٤ . الطمر (الصب فى القوالب)

Molding

اولاً : الطمر فى شمع البارافين Paraffin wax embedding routine

عند الوصول بالعينات النباتية إلى الحالة النقية لمذيبات الشمع ، وبعد إزالة الماء بالتجفيف (والترويق) تبدأ عملية التشريب والترقيد بالشمع ، ويستخدم لذلك شمع البارافين إما منفرداً أو مخلوطاً بمواد أخرى .

ويراعى فى شمع البارافين المستخدم توفر الشروط التالية :

(١) أن تكون درجة انصهاره ثابتة ومعروفة وصلابته مناسبة ، وتتراوح درجة انصهار شمع البارافين ما بين ٤٨ إلى ٦٢°م ، مع التجاوز عن درجتى حرارة لكل درجة انصهار فمثلاً الشمع الذى درجة انصهار ٤٨° م مثلاً تتراوح درجة إنصهاره ما بين ٤٨ - ٥٠°م وهكذا - وعادة ما يستعمل الشمع الذى درجة انصهاره ٥٦ - ٥٨° م ، ويفضل خلال الشتاء شمع درجة انصهاره ٥٤ - ٥٦° م ، وفى الصيف ٦٠ - ٦٢° م .

(٢) أن يكون متجانس القوام والملمس ، مع أقل ما يمكن من التركيب المتبلور أو الحبيبى .

(٣) أن يكون نظيفاً خالياً من الشوائب والماء والزيوت الطيارة .

ويمكن تحسين قوام الشمع بمنع التبلور ، وتحسين عملية القطع بإضافة المطاط والشمع الإسكندرانى (شمع العسل) إليه ، وذلك بإذابة ٢٠ جم من المطاط الخام إلى ١٠٠ جم من الشمع المنصهر حتى درجة التدخين ، ثم يبرد ويصب على هيئة البلاطة لحين الاستعمال - وبعد ذلك يمكن عمل الخليط التالى :

شمع بارافين	١٠٠ جم
خليط المطاط وشمع البارافين	٤ - ٥ جم
شمع العسل	١ جم

ثم يصهر الخليط فى الفرن ، ويترك مدة حتى يصير متجانسًا ، ويراعى ترويقه إذا وجدت شوائب - وقد يعد الخليط ويباع تجارياً .

* يستحسن أن يكون المطاط من النوع المسمى مطاط سيلان Ceylon rubber .

* يراعى أن تكون درجة انصهار المطاط مساوية لدرجة التدخين فى الشمع .

التشريب فى شمع البارافين Infiltiration in paraffin wax

ولإجراء عملية التشريب تتبع إحدى الطرق الآتية :

الطريقة الأولى :

توضع العينة النباتية بعد التجفيف والترويق فى زيلول جديد ، فى أنبوبة ذات حجم مناسب ٢ × ٥سم وغطاء فلين ، وتضاف قشور رقيقة من الشمع إلى الزيلول حتى يتوقف ذوبان الشمع على درجة حرارة الغرفة وتترك ٢ - ٤ ساعات ، ثم تنقل الأنبوبة إلى الغرفة العلوية من فرن الشمع ، وهى الغرفة المخصصة لتجفيف الشرائح ، وتتراوح درجة حرارتها بين ٣٥ - ٤٠° م . يضاف مزيد من الشمع على فترات (كل ساعة مثلاً) حتى تصبح قوة تركيز الشمع نحو ٥٠٪ تقريباً ، وتترك لمدة ٤ ساعات - تنقل الأنبوبة إلى فرن الشمع (٦٠° م) دون نزع غطائها وتترك ٢٤ ساعة مع إضافة كمية من الشمع ، إذا تطلب الأمر ذلك (بعد ٦ ساعات مثلاً) - ينزع الغطاء وتضاف كمية أخرى من الشمع وتترك الأنبوبة دون غطاء لمدة ٢٤ ساعة ، حيث يتبخر معظم أو جميع الزيلول . يسكب الشمع الذى يعلو العينات النباتية ويضاف شمع نقى وتترك ٢٤ ساعة . يستبدل الشمع النقى مرة أو مرتين ، ويترك فى كل مرة ٢٤ ساعة ، بعد ذلك يكون تشريب الأنسجة بالشمع تاماً وتصبح العينات معدة للصب (الطمر) فى القوالب .

الطريقة الثانية :

كثافة بعض مذيبات الشمع أقل من كثافة الشمع ، وبذلك تطفو عليه إذا ما أضيفت إلى شمع متجمد ، لكن من الممكن أن يطفو الشمع على كحول البيوتايل العادى NBA أو كحول البيوتايل الثلاثى TBA بإضافة الكلوروفورم بنسبة ١٥٪ إلى NBA و ٢٥٪ إلى TBA كما أن كثافة الشمع أعلى من كثافة الزيلول ، ولكن يمكن إضافة الشمع منصهراً إلى جدران الأنبوبة فيكون طبقة متماسكة من الشمع على سطح المذيب .

يضاف ما يوازى ملء ملعقة صغيرة شمع بـارافين منصهر إلى المذيب النقى ، وهو بارد وبه العينـات النباتية ، فيكون الـشمع طبقة متمـاسكة أعلى المذيب ، وتترك الأنـابيب على درجة حرارة الـغرفة ، ثم تنـقل إلى الفرن الـعلوى (٣٥ - ٤٠° م) ؛ حيث لا ينـصهر الشمع بل يذوب وينتشر إلى أسفل حيث العـينات النباتية . إذا ما تم ذوبان الشمع يضاف كمية أخرى مـن شمع منصهر ، وتـستمر عملية الإضافـة حتى تتكون طبقـة من الشمع لا تذوب على السطح ، وبالـتالى يكون المذيب قد تشبع بالشمـع على هذه الدرجة . لا تخش من تلف العينات إذا طالت مدة هذه العملية ٢ - ٣ يوما .

تنقل الأنابيب إلى فرن الـشمع ، وبذلك تنصهر الطبقة السطحية المـتماسكة ، وتستمر عملية التشريب بالـشمع والتى بدأت على درجة ٣٥° م ، بعد مضى نحـو ٤ ساعات يصب نصف الكمية الموجودة فى الأنابيب ، وتستبدل بكمية مساوية من الشمع النقى ، وتكرر هذه الخطوة ٤ - ٥ مرات ، فى النهاية يسكب الشمع المصاحب للعينات ، ويستبدل بآخر نقى ، وتعاد الأنابيب إلى الفرن سريعاً ، تكرر هذه الخطوة ٢ - ٣ مرات لتمام التأكد من التخلص من كل أثر للمذيب ، وعند تمام التخلص من المذيب لا يكون الشمع دهنى الملمس .

الطريقة الثالثة :

تستعمل فى حالة عدم إضافة الكلوروفورم إلـى كحول البيوتايل العادى أو الثلاثى لرفع كثافتـه ، وتجـرى بنقـل النماذج إلـى خلـيط من البيوتايـل وزيـت البـارافين بنسبة ٥٠ ٪ لكل . تترك النماذج فيـه علـى الأقل لمـدة ساعـة ، ثم يصب مـلء نصـف أنبوبـة بالشمع المنصـهر وتـترك حتى يبدأ الشمع فى التمـاسك ، ثم تسكب النماذج وما عليـها من خليط علـى هـذا الشـمع المتصلـب ؛ بحيـث تكون الـنماذج مغطـاة بالخليـط ، وتـتـرك فـى جـو الغـرفة العادى ، يذيب البيوتايل الشمـع فتأخذ النماذج فى الغوص إلى أسفل ببطء ، وبذا يحدث التشريـب تدريجياً ، ثم تنقل الأنابـيب إلى الغرفة العلوية مـن الفرن ، وتترك لمدة ١٢ ساعة حتى يصبح الخليط والشمع سائلا . تنقل الأنابيب إلى الفرن ، وتنزع الأغطية ، فيـبدأ الكحول فى التـطاير ويزداد تركيز الشـمع ، بعد ٤ - ١٢ ساعة يستبدل هـذا الخليط بشمع نـقى ، وتكرر هذه العمليـة مرتين أو ثلاث كل ٦ ساعات ، ثم يعمل اخـتبار مضغ قطعة شمع للتأكد من زوال كل أثر للمذيب .

الترقيد فى شمع البارافين Embedding in paraffin wax

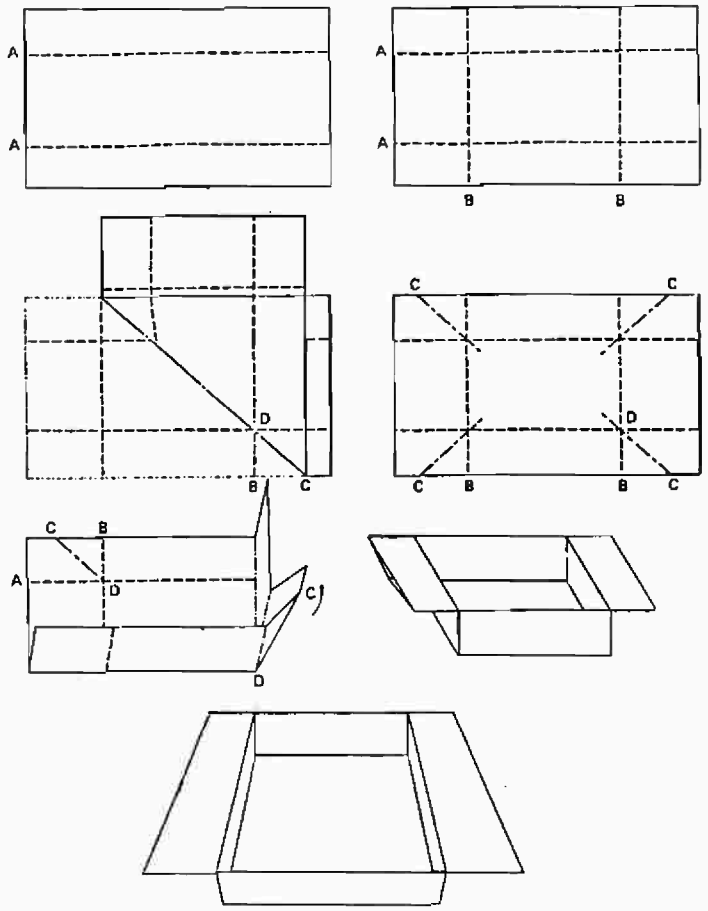
تسكب العينات النباتية بما حولها من شمع منصهر بعد تمام تشريب العينات بالشمع فى قوالب خاصة ، قد تحضر من الورق المقوى (شكل ٤ - ١) ، أو قد تستعمل قوالب معدنية ، وأحياناً تستعمل قوالب الثلج البلاستيك الموجودة مع الثلاجات ، كما قد تستعمل زجاجات ساعة بحجم مناسب .

ولإجراء هذه العملية يفضل إضافة طبقة رقيقة من الجلسرين على السطح الداخلى للقالب ، حتى يسهل فصل قوالب الشمع بعد تجمدها - توضع القوالب على سطح ساخن Hot plate ويضاف طبقة شمع رقيقة ، ثم توضع بطاقة بيانات صغيرة مقلوبة بأحد الأركان ، ثم تصب محتويات الأنبوبة من شمع منصهر به العينات النباتية ، ويراعى أن يغطى الشمع العينات تمامًا وإلا يضاف كمية مناسبة من شمع منصهر ، وتنظم العينات فى الوضع المناسب بواسطة إبرة تشريح دافئة ، مع ترك مسافة مناسبة بين كل عينة وأخرى ؛ ليمكن تجزئة القالب مستقبلاً إلى قطع صغيرة ، تحتوى كل منها عينة واحدة للقطع فيها ، ويراعى عدم تصلب الشمع حتى تمام تنظيم العينات .

يبدأ سطح القالب فى التجمد أولا ؛ حيث تتكون طبقة رقيقة صلبة على السطح ، ويرفع القالب بعيداً عن السطح الساخن ، ثم يوضع القالب بإناء به ماء بارد ليتصلب . وقد يتطلب الأمر أحياناً إمرار لهب على سطح الشمع للتخلص من أية فقاعات هوائية تتكون داخل الشمع . عند بدء تصلب الشمع يغمس داخل الماء لتمام التصلب ، ويمكن وضع ثقل مناسب فوق القالب .

يتماسك الشمع ويصبح بيئة متجانسة نصف شفافة ، أصلح ما تكون لإجراء القطع ، تنزع قوالب الشمع من قوالب الورق ، ويمكن استعمال القوالب الورقية مرة أخرى ؛ حيث إن تشربها بالشمع يجعلها أفضل للاستعمال حيث يكون سطحها مصقولاً .

يراعى ألا يترك الشمع يبرد تدريجياً ؛ حتى لا يتبلور ويصبح غير صالح للقطع ، ولايضاف شمع إلا بالقدر الكافى لتغطية العينات ؛ لأن القوالب السميكة تكون صعبة التماسك . أضف إلى ذلك الإسراف فى استعمال الشمع وسرعة استهلاك محاليل إزالة الشمع فى الخطوات التالية .



How to fold a paper box.

شكل (٤- ١) : كيفية عمل قالب من الورق المقوى لطمر العينات النباتية فى شمع البارافين (ويلى Willey ١٩٧١) .

إذا ظهر أى عيب بالقوالب بعد صبها يمكن إعادة هذه العملية مرة أخرى Recasting ؛ حيث تقسم قوالب الشمع إلى قطع تحتوى على العينات النباتية ، وتوضع فى أنابيب تعاد إلى الفرن مع عمل تغييرتين من الشمع للتخلص من الشمع السابق صبه وتكرر الخطوات السابقة .

قد تظهر بعض المشكلات أثناء عملية التقطيع بالميكروتوم ، نتيجة عدم إجراء التشريب بالشمع على الوجه الأكمل ، ولمعالجة ذلك يلزم **إعادة عملية التشريب بالشمع Reinfiltration** بشرط ألا يكون قد لحق أى ضرر بالأنسجة ، ويتم ذلك بإزالة الشمع بقدر الإمكان من حول العينات ، دون المساس بها ووضعها فى أحد مذيبات الشمع ، وتركها على درجة ٣٥° م لمدة ٢٤ ساعة ، ثم تنقل بعد ذلك إلى داخل الفرن ، وتجرى عملية تشريب بالشمع من جديد كما سبق ذكره .

ثانياً : الطمر فى السللويدن Celloidin embedding routine

تستعمل هذه الطريقة لعمل قطاعات فى النماذج الصلبة أو الهشة ، التى لا يصلح شمع البارافين كدعامة لها . ومن الأمثلة على ذلك منطقة التحام الأصل بالطعم والأنسجة المصابة التى تكون متهتكة ، وكذلك عند عمل القطاعات فى الأشجار الكبيرة . والسللويدن أحد أشكال النتروسليولوز ، والمذيب المستعمل له عادة عبارة عن الاثير وكحول الميثايل بنسب متساوية . والمعتاد تحضير ٥ تركيزات من محلول السللويدن وهى ٢ ، ٤ ، ٦ ، ٨ ، ١٠ ٪ وتتلخص عملية التشريب بالسللويدن فى نقل الأنسجة التى سبق قتلها وطرد الماء منها إلى محلول مخفف من السللويدن ، وزيادة تركيز السللويدن تتم بعدة طرق ، وفيما يلى شرح لإحدى هذه الطرق :

تجرى عملية طرد الماء من العينة باستعمال تركيزات متدرجة من كحول الإيثايل حتى الوصول إلى الكحول المطلق ثم إلى المذيب حيث تبقى مدة ساعة إلى عدة ساعات ثم تنتقل إلى محلول ٢ ٪ سللويدن ، بحيث يكون حجم المحلول ٥ أمثال حجم النموذج على الأقل ، ثم تقفل الزجاجة بسدادة تثبت بسلك ، ثم توضع الزجاجة فى فرن على درجة ٣٥ - ٦٠° م . وعلى فترات تتراوح بين ٢٤ ساعة للنماذج التى سمكها ٣ - ٥ مم إلى يومين أو أكثر للنماذج الأسمك من ذلك ، يغير المحلول بمحلول آخر أكثر تركيزاً ، وذلك بإخراج الزجاجة من الفرن وتبريدها ، واستبدال محلول ٢ ٪ بآخر ٤ ٪ ، ثم نعيد قفل الزجاجة ووضعها فى الفرن بالتالى ، ثم تكرر هذه العملية لمحلول ٦ و ٨ و ١٠ ٪ ، وبعد ذلك

نضيف قشوراً رقيقة من السللويدن للزجاجة كل ٢٤ ساعة ، وعندما يصبح السللويدن سميكًا لدرجة أنه يسيل بصعوبة على درجة حرارة الغرفة يكون صالحًا لعمل قالب ، ويمكن التأكد من ذلك بوضع عود ثقاب جاف داخل محلول السللويدن ، فيأخذ معه كمية من السللويدن .

يتم إعداد قالب السللويدن برفع جزء من النموذج ، وحوله كتلة من السللويدن السميك ، ثم يغمر فى الكلوروفورم فيتصلب السللويدن فى الحال ، ويكون شفافًا ، ويحسن ترك الكتلة فى الكلوروفورم لمدة ١٢ ساعة ؛ حتى يتم تصلب الأجزاء الداخلية ، ثم ينقل النموذج بعد ذلك إلى محلول من أحجام متساوية من كحول الإيثايل ٩٥٪ والجلسرين ؛ ليحفظ فيه استعداداً لعملية القطع .

ثالثاً: الطمر المزدوج فى السللويدن وشمع البارافين

تتلخص هذه العملية فى تشريب الأنسجة بالسللويدن ثم فى شمع البارافين . وتستعمل هذه الطريقة فى حالة النماذج المحتوية على أنسجة صلبة مع وجود مناطق هشة سهلة التكسر ، مثل سوق بعض الحشائش التى بها مناطق تحتوى على خلايا اسكلرنشيمية ملجننة بشدة ؛ مما يستدعى الأمر وجود دعامة أقوى من التى يمكن الحصول عليها من شمع البارافين . لذلك تجرى عملية الترقيد فى السللويدن بإجراء عملية التصلب ، ثم يزال السللويدن المحيط بالنموذج ، مع تعريض الأسطح المقطوعة وعدم التعرض للأجزاء المحتوية على البشرة ، ثم تجرى عملية التشريب فى شمع البارافين ، وبهذه الطريقة يمكن إجراء عملية القطع باستعمال الميكروتوم الدوار والحصول على شريط .

رابعاً: الطمر فى أشباه شموع تذوب فى الماء

هناك طريقة وسط ما بين طرق طمر النماذج فى الشمع أو السللويدن ، وقطع النماذج دون طمر . ويستعمل فى ذلك مركبات صناعية تشبه الشمع ، ولكنها تذوب فى الماء مثل مركب Glycerol monostearate الذى ينصهر على درجة ٥٥° م .

تنقل النماذج الحية أو المقتولة من الماء مباشرة إلى المادة المستعملة المنصهرة (Glycerol monostearate) ثم توضع فى الفرن لمدة ٤٨ ساعة تغير أثناءها ٦ مرات ، ولا يحدث أثناءها تشرب كامل للأنسجة ، ولكن تكتسب النماذج صلابة ؛ وبذا يمكن عمل قطاعات جيدة رقيقة بواسطة الميكروتوم المنزلق . وتنقل القطاعات إلى الكلوروفورم ، ومنه إلى الكحول ومن الأخير للصبغة .