الفصل التاسع

صبغ المسحات الخلوية

هناك العديد من الصبغات المستخدمة في مختبرات الخلايا المرضية لغرض إظهار مكونات المحتويات الخلوية. ومن هذا الصفات ما هو روتيني مثل صبغة بابنكولا إضافة إلى صبغات خاصة بالكروماتين الجنسي وأخرى خاصة لتحديد مؤشر نضج الخلايا الطلائية وغيرها لإظهار بعض مسببات العدوى وصفات الخلايا السرطانية.

صبغة بابنكولا

تعتبر صبغة بابنكولا Papanicolaou stain الصبغة الروتينية للمسحات الخلوية بإختلاف أنواعها. تشتمل هذه الصبغة على استخدام هيماتوكسلين هارس لصبغ أنوية الخلايا بينما تقوم محاليل إيوسين آزار والبرتقالي - ج في صبغ السيتوبلازم.

المحاليل المستخدمة

محلول هيماتوكسلين هارس

هيماتوكسلين ..... ١ جم

كحول إثيلي مطلق ..... ١٠ سم^{٣}

شبة الأمونيوم أو البوتاسيوم ..... ٢٠ جم

ماء مقطر..... ٢٠٠ سم^{٣}

أكسيد الزئبقيك. ..... ٠,٥ جم

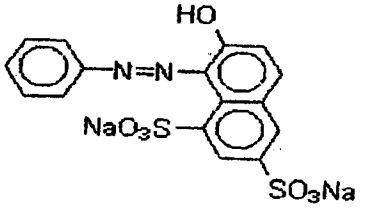
يذاب الهيماتوكسلين بالكحول بينما تذاب شبة الأمونيوم أو البوتاسيوم بالماء عن طريق التسخين. يخلط بعد ذلك المحلولان ويسخن الخليط حتى الغليان بالسرعة الممكنة يضاف بعد ذلك أكسيد الزئبقيك Mercuric oxide حيث يكتسب المحلول عند ذلك اللون الأزرق الداكن. بعدها تبعد العينة عن اللهب وتبرد مباشرة بواسطة الماء البارد ثم يرشح محلول الصبغة ويصبح جاهزاً للاستخدام.

محلول البرتقالي – ج

محلول البرتقالي - ج (٠,٥٪) ١٠٠ سم٣

(يذاب في كحول إثيلي)

جمض التنغستات الفسفوري .....٠,٠١٥ جم



التركيب الكيميائي لصبغة البرتقالي - ج

محلول إيوسين - آزار Eosin-azur solution

أخضر - خفيف(٠,١٪ في ٩٥٪ كحول إثيلي)..... ٤٥ سم٣

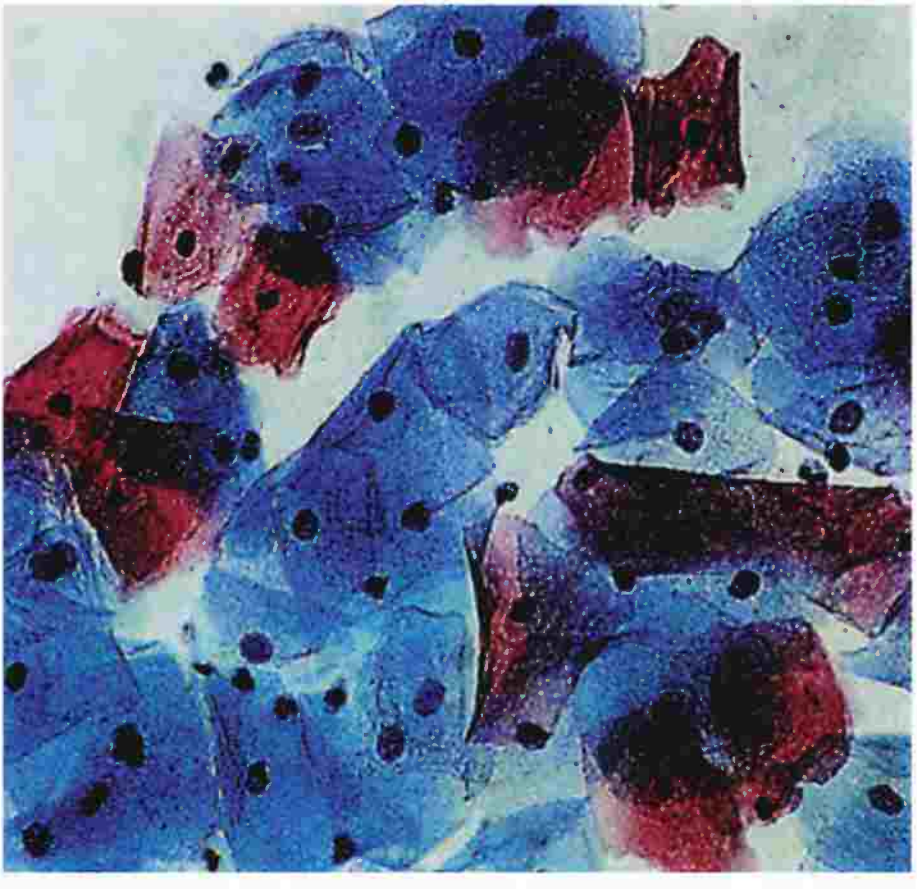
Light green SF Yellowish

الصبغة البنية لبسمارك (٠,٥٪ في ٩٥٪ كحول إثيلي) ١٠ سم٣
Bismarck brown

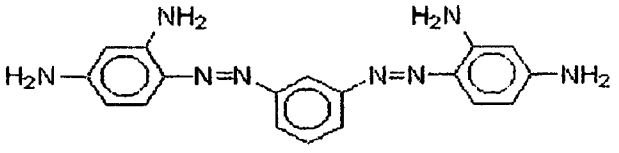
إيوسين مصفر (٠,٥٪ في ٩٥٪ كحول اثيلي سم٣

حمض التنغستات الفسفوري ..... ٠,٢ جم

محلول كربونات الليثيوم المشبع ..... نقطة واحدة



الشكل (٧٧) صورة ضوئية لمسحة خلوية مصبوغة بصبغة بابنكولا.



التركيب الكيميائي للصبغة البنية لبسمارك

طريقة الصبغ

١ - ثبت المسحات الخلوية في ٩٥٪ كحول إيثيلي لمدة ١٠ دقائق.

٢ - مرر المسحات الخلوية في تراكيز الكحول التنازلية (٨٠٪، ٧٠٪، ٥٠٪) بمعدل دقيقتين لكل مرة وحتى الماء المقطر.

٣ - اصبغ المسحات الخلوية في محلول هيماتوكسلين هارس لمدة ٥ - ٨ دقائق.

٤ - اغمس المسحات الخلوية في ماء عادي.

٥ - اغمس المسحات الخلوية في كحول حمضي مائي (٠,٢٥٪) لمدة ثانيتين حتى يزول اللون من السيتوبلازم ويبقى فقط في النواة.

٦ - انقل المسحات مباشرة إلى ماء عادي لمدة ٣ دقائق.

٧ - اغمس المسحات في ماء قلوي لمدة دقيقة.

٨ - انقل مباشرة إلى ماء عادي.

٩ - مرر المسحات الخلوية في تراكيز الكحول التصاعدية حتى ٩٥٪ كحول إثيلي بمعدل دقيقة لكل تبديل.

١٠ - ضع المسحات في محلول البرتقالي - ج لمدة دقيقتين.

١١ - إغمس المسحات في ٩٥٪ كحول إثيلي (مرتين).

١٢ - اغمس الشرائح في خليط من حمض الخليك الثلجي الكحولي (١٪). وحمض التنغستات الفسفوري الكحولي (١٪) لمدة ١٠ ثواني.

١٣ - اغمس المسحات في كحول إثيلي (٩٥٪) لمدة دقيقة.

١٤ - اغمس المسحات في محلول الإيوسين - آزار لمدة ٥ دقائق.

١٥ - اغمس في كحول إثيلي ٩٥٪ لمدة دقيقة.

١٦ - مرر المسحات في تبديلين من كحول إثيلي (٩٥٪) ثم تبديلين من الكحول المطلق وتبديلين من الزايلين بمعدل دقيقة لكل تبديل.

١٧ - غط المسحات بالمادة الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي (الشكل رقم٧٧).

طريقة بابنكولا السريعة

تستخدم هذه الطريقة في صبغ القطاعات الثلجية للأورام التي يتم فحصها أثناء العمليات الجراحية من أجل تحديد الورم من حيث كونه خبيث أو حميد حيث تحدد نتيجة هذا الفحص التصرف التالي الذي سيقوم به الجراح. وكما تستخدم هذه الطريقة في صبغ الطبع الخلوية Cellular prints للأورام والغدد اللمفاوية والجلد وغير ذلك.

وفيما يلي خطوات هذه الطريقة لصبغ مسحات الطبع الخلوية :

١ - تثبيت المسحات في كحول إثيلي (٩٥٪) لمدة دقيقة واحدة.

٢ - تغمس المسحات لمرة واحدة في كحول (٥٪).

٣ - تغمس المسحات لمرة واحد في ماء مقطر.

٤ - تنقل المسحات إلى هيماتوكسلين هارس لمدة ٤٠ ثانية.

٥ - تغمس المسحات في الماء العادي لمدة ٣ ثواني.

٦ - تغمس المسحات في محلول كربونات الليثيوم Lithium carbonate لمدة ١٥ ثانية. يحضر محلول كربونات الليثيوم من خلال خلط ١ سم^{٣} من محلول كربونات الليثيوم المشبع مع ١٠٠ سم^{٣} من الماء المقطر.

٧ - تغمس المسحات في كحول إثيلي (٥٪) لمرة واحدة.

٨ - تغمس المسحات في كحول إثيلي (٩٥٪) لمرة واحدة.

٩ - تغمس المسحات في محلول برتقالي - ج لمدة ١٥ ثانية.

١٠- تغمس المسحات في كحول إثيلي (٩٥٪) لمرة واحدة.

١١- تغمس المسحات في محلول إيوسين آزار لمدة ٣٠ ثانية.

١٢- تمرر المسحات في كحول إثيلي (٩٥٪) ثم كحول مطلق لمدة ٢٠ ثانية ثم تروق بالزايلين لمدة ٣٠ ثانية وتغطى بعدها بأحد المواد الطامرة الراتنجية.

وكما يمكن إعادة صبغ Restaining المسحات الخلوية التي سبق صبغها بطريقة بابنكولا تبعا للخطوات التالية :

١ - ضع المسحات الخلوية في الزايلين حتى تسقط منها الأغطية الزجاجية وقد يلزم لذلك أكثر من ١٢ ساعة.

٢ - اغمس المسحات في كحول إثيلي مطلق لمدة دقيقة واحدة.

٣ - اغمس المسحات في كحول (٩٥٪) لمدة دقيقة واحدة.

٤ - اغمس المسحات في كحول اثيلي (٧٠٪) لمدة دقيقة واحدة.

٥ - اغمس المسحات في كحول إثيلي (٧٠٪) يحتوي على حمض هيدروكلوريك (١٪).

٦ - اغمس القطاعات في الماء المقطر ثم إبدأ بصبغها من جديد بخطوات صبغة بابنكولا الاعتيادية.

كما أنه يمكن صبغ المسحات الخلوية بطريقة الهيماتوكسلين والإيوسين مع النظر بعين الاعتبار أنه لا يتم الحصول على صبغ واضح للأنوية التي تشكل أحد دعامات التشخيص في مختبرات الخلايا المتساقطة. كذلك تستخدم صبغة حمض البيريوديك - شيف Periodic acid-Schiff التي يرمز لها بالرمز PAS في تحديد الخلايا الميزوثيلية Mesothelial cells والخلايا السرطانية المفرزة للمخاط في حالة السرطان الغدي Adenocarcinoma حيث يحتوي سيتوبلازم خلايا هذا السرطان على حبيبات تصطبغ إيجابيا بصبغة PAS التي تتلخص خطواتها بالآتي :

١ - تمرر المسحات حتى الماء المقطر.

٢ - تنقل إلى محلول حمض البيريوديك (١٪) لمدة ١٠ دقائق.

٣ - تغمس المسحات بالماء المقطر ثم تنقل إلى كاشف شيف لمدة ١٥ دقيقة.

٤ - ضع القطاعات في محلول هيماتوكسلين هارس لمدة ٥ دقائق.

٥ - تغسل المسحات بالماء الجاري ثم تمرر بتراكيز الكحول التصاعدية وتروق بالزايلين وتغطى بأحد المواد الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

ويمكن إخضاع المسحات الخلوية للبلغم لتفاعل أزرق بروشيا Prussian blue reaction لإظهار الحديد وصبغيات الهيموسدرن Haemosiderin في الخلايا النسيجية Histiocytes حيث أن وجود الحديد يمكن أن يكون مؤشر على وجود أجسام أسبستوزية في الجهاز التنفسي. ويمكن إجمال خطوات تفاعل أزرق بروشيا بالخطوات التالية : -

١ - مرر المسحات حتى الماء المقطر.

٢ - تنقل المسحات إلى خليط يحضر مباشرة قبل الاستخدام من كميات متساوية من سيانيد الحديدوز البوتاسيومي (٢٪) مع حمض هيدروكلوريد (٢٪) ولمدة

نصف ساعة عند حرارة ٣٧ م. ويمكن استخدام حرارة ٦٠ م في حالة النتائج غير الواضحة.

٣ - تغمس المسحات بالماء المقطر ثم تصبغ بصبغة أحمر متعادل (١٪) لمدة ٣ دقائق.

٤ - تغسل المسحات بالماء العادي ثم تمرر بتراكيز الكحول التصاعدية ثم تروق بالزايلين وتغطي بأحد مواد الطمر الراتنجية والغطاء الزجاجي.

إضافة إلى ما سبق ولغرض دراسة مكونات الخلايا غيرالطلائية للمسحات الخلوية فإنه يمكن استخدام صبغة كيمزا May-Grunwald-Giemsa stain لغرض إظهار كريات الدم الحمراء والبيضاء بأنواعها المختلفة خاصة في مسحات سوائل الجسم وعينات البلغم. ويمكن إجمال خطوات هذه الطريقة بالآتي :

١ - تعمل مسحات خلوية وتترك لتجف بالهواء.

٢ - تنقل المسحات إلى كحول لمدة ٨ - ١٠ دقائق.

٣ - تنقل المسحات لمدة ٨ دقائق إلى محلول صبغة May-Grunwald (٠,٣٪ مذاب في كحول مثيلي يخلط مع حجم متساوي من محلول منظم رقم الهيدروجيني = ٦,٨).

٤ - تنقل المسحات إلى صبغة كيمزا لمدة ١٧ دقيقة.

٥ - تغمر المسحات بواسطة المحلول المنظم ذو الرقم الهيدروجيني = ٦,٨.

٦ - تجفف المسحات بالهواء ثم تفحص مباشرة.

صبغات الكروموسوم الجنسي

اكتشف الكروموسوم الجنسي Sex chromatin عام ١٩٠٨م من قبل العالم Muray Liewellyr ، وكما يعرف الكروموسوم الجنسي أيضا بجسم بار Barr body.

ويرادف جسم بار في الخلايا الجسدية ما يعرف Drumstick في خلايا الدم البيضاء المتعادلة المفصصة في مسحات الدم.

يظهر الكروموسوم الجنسي في جميع الخلايا الجسدية للأنثى في الطور البيني Interphase في ٢٠ - ٣٠٪ من هذه الخلايا لكن لا تشاهد هذه الأجسام في ٣٠ - ٦٠٪ من الخلايا بسبب عوامل التقنية المستخدمة في تحضير المسحات وصبغها وظروف أخرى. وأفضل المسحات لدراسة الكروموسوم الجنسي هي مسحات تجويف الفم والأساس بالكشف عن الكروموسوم الجنسي في مسحات تجويف الفم هو أن وجوده في خلايا هذا التجويف يعني أن صاحب هذه المسحات أنثى سوية أو ذكر يعاني من متاعب جنسية أو هرمونية. وفيما يلي الحالات التي يلزم بها الكشف عن جسم بار وتقدير نسبته:

- النمو الجنسي غير الطبيعي عند الجنسين.
- أعضاء التناسل المبهمة Ambiguous genitalia.
- انحباس الطمث Amenorrhea.
- شذوذ الكروموسومات الجنسية.
- يكشف عن الكروموسوم الجنسي في فحوصات الألعاب الأولومبية أو المباريات الرياضية في حالة الشك بأن رجل تقدم بنفسه للمنافسة على أنه إمرأة.

ولتحضير مسحات تجويف الفم لغرض تحديد جسم بار فإنه يجب إتباع الخطوات التالية:

- يجب تنظيف الفم من بقايا الأطعمة وأي مواد أخرى من خلال المضمضة وتفريش الأسنان.

- تكشط خلايا طلائية من بطانة تجويف الفم (الجهة الداخلية لجدار الفم) باستخدام ملعقة خشبية Tongue depressor.

- يتم فرد الخلايا المكشوطة مباشرة على سطح شريحة نظيفة ومن ثم تغمس مباشرة في المثبت (٩٥٪ كحول) أو ترش بواسطة أحد مثبتات المسحات الخلوية الرشوشية. ويجب على الأقل عمل ٤ مسحات خلوية للشخص الواحد مع عمل مسحات ضابطة (عادة من فنيي المختبر). ويجب الانتباه إلى عدم جفاف المسحات الخلوية قبل التثبيت حيث أن ذلك سيؤدي إلى ضعف أو عدم صبغ الكروموسوم الجنسي.

صبغ الكروماتين الجنسي

تصبغ المسحات الخلوية جنبا إلى جنب مع المسحات الضابطة بأحد الصبغات الموصى بها لإظهار جسم بار. وأشهر هذه الصبغات:

- صبغة البلور البنفسجي Cresyl echt violet.
- صبغة الثايونين الحمضي Acid thionin.
- صبغة جاورد المحورة Modified Guard stain.

صبغة البلور البنفسجي Cresyl Echt Violet Stain

هذه الصبغة مستخدمة على نطاق واسع في مختبرات التقنية الخلوية لتحديد نسبة الكروموسوم الجنسي.

خطوات العمل

١ - أكشط خلايا من تجويف الفم ثم افردها مباشرة على شرائح نظيفية ثم إغمس المسحات مباشرة قبل أن تجف في محلول الكحول الإثيلي - الأثير (١ : ١) وتترك الشرائح داخل المحلول على الأقل لمدة ربع ساعة.

٢ - مرر الشرائح حتى الماء المقطر.

٣ - اغمس الشرائح في محلول البلور البنفسجي (١٪) لمدة عشر دقائق.

٤ - اغمس الشرائح في كحول إثيلي (٩٥٪) حتى يتوقف خروج الصبغة من سيتوبلازم الخلية ويمكن الاستدلال على ذلك إما بالنظر أو بالفحص بالمجهر.

٥ - مرر المسحات في تراكيز الكحول التصاعدية ثم روقها بالزايلين وغطها في أحد المواد الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي (الشكل رقم ٧٨).

- يبدأ فحص المسحات الخلوية الضابطة فإذا ظهر بها جسم بار بوضوح يتم تحديد نسبة ذلك حيث يتم بعد ذلك قراءة المسحات الخلوية الأخرى. وكما أنه يجب مسح ٥٠٠ - ٦٠٠ خلية لتحديد نسبة جسم بار.

صبغة جاورد المحورة Modified Guard Stain

محلول سكارلت - ببرخ Biebrich Scarlet solution

يحضر هذا المحلول من المكونات التالية :

سكارلت ببرخ ..... ١ جم
(Biebrich scarlet)

كحول اثيلي (٥٠٪) ..... ١٠٠ جم

حمض الخليك الثلجي ..... ٥ سم^{٣}

حمض التنغستات الفسفوري ..... ٠,٣ جم

يترك هذا المحلول بعد التحضير لمدة ٢٤ ساعة ثم يرشح بعدها ويصبح جاهزا للاستخدام. ويبقى هذا المحلول صالحا للاستخدام عند حرارة الغرفة لفترة طويلة.

محلول أخضر سريع Fast green solution

يحضر هذا المحلول من المكونات التالية :

أخضر سريع ..... ٠,٥ جم
(Fast green)

كحول إثيلي (٥٠٪) ٨٥ سم٣

حمض الخليك الثلجي ١٥ سم٣

حمض المولبديك الفسفوري ٠,٣ سم٣

حمض التنغستات الفسفوري ..... ٠,٣ جم

يترك هذا المحلول لمدة ٢٤ ساعة ثم يرشح قبل استخدامه ويبقى صالحا لمدة شهر عند حرارة الغرفة وإلى أربعة أشهر إذا ما تم حفظه عند حرارة صفر مئوية.

خطوات العمل

١ - اصبغ في محلول سكارلت ببرخ لمدة دقيقتين.

٢ - اغمس المسحات الخلوية في تبدلين من كحول إثيلي (٥٠٪) بمعدل غمسة لكل تبديل.

٣ - انقل المسحات إلى محلول أخضر سريع لمدة ١٩ - ٢٤ دقيقة.

٤ - مرر المسحات في تراكيز الكحول التصاعدية ثم روقها بالزايلين وغطها بمادة طامرة راتنجية والغطاء الزجاجي.

والجدير بالذكر بأنه يجب اختيار الخلايا التي تكون بها الأنوية واضحة وعادة يظهر ذلك بوضوح في الخلايا الطلائية الوسطية Intermediate epithelial cells التي تظهر محتوياتها النووية الكروماتينية بوضوح وكما تستبعد الخلايا التي بها أنويه منكمشة. هذا ويجب النظر بعين الاعتبار إلى أنه لا يجوز إجراء هذا الفحص على خلايا فم ملتهب.

وهنالك العديد من العوامل التقنية التي تؤثر على تحديد جسم بار منها :

١ - **طريقة الصبغ** : أي خلل في عملية الصبغ سيؤدي إلى صبغ بشكل ضعيف أو عدم صبغ جسم بار ومن هنا تأتي أهمية صبغ شرائح ضابطة في كل مرة.

٢ – **المسحة الخلوية**: تحضير المسحة من أهم العوامل لإظهار جسم بار حيث أن جفاف المسحات الخلوية قبل التثبيت يؤدي إلى عدم صبغ جسم بار.

٣ – إذا أخذت المسحات في فترة بعد الولادة Post partum مثلاً ينخفض معدل نسبة جسم بار إلى ما دون ١٥٪ في الأسبوع الأول بعد الولادة.

٤ – **العلاج الهرموني** : يؤدي العلاج بهرمون الإستروجين إلى خفض الخلايا المحتوية على جسم بار.

الشكل رقم (٧٨) صورة ضوئية تظهر جسم بار في مسحة مصبوغة بطريقة البلور البنفسجي

٥ –**الدورة الشهرية**: ينخفض مستوى جسم بار في طور النمو Proliferative phase من الدورة الشهرية وحتى منتصفها. لذلك فإن أفضل طرق لتحضير المسحات لغرض إظهار جسم بار هي أثناء مرحلة Late luteal phase وأثناء فترة الطمث.

٦ –**بعض الأدوية**: تعمل بعض الأدوية مثل السلفنميد والمضادات الحيوية على خفض نسبة وحجم جسم بار في خلايا تجويف الفم.

يظهر جسم بار على هيئة بقعة ملتصقة بالغشاء النووي في أنوية الخلايا الجسدية الأنثوية فيما لا يظهر في الخلايا الجسدية للذكر حيث أن كروموسومه الجنسي

(xy) بينما للأنثى (xx). ويفيد تحديد جسم بار في العديد من الحالات المرضية والمتلازمات الوراثية كما هو الحال في تحديد الإصابة بمتلازمة كلينفلتر Klinefelter`s syndreome عند الذكور الذين يحملون كروموسوم جنسي على هيئة xxy مما يؤدي إلى ظهور جسم بار في خلاياهم الجسدية. كما يفيد تحديد جسم بار الاستدلال على إصابة الإناث بما يعرف بمتلازمة تيرنر Turner's syndrome حيث يكون الكروموسوم الجنسي عندهن (xo) وبالتالي يغيب جسم بار من خلاياهن الجسدية.

وتوضح الجداول ٨، ٩، ١٠ العلاقة بين النمط الظاهري والعيوب الخلقية للأشخاص الذين يعانون من تغييرات في الكروموسومات الجنسية.

جدول رقم (٨) . العلاقة بين الكروموسوم الجنسي والنمط الظاهري.

النمط الظاهري	الكروموسوم الجنسي	المظاهر/ العيوب الخلقية
ذكر سوي	xy	ذكر طبيعي ليس عنده كروموسوم جنسي
أنثى سوية	xx	أنثى طبيعية عندها كروموسوم جنسي واحد
متلازمة كليفلتر	ذكر xxy	عنده ٤٧ كروموسوم ويشاهد به جسم بار مع أنه ذكر.
syndrome		الخصية صغيرة، له القدرة على الإنتصاب وقذف المني لكنه عادة عقيم.
متلازمة	أنثى xo	عندها ٤٥ كروموسوم عليها مظاهر الذكوره
تيرنر		حيث لا تحتوي خلاياها على جسم بار لها قامة قصير وعنق
Turner`s syndrome		قصيرة وثنايات وحلمات الصدر متباعدة
أنثى	xxx	عندها كروموسومين جنسيين
متلازمة داون	أنثى xx	عندها كروموسوم جنسي واحد
Down's syndrome		عدد الكروموسومات ٤٧ حيث أن الكروموسوم الجسدي رقم ٢١ ، هو ثلاثي بدل ثنائي. عادة المصابين بهذه المتلازمة يكونون منغولي المظهر ويعانون من أمراض في القلب.

جدول رقم (٩). التغيرات في الكروموسوم الجنسي عند الذكور .

النمط الظاهري	الكروموسوم الجنسي	النمط الكروموسومي	عدد الكروموسومات	المظاهر
ذكر	غير موجود	xy	٤٦	ذكر طبيعي
ذكر	موجود	xxy	٤٧	متلازمة كلينفلتر
ذكر	غير موجود	xyy	٤٧	عدم هبوط الخصى، احتمال وجود تخلف عقلي متباين الدرجة. شذوذ في الأسنان، طول القامة (يزيد عن ستة أقدام)
ذكر	غير موجود	xyyy	٤٨	تخلف عقلي وجسدي بسيط، فتق أربي Inguinal hernia، عدم هبوط الخصى. تضيق رئوي خلل في تنسج الأسنان Dental dysplasia.
ذكر	اثنين من جسم بار	xxxy	٤٨	متلازمة كلينفلتر فضلا عن مزيد من التخلف العقلي وضمور الخصى.
ذكر	ثلاث من جسم بار	xxxxy	٤٩	تخلف عقلي، الأعضاء التناسلية الخارجية ذات عيوب خلقية. تشوهات في الهيكل العظمي. ملامح وجه تشبه متلازمة داون.

جدول رقم (١٠) التغيرات في الكروموسوم الجنسي عند الإناث.

النمط الظاهري	الكروموسوم الجنسي	النمط الكروموسومي	عدد الكروموسومات	المظاهر
أنثى	موجود	xx	٤٦	أنثى سوية
أنثى	جسم بار اصغر من جسم بار الاعتيادي	xx	٤٦	غدة تناسلية لا تظهر الخصائص الجنسية الثانوية. تعاني الأنثى من العقم.
أنثى	غير موجود	xo	٤٥	متلازمة تيرنر
أنثى	اثنتين من جسم بار	xxx	٤٧	أنثى سوية من حيث المظهر الخارجي ولكنها تعاني من تخلف عقلي. قد لا تظهر الخصائص الجنسية الثانوية وقد تعاني من اضطراب في الحيض.
أنثى	ثلاث من جسم بار	xxxx	٤٨	انثى سوية من حيث المظهر الخارجي ولكنها تعاني من تخلف عقلي
أنثى	أربع من جسم بار	xxxxx	٤٩	تخلف عقلي مع وجه منغولي الشكل. تغير خريطة راحة اليد وتشوهات في الهيكل العظمي.

التغيرات الهرمونية

يبطن الجهاز التناسلي للأنثى نسيج طلائي حيث يبطن كل من المهبل وعنق الرحم الخارجي نسيج طلائي حرشفي طبقي بينما يبطن الرحم من الداخل نسيج طلائي عمادي غدي بسيط. تتأثر البطانات الطلائية للجهاز التناسلي الأنثوي

بالهرمونات الجنسية الأنثوية وبالذات الإستروجين والبروجسترون خلال الدورة الشهرية حيث تشهد زيادة في عدد الخلايا Proliferation وتتميز بإكتساب مظاهر مورفولوجية مميزة.

وعندما يكون جدار عنق الرحم مكتمل النمو فإنه يمكن مشاهدة أربع طبقات من الخلايا (الشكل رقم ٧٩) وهي:

– طبقة الخلايا القاعدية Basal cell layer

تتكون هذه الطبقة من خلايا قاعدية Basal cells تستند على الغشاء القاعدي وهي مسئولة عن تكوين الطبقات الثلاث الأخرى وخلايا هذه الطبقة لا تتساقط تحت تأثير الهرمونات الجنسية.

– طبقة الخلايا فوق القاعدية Parabasal cell layer

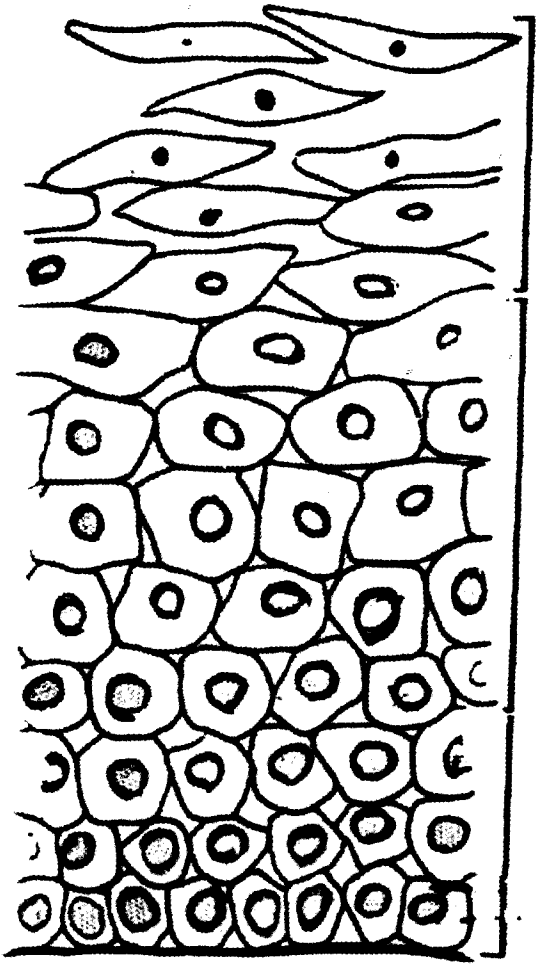
تتكون هذه الطبقة من خلايا تعرف بالخلايا فوق القاعدية Parabasal cells وهي صغيرة دائرية أو بيضاوية الشكل ولها سيتوبلازم كثيف ونواة كبيرة وسطية.

– طبقة الخلايا الوسطية Intermediate cell layer

تتكون هذه الطبقة من خلايا طلائية وسطية Intermediate epithelial cells لها سيتوبلازم كثيف بعض الشيء وأنوية محببة. وتتساقط هذه الخلايا عادة على هيئة كتل خلوية وتكون أطرافها مثنية وهي أكبر حجما من خلايا الطبقة فوق القاعدية. وخلايا هذه الطبقة غنية بالجلايكوجين مما يجعلها بيئة مناسبة لنمو البكتريا العضوية المعروفة بعصيات دودرلين Doderlein bacilli.

– طبقة الخلايا السطحية Superficial cell layer

تتكون هذه الطبقة من خلايا طلائية سطحية Superficial epithelial cells وهي عبارة عن خلايا حرشفية خلاياها متعددة الأضلاع وسيتوبلازمها شفاف وأنويتها صغيرة وكثيفة.



الشكل (٧٩): رسم تخطيطي يوضح الطبقات المكونة لجدار عنق الرحم.

وتتأثر الخلايا المتساقطة من جدار عنق الرحم بالهرمونات الجنسية الأنثوية. (الشكل رقم ٨٠).

تأثير الإستروجين

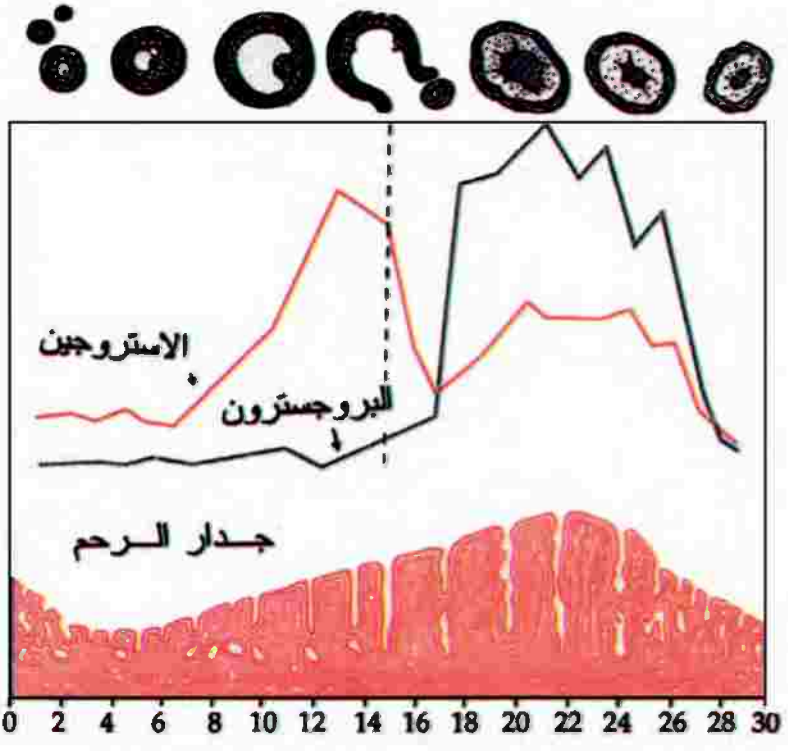
يعمل الإستروجين Eostrogen على زيادة خلايا جميع الطبقات المكونة للرحم حيث تنمو الخلايا جار القاعدية إلى خلايا طلائية وسطية وهذه بدورها تنمو إلى خلايا طلائية حرشفية سطحية. إن هذا من شأنه أن يؤدي إلى تساقط الخلايا الحرشفية السطحية بشكل أساسي إضافة إلى عدد من الخلايا الطلائية الوسطية.

تأثير البروجسترون

يعمل البروجسترون Progestron على زيادة نمو الخلايا الوسطية الطلائية إلى خلايا حرشفية سطحية وتتساقط تبعا لذلك كل من الخلايا الحرشفية السطحية والخلايا الطلائية الوسطية. وتظهر الخلايا الطلائية الوسطية على هيئة كتل من الخلايا ويظهر التحلل السيتوبلازمي على هذه الخلايا.

تأثير غياب الإستروجين والبروجسترون

خلال الفترة السابقة للبلوغ أو فشل عمل المبيض أو وجود خلل في أداء الغدة النخامية أو خلال فترة انقطاع الطمث فإن ذلك يصاحبه ضمور في نمو طبقات جدار الرحم ولا تتكون الخلايا الوسطية أو السطحية وبالتالي فإن الخلايا المتساقطة من جدار الرحم عبارة عن خلايا فوق قاعدية بشكل أساسي مع قليل من الخلايا الطلائية الوسطية.



الشكل رقم (٨٠). رسم تخطيطي يوضح التغيرات في الهرمونات الجنسية وما يصاحبها من التغيرات النسيجية في بطانة الرحم خلال الدورة الشهرية.

مؤشر النضج

المسحات الخلوية لجدار عنق الرحم والمهبل لا تحتوي بشكل أساسي وفي الأوضاع الطبيعية على أكثر من نوعين من الخلايا التي تتساقط بها كل من الطبقة السطحية والطبقة الوسطية وتكون نسبة هذه الخلايا في المسحات الخلوية انعكاس لنمو طلائية عنق الرحم والمهبل تحت تأثير الهرمونات الجنسية.

ومؤشر النضج Maturation index الذي يرمز له بالرمز MI هو النسبة بين الخلايا فوق القاعدية والمتوسطة والسطحية في المسحة الخلوية. ويكتب دليل النضج عادة على هيئة ثلاثة أرقام فمثلا إذا كان دليل النضج هو ٧٥/١٧/٨ فهذا يعني أن ٧٥٪ من الخلايا الطلائية المتساقطة هي من خلايا طلائية فوق قاعدية و ١٧٪ نسبة الخلايا الطلائية الوسطية و ٨٪ هي نسبة الخلايا السطحية. ولا تحتسب الأنواع الأخرى من الخلايا الأخرى في المسحات الخلوية للمجرى التناسلي الأنثوي كالخلايا الطلائية العمادية المتساقطة من عنق الرحم وخلايا جدار الرحم Endometrial cells.

تتساقط الخلايا الطلائية السطحية الحرشفية تحت تأثير هرمون الإستروجين بينما تتساقط الخلايا الطلائية المتوسطة الوسطية تحت تأثير كل من الإستروجين والبروجسترون. وفي الحالات التي يضعف بها كل من نشاط الإستروجين والبروجسترون تظهر الخلايا الطلائية فوق القاعدية بسبب ضمور في جدار الرحم. ومن هذه الحالات:

١ - عدم البلوغ.

٢ - فشل عمل المبيض Ovarian failure.

٣ - انقطاع الحيض (سن اليأس) Menopause.

يتم تقدير مؤشر النضج من خلال استخدام مسحات مهبلية يتم جمعها من جانبي المهبل لتحرى التغيرات الهرمونية ومع أنها قليلة الفائدة في تتبع التغيرات السرطانية لعنق الرحم لكنها تفيد في استدلالات وظائف المبيض والمشيمة. ولتحديد مؤشر النضج فإنه يتم صبغ المسحات الخلوية المهبلية بصبغة شور.

صبغة شور Shorr stain

تمتاز هذه الطريقة بأنها بسيطة وسريعة ويمكن بواسطتها التمييز بين أنواع الخلايا خاصة لدراسة تأثير الهرمونات على نضج الخلايا الطلائية المبطنة لجدار الرحم بسبب التمييز بين سيتوبلازم هذه الخلايا المختلفة ولكن لا تصبغ هذه الطريقة النواة بنفس الكفاءة لصبغ السيتوبلازم، لذا يفضل عدم استخدامها لتشخيص الخلايا السرطانية وإنما لدراسة مدى نضج هذه الخلايا من واقع تأثير الهرمونات الجنسية عليها.

المحاليل المستخدمة

محلول الصبغة

كحول إثيلي (٥٠٪) ..... ١٠٠ سم^{٣}

ببرخ سكارلت (من النوع المائي) ..... ٠,٥ جم

(Beibrich scarlet)

البرتقالي - ج ..... ٠٢٥ جم

أخضر السريع - ف س ف ..... ٠,٧٥ جم

حمض التنغستات الفسفوري ..... ٠,٥ جم

حمض المولبيديك الفسفوري ..... ٠,٥ جم

(Phosphomolybdic acid)

حمض الخليك الثلجي ..... ١ سم^{٣}

طريقة الصبغ

١ - ثبت المسحات الخلوية في مزيج من الكحول مع الأثير (١ : ١) لمدة دقيقتين.

٢ - ضع المسحات الخلوية في محلول صبغة شور لمدة دقيقتين.

٣ - إغمس المسحات الخلوية في كحول (٧٠٪) لإزالة الصبغة الزائدة.

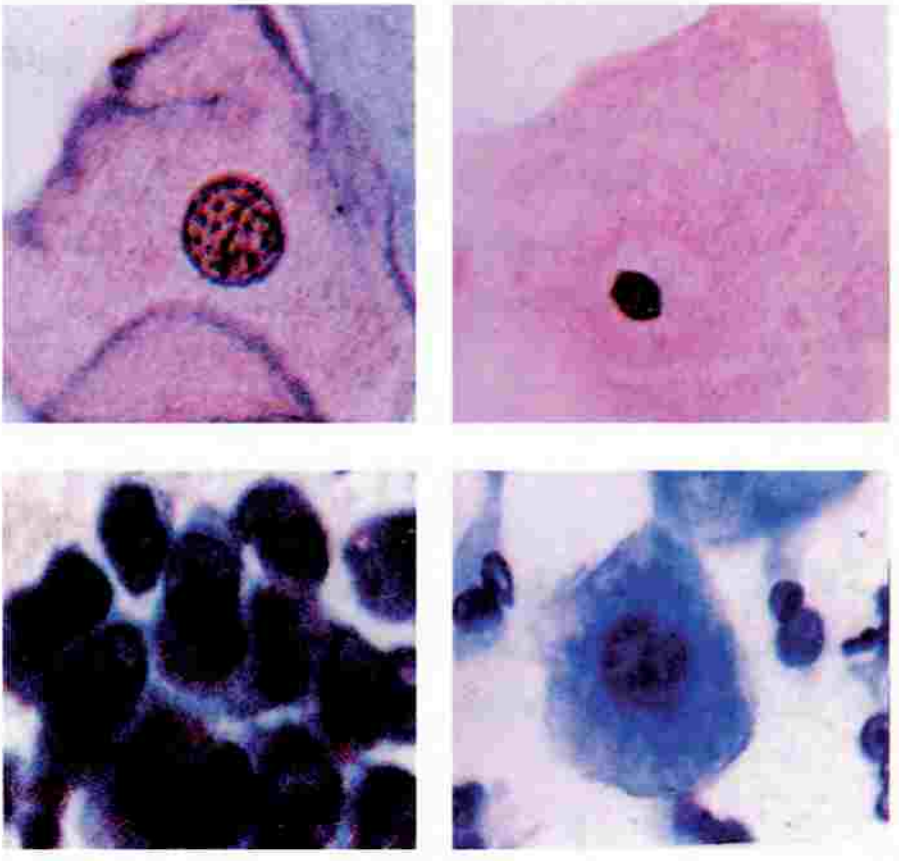
٤ - إغمس في كحول (٩٥٪) ثم كحول مطلق.

٥ - روق المسحات في الزايلين ثم غطها بالغطاء الزجاجي والمادة الطامرة الراتنجية.

النتائج

يصطبغ سيتوبلازم الخلايا الطلائية السطحية باللون اللامع إلى اللون الأحمر البرتقالي. أما الخلايا الطلائية المتوسطة وفوق القاعدية والقاعدية فإن سيتوبلازمها يأخذ اللون الأخضر المزرق، وتصطبغ أنوية هذه الخلايا مجتمعة باللون الأحمر (الشكل رقم ٨١).

هذا ولا تصلح المسحات الخلوية السميكة أو مسحات الخلايا الملتهبة والتي عليها أعراض التحلل السيتوبلازمي لحساب مؤشر النضج للخلايا الطلائية.



الشكل (٨١) صورة ضوئية لكل من

(أ) خلايا طلائية سطحية . (ب) خلايا طلائية وسطية .

(ج) خلايا طلائية فوق قاعدية . (د) خلايا جدار الرحم .

ويمكن تقسيم فترة الدورة الشهرية بالنسبة لنوعية الخلايا المتساقطة إلى ستة مراحل هي :

١ – مرحلة الحيض : Menstrual phase

معدل هذه الفترة هو خمسة أيام وتتصف المسحات المهبلية لهذه المرحلة بسيادة كريات الدم الحمراء وعدد من خلايا بطانة الرحم والخلايا النسيجية وكريات الدم البيضاء.

٢ – مرحلة النمو المبكر : Early proliferative phase

وهذه هي الفترة التي تعقب مرحلة الحيض وتبلغ ٢ - ٣ أيام تتصف بسيادة الخلايا النسيجية وكريات الدم البيضاء وربما يظهر عدد قليل من خلايا بطانة الرحم.

٣ – مرحلة النمو: Proliferative phase

وتشمل هذه المرحلة الفترة ما بين اليوم التاسع وحتى اليوم الرابع عشر من الدورة. وفي المسحات الخلوية لهذه الفترة يقل عدد الخلايا النسيجية وكريات الدم البيضاء وتظهر الطلائية الحرشفية بأعداد كبيرة تشكل حوالي ٥٠ - ٦٠٪ من الخلايا الكلية.

٤ – مرحلة الإباضة : Ovulatory phase

وهذه فترة قصيرة ما بين اليوم الخامس عشر واليوم السادس عشر من الدورة. وتسود بهذه المرحلة الخلايا الطلائية الحرشفية.

٥ – المرحلة الافرازية : Secretory phase

تشمل هذه المرحلة على الفترة ما بين اليوم السابع عشر وحتى اليوم الرابع والعشرين من الدورة. وتتصف هذه الفترة بإزدياد تدريجي لظهور الخلايا الطلائية الوسطية على حساب الخلايا الطلائية الحرشفية وظهور كريات الدم البيضاء.

٦ – مرحلة ما قبل الحيض : Pre-menstrual phase

تمتد هذه الفترة ما بين اليوم الخامس والعشرين من الدورة وحتى ما قبل الحيض تكون بها السيادة للخلايا الطلائية الوسطية وكريات الدم البيضاء.

وهنالك العديد من العوامل المؤثرة على تساقط خلايا المهبل منها :

- **العدوى** : تعمل العدوى البكتيرية أو بالمسوطة المهبلية *Trichomonas vaginalis* على إكساب الخلايا اللون الإيوسيني Eosinophilia كما تسبب الإصابة بعصيات دودرلين انكماش أنوية الخلايا المتوسطة مما يصعب معه التمييز بين الخلايا الطلائية السطحية والوسطية.

- **بطانة عنق الرحم**: وجود تفتت وانحلال في بطانة عنق الرحم أو وجود عيب خلقي فيه يزيد من نسبة الخلايا فوق القاعدية.

- **الاشعاع** : يعمل الإشعاع على زيادة تساقط الخلايا القاعدية حيث يقلل هذا من مقاومتها لحث الإستروجين.

- **زيادة تعاطي الفيتامينات** : يؤدي الإسراف في تعاطي كل من فتيامين أ و ج إلى زيادة طبقة الخلايا فوق القاعدية مما يؤدي إلى ما يعرف بالجنوح نحو اليمين أو الوسط Shift to right or to middle.

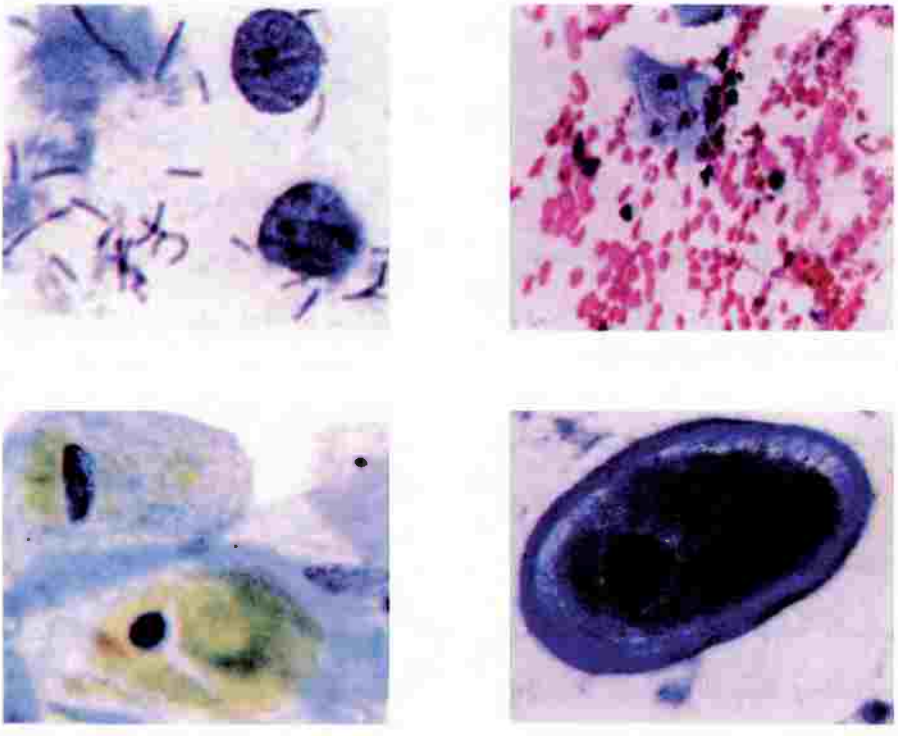
- **الحمل** : يعمل الحمل وتحت تأثير هرمون Chorionic gonadotropin من المشيمة والهرمونات الجنسية (الإستروجين والبروجسترون) من المبايض في زيادة سمك كل من طبقتي الخلايا الوسطية والقاعدية وتساقط الخلايا الطلائية الحرشفية للمهبل بأعداد قليلة ، لذلك تظهر في المسحات الخلوية حبيبات وترسبات بروتينية على المسحات الخلوية وحطام خلايا وإفرازات مهبلية. وكما تظهر الخلايا الوسطية على هيئة كتل تكون خلاياها ملتفة على بعضها البعض وتسود على غيرها من الخلايا ويصاحب ذلك ظهور عدد محدد من الخلايا الشبكية (النسيجية) Histiocytes بينما وجودها بأعداد كبيرة يكون بمثابة إنذار على احتمالية الإجهاض. وكما يزيد تحت وطأة الحمل عدد وحجم الخلايا فوق القاعدية ويشاهد في بعضها أكثر من نواة وتصبح كثيفة الكروماتين

وتكون أنويتها مركزية وغاية في الوضوح ويكون ظهورها بأعداد كبيرة مؤشر على وجود التهاب.

كما يعمل الحمل على تراكم الجلايكوجين في سيتوبلازم الخلايا فوق القاعدية والخلايا الوسطية ويظهر بعضها على هيئة قارب (زورق) وتعرف باسم الخلايا الزورقية Navicular cells . ولا يعني وجود هذا النوع من الخلايا في المسحات الخلوية المهبلية على الجزم بضرورة حدوث الحمل حيث تشاهد هذه الخلايا خلال فترة اليأس وانقطاع الطمث أو بسبب نقص الإستروجين أو زيادة البروجسترون. وتظهر هذه الخلايا بشكل غير متجانس ويكون سيتوبلازمها أخضر مزرق بالوسط وشديد الصبغ في الأطراف. كذلك تزيد نسبة مساحة النواة إلى السيتوبلازم وتصبح الأنوية غير مركزية دائرية بيضاوية وأحيانا تكون مستطيلة الشكل على هيئة السيجار.

– **الولادة** : يزداد تساقط الخلايا بعد الولادة مباشرة وتكون معظم الخلايا المتساقطة خلايا فوق قاعدية وخلايا زورقية. وكما يشاهد في المسحات المهبلية لفترة ما بعد الولادة كثير من خلايا كريات الدم الحمراء والبيضاء المتعادلة الشبكية. وبعد اليوم الخامس من الولادة يبدأ ظهور خلايا إيوسينية ويتناقص الجلايكوجين وتظهر فجوات في سيتوبلازم هذه الخلايا وتكون أنويتها غير مركزية ولا تلبث هذه الخلايا أن تعود تدريجيا إلى مظهرها الطبيعي بعد حوالي ٢٥ يوما من الوضع إلا إذا كان هنالك استمرار في رضاعة المولود.

– **الرضاعة** : تؤدي الرضاعة إلى ضمور في الطبقات المكونة لطلائية المهبل لذلك تظهر في المسحات الخلوية المهبلية خلال فترة الرضاعة الخلايا الطلائية فوق القاعدية والمتوسطة بأنوية دائرية أو بيضاوية يحتوي سيتوبلازمها على كمية



الشكل (٨٢). صورة فوتوغرافية توضح ارتباط نوع الخلايا المتساقطة مع عوامل أخرى.

(أ) فترة الحيض

(ب) العدوى الجرثومية

(ج) الحمل

(د) الرضاعة

كبيرة من الجلايكوجين وتكون أطراف هذه الخلايا سميكة (الشكل رقم ٨٢). ويستمر الوضع على حاله حتى بداية التبويض حيث يبدأ ظهور الخلايا الطلائية الحرشفية.

وتجدر الإشارة إلى أنه في حالة وفاة الجنين فإن المسحات الخلوية للمهبل تظهر ما يعرف بالجنوح نحو اليسار Shift to left ويستمر هذا التأثير خلال العشرة الأيام الأولى من بعد وفاة الجنين يتبعها بعد ذلك ظهور عدد كبير من الخلايا الطلائية السطحية ذات المظهر الايوسيني ويصاحب ذلك كثافة في كريات الدم الحمراء والكريات البيضاء ومخاط لكن بدون ظهور عصيات دودرلين.

ويمكن إجمال أنواع الخلايا في المسحات الخلوية للمهبل وعنق الرحم بالآتي:

١ - **خلايا طلائية حرشفية Squamous eptihelial cells**

وتكون هذه الخلايا على ثلاثة أشكال:

- خلايا طلائية سطحية.
- خلايا طلائية وسطية.
- خلايا جار القاعدية.

٢ - **خلايا طلائية عمادية Columnar epithelial cells**

تتساقط هذه الخلايا من عنق الرحم وهي نادرة في المسحات الخلوية الطبيعية كبيرة الحجم تحمل قممها أهداب وأنويتها كبيرة تلامس قواعدها. تشاهد هذه الخلايا في المسحات المهبلية في حالات مرضية متعددة منها:

- تآكل وتفتت بطانة الرحم.
- إلتهاب عنق الرحم Endocervicitis
- سليلات عنق الرحم Endocervical polyp

٣ - خلايا بطانة الرحم Endometrial cells

تشاهد خلايا بطانة الرحم في المسحات الخلوية التي يتم جمعها خلال فترة الطمث وتشاهد عادة على هيئة كتل خلوية وهي على نوعين: خلايا سداتية Stromal cells وخلايا غدية Glandular cells. وإذا ما ظهرت هذه الخلايا في المسحات التي تجمع بعد فترة الطمث فهي مؤشر على تغيرات مرضية قد يصل حتى احتمالية تغيرات سرطانية في جدار الرحم، لذلك فإن وجود هذه الخلايا في المسحات الخلوية بعد فترة الطمث من الدلالات الخطرة التي تستدعي متابعة وعمل فحوصات نسيجية لجدار الرحم من خلال عمل كشط لبطانة الرحم الداخلية Curettage.

٤ - خلايا غير طلائية Non-epithelial cells

وتشمل هذه الخلايا كل من كريات الدم الحمراء والبيضاء والخلايا النسيجية وخلايا البلازما والحيوانات المنوية.

وهنالك العديد من التغيرات المورفولوجية للخلايا الطلائية للمسحات الخلوية للمهبل أو عنق الرحم تعود لمسببات العدوى من بكتيريا وفيروسات وفطريات وطفيليات:

- البكتيريا مثل عصيات دودرلين (*Lactobacillus* sp.) وبكتيريا *Gardnerella vaginalis*.

- الفطريات مثل فطر القلاع *Monilia (Candida) albicans* وفطر Actinomyces. ويشاهد فطر القلاع في مسحات الافرازات المهبلية ومسحات البلغم خاصة عند الأشخاص الذين خضعوا لعلاج بالمضادات الحيوية.

- الطفيليات مثل المسوطات المهبلية *Trichomonas vagianlis*

- الفيروسات مثل فيروس الهيربس *Herpes simplex genitalis*

- وفيروس HPV المسبب لتغيرات بعض الخلايا الطلائية وفيروس Koilo المسبب لتغيرات خلوية فيروسية والفيروس البشري الثألولي Human papilloma virus.

تشتمل التغيرات المرضية (الشكل رقم ٨٣) على العديد من التغيرات المورفولوجية في الخلايا المتساقطة منها :

- تغيير في ترتيب الخلايا Cell arrangment.
- تغيير في شكل الخلايا.
- تغيرات في سيتوبلازم الخلايا المتساقطة.

- الاستحلال Degeneration . وهذا تغيير يعتبر كرد فعل للخلايا على مسببات مرضية. ويصبح سيتوبلازمها منتفخا ويحتوي على مادة لا توجد في الأصل أو بشكل قليل في الأحوال الاعتيادية وقد يكون الاستحلال بروتينيا Albuminous أو مائيا أو شحميا أو شفافا Hyaline كما في حالة الكبد المتشمع.

- نخر Necrosis وهي حالة على طريق هلاك الخلايا حيث ينتفخ السيتبولازم. وتبدأ النواة بزوال حبيباتها قبل انقباضها وانكماشها.

- تحلل السيتوبلازم Cytolysis الذي يظهر في بعض حالات الالتهابات وكذلك الحمل.

- اكتساب السيتوبلازم لون الإيوسين Eosinophilia .

- ظهور فجوات Vacuolation في السيتوبلازم.

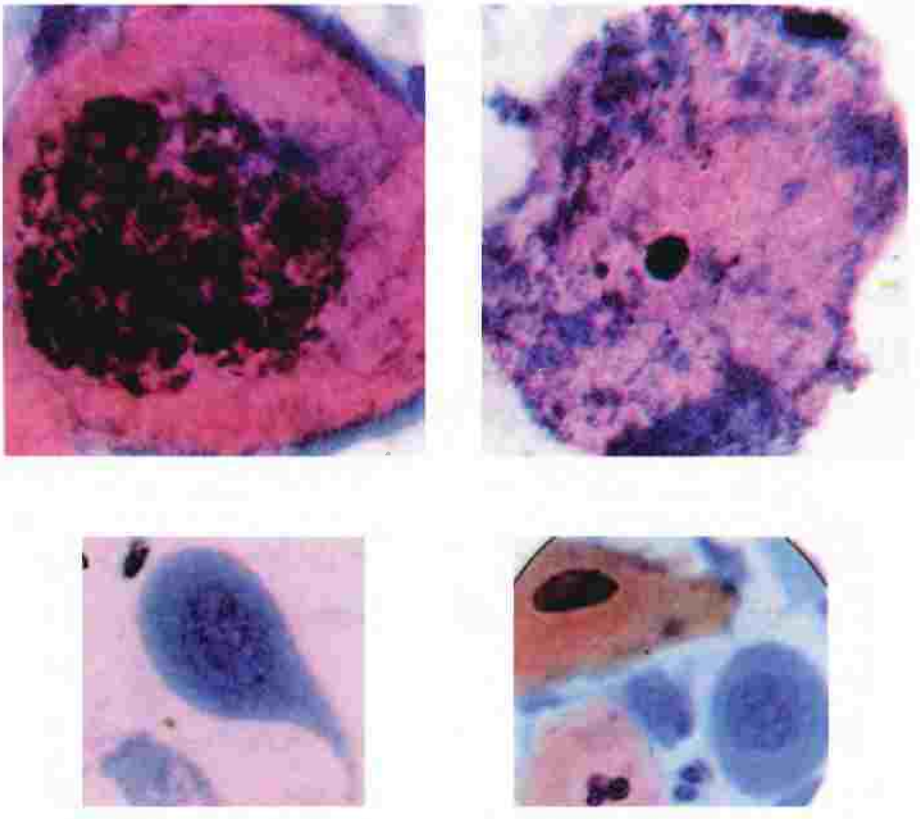
- تغيرات في أنوية الخلايا المتساقطة تشمل :

- انكماش النواة وتكثفها Karyopyknosis حيث تصبح النواة صغيرة ومنكمشة لفقدانها جزء من السائل النووي.

- تحلل النواة Karyolysis.

- تحطم النواة Karyorrhexis حيث تظهر النواة على هيئة قطع.

- عدم انتظام الغشاء النووي.



الشكل (٨٣). صورة ضوئية لبعض التغيرات المرضية في الخلايا المتساقطة.

أ – تغيرات إستحلالية ب ـ تحلل النواة

ج – خلية غير طبيعية د – خلايا حرشفية عمادية الشكل .

- تضخم وتكثف كروماتين النواة.
- تغير في شكل النواة.
- تضخم حجم النواة مقارنة مع حجم السيتوبلازم.
- ظهور النوية Nucleoli بشكل بارز.

ويمكن إجمال التغيرات المرضية التي تتساقط منها هذه الخلايا بالآتي :

- ضمور خلوي Epithelial atrophy وهو ضمور في حجم النسيج والعضو.
- توقف نمو النسيج Hypoplasia يؤدي إلى عدم تكامل الشكل.
- نمو مفرط للنسيج Hyperplasia.
- إستبدال النسيج بآخر Metaplasia وتظهر الخلايا المتساقطة جامعة بين صفات الخلايا الطلائية والخلايا العمادية.
- التغيرات الخلوية غير الطبيعية Atypia.
- نمو نسيجي غير طبيعي ما قبل سرطاني Dysplasia.
- تغيرات قبل سرطانية Dyskaryosis حيث تظهر بعض الصفات السرطانية بالخلية وليس جميعها.

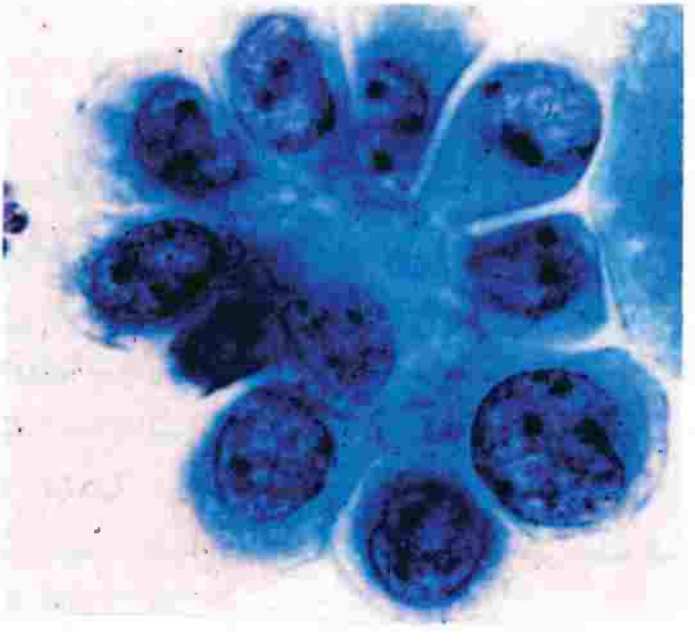
- **تغيرات سرطانية** : كان أول استخدام لمسحات الخلايا المتساقطة في المهبل لتشخيص السرطان عام ١٩٤٣م ثم انتشر استخدامها على نطاق واسع في تشخيص الآتي :

- السرطان الموضعي الغدي Adenocarcinoma (الشكل رقم ٨٤).
- الأورام السرطانية الإنبثاثية Tumour metastatic (الشكل رقم ٨٥).

وتشترك الخلايا السرطانية على اختلاف أنواعها بمظاهر خاصة - الأشكال ٨٦-٨٨) منها :

١ - تضخم حجم النواة وزيادة في نسبة حجم النواة إلى حجم السيتوبلازم Nucleocytoplasmic ratio

الشكل (٨٤). صورة ضوئية لسرطان غدي في خلايا متساقطة في السائل البلوري وأثبتت التحـــاليل أن مصدر هذه الخلايا الثدي.



الشكل (٨٥). صورة ضوئية لسرطان غدي في خلايا متساقطة في السائل البريتوني مصدرها البنكرياس.

٢ - تكثف الكروماتين مما يجعل أنوية هذه الخلايا تصطبغ بشكل أعمق مقارنة مع الخلايا الطبيعية.

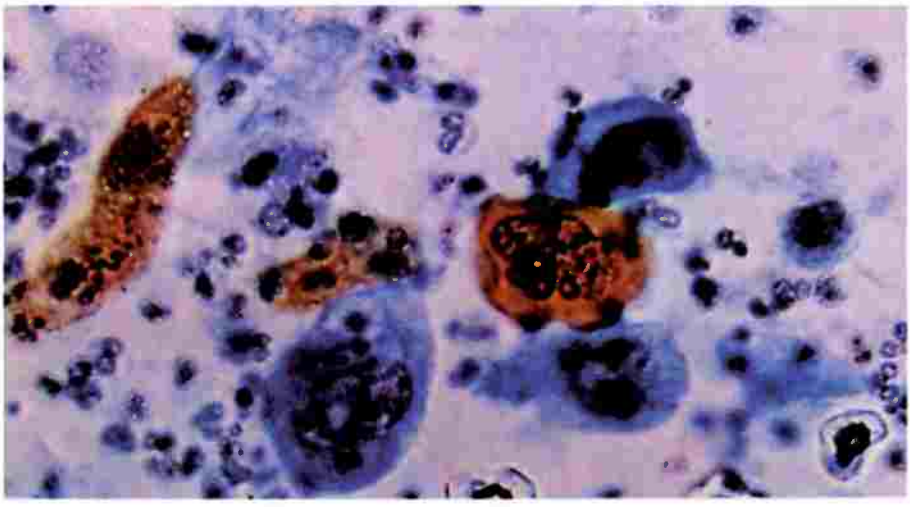
٣ - بروز النوية بشكل واضح.

٤ - عدم انتظام الغشاء النووي .

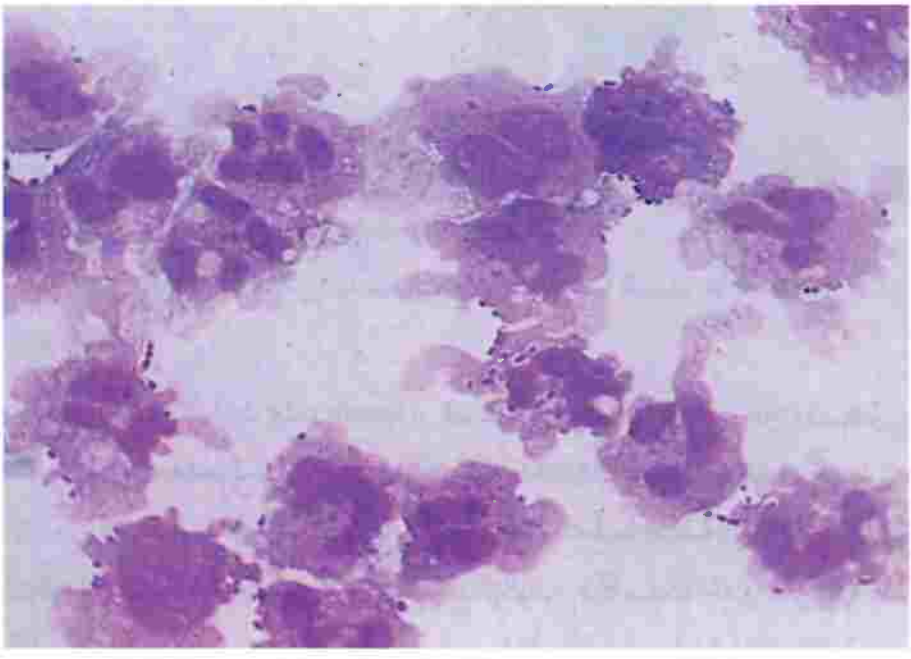
الشكل (٨٦): صورة ضوئية لسرطان متقرن من شفط إبري للكبد.

يطلق على الخلايا التي لأنويتها صفات سرطانية بينما السيتوبلازم طبيعي حالة Dyskaryosis.

تكون الالتهابات محدده Specific أو قد تكون غير محددة Non-specific وقد يحتوي النضح الخلوي Exudates على كريات الدم البيضاء والخلايا النسيجية Histiocytes إضافة إلى عدد من كريات الدم الحمراء والفايبرين ومخلفات خلايا محطمة إضافة إلى أن نوع الخلايا المتواجدة في المسحة الخلوية يعطي فكرة عن موقع الإلتهاب. فإذا سادت الخلايا الحرشفية كان ذلك مؤشراً على التهاب بطانة المهبل أو عنق الرحم الخارجي بينما مشاهدة خلايا بطانة الرحم يدل على وجود التهاب في جدار الرحم Endometritis وأن وجود خلايا عمادية مهدبة يدل على التهاب في داخل عنق الرحم Endocervicitis.



الشكل (٨٧) . صورة ضوئية لسرطان متقرن من إفرازات مهبلية.



الشكل (٨٨). صورة ضوئية تظهر خلايا الدم البيضاء من عينة للسائل النخاعي الشوكي وتظهر الخلايا الالتهابية ملتهمة بعض البكتريا الممرضة.

المسحات الخلوية للبلغم

يشاهد في المسحات الخلوية للبلغم عدة أنواع من الخلايا منها :

١ – الخلايا العمادية Columnar cells

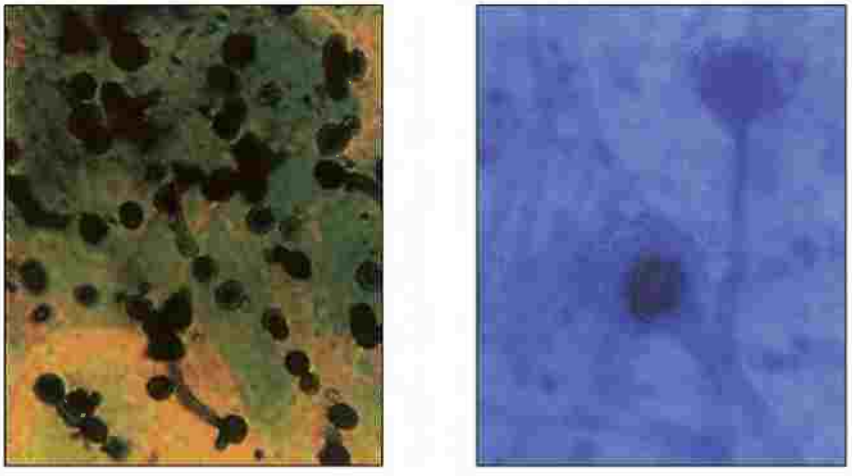
يمكن مشاهدة نوعين من الخلايا العمادية في مسحات البلغم وهي خلايا عمادية مهدبة وخلايا عمادية مفرزة للمخاط Mucous-secreting columnar cells وتشاهد الخلايا العمادية إما مفردة أو مرتبة في صف من الخلايا.

٢ – الخلايا النسيجية Histiocytes

تشاهد هذه الخلايا في مسحات البلغم وأحيانا تحتوي على جسيمات كربون في سيتوبلازمها.

٣ – كريات الدم البيضاء Leucocytes

تشاهد هذه الخلايا في مسحات البلغم كدلالة على وجود التهاب في المجرى التنفسي وكما يشاهد أحيانا عدد من الخلايا اللمفاوية والخلايا المحبة للإيوسين. كما يشاهد في مسحات البلغم محتويات غير خلوية كالمخاط Mucous حيث في بعض الأحيان يكون على هيئة شريط مخاطي يعرف بشريط كيرشمان Curshmana`s spiral ويظهر عادة في بلغم مرضى الربو والالتهاب المزمن للجهاز التنفسي. كما تحتوي مسحات البلغم على مسببات العدوى من بكتيريا وفطريات مثل فطر القلاع والأسبرجلس (الشكل رقم ٨٩) وإلى بقايا طعام Contaminants على الأغلب تكون من أصول نباتية.



الشكل (٨٩). صورة ضوئية تظهر فطر الأسبرجلس من عينة غسيل القصبة الهوائية .

الكشف عن الأجسام الأسبستوزية في البلغم

للكشف عن الأجسام الأسبستوزية Asbestos bodies فإنه يفضل استخدام مهضوم البلغم Sputum digest أو مهضوم خزعة رئوية. ويتم ذلك من خلال استخدام الكلوراكس Clorax (هيبوكلوريت الصوديوم) ٥,٢٥٪.

- يضاف إلى عينة البلغم أو الخزعة النسيجية من الرئة بعد وزنها وتقطيعها إلى أجزاء صغيرة بمعدل ٢٠٠ سم^{٣} من الكلوراكس إلى ٥ جم من العينة.

- تترك العينة حتى تهضم بالكامل وقد يلزم ذلك ما بين ٢٤ - ٧٢ ساعة حسب حالة الخزعة النسيجية مع الحرص على التحريك خلال هذه الفترة أما هضم البلغم فإنه يتم بعد فترة قصيرة خلال دقائق ويمكن ترك عينة البلغم عدة ساعات لهضم جميع ما تحتويه العينة من خلايا وألياف وخلاف ذلك.

- يتم طرح الرائق ببطء وهدوء دون فقدان أي جزء من الراسب.

- يضاف إلى الراسب ٢٠ سم^{٣} من الكلوروفورم ويحرك جيداً ثم يضاف بعد ذلك كمية من الكحول الإثيلي (٥٠٪).

- ترج العينة عدة مرات من أجل تعليق جميع الراسب.

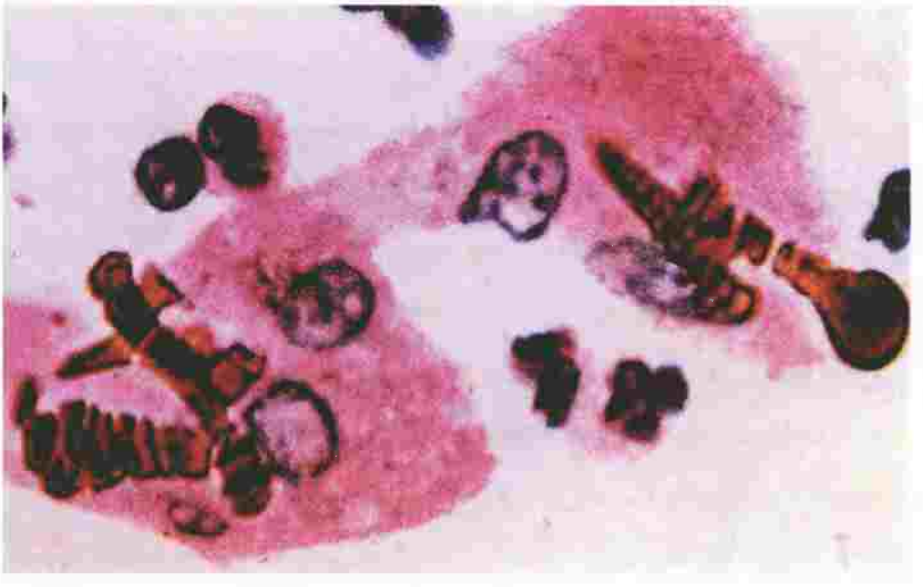
- يعمل طرد مركزي عند سرعة ٦٠٠ - ٨٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ١٠ دقائق.

- بعد الانتهاء من الطرد المركزي تظهر ٣ طبقات على النحو التالي:

الطبقة العلوية : الكحول الاثيلي.

الطبقة الوسطى: سوداء تتكون من جسيمات كربونية وقطرانية قد يحتويه البلغم أو الخزعة النسيجية.

الطبقة السفلى : كلوروفورم



الشكل (٩٠). صورة ضوئية تظهر أجسام أسبستوزية لمسحة خلوية لعينة بلغم.

- يطرح الرائق ثم تكرر الخطوة بإضافة الكلورفورم وكحول اثيلي والطرد المركزي.

- يعاد تعليق الراسب بواسطة قطرة من كحول إثيلي (٩٥٪)

- تعمل مسحات خلوية من الراسب (الشكل رقم ٩٠).

دراسة الطراز النووي

للتقنيات المستخدمة لدراسة الطراز النووي Karyotype أهمية كبيرة خاصة في دراسة الشذوذ الكروموسومي والتطور الجنيني والتغييرات التي يمكن أن تطرأ على تركيب هذه الكروموسومات والتي ربما تشير إلى تغيير جيني قد يكون مرتبطا بالإصابة ببعض الأمراض . كذلك يستفاد من دراسات الطراز النووي في تحديد عدد الكرموسومات لغرض تصنيف الكائنات الحية .

تتم دراسة الطراز النووي في عدة مراحل تكون بدايتها الحصول على خزعة نسيجية صغيرة من نخاع العظم أو الجلد أو المشيمة أو من النسيج المبتور في عملية الطهور Circumcision وكما يمكن استخدام خلايا الدم والسائل الأمنوسي لذات الغرض . يلي ذلك إكثار هذه الخلايا بواسطة المزارع الخلوية إذا لزم الأمر ومن ثم معاملتها بالكولشسين Colchicine أو أحد مركباته الذي يؤدي إلى إيقاف التكاثر الميتوزي في الطور الوسطى Metaphase من الانقسام . يتم بعد ذلك معاملة الخلايا بواسطة محلول منخفض الضغط الأسموزي ليعمل على انتفاخ الخلايا وتفجرها ومن ثم خروج الكروموسومات منها ومن ثم صبغها بأحد الصبغات المناسبة مثل صبغة كيمزا . وتستخدم الأمور التالية في التفريق بين الكروموسومات إلى أزواج متماثلة حسب الحجم وموقع السنترومير :

- موقع السنترومير (مكان ارتباط كروماتيدي الكروموسوم) .

- طول الكروماتيد .

- الفوراق في G-Banding في الكروماتيدات التي تظهر بعد صبغة كيمزا حيث تعمل هذه الصبغة على صبغ أجزاء من الكروموسومات دون غيرها حيث تظهر بشكل داكن ويطلق عليها G-bands . وفيما يلي مراحل دراسة الطراز النووي لخلايا الدم :

مرحلة تحضير الكروموسومات

يتم تحضير الكروموسومات تبعا للخطوات التالية :

١ ـ يضاف ٤.٣ قطرات من الدم إلى أنابيب مزارع خلوية يحتوي كل منها على ٥ سم^{٣} من بيئة PHA-PRM-1640 عند حرارة الغرفة ، ثم تخلط محتويات كل أنبوب عن طريق التقليب .

٢ ـ يتم حضن الأنابيب عند حرارة ٣٧ م وثاني أكسيد الكربون (٥ ٪) لمدة ٧٢ ساعة بحيث تكون الأنابيب غير محكمة الإغلاق مع ملاحظة تقليب محتويات الأنابيب كل ٢٤ ساعة .

٣ ـ يضاف إلى كل أنبوب ٢ سم^{٣} من مركب Colecimid ثم تعاد إلى الحاضن مرة أخرى ولمدة ساعتين .

٤ ـ تنبذ الأنابيب عن طريق الطرد المركزي لمدة ١٠ دقائق عند سرعة ألف دورة/دقيقة .

٥ ـ يزال الجزء الرائق بواسطة مضخة تفريغ ويضاف بعدها إلى كل أنبوب ٥ سم^{٣} من محلول منخفض الضغط الأسموزي (٠,٧٥ جزيئي كلوريد الكالسيوم) ثم تحضن الأنابيب عند حرارة ٣٧ م وثاني أكسيد الكربون (٥ ٪) لمدة ١٠ دقائق.

٦ ـ تنبذ الأنابيب بواسطة الطرد المركزي لمدة ١٠ دقائق وعند سرعة ألف دورة/دقيقة ويزال بعدها الجزء الرائق بواسطة مضخة تفريغ .

٧ - يضاف إلى كل أنبوب ٥ سم٣ من المثبت (٧,٥ سم٣ من حمض الخليك + ٢٢,٥ سم٣ ميثانول) ثم تحضن الأنابيب عند حرارة ٣٧ م وثاني أكسيد الكربون (٥ ٪) لمدة ٢٠ دقيقة .

٨ - يتم تعليق محتوى كل أنبوب باستخدام ماصة باستور ثم تنبذ محتويات الأنابيب عند سرعة ألف دورة/دقيقة . يزال الرائق من كل أنبوب بواسطة مضخة تفريغ ثم يضاف إلى كل أنبوب ٥ سم٣ من المثبت إلى الراسب . تعلق محتويات الأنابيب وتحضن لمدة ٢٠ دقيقة عند حرارة ٣٧ م وثاني أكسيد الكربون (٥ ٪) .

٩ - تنبذ محتويات الأنابيب بالطرد المركزي ويزال الجزء الرائق ، ثم يضاف إلى الراسب قليل من المثبت ويتم تعليق الخلايا وتحفظ في الثلاجة عند ٤ م لاستخدامها بالمرحلة التالية :

مرحلة صبغ الكروموسومات

١ - تؤخذ قطرة من معلق الخلايا الناتج من الخطوة التاسعة من المرحلة السابقة.

٢ - تغطى المسحة الخلوية بواسطة صبغة كيمزا لمدة ٢٠ دقيقة .

٣ - تغسل المسحات بواسطة الماء المقطر ثم تجفف وتغطى بمادة طامرة راتنجية.

٤- تفحص الكروموسومات المصبوغة بالعدسة الزيتية لمجهر ضوئي مزود بكمرة تصوير .

مرحلة تحديد G-Banding

١ - يتم إزالة الصبغة من خلال غمس المسحات الخلوية لمدة ١٠ دقائق في كحول إثيلي (٩٥٪) .

٢ ـ تنقل الشرائح إلى محلول منظم الفوسفات عند حرارة ٥٦ م لمدة ١٠ دقائق.

٣ ـ تغمس المسحات لمدة ١٥ دقيقة في المحلول المحضر من الآتي :

محلول التربسين (٢٥ ٪)	٠,٢٢ سم٣
ميثانول	٢,٧ سم٣
صبغة كيمزا	٠,٢٢ سم٣
منظم الفوسفات (الرقم الهيدروجيني = ٧,٤)	٦,٥ سم٣

٤ ـ تغمس الشرائح بالماء المقطر ثم تجفف وتفحص تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي المركب ويتم تحليل الكروموسومات بحسب كل من الآتي :

١- قياس طول كل كروموسوم.

٢- حساب نسبة طول الذراع الأطول إلى طول الذراع الأصغر.

٣- حساب طول الذراع الأصغر إلى الطول الكلي للكروموسوم.

وكما يمكن تحضير الطراز النووي من نخاع العظم حسب الخطوات التالية :

١- حقن الحيوان (فأر ، جرذ ،....ألخ) بالكولشسين في تجويف البطن (٤ملغم/كغم)، وذلك قبل قتل الحيوان بأربع ساعات.

٢- تؤخذ عظمة الفخذ Femur وتنظف من الأنسجة المحيطة بها وتقطع من طرفها وتحقن بحوالي ٣-٤ سم٣ من المحلول الفسيولوجي في أحد طرفي العظمة ثم ينبذ الخليط عند سرعة ألف دورة/دقيقة لمدة ٥ دقائق.

٣- تعلق الخلايا في ٣سم٣ من محلول منخفض الضغط الأسموزي وتحضن عند حرارة ٣٧م لمدة ١٠-١٥ دقيقة.

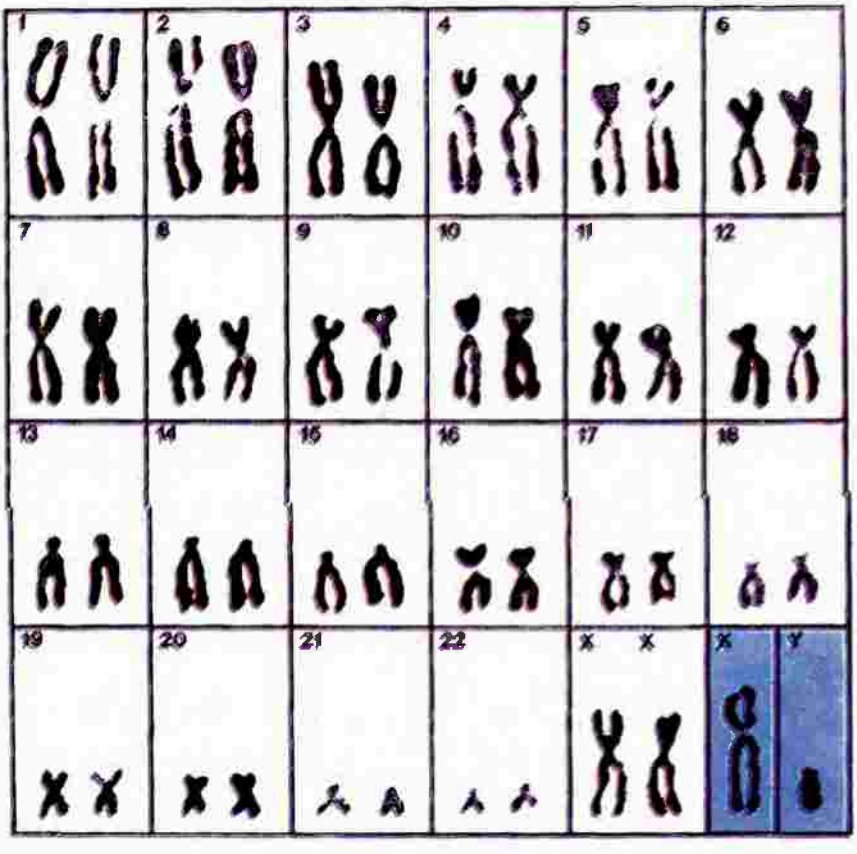
٤- تنبذ الخلايا لمدة ٥ دقائق عند سرعة ألف دورة/دقيقة ثم يضاف على الخلايا المترسبة ٢-٣سم٣ من محلول التثبيت المكون من حمض الخليك الثلجي وميثانول (١ : ٣) لمدة ١٠ دقائق عند حرارة الغرفة.

٥- تكرر الخطوة السابقة مرتين

٦- تعمل مسحات خلوية من الخلايا المترسبة ثم تجفف.

٧- تصبغ المسحات وتترك لتجف ثم تغطى بمادة طامرة راتنجية والغطاء الزجاجي.

٨- تفحص الكروموسومات (الشكل رقم ٩١) وتصور وتحلل للقياسات التي سبق ذكرها.



الشكل (٩١). صورة فوتوغرافية للطراز النووي للإنسان .

الكشف عن حمض الهيالورونيك في السائل المصلي

يمكن الكشف عن حمض الهيالورونيك Hyaluronic acid في السائل المصليSerous fluid تبعا للخطوات التالية :-

١ - يضاف ٥ سم^{٣} من السائل المصلي إلى ١٢,٥ سم^{٣} من ماء مقطر.

٢ - يضاف إلى الخليط ٠,٠٧ من حمض الخليك الثلجي (٥٠٪) تظهر بعده عكارة كثيفة مباشرة إذا كان السائل يحتوي على حمض الهيالورونيك.

٣ - أدخل في الخليط عود خشبي ثم إسحبه ببطء فإذا حمل العود الخشبي معه تعلق أو تجلط فهذا يؤكد وجود حمض الهيالورونيك.

٤ - لمزيد من التأكد على النتيجة يتم إضافة قليل من إنزيم الهيالورونداز Hyaluronidase إلى الخليط ويحضن لمدة نصف ساعة عند حرارة ٣٧ م.

٥ - يعاد غمس عود خشبي في الخليط ويسحب ببطء. إن اختفاء التعلق أو التجلط الذي ظهر في الخطوة الثالثة يؤكد بأن التجلط كان بسبب احتواء السائل على حمض الهيالورونيك.

تحضير القالب الخلوي

في حالة توفر راسب كبير للعينة بعد عمل عدد من المسحات الخلوية منها فإنه يمكن عمل قالب خلوي Cell block منها تبعا للخطوات التالية :

١ - يضاف ٣ - ٤ قطرات من البلازما إلى الراسب الخلوي.

٢ - يضاف ٣ - ٤ قطرات من محلول الثرومبين Thrombin (يحضر من ٥٠٠ وحدة من الثرومبين في ١٠ سم^{٣} من ماء مقطر) إلى الخليط ويحرك جيدا.

٣ - يترك الخليط عدة ثواني حتى يتجلط.

٤ - تضاف عدة قطرات من الفورمالين الوردي (١٠٪) Pink formalin إلى الكتلة الخلوية المتجلطة ويترك لمدة نصف ساعة لإتمام عملية التثبيت.

٥ - يعامل المتجلط بنفس الخطوات لتحضير القطاعات البرافينية من الخزعة النسيجية.

يساعد الفورمالين الوردي في إظهار القالب الخلوي حتى يسهل التعامل معه خاصة أثناء تحضير القطاعات البرافينية من القالب الشمعي. ويحضر الفورمالين الوردي من خلال إضافة عدة قطرات من الإيوسين إلى مثبت الفورمالين (١٠٪) المستخدم في تثبيت القالب الخلوي. هذا ولا يوثر الإيوسين على تراكيب الخلايا بعد صبغ قطاعات القالب الخلوي.

كما يمكن تحضير مسحة خلوية رطبة Wet film تبعا للخطوات التالية :

١ - تؤخذ قطرة من راسب العينة بعد نبذها مركزيا بواسطة إبرة تلقيح وتنقل إلى وسط شريحة زجاجية نظيفة.

٢ - توضع قطرة من محلول أزرق التوليدين بجانب القطرة السابقة.

٣ - تخلط القطرتين بواسطة إبرة التلقيح ثم تغطى مباشرة بواسطة الغطاء الزجاجي.

٤ - تفحص المسحة الخلوية مباشرة بواسطة المجهر

ويحضر محلول أزرق التوليدين المستخدم مما يلي :

أزرق التوليدين ..... ٠,٥ جم

كحول إثيلي (٩٥٪)..... ٢٠ سم^{٣}

ماء مقطر ..... ٨٠ سم^{٣}

وفي نهاية هذا الباب لا بد من توضيح بعض المتاعب التي يجب التنبه لها في التعامل مع المسحات الخلوية والتي من شأنها جعل التشخيص في غاية الصعوبة.

١ - تشويه الخلايا بسبب جفاف المسحات الخلوية قبل تثبيتها وهذا من شأنه أن يظهر الخلايا بشكل غير واضح إضافة إلى اصطباغ السيتوبلازم بالإيوسين وزيادة حجم النواة عن الحجم الطبيعي.

٢ - تلوث المسحات بمواد غريبة قد تكون خارجية أو داخلية المصدر مثل تلوث الخلايا بجسيمات بودرة الكفوف أثناء أخذ مسحات المهبل أو عنق الرحم. وكما قد تتلوث المسحات الخلوية من مصدر داخلي كحالة إحداث جرح أثناء تحضير المسحات وهذا من شأنه إدخال عوامل أخرى مثل كريات الدم الحمراء إلى المسحات.

٣ - وجود الطافيات Floaters على المسحات الخلوية وهي عبارة عن مكونات خلوية تنتقل من شريحة إلى أخرى أثناء عملية التثبيت أو الصبغ. ويكون الأمر غاية في الخطورة عندما تكون هذه الطافيات ذات طبيعة سرطانية.