإسموزى osmotic pressure يعادل الضغط الإسموزى للنسيج الخلوي للعينة.

فوائد عملية التثبيت:

- منع التحلل الذاتي autolysis.
- منع التعفن rotting بقتل البكتريا والكائنات الرمية الأخرى.
- تحويل البروتينيات الذائبة إلى بروتينيات غير ذائبة بما يعني تخثر البروتين protein coagulation في الخلايا؛ مما يؤدى إلى تصلب الأنسجة فتسهل عملية التقطيع.
- الحفاظ على مكونات الأنسجة وعلاقاتها فيما بينها دون تشوه.
- بقاء مكونات الخلية كاملة وفي شكلها الحقيقي.
- جعل النسيج أكثر قابلية للصباغة.

أنواع المثبتات:

يمكن تقسيم المثبتات fixatives إلى مثبتات أولية بسيطة ومثبتات مركبة.

- **المثبتات الأولية Primary fixatives:** وهي تتكون من مادة كيميائية واحدة ومن أهمها: الكحول الإيثيلي المطلق absolute ethanol والفورمالدهيد formaldehyde وحمض الخليك الثلجي acetic acid glacial.

١. **الكحول الإيثيلي:** يمتزج جيداً مع الماء، ويمتاز بسرعة نفاذ معتدلة ويكسب الأنسجة صلابة كافية، كما أنه لا يتفاعل مع البروتين الخلوي cellular protein مما يسهل دراسته بالأصباغ المناسبة، ولأنه لا يسبب تغييرات أو ترسبات خارجية في النسيج فلا تكون هناك حاجة لغسل العينة من أثره كمثبت. إلا أن هذا

الكحول يسبب انكماشاً shrinking نسبياً للنسيج، ويحطم الميتوكوندريا mitochondria (بيوت الطاقة) كما يذيب القطرات الدهنية fate globules الموجودة داخل الخلايا.

٢. **الفورمالدهيد:** يستخدم عل هيئة فورمالين formalin وذلك بإذابته في الماء بنسبة % 40. يمتاز بأنه سريع النفاذ ويكسب النسيج صلابة عالية دون التأثير على حجم الخلايا، وهو يحافظ على شكل وتركيب الدهون fats والمواد السكرية glycogens ويثبت الميتوكوندريا mitochondria ولا يؤثر على شكل النواة nucleus. والفورمالدهيد يتفاعل مع المجموعات القاعدية فى البروتينات تاركاً المجموعات الحمضية حرة، ولذلك تصبغ الأنسجة – المثبتة بالفورمالدهيد – جيداً بالأصباغ القاعدية. والأنسجة المثبتة بالفورمالدهيد قد لا تحتاج إلى غسيل لأنه يمتزج جيداً بالماء والكحول.

من عيوب هذا المثبت أنه يسبب تكون فراغات كبيرة بين الخلايا المتجاورة، كما أنه يسبب انكماش الخلايا، لذلك يفضل إضافة محلول ملحي saline تركيزه % 0.85 ليحافظ على التوازن الأسموزي (يحضر محلول الفورمالين الملحي formol saline بمزج 10 ml فورمالين مع 90 ml محلول ملحي)

٣. **حمض الخليك الثلجي:** سريع النفاذ ومثبت جيد للأحماض النووية nucleic acids، ولا يسبب أي تغيرات خارجية ويمتزج بسهولة مع الكحول، فلا يحتاج النسيج المثبت به إلى عملية الغسيل، لكنه لا يؤثر على صلابة النسيج ويسبب زيادة ملحوظة

(انتفاخ) في حجم الخلايا؛ لذلك يضاف إلى كثير من المثبتات المركبة ليحد من عملية الانكماش التي قد تحدث في أثناء العمليات التي تمر بها العينة.

ويعتبر حمض الخليك من أشهر المثبتات المستعملة في الدراسات السيتولوجية cytological studies مثل دراسة كروموسومات الخلية chromosomes.

- **المثبتات المركبة** Compound fixatives: وهي عبارة عن مخلوط من أكثر من مادة كيميائية. وغالباً ما تكون هذه المواد من المثبتات الأولية.

المثبتات المركبة عديدة، ومن أهمها وأكثرها استعمالاً في هذا المجال:

- مثبت كلارك Clark's fixative
- مثبت كارنوى Carnoy's fixative
- مثبت بوان Bouin's fixative

تركيب هذه المثبتات وغيرها في ملحق هذا الكتاب.

ثالثاً: غسل النسيج Rinsing:

بعد الانتهاء من تثبيت العينة قد يحتاج الأمر إلى غسلها للتخلص من آثار المثبت والذي قد يؤثر بدوره على العمليات اللاحقة. ولبعض المثبتات وسيلة غسيل خاصة طبقاً لخواصها الكيميائية ومدى تأثيرها على النسيج خلال عملية التثبيت، فالعينات المثبتة في محلول الفورمالين قد يلزم غسلها بماء

الصنبور الجاري، أما تلك المثبتة بمثبت بوان يلزم غسلها بالكحول (70%) حتى يزول اللون الأصفر الناتج من حمض البكريك picric acid الموجود بهذا المثبت.

يمكن حفظ العينة بعد الغسيل في 70% كحول إيثيلي إذا لزم الأمر، ولكن يفضل إتمام العمليات اللاحقة مباشرة.

رابعاً: نزع الماء (الإنكاز) Dehydration:

في هذه العملية يتم نزع الماء من النسيج باستبداله تدريجيا بالكحول الإيثيلي ethanol، وتتم هذه العملية بتمرير النسيج الحيواني في تركيزات تصاعدية من الكحول تبدأ في 30% ثم في 50% ثم 70% ثم 90% وأخيراً يمرر مرتين في تركيز 95% ومدة المعاملة تتراوح بين ثلاثين دقيقة إلى ثلاث ساعات لكل تركيز حسب حجم ونوع العينة.

أما الأنسجة النباتية فتكون أكثر صعوبة فى معاملتها لأن مكونات السيتوبلازم cytoplasm لها قابلية للانفصال عن جدار الخلية؛ ولذلك يزال الماء منها (تنكز) بتمريرها في تركيزات كحولية تبدأ من 5% ثم 10% ثم 20% ثم 30% وهكذا حتى تركيز 100% (absolute ethanol).

الهدف من تمرير العينة فى هذه السلسلة من التركيزات الكحولية المتدرجة تصاعدياً هو تجنب حدوث انكماشات (تجعدات) في النسيج إذا ما عوملت العينة بالكحول المطلق مباشرة، وهو الذي يتميز بقدرته الكبيرة على نزع الماء من داخل الخلايا فيما يعرف بخاصية hydroscopic action.

عملية نزع الماء من النسيج هي خطوة هامة جداً لأن الماء لا يمتزج مع شمع البرافين paraffin wax الذي سوف تطمر فيه العينات النسيجية؛ مما يعيق نفاذ

هذا الشمع المنصهر إلى داخل النسيج، ومن مؤشرات عدم إتمام عملية نزع الماء بنجاح تام كما هو مطلوب ظهور عكارة turbidity أثناء عملية ترويق clearing العينة بمحلول الزيلين xylene (هي الخطوة التالية). حينئذ يجب إعادة عملية نزع الماء مرة أخرى.

الجدير بالذكر أن عملية الإنكاز هذه تتم بواسطة الكحول الإيثيلي؛ لأن الكحول الإيثيلى يمتزج جيداً مع كل من الماء ومحلول الترويق (xylene)

خامساً: الترويق Clearing:

الكحول المستخدم في عملية الإنكاز لا يمتزج مع شمع البرافين المستخدم فى عملية الطمر embedding، فكان لابد من التخلص من آثاره المتبقية فى النسيج وذلك باستخدام مادة الزيلين xylene التى تمتزج جيداً مع الكحول ومع شمع البرافين.

هذه العملية تستغرق حوالي 30 دقيقة وهي تساعد على:

- إحلال الشمع مكان الكحول.
- جعل النسيج أكثر شفافية.

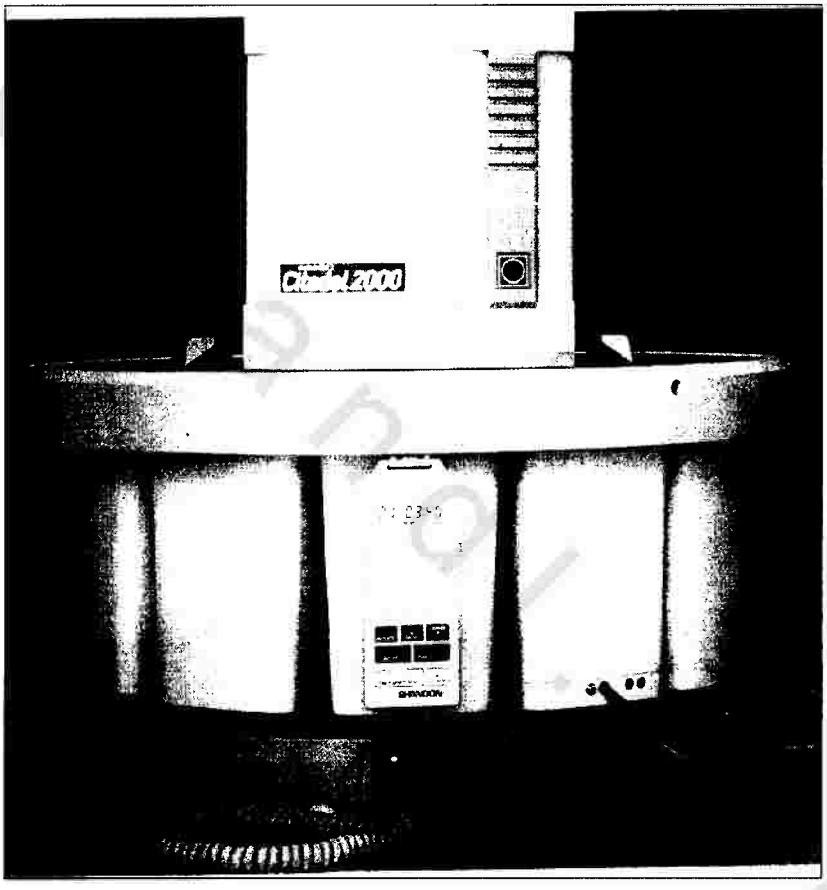
ويمكن استخدام مواد هيدروكربونية أخرى غير الزيلين كمحاليل ترويق كالأسيتون acetone والكحول الميثيلى methanol والتولوين toluene والبنزين benzene والكلوروفورم chloroform لكنها مواد سريعة التطاير وغالية الثمن نسبياً.

سادساً: التشريب (التخليل) Impregnation (Infiltration):

الهدف من هذه العملية هو إحلال الشمع paraffin مكان محلول الترويق xylene وذلك لإكساب النسيج صلابة يقاوم بها أوساط الطمر. تتم هذه العملية بتخليل النسيج أولاً في مزيج متساو من الشمع المنصهر والزيلين لمدة 30 دقيقة، ثم ينقل النسيج ليتشبع في شمع البرافين النقي المنصهر لمدة 30 دقيقة أخرى.

تتم هذه العملية داخل فرن درجة حرارته أعلى بقليل (درجتين على الأكثر) من درجة انصهار الشمع حتى لا تتلف العينات من تأثير الحرارة، وتكرر عدة مرات حسب طبيعة النسيج.

وتتوفر الآن بعض الأجهزة التي تمرر العينات من خلالها في جميع العمليات السابقة بداية من التثبيت حتى التخليل في الشمع؛ حيث تعمل هذه الأجهزة بشكل أوتوماتيكي بعد إمدادها بالبيانات اللازمة (مثل زمن التمرير في كل محلول واختيار العمل تحت تفريغ select vacuum واختيار العمل أوتوماتيكياً أو يدوياً select automatic or manual operation. هذه الأجهزة تسمى أجهزة معاملة (تحضير) الأنسجة Tissue processor (شكل ٢١).



(شكل ٢١) جهاز معاملة الأنسجة Tissue processor

سابعاً: الطمر Embedding:

الهدف من عملية الطمر هو اختراق وإحاطة النسيج بمادة الطمر (شمع البرافين) فتتكون كتلة صلدة ومتماسكة paraffin block يسهل تقطيعها. وتتم هذه العملية بصب الشمع المنصهر في قوالب خاصة – تدهن داخليا بالجلسرين لتفادي التصاق الشمع بالقالب – ثم تنقل إليه العينة بملقط نظيف. يجب تحريك العينة دائرياً بإبرة تشريح needle لتفادى تكون أي فقاعات، ثم تثبت فى منتصف الشمع طولياً أو عرضيا، ولتبريد الشمع في القالب يتم النفخ برفق على سطحه حتى تتجمد طبقة رقيقة على السطح ثم يطمر القالب برفق في حمام مائي بارد درجة حرارته من 15-16°c مع مراعاة أن لا تقل هذه الدرجة عن 10°c حتى لا يتسبب ذلك في انكماش الشمع وبالتالي تشقق القالب الشمعي (يمكن تبريد القالب الشمعي على لوح تبريد كهربائي cooling plate بمجرد الانتهاء من صب البارافين في القالب وتمركز العينة فيه). ويمكن تخزين القوالب الشمعية بعيناتها حتى وقت التقطيع بشرط حفظها في مكان بارد مع كتابة البيانات الخاصة بالعينة ويمكن تسجيل ذلك على شريط من الورق يغمس طرفة في القارب الشمعي قبل تجمده.

شمع البرافين المستخدم في عمليات التشريب والطمر يوجد منه نوعان أحدهما يعرف بالشمع الرخو أو الطري soft paraffin درجة انصهاره بين 50-52 c وهو يستخدم مع العينات الرخوة أو عند الرغبة في الحصول على قطاعات سميكة. أما النوع الآخر فهو يعرف بالشمع الجامد hard paraffin درجة انصهاره بين 58-62°c ويفضل استخدامه لطمر العينات الصلبة وفي الظروف والمناطق الحارة لأنه يتحمل درجات الحرارة العالية والتي قد تتولد في أثناء عمليات التقطيع أو التي تتعرض لها تلك المناطق. ولا يفضل طمر العينات في

الشمع الجامد إذا رغبنا في عمل قطاعات سميكة وذلك لصعوبة الحصول على شريط متصل من القطاعات عند التقطيع بالميكروتوم.

قد تحدث بعض العيوب في قالب الشمع أثناء عملية الطمر مما يتسبب في صعوبة التقطيع وتؤثر على جودة القطاعات، فيما يلي أهم هذه العيوب وأسباب حدوثها وكيفية تلافيها:

١. **تكون مناطق بيضاء (بلورات)داخل قالب الشمع:** ويرجع ذلك إلى بطء في عملية التبريد أو وجود آثار لمحلول الترويق (الزايلين) في الشمع المستخدم للطمر. في الحالة الأولى تعاد عملية الطمر باستخدام ماء أكثر برودة، وفي الحالة الثانية يعاد تمرير العينة مرتين في الشمع النقي.

٢. **حدوث تشققات في القالب الشمعي:** إذا كان التشقق عمودياً على السطحين السفلي والعلوي للقالب الشمعي فهذا يعني أن الشمع قد تم تبريده بسرعة (يجب التبريد بسرعة معتدلة في حمام مائي درجة حرارته لا تقل عن 10°c)، أما إذا كان سطح التشقق موازياً للسطحين السفلي والعلوي فهذا يعني أن عملية صب الشمع في القارب كانت على دفعتين (يجب أن يصب الشمع في القارب على دفعة واحدة).

٣. **وجود قطرات ماء داخل القالب الشمعي:** قد يدخل الماء إلى القالب في الفقاعات الهوائية التي تتكون عند سطح القالب الشمعي عند صب الشمع في القالب. ويمكن إزالة هذه الفقاعات بملقاط ساخن ثم يعاد تبريد الطبقة العليا من الشمع بالنفخ على سطح الشمع قبل تبريد القالب في الماء.

٤. **وجود منطقة مملوءة بالهواء عند مركز القالب الشمعي:** يحدث ذلك عندما يستخدم في تبريد القالب الشمعي ماء أكثر برودة من اللازم مما

يتسبب في تجمد الطبقة الخارجية من الشمع بسرعة أكبر من مركز القالب الشمعي، مما يؤدي إلى تقلص الشمع بعيداً عن مركزه. ومما يساعد في حدوث هذا العيب استخدام شمع ساخن أكثر من اللازم في عملية الطمر. في هذه الأحوال يجب إعادة عملية الطمر.

٥. **السطح العلوي للقالب الشمعي يكون بروزاً شمعياً:** يحدث هذا العيب نتيجة وضع القارب الشمعي في الماء قبل تكوين طبقة رقيقة متجمدة على سطح الشمع عن طريق النفخ. وعادة ما نجد أن الماء قد تسرب إلى داخل القالب الشمعي. في هذه الحالة يجب إعادة عملية الطمر.

٦. **حدوث انخفاض على السطح العلوي للقالب الشمعي عند مركزه قد يصل إلى العينة داخل القالب:** يرجع ذلك إلى أن الشمع المستخدم في عملية الطمر كان ساخناً جداً مما يؤدي إلى تقلص الشمع عند تبريده. في هذه الحالة تعاد عملية الطمر باستخدام شمع درجة حرارته أقل.

في جميع الحالات التي تتطلب إعادة عملية الطمر يزال الشمع من حول العينة باستخدام شفرة حادة أو مشرط إلى أقصى درجة ممكنة بحيث لا يترك حول العينة إلا طبقة رقيقة من الشمع، ثم توضع العينة في الفرن داخل إناء الطمر، وذلك حتى تذوب الطبقة الشمعية حول العينة تماماً ثم تعاد عملية الطمر.

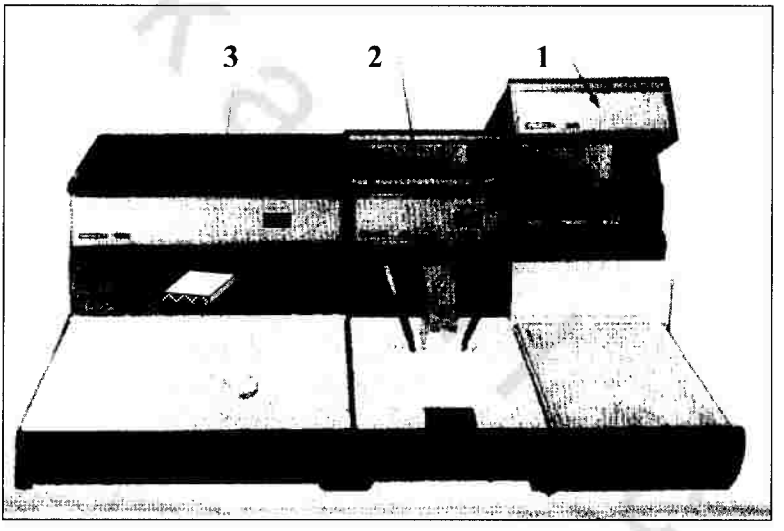
وتتوفر حالياً أجهزة لطمر العينات (الأنسجة) في شمع البارافين وعمل الشكل النهائي للقالب ليكون جاهزاً للتقطيع، وهذه الأجهزة تسمى نظام طمر الأنسجة Tissue- embedding console system (شكل ٢٢)

تتركب هذه الأجهزة عادة من ثلاث وحدات أساسية 3 consoles تستخدم بالتتابع كنظام متكامل لإخراج القالب الشمعي في أفضل صورة. هذه الوحدات عبارة عن:

١. وحدة التسخين The thermal console يصهر فيها شمع الطمر embedding paraffin عند درجة الحرارة المناسبة.

٢. وحدة التوزيع The dispensing console يوزع منها الشمع المنصهر في القوالب التي توضع فيها العينات.

٣. وحدة التبريد The cryo- console وهو عبارة عن لوح كبير مبرد توضع عليه القوالب التي تحتوي على العينة مطمورة في الشمع، حيث تترك عليه هذه القوالب لتتجمد في درجة التبريد المناسبة، وتكون جاهزة لعملية التقطيع.



(شكل ٢٢) جهاز طمر العينات Tissue embedding console

١ وحدة التسخين thermal console

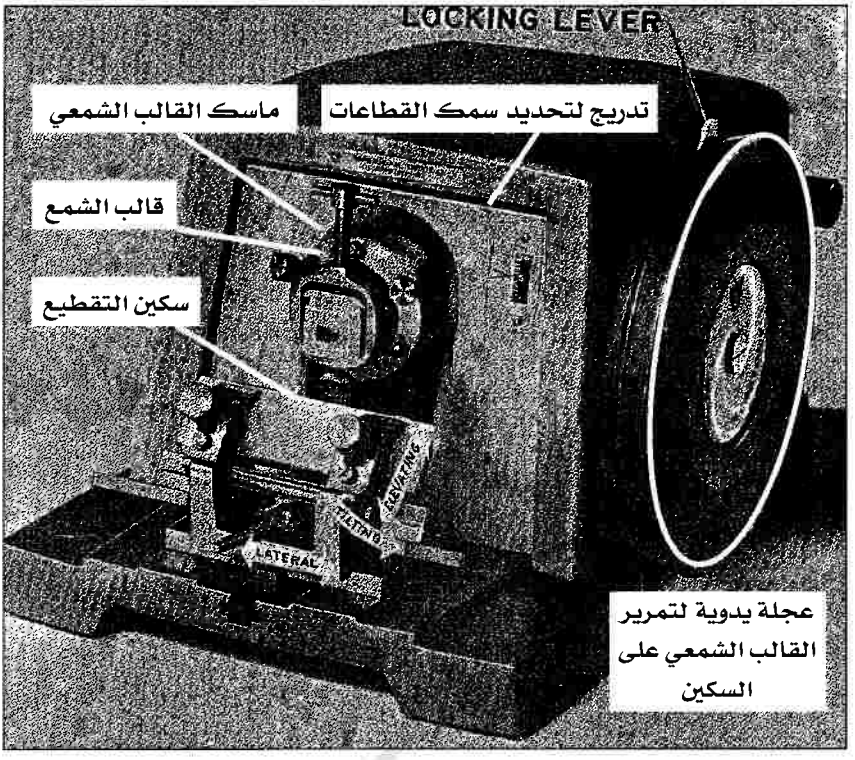
٢ وحدة التوزيع the dispensing console

٣ وحدة التبريد the cryo- console

ثامناً: التقطيع Sectioning:

قبل البدء في عملية التقطيع وعمل القطاعات باستخدام المشرح (الميكروتوم) يلزم أولاً تشذيب القالب الشمعي trimming بإزالة الشمع الزائد عن المطلوب من حول العينة بحيث لا يزيد الشمع حولها عن 2 mm من جميع الجهات فيما عدا الجهة التي سيثبت من عندها القالب في الميكروتوم، حيث يجب أن تكون كمية الشمع خلف العينة بحوالي 0.5 cm، وغالباً ما تستخدم قوالب خاصة ذات أبعاد مناسبة لجهاز التقطيع، وفي هذه الحالة يلزم فقط تشذيب القالب الشمعي من جهة التقطيع وذلك بعد تثبيته في الجهاز وحتى انجلاء (ظهور) العينة. ويراعي أن يزال الشمع الزائد بواسطة شفرات حادة على دفعات بحيث يزال في كل مرة ما لا يزيد عن 1 mm من الشمع حتى لا ينفلق القالب الشمعي. مع مراعاة أن يكون السطحان العلوي والسفلي بعد تشذيبهما متوازيين وأفقيين. كما يفضل أن تكون واجهة القالب الشمعي على شكل معين rhombic حتى يسهل تمييز السطح العلوي عن السفلي.

بعد الانتهاء من عملية التشذيب تثبت الكتلة الشمعية على حامل العينة specimen holder في جهاز التقطيع microtome (شكل ٢٣)، ثم تقطع القطاعات بسمك 7- 3 ميكرون فتظهر القطاعات على شكل شريط متصل (ribbons)، ويفضل تبريد سطح القالب بقطعة من الثلج الناعم قبل البدء في عملية التقطيع، وذلك لزيادة صلابة منطقة التقطيع في القالب مما يزيد من جودة القطاعات الناتجة. ويتم إزالة التجعدات التي قد تظهر على القطاعات باستقبالها في حمام مائي دافئ.



(شكل ٢٣) جهاز عمل القطاعات للفحص بالمجاهر الضوئية (الميكروتوم)

عيوب القطاعات الشمعية في أثناء عملية التقطيع:

١. **القطاعات المتتالية لا تلتصق مع بعضها على هيئة شريط:** ويرجع ذلك لواحد أو أكثر من الأسباب التالية:

أ - الحافة العليا والسفلى للقالب ليستا متوازيتين ويجب إعادة تشذيب القالب الشمعي.

ب - الحافتان العليا والسفلى للقالب لا توزيان حافة السكين العليا.

ت - القالب الشمعي بارد جداً، يمكن النفخ عليه أو وضعه في ماء ساخن.

ث - الشمع المستخدم للطمر من النوع الجامد جداً، ويفضل إعادة عملية الطمر.

ج - سمك القطاعات كبير ويجب التقطيع بسماكة أقل.

ح - درجة حرارة الغرفة قد تكون منخفضة جداً بالنسبة لدرجة انصهار الشمع.

خ - حافة التقطيع بالسكين غير نظيفة.

٢. القطاعات تلتف على بعضها عدة مرات في شكل أنبوبي: يمكن إصلاح هذا العيب أحياناً بأن نبدأ بالحصول على عدد صغير من القطاعات التي نمسك بها ونفردها بواسطة فرشاة، ثم نستأنف التقطيع ليؤدي ثقل القطاعات السابقة إلى فرد القطاعات اللاحقة. وإذا لم يتم إصلاح العيب بهذه الطريقة فإن سبب التفاف القطاعات يكون واحداً أو أكثر مما يلي:

أ - قد تكون السكين مائلة جدا إلى الأمام.

ب - قد تكون حافة التقطيع في السكين غير حادة.

ت - درجة حرارة الغرفة منخفضة جداً بالنسبة لدرجة انصهار الشمع.

٣. شريط القطاعات ينحني بشدة إلى أحد الجانبين: يرجع ذلك إلى عدم جودة عملية التشذيب للقالب الشمعي، فيكون أحد جوانب القالب أطول من الجانب الآخر، وبالتالي فإن شريط القطاعات ينحني تجاه الجانب الأقصر. ويجب في هذه الحالة إعادة تشذيب القالب. فإذا استمر انحناء الشريط تكون حافة التقطيع في السكين مائلة وغير مستوية، ويجب استخدام منطقة تقطيع أخرى في السكين أو استخدام سكين أخرى.

٤. شريط الشمع ينشق طولياً أو تظهر به خدوش على سطحه: قد يرجع ذلك العيب إلى:

أ - وجود حبات من التراب أو فتات من الشمع على حافة السكين، يجب في هذه الحالة تنظيف السكين.

ب - وجود خدش في السكين في هذه النقطة، ويجب استخدام منطقة أخرى من حافة التقطيع.

ت - الشمع المستخدم في الطمر غير نظيف ويجب إعادة عملية الطمر باستخدام شمع نظيف.

٥. القطاعات مضغوطة ومساحة القطاع تقل كثيراً عن مساحة واجهة القالب الشمعي: يرجع ذلك إلى واحد أو أكثر من الأسباب الآتية:

أ - درجة انصهار الشمع المستخدم في الطمر منخفضة جداً، ويجب إعادة طمر العينة في شمع درجة انصهاره أنسب.

ب - السكين مائلة جداً إلى الأمام ويجب تعديل وضعها.

ت - السكين غيرحادة ويجب استخدام سكين حادة أكثر.

٦. عدم الحصول على قطاع مع كل مرة يمر فيها القالب الشمعي على السكين أو أن القطاعات الناتجة لا تكون موحدة السمك:

قد يكون السبب في ذلك:

أ - السكين قد تكون غير مائلة بالقدر الكافي ويجب إمالتها ناحية القالب بالقدر المناسب.

ب - عدم تثبيت ماسك السكين أو ماسك القالب جيداً ويجب إحكام مسامير التثبيت جيداً.

ت - خلل في الميكروتوم نفسه مما يستدعي ضبطه أو استخدام ميكروتوم آخر.

٧. **القطاعات تلتصق بالقالب الشمعي عند صعوده إلى أعلى في أثناء تشغيل الميكروتوم بدلاً من بقائها على السكين:** ويرجع ذلك إلى:

أ - حافة التقطيع في السكين غير حادة أو غير نظيفة ويجب شحذها وتنظيفها.

ب - السكين غير مائلة بالوضع الكافي ويجب إمالتها بقدر مناسب.

ت - الشمع المستخدم في عملية الطمر من النوع الرخو أو أن درجة حرارة الغرفة عالية، وفي هذه الأحوال يجب إعادة الطمر في شمع جامد وخفض درجة حرارة الغرفة في أثناء عملية التقطيع.

٨. **العينة تتفتت وتسقط من القالب الشمعي وتكون ذات مظهر طباشيري:** يحدث هذا العيب في حالتين:

أ - العينة لم يتخللها الشمع جيداً.

ب - عدم نزع الماء من العينه جيداً.

٩. **العينة تتفتت ولكنها ليست طباشيرية:** يحدث هذا العيب في حالة شدة قساوة العينة تحت تأثير السائل المستخدم في عملية الترويق أو تعرض العينة لدرجات حرارة عالية في أثناء عملية التخليل في الشمع. في هذه الحالة يعالج القالب الشمعي بغمره في ماء الصنبور بحيث يكون السطح المقطوع للعينة ذاتها معرضاً له، وذلك لمدة 12 ساعة أو في خليط من الماء والجليسرين بنسبة 1:9 أو في 60% كحول إيثيلي، ثم تقطع العينة فور إخراجها من السائل المستخدم. هذه المعالجة لا تصلح في حالة عينات النسيج العصبي أو الليمفي أو الدهني.

١٠. **سقوط العينة من القالب الشمعي دون تفتتها أو اكتسابها مظهراً طباشيرياً:** يحدث ذلك نتيجة تجمد طبقة من شمع التخليل حول العينة قبل عملية الطمر، وذلك في مرحلة نقلها من الفرن إلى قالب الطمر. يعالج هذا العيب بإعادة الطمر، وينصح بوضع قالب الطمر قرب الفرن.

١١. **شريط القطاعات المحتوي على العينة ينحني تجاه أحد الجوانب، بينما الشريط الخالي من العينة يكون مستقيماً:** ويرجع ذلك لكون العينة ليست في مركز القالب الشمعي، ويجب مراعاة تثبيت العينة في منتصف القالب أثناء عملية الطمر.

١٢. **القطاعات تلتصق بالأشياء المحيطة وتتطاير:** يرجع ذلك لتولد كهرباء استاتيكية نتيجة الاحتكاك أثناء عملية التقطيع. ويعالج ذلك بزيادة درجة الرطوبة في منطقة التقطيع (غرفة الميكروتوم) ويمكن ذلك بغلي كمية من الماء في إناء غير مغطى أو تأجيل التقطيع للصباح الباكر حيث الرطوبة الأعلى في اليوم.

١٣. **ظهور ثقوب كبيرة في القطاعات:** يرجع ذلك غالباً إلى وجود مواد صلبة في العينة وخاصة في بعض العينات مثل: ديدان الأرض حيث يوجد في أمعائها حبات من الرمل. يمكن تجنب ذلك بتجويع الديدان ثم إطعامها كمية من ورق الترشيح الرطب الذي يدفع بالحصى خارج الجهاز الهضمي، ثم تجوع الديدان لعدة أيام حتى يتم التخلص من ورق الترشيح الموجود بالقناة الهضمية.

تاسعاً: تحميل القطاعات Mounting:

قبل تحميل القطاعات على الشرائح الزجاجية يجب التأكد من النظافة التامة لهذه الشرائح. ويمكن غسل وتنظيف الشرائح الزجاجية قبل استعمالها وذلك باتباع الخطوات التالية:

١. توضع الشرائح في محلول من حمض الكروميك (% 10) لمدة يوم.

٢. تغسل الشرائح في ماء الصنبور الجاري لمدة يوم.

٣. توضع الشرائح في محلول من مسحوق الصابون لعدة ساعات.

٤. تغسل الشرائح في ماء الصنبور مرة أخرى.

٥. توضع الشرائح في كحول حمضي مكون من Hcl 1% في كحول (70%) لعدة ساعات.

٦. تغسل الشرائح في ماء جار لعدة ساعات.

٧. تجفف الشرائح بمنشفة نظيفة خالية من الوبر ثم تجمع الشرائح في علب تحفظ بعيداً عن الأتربة.

إذا لاحظت أن الشرائح الواردة إليك نظيفة يمكن حذف الخطوات ١، ٢.

تبدأ عملية تحميل ولصق القطاعات على الشرائح الزجاجية وذلك بنقلها من العلبة الكرتونية التي جمعت فيها هذه القطاعات أو من الحمام المائي مباشرة بواسطة فرشاة إلى سطح شريحة زجاجية ساخنة عليها قطرة من الماء المقطر حتى تنفرد القطاعات وتلتصق بالشريحة، بعد ذلك يجفف الماء الزائد وتحفظ الشريحة في فرن درجة حرارته 37°c لمدة 24 ساعة، بعدها يمكن

حفظها لأي مدة من الزمن وتصبح الشريحة جاهزة للصبغ بشرط حمايتها من الأتربة والحرارة العالية.

يجب مراعاة النقاط التالية في أثناء تحميل ولصق القطاعات:

١. تقطع شرائط القطاعات المحفوظة في العلبة بواسطة شفرة أو مشرط إلى قطاعات منفردة أو إلى مجموعات يتكون كل منها من عدة قطاعات حسب طبيعة العمل.

٢. يتم تسخين الشرائح على سخان كهربائي hot plate درجة حرارته يجب أن تقل 10-15°c عن درجة انصهار الشمع المستخدم في الطمر؛ وذلك لتجنب انصهار الشمع في أثناء لصق القطاعات (تلصق القطاعات والشريحة على السخان) أو تمزق النسيج.

٣. يراعى ضبط اتجاهات القطاعات على الشريحة (توحد الاتجاهات إذا تم تحميل أكثر من قطاع على الشريحة) وذلك حتى يسهل فحصها.

٤. قد تقتضي بعض الأحوال التي يتعين فيها تعريض القطاعات أثناء الصباغة إلى درجات حرارة عالية أو مواد كيماوية معينة كالأحماض والقلويات القوية إلى استخدام مواد لاصقة للقطاعات بدلاً من الماء وإلا انفصلت القطاعات عن الشرائح الزجاجية أثناء معالجتها بهذه المواد، حيث يمكن أن تدهن الشريحة المجهرية الزجاجية بمادة لاصقة مثل زلال البيض albumin أو ما يعرف بلاصق هوبت Haupt، s adhesive أو لاصق ماير Mayer's adhesive ثم ينقل عليها القطاع مع ما يصاحبه من قطرة ماء، ثم تجفف الشريحة على سخان دافئ hot plat فيلتصق عليها القطاع ويكون جاهزاً للإصباغ.

- يتركب لاصق ماير من زلال بيضة واحدة وكمية مناسبة من الجلسرين، وواحد جرام من سالسيلات الصوديوم، ثم يرشح خلال شاش قطني.

الصعوبات التي قد تصاحب لصق القطاعات على الشريحة الزجاجية وكيفية تلافيها:

١. **الشمع ينصهر ويصاحب ذلك تمزق القطاعات:** يرجع ذلك إلى ارتفاع درجة حرارة السخان الكهربائي في أثناء فرد القطاع عليه.

٢. **انزلاق القطاعات الشمعية من فوق الشرائح الزجاجية:** قد يكون ذلك نتيجة ميل السخان hot plate الذي يجب أن يكون أفقياً تماماً، أو نتيجة كثرة كمية المحلول المستخدم في عملية اللصق. وفي جميع الحالات يمكن الحفاظ على القطاعات المنزلقة بسكب ماء بارد عليها ثم سحبها على الشريحة باستخدام إبرة التشريح.

٣. **ظهور فقاعات أسفل القطاعات عند وضعها فوق محلول اللصق:** يمكن تجنب ذلك بوضع القطاع على الشريحة تدريجياً من جانب إلى جانب، ويمكن التخلص من الفقاعات برفع القطاع من أحد جوانبه حتى تزول هذه الفقاعات الهوائية.

٤. **انفصال القطاعات بعد جفافها عن الشريحة الزجاجية:** يرجع ذلك إلى وجود كمية من الماء تحت القطاعات، ويظهر على هيئة منطقة لامعه إذا ما نظرنا أسفل الشريحة الزجاجية. ولتجنب ذلك يجب فرد القطاعات على كمية غير قليلة من محلول اللصق، ثم يصفى الماء جيداً من أسفل القطاع، ثم تجفف الشريحة بواسطة منشفة نظيفة.

٥. **القطاعات تنثني بدلاً من أن تنبسط على الشريحة:** قد يكون ذلك ناتجاً من ارتفاع درجة حرارة السخان أو أن الشمع المستخدم في الطمر يكون لينا بالنسبة إلى رقة القطاعات أو قساوة النسيج. ولعلاج ذلك يتم خفض درجة حرارة السخان للحالة الأولى ويمكن الإمساك بالقطاع بإبرتي تشريح ومحاولة فرد القطاع برفق في أثناء التسخين.

٦. **قطاع العينة يتشقق:** يحدث ذلك عادة في بعض الأنسجة مثل الطحال والكبد والعقد الليمفاوية والأنسجة العصبية، ولمنع حدوث ذلك يجب تصفية الماء من على الشريحة وتجفيفها بمجرد فرد القطاع ثم تجفف على درجة حرارة مرتفعة حتى لحظة بدء الشمع في الانصهار.

عاشراً: صبغ القطاعات Staining:

قبل معاملة الشريحة بالصبغة يلزم أولاً التخلص من الشمع الموجود في القطاع وذلك بواسطة الزيلين xylene الذي يذيب الشمع، ثم يتم التخلص من الزيلين بواسطة الكحول المطلق، ثم إذا كانت الصبغة المستخدمة ذائبة في الماء يجب تمييء hydration القطاعات وذلك بمعالجتها بتركيزات متدرجة الانخفاض من الكحول ثم بالماء المقطر.أما إذا كانت الصبغة ذائبة في تركيز معين من الكحول فإن القطاع يمرر بالكحول حتى ذلك التركيز فقط. بعد ذلك تصبغ الشريحة بالصبغة المناسبة مثل صبغة الهيماتوكسلين haematoxlyn والإيوسين eosin.

لكى تكون الشريحة المحضرة مستديمة permanent slid تتحمل الحفظ لفترات طويلة يلزم التخلص من الماء والكحول الموجود فى القطاع المصبوغ وخاصة أن مواد اللصق المستخدمة مثل الكندا بلسم Canada balsam لا تمتزج مع الماء أو الكحول، ويتم ذلك بتمرير الشريحة المصبوغة في تركيزات

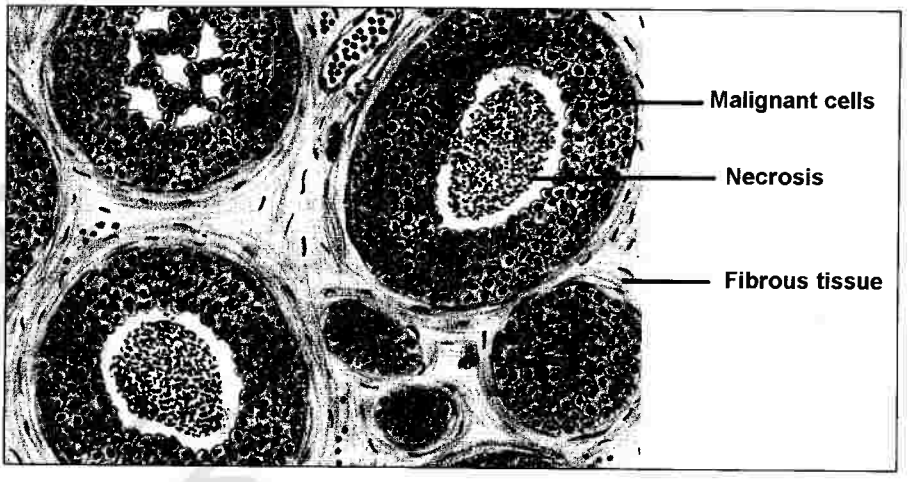
تصاعدية من الكحول ثم تمرر في الزيلين. بعد ذلك يضاف إلى القطاع قطرة من الكندابلسم ثم يمال عليها غطاء الشريحة تدريجياً بحيث لا تتكون فقاعات هوائية بين الشريحة والغطاء.

خطوات صبغ قطاع برافين بصبغة الهيماتوكسلين والإيوسين وعمل شريحة مستديمة

Haematoxylin and Eosin (H &E) Staining of the Paraffin Section with

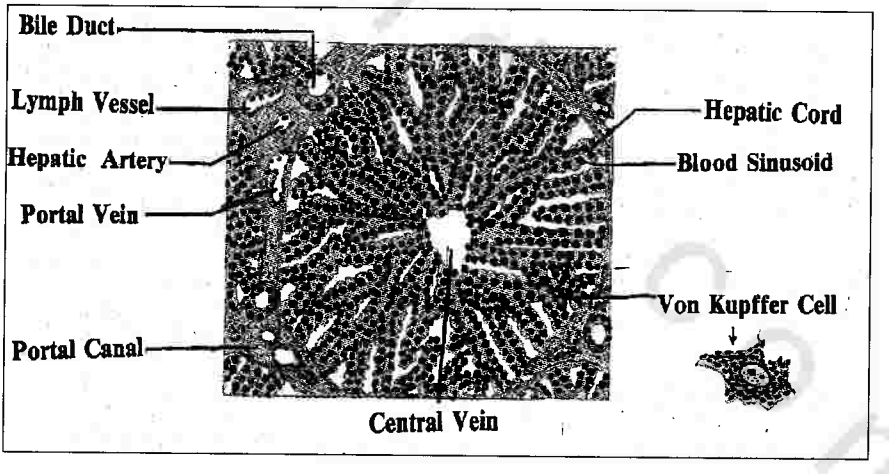
١. يزال البرافين بواسطة الزيلين	2 min
٢. يزال الزيلين بواسطة الكحول المطلق	2 min
٣. تغطى الشريحة بتركيز 90% كحول	1 min
٤. تغطى الشريحة بتركيز 70% كحول	1 min
٥. تشطف الشريحة بالماء المقطر	
٦. تصبغ الشريحة بالهيماتوكسلين	5 - 10 min
٧. تشطف الشريحة بماء الصنبور	5 - 10 min
٨. تشطف الشريحة بالماء المقطر	
٩. تصبغ الشريحة بالإيوسين	1 min
١٠. تشطف الشريحة بتركيز 70% كحول	
١١. تغمر الشريحة بتركيز 90% كحول	1 min
١٢. تغمر الشريحة بالكحول المطلق	2 min
١٣. تروق الشريحة فى الزيلين	2 min

يتم التخلص من الزيلين بإمالة الشريحة لفترة ثم توضع على القطاع قطرة من الكندا بلسم ثم يوضع عليها غطاء الشريحة بحرص.



(شكل ٢٤)

قطاع عرضي في خصية مصبوغ بصبغة الهيماتوكسلين والأيوسين وتم فحصه بالمجهر الضوئي



(شكل٢٥) قطاع عرضي في فصيص كبدي تم فحصة بالمجهر الضوئي

الطريقة المثلى لاستخدام الميكروسكوب (فحص العينات):

بعد تجهيز القطاعات وتحميلها وصبغها يتبقى معرفة الخطوات التي يجب اتباعها لتشخيصها sections diagnosis جيداً. ويمكن تلخيص هذه الخطوات في النقاط الآتية:

١. ينظر للقطاع بالعين المجردة naked eye بواسطة العدسة العينية مقلوبة inverted ocular lens. وذلك يساعد على:

i. رؤية أكثر من عضو.
ii. رؤية أكثر من نسيج بعدة ألوان مختلفة.
iii. رؤية التجاويف lumens الخاصة بأي عضو.
iv. رؤية الحافظة capsule والشبكة trapeculae.
v. رؤية الفصوص الخاصة بأي عضو lobulation.

٢. تستعمل العدسات الشيئية ذات القوى الصغرى low power objectives لرؤية الأنواع المختلفة للأنسجة والعلاقات التشريحية anatomical relations بينها وكذلك ترتيب الطبقات المختلفة للنسيج.

٣. تستخدم العدسات الشيئية ذات القوى الكبرى high power objectives لدراسة التفاصيل الدقيقة للنسيج.

عند وصف التراكيب organelles الموجودة في أي قطاع يؤخذ في الاعتبار أبعادها المختلفة dimensions، فبعض التراكيب يكون لها بعدان two dimensions وقد ترى من زاويتين، وتراكيب أخرى تكون لها ثلاثة أبعاد three dimensions وقد ترى من ثلاثة زوايا، وذلك يتوقف على كيفية توجيه العينة أثناء عمل الكتلة الشمعية paraffin block واتجاه التقطيع، ومن الأمثلة

الواضحة لتلك الأنواع من التراكيب: الأوعية الدموية والقنوات ducts and blood vessels فقد تظهر مستديرة rounded في قطاع وبيضاوية oval أو خطين متوازيين two parallel lines في قطاع آخر.

قد تظهر في أثناء الفحص بالمجهر بعض العيوب artifacts في القطاعات يلزم أخذها في الاعتبار والعمل على تفاديها في أثناء عمليات التحضير. أهم هذه العيوب هي:

- ظهور أخاديد: Farrows نتيجة وجود ثلمات notches فى حافة سكين التقطيع.
- ظهور طيات: Folds نتيجة عدم فرد flattening القطاعات جيداً في حمام مائي.
- ظهور فراغات داخلية internal cavities: نتيجة وجود تجعدات في القطاع shrinkage.
- ظهور بقع ملونة: Colored spots نتيجة ترسبات في الصبغة المستخدمة.

تحضير القطاعات بطريقة التجميد
FREEZING TECHNIQUE

هذه الطريقة هي إحدى الطرق المستعملة تحت ظروف خاصة تتطلب التشخيص السريع، حيث يتم تثبيت وتصليب النسيج باستخدام التجميد الفجائي دون الحاجة إلى العمليات العديدة التي تمرر بها العينة في المحاليل الكيميائية المستخدمة في طريقة تحضير قطاعات الشمع السابقة التي تستغرق وقتاً وجهداً كبيرين.

تستخدم عدة طرق لتجميد النسيج وتقطيعه وذلك حسب الوسيلة المستخدمة للتبريد ومن ذلك:

- تجميد الأنسجة بوضعها مباشرة في النيتروجين السائل liquid nitrogen أو في غاز ثاني أكسيد الكربون CO_2، ثم تقطع القطاعات بواسطة جهاز التقطيع (الميكروتوم) البارد freezing microtome.

- تجميد الأنسجة باستخدام جهاز التجميد الكهربائي electrical freezing apparatus وتقطع القطاعات بسمك ٥ – ١٠ ميكرون بواسطة جهاز الكريوستات cryostat (شكل ٢٨) وهو من أكثر الأجهزة استعمالاً في التحضيرات المجهرية تحت ظروف التبريد (من –١٥ إلى –٢٠ درجة مئوية)

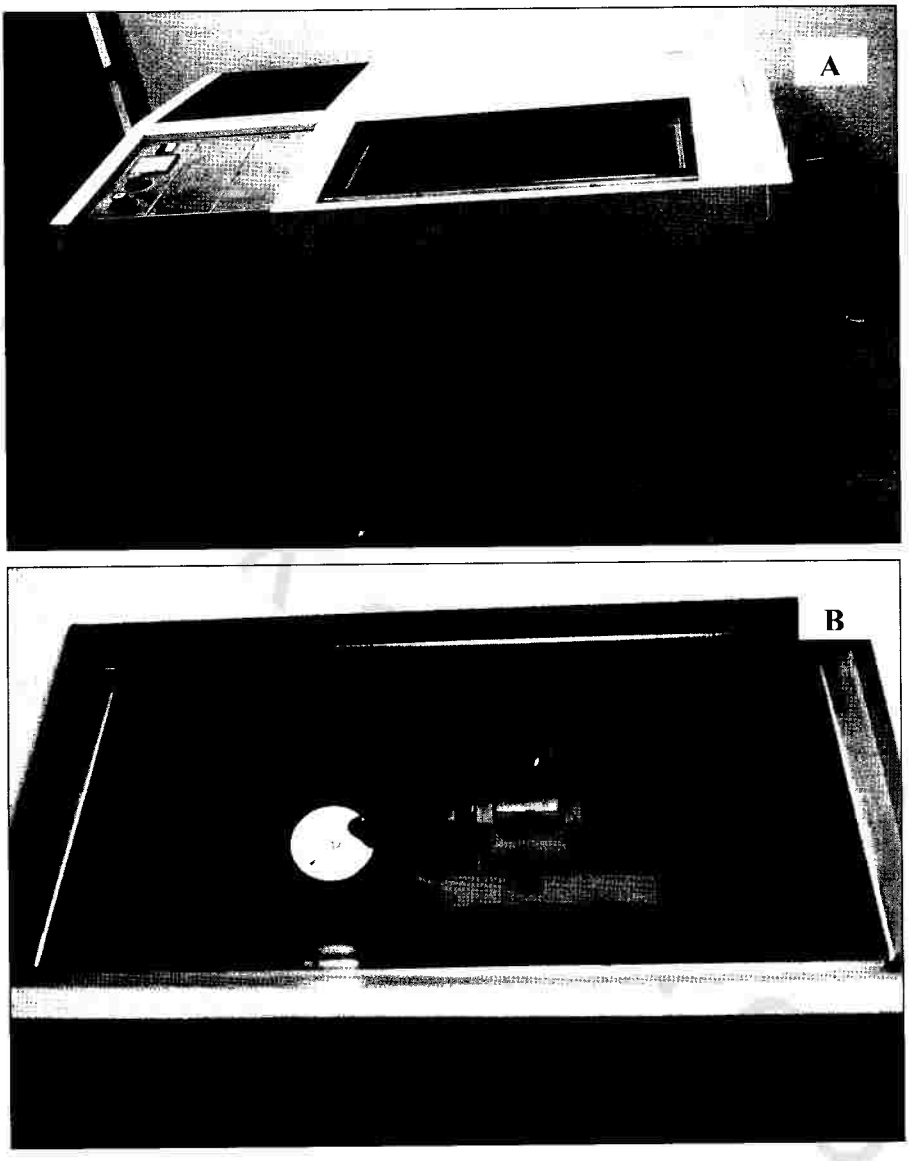
وبعد تقطيع القطاعات تلتقط بواسطة الشرائح الزجاجية، ثم تصبغ كالمعتاد بالصبغة المناسبة ثم تشخص.

مميزات تحضير القطاعات بالتجميد:

i. السهولة والسرعة في تجهيز القطاعات مما يساعد أخصائي علم الأمراض Pathologists في التشخيص diagnosis السريع والتصرف على ضوء ذلك بسرعة، وخاصة أثناء العمليات الجراحية surgical operations.

ii. عدم استخدام أية مواد كيميائية، وبالتالي يمكن استخدام هذه الطريقة في الدراسات الكيميائية للأنسجة histochemistry، مثل دراسة الأجسام المضادة antibodies والإنزيمات، وكذلك الكشف عن ومتابعة مسار النظائر المشعة radioactive substances والتي قد تستخدم في كثير من التجارب الحيوية biological experiments.

iii. تستعمل هذه الطريقة لدراسة الأنسجة الدهنية والمواد التي لها قابلية للذوبان في مواد الإنكاز والترويق.



(شكل ٢٦)

A منظر عام للكريوستات

B صورة توضح غرفة التقطيع في الكريوستات

تحضير القطاعات بطريقة السوليدين
CELLOIDIN TECHNIQUE

هذه الطريقة تستغرق وقتاً طويلاً وجهداً أكبر، حيث يتم طمر الأنسجة في كتلة من السوليدين celloidin mass لمدة ستة أسابيع، ثم تقطع هذه الكتلة بواسطة جهاز يعرف بالميكروتوم المنزلق sliding microtome.

مميزات طريقة السوليدين:

i. المحافظة على علاقات الأنسجة مع بعضها البعض وذلك نظراً لعدم تعريضها للحرارة.

ii. استخدامها لتحضير قطاعات من الأعضاء الكبيرة الحجم التي تتميز باحتوائها على طيات كثيرة وتجاويف plenty of folds and lumina مثل المخ brain.