التشريبInfiltration

- هي عملية احلال مواد التشريب محل محاليل الترويق او محل محاليل الترويق والانكاز (ازالة الماء) في حالة الامتزاج
- قبل البدء بالتشريب يوضع النسيج في وعاء زجاجي يسمى صحن سيراكوز Syracuse dish يحتوي خليطا 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.
- الغرض منها دعم وتقوية الخلايا من الداخل والخارج بحيث يصبح النسيج ذو قوام صلب، يحافظ على النسيج دون تشويهها أو تغير تركيبها الخلوي فيساعد على التقطيع بسهولة دون تمزق او تهشم المقطع.
- مواد التشريب المستعملة هي البرافين والسيلودين والجيلاتين والشمع المائي
- حجم وسط التشريب يجب ان يكون حوالي عشرة اضعاف حجم النسيج
- تشرب الانسجة التي فيها هواء كالرئة بالشمع في فرن مفرغ من الهواء حتى لا تظهر فراغات في قالب الشمع.

شمع البارافين paraffin wax

- يعتبر اكثر مواد التشريب شائعة الاستعمال
- يمتاز بان له درجة أنصهار مختلفة لذا يعتمد اختيار نوع البارافين على:
- نوع النسيج / 2- سمك المقطع / 3- معدل درجة الحرارة الغرفة
- البارافين الطري وتكون درجة انصهاره بين 45 -55 م°، يستخدم في طمر الأنسجة الرخوة وعمل المقاطع السميكة ويستعمل في الجو البارد.
- البارافين الصلب تتراوح درجة انصهاره بين 56 -68 م°، تستخدم في الأنسجة القاسية وعمل المقاطع الرقيقة 5 مايكروميتر اواقل ويستعمل في الجو الحار.

الطمر Embedding

- بعد التشريب بالشمع يتم طمره في الشمع النقي
- ينقل النسيج اليه بحذر
- القالب الجيد يكون رائقا ومتجانسا
- ظهور جيوب هوائية في القالب غير الجيد فتبدو كنقط بيضاء تسمى هذه بظاهرة التبلور Crystallization
- القالب المتبلور لا يصلح ويفضل اعادة طمره
- يطرد الهواء بصهر الجزء العلوي من القالب باداة ساخنة
- انواع القوالب اما معدنية اوبلاستيكية او ورقية او زجاجية.
- قوالب الطمر ذات حجوم مختلفة 22x 22 ملم و 22 30x ملم و 22 40x ملم وجميعها بعمق 5 ملم تصنع من الورق اللامع الخاص بالمجلات وهناك قوالب جاهزة بلاستيكية او زجاجية خاصة ولابد من دهنها بالكليسرين من الداخل قبل الطمر ليسهل رفعها.

وسائط التشريب والطمر

أ- نظير البلاستيك paraplast

مزيج من شمع البارافين ومبلمرات البلاستيك ودرجة انصهاره بين 56 و57 م° مزاياه:

1. تجانس القوالب الناتجة
2. بطء تجمده عند الطمر

3. سهولة قطع شريط النسيج
4. مايضيفه من سهولة في قطع القوالب الكبيرة

ب- **الاصماغ الصناعية synthetic resins**

- صموغ الاكريليك Acrylic مثل ايثيل ميثاكريليت وصموغ ايبوكسي مثل ارالدايت وصموغ البولستر خاصة في التحضيرات المجهرية الالكترونية.
- تصبح شديدة الصلابة عند التبلمر لذا تساعد في عمل مقاطع رقيقة جدا سمكها بين 400 و600 انكستروم (A˚) وتستعمل لمقاطع المجهر الضوئي بسمك 1و2 مايكرومتر.
- لاتحدث تشوهات في بناء النسيج
- يتم الطمر في فرن حرارته 60 و70 م˚ ولمدة 8 الى 12 ساعة.

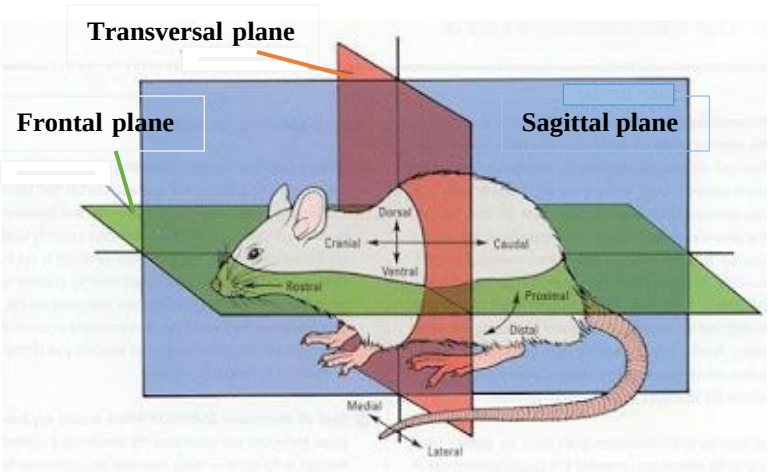
انواع المقاطع

1. **المقاطع الطولية longitudinal section** وتكون على نوعين:

أ- **سهمية sagittal plane** اي موازية للمحور الطولي وعمودية على العرضي ويكون القطع فيها من احد جانبي العينة الى الجانب الاخر، فيتضمن المقطع جانب ايمن واخر ايسر

ب- **امامي او جبهي frontal plane** اي موازية للمحور الطولي وعمودية على العرضي ويكون القطع فيها متجها من ظهرالعينة الى البطن، فيتضمن المقطع جانب ظهري واخر بطني

2. **المقاطع العرضية Transversal (Cross) plane** عمودية على المحور الطولي للعينة وموازية للمحور العرضي ويكون اتجاه القطع من الراس الى الذيل



المشاكل المتوقعة اثناء تقطيع الانسجة واسبابها وعلاجها

	المشكلة	السبب	العلاج
1	التفاف المقاطع الى الاعلى وعدم تكوين شريط	-الشمع صلب -السكين باردة -ميل السكين زائدة	-طمر القالب بشمع طري -تدفئة السكين -تقليل ميل السكين

2	التواء شريط المقاطع	-عدم توازي سطحي القالب السفلي والعلوي -سخونة احد جانبي القالب اكثر من الجانب الاخر -عدم تساوي حدة السكين	-اعادة تقليل القالب ليصبح متوازي الحواف -تبريد القالب -تغيير مكان القطع على السكين بتحريكها او اعادة شحذها
3	انشقاق المقاطع طوليا	-وجود ثلمات في حد السكين -وجود فضلات على حد السكين -وجود فضلات او اجزاء صلبة في النسيج او الشمع	-تغيير مكان القطع -تنظيف حافة السكين -اعادة الطمر باستعمال شمع مرشح
4	عدم انتظام سمك المقاطع	-عدم تثبيت السكين وقالب الشمع -عدم ضبط الية الدفع في جهاز التقطيع	-احكام تثبيت السكين وقالب الشمع -تزييت اجزاء جهاز التقطيع او تغييرها
5	وجود اجزاء سميكة واخرى رقيقة في كل مقطع	- اهتزاز حافة السكين نتيجة ميلها الزائد	- تقليل ميل السكين
6	التصاق المقاطع بقالب الشمع	-شحن قالب الشمع بكهرباء ساكنة -وجود شظايا من الشمع على حافة السكين او الطرف العلوي لقالب الشمع -صغر زاوية الخلوص	-زيادة رطوبة مكان القطع وتفريغ شحنات الكهرباء الساكنة باستعمال مصباح بنسن Bunsen -تنظيف حافة السكين وطرف قالب الشمع -زيادة زاوية الخلوص
7	وجود ثقوب بالمقاطع	- وجود فقاعات هواء بقالب الشمع	- اعادة الطمر
8	سماع صوت معدني اثناء القطع	-قساوة النسيج -وجود بلورات في النسيج -تعرض النسيج لمدة طويلة للكحول -بطء التقطيع	-الحل ليس سهلا الا اذا كان السبب هو بطء سرعة التقطيع، وفي هذه الحالة يكمن الحل في زيادة سرعة التقطيع
9	عدم تكون شريط رغم جودة المقاطع	-الشمع بارد او صلب -عدم موازاة حافة القالب لحافة السكين -المقاطع غليظة	-تدفئة السكين والطمر بشمع طري -الموازاة بين حافة السكين وحافة قالب الشمع -تقليل سمك المقطع
10	تساقط النسيج من قالب الشمع	-عدم اكتمال ازالة الماء والتشريب	-اعادة ازالة الماء والتشريب
11	تفتت النسيج في مقطع الشمع	-فترة التشرب اطول من اللازم ودرجة الحرارة وسط التشريب عالية	-نظرا لان النسيج يكون (مطبوخا) في هذه الحالة، فانه قد فات الاوان لاي حل

صبغ الانسجة

- الصبغة ضرورية لانها تزيد من الفروق في معامل انكسار مكونات الخلية والنسيج مما يؤدي الى تمايزها، ويحدث هذا نتيجة الفرق في ميل بعض مكونات الخلية او النسيج لمعظم الصبغات.

نظرية الصبغ:

1. **الكيميائية** - ترتكز على التفاعل الكيميائي فالانسجة او المكونات اما قاعدية فهي acidophilic فتصطبغ بالصبغات الحامضية او حامضية فهي basophilic فتصطبغ بالصبغات القاعدية.
2. **الطبيعية** - ترتكز على ان الانسجة تصطبغ بوسائل طبيعية مثل الامتصاص والادمصاص والخاصية الشعرية والانتشار والاوزموزية.

تصنيف الصبغات:

❖ **تصنف حسب مصدرها:**

1- **الطبيعية** : يحصل عليها اما من مصدر حيواني او نباتي، وتستعمل انواع من الصبغات الطبيعية في التحضيرات المجهرية بشكل واسع (قرمز Cochineal وكارمين Carmine وهيماتوكسلين Haematoxylin واورسين Orcein و سافرون Saffron ونيلة Indigo)

أ- **Carmine & Cochineal**: تستخرج هذه الصبغات من جسم حشرة صغيرة اسمها *Coccus cacti* تعيش على نبات الصبار، وتوجد الصبغة على شكل رحيق ارجواني في اناث هذه الحشرة. وغلي القرمز مع ملح الشب Alum ينتج راسب لا يذوب بالماء يدعى كارمين Carmine، ويستعمل كصبغة جيدة للنواة.

ب- **Haematoxylin**: تستخرج من خشب شجرة بقولية صغيرة اسمها *Hematoxylin campechianum* تزرع في امريكا الجنوبية والوسطى. وتستخلص الصبغة بمعاملة الجذوع بالايثر. ولا يستعمل الهيماتوكسلين كصبغة نظرا لعدم ميله للانسجة، الا بعد اكسدته ليكون هيماتين Hematein.

ت- **Orcein**: تستخلص من الاشن (الحزاز) lichen يسمى Rocella ويحضر بغلي الاشن في الماء.

ث- **Saffron**: يستخلص من مياسم نبات الزعفران Crocus

ج- **Indigo**: تستخرج من نباتات تنتمي للجنس Indigofera

2 - المصنعة: مركبات عضوية تشتق من البنزين، تعمل بعد ان ترتبط حلقة البنزين لمجموعة حاملات الالوان Chromophores الخاصة بالصبغة فتكون مولد الصبغة Chromogen والاخير لا يصبغ الا بعد ان يرتبط مع مكون اخر حامضي او قاعدي يسمى مساعد اللون Auxochromes

❖ **تصنف حسب حاملات الالوان Chromophore : وهي مجموعة ذرية ترتبط باللون:**

تصنف الصبغات الى تلك التي تحتوي على:

1- صبغات **الكينونويد Quinonoid dyes:** ينتمي لها (Xanthene و Hematein و Thiazine)،

أ- **Hematein**: مجموعة صغيرة من الاصباغ المستخرجة من نبات بقلي يدعى Hematoxylon campechianum لونه احمر الى بني، وبوساطة مرسخ صبغة، يصبح من اهم الاصباغ في التحضيرات المجهرية.

ب- **Xanthene**: تمثل الصبغة السايتوبلازمية Eosin احد الامثلة عن هذه

المجموعة التي يشير اسمها الى اللون الوردي. (ومنها Eosin Y و Eosin B وPhloxin ويمكن تحضير محاليل مائية من هذه الصبغة بتركيز 1%). ولمنع نمو العفن في هذه المحاليل يضاف 0.25 مل من فورمالديهايد 40% لكل 100% مل من المحلول.

ج- **Thiazine**: في هذه المجموعة يربط عنصر الكبريت والنتروجين بين حلقتين. وهي مهمة في صبغ البروتينات النووية. ومثال اخر لهذه المجموعة هي صبغة Azure B.

2- **Azo- dyes**: منها Congo Red و Trpan Blue و Orange G و Janus Green. وهي تصبغ السايتوبلازم.

3- **Nitro- dyes**: وهي اصغر مجموعة وحامض البكريك احد المكونات الاساسية لمثبت بوان.

❖ **تصنف حسب مساعدات اللون auxochromes :وهي مجموعة لها القابلية لربط الصبغة مع النسيج:**

1. **اصباغ قاعدية Basic stain:** يحمل مساعد اللون فيها شحنة موجبة، ومثال عليها Basic fuchsin وتصبغ مكونات الخلية الحامضية كالنواة.
2. **اصباغ حامضية Acidic stain:** يحمل مساعد اللون فيها شحنة سالبة، ومثال عليها Acidic fuchsin وتصبغ مكونات الخلية القاعدية كالسايتوبلازم.
3. **اصباغ متعادلة Neutral stain (Romanovsky):** تنتج عن تفاعل صبغ حامضي واخر قاعدي، لا تذوب بالماء بل بالمذيبات العضوية مثل صبغات Romanovsky التي تستخدم لصبغ الدم وتصبغ مكونات الخلية المحبة للقاعدة والمحبة للحامض.

مرسخات الصبغة Mordants

- تساعد على تثبيت الصبغة بالانسجة وهي ضرورية في حالة الهيماتوكسلين.
- المركب المكون من الصبغة والمرسخ يدعى البحيرة lake
- تستعمل الكبريتات والكلوريدات كمرسخات ولكن املاح الالومنيوم والحديد والنحاس اصبحت لاسباب تاريخية اكثر شيوعاً

طرق الاستعمال:

1. يوضع النسيج بالمرسخ قبل التصبيغ
2. يخلط مع الصبغة ووضع النسيج بالخليط المذكور.
3. يوضع النسيج بالمرسخ بعد التصبيغ (حالة نادرة)

- لاجل الحصول على محاليل تحتوي الصبغة والمرسخ معا ولها فعالية تستمر لمدة طويلة يجب ان تكون ذات قوة اكسدة ضئيلة وشبه معدومة لذا يفضل استعمال شب الامونيا Ammonium alum وشب البوتاسيوم Potassium alum
- اما لتحضير محلول مرسخ وصبغة قصير الامد يستعمل شب الحديد Ferric alum وferric chloride

طرائق الصبغ

1. **الصبغ التقدمي progressive staining:** في هذه الطريقة تفحص المقاطع بين حين واخر، حتى اذا ما تبين ان مكوناتها قد التقطت القدر الكافي من الصبغ تستخرج من محلول الصبغة. وتستعمل صبغات السايتوبلازم تقدميا.

2. **الصبغ التراجعي regressive staining:** في هذه الطريقة يغالى في صبغ النسيج، اي يصبغ النسيج بقدر اكثر مما هو مطلوب في الخطوة الاولى، ثم تزال الصبغة الزائدة عن الحاجة باستعمال عوامل التمييز Differentiating Agents، وتستعمل صبغات النواة تراجعيا.
3. **الصبغ المباشر Direct staining:** هذه هي الحالة التي يكون فيها صبغ الانسجة كاف عندما توضع في محلول مائي او كحولي من الصبغة مثل ازرق المثيل او ايوسين، دون الحاجة الى وسيط.
4. **الصبغ غير المباشر Indirect staining:** لا تصطبغ الانسجة بكثير من الصبغات الا بوجود وسيط يسمى المرسخ Mordant كما في الهيماتوكسلين وتستعمل الصبغة والمرسخ معا.

التمييز Differentiation

- يقصد بهذه العملية التخلص من الصبغة الزائدة، وهي متصلة بالصبغ التراجعي.
- مثال على عوامل التمييز الجيدة هو الكحول الحامضي الذي يزيل الهيماتوكسلين الزائد.
- بشكل عام يكون وسط التمييز حامضيا اذا كانت الصبغة قاعدية والعكس صحيح. وذلك لان انتقائية الانسجة للصبغات القاعدية او الحامضية ليس مطلق.
- وكذلك يمكن الاستفادة من هذه خاصية التمييز لازالة الصبغة الباهتة من الشرائح القديمة، اذ باستعمال وسط تمييز مناسب، تزال الصبغة القديمة كليا ويتم اعادة صبغ تلك الشرائح.