جامعة الانبار
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

# التحضيرات المجهرية

# microscopic technique

## المحاضرة السادسة

## الطمر

## Embedding

مدرسة المادة: م. د. مريم ابراهيم سلمان

**المادة: التحضيرات المجهرية microscopic technique للمرحلة الثالثة**

**المحاضرة السادسة**

**الطمر Embedding**

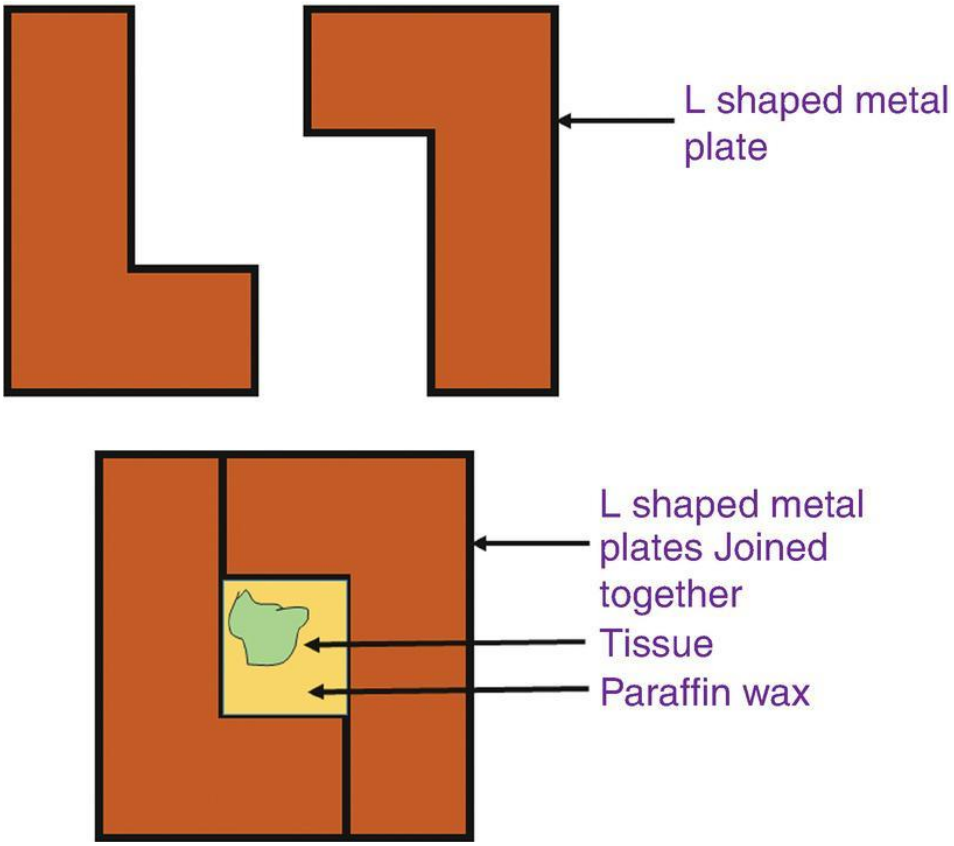
يعرف الطمر بأنه عملية إحاطة أو تغليف واختراق أوساط الطمر للنماذج المشربة بها وذلك لتصليدها وجعلها كتلة متماسكة لغرض قطعها و يعتمد مدى اختراق وسط الطمر أساسا على نوع المثبت المستخدم، ففي حالة المثبتات المخثرة التي تعمل على تحويل بروتين الخلية من الشكل المتجانس الى الشكل الشبكي الذي يسمح لأوساط الطمر بالاختراق لمسافات معينة، أما في حالة المثبتات غير المخثرة التي تثبت بروتين الخلية بشكله الطبيعي المتجانس فهي لا تسمح لأوساط الطمر بالاختراق ونتيجة لذلك تكون الأنسجة المطمورة جافة ومتفتتة وغير مسندة بصورة جيدة وغالبا ما تتشقق وتتناثر أثناء قطعها. غالبا وليس دائما تشرب النماذج وتطمر بنفس الوسط وتدعى هذه العملية بالطمر البسيط simple embedding أما إذا شربت بوسط وطمرت بأخر فيطلق على هذا النوع من الطمر بالطمر المزدوج double embedding كأن يكون التشريب بالسيلويدن والطمر بشمع البرافين.

تمتاز جميع اوساط الطمر بصورة عامة السريعة على التحول بسهولة من الحالة السائلة liquid state إلى الحالة الصلبة و ذلك اما بعملية التبريد كما في حالة الطمر بشمع البارافين والشمع المائي أو بالتبخير كما في حالة الطمر بالسيلويدن والجيلاتين أو بعملية البلمره polymerization كما في حالة الطمر باللدائن.

تجرى عملية الطمر Embedding بعد تشريب النسيج جيدا بالشمع، اذ يطمر بعد ذلك في شمع نقي لتحضيره للقطع وتتم الخطوة الأولى، بصب الشمع المنصهر في قالب مناسب، ثم ينقل النسيج إلى الشمع، باستعمال ملقط غير حاد، ويحبذ العمل بسرعة، لتجنب تصلب الشمع قبل ضبط وضع النسيج. بعد ذلك يبرد وعاء الشمع والنسيج بسرعة و يتم ذلك بالنفخ على سطح الشمع حتى يتصلب نوعا ما، ثم يغمس القالب ببطء في وعاء به ماء عند درجة حرارة الغرفة. ويسبب الماء تحت درجة ١٠ س ، تقلصاً وربما تشققاً لقالب الشمع. يبدو قالب الشمع الجيد رائقاً

ومتجانساً، ويؤدي الطمر غير الجيد إلى ظهور جيوب هوائية في قالب الشمع تبدو كنقط بيضاء، وتسمى هذه الظاهرة التبلور Crystallization. ويمكن طرد الهواء بصهر الجزء العلوي من القالب بأداة ساخنة قليلا. وللقوالب المتبلورة مشاكل عند القطع يتم علاجها بإعادة الطمر. ويمكن حفظ قوالب الشمع في مكان بارد لمدة طويلة.

تصنع قوالب الطمر من المعدن وغالبا ما تصنع القوالب المعدنية من النحاس الأصفر، بشكل قطعتان (على شكل حرف L بالانجليزية بمقاس ١,٥سم x ٢,٥ سم)، و قطعة ثالثة هي القاعدة المعدنية التي تكون اما مربعة او مدورة الشكل.




وقد تكون القوالب من البلاستيك على قاعدة من صلب لا يصدا، تدهن بالجليسرين قبل صب الشمع فيها. أما قوالب الطمر الورقية فيمكن عملها من قطعة مستطيلة من ورق عادي، او من ورق مقوى بعض الشيء، يتم تشكيلها على هيئة وعاء كالعلبة وميزة هذه القوالب هي كونها

رخيصة ويمكن كتابة بيانات هامة عليها. إضافة إلى ما تقدم توجد قوالب طمر تصنع من البلاستيك بثلاثة حجوم (٢٢x٢٢ مم و ٢٢ x ٣٠ مم و ٢٢ x٤٠ مم وجميعها بعمق ٥ مم)، وتمتاز بسهولة فكها عن بعضها. كذلك يمكن استعمال صحون زجاجية غير عميقة وصحون سيراكوز كقوالب طمر وفي جميع الحالات، تدهن قوالب الطمر بالجليسرين من الداخل حتى يسهل رفع قالب الشمع منها.

**الطمر بشمع البرافين Embedding in Paraffin wax**

يعتبر البارافين قديما وحديثا من أكثر الأوساط الشائعة الاستخدام في الطمر وذلك للميزات التالية:

أ -يمكن الاحتفاظ أو خزن النماذج المطمورة بشمع البارافين في أماكن جافة لفترات غير محدودة.

ب -يمكن الحصول على أي سمك للمقاطع تبدأ من ٢ مايكرون فما فوق

ت -يمكن الحصول على شريط ribbon حاوي على سلسلة من المقاطع المتصلة مع بعضها البعض.

ث -سهولة تثبيت ولصق شريط الشمع على الشرائح الزجاجية وسهولة ازالته منها قبل عملية الصبغ.

ج -يمكن الحصول على الشمع بسهولة وبدرجات انصهار مختلفة بحيث تتلائم مع طبيعة النماذج وسمك المقاطع و اداة القطع و ظروف القطع.

ح -يمكن شراءه بأسعار زهيدة.

خ -أن عملية الطمر فيه بسيطة وسريعة نوعا ما.

اما أهم مساوئه فهو حصول تقلص طفيف للنماذج المطمورة فيه عند تجمده.

آن شمع البارافين هو أحد مشتقات البترول الخام حيث يتألف من سلسلة طويلة مشبعة لهايدروكاربون الميثان. أن الشمع التجاري يتألف من خليط من جزيئات ذات أوزان جزيئية مختلفة اما الشمع المستخدم في التحضيرات المجهرية فيذوب بدرجات حرارية تتراوح بين ٥٢ – ٦٦ درجة مئوية وقد اقترح بأن عدد ذرات الكاربون للشمع المستخدم في التحضيرات المجهرية لا يزيد على ٣٠ ذرة وذلك لأن الشمع ذو الصيغة ، $CH_3( CH_2 )_{28} CH_3$ يذوب في درجة حرارة ٦٦ مئوي . ولدى طمر النماذج في شمع البارافين تبدأ الأوساط السابقة للشمع بالخروج من الأنسجة لتحل محلها جزيئات الشمع بالانتشار الى الداخل . وتتوقف جودة الطمر على سرعة خروج الأوساط السابقة فعندما تكون سرعة الخروج أكبر من سرعة الاحلال بالشمع يحدث انكماش لخلايا الأنسجة المطمورة . اما اذا كانت سرعة الخروج بطيئة جدا فان الطمر يكون غير كامل incomplete .

الطريقة :

١ -بعد خطوات إزالة الماء بوساطة سلسلة الكحول الإيثيلي ( على سبيل المثال ) متزايد التركيز ، يوضع النسيج في سائل الترويق الذي هو احد مذيبات شمع البرافين كالزايلين أو الكلوروفورم أو زيت خشب الأرز .

٢ - يشرب النسيج بشمع البرافين السائل في فرن مناسب عند حرارة تتراوح بين ٥٠-٥٥° س وتعتمد مدة التشريب وعدد تغييرات الحمام الشمعي على حجم العينة وقوام النسيج نفسه . أما اختيار شمع البرافين الذي تكون له درجة انصهار معينة فيعتمد على معدل درجة الحرارة في مكان العمل وعلى طبيعة النسيج موضع الدراسة ، وكذلك على سمك المقاطع المطلوبة.

٣ -بعد إتمام عملية التشريب يسمح للشمع بالتجميد ليكون كتلة حول النسيج يمكن تحضير مقاطع منها . وتمثل هذه الخطوة عملية الطمر التي يمكن سرد خطواتها فيما يلي:

أ -تطلى سطوح قوالب الطمر الزجاجية أو المعدنية طلياً خفيفاً بالجليسرين لمنع الشمع من الالتصاق بها عند تجمده.

ب يملا القالب إلى ما قبل حافته العليا بشمع البرافين المنصهر النقي المرشح الذي لم يسبق استخدامه في التشريب ) والذي يكون قد سبق تسخينه قليلا على لهب بنزن Bunsen burner ، ويعمل على التخلص من أية فقاقيع هوائية بوساطة لهب صغير.

٤ - تحمل العينة برفق وذلك باستخدام ملقط دافيء ( ولكنه ليس ساخنا جدا ) ثم تنقل العينة إلى الشمع الذي صب في القالب ويضبط اتجاهها في الوضع المطلوب .

٥ - توضع ورقة وسم قرب العينة بحيث تلتصق بالسطح الداخل لجانب القالب.

٦ -بعد أن يتجمد سطح الشمع ، تسرع عملية التجمد بغمر القالب في ماء بارد او وضعه في الثلاجة وذلك لمنع تكوين بلورات كبيرة في قالب الشمع وتترك كتلة الشمع لمدة ١٥ دقيقة على الأقل في الماء البارد أما إذا كان حجمها كبيرا فقد يحتاج الأمر إلى تركها ساعة كاملة لإتمام التجمد .

٧ –عندما تتجمد الكتلة تماما يجب إخراجها من القالب ، وقد يحدث هذا تلقائيا إذا كان الجليسرين قد استخدم في تشحيم جوانب القالب . وإذا لم يحدث تلقائيا فإن طرقة خفيفة على قاعدة القالب تكفي لفصل كتلة الشمع عنه.

٨ –إذا تعذر إجراء عملية القطع عقب الطمر مباشرة فيمكن تخزين قالب الشمع ، وذلك في مكان بارد لحين توفر الظروف المناسبة للقيام بعملية التقطيع.

**الطمر في الجيلاتين Embedding in Gelatin**

تستخدم هذه الطريقة في الحالات التي يراد فيها تجنب تعريض الأنسجة لعمليات ازالة الماء وللمحاليل المذيبة للدهون ، وكذلك في الحالات التي يرغب فيها تجنب تعريض الانسجة لدرجات حرارة عالية حرصا على ما فيها من إنزيمات او مركبات أخرى تتأثر بالحرارة ويراد إظهارها. يعتبر الجيلاتين كيمياويا شكلا محورا للغراء collagen ( المادة البروتينية التي تمتاز باحتوائها على نسب عالية من الحوامض الأمينية كالكلايسين والبرولين و هيدروكسي برولين والتي لا تذوب في الماء والموجودة في النسيج الضام والعظام ) ولدى تبريد الجيلاتين السائل لغرض تصلده تبدأ جزيئاته بالاتحاد مع بعضها البعض بواسطة رابطة هايدروجينية بين مجاميع الببتيدات للجزيئات المفصولة وتكون هذه الرابطة حساسة للحرارة ، ففي درجة حرارة اقل من ٢٠ مئوي يكون الجيلاتين صلب وفي درجة أعلى من ٣٧ مئوي يكون سائلا وعند الاحتفاظ بالجيلاتين لفترة طويلة في درجة حرارة أعلى من ٦٠ مئوي خاصة بعد غليه فأنه يفقد قدرته على

التصلد عند تبريده وذلك لما لدرجة الحرارة من تأثير على تقصير سلسلة البروتين المكونة له . كذلك ينصح بعدم اذابة الجيلاتين المستخدم للطمر مرات عديدة قبل الاستعمال لأن ذلك يزيد من طراوته ، أن التبريد البسيط للجيلاتين يكسب الأنسجة المطمورة فيه صلابه تكفي لقطعها ولكن المقاطع تكون ذات قوام لزج ، لذا يتطلب تصلده اكثر وذلك بالتبخير البطيء . أن الطريقة الاعتيادية المستخدمة للتصليد مبنية على اساس ربط جزئيات الجيلاتين مع بعضها البعض بثبات اكثر ويتم ذلك بأضافة بعض المثبتات اليه كالفورمالديهايد حيث يقوم بتكوين اصرة المثلين بين سلاسل البروتين اضافة إلى الأواصر التساهمية الهايدروجينية التي تربط الحوامض الأمينية مع بعضها البعض وبذلك يكون الجيلاتين اصلد فيصعب اذابته بالحرارة ، وللتغلب على الزوجة المقاطع تضاف أملاح الالمنيوم التي تعمل على تثبيت الجيلاتين وازالة لزوجته ، بالاضافة إلى طريقة التصليد المذكورة أعلاه هناك طريقة ثانية تستخدم بصورة عامة لنفس الغرض وذلك بتجميد الماء الموجود في الجيلاتين بواسطة امرار غاز ثاني أوكسيد الكاربون وتحت درجات حرارية واطئة على قوالب الجيلاتين ، بعدها تقطع المقاطع بأستخدام المشراح المجمد.

يمكن اعتبار الجيلاتين من أوساط الطمر الجيدة وذلك للميزات التالية :

أ . لا تحتاج النماذج عند طمرها بالجيلاتين الى عملية الانكاز وبذلك تقل احتمالية تشويه النموذج الذي تسببه محاليل الانكاز .

ب . يستخدم الجيلاتين لطمر معظم الأنسجة الدهنية lipids المثبتة وغير المثبتة .

ج- يمكن بسهولة قطع مقاطع ذات مساحات سطحية كبيرة .

ء- سهولة وسرعة الطمر بالجيلاتين .

هـ- الجيلاتين وسط جيد لطمر النماذج ذات الأنسجة المفككة وسهلة التفتت اثناء قطعها بالمشراح .

اما من اهم مساويء الجيلاتين فهي :

أ ـ صعوبة ازالة الجيلاتين من الأنسجة المشربة به .

ب . قابلية الجيلاتين للاصطباغ بالصبغات الحامضية والقاعدية وبالتالي تكون التحضيرات غير واضحة .

ج . لا يمكن الاعتماد عليه في قطع مقاطع تقل عن ٥ مايكرون سمكاً .

د . لا يمكن الحصول على شريط مستمر عند قطع المقاطع .

هـ . يجب استخدام مثبتات خاصة لدى الطمر بالجيلاتين مثل الفورمالديهايد او المثبتات التي لا تذيب الدهون.

الطريقة:

المحاليل اللازمة

١. مثبت فورمالين كالسيوم Formalin Calcium.
٢. وسط الطمر ويتكون من

ا-مسحوق جيلاتين Gelatin ١٥ غم.

ب . جليسرين Glycerine ١٥ مل.

ج- ماء مقطر Distilled Water ٧٠ مل.

ء- ثايمول Thymol بلورة صغيرة

٣. محلول ٣٥-٤٠ ٪ فورمالدهايد Formaldehyde ٢٠ مل.

١. ثبت قطعا صغيرة من النسيج لمدة ١٠-١٥ ساعة في مثبت الفورمالين كالسيوم عند درجة ٥٤ س.
٢. . اغسل في ماء جار لمدة ٣٠ دقيقة
٣. . ضع النسيج في وسط الطمر داخل الفرن عند درجة ٣٧ س لمدة ساعة.
٤. . اقطع كتلة من الجيلاتين حول النسيج وبردها بسرعة .

٥. . جمد كتلة الجيلاتين المحتوية على النسيج بوضعها في محلول ٣٥-٤٠ % فورمالديهايد.

٦. . اقطع بأستعمال جهاز القطع المجمد ويمكن تخزين المقاطع عند درجة ٤° س.

**المصادر Reference**


١. العطار، عدنان عبد الامير وسهيلة محمود العلاف وكواكب عبد القادر المختار، التحضيرات المجهرية، مطابع وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ١٩٨٢.

٢. الحاج، حميد احمد، التحضيرات المجهرية الضوئية، دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة، عمان، ٢٠١٥.

٣. نوري، ماجدة عبد الرضا، علم تقنية الشرائح المجهرية، مطبعة التعليم العالي في الموصل، ١٩٨٩.

4. Bancroft, J. and Stevens, A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London. 2002.