الفصل السابع

تحضيرات القطاعات الميكروسكوبية
(الشمعية والجيلاتينية والسيللودينية)
Preparation of Microscopic Sections, Paraffin, Gelatine and Celloidin Sections

لا غنى للمهتمين بدراسة تركيب أجسام الحيوانات والنباتات عن عمل قطاعات رقيقة فيها بقصد فحص أنسجتها وخلاياها باستخدام الميكروسكوب.

وفى الدراسات الروتينية يطمر الحيوان (إن كان صغير الحجم) أو جزءا من جسمه فى الشمع المنصهر بعد إجراء العمليات اللازمة من تثبيت ونزع ماء عن طريق الكحولات ثم ترويق العينة بمحاليل مثل الزيلول. وبعد ذلك تؤخذ الكتلة الشمعية المحتوية على النسيج بعد تجمدها وتوضع على آلة قطع الأنسجة المسماة الميكروتوم Microtome (شكل ٥) وهو مزود بسكين خاص ويمكن بواسطته الحصول على قطاعات سمكها يبدأ من واحد ميكرون فأكثر حسب طبيعة الدراسة. وفى الدراسات الطلابية فإن سمك ٥ ميكرون يكون كافيا. ثم تؤخذ القطاعات الشمعية وتلصق على شرائح نظيفة ثم يذاب الشمع من حول العينة بمادة مثل الزيلول، ثم تصبغ القطاعات بأى من الطرق المعروفة. ومن ميزة هذه الطريقة إمكانية الحصول على عدد كبير من القطاعات دون فقد أى منها وذلك بسهولة ويسر.

غير أنه عند إجراء الدراسات التى تهتم بوجه خاص بدهون الأنسجة والخلايا فلا يمكن الاعتماد على هذه الطريقة لأن النسيج يتعرض أثناء الإعداد للكحولات والزيلول وهى بالطبع مواد مذيبة للدهون.

كما أن القطاعات الشمعية لا تصلح إذا كانت الدراسات تهتم بإنزيمات الأنسجة والخلايا حيث أن الطمر فى الشمع المنصهر يعرض النسيج لدرجات حرارة عالية نسبيا مما يعرض إنزيمات النسيج للتكسر والتلف.

وعلى هذا الأساس فإنه عند دراسة الدهون أو الإنزيمات فى الأنسجة يلجأ الباحثون إلى عمل نوع آخر من القطاعات هو **القطاعات الثلجية** Frozen sections. وعند إعداد هذه القطاعات تطمر العينة فى الجيلاتين ثم توضع الكتلة الجيلاتينية على **ميكروتوم ثلجى** Freezing microtome (شكل ٩) حيث تتجمد الكتلة الجيلاتينية والعينة التى بها بواسطة تيار من غاز ثانى أكسيد الكربون المضغوط ثم تقطع القطاعات. كما أنه يمكن وضع العينة مباشرة على الميكروتوم دون طمر فى الجيلاتين إذا ما كانت غير معرضة للتفتت أثناء التقطيع. وبهذا الأسلوب فإن العينة لا تتعرض قبل التقطيع للحرارة العالية أو للكيماويات المذيبة للدهون.

وقد استحدث منذ ثلاثة عقود جهاز يسمى الكريوستات Cryostat (شكل ١٠) وهو عبارة عن ميكروتوم ثلجي مثبت داخل حجرة خاصة صغيرة تشبه الثلاجة يمكن أن تصل الحرارة فيها إلى -٣٠°م وبذلك نضمن أن العينة والسكين والجو المحيط بعملية التقطيع كلها فى درجة حرارة منخفضة لا تسمح بتغيرات تحللية للنسيج. ويلاحظ أنه فى بعض التحضيرات يراعى تثبيت العينة فى المثبت المناسب قبل التقطيع وفى البعض الآخر تقطع العينة بسرعة دون تثبيت ثم تثبت القطاعات بعد ذلك ويراعى فى حالة استخدام المثبتات ألا تحوى مواد كيماوية مذيبة للدهون.

وسوف نعرض فيما يلى بالتفصيل للخطوات المختلفة لتحضير القطاعات الميكروسكوبية.

إعداد الحيوان: قد يقتضى الأمر – قبل أخذ عينة من الحيوان – تخديره أو قتله، ويتبع لذلك طرق معينة.

أخذ العينة: يؤخذ الحيوان بعد ذلك أو عينة منه مع مراعاة أعتبارات معينة.

التثبيت: توضع العينات فى المثبتات Fixatives وللمثبتات وظائف عدة، منها أنها تحافظ على النسيج من التلف. وبصورة عامة فإن هناك اعتبارات هامة يجب مراعاتها عند إجراء التثبيت. ويعتمد اختيار المثبت بصفة خاصة على الغرض الذى تجرى من أجله الدراسة.

معاملة العينات بعد التثبيت Post-fixation treatment:

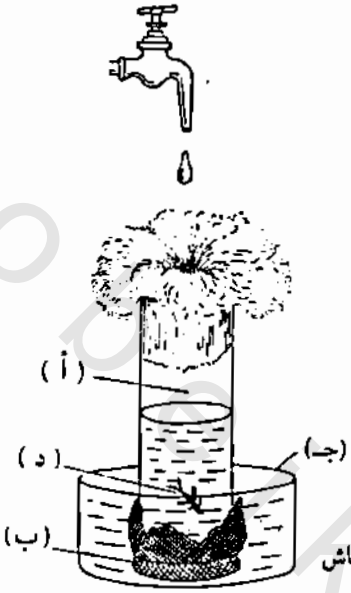
يعد تثبيت العينة فى المثبتات يجب ازالة الزائد من بعض مكونات المثبت داخل العينة وإلا حصلنا على صباغة غير جيدة للقطاعات، أو نشاهد رواسب بلورية فى النسيج. ويتبع لإزالة المثبت الزائد عدة طرق تبعا للمادة المراد التخلص من الزائد منها:

١ – إزالة الزائد من الفورمالين، حمض الكروميك، بيكرومات البوتاسيوم وحمض الأوزميك:

Elimination of excess of formlin, chromic acid, potassium bichromate hand osmic acid:

تزال الزيادة من الفورمالين عادة بغسل العينة فى الماء الجارى لمدة ١٢ ساعة. إلا أن معاملة العينة بتغييرتين من ٢٠٪ كلورال هيدريت (٢٤ ساعة لكل تغييرة) تعطى نتيجة أفضل خاصة عندما يتبع التثبيت بالمعالجة بامﻻح الفضة كما فى حالة إظهار الليفات العصبية أو جهاز جولجى. وعادة ما توجد بقع الفورمالين فى القطاعات التى تثبت عيناتها فى الفورمالين فى وسط حامضى وكانت غنية بالدم مثل الطحال. وفى هذه الحالة تزال البقع بوضع القطاعات فى حمض بكريك كحولى لبعض دقائق.

أما الزيادة من حمض الكروميك وبيكرومات البوتاسيوم وحمض الاوزميك فهى تزال بغسل العينة لمدة ٢٤ ساعة فى الماء الجارى. ويلاحظ أن الزيادة من حمض الأوزميك تختزل إلى راسب لا يذوب عند معاملة النسيج بالكحولات.



رقم (١٨) أنبوبة عليها شاش

وتجرى عملية غسل العينة فى ماء الصنبور الجارى كما يلى (شكل ١٨): اقطع قاع انبوبة واسعة أو آنية صباغة أنبوبية الشكل (أ) ثم سد الفوهة الناشئة جيدا بقطعة لينة من السلك المنسوج (ب). ضع هذه الأنبوبة رأسيا فى اناء صغير. (جـ) مملوء بالماء. (د) فى الأنبوبة ثم سد فوهتها بسدادة قطنية (هـ). ضع الأنبوبة أسفل صنبور يقطر منه الماء. إذا كانت العينات صغيرة الحجم ويخشى فقدها من خلال السدادة السلكية فيمكنك أن تبسط ورقة ترشيح على الفوهة قبل أن تربط القطعة السلكية. أما إذا كانت العينات صغيرة جدا فيمكنك أن تخيط حولها قطعة من الشاش قبل أن تضعها فى الانبوبة.

٢ - إزالة الزائد من كلوريد الزئبقيك Elimination of excess of Mercuric cloride:

تكون الزيادة من كلوريد الزئبقيك Mercuric cloride فى النسيج بلورات يتسبب وجودها فى إخفاء التفصيلات التركيبية للنسيج فضلا عن إتلاف هذه البلورات لنصل سكين الميكروتوم أثناء عملية التقطيع. ولذا فإنه من الواجب فى هذه الحالة غسل العينة لمدة ٥-٨ ساعات فى ٧٠٪ كحول مضافا إليه كمية كافية من محلول اليود الكحولى ($\frac{1}{4}$ جم يود مذاب فى ١٠٠ سم^3 ٧٠٪ كحول) مما يعطى للمحلول لونا أصفرا. وإذا زال اللون الأصفر من المحلول خلال فترة المعالجة فأضف كمية إضافية من محلول اليود الكحولى. والتفاعل الحادث هنا هو أن اليود يتفاعل مع كلوريد الزئبق $HgCl_2$ ليكون أيوديد الزئبق HgI_2 الذى سرعان ما يذوب فى المحلول. ولضمان إزالة بلورات كلوريد الزئبقيك تماما فإن القطاعات - قبل الصباغة - يجب أن تمر بمعاملة خاصة فتغطى القطاعات بعد غسلها فى الماء بواسطة محلول «ليوجول أيودين Lugol Iodine» (١ جم يود + ٢ جم أيوديد البوتاسيوم + ٣٠٠ سم^3 ماء مقطر) وذلك لمدة ٥ دقائق ثم تغسل الشرائح فى الماء وتنقل إلى محلول ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم (الهيبو) حتى يزول اللون البنى للقطاعات ثم تغسل القطاعات فى ماء الصنبور الجارى ثم بالماء المقطر ثم تصبغ.

٣ - إزالة الزائد من حمض البكريك Elimination of excess of picric acid:

يزال الزائد من حمض البكريك فى العينة بعد التثبيت بوضعها فى ٧٠٪ كحول مضافا إليه بضع قطرات من محلول مشبع من كربونات الليثيوم lithium carbonate لفترة حتى يزول اللون الأصفر من القطاعات.

وبعد عمل القطاعات، إذا ظهر فيها بقية من اللون الأصفر فإنه سيزول فى سلسلة الكحولات التى ستعامل بها القطاعات قبل الصباغة.

نزع الماء من العينة Dehydration:

تحتوى معظم المثبتات على الماء، لذا يلزم نزع الماء من العينة قبل طمرها فى الشمع. أما إذا كان المرغوب عمل قطاعات ثلجية، فلا تجرى عملية نزع الماء.

وتجرى عملية نزع الماء من العينة بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول الاثيلى (٣٠٪، ٥٠٪، ٧٠٪، ٨٠٪، ٩٥٪، تغييرتان من الكحول المطلق) ويعتمد الوقت اللازم لكل خطوة على حجم العينة ونوعها. وعادة فإن نصف ساعة لكل تغييرة يكون كافيا للعينة متوسطة الحجم، ويزداد الوقت اللازم مع زيادة حجم العينة.

وإذا أريد تخزين العينات فى هذه المرحلة، احفظها فى محلول من ٧٠٪ كحول (٩٥ جزء) وجلسرين (٥ أجزاء).

ويلاحظ أن إطالة تعريض العينة فى ٩٥٪ كحول أو فى الكحول المطلق يسبب جفاف العينة مما يجعل عملية تقطيعها بالميكروتوم متعذرة فيما بعد. وعموما يمكن إصلاح هذا العيب بنقع العينات فى خليط من كميات متساوية من الكحول والجلسرين والماء المقطر.

وإذا استعمل كحول البيوتيل Absolute butyl alcohol فيمكن بعده نقل العينات إلى خليط منه ومن الشمع، ثم الشمع النقى دون الحاجة إلى ترويق العينات حيث أن كحول البيوتيل يذوب فيه الشمع. وتستعمل هذه الطريقة مع الحلقيات.

وبالنسبة للخلايا المحتوية على كمية من الملح فإنه يجب إجراء عملية نزع الماء بسرعة، كما يجب تجنب الكحول المطلق والزيلول حتى لا يؤدى استعمالهما إلى جفاف العينة. ولذلك فإن العينة تنقل من ٩٥٪ كحول إلى بنزوات المثيل methyl benzoate أو سلسلات المثيل methyl salicylate للترويق ثم إلى زيت السيدار (زيت الأرز) Cedar wood oil أو البنزين Benzol لاستكمال عملية الترويق. وفى هذه الحالة ينصح أيضا بالتشبيع بطريقة بترفاى (السيللودين – شمع) Peterfi's Celloidin-Paraffin.

الترويق Clearing:

الترويق خطوة وسيطة بين عملية نزع الماء بالكحول وعملية الطمر فى الشمع حيث أن الكحول لا يذوب فى الشمع، ولذا لابد من وضع العينة وقتا كافيا فى سائل وسيط يذوب فى كليهما. ومن أشهر المواد المستعملة فى الترويق الزيلول والبنزين والتولوين وزيت الأرز والتربنيول والديوكسان. وجميع هذه المواد تجعل العينة مهيأة للطمر فى الشمع كما تجعلها شفافة إلى حد ما. وتعتمد المدة التى توضع فيها العينة فى إحدى هذه المواد على طبيعة المادة المستخدمة فى عملية الترويق، وكذلك على حجم العينة ونوعها. فمثلا فى حالة استعمال الزيلول فإن $\frac{1}{4}$ ساعة ـ ٣ ساعات يعتبر زمنا مناسبا بينما فى زيت الأرز تحتاج العينة إلى ١٢ ساعة، وفى التربنيول إلى ثلاثة أيام. ويلاحظ أن هذه التوقيتات غير ملزمة للباحث ولكننا نذكرها هنا فقط للاسترشاد بها، حيث أن لكل تحضير ظروفه الخاصة التى يجب أن يستخلص منها الباحث التوقيتات اللازمة.

ويعيب الزيلول أنه يسبب جفاف العينات ولذا يجب عدم إطالة وقت تعريض العينات له قدر الإمكان، ويجب عدم استعمال الزيلول مع العينات الغنية بالمح ويستعمل بدلا منه بنزوات المثيل أو سلسلات المثيل. ويمكن اختبار الزيلول القديم بورق عباد الشمس Litmus Paper فإذا وجد أنه حامضى أضف كمية من كربونات الكالسيوم له ورج جيدا ثم رشح. والزيلول رخيص الثمن وهو أكثر المواد استخداما فى عملية الترويق.

ويتميز زيت الأرز (Cedar Wood Oil) – وهو النوع رقيق القوام الذى يختلف عن الطراز غليظ القوام والمستخدم فى غمر العدسات المجهرية – بأنه لا يسبب جفافا للعينات، إلا أنه غالى الثمن. وتأخذ عملية التشبيع فى الشمع بعده وقتا طويلا نسبيا حتى يمكن التخلص منه. ويمكن التغلب على ذلك بنقع العينات فى البنزين – التلوين لمدة نصف ساعة قبل التشبيع فى الشمع. وإذا لاحظت تكون بلورات أبرية متجمدة فى زيت الأرز، فإن ذلك يرجع إلى وجود شوائب منها حمض الخليك، ويمكن التخلص منها بإضافة ٠,٥ سم^{٣} من الزيلول لكل ٤٠ سم^{٣} من زيت الأرز.

ويتميز كل من التربنيول والديوكسان بإمكانية استخدامهما لنزع الماء والترويق فى نفس الوقت، بمعنى أنه يمكن نقل العينة من ٩٥٪ كحول إلى التربنيول أو الديوكسان، ومنه إلى الشمع. كما أنهما لا يسببان جفاف العينة فى الوقت المحدد لتمام الترويق. إلا أن الديوكسان قد يحتوى بعض الماء، لذا فإنه ينصح بوضع كمية من اكسيد الكالسيوم Calcium Oxide أو كلوريد كالسيوم لا مائى Anhydrous Calcium Chloride فى الوعاء المحتوى على الديوكسان مع تغطيته.

ويتميز البنزين بأنه لا سبب جفاف العينة وبأنه يروق العينة فى مدة قصيرة فضلا عن كونه رخيص الثمن نسبيا، إلا أنه سريع الاشتعال وأبخرته ضارة على المدى الطويل.

ويشبه التولوين فى كثير من صفاته البنزين إلا أن الأول أغلى فى الثمن. ويستخدم الكلوروفورم فى بعض المعامل بغرض الترويق حيث لا يسبب جفافا للعينات ولذا فإنه يستخدم مع الجهاز العصبى. ويلاحظ أن العينات تطفو على سطحه. ألا أن الكلوروفورم غالى الثمن نسبيا ولا يجعل العينات شفافة مثل الزيلول والبنزين والتولوين وأبطأ من الزيلول فى عملية الترويق وأبخرته سامه.

وهناك مواد أخرى تستخدم للترويق مثل زيت القرنفل Clove Oil ورابع كلوريد الكربون Carbon tetrachloride والتراهيدروفيوران Tetrahydrofuran (THF). وغيرها.

وإذا لاحظت أثناء عملية الترويق أن السائل المستخدم أصبح عكرا فهذا يعنى وجود ماء فى السائل.. وهذا يجب تجنبه حيث أن المفروض أن العينة قد تم نزع الماء منها فى الخطوة السابقة. ولعلاج هذه الحالة عليك أن تعيد خطوة نزع الماء من العينة بوضعها فى عدة تغييرات من الكحول المطلق وقتا كافيا ثم ارجاعها مره أخرى إلى كمية جديدة من سائل الترويق. ويلاحظ أنك إذا طمرت فى الشمع عينه لا زالت تحتوى على الماء فإنه سيتعذر عليك تقطيعها بالميكروتوم بعد ذلك.

التشبيع والطمر فى الشمع Infiltration and Embedding in Paraffin Wax:

أولاً: التشبيع Infiltration:

بعد ترويق العينة تنقل إلى الفرن عند درجة ٥٦-٦٤°م حيث توضع بالتتابع فى أربع أوان زجاجية تحتوى الأولى منها على خليط من الشمع وسائل الترويق وتحتوى الأوانى الثلاث الباقية على شمع منصهر. وترقم هذه الأوانى بالأرقام (شمع ١، شمع ٢، شمع ٣) على التوالى. وتوضع العينات لفترات مناسبة فى هذه الأوانى الأربع تتراوح ما بين $\frac{1}{4}$ ساعة إلى ساعتين فى كل واحدة وكأمثلة على ذلك فإن العينة التى يبلغ طول كل ضلع من أضلاعها فى حدود ٦ مم تحتاج إلى ساعة واحدة فى كل تغييرة بينما الأعضاء المحاطه بألياف مثل الخصية، أو كيوتيكل مثل الأسكارس فإنها تحتاج إلى ساعتين فى كل تغييرة. وعموما، يعتمد تحديد مدة التشبيع بالشمع أساسا على نوع العينة وحجمها. والغرض من هذه الخطوة هو تخلل الشمع للعينة تماما بحيث يحل محل سائل الترويق. ومن المفروض فى نهاية هذه الخطوة أن تصبح العينة خالية تماما من سائل الترويق. ويراعى وضع كأس زجاجية فى الفرن يتم فيها صهر كمية من الشمع الذى ستطمر فيه العينة فى النهاية. ويستحسن ترشيح هذا الشمع قبل استخدامه.

يتميز الشمع إلى نوعين، هما الشمع الطرى Soft wax والشمع الجامد Hard wax، درجة إنصهار الأول ٥٠-٥٢°م. ودرجة انصهار الثانى ٥٨-٦٢°م. ويعتمد اختيار نوع الشمع المستخدم على نوع العينة وعلى درجة حرارة الجو التى ستقطع فيها العينات بالميكروتوم، وكذلك على سمك القطاعات المرغوب الحصول عليها. وعادة ما يلزم شمع أكثر صلابة للعينات الصلبة بينما يلزم شمع طرى للأنسجة الرخوة. وإذا كانت العينات ستقطع بالميكروتوم فى جو حار فيجب أن تكون مطمورة فى شمع جامد، والعكس بالعكس. وإذا كان المراد الحصول على قطاعات سميكة فيجب أن تكون العينات مطمورة فى شمع طرى وإلا تعذر الحصول على شريط متصل من القطاعات عند التقطيع على الميكروتوم.

ويجب أن يراعى ألا تزيد درجة حرارة الفرن الموجودة بداخله العينات أكثر من درجتين عن درجة انصهار الشمع بالفرن حتى لا تؤدى الحرارة العالية إلى تلف العينات. وبالنسبة للملقط الذى سوف تنقل به العينات من طبق شمع إلى آخر من المفضل تركه فى الفرن ليأخذ درجة حرارته حيث استخدام ملقط بارد سيتسبب فى تراكم الشمع وتجمده عند طرف الملقط مما يعيق أن استخدامه بسهولة. ويجب تجنب تسخين الملقط على اللهب المباشر فقد يؤدى ذلك إلى ارتفاع حرارة الملقط بدرجة تضر بالعينة. ويراعى عدم فتح باب الفرن دون داع أو لمرات متعددة لأن ذلك يؤدى إلى انخفاض درجة الحرارة داخل الفرن مما قد يتسبب فى تجمد الشمع وتعطيل تخلله للعينة، ويستعمل أحيانا فرن خاص مزود بماكينة لتفريغ الهواء من داخله عند تشبيع العينات بالشمع وذلك لضمان عدم وجود هواء فى داخل العينة.

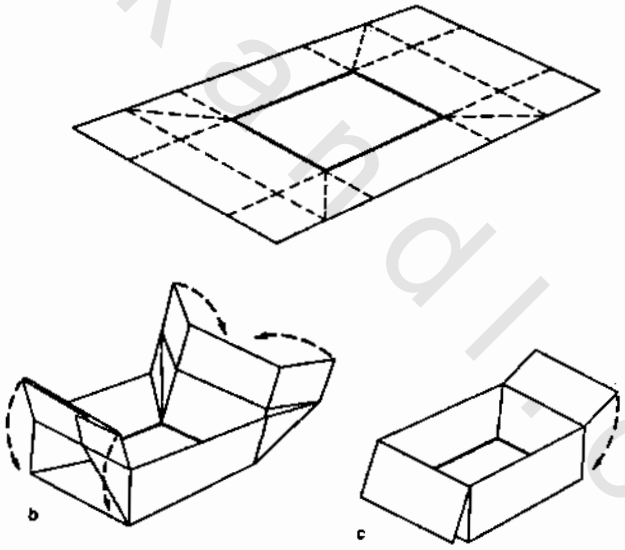
وتزود بعض المعامل بجهاز آلى (هستوكينيت Histokinete) لإعداد العينات (صفحة ١٤) يجرى عمليات نزع الماء والترويق والتشبيع بالشمع وفيه تضبط مقدما التوقيتات الخاصة بالتغييرات. وعادة ما يترك الجهاز ليعمل أثناء الليل.

وهناك نوع من الشمع يسمى كاربواكس Carbowax وهو عبارة عن بولى إثيلين جليكول يذوب فى الماء وباستعمال هذا الشمع يمكن نقل العينة من المثبت أو الماء إلى الشمع مباشرة دون إمرار العينة فى خطوات نزع الماء أو الترويق.

ثانيا: الطمر Embedding:

بعد تمام تشبيع العينة بالشمع تجرى خطوة الطمر حيث يجهز حيز خاص خارج الفرن يصب فيه الشمع المنصهر ثم تنقل العينات بالملقط من وعاء شمع ٣ الموجود بالفرن إلى ذلك الحيز، ثم يترك الشمع ليتجمد وبذلك تصبح العينة مطمورة داخل قالب شمعى.

ومن المعتاد أن يجهز الحيز الذى ستطمر فيه العينة عن طريق قطعتين من المعدن أو الخشب كل منهما على شكل حرف L حيث يتم بهما معا تكوين شكل مكعب أو متوازى مستطيلات ثم يوضع لوح زجاجى صغير أسفل القطعتين ثم يصب الشمع المنصهر فى داخل هذا الحيز. وإذا تعذر الحصول على هاتين القطعتين فيمكن تكوين قارب ورقى يؤدى نفس الغرض. وفى هذه الحالة لا داعى للوح الزجاجى. ويوضح (شكل ١٩) خطوات تكوين ذلك القارب.



شكل رقم (١٩)

ويراعى بعد صب الشمع أن يتم نقل العينة من الفرن إلى القارب بسرعة وبملقط دافئ حتى لا يتجمد الشمع عند طرف الملقط كما يراعى عند وضع العينة فى الحيز أن يتم توجيهها فى الاتجاه المطلوب قبل تجمد الشمع داخل هذا الحيز.

ولتجميد الشمع فى القارب فإنه ينفخ برفق على سطحه حتى تتجمد طبقة رقيقة على السطح ثم يطمر القارب برفق فى ماء بارد درجة حرارته ١٥-١٦°م ويراعى ألّا تقل درجة حرارة الماء عن

١٠°م حتى لا يتسبب ذلك فى انكماش الشمع بشدة مما يؤدى إلى تشققات فى القالب الشمعى، حيث يجب أن يكون ذلك القالب رائقا متجانسا. ويمكن تخزين القوالب الشمعية المحتوية على العينات إلى أى وقت يراد فيه تقطيعها بالميكروتوم بشرط حفظها فى مكان بارد لا يسمح بانصهار أو ليونة الكتلة الشمعية مع ارتفاع درجة حرارة الجو. ويراعى كتابة البيانات اللازمة على القالب الشمعى مثل نوع العينة واسم الحيوان واسم المثبت وأية بيانات أخرى لها أهمية فى العمل. ويمكن تسجيل ذلك على شريط من الورق يغمس طرفه فى القارب الشمعى قبل تجمد الشمع.

العيوب المحتمل حدوثها أثناء عملية الطمر وكيفية تلافيها:

قد تحدث بعض العيوب فى قالب الشمع أثناء عملية الطمر مما يتسبب فى صعوبة عملية التقطيع أو إلى الحصول على قطاعات غير جيدة المستوى... وسنذكر هنا بعض هذه العيوب وأسباب حدوثها وكيفية تلافيها:

(أ) تكون مناطق بيضاء داخل القالب الشمعى (بلورات):

يرجع ذلك إما إلى أن عملية تبريد الشمع كانت بطيئة أو أن الشمع المستخدم لا يزال محتويا على المادة المستخدمة فى عملية ترويق العينات، وهذا يمكن تحديده عن طريق اختبار رائحة الشمع. وفى الحالة الأولى تعاد عملية الطمر باستخدام ماء أكثر برودة، وفى الحالة الثانية يعاد تمرير العينات فى تغييرتين من الشمع النقى.

(ب) حدوث تشققات فى القالب الشمعى:

إذا كان سطح التشقق عموديا على السطحين السفلى والعلوى للقالب الشمعى فهذا يعنى أن الشمع قد تم تبريده بسرعة أما إذا كان سطح التشقق موازيا للسطحين السفلى والعلوى فهذا يعنى أن عملية صب الشمع فى القارب لم تكن على دفعة واحدة بل كانت على دفعتين.

(جـ) السطح العلوى للقالب الشمعى يكون بروزا شمعيا:

يحدث هذا العيب نتيجة وضع القارب الشمعى فى الماء قبل تكوين طبقة رقيقة متجمدة على سطح الشمع عن طريق النفخ. وعادة ما نجد أن الماء قد تسرب إلى داخل القالب الشمعى. وفى هذه الحالة يجب إعادة عملية الطمر.

(د) حدوث انخفاض على السطح العلوى للقالب الشمعى عند مركزه قد يصل إلى العينة داخل القالب:

ويرجع ذلك إلى أن الشمع المستخدم فى عملية الطمر كان ساخنا جدا لدرجة أكثر من اللازم مما يؤدى إلى تقلص الشمع عند تبريده. وفى هذه الحالة يعاد الطمر باستخدام شمع عند درجة حرارة أقل.

(هـ) وجود قطرات من الماء داخل القالب الشمعى:

وفى هذه الحالة يدخل الماء إلى القالب فى الفقاعات الهوائية التى تتكون عند سطح القالب الشمعى عقب صب الشمع فى القارب. ويمكن إزالة هذه الفقاعات بملقط ساخن ثم يعاد تبريد الطبقة العليا من الشمع بالنفخ على سطح الشمع قبل تبريد القارب فى الماء.

(و) وجود منطقة مملوءة بالهواء عند مركز القالب الشمعى:

يحدث ذلك عندما يستخدم فى تبريد القالب الشمعى ماء أكثر برودة من اللازم مما يتسبب فى تجمد الطبقة الخارجية من الشمع بسرعة أكثر من لب القالب الشمعى مما يؤدى إلى تقلص الشمع بعيدا عن مركزه. ومما يساعد فى حدوث هذا العيب أستخدام شمع فى عملية الطمر ساخن أكثر من اللازم. ويراعى فى هذه الحالة إعادة عملية الطمر.

وفى جميع الحالات التى يتطلب فيها إعادة عملية الطمر يزال الشمع من حول العينة باستخدام موسى أومشرط إلى أقصى درجة ممكنة بحيث لايترك حول العينة إلا طبقة رقيقة من الشمع، ثم توضع العينة فى الفرن فى الإناء الخاص بشمع ٣ حتى تذوب الطبقة الشمعية حول العينة تماما ثم تترك لمدة ٢٠ دقيقة فى هذا الإناء وتعاد بعد ذلك عملية الطمر.

وقد نلجأ فى بعض الأحيان إلى طمر العينات فى مواد أخرى غير الشمع. ومن أمثلة ذلك ما يلى:

(أ) التشبيع والطمر فى الجيلاتين Infiltration and Embedding in Gelatin:

تستعمل هذه الطريقة عندما يراد تجنب تعريض العينات للمواد المذيبة للدهون التى تستعمل فى عمليتى نزع الماء والترويق أو تعريضها للحرارة العالية فى الفرن عن التشبيع بالشمع مما يتلف الإنزيمات فى النسيج. كما تستعمل هذه الطريقة مع الأنسجة سهلة التفتت مثل الخصية.

ولإعداد العينة فإنها تغسل بعد عملية التثبيت، ثم توضع فى آنية مناسبة بها محلول ١٠٪ جيلاتين ساخن فى حالته السائلة لمدة ١٢ ساعة وذلك بغرض تشبيع العينة بالجيلاتين. وبعد ذلك تنقل الآنية إلى مكان بارد لتجميد الجيلاتين. يقطع قالب مناسب الحجم من الجيلاتين المتجمد يحوى العينة وذلك بواسطة موسى أو مشرط. تجرى بعد ذلك عملية تقسية لقالب الجيلاتين بوضعه فى ١٠٪ فورمالين لبضع ساعات قبل عملية التقطيع. ويراعى أن عملية التقطيع هنا تكون بالميكروتوم الثلجى (شكل ٩) حيث يسلط على قالب الجيلاتين تيار من غاز ثانى أكسيد الكربون المضغوط حتى يصبح القالب صلبا ليسهل قطعه بسكين الميكروتوم إلى قطعات ذات سمك مناسب (٨-١٥ ميكرون).

(ب) الطمر المزدوج فى السيلودين والشمع

Double Embedding in Celloidin and Wax:

تتبع هذه الطريقة للطمر فى حالة العينات الصلبة وسهلة التفتت إذا ما طمرت فى الشمع. وفى هذه الحالة تغسل العينة بعد تثبيتها كالمعتاد ثم تجرى عملية نزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول

تنتهى بوضعها فى الكحول المطلق لفترة من ٢-١٦ ساعة. ثم تنقل العينة إلى تغيرتين أو ثلاثة فى محلول من السيلودين المذاب فى المثيل بنزويت (١ جم من ألواح السيلودين الجاف فى ١٠٠ سم^{٣} مثيل بنزويت) وتترك فيه لمدة ٢٤ ساعة لكل تغيرة. تنقل العينة بعد ذلك إلى ثلاث تغيرات من البنزين النقى (٤ ساعات ثم ٨ ساعات ثم ١٢ ساعة) ثم تنقل العينة بعد ذلك إلى خليط من الشمع المنصهر والبنزين بالتساوى (١ : ١) لمدة ساعة فى الفرن ثم تنقل العينة إلى تغيرتين من الشمع المنصهر، كل تغيرة من $\frac{١}{٢}$ - ٦ ساعات على حسب نوع العينة وحجمها (٣ ساعات للعينة التى طول أى ضلع فيها حوالى ٥ مم). ثم أطمر العينة فى الشمع بالطريقة المعتادة. وإذا وجدت عيوب فى الطمر يراعى ما سبق ذكره فى هذا الصدد فى موضوع الطمر فى الشمع.

(جـ) الطمر فى نيترات السليلوز السيللودين، نيتروسليولوز منخفض اللزوجة) والمعاملات اللاحقة:

Cellulose nitrate (Celloidin and L.V.N.) Embedding and the Subsequent Treatments:

نلجأ أحيانا إلى الطمر فى السيللودين أو النيتروسليولوز للتغلب على بعض مشاكل الطمر فى الشمع مع بعض العينات. ومن ميزات الطمر فى السيللودين أو النيتروسليولوز ما يلى:

١ - عدم تعرض النشيج للحرارة أثناء الطمر مما يجنب النسيج عمليات الانكماش.

٢ - يعطى نتيجة أفضل عند التقطيع مع الأنسجة الكثيفة مثل العظم.

٣ - يعطى نتيجة أفضل مع القطاعات السميكة لبعض الأعضاء مثل المخ، حيث أن القطاعات الشمعية فى هذه الحالات تكون مشوهة.

٤ - يعطى نتيجة أحسن مع بعض الأعضاء التى تتكون من طبقات من أنسجة ذات صلابة متباينة مثل العين.

غير أن هناك بعض العيوب فى طريقة الطمر بالسيللودين والنيتروسليولوز نذكرها فيما يلى:

١ - البطء الشديد الذى تتم به هذه الطريقة فهى عادة تستغرق عدة أسابيع.

٢ - من الصعب الحصول بها على قطاعات سمكها أقل من ١٠ ميكرونات.

٣ - التقطيع لا يكون أشرطة من القطاعات، وبذلك فإنه من الصعب الحصول على سلسلة كاملة متتابعة من القطاعات.

ويعتبر الطمر فى النيتروسليولوز منخفض اللزوجة (Low-Viscocity nitrocellulose (L.V.N. أفضل من الطمر فى السيليودين لاعتبارات عديدة.

وفيما يلى طريقة التشبيع والطمر فى هذه المواد:

- ضع العينات فى خليط من كميات متساوية من الكحول والاثير (٢٤ ساعة).
- ضع العينات فى ٢٪ سيللودين فى (كحول مطلق - أثير) (٥-٧ أيام).

- ضع العينات فى ٤٪ سيللودين فى (كحول مطلق - أثير) (٥-٧ أيام).

- ضع العينات فى ٨٪ سيللودين فى (كحول مطلق - أثير) (٣-٤ أيام).

- اعمل قاربا ورقيا عميق الجدران - أطمر العينات فى ٨٪ سللودين بحيث يكون حول العينة سيللودين كاف من جميع الجهات. ضع القارب فى وعاء جيد الغلق ومعه وعاء صغير مملؤ بالأثير. وبخار الإثير يساعد على تخليص السيللودين من الفقاعات التى تكونت فيه أثناء صبة.

بعد ساعتين، استبدل الإثير بالكلوروفورم. أترك قارب السيللودين ومعه وعاء الكلوروفورم لعدة أيام فى وعاء أكبر محكم الغلق. بخار الكلورفورم يساعد على تجمد السيللودين. بعد ذلك شذب قارب السيللودين مع ترك مسافات كافية حول العينة. عرض كتلة السيللودين إلى بخار الكلوروفورم ثم خزنها فى ٧٠٪ كحول حتى وقت التقطيع.

- عند التقطيع ضع كتلة السيللودين على حامل الميكروتوم وثبتها بمحلول غليظ القوام من السليودين أو L.V.N. أو باللاصق المسمى «ديوروفكس» Durofix. ضع اللاصق على الحامل، واغمر قالب السليودين فى (كحول - أثير). بالضغط حاول تثبيت القالب الشمعى على الحامل وضعهما معا فى ٧٠٪ كحول لمدة ساعتين مع استمرار الضغط.

يتم تقطيع قالب السيللودين بواسطة الميكروتوم الانزلاقى أو الميكروتوم ذو القاعدة المنزلقة Base sledge microtome ويراعى أن تبلل السكين والقالب بواسطة ٧٠٪ كحول باستمرار. ضع القطاعات بواسطة فرشاة فى ٧٠ ٪ كحول.

عند صباغة القطاعات مررها فى زيلول ثم خليط من الكحول المطلق والكلوروفورم (وليس كحول مطلق فقط) ثم فى ٩٠٪ كحول. مرر تدريجيا إلى الماء ثم أصبغ فى مالورى أو كلورا زول بلاك.

بعد الصباغة انزع الماء، بسلسلة صاعدة من الكحول حتى تصل إلى ٩٠٪ كحول ومنه إلى خليط من كحول مطلق وكلوروفورم (تجنب الكحول المطلق بمفرده). مرر إلى كلوروفوم نقى ثم إلى زيت السيدر وبعده إلى البلسم.

تشذيب القالب الشمعى وتثبيته على الميكروتوم

Trimming of Paraffin Blocks and Fixing to the Microtome Holder

(أشكال ٢٠، ٢١، ٢٢):

قبل تقطيع العينة بالميكروتوم يلزم تشذيب القالب الشمعى بإزالة الشمع الزائد عن المطلوب من حول العينة بحيث لا يزيد الشمع حولها عن ٢ مم من جميع الجهات فيما عدا الجهة التى سيثبت من عندها القالب فى الميكروتوم، فيجب أن تكون كمية الشمع خلف العينة بحوالى $\frac{1}{2}$ سم (شكل ٢٢). ويراعى أن يكون القالب الشمع الزائد عن طريق شفرة أو مشرط حاد على دفعات بحيث يزال فى كل مرة ما لا يزيد عن ١ مم من الشمع حتى لا ينفلق القالب الشمعى إذا أزيل من القطعة الواحدة سمك كبير من الشمع. ويراعى أثناء ذلك أن يكون السطحان العلوى والسفلى بعد تهذيبهما متوازيين وأفقيين.

ويفضل البعض أن تكون واجهه القالب الشمعى على شكل معين Rhombic حتى يمكن تمييز السطح السفلى عن السطح العلوى.

ثبت القالب الشمعى بعد تشذيبه فى ماسك القالب الشمعى بالميكروتوم وذلك بتسخين قاعدة القالب الشمعى بقضيب معدنى أو قاعدة مشرط مستغنى عنها، كما توضع قطعة صغيرة من الشمع على سطح ماسك القالب الشمعى ويجرى صهرها بنفس الطريقة ثم يثبت القالب الشمعى على ماسك القالب الشمعى بسرعة ثم يغمر الماسك وعليه قالب الشمع فى ماء بارد لمدة دقيقتين حتى يتجمد الشمع المستخدم فى اللصق ويثبت القالب الشمعى تماما فوق سطح الماسك (شكل ٢٢).

تقطيع العينات Section cutting:

يجرى تقطيع قالب الشمع المحتوى على العينة بواسطة الميكروتوم. وتجرى عملية تقطيع العينة فى اتجاهات مختلفة حسب طبيعة الدراسة.

اتجاهات قطع العينات:

بالنسبة لأجسام الحيوانات فإنه من المعتاد عمل قطاعات فى اتجاهات معينة يطلق عليها اسم «**قطاعات عرضية**» Transverse sections، «**قطاعات جبهية**» Frontal sections «**قطاعات سهمية**» Segittal sections ويوضح (شكل ٢٣) اتجاهات هذه القطاعات.

ويلاحظ أن القطاع العرضى يكون فى مستوى عمودى على اتجاه امتداد جسم الحيوان. أما القطاع الجبهى فهو فى اتجاه أفقى بامتداد جسم الحيوان ويكون القطاع السهمى رأسيا فى الخط المنصف لجسم الحيوان. ويطلق على القطاعات الرأسية التى على جانبى القطاع السهمى اسم **قطاعات جار سهمية** Parasagittal section.

وبالنسبة لبعض الأعضاء الممتدة مثل الأمعاء فإن القطاع الذى يؤخذ فى اتجاه امتداد العضو يطلق عليه اسم «**قطاع طولى** longitudinal section أما القطاع الذى يؤخذ عموديا على هذا الاتجاه فيسمى «قطاع عرضى Cross section.

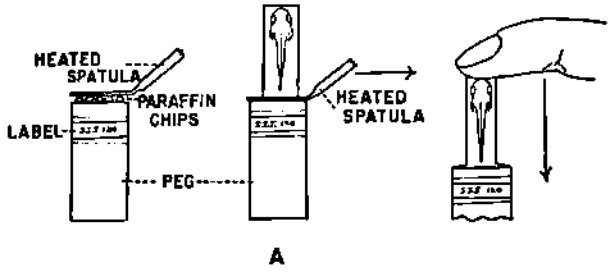
وبالنسبة للقطاعات المأخوذة فى مستوى السطح لأعضاء مبسوطة مثل الجلد أو جدار المثانة البولية فيطلق عليها اسم «**قطاعات مماسية**» Tangential sections.

العيوب التى تظهر فى القطاعات الشمعية أثناء عملية التقطيع وكيفية تلافيها:
(شكل ٢٤)

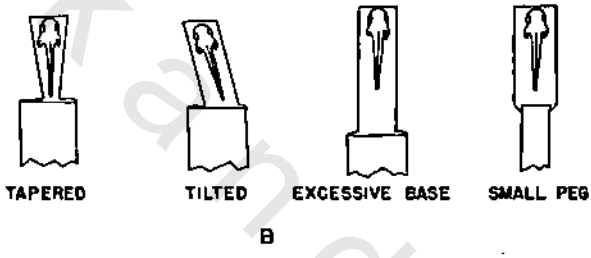
أولاً: القطاعات المتتالية لا تلتصق مع بعضها لتكون شريطا شمعيا:

يرجع هذا إلى سبب أو أكثر من الأسباب الآتية:

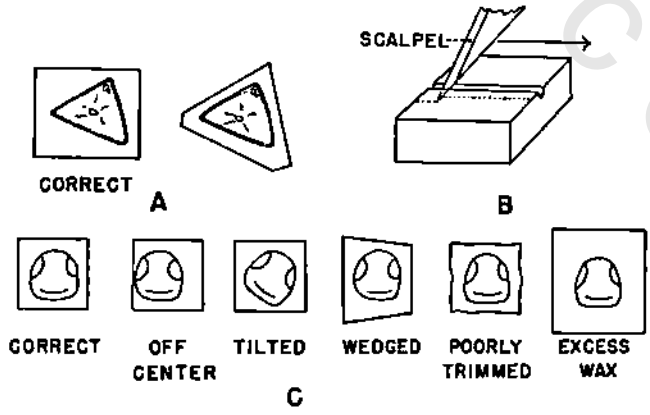
١ - الحافة العليا والسفلى للقالب الشمعى ليستا متوازيتين ويجب اعادة تشذيب القالب الشمعى.



شكل رقم (٢٠)

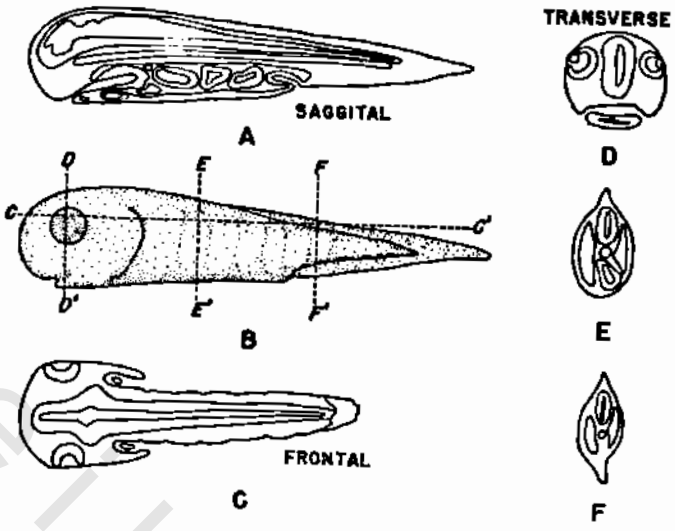


شكل رقم (٢١)

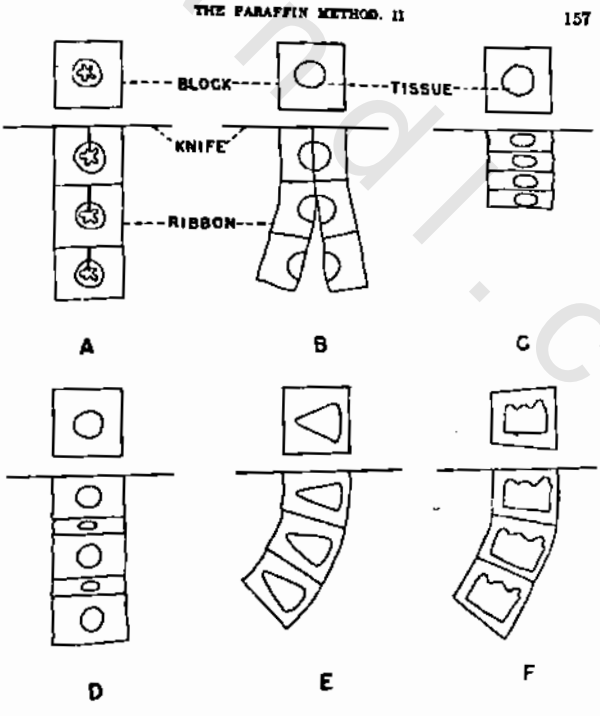


شكل رقم (٢٢)

obeikandl.com



شكـل رقم (٢٣)



شكـل رقم (٢٤)

obeikandl.com

٢ – الحافتان العليا والسفلى للقالب الشمعى لا توازيان حافة السكين العليا.

٣ – القالب الشمعى بارد جدا ويمكنك أن تنفخ عليه أو تضعه فى ماء ساخن.

٤ – الشمع المستخدم للطمر من النوع الجامد جدا ويستحسن اعادة الطمر.

٥ – سمك القطاعات كبير ويجب قطع قطاعات بسمك أقل.

٦ – درجة حرارة الغرفة منخفضة جدا بالنسبة لدرجة انصهار الشمع.

٧ – السكين مائل جدا ويستحسن تقليل ميله (شكل ٢٥).

٨ – حافة السكين العليا غير نظيفة.

ثانيًا: القطاعات تلتف على بعضها عدة مرات فى شكل أنبوبى:

يمكن إصلاح هذا العيب أحيانا بأن نبدأ بالحصول على عدد صغير من القطاعات التى نمسك بها ونفردها بواسطة فرشاة ثم نستأنف التقطيع فسيؤدى ثقل القطاعات السابقة إلى فرد القطاعات اللاحقة.. وإذا لم يصلح العيب بهذه الطريقة فإن سبب لف القطاعات قد يكون واحدًا أو أكثر مما يلى:

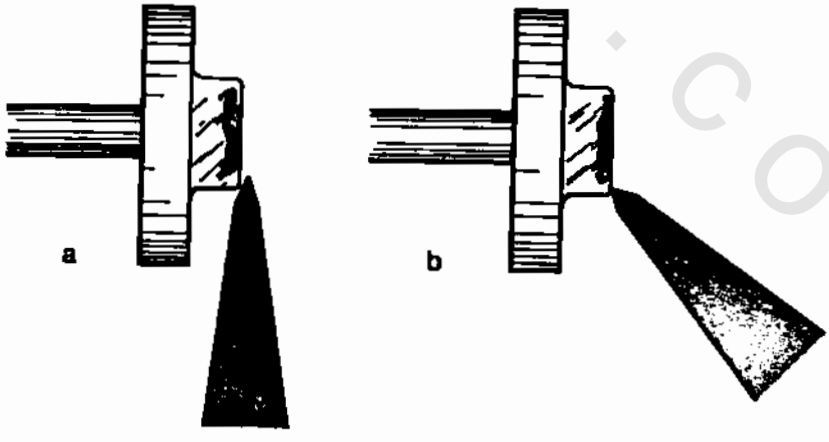
١ – قد تكون السكين مائلة جدا إلى الأمام.

٢ – قد تكون السكين غير محماة (غير مسنونة جيدا).

٣ – درجة حرارة الغرفة منخفضة جدا بالنسبة لدرجة انصهار الشمع.

ثالثًا: شريط الشمع ينحنى بشدة إلى أحد الجانبين:

يرجع هذا إلى عدم جودة تشذيب القالب الشمعى بحيث كان أحد جانبى القالب أطول من الجانب الآخر وبذلك فإن الشريط الشمعى ينحنى تجاه الجانب القصير. ويجب فى هذه الحالة



شكـــل رقم (٢٥)

مراجعة تشذيب القالب الشمعى. فإذا استمر انحناء الشريط الشمعى إلى أحد الجانبين بعد ذلك فهذا يعنى أن السكينة مائلة وعليك فى هذه الحالة اختيار جزء آخر من السكين.

رابعًا: شريط الشمع ينشق طوليا أو تظهر به خدوش على سطحه:

يعزى هذا فى أغلب الأحوال إلى وجود حبات من التراب أو فتات من الشمع على حافة السكين ويجب فى هذه الحالة تنظيف السكين. وإذا استمر وجود هذا العيب بعد ذلك فى نفس المكان فهذا يعنى وجود خدش بالسكين عند هذه النقطة ويجب فى هذه الحالة اختيار مكان آخر من حافة السكين لإستخدامه فى التقطيع. وإذا استمر وجود الخدش أو التشقق فى نفس المكان رغم المحاولات السابقة فهذا يعنى أن الشمع المستخدم فى الطمر ليس نظيفا تماما إذ يوجد فى القالب الشمعى شىء ما على درجة من الصلابة يسبب هذا العيب عند التقطيع، ولذا يجب إعادة الطمر فى شمع نظيف.

خامسًا: القطاعات مضغوطة ومساحة القطاع تقل كثيرا عن مساحة واجهة القالب الشمعى:

يرجع هذا إلى سبب أو أكثر مما يلى:

١ - درجة انصهار الشمع المستخدم فى الطمر منخفضة جدا.

٢ - السكين مائلة كثيرا إلى الأمام.

٣ - السكين غير مشحوذة جيدا.

سادسًا: عدم الحصول على قطاع شمعى مع كل مره يمر فيها القالب الشمعى على السكين أو أن القطاعات الناتجة ليست موحدة السمك:

قد يكون السبب أن السكين غير مائلة بالقدر الكافى أو قد يكون السبب فى ذلك هو أن ربط مسامير ماسك السكين أو ماسك القالب الشمعى غير محكم وإذا لم يكن ذلك هو السبب فقد يرجع هذا العيب إلى خلل ما فى الميكروتوم نفسه مما يستدعى ضبطه أو تغيير أجزاء معينه به.. أو العمل على ميكروتوم آخر.

سابعًا: القطاعات تلتصق بالقالب الشمعى عند صعوده إلى أعلى اثناء تشغيل الميكروتوم بدلا من بقائها على السكين:

قد يكون السبب فى ذلك واحد أو أكثر مما يلى:

١ - السكين غير مشحوذ جيدا أو حافته غير نظيفة.

٢ - السكين غير مائلة بالقدر الكافى.

٣ - الشمع المستخدم فى الطمر من النوع اللين أو أن درجة حرارة الغرفة عالية.

ثامنًا: القطاع غير متجانس السمك:

قد يكون السبب هو أن ربط مسامير ماسك السكين أو ماسك القالب الشمعى غير محكم.

تاسعًا: العينة تتفتت وتسقط من القالب الشمعى وذات مظهر طباشيرى:

يحدث هذا العيب فى حالة ما إذا كانت العينة لم يتخللها الشمع جيدا أو فى حالة عدم نزع الماء منها جيدا بعد التثبيت.

عاشرًا: العينة تتفتت ولكن لونها غير طباشيرى:

يحدث هذا العيب فى حالة شدة قساوة العينة تحت تأثير السائل المستخدم فى عملية الترويق أو بتعرض العينة لدرجات عالية من الحرارة أثناء التخلل بالشمع. وفى هذه الحالات يعالج القالب الشمعى بغمره فى ماء الصنبور بحيث يكون السطح المقطوع للعينة ذاتها معرضا له وذلك لمدة ١٢ ساعه أو فى خليط من الماء والجليسرين بنسبة ٩ : ١ أو فى ٦٠٪ كحول اثيلى ثم تقطع العينة فور اخراجها من السائل المستخدم. ويلاحظ أن هذه المعالجة لا تصلح فى حالة ما اذا كانت العينة لنسيج عصبى أو لمفى أو دهنى.

حادى عشر: سقوط العينة من القالب الشمعى دون تفتتها أو اكتسابها مظهرا طباشيريا:

يحدث ذلك فى حالة عدم العناية الكاملة بعملية الطمر حيث أن العينة تبرد فى مرحلة نقلها من الفرن إلى القارب الشمعى لطمرها مما يتسبب فى تجمد طبقة من الشمع حول العينة قبل طمرها ولذلك فإنه ينصح بوضع القارب الشمعى قرب الفرن. ويعالج هذا العيب باعادة الطمر.

ثانى عشر: انفصال قطاع العينة عن قطاع الشمع فى منطقه أو أكثر:

يحدث ذلك نتيجة الانضغاط المتزايد أثناء التقطيع لشمع الطمر اذا قورن بالشمع الذى استخدم فى عملية التخلل. ويمكن تقليل الشمع المحيط بالعينة وتبريد القالب الشمعى فى ماء مثلج قبل التقطيع. كما ينصح باعادة الطمر فى شمع ذو درجة حرارة انصهار أعلى.

ثالث عشر: الشريط الشمعى المحتوى على العينة ينحنى تجاه أحد الجوانب بينما الشريط الشمعى الخالى من العينة يكون مستقيما:

يرجع ذلك إلى كون العينة ليست فى مركز القالب الشمعى.

رابع عشر: يصدر صوت خشن من العينة أثناء التقطيع:

يرجع هذا إلى شدة قساوة العينة أو أن الشمع الذى تخلل العينة فى الفرن كانت حرارته عالية جدا أو تعرض النسيج لفترة طويلة للمحاليل التى تسبب صلابة العينة. ويمكن علاج ذلك بمعاملة قالب الشمع بالماء كما سبق شرح ذلك فى (البند عاشرًا). وقد يرجع هذا العيب أيضا إلى وجود بلورات ملحية فى النسيج بسبب عدم معاملة العينة بعد التثبيت لازالة الزائد من المثبت.

خامس عشر: اهتزاز السكين أثناء التقطيع:

يرجع ذلك إلى كون السكين رفيعة جدا ولذا فإنه ينصح باستبدالها بسكين أكثر سمكا. وقد يرجع إلى أن ميل السكين أزيد أو أقل من المطلوب. وقد تكون العينة قد جفت أكثر من اللازم

لتعرضها لفترات للمحاليل التى تسبب صلابة العينه، وفى هذه الحالة يعالج قالب الشمع بالماء كما سبق شرح ذلك فى (البند عاشرًا).

سادس عشر: القطاعات الشمعية تلتصق بالأشياء المحيطة وتتطاير بسبب تولد كهرباء استاتيكية نتيجة الاحتكاك المتولد من عملية التقطيع:

يعالج ذلك بزيادة درجة الرطوبة فى الحجرة بغلى كمية من الماء فى اناء غير مغطى. ويمكنك أن تؤجل التقطيع إلى وقت آخر يكون فيه الجو أكثر رطوبة مثل الصباح الباكر.

سابع عشر: ظهور ثقوب كبيرة فى قطاعات العينة نتيجة وجود مواد صلبة فيها:

يحدث ذلك مثلا فى بعض العينات مثل ديدان الأرض حيث يوجد بامعائها حبات من الرمل. ويتم تجنب ذلك بتجويع الديدان ثم باطعامها كمية من ورق الترشيح الرطب الذى يدفع بالحصى خارج الجهاز الهضمى ثم تجوع الديدان لعدة أيام حتى يتم التخلص من ورق الترشيح الموجود بالقناة الهضمية.

تنظيف الشرائح ولصق القطاعات

(أ) تنظيف الشرائح: Cleaning of Slides:

سبق القول أن الشرائح الزجاجية تزود فى علب - وقد تزود العلب ببيان عن أنها نظيفه وجاهزة للاستعمال. وهذا يوفر الكثير من الجهد والوقت والكيماويات اللازمة لتنظيف الشرائح، إلا أنه من المرغوب فيه غسل الشرائح فى معظم الأحوال قبل الاستعمال. ويجرى غسل الشرائح بالطريقة الآتية:

١ - توضع الشرائح فى محلول من حمض الكروميك (١٠٪) لمدة يوم كامل.
٢ - تغسل الشرائح فى ماء الصنبور الجارى لمدة ٢٤ ساعة على الأقل.
٣ - توضع الشرائح فى محلول من مسحوق صابون لعدة ساعات.
٤ - تغسل الشرائح فى ماء الصنبور مرة ثانية.
٥ - توضع الشرائح فى كحول محمض (١٪ حمض يد كل فى ٧٠٪ كحول) لعدة ساعات.
٦ - تغسل الشرائح فى ماء جارى لعدة ساعات.
٧ - تجفف الشرائح بمنشفة نظيفة خالية من الوبر وتجمع فى علب تحفظ بعيدا عن الأتربة.

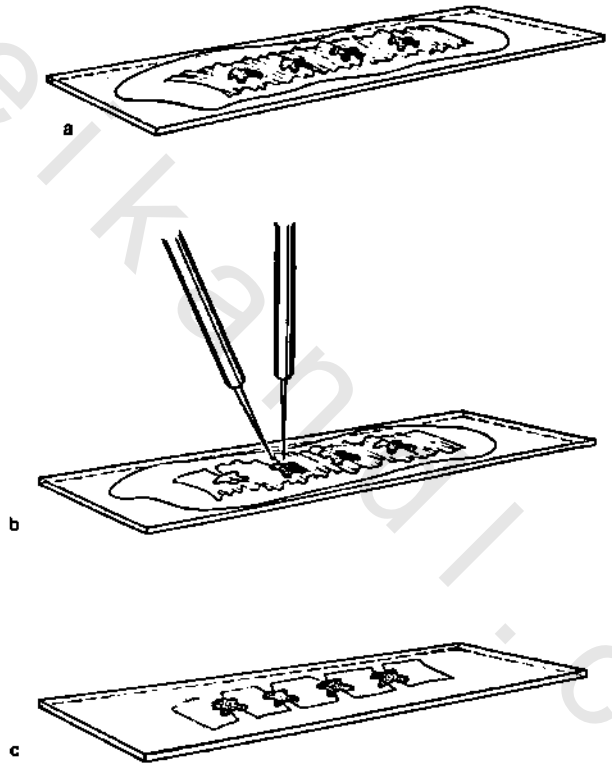
ملحوظة:

إذا لاحظت أن الشرائح الواردة إليك نظيفة فيمكنك حذف الخطوات ١، ٢ من الخطوات المشار إليها.

ومن المفيد ان نذكر أنه عند وضع الشرائح فى أوانى الغسيل فإنها توضع واحدة واحدة، بحيث لا تلتصق أية شريحتان بسطحيهما معا حتى تضمن جودة غسل كل شريحة.

(ب) لصق القطاعات: **Affixation of Sections** (شكل ٢٦).

تلصق القطاعات الشمعية على شرائح زجاجية نظيفة وذلك بنقل القطاع الشمعى من العلبة الكرتونية التى جمعت فيها القطاعات عند التقطيع بواسطة فرشاة إلى سطح شريحة زجاجية ساخنة عليها قطرة من الماء المقطر وذلك يسمح ببسط القطاع الشمعى والعينة ولصقها على الشريحة. وبعد ذلك يجفف الماء الزائد وتحفظ الشرائح فى فرن درجة حرارته ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة بعدها يمكن حفظها لأى مدة من الزمن، وتصبح هذه القطاعات معدة للصباغة بشرط حمايتها من الأتربة والحرارة العالية. ويلاحظ فى عملية لصق القطاعات ما يلى:



شكل رقم (٢٦)

١ – تقطع شرائط الشمع المحفوظة فى العلبة بواسطة شفرة أو مشرط إلى قطاعات منفردة أو إلى مجموعات يتكون كل منها من عدة قطاعات وذلك حسب طبيعة العمل.

٢ – لتسخين الشرائح فإنها توضع على لوح معدنى Hot Plate متصل بالتيار الكهربائى وله ضابط لدرجات الحرارة ومنظم كهربى.

obeikandl.com

٣ - يجب عدم السماح للقطاع الشمعى بالانصهار أثناء عملية اللصق على اللوح المعدنى.. ولذلك فإن حرارة اللوح المعدنى يجب ألا تزيد عن ١٠-١٥ درجة أقل من درجة انصهار الشمع المستخدم فى الطمر. لأن ارتفاع الحرارة عن ذلك بسبب تمزق النسيج.

٤ - يراعى عند ترتيب القطاعات على الشريحة ضبط اتجاهها بحيث يسهل فحصها بالميكروسكوب بعد ذلك، وإذا كان هناك أكثر من قطاع على الشريحة فمن المعتاد أن توحد اتجاهاتها.

٥ - قد تقتضى بعض الأحوال التى يتعين فيها تعريض القطاعات أثناء الصباغة إلى درجات حراره عالية أو مواد كيماوية معينة كالأحماض والقلويات القويه إلى استخدام مواد لاصقة للقطاعات بدلا من الماء وإلا انفصلت القطاعات عن الشرائح الزجاجية أثناء معالجتها بمثل هذه الكيماويات أو تعريضها إلى الحرارة العالية. ومن أكثر محاليل اللصق شيوعا محلول لصق هوبت Haupt's affixative ومحلول لصق ماير Mayer's affixative.

محلول لصق هوبت Haupt's affixative:

يتكون المحلول الأساسى مما يلى:

ماء مقطر	Distilled water	١٠٠ سم٣
جيلاتين	Gelatin	١ جم
بلورات الفينول	Phenol crystals	٢ جم
جلسرين	Glycerin	١٥ سم٣

أذب الجيلاتين فى الماء المقطر الدافىء ثم أضف الفينول والجلسرين ثم رشح. وعند تحضير محلول الاستعمال، خذ ١ سم٣ من الراشح وخففه فى ٥٠ سم٣ من ٢٪ فورمالين. والفورمالين هنا يمنع إزالة محلول اللصق من على الشريحة وبالتالى يمنع انفصال القطاع عن الشريحة عند استكمال خطوات الصباغة. إلا أن العمل بهذا المحلول لفترات طويلة يعرض العيون والحلق لبخار الفورمالين الذى يؤذيها.

محلول اللصق ماير Mayer's affixative:

يتكون المحلول الأساسى مما يلى:

بياض البيض (الزلال)	Albumen	٥ سم٣
جلسرين	Glycerin	٥٠ سم٣
ساليسلات الصوديوم (أو ثيمول أو فورمالين) (لمنع التعفن)	Sodium salicilate or thymol	١ جم

أضف هذه المواد إلى بعضها ثم رشح. وعند تحضير محلول الاستعمال خذ ١ سم٣ من هذا المحلول الأساسى وأضفه إلى ٥٠ سم٣ ماء مقطر سبق غليه لطرد الهواء منه حتى لا يتسبب فى حدوث فقاعات أسفل القطاعات.

بعض الصعوبات التى قد تحدث أثناء لصق القطاعات وكيفية تلافيها أو معالجتها:

أولاً: الشمع ينصهر ويصاحب ذلك تمزق القطاعات:

يرجع هذا إلى شدة تسخين اللوح المعدنى أثناء فرد القطاعات عليه.

ثانيًا: إنزلاق القطاعات الشمعية من فوق الشرائح الزجاجية إلى سطح لوح التسخين المعدنى:

قد يرجع هذا إلى ميل لوح التسخين الذى يجب أن يكون فى وضع أفقى تماما أو يرجع إلى كثرة كمية المحلول المستخدم فى اللصق. وفى جميع الحالات يمكنك الحفاظ على القطاعات المنزلقة بأن تسكب عليها بسرعة كمية من الماء البارد ثم تسحبها برفق إلى ما فوق الشريحة مرة أخرى باستخدام إبرة تشريح.

ثالثًا: ظهور قفاعات أسفل القطاعات عند وضعها فوق محلول اللصق:

يمكن تجنب ذلك بأن تحرص على أن تضع القطاعات فوق المحلول بأن تسقط القطاع تدريجيا من جانب إلى جانب. ويمكنك التخلص من القطاعات بأن ترفع القطاع من أحد طرفيه حتى تهرب فقاعة الهواء. ولا تحاول أن ترفع درجة حرارة لوح التسخين بقصد التخلص من الفقاعات لأن ذلك سيؤدى إلى تمدد الفقاعات وكبرها فى الحجم وليس القضاء عليها.

رابعًا: تبدو القطاعات كأنها مفرودة ولكن بعد تمام جفافها فإنها جزئيا أو كليا عن الشريحة الزجاجية:

يحدث ذلك نتيجة وجود كمية من الماء تحت القطاع ويمكن كشف ذلك بالنظر إلى السطح السفلى للشريحة فسنجد تحت القطاع منطقة لامعة.

ولتجنب ذلك العيب فإن القطاع يجب أن يفرد أولا على كمية غير قليلة من محلول اللصق ثم يصفى الماء جيدا من أسفل القطاع ثم تجرى عملية تجفيف الشريحة من الماء بواسطة منشفة.

خامسًا: القطاعات الشمعية تتثنى بدلا من أن تنبسط:

قد يرجع هذا إلى أن حرارة لوح التسخين عالية جدا أو أن الشمع المطمور فيه العينة يكون لينا بالنسبة إلى رقة القطاعات أو قساوة النسيج. وفى الحالتين الأخيرتين يمكن تجنب هذا العيب بالامساك بالقطاع الشمعى من طرفيه بابرتى تشريح ومحاولة فرد القطاع برفق أثناء عملية التسخين.

سادسًا: قطاع العينة يرتفع عن سطح الشريحة عند انبساط القطاع الشمعى أثناء التسخين:

يدل ذلك على انضغاط الشمع المتزايد بسبب أن درجة انصهار الشمع المستخدم ليست عالية بدرجة كافية أو أن قالب الشمع لم يكن قد برد بالدرجة الكافية قبل تقطيع القطاعات. ويمكن إصلاح هذا العيب فى بعض الحالات بالامساك بالقطاع الشمعى من طرفيه بابرتى تشريح ومحاولة جذبه برقة على الناحيتين. ويمكن أيضا إصلاح العيب بالقطع بالشفرة بكل حذر فى كل قطاع

شمعى أسفل وأعلى العينة. وسواء اتبعنا هذا الأسلوب أو ذلك فإنه يجب فصل القطاعات عن بعضها قبل أن تجف القطاعات على الشريحة.

سابعًا: قطاع العينة يتشقق:

يحدث ذلك عادة فى بعض الأنسجة مثل الطحال والكبد والعقد اللمفية والأنسجة العصبية. ولمنع حدوث هذا التشقق فإنه يتعين تصفية الماء على الشريحة وتجفيفها بمجرد فرد القطاع ثم تجفف القطاعات فى درجة حرارة مرتفعة (حوالى ٦٠°م) أو تجفيفها على لهب بنزن حتى لحظة بدء الشمع فى الانصهار.

الصباغة Staining

بعد تحميل القطاعات الشمعية على الشرائح، يجب أن تجفف فى حضانة عند درجة ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة على الأقل. ويمكن تخزين القطاعات بعد ذلك لأية فترة دون أن تتلف بشرط حمايتها من الأتربة ودرجة الحرارة المرتفعة.

وإذا ما أريد صباغة القطاعات، يجب أولا إزالة الشمع المحيط والمتخلل للقطاعات وذلك باستخدام الزيلول عادة، وبعد ذلك تمرر الشرائح فى سلسلة هابطة التركيز من الكحول (١٠٠٪، ٩٥٪، ٨٠٪، ٧٠٪، ٥٠٪) ثم الماء المقطر، وذلك إذا كان الصبغ ذائبا فى الماء، أما إذا كان الصبغ ذائبا فى تركيز معين من الكحول فيجب تمرير الشرائح فى سلسلة الكحولات حتى تصل إلى ذلك التركيز ومنه تنقل الشرائح إلى الصبغ مباشرة. وبصفة عامة يتم صباغة القطاعات بإحدى الطرق الآتية:

(أ) الصباغة بصبغ واحد مثل التولويدين بلو.

(ب) الصباغة بمحلول لصبغ واحد ذو عدة تكونات صبغية كما فى حالة صبغ جمسا.

(جـ) الصباغة بمحلول واحد يحتوى على صبغين كما فى حالة صبغ «مثيل جرين بيرونين».

(د) الصباغة بصبغ يتلوه صبغ آخر كما فى حالة الهيماتوكسيلين والأيوسين.

(هـ) الصباغة بعدة محاليل كما فى حالة طريقة ماسون الثلاثية.

(و) الصباغة بمحلول يسبقه مرسخ كما فى حالة طريقة هايدن هان هيماتوكسيلين لصباغة الحبيبات السبحية.

التمييز Differentiation

يقصد بالتمييز إزالة الصبغ الزائد من القطاع، ويستعان فى الحكم على درجة الصبغ باستخدام المجهر بعد وضع لوح زجاجى على منصته حماية له من المحاليل المستخدمة فى الصباغة.

وتتنوع محاليل التمييز حسب طريقة الصباغة، فمثلا يستخدم كحول محمض لتمييز الهيماتوكسيلين فى حالة صباغة الهيماتوكسيلين والايوسين الروتينية، ويستخدم شب الحديد فى حالة

صباغة الحبيبات السبحية بطريقة هايدن هان هيماتوكسيلين، ويستخدم انيلين كحولى فى طريقة هيدن هان أزان.

ويراعى عند فحص القطاع للحكم على مدى التمييز أن تغسل الشريحة فى الماء المقطر لإزالة محلول التمييز من القطاع حتى تقف عملية التمييز أثناء فترة فحص القطاع.

وإذا وجدت أن تمييز الصبغ لم يتم بعد فعليك أن ترجع الشريحة إلى محلول التمييز لفترة أطول ثم تعيد فحصها مرة أخرى وهكذا.

وإذا لوحظ أن محلول التمييز تسبب فى فقد أكثر من اللازم لصباغة القطاع فهذا يدل على زيادة الوقت الذى وضعت فيه الشريحة فى محلول التمييز، ويمكنك أن تستغنى عن هذه الشريحة أو أن تعيدها إلى محلول الصبغ وتستخدم شريحة أخرى لضبط الوقت الذى تستغرقه عملية التمييز.

ويفضل دائما تحديد الوقت الذى تستغرقه عملية التمييز باستخدام شريحة واحدة بينما تكون بقية الشرائح فى محلول الصبغ، حتى إذا ما تم تحديد الفترة اللازمة للتمييز يتم تطبيقها على بقية الشرائح دون الرجوع إلى المجهر للحكم على درجة التمييز.

ويجب الحرص دائما على عدم جفاف القطاع أثناء عملية الفحص المجهرى لتحديد درجة التمييز المطلوبة.

نزع الماء ـ الترويق ـ التحميل وتغطية العينات
Dehydration – Clearing and Mounting

إذا أريد بعد انتهاء عملية الصباغة تحميل القطاعات فى أحد الأصباغ مثل الكندابلسم فإن ذلك يستلزم نزع الماء من القطاعات بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول حيث أن الأصباغ لا تذوب فى الماء أما إذا كان التحميل سيتم فى مواد مثل الجلسرين والجيلاتين فإن عمليتى نزع الماء والترويق تصبحان لا ضرورة لهما.

نزع الماء Dehydration:

تتم عملية نزع الماء من القطاعات بتمرير الشرائح فى سلسلة متزايدة التركيز من الكحول (عادة ٣٠٪ – ٥٠٪ – ٧٠٪ – ٩٥٪ وتغييرتين من كحول ١٠٠٪) وتترك الشرائح مدة ٣ دقائق فى كل تغييرة تزاد إلى ٥ دقائق بالنسبة للكحول المطلق (١٠٠٪).

وفى بعض الأحيان يكون من المرغوب فيه عدم تعريض القطاعات المصبوغة للماء حيث أن الأخير يسبب فقد الصبغ من القطاعات. وفى هذه الحالة تجفف القطاعات والشرائح بورق ترشيح ثم تمرر فى تغييرتين من الكحول المطلق فقط.

الترويق Clearing:

يتم ذلك بسائل قابل للذوبان فى كل من الكحول المطلق وصمغ التحميل. ومن أشهر سوائل الترويق الزيلول. ويراعى التنبه إلى المادة المذيبة لصمغ التحميل حتى يجرى الترويق فى هذه المادة

المذيبة. ويجرى الترويق بوضع الشرائح فى خليط من الكحول المطلق والزيلول ثم فى تغييرتين من الزيلول، وتوضع الشرائح ٥ دقائق فى كل من التغييرات الثلاث.

مواد تحميل العينات والقطاعات
Mounting media

هى سوائل تقترب معاملات انكسارها من معامل انكسار الزجاج (١,٥١٨) وتوضع بين العينة الواقعة على الشرحة والغطاء الذى يغطى العينة.

وهناك نوعان من مواد التحميل:

(أ) مواد تحميل صمغية للتحضيرات التى ينزع منها الماء فى الكحول وتروق فى الزيلول.

(ب) مواد تحميل مائية للتحضيرات التى يفسدها استخدام الكحول والزيلول ولذا فهى تغسل فى الماء وتحمل فى مواد تذوب فى الماء. وغالبا ما توضع مواد التحميل فى وعاء زجاجى خاص مزود بقضيب زجاجى تؤخذ بواسطته قطرات سائل التحميل، ويراعى تغطية هذا الوعاء جيدا لحمايته من الأتربة وتقليل عملية تبخيره.

(أ) **مواد التحميل الصمغية:** ومن أشهرها ما يلى:

- **كندا بلسم Canada balsam:**

معامل انكساره (١,٥٢٤) ويحمل فيه بعد الترويق فى الزيلول ويجب أن يحفظ هذا الصمغ فى زجاجة داكنة اللون. ويستحسن إضافة دقائق من كربونات الكالسيوم إلى الزجاجة الأساسية التى تحتوى على الصمغ ضمانا لتعادلها حيث أن الصمغ الحامضى يساعد على زوال لون صبغ القطاعات.

- **ايوبارال (Euparal):**

معامل انكساره (١,٤٨٣) ويمكن التحميل فيه من ٩٥٪ كحول مباشرة فى حالة ما إذا أريد تجنب الكحول المطلق والزيلول. وهو يتكون من ايوكالبتول Eucalyptol وبارالدهيد paraldehyde ومواد أخرى. وقد يكون لونه أصفر فاتحا أو أخضر. أو من مميزات الايوبرال أنه لا يسبب بهتانا للأصباغ ويجف بسرعة، كما أن انخفاض معامل انكساره يسمح بالفحص الجيد للعينات غير المصبوغة.

- **زام (Xam):**

معامل انكساره (١,٥٢) ويحمل فيه بعد الترويق فى الزيلول وهو إما عديم اللون أو أصفر باهت. ومن ميزاته أنه يجف بسرعة دون انكماش ولا يسبب بهتان الصبغ. وهو مكون من مواد ذائبه فى الزيلول.

- **دى. بى. اكس. D.P.X، بى. بى. أس. B.P.S.:**

يتكون دى. بى. أكس من دسترين distrene بلاستسيزير Plasticizer وزيلول Xylol ويتكون بى. بى. أس من بيوتيل butyl فثاليت phthalate وستيرين styrene.

ويحمل فى أى من هاتين المادتين بعد الترويق فى الزيلول وهما تتميزان بسرعة الجفاف وأنهما لا تؤثران على الاصباغ ولكن لا ينصح باستخدامها مع القطاعات السميكة تجنبا لحدوث إنكماش واضح فى مادة التحميل.

(ب) مواد التحميل المائية: ومن أشهرها ما يلى:

- جلسرين جيللى (كازير) Glycerin – Jelly (Kaiser):

وهو يحضر فى المعمل كما يلى: ذوب ١٠ جم جيلاتين فى ٦٠ سم٣ من الماء فى كأس وسخن بواسطة حمام مائى. أضف بعد ذلك ٧٠ سم٣ من الجلسرين النقى، ٢٥, جم بلورات الفينول وقلب جيدا. أحفظ السائل قبل تجمده فى زجاجة محكمة القفل. عند الاستعمال ضع الزجاجة فى ماء دافئ فى فرن الشمع حتى يتم الانصهار.

ويعيب الجلسرين جيللى أنه يظل طريا على الشريحة مما يعرض التحضير للتلف بسهولة عند أى اصطدام أو إذا ما وضعت الشريحة مائلة. ويمكن التغلب على ذلك إذا ما لحمت حواف الشريحة Ringing. ومعامل انكساره (١,٤٧) تقريبا.

مادة تحميل أباثى Apathy's mountant:

سميت هذه المادة باسم «فون أباشى» الذى وصف طريقة تحضيرها واقترح استعمالها مع تحضيرات الأعصاب المصبوغة بالمثيلين الأزرق. وهى تحضر مما يلى:

بلورات صمغ عربى نقى (وليس مسحوقا)	Pure arabic gum (crystals, not powder)	٥٠ جم
سكر قصب نقى	Pure cane sugar	٥٠ جم
مـاء مقطـر	distilled water	٥٠ سم٣
ثيمول	Thymol	٠,٠٥ جم

ويتم الذوبان بمساعدة حراره هادئة. وتخزن المادة فى زجاجة محكمة الغلق. ومعامل انكسارها (١,٥٢). ولا يحتاج هنا إلى لحم الغطاء الزجاجى فوق الشريحة.

جليسرين Glycerin:

يمكن استخدام خليط من كميات متساوية من الجلسرين والماء المقطر كمادة تحميل مؤقته. معامل الانكسار (١,٣٩٧) تقريبا.

مادة تحميل فارانتس Farrants medium:

مـاء مقطـر	distilled water	٤٠,٠ سم٣
صمغ عربى (أكاسيا)	arabic gum (acacia)	٤٠,٠ جم
جليسرين	glycerin	٢٠ سم٣
فينول (حمض كربوليك)	phenol (Carbolic acid)	٠,١ جم

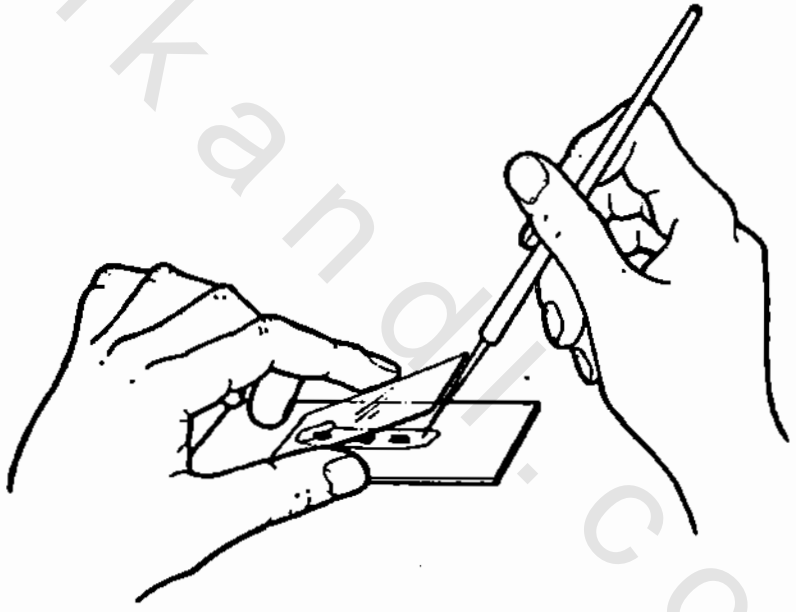
كما يمكن الحصول على مواد التحميل المائية جاهزة من الشركات المختصة.

تغطية العينات Mounting: (شكل ٢٧)

- اغسل الأغطية الزجاجية فى كحول وجففها بمنشفة نظيفة خالية من الوبر.

- خذ الشريحة من سائل الترويق وتأكد من الناحية التى عليها العينة، ومن المفيد أن نفعل ذلك مع كل شريحة. ضع الشريحة فى وضع أفقى بحيث يكون السطح الذى عليه العينة إلى أعلى.

- ضع كمية مناسبة من مادة التحميل بواسطة القضيب الزجاجى عند طرف العينة. لا تضع كمية أكبر من اللازم من مادة التحميل لأنها فى هذه الحالة سوف تنتشر فوق الشريحة وتسبب لك المضايقات، كما لا تضع كمية أقل من اللازم وإلا تسبب ذلك فى وجود فجوات هوائية أسفل الغطاء الزجاجى. إذا تبخر سائل الترويق جزئيا من العينة قبل أن تغطى بمادة التحميل، ارجع الشريحة إلى الزيلول.



شكل رقم (٢٧)

- أمسك غطاءا زجاجيا نظيفا رقيقا (الغطاء السميك سيكون عقبه أمام فحص العينة بالعدسه الكبرى للمجهر وكذلك سيحدث نفس الشىء إذا كانت طبقة مادة التحميل أكثر سمكا من اللازم) من حافتيه بين إبهام وسبابة يدك اليسرى ثم اجعل الحافة الثالثة للغطاء تلامس سطح الشريحة عند طرف العينة الموجود عنده مادة التحميل بحيث يكون الغطاء مائلا بزاوية ٤٥° تقريبا ومادة التحميل محصورة بين الشريحة والغطاء. إمسك بلقط فى يدك اليمنى بالحافة الرابعة للغطاء،

أترك الغطاء من يدك اليسرى. اجعل الغطاء يهبط تدريجيا على الشريحة دافعا مادة التحميل أمامه حتى يستقر الغطاء فوق الشريحة دون تكون فقاعات هوائية أسفله (شكل ٢٧).

– امسح بقطعة قماش نظيفة السطح السفلى وجوانب السطح العلوى للشريحة. وكن حذرا حتى لا تزحزح غطاء الشريحة من مكانه.

– إذا ظهرت مادة التحميل أسفل الغطاء الزجاجى غائمه لبنيه المظهر بدلا من كونها بلورية رائقة فهذا يعنى وجود ماء. وفى هذه الحالة عليك أن تزيل مادة التحميل فى الزيلول وترجع الشرائح إلى الكحول المطلق وتعيد نزع الماء فى تغيرتين من كحول مطلق جديد. روق القطاعات ثم أعد التحميل.

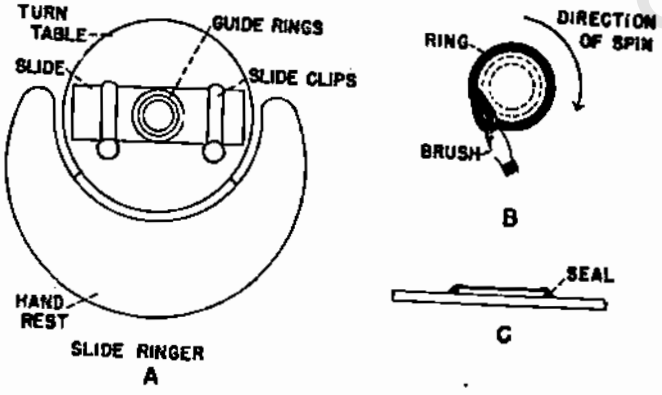
– ضع الشرائح فى حضانة عند درجة ٣٧ م لمدة يوم واحد حتى تجف مادة التحميل.

– أزل مادة التحميل الخارجة عن حدود الغطاء الزجاجى باستخدام شفرة حاد وكن حذرا حتى لا تندفع الشفرة أسفل الغطاء الزجاجى ويتلف التحضير. امسح آثار مادة التحميل من على الشريحة بقطعة قماش مبللة بالزيلول ثم امسح الشريحة بقطعة قماش أخرى مبللة بالكحول المطلق.

– احفظ الشرائح فى صوانى Trays الشرائح أو فى العلب المخصصة لذلك. ضع هذه الصوانى أو العلب فى الدولاب الخاص بالشرائح ويستحسن أن تكون الشرائح موضوعه فى هذه الحالة أفقيا.

مواد لحم أغطية الشرائح Ringing media:

بعض مواد التحميل ـ كما سبق القول ـ لا تجف مما يقتضى لحم حواف الغطاء الزجاجى بمواد خاصة حفاظا على التحضير. وبعض هذه المواد نظيف صلب مثل مادة كرونج اللاصقة Kronig's cement الذى يتكون من جزءين من الشمع، ٧ – ٩ اجزاء من مسحوق صمغ الكولوفونيم Colophonium Resin Powder. سخن مع التقليب ثم رشح المحلول وهو ما زال ساخنا فى وعاء معدنى. عند الاستعمال يعاد صهر المادة. وهناك موادلحم سائلة مثل «ديوروفكس» Durofix وهى مادة سليولوزية لاصقة. ويمكن أيضا استخدام طلاء الأظافر.



شكل رقم (٢٨)

وتتم عملية لحم الأغطية بالاستعانة بفرشاة أو سلك طرفه ملتو. ويمكن استخدام آلة دوارة خاصة Turntable لهذا الغرض (شكل ٢٨) ويقتصر استعمالها مع أغطية الشرائح المستديرة.

تسجيل البيانات على الشرائح Labelling of slides:

يتطلب الأمر فى كثير من الأحيان تسجيل بعض البيانات عن التحضير على الشرائح ذاتها. ومن أمثلة ذلك اسم العضو ـ اسم الحيوان ـ الهدف من التحضير ـ اسم المثبت ـ اسم الصبغ ـ الحالة المرضية إن وجدت. ويتم كتابه ذلك عادة على الجانب الأيسر من الشريحة باستخدام قلم ماسى (الماظ) Diamond Pencil. ويمكن أن يتم ذلك أيضا بلصق ورقة على الشريحة بعد تدوين هذه البيانات عليها. وهناك أوراق ذاتية اللصق معدة خصيصا لهذا الغرض. وتتم الكتابة بالحبر الصينى الأسود. وتجدر الإشارة إلى وجوب كتابة البيانات بصورة رمزية ملخصة نظرا لضيق المساحة.

obeikandl.com