صبغ القطاعات النسيجية

لا يمكن صبغ القطاعات البرافينية قبل إزالة الشمع Deparaffinization منها وذلك من خلال امرار القطاعات في الزايلين ثم في تراكيز الكحول التنازلية (كحول مطلق ، ٩٥٪ ، ٩٠٪ ، ٨٠٪ ، ٧٠٪ ، ٥٠٪) وحتى الماء المقطر. وهنالك عدة طرق لصبغ القطاعات النسيجية أشهرها الآتي:

١ - **الصبغ التدريجي**: يتم الصبغ التدريجي Progressive staining من خلال صبغ مكونات الأنسجة وخلاياها خطوة خطوة فمثلاً يتم صبغ الأنوية ثم بعدها السيتوبلازم أو العكس.

٢ - **الصبغ التراجعي**: في الصبغ التراجعي Regressive staining حيث تصبغ كامل محتويات النسيج ثم تزال الصبغة الزائدة بالتدريج باستخدام محاليل التمييز.

٣ - **الصبغ المباشر** : تتلون في الصبغ المباشر Direct staining أجزاء النسيج دفعة واحدة باستخدام محلول واحد مثل أزرق التولئدين.

٤ – **الصبغ غير المباشر**: يلزم في الصبغ غير المباشر Indirect staining استخدام أحد مثبتات اللون مثل شبة الحديد أو شبة البوتاسيوم وأحياناً بعض العناصر المعدنية المتأينة مثل أيونات الزئبق.

٥ – **الصبغ الحيوي**: يراد بالصبغ الحيوي Vital staining إظهار بعض العضيات أو المكونات الخلوية والنسيجية دون التسبب بموتها. ويتم ذلك بحقن تراكيز مخففة للغاية من محلول الصبغ داخل الكائن الحي أو بواسطة عزل الخلايا الحية ووضعها في محلول الصبغة كما هو الحال في الصبغ الحيوي للحيوانات المنوية. من الأصباغ المستخدمة صبغة أحمر الزرين، وأحمر كونغو، وأزرق المثيلين، والأزرق النيلي حيث يستخدم محلول رنجر Ringer`s solution كوسط مذيب.

ويمكن إجمال الصبغات المستخدمة في مختبرات الأنسجة إلى مجموعتين:

(أ) **صبغات روتينية Routine stains** : وهي مجموعات الصبغات التي يتم استخدامها لتحديد التركيب النسيجي العام من حيث أنواع الأنسجة والخلايا والألياف والمكونات النسيجية الأخرى.

(ب) **صبغات خاصة Special stains** : وهذه مجموعة من الصبغات التي يتم استخدامها في حالات معينة لحاجة تشخيصية معينة تكشف عن بعض محتويات الخلايا والأنسجة كالدهون والجلايكوجين والإنزيمات (جدول رقم ٥).

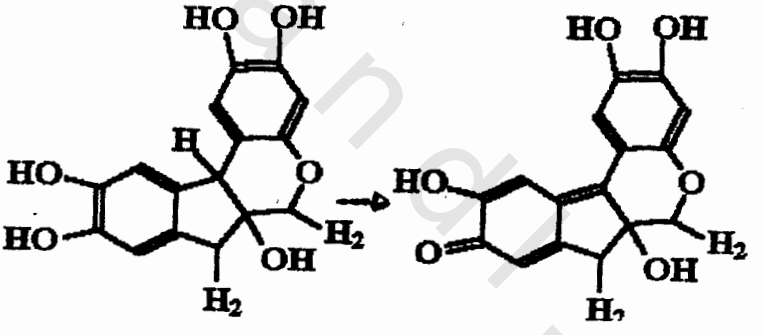
وتشتمل مجموعات الصبغات الروتينية المستخدمة في مختبرات الأنسجة على العديد من الصبغات تأتي في مقدمتها صبغة الهيماتوكسلين والإيوسين.

صبغة الهيماتوكسلين والإيوسين

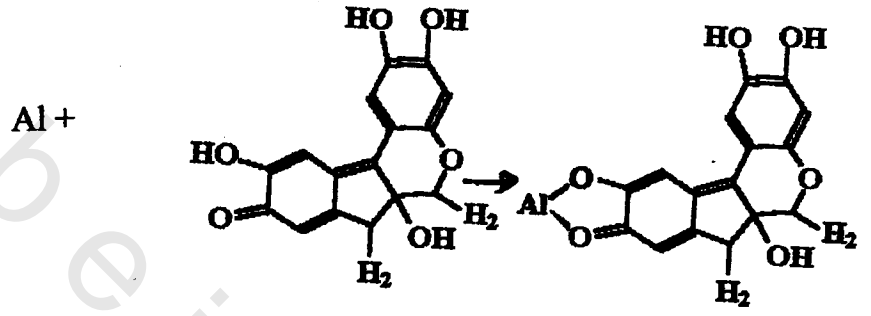
يحصل على الهيماتوكسلين Haematoxylin من خشب شجرة *Haematoxylon campechianum* المنتشرة في كل من أمريكا الوسطى والجنوبية.

الهيماتوكسلين

يستخدم الهيماتوكسلين لصبغ أنوية الخلايا والألياف المرنة والفايبرين، والخلايا العصبية الساندة Neuroglia والتخطيط العضلي. تجب الإشارة إلى أنه لاستخدام الهيماتوكسلين يجب أولاً تحويله إلى هيماتين عن طريق أكسدته بواسطة الأكسجين أو يودات الصوديوم $NaIO_3$ كما يجب أن يضاف إلى محلول الهيماتين أحد مثبات اللون Mordant مثل أملاح الألمنيوم أو الحديد أو التنغستون. والهيماتين هو المستخدم في الصبغ وليس الهيماتوكسلين ولكن الهيماتبن لا يصبغ الأنوية بدون مثبت اللون. وتوضح المعادلة التالية تحول الهيماتوكسلين إلى هيماتين:



هنالك نوعان من الشبة Alum يمكن استخدامها مع الهيماتوكسلين هما كبريتات الألمنيوم البوتاسية وكبريتات الألمنيوم الأمونية ، وفي كلا النوعين الألمنيوم هو العنصر الفعال حيث يعمل كمثبت اللون من خلال تفاعل الألمنيوم مع الهيماتين ليكون ما يعرف بهيماتين الألمنيوم كما توضح المعادلة التالية:

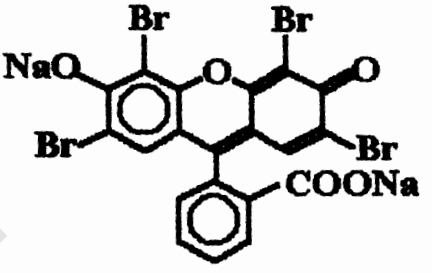


وخلال الصبغ فإن الألمنيوم يرتبط مع مجموعات الفوسفات في الحموض النووية بالنواة. والألمنيوم عبارة عن رابطة وسطية بين الهيماتين ومجموعات الفوسفات بالنسيج وبين الكروماتين والصبغة.

كذلك يمكن استخدام أملاح الحديديك كمثبتات اللون عند استخدام الهيماتوكسلين في صبغ الأنوية، إضافة إلى استخدام التنغستون مع هيماتوكسلين في صبغة PTAH المستخدمة لصبغ بعض تراكيب الدماغ وإظهار تخطيط العضلات.

الإيوسين

يختلف نوع الإيوسين المستخدم مع صبغة الهيماتوكسلين فهناك نوع Eosin Y ؛ حيث يصبغ السيتوبلازم والألياف العضلية بلون وردي غامق، بينما تصبغ الغضاريف بلون وردي شاحب، أما كريات الدم الحمراء والحبيبات المحبة للإيوسين في كريات الدم البيضاء الحمضية فإنها تصبغ بلون وردي فاتح.



التركيب البنائي للإيوسين

ويمكن استخدام محاليل مائية أو كحولية من الإيوسين. وتحضر محاليل الإيوسين المائية عند تركيز ١ - ٢٪ بالماء العادي ولا يجبذ استخدام الماء المقطر حيث أن الماء العادي يحتوي على أملاح الكالسيوم مما يجعلها قاعدية بعض الشيء. وعادة مدة الصبغ في محلول الإيوسين المائي ١ - ٣ دقائق تغسل بعدها القطاعات بالماء العادي. ويحضر محلول الإيوسين الكحولي عند تركيز ٠,٥ - ١٪ في كحول اثيلي يتراوح تركيزه ما بين ٦٠ - ١٠٠٪ ويفضل استخدام كحول إثيلي ٩٥٪ وتكون مدة الصبغ ١ - ٢ دقيقة ثم تغسل القطاعات في كحول ٩٥٪ لمدة ١ - ٥ دقائق لإزالة الصبغة الزائدة.

وتجدر الإشارة إلى أن هنالك العديد من المختبرات التي تضيف حمض الخليك الثلجي بمعدل عدة قطرات لكل لتر من محلول الإيوسين سواء كان المحلول مائياً أو كحولياً. إن إضافة حمض الخليك الثلجي من شأنه أن يزيد من تأين المجموعات الأمينية في الأنسجة ومن ثم يزيد ارتباط الإيوسين بالنسيج ومن ثم تغميق الصبغ. وكما أنه لا بد من التنبيه إلى أن زيادة حمض الخليك لها نتائج سلبية للغاية خاصة الحد

من عملية التمييز أثناء الصبغ مما يجعل اللون فاقع والتأثير على صبغ النواة بالهيماتوكسلين. كذلك لا بد من الإشارة إلى أن بعض المختبرات تلجأ إلى إضافة كمية قليلة من مادة (فلوكسين - ب) Phloxine- B إلى الإيوسين الكحولي المحضر من (إيوسين - واي) Eosin Y. وكما يجب أن لا يغيب عن البال تأثير التثبيت على نتائج الصبغ بالإيوسين فالتثبيت الضعيف وغير الكافي من شأنه أن يسبب متاعب عدة في الصبغ بالإيوسين.

المحاليل المستخدمة

محلول هيماتوكسلين ماير Mayer`s haematoxylin

أضف إلى ٧٥٠سم^3 ماء مقطر كل من الأتي :

كبريتات البوتاسيوم الألمونية $[KAl(SO_4)_2.12H_2O]$ ..... ٥٠ جم
Aluminium potassium sulphate

هيماتوكسلين ..... ١ جم

يودات الصوديوم..... ٠,٢جم
(Sodium iodate)

حمض الستريك أحادي التميء . ..... ١ جم

هيدرات الكلورال..... ٥٠ جم

أكمل الحجم بالماء المقطر حتى ١٠٠٠سم^3. ويبقى هذا المحلول صالحاً للاستخدام لمدة عام.

محلول الإيوسين Eosin

إيوسين ٢,٥جم

ماء مقطر ..... ٥٠٠سم^3

يضاف إلى هذا المحلول عدة بلورات من الفينول لمنع نمو الفطريات بها.

ويمكن تحضير محلول إيوسين كحولي من الآتي :

إيوسين .... ١ جم

كحول اثيلي ٩٥٪.. ٥٠٠ سم^{٣}

محلول سكوت Scott`s tap water

بيكربونات الصوديوم .... ٣,٥ جم

كبريتات المغنيسيوم .... ٢٠ جم

ماء عادي .... لتر واحد

يضاف إلى هذا المحلول عدة بلورات من الثايمول.

خطوات العمل :

١- ازل الشمع من القطاعات من خلال امرارها بتراكيز الكحول التنازلية حتى الماء المقطر.

٢- اصبغ القطاعات في محلول هيماتوكسلين ماير لمدة ٥ - ١٥ دقيقة.

٣- اغسل القطاعات بالماء الجاري لمدة دقيقتين.

٤- ازل الزائد من الصبغة من خلال وضع القطاعات في محلول حمض الهيدروكلوريك (٠,٢٥٪) لمدة ١ - ٥ ثواني.

٥- انقل القطاعات مباشرة إلى الماء الجاري لمدة ٣ - ٥ دقائق حتى تزرق القطاعات. ولتوفير المياه المستهلكة فإنه يمكن الاستعاضة عن ذلك من خلال غمس القطاعات في ماء قاعدي والمعروف بمحلول سكوت لمدة ٣٠ - ٤٠ ثانية لتزريق الهيماتوكسلين.

٦- اغمس القطاعات بالماء الجاري لمدة دقيقتين.

obeikandi.com

٧- انقل القطاعات إلى محلول الإيوسين لمدة ٣٠ - ٦٠ ثانية.

٨- اغمس بالماء المقطر لمدة ٣٠ ثانية.

٩- انزع الماء من القطاعات بامرارها في تراكيز الكحول التصاعدية حتى الكحول المطلق. وفي حالة استخدام إيوسين كحولي فإنه يجب نقل القطاعات من محلول الإيوسين إلى كحول إثيلي ٩٥٪ ثم بعدها تمرر بتبديلين من الكحول المطلق.

١٠- روق القطاعات بالزايلين ثم غطها بأحد المواد الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجـــة

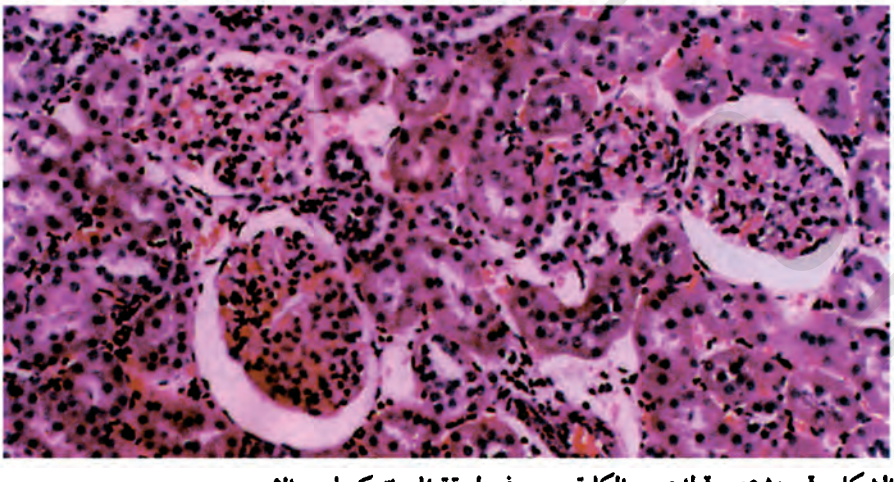
الأنوية..... زرقاء

السيتوبلازم ..... أحمر

الألياف الغروية..... حمراء

الكراتين ..... أحمر

كريات الدم الحمراء..... حمراء



الشكل رقم (٥١). قطاع من الكلية مصبوغ بطريقة الهيماتوكسلين والإيوسين.

وكما أنه لابد من الأخذ بالاعتبار الملاحظات التالية :

١- عند صبغ قطاعات طمرت بالسلوئيدين فإنه يجب أن يتم نزع الماء باستخدام الكحول البيوتيلي Butanol بدلا من الكحول الإيثلي حيث تغمس القطاعات بالكحول البيوتيلي مرتين بواقع ١٠ دقائق لكل تبديل.

٢- إذا كانت القطاعات عوملت بمحاليل شديدة الحموضة في أحد المراحل قبل الصبغ فإن ذلك يؤدي إلى صبغ الأنوية بلون باهت. وللتغلب على ذلك فإنه يتم غمس القطاعات في محلول مائي من بيكربونات الصوديوم ٥٪ أو محلول حمض البيريوديك (٥٪) قبل صبغها بالهيماتوكسلين.

صبغة الهيماتوكسلين والإيوسين السريعة

هذه الطريقة خاصة بالقطاعات الثلجية المستخدمة في غرفة عمليات مختبر الأمراض وتبعا للخطوات التالية :

١- تنقل القطاعات الثلجية إلى محلول فورمول حمض الخليك - الفورمالدهيد.

٢- تغمس القطاعات بالماء المقطر ثم تنقل إلى محلول صبغة الهيماتوكسلين لمدة ٩٠ ثانية.

٣- تغمس القطاعات في محلول كربونات الليثيوم المشبعة ثم تغمس بالماء المقطر قبل أن تنقل إلى محلول الإيوسين لمدة ١٠ - ١٥ ثانية.

٤- تغمس القطاعات بالماء المقطر ثم تمرر بتراكيز الكحول التصاعدية وتروق بالزايلين وتغطى بالمادة الطامرة والغطاء الزجاجي وتفحص مباشرة بواسطة المجهر.

صبغ ألياف الأنسجة الضامة

يوجد أربعة أنواع من الألياف في الأنسجة الضامة وهي :

١- الألياف الغروية.

٢- الألياف المرنة.

٣- الألياف الشبكية.

٤- ألياف أكستلان Oxytalan.

وبسبب اختلاف هذه الأنواع من الألياف من حيث التركيب الكيميائي والفيزيائي لذلك فإنها تصبغ بطرق مختلفة.

صبغ الألياف الغروية

تتكون الألياف الغروية بالأساس من بروتينات جلايكولية يكثر بها كل من الحموض الأمينية والجلايسين والبرولين وتنفرد باحتوائها على الحمض الأميني هيدروكسيل اللايسين وكما تحتوي كربوهيدرات الألياف الغروية على مجموعات بيتا جلاكتوز وألفا - جلوكوز. وتصبغ الألياف الغروية بصبغة الهيماتوكسلين والإيوسين بلون وردي وكما تصبغ أيضا بشدة بالصبغات الصبغية المتأينة. وأشهر هذه الصبغات صبغة ثلاثية الألوان Trichrome أشهرها صبغة مالوري ثلاثية الألوان.

الصبغة ثلاثية الألوان Trichrome stain

تستخدم هذه الصبغة بشكل روتيني لصبغ قطاعات الكبد والكلية وذلك للتمييز وإظهار الألياف الغروية والألياف العضلية خاصة في حالات الأورام وكذلك في الأمراض التي تزيد بها كثافة الألياف الغروية مثل نخع الكبد Cirrhosis. تشتمل هذه الصبغة على استخدام ثلاثة أو أكثر من الأصباغ المتأينة لصبغ الأنوية والألياف الغروية والسيتوبلازم وعلى محلول حمض التنغستات الفسفوري PTA كمثبت اللون في

وسط يكون به الرقم الهيدروجيني أقل من ٢ حتى لا تتكسر هذه الحموض وتكون مركبات أخرى وتتحطم في الأوساط الأقل حمضية.

تعمل أصباغ هذه الطريقة على صبغ الألياف الغروية وتمييزها عن الأنسجة العضلية من خلال اتحاد أيونات الحموض المستخدمة مع مجموعات فعالة في مكونات الألياف الغروية ثم يرتبط المركب الناتج مع مجموعات متأينة في الأصباغ كما توضح المعادلة التالية:

ألياف غروية $-NH_2 + H^+ +$ [PMA] → ألياف غروية- Collagen NH^+_3- (PMA)
[PTA] (PTA)

→ ألياف غروية- Collagen NH^+_3 -PMA - Dye
PTA - Dye

والأصباغ المستخدمة في هذه الطريقة متعددة منها هي :

١ - أزرق الأنلين Aniline blue (صبغة تجارية عبارة عن خليط أزرق المثيل وأزرق الماء) وتقوم بصبغ الألياف الغروية.

٢- برتقالي - ج Orange G وتقوم بصبغ السيتوبلازم، كريات الدم الحمراء، الميلانين، والعضلات.

٣- الفوكسين الحمضي Acid fuchsin يعمل على صبغ بقية أجزاء النسيج بلون وردي.

obeikandl.com

ويفضل أن يتم تثبيت عينات القطاعات النسيجية بالفورمالين الملحي أو مثبت بوان.

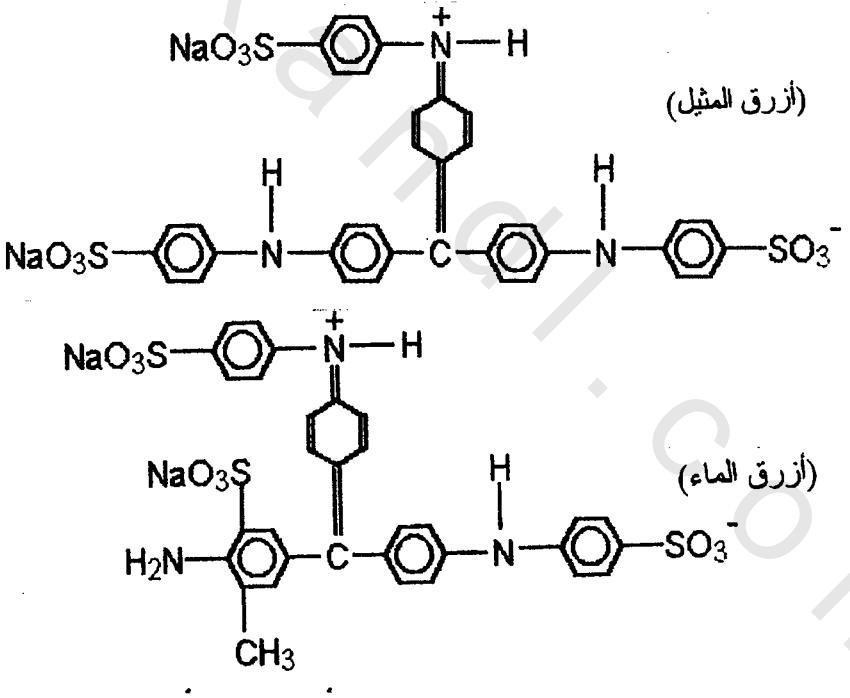
وهنالك عدة طرق للصبغة ثلاثية الألوان منها :

(أ) صبغة مالوري ثلاثية الألوان Mallory trichrome .

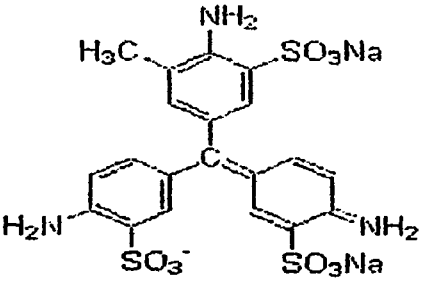
(ب) صبغة ماسون ثلاثية الألوان Masson trichrome .

(ج) صبغة آزان ثلاثية الألوان Azan trichrome .

(د) صبغة فان جيسن ثلاثية الألوان Van Gieson trichrome .



التركيب البنائي لأزرق الأنلين



التركيب البنائي للفوكسين الحمضي

صبغة مالوري ثلاثية الألوان

تستخدم هذه الطريقة لإظهار محتويات الأنسجة الضامة من ألياف غروية وشبكية وتركيب الغضاريف، والعظم، والأمليد.

المحاليل المستخدمة

يحضر محلول الصبغ من الآتي:

حمض التنغستات الفسفوري ..... ١ جم

Phosphotungestic acid

برتقالي - ج ..... ٢ جم

أزرق الأنلين ..... ١ جم

حمض الفوكسين ..... ٣ جم

يمكن لهذا المحلول أن يبقى صالحا للاستخدام لمدة عامين.

obeikandl.com

ودور حمض التنغستات الفسفوري هو ربط أزرق الأنلين مع الألياف الغروية والأغشية الخلوية.

محلول هيماتوكسلين فاكرت الحديدي Weigert's iron haematoxylin

يحضر هذا المحلول بخلط كميات متساوية ومباشرة قبل الاستخدام من كل من محلول (أ) ومحلول (ب) التاليين وبعدها يبقى هذا المحلول صالح الاستخدام لمدة لا تزيد عن ٣ أيام.

محلول (أ)

يحضر هذا المحلول من الآتي :

هيماتوكسلين	٥ جم
كحول إثيلي ٩٥٪	٥٠٠سم^{٣}

يبقى هذا المحلول فعالا لعدة سنوات وهو قابل للاشتعال ويجب تجنب استنشاق أبخرته أو ملامسته مباشرة للجلد.

محلول (ب)

يحضر هذا المحلول من الآتي :

كلوريد الحديديك	٥,٨ جم
$FeCl_3 . 6H_2O$	
ماء مقطر	٤٩٥ سم^{٣}
حمض هيدروكلوريك مركز	٥ سم^{٣}

ويبقى هذا المحلول فعالا لمدة عام من تاريخ تحضيره.

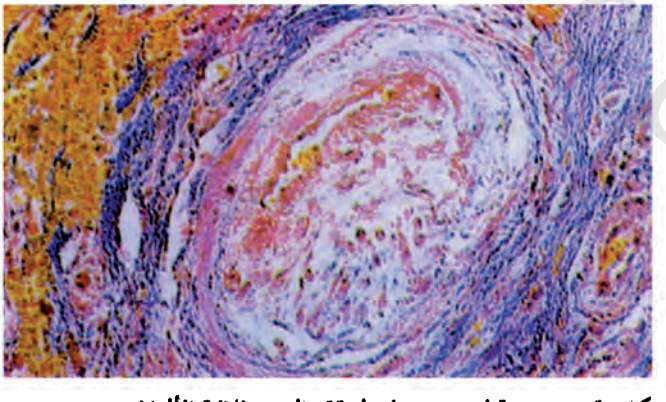
طريقة الصبغ

- تمرر القطاعات حتى الماء المقطر.
- تنقل القطاعات إلى محلول هيماتوكسلين فاكرت لمدة ٥ دقائق.
- تغسل القطاعات بالماء الجاري لمدة دقيقتين.
- تنقل القطاعات إلى محلول الصبغ لمدة ٥ دقائق.
- تغمس القطاعات بالماء الجاري مرتين ثم تجفف بواسطة ورق الترشيح.
- تغمس القطاعات إلى ثلاثة تباديل من الكحول المطلق ثم تروق بالزايلين.
- تغطى القطاعات بمادة طامرة راتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجـــة

الألياف الغروية	أزرق
العضلات	أحمر
كريات الدم الحمراء	برتقالي
الأنوية	أزرق داكن

أما الألياف المرنة فإنها تتلون بلون أصفر وردي أو لا تنصبغ بتاتا (الشكل رقم ٥٢).



الشكل رقم (٥٢). قطاع مصبوغ بطريقة مالوري ثلاثية الألوان.

obeikandl.com

أما في صبغة ماسون ثلاثية الألوان (الشكل رقم ٥٣) فإنه تستخدم الصبغات التالية :

١ - صبغة هيماتوكسلين فاكرت الحديدي ويستعمل لتلوين الأنوية.

٢ - خليط من أصباغ حمضية (الفوكسين الحمضي وبنكو Ponceau (منزوع الزايلين) لتلوين السيتوبلازم.

٣ - صبغة أخضر الخفيف لصبغ الألياف الغروية.

٤ - حمض البكريك لصبغ كريات الدم الحمراء.

أما في صبغة آزان ثلاثية الألوان (الشكل رقم ٥٤) فإنه تستخدم الصبغات التالية :

١ - صبغة أزوكارمين Azocarmine لصبغ السيتوبلازم.

٢ - أزرق الأنلين لصبغ الألياف الغروية.

٣ - صبغة مضادة ومثبت اللون حمض التنغستات الفسفوري.

وكما تستخدم الصبغات التالية في طريقة فان جيسن ثلاثية الألوان :

(أ) هيماتوكسلين فاكرت الحديدي لتلوين الأنوية.

(ب) حمض البكريك لتلوين السيتوبلازم.

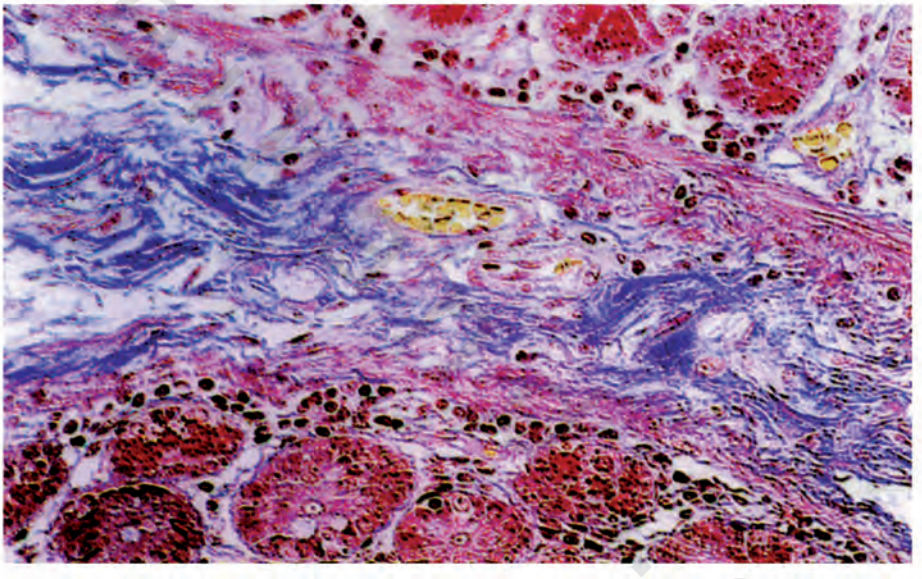
(جـ) الفوكسين الحمضي لتلوين الألياف الغروية.

ويقوم مبدأ هذه الطرق المختلفة على أساس أن الأنسجة الضامة تحمل الكثير من المجموعات القاعدية مما يجعلها قابلة للصبغ بالصبغات الحمضية.

صبغ الألياف المرنة

تحتوي الألياف المرنة على بروتين الإلاستين Elastin الذي تكثر به الحموض الأمينية مثل الجلايسين والفالين والألنين، وهذه البروتينات غير قابلة للذوبان بالماء. تنتشر الألياف المرنة في جميع أعضاء الجسم وبالذات بالجهاز التنفسي والجهاز الدوراني

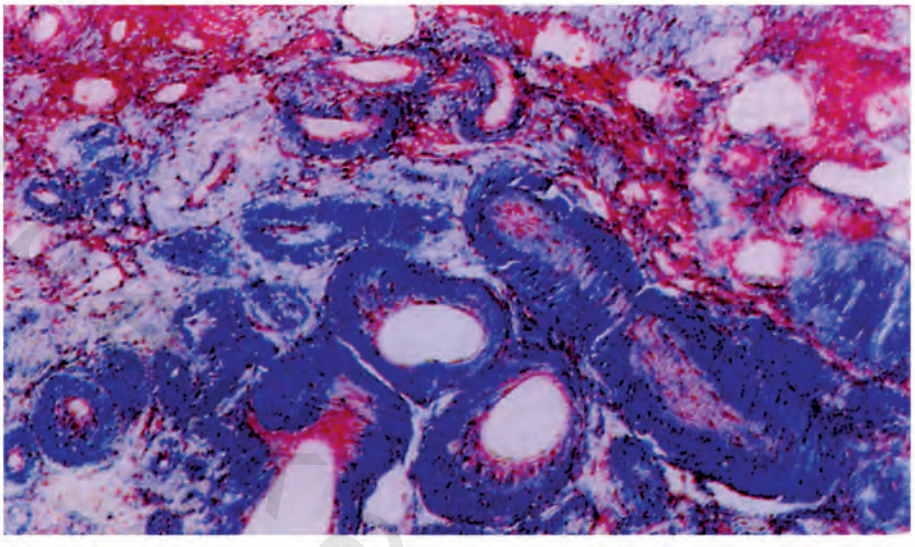
والجلد وقد تكون منفردة كما هو الحال في الجلد أو على هيئة صفيحة كما هو الحال في الشرايين. والألياف المرنة غير المصبوغة صفراء مخضرة اللون وتصبغ بالأصباغ الحمضية والقاعدية على حد سواء فهي مثلا تصبغ بكل من الإيوسين وصبغة أحمر كونغو. وتصبغ الألياف المرنة بهذه الأصباغ عن طريق ارتباطها معها بوساطة Van der Waals forces. ومن الطرق المشهورة لصبغ الألياف المرنة الآتي :



الشكل رقم (٥٣). قطاع مصبوغ بطريقة ماسون ثلاثية الألوان .

١- طريقة هيماتوكسلين فيرهوف Verhoeff's Haematoxylin

تصبغ هذه الطريقة الألياف المرنة في الأوعية الدموية الكبيرة خاصة إذا ما تم استخدام صبغة فان جيسن Van-Geisen كصبغة مضادة ويستخدم بهذه الطريقة هيماتوكسلين مذابا في كحول مطلق.



الشكل رقم (٥٤). قطاع مصبوغ بطريقة آزان ثلاثية الألوان .

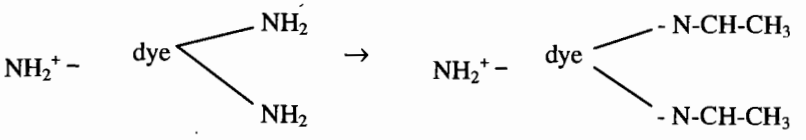
٢ – طريقة فاكرت لصبغ الألياف المرنة Weigert's Elastic Stain

يستخدم بهذه الطريقة كل من الفوكسين القاعدي والروسورسين Resorcin بوجود كلوريد الحديديك ولا تعتبر هذه الطريقة دقيقة بما فيه الكفاية وتحتاج إلى محاليل تمييز.

٣ – طريقة غموري ألدهيد الفوكسين لصبغ الألياف المرنة

Gomori's Aldehyde Fuchsin Elastic Stain

تساعد هذه الطريقة في صبغ الألياف المرنة في الشرايين وكذلك في صبغ الخلايا البدينة وبعض خلايا البنكرياس و Adeno hypophysis . يستخدم بهذه الطريقة كل من الدهيد الفوكسين والبراروسنالين والأستالدهيد. وتلخص المعادلة التالية ميكانيكية الصبغ :



طريقة هيماتوكسلين فيرهوف

محلول هيماتوكسلين فيرهوف: يذاب ١ جم من الهيماتوكسلين في ٢٠ سم^3 كحول إثيلي مطلق ثم يذاب على التوالي ٨ سم^3 من محلول كلوريد الحديديك (١٠٪) و ٨ سم^3 محلول يود لوغول .

طريقة الصبغ

١ - تمرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢ - تنقل القطاعات إلى محلول هيماتوكسلين فيرهوف لمدة ٢٠ - ٥٠ دقيقة حتى تنصبغ القطاعات بالكامل باللون الأسود (أو لمدة ٤٥ ثانية باستخدام جهاز الأمواج الدقيقة Microwave).

٣ -تغمس القطاعات بالماء المقطر ثم تنقل إلى ملحول التمييز، كلوريد الحديديك (٢٪) ، بحيث يزال اللون الأسود من القطاع ما عدا الألياف المرنة.

٤ -تنقل الشرائح بعد غسلها بالماء الجاري إلى محلول ثيوكبريتات الصوديوم (٢,٥٪) لمدة دقيقتين (لإزالة بقايا اليود).

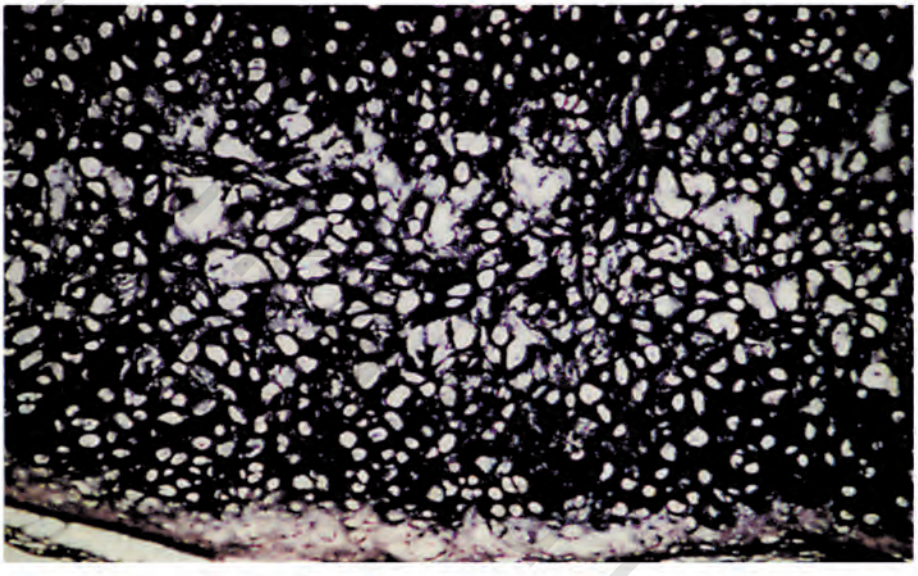
٥ -تغسل القطاعات بالماء الجاري.

٦ -تنقل القطاعات إلى محلول الصبغة المضادة مثل فان جيسن Van Gieson (٢ - ٣ دقائق).

obeikandl.com

٧ - تغسل القطاعات ثم تمرر بتراكيز الكحول التصاعدية وتروق بالزايلين وتغطى بالمادة الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة : تظهر الألياف المرنة بلون أسود (الشكل رقم ٥٥).

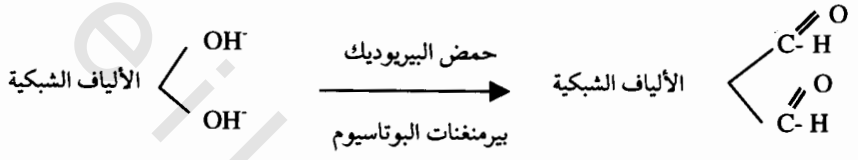


الشكل رقم (٥٥). قطاع مصبوغ بطريقة هيماتوكسلين فيرهوف تظهر الألياف المرنة.

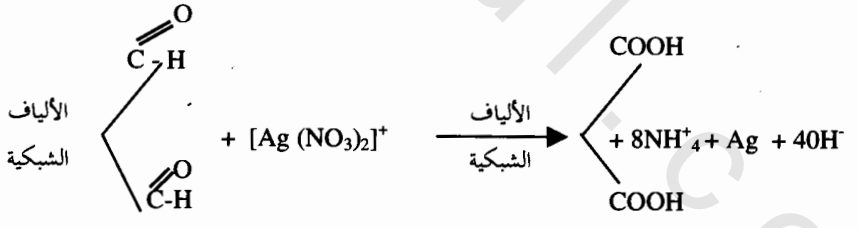
صبغ الألياف الشبكية

تترتب هذه الألياف بشكل شبكي لتدعيم الخلايا والأنسجة اللينة وتشاهد في الأعضاء اللمفاوية بالجسم كالطحال والعقد اللمفاوية والكبد وغدة الثايموس وكذلك في الغشاء القاعدي الذي تستند عليه الأنسجة الطلائية. لا تصبغ هذه الألياف بصبغة اليهماتوكسلين والإيوسين وتتلون بشكل ضعيف في الصبغة ثلاثية الألوان. وتمتاز الألياف الشبكية بأنها محبة للفضة Argyrophilic لذلك يتم الكشف عنها من خلال التخلل بمركبات الفضة التي تظهر الألياف الشبكية بلون بني مسود.

وأشهر الطرق المستخدمة لصبغ الألياف الشبكية طريقة سويت وجورودن Gordon and Sweet`s method التي تعتمد على ترسيب الفضة على الألياف الشبكية والأغشية القاعدية من خلال احتوائها على السكاكر السداسية في بروتينات الجلايكول حيث يتم أكسدة مجموعات الهيدروكسيل في هذه السكاكر إلى مجموعة ألدهيدية باستخدام حمض البيريوديك أو بيرمنغنات البوتاسيوم كما توضح المعادلة التالية :



وتعمل مجموعات الألدهيد الناتجة على اختزال أيونات ثاني أمين الفضة $[Ag\ (NO_3)_2]^+$ وتحويله إلى فضة يترسب على الألياف المحتوية على السكاكر السداسية كما توضح المعادلة التالية :



$$\rightarrow Ag\ (NH_3)_2\ O + HCHO = 2Ag + 4\ NH_3 + HCOOH$$

أما أيونات ثاني أمين الفضة غير المختزلة فيتم إزالتها بواسطة ثيوكبريتات الصوديوم.

المحاليل المستخدمـــة

محلول أيون ثاني أمين الفضة (محلول الفضة الأموني العملي)

Ammoniacal silver working solution

يحضر هذا المحلول قبل الإستخدام مباشرة على النحو التالي :

يضاف إلى ١٠سم^{٣} من محلول نترات الفضة ١٠٪ أمونيا مركـزة ٢٨٪ قطرة قطره حتى يوشك المترسب المتكون (أكسيد الفضة) على الاختفاء. يضاف ٧,٥سم^{٣} من محلول هيدروكسيل الصوديوم ٤٪ ثم تضاف بعد ذلك أمونيا مركزة قطرة قطره حتـى يختفي الراسب المتكون. يكمل حجم المحلول بالماء المقطر حتى ١٠٠سم^{٣}. ويتكون أيون ثاني أمين الفضة كما توضح المعادلات التالية :

$$1 - \ NH_4OH + 2AgNO_3 \longrightarrow NH_4NO_3 + Ag_2O$$

$$2 - \ Ag_2O + 4NH_4OH \longrightarrow 2\,[Ag\,(NH_3)_2]_+ + 2OH^- + 3H_2O + H_2O$$

طريقة الصبغ :يفضل استخدام قطاعات يتم لصقها جيدا على الشرائح بواسطة محلول زلال البيض أو الجلاتين حتى لا تسقط بفعل محلول هيدروكسيل الأمونيوم.

١ - تمرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢ - تنقل القطاعات إلى محلول بيرمنغنات البوتاسيوم ١٪ لمدة ٣ دقائق.

٣ - تغسل القطاعات بالماء الجاري ثم تنقل إلى حمض الأكزاليك ١٪ حتى يختفي لون برمنغنات البوتاسيوم من القطاعات.

٤ - تغسل القطاعات بالماء الجاري ثم تصبغ بمحلـول شبة الحديـد Iron alum وهي عبارة عن كبريتات الأمونيوم الحديديكية Ferric ammonium sulfate ٢,٥٪ لمدة ١٥ دقيقة.

٥ - تغسل القطاعات بالماء المقطر مرتين بمعدل دقيقتين لكل مرة بعدها تنقل القطاعات إلى محلول أيون ثاني أمين الفضة (محلول الفضة الأموني العملي) حديث التحضير لمدة ١٠ - ١٥ ثانية.

٦ - تغمس القطاعات بالماء المقطر ثم تنقل إلى محلول الفورمالين ١٠٪ حديث التحضير لمدة ٤٥ ثانية.

٧ - تغسل القطاعات بالماء الجاري ثم تغمس في محلول كلوريد الذهب ٠,٢٪ لمدة ٣ دقائق.

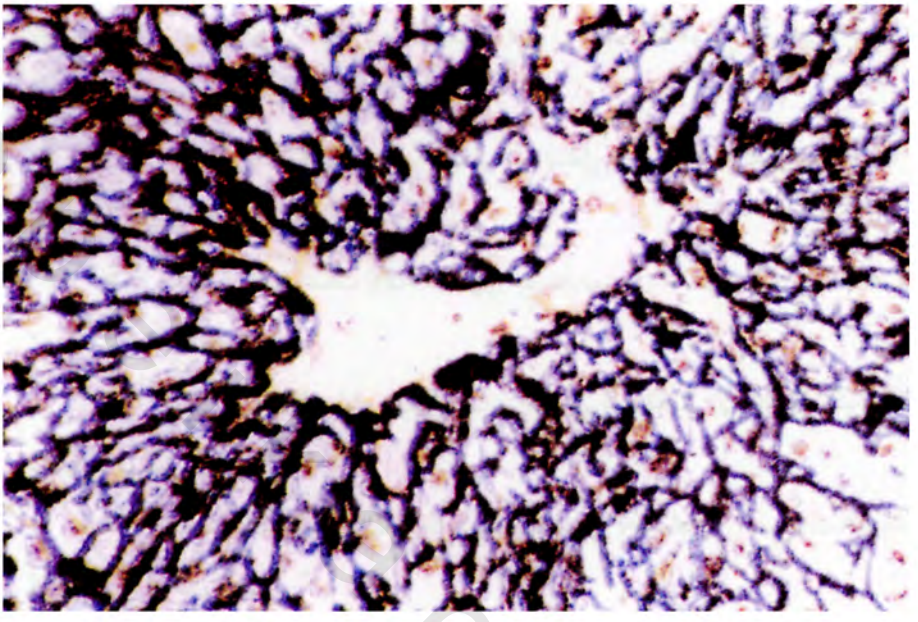
٨- تغسل القطاعات جيدا بالماء الجاري ثم تنقل إلى محلول كبريتات الصوديوم لمدة ٣ دقائق.

٩ - تغسل القطاعات بالماء الجاري ثم تنقل إلى أحد محاليل الصبغات المضادة كالإيوسين أو فان جيسن.

١٠- تغمس العينات بالماء المقطر ثم تمرر بتراكيز الكحول التصاعدية وتروق بالزايلين وتغطى بأحد المواد الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة :

تظهر الألياف الشبكية بلون أسود بينما تصبغ الأنوية بلون أزرق مسود وبقية أجزاء النسيج تأخذ لون الصبغة المضادة (الشكل رقم ٥٦).



الشكل رقم (٥٦). قطاع مصبوغ بصبغة سويت وجوردون تظهر الألياف الشبكية.

صبغ ألياف أكستلان Oxytalan

هذه الألياف محددة الوجود في الأنسجة البشرية والحيوانية فهي تشاهد في الغشاء Periodontal membrane ، وكذلك في الأوتار العصبية، وفي تماس الألياف المرنة للجلد مع الأوعية الدموية، وكما تظهر في بعض الحالات المرضية كما هو الحال في تليف قرنية العين. وقد عرفت هذه الألياف للمرة الأولى عام ١٩٥٨م. وتعتبر ألياف أكستلان ألياف مرنة غير ناضجة يمكن صبغها بألدهيد الفوكسين ولكنها لا تتلون بهمياتوكسلين فيرهوف ، كما هو الحال في الألياف المرنة.

صبغة فان جيسن Van Gieson

يتم بهذه الطريقة استخدام مادتي صبغ تحمل كل منهما أيونات سالبة واحدة تصبغ الألياف الغروية والأخرى تصبغ سيتوبلازم الألياف العضلية وكريات الدم الحمراء. إن استخدام صبغتين كل منهما تحمل أيونات سالبة يؤدي إلى تنافس بينهما للارتباط مع الأيونات الموجبة الموجودة في جزئيات البروتينات وحيث أن أيونات الصبغة الأصغر حجما تصل إلى البروتين بشكل أسرع من الصبغة الأكبر حجما. وكما أنه عند الغسل بالماء والكحول فإن الصبغة الأخف وزنا تخرج بسرعة بينما تبقى الأخرى الأثقل وزنا مرتبطة مع الأيونات الموجبة للبروتين. إضافة إلى ما سبق فإن الألياف الغروية أقل نفاذية للصبغات من سيتوبلازم الألياف العضلية والخلايا الأخرى.

ويستخدم بهذه الطريقة خليط من الفوكسين الحمضي Acid fuchsin وحمض المر Picric acid وهي من أبسط الطرق لصبغ الألياف الضامة الكولاجينية. ويمكن استخدام مادة بنكوه - إس Ponceau كبديل للفوكسين الحمضي. ولابد من الإشارة إلى أنه يجب أن يتم صبغ الأنوية بواسطة الهيماتوكسلين الحديدي بعدها تصبغ القطاعات بالفوكسين الحمضي المشبع بحمض المر.

ويمكن استخدام أي من المثبتات الروتينية خاصة تلك المحتوية على كلوريد الزئبقيك في تحضير القطاعات المراد صبغها بهذه الصبغة.

مكونات محلول الصبغ

فوكسين حمضي ..... ٠,٢٥ جم

Acid fuchsin

حمض النيتريك ..... ٠,٥ سم^{٣}

جليسرين ..... ١٠ سم^{٣}

ماء مقطر ..... ٩٠ سم^{٣}

يضاف حمض المر حتى الإشباع .

خطوات الصبغ

١- مرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢- اصبغ الأنوية بواسطة محلول هيماتوكسلين ماير أو محلول همالم أزرق السلستين Celestine blue-haemalum.

٣- اغسل القطاعات بالماء الجاري ثم إغمسها بالماء المقطر.

٤- انقل القطاعات إلى محلول فان جيسن لمدة ٣ - ٦ دقائق.

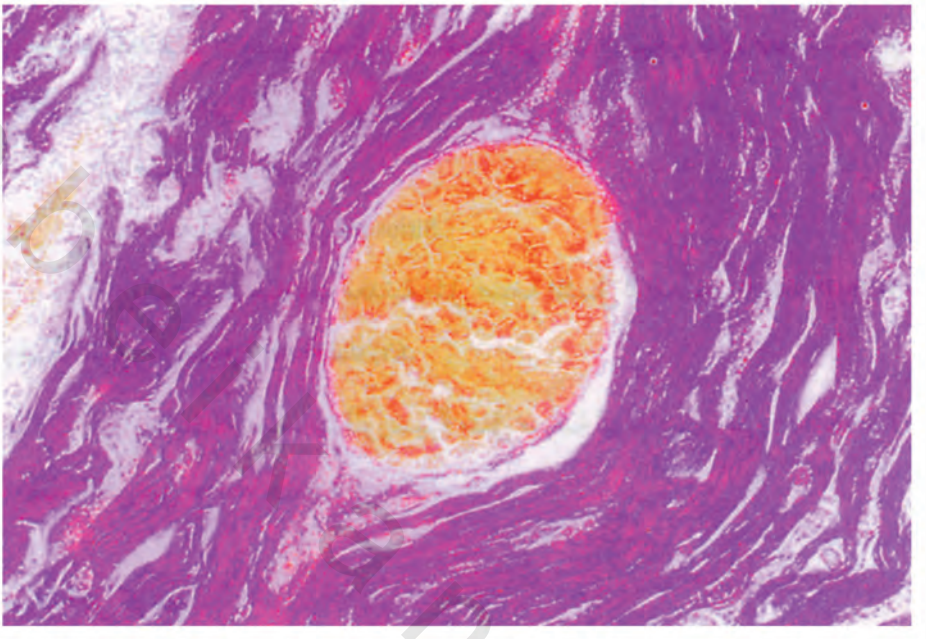
٥- اغمس القطاعات بالماء المقطر ثم انقلها إلى كحول إثيلي ٩٥٪ (إذا تم غسل القطاعات بالماء الجاري أو الماء القاعدي فإن ذلك يؤدي إلى استخلاص الصبغة).

٦- مرر القطاعات بالكحول المطلق وروقها بالزايلين وغطها بأحد المواد الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة

الألياف الغروية	:	أحمر فاقع
العضلات	:	أصفر
كريات الدم الحمراء	:	أصفر
الفايبرين	:	أصفر
الأنوية	:	بني غامق أو مسود
السيتوبلازم	:	أصفر (الشكل رقم ٥٧).

obeikandl.com



الشكل رقم (٥٧). قطاع مصبوغ بطريقة فان جيسن.

صبغ الأملويد

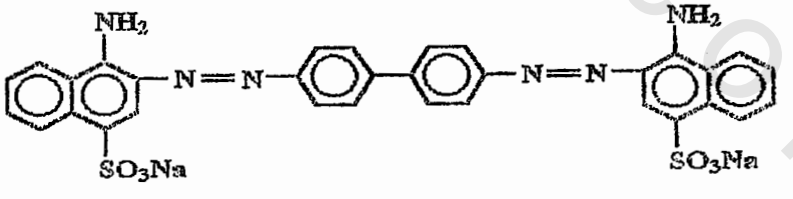
الأملويد Amyloid عبارة عن مواد بروتينية نشوية غير طبيعية شفافة إيوسينية متجانسة تترسب بين وخلال العديد من الأنسجة في بعض الحالات المرضية خاصة تلك التي تصيب الكبد، والطحال، والكلية، والغدد جارات الكلوية وبالذات في حالات الالتهابات التي تصيب هذه الأعضاء مثل الروماتزم وكذلك في بعض الأورام السرطانية مثل سرطان الكلية، ومرض هوجكن Hodgkin's disease ، والاضطرابات المناعية الأخرى. كذلك لا بد من الإشارة إلى أن الأملويد يترسب في أنسجة القلب عند كبار السن. ويعرف ترسب الأملويد بالأنسجة Amyloidosis ويترسب عادة بين الخلايا البرنشمية للأنسجة الضامة.

يتم صبغ الأمليد باستخدام قطاعات ثلجية أو برافينية وإذا ما تم اختيار إستخدام القطاعات البرافينية فإن يجب أن تثبت الخزعات النسيجية لفترة قصيرة ويصبغ الأمليد في العديد من الأصباغ منها :

- صبغة أحمر كونغو.
- صبغة أحمر سرس Sirius red.
- باستخدام صبغات معدنية مثل صبغة المثيل البنفسجي Methyl violet وصبغة البلور البنفسجي Crystal violet.
- باستخدام صبغات فلورسينية مثل صبغة ثيوفلافين - تي- Thioflavin وأصفر الكريدين Credin yellow.

صبغة أحمر كونغو

تعتبر صبغة أحمر كونغو Congo red القاعدية من أفضل الطرق للكشف عن الأمليد. وأحمر كونغو عبارة عن كاشف يتغير لونه من أحمر إلى أزرق عندما ينخفض الرقم الهيدروجيني أقل من ٣، وهوصبغة تبادلية اللون Metachromatic، ويرتبط الأمليد مع الصبغة بواسطة روابط هيدروجينية



التركيب البنائي لأحمر كونغو

محلول الصبغ

أحمر كونغو .... ١ جم

Congo red

كحول إثيلي ٧٠٪ .... ١٠٠سم[٣]

يحضر هذا المحلول على الأقل ٢٤ ساعة قبل الاستخدام.

محلول هيماتوكسلين ماير Mayer's haematoxylin

يحضر هذا المحلول من المحتويات التالية :

هيماتوكسلين .... ١ جم

ماء مقطر .... ١٠٠٠سم[٣]

يودات الصوديوم .... ٠,٢ جم

Sodium iodate

كبريتات الألمنيوم البوتاسيومي (شبة البوتاسيوم) .... ٥٠ جم

Potassium aluminum sulfate

حمض الستريك .... ١ جم

الكلورال المميء .... ٥٠ جم

Chloral hydrate

يذاب الهيماتوكسلين بالماء ثم يغلي لمدة ٥ دقائق. بعدها تضاف يودات الصوديوم وتترك لمدة ١٥ دقيقة ثم بعد ذلك تضاف باقي المواد الكيميائية في تسلسلها السابق بحيث لا تضاف مادة كيميائية قبل أن تذوب سابقتها بالكامل ويبقى هذا المحلول صالح للاستخدام لمدة عام تقريبا.

خطوات الصبغ

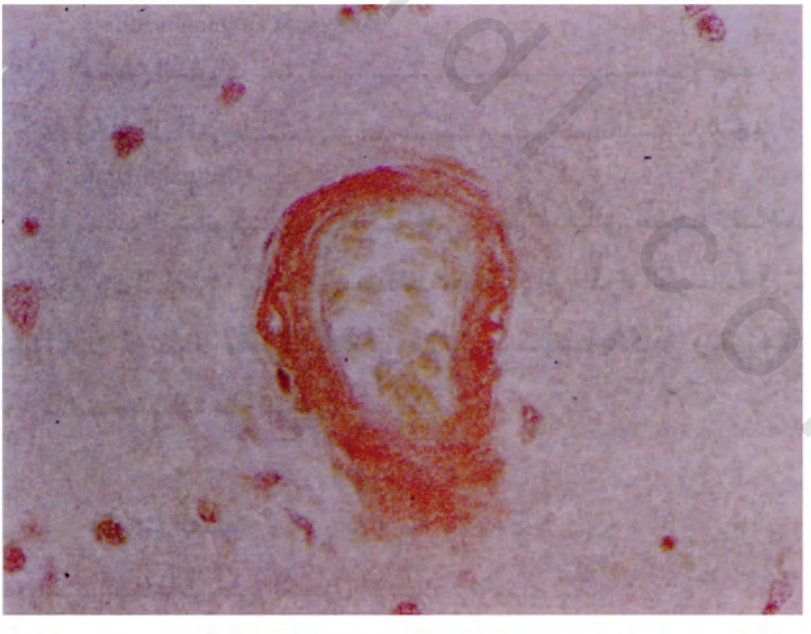
تمرر القطاعات حتى الكحول الإيثلي ٥٠٪ .

obeikandl.com

- تغمس القطاعات في محلول أحمر كونغو لمدة ٧ دقائق.
- تزال الصبغة الزائدة بغمس القطاعات في محلول هيدروكسيل البوتاسيوم ٠,٢٥٪ مذاب في ٨٠٪ كحول ايثلي لمدة دقيقتين. ويستدل على إزالة الصبغة الزائدة من خلال الفحص المجهري.
- تصبغ أنوية الخلايا بغمس القطاعات بهيماتوكسلين ماير.
- تغسل القطاعات بالماء المقطر ثم تمرر بتراكيز الكحول التصاعدية وتروق بالزايلين وتغطى بأحد المواد الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة

يظهر الأمليد بلون أحمر بينما تصطبغ أنوية الخلايا بلون مزرق (الشكل رقم ٥٨).



الشكل رقم (٥٨). قطاع مصبوغ بطريقة أحمر كونغو يظهرالأمليد.

obeikandl.com

صبغة أحمر سرس Sirius red method

محلول أحمر سرس

يذاب ٠,٥ جم من أحمر سرس في ٤٥ سم^{٣}من ماء مقطر ثم يضاف ٥٠سم^{٣} كحول إثيلي ٩٩٪ و ١ سم^{٣} من هيدروكسيل الصوديوم ١٪. يضاف محلول كلوريد الصوديوم ٢٠٪ قطرة قطرة حتى بداية تكون راسب. يترك المحلول ليوم كامل قبل أن يرشح. ويبقى المحلول صالح للاستخدام لشهر واحد.

تستخدم هذه الصبغة للكشف عن الأمليود تبعا للخطوات التالية :

١- تمرر القطاعات في الماء المقطر.

٢- تنقل القطاعات إلى هيماتوكسلين لمدة دقيقة واحدة.

٣- تنقل القطاعات إلى الماء الجاري لمدة ٣ دقائق ثم تغمس في كحول إثيلي ٧٠٪ .

٤- تنقل القطاعات إلى محلول أحمر سرس لمدة ساعة.

٥- تغسل القطاعات بالماء الجاري لمدة ٥ دقائق ثم تمرر بتراكيز الكحول التصاعدية وتروق بالزايلين وتغطى بالمادة الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة : يظهر الأمليود بلون أحمر وردي.

صبغ قطاعات العظم

تصبغ قطاعات العظم بعدة طرق أهمها :

١- الهيماتوكسلين والإيوسين

٢- صبغة ثايونين - حمض البكريك لشمورل

٣- صبغة سيانين الكروم

٤- صبغة فون - كسا

طريقة ثايونين - حمض البكريك لشمورل Schmorl`s Picro-Thionin Method

تعتبر طريقة ثايونين - حمض الكبريك لشمورل من أشهر الطرق لصبغ قطاعات العظم لإظهار القنيات العظمية ومكونات جهاز هافرس وهنا يفضل استخدام قطاعات سميكة من عينات تم طمرها بواسطة السلوئيدين وكما يمكن استخدام قطاعات ثلجية سميكة.

المحاليل المستخدمة

محلول الثايونين الرئيسي

ثايونين ..... ٠,٢٥ جم

ماء مقطر ..... ١٠٠ سم^{٣}

محلول الثايونين العملي

بعد ترشيح محلول الثايونين الرئيسي تضاف كميات متساوية من الماء المقطر إلى هذا المحلول ثم يضاف وقبل الاستخدام مباشرة قطرة من الأمونيا لكل ١٠ سم^{٣} من المحلول.

طريقة العمل

١- مرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢- انقل القطاعات إلى ملحول الثايونين العملي لمدة ٢٠ - ٣٠ دقيقة.

٣- اغسل القطاعات بالماء المقطر.

٤- اغمس القطاعات في ملحول حمض البكريك المشبع.

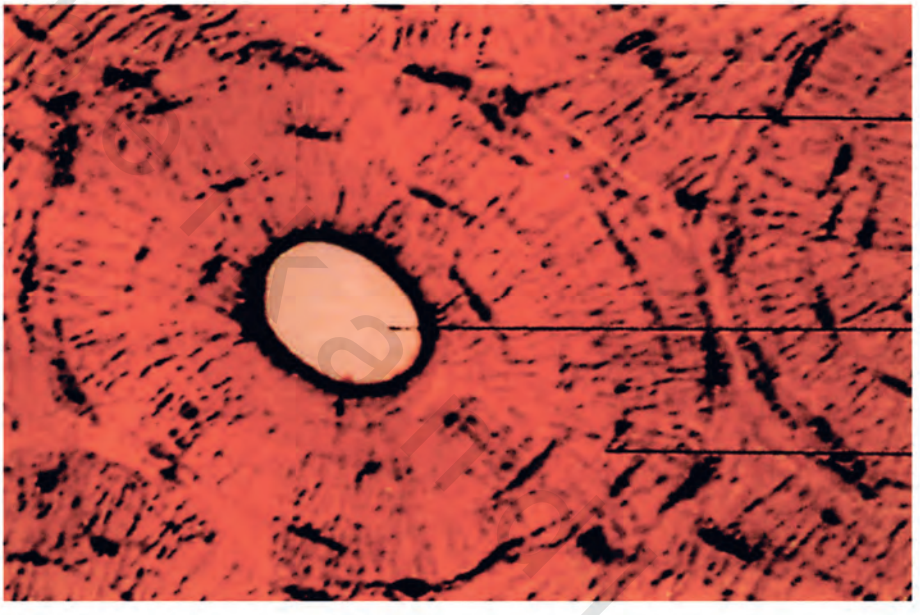
٥- اغسل القطاعات بالماء المقطر ثم انقلها إلى كحول ٧٠٪ لمدة ٥ - ٧ دقائق.

٦- مرر القطاعات بسرعة بتراكيز الكحول التصاعدية ثم روقها بالزايلين وغطها بأحد مواد الطمر الراتنجية والغطاء الزجاجي.

obeikandl.com

النتيجة

تظهر القنيات العظمية بلون بني مسود بينما سداه العظم تأخذ اللون الأصفر وتتلون الخلايا العظمية بلون أحمر (الشكل رقم ٥٩).



الشكل رقم (٥٩). قطاع مصبوغ بطريقة ثايونين - حمض البكريك .

صبغ الأنسجة العضلية

هنالك العديد من الصبغات المستخدمة لصبغ قطاعات الأنسجة العضلية.

صبغة هيماتوكسلين – حمض التـــنغستات الفوسفاتي

Phosphotungestic Acid Haematoxylin

تستخدم هذه الطريقة التي يرمز لها بالرمز PTAH لصبغ العضلات المخططة الهيكلية والقلبية والفايبرين والدبق العصبي. وهذه الطريقة مثال على الصبغ التدريجي

Progressive staining وتشتمل على استخدام حمض التنغستات الفوسفاتي والهيماتين إضافة إلى مثبت اللون شبة الحديد. وتستخدم هذه الصبغة بشكل خاص لإظهار تخطيط العضلات الهيكلية والقلبية وكذلك الفايبرين. ويقوم حمض التنغستات الفوسفاتي بحمل الهيماتين وربطه بالفايبرين بواسطة روابط كيميائية وتشابكات فيزيائية.

محلول الصبغ

هيماتين Haematin ..... ٠,٥ جم

حمض التنغستات الفوسفاتي ..... ٥ جم

ماء مقطر ..... ٥٠٠ مل

يذاب كل من الهيماتين وحمض التنغستات الفوسفاتي بشكل منفصل في نصف كمية الماء المستخدمة. وفي حالة عدم توفر الهيماتين فإنه يستخدم بدلاً عنه هيماتوكسلين يضاف إليه كمية من يودات الصوديوم Sodium iodate من أجل انضاج الهيماتوكسلين.

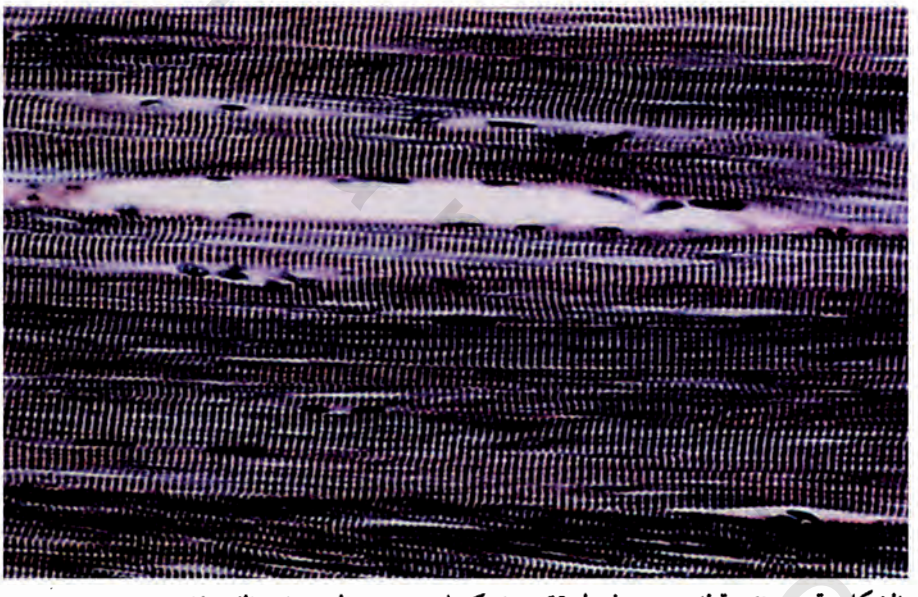
طريقة الصبغ

- تمرر القطاعات حتى الماء المقطر.
- تنقل القطاعات إلى محلول شبة الحديد لمدة ساعة.
- تغسل القطاعات في الماء المقطر لمدة دقيقة واحدة.
- تنقل القطاعات إلى محلول الصبغ لمدة ١٢ ساعة عند حرارة الغرفة ويمكن اختصار الوقت بالاستعاضة عن ذلك بوضع القطاعات في محلول الصبغ لمدة ساعتين عند حرارة ٦٠°م وتفحص الشرائح مجهرياً بين فترة وأخرى.

- تغمس القطاعات مرة واحدة في كحول إثيلي ٩٥٪ ثم تنقل مباشرة إلى كحول مطلق وتروق بالزايلين وتغطى بأحد المواد الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي (الشكل رقم ٦٠).

النتيجة

تظهر الخطوط العضلية، والخلايا النجمية Astrocytes ، وخلايا الدبق العصبي Neuroglia ، والدبق الليفي fibrogilia بلون مزرق (الشكل رقم ٦٠).



الشكل رقم (٦٠). قطاع مصبوغ بطريقة هيماتوكسلين - حمض التنغستات الفوسفاتي .

صبغ الغشاء القاعدي

الغشاء القاعدي Basement membrane عبارة عن طبقات من مواد بين خلالية يوجد عادة على قواعد الأنسجة الطلائية والغدية ويقوم بوظيفة تدعيمية للأنسجة الضامة التي توجد أسفل الأنسجة الطلائية أو بينها.

يتكون الغشاء القاعدي من عديدات التسكر ومواد بروتينية ترتبط بشكل وثيق بألياف الأنسجة الضامة. ولا يصبغ الغشاء القاعدي بشكل واضح تام بواسطة صبغة الهيماتوكسلين والإيوسين. وتعد الطرق الآتية من أفضل الطرق لصبغ الأغشية القاعدية :

١- صبغة حمض البريوديك شيف PAS .

٢- صبغات التخلل بالفضة.

٣- صبغة أزان ثلاثية الألوان Azan trichrome.

٤- طريقة جون Jon's method المعروفة بصبغة نترات فضة المثنمين Methenamine silver nitrates والتي تعرف أيضا بطريقة نترات الفضة - حمض البيريوديك Periodic acid- silver nitrate method.

٥- صبغة MSB.

٦- صبغة بجلر وسويت Puchtler-Sweat method.

طريقة جون - مثنمين الفضة Jone's Methenamine Silver Method

تستخدم هذه الطريقة لإظهار الغشاء القاعدي خاصة في قطاعات الكلية وذلك لإظهار التغيرات على هذا الغشاء في كبب الكلية والنبيبات البولية. تعتمد هذه الطريقة على أن حمض البيريوديك يؤكسد المواد النشوية الموجودة في الغشاء القاعدي وينتج عن ذلك مجموعات ألدهيدية تعمل على اختزال الفضة وتحولها إلى فضه معدنية مرئية.

المحاليل المستخدمة

محلول المثنمين الفضي الرئيسي Methenamine silver solution

يحضر هذه المحلول من المكونات التالية :

محلول المثنمين ٣٪ ٤٠٠ سم٣

(Methenamim)

محلول نيترات الفضة (٥٪) ٢٠ سم٣

يحفظ هذا المحلول في الثلاجة ويبقى صالحا للاستخدام لمدة ٦ شهور.

محلول المثنمين العملي

يحضر هذا المحلول مباشرة قبل الإستخدام كما يلي :

محلول المثنمين الرئيسي ٥٠ سم٣

محلول البوراكس ٥٪ ٦ سم٣

ويستخدم هذا المحلول لمرة واحدة بعد تحضيره مباشرة.

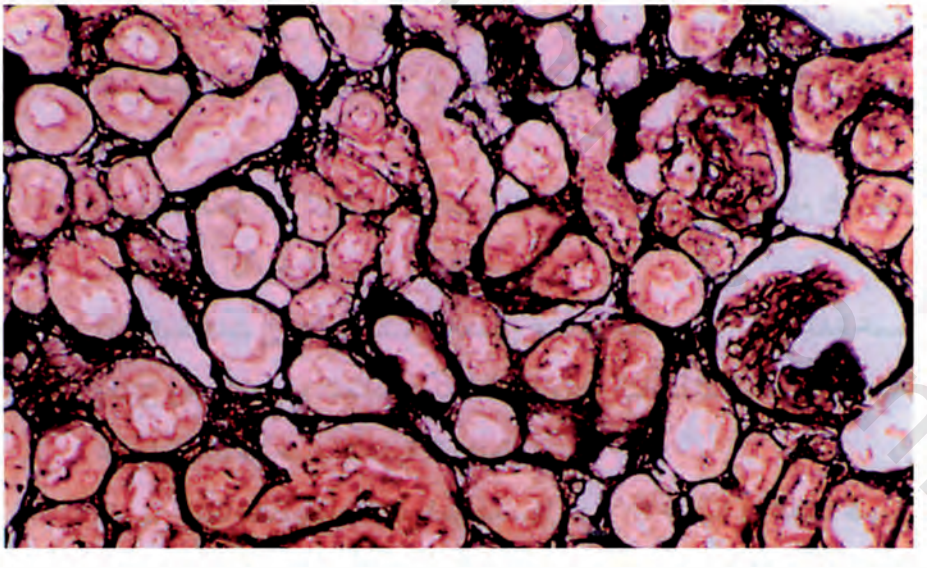
خطوات العمل

- مرر القطاعات حتى الماء المقطر.
- انقل القطاعات إلى محلول حمض البيريوديك ١٪ عند حرارة ٦٠°م لمدة ١٥ دقيقة.
- اغسل القطاعات في ثلاثة تباديل من الماء المقطر (ويفضل استخدام الماء خالي الأيونات إذا توفر).
- انقل القطاعات إلى محلول المثنمين العملي عند درجة حرارة ٦٠ °م لمدة خمس دقائق وحتى تصبح القطاعات بنية اللون ويتم أثناء ذلك فحص القطاعات مجهريا للتأكد من صبغ الأغشية القاعدية.
- اغمس القطاعات بالماء المقطر ثم اغمسها حتى ٢٠ غمسة في محلول كلوريد الذهب ٠,٢٪ حتى يظهر اللون الرصاصي.

obeikandi.com

- اغمس القطاعات بالماء المقطر ثم انقلها إلى محلول ثيوكبريتات الصوديوم ٥٪ لمدة دقيقة واحدة.
- اغسل القطاعات بالماء العادي ثم اصبغ الأنوية بواسطة هيماتوكسلين هارس لمدة ١ - ٣٠ دقائق.
- اغمس القطاعات لمرة واحدة بالماء الحمضي ثم انقلها لمدة ٣ دقائق إلى الماء العادي واغسمها لمدة ٣ - ٥ دقائق بالماء القاعدي.
- اغمس القطاعات بالماء المقطر ثم انقلها إلى محلول الإيوسين لمدة ١ - ٢ دقيقة.
- مرر القطاعات بتراكيز الكحول التصاعدية ثم روقها بالزايلين وغطها بأحد المواد الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة : تظهر الأغشية القاعدية بلون أسود بينما تأخذ الأنوية اللون الأزرق (الشكل رقم٦١).



الشكل رقم (٦١). قطاع مصبوغ بطريقة جون - مثمين الفضة تظهر الغشاء القاعدي.

الكشف عن الفايبرين

من الطرق المستخدمة للكشف عن الفايبرين Fibrin طريقة فريزر - لندرم
Fraser -Lendrum method

المحاليل المستخدمة

محلول أزرق السلستين Celestine blue solution

يحضر هذا المحلول من المكونات الآتية :

كبريتات الأمونيوم الحديديكية ..... ٢,٥ جم
Ferric ammonium sulfate

ماء مقطر ..... ٥٠ سم^{٣}

أزرق السلستين ..... ٠,٢٥ جم
Celestine blue

جلسرين ..... ٧ سم^{٣}

تذاب كبريتات الأمونيوم الحديديكية في الماء المقطر ثم يضاف أزرق السلستين ويغلى المحلول ويضاف الجليسرين بعد ترشيحه. ويصلح هذا المحلول للاستخدام لمدة ستة شهور.

محلول حمض البكريك - البرتقالي - ج Orange G-picric acid

يحضر هذا المحلول من المكونات الآتية :

حمض البكريك ..... ٢,٨ جم

كحول إثيلي ٨٠٪ ..... ٢٠٠ سم^{٣}

البرتقالي - ج ..... ٠,٤ جم
Orange G

ويبقى هذا المحلول صالحا للاستخدام لمدة عام .

obeikandi.com

محلول الفوكسين الحمضي

الفوكسين الحمضي .... ١ جم
Acid fuchsin

ما مقطر .... ١٠٠ سم^3

حمض الخليك الثلجي .... ١ سم^3

ويبقى هذا المحلول صالحا للإستخدام لمدة عام.

محلول التمييز

محلول حمض البكريك - البرتقالي - ج .... ٥ سم^3

كحول اثيلي (٨٠٪) .... ٤٥ سم^3

المحلول الرئيسي :

يحضر من الآتي

حمض التنغستات الفسفوري .... ٢٥ جم

حمض البكريك .... ٢،٥ جم

كحول إيثلي (٩٥٪) .... ٢،٥ جم

خطوات الصبغ :

١ - مرر القطاعات حتى الماء وأزل صبغيات الزئبق بواسطة محلول اليود.

٢ - انقل القطاعات إلى محلول أزرق السلستين لمدة ٥ دقائق.

٣ - اغسل القطاعات بالماء الجاري ثم انقلها إلى هيما توكسلين ماير لمدة ٥ دقائق.

٤ - اغسل القطاعات بالماء الجاري ثم انقلها إلى محلول حمض البكريك - البرتقالي لمدة ٥ دقائق.

٥ - اغسل القطاعات بالماء الجاري ثم انقلها إلى محلول الفوكسين الحمضي لمدة ٥ دقائق.

obeikandi.com

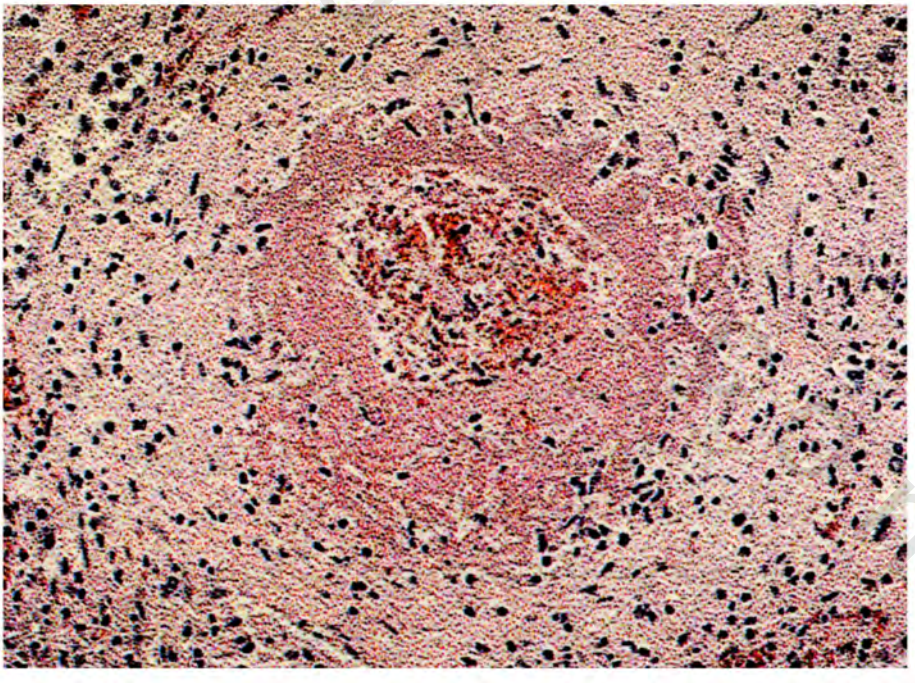
٦ - اغسل القطاعات بالماء الجاري ثم اغمسها بمحلول التمييز لمدة ١٠ ثواني.

٧ - اغسل القطاعات بالماء الجاري ثم انقلها إلى محلول ماكفارلنس العملي لمدة ٥ دقائق (١٠سم^3 من المحلول الرئيسي + ٣٠سم^3 كحول ايثلي ٩٥٪ + ١٠سم^3 ماء مقطر).

٨ - اغسل القطاعات بالماء الجاري ثم انقلها إلى أخضر خفيف (٢٪) لمدة دقيقتين.

٩ - مرر القطاعات بتراكيز الكحول التصاعدية وروقها بالزابلين وغطها بمادة طامرة راتنجية.

النتيجة : يظهر الفايبرين بلون أحمر فاتح.



الشكل رقم (٦٢). قطاع مصبوغ بطريقة فريزر - لندم يظهر الفايبرين.

صبغ مسحات الدم ونخاع العظم

لصبغ مسحات الدم ونخاع العظم لا بد من تحضير المسحات بشكل جيد ويتم ذلك من خلال استخدام شرائح تم تنظيفها تماما باستخدام الكحول والأستيون. ويتم تحضير المسحة من خلال وضع قطرة من الدم أو نخاع العظم على طرف الشريحة ثم فردها على الجزء الأوسط من الشريحة باستخدام الأغطية الزجاجية Cover slips. ويتم الفرد من خلال تحريك الغطاء الزجاجي على سطح الشريحة بزاوية مقدارها ٤٥ . وكما أنه لا بد من أن يتم تجفيف المسحات تماما قبل الشروع بصبغها.

هنالك العديد من الصبغات التي تستخدم لصبغ مسحات الدم ونخاع العظم وأهمها الصبغات التالية :

- صبغة رايت Wright stain
- صبغة ليشمان Leishman's stain
- صبغة كيمزا Giemsa's stain

صبغة ليشمان Leishman`s Stain

وضع أسس هذه الصبغة العالم ليشمان عام ١٩٠١م وما زالت تستخدم حتى الآن في معظم المختبرات الطبية. وتمتاز هذه الصبغة بقدرتها على صبغ كريات الدم على اختلاف أنواعها وكذلك الطفيليات الأولية التي تعيش في الدم. ولكن من الأهمية بمكان أن يضبط الرقم الهيدروجيني PH لمحلول الصبغ من أجل الحصول على أفضل النتائج حيث يضبط الرقم الهيدروجيني المستخدم عند ٦,٨ لدراسة كريات الدم وعند ٧,٢ لدراسة طفيليات الدم الأولية . وكما تستخدم هذه الصبغة لصبغ مسحات المسوطات المهبلية في إفرازات المهبل.

محلول الصبغ

ضع ٠,١٥ جم من الصبغة في ١٠٠سم^{٣} من كحول الميثانول وحرك المحلول باستمرار بالرج المغناطيسي لمدة ٦ ساعات ويصبح المحلول جاهز للاستخدام بعد ٢٤ ساعة.

خطوات العمل

١- حضر مسحات حديثة من الدم واتركها لمدة دقيقة حتى تجف.لا حاجة للتثبيت لأن الكحول المثيلي يعمل عمل المثبت في الخطوة التالية. ويمكن إنجاز التثبيت من خلال غمس المسحة في محلول حمض الخليك الثلجي (٣٪ في ميثانول ٩٥٪) ثم تغمس بالماء المقطر وتترك لتجف.

٢- اغمر المسحة بمحلول صبغة ليشمان .

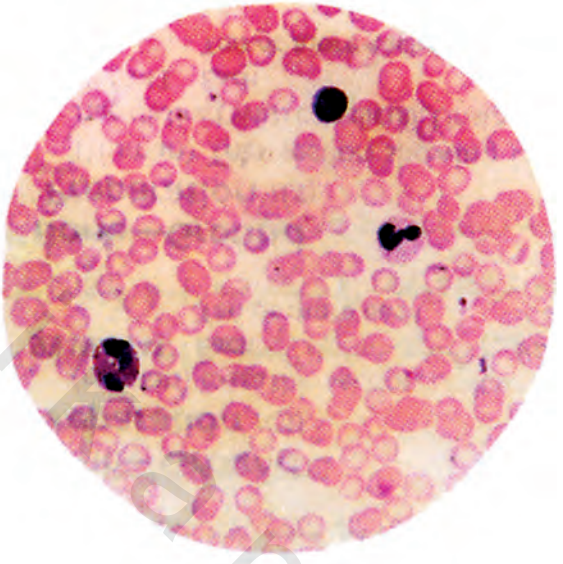
٣- بعد مرور ثلاثون ثانية أضف منظم الفوسفات مضبوط الرقم الهيدروجيني عند ٦,٨ بحيث تصبح نسبة الخليط من الماء المقطر إلى محلول الصبغة فوق المسحة (٢ ماء مقطر : ١ محلول صبغة) وأترك الشريحة لمدة ٨ - ١٠ دقائق.

٤- اغسل العينة بسرعة بالماء المقطر ثم غطها في منظم الفوسفات (الرقم الهيدروجيني = ٦,٨) واترك الشريحة لتجف على طرف واحد، ولا يلزم تغطية مسحة الدم بكندا بلسم وغطاء الشريحة وإنما تفحص باستخدام العدسة الزيتية.

النتيجـــة

الأنوية	زرقاء
كريات الدم الحمراء	حمراء
أنوية الطفيليات	حمراء
صفائح الدم	زرقاء بنفسجية

(الشكل رقم ٦٣)



الشكل رقم (٦٣). مسحة دم مصبوغة بطريقة ليشمان.

صبغة كيمزا Giemsa Stain

تتكون هذه الصبغة من آزر - ٢ II Azur وأزرق مثيلين و آزر - ب وإيوسينات eosinate

المحاليل المستخدمة

تحضير محلول الصبغة : اضف ٢ جم من صبغة كيمزا إلى ١٣٢ سم^3 من الجليسرول ثم اغلق الوعاء بإحكام ورجه جيداً واترك المزيج عند ٦٠°م لمدة ساعتين وأضف ١٣٢ سم^3 من الكحول المثيلي. اترك المحلول ليبرد ثم رجه لمدة ساعة. ويصلح

هذا المحلول لمدة عامين وعند الاستخدام فإن جزء من هذا المحلول يخلط مع خمسين جزءاً من محلول ماء منظم (الرقم الهيدروجيني = ٦,٨).

يضاف الجليسرول إلى الكحول المثيلي لإذابة الصبغة ومن أجل المحافظة لفترة طويلة على الصبغة من التلف فيما لو أذيبت في الكحول لوحده والعامل الأهم في هذه الصبغة هو الرقم الهيدروجيني لمحلول الصبغ.

خطوات العمل

١- حضر مسحات دم حديثة كما سبق توضيحه.

٢- انقل المسحات إلى ماء منظم الرقم الهيدروجيني.

٣- اغمر المسحات بواسطة محلول الصبغة العملي.

٤- اغمس المسحات بالماء المقطر.

٥- انقل المسحات إلى محلول حمض الخليك الثلجي ٠,٥٪ حتى يصبح لون القطاعات ورديا.

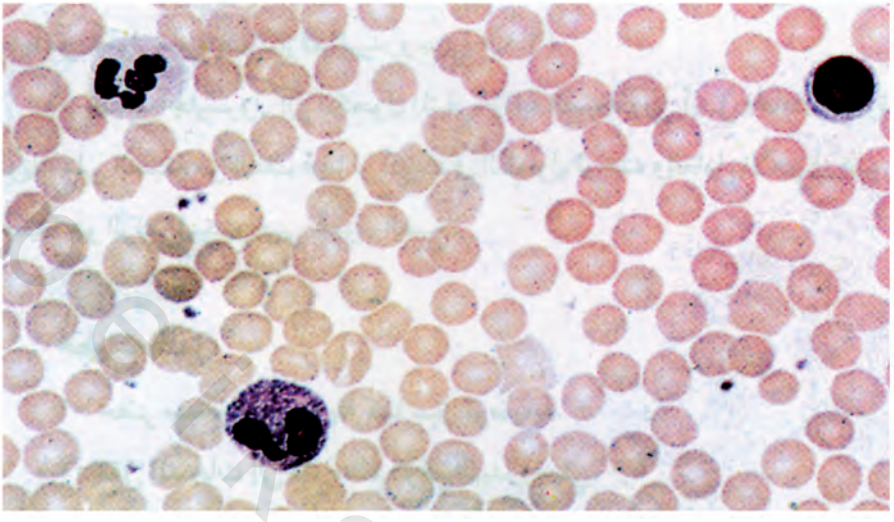
٦- اغسل المسحات بالماء العادي.

٧- جفف المسحات بواسطة ورق الترشيح.

٨- مرر وبسرعة المسحات بتراكيز الكحول التصاعدية ثم روقها بالزايلين وغطها بالمادة الطامرة الراتنجية.

(الشكل رقم ٦٤)

opeikandl.com



الشكل رقم (٦٤). مسحة دم مصبوغة بطريقة كيمزا.

صبغ البكتيريا والفطريـــات

هنالك العديد من الصبغات المستخدمة لصبغ البكتيريا والفطريات

صبغ البكتيريا

هنالك العديد من الصبغات المستحدمة للكشف عن البكتيريا في القطاعات النسيجية منها :

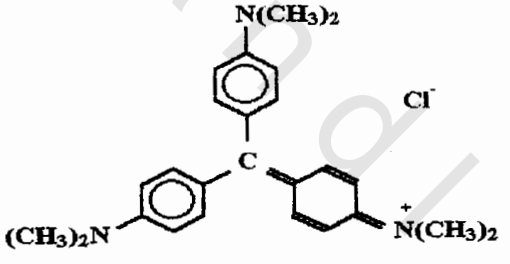
١ - صبغة جرام المحورة .

٢ - صبغة زيل نلسون .

٣ - صبغة كيمزا - هارليكو .

صبغة جرام المحورة للكشف عن البكتيريا بالقطاعات

تستخدم هذه الطريقة لصبغ كل من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام على أساس التمييز بينهما بسبب تركيب الجدار الخلوي حيث أن هذا الجدار يكون أسمك في البكتيريا الموجبة ويتكون من بروتين جلايكولي. يصبغ جدار كل من نوعي البكتيريا في البداية بواسطة صبغة البلور البنفسجي Crystal violet لكنه يفقد فقط من جدار البكتيريا السالبة بواسطة الأسيتون ويبقى في جدار البكتيريا الموجبة لأن جدار البكتيريا السالبة مكون من طبقة بروتين جلايكولي مغطاة من الخارج بطبقة من عديدات التسكر الدهنية ومن ثم تأخذ البكتيريا السالبة لون الفوكسين القاعدي.



التركيب البنائي للبلور البنفسجي

خطوات العمل

١- مرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢- انقل القطاعات إلى محلول صبغة البلور البنفسجي ١٪ لمدة دقيقة واحدة.

٣- اغسل بالماء الجاري ثم انقل القطاعات إلى محلول يود لوغول لمدة دقيقة واحدة.

٤- اغسل بالماء الجاري ثم جففها بواسطة ورق الترشيح.

٥- اغمر القطاعات بالأسيتون حتى يتوقف خروج اللون من القطاعات.

٦- أغسل القطاعات بالماء الجاري ثم اغمرها بواسطة محلول الفوكسين القاعدي ٢٥٪ لمدة ٣ دقائق.

٧- اغسل القطاعات بالماء الجاري ثم جففها بواسطة ورق الترشيح.

٨- اغمس القطاعات مرتين بواسطة الأسيتون.

٩- انقل القطاعات مباشرة إلى محلول الأسيتون - حمض البكريك المشبع ١ : ١ حتى تأخذ القطاعات اللون السلموني.

١٠- اغمس القطاعات مرتين في الأسيتون.

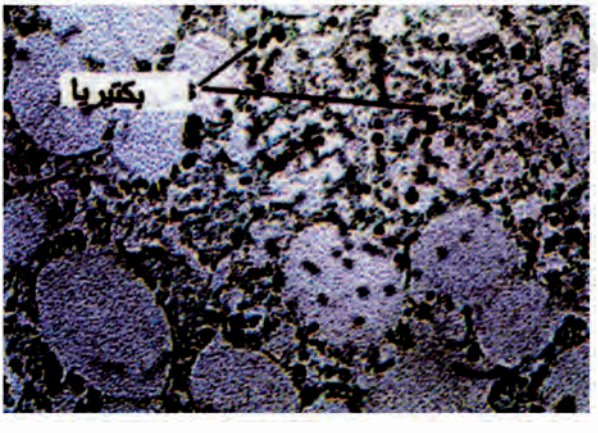
١١- جفف القطاعات بالهواء ثم انقلها إلى الزايلين ثم غطها بالمادة الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة:

البكتيريا الموجبة لصبغة غرام - أزرق

البكتيريا السالبة لصبغة غرام - أحمر

(الشكل رقم ٦٥)



الشكل رقم (٦٥). قطاع مصبوغ بطريقة جرام المحورة.

صبغ جرثومة السل

يكشف عن جرثومة السل Acid fast bacilli بالقطاعات النسيجية باستخدام طريقة Auramine-Rhodamine fluoresence وكذلك بطريقة زيل نيلسون.

طريقة زيل نيلسون Ziehl-Neelsen

تعتبر طريقة زيل نيلسون من أشهر الطرق للكشف عن جرثومة السل بالقطاعات النسيجية ومسحات البلغم ويتم ذلك اعتمادا على أن كبسولة هذه الجرثومة دهنية مما يمكنها من الصبغ بكاربول الفوكسين ويجلعها قادرة على مقاومة نزع هذه الصبغة بواسطة الحمض.

المحاليل المستخدمة

محلول الصبغ : يحضر محلول الصبغ من المكونات التالية :

فوكسين قاعدي ..... ٢,٥ جم

ماء مقطر ..... ٢٥٠ سم^{٣}

كحول إثيلي مطلق ..... ٢٥ سم^{٣}

مصهور الفينول ..... ١٢,٥ سم^{٣}

تخلط المحتويات ثم ترشح داخل قارورة داكنة. ويبقى هذا المحلول صالحا للاستخدام لمدة سنة.

محلول أزرق المثيلين الرئيسي

يحضر من الآتي :

أزرق المثيلين ..... ٠,٧ جم

Methylene blue

ماء مقطر ..... ٥٠ سم^{٣}

يصلح هذا المحلول للاستخدام لمدة عام

محلول أزرق المثيلين العملي

يحضر هذا المحلول من الآتي

محلول أزرق المثيلين الرئيسي ..... ٥ سم^{٣}

ماء مقطر ..... ٤,٥ سم^{٣}

يصلح هذا المحلول للإستخدام لمدة شهرين

خطوات العمل

١ - مرر القطاعات حنى الماء المقطر.

٢ - انقل القطاعات إلى محلول كاربول فوكسين وسخن لمدة ٤٥ ثانية بواسطة جهاز الأمواج الدقيقة Microwave ثم اترك القطاعات في المحلول الساخن لمدة ٥ دقائق. ويمكن أن يستعاض عن ذلك بتسخين القطاعات لمدة ساعة عند حرارة ٦٠°م.

٣ - اغسل القطاعات بالماء الجاري.

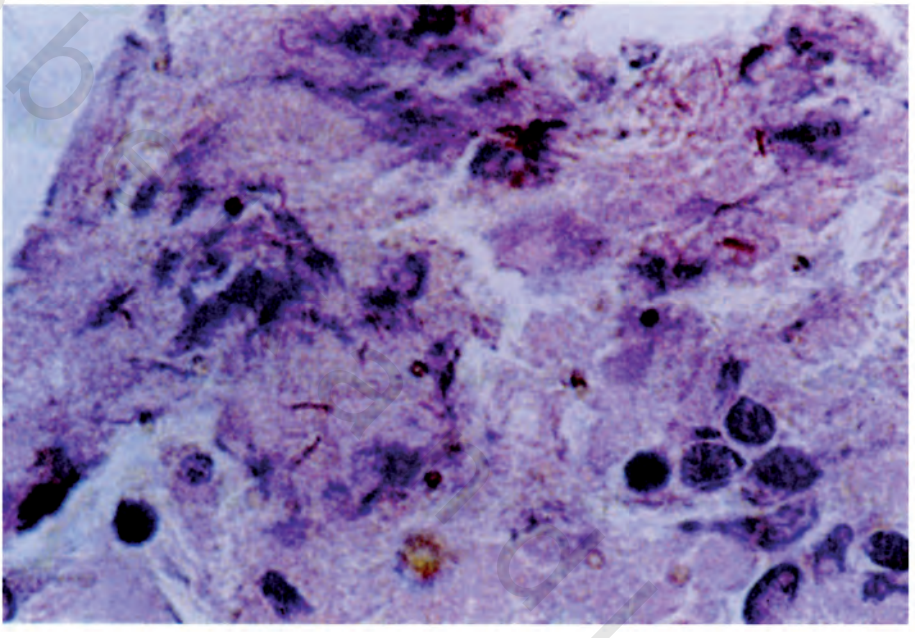
٤ - انقل القطاعات إلى محلول الكحول الحمضي ١٪ حمض هيدروكلوريك في كحول ٧٠٪ حتى يتوقف خروج اللون الوردي من القطاعات.

٥ - اغمس بالماء المقطر ثم انقل القطاعات إلى محلول أزرق المثيلين العملي لمدة ٣٠ ثانية.

٦ - اغمس بالماء العادي ثم مرر القطاعات بتراكيز الكحول التصاعدية وروقها بالزايلين وغطها بالمادة الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

obeikandl.com

النتيجة : تظهر جرثومة السل بلون أحمر غامق بينما تكون خلفية القطاعات زرقاء. (الشكل رقم ٦٦).



الشكل رقم (٦٦). قطاع مصبوغ بطريقة زيل نلسون يظهر جرثومة السل.

صبغ بكتيريا كامبيلوباكتر (هيلوباكتر)

بكتيريا هيلو باكتر من نوع *Helicobacter pylori* جرثومة حلزونية سالبة لصبغة غرام. ويعتقد أنها تسبب قرحة المعدة حيث أنها تقوم بهضم البطانة المخاطية للمعدة مما يجعل باقي طبقات المعدة دون حماية أمام الحمض المعدي. يمكن الكشف عن هذه البكتيريا بالقطاعات النسيجية بعدة طرق منها:

١ - صبغة كيمزا - هارليكو Harlecoapid Geimsa method

٢ - طريقة Silver spirachetes method

٣ - طريقة الأكردين البرتقالي Acridine orange

صبغة كيمزا – هارليكو

يتم في هذه الصبغة استخدام كل من أزرق المثلين والإيوسين حيث أن أزرق المثلين صبغة تبادلية اللون Metachromatic.

خطوات العمل

١ - مرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢ - اصبغ في محلول الإيوسين لمدة دقيقتين.

٣ - ازل الصبغة الزائدة ثم انقل القطاعات إلى محلول أزرق المثيلين لمدة ٣ دقائق.

٤ - اغمس القطاعات بشكل سريع في تبديلين من الماء المقطر بمعدل ثانية لكل تبديل.

٥ - انقل القطاعات إلى تبديلين من حمض الخليك الثلجي ٠,٢٥٪ بمعدل ثانية لكل تبديل.

٦ - مرر القطاعات في كحول ٧٠٪ ثم تبديلين من الكحول المطلق بمعدل ثانية لكل تبديل.

٧ - روق القطاعات بالزايلين وغطها بالمادة الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة

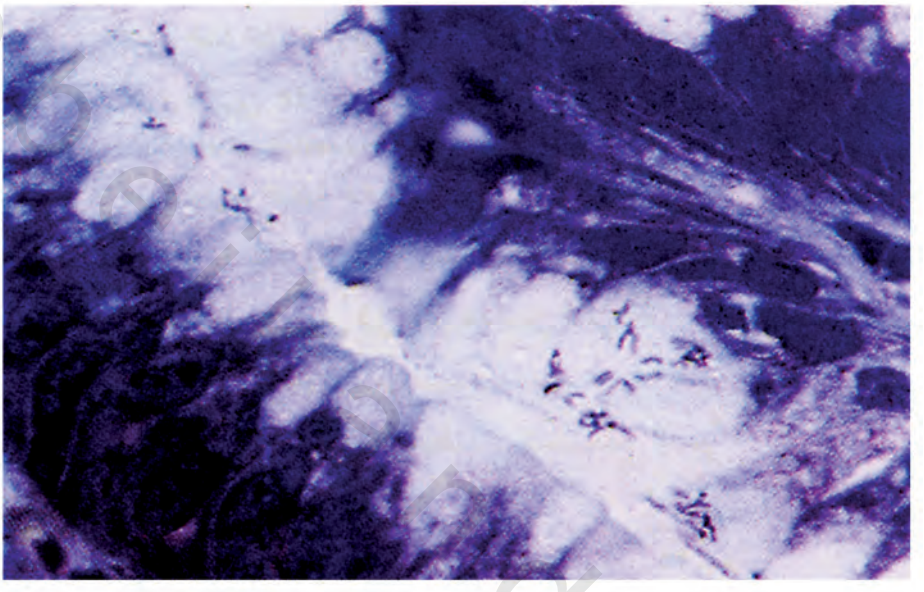
جرثومة هيلاكوباكتر (كامبلوباكتر) ..... أزرق غامق

الخلايا البدينة ..... بنفسجي / قرمزي

obeikandl.com

الخلفية أزرق إلى وردي

(الشكل رقم ٦٧).



الشكل رقم (٦٧). قطاع في معدة مصبوغ بطريقة كيمزا هاليكو يظهر جرثومة كامبيلوباكتر

صبغ الفطريات

يتم صبغ الفطريات في القطاعات النسيجية على أساس أن الجدار الخلوي لخلايا الفطريات يحتوي على عديدات تسكر يمكن أكسدتها لتكوين مجموعات ألدهيدية حيث تقوم هذه المجموعات بدورها باختزال نيترات الفضة إلى فضة معدنية تظهر في مكان وجود الفطريات من القطاعات النسيجية.

وتعتبر طريقة فضة المثنمين لجروكت Methenamine silver-Grocott's المحورة من أفضل الطرق لصبغ خلايا الفطريات في القطاعات النسيجية حيث يتفاعل حمض الكروميك مع مجموعات الجلايكول في عديدات التسكر في جدارخلايا الفطر ويحولها

إلى مجموعات ألدهيدية وتقوم هذه المجموعات باختزال نيترات الفضة وتظهر الفضة المعدنية مكان وجود الفطر في النسيج.

المحاليل المستخدمة

محلول فضة المثنمين الرئيسي

محلول المثنمين ٣٪ ..... ١٠٠ سم^{٣}

(Hexamethylene tetramine)

محلول نيترات الفضة ٥٪ ..... ٥ سم^{٣}

يحفظ هذا المحلول في الثلاجة ويبقى صالحا للإستخدام لمدة شهر إلى شهرين.

ويحضر المحلول العملي قبل الاستخدام من الآتي:

محلول فضة المثنمين الرئيسي ..... ٢٥ سم^{٣}

بوراكس (٥٪) ..... ٣ سم^{٣}

(حديث التحضير)

ماء مقطر ..... ٢٥ سم^{٣}

خطوات العمل

١ - مرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢ - انقل القطاعات إلى محلول حمض الكروميك ٥٪ حديث التحضير لمدة ساعة في حمام مائي عند حرارة ٦٠°م ويمكن الاستعاضة عن ذلك بوضع القطاعات في محلول حمض الكروميك ٢٪ لمدة ٤٥ ثانية في جهاز الأمواج الدقيقة ثم تترك بالمحلول بعد ذلك لمدة ٥ دقائق.

٣ - اغسل القطاعات جيدا بالماء العادي.

٤ - انقل القطاعات إلى محلول ثيوكبريتات الصوديوم ١٪ لمدة دقيقة واحدة.

٥ - اغسل القطاعات بالماء العادي ثم بثلاث تبديلات من الماء المقطر.

obeikandl.com

٦ - انقل القطاعات إلى محلول فضة المثنمين العملي لمدة ساعة في حمام مائي عند حرارة ٦٠ °م وحتى ظهور اللون البني. ويستعاض عن ذلك بوضع القطاعات في محلول فضة المثنمين العملي لمدة ٧٠ ثانية في جهاز الأمواج الدقيقة ثم تترك القطاعات داخل المحلول الساخن حتى تصبغ القطاعات بلون بني.

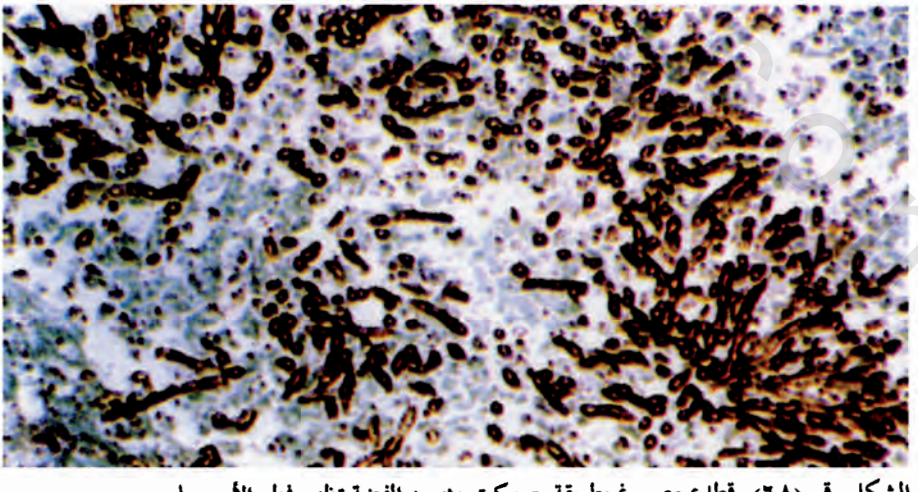
٧ - اغمس القطاعات بتبديلين من الماء المقطر ثم انقلها إلى محلول كلوريد الذهب ٠.٢٪ لمدة دقيقة وحتى تكتسب القطاعات اللون الرصاصي.

٨ - اغسل القطاعات بالماء المقطر ثم انقلها إلى محلول ثيوكبريتات الصوديوم ١٪ حديث التحضير.

٩ - اغسل القطاعات بالماء العادي ثم اغمسها بالماء المقطر ثم انقلها لمدة دقيقة واحدة إلى محلول الأخضر الخفيف ٠,٢٪.

١٠ - مرر القطاعات بتراكيز الكحول التصاعدية ثم روقها بالزايلين وغطها بالمادة الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة : تظهر خلايا الفطريات بلون أسود بينما تكون الخلفية خضراء . (الشكل رقم ٦٨).



الشكل رقم (٦٨). قطاع مصبوغ بطريقة جروكت مثنمين الفضة تظهر فطر الأسبرجلس.

صبغ الأميبا الحالة للنسيج

تستخدم طريقة Amaeba-Gridley's method لصبغ الأميبا الحالة للنسيج *Entamoba histolytica* على أساس أن كريات الدم الحمراء التي تبتلعها هذه الطفيليات الأولية تصطبغ بشكل واضح بصبغة الإيوسين.

المحاليل المستخدمة

محلول الأنلين والإيوسين Aniline - eosin solution

يحضر هذا المحلول من المحتويات التالية :

إيوسين ..... ١,٥ جم

كحول إثيلي ٨٠٪ ..... ١٠٠ سم^{٣}

أنلين ..... ٣ سم^{٣}

حمض الخليك الثلجي ..... ١ سم^{٣}

يبقى هذا المحلول صالحا للإستخدام لمدة ٦ شهور.

محلول أخضر النافثول - ب Naphthol green-B solution

يحضر هذا المحلول من المحتويات التالية :

أخضر نافثول - ب ..... ١ جم

ماء مقطر ..... ١٠٠ سم^{٣}

حمض الخليك الثلجي ..... ١ سم^{٣}

يبقى هذا المحلول صالحا للإستخدام لمدة ٦ شهور .

obeikandl.com

خطوات العمل

١ - مرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢ - انقل إلى محلول هيماتوكسلين هارس لمدة ٥ دقائق.

٣ - اغمس القطاعات في ماء حمضي ثم انقلها مباشرة إلى ماء جاري.

٤ - اغمس القطاعات لمدة ٥ ثواني في ماء قاعدي ثم انقلها إلى ماء جاري.

٥ - انقل القطاعات إلى محول الأنلين والإيوسين لمدة ٥ دقائق.

٦ - اغمس القطاعات بالماء المقطر.

٧ - انقل القطاعات إلى محلول أخضر النافثول - ب لمدة ٥ دقائق.

٨ - انقل القطاعات إلى كحول ٩٥٪ حتى تأخذ كريات الدم الحمراء اللون الوردي.

٩ - مرر القطاعات بتراكيز الكحول التصاعدية ثم روقها بالزايلين وغطها بالمادة الطامرة الراتنجية.

النتيجة

الأميبا الحالة للنسيج ..... خضراء مزرقة

كريات الدم الحمراء..... وردية

الأنسجة الضامة ..... خضراء

صبغ حبيبات نسل

يتم الكشف عن حبيبات نسل Nissel granules في الخلايا العصبية التي تفقد جزيئا أو كليا في الخلايا العصبية أو تعرض للتلف أو ضمور في محاورها أو تشقق غلافها اللين.

يكشف عن حبيبات نسل بواسطة طريقة صبغة إخت للبلور البنفسجي Cresyl-Echt Violet stain ويتم ذلك اعتمادا على أن هذه الحبيبات تعود بالأساس إلى الشبكة الاندوبلازمية الخشنة والتي تحتوي بالأساس على الحمض النووي الرايبوزي الأكسجين (RNA) وهو حمضي الطبيعة وينصبغ بشدة بأصباغ الأنلين القاعدية.

خطوات العمل

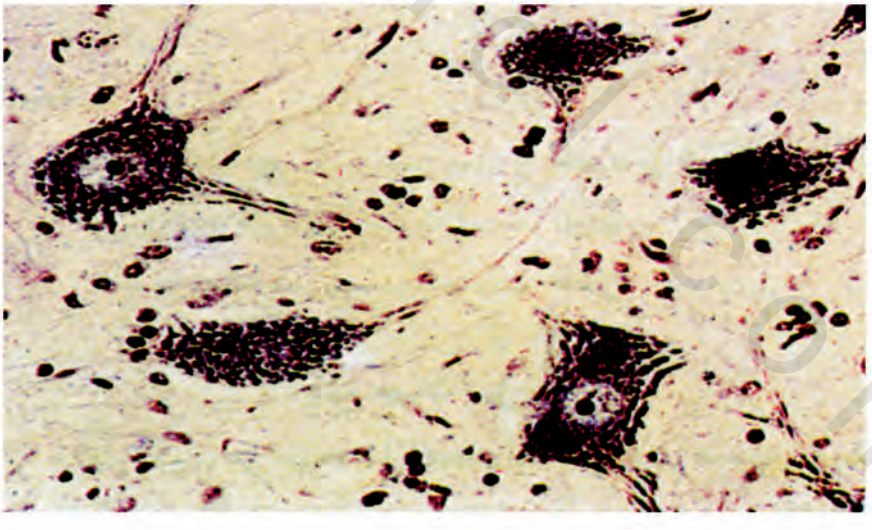
١ - مرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢ - انقل القطاعات إلى محلول إخت للبلور البنفسجي(٠,٥٪) لمدة ٣ دقائق.

٣ - اغسل القطاعات بالماء المقطر.

٤ - مرر القطاعات بتراكيز الكحول التصاعدية وروقها بالزايلين وغطها بأحد المواد الطامرة الراتنيجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة : تظهر حبيبات نسل بلون أزرق غامق إلى بنفسجي. (الشكل رقم ٦٩).



الشكل رقم (٦٩). قطاع مصبوغ بطريقة إخت البلور البنفسجي يظهر حبيبات نسل.

صبغ الخلايا المحبة للإيوسين

يتم الكشف عن هذه الخلايا المحبة للإيوسين على أساس رغبة الحبيبات السيتوبلازمية بها بالإصطباغ بالإيوسين. وتعتبر صبغة لندرم Lendrum من أشهر الطرق المستخدمة لإظهار الخلايا المحبة للإيوسين في القطاعات النسيجية.

المحاليل المستخدمة

محلول هيماتوكسلين ماير

محلول كروموتروب الفينولي Phenol-chromotrope 2R : يصهر ٥ جم من الفينول بواسطة التسخين في وعاء ارلن بواسطة الماء الساخن ثم تضاف إلى ٢,٥ جم من كروموتروب الفينولي وتمزج جيدا ثم يضاف إلى الخليط ١٠٠ سم^{3} ماء مقطر.

طريقة الصبغ

١ - تمرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢ - تنقل القطاعات إلى محلول هيماتوكسلين ماير لمدة ١٠ دقائق.

٣ - تغسل القطاعات بالماء الجاري لمدة ٣ دقائق ثم تغمس بالكحول الحمضي (١٪ حمض هيدروكلوريك في ٧٠٪ كحول إثيلي) لمدة ثانيتين.

٤ - تغمس القطاعات بالماء القاعدي لمدة ١ - ٢ دقيقة ثم تغسل بالماء الجاري.

٥ - تنقل القطاعات إلى محلول كروموتروب الفينولي لمدة ٢٥ دقيقة.

٦ - تغسل القطاعات بالماء الجاري لمدة ١- ٣ دقائق.

٧ - تمرر القطاعات في تراكيز الكحول التصاعدية ثم تروق بالزايلين وتغطى بأحد المواد الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة:

يظهر سيتوبلازم الخلايا المحبة للإيوسين بلون أحمر بينما تصبغ أنويتها بالهيماتوكسلين

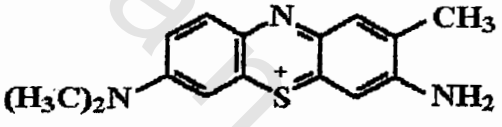
صبغ الخلايا البدينة

تنتشر الخلايا البدينة Mast cells بشكل كبير في الأنسجة الضامة حيث يحتوي سيتوبلازم هذا الخلايا على حبيبات تبادلية اللون مكونة من الهبارين والهستمين. تصبغ الخلايا البدينة بصبغة أزرق التوليدين Toluidine blue كالآتي :

المحاليل المستخدمة

محلول أزرق التوليدين الرئيسي

يحضر هذا المحلول بإذابة ١ جم من أزرق التوليدين في ١٠٠سم^{٣} من كحول إثيلي ٧٠٪ . وهذا المحلول صالح للاستخدام لمدة ٦ أشهر.



(التركيب البنائي لأزرق التوليدين)

محلول أزرق التوليدين العملي

يحضر هذا المحلول مباشرة قبل الاستخدام من المكونات التالية :

محلول أزرق التوليدين الرئيسي ..... ٥ سم^{٣}

محلول كلوريد الصوديوم (١٪) ..... ٤٥ سم^{٣}

خطوات العمل

١ - مرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٢ - انقل القطاعات إلى محلول أزرق التوليدين العملي لمدة ١ - ٢ دقيقة.

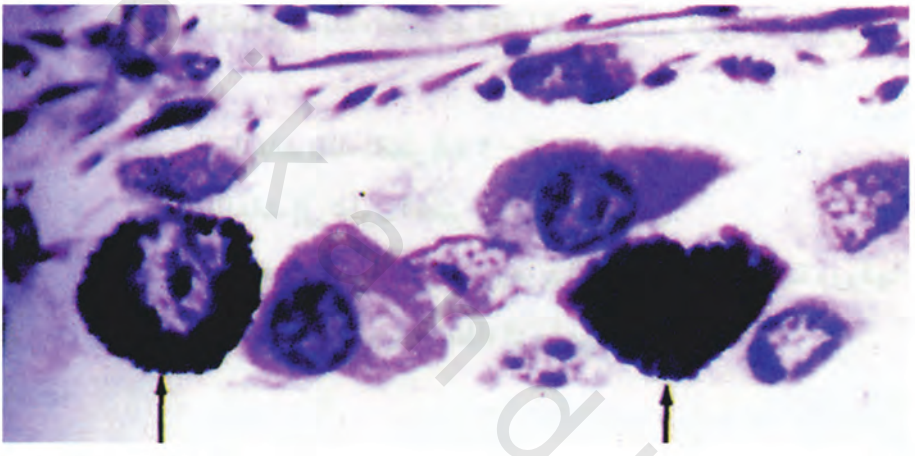
obeikandl.com

٣ - اغمس القطاعات بثلاث تباديل من الماء المقطر.

٤ - انقل القطاعات بسرعة إلى كحول اثيلي ٩٥٪ ثم مررها بالكحول المطلق وروقها بالزايلين وغطها بأحد المواد الطامر الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة

تظهر الخلايا البدينة بلون بنفسجي (الشكل رقم ٧٠).



الشكل رقم (٧٠). قطاع مصبوغ بطريقة أزرق التوليدين يظهر الخلايا البدينة.

صبغ بلورات اليورات

يمكن صبغ بلورات اليورات Urate crystals بطريقة فضة المثنمين لغموري Gomori's methenamiane method . ومبدأ هذه الطريقة أن بلورات اليورات ترتبط بالفضة التي يمكن إظهارها من خلال اختزالها إلى فضة معدنية. وهنا لا بد من الإشارة إلى أن الخزع النسجية التي يراد الكشف عن بلورات اليورات بها يجب أن تنقل بعد التثبيت مباشرة إلى الكحول المطلق ثم تروق بالزايلين وتخلل بواسطة الشمع البرافيني ويجب أن لا يتم امرار العينة بعد التثبيت بالماء ولا بتراكيز الكحول المخففة.

خطوات العمل

١ - ازل الشمع من القطاعات بامرارها بالزايلين ثم الكحول المطلق ويجب أن لا تمرر بتراكيز الكحول التنازلية المخففة.

٢ - انقل القطاعات إلى محلول فضه المثنمين العملي عند حرارة ٦٠ °م في حمام مائي لمدة نصف ساعة.

٣ - اغمس القطاعات بالماء المقطر ثم انقلها إلى محلول ثيوكربونات الصوديوم (٥٪) لمدة ٣ دقائق.

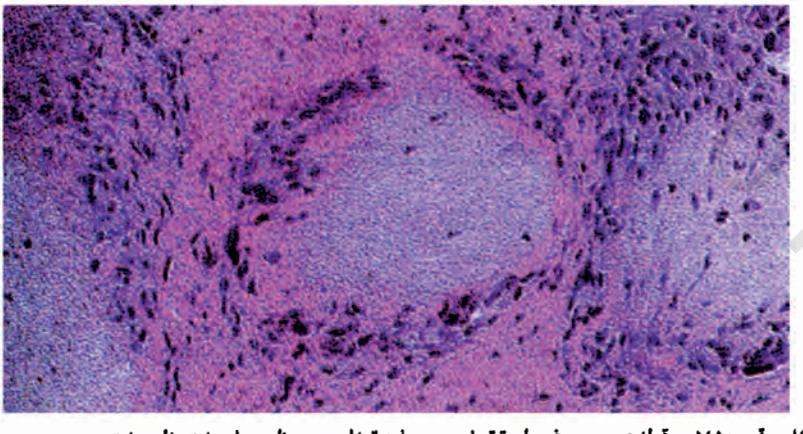
٤ - اغسل القطاعات بالماء المقطر لمدة ٢ - ٣ دقائق.

٥ - انقل القطاعات إلى محلول أخضر خفيف لمدة دقيقتين.

٦ - اغمس القطاعات بالماء المقطر ثم مررها بتراكيز الكحول التنازلية وروقها بالزايلين وغطها بالمادة الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي.

النتيجة

تظهر بلورات اليورات بلون أسود على خلفية خضراء. ولابد من الإشارة إلى أن أملاح الكالسيوم تصطبغ أيضا بلون أسود. (الشكل رقم ٧١).



الشكل رقم (٧١). قطاع مصبوغ بطريقة غموري فضة المثنمين يظهر بلورات اليورات.

صبغ هياكل الأجنة

تعتبر طريقة داوسن المحورة Modified Dawson's method من أفضل الطرق لصبغ هياكل الأجنة التي يمكن إنجازها بالخطوات التالية :

١ - يؤخذ الجنين ويفتح بطنه وتزال أحشائه بالكامل إضافة إلى الكبد لكن لا ضرورة لنزع الدماغ.

٢ - تثبت العينة في كحول ٩٥٪ لمدة أسبوعين أو أكثر.

٣ - تغمس العينة في ماء عادي ثم تنقل إلى محلول كربونات البوتاسيوم ١٪ لمدة شهر.

٤ - يتم ترويق الأعضاء الناعمة بواسطة هيدروكسيد البوتاسيوم ١٪ لمدة ١٥ يوم ولتصليب الأجزاء الناعمة أثناء الترويق ولحمايتها من التكسير فإنه تنقل العينة إلى خليط من كحول ٩٥٪. وجليسرين بنسب متساوية ١ : ١ لمدة ١٢ ساعة ثم تعاد مرة أخرى إلى محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ٠,٥٪ لمدة ١٥ يوم أخرى.

٥ - تنقل العينة إلى محول الزرين أحمر إس ٠,٥٪ Alizarin red S المضاف إليه عشر قطرات من هيدروكسيد البوتاسيوم ١٠٪ لمدة ساعة كاملة.

٦ - تغسل العينة بالماء العادي لمدة ٣٠ دقيقة.

٧ - لإزالة الصبغة الزائدة من العينة فإنها تغمس في جليسرين ٢٠٪ مذاب في محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ١,٥٪ لمدة ١٠ أيام.

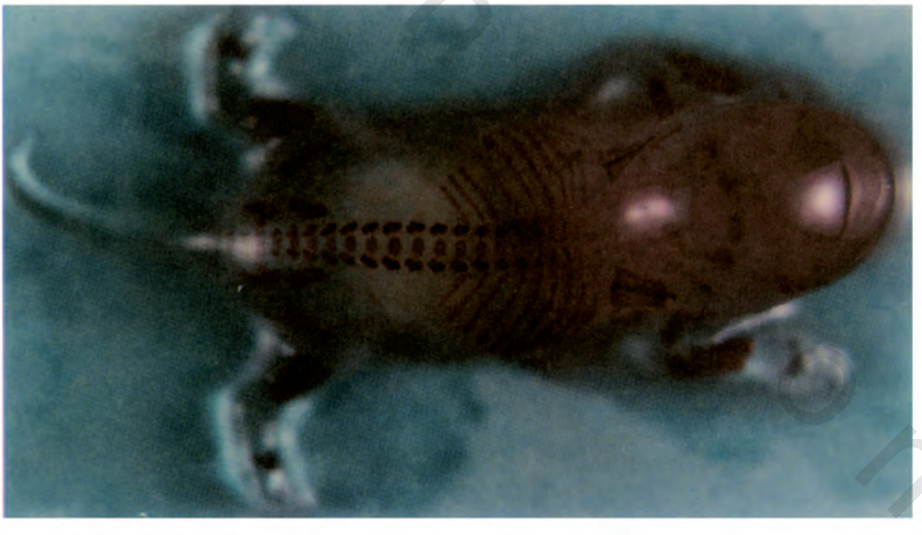
٨ - تمرر العينة خلال تراكيز من الكحول والجليسرين كما يوضح الجدول التالي:

	المحلول الأول	المحلول الثاني	المحلول الثالث	المحلول الرابع	المحلول الخامس
كحول (٩٥٪)	١٠	٢٠	٣٠	٤٠	٥٠
جليسرين	١٠	٢٠	٣٠	٤٠	٥٠
ماء مقطر	٨٠	٦٠	٤٠	٢٠	-

٩ - يملأ الوعاء الأخير (قد يكون زجاجي أو بلاستيكي) بالمحلول الخامس المكون من جليسرين وكحول ٩٥٪ بنسبة ١:١.

النتيجة

يصبغ هيكل الجنين العظمي بلون أحمر غامق (الشكل رقم ٧٢).



الشكل رقم (٧٢). قطاع مصبوغ بطريقة داوسن المحورة.

صبغ الديدان والحشرات

هنالك العديد من الطرق لصبغ الديدان والحشرات والمفصليات الصغيرة أو أجزاء من هذه الكائنات والتي تتم عن طريق التحميلات الكاملة Whole mounts ومن هذه الطرق:

١ - طريقة كارميلم كارمين بوراكس

٢ - طريقة هيماتوكسلين ماير.

يفضل تثبيت العينات المراد صبغها بمثبتات الكحول أو مثبت جندر أو كارنوي أو روسمان. وفي هذه الطرق تستخدم عينات كاملة ويعمل لها طمر كلي Whole mount في محاليل التثبيت ونزع الماء والترويق والصبغ.

صبغة كارمين بوراكس Borax Carmine Stain

تستخدم هذه الطريقة للطمر الكلي للقراد أو الحلم.

محلول الصبغ

يتكون محلول الصبغ من الآتي:

كارمين ..... ٣٠ جم

بوراكس ..... ٤ جم

ماء مقطر ..... ١٠٠ سم^{٣}

تترك هذه المكونات لمدة نصف ساعة أو أكثر حتى يذوب الكارمين بالكامل ثم يضاف إليه ١٠٠ سم^{٣} من الكحول الإثيلي ويترك بعد ذلك لمدة يومين ثم يرشح ويصبح جاهزا للإستخدام.

خطوات الصبغ

١ - تغلى العينات في هيدروكسيد البوتاسيوم ٥٪ في حمام مائي حتى تتحلل الأحشاء. ولا تعمل هذه الخطوة في حالة عينات الحلم أو يرقات القراد وتكون البداية من الخطوة التالية.

٢ - تنقل العينات بواسطة الفرشاة إلى محلول الصبغة لمدة ٥ - ٣٠ ساعة وفي حالة الحلم واليرقات يكفي ٣ ساعات بينما يكفي ٥ ساعات في حالة القراد الناعم.

٣- تغسل العينات بالماء ثم تنقل إلى كحول حمضي (٧٠٪ كحول إثيلي يحتوي على ٣٪ حمض هيدروكلوريك) لمدة ١ - ٢ دقيقة لإزالة الصبغة الزائدة ويستدل على ذلك بتوقف خروج الصبغة من العينات.

٤- تنقل العينات إلى كحول إثيلي ٧٠٪ لمدة ساعتين.

٥- تنقل العينات إلى كحول إثيلي ٩٠٪ لمدة ساعتين.

٦- تنقل العينات إلى كحول مطلق لمدة ساعتين ثم تنقل إلى تبديل آخر من الكحول لمدة ساعتين.

٧- تروق العينات بواسطة زيت خشب الأرز Ceder wood oil أو بواسطة زيت القرنفل Clove oil لمدة ٢٤ ساعة في حالة عينات القراد الجامد بينما تكفي ٤ ساعات في حالة القراد الناعم والحلم ويرقات القراد الجامد.

٨- تنقل العينات إلى ثلاث تباديل متتالية من الزايلين لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة لكل منها.

٩- تنقل كل عينة إلى شريحة زجاجية نظيفة ويتم فرد أرجلها بالسرعة الممكنة حتى لا تجف ثم تغطى في كندا بلسم والغطاء الزجاجي. ويحاط الغطاء الزجاجي بشمع منصهر (الشكل رقم ٧٣).

obeikandl.com

الصبغ الحيوي

يستخدم الصبغ الحيوي Vital staining لإظهار أجزاء من الخلايا الحية حيث يتم إدخال الصبغة إلى داخل الخلية عن طريق البلعمة السيتوبلازمية أو من خلال امتصاص هذه الصبغة من قبل عضيات سيتوبلازمية بواسطة الألفة الاختيارية . ويجب النظر بعين الاعتبار عند الحديث عن الصبغ الحيوي بأن النواة مستعصية على هذا النوع من الصبغ حيث لا يسمح الغلاف النووي بمرور الأصباغ خلاله وأن نفاذ

الشكل رقم (٧٣). عينة قمل *Pediculus capitis* مصبوغة بطريقة كارمين بوراكس.

الأصباغ للغلاف النووي هو مؤشر على بداية احتضار هذه الخلايا . يتم الصبغ الحيوي إما عن طريق غمر الخلايا أو الكائن الحي أو حزمة نسيجية منه بمحلول الصبغ أو عن طريق حقن محلول الصبغ في جسم الكائن الحي . ويعتبر العالم باول آرليخ أول من استخدم الصبغ الحيوي حيث استطاع إظهار الخلايا العصبية الطرفية بواسطة أزرق المثلين . وهنالك العديد من الأصباغ المستخدمة لغرض الصبغ الحيوي مثل أحمر متعادل وأزرق تريبان Trypan blue وأخضر جينس Janus green وأزرق النيلي حيث يستخدم أزرق النيلي في إظهار النتوءات الدهنية في الخلايا الحية بينما تعمل صبغة أخضر جنيس على إظهار الميتوكوندريا في هذه الخلايا . وكما تستخدم صبغة أزرق تريبان المكونة من جسيمات غروية معلقة في إظهار خلايا الجهاز الإندوثيلي الشبكي.

يستخدم الصبغ الحيوي في العديد من التطبيقات ونتطرق هنا إلى استخدام أزرق المثلين في صبغ الألياف العصبية والنهايات العصبية في الخزع العضلية . ومبدأ الصبغ هنا هو العمل على اختزال أزرق المثلين قبل دخوله إلى ألياف وخلايا النسيج ثم أكسدته مرة أخرى داخل الخلايا بواسطة مولبدات الأمونيوم ليعود إلى لونه الأزرق .

محلول أزرق المثلين

يحضر هذا المحلول من الآتي :

أزرق مثلين طبي (خالي من الخارصين)	٥٠ ملجم
ماء مقطر معقم	١٠٠ سم^{٣}
كلوريد الصوديوم	٠,٨٥ جم

تضاف هذه المواد على التوالي حتى يتم الحصول على محلول صبغ متعادل الضغط الأسموزي (جدول رقم ٦) .

خطوات العمل

١- يتم حقن أزرق المثلين في الخزعة النسيجية لمدة ٥-١٠ دقائق وإذا كانت الخزعة صغيرة فإنه يتم طمرها بمحلول الصبغ كما هو الحال في الخزع العضلية والجلدية.

٢- يتم تقطيع الخزع النسيجية إلى أجزاء طولية لا يزيد سمك كل منها من ٣ ملم .

٣- تنقل الأجزاء النسجية إلى طبق بتري محتوي على ورق ترشيح أو ورق نشاف مشبع بالمحلول الفسيولوجي مع إمرار الأكسجين على الأجزاء النسيجية بمعدل ٤ لترات بالدقيقة . تستمر هذه الخطوة لغرض أكسدة أزرق المثلين لمدة ساعة مع الحرص على استمرار تقليب الأجزاء النسيجية باستمرار وبقاء جميع سطوحها رطبة وأن لا تجف هذه السطوح .

٤- تنقل الخزعة النسيجية إلى محلول مولبدات الأمونيوم المائي ٨٪ البارد عند حرارة ١-٤م ولمدة ٢٤ ساعة .

٥- تغسل الأجزاء النسيجية لمدة نصف ساعة في عدة تباديل من الماء المقطر .

٦- تنقل الأجزاء النسيجية إلى محلول الفورمالين ١٠٪ لمدة ٢٤ ساعة .

٧- تغسل الأجزاء النسيجية بالماء المقطر ويمكن سحق جزء منها من خلال وضعها بين شريحتين واستخدام ضغط مناسب يعمل على فرد خلايا وألياف القطعة النسيجية . تمرر بعدها بتراكيز الكحول التصاعدية وتروق بالزايلين وتغطى بالمادة الطامرة الراتنجية والغطاء الزجاجي. وإذا تعذر سحب القطع النسيجية كما هو الحال في خزع الجلد ، فإنه يتم تحضير قطاعات ثلجية عند سمك ٥٠-٨٠ ميكرومتر .

النتيجة

تظهر الألياف العصبية ونهايات الأعصاب بلون أزرق .

ومن استخدامات الصبغ الحيوي الكشف عن الحيوانات المنوية الميتة في المني حيث يمكن تحديد نسبة الحيوانات المنوية الحية والميتة Viability test تبعا لما يلي :

محلول أ : يذاب ٢.٢ جم من فوسفات الصوديوم في ٥٠ مل ماء مقطر .

محلول ب : يذاب ٠,٨٥ جم من فوسفات البوتاسيوم في ٥٠ مل ماء مقطر .

تخلط الكميتان ثم يضاف إليهما ٢ جم من صبغة أخضر سريع Fast green وتخلط جيدا ثم يضاف ٠,٤ جم من صبغة الإيوسين المزرق Bluish eosin وتخلط جيدا . يغلى بعد ذلك المحلول ويرشح بواسطة ورق الترشيح .

خطوات العمل

١- تخلط قطرة من المني مع قطرة من محلول الصبغة على شريحة نظيفة جافة ، ثم تعمل مسحة على الشريحة بوساطة غطاء زجاجي وبزاوية ميل ٤٥ م .

٢- تجفف الشريحة بسرعة باستخدام صفيحة ساخنة .

٣- تحسب نسبة الحيوانات الميتة والحية من مواقع عشوائية مختلفة على الشريحة ، إذ أن الحيوانات المنوية الميتة تمتص الصبغة والحية ترفضها وتظهر بيضاء بدون صبغة.

الجدول رقم (٥). بعض الصبغات الخاصة المستخدمة في مختبرات الأنسجة.

المراد صبغه	الصبغات المستخدمة
الأمليود Amyloid	صبغة أحمر كونغو
	صبغة أحمر سرس Sirius red
	صبغة أزرق الألشيان
	صبغة ثيوفلافين Thioflavin

تابع الجدول رقم (٥).

المراد صبغه	الصبغات المستخدمة
الكولاجين	بكرورفوكسين Picro-fuchsin
	صبغة بكروفوكسين لفان جيسن Van Gieson's picro-fuchsin
	صبغة بكرو أحمر سرس لبتجلر Puchtler's Picro-Sirirs red
	طريقة بريلمير ثلاثية الألوان Brillmeyer`s trichrome
الفطريات	الأكردين البرتقالي الفلورسيني Acridine orange fluroescence
	الأكروين البرتقالي الفروسيني - شيف Acridine orange fluorescence Shiff
	صبغة فضة المثنمين لجروكت
جرثومة هيلاكوباكتر *Helicobacler pylori*	اصفر الألشيان - أزرق التوليدين Alcian yellow- toluidine blue
	صبغة كيمزا - السريعة لهاليكو Haleco rapid Geimsa
	صبغة Silver spirochetes
	صبغة الأكردين البرتقالي Acridine orange
العظم	الهيماتوكسلين والإيوسين (بغض النظر عن المادة الطامر المستخدمة)
	صبغة ثايونين - حمض البكريك لشمورل (الطمر بالسلوئيدين)
	صبغة فون كسا (بغض النظر عن المادة الطامرة المستخدمة)
	صبغة سيانين السلوكروم Solochrome cyanine

الجدول رقم (٦). الفترة الزمنية لصلاحية محاليل الصبغ.

محلول الصبغ	الصلاحية
هيماتوكسلين ماير	محلول رئيسي : ٦ - ٨ شهور
	محلول عملي : أسبوعان
هيماتوكسلين هارس	محلول رئيسي : ٦ شهور
	محلول عملي : اسبوعان
هيماتوكسلين فكرت Weigert's haematoxylin	محلول رئيسي : ٤ شهور
	محلول عملي : أسبوع واحد
إيوسين كحولي	محلول رئيسي : ٤ شهور

تابع – الجدول رقم (٦).

محلول الصبغ	الصلاحيـــة
فلوكسين - ب المائى Phloxin B	محلول رئيسى : ٤ شهور
حمض البيريوديك	شهرين ويطرح بعد استخدامه لمرة واحدة
كاشف شيف	٣ شهور مع حفظه بالثلاجة
أخضر خفيف Light green	شهر ويطرح إذا لوحظ نمو فطري
محلول الديستاز	أسبوع بالثلاجة
ألدهيد الفوكسين	شهرين بالثلاجة ، وتقل فعاليته بالتدريج ويفضل استخدامه حديث التحضير
متانل الأصفر Metanil yellow	شهرين
نيترات الفضة	أسبوعان بالثلاجة
المثنمين Methenamine	شهر بالثلاجة
بوراكس	محلول رئيسي : ٦ شهور محلول عملي : ٢٤ ساعة ويطرح بعد الاستخدام
كلوريد الذهب	٦ شهور، ولا يستخدم أكثر من ٣ مرات
ثيوكبريتات الصوديوم	٦ شهور ويطرح بعد استخدامه مرة واحدة
أزرق المثلين	٣ شهور
محلول البلور البنفسجي Crystal violet	٣ شهور، يطرح المحلول بعد الاستخدام
ثاني كربونات الصوديوم	٦ شهور يطرح المحلول بعد الاستخدام
يود غرام	شهرين ، يطرح المحلول بعد الاستخدام
الفوكسين القاعدي	شهر واحد ، يطرح المحلول بعد الاستخدام لمرة واحدة
حمض البكريك المائي المشبع	٦ شهور ، يطرح بعد الاستخدام الأول
محلول كيمزا	٣ شهور ، يطرح بعد الاستخدام الأول
محلول الحديد الغروي Colloidal iron	٢٤ ساعة، يطرح بعد الاستخدام الأول
فان جيسن	٤ شهور
سيانيد الحديدوز البوتاسيومي	٦ شهور
الهيالورنداز	أسبوعان بالثلاجة

obeikandl.com

تابع – الجدول رقم (٦).

محلول الصبغ	الصلاحيـــة
أزرق الألشيان	شهران
يود كحولي	أسبوعان
هيماتوكســـــلين حمـــــض التنغستات الفسفوري PTAH	لسنوات ، يحفظ بالثلاجة
أزرق الأنلين	شهرين
الهيدروكينون	شهر واحد ، يحفظ بالثلاجة
الفوكسين الحمضي ١٪	٦ شهور
أحمر كنغو	٦ شهور
أخضر سريع	محلول رئيسي : شهران / محلوي عملي : اسبوعان
أخضر المثيل	٦ شهور
أحمر سريع	شهران
أحمر زيتي – و	محلول رئيسي : سنة واحدة / محلول عملي : ٤ شهور
البرتقالي – ج	٣ شهور
بايرونين – واي	٦ شهور
أسود سودان – ب	سنة واحدة
أزرق التولئدين	٦ شهور
محلول فيرهوف Verhoeff's elastic	سنتان
الفضة الأمونية	شهر واحد
كلوريد الحديديك ٢٪	شهر واحد
كربونات الليثيوم المشبعة	٦ شهور
حمض الخليك الثلجي ٣ ٪	٦ شهور ، يستخدم المحلول لمرة واحدة
محلول الفورمالين ١٠ ٪	٦ شهور ، يستخدم المحلول لمرة واحدة
المحاليل المنظمة	من أشهر وحتى سنوات
نيترات الفضة	٦ شهور بالثلاجة بداخل قارورة داكنة
هيدروكسيل الصوديوم ٣ ٪	٣ شهور بالثلاجة

obeikandi.com