



كيمياء النسيج الحيوانية و النباتية
(الجزء العملي)



السنة: الثالثة.
القسم: علم الحياة الحيوانية.
الاختصاص: حيوية كيميائية.



منشورات جامعة دمشق
كلية العلوم

كيمياء النسيج الحيوانية و النباتية الجزء العملي

الدكتورة هيفاء قاسم

أستاذ مساعد في قسم علم الحياة النباتية

أ. عبيرة معلا
مشرفة على الأعمال في قسم علم الحياة النباتية

أ. وفاء عبدالله الهريسي
مديرة أعمال في قسم علم الحياة الحيوانية

1438 - 1439 هـ

2016 - 2017 م

جامعة دمشق



فهرس محتويات الكتاب

رقم الصفحة

9	مقدمة
13	الفصل الأول : المجاهر المستعملة في الدراسات النسيجية.
13	أولاً: المجاهر الضوئية البسيطة
14	ثانياً: المجاهر الضوئية المركبة
15	1- المجهر المركب (مضئ الحقل) .
19	2- المجهر مظلم الحقل .
21	3- المجهر متباين الطور .
23	4- المجهر المتألق .
25	5- المجهر المقلوب .
26	6- المجهر متداخل الضوء .
28	ثالثاً: المجهر الإلكتروني.
29	1- لمجهر الإلكتروني النافذ .
35	2- المجهر الإلكتروني الماسح .
39	الفصل الثاني: الأجهزة اللازمة في التحضير المجهرى
39	أولاً: أجهزة التقطيع (الميكروتوم).
50	ثانياً: أفران صهر الشمع
51	ثالثاً: جهاز تدفئة الشرائح
51	رابعاً: الأجهزة المتخصصة الآلية .
55	الفصل الثالث: المثبتات .
56	- صفات المثبت الجيد .
56	- أنواع المثبتات .
66	- العوامل المؤثرة في التثبيت .
67	- شروط نجاح عملية التثبيت .

68	- المثبتات المستعملة في كيمياء النسيج الحيوانية .
70	- المثبتات المستعملة في كيمياء النسيج النباتية .
73	الفصل الرابع: التلوين والمواد الملونة
74	- تصنيف الأصبغة.
76	- تفسير آلية التلوين .
78	- ظاهرة التحول اللوني
78	- طرائق التلوين.
80	- محاليل التلوين والتمييز
80	1- بعض الملونات النووية
84	2- بعض الملونات السيتوبلاسمية
85	3- محاليل التمييز
86	- بعض نماذج التلوينات الكاملة .
87	- الملونات الحيوية .
89	الفصل الخامس: سوائل اللصق ووسائط التغطية
89	أولاً: سوائل اللصق
90	ثانياً: وسائط التغطية
95	الفصل السادس: إعداد المحضرات النسيجية (طريقة الشمع).
95	1- الحصول على العينة .
97	2- تثبيت العينة .
98	3- غسل العينة .
99	4- نزع الماء من العينة .
101	5- ترويق العينة .
103	6- التشريب والظمر
108	7- التشذيب (نحت القالب) .
108	8- التقطيع .
112	9- لصق المقاطع وفرش الشريط الشمعي على الشرائح .

115	10- التلوين.
119	11- التغطية والاستر .
121	ملخص مراحل إنجاز المحضرات الحيوانية (من التثبيت وحتى الستر).
123	ملخص مراحل إنجاز المحضرات النباتية (من التثبيت وحتى الستر).
127	الفصل السابع: إعداد المحضرات النسيجية (معالجات خاصة)
127	أولاً: تحضير مقاطع من النسيج العظمي .
129	ثانياً: إعداد المحضرات النسيجية بطريقة السيلونيين
132	ثالثاً: إعداد المحضرات النسيجية بطريقة الطمر بالتجميد
135	الفصل الثامن: تلوين النسج بالطريقة العامة .
143	الفصل التاسع: التلوين النسيجي الكيميائي.
143	أولاً : الكشف عن الكربوهيدرات .
153	ثانيا : الكشف عن البروتينات .
158	ثالثا : الكشف عن الأنزيمات .
170	رابعا : الكشف الليبيدات و الليبيدات البروتينية .
177	خامسا :الكشف عن الحموض النووية .
180	سادسا : الكشف عن المعادن.
189	سابعا : الكشف عن الأصبغة.
197	ثامنا : الكشف عن الفيتامينات.
201	الفصل العاشر: استخلاص الزيوت العطرية والمركبات الثانوية
201	من النسج النباتية .
201	A-استخلاص الزيوت العطرية
206	B-استخلاص مركبات النبات الثانوية
212	C - الأصبغة النباتية
	الملاحق :
217	ملحق 1 : -المحاليل المنظمة الموقية

- 223 - ملحق 2 : الصبغ الكيميائية للمواد المستخدمة مخبرياً وأوزانها الجزيئية.
- 227 - ملحق 3 : الأوزان الذرية.
- 229 - ملحق 4 : أهم الملونات المستعملة في التلوين.
- 231 فهرس الأشكال الملونة ضمن الكتاب
- 235 المصطلحات العلمية: إنكليزي عربي.
- 241 المراجع العربية.
- 243 المراجع الأجنبية.
- 245 اللجنة العلمية.
- 247 ملحق 5 : صور مقاطع نسيجية ملونة .
- 247 - صور كما تبدو في بعض المجاهر
- 248 - صور مقاطع لأنسجة حيوانية مصبغة بالهيماتوكسيلين إيوزين
- 252 - صور مقاطع الكشف الكيميائي النسيجي في النسيج الحيوانية .
- 258 - صور مقاطع في أعضاء نباتية ملونة بطرائق متنوعة

المقدمة :

يعد علم البيولوجيا (علم الحياة) اللبنة الأساسية للعلوم الطبية، وذلك من خلال تطوير طرائق البحث العلمي على الحيوان والنبات، ومن ثم تقديم الحلول المناسبة في معالجة الكثير من الأمراض. كما أن عملية التحضيرات المجهرية مع أنها غاية في التعقيد والدقة، إلا أنها ذات أهمية كبيرة في الحياة العملية والبحثية والتشخيصية، وهذه العملية ذات علاقة مع بعض العلوم، كعلم الخلية وعلم النسيج وعلم الأمراض.

بدأت الدراسات النسيجية منذ القدم وفق مراحل زمنية متتالية إذ بدأت بالمعالجة البسيطة وانتهت إلى أعمال علمية دقيقة هدفت إلى توثيق المعلومات والوصول إلى أدق التفاصيل العلمية. لقد كانت البدايات مع القدماء وخصوصاً الفراعنة، حين حضروا محاليل لحفظ جثث موتاهم، وتوصلوا إلى أن المحاليل التي يدخل في تركيبها الكحول وبعض الزيوت، تؤدي هذا الغرض، وتثبت النماذج على الوضع الذي كانت عليه في أثناء الحياة. أما علم النسيج فكان معروفاً من قديم الزمان، أي من عهد أرسطو و ابن سينا. ثم أخذ هذا العلم في التوسع والإستقلال بعد اكتشاف المجهر وبعد الإعتراف بنظرية الخلية كوحدة لبناء الجسم الحي، وعلى هذا الأساس تم تطوير علم الشرائح المجهرية منذ منتصف القرن التاسع عشر.

كما شهدت بدايات القرن العشرين ملامح ظهور علم كيمياء النسيج نتيجةً لتجهيز كل من تقنيات علم النسيج وعلم الكيمياء الحيوية وعلم الكيمياء التحليلية، فقد تمكن هذا العلم الحديث من خلال دراسة المقاطع النسيجية المهيئة بطريقة خاصة من الإستدلال على المكونات الكيميائية التي يتركب منها النسيج، ومن ثم تحديد كمياتها وأماكنها ووظائفها، وهذا ساعد كثيراً في فهم وظائف الأعضاء والنسيج والخلايا، من خلال الاستدلال على المحتوى الكيميائي للخلية وما يطرأ عليه من تبدلات في الحالة الطبيعية والمرضية.

ويعد العالم الفرنسي فرانسواز راسبيل Francois Raspail مؤسساً لعلم كيمياء النسيج النباتية (1826)، وأتى من بعده العالم ليبرمان Leiberman ليطور هذا العلم في النسيج الحيوانية (1887)، ثم تتالت الإنجازات حتى بدايات القرن العشرين، إذ استقل علم كيمياء النسيج عن بقية العلوم، وأصبح علماً قائماً بذاته. من أشهر العلماء العاملين في هذا المجال نذكر: ليسون Lson

، غوموري Gomori، بيرلز Perls، ليللي Lillie، ماك مانوس Mc Manus، وغيرهم الكثير.

كما تمكن العلماء من التحري عن المركبات الكيميائية (بروتينات، أنزيمات، هرمونات، أملاح معدنية) في النسيج المختلفة وتعرف وظائفها من خلال تطبيقات تقانات كيميائية نسيجية.

وكان لإختراع المقطاع (الميكروتوم) في نهاية القرن التاسع عشر، من قبل العالم بان بوركنج Pann porkenje أثر كبير في تقطيع النماذج النسيجية إلى شرائح رقيقة ليسهل فحصها بالمجهر، بعد أن كانوا يستعملون الشفرات والسكاكين في تقطيع نماذجهم بالأيدي، ورافق ذلك نجاح بعض الباحثين في استعمال ألوان طبيعية نباتية لصبغ الشرائح.

واستمر علم الشرائح في تطوره، ومع إنتشار المجهر الالكتروني تطورت دراسة الشرائح المجهرية واستخدمت طرائق تثبيت وتقطيع وتلوين مختلفة عن تلك الطرائق المستعملة في الدراسات بالمجهر الضوئي. والجدير بالذكر، أن دراسة علم الشرائح مهماً في الحالات المرضية في مختبرات التشريح المرضي لمعرفة التركيب النسيجي للعيينة المستأصلة.

يشكل كتاب عملي كيمياء النسيج الحيوانية والنباتية لبنة أساسية ومهمة في تطوير المنهاج العلمي المتبع في نطاق علوم الحياة (البيولوجيا Biology) وتحديثه، إذ أن المكتبة العربية في جامعاتنا تفتقر إلى مثل هذه الكتب ولاسيما أن المعطيات البيولوجيا الحديثة تتقدم بسرعة بعد انتشار الشبكة الذكية (انترنت) ونشر المعلومات عليها بحيث يتمكن أي شخص من الاطلاع على الأبحاث المنشورة.

يُدرس هذا الكتاب لطلاب كلية العلوم الطبيعية (علم الاحياء) - السنة الثالثة- فرع حيوية كيميائية . وقد أوردنا فيه تعريفاً بأنواع المجاهر المتنوعة ابتداءً من المجهر الضوئي البسيط، وانتهاءً بالمجهر الالكتروني، ومن ثم انتقلنا إلى تعرف الأدوات والأجهزة والمواد المتنوعة المستخدمة في مخابر كيمياء النسيج، التي تمكّن الطالب من إعداد المحاضرات النسيجية عموماً، ابتداءً بالتثبيت وانتهاءً بالتلوين والستر. بحيث يتمكن الطالب أو الباحث من الحصول على مقاطع نسيجية متسلسلة، وهي رقيقة و دقيقة جداً، ويمكن حفظها لسنوات دون أن يطرأ عليها أي تبدل، كما يمكن تصويرها ونشرها. ويتعلم أيضاً تقانة الكشف الكيميائي النسيجي لمركبات موجودة ضمن الخلية الحية سواء أكانت حيوانية أم نباتية، وذكرنا طرائق مختلفة ومتنوعة من العمل المخبري ونتائج كل طريقة.

كما توخينا في عرضنا الدقة والتبسيط، بحيث يتوصل الطالب والباحث إلى نتائج مرضية وجيدة، بعد أن زدنا الكتاب بصور ملونة توضح تلك النتائج، ويستفيد منها عند دراسته للمقاطع التي قام بتحضيرها. فضلاً عن ملاحق للمركبات الكيميائية وصيغها المستخدمة في التجارب المخبرية. آمليين من الله أن نكون قد وفقنا بعملنا هذا بما فيه رفعة هذا الوطن وسموه، وأن نكون قد قدمنا لطلابنا الأعزاء كل فائدة وعون للنهوض بمسيرة العلم في بلدنا الحبيب سورية.

وأخيراً لآبد من التنويه لطلابنا الأعزاء بأنه للحصول على نتائج مرضية وإيجابية في العمل المخبري: لآبد من الالتزام بتوجيهات الأستاذ المشرف، وقراءة التعليمات العملية قبل الدخول إلى الجلسة العملية، والالتزام بالهدوء و دقة العمل. إن أي خطأ في مراحل العمل لايمكن كشفه إلا بعد الوصول إلى نهايته، وعندئذ يكون الوقت المحدد قد فات ولا يمكن التراجع، ويجب إعادة العمل من بدايته، وهذا لا يتناسب مع الزمن المخصص للجلسة العملية .

المؤلفون

الدكتورة هيفاء قاسم

مديرة الاعمال: وفاء عبدالله الهريسي

المشرفة على الأعمال: عبيرة معلا



المجاهر المستعملة في الدراسات النسيجية

جهاز التكبير عبارة عن أداة علمية لها القدرة على تكبير العينات الصغيرة جداً وبالذات التي تستحيل رؤيتها بالعين المجردة وتوضيحها، مثل الخلايا الحيوانية أو النباتية. ويعتمد جهاز التكبير في المقام الأول على الاستفادة من خاصية العدسات ومقدرتها على تكبير الأجسام إذ لا يخلو أي جهاز تكبير من وجود عدسة واحدة أو أكثر سواء كانت زجاجية أو كهرومغناطيسية كما هي الحال في المجهر الإلكتروني.

إن أجهزة التكبير عديدة وتعرف باسم المكبرات (Magnifier) أو المجاهر (Microscopes)، وتتفاوت فيما بينها من حيث الصنع لكن الوظيفة واحدة وهي المساعدة على تكبير الأجسام والعينات الصغيرة ومن ثم تعرفها.

وسنتعرف في هذا الفصل على أنواع المجاهر وكيفية استعمالها في الدراسات النسيجية، ونذكر منها :

- المجاهر الضوئية البسيطة.
- المجاهر الضوئية المركبة.
- المجهر الإلكتروني.

أولاً - المجاهر الضوئية البسيطة

تُعرف المجاهر الضوئية البسيطة باسم المكبرة ، ويعتمد هذا النمط من المكبرات على مصدر ضوئي طبيعي أو كهربائي. توجد عدة أنواع من هذا النمط تختلف من حيث التصميم ولكنها جميعاً تشترك في صفة أساسية واحدة وهي أن لها عدسة محدبة الوجهين. أما قوة تكبيرها فتكون في العادة محدودة، وتتراوح بين 5 و 25 مرة.

يوجد منها أنواع عديدة متباينة من حيث الشكل وكيفية الصنع لكنها تجمع صفة أساسية واحدة وهي أنها تملك عدسة محدبة واحدة فقط (شكل 1). من أشهر المجاهر البسيطة المستعملة في الحياة اليومية ما يلي:

1- مجهر ليفينهوك Leeuwenhoek microscope

2- عدسة الساعاتي Watch-maker len

3- عدسة الجيب Pocket lens

4- عدسة اليد Hand lens

5- عدسة الطاولة Table lens

6- المصباح المكبر Touch-magnifier.



شكل 1 : نماذج مختلفة لمجاهر بسيطة (مكبرات)

ثانياً- المجاهر الضوئية المركبة

يُعد هذا النمط من المجاهر أكثر تعقيداً من المجاهر البسيطة من حيث الصنع، كما يمتاز بقوة تكبير أعلى. وتتباين المجاهر الضوئية المركبة فيما بينها كثيراً من حيث الصنع، لكنها جميعاً تشترك في صفة جوهرية واحدة وهي أن لها جهازاً بصرياً كبيراً مكوناً من نوعين من العدسات: النوع الأول منها يعرف باسم العدسات الجسمية وهي التي تكون دوماً بالقرب من الشيء المراد فحصه. أما النوع الثاني من العدسات فيعرف بالعدسات العينية وهي التي تنظر العين من خلالها. نذكر من أنواع المجاهر المركبة ما يأتي:

1- المجهر مضيء الحقل Bright-field microscope أوالمجهر المركب Compound microscope

2- المجهر مظلم الحقل Dark-field microscope

3- المجهر المتباين الطور phase-contrast microscope

4- المجهر المتألق Fluorescence microscope

5- المجهر المقلوب Inverted microscope

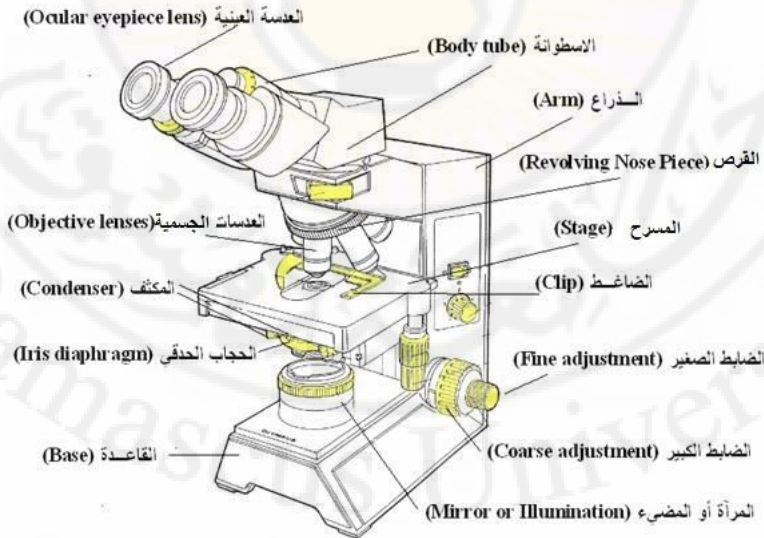
6- المجهر متداخل الضوء Interference light microscope.

سنذكر بشيء من التفصيل تركيب المجهر المركب أو ما يعرف أحياناً بالمجهر المضيء الحقل، فهذا النوع من المجاهر بمنزلة المثال النموذجي للمجاهر بشكل عام، والأكثر استعمالاً.

- المجهر المركب أو (مضيء الحقل):

يتركب من عدة اجزاء (شكل 2) هي:

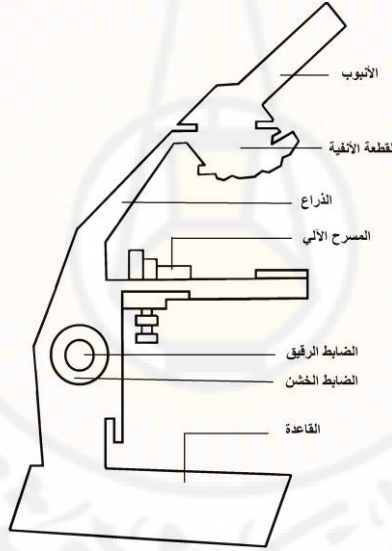
- جهاز الحمل والتحرك.
- جهاز التكبير.
- جهاز الاضاءة.



شكل 2: اجزاء المجهر المركب.

• جهاز الحمل والتحرك:

يتركب من قاعدة المجهر ومن حامل أو ذراع يشبه حرف (C)، ويتصل به من المنتصف صفيحة مربعة أو دائرية تعرف باسم المسرح . ويوجد في منتصفه ثقب يسمح للأشعة الضوئية بالمرور من خلاله، كما يتصل بالذراع في نهايته العلوية قطعة معدنية مستديرة قابلة للدوران تعرف بالقطعة الأنفية، والتي بدورها تحمل أنبوباً واحداً أو أكثر يحمل في أعلاه العدسات العينية. كما يوجد على الذراع ضوابط التحريك ويتم بواسطتها التحكم في رفع مسرح المجهر أو خفضه بشكل سريع من خلال تحريك الضابط الخشن. أما المسرح فهو تلك القطعة التي توضع عليها الشريحة المجهرية المراد فحصها، وتمتاز باحتوائها على جهاز آلي محرك يُحرّك بواسطته الشريحة وبشكل دقيق (للأمام والخلف ولليمين واليسار) مثل هذا المسرح المحرك يعرف بالمسرح الآلي. (شكل 3).



شكل 3 : جهاز الحمل والتحرك في المجهر الضوئي المركب

• جهاز التكبير:

- يتكون من نوعين من العدسات الزجاجية المكبرة :
العدسات العينية: وهي التي تنتظر العين من خلالها، وتتوضع في نهاية أنبوب قصير طوله حوالي 4 سم وقطره حوالي 5,2 سم ويعرف بأنبوب العدسة العينية ، كما يوجد حاجز داخلي في وسط أنبوب العدسة العينية ذو فتحة مركزية تحدد من

مجال رؤية الحقل ويبلغ قطره حوالي 8 مم ويعرف باسم الحجاب الحقلي . و يوجد أيضاً عند قمة هذا الأنبوب عدسة صغيرة محدبة مستوية هي عدسة العين وعند نهاية الأنبوب توجد عدسة أخرى محدبة مستوية تعرف بعدسة الحقل (شكل 4).



شكل 4: انواع العدسات العينية

- العدسات الجسمية: هي العدسات التي تكون قريبة من الجسم المراد فحصه، وتوجد مثبتة على القطعة الأنفية للمجهر. وهي عبارة عن أنابيب تتفاوت كثيراً فيما بينها من حيث الطول وقوة التكبير.

تصنف العدسات الجسمية إلى ثلاثة أنواع:

- ❖ عدسات منخفضة التكبير وتتراوح قوة تكبيرها من 2 إلى 10 مرات .
- ❖ عدسات عالية التكبير و تتفاوت قوة تكبيرها بين 40 إلى 80 مرة .
- ❖ العدسات الزيتية وتتراوح قوة تكبيرها من 60 إلى 100مرة.

من الجدير بالملاحظة أن العدسات الجسمية كلما زادت قوة تكبيرها صغرت عدساتها، وارتفعت جودتها، وزاد طولها وارتفع سعرها، وكذلك زاد الرقم العددي المكتوب عليها، وقصرت المسافة بين عدساتها الأمامية والعينة المدروسة. كما أن الوظيفة الأساسية للعدسة الجسمية هي تكوين صورة خيالية وسطية مكبرة للجسم المدروس والتي بدورها تكبر مرة ثانية بواسطة العدسات العينية لتتكون لها صورة نهائية مكبرة (شكل 5).



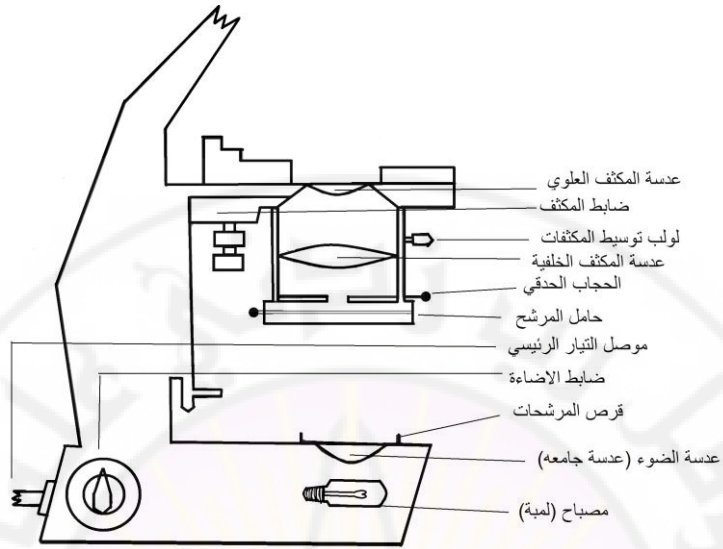
شكل 5: أنواع العدسات الجسمية.

تُعد العدسة الجسمية من أهم مكونات المجهر نظراً أنها المسؤولة عن تكوين الصورة الأولية للجسم (الشيء)، فلها القدرة على تحليل تفاصيله الدقيقة وكذلك تكبير هذا الجسم. تُعرف العدسات الجسمية شائعة الاستعمال بالعدسات اللالونية (Achromats) وتتمتاز هذه العدسات بأن الزيغ اللوني معدل عن طريق جمع الأشعة الحمراء والزرقاء في بؤرة واحدة. ويعطى هذا لوناً باهتاً كطيف ثانوي (أخضر تفاحي شاحب) يمكن رؤيته حول حواف العينة ما يجعل عملية التباين أكثر وضوحاً.

• جهاز الإضاءة:

ويشمل مصباح الاضاءة والمكثف .

كانت إضاءة المجهر الضوئي سابقاً تعتمد على ضوء الشمس أو لهب الشموع أو مصباح كهربائي خارجي وتعكس الأشعة بواسطة مرآة توضع تحت العينة المراد فحصها، أما اليوم فمعظم المجاهر الحديثة تحتوي على مصدر إضاءة داخلي مزود بعدسات جامعة يوجد عادة في قاعدة المجهر، وهذا يضمن عدم تشتت أشعة الضوء مما يسهل العمل المجهرية. كما أن جهاز الإضاءة مزود بالحجاب الحديقي الذي يتحكم بحزمة الأشعة الضوئية الصادرة من المصباح الكهربائي ويحصرها، فيزيد هذا من تباين الصورة عند اختزال شدة الوهج . وبشكل مختصر فإن مصدر الإضاءة عبارة عن مصباح (لمبة) يوجد في قاعدة المجهر ويزود بالتيار الكهربائي من خلال موصل التيار الرئيسي، وله ضابط للتحكم بشدة الضوء . تركز الأشعة الضوئية المنبعثة من المصباح الكهربائي للمجهر باتجاه المكثف بواسطة عدسة أو منشور خاص تقع فوق المصباح مباشرة وتعرف بعدسة الضوء . ويمكن التحكم بكمية الإشعاعات المنبعثة من المصباح بواسطة الحجاب الحديقي والمثبت فوق عدسة الضوء. كما يوجد قرص صغير يحيط بعدسة الضوء يوضع به مرشحات الضوء الملونة والمرغوب بها والذي يعرف بقرص المرشحات (شكل6).



شكل 6: جهاز الاضاءة في المجهر المركب

ومهما كان نوع الإضاءة المستعملة فلا بد من استخدام ما يعرف بالمكثف تحت المسرحي. وظيفته الرئيسية هي تكثيف الأشعة الضوئية بشكل مركز على العينة المراد فحصها وضمان الحصول على مخروط ضوئي يتناسب مع الفتحة العددية للعدسة الجسمية للمجهر. يزود المكثف بحجاب حدقي من السهل التحكم في قطر فتحته الحدقية، وذلك عند الرغبة في تحديد مساحة الحقل المضاء بشكل دقيق.

- المجهر مظلم الحقل:

إن المجهر مظلم الحقل (شكل 7)، لديه القدرة على إعطاء صور على مستوى عال من التباين سواء كانت لعينات حية أو ميتة غير مصبوغة، لكن بشرط أن يكون هناك تناقص ملحوظ في معامل الانكسار بينها وبين بيئة التحميل المحيطة بها، أو بمعنى آخر تبدو الصورة براقة في وسط حقل مظلم تماماً، بينما معظم المجاهر تعطي صوراً معتمة في وسط حقل مظلم

مضىء.

كما هو معروف، إن تشكل الصورة المجهرية يعزى إلى دخول كل من الضوء المباشر والضوء المنحرف الصادر من العينة إلى العدسة الجسمية، إذ تعطى تفاصيل واضحة المعالم لهذه العينة. لكن إذا استبعدنا الضوء المباشر بأكمله من المساهمة في تشكيل الصورة المجهرية بمنعه

من الدخول إلى العدسة الجسمية، فإننا نستطيع أن نحصل على صورة كاملة التفاصيل، لكن بتباين معاكس. ولو منعنا الضوء المنحرف من الوصول إلى العدسة الجسمية، فإننا في هذه الحالة لا نحصل على الصورة المجهرية إطلاقاً. ولكي تتم عملية منع الضوء المباشر من الوصول إلى العدسة الجسمية، توضع حلقة مركزية في المستوى البؤري للمكثف، ووظيفة هذه الحلقة تكوين مخروطاً مجوفاً للأشعة الضوئية، وبحيث تكون فيه الأشعة الداخلية لهذا المخروط تقع خارج نطاق زاوية القبول للعدسة الجسمية. والجدير بالذكر أن مثل هذه الحلقات المركزية لا تزود بها المجاهر الضوئية العادية.



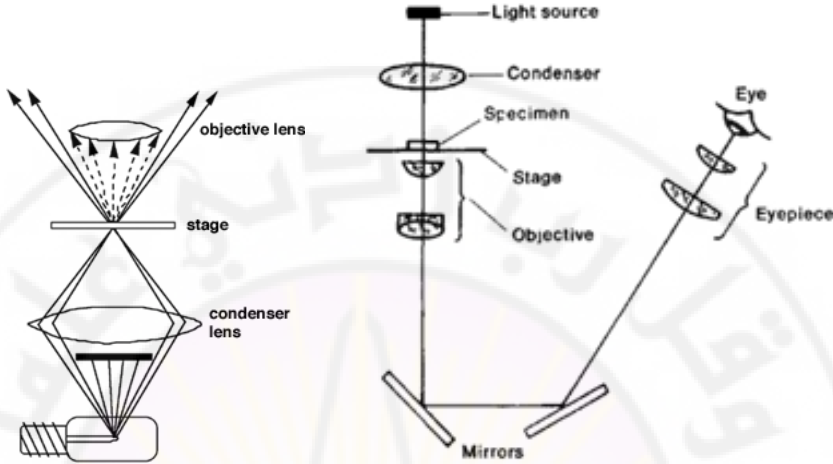
شكل 7: المجهر مظلم الحقل

ويمكن استعمال العدسة الزيتية في الدراسة بالمجهر المظلم بشرط أن تكون فتحتها العددية أصغر من فتحة المكثف، ولهذا فغالباً ما تكون العدسات الزيتية في المجاهر مظلمة الحقل تحتوي على حجاب حدقي من السهل التحكم فيه حتى نضمن دائماً أن تكون الفتحة العددية للعدسة الزيتية أصغر من الفتحة العددية للمكثف .

أما عن المكثف المستخدم في المجهر مظلم الحقل فيعرف باسم الكارديويد (Cardioid) وهو عبارة عن مكثف سطوحه مرآيا عاكسة مقعرة ومرآيا عاكسة محدبة، ويمرر أشعة ضوئية شديدة الانحراف. وكما هو معروف، أن العينة المدروسة يجب أن تكون في بؤرة المخروط الضوئي. ويعني هذا ضرورة التركيز الصحيح للمكثف ووضعه مركزياً مع المحور البصري للمجهر. كما يجب الإدراك بأن سمك الشريحة المجهرية أمر جوهري، فالشريحة السمكية تحول دون تركيز المكثف بالشكل الدقيق (شكل 8).

إن استخدام المجهر مظلم الحقل يناسب دراسة عينات الكائنات المائية مثل الأوليات والجوفمغويات الصغيرة. كما يؤدي دوراً بارزاً عند الرغبة في دراسة طبيعة حركة الأهداب

وكيفية عملها في الحيوانات الهيدبية ويفيد في دراسة الدم الطازج. (صورة مجهرية في الملحق الملون، فيها هياكل الشعاعيات كما تبدو في المجهر مظلم الحقل).



شكل 8 : مخطط سير الاشعة في المجهر مظلم الحقل.

- المجهر المتباين الطور:

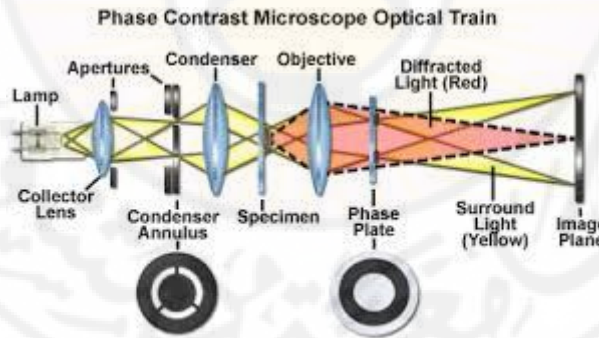
يرجع الفضل الأول في اكتشاف هذا النوع من المجاهر إلى العالم زرنيك (Zernike). لاحظ أن العينة الملونة تؤثر في مسار الضوء المار بها، لأن الأصباغ تقوم بامتصاص بعض الأشعة الضوئية وهذا يسبب تبايناً بين معامل انكسار العينة وبيئة التحميل وسمك العينة ذاتها، فينتج عن ذلك تغيير في السعة الضوئية. ولا تستطيع عين الإنسان أن تحس بالتغير الذي يحدث لطور موجات الضوء، ولهذا فالعينات التي تحدث مثل هذا التغير عند استخدام المجاهر الضوئية تحتاج إلى استعمال عدسات إضافية لكي تغير في السعة الضوئية، وهذا ما يقوم به مجهر الطيف المتباين (شكل 9).

وكما هو معروف، أن الصورة التي يكونها المجهر للعينة المدروسة تتشكل نتيجة تداخل الضوء المباشر مع الضوء المنحرف بسبب تلك العينة. في العينات المصبوغة يكون الاختلاف في الطور بين الشعاع المباشر والشعاع المنحرف وبزاوية مقدارها 180° ، لهذا ينتج اختزال للسعة الضوئية، التي بدورها تؤدي إلى حدوث التباين الضروري لرؤية العينة. لكن لو تصورنا أن العينة شفافة، عندئذ لن ينتج لدينا تغير في السعة الضوئية، لذا لا ينتج لدينا التباين الكافي للصورة المجهرية الشفافة، وبالإمكان عكس مظهر الصورة المجهرية بحيث تصبح أكثر بريقاً من الحقل المجهرى، لو أعقنا الضوء المباشر مع المحافظة على الشعاع المنحرف، وهذا ما يعرف

بطور التباين. إن عملية التحكم في طبيعة الإضاءة تتم بتعديلات بصرية تجري في مجهر الطور المتباين وذلك بإدخال ما يعرف بصحيفة الطور (Phase plate) التي توضع خلف المستوى البؤري للعدسة الجسمية. وهي عبارة عن قرص من الزجاج به تجويف دائري، كما يتم الحصول على الضوء من خلال مكثف تحت مسرحي مزود بحجاب حلقي (شكل 10). (مقطع في ساق نباتي كما يبدو في المجهر متباين الطور الملون).



شكل 9 : المجهر متباين الطور.



شكل 10: مخطط سير الأشعة في المجهر المتباين الطور.

- المجهر المتألق:

عُرف منذ زمن بعيد أن بعض المواد لها خاصية امتصاص الموجات الضوئية القصيرة مثل ألوان الطيف الأزرق والبنفسجي أو فوق البنفسجي ما يتسبب في تهيج تلك المواد وإطلاق طاقة ضوئية ذات موجة طويلة. إذا كان إطلاق مثل هذه الموجات الضوئية طويلة الموجة يستمر

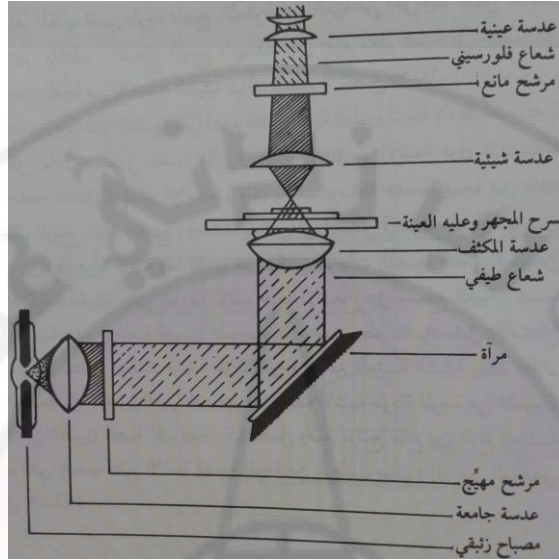
خلال عملية تهيج المادة فقط، فإن هذه الظاهرة تعرف باسم الإضاءة المتألقة (Fluorescence)، أما إذا استمرت الموجات الطويلة بعد توقف عملية التهيج ولو لفترة زمنية قصيرة فتمثل هذه الظاهرة من الإضاءة تعرف باسم الإضاءة الفسفورية (Phosphorescence). والمجهر المتألق عبارة عن مجهر عادي لكن الإضاءة فيه تتم إما بوساطة الضوء النافذ، أو بوساطة الضوء الساقط كما في المجاهر الحديثة. يستعمل الحقل المظلم عند الفحص بالمجهر الفلورسيني. (شكل 11).



شكل 11 : المجهر المتألق.

يتركب المجهر المتألق النفاذ من مصباح يطلق أشعة الطيف المعروفة، وغالباً ما يحتوي هذا المصباح على قوس زئبقي شديد الإضاءة. ويقوم المرشح الموجود أمام المصباح بتحديد الشعاع ذي الموجة القصيرة المطلوب إمرارها فقط، وهذا الشعاع يتم عكسه باتجاه مكثف المجهر بوساطة المرآة العاكسة الذي بدوره يركز الشعاع على العينة المصبوغة التي لها القدرة على امتصاص مثل هذا الشعاع، تنتهيج وتصدر نوعاً آخر من الإشعاع طويل الموجة الذي يمر خلال العدسة الجسمية، فالعدسة العينية للمجهر ما يؤدي إلى رؤية صورة العينة البراقة. ونظراً إلى أن كمية من الشعاع قصير الموجة قد تمر من خلال العينة إلى عدسات المجهر، وكما هو معروف أن مثل هذا الشعاع لا يرى بالعين، ولكنه يؤثر فيها. لذلك يتوجب وضع مرشح مانع بين العدسة الجسمية والعدسة العينية للمجهر لكي يمنع مرور الشعاع قصير الموجة لكنه في

الوقت نفسه يسمح للشعاع طويل الموجة بالمرور، وهذا بالطبع يضمن سلامة عين الفاحص (شكل 12).

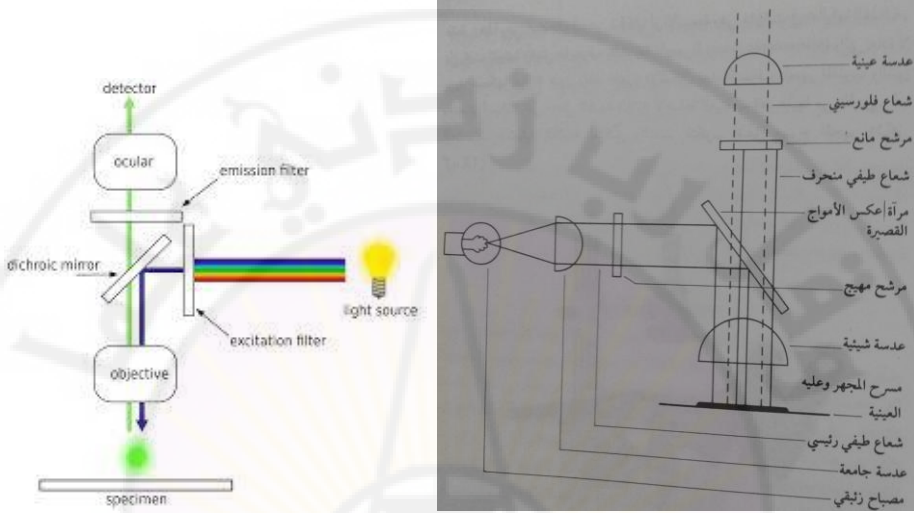


شكل 12: الجهاز البصري في المجهر المتألق ذي الشعاع النافذ .

بدأ التركيز حديثاً على استعمال نوع جديد من المجاهر المتألقة تعتمد في إضاءتها على الضوء الساقط بدلاً من الضوء النافذ (شكل 13). و يسمح هذا النوع من المجاهر للضوء قصير الموجة المهيج بالسقوط على العينة من الأعلى، ولذا تعمل العدسة الجسمية محل المكثف. ولا يسقط الشعاع المهيج على جميع معالم العينة بل يقتصر على إضاءة الجزء المفحوص بالعدسة الجسمية كما أن التهيج يحصل للأجزاء السطحية، وهذا يضمن زيادة تألق الصورة نظراً إلى عدم فقدان كمية الفلورة نتيجة لامتناس العينة لها بشكل عام.

يستعمل الضوء الأزرق أو الأشعة فوق البنفسجية مصدراً للإضاءة، ويكثف بالمرشح المولد (المهيج) وبعدها يعكس إلى الأسفل في مركز المحور البصري للمجهر بواسطة مرآة خاصة (لها القدرة على عكس الموجات القصيرة فقط)، ليمر من خلال العدسة الجسمية التي بدورها تكثف حزمة الإشعاع على سطح العينة. وعندما تمتص العينة هذه الأشعة قصيرة الموجة التي تهيج بعض المواد مثل الملونات المتألقة، تنطلق موجات ضوئية طويلة الموجة تمر عبر العدسة الجسمية، وتتخذ خلال المرآة العاكسة إلى العدسة العينية للمجهر، و هذه الأشعة طويلة الموجة

هي المسؤولة عن تكوين الصورة للعينة المدروسة. كما يفضل وضع مانع بين المرآة العاكسة والعينة لكي يحجب جميع الأشعة قصيرة الموجة من الوصول مباشرة إلى عين الفاحص .



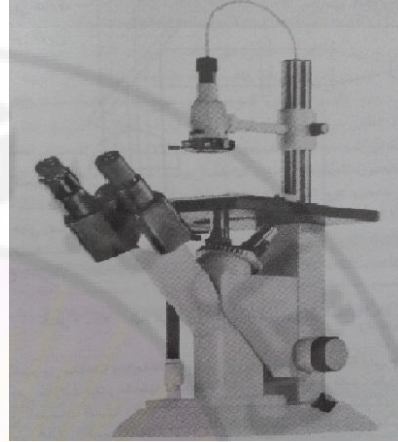
الشكل 13: الجهاز البصري في المجهر المتألق ذي الشعاع الساقط.

أخيراً يؤدي المجهر المتألق دوراً مهماً في دراسات و الكروموسومات الخلوية وتصنيفها، وتفسير ما يحدث من تغيرات غير طبيعية في كروموسومات الخلية، كما يسهم بدور بارز في دراسة الأجسام المضادة والخلايا السرطانية (لاحظ في الملحق الملون مقطعاً في نسيج عصبي، يوضح خلية بوركنج العصبية كما تبدو في المجهر المتألق).

- المجهر المقلوب:

يُعد مجهراً ضوئياً اعتيادياً لكنه مصمم بشكل خاص ليؤدي أغراضاً خاصة. نجد أن هذا النوع من المجاهر يناسب دراسة الخلايا والنسج المزروعة وهي مازالت في أطباق ودوارق الزراعة. فلقد قدم هذا المجهر خدمة جليلة إلى المهتمين بعلم الحياة إذ مكنهم من مشاهدة ومتابعة ما يحدث من تطورات وتغيرات للخلية وهي مازالت حية، بل وهي مازالت تباشر نشاطها الحيوي كالإنقسام أو التغذية أو النمو. ويعتمد أساساً على جعل الضوء اللازم لإضاءة العينة يسقط عليها من الأعلى ويمكن التحكم بزيادة الإضاءة حسب الحاجة، أما العدسات الجسمية اللازمة للتكبير والتمييز فتكون أسفل مسرح المجهر (شكل 14).

إن للمجهر المقلوب أهمية بالغة في العصر الحديث من أجل عملية التصوير المستمر، وهذا بالطبع يمكننا من رؤية دراسة ما يجري داخل الخلية الحية من نشاطات حيوية.



شكل 14: المجهر الضوئي المقلوب.

- المجهر متداخل الضوء:

يشبه إلى حد كبير المجهر متباين الطور لكنه يستطيع أن يوضح الموجات الضوئية التي حصل لها إعاقة نسبية بعد مرورها من خلال العينة الشفافة. وفي الحقيقة يستخدم المجهر متداخل الضوء (شكل 15)، في قياس مقدار الإعاقة الضوئية التي بدورها تُستغل في الدراسات الكمية أكثر من دراسات المشاهدة. فعند معرفة سمك العينة المدروسة كالخلية أو أعضياتها مثل النواة أو الجسم النسيجي، ومعامل انكسار المادة المحيطة بالعينة فإنه بالإمكان حساب معامل انكسار العينة وبالتالي يمكن تقدير تركيز الأجسام الصلبة بها ووزنها الجاف. كما يمكن استخدام هذا النوع من المجاهر لدراسة العينات على مستواها الخلوي أو النسيجي، لذا يسميه العلماء الميزان الدقيق لعلماء الأحياء. (يبدو في الملحق الملون، صورة مجهرية توضح عملية الإنقسام الخلوي كما تبدو في المجهر متداخل الضوء) .

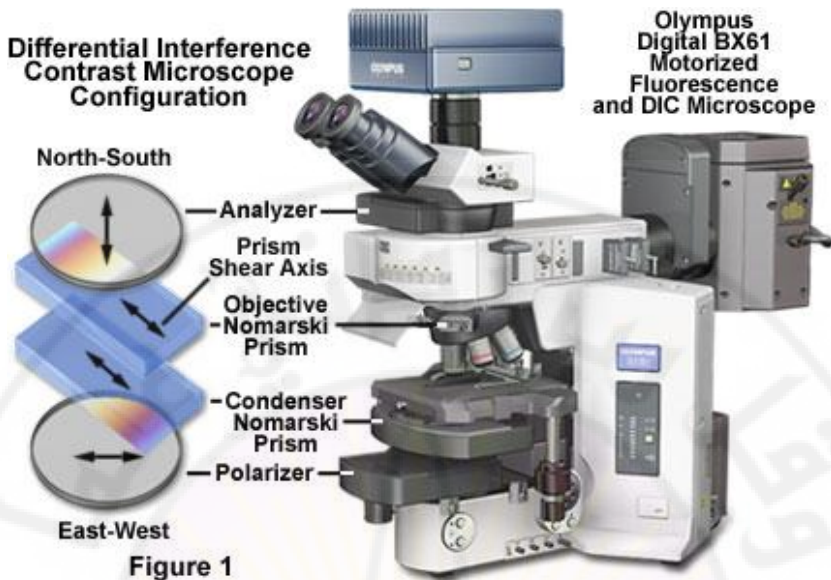


Figure 1

الشكل 15: المجهر متداخل الضوء.

إن أبرز خدمات هذا المجهر تتركز في استخدامه لتقدير كمية الوزن الجاف (الكتلة الجافة) للخلايا، فمن المعروف أن معامل انكسار الخلية يرتبط مباشرة مع تركيز محتوياتها الصلبة، وأن التغير في الطيف الضوئي نتيجة مروره خلال الخلايا يرتبط بمعامل انكسار وسمك الخلية ذاتها. فلو عرفنا معامل الانكسار وكذلك سمك الخلية فبالاستطاعة حساب تركيز الأجسام الصلبة (الكتلة الجافة) في داخل الخلية من المعادلة الآتية :

$$ك = \frac{\Delta \times 100}{\theta}$$

حيث (ك) الكتلة الجافة للخلية

(أ) مساحة الخلية

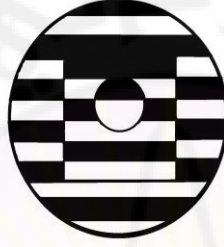
(θ) مقدار التغير في الطيف (Phase change)

(ث) ثابت يعادل (0.0018).

يُظهر في حقل الرؤية للمجهر (شكل 16)، أشربة سوداء متوازية وبعد مرور شعاع الضوء من العينة يحدث تغيير جانبي لعدد من الأشربة السوداء ويمكن قياس هذا التغيير في الأشربة السوداء ومنها يمكن حساب مقدار التغير الطيفي الذي نتج عن العينة.



أ - قبل وضع العينة



ب - بعد وضع العينة

شكل 16: حقل الرؤيا في المجهر متداخل الضوء.

ثالثاً: المجهر الإلكتروني

يُعد اختراع المجهر الإلكتروني الذي تصل قوة تكبيره العالية ليس فقط لفحص الكائنات الحية الدقيقة بل إلى امكانيه مشاهدة أدق التفاصيل الدقيقة بها، إنجازاً كبيراً في مجال الدراسات الخلوية. تستخدم في المجهر الإلكتروني الإلكترونات مصدراً للإضاءة بدلاً من الضوء الكهربائي، ورؤود بعدسات كهرومغناطيسية- تعمل على تركيز الشعاع الإلكتروني- للحصول على تكبيرات عالية تصل إلى مئات آلاف المرات. ويوضح الجدول الآتي أهم الفروق بين المجهر الإلكتروني والمجهر الضوئي:

المجهر الإلكتروني	المجهر الضوئي	
فتيلة التيجستين	المصباح الكهربائي	مصدر الإضاءة
كهرومغناطيسية	زجاجية	نوع العدسات

العدسات	العدسة العينية العدسة الجسمية العدسة المكثفة	العدسة الجسمية العدسة المكثفة العدسة المتوسطة العدسة العارضة
تغيير التكبير	تحريك العدسة الجسمية	تغيير التيار المار بالمجال الكهرومغناطيسي للعدسة الجسمية و المتوسطة
ضبط البعد البؤري	تغيير المسافة بين العدسة الجسمية والعينية	تغيير شدة التيار الكهربائي المار بالعدسة الكهرومغناطيسية

وتوجد 3 أنواع رئيسية (تبعاً لتفاعل الشعاع الالكتروني مع العينة) :

- 1-المجهر الالكتروني النافذ (TEM): وهو يتميز بإعطاء صورة من بعدين طولي وعرضي، نتيجة لنافذ الشعاع الالكتروني داخل المقاطع الرقيقة من النسيج أو الخلايا.
- 2-المجهر الالكتروني الماسح (SEM): وهو يعطي صورة ثلاثية الأبعاد، نتيجة مسح سطحي و خارجي شامل للأنسجة أو الخلايا.
- 3-المجهر الالكتروني الماسح النافذ (STEM): وهو يقدم صورة ثلاثية الأبعاد، نتيجة لقدرته على اختراق العينات الصغيرة، وبالتالي يعطي صورة تحتوي على التفاصيل الدقيقة الداخلية للعينة والخارجية أيضاً.

1- المجهر الالكتروني النافذ (TEM):

يعمل المجهر الالكتروني النافذ على المبادئ الأساسية نفسها التي يعمل عليها المجهر الضوئي، ولكنه يستخدم الإلكترونات مصدراً للإضاءة عوضاً عن الضوء المرئي. إن ما نراه بواسطة المجهر الضوئي - غالباً - محدود بالطول الموجي للضوء المرئي الذي يقدر ب 500 نانومتر، إذ أننا لا نستطيع مشاهدة الجسيمات التي تبعد عن بعضها مسافة يقل قطرها عن نصف الطول الموجي للشعاع المار خلالها . تستخدم المجاهر الإلكترونية الإلكترونية "مصدراً للإضاءة" وهي تعطي أطوال موجية أقصر بكثير من الطول الموجي للضوء المرئي، وبالتالي

تسمح برؤية أفضل ألف مرة من المجهر الضوئي. مثلاً، من الممكن دراسة التفاصيل الصغيرة في الخلايا أو مختلف المواد الصغيرة القريبة من المستوى الذري. واعتماداً على إمكانات التكبير العالي المتوفرة لديه أصبح المجهر الإلكتروني النافذ أداة قيمة سواء في الطب والبيولوجيا والعلوم البحثية. (شكل 17).



شكل 17: المجهر الإلكتروني النافذ

تحتوي جميع المجاهر الإلكترونية النافذة على نفس التراكيب الأساسية الآتية:

1. نظام الإضاءة (illumination system).
2. نظام تكوين الصورة (system imaging).
3. نظام ضبط عمل مضخات التفريغ (vacuum pump system).
4. نظام تبريد العمود (colling system).
5. نظام التقاط الصور (image recording system).
6. حامل خاص بالعينة (specimen stage).

تشتمل وحدة المجهر الإلكتروني النافذ: على الأجهزة والأدوات الآتية:

- الأجهزة:

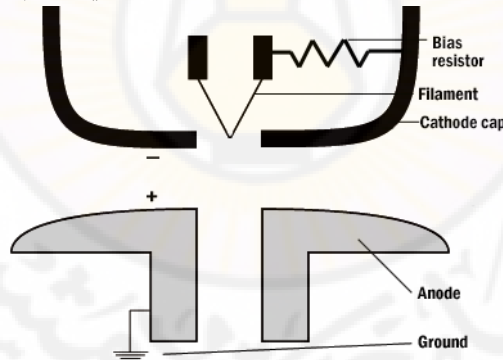
- المجهر الإلكتروني النافذ.
- جهاز المعالجة الكيميائية الأوتوماتيكية أو جهاز التدوير.
- جهاز التشذيب.
- جهاز تقطيع المقاطع الرقيقة.
- جهاز تقطيع السكاكين الزجاجية.
- جهاز إعداد القوالب.
- مجهر ضوئي ومجهر تشريحي.
- فرن كهربائي.
- جهاز التسخين الحراري.

- الأدوات:

- شبكات نحاسية
- سكين ماسية
- ملاقط حادة
- أطباق بتري
- مشارط
- شرائح زجاجية
- أوراق ترشيح
- عبوات زجاجية صغيرة
- إبر تلقیح
- قوالب خاصة بطمر العينات
- ماصات دقيقة
- قصدير
- بارافيلم (ورق مشمع)
- شمع الأسنان أو طلاء الأظافر
- قوالب خاصة بإعداد السكاكين الزجاجية
- قضبان زجاجية

كيف تتكون الصورة في المجهر الإلكتروني النافذ؟:

توجد في قمة عمود المجهر فتيلة التنغستين "مصدر الإضاءة" وتعرف بمُدفع الإلكترونات وهي موجودة في بيت الكاثود (شكل 18). تسخن الفتيلة عند مرور تيار كهربائي بها، وتتوهج وتقوم بإطلاق الكترونات تسرع بواسطة الأنود، ثم تنتقل عبر عمود المجهر - المفرغ هوائياً وذا ضغط ثابت- على شكل حزمة كحزمة الضوء. يستخدم المجهر الإلكتروني النافذ العدسات الكهرومغناطيسية لتركيز الإلكترونات الموجودة في الشعاع الإلكتروني الرفيع جداً عوضاً عن العدسات الزجاجية المركزة للضوء في المجهر الضوئي. ينتقل بعد ذلك الشعاع الإلكتروني خلال العينة المراد فحصها، واعتماداً على كثافة المواد الموجودة في العينة ترتد بعض الإلكترونات من الشعاع الإلكتروني وتختفي، بينما الإلكترونات غير المرتدة تكمل إنتقالها إلى أسفل المجهر وتعمل على تسخين الشاشة الفلوروسينية، وهذا يؤدي إلى ظهور "صورة الظل" للعينة مع أجزائها المختلفة وهي تظهر كعتامه مختلفة "درجات من اللون الأسود" اعتماداً على كثافتها. يمكن دراسة الصورة مباشرة بواسطة شاشة المجهر، أو عن طريق الصورة الملتقطة بواسطة الكاميرا الرقمية الموصولة بجهاز كمبيوتر أو المأخوذة بواسطة أفلام التصوير. (صورة مجهرية في الملحق الملون وفيها صانعة خضراء كما تبدو بالمجهر الإلكتروني النافذ).



شكل 18: رسم تخطيطي يوضح فتيلة التنغستين مصدر الإضاءة في المجهر الإلكتروني.

تحضير العينات الخاصة بالمجهر الإلكتروني النافذ:

في المجهر الإلكتروني النافذ، لا بد أن تكون العينة المراد فحصها قليلة السماكة حتى تسمح بمرور الإلكترونات خلال النسيج. توجد عدة طرق لتحضير المواد اعتماداً على الغرض من دراستها. من الممكن تقطيع مقاطع رقيقة جداً من العينة المأخوذة من قطعة من النسيج وبعد معالجتها بطرق كيميائية خاصة، تثبت إما في مادة راتنجية (بلاستيكية) قابلة للبلورة، أو يتم

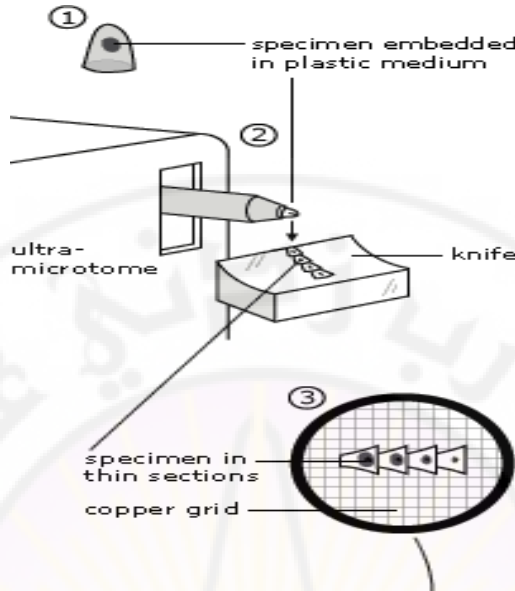
العمل عليها وهي في حالة التجمد. كما توجد طريقة مختلفة لتحضير العينة المعزولة ودراستها في محلول يحوي مثلاً الفيروسات والجزيئات الحرة بواسطة المجهر الالكتروني النافذ. ومن الممكن صبغ العينة بطرق مختلفة لتحديد تفاصيل معينة من النسيج. مثلاً، يمكن التلوين بواسطة المعادن الثقيلة مثل اليورانسيوم و الرصاص، التي لديها القدرة على عكس الإلكترونات جيداً وتحسين التباين في الصورة. نذكر مثالين لشرح بعض التفاصيل:

1- المقاطع المظورة :

تحتوي المواد البيولوجية في الغالب على كمية كبيرة من الماء. وبما أن العمل في جهاز المجهر الالكتروني النافذ يتم تحت ظروف التفريغ الهوائي، لذلك لابد من إزالة الماء من العينة (لتجنب أي خلل ناتج من وجود أقل كمية من الماء). يحفظ النسيج في مثبتات مختلفة تعمل على المحافظة على تفاصيل النسيج كما لو كان في مصدره الأصلي وذلك بتهيئة المحتوى البروتيني والجليكوجيني والدهني وغيرها من التراكيب الداخلية، ثم ينزع الماء من النسيج بواسطة الكحول (غالباً الإيثانول) أو الأسيتون بالتدرج من التراكيز المنخفضة حتى التراكيز المركزة. وبعد ذلك، تظمر العينة في مادة راتنجية (resin) قابلة للبلعمة داخل قوالب بلاستيكية خاصة، مع مراعاة توجيه العينة في قاع القالب. ثم تنقل القوالب إلى الفرن عند درجة حرارة معينة وبوقت كافٍ حتى تتصلب المادة الراتنجية. وبعد تبريد القوالب (blocks)، يصبح من الممكن تقطيعها إلى مقاطع فائقة الرقة بواسطة السكين الماسية باستخدام جهاز تقطيع المقاطع فائقة الدقة (شكل 19). ولابد أن تتراوح سماكة المقاطع بين 50-100 نانومتر. ومن ثم تحمل هذه المقاطع على شبكات نحاسية (copper grid) (شكل 20)، وتصبغ بواسطة المعادن الثقيلة وبعدها تكون جاهزة للفحص تحت الشعاع الالكتروني.



شكل 19 : يوضح العينة المظورة بالريزين والمحمولة على جهاز التقطيع فائق الدقة .



شكل 20: آلية تحميل المقاطع على شبكات نحاسية.

2- المواد المعزولة واستخدام التلوين السالب:

المواد المعزولة قد تكون محلول بكتيرياً أو محلولاً فيروسياً أو محلولاً من جزيئات معزولة، تمتد على شبكة نحاسية مغطاة بفلم دعامي خاص (مثل الشبكات النحاسية المغطاة بغشاء الفورمافار). بعد ذلك تُضاف قطرة من محلول من المعدن الثقيل - اليورانيوم مثلاً - حيث إن محلول ملح اليورانيوم لا يرتبط مع العينة وإنما يترسب حولها على الشبكة النحاسية. وسوف تظهر العينة عند فحصها بواسطة المجهر الإلكتروني النافذ مثل الصورة السالبة، إن محلول ملح اليورانيوم لا يرتبط مع العينة، وإنما يترسب حولها على الشبكة النحاسية. وسوف تظهر العينة عند فحصها بواسطة المجهر الإلكتروني النافذ مثل الصورة السالبة (negative).

تحضير عينة من نسيج حيواني لدراستها بالمجهر الإلكتروني النافذ:

- التثبيت: يتم باستعمال محلول 2.5% غلوترالدهيد أو محلول 1% رابع أكسيد الأوسميوم مدة ساعتين أو 24 ساعة في البراد .
- الغسل: يتم غسل العينة بمحلول منظم 4 مرات، مدة كل حمام ساعة واحدة، على أن تكون مدة الحمام الأخير 24 ساعة وبالبراد.

- **التجفيف:** والمقصود به سحب الماء من العينة، ويتم بحمامات عدة من الكحولات متزايدة التركيز وفق مايلي:
 -كحول 30% ثم كحول 50 % ثم كحول 70 % ثم كحول 80 % مدة كل منها 10 دقائق.
 -كحول 90% ثلاثة حمامات مدة كل منها 15 دقيقة.
 - كحول مطلق 100% ثلاثة حمامات مدة كل منها 15 دقيقة.
- **الترويق:** باستعمال الأسيتون أو أكسيد بروبالين ويتم بإجراء حمامين مدة كل منها 15 دقيقة.
- **التشريب والطرر:** يمكن إجراء 3 حمامات مدة كل منها ساعة، على أن يكون الحمام الأول مكوناً من مزيج الأسيتون والريزين بنسبة 2:1 على التوالي . ثم يكون الحمام الثاني بنسبة 1:2 على التوالي ، وأخيراً يجري الحمام الثالث من الريزين فقط .

2-المجهرالإلكتروني الماسح:

يشتمل المجهر الالكتروني الماسح على الأجزاء الأساسية الآتية (شكل 21):

1- العمود البصري الالكتروني:

يتألف من مدفع الكتروني ذي منبع من التنغستن. ويحتوي على إمكانية الضبط الميكانيكي و الإلكترومغناطيسي بشكل آلي. كما يتميز بدقة عالية جداً تتجاوز 4 نانومتر وتصل إلى 3 نانومتر في طور الضغط المرتفع. يكون العمود الالكتروني محمياً بالـ μ (الحماية من الحقول المغناطيسية) .

الميكروسكوب الالكتروني الماسح Scanning Electron Microscopes



شكل 21: المجهر الالكتروني الماسح.

2_ حجرة العينات:

مزود بحجرة كبيرة للعينات يتم تشغيلها والتعامل معها بشكل آلي بوجود ضغط عالٍ مناسب وملائم للكثير من التطبيقات. ويتحكم بالحجرة بعدة طرائق فعالة. ويوجد منصة معدة للاستخدام ووضع العينات، يتحكم بعملها آلياً بشكل كامل، وهي مزودة بمحاور للحركة والضبط ومصممة لتكون ذات قدرة كبيرة على الميلان والانحدار، كما تزود المنصة بتقانة عالية تسمح بتبديل العينة بسرعة شديدة خلال دقائق.

3- وحدة التشغيل والإظهار:

يعتمد نظام التشغيل على بيئة ويندوز وبواجهات غرافيك، مع أنظمة معالجة الصور بطرائق وآليات مختلفة تؤمن إجراء الدراسات المختلفة للعينات، مع إمكانية تخزين الصور.

4- نظام التخلية الأوتوماتيكي:

يؤمن نظام التخلية الأوتوماتيكي Automatic Vacuum system درجة عالية جداً من التخلية باستخدام مضخة تخلية خاصة (شكل 22).



شكل 22 جهاز التخلية

يرفق مع الجهاز وحدة طلاء خاصة لتحضير العينات Sputter Coater تقوم بطلي العينات بطبقة رقيقة من الذهب أو البلاتين. (انظر في الملحق الملون لصور كما تبدو في المجهر الالكتروني الماسح، وهي شكل لرأس بعوضة، وشكل آخر يوضح حبات الطلع).



الأجهزة اللازمة في التحضير المجهرى

تحتوي مختبرات التحضير المجهرى والأمراض النسيجية على مجموعة من الأجهزة التي لا يمكن الاستغناء عنها. مفضلاً عن الأجهزة الموجودة في المختبر كجهاز تقطير الماء، وجهاز قياس الأس الهيدروجيني، وجهاز قياس الحرارة، وجهاز الوزن. وجهاز الطرد المركزي والبراد، فضلاً عن الأدوات الزجاجية المختلفة الأحجام كالبياشر والدوارق والماصات وزجاجات الساعة والقضبان الزجاجية وغيرها، فإنه لا بد من وجود أجهزة تستخدم في تقطيع العينات النسيجية، فضلاً عن أجهزة شحذ سكاكين القطع، وأفران صهر الشمع، ومناضد تدفئة الشرائح وأوعية توزيع الشمع، ومعالجات النسيج الآلية وأجهزة التلوين الذاتي. في هذا الفصل سنتعامل مع معظم هذه الأجهزة عن كثب، وسنتطرق إلى بعض الأدوات المرتبطة بعمل هذه الأجهزة، ولاسيما تلك المعنية بالتقطيع.

أولاً: أجهزة التقطيع (الميكروتوم Microtomes)

تشكل أجهزة التقطيع عماد مختبر التحضير المجهرى الضوئي، ومختبر الأمراض النسيجية، وتشترك جميع أنواع أجهزة التقطيع بثلاث آليات، وهي: آلية ضبط سمك المقاطع، وآلية حمل السكين و تثبيتها، وآلية تثبيت القالب الحامل للعينة. يوجد أنواعاً عديدة من أجهزة التقطيع اليدوية، وهي:

- 1- جهاز التقطيع اليدوي Hand Microtome.
 - 2- جهاز التقطيع الدوار Rotary Microtom.
 - 3- جهاز التقطيع السيلوندي sliding microtome.
 - 4- جهاز التقطيع الدقيق Ultra-Microtome.
 - 5- جهاز التقطيع الجليدي Freezing Microtome.
- ومن الجدير بالذكر أنه طُوِّرت الأنماط المذكورة أعلاه بحيث أصبح عملها آلياً. وسنتعرف على هذه الأجهزة وآلية عملها ومدى استعمالاتها في التحضير المجهرى .

- جهاز التقطيع اليدوي:

يتكون هذا الجهاز من أسطوانة معدنية، لها قاعدة واسعة تستقر عليها، ولها منصة أفقية واسعة أيضاً تستند عليها السكين في أثناء التقطيع. ويوجد في التجويف الوسطي مكان خاص يستقبل النسيج المراد قطعه، و يثبت قائماً وموازياً للمحور الطويل لجهاز التقطيع، ويمكن إبرازه لمسافات قصيرة محددة بآلية مدرجة. (شكل 23).



شكل 23: المقطاع اليدوي، ويستخدم عادة في تقطيع النسيج النباتية .

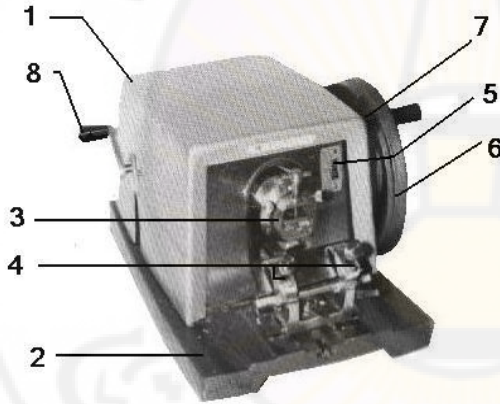
يوضع النسيج النباتي المراد قطعه غالباً داخل تجويف يُعمل في جذر نبات الجزر، أو من نخاع نبات مناسب كالبيلسان مثلاً، ليُعمل دعامةً للنسيج. ويثبت النسيج والدعامة بآلية توجد عند أسفل أسطوانة جهاز التقطيع، بحيث يبرز النسيج والدعامة مسافة صغيرة جداً فوق مستوى المنصة الأفقية. وتستند السكين إلى الحافة الخارجية للمنصة ثم تمرر بسرعة نحو المركز فتقطع مقطعاً يلتقط من سطح السكين بفرشاة رسم. هذا النوع من الميكروتومات قليل الاستعمال ويناسب دراسة المقاطع النباتية، ولا يناسب النسيج الحيوانية .

- جهاز التقطيع الدوار:

وهو من أكثر الأنواع شيوعاً، اخترع عام 1885، ويسمى بالدوار لأن جهاز الدفع فيه يُغذى بعجل دوار يوجد عند أحد جوانب الجهاز ويدار آلياً أو باليد. ويكون جهاز تغذية الدفع عادة مغطى لحمايته، و يستخدم في عمل مقاطع الشمع المتسلسلة . ويتألف من (شكل 24) :

- 1- جسم الميكروتوم ويحوي بداخله على مسننات الحركة.
- 2- قاعدة يرتكز بها على الطاولة.
- 3- حامل القالب (حامل البلوك) وهو المكان الذي يثبت فيه قالب البارافين، ويكون متحركاً.

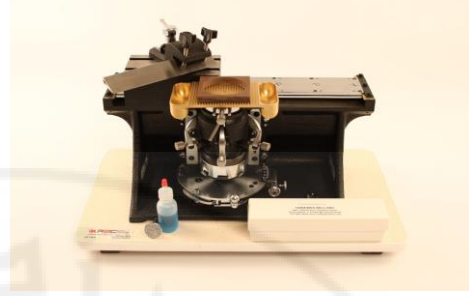
- 4- حامل السكين الذي تثبت عليه السكين، ويمكن التحكم بزاوية ميلان السكين التي تعادل تقريباً 45-60° ، وهنا تكون السكين ثابتة. ويمكن لهذا الحامل أن يتحرك على مزلاج خاص أسفل الحامل بحيث يسمح بتقريب السكين من البلوك، وإبعادها عنه.
- 5- عداد رقمي لتحديد سماكة المقطع المطلوب الحصول عليه، وهو مدرج من 0-50 ميكرونًا.
- 6- عجلة جانبية تتوضع على الجهة اليمنى تحمل مقبضاً و تدار بواسطة اليد. وكل حركة دائرية تدفع حامل القالب إلى الأمام بضعة ميكرونات تساوي عدد الميكرونات المثبتة على العداد الرقمي.
- 7- خطاف أمان يوجد على عجلة التدوير، يقوم بتنشيط حركة الميكروتوم.
- 8- ذراع جانبية على الجهة اليسرى لتقريب حامل البلوك و إبعاده.



شكل 24: جهاز التقطيع الدوار. (تسمية الأجزاء متوافقة مع أرقام النص).

- جهاز التقطيع السيلوندي:

وفيه تكون السكين متحركة، بينما يكون قالب السيلونديين ثابتاً (شكل 25). ويستخدم في تقطيع العينات التي يتطلب تحضيرها عدم استعمال طريقة الطمر بالشمع لأن حرارة انصهار الشمع، تؤثر سلباً في العينة باعتبارها عينات دراسة الأنزيمات أو دراسة المواد الدهنية . وفيه نحصل على مقاطع مفردة (غير متسلسلة).



الشكل 25: مقطع السيلونيدين.

- جهاز التقطيع الدقيق:

اخترع في نهاية الأربعينات من القرن الماضي (شكل 26)، ويتوفر في مختبرات البحث والدراسة بالمجهر الالكتروني، ويستعمل لعمل مقاطع فائقة الدقة، يتراوح سمكها بين 50 و 100 نانومتراً، ويختلف عن الأنواع التقليدية بما يأتي:

- يحتاج إلى أنواع خاصة من السكاكين (زجاج أو ماس) ليقطع قوالب الطمر الصغيرة (2×3 ملم).

- جهاز التغذية فيه يعمل آلياً أو بالتمدد الحراري، وهو مبني عادة على نظام إلكتروني. تستعمل أجهزة التقطيع من هذا النوع في البحوث التي تتعامل مع النسيج والخلايا والجراثيم والفيروسات وتلك التي تتطلب معرفة التركيب الدقيق للخلايا، وكذلك دراسة بنية الجسيمات أو الجزيئات الخلوية الكبيرة، كما يستعمل لتقطيع العينات لدراستها بالمجهر الالكتروني.



شكل 26: جهاز التقطيع فائق الدقة.

- جهاز التقطيع الجليدي (الثلجي):

ويسمى بجهاز التقطيع الإكلينيكي (شكل 27)، وهو يفيد في عمل مقاطع التشخيص المرضي في حال الحاجة السريعة إليها، وفي دراسة أنزيمات النسيج ودهونها، ولكنه لا يصلح لعمل مقاطع متسلسلة، ويستعمل لعمل مقاطع لأنسجة غير مثبتة أو مطمورة، وفيه تكون قاعدة حمل العينة متصلة بأسطوانة ثاني أكسيد الكربون أمن أجل تبريد العينة والسكين بسرعة.



شكل 27 : جهاز التقطيع الجليدي .

يتميز الميكروتوم الجليدي (الثلجي) بعدم وجود كتلة شمعية إذ استبدلت بكتلة ثلجية . ويعتمد عمل المقطاع الثلجي على أساس التبريد السريع للعينة بواسطة غاز CO_2 في سائل الطمر غير المتبلور بالبرودة أو باستخدام وحدة تبريد (شكل 28)، ويتكون جهاز التبريد من أنبوبة معدنية متصلة بأسطوانة تحتوي على غاز CO_2 ، ويفتح الطرف الآخر للأنبوبة على سائل الطمر الذي به العينة المراد تقطيعها، ويفتح ضابط الغاز يتجمد السائل وبه العينة فتتكون كتلة ثلجية صلبة من السهل قطعها. يمكن عمل قطاعات ثلجية غير مثبتة في درجة حرارة منخفضة $-45^{\circ}C$ مئوية، على ألا يزيد سمك العينة عن 3 مم.



شكل 28: المقطاع الثلجي. لاحظ وحدة التبريد (نمط متطور)

- خطوات استخدام الميكروتوم الثلجي:

- 1- نضع قطرة أو قطرتين من سائل الطمر على حامل التثليج، ثم نفتح ضابط الغاز ونغلقه بالتبادل فيتجمد السائل.
- 2- يوضع النسيج فوق السائل بشكل منظم، وتكرر نفس العملية من فتح الغاز و إغلاقه فيتجمد النسيج.
- 3- نضع قطرة أو قطرتين من سائل الطمر فوق النسيج بحيث يغطي النسيج بسائل الطمر بالكامل، وتكرر نفس العملية من فتح الغاز وإغلاقه الغاز حتى تتكون كتلة صلبة من الثلج يسهل تقطيعها.
- 4- تعمل قطاعات سمكها من 5-7 ميكرون.
- 5- توضع القطاعات في محلول فسيولوجي (0.9 كلوريد صوديوم) أو ماء مقطر في طبق بتري.
- 6- تحمل القطاعات بعد ذلك على شرائح نظيفة تكون مدهونة بزلال البيض أو الجيلاتين.

- الكريوستات (آلة القطع الثلجية):

تعد أجهزة الكريوستات من أشهر الأجهزة في تحضير القطاعات الثلجية وأكثرها فعالية في مختبرات الأنسجة المرضية.

وجهاز الكريوستات cryostat (شكل 29)، عبارة عن ميكروتوم دوار بكامل أنظمته موضوع داخل ثلاجة ويحتوى على أنظمة خاصة ودقيقة للتبريد والقطع ومنع تكون الجليد (Defrost) كما يجب استخدام سكاكين خاصة لتحضير القطاعات الثلجية لا تكون لها حافة كبيرة لأن ذلك يسبب صعوبة في النقاط القطاعات من السكين إذا كانت العينة صغيرة .

وتتميز أجهزة الكريوستات بأنها مزودة بأنظمة تسمح بضبط درجة الحرارة المطلوبة تتراوح ما بين الصفر مئوي إلى -45°C مئوية. ويلاحظ أن درجات الحرارة تختلف باختلاف نوع النسيج فمثلاً يفضل تحضير قطاعات ثلجية في عينات غير مثبتة عند درجة حرارة -15°C لكل من الطحال والكلية والخصية والكبد والدماغ والعقد اللمفاوية. في حين أن درجة الحرارة -25°C مئوية تناسب كلا من عينات الأنسجة العضلية والجلد والغدد والعظم الهش.

أما العينات المثبتة فإنه يسهل تحضير قطاعات ثلجية منها عند درجة حرارة من -10°C إلى -12°C ، كما أنه يصعب تحضير قطاعات ثلجية أقل سمكا من 8-10 ميكرون سواء كانت العينة مثبتة أو غير مثبتة.



شكل 29: الكريوستات (آلة القطع الثلجية)

- خطوات استخدام جهاز الكريوستات:

- 1- يقطع النسيج قطعا صغيرة حوالي 3 مم .
- 2- نضع قطره أوقطرتين من سائل الطمر مثل جلاتين (12%) أو محلول الجيلاتين والجلسرين، ويثبت فيه العينة أو النسيج.
- 3- يبرد النسيج حتى نصل إلى درجة الصلابة المناسبة.
- 4- يثبت الحامل داخل ميكروتوم الكريوستات ، وتضبط السكين بحيث تلامس سطح العينة.
- 5- عند ملامسة السكين لكتلة الثلج تتفصل القطع محاطة بقطعة من البلاستيك (سائل الطمر) نقوم بإزالتها .
- 6- نضع الشريحة بحيث تلامس بحذر المقطع ثم نترك في درجة حرارة الغرفة، فيزول الثلج وتبقى العينة (يمكن دهن الشرائح بالجلاتين أو زلال البيض).

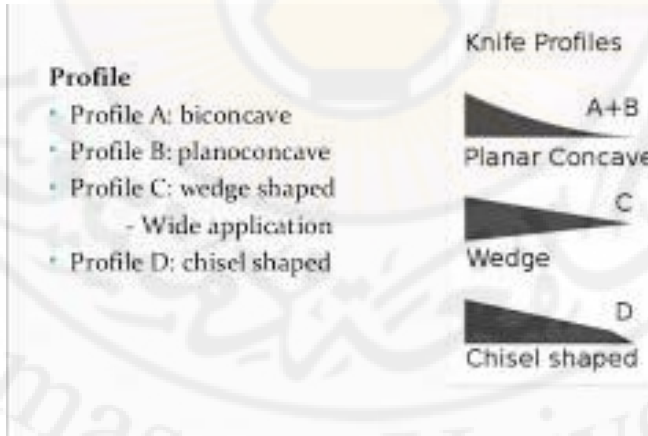
- سكاكين أجهزة التقطيع:

يعتمد إنتاج مقاطع جيدة على عدد من العوامل، لعل أهمها السكين. فبغض النظر عن تعقيد جهاز القطع أو بساطته، أو عمليات تحضير النسيج قبل القطع فالناتج سيكون مقاطع رديئة، إذا لم تكن السكين حادة.

تصنع سكاكين التقطيع من فولاذ غير قابل للصدأ ذي درجة عالية من الجودة، ويكون من الليونة بحيث يمكن شحذه لتصبح حافته بالغة الحدة، ويكون من الصلابة بحيث تقاوم تلك الحافة الحادة للاحتكاك بالنسيج المطمور فلا تتكسر.

- أنواع سكين جهاز التقطيع:

- ❖ ذات الحافة المستوية Plane-edge type: وهي الأكثر استعمالاً، تستعمل لقطع النسيج المطمورة في قوالب البلاستيك، أو الشمع أو العينات المجمدة.
- ❖ مقعرة الوجهين Bioconcave type: تسمى أيضاً مجوفة الجانبين، وتستخدم أيضاً للقطع من قوالب الشمع.
- ❖ المقعرة المستوية Plane-concave type: تسمى أيضاً مجوفة الجانب، وتستخدم لقطع قوالب السلويدين (شكل 30).



شكل 30: أنواع سكين التقطيع.

A مقعرة الوجهين، B مستوية الوجهين، C ذات حافة مستوية، D ذات حافة مشطوفة. بالنسبة إلى التحضيرات المجهرية الإلكترونية، تصنع السكين من الماس، ويكون حدها القاطع بحدود 2-3 ملم، وهي باهظة الثمن.

- العناية بسكين التقطيع:

تنظف السكين قبل الاستعمال إما بفرشاة من شعر الجمل، أو خرقة ناعمة مغموسة بالكزاليين، ويبدأ بالتنظيف من ناحية القاعدة إلى الحافة، وليس العكس، ولعله من المفيد فحص طرف السكين تحت المكبرة، لملاحظة النتوءات والتسننات فيها، والابتعاد عنها عند قطع النسيج. وعند الانتهاء من استخدام السكين، تراعى الأمور الآتية:

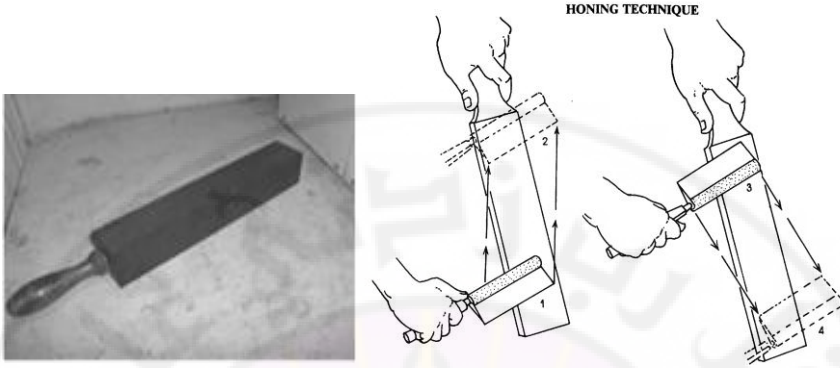
- تنظيف السكين بوسط مناسب، مثل الكزاليين وذلك باستعمال فرشاة شعر الجمل، كما أشرنا إلى ذلك مسبقاً.
- إزالة آثار الكزاليين بخرقة قماشية ناعمة.
- تجفيف السكين عند حرارة الغرفة.
- حفظ السكين في علبة خاصة بحيث يوجه الطرف الحاد إلى أسفل.

- شحذ السكين:

تغدو حواف السكين القاطعة بعد الاستعمال المستمر قليلة وغير حادة، وقد يؤدي لذلك أيضاً سوء الاستعمال، فتصبح غير صالحة، لما بها من ثلمات وتسننات. ويمكن شحذ السكين الكليّة بطريقتين إما يدوياً أو آلياً:

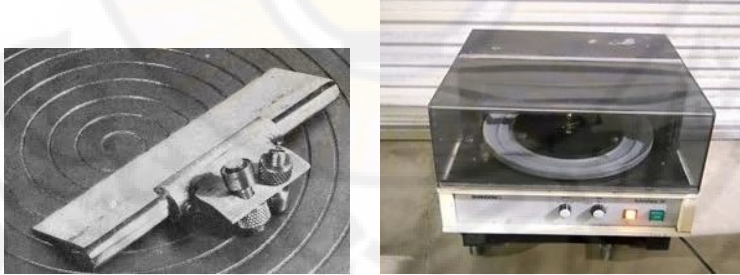
أ- السن اليدوي: تكون هذه الطريقة ضرورية عندما يصبح الحد القاطع للسكين عريضاً وبه ثلمات كثيرة. و أداة السن عبارة عن قطعة مستطيلة من مادة حاكّة، مثل كربوراند carborundum، أو لوحة من الزجاج طولها 35 سم، وعرضها 25 سم، توضع عليها المادة الحاكّة، التي هي أكسيد الألومنيوم معلقاً في الماء. ويستعمل الزيت عادة مخففاً للاحتكاك.

تستعمل في عملية السن طبقة حبيبات حك شبه متجانسة يبلغ قطرها حوالي 20 ميكرومتراً. وإذا كانت الثلمات الموجودة على حد السكين عميقة، فمن الأفضل استعمال حاك خشن ما يوفر الوقت والجهد في الشحذ، وعندما تقل الثلمات يستعمل حاك ناعم، ويكون اتجاه التجليخ كما مبين في الشكل (شكل 31). ويجب تنظيف السكين بعد كل عملية انتقال من الحاك الخشن إلى الناعم، وكذلك ينظف حجر الجليخ. ويتبع الجليخ عملية أخرى تدعى الصقل، حيث تستعمل حبيبات حك دقيقة يبلغ قطرها حوالي 5 ميكرومتر. وبعد إنتهاء عملية الصقل يدهن طرف السكين الحاد بالزيت لمنع الصدأ، وتعلق السكين في علبة خاصة، ولا تلقى على أحد جانبيها.



شكل 31: عملية السن اليدوي بالمشحذ الجلدي.

ب- شحذ السكاكين آلياً: ظلت السكاكين تشحذ لمدة طويلة على مشحذ جلدي أو على حجر السن، ولكن لصعوبة العملية واحتياج إتقانها إلى جهد كبير من قبل العاملين في التحضير المجهري استعيض عن ذلك بجهاز آلي لشحذ السكاكين الكليّة بدقّة وسرعة بحيث يكون حجر الجليخ فيه من الزجاج المسنفر، توضع عليه مادة حاكّة abrasive (شكل 32). تتوافر من هذا الجهاز أنواع عديدة: منها ما تتحرك فيه السكين على حجر السن ومنها ما تكون فيه السكين ثابتة وحجر السن متحركاً .

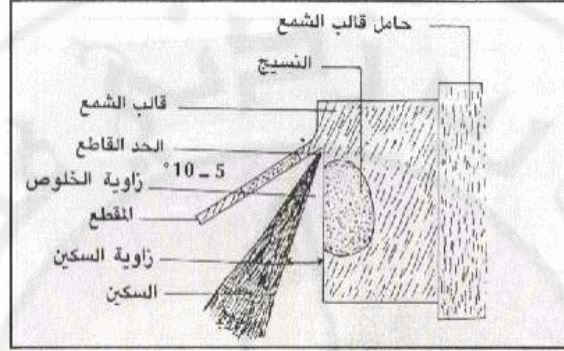


شكل 32: جهاز شحذ السكين آلياً.

- زاوية ميل السكين:

يجب تثبيت السكين في مكانها على المقطاع بشكل جيد قبل البدء بالقطع، ثم تحدد الزاوية المناسبة للعمل، بحيث يميل حد السكين، بزاوية تجعل الحد القاطع غير مواز لقلب الشمع. تسمى الزاوية التي تترك بين حد السكين القاطع، و قالب الشمع زاوية الخلوص clearance angle (شكل 33) والتي يجب أن تكون أقل ما يمكن (5-10 درجات)، لأنها إذا كانت كبيرة

فإن المقطع الناتج سيتجعد ويلتف على شكل أسطواني، وإذا كانت صغيرة فإن المقاطع ستلتصق على أعلى قالب الشمع، بدلاً من أن تنزلق على السطح الحر للسكين. يوجد على طرف مكان حامل السكين تدريجات تساعد العامل على الجهاز في تحديد زاوية ميلان السكين .



شكل 33: زاوية ميلان السكين (زاوية الخلوص)

- حامل الشفرة:

يتم حالياً استبدال السكين بشفرات خاصة للمقاطع، و تركيب على حامل خاص يسمى حامل الشفرات بدلاً من حامل السكين، ويتم التخلص من الشفرة بعد التقطيع واستبدالها بشفرة جديدة دون الحاجة إلى سنّها وصقلها (شكل 34). يوجد في الأسواق قياسات متنوعة للشفرات، ويتم الاختيار بما يتلاءم مع العينة المراد قطعها، مثلاً يحتاج قطع العظم إلى شفرة أكثر صلابة و ثخانة.

يتم تركيب حامل الشفرة مكان حامل السكين، ويراعى درجة ميلانه عن العينة المراد قطعها.



شكل 34: حامل الشفرة، وعلبة الشفرات.

ثانياً: أفران صهر الشمع

تنتج شركات عديدة أنواعاً من أفران الشمع تختلف فيما بينها في تفاصيل بسيطة، ولكن المبدأ التصميمي واحد فيها جميعاً. فهذه الأفران عبارة عن خزانات تسخن كهربائياً، ويمكن ضبط درجة حرارتها عند مدى يتراوح بين 37°C و 100°C مئوية، وذلك بواسطة ضابط يتحكم في قوة التيار الكهربائي الواصل إليها. وتحتوي جدر الفرن على مادة عازلة تعين على تثبيت درجة حرارته وأهم ما يجب التأكد منه هو ثبات درجة حرارة الفرن حول الدرجة المرغوبة التي يضبط عليها حتى لا ترتفع إلى مستوى يؤدي إلى (طبخ) العينة التي يجري تشريبها بالشمع المنصهر (شكل 35).



شكل 35: جهاز صهر الشمع (على اليمين)، ب- حاضنة (على اليسار).

ومن أنواع أفران الشمع ما هو مقسم أفقياً إلى بضع حجرات أصغر تكون لكل منها درجة حرارة تختلف عن تلك التي تليها إلى أسفل (45°C ، 50°C ، 60°C مئوية مثلاً). وميزة هذا النوع أنه يمكن إجراء مرحلة التشريب فيه بخلط الشمع ووسط الترويق في الحجرة العلوية عند درجة حرارة أقل من درجة إنصهار الشمع، وذلك قبل نقله إلى الشمع المنصهر النقي في الحجرة الوسطى أو السفلية، كما أنه يتيح إجراء عمليات تشريب متباينة باستخدام أكثر من نوع واحد من الشمع تختلف في درجة إنصهارها وذلك لتتناسب مع قساوة أو ليونة النسيج المراد طمره. وهناك أنواع من أفران الشمع يمكن إفراغها من الهواء بإيصالها بمضخة تفريغ وهي مفيدة جداً في حالة تشريب أنسجة محتوية على هواء كالرنتين مثلاً إذ يسهل تفريغ هواء هذه النسيج ليحل الشمع محله.

ثالثاً: جهاز تدفئة الشرائح

وتسمى ايضاً مجفف الشرائح وهي تستخدم في بسط المقاطع وتجفيفها على الصفيحة المجهرية وهناك عدة نماذج منها. وهي عبارة عن صفيحة من المعدن مطلية بلون أسود، وتوجد تحتها عناصر تسخين كهربائية مع منظم يعطي درجة حرارة ثابتة بحدود 35-45 °C مئوية (شكل 36).



شكل 36: جهاز تدفئة الشرائح المجهرية.

رابعاً: الأجهزة المتخصصة الآلية

لقد أمكن في العقود الأخيرة تطوير أجهزة تسهل عمل التحضيرات المجهرية على نطاق واسع بطريقة آلية ودون الحاجة إلى عدد كبير من العاملين الفنيين. وتستخدم هذه الأجهزة في المختبرات الطبية والمشافي التي يحتاج الأمر فيها إلى سرعة تحضير أعداد كبيرة من الشرائح، أو في مختبرات الشركات المتخصصة في تحضير الشرائح المجهرية الجاهزة وبيعها. وعليه فإن طالب التحضير المجهرى المبتدئ نادراً ما يستعمل هذه الأجهزة، ولكن حرصنا على ذكرها في هذا الكتاب جاء زيادة لفائدة الطالب وتوسيع مداركه في هذا المجال. وأهم هذه الأجهزة هي: معالج النسيج الآلي وجهاز التلوين الذاتي (الأوتوماتيكي).

1- معالج النسيج الآلي:

يقوم هذا الجهاز بجميع العمليات التي تجري على النسيج، بدءاً من التثبيت و حتى عملية التشريب بالشمع. والجهاز عبارة عن منضدة دائرية بها ثقب واسعة (فتحات) توضع فيها الكؤوس الممتلئة بالمحاليل المستعملة، ويوجد ماسكات خاصة لمسك هذه الكؤوس، بالإضافة إلى حمامين يوضع فيهما شمع البرافين المنصهر، ويتسع كل كأس لحوالي ليتر واحد من كل محلول (شكل 37).

توضع النسيج في سلة خاصة بها حجرات عديدة، تعلق في ذراع الجهاز الذي يقوم عن طريق آلية خاصة بتحريك سلة النسيج في المحلول صعوداً ونزولاً، وإبقائها في كل محلول المدة المقررة لها حسب برنامج محدد بساعة خاصة في أسفل الجهاز، ومن ثم نقلها إلى بقية المحلول حسب البرنامج المشار إليه، إلى أن تصل إلى حمامي الشمع لإجراء عملية التشريب في كل حمام على حدة عند درجة حرارة انصهار الشمع. أي أنه يمكن وضع برنامج الجهاز على مدى 24 ساعة وتركه ومغادرة المكان ليقوم هو بالعمل المطلوب بشكل آلياً. ويمكن التحكم في الوقت إلى ربع ساعة على الأقل في كل محلول.



شكل 37: جهاز معاملة النسيج الآلي .

2- جهاز التلوين الآلي:

يتكون هذا الجهاز من منصتين دائريتين بهما أماكن خاصة لتثبيت أحواض التلوين عليها، بحيث تحوي العدد المطلوب من هذه الأحواض، التي لا يزيد عددها على عشرين حوضاً. وللجهاز حامل شرائح خاص، به شقوق لاحتضان الشرائح منفصلة عن بعضها، ويقوم ذراع الجهاز بإجراء عملية التحريك برفع حامل الشرائح وخفضه مرات عديدة في المحاليل الموضوعة في الأحواض، حسب المدة المقررة في البرنامج المعد للجهاز، ومن ثم نقلها خلال المحاليل كلها وحسب البرنامج أيضاً، حتى تخرج الشرائح من آخر حوض مصبوعة جاهزة لوضع وسط التحميل (التغطية) عليها، ومن ثم تغطيتها بالأغطية الزجاجية المناسبة (شكل 38).



شكل 38: جهاز التلوين الآلي و يبدو فيه حامل الصفائح يدور أو ينتقل على أحواض التلوين حسب البرنامج المؤتمت.

- بعض الأجهزة الموجودة في مختبر الدراسة:

- 1- جهاز تقطير الماء Water disillator: يستخدم لتقطير المياه اللازمة في تحضير المحاليل ، وغسل العينات .
- 2- جهاز الحمام المائي water bath: الذي يتربك من حوض ماء معدني مركب على سخانة كهربائية، فيه ضابط للحرارة ومؤقت زمني، وله أحجام مختلفة.
- 3- الثلاجة Refrigerator: ضرورية لحفظ المحاليل والعينات التي يتطلب تحضيرها درجة حرارة منخفضة .
- 4- مقياس الأس الهيدروجيني pH meter: لمعايرة الأس الهيدروجيني للمحاليل .
- 5- مقياس الحرارة Thermometer: لقياس درجة حرارة المحاليل عند تحضيرها .
- 6- مؤقت زمني: لضبط الزمن اللازم للتجربة المخبرية.
- 7- ميزان عادي Balance: يستخدم للأوزان العشرية .
- 8- ميزان كهربائي Electrical balance: يستخدم للأوزان أكثر من الرقم العشري الأول
- 9- جهاز الطرد المركزي Centrifuge: يستخدم لفصل بعض عناصر الخلية عن بعضها

10- أدوات زجاجية متنوعة : كالكؤوس Beakers، والزجاجات Reagent bottles، والمصاصات Pipettes، والأقماع Funnels، والصفائح المجهرية Slides، والسواتر Cover slip.... وغيرها. (شكل 39).



شكل 39: بعض الأجهزة المستعملة في مختبر دراسة النسيج.

المثبتات Fixatives

تعتمد دراسة الخلايا على الملاحظة الحية و المباشرة، ولكن في أغلب الأحيان لا نستطيع دراستها و خصوصاً إذا اضطررنا لدراستها خلال فترات طويلة، لذلك لابد من تثبيت هذه النسيج بمثبتات خاصة ومن ثم تلوينها ودراستها بالمجهر . ومن أجل تحقيق هذا الهدف لابد من إجراء تثبيت للخلايا أو النسيج المدروسة .

يقصد بالتثبيت Fixation قتل سريع للخلايا دون أن يطرأ عليها تغيير في شكلها أو بنيتها، والمحافظة عليها قدر المستطاع بحالة أقرب ما تكون إلى الحالة الحية، ومن ثم إيقاف عمليات التفسخ decay التي تنتج عن نشاط البكتريا، وكذلك إيقاف عملية التحلل الذاتي autolysis للنسيج بفعل الأنزيمات الحالة، ومن ثم جعلها قابلة للتلوين بصورة اصطفاية، ودراستها بالمجهر .

إن عملية التثبيت مهمة في الدراسات النسيجية، ويجب أن تكون دقيقة، لأن التثبيت السيئ يعطي فكرة خاطئة عن النسيج، مثلاً قد تنتج الخلية و يزداد حجمها، أو تنكمش ويقلص حجمها، أو تتخثر المواد البروتينية ضمن السيتوبلازما، أو تتحلل بعض المكتنفات الخلوية، أو تترسب بعض العضيات ...

كما أن لسرعة انتشار المثبت ضمن الخلية دوراً كبيراً في إنجاز عملية التثبيت، فبعض المثبتات تنفذ بسرعة إلى داخل الخلية خلال دقائق أو ساعات قليلة، وبعضها الآخر يحتاج إلى أيام لينفذ إلى داخل الخلية. كما أن لدرجة حموضة المثبت أو ما يعرف بالـ pH دوراً في نفوذية الخلية للمواد.

ويعطي المثبت للعينة النسيجية صلابة معينة تساعد على إتمام العمليات اللاحقة كالغسل والتشريب بالبارافين، ومن ثم التلوين بسهولة. فإذا كانت عملية التثبيت سيئة وكان النسيج رخواً، فإن النسيج سيتمزق في أثناء عملية القطع ، ولا يعطي صورة واضحة عنه بعد تلوينه .

إن عملية التثبيت الناجحة تجعل النسيج قابلاً للقطع بشكل جيد، كما تجعل العناصر الموجودة ضمن الخلية غير قابلة للإحلال في أثناء مرحلة التلوين ولا يطرأ عليها أي تبديل .

- صفات المثبت الجيد :

- 1- أن يكون المثبت سريع النفوذ إلى العينة.
- 2- أن يحمي النسيج من الانكماش أو الانتباج في أثناء التثبيت.
- 3- أن يساعد على منع عمليات التحلل البكتيري في الخلية.
- 4- أن يعمل على تحويل المادة المراد الكشف عنها إلى مادة غير قابلة للذوبان، و يرسبها، و يمنعها من الانسياب و الانتشار من مكانها في النسيج.
- 5- أن يجعل النسيج قادراً على تحمل العمليات الآتية للتثبيت من نزع الماء و الترويق و الطمر بالبارافين والتلوين.
- 6- أن يجعل النسيج قابلاً للفحص المجهرى وعملية التباين البصري.

- أنواع المثبتات :

نظراً إلى وجود مثبتات عديدة ، فقد قسمها الباحثون إلى: مثبتات بسيطة ومثبتات مركبة .

1- مثبتات بسيطة Simple fixatives:

وهي تتركب من مادة واحدة يمكن استعمالها في التثبيت، أو يمكن أن تدخل مع مواد أخرى في تركيب المثبتات المركبة ، نذكر منها: الكحول الإيثيلي والفورمالين وحمض الخل وحمض الكروم وثنائي كرومات البوتاسيوم و كلور الزئبق (السليمانى) و رابع أكسيد الأوسميوم...وسنشرح بعضاً منها.

* الكحول الإيثيلي Ethanol:

يستعمل بتركيز مختلفة من 30% إلى 100% ، و يتنافر مع ثنائي كرومات البوتاسيوم وحمض الأوسميوم، ويخثر البروتين، ويحل الدهون المركبة، ولا يصلح لتثبيت جهاز غولجي والجسيمات الكوندرية. يسبب تصلباً للعينة إذا بقيت فيه لفترة طويلة، كما يسبب انكماشها بسبب نزع الماء منها. وهو أخف من الماء، لذلك يجب رفع العينة عن قعر الوعاء عند التثبيت.

يستعمل الكحول بتركيز 70 % منفرداً لتثبيت الحديد والكالسيوم والميوزين في الخلية، ولمدة 2-4 ساعات، ولكن غالباً ما يدخل مع مواد أخرى في المثبتات المركبة.

ويعد مثبتاً جيداً لأغراض الكيمياء النسيجية، وخاصة عند تثبيت الأنزيمات في المقاطع المجمدة، ولا يحتاج الأمر لعملية نزع الماء بعده، بل تنقل العينة مباشرة إلى الكحول المطلق.

* حمض الخل الثلجي Acetic acid:

يستعمل بتركيز 0.3 - 5 %، ويُعد مثبتاً جيداً للصبغيات، إلا أنه يخرب الجسيمات الكوندرية، ويسبب انتفاخ النسيج دون تصلبه. وهو يضاف عادة إلى المثبتات الأخرى لمعادلة الانكماش الذي تسببه هذه المواد، ولا يحتاج إلى عملية غسيل لسهولة امتزاجه مع الكحول الإيثيلي.

* ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate:

تستعمل بتركيز 1-2% وهي تتنافر مع الكحول، ولا ترسب البروتين، وتحل الكروماتين، وتثبت الجسيمات الكوندرية والليبيدات المركبة (كالدهون الفوسفاتية)، ويجب الغسل جيداً بالماء عند التثبيت بها. يمكن للقطع المثبتة بهذا المحلول تلوينها بالملونات الحمضية والقاعدية .

* حمض الكروم Acide chromique:

يستخدم بتركيز 0.5 - 2 %، وهو مؤكسد قوي، ويتنافر مع الفورمول والكحول، ويرسب كل أنواع البروتين ويجعل التلوين سهلاً بالملونات القاعدية، يجب الغسل بعده بالماء.

* الأسيتون Acyton:

يستعمل في تثبيت المقاطع المجمدة بحرارة 4°C مئوية، وفي تثبيت الأنزيمات، وهو سريع المفعول لكنه يتسبب في تجعيد النسيج، ولهذا فإن استعماله محدود، كما يمكن استعماله مع الكحول بنسبة 1 : 1 لترسيب البروتين.

2- المثبتات المركبة Compound Fixative:

وفيها تمزج بعض المواد السابقة بنسب معينة ليكون تأثيرها على النسيج بشكل أفضل. من هذه المثبتات نذكر: جندر - بوان - ليلي المعدل - كارنوي - زنكر..... إلخ (سيتم شرحها لاحقاً). وتسهل للدراسة تقسم المثبتات المركبة وفق تركيبها الكيميائي كما يأتي:

1- المثبتات الحاوية على زمرة ألدهيدية (مثبتات الفورمالين):

• الفورمالين Formalin:

اسمه الشائع فورمول، يُحضر من إذابة غاز فورم ألدهيد formaldehyde في الماء، فنحصل على تركيز 37-40% وهو ما يعادل 100%. يتعكر الفورمالين لدى حفظه لفترة طويلة، و لاسيما عند انخفاض درجة الحرارة، فيتكون راسب أبيض هو بارافورم ألدهيد، يمكن تصفيته بالترشيح.

يعمل الفورمالين على تثبيت بروتين الخلية والدهون والنسج العصبية، والعينات المجمدة، ولكنه مثبت سيئ للغليكوجين. من حسناته أنه سريع الدخول إلى النسيج، ولهذا يمكن استعماله في تثبيت قطع كبيرة. أما مساوئه فهي عدم وضوح النوى إذا بقي النسيج فيه مدة طويلة، وقد يسبب ترسيب بعض الأصبغة البنية اللون في الوسط الحمضي، وتعرف هذه الأصبغة بصبغات الفورمالين Formalin pigment ويجب التخلص منها بالغسل جيداً بمحلول الأمونيا (عدة دقائق)، أو بالماء الجاري لساعات طويلة، أو بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم 1% محضر بكحول إيثيلي 80% مدة 30 دقيقة.

ويمكن تعديل الفورمالين في الوسط الحمضي بإضافة محاليل واقية، مثل فوسفات الصوديوم أو كربونات الكالسيوم إلى الفورمالين.

إن الرائحة الواخزة للفورمالين تسبب ضرراً للجهاز التنفسي، ولذلك يجب استعماله بحذر. و للحصول على فورمالين 10% نأخذ حجماً من الفورمالين 40%، و نضيف له تسعة أضعاف من ماء الصنبور .

من المثبتات التي يدخل في تركيبها الفورمالين نذكر:

مثبت الفورمالين حسب باكر (1958) Baker : يتركب من :

concentrated formalin مركز فورمالين ml10

calcium chloride 10% كلور الكالسيوم المائية ml10

distilled water ماء مقطر ml80

يبقى لفترة طويلة، ويمكن حفظ النسيج بهذا المثبت لمدة غير محدودة. ويغسل المثبت بالماء.

مثبت الفورمالين المتعادل المنظم buffered neutral formalin fixative:

يُعد مثبت عام، ويصلح لتثبيت الكبد و الرئة و الخصية و العقد اللمفاوية. مدة التثبيت فيه 24-48 ساعة، تغسل العينة بعدها بالماء لازالة آثار الفورمالين، أو بمحلول الأمونيا. و يتركب من:

concentrated formalin	فورمالين مركز	ml 10
monosodium phosphate	فوسفات الصوديوم الأحادية	g 0.4
disodium phosphate	فوسفات ثنائي الصوديوم اللامائية	g 0.65
distilled water	ماء مقطر	ml 90

مثبت الفورمالين الكلسي Formol Calcium:

calcium chloride	كلور الكالسيوم(اللامائية)	g 1
concentrated formalin	فورمالين مركز	ml 10
distilled water	ماء مقطر	ml 90

تتراوح مدة التثبيت بين 24-48 ساعة، ويغسل المثبت بالماء الجاري أو بمحلول الأمونيا، ويُعد مثبت جيد للمواد الدهنية.

مثبت دفانو Dafano 's Fixative: يتكون هذا المثبت من:

cobalt nitrate	نترات الكوبالت	g 1
concentrated formalin	فورمالين مركز	ml 15
distilled water	ماء مقطر	ml 100

تتراوح مدة التثبيت بين 12-24 ساعة ويغسل المثبت بالماء الجاري مدة بنفس مدة التثبيت. وهذا المثبت مفيد لإظهار جهاز غولجي.

مثبت فورمالين حمض الخليك الكحولي Formalin-Acetic Acid Alcohol (FAA):

يستخدم في تثبيت الأنسجة النباتية بشكل عام. من أبرز فوائده أنه يمكن حفظ النسيج فيه لمدة طويلة بسبب ثبات تركيبه الكيميائي، إذ تتراوح مدة التثبيت فيه بين 8-24 ساعة، يتكون هذا المثبت من:

ml 50	كحول ايثيلي مطلق absolute ethyl alcohol
ml 5	حمض الخل الثلجي glacial acetic acid
ml 10	فورمالين مركز concentrated formalin
ml 35	ماء مقطر distilled water

مثبت روسمان Rossman's Fixative : يعد مثبتاً عاماً، كما يصلح لتثبيت الغليكوجين في النسيج الحيوانية، مدة التثبيت فيه 24-48 ساعة، ثم تغسل العينة مباشرة بعد التثبيت بالكحول 95%. من الأفضل تحضيره عند الاستعمال، ويتركب من:

ml 90	كحول مشبع بحمض المر.
ml 10	فورمالين 40%.

مثبت حمض الكروم - حمض الخل - الفورمالين :

يعد مثبتاً عاماً للنسج النباتية، مدة التثبيت فيه 24-48 ساعة ويحضر لحظة الاستعمال. ويتركب من:

ml 30	حمض الكروم 1% chromic acid
ml 20	حمض الخل 10% acetic acid
ml 10	فورمول concentrated formalin
ml 40	ماء مقطر distilled water

• غلوترالدهيد Gluteraldehyde :

يستعمل لتثبيت عينات المجهر الإلكتروني. يثبت بروتين الخلية والأنزيمات، ويوضح النواة والسيتوبلازما بشكل جيد. من مساوئه إنه يسبب تصلب العينة، لذلك يستعمل بتركيز مخفف 2%. ولا يصلح هذا المثبت للدراسات المناعية النسيجية، ولا للكشف عن الغليكوجين أو الحموض النووية.

3- المثبتات الحاوية على شوارد معدنية :

• شوارد الزئبق Hg: تمتاز المثبتات المحتوية على كلور الزئبق بقدرتها على توضيح النواة الخلوية، وخاصة عند دراسة نخاع العظم والأعضاء المكونة للدم. كما أنها توضح بنية النسيج الضام، ولا تصلح لتثبيت الغليكوجين، ومن مساوئها أنها تسبب تصلب النسيج إذا بقي فيها لمدة طويلة، كما أنها تكون رواسب بلورية إبرية الشكل صفراء اللون هي كلور الزئبق Hg_2Cl_2 ، ويمكن التخلص من هذه البلورات عن طريق معالجة العينة بمحلول لوغول logol، ويتركب من يود مشبع في كحول ايتيلي تركيزه 70%. ومن هذه المثبتات نذكر:

مثبت زنكر Zenker's Fixative :

يستعمل للكشف عن الاقراص النيرة والعائمة في العضلات المخططة ويتركب من:

g 2.5	potassium dichromate	ثنائي كرومات البوتاسيوم
g 4	mercuric chloride	كلور الزئبق
ml 95	distilled water	ماء مقطر
ml 5	glacial acetic acid	حمض الخل الثلجي

تتراوح مدة التثبيت بين 4 - 18 ساعة، ويغسل النسيج بماء جار لمدة تتراوح بين 8 - 12 ساعة. يحضر المثبت قبل الاستعمال نظراً إلى عدم ثباته، وللتسهيل يمكن مزج المكونات الثلاثة الأولى وخزن المثبت في هذه الصورة الثابتة على ألا يضاف حمض الخليك إلا قبل الاستعمال مباشرة.

مثبت سوسا Susa's Fixative :

مثبت عام، تتراوح مدة التثبيت فيه بين 3 - 24 ساعة، ويجب غسل النسيج بعد التثبيت في محلول يود مشبع في كحول ايتيلي تركيزه 70%. وذلك لإزالة آثار كلور الزئبق. يحضر لحظة الاستعمال، و يتركب من:

g 4.5	mercuric chloride	كلور الزئبق
g 5	Sodium chloride	كلو الصوديوم
g 2	trichloro acetic acid	ثلاثي كلور حمض الخل

ml 4	حمض الخل الثلجي glacial acetic acid
ml 20	فورمالين مركز concentrated formalin
ml 30	ماء مقطر distilled water

يصلح لتثبيت الأعضاء المولدة للدم ولتثبيت بطانة الاوعية الدموية.

• شوارد الكروم Cr:

تعمل على تثبيت البروتينات ولاسيما الحاوية على زمرة الهيدروكسيل OH، أو زمرة الكربوكسيل COOH، والدهون الفوسفاتية، ولكنها تعمل على تحلل الـ DNA. وتعد مثبتات الكروم جيدة لتوضيح الجسيمات الكوندرية وجهاز غولجي و الكريات الدموية الحمراء، وتصلح لتثبيت الغليكوجين والليبيدات. يجب غسل العينة بعد التثبيت مدة 24 ساعة بالماء، لأن شوارد الكروم تتفاعل مع الكحول الإيثيلي مكونة راسباً أخضر اللون في النسيج هو ماءات الكروم Cr₂ (OH).

نذكر من هذه المثبتات : زنكر - هلي

مثبت هلي Helly 's Fixative :

يفيد في تثبيت الطحال والعقد اللمفاوية و الغدة البنكرياسية و الغدة النخامية، وتتراوح مدة التثبيت فيه 6-24 ساعة. يتרכب من المواد نفسها التي يتרכب منها مثبت زنكر، ولكن يضاف إليه الفورمالين بدلاً من حمض الخل عند الاستعمال.

4- المثبتات الحاوية على حمض المر (حمض البيكريك) Picric acid:

يعد حمض البيكريك من أكثر المثبتات استعمالاً في تثبيت النسيج الحيوانية، ولا يستعمل وحده بل مع المحاليل المركبة، يختر بروتين الخلية و يحلل الحموض النووية. إن وجود حمض المر في المثبت يعطي للعينة لوناً أصفر، ولهذا يجب غسل العينة بعد التثبيت بكحول 70% مضافاً إليه كربونات الليثيوم حتى زوال اللون الأصفر، أو بالغسل بكحول 50% عدة مرات حتى زوال اللون الأصفر . ويتكون حمض البكريك من ثلاثي نترت الفينول، وهو مادة صفراء صلبة قابلة للانفجار عند جفافها، ولهذا يجب حفظها تحت الماء بشكل دائم. و تجدر الإشارة

إلى أن حمض المر يسبب انكماشاً في النسيج، ولهذا يضاف إليه حمض الخل الثلجي ليعاكس أثر الانكماش.

من المثبتات التي يدخل في تركيبها حمض البكريك نذكر :

مثبت بوان Bouin 's Fixative :

مثبت عام جيد للنسج الحيوانية وهو ثابت لمدة طويلة، مدة التثبيت هي من 24 إلى 48 ساعة، ويمكن حفظ النسيج بهذا المثبت لعدة أسابيع دون ضмор، ويؤدي ترك النسيج بهذا المثبت لمدة أشهر قليلة إلى صبغ نووي ضعيف، بسبب تفكيكه للحموض النووية، وتجدر الإشارة إلى أن غراماً واحداً من حمض البكريك يشبع 75 مل من الماء. يتركب من :

75 ml	saturated aqueous picric acid	المحلول المشبع
20 ml	concentrated formalin	فورمول مركز
5 ml	glacial acetic acid	حمض الخل الثلجي

يغسل المثبت بعد انتهاء مدة التثبيت بمحلول كحول إيثيلي تركيزه 50%، على أن يتم تبديل المحلول عدة مرات حتى زوال اللون الأصفر. أوبوضع الشرائح الحاملة للمقاطع بمحلول كحول إيثيلي تركيزه 70% مضافاً إليه بضع قطرات من محلول كربونات الليثيوم المشبع.

مثبت بوان دوبوسك Bouin – Duboscq Fixative :

يسمى هذا المثبت باسم آخر وهو بوان الكحولي، ويتكون من:

150 ml	ethyl alcohol 80%	كحول إيثيلي
60 ml	concentrated formalin	فورمالين مركز
150 ml	glacial acetic acid	حمض الخل الثلجي
10 g	picric acid crystals	بلورات حمض المر

يحضر هذا المثبت قبل استعماله بوقت قصير، وهو أفضل من مثبت بوان التقليدي خاصة بالنسبة إلى النسج التي يصعب اختراقها كالجلد. تتراوح مدة التثبيت بين 24-48 ساعة. يُزال اللون الأصفر من الأنسجة بغسلها عدة مرات في كحول إيثيلي تركيزه 95%، ثم تستكمل عملية إزالة الماء. أويمكن التخلص من هذا اللون بغسل المقاطع بعد تحميلها على الشرائح بكحول إيثيلي 70% مضافاً إليه بضع قطرات من محلول كربونات الليثيوم المشبع.

مثبت جندر 's Fixativ : Gender

وهو مثبت جيد لتثبيت الغليكوجين ضمن الخلية الحيوانية، مدة التثبيت فيه 4-8 ساعات، وتغسل العينة بكحول تركيزه 95% لإزالة اللون الأصفر، ثم تستكمل عملية إزالة الماء. يحضر هذا المثبت قبل استعماله بوقت قصير، و يتركب من:

80 ml	محلول كحول 90% مشبع بحمض المر .
15 ml	فورمول formalin
5 ml	حمض الخل الثلجي acetic acid

5- المثبتات الكحولية Alcoholic Fixatives:

لا يستعمل الكحول المطلق كمثبت، وإنما يستعمل بتركيز 70%-90% ، بسبب إنكماش النسيج ولهذا يضاف له حمض الخل الثلجي حتى يقلل من ذلك الانكماش. للمثبتات الكحولية سرعة نفاذية جيدة، ولذلك تستعمل في التحضيرات المجهرية الروتينية. إنها جيدة لحفظ الخلايا العصبية وخاصة جسيمات نيسل Nissl bodies ضمن الخلية العصبية، كما أنها تصلح لتثبيت الغليكوجين، وإذا ما أريد دراسة الأحماض النووية في المقاطع الشمعية، فإن المثبت الكحولي المفضل هو مثبت كارنوا.

• مثبت كارنوا Carnoy's Fixative :

من فوائد استعمال مثبت كارنوا سرعة اختراقه للنسيج، وعدم الحاجة لعمليتي الغسيل وإزالة الماء، ولذلك فهو يستعمل عند معالجة عينات الخزعة في المشافي، كما يستخدم لتثبيت العينات النباتية الفتية، إذ تثبت النسيج بمحلول كارنوا لمدة ساعة ثم تنقل إلى كحول مطلق مباشرة، ثم تنقل إلى مزيج من الكحول والكلوروفورم بنسبة 1:1 ثم تروق، وتستكمل بقية الخطوات من تشريب وطمر وقطع وتلوين. ويتركب من :

10 ml	حمض الخلي الثلجي glacial acetic acid
60 ml	كحول ايتيلي مطلق absolute ethyl alcohol
30 ml	كلوروفورم chloroform

• مثبت ليللي Lillie 's Fixative:

وهو مثبت جيد للحموض النووية وخاصة الـ DNA مدة التثبيت فيه 24 ساعة و بدرجة حرارة 4 °C مئوية . يفضل استعماله طازجاً و يتركب من:

85 ml	Ethanol absulu	كحول مطلق
10 ml	formalin	فورمول
5 ml	acetic acid	حمض الخل الثلجي

6- المثبتات الحاوية على رابع أكسيد الأوسميوم Osmium tetroxide:

يُعرف رابع أكسيد الأوسميوم باسم حمض الأوسميوم وهو مثبت صلب غير مؤين، يذوب في الماء ولكنه يذوب أكثر في المذيبات العضوية. يستخدم لتثبيت العينات التي ستفحص بالمجهر الإلكتروني. ويثبت الجسيمات الكوندرية وجهاز غولجي و الليبيدات غير المشبعة، ولا يصلح لتثبيت البروتين أو الكربوهيدرات، ويعطي لوناً أسود للنسيج. يتنافر مع الكحول، كما أنه بطيء النفوذ في النسيج، ولهذا يجب تقطيع العينة إلى قطع متناهية في الصغر (2 mm). إن غلاء ثمنه و آثاره الضارة على حاسة الشم والبصر بسبب أبخرته السامة المتصاعدة في درجة حرارة الغرفة يحد من استعماله في الدراسات المجهرية العادية .
نذكر من هذه المثبتات:

• مثبت ألتمان Altmann 's Fixative:

يفيد لإظهار الدهون والميتوكوندريا. مدة التثبيت فيه 12 ساعة، ثم تغسل العينة بماء جار لمدة تتراوح بين 8 و 12 ساعة. يتكون هذا من:

50 ml	potassium dichromate 5%	ثنائي كرومات البوتاسيوم 5%
50 ml	osmic acid 2%	حمض الأوسميوم 2%

• مثبت شامبي Champy 's Fixative :

يثبت الجسيمات الكوندرية وجهاز غولجي، مدة التثبيت فيه 12-16 ساعة، يحضر طازجاً عند الاستعمال، يتخلل ببطء إلى النسيج لاحتوائه على حمض الأوسميوم، يحتاج إلى غسل مدة 24 ساعة للتخلص من آثار الكرومات. يتركب من :

35 ml	ثاني كرومات البوتاسيوم 2% أو 3% Dicromatpotacium
35 ml	حمض الكروم 1% Chromic acied
20 ml	رابع أكسيد الأوسميوم 2% Osmium tetroxide

• مثبت فيلمنج Filming 's Fixative :

مثبت جيد للكروماتين يحافظ على الجسيمات الكوندرية وعلى جهاز غولجي في الخلية، مدة التثبيت فيه 12-24 ساعة، و من مساوئه أنه بطيء النفوذ إلى النسيج، ولهذا يجب أن تكون القطع صغيرة كما يجب الغسل بالماء لفترة طويلة لانتقل عن 12 ساعة لإزالة آثار حمض الأوسميوم. يتركب من :

75 ml	حمض الكروم Chromic acied
20 ml	حمض الأوسميوم Osmium acied
5 ml	حمض الخل الثلجي Acitic acies

6- التثبيت باستعمال أجهزة الموجات الدقيقة Microwave:

وهي طريقة حديثة جداً، تستخدم أجهزة الموجات الدقيقة في تثبيت الخزع النسيجية بهدف اختصار الزمن أولاً وبهدف المحافظة على التراكيب الخلوية التي تتأثر بالمواد الكيميائية من جهة ثانية، كما هو الحال في دراسات الكيمياء المناعية، وفي الدراسات الأنزيمية. ويتم التثبيت بغمس العينة في محلول فيزيولوجي، أو في أحد المثبتات الكيميائية خلال فترة زمنية قصيرة تتراوح ما بين عدة ثوان و عدة دقائق، و في درجة حرارة تتراوح بين 45 و 55° مئوية وضمن أوعية لا يزيد قطرها عن 3.5 سنتيمتر وارتفاعها 1 سنتيمتر.

- العوامل المؤثرة على التثبيت:

يمكن إيجاز العوامل المؤثرة في التثبيت وذكرت سابقاً كما يأتي:

- 1- المثبت المستخدم: يجب أن تتراوح درجة الحموضة pH للمثبت من 6 إلى 8 ، ولهذا يفضل استعمال مواد منظمة للمثبت، كالفسفات والبيكربونات وغيرها.
- 2- قوة النفوذية: وتتعلق بتركيز المثبت وبسرعة اختراقه للأنسجة.

- 3- حجم المثبت: يجب أن يكون حجم المثبت أكبر بـ 20 مرة على الأقل من حجم العينة، منعاً لتمدده بفعل الماء الخارج من الخلايا .
- 4- درجة الحرارة: تختلف درجة الحرارة المناسبة لتثبيت العينة حسب هدف الدراسة، فعند تثبيت عينة من أجل الكشف عن الأنزيمات، فإن درجة الحرارة الأنسب هي الحرارة المنخفضة 3-4°C مئوية وكذلك الحال بالنسبة لتثبيت العينات المراد دراستها بالمجهر الإلكتروني. إلا أن درجة 25°C مئوية هي الأفضل للتثبيت بشكل عام.
- 5- تركيز المثبت: إن زيادة تركيز المثبت سينعكس سلباً على عملية التثبيت (يسبب انكماش النسيج أو انتباجه)، وعليه يجب التقيد بنسب المواد الداخلة في تركيب المثبتات.
- 5- زمن المثبت: وهذا يختلف من مثبت لآخر ومن نسيج لآخر.

شروط نجاح عملية التثبيت:

- إن التثبيت السبئي يعطي صورة مجهرية ونتائج خاطئة في نهاية عمل المقاطع النسيجية، حتى ولو كانت المراحل اللاحقة صحيحة، ولهذا فإنه لا بد من تحقيق بعض الشروط لنجاح عملية التثبيت نوردتها فيما يلي:
- 1- اختيار المثبت المناسب الذي يعمل على تثبيت المادة المراد الكشف عنها في الخلية، فمثلاً لا نستخدم الأسيتون في تثبيت قطعة كبدية أو قطعة عضلية نريد أن نكشف في خلاياها عن الغليكوجين، لأن الأسيتون يحل الغليكوجين ولا يرسبه. أما حمض الخل فهو يثبت بروتينات النواة ولا يثبت بروتينات السيتوبلازما، لذلك فهو مثبت جيد للصبغيات، ولكنه يخرب الأجسام الكوندرية في السيتوبلازما.
- 2- ضرورة وضع العينة الحيوانية مباشرة في المثبت بعد أخذها من الجسم وقبل تحليلها، ولهذا يجب تحضير المثبت والأوعية اللازمة للعمل قبل البدء بالتشريح.
- 3- أن يكون حجم العينة المراد تثبيتها صغيراً، بحيث تسمح للمثبت بالنفوذ خلالها في وقت قصير. وبشكل عام يتراوح حجم العينة من 2 إلى 5 ملم، وقد وجد أن ثخانة القطعة تكون أكثر أهمية من حجمها، فالقطعة المثالية تكون رقيقة وسطحها كبير.
- 4- أن تكون كمية المثبت كافية وأكثر بـ 20 مرة على الأقل من حجم القطعة المراد تثبيتها (كما ذكر)، وإلا ستكون كمية المثبت غير كافية لعملية التثبيت بفعل تمدده.

5- أن توضع العينة في المثبت مدة كافيةً من الزمن تكفي لنفوذ المثبت إلى داخلها، و تمتد هذه المدة من عدة ساعات إلى عدة أيام، ويتعلق هذا الأمر بنوع النسيج المطلوب تثبيته، فمثلاً تحتاج قطعة الجلد إلى 24 ساعة على الأقل لتثبيتها، بينما تحتاج مشيمية العين إلى ثلاث ساعات لتثبيت الأصبغة فيها. كما أن مدة التثبيت المناسبة للغدد اللعابية في الحشرات ثنائية الأجنحة لا تتطلب أكثر من بضع دقائق ولا تزيد عن 30 دقيقة، لكن على العموم يمكن ترك العينة في المثبت مدة ليلة كاملة بشرط تخزينها عند درجة حرارة 4°C مئوية.

6- تتعلق مدة التثبيت بسرعة دخول المثبت إلى النسيج، فالكحول سريع النفوذ إلى النسيج خلال عدة ساعات، بينما يُعد رابع أكسيد الأوسميوم مثبناً بطيء النفوذ إلى العينة، و يحتاج إلى عدة أيام لينفذ إلى النسيج، وبشكل عام نقول إن ترك العينة في المثبت لفترة طويلة قد يسبب لها القساوة والتلف، وستفشل عمليات التقطيع اللاحقة، وكذلك عملية التلوين.

7- أن توضع العينة في المثبت وليس العكس، مع تحريك العينة من فترة لأخرى، ويفضل رفع العينة عن قعر الوعاء بقطعة قطن صغيرة خصوصاً عند التثبيت بالكحول، لأن الماء الخارج من العينة سيتجمع أسفل الوعاء، ومن ثم فإن العينة ستغمر بالماء و ليس بالكحول.

المثبتات المستعملة في كيمياء النسيج الحيوانية

مثبتات المواد النشوية: يعد الغليكوجين من المواد الكربوهيدراتية الادخارية في النسيج الحيوانية (ويقابله النشاء في النسيج النباتية)، وهو مادة سريعة الذوبان في الماء، ولهذا فإن المثبتات الحاوية على الفورمالين تعد سيئة لتثبيت الغليكوجين لأنها تحله، بينما تعد المثبتات الكحولية هي الأفضل كمثبت جندر ومثبت كارنوا وغيرها. ويمكن استعمال مثبتات حاوية على الكحول و الفورمالين معاً عند الكشف عن السكاكر المخاطية (مثلاً مثبت ليلى).

مثبتات المواد الدهنية: تكون المواد الدهنية حرة أو مرتبطة، وتذوب في البنزن والإيتر والتولوين والكلوروفورم والأسيتون ولا تذوب في الماء، ولهذا فإن المثبتات الحاوية على إحدى المواد السابقة لا تصلح لتثبيت الدهون. و يمكن إضافة كلور الكالسيوم 1% إلى مثبتات الفورمالين لتثبيت الدهون ولاسيما الدهون الفوسفاتية، ويعد مثبت فورمول الكالسيوم و مثبت

إلقتان ومثبت أورث من المثبتات الجيدة، ويمكن إستعمال رابع أكسيد الأوسميوم في بعض المثبتات مثل: فيلمنغ - شامبي - لويسكي - بيكر. يفضل عادة تثبيت المواد الدهنية بالمقاطع المجمدة و تقطيعها بمقطع التجميد (الكريوستات cryostat).

مثبتات المواد البروتينية: تحتوي المواد البروتينية على زمر فعالة تتفاعل مع المثبت لتكوين بروتين مترسب، وهذه الزمر هي:

- زمرة الأمين $-NH_2$
- زمرة الببتيد $-CO-NH$
- زمرة الألدهيد $-COH$
- زمرة الكربوكسيل $-COOH$
- زمرة الهيدروكسيل $-OH$
- زمرة السلفهيدريل $-SH$
- زمرة ثنائي الكبريت $-S-S-$
- زمرة الأميد $CONH_2$ وغيرها.

ولهذا يجب اختيار المثبت القادر على ترسيب هذه المجموعات. ومن هذه المثبتات نذكر:

* مثبتات الفورمالين: التي تتفاعل مع مجموعة الأمين و الهيدروكسيل.

* مثبتات حاوية على شوارد معدنية وهي تتفاعل مع مجموعة الكبريت.

وبشكل عام، يمكن القول: إن المثبتات الكحولية جيدة لأنها تخثر البروتين و ترسبه كمثبت كارنوا، أما مثبت بوان فهو سيئ للكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعة $-SH$ (الترتوفان).

مثبتات الحموض النووية: يوجد نوعان من الحموض النووية: DNA و RNA بالإضافة إلى البروتينات النووية. وبشكل عام نجد أن مثبتات البروتين تصلح لتثبيت الحموض النووية، و يفضل استعمال مثبت كارنوا لتثبيت الـ RNA، لأنه يذيب محتويات السيتوبلازما دون الحمض النووي الريبي، ويرى بعضهم أن مثبت ليللي المعدل جيد للكشف عن الـ DNA، أما مثبت بوان فلا يصلح لتثبيت الحموض النووية لأنه يحلها، بينما يرى آخرون أنه لا مانع من استعمال الفورمالين 10%.

مثبتات الأنزيمات: تتأثر الأنزيمات بالحرارة المرتفعة التي يتعرض لها النسيج في أثناء التضمين بالشمع ولهذا فإن الكشف عن الأنزيمات يُعد صعباً بطريقة المقاطع البارافينية التقليدية. وتكمن الصعوبة في دراسة الأنزيمات أن التثبيت يطال الركيزة (المادة المتفاعلة)، وليس الأنزيم نفسه، ولهذا يفضل التثبيت بالتجميد. أما إذا تمت الدراسة بطريقة مقاطع البارافين، فيجب أن تكون العينة متناهية في الصغر، و أن تكون فترة التثبيت قصيرة و كذلك عملية الغسل.

ويُعد الفورمالين 4% والمبرد إلى درجة 4°C مئوية مثبثاً جيداً لأنه يحافظ على نشاط الأنزيم نوعاً ما، وتعد مثبتات الأسيتون - الكحول أفضل من غيرها لتثبيت الأنزيمات على تستعمل لفترة قصيرة (5-10 دقائق). إن الأسيتون و الكلوروفورم بنسبة 1:1 مدة 2-5 دقائق، و بدرجة حرارة 4°C مئوية يعد مثبثاً جيداً.

وبشكل عام نقول : إن نشاط الأنزيم يتحدد وفقاً لنوع المثبت و المحاليل المنظمة المستعملة و درجة الحموضة وفترة التثبيت ودرجة الحرارة التي يتم فيها التثبيت كما سنرى لاحقاً.

مثبتات الحموض الأمينية: يمكن استعمال الفورمالين 10% للكشف عن التريتوفان في خلايا بانث Paneth في الأمعاء أو حبيبات زيموجين Zemogen في قناة البنكرياس، و يمكن استعمال مزيج من كحول مطلق وحمض الخل بنسبة 2 : 1 للكشف عن الأرجنين. وبشكل عام يفضل استعمال مثبتات تحوي على كلور الزئبق التي تتفاعل مع المجموعات الأمينية، أو استعمال الكحول المطلق.

مثبتات المواد غير العضوية: كالحبيبات المحبة للفضة argentaffin granules والحبيبات المحبة للإيوزين eosinophilic granules، و صبغة البيلوروبين bilirubin، وصبغة الهيموسيدرين haemosiderin، وكلها تثبت بالفورمالين 10% أو بالكحول المطلق. وتعد المعادن من المواد اللاعضوية التي يمكن الكشف عنها: يمكن تثبيت النحاس بمثبت الفورمالين مضافاً إليه حمض الروبينيك، و يمكن تثبيت الحديد باستعمال الفورمالين المخفف أيضاً، أما الكالسيوم فينحل في الفورمالين، و لهذا يفضل استعمال الكحول أو مثبت بوان بدلاً من الفورمالين.

المثبتات المستعملة في كيمياء النسيج النباتية

- 1- مثبتات عضوية: فورمول + كحول.
- 2- مثبتات حامضية: حمض الخل + حمض الكرومي.
- 3- مثبتات ملحية: كبريتات البوتاسيوم + كبريتات الصوديوم.
- 4- مثبتات تتركب من مزيج عدة مواد (Formalin Acide Alcohol) يسمى اختصاراً FAA ويتركب من :

ml 50	كحول ايتيلي
ml 5	حمض الخل الثلجي
ml 10	فورمالين مركز
ml 35	ماء مقطر

- 5- مثبت CRAF ويتركب من :

ml 30	حمض الكروم
ml 20	حمض الخل
ml 10	فورمالين
ml 40	ماء مقطر

- 6- مثبت كارنوا (ذكر تركيبه في بحث المثبتات).



التلوين staining والمواد الملونة

بدأ استخدام التلوين (الصبغ) باستعمال الملونات التجارية (الأصبغة) في التحضيرات النسيجية المجهرية في النصف الثاني من القرن التاسع عشر، وأول من حاول صبغ النواة الباحث جيرياج Garbage سنة 1858 عندما حاول صبغ الخلايا العصبية، ثم نجح الباحث بومر Bohmer في دمج الهيماتوكسيلين مع مادة الشبة و استطاع تلوين النواة، ولاتزال الملونات القديمة مستعملة حتى اليوم في طرائق التلوين التقليدية.

من المعروف أن الضوء العادي يتكون من سبعة ألوان مختلفة (ألوان الطيف) يمكن تمييزها بوساطة الموشور الزجاجي، فاللون الأسود ينتج من امتصاص جميع ألوان الطيف، واللون الأبيض ينتج عن تناثر ألوان الطيف، أما اللون الأحمر فينتج عن انعكاس الشعاع الأحمر. ولهذا نقول إن لون المادة يعتمد على طبيعة الطيف المنعكس عنها.

كما تتباين المواد المختلفة كثيراً فيما بينها من حيث قدرتها على امتصاص وعكس ألوان الطيف، وهذا مرتبط بتركيب جزيئات المادة ونوعية الروابط بين ذراتها، وقد لوحظ أن معظم المواد الملونة تكثر فيها الروابط المزدوجة (الثنائية) مثل مادة الكلوروفيل Chlorophyle الخضراء في النبات أو مادة الليكوبين Lycopene الحمراء في البنندورة .

والملونات عبارة عن مركبات عضوية قد تكون عطرية Aromatic أو تشبه الملح Salt-like أو متبلورة صلبة Crystalline-solid ، ولكنها تذوب في الماء على شكل أيونات وهذه الأيونات موجبة أو سالبة ملونة. تتحد الأيونات الملونة كيميائياً مع جزيئات المكونات الخلوية للعينة فينعكس اللون على العينة نفسها .

يتكون اللون من قسمين : الأول يعرف بالحامل اللوني Chromatophore يعزى إليه اللون، والثاني هو مساعد اللون Auxochrome يعزى إليه ارتباط حامل اللون مع جزيئات المادة المراد صبغها.

من الناحية النسيجية الخلوية، تعود أهمية التلوين في التحضيرات النسيجية للأسباب الآتية:

- 1- إن قرينة انكسار عناصر الخلية قريبة من بعضها و يصعب التمييز بينها، ولهذا نلجأ إلى صباغتها، فتصبح قرائن الإنكسار متفاوتة، ومن ثم يسهل تمييزها من بعضها.
- 2- إن الصورة الناتجة عن امتصاص الضوء من المحضرات الملونة، هي أكثر وضوحاً من الصور الناتجة عن امتصاص الضوء من المحضرات غير الملونة.
- 3- إن لبعض الملونات تأثيراً اصطفاً في عناصر الخلية، وهذا يتعلق بالملون نفسه وبالعناصر الخلية، ومن ثم فإنها تلون بعض العناصر دون غيرها، وهذا هو مبدأ التمايز اللوني في كيمياء النسيج.

4- سهولة حفظ الشريحة المجهرية مدة طويلة من الزمن، والاستفادة منها في الدراسة أو التوثيق أو التشخيص المرضي.

أما طرائق التلوين في الكيمياء النسيجية فهي حديثة نوعاً ما. لن ندخل في الدراسة النظرية للتفاعلات الكيميائية للتلوين ضمن النسيج، و لكن سنبحث عن التقانات التي تسمح بالحصول على نتائج واضحة و سهلة التفسير، ويمكن للطالب أن يقوم بها في الجلسة العملية .

- تصنيف الملونات:

الملونات هي مواد تجتاز الأغشية الخلوية لتصل إلى داخل الخلية و تلون عناصرها بشكل اصطفاي، لذلك هناك تصنيفات عديدة لها، فهي **تصنف حسب المنشأ إلى:**

- ملونات ذات منشأ طبيعي: وهي تستخلص إما من مواد نباتية كالهيماتوكسيلين الذي يستخرج من أشجار الهيماتوكسيل في غابات كندا والمكسيك، والسفرانين الذي يستخلص من نبات الزعفران، والأورسئين الذي يستخرج من أشنه rocella، والنيلة التي تستخرج من نبات شجرة النيلة indigofera، أو من مواد حيوانية كالكارمن الذي يستخرج من الأجنحة الغمدية لبعض الحشرات.

- ملونات ذات منشأ صناعي: و تصنع في المعامل، وهي مركبات يدخل في تركيبها البنزن، ويتم الربط فيها بين حلقة البنزن وحامل اللون chromatophore فيتشكل مولد اللون chromogen. إن مولد اللون ليس له القدرة على التلوين إلا إذا كان بشكل ملح ويحول إلى ملح بتدخل مساعدات التلوين auxochromes، ومنها نذكر:
- جذر الهيدروكسيل OH
 - زمرة الأمين NH_2
 - زمرة الكاربوكسيل COOH
 - زمرة الكبريتات SO_3

كما تصنف الملونات حسب درجة الحموضة pH إلى:

- الملونات الحامضية acidic stain: إذا كان مساعد اللون لديه القدرة على الارتباط مع الشوارد الموجبة لجزيئات المادة المراد تلوينها، فالملون حامضي و يتفاعل في الوسط القلوي (يلون السيتوبلاسما). نذكر من الملونات الحامضية: الايوزين، الفوكسين الحامضي، أحمر كونغو، أزرق تريبيان، أخضر جانوس، اليزارين، أورانج G، وغيرها. ويكون النسيج محباً للملونات الحامضية .
- الملونات القلوية أو الأساسية basic stain: إذا كان مساعد اللون لديه القدرة على الارتباط مع الشوارد السالبة لجزيئات المادة المراد صبغها، فيكون الملون قاعدي ويتفاعل في الوسط الحمضي (تلون النواة)، كما هو الحال عند: الهيماتوكسيلين، الهيمالان، الفوكسين القاعدي، أزرق تولويدين، أزرق النيل، أحمر معتدل، وغيرها. وتعرف النسيج التي تلون بالملونات القاعدية بأنها محبة للصفات القاعدية .
- الملونات المعتدلة neutral stain: تلون الأوساط المعتدلة في الخلية، نذكر منها : أحمر أو أسود سودان III، أزرق الميتيلين، وغيرها.

وأخيراً تصنف الملونات بحسب نوع الزمرة الكيميائية لمساعد اللون (أيون موجب أو أيون سالب).

وختلاصة القول: إن آلية التلوين معقدة وتتبع كل حالة، و تعتمد على التشرب وعلى انحلال الملون. ويفضل من أجل تثبيت التلوين إجراء عملية تمهيدية هي التخلص أي التهيئة للتلوين mordancage، باستعمال مواد مثبتة للون، تكون بشكل أملاح أو هيدروكسيدات المعادن تخطط مع الملون كشب الحديد ferric alum و شب الأمونيا ammonium alum و حمض فوسفوتنغنستيك phosphotungstic وكلور الحديد ferric chloride وغيرها. وتعمل مثبتات اللون وفق آليتين:

1- يتم وضع النسيج بمثبت اللون قبل إجراء عملية التلوين (كما هو الحال عند وضع

المقاطع في محلول الأكسدة قبل التلوين بكاشف شيف عند الكشف عن الغليكوجين).

2- أو يخطط مثبت اللون بالملون نفسه (كما هو الحال عند التلوين بالهيماتوكسيلين إذ يتم

خلط شب الحديد مع محلول الهيماتوكسيلين الأم).

ويختلف زمن التلوين من ملون لآخر، وبحسب كونه طازجاً أم قديماً، وهل مستعمل لمرة واحدة أم مرات عدة. ويفضل الاستعانة بالمجهر لتحديد درجة اللون المطلوبة، كما يجوز في التلوين أن يحل ملون محل ملون آخر إذا كانا متقاربين من الناحية الكيميائية (كما هو الحال بين الهيمالان والهيماتوكسيلين)، ويمكن أن نمزج بين أكثر من ملون (ارثيروزين و أورنج E على سبيل المثال). كما أن عملية التثبيت السابقة تؤثر في عملية التلوين، فالتثبيت السيئ يعطي نتيجة سلبية، مثلاً عند الكشف عن الـ DNA في النواة، فإن استعمال مثبت بوان سيؤدي إلى حلمهة الـ DNA، ومن ثم فإن الملون (أخضر الميتيل) الذي يستخدم عادة للكشف عن الـ DNA في الخلية، لا يجدي نفعاً عند استعماله لهذا الكشف، بالرغم من كونه ملوناً خاصاً بـ DNA.

- تفسير آلية التلوين:

إن عملية التلوين معقدة وترتبط بعوامل عديدة، ولهذا تفاوتت النظريات في تفسير آلية

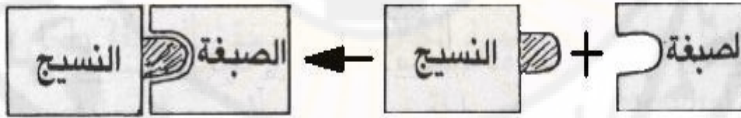
التلوين، ونذكر من هذه النظريات:

1- النظرية الكيميائية: وتقول ببساطة أنه يتم التلوين بتكوين مادة ملحية بين الشق الموجب cation أو الشق السالب anion للملون، و بين مجموعات كيماوية موجودة في الخلية، و بهذا تكون الخلية المحبة للحمض محتوية في مكوناتها على مجموعة قاعدية، ومن ثم ستتفاعل مع الملونات الحامضية، أما إذا كانت محبة للأساس، و محتوية على مجموعة حامضية، فإنها ستتفاعل مع الملونات القلوية.

2- النظرية الطبيعية: وتتم بآليات طبيعية كالامتصاص و الخاصة الشعرية و الانتشار، والترسيب...والياً تفسر آلية التلوين بالنظريتين معاً.

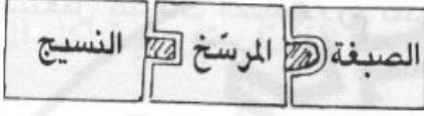
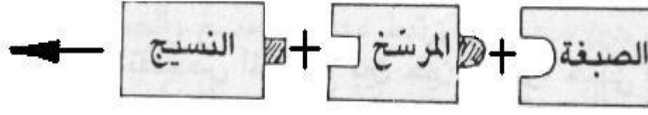
3- تفسيرات أخرى للصبغ الكيميائي:

- التلوين التقدمي progressive staining: توضع المقاطع في الملون حتى ظهور اللون المناسب، كما هو الحال عند صبغ السيئوبلازما بالإيوزين.
- التلوين التراجعي regressive st.: يصبغ النسيج ثم يُزال الفائض من اللون باستعمال محاليل تمييز كما هو الحال عند صبغ النواة بالهيماتوكسيلين.
- التلوين المباشر direct st.: يصبغ النسيج في محلول مائي أو كحولي للصبغة دون وسيط كما هو الحال عند التلوين بالإيوزين أو أزرق ميتيلين، (شكل 40).



شكل 40: التلوين المباشر.

- التلوين غير المباشر Indirect st: يحتاج التلوين إلى وسيط لظهوره في النسيج كإضافة شب البوتاسيوم إلى الهيماتوكسيلين كي يمتصه النسيج، (شكل 41).



شكل 41: التلوين غير المباشر.

- ظاهرة التحول اللوني metachrom :

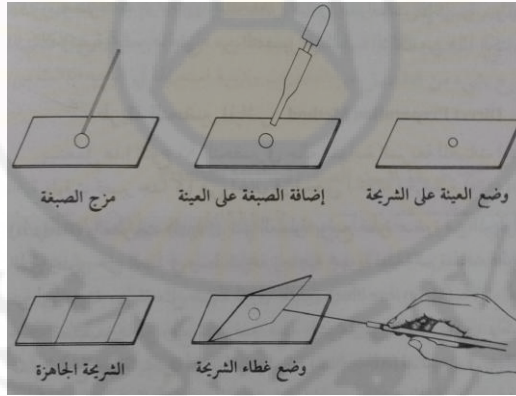
وهي ظاهرة خاصة بالنسج الحيوانية. من المعروف أن الملونات تلّون النسج بظلال ألوانها، ولكن في حالات أخرى تلوّنها بألوان تختلف عن اللون نفسه، وقد لوحظت هذه الظاهرة أول مرة عام 1875 من قبل الباحث Jurgenz، وأطلق عليها اسم التحول اللوني، و يسمى النسج الذي يغير اللون بحال اللون. من النسج الحالة للون نذكر: النسج الغضروفي، النسج الضام ، النسج الظهاري المخاطي إلخ. ومن الملونات المحوّلة للّون نذكر: أزرق التولويدين، بنفسجي الميتيل إلخ . تعتمد ظاهرة التحول اللوني على طبيعة الملون و على مكونات النسج نفسه.

إن الملونات المحولة للّون ذات طبيعة قاعدية وتتفاعل مع محولات اللون الحمضية والغريب أن التغير اللوني الذي تحدثه هذه المحولات اللونية يكون دائماً في نفس النمط ، فالملونات الخضراء تتحول إلى زرقاء والملونات الزرقاء تتحول إلى حمراء والحمراء تتحول إلى اللون الاصفر أو البرتقالي...

- طرائق التلوين

1- طريقة التلوين المباشر (التحضير المباشر):

يُستعمل هذا النوع من التحضير في حال الدراسات السريعة للعينات الحية ولوقت قصير جداً كما هو الحال في فحص الخلايا الحرشفية المبطنة للفم أو فحص بعض الأوليات (Protozoa): كالأوغليفا والبرامسيوم والكاننات الحية الأخرى مثل البكتريا والفطريات. تتم العملية بوضع قطرة صغيرة من المحلول المائي الذي يحتوي على العينة في وسط شريحة زجاجية نظيفة ثم تضاف قطرة صغيرة من الملون مثل صبغة أزرق الميثيلين (Methylene blue). تحرك المحتويات جيداً بقضيب زجاجي رفيع ثم يوضع غطاء الشريحة على النقطة المائية، وبشكل مائل وبشرط أن يتركز على إبرة التشريح مثلاً ثم يسمح للغطاء بالانخفاض فوق القطرة ليصبح في وضعه الأفقي، وتتبسط القطرة المائية تحت الغطاء، دون تشكل فقاعات هوائية. يفضل أن توضع طبقة من الفازلين أو الجيلاتين أو شمع البرافين حول حواف غطاء الشريحة، وهذا يكبح عملية التبخر للمحلول المائي تحت الغطاء. الجدير بالذكر أن هذا النوع من الشرائح لا يمكن حفظها لفترة طويلة من الزمن لكنها تناسب الدراسة لفترة قصيرة لمدة عدة ساعات فقط (شكل 42).



شكل 42: طريقة التلوين الحية

2- طريقة التلوين العامة (التقليدية): يمكن فيها صبغ عناصر النسيج و تمييز البنية الخلوية (النواة - السيتوبلاسما - الجدار الخلوي) كطريقة الهيماتوكسيلين - إيوزين، حيث يلون الهيماتوكسيلين النواة باللون البنفسجي المزرق، و يلون الإيوزين السيتوبلاسما باللون الزهري، أو صبغ الجدر الخلوية المتخشبة باللون الأحمر بملون السفرائين، والجدر السيللوزية باللون

الأزرق بملون أزرق الأنيلين في النسيج النباتية وستعرف الطريقة بالتفصيل في الفصول القادمة .

3-طريقة التلوين الخاص: يكشف فيها عن بعض مركبات الخلية بعينها، كالكشف عن الغليكوجين، أو DNA، أو الدهون، أو الجسيمات الكوندرية، أو جهازغولجي. فمثلاً يلون كاشف شيف حبيبات الغليكوجين في الخلية دون غيرها بلون أحمر آجري ، وكذلك يلون خلايا النحاس الجسيمات الكوندرية الحبيبية بلون أزرق قائم عند الكشف عنها، كما يلون أسود السودان الليبيدات باللون الأسود، وستعرف طرائق التلوين الخاصة لاحقاً .

- محاليل التلوين والتمييز المستخدمة في العمل المخبري:

تستعمل في مختبرات التحضير المجهرى والأمراض النسيجية عدة أنواع من محاليل التلوين، يُستخدم بعضها لصبغ النواة، وبعضها الآخر يستخدم لصبغ السيتوبلازما أو المكتثفات السيتوبلازمية، أو المدخزات الخلوية. ونستعرض فيما يلي مكونات وكيفية تحضير أبرز الملونات، فضلاً عن أبرز محاليل التمييز التي تزيل التلوين السيتوبلازمي الزائد.

1- الملونات النووية:

- صبغة الهيماتوكسيلين Hematoxylin:

يُعد ملون الهيماتوكسيلين من أكثر الملونات النووية استعمالاً في مختبرات الأمراض النسيجية والبيولوجيا العامة، وهو يلون النواة باللون البنفسجي المزرق، كما يلون سيتوبلازما النسيج النباتية باللون الأصفر. وتوجد له عدة صيغ، تشترك جميعها بوجود واحد أو أكثر من المكونات الآتية فضلاً عن صبغة الهيماتوكسيلين نفسها:

- الشبة alum وهو مثبت للصبغة، ومن أكثرها استعمالاً شب البوتاسيوم .

- الحمض acid، وهذا يساعد في تحسين عملية التلوين.

- الغليسيرول glycerol، يطيل (عمر) الملون.

-عامل أكسدة oxidizing agent، ويساعد في تحويل الهيماتوكسيلين إلى هيماتين.

وأطلق على هذه الصيغ بأسماء الرواد الأوائل الذين استعملوها.

▪ هيماتوكسولين إرليخ Ehrlich 's Hematoxylin:

يتركب من:

g 1.6	هيماتوكسولين hematoxylin
ml 48	كحول ايتيلي ethyl alcoho
g 4.8	شب البوتاسيوم potassium alum
ml 24	ماء مقطر distilled water
ml 24	جليسيرول glycerol
ml 2.4	حمض خل ثلجي glacial acetic acid

طريقة التحضير:

- 1- أذب الهيماتوكسولين في الكحول على نار هادئة (عند درجة حرارة 50-55 C° مئوية).
 - 2- أذب الشبة في الماء المقطر على نار هادئة، ثم أضف الغليسرول حين يكون هذا المحلول دافئاً، ثم اترك هذا الخليط ليبرد.
 - 3- أضف محلول الهيماتوكسولين (المحضر في الخطوة 1) بأحجام قليلة إلى محلول الشبة (المحضر في الخطوة 2)، واخلطهما جيداً.
 - 4- أضف حمض الخل الثلجي، واخلط جيداً.
 - 5- أغلق الوعاء المحتوي على التحضير بسدادة قطنية، واترك المحلول ليتأكسد بتعريضه للهواء. تستغرق عملية الأكسدة 6 أسابيع على الأقل، وبطبيعة الحال فإن ترك المحلول لمدة أطول يساعد في الإنضاج الأفضل.
 - 6- رشح المحلول قبل الاستعمال.
 - 7- عند الاستعمال، يمكن أكسدة صبغة الهيماتوكسولين بإضافة 0.1 g من أيودات الصوديوم لكل 100 ml من المحلول، ثم تُخلط المواد جيداً وتترك لمدة ساعة أو ساعتين قبل الاستعمال.
- يستعمل هذا الملون تراجعياً، ويتراوح الوقت اللازم للتلوين بين 3-9 دقائق.

▪ هيماتوكسولين هارس Harris، sHematozylin:

يتركب من:

g5	هيماتوكسولين hematoxylin
----	--------------------------

ml50	ethyl alcohol كحول إيثيلي
g100	potassium alum شب البوتاسيوم
ml 950	distilled water ماء مقطر
g 2.5	mercuric oxide أكسيد الزئبق
ml 40	glacial acetic acid حمض الخل الثلجي
طريقة التحضير:	

- 1- أذب الهيماتوكسلين في الكحول على نار هادئة (بدرجة حرارة 50-55°C مئوية).
 - 2- أذب الشبة في الماء المقطر على نار هادئة ، وحرك الخليط باستمرار.
 - 3- أضف محلول الهيماتوكسلين الكحولي (المحضر بخطوة 1) إلى محلول الشب المائي الدافئ، واخلطهما جيداً وباستمرار فوق النار وحتى الغليان.
 - 4- ابعد الخليط عن النار، وأضف أكسيد الزئبق ثم برد الخليط في حمام ماء بارد.
 - 5- أضف حمض الخل الثلجي، ورشح الخليط قبل الاستعمال.
- يستعمل هذا الملون تراجعياً. ويتراوح الوقت اللازم لتلوين النسج بين 4 و 25 دقيقة.

■ هيماتوكسلين ماير sHematoxylin.Mayer:

وهو الأكثر استعمالاً ويتركب من:	
g 1	hematoxylin بلورات هيماتوكسلين
ml 1000	distilled water ماء مقطر
g 0.2	sodium iodate فوق يودات الصوديوم
g 50	potassium alum شب البوتاسيوم
ml 1	citric acid حمض الليمون
ml 50	chloral hydrate هيدرات كلور
طريقة التحضير:	

- 1- أذب الهيماتوكسلين وشب البوتاسيوم وإيودات الصوديوم في الماء المقطر، واترك الخليط حتى صباح اليوم التالي عند درجة حرارة الغرفة.
- 2- أضف هيدرات الكلور وحمض السيتريك إلى الخليط المحضر أعلاه. ثم اخلط المحتويات السابقة جيداً ودعها تغلي لمدة 5 دقائق.

3- برّد الخليط ثم رشحه.

يستعمل هذا الملون تقديمياً ، وتتراوح مدة تلوين النسيج بين 2 و 4 دقائق.

- ملون الكارمين الخلوي Aceto Carmine:

فضلاً عن استعماله لتلوين النواة بلون قرمزي، فإن هذا المحلول يُستعمل لتلوين الديدان المفلطة، ولتلوين الجدر الخلوية ذات الطبيعة البكتوسيللوزية في الخلايا النباتية. يتركب من :

حمض الخل (45%) acetic acid ml 100
كارمين carmine g 10

طريقة التحضير:

ضع بودرة الكارمين في حمض الخل واغل الخليط لمدة 4 دقائق، ثم برده ورشحه. ثم جفف الناتج (الراشح) على ورق الترشيح ويسمى الكارمين الحامضي acidified carmine. اخلط الراشح مع المواد الآتية، وبالتسخين حتى الذوبان:

كارمين الحامضي acidified carmine g 1
شب البوتاسيوم potassium alum g 10
ماء مقطر distilled water ml 200

رشح الخليط، وأصف بلورات قليلة من التيمول thymol لمنع نمو العفن.

- ملون السفرانين Safranin:

يلون هذا المحلول الجدر المتخشبة في الخلايا النباتية بلون أحمر (تكون خلايا الجدار المتخشبة عديمة النواة، والجدار المتخشبة هو: الأوعية متخشبة - والألياف المتخشبة - والبارانشيم المتخشبة)، ويستخدم مع ملون مقابل له يسمى أخضر سريع fast green. ويمكن استعمال هذا المحلول لإظهار الألياف المرنة، وألياف اللجنين lignin، والأوعية الخشبية، إذ تظهر كلها بلون أحمر. يحضر بحل g 1 من السفرانين safranin، في 99 ml من الكحول الإيثيلي تركيزه 70%. يرشح عند الاستعمال، يُحفظ لفترة غير محدودة.

- ملون أحمر معتدل Neutral red : يلون النوى بلون أحمر، و يحضر بحل g 1 من

الأحمر معتدل nature lred في 100 ml ماء مقطر. يُحفظ لفترة غير محدودة.

- صبغة أزرق الأنالين Analin bleu:

يلون الجدر الخلوية السللوزية بلون أزرق، علماً أن الجدار السللوزي هو : البشرة - اللحاء- برانشيم (قشري أو مخي أو إدخاري). كما يلون الخشب الأول الفتى الذي لم تتخشب جدران خلاياه بشكل كامل، وكذلك الميرستيم الابتدائي في الساق والجنور. و يستخدم أيضاً لتلوين المقاطع نصف الرقيقة المطمورة بمادة الريزين (الراتنج) والتي تفحص بالمجهر الضوئي .

يحضر بحل 0.5 g أزرق الأنالين Analin bleu في 100 ml من الماء المقطر. يغلى المزيج، ثم يبرد ويرشح ويضاف إليه 8 ml من حمض الخل. يُحفظ هذا المحلول لفترة طويلة ، وعند الاستعمال يُؤخذ حجم من المحلول الأم ويُضاف إليه حجامان من الماء المقطر.

2- الملونات السيتوبلازمية:

- ملون الإيوزين Eosin:

يلون السيتوبلازما بلون زهري، ويمكن حله بالماء أو بالكحول .

■ الإيوزين كحولي، ويتكون من:

g 1	eosin Y إيوزين واي
ml 99	كحول إيثيلي (75%) ethyl alcohol
ml 2	حمض الخليك الثلجي glacial acetic acid

■ الإيوزين المائي، ويتكون من نفس التراكيب السابقة، على أن يستبدل الكحول بالماء.

إن إضافة حمض الخل يجعل التلوين أكثر قوة. ولمنع نمو العفن، يُضاف 0.25 ml من فورمالين تركيزه 10% لكل 100 ml من محلول الملون.

- ملون أورانج ج Orange G:

يلون السيتوبلازما بلون قرنفلي، ويحضر بحل المواد الآتية:

g 1	أورانج ج orange G
g 5	حمض فوسفوتنغستيك phosphotungstic acid
ml 100	كحول إيثيلي مطلق ethyl alcohol

- ملون أخضر سريع Fast green:

يلون السيتوبلاسما بلون أخضر، ويتركب من:

g 0.5	أخضر سريع fast green
ml 50	زيت القرنفل clove oil
ml 50	كحول ايتيلي مطلق ethyl alcohol

- ملون بيكروأنديغو كارمن Picro andigo Carmen:

يلون السيتوبلاسما بلون أخضر، و يحضر بحل g 0.25 من أنديغوكارمن Andico Carmen في 100 ml من المحلول المائي المشبع بحمض البيكريك. يصلح للاستعمال مدة 6 أشهر .

- ملون أحمر سودان الثالث Sudan red III ، أو ملون أسود سودان الثالث Sudan

:black III

يلونان المواد الدهنية، فالأول يلونها بلون أحمر، بينما يلونها الثاني بلون أسود، ويتركب من حل الملون في كحول 70%، لدرجة الاشباع، ويحفظ لحين الاستعمال ويرشح لحظة الاستعمال فوق الصفائح المجهرية .

- ملون مالوري : P.T.A .H:

يستخدم للكشف عن الأقرص النيرة و العاتمة في العضلات المخططة و للكشف عن الألياف العصبية ويلونها باللون الأزرق، و يتركب من :

g 0.1	هيماتوكسيلين Hematoxylin
g 0.1	حمض فوسفوتنغستين Phosphotengestic acid
ml 100	ماء مقطر .

تخلط المقادير السابقة وتترك عدة أسابيع في ضوء النهار لتتخمر، ثم تستخدم في التلوين.

3- محاليل التمييز:

تستعمل هذه المحاليل عند إجراء التلوين التراجعي، وذلك لإزالة اللون الزائد في النسيج الحيوانية أو النباتية. ومن أبرز أنواع هذه المحاليل نذكر:

- الكحول الحامضي Acid Alcohol:

يستعمل لإزالة التلوين الزائد في النسيج الحيوانية، يحضر من إضافة 5 ml حمض كلور الماء المركز إلى 100 ml كحول تركيزه 70%.

- زيت القرنفل - كحول - زایلين Xylene - Alcohol - Clove Oil:

يستعمل لإزالة التلوين الزائد في النسيج النباتية. يحضر من مزج 50 ml من زيت القرنفل مع 25 ml كحول إيثيلي مطلق و 25 ml أكزايلين.

- بعض ملونات النماذج الكاملة Whole Mount Stains:

- كارمالم كيركباتريك Kirkpatrick's Carmalum:

يستعمل في تحضير نماذج كاملة من ديدان التريماتودا و السيستودا ويتركب من :

كارمن أو كوتشينيل (cochineal) carmine 2.5 g

حمض الخليك الثلجي 45 % glacial acetic acid 50 ml

شب البوتاسيوم potassium alum 2.5 g

ماء مقطر distilled water 100 ml

طريقة التحضير:

اسحق الكارمين أو الكوتشينيل في هاون بشكل جيد، ثم أضف حمض الخليك الثلجي و 50 ml من الماء المقطر، واغليها لمدة 20 دقيقة. أذب شب البوتاسيوم في 50 ml ماء، وأضف إليه الكارمن أو الكوتشينيل بعد تبريده. ثم اغل المزيج برفق لمدة ساعة، ثم برده، ورشحه. يفضل إضافة بلورة من التايمول لمنع نمو الفطريات. يبقى المحلول صالحاً عدة سنوات .

- بوراكس كارمن Borax Carmine:

هو ملون جيد لعينات صغيرة، حيوانية كانت أم نباتية، وكذلك لأجنة الطيور والزواحف، ولبعض الديدان، والأوليات. يتركب من :

g 4

borax بوراكس

g 3

كارمن carmine

ml 100

ماء مقطر distilled water

طريقة التحضير: سخن هذه المكونات لمدة 30 دقيقة، ثم أضف لها بعد أن تبرد 100 ml من الكحول الإيثيلي. اترك الخليط لمدة يومين، ثم رشحه. عند توفر مسحوق بوراكس كارمن فإنه يمكن تحضيره بحل 3g من المسحوق في 100 ml من الكحول 30%. يترك المحلول لمدة يومين ، ثم يرشح ويستعمل .

- الملونات الحيوية Vital Stains

قد نضطر في بعض الأحيان إلى مراقبة الوظائف الحيوية للخلية كالتغذي والاطراح والتقل أو التعرف على بعض التراكيب الخلوية فيها، وإجراء مقارنة بين تلوينها بالشكل الحي وتلوينها بالطرائق التقليدية. من أجل هذا نلجأ إلى استعمال الملونات الحيوية. تتصف هذه الملونات بقدرتها على تلوين الخلايا الحية (الغير مثبتة). وعليه فإن الملونات الحيوية، تُستعمل بتركيز خفيفة و بكميات قليلة، حتى لا تؤثر في الخلايا الحية. يتم تلوين العينة على الشريحة الزجاجية مباشرة، أو بوضعها في سائل فيزيولوجي مضافاً إليه بضع قطرات من الملون الحيوي.

تصنف الملونات الحيوية إلى:

- الملونات الحامضية: منها الأليزارين alizarin، أزرق تريبان trypan blue، أحمر كونغو congo red. وهي تستعمل بتركيز 10 % و يتم إذابتها بماء معدني أو سائل رينغر.
- الملونات القلوية: مثل أخضر جانوس (الصبغ الأجسام الكوندرية)، أزرق الميتيلين، أزرق التوليدين (لصبغ الفجوات الخلوية).

أما آلية دخول الملون إلى الخلية فيعتمد على نفوذية الخلية، وعلى تركيز الملون، بالإضافة إلى عوامل خارجية كدرجة الحرارة ودرجة الحموضة. ويمكن للملون أن يتجمع في أماكن مختارة من الخلية وذلك حسب التركيب الكيميائي للخلية.

تركيب بعض الملونات الحيوية:

أخضر جانوس Janus Green:

يستعمل لصبغ الأجسام الكوندرية، وهو يتكون من حل 0.1 g من بودرة أخضر جانوس Janus green في 100 ml ماء ملحي (فيزيولوجي).

ثيونين Thionin:

صبغة حيوية لإظهار بعض أوجه النشاط الخلوي، وتتكون من مزج المحاليل الآتية:

حمض كلور الماء 1% Hydrochlorat 2.5 ml

ثنائي كبريتات الصوديوم المائبة 2.48 % sodium thiosulphate 2.5 ml

ثيونين مائي 0.01 % thionine 100 ml

تخلط المكونات ويترك المحلول في الظلام لحين الحاجة إليه. بعد ثلاث ساعات يفقد المحلول لونه ويكون جاهزاً للاستعمال، وعندما يستعيد المحلول لونه، فإنه لا يكون مناسباً لإجراء التلوين الحيوي.

سوائل اللصق و وسائط التغطية والستر

يقصد بسائل اللصق، السائل المستخدم في لصق المقطع النسيجي على الشريحة المجهرية، بينما يكون المقصود بوسط التغطية ذلك السائل الذي يوضع في نهاية إعداد الشريحة المجهرية من أجل التغطية والستر.

أولاً: سوائل اللصق

تُستعمل في فرش المقطع النسيجي بعد التقطيع ومده ولصقه على الصفيحة المجهرية . ويكون العمل بمساعدة جهاز تسخين الشرائح، وبدرجة حرارة 45 درجة مئوية. وتحضر هذه السوائل في المختبر، لأن عمرها قصير وتفسد بسرعة. يوجد أنواع كثيرة نذكر منها:

- الماء الجيلاتيني gelatin water :

يحضر بـحل :

جيلاتين نقي gelatin	g 0.5-1
ماء مقطر	ml 100

يذاب الجيلاتين في الماء ويسخن حتى الغليان ثم يرشح و يبرد. يستعمل لعدة أيام ويمكن إضافة 2 g من بلورات التيمول و 15 ml من الغليسرول لمنعه من التعفن.

- لاصق بياض البيض:

يمكن استخدام بياض البيض (الطازج) مباشرة دون أية إضافات لدهن الصفائح الزجاجية ثم لصق المقاطع عليها، أو يحضر لاصق بياض البيض الجاف على الشكل الآتي:

مسحوق ألبومين (بياض البيض الجاف) albumen	g 5
ملح الطعام sodium chloride	g 0.5
ماء مقطر distilled water	ml 100

تخلط المواد أعلاه ثم يرشح الخليط ويضاف 50 ml من الغليسرول إلى 50 ml من الراشح. ويفضل إضافة بضع بلورات من التيمول لمنع نمو الفطريات.

- بياض البيض - طريقة ماير Mayer 's Albumen:

يتكون من

ml 50

egg albumen بياض البيض

ml 50

glycerol غليسرول

g 1

thymol تيمول

يرج بياض البيض مع نقاط قليلة من حمض الخليك المخفف ، ثم تضاف المكونات الأخرى، وترج جيداً.

- لاصق لاند Land 's Adhesive:

ويتكون من محلولين:

▪ محلول أ:

g 0.5

Arabic gum صمغ عربي

ml 50

distilled water ماء مقطر

▪ محلول ب:

g 0.5

potassium dichromate ثنائي كرومات البوتاسيوم

ml 100

distilled water ماء مقطر

طريقة التحضير: امسح الشريحة المجهرية بقطرات من محلول (أ) ثم أضف عدد مماثل من القطرات من محلول (ب). انقل المقاطع على الصفيحة ثم دعها تتمدد على سخان الشرائح. ثم جفف المقاطع بإزالة السائل الزائد بورقة ترشيح.

ثانياً: وسائط التغطية

بعد الإنتهاء من عمل تلوين الشرائح يتوجب تغطيتها بوسط مناسب، ثم بغطاء زجاجي حتى يمكن فحص الشريحة تحت المجهر، وكذلك لحفظ التحضير أطول فترة ممكنة وبعيداً عن الغبار. وتكون وسائط التغطية إما مائية، أو عضوية. وتتوفر هذه الوسائط إما جاهزة، أو تحضر في المختبر إذا ما استدعت الظروف ذلك. يوجد بالأسواق أنواعاً مختلفة من وسائط

التغطية، ويتم اختيار البعض منها حسب طريقة التلوين المتبعة، وحسب صفات سائل التغطية الذي يجب أن تتوفر فيه الصفات الآتية:

- 1- أن يكون معامل انكساره للضوء مساوياً لمعامل انكسار الضوء في الصفيحة والساترة.
- 2- أن يكون معامل انكساره قريباً من معامل انكسار النسيج المراد فحصه.
- 3- أن يحافظ على شفافية المقطع، ولا يتبدل مع مرور الوقت، كأن يتشقق أو يصبح حبيبياً أو يتبدل لونه.
- 4- أن لا يتفاعل مع الملون المستعمل في التلوين أو مع مكونات النسيج.
- 5- أن يكون قابلاً للمزج مع وسط الترويق.

- أنواع وسائط التغطية:

1- الوسائط المائية Aqueous Media:

وسط هلام الغليسرين Glycerine Jelly: يستعمل في تغطية المقاطع التي هي بحاجة لبقاء الماء فيها (كالكشف عن الدهون) ويتكون من:

g 10	جيلاتين gelatin
ml 60	ماء مقطر distilled water
ml 60	غليسرين glycerine
g 0.2	بلورات فينول phenol crystals

يذاب الجيلاتين في الماء عند درجة حرارة 37°C مئوية. ثم تضاف المكونات الأخرى وتخلط جيداً. ويمكن تخزين هذا الوسط لحين الاستعمال، حيث يلزم حينئذ تسخين الوسط على صفيحة دافئة. إن هذا السائل محدود الاستعمال بسبب الحاجة إلى تسخينه قبل الاستعمال، وكذلك عدم تجمده بشكل جيد بعد التغطية، كما أنه يسبب تخفيف قوة التلوين مع الوقت.

وسط أباتي Apathy's Medium ويتركب من:

g 50	بلورات صمغ عربي نقي Arabic gum crystals
g 50	قطر سكر قصب نقي cane sugar syrup
ml 50	ماء مقطر distilled water

g 0.05

thymol تيمول

تذاب هذه المكونات بتسخينها عند درجة حرارة خفيفة. ثم يحفظ الوسط بوعاء محكم الغطاء. إن ميزات هذا الوسط، مثل تصلبه بعد التغطية، وكذلك إرتفاع معامل انكساره مقارنة بوسائط مائية أخرى، جعلته شائع الاستعمال.

وسط برليس Berlese 's Medium:

يصلح لتغطية الحشرات الصغيرة والطفيليات، يتكون من:

ml 10

قطر الغلوكوز glucose syrup

(يحضر بإضافة 5 g غلوكوز إلى 5 ml ماء مقطر)

ml 15

صمغ عربي Arabic gum

ml 20

ماء مقطر distilled water

ml 75

حمض كلور الماء chloral hydrate

يذاب الصمغ العربي في الماء المقطر. ثم يضاف قطر الغلوكوز ومن ثم هيدرات الكلور لحد الإشباع. يسخن الخليط ببطء، ويحرك جيداً. ثم يرشح الخليط من خلال كمية قليلة من الصوف الزجاجي.

2- الوسائط العضوية Organic Media:

تتوفر أنواع عديدة من الوسائط العضوية بشكل جاهز، ونظراً إلى أن بلسم كندا يعد وسطاً شائع الاستعمال، فإنه ربما يكون مفيداً ذكر طريقة تحضيره في حال عدم توفره جاهزاً.

بلسم كندا Canada Balsam:

هو مادة راتنجية طبيعية تحتوي على حمض الكربوكسيل وحمض الأبيتيك، يحضر بإذابة 60 g من بودرة بلسم كندا في 100 ml من الكزابلين، و يفضل اضافة كمية قليلة من كربونات الكالسيوم لجعله متعادلاً، ويُفضل أيضاً حفظه في زجاجة قاتمة اللون.

يُعد وسط طمر عام، و هو شفاف لا لون له إلا أنه يصبح عاتماً مائلاً للاصفرار بمرور الوقت، ويحتاج إلى وقت طويل لجفافه، ولهذا يجب وضع المقاطع في المحم بدرجة حرارة 45 ° C

مئوية و لمدة 24-48 ساعة بعد التغطية والستر. لا يستعمل لتغطية المقاطع الملونة بتفاعل بروشيا Prussia.

كابرات السيليلوز cellulose caprate .

يذاب 100 g كابرات السلوز في 100 ml الكزاليين، ويصلح لتغطية المقاطع الملونة بتفاعل بروشيا أو الهيماتوكسلين الإيزين.

أيوبارال euparal ويحضر من خليط بارألدهيد paraldehyde و الكمسال camsal والسدرار sadarac و مستخلص الكافور eucalyptol ، بمقادير متساوية، ويستعمل في طمر المقاطع التي تعالج بكحول 95% دون الحاجة إلى نزع الماء بالكحول المطلق، خاصة إذا كان نزع الماء بالكحول المطلق سيؤدي إلى تلف التلوين أو النسيج.

3- وسائط طمر صناعية:

تصنع في المعامل من مواد كيميائية، ولها استعمالات صناعية ، نذكر منها:

:D.P.X

هو مادة صناعية شفافة يتركب من مزج بولي استرين polystrene وفوسفات ثلاثي الكريزيل tricresyl phosphate و الكزاليين xylene بنسب محددة. يعد وسط طمرعام لأغلب النسيج. وهو منافس لبلم كندا بسبب سرعة جفافه وشفافيته العالية وعدم تفاعله مع الملونات المستعملة وكذلك رخص ثمنه. يصلح لطرالنسيج المراد دراستها بالمجهر المتألق ولا يصلح للصق المقاطع السيلويديية.

البيرمونت Permunt:

هو سائل لصق يستخدم صناعياً في لصق القطع الزجاجية، ويتركب من مزيج من مواد عضوية وغير عضوية، غير ذوابة، ومعلقة في وسط زيتي ،أو معلقة في مستحلب ما ئي. يمتاز بشفافيته وسرعة جفافه .

- الأغطية الزجاجية (السواتر):

لابد في نهاية التحضيرات المجهرية من استعمال سواتر زجاجية رقيقة، وذلك لحماية المقطع من الجفاف والانساخ بالغبار، ويوجد بالسوق ساترات زجاجية بقياسات مختلفة:

18×18 مم - 24×24 مم - 24×36 مم - 24×50 مم - 24×60 مم

ويمكن اختيار الساترة المناسبة لقياس المقطع النسيجي.

إعداد المحضرات النسيجية (طريقة الشمع)

إن عملية إعداد المحضرات النسيجية تمر بمراحل ثلاث هي:

- 1- التثبيت.
- 2- التشريب والتضمين.
- 3- التلوين والتغطية.

لابد في البداية من القيام بالتحضيرات اللازمة لعمل المقاطع النسيجية، وأول هذه التحضيرات هو الحصول على العينة نباتية كانت أم حيوانية، ومعالجتها بالمواد الكيميائية (التثبيت)، ومن ثم صبها في قوالب ليسهل تقطيعها وتلوينها بحيث يصبح من السهل دراسة مكوناتها التركيبية بواسطة المجاهر الضوئية أو الالكترونية. وسنخصص في هذا الفصل شرح أهم طرائق التحضير الواجب اتباعها، ومراحل إعداد العينة وتحضيرها للفحص المجهرى.

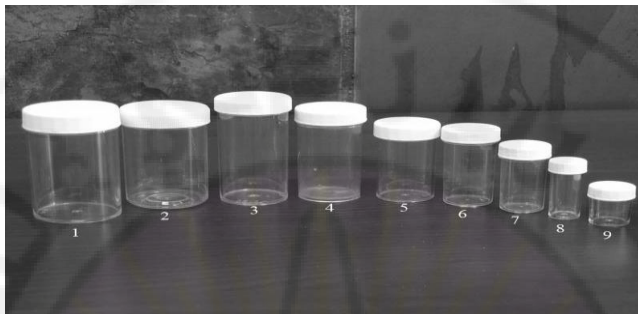
1- الحصول على العينة:

قد تكون العينة المدروسة عبارة عن كائن حي كامل، وقد تكون جزءا من جسم هذا الكائن. وتعتمد كيفية الحصول على العينة أساساً على الهدف المقصود في أثناء الدراسة. يفضل دائماً أن يعامل الكائن الحي بطريقة إنسانية في أثناء استخدامه في الدراسات التجريبية، وكثير من دول العالم اليوم قد وضعت قوانين واضحة تهدف إلى المعاملة الحسنة بكائنات التجارب، ويشذ عن هذا الكائنات النباتية نظراً إلى أنها لا تبدي أي نوع واضح من الإحساس بالألم . ولهذا نستطيع أن نذكر أهم الطرائق المتبعة في الحصول على العينة من الكائن الحيواني كالاتي:

الذبح (Slaughtering) - التثخيع (pinthing) - الضرب على مؤخرة الرأس (blow on the head) - التخدير (anaesthesia).

يُشرَح الحيوان بعد تخديره، وتُستأصل منه الأعضاء المطلوب تثبيتها، ثم تقطع إلى قطع صغيرة لا يتجاوز قياسها 5 mm، بواسطة شفرة حادة وليس بالمشרט، فيقطع لمرة واحدة حتى لا يتمزق النسيج، ثم توضع في عبوات، أو حبابات صغيرة flacons مملوءة بالمثبت المطلوب (شكل 43)، ويكتب عليها بقلم الرصاص، المعلومات الخاصة بالعينة والمثبت و توضع جانباً،

أو يغمس معها قصاصة ورقية صغيرة مكتوب عليها بقلم الرصاص: اسم العينة واسم الحيوان (أرنب - ضفدع - حمام فأر)، أو اسم العينة النباتية، واسم المثبت المستخدم، وأخيراً اسم الطالب الذي قام بالعمل. أو أن تتم الكتابة على السطح الخارجي للزجاجة بقلم كحولي لا يتأثر بالكحول.



شكل 43: أوعية زجاجية ذات أحجام مختلفة تستخدم في التثبيت.

و إذا كانت الأعضاء المحررة مغطاة بالدم، فإنه يفضل غسلها بالماء الفزيولوجي قبل وضعها في المثبت. وفي حالة الأعضاء الرخوة (كالطحال مثلاً)، لا مانع من تثبيت قطع كبيرة الحجم نسبياً في بيشر لمدة قصيرة حتى تتماسك، ثم تقطع بعد ذلك إلى قطع صغيرة الحجم، وتوضع من جديد في قارورات صغيرة مملوءة بمثبت نظيف.

أما في حالة الأعضاء ذات المقطع الدائري (كالشريان، معي ...)، فيفضل حقن سائل التثبيت في داخلها بواسطة محقنة syringe، ليتم المحافظة على مقطعها الدائري، ولضمان دخول المثبت إلى تجويفها الداخلي .

و في حالة الأعضاء المسطحة (كالمثانة)، فيجب فرد قطعة من المثانة على قطعة من الورق المقوى، ثم تغمس المثانة والكرتونة في المثبت من أجل الحفاظ على شكلها المسطح، وكذلك الأمر في حالة النسيج الرخوة الطرية، أو يمكن تثبيتها بالدبابيس على قطعة فلين أو على قاعدة شمعية، ثم صب المثبت عليها، كما هو الحال في النسيج الدهني أو المساريقا.

أما في العينات النباتية: خذ قطعة صغيرة من عضو نباتي معين (ورقة، ساق، جذر، برعم ورقي أو برعم زهري ...) وثبتها في مثبت FAA أو مثبت كارنوا.

2- تثبيت العينة:

إن الغرض الأساسي من التثبيت هو الحفاظ على طبيعة التراكيب النسيجية والخلوية أقرب ما تكون إلى طبيعتها الأصلية وهذا يستوجب الكبح أو الحد من التغيرات التي تحصل بعد الوفاة بأسرع فرصة ممكنة، ولكي تصمد للعمليات التي تمر بها في أثناء الإعداد للدراسة مثل النقطيع أو التلوين. والجدير بالمعرفة أنه لا يوجد مثبت مثالي يناسب جميع الأغراض بل تحدد الدراسة نوع المثبت الواجب استعماله.

فمن المعروف أن الدراسات الخلوية يتقادم فيها استعمال المثبتات المخثرة القوية، لأنها تحطم الكثير من التراكيب السيتوبلازمية، لكن يفضل استخدام المثبتات غير المخثرة مثل كرومات البوتاسيوم الثنائية. أما في الدراسات النسيجية فيفضل عادة استخدام مثبتات مخثرة قوية، لأنها تجعل النسيج في حالة تساعد على عمليات النقطيع والتلوين، ولأن التراكيب السيتوبلازمية الدقيقة تكون غير ذات أهمية عظمى. وبما أن المثبتات تنفذ وتتفاعل مع النسيج عند سرعات مختلفة تبعاً لنوع المثبت وسمك النسيج، لذا يجب تصغير حجم العينة المراد تثبيتها بحيث لا تزيد عن (2-5 mm) ، (كلما كانت سرعة نفاذ المثبت بطيئة وجب تصغير حجم العينة).

أما مدة التثبيت المثالية فيجب أن تحدد بالقيام بالعديد من التجارب كما أن كمية المثبت المستعملة يجب أن تكون أكبر بحوالي 20 مرة من العينة المثبتة. وتؤدي درجة الحرارة دوراً مهماً في عملية التثبيت، لكن معظم المثبتات النسيجية يمكن استعمالها عند درجة حرارة الغرفة. ويمكن تثبيت العينة بالحرارة العالية كما هي الحال عليه في دراسة الكروموسومات أو التبريد المنخفض كما في الدراسات الأنزيمية.

وقد سُرحَت المثبتات وكيفية تحضيرها وأنواعها بشيء من التفصيل في الفصل الثالث من هذا الكتاب .

العمل المخبري لتثبيت العينات الحيوانية:

بعد تشريح حيوان فقاري (مثلاً الأرنب) خذ قطعاً صغيرة الحجم (حوالي 5 mm³) وضعها في مثبت عام (مثبت بوان)، وذلك من أعضاء مختلفة كالمرى والمعدة والمعى والرغامى والحالب والمثانة والأوعية الدموية و الرحم و البريخ و....الخ، وإذا أردت تثبيت الكلية فمن الأفضل وضعها في مثبت كحولي. أما الأعضاء العصبية كالنخاع الشوكي أو المخيخ أو العصب فمن الأفضل تثبيتها في محلول الفورمالين 10% أو في كحول 70 % ، وكذلك الأمر بالنسبة إلى

الخصية أو المبيض والغدد، فيفضل تثبيتهم في كحول 70 % . يمكن أيضاً تثبيت قطع نسيجية بهدف الكشف الكيميائي النسيجي فيها: ثبت قطعة من الكبد أو العضلات في مثبت جندر، أو في أي مثبت كحولي آخر وذلك لترسيب الغليكوجين. ويمكن تثبيت قطعة كبدية وقطعة من الطحال في الفورمالين 10% للكشف عن الحديد في أنسجتهما. وأخيراً ثبت قطعة من المعى أو الخصية في مثبت ليللي بهدف الكشف عن الـDNA. وإذا أردت الكشف عن البروتين فبإمكانك تثبيت قطعة من العضلات في كحول 90% .

العمل المخبري لتثبيت العينات النباتية :

خذ قطعة من ساق أحادي الفلقة وقطعة أخرى من ساق ثنائي الفلقة وثبتهما في مثبت FAA.

3- غسل العينة:

بعد إتمام عملية التثبيت نتخلص من آثار المثبت المتبقية في العينة التي قد تؤثر سلباً في خطوات التحضير اللاحقة. وتغسل غالباً باستخدام الماء الجاري، ولكنها في الحقيقة تتوقف على نوعية المثبت المستخدم كما يلي:

1- إن العينات المثبتة في مثبت بوان يجب غسلها في كحول 70% حتى يزول اللون الأصفر من محلول الغسيل والنواتج عن حمض البكريك، أو أن تغسل بمحلول فحمات الليتيوم المشبع حتى زوال اللون الأصفر.

2- العينات المثبتة في مثبت كلوريد الزئبق مثل مثبت زنكر، فيجب غسلها في كحول 95% مضافاً إليه كمية من اليود (محلول كحولي مشبع باليود)، وتتراوح مدة الغسيل بين 5 - 8 ساعات. ووظيفة اليود هي إزالة كلوريد الزئبق من العينة وذلك للتخلص من الترسبات السوداء والتي تظهر بعد صبغ المقاطع وسببها كلوريد الزئبق.

3- العينات المثبتة في مثبت روسمان الذي لا يدخل الماء في تركيبه، تغسل في كحول 95%.

4- العينات المثبتة في الفورمالين، فعادة تغسل بماء الصنبور الجاري لمدة 24 ساعة على الأقل حتى يتخلص من آثار هذا المثبت، أو أن تغسل بمحلول الامونياك (1 ml أمونياك في كحول 75%) للتخلص من بقايا الأصبغة الفورمولية أو يضاف هيدروكسيد البوتاسيوم 1% إلى كحول 70% للتخلص من أصبغة الفورمالين البنية اللون.

5- العينات المثبتة بالكحول ليست بحاجة إلى غسيل وإنما تنقل مباشرة إلى كحول 96% .

ومن المعلوم أنه بعد انتهاء عملية غسل العينة بالإمكان حفظها في كحول 70%، إلا أنه يفضل القيام بعملية نزع الماء وطمر العينة في شمع البرافين مباشرة بعد الغسل. كما يُفضل نقل القطع النباتية وقطع الرئة الحيوانية إلى مخلية الهواء لسحب الهواء المحصور في الفجوات مدة ساعتين على الأقل .

العمل المخبري لغسيل العينات: اغسل العينات التي قمت بتثبيتها، كما ذكرنا أعلاه.

4- نزع الماء من العينة:

لا بد من إزالة الماء من العينة لأن بقاء الماء فيها يؤدي إلى تلفها وتفسخها وعدم تشربها بالشمع لاحقاً. تتوفر عدة أوساط لإزالة الماء من النسيج بعد غسلها. منها الكحول الإيثيلي، والكحول الميتيلي، والأسيتون، والديوكسان، والبيوتانول، وكذلك الأيزوبروبانول . في الحقيقة يعد كحول الإيزوبروبانول معادلاً للكحول الإيثيلي في الجودة ككحول نازع للماء، ويمتاز بأنه لا يسبب أي انكماش أو صلابة للأنسجة الخلوية فيما لو قورن بالكحول الأيثيلي، ولعل من أهم عيوب كحول الإيزوبروبانول عدم صلاحيته مع العينات المراد طمرها في مادة النيتروسليلوز (Nitrocellulose) نظراً إلى عدم ذوبان هذه المادة فيه كما أن معظم الأصباغ المعروفة لا تذوب فيه أيضاً.

وبشكل عام يستعمل الكحول الإيثيلي باعتباره وسطاً مناسباً لإزالة الماء و بشكل متدرج، ويتطلب هذا الأمر تحضير تركيزات مختلفة من الوسط المختار لهذه الغاية. ولعمل تركيزات مختلفة منه يستعمل الكحول ذو التركيز 95% باعتباره مصدراً مناسباً، وذلك لخص ثمنه وسهولة الحصول عليه، مقارنة بالكحول المطلق.

تحضير الكحولات مختلفة التركيز: يمكن إتباع إحدى الطريقتين الآتيتين لتحضير التركيز المطلوب:

أ- الطريقة الأولى:

يؤخذ حجم من الكحول ذي التركيز العالي (95% مثلاً) يعادل قيمة التركيز المطلوب (70%) مثلاً، ويوضع في مخبر مدرج. تطرح قيمة التركيز المطلوب من قيمة التركيز العالي، وتضاف قيمة الفرق كماء مقطر إلى الكحول في المخبر المدرج.

مثال:

%95	قيمة التركيز العالي
%70	قيمة التركيز المطلوب
ml 190	حجم الكحول المطلوب

الحل:

يوضع 70 ml من الكحول 95% في إنبوب مدرج.
يضاف 25 ml ماء مقطر (95-70) إلى الأنبوب المدرج أعلاه. وبذلك يمكن الحصول على 95 ml من كحول تركيزه 70%.
واضح أن الكمية المطلوبة هي ضعف هذا الحجم. لذا، يؤخذ 140 (2x70) ml من الكحول 95% ويضاف إليه 50 (2x25) ml ماء مقطر .

ب- الطريقة الثانية:

تعتمد هذه الطريقة على المعادلة الآتية:

ت 1 x ح 1 = ت 2 x ح 2 ، حيث ترمز هذه الحروف والارقام إلى:

ت 1: قيمة التركيز العالي = 95%

ت 2: قيمة التركيز المطلوب = 70%

ح 1: حجم الكحول ذي التركيز العالي، وهو المطلوب معرفته.

ح 2: حجم الكحول ذي التركيز المطلوب، وهو 190 مل.

وإذا ما وضعت هذه الأرقام في أماكنها المناسبة في المعادلة المذكورة فإننا نحصل على:

$$190 \times 70 = 1 \times 95$$

ولذا فإن حجم الكحول ذي التركيز الأعلى اللازم هو:

$$140 \text{ مل} = \frac{70 \times 190}{95}$$

ويكون حجم الماء المطلوب إضافته 190 - 140 = 50 مل. ويمكن استعمال إحدى الطريقتين لتحضير تركيزات مختلفة لأي مزيج للماء.

إزالة الماء في العمل المخبري:

قم بإجراء عدة حمامات للعينة تبدأ بكحولات متدرجة في التركيز من 50% ثم 70% ثم 90% ثم كحول مطلق 100% ، مدة كل حمام حوالي 30 دقيقة للعينة الحيوانية، ومدة ساعة إلى ساعتين للعينة النباتية ، ويفضل إجراء حمامين من الكحول المطلق لضمان نزع الماء من العينة. (يعتبر الكحول مطلقاً ، إذا لم تتجاوز نسبة الماء فيه 2% و للتأكد من أن نسبة الماء لا تزيد عن 2% في الكحول المطلق، يضاف 5 ml من الكحول إلى 5 ml من الكزايولين، فإذا لم يتغير لون المزيج يُعد الكحول مطلقاً).
يجب عدم ترك النسيج في الكحول 95% أو الكحول المطلق لأكثر من ساعتين في كل تركيز، لأن ذلك يؤدي إلى جعل النسيج قاسياً.
في القطع النباتية لابد من تليين الجدار الخلوي باستخدام الكحول البيوتيلي (البيوتانول) مدة 3 أيام ، وذلك بعد الانتهاء من عملية الغسيل وقبل نزع الماء.

5-ترويق العينة

من المعروف أن الكحولات المستخدمة في عمليات نزع الماء من أنسجة العينة لا تمتزج مع شمع البرافين، لذا يجب التخلص من جميع آثارها في العينة، وذلك بغسل العينة بمادة تمتزج مع الكحول من جهة ومع مادة الطمر الشمعية من جهة أخرى. وتتوفر عدة وسائط لترويق النسيج بعد إزالة الماء نذكر منها: الكزايولين والكلوروفورم والتولوين وزيت خشب الآرز وزيت القرنفل وغيرها الكثير. وفي جميع الحالات يراعى عند اختيار الوسط المناسب ما يأتي:

- سهولة امتزاجه بوسط نزع الماء وهو الكحول.
- سهولة التخلص منه في فرن الشمع.
- اعتدال سعره، وسلامة تداوله.

ومن أوساط الترويق المستخدمة في تحضير العينة النسيجية نذكر:

- الكزايولين Xylene:

هذا الوسط يسبب تخريش في النسيج المخاطي الأنفي والعيني للمستخدم. إلا أنه شائع الاستعمال في مختبرات التحضير المجهرية ويعتبر من أفضل المروقات لأنه يضيف الشفافية على النسيج ويعطي فكرة جيدة عن إتمام عملية الترويق. فضلاً عن ذلك فإن الكزايولين لا يتطاير

بسرعة، ويمكن إخراجها من النسيج في أثناء التشريب بسرعة معقولة. من مساوئه أنه يسبب انكماش النسيج ويجعله هشاً إذا ما ترك فيه لمدة طويلة. وللتغلب على احتمال عدم إزالة الماء من النسيج بشكل مطلق، فإنه يفضل إضافة 30 g من الفينول إلى 70 ml من الكزايولين حتى لا يؤثر بقايا الماء في الخطوات اللاحقة.

- الكلوروفورم Chloroform:

يُعد من أفضل وسائط الترويق للإستعمالات العامة، نظراً إلى أنه لا يقسي النسيج كثيراً. ولذلك فإنه يفضل في ترويق الأجنة والنسج العصبية والعظمية. غير أن الكلوروفورم بطيء في ترويق النسج مقارنة بالكزايولين.

- زيت خشب الآرز Cedarwood Oil:

يُعد الوسط المميز لترويق النسج الحيوانية وخاصة الأجنة، لأنه يسبب أقل قدر من إنكماش وتقسية النسج. غير أن ضعف امتزاجه مع بلسم كندا وارتفاع سعره، يجعل إستعماله محدوداً.

- زيت القرنفل Clove Oil:

يُعد مروقاً مثالياً للأنسجة النباتية، وخاصة المقاطع السمكية، ويمكن نقل النسج إليه مباشرة من الكحول 90%. إلا أنه يجعل النسج هشاً نوعاً ما، و يسبب إزالة ملونات السفرانين والهيماتوكسلين من النسج، وكذلك صعوبة امتزاجه ببلسم كندا، الأمر الذي يحد من استعماله.

- تيربينول Terpinol:

هذا الوسط جيد ومفضل بسبب عدم تقسيته للأنسجة حتى ولو تركت فيه لمدة طويلة، وكذلك إمكانية نقل النسج إليه من كحول 80%. وهو وسط جيد لترويق تحضيرات كاملة من حيوانات دقيقة تعيش في المياه العذبة.

- المروق النسيجي histo-clear: من المواد الحديثة الاستعمال في ترويق النسج، فهي غير سامة وغير قابلة للاشتعال، ولا تتطلق منها أبخرة متطايرة سامة أو مخرشة ولكنها غالية الثمن.

- العمل المخبري:

ضع كمية قليلة من الكزاليين في أنبوب صغير، ثم أضف إليه العينة بواسطة الملقط. إن ترويق قطع نسيجية عامة بالكزاليين، يتطلب تغيير وسط الترويق مرتين أو ثلاث مرات بحيث تتراوح المدة من ساعة إلى ساعتين لكل حمام. أما بالنسبة للمقاطع النسيجية، فإنها تروق مرتين أو ثلاث مرات، بحيث تتراوح فترة كل منها بين ثلاث وست دقائق.

6- التشريب والظمر:

بعد نزع الماء من العينة وترويقها، تصبح النسيج الحيوانية وبعض النسيج النباتية لينة رقيقة ومن المتعذر إجراء مقاطع رقيقة منها إلا إذا دُعِمت أو قويت بمادة تتخللها وتحيط بها. هذه مهمة مادة الظمر، ولكي تتم هذه العملية على نحو مرضي، لا بد أن يكون قوام النسيج وقوام وسط الظمر متجانسين تماماً. وهذا لا يتأتى إلا إذا تخلل وسط الظمر كل خلايا النسيج وجميع أجزائه وحيزاته والفراغات بين الخلايا، أي أن يكون النسيج متشرباً بوسط الظمر، ومن ثم يتصلب هذا الوسط بحيث يمكن لسكين حادة أن تقطعه إلى مقاطع رقيقة لا تنهتك أو تنفقت. مما تقدم يتضح أن هناك شرطاً يجب توفره في وسط الظمر وهو التحول من السيولة إلى الصلابة تحت ظروف في متناول اليد. ففي مرحلة التشريب يكون الوسط سائلاً، وبانتهاء هذه المرحلة يجري تغيير الظروف الفيزيائية بحيث يتبدل الوسط إلى صلب ويضفي على النسيج الدعامة المطلوبة. من هذه المواد نذكر شمع البرافين Parafin والجيلاتين Gelatin والسيلوبيدين Celloidin والآغار Agar وغيرها...

- شمع البرافين:

وهو عبارة عن خليط من الهيدروكربونات الأليفاتية ذات المعادلة العامة C_nH_{2n+2} إذ تكون n عادة بين 21 و 34. وهذه التباينات وكذلك وجود مقادير متفاوتة من الشوائب هي المسؤولة عن اختلاف العينات التجارية فيما بينها. فحتى البرافين الذي يباع للاستعمال في الدراسات النسيجية هو عبارة عن خليط تقع درجة انصهاره في مدى يبلغ $55 \pm 2^\circ C$ مئوية. وهناك نوعان من البرافين للاستخدام النسيجي أحدهما طري درجة انصهاره 55-56 درجة مئوية (يستخدم في ظمر العينات الحيوانية)، والنوع الآخر صلب درجة انصهاره 58-60 درجة مئوية (يستخدم للعينات

النباتية عادة). في معظم الحالات تدعو الضرورة إلى ترشيح شمع البرافين التجاري قبل استخدامه في الفرن وبدرجة حرارة تتراوح بين 55- 60 درجة مئوية وباستخدام ورق ترشيح عادي (شكل 44).



شكل 44: شمع حبيبي نقي وشمع تجاري

وفيما يتعلق بصفات الشمع نذكر أن هذا الوسط لا يختلط بالمواد الآتية: الماء، الكحول الميثيلي والبروبانول والغليسرين وبنزات الميثيل وسليسيلات الميثيل . وعلى العكس من ذلك فإنه يختلط بالإيثر والأنيلين والديوكسان والبيوتانول والكلوروفورم وزيت خشب الأرز وثاني أكسيد الكربون والهيدروكربونات البنزينية. إن **شمع البرافين** من وسائط الطمر الأكثر استعمالاً في مخابر التحضير المخبري لأسباب عدة، منها سهولة الحصول عليه ورخص ثمنه وسهولة التعامل معه .

- الجيلاتين:

يستخدم في الحالات التي يراد فيها تجنب تعريض النسيج لعمليات إزالة الماء وللمحاليل المذيبة كما في الدهون، وكذلك في الحالات التي يرغب فيها تجنب تعريض النسيج لدرجات حرارة عالية كالأنزيمات . ويستخدم عادة مثبت فورمالين كالسيوم . أما وسط الطمر فيتكون من:

g 15	مسحوق جيلاتين gelatin
ml 15	غليسرين glycerine
ml 70	ماء مقطر distilled water
بلورة صغيرة	ثيمول thymol
ml 20	فورم الدهيد 40% formaldehyde

تثبت قطعاً صغيرة من النسيج لمدة 10 - 15 ساعة في مثبت الفورمالين كالسيوم عند درجة حرارة 4°C مئوية. ثم تغسل في ماء جار لمدة 30 دقيقة. وبعد ذلك يطمر النسيج في وسط الطمر الجيلاتيني داخل الفرن عند درجة حرارة 37°C مئوية لمدة ساعة. تجمد كتلة الجيلاتين المحتوية على النسيج بوضعها في محلول 35 - 40% فورمالدهيد. و تقطع على جهاز القطع الجليدي مباشرة، ويمكن حفظ المقاطع عند درجة 4°C مئوية.

- الأغار:

تستخدم هذه الطريقة أيضاً لمعالجة النسيج التي يراد قطعها بجهاز التقطيع المجمد. ويكون المثبت محلول فورمالين 10%. ضع قطعة النسيج المراد قطعها في 5 ml من محلول فورمالين 10% وسخنها برفق حتى الغليان. ثم اسكب الفورمالين واستبدله في الحال بمحلول الأغار 2%، يكون قد سبق تسخينه إلى نقطة الإنصهار. إغل برفق لمدة دقيقة واحدة. اسكب الآجار وارفع العينة بملقط وضعها على قرص خاص داخل جهاز التقطيع المجمد، وجدها بواسطة غاز ثاني أكسيد الكربون وأعمل المقاطع المطلوبة. تجدر الإشارة هنا إلى أن الأغار لا يلتقط صبغة الهيماتوكسلين والإيوزين، وهو يختلف في ذلك عن الجيلاتين الذي يصبغ بسهولة ولاسيما بالأصباغ القاعدية.

وبشكل عام: تعتمد الطريقة العامة للطمر على:

- 1- صفات الشمع المذكورة أعلاه.
- 2- إزالة الماء تماماً من العينة.
- 3- الترويق بواسطة سائل يختلط بشمع البرافين اختلاطاً تاماً كالكزايلين.
- 4- التشريب بشمع البرافين السائل.
- 5- الطمر وتشكيل كتلة الشمع حول النسيج على شكل قالب شمعي.

العمل المخبري:

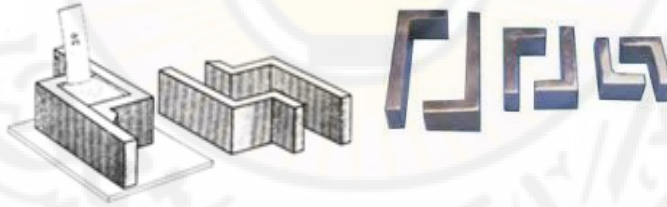
أ- **التشريب:** بعد إزالة الماء بكحولات متزايدة التركيز، يوضع النسيج في سائل الترويق كالكزايلين، ثم يشرب النسيج بشمع البرافين السائل في فرن مناسب عند درجة حرارة تتراوح بين 55 - 60°C مئوية (حسب نوع البرافين ونقاوته) وتعتمد مدة التشريب وعدد تغييرات الحمام

الشمعي على حجم العينة وقوام النسيج نفسه، وبشكل عام يُجرى 3 حمامات تشريب بالشمع مدة كل منها 2 ساعة للنسج الحيوانية و من 8-24 ساعة للنسج النباتية، أما اختيار شمع البرافين الذي تكون له درجة انصهار معينة، فيعتمد على معدل درجة الحرارة في مكان العمل (في الشتاء نستعمل البرافين الطري وفي الصيف البرافين الصلب بالنسبة للعينات الحيوانية، أما العينات النباتية فنستعمل دائماً شمع صلب)، وعلى طبيعة النسيج موضع الدراسة (مدة تشريب قطعة الكبد تحتاج إلى 2 ساعة في الحمام الواحد، بينما تحتاج قطعة الجلد إلى 8 ساعات تشريب للحمام الواحد). إن تشريب قطعة نسيجية نباتية بالشمع، تحتاج إلى وقت أطول من تشريب قطعة نسيجية حيوانية.

ب- الطمر (صب القوالب): الهدف من هذه الخطوة هو وضع العينة في قالب

شمعي يعرف بالبلوك (Block). وتتم وفق الخطوات الآتية :

- 1- يستخدم لعملية الطمر قالب مكون من قطعتين معدنيتين متقابلتين كل منها على شكل حرف L وتسمى قضبان لوكار Locar، توضعان على قاعدة من صفيحة معدنية أو قطعة بورسلين ذات سطح ناعم وأملس (شكل 45).



شكل 45: قضبان لوكار وكيفية تشكيل القالب منها .

وهناك في الأسواق نماذج أخرى لقوالب صب العينات في البرافين (شكل 46).



شكل 46: نماذج مختلفة من قوالب طمر العينة بالشمع

2- تظلى سطوح قوالب الطمر المعدنية أو الورقية طلياً خفيفاً بالجليسرين لمنع الشمع من الالتصاق بها عند تجمده.

3- يملأ القالب إلى ما قبل حافته العليا بشمع البرافين المنصهر النقي المرشح .

4- تحمل العينة من آخر حمام شمعي برفق وذلك باستخدام ملقط دافئ (ذلك بتسخينة على مصباح لهب كحولي) ثم تنقل العينة إلى الشمع الذي صب في القالب وتوضع قريبة من القاعدة ومن الجهة الأمامية للقالب ويضبط اتجاهها في الوضع المطلوب (أي توجيه العينة).

5- توضع ورقة كرتونية في الطرف المقابل للعينة بحيث تلتصق بالسطح الداخلي لجانب القالب الخلفي ويكتب عليها معلومات خاصة بالعينة كإسم العينة، ونوع المثبت، ونوع العضو، وإسم الطالب الذي قام بالعمل.

6- يجب أن نحرك سطح الشمع وقبل تجمده بالملقط الدافئ لخروج فقاعات الهواء من القالب وعدم تشكل فجوة هوائية على سطحه، و بعد أن يتجمد سطح الشمع، تسرع عملية التجمد بغمر القالب في ماء بارد أو وضعه في الثلجة (ويمكن تركه ليتجمد بشكل تلقائي بحرارة المختبر).

7- عندما تتجمد الكتلة تماماً يجب إخراجها من القالب، وقد يحدث هذا تلقائياً إذا كان الغليسرين قد استخدم في (تشحيم) جوانب القالب. وإذا لم يحدث تلقائياً فإن طريقة خفيفة على قاعدة القالب تكفي لفصل كتلة الشمع عنه.

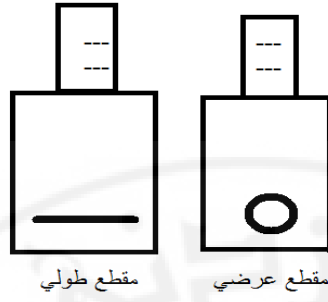
8- إذا تعذر إجراء عملية القطع عقب الطمر مباشرة، يمكن تخزين قالب الشمع، في مكان بارد في علبة كرتونية لحين توفر الظروف المناسبة للقيام بعملية التقطيع.

- توجيه العينة:

تكون العينة موجودة في الطرف المقابل للورقة المغموسة في القالب، وهذا يعني أن التقطيع سيكون من الطرف المقابل للورقة بشكل دائم، وعليه فإنه عند إجراء مقاطع طولية أو عرضية يتم بتوجيه العينة للقطع بشكل طولي أو عرضي عند وضعها في قالب الشمع (شكل 47):

أ- في حال المقطع الطولي توضع العينة موازية بشكل طولي للسطح الأمامي للقالب (كما هو الحال في دراسة العضلات)

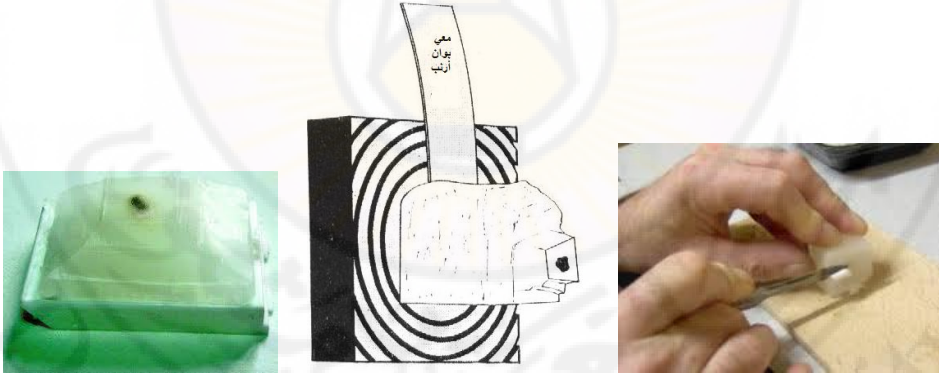
ب- في حال المقطع العرضي توضع العينة عمودية على السطح الأمامي للقالب (كما في المري أو الحالب).



شكل 47: توجيه العينة في القالب الشمعي (الوجه الأمامي للقالب).

7- التشذيب (نحت القالب):

المقصود بالتشذيب Trimming هو عملية نحت القالب للتخلص من البارافين الزائد حول العينة باستعمال مشرط حاد، وتتم العملية بنحت محيط العينة بحيث تبرز العينة بشكل مكعب أمام القالب، و يجب أن تكون عملية التشذيب منتظمة، أي أن تكون أضلاع المكعب متوازية و خاصة العلوية و السفلية منها، لأن الأضلاع غير المتوازية، تؤدي إلى انحراف شريط المقاطع المتسلسلة عند القطع إلى اليمين أو إلى اليسار. (شكل 48).



شكل 48: النحت أو تشذيب القالب.

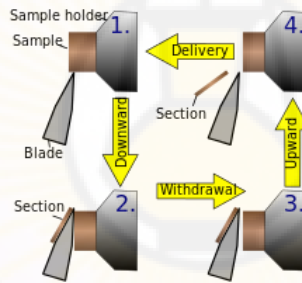
8- التقطيع:

تتم عملية تقطيع النسيج إلى قطاعات Sections رقيقة جداً بأجهزة خاصة تعرف باسم المقطاع (Microtomes) وهي عملية تحتاج إلى بذل كثير من الجهد والوقت، لكنها تعطي

نتائج طبية وبالذات عند دراسة العينة على مستواها النسيجي. وسوف نكتفي بتوضيح عمل المقاطع الشمعية بواسطة المقطاع اليدوي، وهذه تحتاج إلى خطوات عديدة سنوجزها فيما يأتي:

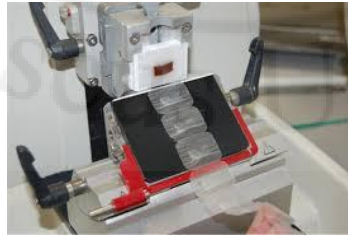
العمل المخبري:

1. أوقف حركة العجلة الجانبية باستعمال مسمار الأمان.
2. ثبت قالب الشمع المشذب في مكانه على حامل القطع.
3. ثبت السكين في مكانها على حامل السكين و اضبط درجة ميلانها. يوجد مؤشر على جانبي المقطاع تحت حامل السكين، مدرج من 0-20 يضبط درجة ميلان السكين.
4. ضبط عداد القطع على درجة كبيرة و لتكن 30-20 ميكرونًا، في البداية وذلك لإزالة الشمع الفائض أمام العينة.
5. أبعد مسمار الأمان من مكانه وابدأ بتدوير عجلة الميكروتوم باتجاه عقارب الساعة، فيقترب حامل القطع من السكين، تابع التقطيع حتى ظهور العينة. لاحظ أن تحريك عجلة المقطاع دائرة كاملة، يؤدي إلى قطع مقطع واحد (شكل 49).



شكل 49: آلية التقطيع

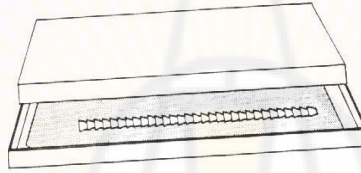
6. ثبت عداد القطع على الدرجة المطلوبة (5-7 ميكرون)، و لتكن 6 ميكرون.
7. ابدأ بالقطع مرة أخرى، بتحريك العجلة حركة دورانية منتظمة، فتظهر المقاطع على السكين بشكل شريط متسلسل (شكل 50). لاحظ أن للشريط المتسلسل وجهين : وجه لامع مصقول للأسفل من جهة السكين، ووجه ناشف (مت) من الأعلى.



شكل 50: التقطيع و تشكيل شريط الشمع

8. أوقف الحركة وثبت مسمار الأمان في مكانه.
9. ارفع شريط مقاطع البارافين المتسلسلة بواسطة فرشاة ناعمة ورطبة من طرفيه وبهدوء، وضعه جانباً على قطعة كرتون قائمة اللون، بحيث يكون وجهه اللامع للأسفل. وانتبه إلى عدم نفث الهواء قريباً من الشريط كي لا تتطاير المقاطع. إذا كان الهدف من التقطيع هو الحصول على مقاطع متسلسلة (كما هو الحال في تقطيع الأجنة) فيجب الحفاظ على تسلسل المقاطع وترقيمها إن لزم الأمر وخاصة عند حفظها في علبة كرتونية لحين اللصق (شكل 51). أما إذا كان الهدف دراسة مقاطع لا على التعيين (كما هو الحال في دراسة المقاطع النسيجية)، فإنه ليس من الضروري الحفاظ على تسلسل المقاطع.

10. يمكن اختيار المقاطع المناسبة من أجل تحميلها على الشريحة .



شكل 51: وضع شريط البارافين في علبة وحفظه لحين اللصق

- مشكلات التقطيع والحلول المقترحة:

1- عدم تشكل المقاطع :

- وهذا بسبب أن حامل القطع يكون قد وصل إلى حده النهائي، ولهذا يجب إعادته إلى نقطة البداية (عن طريق عجلة موجودة على يسار المقطاع)،
- أو أن السكين بعيدة عن حامل العينة، فيجب تقريبها من القالب بواسطة مزلاج خاص بها يقع أسفل حامل السكين.
- كما أن درجة ميلان السكين بدرجة غير مناسبة وفي وضع غير صحيح يؤدي إلى عدم تشكل المقاطع .

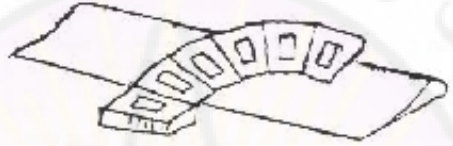
2- التصاق المقاطع ببعضها أو بالسكين وعدم تشكل شريط بارافيني، وله أسباب كثيرة منها:

- ارتفاع درجة حرارة المختبر .
- ليونة البارافين، فيجب تبريد المختبر، أو وضع العينة في البراد.

- درجة ميلان السكين تكون قليلة.
- حافة السكين تكون متسخة بالشمع فيجب مسحها بقطعة شاش مبلة بالكزيلول.

3- انحناء المقاطع إلى اليمين أو اليسار:

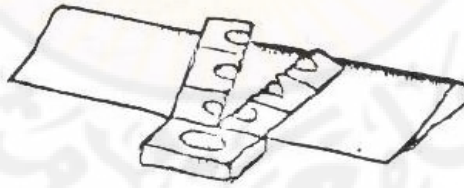
- سببه أن تشذيب القالب سيء، وأن حواف التشذيب غير متوازية. يجب تصحيح التشذيب بحيث تكون الحافتان العلوية والسفلية متوازيتين. (شكل 52).



شكل 52: انحناء الشريط البارافيني نحو الجانب

4- ظهور تشققات في المقاطع وتمزقها:

- وهذا سببه وجود أثلام مجهرية وعدم شحذ السكين.
- كما أن إتساخ السكين بالبارافين والتصاقه عليها يسبب تمزق المقاطع، فيجب شحذ السكين وتنظيفها. (وفي حال استخدام الشفرة يجب تبديلها). (شكل 53).



شكل 53: تمزق المقاطع في أثناء التقطيع.

- ### 5- انفصال العينة عن قالب البارافين: سببه أن عملية صب البارافين غير ناجحة، تكون قد تمت بشمع صلب أو بارد. ويتم إصلاح ذلك بإعادة الصب مرة أخرى.

6- تقنت العينة عند التقطيع سببه:

- بسبب احتواء العينة على الماء وعدم تشربها بالبارافين بشكل جيد، يجب تحضير عينة جديدة.

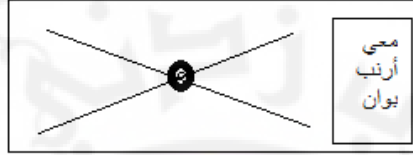
- كما أن بقاء العينة في المثبت أو في الكزايلين فترة طويلة من الزمن، يسبب قساوة لها وهذا يؤدي إلى تفتتها عند القطع، لذلك يجب تثبيت عينة جديدة.
- 7- سماع صوت معدني في أثناء التقطيع: سببه إما التركيب الخاطئ للسكين أو انحلال بعض البراغي في الجهاز، فيجب التحري عن السبب.
- 8- عدم انتظام سماكة المقاطع: سببه إهتزاز السكين نتيجة ميلها الزائد، لذا يجب إحكام تثبيت السكين و تقليل ميلها.
- 9- وجود ثقب في المقطع: وسببه وجود فقاعات هوائية بقالب البارافين، بسبب الطمر بشمع بارد، لذا علينا إعادة الصب مرة أخرى.
- 10- مساحة المقطع المقطوع أقل من مساحته على سطح القالب:
 - بسبب ميل السكين كثيراً للأمام. يجب الانتباه إلى درجة ميل السكين.
 - أو أن توجيه العينة مائلة يجب إعادة صب العينة وتوجيهها بشكل صحيح .
- 11- المقاطع مضغوطة: بسبب كون السكين غير حادة أو أن الشمع المستعمل في عملية الصب لين .
- 11- يرتفع الشريط مع القالب بسبب وجود الكهرباء الساكنة، في هذه الحالة يجب رفع نسبة الرطوبة في المختبر أو هناك قطع من الشمع ملتصقة بالسكين أو القالب وفي هذه الحالة يجب تنظيفها.
- 9- لصق المقاطع وفرش الشريط الشمعي على الشرائح:

إن المقصود باللصق هو مد شريط البارافين الحاوي على المقطع النسيجي وفرده على الصفيحة الزجاجية slide. يمكن إستعمال الماء المقطر في عملية المد، كما يمكن استعمال سائل لصق يساعد على تثبيت المقاطع على الشرائح وعدم سقوطها في مراحل تالية. وتنفرد بمساعدة مصدر حراري (كالمناضد الحرارية)، ومن ثم تجفف الشرائح على صفيحة دافئة لمدة ساعة، بعد إزالة السائل الزائد بورقة ترشيح.

العمل المخبري:

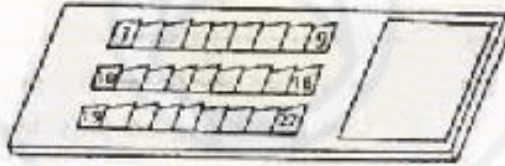
حضر أولاً كمية من الماء الجيلاتيني من أجل عملية اللصق، ثم سخن جهاز تدفئة الشرائح إلى درجة 45 C° مئوية، وابدأ بمد المقاطع التي قمت بقطعها على الصفيحة المجهرية وفق الخطوات الآتية:

1- اترك مسافة 1.5 - 2 سنيمتر من طرف الصفيحة الزجاجية لوضع لصاقة ورقية عليها فيما بعد، وذلك لكتابة المعلومات الخاصة بالمقطع النسيجي، ثم تفرش قطرة من الماء الجيلاتيني أو أي لاصق آخر في منتصف المسافة المتبقية من الصفيحة (شكل54).



شكل 54: مكان لصق المقطع على الشريحة المجهرية

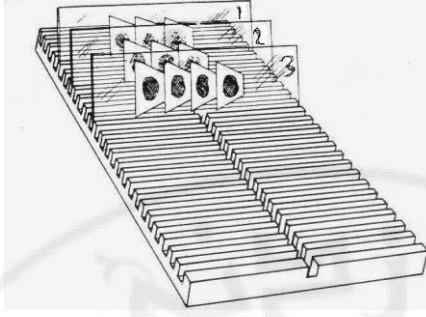
2- يُؤخذ مقطع أو أكثر من شريط المقاطع المتسلسلة، ويوضع فوق قطرة الماء الجيلاتيني، و يجب الانتباه عند وضع المقطع فوق الماء الجيلاتيني بحيث يكون الوجه اللامع باتجاه القطرة (نحو الأسفل). وفي حال لصق مقاطع متسلسلة (كما في مقاطع الأجنة) يجب الحفاظ على ترتيب المقاطع بحيث يتم لصقها وبشكل تسلسلي من اليسار إلى اليمين، ومن الأعلى إلى الأسفل ، كما هو موضح في (الشكل55).



شكل 55: لصق المقاطع على الصفيحة المجهرية وترتيبها المتسلسل

3- توضع الصفيحة الزجاجية slide التي عليها المقطع فوق سخان الصفائح وبحرارة 45°C مئوية من أجل تمديد المقطع وفرده، ولإمانع من الاستعانة بمسيري تشريح أو بدبوسين في عملية فرد المقطع وذلك بشده من طرفيه (من محيط المقطع الشمعي) دون تمزيقه.

4- يزال الفائض من الماء الجيلاتيني بورق النشاف، ثم توضع الصفيحة على حامل خاص للصفائح بالترتيب (شكل56).



شكل 56 : حامل الصفائح.

- 5- ضع حامل الصفائح في المحم وحرارة 45°C مئوية مدة 24 ساعة، ليتم تجفيف المقاطع و التصاقها بشكل جيد على الصفائح.
- 6- احفظ المقاطع في علبة خاصة ذات جوانب محززة و خلف بعضها، وغط العلبة منعاً من تسرب الغبار (شكل 62).
- 7- لاتنس تدوين المعلومات الخاصة بالمقطع على طرف الصفيحة، إما بالترقيم، أو بكتابة اسم العينة وذلك باستعمال قلم ألماس، أو بلصق قصاصة ورقية على طرف الصفيحة تُكتب عليها معلومات تتعلق بالعينة، أو تمزج مقادير متساوية من الماء الجيلاتيني و الحبر الصيني، ثم يستعمل المزيج في تعليم الصفائح والكتابة عليها.

- طريقة أخرى لللصق المقاطع (طريقة الحمام المائي):

يمكن لصق المقاطع باستعمال جهاز الحمام المائي (شكل 57).

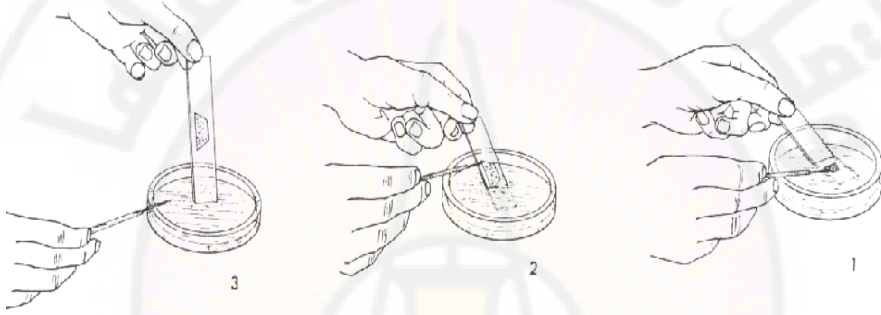


شكل 57: جهاز الحمام المائي.

العمل المخبري:

- 1- سخن الحمام المائي لدرجة 45°C مئوية.
- 2- خذ مقطعاً أو أكثر بواسطة المشروط، ثم ارفعه بفرشاة رطبة واتركه على سطح الماء الساخن، فيتمدد المقطع و ينبسط خلال دقيقة أو دقيقتين.

- 3- تدهن الصفيحة المجهرية بسائل اللصق (يفضل ماء زلاي- لاصق ماير) ثم يغمس طرف الصفيحة الزجاجية المدهونة بسائل اللصق في الماء الساخن ويسحب المقطع بمساعدة إبرة تشريح وبهدوء إلى منتصفها.
- 4- لامانع من إمالة الصفيحة للتخلص من الماء الزائد، أو سحبه بورق نشاف، ثم توضع الصفيحة على حامل الصفائح ويوضع الحامل في المحم وبحرارة 45°C مئوية (شكل 58).



شكل 58: لصق المقاطع على الصفيحة باستعمال الحمام المائي.

10- عملية التلوين:

إن طريقة التلوين تتحدد وفق الهدف من الدراسة، إلا أن المراحل التمهيدية ما قبل التلوين والمراحل ما بعد التلوين تكون متشابهة في كل طرق التلوين. للقيام بالتلوين لابد من استعمال أوعية خاصة لهذا الغرض. ولها أنماط عدة:

1- النمط الأول: عبوات مستطيلة الشكل ذات وجهين محززين متقابلين، بحيث تُحصر الصفائح المجهرية طولياً أو عرضياً بين هذين الوجهين (شكل 59)، و تتسع هذه العبوة إلى 5-8 صفائح، ويمكن أن تتسع إلى عدد مضاعف من 10-16 عند وضع الصفائح بشكل مضاعف ضمن المسرى الواحد (أي بشكل متعاكس ظهراً لظهور). وهنا يمكن الإكتفاء بحوض صبغ واحد لإجراء مراحل التلوين على أن تستبدل المواد اللازمة لذلك.



شكل 59: حوض تلوين محرز الجوانب (أفقي وعمودي).

2- النمط الثاني : يمكن استعمال سلال مع أحواض وتتسع السلة الواحدة من 12 - 25 صفيحة، وتوضع الصفائح المجهرية في مكانها المخصص لها في السلة، ثم تغطس السلة التي فيها المحضرات في حوض التلوين، وفي هذه الحالة تُستعمل عدة أحواض لإنجاز مراحل التلوين، وتنقل السلة من حوض لآخر عن طريق الحامل المعدني (شكل 60).



شكل 60: حوض تلوين له سلة

إن عملية التلوين هي عملية معاكسة للتثبيت، بمعنى أنه يجب إعادة الماء إلى المقطع حتى يتم تلوينه، حيث إن التلوين لا يحدث إلا في وسط مائي.

أما عن مراحل التلوين فيمكن إيجازها كالآتي:

1- نزع البارافين حول المقطع النسيجي : ويتم بالغسل بالتولوين أو الكزاليين بحمامين مدة كل منهما 5 - 10 دقائق، ويمكن زيادة المدة إذا كان المحلول مستعملاً مسبقاً لمرات عديدة.

2- إعادة الماء إلى المقطع أي التشريب بالماء : باستعمال كحولات متناقصة في التركيز تبدأ بالكحول المطلق، ثم بالكحول 95%، ثم الكحول 90%، ثم الكحول 70%، ثم الكحول 50%، ثم الماء المقطر.

ويمكن دعم المقاطع بالكولوديون وإعادة الماء معاً عن طريق معالجة المقاطع بالمزيجين الآتيين :

*مزيج 1: مدة المعالجة بهذا المزيج 2-3 دقائق. يتركب من :

50 ml	كحول مطلق
50 ml	إيتر
2 ml	كولوديون 2%

*مزيج 2: مدة المعالجة بهذا المزيج 1-2 دقيقة. يتركب من :

90 ml	كحول 95%
10 ml	فورمول

إذاً يتم نقل المقاطع عند المعالجة بالكولوديون من الكزاليين إلى مزيج 1، ثم إلى مزيج 2، ومن ثم إلى الماء المقطر، دون المرور بالكحولات المتناقصة في التركيز. تنفيذ طريقة الدعم بالكولوديون باختصار زمن إمالة المقاطع، كما تنفيذ في دعم المقاطع على الصفيحة خصوصاً في حالة التلوين بأصبغة ذات تفاعل قوي على النسيج كما هو الحال عند استعمال كاشف شيف .

ونشير إلى أن طريقة الدعم بالكولوديون تستعمل في دعم المقاطع الحيوانية فقط .

3- مرحلة التلوين: تنقل الصفائح إلى الملون المناسب، ولابد من الإشارة إلى أنه إذا كان الملون مائياً، فإنه يجب نقل الصفائح مباشرة من الماء المقطر إلى الملون، أما إذا كان الملون كحولياً، فيجب نقل الصفائح مباشرة من كحول 70% إلى الصباغ دون المرور بمرحلة الماء المقطر. توضع الصفيحة في الملون المناسب وبالزمن المناسب. وهذا يختلف حسب الهدف من عملية التلوين، ثم تغسل بالماء الجاري ثم بالماء المقطر لإزالة آثار التلوين الزائدة، إلا إذا كان الملون كحولياً فلا حاجة إلى غسل بالماء.

4- نزع الماء من المقطع النسيجي بعد عملية التلوين: ويتم ذلك بتمرير الصفائح في كحولات متزايدة التركيز إعتباراً من كحول 90% ثم كحول 95% ثم كحول مطلق، ويفضل إجراء حمامين في الكحول المطلق مدة كل منهما تتراوح ما بين 5-10 دقائق، وذلك لضمان نزع الماء. إن بقاء الماء في المقطع النسيجي يؤدي إلى تلفه.

5- الترويق أو التشفيف: إن بقاء الكحول في المقطع يجعل الصورة عاتمة غير شفافة ولايسمح بمرور الأشعة الضوئية من خلاله عند الفحص المجهرى. ولهذا لابد من نزع

الكحول من المقطع بعملية تسمى الترويق أو التشفيف، ويتم الترويق بنقل الصفائح من الكحول المطلق إلى محلول الكزايلين أو التولوين، وهنا يتوجب أن يبقى المحلول رائقاً ولا يشكل ضبابية حليبية اللون حول المقطع. إن تشكل الضبابية الحليبية في السائل يدل على بقاء الماء في المقطع وبهذه الحالة يجب إعادة سحب الماء مرة أخرى بإعادة المقطع إلى الكحول المطلق. و يفضل إجراء حمامين من الكزايلين مدة كل منها 5-10 دقائق.

العمل المخبري:

حضر المحاليل اللازمة لمراحل التلوين وضعها في أحواض التلوين، ثم رتب هذه الأحواض وفق مراحل التلوين. رتب الصفائح المجهرية في سلة التلوين. ولنجاح عملية التلوين لابد من الالتزام بالنصائح الآتية:

- 1- تحضير المحاليل و الملونات والأوعية اللازمة للعمل كافة قبل البدء بالتلوين، تفادياً للارتباك أثناء العمل.
- 2- يجب أن تكون الأوعية المستخدمة في العمل نظيفة.
- 3- تغطية العبوات، في أثناء مراحل التلوين لمنع تبخر المواد، وانتشار الروائح.
- 4- عند الانتقال من محلول لآخر يفضل التخلص من بقايا المحلول الأول بورق نشاف.
- 5- عدم غمس رؤوس الأصابع في المحاليل، لأنها قد تسبب أضراراً في الجلد ويفضل لبس قفازات أو نقل الصفائح بواسطة الملقط أو استخدام سلة التلوين.
- 6- عند إخراج المقاطع من الحاضنة (المحم)، يجب تركها قليلاً على الطاولة لتبرد، ثم نتابع العمل لأن التلوين المباشر يسبب تساقط المقاطع بسبب التفاوت الحراري الكبير بين المحم و حرارة المخبر.
- 7- الانتباه إلى ضرورة عدم جفاف المقاطع عند نقلها من مرحلة لأخرى، بل يجب أن تبقى رطبة.
- 8- يجب غمر المقاطع كلها بالمحاليل عند وضعها في أحواض التلوين ولو لم يتم غمر الصفيحة كلها.
- 9- لا يجوز مطلقاً استعمال الكحولات أو الكزايلين المستخدمة في بداية التلوين مرة أخرى في نهايته، وإنما يتم الفصل بين المواد المستعملة في بداية العمل ونهايته.
- 10- تحفظ الملونات في زجاجات قاتمة لأن بعضها يتخرب بالضوء، كما يجب حفظها بالبراد لأن بعضها يتخرب بالحرارة.

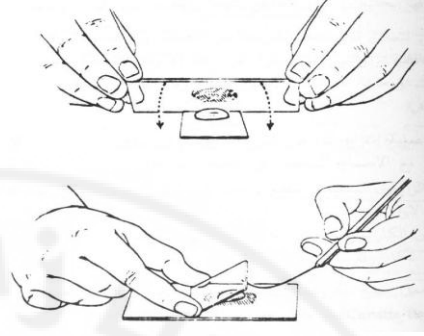
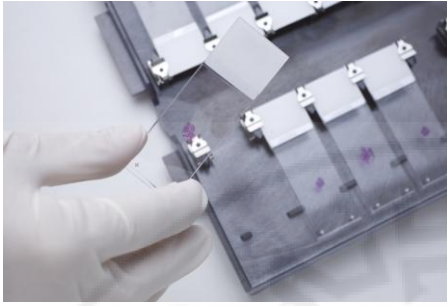
- 11- يجب الفصل بين المحاليل الأم والمحاليل المستعملة، فلا يجوز أبداً إعادة المحلول المستعمل إلى المحلول الأم، بل يجب إعادته إلى زجاجة خاصة به لأن المواد الملونة يمكن استعمالها لمرات عدة بعد ترشيحها.
- 12- ترشيح المواد الملونة قبل كل استعمال تفادياً لالتصاق الشوائب على المقطع النسيجي.
- 13- بعد الغسل بالماء الجاري، يُعاد الغسل ثانية بالماء المقطر.
- 14- يمكن إطالة زمن التلوين إذا كانت محاليل التلوين قد استعملت مرات عدة. يقوم الطالب بتلوين العينات التي حضرها. وقطعها، مستخدماً الطرائق التي يحددها له الأستاذ المشرف بما يتفق مع الهدف من الدراسة.

11-التغطية والستر:

وهي المرحلة الاخيرة من اعداد المحضرات النسيجية .

- العمل المخبري:

- 1- ترفع الصفيحة الزجاجية من آخر حمام اكزاليين، وتمسك بين السبابة والإبهام، ثم ينظف محيط المقطع النسيجي بقطعة شاش جافة، ويمكن استعمال رأس مدبب (رأس المشروط أو دبوس أو رأس الحربة) في إزالة بقايا سائل اللصق الملونة حول المقطع النسيجي. يجب الانتباه إلى عدم جفاف المقطع، وفي هذه الحالة يجب إعادته إلى الكزاليين مرة أخرى من أجل ترطيبه.
- 2- توضع قطرة من سائل التغطية (بلسم كندا مثلاً) فوق النسيج الرطب.
- 3- تمسك الساترة المناسبة بين الإبهام و السبابة وتوضع بشكل مائل على الصفيحة المجهرية وقريبة من المقطع النسيجي وبزاوية 45° تقريباً، ثم تنزل ببطء فوق المقطع وفوق قطرة البلسم، فيتمدد البلسم وينتشر تحت الساترة .
- 4- لآمانع من الضغط بهدوء على الساترة، لطرد الفقاعات الهوائية إن وجدت، ولتمديد السائل تحت الساترة وتوضع بشكل أفقي على صينية لتجف بدرجة حرارة المختبر، ومن الأفضل وضع المحضرات في المحم مدة يوم كامل (بحرارة 45 C° مئوية) حتى تجف.
- 5- يلصق على أحد جانبي الصفيحة لصاقة ورقية ويكتب عليها المعلومات الآتية : اسم العينة، و المثبت المستعمل، و الملون، و أخيراً اسم الطالب الذي قام بالعمل (شكل 61).



شكل 61: التغطية بالبلسم و الساترة.

- ملاحظات عامة حول التغطية :

- 1- ضع قطرة صغيرة من سائل التغطية ولا تزد منها، لأن الفائض سيخرج من حواف الساترة عند إطباقها.
- 2- نظف الفائض من السائل حول محيط الساترة قبل جفافه، بقطعة شاش مبللة بالكزاليين . أما بعد جفافه فنظفه بالحك بأداة حادة ثم امسحه بالكزاليين.
- 3- نظف الصفيحة بعد جفافها بالكحول (من أجل تلميعها).
- 4- إذا كان البلسم جامداً، أضف إليه قطرات من الكزاليين ثم اتركه في المحم أوعلى سخان الصفائح بحرارة 45°C مئوية و لمدة 10 دقائق حتى يصبح سائلاً. إن البلسم كثيف القوام، يؤدي إلى تكون فقاعات هوائية، أما البلسم الرقيق فإنه يسيل بسهولة من أطراف الساترة.
- 5- لا تترك زجاجة البلسم مكشوفة حتى لا تجف و تتعرض للتلوث.
- 6- احفظ المقاطع التي أنجزتها في علبة محضرات خاصة ذات جوانب محززة .



شكل 62 حفظ المقاطع في علبة خاصة للمحضرات

ملخص مراحل إنجاز المحاضرات الحيوانية (من التثبيت وحتى الستر)

1- مرحلة التثبيت و نزع الماء والترويق:

- ✓ التثبيت باستخدام مثبت يتناسب مع هدف الدراسة .
- ✓ الغسيل حسب المثبت المستخدم .
- ✓ نزع الماء بإجراء حمام كحولي تركيزه 70% وآخر تركيزه 90% . ثم إجراء حمامين من الكحول المطلق . مدة كل حمام من الحمامات السابقة 30 دقيقة .
- ✓ الترويق بإجراء 3 حمامات من الكزايلين مدة كل منها 30 دقيقة .

2- مرحلة التضمين بالشمع وصنع القوالب الشمعية ومد الصفائح:

- ✓ التضمين بالشمع بإجراء 3 حمامات من الشمع في الحاضنة مدة كل منها 2 ساعة .
- ✓ صب قوالب الشمع .
- ✓ تشذيب قالب الشمع .
- ✓ التقطيع وتحميل المقاطع على الصفيحة المجهرية .

3- مرحلة نزع الشمع و إعادة الماء للمقاطع والتلوين:

- ✓ نزع الشمع حول المقطع النسيجي بإجراء حمامين من الكزايلين مدة كل منها 5-10 دقائق .
- ✓ إعادة الماء للمقطع بطريقة الدعم بالكولوديون .
- ✓ التلوين حسب الهدف منه .

4- نزع الماء من المقاطع والترويق والتغطية والاستر:

- ✓ نزع الماء من المقطع بإجراء حمام كحول 90% ، وحمامين من الكحول المطلق . مدة كل حمام كحولي 5-10 دقيقة .
- ✓ لترويق وإزالة الكحول من المقطع وجعله شفافاً بإجراء حمامين من الكزايلين مدة كل منها 5-10 دقائق .
- ✓ التغطية بالبلسم المناسب والتستير بالساترة المناسبة .



ملخص مراحل إنجاز المحضرات النباتية (من التثبيت وحتى الستر)

تتميز الخلية النباتية عن الخلية الحيوانية بوجود: الجدار الخلوي، الفجوات، والصانعات. كما أنها تصنع الغذاء كالكسكريات والشحوم والدم. تتركب لجدران الخلوية من عدة أنواع من السكاكر المتعددة أهمها السيللوز والهيسلوز والمواد البكتينية وقليل من البروتينات ويمكن للجدار الخلوي أن يتخشب أو يتفلى.

إن التعامل مع النسيج النباتية له إيجابيات مهمة من حيث تعزيز الخبرة في التعامل مع النسيج القاسية لأنه من حيث الجوهر، تشكل هذه الخبرة تكراراً لخطوات تحضير المقاطع في النسيج الحيوانية، باستثناء الوقت المقرر لكل خطوة إذ يكون أطول في النسيج النباتية بسبب قساوتها نتيجة لوجود الجدار الخلوي، الذي يتطلب تليينه قدر الإمكان بحمامات من الكحول البوتيلي. إن هذا الموضوع يعد أساسياً جداً لطلاب علوم الحياة النباتية والزراعة، إذ يؤهلهم للبحث في شتى المختبرات.

تطبق هذه الطريقة على جميع الأعضاء النباتية كالجزر والساق والورقة ويفضل استعمال الأعضاء الطرية أو حديثة النمو، ويمكن استخدامها في تحضير مقاطع في القمم النامية الجذرية منها والساقية. (ويؤخذ على هذه الطريقة أنها تهتم بصنع الجدر الخلوية فقط . دون النواة والسينوبلازما)، ولذلك يكون من الأفضل استخدام الطريقة في التلوين الثلاثي (هيميا توكسلين، سفرانين، أزرق الأنيلين).

الطريقة الأساسية في تثبيت العينات النباتية وتشبعها بالشمع ، وتحضير المقاطع وتلوينها:

في تلوين النسيج النباتية اتميزاً من النسيج الحيوانية \ يجب ما يأتي:

1- تليين الجدار الخلوي بالكحول البوتيلي لمدة 3- أيام

2- استخدام مخلية الهواء لوجود الفجوات

3- المراحل المتشابهة مع الحيوان تكون في النبات مدتها أطول

1-مرحلة التثبيت ونزع الماء والتشريب والظمر: استخدم مثبت فورمالين - حمض الخل -

كحول (F-A-A) أو مثبت حمض الكروم - حمض الخل - فورمالين.

1- ضع المادة النباتية المراد دراستها في أحد المثبتين المذكورين، ونذكر بضرورة تحضير المثبت لحظة الاستعمال مباشرة.

2- اغسل بالماء الجاري من 24- 48 ساعة.

3- مرر بمخيلية الهواء مدة ساعتين على الأقل بعد وضع العينة بالماء المقطر بهدف نزع الهواء المحصور في الفجوات.

4- اغسل 3 مرات بالكحول 70% وبدرجة حرارة 60 م°، ومدة كل حمام 30 دقيقة على أن يكون الحمام الأول بارداً في المحم، كما يجب ترك الحمام الأخير حتى يبرد وذلك قبل الانتقال إلى المرحلة الآتية. (يجب التأكد من عدم جفاف العينات).

5- اترك العينة في كحول 95% مدة 20 ساعة.

6- ضع العينة في كحول إيثيلي مطلق 100% مدة ساعة. كرر العملية 3 مرات.

7- انقل العينة إلى كحول بوتيل مدة 20 ساعة.

8- ضع العينة بكحول بوتيلي (حمام ثاني وحمام ثالث) مدة كل منها 24 ساعة بهدف تليين الجدر النباتية القاسية.

9- ضع العينة في نهاية الحمام الثالث في المحم بدرجة 60 C° مئوية مدة ربع ساعة.

10- شرب العينة بالشمع النقي مدة نصف ساعة (حمام أول).

11- كرر عملية التشريب بالشمع بإجراء حمامين مدة كل منها 30-60 دقيقة.

12- صب في قوالب الشمع عن طريق وضع العينة في عمق أو قاع القالب ويستحسن توجيهها تحت المكبرة.

2- مرحلة التقطيع واللصق:

- 1- شذب القالب مع الحرص على جعل الوجه العلوي موازياً تماماً للوجه السفلي.
- 2- ثبت القالب على الميكروتوم، وقطع بالسماكة المطلوبة (10 ميكرومتر).
- 3- الصق المقاطع على الصفيحة الزجاجية كما تم ذكره سابقاً.

3- مرحلة نزع الشمع عن المقطع النسيجي والتلوين :

- 1- ضع الشرائح في سلة التلوين.
- 2- أجر ثلاثة حمامات من الكزيلول مدة كل منها 2-3 دقائق لإزالة الشمع حول المقاطع.
- 3- اغسل بمزيج من (كزيلول 2/1 + 2/1 كحول مطلق) مدة 3-4 دقائق.
- 4- اغسل بمزيج من (كحول مطلق 5/4 + فورمول 5/1) مدة 5 دقائق.
- 5- الغسل عدة مرات بالماء العادي، ثم بالماء المقطر.
- 6- ضعه في شب الحديد 5% لمدة 40 دقيقة. ثم اغسل بالماء العادي ومن ثم بالماء المقطر.
- 7- مايز في شب الحديد 1% (يمكن مراقبة بالمجهر) من 1-3 دقائق. ثم اغسل بالماء المقطر.
- 8- مرر الشرائح إلى الكحول 50% مدة 2-3 دقائق.
- 9- لون بصبغة السفرانين مدة 2-3 ساعات (يمكن تمديده إلى 24 ساعة).
- 10- اغسل بكحول 95% مدة 3 دقائق.
- 11- اغسل بالكحول المطلق مدة 2 دقيقة . كرر العملية ثلاث مرات.
- 12- لون بصبغة أزرق الأنيلين مدة 4-6 دقائق (يمكن تمديد المدة إلى 10 دقائق).

4- مرحلة نزع الماء والتغطية والاستر

- 1- استعمل محلول التفتيح الساليسيلات Salicylat مدة 10 دقائق.

- 2- اغسل بمحلول الكزايلين مدة 2 دقيقة. كرر العملية ثلاث مرات.
- 3- غط المقاطع ببلم كندا وضع عليها ساترة ثم جفف الشريحة في المحم مدة 3 ساعات وذلك بعد تنظيف الشرائح من بلم كندا الزائد.



إعداد المحضرات النسيجية (معالجات خاصة)

تحتاج بعض النسيج إلى معاملة خاصة أثناء تحضيرها للدراسة النسيجية، قد تكون قاسية لايمكن قطعها أو تحتوي على مواد تتحل عند تثبيتها مما يعطي صورة مجهرية خاطئة. وسنتعرف في هذا الفصل على كيفية اعداد مقاطع النسيج العظمي، بالإضافة إلى التعرف على تقانة إعداد المقاطع بطريقة الطمر بالسيلوئيدين، وطريقة الطمر بالتجميد.

أولاً: اعداد محضرات النسيج العظمي

إن قساوة العظم تجعل تحضيره للمقاطع النسيجية، عملية مختلفة عن بقية النسيج، لذلك يجب معاملة النسيج العظمي معاملة خاصة لجعله طرياً قابلاً للقطع بالمقطع، و ذلك بنزع أملاح الكالسيوم بعد التثبيت حتى يصبح مرناً طرياً.

العمل المخبري:

1- **التثبيت:** يمكن التثبيت بمثبت بوان أو بالفورمالين 10% أو ببعض المركبات التي

يدخل في تركيبها الفورمالين كالمثبت التالي :

كلوريد الزئبق ($HgCl_2$) أو سليمان مشبع بالماء ml 75

فورمالين تجاري ml 20

حمض الخل الثلجي. ml 5

يقطع العظم برفق بواسطة المنشار أو شفرة حادة، إلى قطع حجمها 0.5-1 cm، و توضع في المثبت مدة لا تقل عن 48 ساعة.

2- **غسل العينة:** إذا ثبتت العينة بالفورمالين 10%، فتغسل بالماء الجاري مدة 12-

24 ساعة، أما إذا ثبتت بالمحلول المذكور، فتغسل بمحلول لوغول اليودي ثم بالماء.

3- **نزع الكلس:** الهدف من هذه المرحلة هو إذابة الأملاح المعدنية في العظم، ليفقد

قساوته و يصبح طرياً مرناً، ليسهل تقطيعه فيما بعد. و تتم هذه المرحلة باستعمال

محاليل عديدة نذكر منها:

* محلول حمض النمل Phormic acide مع حمض كلور الماء و يتركب من:

حمض الفورميك 88%. ml 10

حمض كلور الماء. ml 8

ماء مقطر. ml 82

يستبدل المحلول حول العينة كل 8-10 ساعات حتى يصبح العظم طرياً (لعدة أيام)، ثم

يغسل العظم بالماء الجاري مدة 6-8 ساعات، ثم ينزع الماء منه بالكحول و يروق

بالكزايلين ويطمر بالشمع.

* محلول حمض النمل و نترات الصوديوم و يتركب من:

محلول أ : حمض الفورميك ml 50

يسبب الانتفاخ { ماء مقطر ml 50

محلول ب : نترات الصوديوم g 20

يمنع الانتفاخ { ماء مقطر ml 100

نخلط مقدارين متساويين من محلول آ و محلول ب (حجم لحجم)، و يوضع فيه العظم حتى

يصبح طرياً. ثم يغسل بالماء الجاري مدة 6-8 ساعات لإزالة آثار المحاليل المزيلة للأملاح.

يصلح هذا المزيج لنزع الكلس من العينات الكبيرة الحجم، ولا يؤثر في تقبل النسيج للملونات فيما

لو بقي العظم فيه لمدة طويلة.

* حمض الآزوت 5%: يستعمل حمض الآزوت بتركيز منخفض لنزع الكلس شريطة تبديله

عدة مرات في اليوم و لمدة 4-5 أيام، يتبعه غسل بالماء الجاري. من ميزات هذا المحلول، أنه

ينزع الكلس بشكل أسرع من حمض النمل. و من مساوئه، أنه يضعف تقبل النسيج للملونات

عند تلوينه.

4- التلوين: يتم التلوين وفق طريقة التلوين العامة، أي بالهيماتوكسيلين إيوزين (H.E).

ملاحظات عامة حول تثبيت العظم:

- 1- يجب استبدال محاليل نزع الكلس عدة مرات في اليوم.
- 2- أن يكون العظم قريباً من السطح لأن الأملاح الذائبة ستترسب في القعر، ولهذا لابد من رفع العظم عن قعر الزجاج، إما بوضعه في سلة خاصة، أو بربطه في خيط و تعليقه قريباً من السطح.
- 3- تتم عملية نزع الكلس عندما يصبح العظم طرياً ويسهل قطعه بالمشروط. ويمكن الاستدلال كيميائياً عن نزع الكلس بشكل تام كما يلي:
نأخذ 5 ml من المحلول المستخدم في نزع الكلس، ثم يضاف إليه عدة نقاط من الأمونيا حتى يصبح المحلول قلويّاً ($pH > 7$)، ثم يضاف إليه 5 ml أكزالات الأمونيوم 5% ويترك المحلول مدة 30 دقيقة. فإذا تكون راسب أبيض أو تعكر المحلول، فإن ذلك يدل على أن عملية نزع الكلس لم تكتمل بسبب تكون أكزالات الكالسيوم، ولهذا لابد من إعادة العينة مرة أخرى إلى محلول نزع الكلس بعد تغييره.
- 4- يجب غسل العينة جيداً قبل البدء بنزع الماء للتخلص من بقايا المحلول الحمضي، لأن بقاء الحموضة في النسيج يعيق عملية التلوين. يمكن إزالة الحموضة من العينة بوضعها في محلول كبريتات الصوديوم 5% مدة 6-12 ساعة قبل نزع الماء، أو الغسل بالماء الجاري بنفس المدة.

ثانياً: إعداد المحضرات بطريقة الطمر بالسيلونيدين

إن السيلونيدين وسط طمر كالبارافين، وهو عبارة عن نترات السيللوز النقية، يسمى تجارياً: بارا لويدين paralodion، لونه مائل للاصفرار يشبه العسل الطبيعي، ويكون بشكل أشربة، وعند الاستعمال تذاب هذه الأشربة في خليط متساو من الكحول المطلق والإيتر.

من ميزات هذه الطريقة :

- 1- إن عملية التشبيع تتم في حرارة المختبر وليس في المحم، وهذا يساعد على عدم تقلص النسيج.
 - 2- يمكن استعمال عينات كبيرة الحجم (كالأجنة مثلاً) ومن ثم فإن المقاطع كبيرة الحجم يمكن أن تبقى محفوظة في السيلوئيين مدة طويلة دون أن يطرأ عليها أي تغيير .
- من عيوب هذه الطريقة:

- 1- عدم الحصول على شريط مقاطع متسلسلة، لأن التقطيع بالسيلوئيين يعطي كل مقطع على حدة.
- 2- هذه الطريقة تحتاج إلى وقت طويل يستمر عدة أيام أو أسابيع.
- 3- الحصول على مقاطع سمكية (10-15 ميكرون)، ومن ثم لا يمكن دراسة مكونات الخلية بشكل دقيق.

العمل المخبري:

- 1- **التثبيت والغسل:** يتم التثبيت بمتبث عام، ومن ثم يمكن الغسل حسب المتبث المستخدم.
 - 2- **التشبيع:** بعد نزع الماء تطمر العينة في السيلوئيين 6% في زجاجة محكمة الإغلاق، من يوم إلى عدة أيام، وهذا يتعلق بسماكة النسيج ونوعه ثم تطمر في السيلوئيين 12% مدة 3 أيام على الأقل.
- نلاحظ إن عملية التشبيع تتم مباشرة بعد الغسل دون المرور بمرحلة نزع الماء والترويق.

- تحضير السيلوئيين 6% و 12% و 14% وفق يلي :

* تحضير السيلوئيين 6% :

9 غرام بارالوديون + 75 مل كحول مطلق + 75 مل ايتير.

* تحضير السيلوئيين 12% :

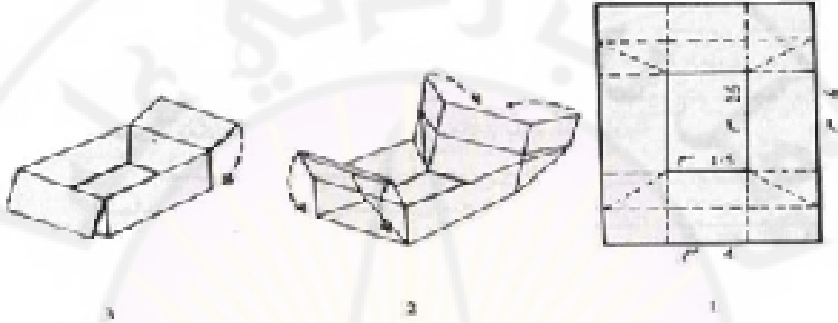
18 غرام بارالوديون + 75 مل كحول مطلق + 75 مل ايتير.

* تحضير السيلوئيين 14% :

21 غرام بارالوديون + 75 مل كحول مطلق + 75 مل ايتير.

يذاب السيلونيدين في خليط الكحول والإيثر في إناء زجاجي محكم الإغلاق، يرح الإناء عدة مرات في اليوم ولمدة 3-7 أيام، ثم يسحق الراسب المتجمع في قعر الإناء بواسطة قضيب زجاجي عدة مرات في اليوم إلى أن يتم تحضير المحلول.

3- **الطمر**: يفضل صنع قالب للطمر بالسيلونيدين من الورق المقوى كما في (الشكل 63).



شكل 63: طريقة صنع قالب طمر سيلونيدين من الورق المقوى

نصب وسط الطمر وهو السيلونيدين 14% في القالب، ثم ننقل العينة من آخر وسط تشبييع إلى وسط الطمر، نتركه ليتبخر ويتجمد قليلاً، ثم يوضع القالب السيلونيديني في إناء خاص يحتوي على الكلوروفورم، بحيث لايطمر القالب في الكلوروفورم وإنما تنغمر فقط القاعدة، ثم يغلق الإناء بشكل جيد بحيث يتعرض القالب لأبخرة الكلوروفورم ومن ثم يتم تصلبه بأبخرة الكلوروفورم.

4- **حفظ القوالب**: يحفظ قالب السيلونيدين والذي يحتوي على العينة في كحول 80% بعد تصلبه لحين التقطيع (شكل 64).



شكل 64: حفظ قالب السيلونيدين في الكحول

5- **تقطيع القوالب:** يثبت قالب السيلويديين في مكانه على الميكروتوم الخاص. يُقطع كل مقطع على حدة، ثم تجمع المقاطع و تحفظ في كحول 70% لحين لصقها وتلوينها.

6- **تحميل المقاطع على الشريحة المجهرية:** تمسح الصفيحة الزجاجية بزال البيض والجليسرين ثم يوضع عليها المقطع المطلوب وذلك بعد تجفيفه جيداً من الكحول بورق ترشيع، ثم يقطر على المقطع بضع قطرات من زيت القرنفل، ويترك لمدة 5 - 20 دقيقة حتى يصبح شفافاً تماماً، ثم يسكب زيت القرنفل من على الشريحة، وتوضع الشريحة مع المقطع في كحول 95%، أو 100 %. تعاد العملية من 2-3 مرات حتى يفكك السيلويديين، ثم تنقل الشريحة إلى محلول متساو من الكحول المطلق والإيثير حتى يذاب السيلويديين بشكل نهائي، وأخيراً يعاد الماء للمقطع بنقل الصفيحة إلى كحول 70%، ثم كحول 50 % مدة 2 - 5 دقائق لكل مرحلة، ثم الماء المقطر وبعدها تصبغ حسب الطريقة المختارة.

ثالثاً: إعداد المحضرات بطريقة الطمر بالتجميد (الكريوستات)

إن إعداد المحضرات النسيجية بطريقة التجميد، له أهمية كبرى في الكيمياء النسيجية للأسباب الآتية:

- 1- تتأثر بعض محتويات الخلية بالحرارة المستخدمة في صهر الشمع، كالأنزيمات، كما أن المواد الدهنية تنحل بالكحول.
 - 2- يعمل الكزاليين على تثبيط الأنزيمات، ومن ثم لا يمكن الكشف عنها بالطريقة الكلاسيكية.
 - 3- إختصار الوقت اللازم لإعداد المقاطع الشمعية إذ تدرس النسيج بشكل سريع في مختبرات النسيج المرضية في أثناء العمليات الجراحية لإظهار نتائج الفحص النسيجي والتي بناءً عليها سيبنى الطبيب تشخيصه للمرض.
 - 4- توفر هذه الطريقة في استعمال المواد الكيميائية من اكزاليين وكحول وغيرها.
- تعتمد هذه الطريقة على تجميد العينة بالتبريد الشديد كهربائياً، أو باستعمال غاز ثاني أكسيد الكربون، أو بالنيتروجين السائل، وهذا يعني أن العينة ستطمر بالتلج بدلاً من الشمع ويتم تقطيعها بواسطة المقطاع الثلجي أو ما يعرف بالكريوستات. ويجوز استعمال عينات مطمورة

بالآغار أو الجيلاتين، ولكن ما يؤخذ على هذه الطريقة هو عدم الحصول على شريط المقاطع المتسلسلة.

العمل المخبري:

تضبط درجة حرارة الكريوستات حسب نوع النسيج: فمثلاً يمكن تحضير مقاطع من عينات حية للطحال والكلية والغدد والدماغ والعقد اللمفاوية والمواد الدهنية عند درجة حرارة (-15°C مئوية)، أما الجلد والعضلات فتقطع بحرارة (-25°C مئوية)، وكذلك العينات المثبتة فيتم تقطيعها بدرجة حرارة (-15°C مئوية)، كما أن للمحتوى المائي للعينات دوراً في تحديد درجة القطع، فالعينة التي تحوي على كمية كبيرة من الماء يفضل تقطيعها عند حرارة (-15°C مئوية)، أما العينة فقيرة الماء فتقطع بدرجة (-25°C مئوية).

إن عملية التبريد يجب أن تتم بسرعة، لأن التبريد البطيء يؤدي إلى تكوين بلورات ثلجية كبيرة الحجم ضمن النسيج فتسبب تهشم الخلايا، وتقادياً لهذه المشكلة يمكن استعمال سائل النتروجين بدرجة (-190°C مئوية تحت الصفر).

الطمر: تطمر العينة بعد التجميد لعمل قالب ويثبت على الحامل الخاص للعينة. من أهم مواد الطمر نذكر مايلي :

- 1 - الجيلاتين 12%.
- 2 - محلول السكروز 30% والذي يحتوي على 1% من صمغ الأكاسيا acacia.
- 3 - محلول الجيلاتين والجليسرين ويحضر من:
جيلاتين. 16 g
جليسرين تذاب في 70 ml ماء مقطر.
15 ml
بلورة تيمول thimol لمنع التعفن.

يحفظ هذا المحلول بدرجة 4°C مئوية، ويصهر قبل الاستعمال مباشرة على حمام مائي. توضع العينة في محلول جيلاتين غليسرين مدة 5-8 ساعات و بدرجة حرارة 37°C مئوية ثم تنقل بالمحلول نفسه إلى الثلاجة ويعمل منها قالب، ثم يشذب القالب و يوضع في مثبت فورمول الكالسيوم 10% و بدرجة 4°C مئوية حتى يتصلب، ويمكن حفظه في الثلاجة عدة أيام لحين الاستعمال، و تلون فيما بعد بالهيماتوكسيلين إيوزين.

خطوات استخدام جهاز الكريوستات:

- 7- يقطع النسيج قطعاً صغيرة حوالي 3 مم.
- 8- نضع قطره أوقطرتين من سائل الطمر مثل جلاتين (12%) أو محلول الجيلاتين والغليسرين، ويثبت فيه العينة أو النسيج.
- 9- يبرد النسيج حتى نصل إلى درجة الصلابة المناسبة.
- 10- يثبت الحامل داخل ميكروتوم الكريوستات وتضبط السكين بحيث تلامس سطح العينة.
- 11- عند ملائمة السكين لكتلة الثلج تتفصل القطع محاطة بقطعة من البلاستيك (سائل الطمر) نقوم بإزالتها.
- 12- نضع الشريحة بحيث تلامس بحذر المقطع ثم نترك في درجة حرارة الغرفة فيزول الثلج وتبقى العينة (يمكن دهن الشرائح بالجلاتين أو زلال البيض).

تلوين المقاطع بطريقة التجميد:

تستعمل هذه الطريقة السريعة في المشافي ومخابر التشريح المرضي، في أثناء العمليات الجراحية، على النحو الآتي:

- 1 - تثبت العينة مدة 20 ثانية في محلول فورمول حمض الخل فورمالين.
- 2 - تغمس المقاطع بالماء ثم في الهيماتوكسيلين هارس مدة 90 ثانية.
- 3 - تغمس المقاطع في محلول كربونات الليثيوم المشبعة، ثم في الماء المقطر، ثم في الإيوزين مدة 10-15 ثانية.
- 4 - تغمس المقاطع بالماء المقطر، ثم ينزع منها الماء، وتزرق وتاستر وتقص.

تلوين النسيج بالطريقة العامة

سنتناول في هذا البحث سرداً لبعض طرائق التلوين العامة الأكثر استعمالاً في العمل المخبري التي تهدف أساساً إلى توضيح التراكيب الخلوية (نواة - سيتوبلاسما) ولا تعطي معلومات عن كيمياء النسيج. يقوم الطالب بتلوين المقاطع التي حضرها سابقاً، ثم يدرسها بالمجهر الضوئي المركب مستعيناً بالأشكال في الملحق الملون، سواء كانت المقاطع نسيج حيوانية أم نسيج نباتية. وقبل معاملة المقاطع أو العينات بالملون المختار لابد أن نشير إلى أمرين:

- أن مبدأ الحصول على المقاطع الجاهزة في النسيج الحيوانية والنسيج النباتية واحد، ولكن يكمن الاختلاف البسيط في زمن المراحل وتسلسلها ويعود ذلك إلى اختلاف الخلية النباتية عن الحيوانية بوجود الجدار الهيكلي والصناعات والفجوات.
- ضرورة إحضار العينة إلى الماء، لأن التلوين لا يحدث إلا في وسط مائي.

- الهيماتوكسيلين إيوزين - Hymatoxylen- Eosien:

تستخدم هذه الطريقة لدراسة المقاطع النسيجية الحيوانية بشكل عام بحيث نستطيع أن نميز فيها بين نواة و سيتوبلاسما الخلية دون تمييز باقي عناصر الخلية. و يمكن بهذه الطريقة تلوين مقاطع للأجهزة المختلفة في الجسم لدراسة بنيتها الخلوية (كعمل مقاطع في جهاز الهضم و مقاطع في جهاز البول والتكاثر و مقاطع في جهاز التنفس والدوران أو مقاطع في النسيج العصبية... إلخ).

المثبت المستخدم: محلول بوان أو أي مثبت عام.

المحاليل المطلوبة: هيماتوكسيلين - إيوزين (يرمز لها اختصاراً بـ H.E).

العمل المخبري:

- 1- أزل البارافين عن المقاطع ثم عالجها بالكولوديون ثم أعد لها الماء.
- 2- لون النوى بالهيماتوكسيلين مدة 2-10 دقائق.

3- اغسل بالماء الجاري مدة 2-10 دقائق حتى يظهر لون بنفسجي مزرق غامق. ثم اشطف بالماء المقطر.

4- لون السيتوبلاسما بالإيوزين مدة 5-2 دقائق.

5- انزع الماء اعتباراً من كحول 90 % ثم كحول مطلق ثم رَوِّق وغط واستر.

النتيجة : تتلون السيتوبلاسما باللون الزهري و تتلون النوى بلون بنفسجي مزرق. (الأشكال في الملحق الملون توضح مقاطع متنوعة ملونة بـ H.E وتعود إلى نسج حيوانية متنوعة).
ملاحظة عامة:

* بعد التلوين بالهيماتوكسيلين يجب فحص المقاطع، فإذا كانت النوى ملونة بشدة وتميل إلى السواد، فهذا يعني أن المقاطع تركت في الملون لفترة أطول من الوقت اللازم، ويمكن إصلاح ذلك بإعادة غمس المقاطع في كحول حامضي لإزالة الفائض من الملون، ثم تغسل بالماء المقطر. أما إذا كان اللون أزرق باهتاً فهذا يعني أن مدة بقاء المقاطع في الملون قليلة ويجب زيادة مدة التلوين. (يحضر الكحول الحامضي بإضافة 5-7 قطرات من حمض كلور الماء المركز إلى 100 مل كحول 70%).

- **السفرانين والأخضر السريع Safranin and fast green**

يمكن استخدام هذا الملون للقطاعات المعمولة باليد من النسج النباتية، ويحضر كما يأتي:

أ- سفرانين Safranin O 1% في كحول إيثيلي 95% ويخفف بحجم مساوٍ له من الماء قبل الاستخدام.

ب- حمض الخل الثلجي Acetic acid 1 ml

كحول إيثيلي 70 % Ethanol 100 ml

ج- الأخضر السريع Fast green 0.5% ويذاب في خليط من زيت القرنفل والكحول المطلق بنسبة 1:1

د- زيت القرنفل clove oil 50 ml

كحول إيثيلي مطلق Absolute ethanol 25 ml

الكزايلين Xylene 25 ml

العمل المخبري :

- 1-توضع المقاطع بملون السفرانين لمدة تتراوح ما بين 1 و 24 ساعة.
 - 2-تغسل في الماء المقطر.
 - 3-تغمس المقاطع في الكحول الحمضي (محلول ب)، لمدة 20 إلى 30 ثانية.
 - 4-تمرر المقاطع في كحول إثيلي 90% ومن ثم كحول مطلق لمدة دقيقة لكل خطوة.
 - 5-تصبغ المقاطع في محلول الأخضر السريع (محلول ج) لمدة 2-4 دقائق.
 - 6-تنقل المقاطع إلى محلول (د) ولمدة 10-30 دقيقة.
 - 7-تنقل المقاطع إلى محلول الكزاليين ومن ثم تطمر وتغطى بالغطاء الزجاجي.
- النتيجة :** تصطبغ الأنوية والكروموسومات والكيوتكل واللجنين جميعها باللون الأحمر، أما المكونات الأخرى فتصطبغ باللون الأخضر. (صورة مجهرية لمقطع في ساق ثنائي الفلقة في الملحق الملون ملوناً بالسفرانين - أخضر سريع، ومقطع آخر في نسيج اسكليرنشيومي متخشب ملوناً بالسفرانين، ونسيج حي ملوناً بالأخضر السريع).

- كارمن البوراكس (Borax Carmine(Grismtone&Skaer -1972) :

تستخدم هذه الطريقة في تلوين العينات الكاملة. وهذا الملون شفاف، وعند تمرير هذه العينات خلال الكحول الحمضي يبقى التلوين فقط في الأنوية، ولكن عند استخدام مثبت الفورمالدهيد، فإن الأنوية تصبح ضعيفة التلوين. يتركب هذا الملون من:

كارمن Carmine	g 3
بوراكس Borax	g4
ماء مقطر	ml100

تغلى هذه المواد مع بعضها البعض لمدة 30 دقيقة ثم تبرد، ويضاف حجم مساو من 70% كحول إثيلي ومن ثم يرشح الملون قبل الاستخدام.

العمل المخبري :

- 1- توضع المقاطع النسيجية في محلول الكارمن لمدة 10 دقائق.
- 2- تنقل المقاطع إلى الكحول الإيثيلي الحمضي (تضاف أربع نقط من محلول حمض الهيدروكلوريك المركز إلى 100 ml من كحول إثيلي 70%)

3- عندما تصبح المقاطع شفافة، تجفف بتركيز مختلفة من الكحول، ثم تروق بالكزابلين وبعد ذلك تغطي وتاستر.

النتيجة : تصطبغ الأنوية باللون الأحمر الغامق (الأرجواني) بينما تظهر السيتوبلازم بلون أخضر.

- ملون مالوري Mallory stain:

تلون النسيج بألوان حمراء وزرقاء وصفراء زاهية ولكن تبهت هذه الألوان الزاهية خلال سنة من تلوينها، ولذلك يستحسن دائماً حفظ المقاطع المصبوغة بعيداً عن الضوء. لاتستعمل هذه الطريقة في المقاطع المثبتة برابع اكسيد الأوسميوم. تحضر من المواد الآتية:

g 1	حمض الفوسفوتنجستيك Phosphotungstic acid
g 2	أورانج ج Orang G
g 1	ازرق الانيلين Aniline blue
g 3	فوكسين حمضي Fuchsin acid
ml 200	ماء مقطر

تضاف هذه المواد إلى الماء المقطر على التوالي وتذاب كل واحدة قبل إضافة المادة الآتية لها:

العمل المخبري:

1- انزع البرافين، ثم أعد الماء إلى المقاطع بكحولات متناقصة التركيز.

2- انقل إلى الملون مدة 5 دقائق، ثم اغسل بالماء الجاري مدة 5 ثوانٍ .

3- انزع الماء ثم روق وغط ببلم كندا و استر.

النتيجة : تتلون النوى باللون الأحمر والنويات باللون الأصفر ومادة الكولاجين والمواد المخاطية بالأزرق وكريات الدم الحمراء بالأصفر والاستويلاسما بلون قرنفلي إلى أصفر اللون.

- ماير هيمالوم Mayer's hemalum :

هذه الطريقة سريعة و لا تستخدم هذه الطريق مع العينات المثبتة برابع أكسيد الأوسميوم.

وتحضر كالآتي:

- (محلول 1) هيماتوكسيلين Haematoxylin g 1
- ايودات الصوديوم Sodium Iodate g 0.2
- شب البوتاسيوم Potassium Alum g 50
- ماء مقطر ml 1000
- يمزج الخليط جيداً على فترات حتى يصبح السائل بنفسجياً مزرقاً ثم يضاف إليه :
- هيدرات الكلور Chloral hydrate g 50
- حمض الليمون Citric acid g 1
- سيتم تغير لون المحلول إلى البنفسجي المحمر، ثم يخزن في قارورة قاتمة .
- (محلول 2) إيوزين واي Iosien Y محلول مشبع 90% في كحول إيثيلي.

العمل المخبري:

- 1- تصبغ المقاطع في صبغة الهيمالوم (محلول 1) لمدة 5 إلى 15 دقيقة، ويمكن معرفة زمن التلوين اللازم عندما يبدأ اللون بالظهور على المقاطع.
 - 2- تغسل المقاطع بالماء الجاري حتى يصبح اللون أزرق.
 - 3- تنتقل المقاطع إلى كحول 70 % ثم 90 % .
 - 4- تصبغ المقاطع في محلول الإيوزين (محلول 2) مدة 2 إلى 3 دقائق.
 - 5- تغسل المقاطع بكحول 90 %.
 - 6- تنتقل إلى الكحول المطلق مدة 2 دقيقة، ثم تروق أيضاً مدة 2 دقيقة، ثم تغطى ببلم كندا وتاستر.
- النتيجة : تتلون الأنوية بلون أزرق، والسيتوبلازما بلون قرنفلي .

- التلوين المضاعف لتلوين النسيج النباتية الحية بالطريقة اليدوية:

من المعروف أنَّ أهم ميزات الخلية النباتية عن الخلية الحيوانية هو الغلاف الهيكلي (البكتو سللوزي) الذي يحيط بالغشاء السيتوبلازمي. وتختلف الطبيعة الكيميائية لهذا الغلاف تبعاً لنوع النسيج. فقد يبقى سللوزياً في حالة: البرنشيم والكولانشيم والمرستيم واللحاء، وقد يتخشب في حال النسيج السكليرانشيمية والخشبية، أو يتقلن في حال الفلين والقشيرة. ولذلك نلجأ إلى صبغ هذه الغلف حتى نستطيع تميز النسيج المختلفة. والطريقة التقليدية المتبعة في المقاطع اليدوية هي: طريقة التلوين بالمزيج المضاعف (أحمر كارمن الشبي وأخضر اليود)، وتتلخص هذه الطريقة بالخطوات الآتية:

- 1- نبدأ بعمل المقاطع الرقيقة الجيدة وتوضع مباشرة في زجاجة ساعة تحتوي تحت كلوريد الصوديوم (ماء جافيل) لمدة 15- 20 دقيقة لقتل الخلايا وتثبيتها وأكسدة محتواها من المتضمنات الخلوية والإبقاء على الغلف الخلوية فقط.
 - 2- الغسل بالماء عدة مرات حتى لا يبقى أي أثرٍ لتحت كلوريد الصوديوم مع غسل كل الأدوات المستعملة، لأن بقاء أي أثرٍ لهذه المادة المؤكسدة في المقاطع أو الأدوات المستعملة يفسد اقتناص الملونات أو الصباغ.
 - 3- نقل المقاطع إلى زجاجة ساعة تحوي حمض الخل الممدد لمدة 5 دقائق لإزالة قلوية الغلف وجعلها حمضية لتسهيل عملية اقتناص الملون بشدة.
 - 4- التلوين بالمزيج المضاعف (أحمر كارمن الشبي وأخضر اليود) لمدة 5-10 دقائق.
 - 5- الغسل بالماء لإزالة الفائض من الملون.
 - 6- تحميل المقاطع على صفيحة زجاجية في قطرة من الغليسرين وتُغطى بساترة (تجنب حصول الفقاعات). ويمكن حفظها لمدة طويلة بلحم حواف الساترة بصمغٍ خاص أو بطلاء أظافر السيدات أو في محلول هلامي.
- يُنصح باستعمال الحرية أو مصفاة صغيرة لنقل المقاطع من محلول لآخر، أو بسحب المحلول بإبرة حقن، وعدم استعمال الملقط لتلافي تخريب النسيج.

النتيجة: تتلون النسيج ذات الغلف السللوزية بالأحمر، والنسيج ذات الغلف المتخشبة بالأخضر، والمتفلنة أو المتقشرنة بالأخضر المسمر. (المقاطع النباتية في الملحق الملون).

- تلوين الأجسام الكوندرية حسب بنسلي Benschly:

يفضل استخدام مثبتات تحوي على الفورمالين، أو بيكرومات البوتاسيوم، أو رابع أوكسيد الأوسميوم ولكن تجنب المثبتات الحاوية على حمض الخل لأنه يحلها .
المحالييل اللازمة:

- محلول مائي مشبع من خلاات الرصاص
- محلول كرومات البوتاسيوم المائية 5%
- محلول هيماتوكسيلين 2% ويحضر في كحول 95%
- محلول تمييز وهو محلول بوراكس سيانور الحديد ويحضر على البارد من :
 - يورات البوتاسيوم g 4
 - فروسيانور البوتاسيوم g 5
 - ماء مقطر ml 600

العمل المخبري:

- 1- انزع البارافين، ثم أعد الماء للمقاطع بكحولات متناقصة التركيز.
 - 2- عالج بمحلول خلاات النحاس مدة 1 إلى 3 دقيقة ثم اغسل بالماء المقطر.
 - 3- عالج بمحلول كرومات البوتاسيوم مدة 1 إلى 2 دقيقة، ثم مرر بسرعة إلى الماء المقطر.
 - 4- اصبغ بالهيماتوكسيلين مدة 1 دقيقة، ثم اغسل بالماء المقطر.
 - 5- مرر بسرعة في خلاات النحاس عدة ثوان.
 - 6- ميز وبالمراقبة تحت المجهر لمحلول فروسيانور البوراكس، ثم اغسل بالماء الجار .
 - 7- انزع الماء ثم غط واستر.
- النتيجة: يتلون الكوندريوم بالأزرق القاتم .

الكشف عن جهاز غولجي (طريقة التشريب بالفضة):

- 1- ثبت قطعة صغيرة جداً بحمض الأوسيميوم 2% أو بمثبت شامي أو بالفورمول 10% مدة 12-14 ساعة.
 - 2- اغسل بالماء الجاري مدة 24 ساعة، ثم بالماء المقطر عدة مرات ولمدة 24 ساعة.
 - 3- ضع القطع الصغيرة في الحاضنة بحرارة 27 °C في محلول حمض الأوسيميوم تركيزه 1% - 2% لمدة 5 أيام . يجب تبديل المحلول كل 24 ساعة.
 - 4- اغسل بالماء المقطر عدة دقائق، ثم انزع الماء، ثم مرر القطع بمحلول زيت الأرز (Cedre) ثم ضمن بالبرافين.
 - 5- قطع ثم انزع البرافين ثم غط بالبلسم.
- النتيجة: يتلون جهاز غولجي بالاسود.

التلوين الكيميائي النسيجي Histochemical Stains

يسمى تلوين (صبغ) النسيج للكشف عن محتويات خاصة في الخلية بالتلوين الخاص، و هناك العديد من الملونات المشهورة في مجال كيمياء النسيج. أما مواضيع الكشف الكيميائي النسيجي فهي :

أولاً : الكشف عن الكربوهيدرات.

ثانياً : الكشف عن البروتينات.

ثالثاً : الكشف عن الأنزيمات.

رابعاً : الكشف عن الليبيدات والليبيدات البروتينية.

خامساً : الكشف عن الحموض النووية.

سادساً : الكشف عن المعادن.

سابعاً : الكشف عن الأصبغة.

ثامناً : الكشف عن الفيتامينات.

أولاً- الكشف عن الكربوهيدرات

الكربوهيدرات أو السكاكر هي مواد عضوية، تحتوي على هيدروجين و كربون و أكسجين تتوافر في النسيج و تؤمن لها الطاقة. تقسم السكاكر بصورة عامة إلى:

1- السكاكر الأحادية: تركيبها العام $C_n(H_2O)_n$. ويمكن تصنيفها حسب عدد ذرات الكربون الموجودة فيها إلى سكاكر ثلاثية (تريوز)، وسكاكر خماسية (بنتوز)، وسكاكر سداسية (هكسوز)، ويعد الغلوكوز من السكاكر السداسية.

2- السكاكر الثنائية: ورمزها الكيميائي $C_{12}H_{22}O_{11}$ تتربك من اتحاد اثنتين من جزيئات السكر الأحادية مع فقدان جزيء ماء. نذكر منها: المالتوز و السكروز.

3- متعددات السكاكر: تتربك من تكديس أعداد من الجزيئات وحيدة السكر مع فقدان جزيئات مساوية لها من الماء. نذكر منها، الغليكوجين في الحيوان، و النشاء في النبات. يطلق على

النوع الأول والثاني اسم السكر بسبب حلاوة طعمها، ويكون النوع الأول قابلاً للذوبان في الماء والكحول مكوناً محاليلًا رقيقة شفافة، لها القدرة على النفوذ خلال الأغشية الخلوية. أما النشاء فإنه لا يذوب في الماء ولا في الكحول، ويكون مواد غروية عند وضعه في الماء، وليس له القدرة على النفوذ خلال الأغشية الخلوية.

ترتبط السكريات المتعددة مع البروتينات أو الليبيدات، ولذلك تقسم في بعض الأحيان إلى:

- متعددات السكريات البسيطة (كالجليكوجين ويسمى أيضاً النشا الحيواني).
- متعددات السكريات المخاطية: وهي مواد كربوهيدراتية تحتوي على وحدات أمينية (NH_2) بدلاً من زمرة الهيدروكسيل (OH) في الجلوكوز، ولذلك تسمى السكريات الأمينية، ولها دور أساسي في امتصاص الماء و تنشيط حركة الأمعاء و طرح الفضلات منها. و نذكر من أنواعها:
 - 1 - متعددات السكريات المخاطية المعتدلة: تكون بشكل سائل (كإفرازات الغدد المخاطية) أو متوسطة الصلابة (كالمواد الجيلاتينية في الحبل السري)، أو بشكل صلب (كالغضاريف و الكيتين في جدار جسم الحشرات).
 - 2- متعددات السكريات المخاطية الحمضية: تحتوي على حمض غلوكورونيك مثالها: إفرازات الغدد المخاطية في القناة الهضمية، والحمض الهيالوروني في الجلد، و رأس النطفة. و يمكن لهذه السكريات أن ترتبط مع حمض آخر غير عضوي، فضلاً عن ارتباطها بالحمض العضوي الغلوكوروني، مثالها الهيبارين الذي يتكون من سكريات أمينية والحمض الغلوكوروني وحمض الكبريت.
 - 3- البروتينات المخاطية: ترتبط السكريات الأمينية بمواد ثنائية الببتيد. توجد في الإفرازات المخاطية للغدد اللعابية تحت الفك، وفي بعض الهرمونات الجنسية.
 - 4- البروتينات السكرية: ترتبط مع البروتين، وتختلف عن البروتينات المخاطية، بأن نسبة السكر فيها أقل، مثالها ألبومين البيض.
 - 5- الليبيدات السكرية: وهي مواد معقدة تعطي بالإمهاة مادة نتروجينية و حموض دهنية و سكر، نذكر منها: فريوسين phrenosin و الكيراسين kersin وهي مركبات تدخل في بنية النسيج العصبي.
 - 6- حمض الأسكوربيك: ويعرف باسم فيتامين C وهو أحد المشتقات الكربوهيدراتية. يتميز بنشاطه في عمليات الأكسدة والإرجاع، و يوجد في الفواكه الحمضية، أما في النسيج الحيوانية

فهو نادر الوجود، ولكنه يختزن في قشر الغدة الكظرية. وسندرس الكشف عن حمض الأسكوربيك مع الفيتامينات (لأنه معروف علمياً وطبياً كفيتامين).

1- الكشف عن الغليكوجين في الخلايا الحيوانية:

يختزن الغليكوجين في أنسجة الكبد والعضلات الهيكلية وعضلة القلب، وهو يتركب من وحدات من الجلوكوز مرتبطة ببعضها. لا يمكن الكشف عن الغليكوجين بالطرائق العامة، ولهذا يجب الكشف عنه بطرائق خاصة. وهناك طرائق عديدة للكشف عن الغليكوجين، نذكر منها:

1 - تفاعلات الأكسدة.

2 - الاصطباغ اللوني.

3 - تعيين درجة اللون بالأسس.

تعد طريقة الأكسدة الأكثر انتشاراً في مخابر كيمياء النسيج، و تتضمن ثلاثة أزمنة:

1- زمن أكسدة الغلوسيدات في المقاطع بمواد مؤكسدة، و تتم الأكسدة باستعمال إحدى المواد الآتية: البرمنغانات، حمض البريوديك (فوق اليود)، رابع خلات الرصاص، و بزموتات الصوديوم.

2 - زمن كشف الكربونيلات التي تظهر بعد الأكسدة بكاشف شيف.

3 - طرائق مراقبة تسمح بالتأكد من أن التفاعل اللوني الذي حصل يدل على وجود وظيفة ألدهيدية.

- طريقة الأكسدة فوق اليودية (حمض البريوديك) APS periodic acid :

تستعمل في أكسدة السكاكر المتعددة البسيطة والمخاطية لتحرير الزمر الألدهيدية، و تتم في وسط حمضي، و بحرارة المختبر العادية، يتبعها الكشف عن الألدهيدات، و بهذه الطريقة تتأكسد العديد من السكاكر كـالغليكوجين، والكيتين، والمخاط الهضمي، والهيبارين، والمواد شبه المخاطية للغدد اللعابية، و ألياف الكولاجين، وغيرها.

و بعد أكسدة السكاكر، يتم الكشف عن الألدهيدات بكاشف شيف الذي يعطي لوناً أحمر آجراً، كما يجب استعمال محلول اختزالي (كالماء الكبريتي) بعد التلوين بكاشف شيف لإزالة الآثار المتبقية من محلول الأكسدة، الذي لم يمتصه النسيج، ويتداخل مع الملون.

يمكن التحقق من وجود وظيفة ألدهيدية عن طريق اللجوء إلى الهضم الأنزيمي للسكاكر، و من ثم لن نحصل على اللون الأحمر الآجري المميز للسكاكر.

المثبتات المستعملة:

المثبتات الصالحة للكشف عن البروتين هي نفسها صالحة للكشف عن السكاكر، بمعنى أنه يمكن استعمال مثبت كارنوا، أو مثبت بوان بحرارة صفر مئوية، أو استعمال مثبت جندر بدرجة حرارة المختبر.

المحاليل المطلوبة :

* محلول الأكسدة: حمض البريوديك 1%. ويستعمل طازجاً ويتركب من:

Periodic Sodium بيروديك الصوديوم 8,0 g
حمض الازوت 5,0 % 100 ml

* كاشف شيف Schiff: يحتاج تحضيره إلى دقه عالية، وإلى نظافة شديدة في الأدوات

المستعملة، ومن ثم غسلها بالماء المقطر قبل الاستعمال، و يتركب من:

فوكسين اساسي (باراساونيلين) Parasa 1 g
ماء مقطر. 200 ml

حمض كلور الماء النظامي 20 ml

ثنائي كبريتات الصوديوم Thiosulfatsodium 1 g

* محلول ببسلفيت الصوديوم 2%.

* هيماتوكسيلين ماير (لتلوين النوى).

* بيكرو أنديغو كارمن لتلوين السيتوبلازما (يمكن الاستغناء عنه).

طريقة تحضير كاشف شيف : يغلى الماء في حوالة زجاجية، ثم يرفع عن النار، وبعد زوال الفقاعات الهوائية الناتجة عن الغليان، يضاف و بهدوء ومع التحريك 1 غرام فوكسين أساسي، ثم تعاد الحوالة إلى النار وتترك لتغلي بهدوء مدة 5 دقائق. يبرد المحلول في حمام مائي أو تحت الصنبور حتى الدرجة 50 °C، ثم يضاف 20 ml من حمض كلور الماء النظامي. يبرد المحلول مرة أخرى إلى الدرجة 25 °C، ثم يضاف ميتا ببسلفيت الصوديوم ويحرك حتى الذوبان. يملأ المزيج في زجاجة عاتمة ذات غطاء زجاجي (زجاجة مصنفة) وتترك في مكان مظلم لليوم التالي. وعندها يتحول لون المحلول من الأحمر البنفسجي إلى الأبيض الشفاف أو إلى اللون البصلي. و في حال بقاء اللون بنياً محمراً يضاف إلى المحلول 3 g من الفحم الفعال charcoal، يحرك المحلول جيداً ثم يترك ساعة ليرقد ثم يرشح المزيج، فنحصل على سائل شفاف (كالماء). يحفظ في زجاجة عاتمة.

يصلح كاشف شيف للاستعمال عدة أشهر طالما بقي لونه شفافاً، وتصدر عنه رائحة غاز الكبريتي SO_2 ، أما إذا تحول لونه إلى اللون البنفسجي، فهذا يدل على عدم صلاحية المحلول ويجب تبديله.

يمكن اختبار صلاحية كاشف شيف كما يأتي : يؤخذ 10 ml من محلول الفورمالين ونضع فيه بضعة قطرات من كاشف شيف، فإذا تحول لون الفورمالين مباشرة إلى لون وردي بنفسجي، فهذا يدل على صلاحية المحلول، أما إذا تحول لون الفورمالين إلى اللون الأزرق و ببطء، فهذا يدل على فساد كاشف شيف.

تحضير حمض كلور الماء النظامي (HCl (N) : يمدد 85 ml من حمض كلور الماء المركز في لتر ماء مقطر. يحضر طازجاً عند الاستعمال.

العمل المخبري:

- 1- أزل البارافين عن المقاطع، ثم عالج بالكولوديون وبعد ذلك أعد الماء للمقاطع.
- 2- أجر أكسدة للمقاطع مدة 10 دقائق بمحلول الأكسدة، ثم اغسل بالماء الجاري مدة 3-5 دقائق.
- 3- عالج المقاطع بكاشف شيف مدة 10-30 دقيقة، في مكان مظلم.
- 4- مرر المقاطع في الماء الكبريتي (بيسلفيت الصوديوم) مدة 10 ثوان، ثم اغسل بماء جارٍ مدة 10-30 دقيقة.
- 5- لون النوى بالهيماتوكسيلين مدة 3-5 دقائق، ثم اغسل بماء جارٍ بالزمن نفسه
- 6- لون السيتوبلاسما بالبيكرو أنديغو كارمن مدة 1-3 ثوان.
- 7- مرر المقاطع مباشرة إلى الكحول المطلق، ثم روق وغط واستر.

النتيجة: يتلون الغليكوجين باللون الأحمر الآجري وتتلون النوى بالبنفسجي وتتلون السيتوبلاسما بالأخضر. (ادرس المقاطع الحيوانية والنباتية الملونة بكاشف شيف في الملحق الملون).

ملاحظات :

- يمكن الاستغناء عن المرحلة 6 من مراحل العمل السابقة، وبالتالي لن تلون السيتوبلاسما، وفي هذه الحالة ينزع الماء أولاً بالكحول 70%، ثم بالكحول 90%، ثم الكحول المطلق (إيثانول).

- إن استعمال محلول الأكسدة هو الذي يسمح لكاشف شيف بالتلوين، ومن ثم فإن عدم المرور بهذه المرحلة، سيؤدي إلى عدم ظهور اللون الأحمر الآجري المميز للسكاكر.
- يمكن إجراء مجموعة صفائح ضابطة للمقارنة ويستعمل فيها محلول أميلاز اللعاب، أو أنزيم الدياستاز 1% المذاب في 0.2 جزيئي منظم الفوسفات عند pH=6، و يحتوي 0.9% كلور الصوديوم مدة 20-60 دقيقة وحرارة 37 °C مئوية ، وتنتم هذه المرحلة كما يلي:
- 1 - انزع البارافين، ثم أعد الماء باستعمال كحولات متناقصة التركيز دون المعالجة بالكولوديون.
- 2- عالج المقاطع بالأميلاز مدة 15-30 دقيقة و حرارة 37 °C مئوية، ثم اغسل بالماء الجاري مدة 5 دقائق.
- 3- تابع المراحل كالسابق. وتكون النتيجة، أنه لا يظهر اللون الأحمر الآجري المميز للغليكوجين، في أماكن الهضم الأنزيمي كما ظهر في المقاطع السابقة.
- تبدو أحياناً حبيبات الغليكوجين في الخلايا الكبدية، منكسدة في جزء من الخلية على شكل هلال. والسبب في ذلك أن المثبتات المستخدمة تعمل على إزاحة الغليكوجين أمامها في أثناء الدخول السريع للمثبت إلى النسيج و التجمع أمامه على شكل هلال، وهذا يعني أننا أمام صورة غير حقيقية عن توزيع الغليكوجين في الخلايا. وتسمى هذه الظاهرة: **ظاهرة هروب الغليكوجين** (انظر في **مقاطع الكبد من الملحق الملون**). ويمكن القضاء على هذه الظاهرة بعدة طرائق:
- 1 - استعمال مقاطع مجمدة .
- 2 - وضع العينة في محلول 1% حمض الأوسميوم (أو أي حمض آخر) مدة دقيقة واحدة قبل التثبيت وهذا يمنع زحزة الغليكوجين من مكانه، أو بالتثبيت بدرجة حرارة منخفضة +4 °C مئوية.

- الكشف عن الغليكوجين بطريقة كارمين بست Best carmine method:

تستعمل هذه الطريقة في المقاطع البارافينية والمجمدة .

المحاليل المستعملة :

* محلول كارمين بست المخترن (الأم) ويتركب من:

g 2

بودرة مسحوق الكارمين Carmen

g 1

كربونات البوتاسيوم Potasium carbonat

- g 5 كلور البوتاسيوم Potasium clorat
- ml 60 ماء مقطر .
- يُغلى المحلول مدة 5 دقائق، ثم يبرد ويرشح، و يضاف للرشاحة 10 ml من أمونيا 880.
- * محلول كارمن بست التلويني ويتركب من :
- ml 12 محلول كارمن بست المختزن.
- ml 18 أمونيا 880
- ml 18 كحول ميتيلي.
- * محلول بست best التمييزي ويتركب من :
- ml 8 كحول مطلق Ethanol.
- ml 4 كحول ميتيلي Methanol.
- ml 10 ماء مقطر .
- * محلول شب الهيماتوكسيلين alum haematoxalin : يحضر على البارد، ويتركب من :
- g 0.5 أ- هيماتوكسيلين
- ml 50 كحول 95%
- ml 0.8 ب- حمض الكبريت المركز
- g1 شب الحديد
- اخلط المزيج (أ) ثم المزيج (ب) ثم اخلط المزيجين معاً. اتركه مدة ساعة ثم رشحه ،واستعمله خلال 3 شهور فقط .
- العمل المخبري:**
- 1- انزع الشمع، ثم انقل إلى كحولات تنازلية حتى كحول 70%.
 - 2- اصبغ بشب الهيماتوكسيلين مدة 10-15 دقيقة، ثم اغسل بالماء.
 - 3- اترك المقاطع في محلول كارمن بست التلويني مدة 30 دقيقة.
 - 4- أجري عملية التمايز للمقاطع في محلول بست التمييزي ثلاث مرات مدة كل منها 20 ثانية، ثم اغسل مباشرة بكحول 90 % .
 - 5- انقل إلى الكحول المطلق، ثم روق وغط واستر .
- النتيجة :** يتلون الغليكوجين بالأحمر وتتلون النوى بالأزرق (انظر في الملحق الملون لمقطع في الكبد ملوناً بطريقة كارمن بست) .

2- الكشف عن النشاء في الخلايا النباتية:

يُكشف عن النشاء في الخلايا النباتية باستخدام سائل لوغول اليودي، ويتركب من :

g 1	بلورات اليود
g 2	يود البوتاسيوم
ml 300	ماء مقطر

العمل المخبري:

- 1- أجر 3 حمامات من الكزايلين مدة كل منها 2-3 دقيقة.
 - 2- مرر المقاطع إلى مزيج يتركب من الكزايلين والكحول المطلق بنسبة 50% لكل منهما مدة 3-4 دقيقة.
 - 3- مرر المقاطع إلى مزيج يتركب من الكحول المطلق بنسبة 4/5 والفورمالين بنسبة 1/5 مدة 5 دقائق ثم اغسل بالماء العادي.
 - 4- اغمر بمحلول لوغول مدة 5 دقائق ثم اغسل بالماء العادي.
 - 5- انزع الماء بكحول تركيزه 95% مدة 3 دقائق ثم أجر 3 حمامات من الكحول المطلق مدة كل منها 2 دقيقة.
 - 6- مرر المقاطع إلى مزيج من كحول مطلق بنسبة 1/10 و كزايلين بنسبة 9/10 مدة 2 دقيقة.
 - 7- أجر 3 حمامات من الكزايلين مدة كل منها 2 دقيقة ثم غط ببلم كندا واستر.
- النتيجة: تلون حبات النشاء بالأزرق البنفسجي (مقطع في خلايا نباتية لونت باليود للكشف عن حبات النشاء، في الملحق الملون).

3- الكشف عن السليلوز في الجدران الخلوية للخلايا النباتية:

للكشف عن السليلوز يمكن استخدام محلول شلوتز (Schultz's solution) وطريقة تحضيره كما يلي:

g 50	كلور الزنك
g 16	يود البوتاسيوم
ml 17	ماء مقطر

يمزج الخليط، بعدها يضاف زيادة من محلول اليود، ويترك الخليط لعدة أيام في قارورة زجاجية بنية اللون.

تستعمل العينات الطازجة أو المثبتة ولكن لا يحبذ استعمال المثبتات التي تحوي على الكروم.

العمل المخبري:

1- أزل الشمع عن المقاطع ثم مرر في كحولات تنازلية حتى الماء.

2- انقل الصفائح إلى سائل شولتز.

3- فحص المقاطع وهي لا تزال في المحلول.

النتيجة : تصطبغ الجدر الخلوية التي تحوي على كمية السليلوز باللون الأزرق. بينما الجدر التي تحتوي على كمية من اللجنين Lignin والكيوتين Cutin والسوبرين Suberin أو الكيتين Chitin فتصطبغ باللون الأصفر.

4- الكشف عن اللجنين (الخشبين) في الخلايا النباتية:

تصبغ بعض المقاطع المثبتة أو الطازجة في محلول الفلوروغلوسين (Phloroglucin) المشبع في 20% حمض الهيدروكلوريك.

النتيجة: اللجنين سوف يصطبغ باللون البنفسجي.

5- الكشف عن الكيتين في الخلايا الحيوانية:

لا توجد طريقة كيميائية بسيطة للكشف عن الكيتين Chitin ولكن العالم رينشارد عام 1951 وصف طريقة للكشف عن الكيتوسان (Chitosan) وهي طريقة نافعة جداً ولكنها تحطم النسج الأخرى، وهي كما يلي:

أ- توضع قطعة صغيرة من عينة تحتوي على مادة الكيتين (قطعة من جدار جسم حشرة مثلاً) في انبوب اختبار و تغمر بمحلول مشبع من هيدروكسيد البوتاسيوم عند درجة حرارة الغرفة. وتغطى بغطاء مطاطي. تسخن الأنبوبة تدريجياً في حمام غليسرولي حتى درجة حرارة 160°C مئوية خمس عشرة دقيقة.

ب- يبرد المحلول إلى درجة حرارة الغرفة، وبهذا تتحول المواد المتبقية من الكيتين إلى الكيتوسان. ينقل الكيتوسان إلى الماء، ثم توضع هذه القطعة على شريحة زجاجية وتغطى بنقاط من 0.2% من محلول إيودات البوتاسيوم، وتتلون مادة الكيتين باللون البني ويستحسن أن تزال

الزيادة من محلول اليود باستعمال حمض الكبريت 1%، و سوف يتحول لون الكيتين إلى البنفسجي المحمر. وتغطي بمادة بلسم كندا وتحفظ لمدة أطول.
النتيجة: يتلون الكيتين بلون بنفسجي محمر.

6- الكشف عن السكاكر المتعددة المخاطية:

توجد هذه السكاكر في إفرازات المواد المخاطية الهضمية وفي الجدران الخلوية النباتية.

طريقة أزرق السيان alcian blue method:

المثبتات المستخدمة: (مثبت جندر) أو أي مثبت كحولي.

المحاليل المستعملة:

* محلول أزرق السيان 1 %، (أو يمكن حل g1 من أزرق السيان في 30 ml من الكحول المطلق و 70 ml ماء مقطر، بحيث يكون pH = 2.5). يحضر محلول أزرق السيان عند الاستعمال، ويفضل ترشيحه قبل استعماله، و يصلح لمدة اسبوع فقط.

* أورانج G موليبيديك : يحفظ لمدة غير محدودة ، يحضر بارداً من :

g 2 أورانج ج. Orange G

g1 حمض فوسفوموليبيديك Phosphomolibdic acid

ml 100 ماء مقطر.

* هيماتوكسيلين دوغرت أو هيمالان.

العمل المخبري:

1- انزع البارافين، ثم أعد الماء بالكحولات دون المعالجة بالكولوديون.

2- لون بمحلول أزرق السيان مدة 5 - 30 دقيقة، ثم اغسل بالماء الجاري.

3- لون النوى بهيماتوكسيلين دوغرت، أو بالهيمالان مدة ثلاث دقائق.

4- لون السيترولاسما بأورانج G موليبيديك.

5- انزع الماء، ثم روق و غط و استر.

النتيجة: تتلون السكاكر المخاطية بالأزرق البنفسجي (انظرمقطعاً في الكلية وتظهر فيه السكاكر المتعددة المخاطية في قمة خلايا الأنابيب البولية، ومقطعاً آخر في الجدران الخلوية النباتية ملوناً بهذه الطريقة في الملحق الملون).

طريقة أزرق ألسيان - شيف حمض بيرايودييك - Periodic acid Schiff - Alcian blue :

المثبت المستخدم : فورمالين 10%.

المحاليل المطلوبة :

* محلول أزرق ألسيان pH= 2.5

* محلول شيف.

* حمض بيرايودييك 1%.

* ميتا بيسلفيت الصوديوم 2%.

العمل المخبري:

- 1- انزع البارافين، ثم أعد الماء للمقاطع.
- 2- اصبغ في محلول أزرق السيان مدة 5 دقائق. ثم اغسل بالماء المقطر.
- 3- أكسد المقاطع في محلول بيرايودييك مدة 5 دقائق.
- 4- اصبغ في كاشف شيف مدة 10-20 دقيقة، ثم اغسل بالماء الجاري مدة 10 دقائق.
- 5- اغسل بمحلول ميتا بيسلفيت الصوديوم 2% مدة دقيقتين. كرر الغسل مرتين. ثم اغسل بالماء الجار مدة 10 دقائق.
- 6- انزع الماء، ثم روق وغط واستر.

النتيجة : تتلون المخاطيات الحمضية (المخاطية والكربوكسيلية) باللون الأزرق وتتلون المخاطيات المعتدلة باللون الأحمر الأرجواني ويتلون الخليط منها بلون بنفسجي.

ملاحظة : أ - أن عملية ظهور لونين أو أكثر باستعمال صبغة واحدة، تسمى ظاهرة التعدد اللوني metachromasia، وهي تحدث مع أصبغة محددة، ويحدث هذا بسبب اختلاف درجة الحموضة pH في النسيج.

ب - يمكن تلوين النوى بالهيماتوكسيلين ماير قبل نزع الماء، ثم يتم التمييز في 1% كحول حامضي، ثم يتم نزع الماء.

ثانياً: الكشف عن البروتينات

تشكل البروتينات المادة الأساسية والهامة في جسم الكائنات الحية الحيوانية، وهي تتكون

بشكل أساسي من سلسلة من الحموض الأمينية التي ترتبط فيما بينها برابطة ببتيدية N-OH (الربط بين مجموعة الكربوكسيل COOH مع زمرة الأمين NH₂ حيث ينزع منهما الماء). وهناك رابطة من نوع آخر هي الرابطة الكبريتية S-S - بين جزيئين لحمض السستئين وهي رابطة ضعيفة. وللبروتينات أشكال مختلفة وأنواع عديدة نظراً إلى ارتباطها مع مواد أخرى. من وجهة نظر علم كيمياء النسيج تقسم المواد البروتينية في النسيج الحيوانية إلى مايلي:

- 1- البروتينات المتعادلة neutral proteins (لا تتلون بأخضر سريع وأزرق التولويدين).
 - 2- البروتينات القاعدية basic-proteins (تتلون بأخضر سريع عند $PH > 7$).
 - 3- البروتينات الحامضية acid proteins (تتلون بأخضر سريع وأزرق التولويدين عند $PH < 6$).
 - 4- البروتينات النووية nucleoproteins (الهستونات).
 - 5- البروتينات المخاطية mucoproteins منها البروتينات المخاطية في القناة الناقلة للبيض.
 - 6- البروتينات الدهنية lipid proteins منها الدهون الفسفورية.
 - 7- البروتينات النشوية starch proteins مثل بروتين غاما غلوبولين.
- ونظراً إلى التنوع الكبير في البروتينات، فإنه يوجد العديد من طرائق الكشف عنها، ولهذا سيتم ذكر البعض منها.

التثبيت: من الملاحظ أن الحموض الأمينية الحرة ومتعددات الببتيدات البسيطة لا يمكن حفظها بالمثبت، في حين أنه يمكن تثبيت الجزيئات المعقدة أو الأكثر تعقيداً. فالمثبت يجب أن يكون فعالاً، ويحافظ على البنية ويمنع تشوهها، ويعد رابع أوكسيد الأوسميوم من المثبتات الرائعة في الحفاظ على البنية، ولكنه لا يحافظ على المجموعات النشيطة. وكذلك تعد المثبتات الكحولية جيدة لأنها تعمل على تخثير البروتين دون أن تحدث أي تغيير كيميائي فيه كمثبت كارنوا، ولأمانع من التثبيت بالفورمالين، أو حمض المر

طريقة تفاعل ننهيدرين شيفف Ninhydrin- Schiff:

تعد من أشهر الطرائق المستخدمة في الكشف عن البروتين بشكل عام في النسيج الحيوانية والنباتية. فضل كل من العالمين (Yasuma and Itchikawa)، اللذين حضرا الملون لأول مرة عام 1953 استخدام المقاطع المثبتة في مثبت زنكر أو الكحول الإيثيلي المطلق أو الفورمالين 10% . أما العالم (Pearse) فهو يفضل استخدام مثبت كحول إيثيلي 85% أو مثبت كارنوا أو الكحول الحمضي 5%. كما يمكن صبغ المقاطع الثلجية.

المحاليل المستعملة:

* محلول الننهيدرين ويحضر لحظة الاستعمال ، يتركب من:

Ninhydrin	ننهيدرين
g 0.5	
Ethanol	كحول مطلق
ml 100	

* كاشف شيفف.

* محلول التبييض ويتركب من:

Hydroclorat	حمض كلور الماء النظامي
ml 5	
Metabisulfat sodium 10%	ثاني كبريتات الصوديوم 10%
ml 5	
ml 100	ماء مقطر

العمل المخبري:

- 1- انزع البارافين ثم مرر المقاطع في كحول مطلق.
- 2- عامل المقاطع بمحلول الننهيدرين لمدة تتراوح ما بين 16 - 20 ساعة عند درجة حرارة 37 °C مئوية.
- 3- اغسل المقاطع بماء جار لمدة 2- 5 دقائق.
- 4- اغمس المقاطع في كاشف شف مدة 15-20 دقيقة. ثم اغسلها بالماء الجاري مدة 10 دقائق.
- 5- جفف الشرائح ثم ضعها في محلول التبييض مدة دقيقتين. كرر العملية ثلاث مرات.
- 6- اغسل بالماء الجاري عدة دقائق، ثم اغمس بالماء المقطر.
- 7- روق بمحلول الكزايلين وغط بسائل التغطية المناسبة واستر.

النتيجة: تصطبغ البروتينات باللون الوردي المحمر إلى الأرجواني إذا كانت توجد في الخلايا كمية كافية من مجاميع الأمين النشطة (مقطع في اللسان ملوناً بالننهدرين شيف للكشف عن البروتين، في الملحق الملون).

ملاحظة :

1- عند الرغبة في صبغ الأنوية في المقاطع يجب تمرير المقاطع بعد المرحلة السادسة في محلول ماير هيمالوم (Maye' s haemalum)، ثم تغسل وتمرر على كحول إيثيلي حمضي. ثم تابع باقي الخطوات.

2- يمكن الاستعاضة عن محلول الننهدرين باستعمال مركب ألوكان alloxan، أو بمركب كلور أمين ت chloramine T.

3- يمكن تحضير شرائح شاهدة، وذلك بتحويل المجموعات الأمينية إلى مجموعات هيدروكسيلية باستعمال المحلول التالي:

10 ml نترتيت الصوديوم 60%، و 5 ml حمض الخل الثلجي و 25 ml ماء مقطر. تترك المقاطع في هذا المحلول مدة 12 ساعة و بدرجة حرارة الغرفة، ثم تصبغ بمحلول الننهدرين شيف، فلن يظهر اللون الأحمر الوردي الذي ظهر في الشرائح الملونة وغير المعالجة بهذا المحلول.

طريقة (هارتج- زاشاريا Hartig-Zacharia):

المحاليل المستعملة :

- فروسيانور البوتاسيوم 2 % Ferricyanur potassium في حمض كلور الماء 1 % Chlorid acid (يحضر عند الاستعمال).
- كلور الحديدي 1% Ferriclorat.
- أحمر نووي صلب Neuclier sold red.

العمل المخبري:

1- أزل البارافين من المقاطع بإمرارها بتركيز كحولية متناقصة التركيز وصولاً إلى الماء المقطر.

2- اغمس الصفائح بالفيروسيانون لمدة 10 دقائق ثم اغسل بالماء المقطر.

3- اغمس الصفائح في كلور الحديدي لمدة دقيقتين، ثم اغسل بالماء.

4- لون بالأحمر النووي الصلب ثم اغسل بالماء.

5- انزع الماء ثم غط واستر.

النتيجة: تتلون البروتينات الغنية بالحديد باللون الأزرق، وتتلون الأنوية باللون الأحمر (مقطع في الكبد في الملحق الملون، وتظهر فيه البروتينات الغنية بالحديد ملونة بالأزرق، وتتلون الأنوية باللون الأحمر).

طريقة كلور أمين ت - شيف Chloramine T-Schiff

إن مركب كلور أمين-ت، عبارة عن ب-تولوين كبريت كلور أمين الصوديوم *p-toluene sulphochloramine sodium*، وهو مركب مؤكسد للمجموعات الأمينية الحرة الموجودة في البروتين، ينتج مجموعات ألدهيدية يكشف عنها فيما بعد بكاشف شيف.

المحاليل المطلوبة :

- محلول كلور أمين ت مائي 1% عند $pH=7.5$.

- محلول ثيو كبريتات الصوديوم 5%.

- كاشف شيف.

- ثاني كبريتيت الصوديوم 10%.

العمل المخبري:

1- أزل شمع البارافين من المقاطع، ثم مرر في كحولات متناقصة التركيز حتى الماء المقطر.

2- ضع المقاطع في محلول كلور الأمين-T عند $pH = 7.5$ لمدة 6 ساعات و في درجة $37^{\circ}C$ مئوية.

3- اغمس المقاطع بالماء المقطر، ثم انقلها إلى محلول تيوكبريتات الصوديوم 5 %.

4- اغسل بالماء المقطر ثم اغمس المقاطع في كاشف شيف مدة 20-30 دقيقة في الظلام.

5- اغمس المقاطع في محلول ثاني كبريتيت الصوديوم 10% لإبعاد الفائض من كلورأمين-T.

6- اغسل المقطع بالماء الجاري، ثم انزع الماء، وروق وغط واستر.

النتيجة : تظهر أماكن البروتين المرتبطة بمجموعات الأمين باللون الأرجواني.

ثالثاً -الكشف عن الأنزيمات

الأنزيمات هي مواد عضوية ذات طبيعة بروتينية، يحتاج إليها الجسم لإنجاز العديد من التفاعلات الكيميائية، وتنقسم إلى:

1- أنزيمات الإماهة hydrolases: وهي الأنزيمات التي تعمل وسيطاً مساعداً في إتمام

التفاعلات الكيميائية بوجود الماء. أنواعها: أنزيمات الأسترة esterase كأنزيمات

الفوسفاتاز، وأنزيمات أكسدة السكاكر glycosidase، وأنزيمات أكسدة البيبتيدات

peptidases. بالإضافة إلى أنزيمات الإماهة الكربوكسيلية carboxylic

hydrolases نذكر منها كولين استيراز.

2- أنزيمات أكسدة oxidases.

4 -أنزيمات نازعة للهيدروجين dehydrogenase.

يختلف الكشف عن الأنزيمات في كيمياء النسيج عن تلك الخاصة بالكشف عن البروتينات (كونها مواداً بروتينية)، إذ يكشف عن البروتينات عن طريق تفاعل مجموعات الفعالة مع الملون مباشرة، بينما يكشف عن الأنزيمات عن طريق تفاعل الملونات مع المادة الناتجة عن تأثير

الأنزيم وليس الأنزيم نفسه، ولهذا فإن الكشف عن الأنزيمات ليس بالأمر السهل، لذلك لابد من توافر بعض الشروط عند الكشف عن الأنزيمات نذكر منها:

- 1- عدم إحداث أي تغيرات في نشاط الأنزيم عند إعداد المحضرات النسيجية.
- 2- توفر درجة الحرارة المناسبة لنشاط الأنزيم، وهي تختلف من أنزيم لآخر، فبعضها ينشط في درجة 37°C مئوية وهي الغالبة، وبعضها ينشط بدرجة حرارة الغرفة كالفسفاتاز القلوية، بينما ينشط بعضها الآخر في درجة 4°C مئوية كالفسفاتاز الحامضية. والجدير بالذكر هنا، أنه عند درجة الحرارة 55°C مئوية تنكسر الروابط بين البروتينات في الأنزيم، وهذا يؤدي إلى تمسخ البروتين denaturation.
- 3- توفير درجة الحموضة (pH) المناسبة للأنزيم، وهي تختلف من أنزيم لآخر.
- 4- استعمال الركيزة (المادة الخاضعة) Substrate ليؤثر فيها الأنزيم المطلوب الكشف عنه، ولها القدرة بالنفوذ إلى النسيج وانتشارها في أمكنة وجود الأنزيم، ثم ترسب وتلون.
- 5- الوسط الحاضن Incubation medium: وهو محلول يحتوي على الركيزة للأنزيم فضلاً عن مواد أخرى، تقوم بالتعامل مع أحد نواتج الأنزيم إما بالترسيب أو الاقتران، وتحويلها إلى مادة غير ذائبة مترسبة في مكان الأنزيم. يفضل استعمال وسط الحضان بدرجة 4°C مئوية (كما هو الحال في الكشف عن الفوسفاتاز الحامضية). أو بدرجة حرارة الغرفة (الكشف عن الفوسفاتاز القلوية). هناك أشكال عدة لأوساط الحضان، نذكر منها: أوساط حضان مائية و أوساط حضان جيلاتينية.
- 6- يجب عدم تداخل الكواشف المساعدة أو محفزات التفاعل مع التفاعلات الأنزيمية أو مع مادة الركيزة، علماً بأن الأنزيمات هي بحاجة إلى مواد كيميائية أو مواد معدنية لتحفيزها أو تثبيطها.

لهذا يمكن تصنيف الأنزيمات وفق المادة الخاضعة كما يلي:

- 1- مجموعة أنزيمات الأكسدة والإرجاع oxidoreductase وهي نوعان: أنزيمات أكسدة نازعة للهيدروجين dehydrogenases من المادة الخاضعة بوجود الأكسجين وتكوين

الماء. و أنزيمات نازعة للهيدروجين من المادة الخاضعة بوجود مستقبل للهيدروجين مثل NAD و FAD.

2- مجموعة أنزيمات النقل transaminas : تقوم بنقل مجموعة كيميائية من مركب لآخر، مثل ناقلة زمرة الأمين.

3 - مجموعة أنزيمات إ ماهرة hydrolase : تعمل على إضافة الماء إلى المادة الخاضعة من أجل تحليلها (أنزيم هضم البروتين)، أو نزع الماء dehydrolase منها من أجل تحليلها.

4 - مجموعة أنزيمات نازعة lyases: تنزع مجموعة معينة من الركيزة وتكون رابطة ثنائية (أنزيم نازع الكربوكسيل decarboxylase).

5- مجموعة الأنزيمات الرابطة Ligases: تقوم بتحفيز التفاعلات الحيوية التي يتم فيها ارتباط مركبين معاً. (تسمى أيضا أنزيمات مركبة synthetases)

إن اختيار المثبت المناسب و درجة الحرارة والزمن الذي يستغرقه تحضير المقاطع، من الأمور المهمة التي يجب مراعاتها عند الكشف عن الأنزيمات، و يفضل تحضير مقاطع بالتجميد، لأن الحرارة العالية تخرب الأنزيمات، وكذلك المواد الكيميائية المستخدمة في تحضير المقاطع بطريقة البارافين، وإذا كان لابد من التثبيت فمن الأفضل التثبيت بالفورمالين 4% أو بالأسيتون اللامائي و بدرجة حرارة 4 °C مئوية ولمدة 30 دقيقة إلى ساعة، ولا ننسى أن حجم القطعة المثبتة يجب ألا يتجاوز 5 mm.

وفي حال تحضير المقاطع بطريقة البارافين، فإنه من الضروري اختيار شمع البارافين الطري الذي ينصهر في درجة حرارة منخفضة (55 °C مئوية) وأن تتم عمليات التشريب والتضمين بسرعة وبأقل وقت ممكن، كما يفضل نزع البارافين بالإيثير بدلاً من الكزاليين، و من الضروري تحضير صفائح شاهدة لتقارن مع الشرائح التي يكشف فيها عن الأنزيم، و تحضر هذه الشرائح بعدم تمريرها في الوسط الحاضن، أو باستعمال مواد مثبطة لنشاط الأنزيم مثل سيانيد البوتاسيوم 0.1% أو كلوريد الصوديوم 0.1%، أو بتعريض الشرائح لحرارة عالية وهذا يؤدي إلى تخريب الأنزيم.

لا يوجد طريقة عامة للكشف عن الأنزيمات، وإنما لكل أنزيم طريقة نوعية خاصة به للكشف عنه، و لأن الأنزيمات عددها بالمئات، ولذلك فإنه يوجد المئات من طرائق الكشف عنها، ولهذا سنتناول بعضاً من هذه الطرائق للكشف عن بعض هذه الأنزيمات.

1- الكشف عن أنزيم اللاكتاز Lactase:

يعرف هذا الأنزيم باسم بيتا غالاكتوسيداز β -galactosidase، يقوم بتحليل سكر الحليب إلى سكرين هما: الغلوكوز و الغالاكتوز، ويكشف عنه بعدة طرائق، منها ارتباطه بملون آزوري باستعمال المادة الخاضعة (الركيزة) 6- برومو-2-نافتول- β -D - غالاكتوسيد 6-Bromo-2-naphthol β -D galactoside.

المثبت المستخدم: الفورمالين بدرجة 4 °C مئوية، ويفضل التقطيع بالمقطع الثلجي.

المحاليل المستعملة:

- الوسط الحاضن: أذب 100mg من الركيزة (المذكورة سابقاً) في 15 ml كحول ميثيلي. أضف 100 ml ماء مقطر ساخن، درجة حرارته 70 °C، ثم اترك المحلول ليبرد، وأضف إليه 85 ml من المحلول الواقي (المنظم) استرات الفوسفات phosphate-citrate buffer عند pH = 4.95، وأخيراً أضف 100 ml أخرى من الماء المقطر، و يصبح المحلول بعدها صالحاً للاستعمال مدة ستة أشهر ويحفظ بدرجة 4 °C مئوية.
- محلول أزرق سريع ب، ويحل بنسبة 1% عند pH = 7.4-7.8.
- هلام الغليسرين.

العمل المخبري:

- 1- ضع الصفائح في الوسط الحاضن مدة 1-4 ساعة و بدرجة 37 °C مئوية.
- 2- اغسل بالماء المقطر ثلاث مرات ولمدة ثلاث دقائق لكل مرة.
- 3- لون بأزرق سريع ب عند PH= 7.4-7.8.
- 4- اغسل بالماء البارد ثلاث مرات ، ثم غط بهلام الغليسرين، ثم استر.

5- النتيجة: يظهر اللون الأرجواني المترسب في المقاطع مكان نشاط أنزيم اللاكتاز.

2- الكشف عن أنزيم البيروكسيداز Peroxidase:

يوجد هذا الأنزيم في العديد من النسج النباتية و النسج الحيوانية كغدة الثدي، و الغدة الدرقية، والغدد اللعابية، و خلايا الكبد والأمعاء. يعمل هذا الأنزيم على تناول الجذور الحرة (السامة) لأنها غنية بالأكسجين و يقوم بإزالتها من الجسم و تخليصه من الأثر المميت للخلايا. كما يستعمل من أجل ترقيم الأجسام المضادة في التفاعلات الكيميائية المناعية immunochemical . من أشهر الطرائق للكشف عن أنزيم البيروكسيداز نذكر:

طريقة داب ثنائي أمين البنزidine (DAB)

* تحضير المادة الحاضنة تتركب من:

- 3,3 ثنائي أمين البنزidine، رابع كلور الهيدروجين (يعرف اختصاراً باسم داب) 20 mg
ن ، ن ثنائي ميثيل الفورماميد
عدة قطرات
جزيئي 0.1 منظم ترس عند $PH = 7.6$
20 mg
فوق أوكسيد الهيدروجين 0.2 % حديث التحضير.
20 mg
اخلط المواد السابقة وبالتسخين.
* محلول 0.1 جزيئي منظم الفوسفات عند $PH = 7.2$.

العمل المخبري:

- 1- احضن المقاطع في المادة الحاضنة (داب) مدة 10-20 دقيقة بحرارة $37^{\circ}C$ مئوية.
 - 2- اغمس المقاطع بالماء المقطر.
 - 3- ضع المقاطع مدة 5 دقائق في محلول موق من جزيئي منظم الفوسفات عند $PH = 7.2$.
 - 4- اغمس المقاطع بالماء المقطر ثم غط بهلام الغليسرين واستر.
- النتيجة : ظهور ترسبات بنية مكان نشاط أنزيم البيروكسيداز.

3- الكشف عن أنزيمات الفوسفاتاز :

توجد أنزيمات الفوسفاتاز في النسيج الحيوانية وتشمل: فوسفاتاز حمضية تعمل عند $pH = 5$ ، وفوسفاتاز قلوية تعمل عند $pH = 9$.

يكون لأنزيمات الفوسفاتاز نشاط خارج خلوي، لاسيما في الخلايا المهدبة، حيث إنها تتركز في الأطراف الحرة للخلايا، بينما يقل نشاطها داخل الخلايا، وهذا يفسر دورها بتنشيط حركة الأهداب وتوفير الطاقة اللازمة لتحريك الغذاء وطرد الفضلات، وتقوم هذه الأنزيمات أيضاً، بتحليل المواد الغنية بالطاقة الموجودة داخل الخلايا من أجل توفير الطاقة التي يحتاجها الكائن الحي، كما تقوم بهضم بعض البروتينات النووية، لتساعد في تكوين المواد الفوسفاتية اللازمة للطاقة.

تذوب أنزيمات الفوسفاتاز بنوعيتها الحامضي والقلوي باستعمال المثبتات، إلا أنه يمكن الحفاظ عليها باستعمال الكحولات والأسيتون، كما أنها تتأثر بالحرارة العالية، لذلك يفضل عند الطمر، استعمال البارافين الطري، و استعمال مواد خاصة لنزع الماء أو التبييض، ومن أشهر الطرائق للكشف عنها تلك التي تستخدم المعادن الثقيلة كالرصاص و الكوبالت، إذ ترتبط الشحنات الموجبة لهذه العناصر مع الفوسفات المنطلق من نشاط الأنزيم لتشكل معاً ملحاً غير ذائب.

- الفوسفاتاز القلوية Alkaline phosphatase:

توجد في أغشية الخلايا، وفي النهايات المتطاولة السيتوبلاسمية التي تشهد عملية النقل الخلوي مثل الخلايا المعوية، والخلايا المبطنة للأنايب البولية (المتعرجة والقريبة)، وفي الخلايا المهدبة في ظهارة البربخ، وفي بطانة البروستات، وفي بطانة الشرايين. كما أن لها دوراً في تفاعلات شوارد الكالسيوم في أنسجة العظم، ولهذا يرتفع مستوى هذا الأنزيم في الدم في حالة الإصابة بسرطان العظم، بسبب ازدياد نشاط الخلايا بانية العظم. يعمل هذا الأنزيم بنشاط عند $pH = 9.2-9.8$ و بوجود شوارد المغنيزيوم والمنغنيز والتوتياء والكوبالت، ويثبط نشاطه شوارد الفوسفات والزرنيخ والكحول. كما يثبط الفينيل آلانين نشاطه في الأمعاء. يكشف عن هذا الأنزيم في حالة أمراض الكبد و سرطان الدم.

أ- طريقة الكالسيوم كوبالت Calcium-Cobalt (طريقة غوموري):

تصلح لمقاطع البارافين ومقاطع التجميد. وتستخدم للكشف عن الفوسفاتاز القلوية، حيث ينشط هذا الأنزيم عند $pH = 9.2$ وحرارة الجسم $37^{\circ}C$ مئوية، فينطلق الفوسفات من المادة الركيزة (بيتا غليسيروفوسفات الصوديوم β glycerophosphate sodium)، ثم يلتقط الفوسفات بواسطة شوارد الكالسيوم مكونة فوسفات الكالسيوم، ثم يستبدل الكالسيوم بواسطة شوارد الكوبالت باستعمال فوسفات الكوبالت، وأخيراً يترسب الكوبالت بشكل راسب أسود هو كبريتيد الكوبالت.

أ- تحضير مقاطع البارافين:

المحاليل المستعملة :

- محلول الحضان ويتركب من:

10 ml	محلول β غليسيروفوسفات الصوديوم 3%.
10 ml	محلول ثنائي ايتيل باربيتورات الصوديوم 2%.
20 ml	كلور الكالسيوم 2%.
1 ml	كبريتات المغنسيوم 5%.

- محلول نترات الكوبالت 2%.

- محلول كبريتيد الأمونيوم 1%.

- إيوزين.

العمل المخبري:

1- أزل الشمع، ثم أعد الماء إلى المقاطع بتمريرها في كحولات متناقصة التركيز حتى الماء.

2- احضن المقاطع في وسط الحضان مدة 0.5-16 ساعة بحرارة $37^{\circ}C$ مئوية، ثم اغسل بالماء الجاري.

3- انقل المقاطع إلى محلول الكوبالت، ثم اغسل بالماء المقطر.

4- انقل إلى محلول كبريتيد الأمونيوم المخفف مدة دقيقة أو دقيقتين. ثم اغسل بالماء.

5- اصبغ النوى بالإيوزين مدة 5 دقائق (ويمكن الاستغناء عن ذلك).

6- انزع الماء بالكحول، ثم روق و غط ببلم كندا، ثم استر.
النتيجة: تتلون أماكن وجود أنزيم الفوسفاتاز القلوية بلون بني داكن أو بلون بني مسود.
(انظر مقطع في الاثني عشر في الملحق الملون وتظهر فيه أماكن سوداء تدل على نشاط أنزيم الفوسفاتاز القلوية).

ب- تحضير مقاطع التجميد:

المحاليل المستعملة:

- تحضير الوسط الحاضن: يتركب من:

B غليسر وفوسفات الصوديوم 3% . ml 10

فير ونال الصوديوم Sodium veronal ml 10

ماء مقطر ml 5

كلور الكالسيوم 2% . ml 20

كبريتات المغنيزيوم 5% . ml 1

- خلات أو نترات الكوبالت 2% .

- كبريتيد الأمونيوم 1% .

- إيزون.

العمل المخبري:

1- انقل المقاطع الثلجية إلى شرائح مجهرية دون مادة لاصقة بعد قطعها بالكريوستات، ثم

جففها بدرجة حرارة الغرفة لمدة 1-2 ساعة.

2- ضع المقاطع في الوسط الحاضن مدة تتراوح من 30 دقيقة إلى 4 ساعات بدرجة حرارة 37 °C

3- اغسل المقاطع بالماء المقطر، ثم ضع الصفائح في محلول الكوبالت مدة 3-5 دقائق.

4- اغسل المقاطع بالماء المقطر، ثم ضع المقاطع في محلول كبريتيد الأمونيوم مدة 1-2

دقيقة.

5- اغسل بالماء المقطر، ثم اصبغ بمحلول الإيزون مدة 5 دقائق.

6- اغسل بالماء الجاري مدة 5 دقائق، ثم بالماء المقطر، ثم غط باستعمال وسط طمر طبيعي كهلام الغليسرين أو بلسم كندا واستر. (تجنب استعمال أوساط الطمر الصناعية لأنها تتفاعل مع كبريتيد الكوبالت مما يؤدي إلى زوال اللون بالتدرج).
النتيجة: تدل المواضع الملونة باللون الأسود في النسيج على أماكن نشاط أنزيم الفوسفاتاز القلوية.

ب- طريقة ازدواج الآزو Azo doubling:

تصلح لمقاطع الشمع ومقاطع التجميد.

المحالييل المطلوبة:

- وسط الحضان: يتركب من ملح ألفا نفتيل الصوديوم، يذوب في 50 مل من المحلول الوافي فيرونال الصوديوم عند $pH = 9.2-9.4$
- فورمالين 4%.
- أزرق سريع أو أحمر سريع.

العمل المخبري:

- 1- احضن المقاطع في وسط الحضان مدة 3-6 دقائق و بحرارة $37^{\circ}C$ مئوية، ثم اغمس بالماء المقطر.
- 2- انقل المقاطع إلى فورمالين 4% عدة ساعات وبحرارة الغرفة (قلل من فقاعات الغاز إن ظهرت).
- 3- اغسل بالماء، ثم لون النوى، ثم اغسل بالماء الجاري (يمكن الإستغناء عن تلوين النوى).
النتيجة : تظهر أماكن نشاط الأنزيم بلون أسود عند استعمال أزرق سريع أو بلون بني عند التلوين بأحمر سريع.

- الفوسفاتاز الحمضية Acid phosphatase:

توجد الفوسفاتاز الحامضية في الأجسام الحالة (الليزوزومات) و الشبكة البلاسمية الداخلية و الكريات البيضاء الحبيبية و الصفائح الدموية. أما في الأعضاء فتغزر في الكبد والطحال والكلية والكلب والبروستات. يرتفع مستوى هذا الأنزيم في الدم في حال الإصابة بسرطان البروستات، وأمراض الكبد والجهاز اللمفاوي. و لهذا الأنزيم دور كبير في عمليات التحلل الخلوية، و ينشط عند درجة الحموضة 5 - 4 pH بوجود شوارد المنغنيز، ويثبط بوجود شوارد الفوسفات والقلويات، وفي بعض الأعضاء يثبط بوجود شوارد الألوكسان والطرطرات والفورم ألدهيد. تعد طريقة خلات الرصاص من أفضل الطرائق في الكشف عن الفوسفاتاز الحمضية.

أ - طريقة خلات الرصاص Lead acetate :

لهذا الأنزيم آلية الكشف عن الفوسفاتاز القلوية نفسها، ولكن هنا يجري ترسيب كبريتيد الرصاص في أماكن نشاط الأنزيم. وننوه إلى أنه يجب استعمال كمية كافية من الوسط الحاضن وتجنب نزع الماء من المقاطع وعدم الترويق بالكزاليين لأن الكزاليين يعمل على إذابة كبريتيد الرصاص.

التثبيت: فورما لين 10% وحرارة منخفضة.

المحاليل المستعملة :

* الوسط الحاضن: يذاب 0.15 g من بيتا غليسرو فوسفات في 25 ml من محلول 0.1 جزيئي منظم الخلات عند 5 pH، ثم يضاف إلى المحلول 25 ml من 0.08 جزيئي خلات الرصاص، ويحضر هذا المحلول قبل الاستعمال مباشرة و يرشح بعد 20 دقيقة من تحضيره ثم يستعمل.

* كبريتيد الأمونيوم الأصفر 1% (يحضر طازجاً عند الاستعمال).

العمل المخبري:

1- ضع المقاطع المجمدة مدة ساعة بحرارة 37 °C مئوية في الوسط الحاضن.

4- الكشف عن أنزيم الليباز Lipase:

يحلل الليباز الدهون المتعادلة إلى حموض دسمة وجليسرول، ومن أشهر الطرائق للكشف عن الليباز طريقة توين Tween method، وتعتمد هذه الطريقة على تحليل مادة التوين (هي استرات دهنية طويلة) بوجود شوارد الكالسيوم لتعطي حموضاً دسمة، ويترسب الصابون الكلسي مكان وجود الأنزيم، ثم يتحد الصابون الكلسي مع شوارد الرصاص ليعطي راسباً آخر يمكن تلوينه بكبريتيد الأمونيوم الأصفر فينتج لوناً بنياً أسود.

المثبت المستخدم: الفورمالين بدرجة 4 C⁰ مئوية، ويفضل التقطيع بالتجميد.

المحاليل المستعملة :

* وسط الحضان و يتركب من :

- مادة توين 60 (5%) . ml 2
- كلور الكالسيوم. ml 2
- 0.5 جزيئي منظم ترس عند pH=7.2-7.4 ml 5

* محلول نترات الرصاص 1%.

* محلول كبريتيد الأمونيوم الأصفر 1%.

* - صبغة الايوزين.

* - هلام الغليسرول.

العمل المخبري:

1- ضع الصفائح في الماء المقطر، ثم انقلها إلى وسط الحضان مدة 3-12 ساعة، ثم اغسلها بالماء المقطر.

2- انقلها إلى محلول نترات الرصاص 1% مدة دقيقة، ثم اغسل بالماء الجاري مدة 5 دقائق.

3- ضع الصفائح في محلول كبريتيد الأمونيوم الأصفر 1%، مدة 1-2 دقيقة ثم اغسل بالماء المقطر.

4- اصبغ بالايوزين مدة خمس ثوان، ثم اغسل بالماء المقطر.

5- غط المقاطع مباشرة بهلام الغليسرين.

النتيجة : يتلون مكان نشاط أنزيم الليباز بلون بني مسود.

رابعاً : الكشف عن الليبيدات و الليبيدات البروتينية

تشكل الليبيدات lipids (المواد الدهنية) مصدراً مهماً للطاقة، ووسيلة حماية من الصدمات الخارجية كما تقوم بدور أساسي في بناء الأغشية الخلوية وفي تركيب جلد الفقاريات، وهي نوعان دهون بسيطة ودهون مركبة.

تتركب الدهون البسيطة، من حموض دسمة (مشبعة أو غير مشبعة) ترتبط مع الغليسولات بروابط إسترية، أما المركبة منها فهي عبارة عن حموض دسمة مرتبطة مع الغليسولات ومواد أخرى كالدهون الفوسفاتية التي تحتوي على سترات حمض الفوسفور، كما يرتبط بعضها مع البروتينات مشكلاً لليبيدات بروتينية proteolipids ، بحيث يرتبط جزيء البروتين بعدة جزيئات من المادة الدسمة، وهذا يجعلها لا تذوب في الماء بل تذوب في المذيبات غير المستقطبة كالإيثير و الكلوروفورم . أما البروتينات الليبيدية lipoproteins فهي عبارة عن مواد عضوية يرتبط فيها جزيء المادة الدسمة مع عدة جزيئات من البروتين، وبذلك تصبح قابلة للذوبان في الماء والمحاليل المستقطبة، وغير ذوابة في المذيبات غير المستقطبة .

المثبتات المستخدمة :

إن المثبتات الكحولية بشكل عام، تذيب المواد الدسمة، بل إن إضافة شوارد الكالسيوم إلى المثبتات غير الكحولية يخفف من ذوبان المواد الليبيدية، ولأسيما عند الكشف عن الدهون الفوسفاتية. يعد محلول بيكر Baker مثبثاً جيداً، بينما يكون الفورمالين 10% محلاً لجزء من الفوسفوليبيدات، لكنه يحفظ الليبيدات المتجانسة . وإذا أردنا عدم ذوبان الدسم في أثناء التثبيت فيمكن استعمال طريقة التثبيت حسب سياتسيو Ciaccio ، إذ يوضع النسيج الشحمي لمدة 12-2 ساعة في خليط (يحضر مباشرة عند الاستعمال) مكوناً مما يلي :

بيكرومات البوتاسيوم 5% . ml 50

فورمالين تجاري. ml 15

حمض الخل. ml 5

ثم تغسل العينة وتنقل إلى بيكرومات البوتاسيوم 3 % لمدة 5-8 أيام في حرارة المختبر، أو لمدة 1-2 يوم في حرارة 60 °C مئوية، ثم تغسل العينة وتضمن. وبشكل عام، يفضل استخدام التثبيت بالتجميد لتفادي الكحولات الحالة للדם، وكذلك تفادي الحرارة المرتفعة في مراحل إعداد المقاطع البارافينية.

- الطريقة العامة للكشف عن الليبيدات:

طريقة أسود سودان ب Soudan black B:

هذه الطريقة عامة لا تميز بين أنواع الليبيدات، وتتلون الليبيدات بفضل قابلية ذوبان الملون في المادة الدهنية، عن طريق ادمصاص هذا التلوين من قبل حبيبات الدسم دون حدوث تفاعل كيميائي.

إن أحمر سودان III (لونه أحمر) أو أسود سودان B (لونه أسود) يذوب في الكحول 70% ولا يذوب بالماء. يترك التلوين في المحم لمدة 12 ساعة بحرارة 37 °C مئوية، ثم يبرد و يرشح ويحفظ في قارورة محكمة الإغلاق.

المثبت المستخدم : فورمول الكالسيوم، أو التثبيت بالتجميد .

المحاليل المستعملة:

- أسود سودان مشبع بكحول 70%.

- أحمر معتدل 1%.

العمل المخبري:

1- توضع المقاطع المجمدة (أو المقاطع الشمعية بعد إزالة الشمع عنها) في محلول أسود سودان ب المشبع بالكحول الإيثيلي 70% مدة 30 دقيقة (يفضل ترشيح الملون فوقها).

2- تغمس المقاطع في كحول 70% مدة دقيقة واحدة للتخلص من اللون الزائد ثم في الكحول 50%.

3- تغسل المقاطع بالماء الجاري، ثم تصبغ بأحمر معتدل 1% مدة دقيقة واحدة.

4- تغسل المقاطع بالماء المقطر، ثم تغطي بهلام الغليسرين، وتستتر.

النتيجة: تتلون الليبيدات بالأحمر عند استعمال أحمر سودان III، وتظهر الشحوم الثلاثية غير المشبعة باللون الأسود المزرق عند استعمال أسود سودان B، و تتلون الليبيدات الفوسفورية بلون شاحب. أما النوى فتتلون بالأحمر. لايمكن الكشف عن الحموض الدسمة الحرة بهذه الطريقة لأنها تذوب بالكحول 70%. (مقطع في نقي العظم في الملحق الملون).

طريقة أسيتون أسود سودان ب Aceton-Sudan B-Black:

تستعمل للمقاطع الثلجية.

1- اغسل المقاطع الثلجية بالماء الجاري.

2- ضع المقاطع في محلول أسود سودان ب 2% مذاب في الأسيتون و بحرارة

37 °C مئوية، مدة 1-24 ساعة.

3- انقل المقاطع إلى الكزيلول مدة 5-10 دقائق حتى يتوقف خروج الصباغ من المقاطع

4- غط المقاطع بوسط طمر، ثم استتر.

النتيجة: تتلون الليبيدات بلون أسود،

- الكشف عن الليبيدات في النسيج النباتية بواسطة التلوين بأسود السودان الثلاثي .

1- أزل الشمع عن المقاطع بإجراء 3 حمامات من الكزيلول ،مدة كل منها 5 دقائق.

2- ضع المقاطع في كحول 70% مدة 1 دقيقة.

3- لون بأسود سودان الثلاثي مدة 15-30 دقيقة.

- 4- اغسل بكحول 70% مدة دقيقة . ثم بالماء المقطر .
- 5- غط بالجليسرين ثم استر .
- النتيجة: تظهر الليبيدات المعتدلة و الفوسفورية بلون أسود مزرق (خلايا نباتية ملونة بهذه الطريقة في الملحق الملون).

- الكشف عن الليبيدات البروتينية:

يتم الكشف عن الليبيدات البروتينية بوساطة الاستخلاص بالأملاح، وذلك بوضع المقاطع في أحد المحاليل الآتية:

- محلول 0.4 جزيئي من كلور الصوديوم مدة 12 ساعة في مكان بارد.
- محلول 0.7 جزيئي من كلور الصوديوم مدة 1.5 ساعة في مكان بارد.
- محلول 1 جزيئي من كلور الصوديوم عند $pH = 7$ أو $pH = 4$ مدة 6 ساعات.

ثم تلون المقاطع بعد ذلك بأسود سودان ب.

المثبتات المستخدمة: الفورمالين أوفورمالين الكالسيوم مدة 6 ساعات، ويمكن التثبيت بالتجميد،

ثم النقطيع بالمقاطع الثلجي (كربونات).

الملون المستعمل: أسود سودان ب.

تتلون الليبيدات البروتينية بشكل موجب عندما تكون الليبيدات سائلة، وإذا كان التلوين سالباً فعندئذ ينصح بالتلوين بحرارة $60^{\circ}C$ مئوية بعد معالجة المقاطع بالماء الساخن بحرارة $60^{\circ}C$ مئوية.

النتيجة : تتلون الليبيدات البروتينية بلون أسود.

- الكشف عن الليبيدات الفوسفاتية :

يفضل إجراء المقاطع المجمدة

المثبت فورمول الكالسيوم

المحالييل اللازمة :

- محلول كبريتات أزرق نيلة ويحضر من :

حمض الكبريت 0.5% ml 50

محلول مائي كبريتات أزرق نيلة ml 500

يغلى المزيج مدة 2 ساعة ثم يبرد ويرشح ، ويحفظ بالبراد. ثم يرشح قبل كل استعمال .

- أسيتون

- حمض الخل 5%

- حمض كلور الماء 0.5%

العمل المخبري:

1- لون بمحلول أزرق نيلة مدة 90 دقيقة بحرارة 60 °C مئوية ثم اغسل بالماء المقطر .

2- اغمر المقاطع بالأسيتون بحرارة 50 °C في حمام مائي ثم اخرجها واتركها مدة 30 دقيقة لتتبد.

3- اغمر المقاطع بحمض الخل الثلجي 5% مدة 3 دقائق ثم اغسلها بالماء .

4- مايز المقاطع بحمض كلور الماء مدة 30 دقيقة ثم اغسلها عدة مرات .

5- غط بوسط مائي .

النتيجة : تتلون المواد الفوسفو ليبيدية باللون الأزرق .

- الكشف عن الكولستيرول:

يعد الكولستيرول من الستيرويدات الموجودة في النسيج الحيوانية، و يذوب في المذيبات العضوية ولا يذوب في الماء، وكذلك فإن استيراته المتعددة غير المحبة للماء لا تذوب في الماء، ويسبب ترسبه في النسيج أمراضاً متعددة منها مرض وولمان Wolman، حيث يترسب الكولستيرول في النسيج العصبية، و الكريات البيض، و خلايا نخاع العظم، وفي الكبد الذي يتلون بلون أصفر برتقالي.

طريقة آدم بان Adam Pan:

تعتمد على مبدأ أكسدة الكولستيرول.

المحاليل المستعملة:

* محلول التفاعل و يتركب من:

1- 2- نفتو كينون 4 حمض الكبريت. ml 50

كحول مطلق. ml 25

فوق حمض كلور الماء 60%. ml 12.5

فورمالين 40%. ml 1.25

ماء مقطر. ml 11.5

* كلور الحديد 1%.

العمل المخبري:

1- ادهن المقاطع بمحلول التفاعل باستعمال فرشاة ناعمة، ثم سخن المقاطع إلى درجة 65 °C

مئوية مدة 1-2 ساعة، مع الاستمرار بإضافة محلول التفاعل فوق المقاطع وعدم جفافها.

2- اترك المقاطع لتبرد ثم غطها بمحلول فوق حمض كلور الماء 60%، ثم غط واستر.

النتيجة: تظهر أماكن وجود الكولستيرول بلون أزرق.

طريقة ليبيرمان - شولتز Liebermann-Schultz:

وهي طريقة شديدة الخصوصية ولكنها غير حساسة، تستخدم للكشف عن الكولستيرول وأسترته

في النسيج الحيوانية، وهنا تثبت العينة بالفورمالين، ومن ثم إجراء مقاطع بالتجميد.

المحاليل المستعملة:

- محلول كبريتات الأمونيوم الحديدي 2.5% مذاب في 0.2 جزيئي محلول منظم

الخلايا عند pH=3.

- منظم (محلول موق) الفوسفات.
- محلول التفاعل: أضف 0.5 ml من حمض الخل إلى حمض الكبريت المركز، تُضاف نقطة نقطة مع التحريك، ويُتوقف عن إضافة حمض الخل قبل ظهور أي لون للمحلول.

العمل المخبري:

- 1- ضع المقاطع مدة أسبوع و بحرارة 37°C مئوية في محلول كبريتات الأمونيوم الحديدي.
 - 2- اغسل المقاطع عدة مرات بواسطة منظم الفوسفات، ثم اغمسها بالماء.
 - 3- ضع المقاطع في فورمالين 5% مدة 10 دقائق.
 - 4- غط المقاطع بمحلول التفاعل، ثم استر مباشرة بالساترة.
- النتيجة: تتلون أماكن وجود الكولسترول بلون أزرق مخضر.

- الكشف عن الليبيدات المتعادلة:

طريقة الأحمر الزيتي (Lillie 1965) **The oil Red O for neutral lipids** :

تحضير الملون:

يذاب 0.5 g من أحمر الزيتي (O) في 100 ml كحول الأيسوبروبيل 98% . وعند الاستخدام يخفف 6 ml من هذا المحلول بإضافة 4 ml ماء مقطر، يترك المحلول جانباً لمدة 24 ساعة ويرشح مستخدماً ورق ترشيح من نوع (Whatman No. 42) قبل الاستخدام مباشرة.

العمل المخبري:

- 1- تثبت العينات في الفورمالدهيد ثم تحضر بعض المقاطع الثلجية.
- 2- تغمس المقاطع في محلول كحول أيسوبروبيل (60%) حديث التحضير.
- 3- تصبغ في محلول أحمر الزيت (O) لمدة عشر دقائق.
- 4- تغمس المقاطع في الماء.
- 5- تطمر في هلام الغليسرين.

النتيجة: تصطبغ الدهون المتعادلة باللون الأحمر.

خامساً: الكشف عن الحموض النووية

1-الكشف عن الحموض النووية في النسيج النباتية:

طريقة أخضر الميتيل وأحمر البيروني:

وفيها يصطبغ الـ DNA بأخضر الميتيل، بينما يصطبغ الـ RNA بالبيروني. وهي من الأصبغة القلوية، ويعتمد التلوين فيها على التنافس بين الصباغين إذ يحمل أخضر الميتيل مجموعتين من الشحنات الموجبة، في حين أن البيروني يحمل مجموعة موجبة واحدة، ويكون البيروني أسرع في دخوله إلى النسيج من أخضر الميتيل.

يرتبط أخضر الميتيل مع مجموعة الفوسفات في الـ DNA بالشحنتين الموجبتين، وحيث أن سلسلة هذا الحمض مضاعفة، فإن هذا الأمر، يساعد على الارتباط المضاعف ويتحقق هذا الارتباط عند درجة حموضة $pH = 4.2$ ، إذ تكون نقطة التوازن الكهربائي للحموض النووية قريبة من هذه الدرجة.

المحالييل المطلوبة

أ - يذاب g1 من أخضر الميتيل في 100مل محلول 0.05 جزيئي خلات الصوديوم المنظمة ($PH = 5.6$) ويرج المحلول مع حجم مساو له من الكلوروفورم في قمع فصل. تكرر عملية فصل الكلوروفورم الملون وإضافة كمية أخرى منه حتى يصبح الكلوروفورم عديم اللون.

ب- يذاب g1 من بيروني (Pyronin Y) في 100 ml من محلول 0.05 جزيء خلات الصوديوم المنظمة $PH = 5.6$ ، ثم تطبق نفس الطريقة كما في المحلول - أ - بالنسبة إلى الغسيل بالكلوروفورم.

ولكي يحضر الملون النهائي، يخلط 15 ml من محلول (أ) مع 25 ml من محلول (ب) ثم يكمل الحجم إلى 100ml بإضافة محلول 0.05 جزيء من محلول الخلات المنظم ($PH = 5.6$)، بعدها يذاب فيه 6.40 g كلور المغنيزيوم المائي ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)

كما يحبذ استخدام مثبتات الفورمالدهيد أو مثبت كارنوي أو 70% كحول إيثيلي لهذا الغرض.

العمل المخبري:

1- أعد الماء إلى المقاطع.

- 2- اصبغ المقاطع في الملون النهائي مدة 16 ساعة. ثم اغمس المقاطع في ماء مقطر.
 - 3- انزع الماء بحمامين من الكحول البيوتيلي، مدة كل واحد خمس دقائق.
 - 4- روق في محلول الكزابلين ثم اطمر في DPX.
- النتيجة:** يصبغ الحمض النووي الريبي (RNA) باللون الأحمر أما الحمض النووي الريبي اللاأوكسجيني (DNA) فيصبغ باللون الأخضر (مقطع في قمة الجذر ملوناً بهذه الطريقة في الملحق الملون).

2- الكشف عن الحموض النووية في النسيج الحيوانية.

طريقة أحمر البيرونين - أخضر الميتيل:

المثبت المستخدم: كحول حمض الخل بنسبة 3 : 1 (يعمل حمض الخل على تحرير الحموض النووية من البروتينات) أو استعمال التثبيت بالتجميد.

المحاليل المستعملة :

- * أخضر الميتيل 0.5 % ، ويحضر من أخضر الميتيل المستخلص بالكلوروفورم و المذاب في 0.2 جزيئي منظم الخلايا عند $pH=4.2$.
- * محلول البيرونين 0.15 % المذاب في 0.2 جزيئي منظم الخلايا عند $pH=4.2$
- * محلول 0.2 جزيئي منظم الفوسفات.
- * أسيتون مطلق.

العمل المخبري:

- 1- انزع البارافين، ثم عالج المقاطع بالكحولات متناقصة التركيز وصولاً للماء، وإذا استخدمت مقاطع ثلجية، فانقلها إلى الماء المقطر.
- 2- انقل المقاطع إلى ملون أخضر الميتيل مدة 5 دقائق، ثم انقل إلى الماء المقطر مدة 5 دقائق.
- 3- ضع المقاطع في محلول البيرونين مدة 5 ثوان، ثم انقلها بسرعة إلى محلول 0.2 جزيئي منظم الفوسفات، ثم جفف الشرائح جيداً بورق نشاف.
- 4- انقل الشرائح إلى الأسيتون مدة أقل من دقيقة.
- 5- روق المقاطع بالكزابلين، ثم غط ببلم كندا واستر.

النتيجة: يتلون الـ DNA باللون الأخضر بينما يتلون الـ RNA بلون وردي فاتح (مقطع في الكبد ملوناً بهذه الطريقة في الملحق الملون).

ملاحظة: يمكن خلط كميات متساوية من محلول أخضر الميتيل ومحلول البيرونيين، ثم تغمس المقاطع فيهما مدة 20 دقيقة، ثم تنقل إلى 0.2 جزيئي منظم الفوسفات، ثم تجفف بورق نشاف، وأخيراً يتم سحب الماء بكحول البوتيل ثم تغطى بسائل الطمر، فنحصل على النتائج نفسها.

3- الكشف عن الـ DNA بتفاعل فولكن Feulgen reaction:

يكشف عن الـ DNA بتفاعل فولكن، وهو من التفاعلات النوعية الخاصة. يعتمد التفاعل على إمالة الـ DNA بحمض كلور الماء وبحرارة 60 °C مئوية، فتتحرر الزمر الألدهيدية من السكر في الكربون رقم (1)، وسيتم الكشف عنها بكاشف شيف. أما الـ RNA فإنه يتأثر بحمض كلور الماء و يذوب ولا يمكن الكشف عنه بهذه الطريقة.

أما عن المثبتات المستخدمة في الكشف فمن الأفضل أن تكون حموضاً قوية، ويختلف زمن التثبيت حسب المثبت المستخدم كما يلي :

* مثبت كارنوا، أو مثبت هيللي، 8 دقائق .

* مثبت الفورمالين، من 8 دقائق إلى 4 ساعات.

* مثبت زنكر، أو مثبت زنكر فورمول 5 دقائق.

و يمكن استعمال التثبيت بالتجميد، وإجراء مقاطع بجهاز الكريوستات ، ثم القيام بالتلوين.

المثبت المستخدم : ليلي المعدل، كارنوي، حمض الخل الثلجي وإيتانول بنسبة 3 : 1، تجنب مثبت بوان لأنه يحلل الحموض النووية.

المحاليل المستعملة :

* حمض كلور الماء النظامي.

* كاشف شيف ، ذكر سابقاً.

* محلول التبييض، ويتركب من: 5 ml حمض كلور الماء النظامي، و 5 ml بيسلفيت الصوديوم 10%، و 100 ml ماء مقطر.

* أخضر سريع: حل 5,0 g بودرة أخضر سريع، في 100 ml كحول 95%.

العمل المخبري:

- 1- انزع البارافين، ثم عالج بالكحولات ثم أعد الماء.
 - 2- إنقع المقاطع في حمض كلور الماء النظامي في محم حرارته 60°C مئوية مدة 15 دقيقة، ثم اتركها على الطاولة لتبرد مدة 10 دقائق، ثم اغسل بالماء المقطر.
 - 3- عالج بكاشف شيف مدة 20-60 دقيقة في مكان مظلم.
 - 4- مرر في محلول التبييض ثلاث حمامات، مدة كل منها دقيقتان، ثم اغسل بالماء الجاري مدة 15 دقيقة.
 - 5- لون بأخضر سريع مدة 10-15 دقيقة (يمكن الاستغناء عن ذلك).
 - 6- انزع الماء مباشرة بكحول 95%، ثم روق وغط واستر.
- النتيجة: يتلون الـ DNA بلون أحمرقاني وتتلون السيبتوبلاسما بالأخضر (في الملحق الملون، مقطعاً في زغابة معوية، ويظهر الدنا في نوى الخلايا الظهارية، ولونت السيبتوبلاسما باللون الأخضر. ومقطعاً آخرًا في الخصية ويبدو الدنا في نوى الخلايا المنسلية والمنوية. لكن دون تلوين السيبتوبلاسما).

سادساً: الكشف عن المعادن

تُعد العناصر المعدنية مهمة في الكثير من العمليات الحيوية كالنمو (في النبات والحيوان والإنسان) و تدخل في تركيب بعض الأعضاء المهمة كالحديد الذي يدخل في تركيب خضاب الدم و الكالسيوم الذي يدخل في تركيب العظام و عنصر الصوديوم والبوتاسيوم اللذين يسهمان في نقل السائلة العصبية عبر الأغشية العصبية، وعنصر الزنك الذي يدخل في تركيب البروتينات وغيرها من المعادن. وتتجلى أهمية المعادن بشكل أساسي في الجسم بكونها غالباً تُستخدم عناصر محفزة في العديد من التفاعلات الحيوية في النسيج كالاستجابة العضلية، والسائلة العصبية و إنتاج الهرمون وفي عمليات الهضم والتغذية.

وبما أن أجسامنا غير قادرة على إنتاج المعادن فلا بد أن تتوفر هذه الأخيرة في الغذاء اليومي.

1- الكشف عن الكالسيوم:

الكالسيوم هو معدن غير منحل، يشكل جزءاً مهماً من تركيب العظام والأسنان ويعد من أهم المعادن في جسم الإنسان فهو يدخل في الوظائف الأساسية مثل تخثر الدم، وفي نقل السيالة العصبية، وفي الإستجابة العضلية، وكذلك في الحفاظ على ضربات العضلة القلبية. يوجد الكالسيوم في النسيج الحيوانية بأشكال عدة هي : الشكل الشاردي والشكل المحلول . تعتبر كل من طريقتي فون كوسا و أحمر اليزارين من أكثر الطرائق شيوعاً للكشف عن مستودعات الكالسيوم في أنسجة الجسم . إن النسيج المحفوظة في المثبتات غير الحمضية كانت الأفضل للكشف عن مستودعات الكالسيوم.

طريقة أحمر أليزارين س alizarin-red-S:

تعد هذه الطريقة من أشهر الطرائق للكشف عن الكالسيوم، وتعتمد على فك الارتباط بين شوارد الكالسيوم من أملاحه في النسيج ، فيرتبط مع أحمر اليزارين S عند $\text{PH}=4.2$ مشكلاً مركباً معقداً.

المثبت المستخدم : الكحول المطلق.

المحاليل المستعملة:

* أحمر اليزارين س يتركب من :

g 1	أحمر اليزارين Alezarin red
ml 90	ماء مقطر

يضاف للمحلول 10 ml من محلول هيدروكسيل الأمونيوم 1% حتى تصبح 6 = pH 4.

* محلول التمييز يتركب من :

ml 500	كحول 95%
ml 0.5	حمض كلور الماء المركز.

العمل المخبري:

- 1- أزل الشمع عن المقاطع ، ثم مرر بكحولات متناقصة التركيز حتى الماء المقطر.
- 2 - اغمس في أحمر اليزارين س مدة 30 ثانية إلى 5 دقائق، ثم اغمس بالماء مدة 5 - 10 ثانية.

- 3 - اغمس في محلول التمييز مدة 15-20 ثانية.
 - 4 - انزع الماء بالكحولات، ثم روق وغط واستر.
- النتيجة: يظهر الكالسيوم على شكل راسب أحمر برتقالي في أماكن وجوده (الملحق الملون).

طريقة أحمر اليزارين للكشف عن الكالسيوم في المقاطع النسيجية (طريقة أخرى):

المثبت: المستخدم فورمالين 10% أو الفورمالين الكحولي.

المحاليل المستخدمة:

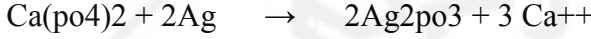
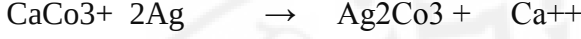
- 1- أسيتون Aceton
- 2- مزيج أسيتون/ كزايلين بنسبة 1 : 1 يحضر وقت التجربة .
- 3- محلول أحمر اليزارين: ويحضر بحل 2 mg في 100 ml من الماء المقطر. يمزج المحلول جيداً ثم يُضاف 5% هيدوكسيد الأمونيوم لتعديل درجة ال pH = 4.3 - 4.1 لأن درجة الحموضة تعد عنصراً مهماً لنجاح عملية التلوين. يجب تجنب الاحتكاك والاستنشاق في أثناء تحضير المحاليل.

العمل المخبري:

- 1- أزل الشمع من المقاطع وأعد الماء باستخدام الكحول 70% .
 - 2- اغسل المقاطع بسرعة بالماء المقطر.
 - 3- اغمر المقاطع لمدة تتراوح بين 30 ثانية إلى خمس دقائق في محلول أحمر اليزارين مع مراقبة المقاطع بالمجهر حتى ظهور اللون الأحمر البرتقالي.
 - 4- ضع المقاطع بالأسيتون لمدة 20 دقيقة.
 - 5- ضع المقاطع بمزيج أسيتون/ كزايلين لمدة 20 دقيقة.
 - 6- شطف النسيج بالكزايلين ثم اطمر المقاطع بمركب البيرمونت Permunt
- النتيجة: ستظهر مستودعات الكالسيوم في النسيج بلون أحمر برتقالي .

طريقة فون – كوسا Von-Kossa

هذه الطريقة أقل دقة من الطريقة السابقة، إلا أنها مهمة في الكشف عن الكالسيوم في النسيج الحيوانية. أما مبدأ هذه الطريقة، فيعتمد على إحلال الفضة مكان الكالسيوم و إطلاقه من أملاح كربونات الكالسيوم و فوسفات الكالسيوم بشكل شوارد وفق المعادلة الآتية:



ثم يجري اختزال الفضة بواسطة ضوء ساطع أو بالأشعة فوق البنفسجية.

المثبت المستخدم : الكحول المطلق.

المحاليل المستعملة:

* محلول نترات الفضة 5%.

* محلول السفرانين 1%.

* محلول هيدروكينون.

العمل المخبري:

- 1- أزل الشمع عن المقاطع ، ثم أعد الماء للمقاطع.
 - 2- ضع المقاطع في محلول نترات الفضة 5%، في مكان مظلم مدة 30 دقيقة.
 - 3- اغمس المقاطع بالماء المقطر وعرضها في أثناء ذلك للضوء مدة ساعة، ثم ضعها في الهيدروكينون مدة 5 دقائق.
 - 4- اغسل بالماء المقطر، ثم اصبغ بالسفرانين 1% مدة 2-3 دقائق.
 - 5- انزع الماء اعتباراً من كحول 70 % ثم روق وغط واستر.
- النتيجة:** تظهر أماكن وجود شوارد الكالسيوم بشكل ترسبات بنية اللون أو سوداء (في الملحق الملون مقطعاً ملوناً بهذه الطريقة).

2- الكشف عن الحديد:

يكون الحديد في النسيج مرتبطاً مع البروتين إما ارتباطاً ضعيفاً، وفي هذه الحالة يمكن تحريره بالمعالجة بالحمض الخفيف الذي يتفاعل مع شوارد الحديدي ferric iron كمافي الهيموسيدرين haemosidrin، أو أن يرتبط بقوة مع البروتين فيطلق عليه اسم الحديد المستتر أو المقنع

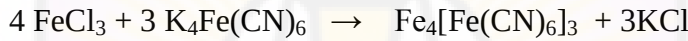
masked iron كما هو الحال في الهيموغلوبين haemoglobin و ferritin، وهما شكلان لاختزان الحديد، ولا يكشف عن الحديد إلا باستعمال محاليل أكسدة قوية لتحرير شوارد الحديد من البروتين المرتبط به.

يوجد الحديد في أنسجة الجسم على هيئة شوارد حديد ثلاثية التكافؤ. ويعد نخاع العظم المخزن الرئيسي للحديد، ويليه الكبد والطحال.

طريقة أزرق بروشيا(طريقة بيرلز)(Prussia bleu(Perls):

وهي من أشهر الطرائق للكشف عن الحديد في النسيج المريضة كالکبد و الطحال في التشريح المرضي.

تعتمد هذه الطريقة على حدوث تفاعل بين شوارد الحديد في النسيج في وسط حامضي مع فيروسيانيد ferrocyanide لتشكيل معقد هو فيروسيانيد الحديد ferric - ferrocyanide وفق المعادلة الآتية :



المثبت المستخدم : فورمالين 10%

المحاليل المستعملة :

- * محلول فيرو سيانيد البوتاسيوم حمض كلور الماء ويتركب من مزج فيرو سيانيد البوتاسيوم 2 % وحمض كلور الماء 2 % بكميات متساوية ، ويحضر طازجاً عند الاستعمال.
- * أحمر معتدل 1%.

العمل المخبري:

- 1- أزل البارافين، ثم أعد الماء للمقاطع بالكحولات متناقصة التركيز حتى الماء المقطر.
- 2- ضع المقاطع في محلول فيروسيانيد البوتاسيوم حمض كلور الماء مدة 30- 60 دقيقة وحرارة 37 °C مئوية على أن يغيّر المحلول كل نصف ساعة، ثم اغسل بالماء المقطر.
- 3- اصبغ النوى بأحمر معتدل مدة 3 د، ثم اغسل بالماء المقطر.
- 4- انزع الماء، ثم روق وغط بالصمغ العربي أو بال D. P. X ، ثم استر.

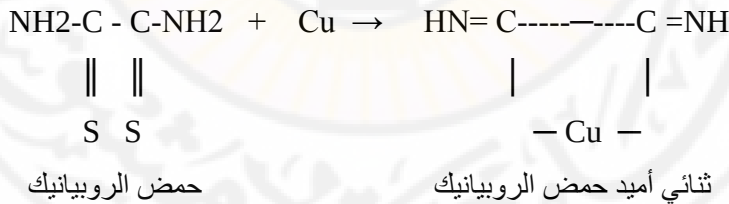
النتيجة: يظهر الحديد بلون أزرق بروشي في أماكن وجوده في النسيج (أشكال مجهرية متنوعة (كبد- طحال - نقي العظم)في الملحق الملون ويظهر فيها أماكن وجود الحديد).

3- الكشف عن النحاس:

يعد عنصر النحاس عنصراً مغذياً أساسياً لأنسجة الجسم، ومكوناً مهماً في بنية وعمل أنزيمات السيتوكرومات وكذلك أنزيمات الأكسدة والإرجاع .

لا يوجد النحاس حراً بل يوجد بتراكيز قليلة في النسيج ومرتبطة مع الألبومين والبروتينات الأخرى، غير أن التراكيمات منه في النسيج يشكل حالة مرضية تشخيصية كحالات تليف الكبد. و يتراكم في خلايا الكبد، وفي قرنية العين وفي الجسم المخطط من الدماغ عند المرضى الذين يعانون من مرض ويلسون الوراثي.

يستخدم عادة للكشف الكيميائي النسيجي عن النحاس كاشفان: الكاشف الأول هو ثنائي تيو اكساميد Dithiooxamide المعروف أيضاً بحمض الروبيانيك rubenic acid والذي يعطي مع النحاس معقد بوليميري مستقر بلون أخضر داكن هو ثنائي أميد حمض الروبيانيك . وهذا المعقد يمكن أن يحفظ ويحافظ على هذا اللون عند طمر المقاطع في وسط راتنجي . ويتم التفاعل وفق المعادلة الآتية :



أما الكاشف الآخر المستخدم للكشف عن النحاس في المقاطع النسيجية هو 5 ب- ثنائي متيل امينو بنزليدين رودانين.

(DMABR) 5p-dimethylaminobenzylidene rhodanine أو ما تعرف بتقانة الرودانين Rhodanine (DMABR) .

يرتبط ملون الرودانيين مع النحاس أو النحاس المرتبط مع البروتينات ليعطي منتجاً ملوناً باللون الأحمر و ينحل بالمذيبات العضوية، وهذا يتطلب الحفظ أو الطمر بوسط مائي. في كلا الكاشفين يتطلب العمل وضع المقاطع مدة ليلة كاملة حتى يظهر اللون . مع الإشارة إلى أن كاشف الرودانيين يعد أكثر حساسية من ديتيواوكزاميد . ويمكن زيادة حساسية الكاشف دي تيواوكزاميد بإطالة فترة الحضانة إلى 72 ساعة . ولهذا فإنه غالباً ما تستخدم طريقة الرودانيين التي تعطي نتائج أفضل . يمكن تلوين النواة بالهيماتوكسيلين. ولا بد من الإشارة أخيراً، إلى أنه في أثناء عملية الاستر وإنزلاق الصفيحة على المقطع، قد يبهت لون النحاس الملون إذا كان تركيز النحاس قليلاً في المقاطع ، لاسيما إذا كان التلوين بالهيماتوكسيلين مبالغاً فيه، وعندها يصعب مشاهدة تراكمات النحاس. و لتجنب التلوين الضعيف للنحاس ينصح باستخدام مقاطع أثخن من 6 ميكرون.

طريقة الرودانيين للكشف عن النحاس:

المثبت المستخدم: فورمالين 10% .

المحاليل المستخدمة :

* 5-p-dimethylaminobenzylidenel : يُرْكَب من حل 2 ml رودانيين في 100 ml كحول مطلق. يمزج جيداً ويوضع في البراد ، ويصلح للاستعمال مدة 3 أشهر. وعند الاستعمال يحرك جيداً ثم يرشح بورق ترشيح ويستخدم كل مره محلول جديد ولمرة واحدة ويرمى الباقي . يجب تجنب الاحتكاك والاستنشاق لكونه محلولاً مخرشاً للجهاز التنفسي . * الهيماتوكسيلين التجاري .

العمل المخبري:

- 1- انزع الشمع وأعد الماء للمقاطع وصولاً للماء المقطر .
- 2- ضع محلول الرودانيين في الميكرويف مدة 60 ثانية باستطاعة 70 ثم ضع المقاطع في محلول جديد مدة 30-60 دقيقة.
- 3- اغسل المقاطع عدة مرات بالماء المقطر (مع تبديل الماء كل مرة).
- 4- ضع المقاطع مدة 1-3 دقائق في الهيماتوكسيلين ثم اغسل بالماء المقطر .

5- انزع الماء بشكل سريع باستخدام الكحول ثم شطف المقاطع بالكزايلين، واطمر بسائل الطمر البيرمونت.

النتيجة: تظهر مستودعات النحاس في النسيج بعد التلوين بلون أحمر ناصع إلى البرتقالي في حين تظهر النوى باللون الأزرق (مقطع في الكبد ملوناً بملون الروداني في الملحق الملون).

طريقة حمض الروبيانيك rubenic acid :

المثبت المستخدم : فورمالين، أو التثبيت بالتجميد (عند التقطيع بالكريوستات).

المحاليل المستعملة :

- 250 ml من كحول 70%، ويضاف إليه 0.1 % حمض الروبيانيك.
- 0.5 g خلات الصوديوم.
- كلوروفورم.
- كحول 70%.

العمل المخبري:

- 1- ضع العينة في كحول 70% مضافاً إليه 0.1 % حمض الروبيانيك مدة 10 دقائق.
- 2- أضف 0.5 g من خلات الصوديوم إلى المزيج السابق (رقم 1) مع التحريك المتواصل حتى تمام الذوبان، ثم اترك العينة في المحلول مدة 24-48 ساعة.
- 3- اغسل العينة في الكحول 70 % ثم حضر المقاطع بالمقطع الثلجي ، أو أتمم العمل وفق الخطوات الآتية :

- أ - اترك العينة في كحول 70% مدة ساعة ونصف، ثم انقلها إلى كحول مطلق مدة 24 ساعة.
 - ب - روق العينة بالكلوروفورم ثم ضمن بالبارافين.
 - ج - قطع المقاطع بسماكة 6 ميكرون، ثم جففها بالمحم (الحاضنة).
 - د - أزل الشمع ثم روق بالكزيبول ثم غط و استر.
- النتيجة : يتلون النحاس بلون أخضر مسود في أماكن وجوده (مقطع في الكبد ملوناً بمحلول حمض الروبيانيك في الملحق الملون) .

4- الكشف عن التوتياء:

يوجد التوتياء (الزنك) في بروتينات الجسم بشكل طبيعي، ويرتبط بخلايا بيتا في جزر لانغرهانس في البنكرياس و هي الخلايا المفترزة للأنسولين، كما يوجد في الكريات البيض الحبيبية، وفي الخلايا الرئيسية في المعدة وخلايا باثيث في الأمعاء، وفي ظهارة البروستات، وفي الجهاز العصبي المركزي ويترسب التوتياء في أنسجة الأشخاص الذين يتعرضون للقنابل الدخانية التي تستخدم لتفريق المتظاهرين.

طريقة ثنائي التيزون Dithizone:

المثبت المستخدم : كحول مطلق بحرارة 4 °C مئوية مدة 10 دقائق في المقاطع الثلجية، أو عينات نسيجية مثلجة.

المحاليل المستعملة :

* محلول التشابك : يذاب في 100 ml من الماء المقطر المواد الآتية :

g 55	نيو سلفات الصوديوم خماسي الماء
g 5.4	خلات الصوديوم الجافة
g 1	سيانيد البوتاسيوم

* محلول ثنائي التيزون: يحضر قبل الاستعمال مباشرة من المواد الآتية :

ml 48	محلول ثنائي التيزون 0.1 مذاب في الأسيتون المطلق
ml 36	ماء مقطر
ml 4	حمض الخل الثلجي 6%
ml 11.6	محلول التشابك
ml 0.4	محلول طرطرات البوتاسيوم والصوديوم 2%.
	* كلوروفورم.

العمل المخبري:

1- أزل الشمع عن المقاطع واتركها تجف.

2- اغمس بمحلول ثنائي التيزون مدة 10 دقائق.

- 3- اغمس مرتين متتاليتين بالكلوروفورم مدة 30 ثانية لكل مرة.
 - 4- ارفع المقاطع من الكلوروفورم، واتركها لتجف بالهواء بشكل جزئي.
 - 5- إغمسها بالماء المقطر، ثم نشفها بورق النشاف، ثم غط بوسط مائي واستر.
 - 6- حضر مقاطع شاهدة وعالجها بحمض الخل الثلجي 1% لاستخلاص التوتياء قبل التلوين. ثم تابع معاجة المقاطع وفق المراحل السابقة.
- النتيجة :** يتلون الزنك بلون قرمزي في أماكن وجوده في النسيج ولن يظهر اللون في المقاطع الشاهدة

سابعاً: الكشف عن الأصبغة Pigments

تؤدي الأصبغة الموجودة في النسيج الحيوانية دوراً مهماً في تشخيص العديد من الحالات المرضية المتعلقة في النسيج كاليرقان – النزف – الزلال – الميلانوما... الخ . وبشكل عام فإنه يقصد بتعبير الأصبغة في مستوى المقاطع النسيجية المواد التي تبدي لوناً معيناً، ويمكن مشاهدتها من دون أي صبغ للنسيج، أوحى بالمشاهدة العيانية، و قد تعكس هذه الأصبغة حالة طبيعية أو مرضية، و تحدد هوية الأصبغة إما من لونها أو حجمها أو شكلها أو من خلال بعض الاختبارات الكيميائية (على سبيل المثال إذا أعطى الاختبار الكيميائي لون أزرق وطبق على صباغ لونه أصفر فالنتيجة ستكون لوناً أخضر).

يمكن تصنيف الأصبغة في النسيج الحيوانية من حيث المصدر إلى ثلاث مجموعات:

- 1- داخلية المصدر endogenous: كالميلانين Melanin – الهيموسيدرين Hemosiderin - اليوريات Urates - والصفراء Bile.
 - 2- خارجية المصدر exogenous: كالحديد Iron - الكربون Carbon – والليوكروم Lipochromes.
 - 3- شوائب Artifact: نذكر منها الفورمالين Formalin - الزئبق Mercury – وبيكرومات البوتاسيوم Bicromat potassium.
- وفي هذا الفصل سنتحدث بإيجاز على الأصبغة داخلية المصدر مع بعض الطرائق للكشف عنها.

1- الميلانين melanin:

يعتبر الميلانين من الأصبغة المشهورة في النسيج الحيوانية، وهو غير مرتبط بالدم ويوجد بشكل خاص في مستوى أنسجة الجسم ويظهر الميلانين بلون أسمر أو أسود. يتركز وجوده في بعض مناطق الجسم: في الجلد ، في جراب الشعرة ، وقزحية العين، وكذلك في بعض مناطق الدماغ عند الجنين وتبدو بشكل بقع Parches في مستوى الغشاء العنكبوتي الذي يغلف الدماغ . إن توزع صبغة الميلانين وكميتها هي مايفسر الاختلاف في لون الشعر والبشرة و من جهة أخرى فإن صباغ الميلانين قد يكون مرتبطاً ببعض الحالات المرضية في الجسم كحالة مرض أديسون، وأورام الشامة الحميدة. ينتج الميلانين من تفاعلات نزع زمرة الكربوكسيل من الحمض الأميني التيروسين. ولا ينحل في المحاليل العضوية بسبب ارتباطه الوثيق مع البروتينات ولهذا تختلف طرق التلوين الخاصة به بين البسيطة والمعقدة.

طريقة فونتانا ماسون للكشف عن الميلانين:

المثبت المستخدم : فورمالين 10 % .

المحاليل المستخدمة :

* محلول أمونياك الفضة Ammoniacal Silver: يحضر المحلول بإضافة 25 ml من محلول 10% نترات الفضة، ثم يضاف هيدروكسيد الأمونيوم قطرة بقطرة حتى يظهر راسب ، ثم يصبح المحلول شفافاً ، بعد ذلك نضيف من جديد 1 ml من محلول 10% نترات الفضة ، يصبح المحلول عكراً بعض الشيء . بعد ذلك نترك المزيج يهدأ لمدة 24 ساعة. يعدّ صالحاً للتخزين فترة من الزمن ، و يرمى المحلول بعد الاستخدام .

* محلول العمل Working Solution: ويحضر بأخذ 12.5 ml من المحلول السابق ويضاف إليه 37.5 ml ماء مقطر قبل التجربة مباشرة، ثم استخدم الماصة لسحب محلول أمونياك الفضة في الطور العلوي ويرشح على ورق ترشيح في حين يترك الراسب الذي يبقى في عمق البيرشر.

* محلول 10 % نترات الفضة: يوضع 20 mg من نترات الفضة في 200 ml ماء مقطر، يمزج جيداً ثم يوضع في إناء منظف بالحمض ويترك في البراد حيث يمكن استخدامه لمدة 6 أشهر.

* محلول 0.1 % كلوريد الذهب Gold Chloride: يوضع 5 ml من محلول 0.1 كلوريد الذهب في 45 ml ماء مقطر.

* محلول 5 % هيبوسلفات الصوديوم .

* ملون الأحمر السريع النووي .

العمل المخبري:

- 1- انزع الشمع ويعاد الماء بوضع المقاطع بالماء المقطر لمدة 2 ساعة.
 - 2- ضع الشرائح في محلول الفضة (محلول العمل) وفي الميكرويف على استطاعة 20 لمدة دقيقتين فتصبح كثافة المقاطع مناسبة (يمكن الاستمرار بوضعها عدة ثواني أخرى إذا لزم الأمر) أو توضع الصفائح بدرجة 60 °C مئوية في الحاضنة لمدة ساعة .
 - 3- اغسل المقاطع في الماء المقطر.
 - 4- ضع في محلول هيبوسلفات الصوديوم لمدة 5 دقائق ثم تغسل بالماء.
 - 5- لون الشرائح مدة 5 دقائق بملون الاحمر السريع النووي ثم تغسل المقاطع بماء جار.
 - 6- انزع الماء بالكزايلين ثم روق و غط واستر.
- النتيجة : تتلون أصبغة الميلانين باللون الأسود .

طريقة قصر الميلانين Melanin bleach

تهدف هذه الطريقة للتخلص من صبغة الميلانين عندما تكون بكميات كبيرة في النسيج، الأمر الذي يصبح معه من الصعب رؤية تفاصيل الخلايا. وعادة ما يستخدم في التجربة مقطعان متشابهان ، يستخدم الأول للتخلص من الميلانين أما المقطع الآخر فيبقى شاهداً.

المثبت المستخدم: 10% فورمالين.

المحاليل المستخدمة :

* برمنغنات البوتاسيوم Potassium Permanganate: حل 0.15 mg من برمنغنات البوتاسيوم في 50 ml من حمض الكبريت الممدد 0.3 % . يحضر هذا المحلول طازجاً ويرمى بعد الاستخدام.

* حمض الأوكزاليك 6% Oxalic Acid

* صبغ الهيماتوكسيلين والايوزين .

العمل المخبري:

- 1- انزع البارافين بالكزائلين، وأعد الماء للمقاطع.
- 2- ضع المقاطع المراد التخلص من الميلانين فيها بمحلول برمنغنات البوتاسيوم لمدة 2-4 ساعة، أما المقطع الشاهد فيترك بالماء حتى نصل إلى مرحلة التلوين بالهيماتوكسيلين إيوزين ، وهنا يجب الانتباه إلى إن المقاطع تميل للسقوط ، لذلك يفضل دعم هذه المقاطع بالكولونيدين بعد هذه المرحلة.
- 3- يوضع المقطع الأول لمدة 2-3 دقيقة في محلول 1% حمض الأوكزاليك ، أو يترك حتى يصبح عديم اللون.
- 4- اغسل المقاطع بالماء المقطر.
- 5- يوضع كل من المقطعين بأن واحد بالهيماتوكسيلين والإيوزين، ثم انزع الماء وروق وغط واستر.

النتيجة: لا يظهر صباغ الميلانين في المقطع المعالج ببرمنغنات البوتاسيوم.

2- الهيموسيدرين Hemosiderin:

يدخل الهيموسيدرين في بعض الحالات المرضية، كالنزوف و مرض فقر الدم الإنحلالي و مرض السكري و التهاب الكبد الليفى وغيرها. يبدو بلون أصفر مائل للسمره في المقاطع النسيجية غير الملونة ، وهو غير منحل في المحاليل القلوية، ولكنه ينحل في المحاليل الحمضية القوية. إن تثبيت المقاطع بالفورمالين يشوه بنية الهيموسيدرين كونه ينحل ببطء بالمحاليل الحمضية الضعيفة .

طريقة مالوري وبيرل :Mallory and Perl's methods

وهي نفسها الخاصة بالحديد ، وحسب هذه الطريقة فإن شوارد الحديد Ferric Iron في النسيج ترتبط مع الفيروسيانيد في المحلول مشكلة فيروسيانيد الحديد المعروف بأزرق بروشيان Prussian blue . وبما أن شوارد الحديد كانت ترتبط بقوة مع البروتينات في الهيموغلوبين فإنه من الضروري أولاً استخدام الحموض لتحريره من المعقد البروتيني . ويستخدم لذلك مزيج من حمض كلور الماء (محلول تحرير) وفيروسيانيد البوتاسيوم (محلول ربط) يمكنه من تحرير شوارد الحديد وتلوينها في نفس الوقت و يستخدم ملون أحمر نووي سريع nuclear fast red لصبغ الأنوية (يمكن الاستغناء عنه).

النتيجة : يتلون الهيموسيدرين (شوارد الحديد) بلون أزرق، وتتلون الأنوية بلون أحمر(مقطع في الكبد ملوناً بهذه الطريقة في الملحق الملون) .

3- اليورات urates:

يشكل كل من الأساسين البيورينيين Purines ، الأدنين والغوانين ، نصف الأسس الأزوتية الداخلة في تركيب الحمضين النوويين DNA ، RNA . إن البيورينات أنفة الذكر التي تتحرر من الخلايا الميتة تدخل من جديد في تشكيل نيكليوتيدات جديدة ، إلا أن كمية صغيرة منها تستقلب إلى مركب الكسانثين Xanthine الذي يتأكسد بدوره إلى حمض البول uric acid ، و تحدث هذه التفاعلات المحفزة أنزيمياً بشكل أساسي في نسيج الكبد . في الحالات الطبيعية يتحرر حمض البول المتشكل إلى الدم ومن ثم يطرح مع البول، من جهة أخرى فإن المستوى العالي من حمض البول في الدم ، يمكن أن ينتج من أخطاء استقلابية متعلقة باستقلاب البيورينات أو من طرح غير كافٍ من قبل الكلى . وعادة ما يترافق ارتفاع مستوى حمض البول مع ترسيب لبلورات بيورات الصوديوم في بعض النسيج وبشكل رئيسي في المفاصل مسبباً داء النقرص . كما أن تبلور اليورات أو المستويات العالية منها في الدم قد يعرض الشخص لحالات مرضية أخرى كال فشل الكلوي، وتشكل الحصى ، والتهاب المفاصل . إن شوارد بيورات الصوديوم Sodium biurate قابلة للذوبان بنسبة 5-10 مغ/1لتر وذلك حسب الطريقة المعتمدة في القياس وهذه النسبة قريبة من المستوى الطبيعي في الدم 3-7مغ/1لتر. أما الشكل البلوري لليورات فهي اليورات وحيدة الصوديوم

Monosodium urate والمرسبة في مستو النسج. وتتميز عادة بلون أصفر شاحب ، لكن يمكن أحياناً أن تتغير من عديمة اللون إلى اللون الأسمر وذلك حسب ثخانة هذه البلورات . في النسج تكون بلورات حمض البول على شكل يورات الصوديوم Sodium urate وهي قابلة للانحلال في المحاليل المائية وقليلة الانحلال في المركبات الكحولية ، ولذلك فإن المثبت الأفضل ليورات الصوديوم هو الكحول 95% والذي يمنع تحلل اليورات. وتتلون بشكل جيد بالهياتوكسيلين ايوزين، وكذلك يمكن مشاهدة البلورات عند فحصها بالضوء المستقطب حيث ستظهر البلورات باللون الأصفر أو الأزرق، وذلك حسب طريقة اصطفاف البلورات. ومن جهة أخرى فإنه يمكن الكشف عن هذه البلورات في المقاطع النسيجية بطريقة تلوين خاصة تدعى طريقة غوموري.

الكشف عن يورات الصوديوم حسب طريقة غوموري:

ميتيلين امين الفضة Gomori's methelenamine- silver method.

حسب هذه الطريقة فإن المقاطع توضع في مزيج (الفضة - ميتيلين أمين). وهنا فإن مركب اليورات مثله مثل صبغة الميلانين يمكن أن يرتبط مع الفضة في أملاح الفضة، وتقوم بإرجاعه إلى ذرات الفضة. وبعد عملية الإرجاع، تستخدم تيوسلفات الصوديوم لإزالة الفضة غير المرجعة من المقاطع . وبعد ذلك يتم تلوين المقاطع بالأخضر الخفيف Light green ، وحسب هذه الطريقة سوف تظهر اليورات بلون أسود أما خلفية المقطع ستظهر بلون أخضر. أما المثبت المستخدم في طرق الكشف عن اليورات فهو الكحول 95% ، وذلك لأن بلورات اليورات هي منحلة في المحاليل المائية.

العمل المخبري:

- 1- ازل البارافين ثم اغسل المقاطع عدة مرات بالكحول المطلق ولا يجب إعادة الماء .
- 2- ضع المقاطع بمحلول ميتيلين أمين الفضة بالميكروويف لمدة 60 ثانية، وفي حال عدم وجود ميكروويف يمكن وضع المقاطع بالمحلول المسخن مسبقاً بدرجة حرارة 60 °C مئوية ، ثم تمكث في حمام مائي مدة 30 دقيقة بدرجة 60 °C مئوية.
- 3- اغسل بالماء المقطر.

4- ضع المقاطع بمحلول هيبوسلفات الصوديوم 5% مدة 3 دقائق ثم اغسل المقاطع بماء الحنفية مدة 3 دقائق ثم بالماء المقطر.

5- لون المقاطع بمحلول الأخضر الخفيف لمدة 3 دقائق ثم اغسل بالماء المقطر.

6- انزع الماء وروق المقاطع ثم غط واستر .

النتيجة: تبدو بلورات اليورات بلون أسود و خلفية المقطع بلون أخضر مع الانتباه إلى أنه في حال وجود توضعات كبيرة للكالسيوم في النسيج فإنها تتلون بلون أسود بهذه الطريقة (الملحق الملون).

4- الصفراء Bile:

تتميز الكريات الحمراء بنصف عمر وسطي 120 يوماً، وبعد أن تتحطم هذه الخلايا، فإن معظم مكوناتها تدخل طرناً إستقلابية متعددة ، و يعاد استخدامها في إنتاج كريات حمراء جديدة. إن أحد أهم نواتج هذا التفكك هو مركب البيلفيرين bilvedrin ، ينتقل هذا الأخير إلى الكبد حيث يرجع بعد ذلك إلى مركب البيلروبين bilirubin .

بعد ذلك يزال البيلروبين من الدم الدوراني، ويفرز كأحد مكونات الصفراء بعد أن يُربط بحمض الغليكورونيك ويصبح هذا المعقد المتشكل منحلأ في الماء على عكس البيلروبين غير المرتبط الذي يعتبر غير منحل . وهذه الأخيرة تنتقل إلى الحويصل الصفراوي ثم إلى الكولون ومنها تطرح من الجسم مع البراز وتكون هي السبب في لون البراز الطبيعي.

يُعد كلاً من البيلفيرين والبيلروبين من الأصبغة الصفراوية. ويختلف لون الأصبغة الصفراوية من الأصفر الضارب للسمرة إلى الأخضر. إن الزيادة في الأصبغة الصفراوية قد تشاهد في مرضى الحصاة الصفراوية، وفي حالات التسمم، وفي بعض الأمراض الأنزيمية الكبدية الخلقية أو الأورام الكبدية. وقد تظهر على لون المريض.

تعتبر تقانة هال Hall technique من أكثر الطرائق استخداماً وتعطي نتائج ثابتة إلى حد كبير أثناء الكشف عن الأصبغة الصفراوية في النسيج . وفي هذه الطريقة يتأكسد البيلروبين إلى البيلفيرين في محلول من كلور الحديدي ferric chloride وحمض ثلاثي كلور الخلات trichloracetic acid . وبعد ذلك يتم تلوين المقاطع بمحلول فان جايسون Van Gieson . ولا بد من الإنتباه إلى أنه فقط الصفراء والأصبغة الصفراوية الموجودة في الخلايا الكبدية تُكشف

بهذه الطريقة الخاصة . وللكشف عن الأصبغة الصفراوية في النسيج الأخرى خارج الكبد مثلاً كأماكن النزف Hemorrhage فإنه تستخدم تقانة غمولين Gmolin . أو تلوين ستين Stein stain إلا أن الطريقتين الأخيرتين لا تعطي في معظم الأحيان نتيجة مقاربة أو ثابتة كما أنه يصعب تفسير النتائج ولذلك فإننا سنقتصر على ذكر الطريقة الأولى .

طريقة هال للكشف عن صبغة البيليروبين في خلايا الكبد:

المثبت : فورمالين 10% .

المحاليل المستخدمة:

* محلول كلور الحديد 10% : يوضع 5 mg من كلور الحديد في 100 ml ماء مقطر (يحضر طازجاً).

* كاشف فوشيت Fouchet's Reagent: يحل 12.5 mg من ثلاثي كلور حمض الخل في 50 ml ماء مقطر يمزج جيداً ، ثم يضاف 5 ml من محلول 10% من كلور الحديد المحضر سابقاً يحضر الكاشف عند الاستخدام ويرمى الفائض بعد الاستخدام.

- محلول فان جيسون Van Gieson's Solution: يحل 1 ml من محلول الفوكسن الحامضي 1% في 45 ml من حمض البكريك المشبع. يمزج جيداً ويبقى هذا المحلول قابلاً للاستخدام لمدة اسبوعين. يجب تجنب الاحتكاك والاستنشاق.

العمل المخبري :

- 1- ينزع البارافين ويعاد الماء للمقاطع .
 - 2- توضع المقاطع بكاشف فوشيت لمدة 5 دقائق.
 - 3- تغسل المقاطع بماء الحنفية، ثم يتبع بالماء المقطر.
 - 4- توضع الشرائح لمدة 3-5 دقيقة في محلول فان جيسون.
- تغسل بالماء المقطر، ثم ينزع الماء وتشطف بالكزابلين ثم تطمر بالسائل الطمر البيرمونت .
- النتيجة :** تظهر مادة الصفراء بلون أخضر، وتتلون العضلات والسيتوبلازما بلون أصفر أما الكولاجين في النسيج فيظهر باللون الأحمر.

ثامناً: الكشف عن الفيتامينات

الكشف عن حمض الأسكوربيك (فيتامين C):

يعد حمض الأسكوربيك أو ما يعرف بفيتامين C من مشتقات المواد الكربوهيدراتية، وهو الفيتامين الوحيد الذي يمكن الكشف عنه في الكيمياء النسيجية بدون طرق نوعية .
لا يمكن لحمض الاسكوربيك تصنيعه في الجسم ، كما لا يمكن تخزينه ، بل يؤخذ عن طريق الأغذية الغنية به كالحمضيات والفليفلة والسبانخ والبروكلي والفريز وغيرها...، ويتميز بنشاطه باعتباره مضاد أكسدة، ويساعد في ترميم الجروح والنزوف والغضاريف .
يمكن الكشف عنه في النسج أكثر من الدم ، إذ يتركز في بعضها بنسب عالية تصل حتى 90-100 % كالظر والغدة الصعترية والقرنية، كما يوجد بكميات قليلة بنسبة 10-50% في الرئة والطحال ومخاطية المعى والبنكرياس والغدد اللعابية. ويطرح عن طريق البول بعد استقلابه.
يفضل استعمال المثبتات البسيطة أو التثبيت بالتجميد . إن استعمال المثبتات قد يؤدي إلى انزياح الفيتامين من مكانه، وبالتالي يعطي صورة غير حقيقية عن أماكن تواجده في النسيج .
لذلك يفضل الكشف عنه في النسج الطازجة والمثبتة بالتجميد. ويكشف عنه باستعمال معدن الفضة في وسط حمضي.

المثبت المستخدم: أي مثبت عام (الكحول 70% أو مثبت بوان).

المحاليل المستعملة:

محلول التلوين ويتركب من:

نترات الفضة

حمض الخل 3%

g 10

ml 100

العمل المخبري:

- 1- الصق مقاطع البارافين بمادة الألبومين على الشرائح المجهرية، واتركها مدة 24 ساعة بدرجة 37 °C مئوية (في الحاضنة).
- 2- اصبغ الصفائح (دون إزالة الشمع) في محلول نترات الفضة الخلي 10% مدة 6-14 ساعة في مكان مظلم.
- 3- اغسل الشرائح في الكحول 95%، ثم الكحول 100%، مدة 5 دقائق لكل مرحلة.
- 4- ضع الشرائح في الكزيلول لإزالة الشمع، ثم غط واستر.

النتيجة: يظهر مكان وجود حمض الأسكوربيك في النسيج بلون بني مسود.

طريقة سوسا للكشف عن حمض الاسكوربيك 1952 Methode Sosa:

تعتمد على ترسيب نترات الفضة الخلية على القطع النسيجية، قبل تضمينها بشمع البرافين، ومن ثم تتم معالجة القطع بطمرها وتقطيعها وتلوينها بالطريقة التقليدية.

المحالييل المستعملة:

- محلول مائي 10% نترات الفضة 100 حجم
- حمض الخل الثلجي 1 حجم
- محلول مائي 10% كبريتات الصوديوم
- محلول مائي 10% هيبوكبريتات الصوديوم.

العمل المخبري:

- 1- اغمر القطع النسيجية في محلول نترات الفضة حمض الخل مدة ساعة في مكان مظلم.
 - 2- انقل الصفائح إلى محلول كبريتات الصوديوم مدة ساعة.
 - 3- مرر إلى محلول هيبو كبريتات الصوديوم مدة ساعة.
 - 4- اغسل بالماء المقطر.
 - 5- ضمن القطع بالشمع ثم قطعها ولونها بالطريقة العامة (هيماتوكسيلين ايزون).
- النتيجة:** تتلون أماكن وجود فيتامين C بلون أسود بسبب ترسب الفضة المعدنية.

طريقة ايرانكو (1954) Methode Eranko:

يُفضل في هذه الطريقة استعمال عينات طازجة غير مثبتة.

المحالييل المطلوبة:

- محلول مائي 20% نترات الفضة 10 حجم
- كحول 96% 9 حجم
- حمض الخل 1 حجم
- محلول مائي حمض الخل الثلجي.

العمل المخبري:

- 1- استعمل نسيجاً طازجاً ، وقطعه بالمقطع الثلجي.
 - 2- عالج المقاطع بمحلول الفضة مدة 10 ثوانٍ إلى عدة دقائق.
 - 3- اغسل بمحلول مائي حمض الخل.
 - 4- غط المقاطع وستر.
- النتيجة : يظهر مكان تواجد فيتامين C بلون أسود .





استخلاص الزيوت العطرية و المركبات الثانوية من النسيج النباتية

الزيوت العطرية هي مجموعة مواد فعالة وتتكون في النبات نتيجة سلسلة من التفاعلات كما تتجمع في مكان محدد من النبات ولها رائحة مميزة، وهي متطايرة في درجة الحرارة العادية لذلك تسمى بالزيوت الطيارة، وعلى عكس الزيوت الدهنية فإن الزيوت العطرية تتبخر و بشكل كامل ولا تترك أي أثر.

إن الزيت العطري (الشكل 65) هو مستخلص نباتي مركز بمنزلة روح النبات أو جوهرة ، أو كما يطلق عليه أحياناً (هرمون النبات). وهذا الزيت تُقرزه غدد خاصة بالنبات قد توجد في الأزهار أو الأوراق أو السيقان أو الجذور كما توجد كذلك في لحاء بعض الأشجار.



شكل 65 : الزيوت العطرية

A- استخلاص الزيوت العطرية

توجد عدة طرائق لتصنيع الزيوت العطرية، وتتوقف طريقة التصنيع على نوع النبتة التي يستخرج الزيت العطري منها. وهذا يعني أن نوع النبات هو الذي يحدد طريقة استخراج الزيت العطري منها - ويوجد استثناء واحد فقط ولكن لكلفته العالية يعتبر خارج النطاق في عمليات الاستخلاص من الناحية الاقتصادية - وهذه الطريقة هي طريقة الاستخلاص باستخدام غاز ثاني أكسيد الكربون .

وطرائق استخلاص الزيوت العطرية بالطرائق المختلفة هي شيقة من الناحية العملية ولكن مع الوضع في الاعتبار أن عدم استخدام الوسائل المناسبة والمواد اللازمة للاستخلاص بطرائق صحيحة يؤدي إلى تدمير المحتوى الفعال للزيوت العطرية والتأثير السلبي في مواصفات الزيت من خلال الخواص والتركيبية الكيميائية للزيوت العطرية فتفقد قيمتها .

طرق الاستخلاص:

فيما يلي سنوجز طرائق استخلاص الزيوت العطرية:

أولاً - الاستخلاص بطريقة التقطير:

الهدف من عملية التقطير هو تحويل السائل الطيار أو المتبخر (الزيت العطري) الموجود بالنبات إلى بخار ثم تكثيفه لاحقاً، وتحويل البخار بالتكثيف إلى سائل مرة أخرى - هذه هي أكثر الطرائق شيوعاً، والأنسب من النواحي الاقتصادية والتقنية . تعتمد هذه الطريقة على الحرارة في الاستخلاص وهنا مكنم الخطر حيث يجب الحرص الشديد لضبط درجة الحرارة والفترة الزمنية اللازمة للتعرض للمصدر الحراري لتتناسب درجة الحرارة مع نوع الزيت الجاري استخلاصه حتى لا يتم تدمير مكوناته الفعالة.

1- الاستخلاص بالتبخير :

باستخدام هذه الطريقة يتم غمر المادة المراد استخلاص الزيت منها تماماً بالماء في وعاء ورفع درجة حرارة الإناء إلى درجة غليان الماء. في هذه الطريقة نحتمي الزيت المراد استخلاصه لدرجة معينة حيث إن الماء الموجود في وعاء الاستخلاص يكون بمنزلة - حافظ من التسخين الزائد - وبعد تبريد المادة المكثفة يُفصل الزيت عن باقي المكونات ويستخدم. يسمى الماء الناتج من عملية التبخر والتكثيف بعد استخلاص الزيت العطري الماء الحلو أو ما يعرف بماء العطور أو ماء الزهور، ومثالاً له عطر اللافندر وماء البرتقال. وتتم عملية تقطير الماء وفصلها تحت الضغط لتخفيض درجة الحرارة التي تتم فيها عملية التبخير والتكثيف لأقل من 100 درجة مئوية وذلك للمحافظة على جودة المواد المستخلصة جميعها وضمان عدم تحول بعض المستخلصات إلى عناصر أخرى أو غير مرغوب في وجودها في المستخلصات التي تغير خصائص المستخلصات ونوعيتها .

2 - التقطير ببخار الماء:

توضع المواد المراد الاستخلاص منها في أوعية خاصة ويُضغط بخار الماء الساخن حتى 100 درجة مئوية، وتحت ضغط أكبر من الضغط الجوي بشدة داخل تلك الأوعية. ينشط بخار الماء ويحفز ويحرر الجزيئات العطرية من مواد الاستخلاص - وتلك الجزيئات العطرية تمتزج ببخار الماء . يجب التحكم في درجة حرارة بخار الماء المستخدم في هذه العملية حتى لا تتأثر النباتات.

3-التقطير بالتشرب المائي :

هذه الطريقة هي نوع من الاستخلاص باستخدام بخار الماء الساخن تحت الضغط ولكن في هذه العملية يتم ضخ البخار داخل أوعية الاستخلاص من أعلى وليس من أسفل كباقي طرائق الاستخلاص بالبخار. وفي هذه الطريقة يظل المواد المراد الاستخلاص منها في قاع أوعية الاستخلاص، وتكون كمية بخار الماء المستخدم أقل من الطرائق السابقة، ومدة الاستخلاص أقل، وجودة الزيت المستخلص وكثافته وقيمة أعلى من الطرائق السابقة .

طرائق أخرى خاصة للاستخلاص بالتقطير:

1-الاستخلاص بالمزج والتجانس:

في هذه الطريقة تتم عملية الاستخلاص على مرحلتين منفصلتين متكاملتين وضرورتين لإنتاج نوع واحد من الزيت العطري - وسنعطى مثالا لسهولة الإيضاح وهو استخلاص زيت الورد العطري الذي يستخلص باستخدام طريقة تقطير الماء المذكورة سابقا - وأحد مكونات الزيت العطري المهمة (فينيل - اثيل - الكحولي) تذوب في الماء المقطر ولا تشكل جزءاً من الزيت العطري المستخرج بتلك الطريقة، وبالتالي تكون مواصفاته ليست بالمستوى الذي يجعل منه نافعاً للأغراض المختلفة - لذلك يتم عملية إعادة تقطير لماء الورد الناتج من عملية التقطير الأولى لاستخلاص مادة (فينيل - ايثيل - الكحولي) وتكثيفها، ثم إعادة إضافتها إلى زيت الورد العطري المستخرج من المرحلة الأولى و ذلك للحصول على زيت الورد العطري المكتمل.

2- الاستخلاص بإعادة التقطير أو بالتقطير المزدوج :

في حال وجود أي نوع من الشوائب في الزيوت العطرية المستخلصة فإنه يمكن تنقيتها من خلال عملية إعادة التقطير عند درجة حرارة معينة لفصل الزيت العطري النقي عن الشوائب وإعادة تقطيره - وهذه الطريقة تستخدم لإستخلاص زيوت ذات مواصفات قياسية مرتفعة .

3- الاستخلاص بالماء والبخار :

باستخدام هذه الطريقة يتم المزج بين طريقتين في آن واحد، وذلك بوضع المواد المراد استخلاص الزيت العطري منها في أوعية التسخين وغمرها بالماء، ورفع درجة حرارة الأوعية إلى الغليان مع إضافة مصدر استخلاص آخر وهو بخار الماء الساخن. وهذه الطريقة يتم فيها استخلاص الزيوت العطرية للأغراض التجارية غير العلاجية . . الاستخلاص بالاحتكاك .

4- الاستخلاص الجزئي على مراحل متتابعة:

في هذه الطريقة يستخلص الزيت العطري في كميات صغيرة وعلى مراحل متتابعة ومتكررة لنفس الطريقة، وفيها تظل عملية الاستخلاص مستمرة بدون توقف بإضافة المواد المرغوب في استخلاص زيوتها العطري حتى الاكتفاء من تحضير الكمية المرغوب فيها من الزيت العطري.

ثانياً- الاستخلاص بطريقة الطرد:

هي طريقة للإستخلاص باستخدام الضغط البارد، وبها تستخرج أغلب الزيوت العطرية من الحمضيات، هذه الطريقة بما أنها لا تستلزم الحرارة فتتم بطريقة العصر على البارد في مكابس هيدروليكية تحت ضغط عالٍ وتعطي زيوتاً عطرية عالية الجودة، ولكن بعض المصانع عند تكرير تلك الزيوت ونواتج العصر تستخدم مركبات كيميائية أو الحرارة .
وهذه الطريقة لها عدة وسائل في تطبيقها نستعرض منها :

1- الاستخلاص البارد الإسفنجي:

كانت هذه الطريقة تستخدم وتنفذ يدوياً، وذلك بغمر قشور الثمار في الماء الدافئ حتى تتشرب الماء فتنتفخ وبالتالي تصبح قابلة للعصر بسهولة وتحرير الزيت العطري من الخلايا الزيتية التي

تحفظه بداخلها، وتعصر ويجمع الزيت الناتج باستخدام الإسفنج الذي ما يلبث أن ينشبع بالزيت العطري الذي يعصر من الإسفنج يدويا ويتم ترشيحه ثم تعبئته.

2- الاستخلاص بالتقشير والتكثيف:

في هذه الطريقة توضع الثمار في وعاء يدار يدويا لعمل الطرد المركزي، وعند دورانه وبفعل سرعة الدوران ومواصفات في الجدار الداخلي للوعاء تنقشر الأغشية الخارجية للثمار، وتتساقط خلايا الزيت العطري والتلوينات النباتية التي تتجمع في وعاء مثبت في قاع الوعاء الدوار، و يفصل الزيت العطري عن الماء والعوالق ويعبأ.

3- الاستخلاص بالتقشير الآلي (الميكانيكي):

هذه الطريقة مشابهة تماماً للطريقة السابقة ولكن تُستخدم أيضاً في استخراج الزيوت من الثمار الحمضية. وفي هذه الطريقة تقوم الآلة بتقشير الثمار، وتكون القشور في صورة شرائح رقيقة وبعدها تقفل باستخدام تيار الماء إلى جهاز للطرد المركزي عالي السرعات، عند دورانه بسرعة كبيرة يتم فصل الزيت العطري بسرعة وكذلك عناصر أخرى يتم فصل الزيت العطري منها لاحقاً.

ثالثاً - الاستخلاص باستخدام المذيبات:

يوجد مذيبات متعددة لاستخلاص الزيوت العطرية من النباتات والأعشاب المجففة وأجزاء النبات المختلفة، ومنها المواد الكيميائية مثل الهكسان، ومنها صور أخرى مثل الزيوت الصلبة والدهون وثاني أكسيد الكربون.

يناسب هذا الاستخلاص الزيوت العطرية أكثر، ويستخدم للأعشاب والنباتات قليلة المحتوى من الزيوت العطرية الطيارة كما هو الحال في صناعة الزيوت العطرية التي تستخدم في صناعة العطور الراقية. يتم باستخدام المذيبات في عملية الاستخلاص استخراج مكونات أخرى غير الزيوت العطرية مثل المواد الشمعية والأصباغ ثم تفصل لاحقاً من نواتج الاستخلاص وكل عنصر على حدة من خلال استخدام طرائق فصل أخرى مختلفة.

1-الاستخلاص بطريقة الغمر في الزيت:

في هذه الطريقة يتم غمر الأزهار العطرية بالزيت النباتي الساخن - فتنمزق الخلايا الحافظة للزيوت العطرية فيمتص الزيت الساخن الزيت العطري منها، وبعد ذلك يصفى الزيت النباتي من الشوائب ويحفظ في العبوات .

2-الاستخلاص بطريقة تشبع الدهون :

من الناحية العملية تعد هذه الطريقة مماثلة للطريقة السابقة، ولكن بدلاً من غمر النباتات أو الأزهار في الزيت الساخن، يتم جمع الأزهار الطازجة ونزع أوراقها، ثم تغمس الأوراق لعدة أيام في زيت أو دهن نباتي أو حيواني (نقي جداً وليست له أي رائحة) حتى يتشرب الدهن الزيت العطري من أوراق الأزهار، تزال أوراق الأزهار القديمة وتستبدل بجديدة وتكرر نفس الخطوات حتى يتشبع الدهن بالزيت العطري. تنزع أوراق الأزهار بعد تشبع الدهن ويذاب الدهن المشبع بالزيت العطري في الكحول لفصل الدهون عن الزيت العطري الذي يُقطر ويعبأ. وغالباً ما يستخدم الدهن بعد عملية الفصل في صناعة صابون الوجه وصناعات أخرى. هذه الطريقة مكلفة جداً وتأخذ وقتاً طويلاً، وهي التي تستخدم في استخلاص الياسمين.

3-الاستخلاص باستخدام المذيبات الكيميائية.

4-الاستخلاص باستخدام ثاني أكسيد الكربون النشط.

B-استخلاص مركبات النبات الثانوية:

Apestraction of Secondary Plant Substances

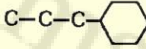
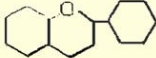
هناك العديد من المركبات التي تنتج في النبات يطلق عليها اسم المشتقات الثانوية لعمليات التمثيل الغذائي وتشمل كل من التربينات والفينولات والقلويدات وغيرها. يعدها البعض بمنزلة مركبات أو نفايات ناتجة من عمليات التحول الغذائي الأساسي Waste products إذ أنها تُثقل بعد تكوينها إلى الفجوات العصارية داخل الخلية أو تخزن بدون فائدة للنبات. إلا أن الدراسات الحديثة أثبتت أهمية هذه المركبات بالنسبة إلى الإنسان فقد استعملت في علاج الكثير من الأمراض الشائعة ومنها مرض السكر وضغط الدم، ولها القابلية على قتل الكثير من الأحياء المجهرية المرضية التي تصيب الإنسان أو تثبيط نموها. كذلك تُمثل تلك المركبات أهمية كبيرة

للإنسان فهي تُستخدم في كثير من الصناعات المهمة مثل الصناعات الدوائية وصباغة الجلود وصناعة الصابون واستخراج الزيوت العطرية، وفي صناعات التجميل، وفي الصناعات الغذائية كمكسبات للطعم والرائحة، وفي صناعة المطاط ... الخ. وعليه يمكن القول إن المشتقات الثانوية هي مواد ذات أهمية كبيرة في مجالات عديدة لذلك استخلصت من مصادر عديدة من النباتات. وسنذكر بعض الطرائق المستخدمة في استخلاص أهم المركبات الثانوية.

1-استخلاص المركبات الفينولية:

حُدثت العديد من المركبات الفعالة في الأغذية النباتية ومن بينها المركبات الفينولية. إن للمركبات الفينولية العديدة انتشاراً واسعاً في المملكة النباتية بوصفها نواتج ثانوية لعملية التركيب الضوئي، وتعد الفاكهة واحدة من أغنى المصادر لهذه المركبات، فضلاً عن كون هذه المركبات مصدراً غذائياً، فإن لها تأثيرات فسيولوجية عديدة مثل كونها مضادة للأكسدة. والفينولات عبارة عن مواد تحمل في تركيبها الهيدروكسيل على حلقة البنزين العطرية وأبسط الفينولات هي التي تحتوي على حلقة فنيل واحدة مثل الكومارين Coumarin . وهناك المركبات المتعددة الفينول التي تحتوي على أكثر من حلقة فنيل واحدة مثل Polyphenol والجزيئات الأكبر منها تشير إلى التانينات .

يشير الجدول الآتي إلى أهم المجموعات الفينولية في النباتات:

C - Skeleton	Group	examples
	Simple Phenols	Hydroquinone Arbutin
	Phenolcarboxylic acids	P - Hydroxybenzoic acid Protocatechuic acid
	Phenylpropanes	Cinnamic acids Cinnamic alcohols Coumarins Lignin
	Flavon derivatives	Flavanones Flavones Flavonols Anthocyanidins

طريقة الاستخلاص:

تؤخذ العينة النباتية المراد استخلاص الفينولات منها ، تغسل جيداً بالماء وتجفف أولاً على ورق ترشيع ثم بالفرن الكهربائي ذي تيار الهواء على درجة حرارة 30°C مئوية لحين الجفاف. تطحن العينة الجافة بطاحونة قهوة كهربائية، وللحصول على مسحوق متجانس يتم إمراره على منخل. (يمكن حفظ المسحوق في قناني زجاجية معتمدة في الثلاجة لحين الاستعمال). يؤخذ 10 غرام من المسحوق المجفف، ويضاف إليها 30 ml من الايثانول المطلق ويحرك المحلول ثم يترك في الثلاجة لمدة 24 ساعة على حرارة 18°C مئوية. يفصل الراسب عن الراشح ويضاف إلى الراسب 30 ml ميثانول تركيز 80 % ويترك لمدة 4 ساعات في درجة حرارة الغرفة. بعدها يجمع الراشح ثم يضاف إلى الراسب 30 ml ميثانول تركيز 50 % ويترك مدة 4 ساعات في درجة حرارة الغرفة. بعد ذلك يستخلص الراسب، ب 30 ml من الماء المقطر، وأخيراً يستخلص ب 30 ml من الأسيتون تركيز 75 % ويترك مدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة، وتكرر هذه الخطوة مرتين. ثم تجمع المستخلصات المتتالية، وترشح بورق ترشيع واتمان رقم 1. يجرى تقدير الفينولات الكلية في المستخلص النهائي بطريقة فولن، وذلك باستعمال كاشف فولن Folin بجهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي 650 نانوميتر. يركز المستخلص الكلي باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary Evaporator تحت الضغط المخزل على درجة حرارة 30°C للتخلص من المذيبات العضوية .

2-استخلاص الفلافونويدات:

بعد تجفيف و طحن الأجزاء النباتية المراد استخلاص الفلافونويدات منها فإنها تعامل بمذيب مناسب للاستخلاص. وأكثر المذيبات استخداماً بهذا الصدد هو الميثانول المائي. تُغمر الأجزاء النباتية في المحلول المائي للميثانول على البارد لمدة لا تقل عن يوم واحد مع التحريك المستمر من وقت إلى آخر، ومن ثم يُرشح ويُغسل المتبقي من الأجزاء النباتية بالمذيب المستخدم للاستخلاص. يُختزل عندئذ حجم الرشاحة وذلك بتبخير أكبر كمية ممكنة من الميثانول، ومن ثم تعامل الرشاحة المائية بالكلوروفورم أو الهكسان كي يتم التخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة مثل الدهون والكلوروفيل، قد تحتوي رشاحة الكلوروفورم أو الهكسان بعض

الفلافونويدات، وعلى الأخص تلك التي لا تتصف بالقطبية الشديدة، وعليه فإن هذه الرشاحة لا تهمل، ويكشف عن وجود الفلافونويدات فيها (تبخر عندئذ الرشاحة المائية المحتوية على الفلافونويدات تحت ضغط منخفض) ، ومن ثم يتم فصل وتنقية هذه المركبات الطبيعية.

2-1- فصل وتنقية الفلافونويدات:

يتم فصل وتنقية الفلافونويدات باستخدام طرائق الفصل الكروماتوجرافي بأنواعه المختلفة. ولعل أكثر هذه الطرائق شيوعاً في الاستخدام لفصل هذه المركبات هي كروماتوجرافي الطبقة الرقيقة و كروماتوجرافي العمود، إذ تستخدم الأولى لفصل الكميات الصغيرة في حين تستخدم الطريقة الأخيرة عندما تتوفر كميات أكبر من المركب الطبيعي، وتستخدم أيضاً طريقة كروماتوجرافي الورق حيث إنه عند تطبيق هذه الطريقة فإنه تُستخدم المذيبات الكحولية لتحريك بقع هذه المركبات على الورق. ومن الكحولات المستخدمة الميثانول والإيثانول والبيوتانول. ويتبع في تحريك هذه البقع الجافة على الورق للمرة الثانية (بعد استخدام المحاليل الكحولية) يتبع استخدام 15% حمض الخل كما هو شائع في تحريك معظم الفلافونويدات على الورق. وفي حالة تنقية الإيثوسيانينات بواسطة كروماتوجرافي الورق فإنه يستخدم خليطاً من البيوتانول وحمض HCl في تحريك بقع هذه المركبات للمرة الأولى بينما يستخدم لتحريكها في المرة الثانية محلول 1% حمض HCl. ومما تحسن الإشارة إليه هنا أن طريقة كروماتوجرافي الورق تعطي دلالة جيدة على نوع المركب الفلافونويدي، وذلك إذا ما عرضت بقع هذه المركبات التي على الورق لأشعة UV في وجود النشادر أو عدم وجوده. إذ تظهر ألوان مختلفة في الحالتين لأنواع المختلفة من الفلافونويدات، وعموماً فإن الفلافونات وكذلك الجليكوزيدات (للفلافونولات) تعطي ألواناً بنفسجية إذا ما عرضت لضوء UV بعد إضافة النشادر.

يستخدم كروماتوجرافي العمود لفصل الكميات الكبيرة من الفلافونويدات. يعبأ العمود بالصنف الثابت الذي قد يكون سليكاجل أو سليلوز أو بولي أميد إذ أن السليكاجل تستخدم لفصل الفلافونويدات الأقل قطبية، في حين أثبت السليلوز فعاليته في فصل الفلافونويدات الجليكوزيدية عن تلك المجردة من السكر، هذا وقد لقي البولي أميد تطبيقاً واسع النطاق في حقل الفلافونويدات نظراً إلى كون هذه المادة مناسبة لفصل جميع المركبات الفلافونويدية وعلى الأخص لفصل الفلافونويدات الجليكوزيدية بعضها عن بعض، ونقطة الاختلاف في استعمال هذه المادة، مقارنة بالسليلوز والسليكاجل، هي إنها تُغسل في العمود بالماء و الميثانول قبل

تطبيق خليط الفلافونويدات المراد فصله، وذلك لتجنب الشوائب التي تذوب في المذيبات المستخدمة للتملص Elution. هذا وتحسن الإشارة إلى أن هناك صنف آخر هو سيفادكس ، يستخدم لفصل الفلافونويدات على الدوام أو على الأقل بقدر استخدام البولي أميد لهذا الغرض. وكالمتبع بعد تعبئة العمود بذاب خليط الفلافونويدات في أقل كمية ممكنة من المذيب المناسب ويطبق في العمود، ومن ثم تستخدم المذيبات المناسبة لعملية التملص.

2-2- الكشف عن الفلافونويدات:

تعطي المجموعات المختلفة من الفلافونويدات ألوانا مميزة مع الكثير من الكواشف هي الأخرى تستخدم للدلالة على وجود هذه المركبات الطبيعية. من الكواشف محلول كلوريد الألومنيوم 5% الذي يعطي بقاءً صفراء إذا ما وجدت المادة الفلافونويدية التي تحمل مجموعة هيدروكسيل في الموضع رقم 5. وتعطي جميع الفلافونويدات ألوانا صفراء أو برتقالية مع هيدروكسيد الصوديوم. وتجدر الإشارة إلى أن الإنثوسيانينات تعطي ألوانا بنفسجية أو زرقاء في وجود القلوي. كما تعطي جميع الفلافونويدات بما في ذلك الإنثوسيانينات ألوانا صفراء إلى برتقالية مع حمض الكبريت المركز.

من الكواشف المستخدمة للتعرف على الفلافونويدات، المحلول الذي يحضر بإضافة HCl المركز إلى محلول فانيلين Vanillin في كحول الايثانول ونسبة 4:1 على التوالي . ويستدل على وجود جميع الفلافونويدات عند رش هذا الكاشف، إذ تظهر بقع حمراء في الحال أو بعد التدفئة البسيطة، إلا أن مركبات الفلافونونات تعطي إيجابية تجاه هذا الكاشف ولكن بصورة أبطأ من الفلافونويدات الأخرى. كما يستخدم هيدروكسيد الحديد الثلاثي للتأكد من وجود الفلافونويدات في الخلاصة النباتية إذ يعطي ألوانا مميزة حمراء أو خضراء أو زرقاء. ولقد توصل العلماء منذ عام 1936 إلى اكتشاف 4000 نوع من الفلافونويدات وعلى الرغم من أن هذا العدد الكبير إلا أنه يمثل جزءاً صغيراً من الفلافونويدات الموجودة في الطبيعة.

3-التربينات Terpenoids:

تشمل التربينات عدداً كبيراً من المواد الهامة للنبات أهمها الزيوت الطيارة Oils Essential والكاروتينيدات Caratenoids والمطاط Rubber وبعض منظمات النمو النباتية مثل الجبرلين وحمض الابسيسيك. فالزيوت الطيارة هي التي تسبب الرائحة العطرية لكثير من النباتات

والأزهار وتلك الزيوت العطرية يمكن فصلها بالتقطير في تيار من بخار الماء فتطفو على هيئة زيت على سطح الطبقة المائية. وتعد الزيوت العطرية مخلوطاً من الهيدروجينات المكرينة مع الكحولات والألدهيدات والكيونات، ويحتوي هيكلها الكربوني على وحدات متكررة من الإيزوبرين Isoprene.

4- القلويدات Alkaloids :

استعملت القلويدات منذ عدة سنوات فقد عرفت بعض الفوائد الطبية والخواص السامة لها في مجموعة من النباتات عرفت بالنباتات الطبية. وقد تمكن الباحثون من استخلاص مادة المورفين في القرن التاسع عشر.

5- استخلاص التانينات Tanins :

التانين عبارة عن مركبات كيميائية ذات طبيعة فينولية تستخلص من الخشب الصميمي ومن قلف الأشجار، وهي على نوعين رئيسيين هما:
التانينات المتحللة: عبارة عن خليط من الفينولات البسيطة، الكلوكون، والاسترات، وحامض الكاليك، إلا أن أغلب استخداماتها هي للأغراض الطبية.
التانينات المتكثفة: تتميز هذه التانينات من خلال وجود وحدات الفلافونويد وهذه الوحدات هي المسؤولة عن درجة كثافة التانين ونوعه.

تجرى عملية الاستخلاص باستخدام جهاز الاستخلاص المستمر السكسوليت:
يؤخذ 500 mg و باستعمال مذيبات الايتر البترولي والبنزين (60-80 °C مئوية) بشكل تعاقبي وعلى التوالي كل على حدة لإزالة التلوينات والدهون.
ثم يستعمل الإيثانول 95 % للحصول على التانين الخام وتستمر عملية الاستخلاص لمدة 48 ساعة إلى أن يصبح لون المذيب في جهاز الاستخلاص عديم اللون.
ويركز المستخلص تحت الضغط المخلخل باستعمال جهاز المبخر الدوار للحصول على 100 ml من التانين الخام. وبعد الترشيح يحصل على راسب بني اللون وراشح من المستخلص الكحولي للعينة.

تتقل العينة بعد إتمام العمل بجهاز الاستخلاص المستمر إلى بيكر سعة (4 L)، ويضاف إليها (2 L) من الماء الحار حرارته 80 ° C مئوية لإكمال عملية استخلاص التانين الباقي باستعمال الزجاج الكهربائي لمدة 48 ساعة .
يترك بعدها المحلول ليبرد ثم يرشح المستخلص المائي ويحصل على راسب بني وراشح من المستخلص المائي للعينة .

C-الأصبغة النباتية Plants pigments

تعرف الأصبغة النباتية: بأنها المواد التي تضيفي لونا معينا على أي عضو أو نسيج نباتي. وتوجد الأصبغة النباتية في مستوى الخلية النباتية في:

1- في الصانعات الخضراء

2- في الصانعات الملونة

3- في العصارة الفجوية

تقسم الأصبغة النباتية إلى:

1- صف المركبات البورفيرينية (الكلوروفيلات)

2- صف الكاروتينويدات

3- صف الأصبغة الفيكوبيلينية

4- صف الأصبغة الفلافينويدية

كيف نفرق بين الأصبغة الكاروتينويدية والإنتوسيانين تحت المجهر وضمن النسيج النباتي:

- الكاروتينويدات: تتجمع في بنى خاصة هي الصانعات الملونة، ولذلك نرى بنى لونية حبيبية ضمن الخلية النباتية.

- الإنتوسيانينات: بما أنها تتحلل في العصارة الفجوية، فلذلك نحن نراها تملأ مكاناً واسعاً من الخلية، ومن المهم أن نعرف أننا لا نراها ضمن بنى حبيبية صغيرة.

1-الكلوروفيلات:

يميز بين نوعين من الكلوروفيل (أ) و (ب) تمتصان بشدة الأشعة البنفسجية و الزرقاء و الأشعة البرتقالية والحمراء ولا تمتصان الأشعة الخضراء إلا بكفاءة منخفضة، بل تقوم بعكس

هذه الأشعة. يوجد كل من كلوروفيل (أ) و (ب) بنسبة 1:3 . والكلوروفيل مركب بورفوريني بحيث يتكون من 4 حلقات بيرول متحدة مع ذرة Mg في المركز.

2-الكاروتينويدات:

نميز منها:

- الكاروتين الفا وبيتا وهي مركبات كربونية مهدرجة نقيه C40H56.
- الزانثوفيلات مركبات كربونية مهدرجة تحتوي على الأوكسجين C40H56O2 .

3-استخلاص الاصباغ وتقديرها بجهاز قياس الطيف السبكتروفوتوميتر:

العمل المخبري:

يوضع 3 g من الورق الطازج الأخضر والمقطع إلى قطع صغيرة في الهاون ، ويضاف إليها 4 ml أسيتون 80% ثم يطحن النسيج النباتي. يرشح المحلول الناتج بحذر ويجمع في الدورق، ثم يعاد الطحن مرة أخرى باستخدام 3 ml أسيتون، ثم ينقل الراشح لنفس الدورق السابق (إذا كان النسيج المتبقي في الهاون محتوياً على الكلوروفيل يعاد استخلاصه كالسابق مستخدمين 3 ml أسيتون).

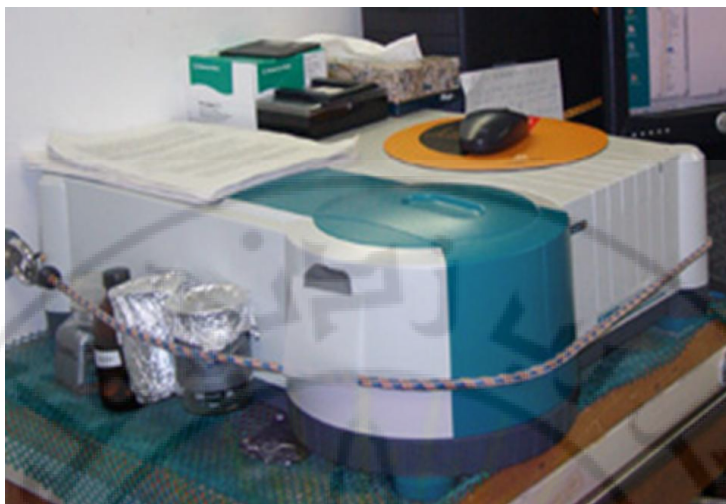
يغسل الهاون وذلك باستخدام 2 ml أسيتون ثم ينقل إلى الدورق المعياري وبذلك نكون حصلنا على مستخلص 12 ml من النسيج النباتي (الكلوروفيل).

يوضع المستخلص في الأنابيب الخاصة لجهاز الطرد المركزي وتسجل قراءة الكثافة الضوئية التي رمزها O.D للمستخلص بعد وضعه في الخلايا الزجاجية الخاصة لجهاز السبكتروفوتوميتر ويستخدم مقاييس الطيف الضوئي (الشكل 66) على الموجات الآتية:

الكاروتين C 440 نانومتر

كلوروفيل A 663 نانومتر

كلوروفيل B 645 نانومتر



شكل 66: جهاز قياس الطيف

4- استخلاص الكلوروفيل بطريقة الغمر في المذيب:

- 1- يوضع 3 g ورق طازج في بيكر.
 - 2- يضاف اليها 30 ml أسيتون 80% ثم يقفل البيكر بإحكام باستخدام ورق الالمونيوم أو البلاستيك حتى يمنع فقد الأسيتون بالتطاير.
 - 3- يترك النسيج منقوعاً ومغموراً في الأسيتون لمدة 15 دقيقة مع الهز اليدوي البسيط مره كل 5 دقائق.
 - 4- ينقل المستخلص الأسيتوني فقط إلى أنبوبة اختبار جديد.
- يوضع المستخلص في الأنابيب الخاصة لجهاز الطرد المركزي وتسجل قراءة الكثافة الضوئية التي رمزها O.D للمستخلص بعد وضعه في الخلايا الزجاجية الخاصة لجهاز السبكتروفوتوميتر، وتستخدم مقاييس الطيف الضوئي على الموجات الآتية :
- الكاروتين 440 نانومتر
كلوروفيل 663 A نانومتر
كلوروفيل 645 B نانومتر
- *** يمكن اتباع الخطوات السابقة باستخدام مذيب آخر وهو ثنائي ميثيل الفورماميد DMF

التحليل الكروماتوجرافي Chromatographic Analysis

5-استخلاص الأصباغ وتقديرها بورق الفصل الكروماتوجرافي:

هي طريقة لفصل وتنقية مخلوط من المواد الكيميائية استناداً إلى الاختلافات في مكوناتها ، وتعتمد الطريقة على أن مكونات المخلوط توزع نفسها بنسب مختلفة بين مكوني نظام ثنائي أحدهما متحرك والآخر ثابت .

ويعد التحليل الكروماتوجرافي من أهم طرائق الفصل الحديثة لأنها طريقة سهلة وسريعة تحافظ على كيان المركبات المراد فصلها، وتصلح لفصل أي مخلوط سواء كان في الحالة الصلبة أو السائلة أو الغازية.

وقد نشأت فكرة التحليل الكروماتوجرافي على يد العالم الروسي ميخائيل تسويت عام Tswett سنة 1903 م عندما حاول فصل الملونات النباتية الملونة ، وكان من أوائل تجاربه تجربة فصل خليط من التلوينات النباتية مثل كلورفيل A و كلورفيل B والكاروتين والزانثوفيل باستخدام عمود زجاجي مملوء بكريونات الكالسيوم ، فظهر خلال العمود طبقات ملونة من هذه الملونات ولهذا أعطاه اسم الكروماتوجرافي وتعني باللاتيني (= chroma لون ، graphic = كتابة أو رسم) . ويتطور هذه الطريقة في الفصل أمكن استخدامها في فصل مزيج لمواد غير ملونة .

المواد والأدوات :

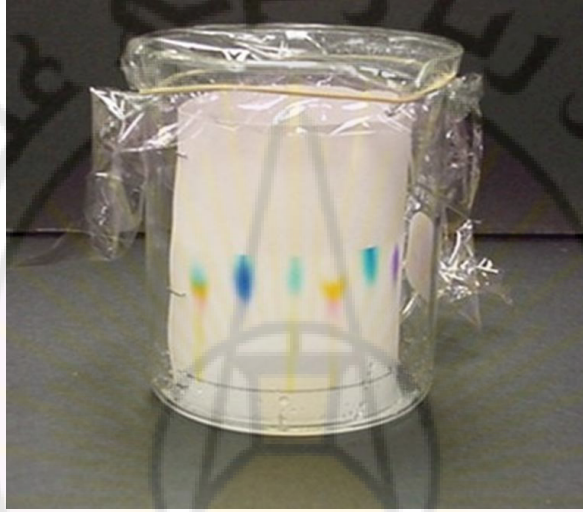
- أوراق نباتية
- أسيتون 80%
- هاون
- ورق ترشيح
- أوراق كروماتوجرافي
- ميزان
- مادة مذيية (ايثر + أسيتون + هكسان) (20+20+60 بالتالي)
- آجار
- غطاء.

العمل المخبري:

يفصل التلوين كما هو موضح في التجربة السابقة ولكن باستخدام كمية أقل من الأسيتون وذلك للحصول على التلوين بكمية مركزة .
يوضع كمية من المذيب في الآجار ويترك لفترة زمنية معينة.

توضع نقاط باستمرار على ورقة الترشيح (ورقة الفصل الكروماتوجرافي) ويتم ذلك بأكثر من مرة على مسافات متباعدة حوالي 4-5 cm، ويمكن وضع التلوينة في خط طولي على ورقة الفصل الكروماتوجرافي (الشكل 67) .

تُدخل ورقة الفصل في الآجار بحيث تكون النقاط للأسفل ، ثم تترك الورقة بداخل الآجار لفترة من الزمن وذلك، حتى يقطع سطح المذيب مسافة قدرها 1 cm تقريباً من نقطة البداية.



شكل 67: نتائج الفصل الكروماتوجرافي

- *- يعطي كلوروفيل أ لون اخضر مزرق.
- *- يعطي كلوروفيل ب لون اخضر مصفر.
- *- يعطي الكاروتين لون اصفر شاحب.
- *- يعطي الزانثوفيل لون اصفر فاتح.

❖ ملحق 1

المحاليل المنظمة (الموقية) Buffer solutions

phosphate Buffer: (الموقية) للفوسفات

يحضر مزيج مكون من 0.1 جزيئي فوسفات الصوديوم أحادي الهيدروجين Na_2HPO_4 ومحلول 0.1 جزيئي فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين KH_2PO_4 حسب النسب الآتية:

0.1 من KH_2PO_4 (ml)	0.1 من Na_2HPO_4 (ml)	PH
94.5	5.5	5.6
92	8	5.8
88	12	6
82	18	6.2
72	28	6.4
50	50	6.8
38	62	7
28	72	7.2
18	82	7.4
12	88	7.6
8	92	7.8
5.5	92.5	8

- جزيئي منظم (موقى) الخلآت Acetate Buffer

يحضر مزيج من 0.2 جزيئي خلآت الصوديوم $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COOH})$ و 0.2 جزيئي حمض الخل CH_3COOH حسب النسب الآتية :

0.2 من CH_3COOH (ml)	0.2 من $\text{Na}(\text{CH}_3\text{COOH})$ (ml)	PH
98.5	1.5	3
97	3	3.2
92	8	3.6
87	13	3.8
80	20	4
70	30	4.2
50	50	4.6
40	60	4.8
30	70	5
20	80	5.2
14	86	5.4
10	90	5.6
5	95	5.9
2.5	97.5	6.2
0	100	6.5

- منظم (موفي) السيترات : Citrate Buffer

يحضر من محلول 0.1 جزيئي سيترات ثنائي الصوديوم و محلول 0.1 جزيئي حمض كلور الماء Hcl حسب النسب الآتية :

Hcl	$\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	PH
67	22	2.2
65.4	34.6	2.4
61.6	38.4	2.8
59.5	40.5	3
57.5	42.8	3.2
54	46	3.4
51.5	48.5	3.6
48	52	3.8
44.2	55.8	4
38.8	61.2	4.2
22.2	61.2	4.4
23.4	67.8	4.6
11.8	88.2	4.8

- جزيئي منظم (موقي) ترس Tris buffer :

يحضر من 0.2 جزيئي ترس (هيدروكسي ميثيل أمين ميثان) tris –hydroxymethyl amino-methane ، وزنه الجزيئي 121.0 g/mol مع 0.1 حمض كلور الماء العياري كما في النسب الآتية :

PH	0.2 جزيئي ترس (مل)	HCL N 0.1 (مل)
7	45.5	25
7.2	44	25
7.4	42	25
7.5	40	25
7.6	38.5	25
7.8	34.5	25
8	29	25
8.2	22	25
8.4	17.5	25
8.5	15	25
8.6	12	25
8.8	9	25
9	6.5	25
9.1	5	25
9.2	4	25

محلول موقى ملحي متوازن (P . B . S)

طريقة التحضير : يتركب المحلول مما يلي :

- * - كلور الصوديوم. NaCl g 20
- * - كلور البوتاسيوم. KCl g 0.5
- * - فوسفات ثنائي الصوديوم المائية $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ g 3.5
- * - احادي فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4 . g 0.5
- * - ماء مقطر. ml 100

تذاب المواد السابقة في الماء المقطر عند $\text{pH} = 7.4$ ، ثم يرشح المحلول قبل استعماله.



❖ ملحق 2

الصيغ الكيميائية للمواد المستخدمة مخبرياً وأوزانها الجزيئية

المادة الكيميائية	صيغتها	الوزن الجزيئي
الأسيتون Acetone	C_3H_2O	58
كزيلول Xylene	C_8H_{16}	106
ماءات الأمونيوم Ammonium hydroxide	NH_4OH	35
برمنغنات البوتاسيوم Potassium permanganate	$KMnO_4$	158
بلسم كندا Canada balsam	$C_{16}H_{24}COOH$	221
بيتا غليسرو فوسفات الصوديوم Sodium β -glycerophosphate	$Na_2C_3H_5(OH)_2PO_{4.5}H_2O$	315
بيكربونات البوتاسيوم Potassium bicarbonate	$KHCO_3$	99
تريس (هيدروكسي ميثيل أمينو ميثان) Tris (hydroxyl methyl) Amino-methane	$C_4H_{11}NO_3$	121
ثنائي كرومات البوتاسيوم Potassium dichromate	$K_2Cr_2O_7$	294
ثيو كبريتات الصوديوم Sodium thiosulfate	$Na_2S_2O_3$	185
ثيو سلفات الصوديوم خماسي الماء	$Na_2S_2O_3$	248
حمض الأوسميوم (رابع أكسيد الأوسميوم) Osmic acid	OsO_4	254
حمض الليمون Citrate acid	$C_6H_8O_7$	192
حمض الخليك Acetic acid (الخل الثلجي)	CH_3COOH	60
حمض فوق اليود (البيريوديك) Periodic acid	H_5IO_6	228

63	HNO_3	Nitric acid حمض الآزوت
98	H_2SO_4	Sulfuric acid حمض الكبريت
100	Cro_3	Chromic acid حمض الكروم
36.5	HCL	Hydrochloric acid حمض كلور الماء
134	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	Maleic acid حمض النمل
229	$\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$	Picric acid حمض البيكريك (المر)
3314	$\text{H}_3\text{PO}_{4+12}\text{WO}_3$	Phosphotungestic حمض فوسفوتنغستيك
199.65	$(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{Cu.H}_2\text{O}$	خلات النحاس أحادية الماء Cupric acetate
82	CH_3COONa	Sodium acetate خلالات الصوديوم
65	KCN	Potassium cyanide سيانيد البوتاسيوم
273	$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$	Potassium alum شب البوتاسيوم
237	$\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2$	Ammonium alum شب الأمونيا
280	$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$	Ferro alum شب الحديد
46	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Ethanol كحول ايتيلي
32	CH_3OH	Methanol كحول ميتيلي
5.119	CH CL_3	Chlorophorm كلوروفورم
6.159	CuSO_4	Copper sulfate كبريتات النحاس
124	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{S}$	كبريتات الأمونيوم الحديدي Ferric ammonium sulfate

68	(NH ₄) ₂ S	Ammonium sulphide	كبريتيت الأمونيوم
142	Na ₂ SO ₄	Sodium sulfate	كبريتات الصوديوم
104	NaHSO ₃	Sodium sulfurique	كبريتيت الصوديوم
98	KCO ₃	Potassium carbonate	كربونات البوتاسيوم
74	Li ₂ CO ₃	Lithium carbonate	كربونات الليثيوم
74.5	KCL	Potassium chloride	كلور البوتاسيوم
58.5	NaCl	Sodium chloride	كلور الصوديوم
127	FeCl ₂	Ferric chloride	كلور الحديدي
162.5	FeCl ₃	Ferro chloride	كلور الحديد
272	HgCl ₂	Mercuric chloride	كلور الزئبق
283	NaK(CO ₃ CHOH) ₄ H ₂ O		طرطرات البوتاسيوم والصوديوم
92	C ₃ H ₈ O ₃	Glesarine	غليسرين
180	C ₆ H ₁₂ O ₆	Glucose	غلوكوز
136	KH ₂ PO ₄	Potassium dihydrogen phosphat	فوسفات البوتاسيوم ثنائي الهيدروجين
142	Na ₂ HPO ₄	Disodium hydrogen phosphat	فوسفات ثنائي الصوديوم أحادي الهيدروجين
138	NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Sodium. Dihydrogen phosphate	فوسفات الصوديوم ثنائي الهيدروجين أحادي التمييه
30	CH ₂ O	Formaldehyde	فورمالين

94	C_6H_6O	Phenol فينول
329	$K_3Fe(CN)_6$	Potassium Ferro cyanide فيروسيانيد البوتاسيوم
229	KIO_4	Potassium iodide فوق يودات البوتاسيوم
34	H_2O_2	فوق أكسيد الهيدروجين (الماء الأكسجيني) Hydrogen Peroxide
69	$NaNO_2$	Sodium nitrite نتريت الصوديوم
85	$NaNO_3$	Sodium nitrate نترات الصوديوم
170	$AgNO_3$	Silver Nitrate نترات الفضة
183	$Co(NO_3)_2$	Cobalt Nitrate نترات الكوبالت
110	$C_6H_6O_2$	Hydroquinone هيدروكينون
40	$NaOH$	Sodium Hydroxide هيدروكسيد الصوديوم
198	$NaIO_3$	Sodium iodate يود الصوديوم
213	KIO_3	Potassium iodate يود البوتاسيوم

ملحق 3: الأوزان الذرية Atomic Weights

فيما يلي جدولاً بالأوزان الذرية للعناصر الكيميائية المستعملة في التحضيرات المجهرية، وهي مرتبة أبجدياً بالإنكليزية :

الاسم بالعربية	الاسم بالإنكليزية	الرمز	الوزن الذري
ألومنيوم	Aluminum	Al	27
باريوم	Barium	Ba	137
بروم	Bromine	Br	80
كادميوم	Cadmium	Cd	11
كالسيوم	Calcium	Ca	40
كربون	Carbon	C	12
كلور	Chlorine	Cl	35.5
كروم	Chromium	Cr	52
كوبالت	Cobalt	Co	59
نحاس	Copper	Cu	64
ذهب	Gold	Au	197
هيدروجين	Hydrogen	H	1
يود	Iodine	I	127
حديد	Iron	Fe	56
رصاص	Lead	Pb	207
ليثيوم	Lithium	Li	7
مغنيزيوم	Magnesium	Mg	24
منغنيز	Manganese	Mn	55
زئبق	Mercury	Hg	201
أزوت (نيتروجين)	Nitrogen	N	14
أوسميوم	Osmium	Os	190
أكسجين	Oxygen	O	16
فوسفور	Phosphorous	P	31
بوتاسيوم	potassium	K	39
فضة	Silver	Ag	108
صوديوم	Sodium	Na	23
كبريت	Sulphur	S	32
يورانيوم	Uranium	U	238
زنك (توتياء)	Zinc	Zn	65



ملحق 4

أهم الملونات المستعملة في التلوين

اسم الملون	الصيغة	الوزن الجزيئي	الاستعمال والكشف
أحمر اليزارين Alizarin Red	$C_{14}H_8O_4$	240	صبغ الهيكل العظمي
أحمر معتدل Neutral Red	$C_{15}H_{17}ClN_4$	289	صبغ الدهون
أحمر نووي Nuclear Red	$Fe(NH_4)_2SO_4$	188	صبغ النواة
أخضر جانوس Janus Green	$C_{30}H_{31}ClN_6$	511	صبغ الميتوكوندريا
أخضر سريع Fast Green	$C_{23}H_{25}ClN_2$	365	صبغ السيتوبلازما أو السللوز
أخضر فاتح Light Green	$C_{23}H_{25}ClN_2$	365	DNA
أخضر ميثيل Methyl Green	$C_{27}H_{35}BrClN_3$	517	حموض نووية
أزرق إنيلين Aniline Blue	C_6H_7N	93	الكولاجين
أزرق ميثيل Methyl Blue	$C_{37}H_{27}N_3Na_2O_9S_3$	800	الميتوكوندريا
أزرق ميثيلين Methylene Blue	$C_{16}H_{18}ClN_3S$	374	طفيليات الدم
أسود سودان ب Sudan Black B	-----	-----	الدهون
أحمر سودان Sudan red	$C_{22}H_{16}N_{40}$	352	الدهون
إيوزين واي Eosin Y	$C_{20}H_6Br_2Na_2O_5$	648	السيتوبلازما
برتقالي ج Orange G	$C_{18}H_{14}N_3NaO_3S$	37	السيتوبلازما
ثيونين Thionin	$C_{12}H_9N_3S$	227	النشاط الخلوي

النواة في النبات	323	$C_{18}H_{15}ClN_4$	سفرانين Safranin
الميتوكوندريا	586	$C_{20}H_{17}N_3Na_{209}S_3$	فوكسين حمضي Acid Fuchsin
الجليكوجين و DNA	301	$C_{20}H_{19}N_3$	فوكسين قاعدي Basic Fuchsin
الكروموسوم في النواة	492	$C_{22}H_{20}O_{13}$	كارمين Carmine
النواة	302	$C_{16}H_{14}O_6$	هيماتوكسيلين Haematoxylin

فهرس الاشكال ضمن الكتاب

شكل 1	نماذج مختلفة لمجاهر بسيطة	صفحة 14
شكل 2	أجزاء المجهر المركب	صفحة 15
شكل 3	جهاز الحمل والتحرك في المجهر الضوئي المركب	صفحة 16
شكل 4	أنواع العدسات العينية	صفحة 17
شكل 5	انواع العدسات الجسمية	صفحة 17
شكل 6	جهاز الإضاءة في المجهر المركب	صفحة 19
شكل 7	المجهر مظلم الحقل	صفحة 19
شكل 8	مخطط سير الأشعة في المجهر مظلم الحقل	صفحة 21
شكل 9	المجهر المتباين الطور	صفحة 22
شكل 10	مخطط سير الأشعة في المجهر المتباين الطور	صفحة 22
شكل 11	المجهر المتألق	صفحة 23
شكل 12	الجهاز البصري في المجهر الفلورسيني ذي الشعاع النافذ	صفحة 24
شكل 13	الجهاز البصري في المجهر الفلورسيني ذي الشعاع الساقط	صفحة 25
شكل 14	المجهر المقلوب	صفحة 26
شكل 15	المجهر المتداخل الضوء	صفحة 27
شكل 16	حقل الرؤية في المجهر المتداخل الضوء	صفحة 28
شكل 17	المجهر الالكتروني النافذ	صفحة 30
شكل 18	رسم تخطيطي يوضح فتيلة التنغستين مصدر الإضاءة في المجهر الالكتروني	صفحة 32
شكل 19	يوضح العينة المطمورة بالريزين والمحمولة على جهاز التقطيع فائق الدقة	صفحة 33
شكل 20	آلية تحميل المقاطع على شبكات نحاسية	صفحة 34
شكل 21	المجهر الالكتروني الماسح	صفحة 36
شكل 22	جهاز التخلية	صفحة 37

شكل 23	المقاطع اليدوي ويستخدم عادة في النسيج النباتية	صفحة 40
شكل 24	جهاز التقطيع الدوار	صفحة 40
شكل 25	مقاطع السيلونيين	صفحة 41
شكل 26	جهاز التقطيع الدقيق	صفحة 42
شكل 27	جهاز التقطيع الجليدي	صفحة 43
شكل 28	المقاطع التلجي-لاحظ وحدة التبريد(نمط متطور)	صفحة 43
شكل 29	الكريوستات	صفحة 45
شكل 30	أنواع سكين التقطيع	صفحة 46
شكل 31	يوضح عملية السن اليدوي بالمشد الجليدي	صفحة 48
شكل 32	جهاز شحذ السكين الياً	صفحة 48
شكل 33	زاوية ميل السكين(زاوية الخلوص)	صفحة 49
شكل 34	حامل الشفرة وعلبة الشفرات	صفحة 49
شكل 35	جهاز صهر الشمع(على اليمين)- حاضنة(على اليسار)	صفحة 49
شكل 36	جهاز تسخين الشرائح المجهرية	صفحة 51
شكل 37	جهاز معاملة النسيج الآلي	صفحة 52
شكل 38	جهاز التلوين الآلي	صفحة 53
شكل 39	بعض الأجهزة المستعملة في مختبر دراسة النسيج	صفحة 54
شكل 40	الصيغ المباشر	صفحة 77
شكل 41	الصيغ غير المباشر	صفحة 77
شكل 42	التلوين الحي	صفحة 79
شكل 43	أوعية زجاجية ذات أحجام مختلفة تستخدم في التثبيت	صفحة 96
شكل 44	شمع تجاري وشمع نقي	صفحة 104
شكل 45	قضبان لوكار وكيفية تشكيل قالب منها	صفحة 106
شكل 46	نماذج مختلفة من قوالب طمر العينة بالشمع	صفحة 106
شكل 47	توجيه العينة	صفحة 108
شكل 48	تشذيب القالب او النحت	صفحة 108

شكل 49	آلية التقطيع	صفحة 109
شكل 50	التقطيع وتشكيل شريط الشمع	صفحة 109
شكل 51	وضع شريط الشمع في علبة لحين اللصق	صفحة 110
شكل 52	انحناء الشريط البرافيني نحو الجانب	صفحة 111
شكل 53	تمزق المقاطع في أثناء التقطيع	صفحة 111
شكل 54	مكان لصق المقطع على الشريحة المجهرية	صفحة 113
شكل 55	لصق المقاطع على الشريحة وترتيبها المتسلسل	صفحة 113
شكل 56	حامل الصفائح	صفحة 114
شكل 57	جهاز الحمام المائي	صفحة 114
شكل 58	لصق المقاطع (طريقة الحمام المائي)	صفحة 115
شكل 59	حوض تلوين محرز الجوانب (أفقي وعمودي)	صفحة 116
شكل 60	حوض تلوين له سلة	صفحة 116
شكل 61	عملية التغطية بالبلسم والساترة	صفحة 120
شكل 62	علبة خاصة للمحضرات	صفحة 120
شكل 63	طريقة صنع قالب طمر السيلونيديين من الورق المقوى	صفحة 131
شكل 64	حفظ قالب السيلونيديين في الكحول	صفحة 131
شكل 65	زيوت عطرية	صفحة 201
شكل 66	جهاز قياس الطيف	صفحة 214
شكل 67	نتائج الفصل الكروماتوغرافي	صفحة 216



المصطلحات العلمية : إنكليزي - عربي

A	
Absorption	امتصاص
Achromats	لألوني
Analysis	تحليل
Antibody	الضد
Antigen	مستضد (مولد الضد)
Albumin	الألبومين (بروتين)
Anhydrous	مركب لا مائي
Arabic gum	صمغ عربي
Artifact	شوائب
Aqueous mounting medium	وسط طمر مائي
Autolysis process	تحلل ذاتي
Auxochromes	مساعداات لونية
B	
Beam	حزمة ضوئية
Biopsy	خزعة
Biotechnology	التقانات الحيوية
Bleaching solution	محلول التبييض
Blood	الدم
Bone marrow	نخاع العظم
Bright-field microscope	المجهر مضئ الحقل
Buffer solution	محلول منظم (موقفي)
C	
Centrifugation	التثقيب
Charcoal	الفحم النباتي
Chromatography	التحليل اللوني
Chromogen	مولد اللون (التلوين)
Chromophor	حامل اللون
Clacification	التشفيف

Clearin	الترويق
Clearnig Ag	وسط الترويق
Clot	خثرة
Coefficien	معامل
Colors	الملونات
Coloration	تلوين
Conterst	التنافس اللوني
Compound microscop	المجهر المركب
Cryostat	الكريوستات (آلة القطع الثلجية)
D	
Dark-field microscope	المجهر مظلم الحقل
Decalcification	نزع الكلس
Dehydration	نزع الماء
degeneration	تحلل الكبد
Detergent	مادة مطهرة
Differentiation solution	محلول التمايز
E	
Embedding	الطمر
Extracts	خلاصات
Evaporat	جهاز التبخير
F	
Fixation	التثبيت
Formalin pigments	صبغات الفورمالين
Fixative	مثبت
Feulgen reaction	تفاعل فولكن
Flask	دورق
fluorescence microscope	المجهر الفلورسيني
Frozen section	مقاطع بالتجميد
:Freezing Microtome	جهاز التقطيع الجليدي
G	

Gramm equivalent	الوزن المكافئ
H	
Hand Microtome	جهاز التقطيع اليدوي
Hemorrhage	النزف
Hemolytic anemia	مرض الدم الإنحلالي
Honing	السن
I	
indigofera	شجرة النيلة
Inverted microscope	المجهر المقلوب
Imbedding	الطمر
Impregnation	التشرب
Immunohistochemistry	الكيمياء النسيجية المناعية
Immunofluoresence	تقانة الفلورة المناعية
Inactivation	التثييط
Incubation medium	وسط الحضان
Inclusion	التضمين
In vitro	وسط زجاجي
Interference light microscope	المجهر متداخل الضوء
Isolation	عزل
L	
Lense	عدسة
Lysosomes	الجسيمات الحالة
Lugol solution	محلول لوغول
M	
Magnifier lenses	عدسة مكبرة
Medium	وسط
Melanin bleach	قصر الميلانين
Metachromatism	تحول لوني

Metachromatic dye	صبغة متغايرة اللون
Microtom	المقطع (ميكروتوم)
Micronde	فرن
	محلول جزيئي Molar solution
Mordant	مرسخ التلوينة
Mounting medium	وسط طامر
Mucosubstances	مواد مخاطية
N	
Nucleoprotein	البروتينات النووية
Nutrients	مواد مغذية
O	
optical contrast	التباين البصري
Oxidation	تأكسد
oxidizing agent	عامل أكسدة
P	
Paraffin Oven	فران صهر الشمع
Paraformaldehyde	بارافورم ألدهيد
phase-contrast microscope	المجهر المتباين الطور
Pigments	الأصبغة
R	
Radioautograph	التصوير الاشعاعي الذاتي
Radioactive	مواد مشعة
Refractice index	معامل الانكسار
Resinous medium mounting	وسط طمر راتنجي
:Rotary Microtome	جهاز التقطيع الدوار
Rubber stopper	غطاء مطاطي
S	

Sample	العينة
Schiff's Reagent	كاشف شيف
Serum	المصل
sepsis	التسمم
Shrinkage	إنكماش
Slipcover	غطاء منزلق
sliding microtome	جهاز التقطيع السيلوندي
Smearing	فرش (مسح) العينة
Spectrophotometr	جهاز الطيف الضوئي
Spectrophotometric Analysis	تقانة التحليل الطيفي الضوئي
Staining jar	وعاء صبغ
Stropping	الصقل
Substrate	مادة خاضعة (الركيزة)
Swelling	إنتفاخ - الإنتباج
T	
Techniques	تقانات
Thrombin	مادة مخثرة
Trimming	تشذيب
Tissue	نسيج
U	
Ultramicrotome	المقطع الدقيق
V	
Vital staining	تلوين حيوي
W	
Washing	الغسيل
Warming Table	جهاز تدفئة الشرائح



المراجع العربية(حسب الأبجدية)

- 1- أبو سمرة، رويدا و آخرون- الكيمياء الحيوية المصورة - الطبعة الثالثة، منشورات المركز العربي للتعريب والترجمة والتأليف والنشر بدمشق 1996.
- 2- أبو خرمة ، دياب و آخرون- علم البيولوجيا - الجزء الثاني - منشورات المركز العربي للتعريب والترجمة والتأليف والنشر بدمشق 1997.
- 3- البنهاوي، محمود، خطاب، فهمي ، الجنزوري، منير- أسس كيمياء النسيج، منشورات جامعة عين شمس 1996.
- 4- السطلي ، محمد علي - موجز علم النسيج ، منشورات جامعة دمشق 1986.
- 5- الحاج ،حميد ،أ. 1982 ، المبادئ الأساسية للتحضير المجهرى الضوئي .جون وايلي – نيويورك
- 6- الحاج ، حميد ، أ. 1989 ، التحضيرات المجهرية الضوئية (التقانات المجهرية) الأسس النظرية والتطبيقات . عمان الاردن .
- 7- الحاج ، حميد أحمد -التحضيرات المجهرية الضوئية، منشورات جامعة الأردن 1998.
- 8- الزالق بشير – الهريسي وفاء -تقانات النسيج الحيوانية -منشورات جامعة دمشق 2009 - 2010 الطبعة الأولى
- 9- الطيب، نوري بن طاهر، جرار، بشير محمد - أساسيات علم كيمياء النسيج، منشورات جامعة الملك سعود، عمادة شؤون المكتبات 1995.
- 10- الطيب، نوري بن طاهر، جرار، بشير محمد - التقنية النسيجية الخلوية، منشورات جامعة الملك سعود، عمادة شؤون المكتبات 2004 .
- 11- نوري ، ماجدة عبد الرضا - علم تقنية الشرائح المجهرية، منشورات جامعة بغداد 1989
- 12- محمد بن صلاح خليفة ،عبد العزيز بن عبد الرحمن الصالح .المجاهر وتقنياتها 1987م -جامعة الملك سعود



المراجع الأجنبية:

- 1-Altman J.(2003) . Using the Cary spectrophotometer Protocole, Altman Laboratory at the EmoryVaccine center H. :/using the spectrophotometer .hlm.
- 2- Beblot C.; Blanchouin, N, Delarue, M , Mosiniak, M ‘and Part‘ . R.(2006). La mitose Technique : Immunoflouescence Accueil Bioch. B.cell B.Dev. B. Mol. B.V.Gen Phy. V.T.P Zoo Web Paris-France .
- 3 - Dieter Gerlach . Botanische Mikrotechnik .1984 . Georg Thieme Verlag Stuttgart .New York
- 4- Dieter Gerlach . Botanische Mikrotechnik .1984 . Georg Thieme Verlag Stuttgart .New York
- 5 -Dolphin ‘W.D.(2008).Biological Investigations ‘ Formo‘Functi n‘ Diversity and Process .8 Edition.Mc/Graw/Hil U. S.A
- 6 -Duvert M. (1989) . Immunocytochim II, methods pratiques société Francaise de Microscopie electronique . ISBN: 2-901483-01-1 Ivry France.
- 7- Interactive Cokor Atlas Histology-Leslie P. Gartner James L Hiatt 2000.lippincott Wiliams&Wikins.
- 8-IHC World (2007).Immunohistochemistry Enzyme Double Stainins protocol. Methods and Techniques. Life Science information Network .WW.ihc word.com/-protocols/general-IHC/.immunoenzyme-double-hm.
- 9 -Glauert Audrey M.(1977). Practical methods in Electron ‘ Microscopy. Amesterdam: North-Holland puplishing Company.
- 10 -Ranga ‘M.M.(2001) .Animal Biotechnology .Agro.Bio.(India‘ New Delhi 110002) .

11 – Kiernan , j.a.(1999) – histological and histochemical methods , theory and practice Ed . 3 Butterworth, Heinemann , oxford,U.K.

12 -Martoja et Martoja , M.(1967) . Initiation –aux techniq
De l'histologie animale.Masson et Cie editeur. Paris VI.France

13- W.Nultsch, A.Grahle. Mikroskopisch- Botanisches ,
Praktikum.1979. Georg Thieme Verlag Stuttgart .New York.

المواقع الالكترونية:

<https://ar.m.wikipedia.org.com>

<https://doctoree.org.com>

<https://scielo.br/scielo.php>

اللجنة العلمية: أ.د سحر الخطيب رئيسة قسم علم الحياة الحيوانية

أ.د سمر النحاس قسم علم الحياة الحيوانية

أ.د سليم زيد قسم علم الحياة النباتية

المدقق اللغوي: أ. د علي كردي قسم اللغة العربية

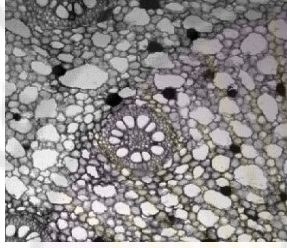
حقوق الطبع و الترجمة والنشر محفوظة لمديرية الكتب والمطبوعات



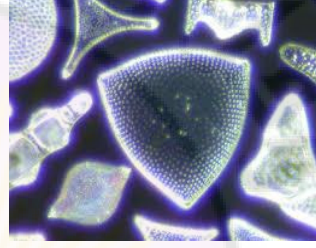
ملحق الصور الملونة

يتضمن الملحق الملون صوراً كما تبدو في بعض المجاهر، تعرف عليها الطالب في الفصل الأول من هذا الكتاب، وصوراً أخرى لمقاطع في نسيج حيوانية و نباتية ولونت بملونات مختلفة، من أجل دراستها بالمجهر الضوئي المركب ، بالإضافة إلى مقاطع للكشف عن الكيمياء النسيجية في بعض الأنسجة الحيوانية و النباتية ولونت بطرق خاصة للكشف عن عناصر وجدت ضمن الخلية

1- صور كما تبدو في بعض المجاهر



مقطع في ساق بالمجهر
متباين الطور



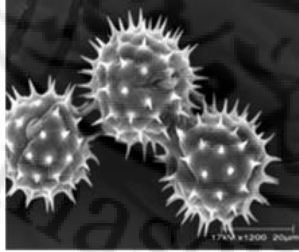
هياكل شعاعيات بالمجهر مظلم
الحقل



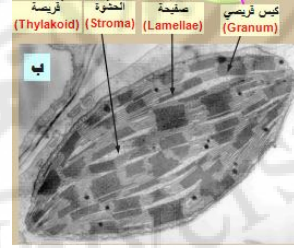
الانقسام الخلوي كما يبدو
بالمجهر متداخل الضوء



خلية بوركنج كما
تبدو بالمجهر المتألق



حببات طلع بالمجهر الإلكتروني
الماسح.



الصانعة الخضراء كما يبدو بالمجهر
الإلكتروني النافذ

2- مقاطع لأنسجة حيوانية مصبوغة بالطريقة العامة

(هيماتوكسيلين ايوزين H.E)

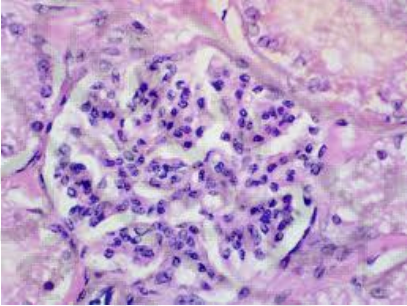
يلون الهيماتوكسيان النواة باللون البنفسجي المزرق، كما يلون الايوزين السيتوبلازما باللون الزهري.



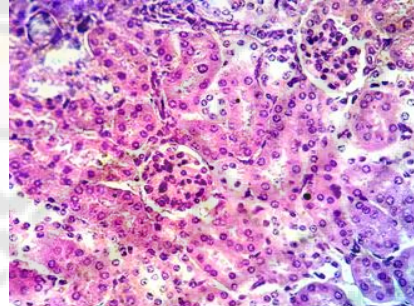
مقطع عرضي في الحالب، وتبدو فيه القميص المخاطية الداخلية، والقميص المتوسطة العضلية، والقميص المصلية الضامة الخارجية، ويحيط به النسيج الشحمي $x=100$.



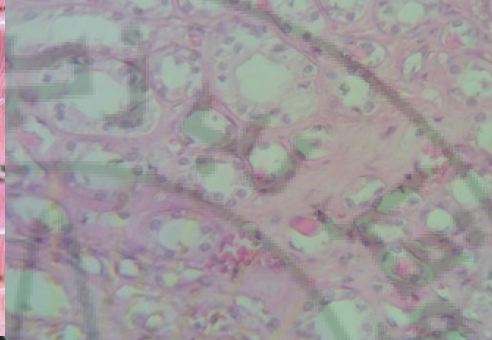
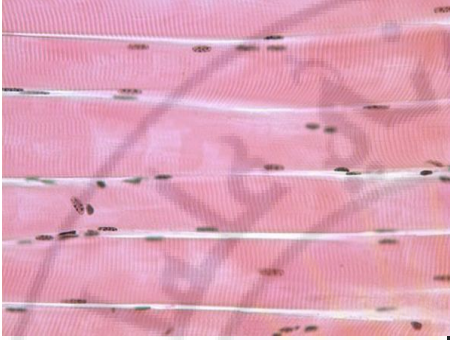
مقطع عرضي في البربخ، ويبدو فيه مقاطع شبه دائرية في الأنبوب البريخي وتظهر الطبقة الظهارية المطبقة تطبق كاذب ومهدبة وتحتها طبقة ضامة عضلية $x=400$.



جسيم مالبكي $x=400$

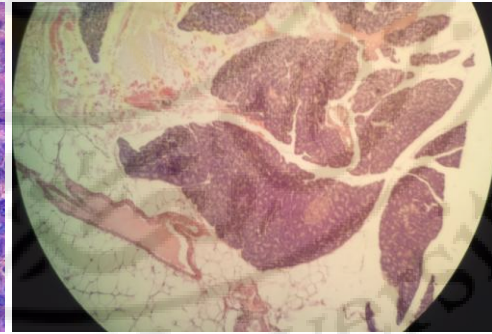
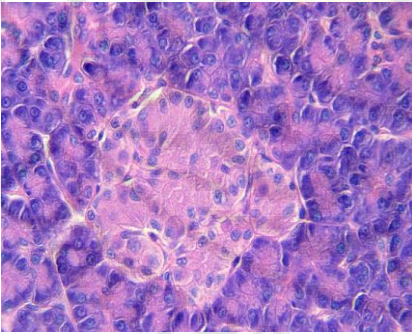


مقطع في المنطقة القشرية من الكلية وتبدو فيه كية مالبكي والأنابيب المتعرجة الإنسية والوحشية $x=100$



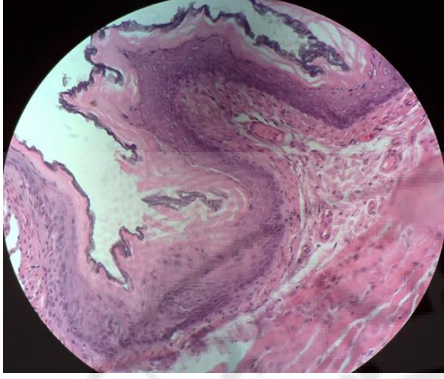
مقطع طولي في عضلة هيكلية، وتبدو الاقراص
النيرة والاقراص العاتمة المميزة للعضلات
المخططة

المنطقة اللبية في الكلية، وتبدو فيها مقاطع لعروة
هائلة والأنابيب البولية الجامعة $x=400$

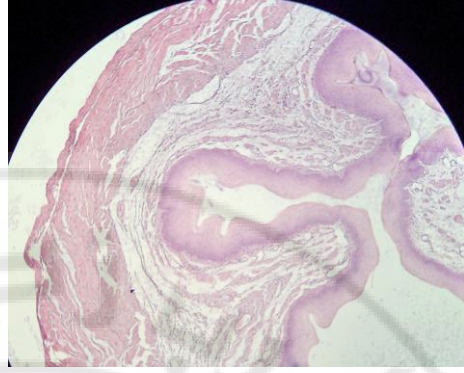


مقطع في البنكرياس، وتبدو فيه جزيرة لانغرهانس
والصماء، والحوصلات المفرزة الخارجية الإفراز
 $x=400$

مقطع في البنكرياس، لاحظ الفصوص البنكرياسية
والقناة الإفراغية والحوصلات المفرزة الخارجية الإفراز
جزيرة لانغرهانس $x=100$



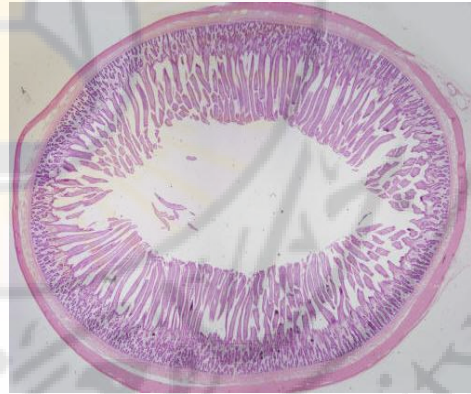
مقطع عرضي في مري الأرنب. يتألف من:
القميص المخاطية الداخلية (بشرة ظهارية مطبقة
متقرنة + كوريون) - القميص العضلية المخاطية
- الطبقة تحت المخاطية - القميص العضلية
- القميص المصلية الخارجية (لا تظهر على
المقطع). $x=100$



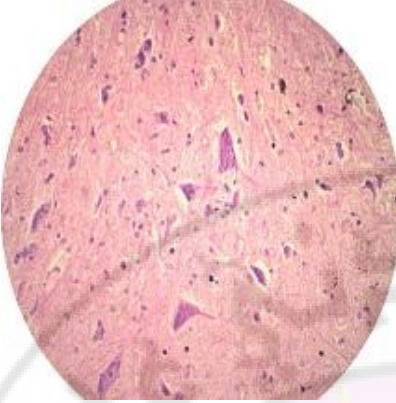
مقطع عرضي في مري الفأر. يتألف من: القميص
المخاطية الداخلية (بشرة ظهارية مطبقة غير متقرنة
+ كوريون) - القميص العضلية المخاطية - الطبقة
تحت المخاطية - القميص العضلية - القميص
المصلية الخارجية. $x=40$



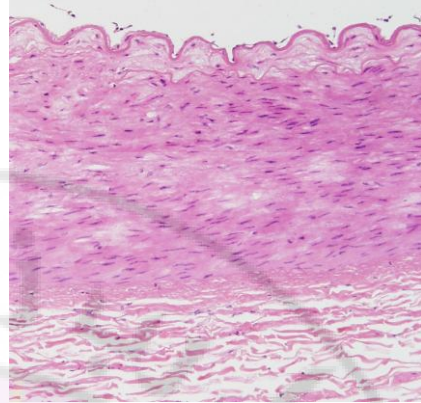
مقطع في المري (على اليمين) والرغامى (على اليسار)
 $x=40$



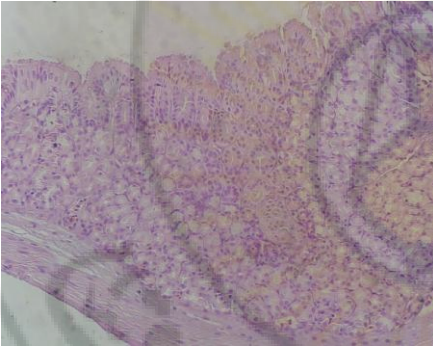
مقطع عرضي في المعى ، وتبدو فيه الزغابات المعوية
والطبقات التي تشكل الجدار $x=40$.



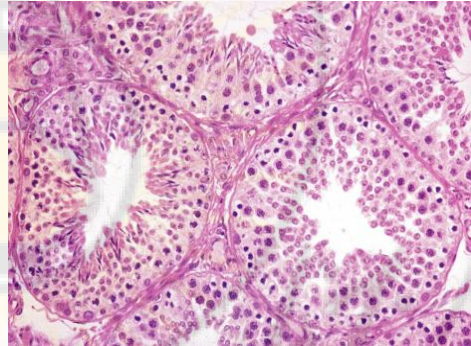
جسيمات نيسل متوضعة داخل الخلايا العصبية في القرن الأمامي للنخاع الشوكي x=100 .



مقطع في شريان عضلي: لاحظ غزارة الألياف العضلية في القميص المتوسط.



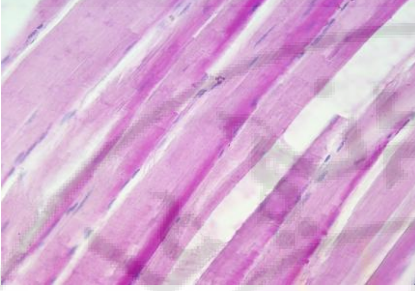
مقطع عرضي في معدة الضفدع، لاحظ البشرة والكوريون والغدد المعدية.



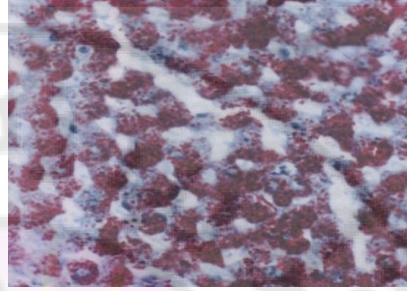
مقطع عرضي في الخصية، ادرس مراحل تطور السلالة المنوية في الأنابيب المنوية .

2- مقاطع الكشف الكيميائي النسيجي في النسيج الحيوانية

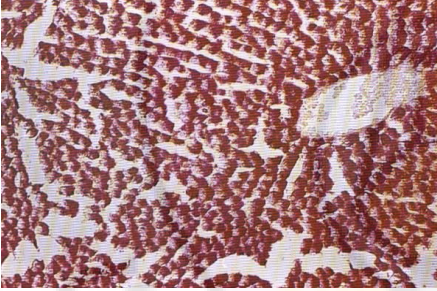
❖ الكشف عن الغليكوجين



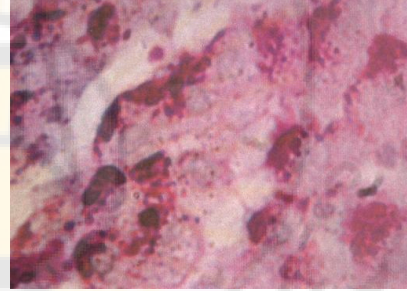
حبيبات الغليكوجين في الخلايا العضلية المخططة ملون بطريقة حمض البريوديك شيف وتبدو نوى الالياف العضلية ملونة بالهيماتوكسيلين بالبنفسجي المزرق ،
x=100



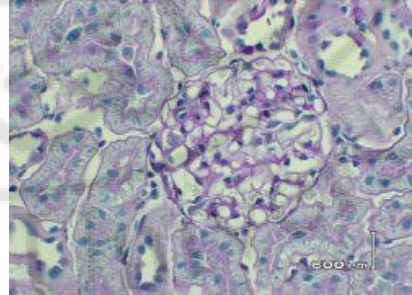
مقطع في كبد أرنب ملون بطريقة حمض البريوديك شيف، وتبدو حبيبات الغليكوجين ملونة باللون الأحمر الآجري ضمن الخلية الكبدية، والأنوية ملونة بالبنفسجي x=400 .



مقطع في الكبد ملوناً بطريقة كارمن بست للكشف عن الغليكوجين.

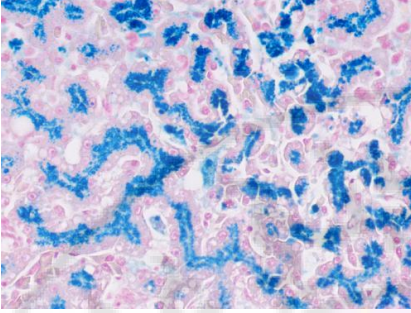


صورة مجهرية توضح ظاهرة هروب الغليكوجين في النسيج الكبدي حيث يتجمع الغليكوجين في جهة معينة من الخلية على شكل هلال X400.



مقطع في قشر الكلية ملوناً بطريقة أزرق السيان للكشف عن السكاكر المتعددة المخاطية.

❖ الكشف عن البروتين



مقطع في الكبد، وتظهر البروتينات الغنية بالحديد ملونة بالأزرق، وتتلون الأنوية باللون الأحمر.

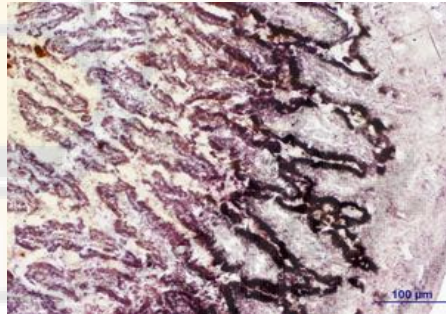


مقطع في اللسان وتبدو أماكن وجود البروتين ملونة بتفاعل شيف ننهدين بلون أحمر أرجواني

❖ الكشف عن الأنزيمات

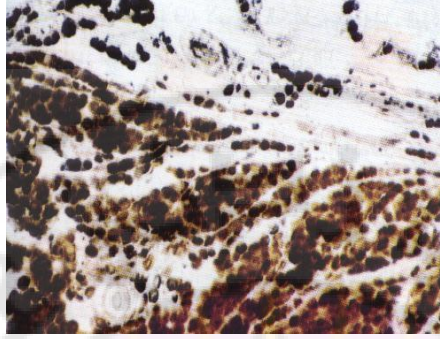


مقطع في اللسان ملون بطريقة خلاص الرصاص للكشف عن الفوسفاتاز الحمضية في غدد فون ايبنر(اللون البني).



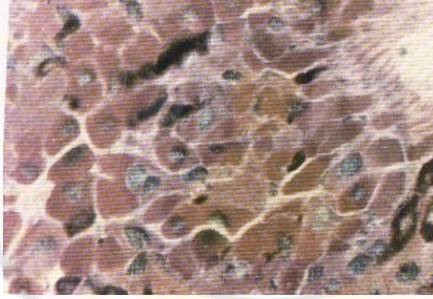
مقطع في الاثني عشر ملون بطريقة الكالسيوم كوبالت وتظهر فيه الفوسفاتاز القلوية ملونة بلون بني مسود.

❖ الكشف عن الدهون



مقطع في نقي العظم ملوناً بأسود سودان. اللون الأسود (شحوم ثلاثية غير مشبعة) واللون البني الشاحب (دهون فوسفورية).

❖ الكشف عن الحموض النووية



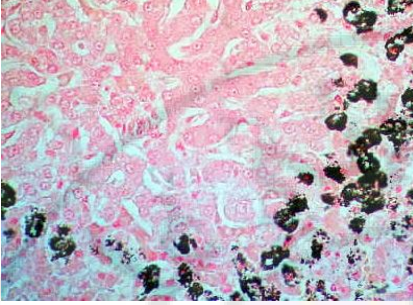
مقطع ملون بأخضر الميتيل-بيرونين، وتبدو فيه النوى ملونة بالأخضر (DNA) بينما تتلون السيتوبلازما باللون الوردي الفاتح (RNA).



مقطع يوضح الخلايا الظهارية المبطنة للزغابة المعوية ويبدو فيه ال DNA داخل النواة ملوناً بتفاعل فولكن، والسيتوبلازما ملونة ببيكرو انديغو كارمن بلون أخضر. $X=400$

❖ الكشف عن الأملاح المعدنية

*الكالسيوم

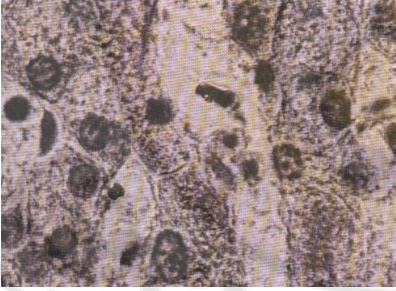


مقطع في نسيج ويبدو فيه تجمعات الكلس ملونة بطريقة فون كسا باللون الأسود.

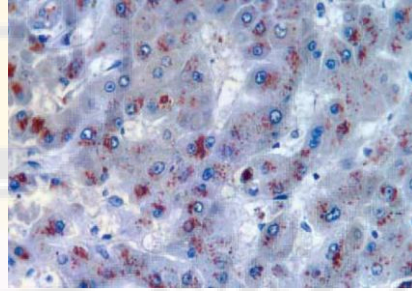


مقطع يبدو فيه تجمعات الكالسيوم ملونة بطريقة أحمر اليزارين.

*الكشف عن النحاس

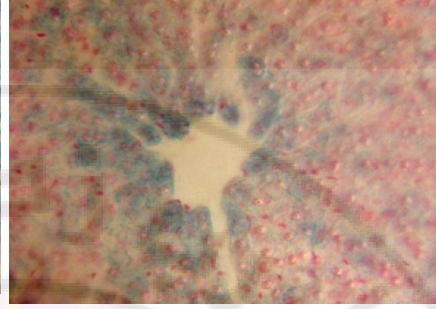
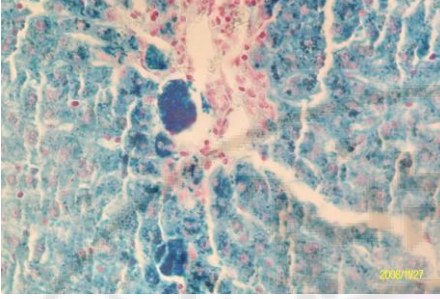


مقطع في الكبد ملوناً بطريقة حمض الروبيانيك للكشف عن النحاس ويبدو النحاس بلون اخضر مسود .

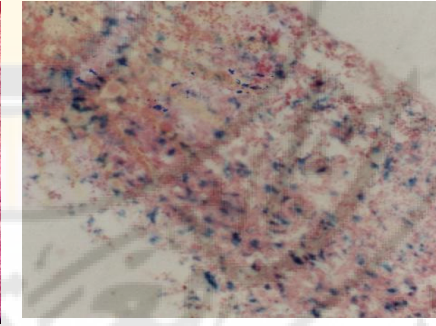
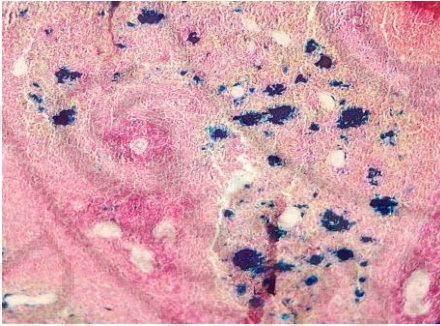


مقطع في الكبد ملوناً بطريقة الرودانين للكشف عن النحاس (اللون الأحمر)، وتم صبغ النواة بالهيماتوكسيلين .

* الكشف عن الحديد



مقطع في الكبد ملون بطريقة أزرق بروشيا، ويبدو الحديد ملوناً بأزرق بروشيا، والنواة ملونة باحمر معتدل ، والسيتوبلازما ملونة باخضر سريع ضمن الخلايا الكبدية ولكن بكميات ضئيلة ، اما نوى الخلايا الكبدية، تتلون بالأحمر، و السيتوبلازما غير ملونة .



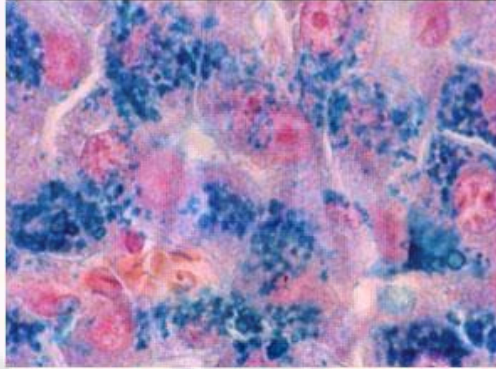
مقطع في الطحال ويبدو الحديد ملوناً بأزرق بروشي وتتوضع تجمعات الحديد في اللب الأحمر.

مقطع في نقي العظم ويبدو الحديد ملوناً بأزرق بروشي ضمن الكريات الدموية وفي خلايا النقي.

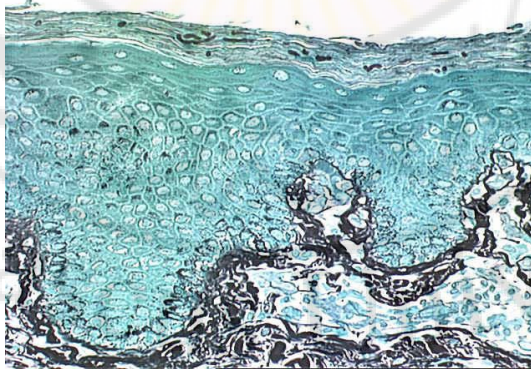
❖ الكشف عن الأصبغة



الكشف عن الهيموسيدرين (لون ازرق) في نقي العظام حسب طريقة بيرل

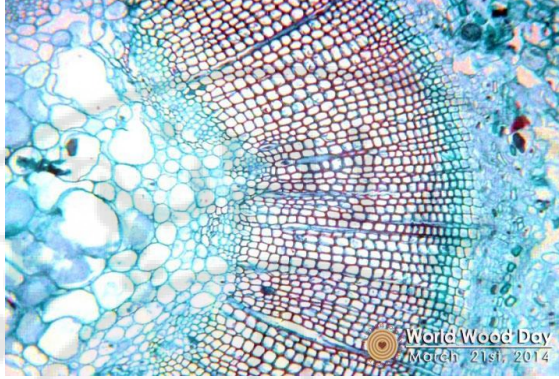


الكشف عن الهيموسيدرين (لون ازرق) في خلايا الكبد حسب طريقة بيرل .

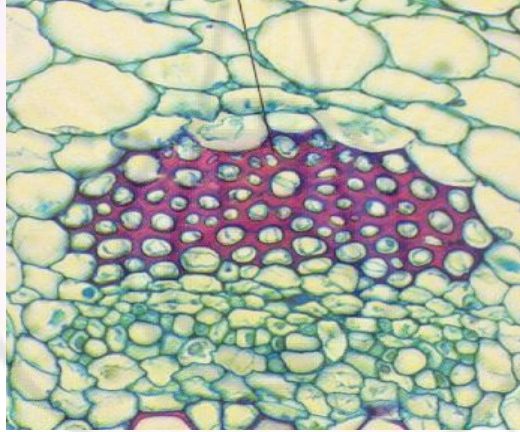


جلد مصبوغ بطريقة غوموري ميتين امين الفضة للكشف عن بلورات اليورات.

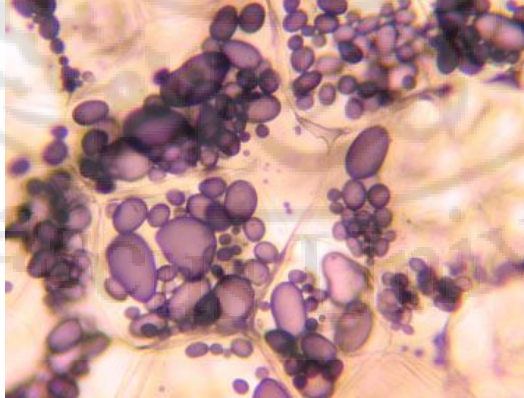
4-مقاطع في أعضاء نباتية ملونة بطرق متنوعة



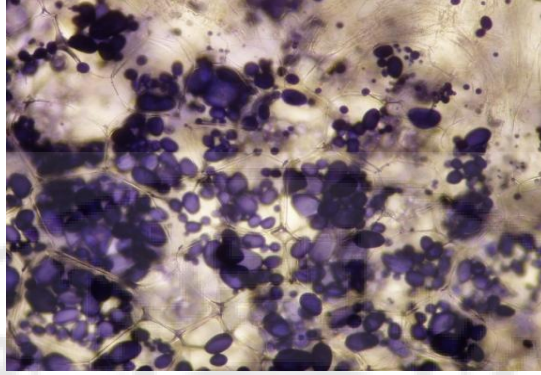
مقطع في ساق ثنائي الفلقة ملوناً بالسفرانين - أخضر سريع



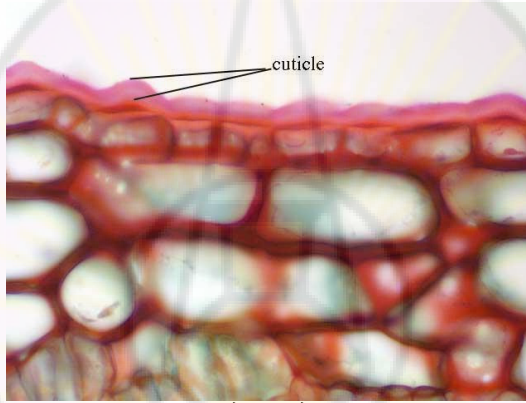
نسيج اسكليرنشيمي متخشب ملوناً بالسفرانين. ونسيج حي ملوناً بالأخضر السريع.



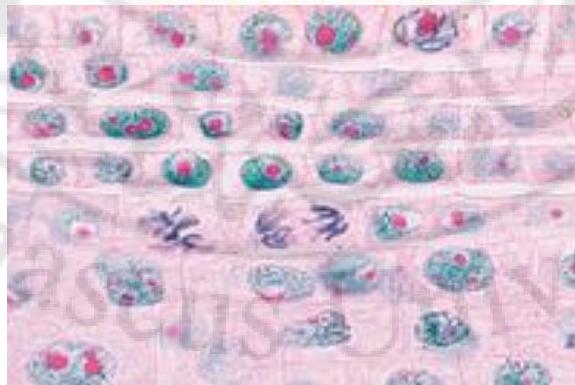
الكشف عن النشاء بملون اليود في نسيج برانشيمي ادخاري



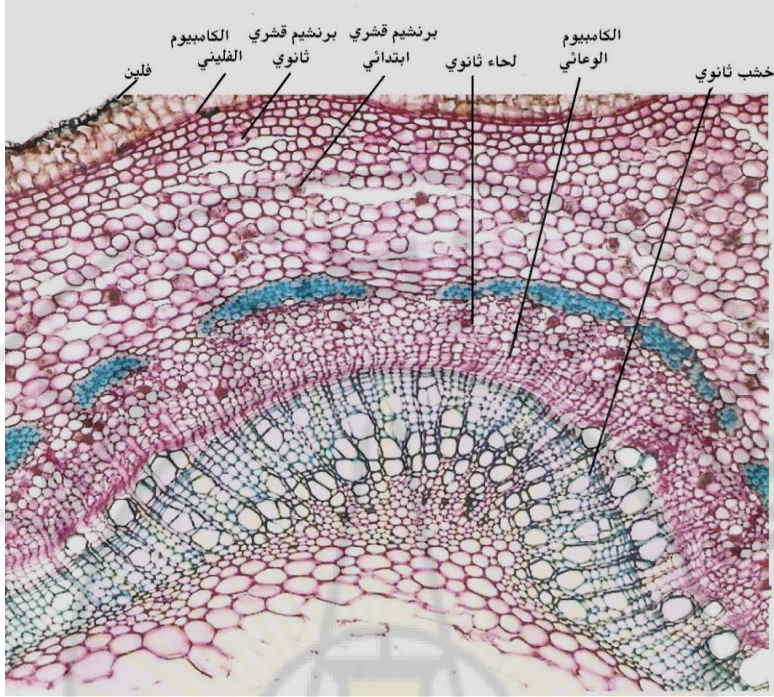
الكشف عن الليبيدات (المعتدلة و الفوسفورية) وتبدو بلون أسود مزرّق في خلايا انخارية



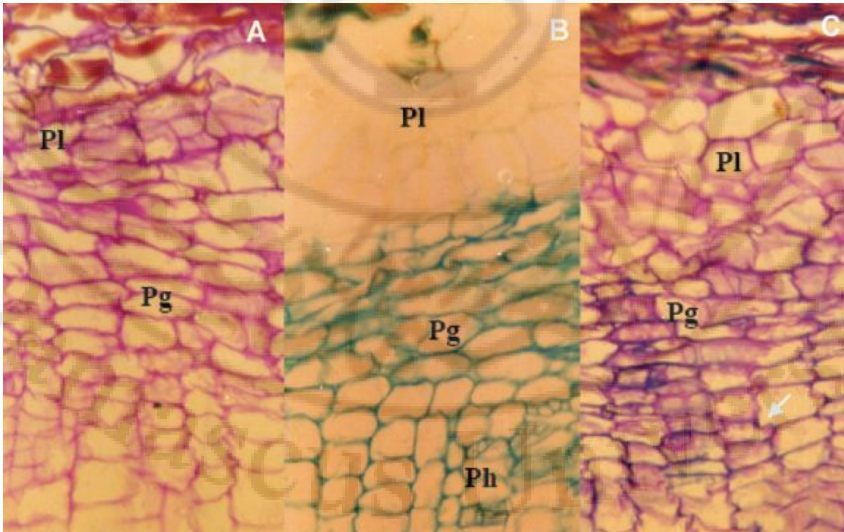
القشيرة (مواد دهنية) ملونة بالسودان الثلاثي



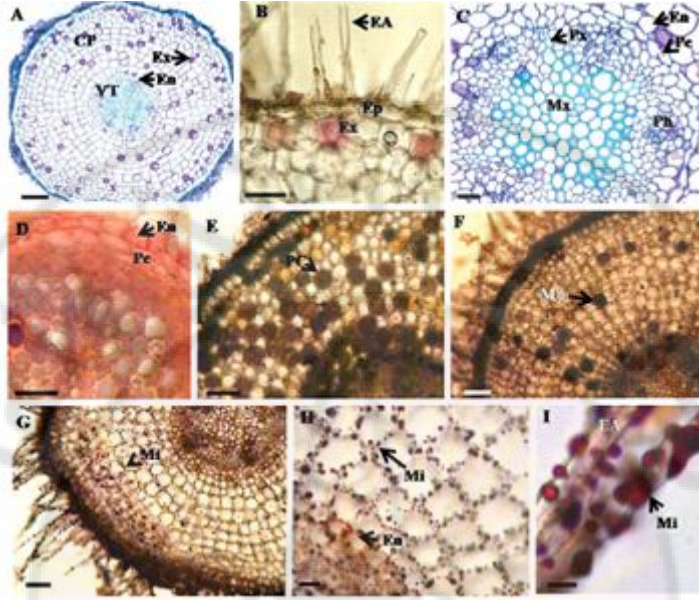
خلايا نباتية مرستيمية لونت بأخضر الميتيل (DNA)، وأحمر البيرونيين (RNA).



التلوين المضاعف: يلون أخضر اليود الخلي النسيج الميتة (المتخشبة) باللون الأخضر، ويلون أحمر كارمن النسيج الحية بلون أحمر.



جدران خلوية ملونة بكاشف شيف (PAS) للكشف عن السكاكر المتعددة: الشكل أ- ملوناً بكاشف شيف . الشكل ب- ملوناً بأزرق ألسيان . الشكل ج- ملوناً بكاشف شيف وأزرق ألسيان.



مقطع عرضي في الجذر لونه بطرائق متنوعة : A- مظهر عام . B- أدمة خارجية فيها أصبغة أنتوسيانين. C - أدمة داخلية وأوعية نسجية . D - أدمة داخلية لونت بالسودان الثالث. E- خلايا فيها مركبات فينولية (عولجت) بثنائي كرومات البوتاسيوم. F- خلايا مع مواد لعابية معالجة بحمض التانيك وشوارد ثلاثي الكلور الأشكال. G - I - مقطع في جذر مع أحياء دقيقة لونت بأحمر سودان .