كما أنه يكسبها دعامة قوية لتهيئتها للقطع بالميكروتوم، و يساعد على حفظها في الظروف العادية لفترة طويلة دون أي أذى.

وتتم العملية بتمرير العينة في مزيج متساوي من الشمع والمادة المروقة(1:1) ثم تنقل العينة إلى شمع البرافين المطلق المنصهر داخل الفرن و تكرر هذه العملية لعدة مرات(2– 3 مرات) كل مرة لمدة نصف ساعة، كما تعتمد عدد مرات تغيير الشمع حسب نوع العينة بحيث تقل كلما كانت العينة رخوة وتزداد كلما كانت العينة صلبة.

ويجب أن يراعى التالي:

– أن يتم التخلل لكامل أجزاء العينة ويحل محل المادة المروقة و إلا فإن عملية تحضير القطاعات ستكون غاية في الصعوبة.

– يجب أن يكون شمع برافين التخلل تام الانصهار (درجتان أعلى من درجة الانصهار) حيث يمتاز بنفاذية أسرع.

– يعتمد ز من التخلل على سمك و حجم العينة و يفضل ألا يزيد سمكها عن(5 مم) و ألا يزيد زمن تخلل عينات العضلات و الأنسجة الضامة عن ثلاث ساعات حتى لا يتسبب في صلابتها بينما يمكن أن تترك عينات الجلد والجهاز العصبي في الشمع المنصهر حتى ست ساعات.

– يجب ألا يقل حجم الشمع إلى حجم العينة عن عشرون ضعفا.

و يمكن في تقنيات أخرى استخدام مادة السللويدين(**celloidin**) في عملية التخليل كما يجب أن يكون الطمر بنفس المادة.

7. *عملية الطمر* ***Embedding***:

وهي عملية الغرض منها عمل قالب من العينة بحيث تحيط بها المادة الطامرة وتدعمها و المواد المستخدمة على نوعين:

–بعضها يذوب في الأوساط المائية عند الحرارة المرتفعة مثل الآجار**Agar** و الجيلاتين و الشمع الكربوني **Carbowax**.

–البعض الآخر لا يذوب في الأوساط المائية مثل شمع البرافين و السللويدين و الميثاكريلات و شمع الإستر.

إلا أن البرافين أشهرها و أكثرها استخداما في معامل الأنسجة و كيمياء الأنسجة و شمع البرافين عبارة عن مادة هيدروكربونية ممزوجة بمواد بلاستيكية.

وهناك عدة أنواع من شمع البرافين تبعا لدرجة انصهاره:

- البرافين الرخو **soft paraffin**: ينصهر عند درجة حرارة(45 – 50) درجة مئوية
- البرافين المتوسطة **medium paraffin**: ينصهر عند درجة حرارة(50 – 55) درجة مئوية.
- البرافين الصلب **hard paraffin**: ينصهر عند درجة حرارة(56 – 68) درجة مئوية.

و أهم عامل لاختيار نوع الشمع هي حرارة الفرن التي يعمل فيها القطاعات و نوعية العينة تحت الفحص، و لعمل القالب الشمعي يعبأ الشمع المنصهر داخل القالب ثم تنقل العينة باستخدام ملقط و توضع العينة بالاتجاه المرغوب به، بعدها يترك القالب على سطح ثلجي فترة قصيرة ليبرد سطحه الخارجي ، و حتى لا يلتصق الشمع بأطراف القالب المعدنية فإنه يفضل مسح قاعدته و أطرافه الداخلية بالفازلين أو الجليسرين قبل ذلك.

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

8. عملية التشذيب *Trimming* :

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

9. تقطيع العينة *Sectioning* :

تثبت العينة على حامل العينة **specimen holder** في الميكروتوم كما يجب أن يزود جهاز القطع بسكين حادة جداً ويحدد سمك القطاع المرغوب فيه(3 – 7) ميكرون للبارافين وبسمك(10 – 15) ميكرون للسللويدين، القطاعات الجيدة عادةً تكون على شكل أشرطة **Ribbons** أو سلسله من القطاعات ويفضل أن توضع هذه الأشرطة على صفيحه سوداء حتى يسهل تمييز القطاعات وأخذ المناسب منها لوضعه على الشريحة الزجاجية.

10. تحميل القطاعات *Mounting*:

يقصد بها وضع القطاع النسيجي على الشريحة الزجاجية، ويمكن أن تتم هذه العملية بإحدى طريقتين:

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

11. عملية الصبغ Staining:

يجب أن يزال شمع البرافين من القطاعات تماما باستخدام الزيلول ومن ثم يجب التخلص من الزيلول هو الآخر بالكحول المطلق، بعدها يجب نقل القطاعات إلى بيئة مشابهه للبيئة المذابة فيها الصبغة (مائية أو كحولية) فإذا كانت الصبغة مذابة في الماء مثلاً يجب تميؤ hydration القطاعات وذلك بتمريرها على سلسلة تركيزها متدرجة الانخفاض من محاليل الكحول حتى تصل إلى الماء (3 دقائق لكل مرحلة) أما إذا كانت العينة مذابة في 50% كحول فيكتفي بتمرير القطاعات في السلسلة الكحولية حتى تصل إلى 50% قبل تمريرها في محلول الصبغة.

ومدة الصبغ تعتمد على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج وقد يصبغ النسيج بأكثر من صبغه أو قد يلجأ الباحث إلى ما يسمى الصبغ المضاد كاستخدام صبغة الهيماتوكسلين لصبغ الأنوية وصبغة الأيوسين لصبغ السيتوبلازم.

بعد الانتهاء من عملية الصبغ تبدأ عملية إعداد الشريحة المجهرية للحفظ المستديم باستخدام مادة شمعية أو مادة بلاستيكية حافظه مثل مادة بلسم كندا أو مادة (D.P.X) ثم يوضع غطاء الشريحة(Cover slip) بزاوية حادة 45 درجة وبحذر شديد حتى لا تتكون فقاعات هوائية Air bubbles ، وهكذا يتم عمل ما يعرف بالشريحة المستديمة.

بعد أن تترك لتجف على مجفف الشرائح يمكن فحص القطاعات تحت المجهر.

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

(Tissue Auto processor)

مميزات تقنية شمع البرافين:

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

2– تعطي سلسلة متتابعة من القطاعات تسمى أشرطةRibbons متصلة مع بعضها البعض وهذه الأشرطة مهمة للعمل البحثي.

3–تعطي قطاعات رقيقة جداً.

4– قطاعات هذه الطريقة سهلة الصبغ.

عيوبها:

– هذه الطريقة تستخدم المثبتات والفرن والتي قد تضر بالنسيج وبتفاصيل تركيب الخلايا.

– استخدام المثبتات قد يذيب المحتوى الدهني للنسيج خلال التحضير لذا لا يمكن دراسة الدهون بهذه الطريقة.

– هذه الطريقة ليست مثالية في كيمياء الأنسجة لأن الحرارة تحطم الأنزيمات مثلاً.

ثانياً: تقنية السللويدين The Celloidin Technique

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