

وهناك عدة أنواع من شمع البرافين تبعاً لدرجة انصهاره:

- البرافين الرخو **soft paraffin**: ينصهر عند درجة حرارة (45 - 50) درجة مئوية
  - البرافين المتوسطة **medium paraffin**: ينصهر عند درجة حرارة (50 - 55) درجة مئوية.
  - البرافين الصلب **hard paraffin**: ينصهر عند درجة حرارة (56 - 68) درجة مئوية.
- و أهم عامل لاختيار نوع الشمع هي حرارة الفرن التي يعمل فيها القطاعات و نوعية العينة تحت الفحص، و لعمل القالب الشمعي يعبأ الشمع المنصهر داخل القالب ثم تنقل العينة باستخدام ملقط و توضع العينة بالاتجاه المرغوب به، بعدها يترك القالب على سطح ثلجي فترة قصيرة ليبرد سطحه الخارجي ، و حتى لا يلتصق الشمع بأطراف القالب المعدنية فإنه يفضل مسح قاعدته و أطرافه الداخلية بالفازلين أو الجليسرين قبل ذلك.

مع العلم أن هناك أنواع جديدة من أجهزة الطمر التي تستخدم الشبكات البلاستيكية الخاصة بتمرير القطاعات و من ثم تطمر القطاعات في النهاية في هذه الشبكات ( لهذه القوالب ميكروتوم خاص ذو حامل ملائم لحجم هذه الشبكات يختلف عن الميكروتوم ذو الحامل الخاص بالقالب المعدني القديم).

#### 8. **عملية التشذيب *Trimming*** :

بعد تحضير القوالب الشمعية يستحسن تشذيبها بشفرة حادة حتى تصبح العينة في وضع مناسب للتقطيع بحيث تصبح أطرافها متوازية و يمكن أن تنطبق على حافة سكين الميكروتوم.

#### 9. **تقطيع العينة *Sectioning*** :

تثبت العينة على حامل العينة **specimen holder** في الميكروتوم كما يجب أن يزود جهاز القطع بسكين حادة جداً و يحدد سمك القطاع المرغوب فيه (3 - 7) ميكرون للبارافين و بسمك (10 - 15) ميكرون للسليويدين، القطاعات الجيدة عادةً تكون على شكل أشرطة **Ribbons** أو سلسله من القطاعات و يفضل أن توضع هذه الأشرطة على صفيحة سوداء حتى يسهل تمييز القطاعات و أخذ المناسب منها لوضعه على الشريحة الزجاجية.

#### 10. **تحميل القطاعات *Mounting*** :

يقصد بها وضع القطاع النسيجي على الشريحة الزجاجية، و يمكن أن تتم هذه العملية بإحدى

طريقتين:

يوضع القطاع في حمام مائي بدرجة حرارة (40 - 45) درجة مئوية ويترك القطاع يطفو على سطح الماء لمدة (1 - 2) دقيقة حتى ينفرد تماما ، تمر الشريحة الزجاجية تحت هذا القطاع ويلتقط بحيث يلتصق على وسط الشريحة ، وذلك برفع الشريحة باتجاه القطاع إلى أعلى مع عدم السماح لتكون أية فقاعات هوائية ، تترك الشريحة تجف على مجفف الشرائح (45) درجة مئوية لمدة (24 ساعة) تقريباً كما يفضل أن تكون الشريحة قد دهنت بلاصق ماير(عبارة عن حجمين متساويين من مادة زلال البيض والجليسرين مع سلسلات الصوديوم) كمادة حافظة. ينقل القطاع إلى شريحة مجهرية عليها قطرة ماء ثم توضع على مجفف الشرائح وتترك حتى تتبخر القطرة المائية ويلتصق القطاع جيداً على الشريحة والمدهونة بلاصق ماير مسبقاً.

### 11. عملية الصبغ *Staining*:

يجب أن يزال شمع البرافين من القطاعات تماماً باستخدام الزيلول ومن ثم يجب التخلص من الزيلول هو الآخر بالكحول المطلق، بعدها يجب نقل القطاعات إلى بيئة مشابهة للبيئة المذابة فيها الصبغة (مائية أو كحولية) فإذا كانت الصبغة مذابة في الماء مثلاً يجب تميؤ **hydration** القطاعات وذلك بتمريرها على سلسلة تركيزها متدرجة الانخفاض من محاليل الكحول حتى تصل إلى الماء (3 دقائق لكل مرحلة) أما إذا كانت العينة مذابة في 50% كحول فيكتفي بتمرير القطاعات في السلسلة الكحولية حتى تصل إلى 50% قبل تمريرها في محلول الصبغة. ومدة الصبغ تعتمد على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج وقد يصبغ النسيج بأكثر من صبغه أو قد يلجأ الباحث إلى ما يسمى الصبغ المضاد كاستخدام صبغة الهيماتوكسولين لصبغ الأنوية وصبغة الأيوسين لصبغ السيتوبلازم.

بعد الانتهاء من عملية الصبغ تبدأ عملية إعداد الشريحة المجهرية للحفاظ المستديم باستخدام مادة شمعية أو مادة بلاستيكية حافظه مثل مادة بلسم كندا أو مادة (D.P.X) ثم يوضع غطاء الشريحة (**Cover slip**) بزاوية حادة 45 درجة ويجذر شديد حتى لا تتكون فقاعات هوائية **Air bubbles** ، وهكذا يتم عمل ما يعرف بالشريحة المستديمة. بعد أن تترك لتجف على مجفف الشرائح يمكن فحص القطاعات تحت المجهر.

في المختبرات الصغيرة ومختبرات أبحاث الدم التي تستخدم عينات قليلة تتم الخطوات السابقة بشكل يدوي بينما في مختبرات الأمر اض التي يتم فيها إجراء فحوصات روتينية لعينات كثيرة تتم باستخدام أجهزة حديثه منها جهاز معاملة الأنسجة الأوتوماتيكي  
(Tissue Auto processor)

مميزات تقنية شمع البرافين:

1- هذه التقنية تأخذ وقت قصير للإعداد (ليس أكثر من يومين).

2- تعطي سلسلة متتابعة من القطاعات تسمى أشرطة Ribbons متصلة مع بعضها البعض وهذه الأشرطة مهمة للعمل البحثي.

3- تعطي قطاعات رقيقة جداً.

4- قطاعات هذه الطريقة سهلة الصبغ.

عيوبها:

- هذه الطريقة تستخدم المثبتات والفرن والتي قد تضر بالنسيج وبتفاصيل تركيب الخلايا.
- استخدام المثبتات قد يذيب المحتوى الدهني للنسيج خلال التحضير لذا لا يمكن دراسة الدهون بهذه الطريقة.
- هذه الطريقة ليست مثالية في كيمياء الأنسجة لأن الحرارة تحطم الأنزيمات مثلاً.

### The Celloidin Technique ثانياً: تقنية الملويدين

تشبه الطريقة السابقة طريقة شمع البرافين إلا أنه في هذه الطريقة يتم استبدال البرافين بالسللويدين. حيث أن بعض العينات مثل عينات العظم والعين يفضل أن يعمل فيها قوالب من السللويدين المعروفة بمادة النيتروسيليلوز (nitrocellulose) وقبل الطمر يجب أن توضع العينة في خليط من ثنائي الأثير والكحول الإيثيلي بنسب متساوية ثم تنقل العينة لمدة أسبوع في كل من محاليل السللويدين (2%، 4%، 8%) المذاب في خليط ثنائي إيثيل الإثير والكحول المطلق على أن توضع العينة داخل المحاليل في وعاء محكم الإغلاق، ويجب أن يكون حجم المحلول على الأقل 10 أضعاف حجم العينة وأن يكون عمقه على الأقل 3 أضعاف أطول طرف للعينة. تنقل بعد ذلك العينة إلى محلول السللويدين (8%) وتترك فترة حتى تزول الفقاعات الهوائية بعدها ينفخ على العينة بشكل جزئي وتترك تحت شافطة أبخرة (Fume hood) لمدة 5 - 10 أيام حتى يسمح للتبخر إلى نصف المحلول تقريباً، بعد ذلك يعمل قالب من العينة

يحيط بها السللويدين وتنقل إلى وعاء تجفيف (Desiccator) بداخلة كلوروفورم حتى يعمل على تصليب القالب، بعد ذلك ترفع العينة من وعاء التجفيف وتلصق على حامل خشبي باستخدام سللويدين (4%) ويحفظ القالب داخل كحول إثيلي (70%) لحين البدء في عمل قطاعات منة. ويمكن أن يستخدم نوع خاص من السللويدين ذو لزوجة أقل (Low Viscosity Nitrocellulose) ويرمز له بالرمز (L.V.N) ويستخدم في بعض الحالات الخاصة لعينات الجهاز العصبي. وتعامل العينة بنفس الطريقة باستخدام محاليل من نفس المادة بتركيز (5%, 01%, 02%) مذابة بخليط من ثنائي الأيثر والكحول الإيثيلي المطلق بنسب متساوية مضافاً إليها 5.0% زيت الخروع (Castor Oil).

مميزاتها:

- تعطي مقاطع كاملة الوضوح يمكن رؤية تفاصيل الأنسجة.
- عدم استخدام الحرارة فيها يحفظ التراكيب النسيجية كما هي.
- ممكن استخدام قطع كبيرة من الأنسجة مثل استخدام العين كاملةً عيوبها:
- تحتاج إلى وقت طويل (شهر تقريباً) لإعداد القطع.
- لا يمكن الحصول على أشرطة من القطاعات لأنها سميكة ومنفصلة عن بعضها البعض.
- قطاع السللويدين جداً صعب في القطع والصبغ.

### الثالث: تقنية التجميد Frozen Method

في هذه الطريقة النسيج الطري أو المثبت يجمد ويصلب ويعمل منه قطاعات بالميكرو توم الثلجي أو ما يسمى بالكريوستات (cryostat).

مميزاتها:

طريقة سريعة وبسيطة تستخدم عادة خلال العمليات الجراحية التي تطلب تشخيص سريعاً للسرطانات.

المواد الكيميائية الموجودة في النسيج لا تتغير بسبب عدم استخدام الحرارة. تستخدم في كيمياء الأنسجة لدراسة فعالية الأنزيمات الخلوية والكشف عن الدهون وتفاعل الأجسام المضادة مع الأنتيجينات .