الفصل التاسع

التحضيرات الخلوية Cytological Techniques

الحبيبات السبحية (الميتوكوندريا) Mitochondria

تبدو الميتوكوندريا عند الفحص بالمجهر الضوئى كحبيبات أو عصى قصيرة أو خيوط فى السيتوبلازم. وللميتوكوندريا قابلية للصباغة بالأوزميوم نتيجة احتوائها على الدهون، كما تحتوى الميتوكوندريا على عدد كبير من الانزيمات التى تلعب دورا هاما فى عمليات التنفس الخلوى. وسنعرض فيما يلى لبعض طرق صباغة الميتوكوندريا.

طريقة التهان Altman's method:

١ – ضع قطعا صغيرة من العينات فى مثبت ريجو Regaud fixative لمدة ٤ أيام فى الثلاجة، غير المحلول يوميا.

٢ – رسخ العينات فى ٣٪ بيكرومات البوتاسيوم لمدة ثمانية أيام عند درجة ٣٧°م، غير محلول كل ثانى يوم.

٣ – اغسل العينات فى الماء الجارى لمدة ١٢ ساعة.

٤ – انزع الماء من العينات بسلسلة صاعدة من الكحول ثم روق العينات وأطمرها فى الشمع، وجهز قطاعات بسمك ٤ ميكرون.

٥ – حضر محلول مشبع من الإثيلين فى الماء المقطر، وذلك بأن ترج الاثنين معا ثم ترشح. ضف ١٠ جم فوكسين حامضى Acid fachsin إلى كل ١٠٠ سم^3 من الرشيح. لا تستعمل هذا الصبغ إلا بعد ٢٤ ساعة وهو صالح لمدة شهر فقط.

خطوات الصباغة:

٦ – أزل شمع القطاعات ومررها فى سلسلة هابطة من الكحول إلى الماء.

٧ – ضع القطاعات لمدة نصف دقيقة فى محلول ١٪ برمنجنات البوتاسيوم.

٨ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر ثم بيض فى ٥٪ حمض اوكساليك.

٩ – اغمس القطاعات فى عدة تغييرات من الماء المقطر (كلها لمدة دقيقتين).

١٠ – سخن محلول الصبغ حتى يتصاعد منه البخار ثم ضع الشرائح فيه بعد أن تبعد المحلول عن المصدر الحرارى (انظر ملحوظة ١).

١١ – ميز الصبغ باستخدام ١٪ كربونات صوديوم حتى يصبح لون الأرضية السيتوبلازمية قرمزيا باهتا جدا (انظر ملحوظة ٢).

١٢ – اغمس الشرائح فى ١٪ حمض يد كل Hcl لتحسين لون الصباغة.

١٣ – اغسل القطاعات فى ماء مقطر عدة مرات.

١٤ – مرر القطاعات فى سلسلة «صاعدة» من الكحول ثم روق وغط القطاعات بواسطة كندا بلسم.

النتائج: تصبغ الميتوكوندريا باللون الأحمر الزاهى.

ملحوظة ١:

يمكنك أيضا أن تضع قطرة من الصبغة على القطاعات، سخن الشريحة على لهب هادئ حتى تتصاعد أبخرة من الصبغ، ابعد الشريحة عن مصدر اللهب لبرهة ثم كرر التسخين ٣–٤ مرات لمدة خمس دقائق. اغسل الشريحة فى ماء مقطر ثم انزع الماء بالكحول.

ملحوظة ٢:

يمكنك أيضا استخدام محلولين من حمض البكريك الكحولى لتمييز الصبغ. تغسل الشرائح بالماء المقطر بينهما.

محلول مميز ١:

حمض بكريك مشبع فى الكحول	Alcohol saturated	٢٠ سم٣
٣٠٪ كحول	30% Alcohol	٨٠ سم٣

محلول مميز ٢:

حمض بكريك مشبع بالكحول	with picric acid	١٠ سم٣
٣٠٪ كحول	30% Alcohol	٨٠ سم٣

طريقة هايدن هان ايرن هيماتوكسيلين Heidenhain Iron Haematoxylin:

١ – جهز قطاعات شمعية كما اتبعت فى الطريقة السابقة (الخطوات من ١–٤).

٢ – مرر القطاعات حتى الماء المقطر.

٣ – ضع القطاعات فى محلول ٥٪ ايرن ألم (كبريتات الحديد الأمونيومية) Iron alum لمدة ساعة عند درجة ٥٦°م. راعى حفظ هذا المحلول فى الثلاجة لتقليل ترسيب الملح على جدران الزجاجة.

٤ – اغسل الشرائح فى الماء ثم ضعها فى محلول هيماتوكسيلين لمدة ساعة واحدة عند درجة ٥٦°م (٩٠ سم٣ ماء مقطر + ١٠ سم٣ كحول ايثيلى + ½ جم هيماتوكسيلين، ويراعى ترك المحلول لمدة ٦ أسابيع قبل استعماله حتى ينضج) – انظر أيضا ملحوظة (١).

٥ – اغسل الشرائح فى الماء ثم ميز الصبغ فى محلول ١٪ أيرن ألم مع فحص الشرائح كل دقيقة

obeikandi.com

تقريبا حتى تتبين لك الميتوكوندريا بلون أزرق داكن وتكون الأرضية السيتوبلازمية عدية اللون أو مائلة إلى الصفرة.

٦ - اغسل الشرائح بالماء لعدة دقائق.

٧ - انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ثم روق وغط بالكندا بلسم.

النتائج:

الميتوكوندريا ..... أزرق يميل إلى السواد

الأرضية السيتوبلازمية..... عدية اللون

ملحوظة ١:

يمكنك أيضا تحضير محلول الصبغ بالطريقة الآتية:

(ذوب ١٠ جم هيباتوكسيلين فى ١٠٠ سم^3 من ٩٥٪ كحول اثيلى واترك المحلول لمدة من ٤-٥ شهور. وعند الإستخدام أضف ٤-٥ سم^3 من هذا المحلول إلى ١٠٠ سم^3 من كربونات الليثيوم. المحلول المعد للاستخدام لا يصلح بعد ٢٤ ساعة من تحضيره).

طريقة حمض الأوزميك Osmic Technique:

١ - ثبت العينات فى محلول زنكر Zenker fluid.

٢ - اغسل العينات لمدة من ٨-١٢ ساعة.

٣ - ضع العينات فى ٢٪ حمض أوزميك لمدة ٤-٦ أيام، غير المحلول كل ثانى يوم.

٤ - اغسل العينات لمدة تتراوح من ٨-١٢ ساعة.

٥ - انزع الماء من العينات بسلسلة صاعدة من الكحول ثم روق العينات بالبنزين (وليس الزيلول) ثم اطمرها فى الشمع.

٦ - جهز قطاعات بسمك ٥ ميكرون.

٧ - بيض أرضية سيتوبلازم الخلايا باستخدام برمنجنات البوتاسيوم ثم اغسل الشرائح بالماء الجارى لمدة ١٥ دقيقة. انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ثم روق وغط بالكندا بلسم.

جهاز جولجى
Golgi Apparatus

يوجد جهاز جولجى فى الطرز المختلفة من خلايا الفقاريات - باستثناء الخلايا التناسلية - على هيئة تركيب شبكى، أما الخلايا التناسلية وجميع خلايا اللافقاريات، وكذلك الخلايا النباتية، فإن جهاز جولجى يوجد فيها على هيئة عصى مقوسة يطلق عليها اسم **الدكتيوسومات Dictyosomes**.

وجهاز جولجى له موضع خاص مميز فى كثير من طرز الخلايا، ففى خلايا الأجزاء القنوية من البنكرياس، يوجد جهاز جولجى فى القطب الافرازى للخلية، بينما يحيط بالنواة فى الخلايا العصبية.

كما أن موقع جهاز جولجى يعتمد على كثير من الإعتبارات الأخرى مثل عمر الحيوان والحالة الفسيولوجية وبعض الحالات المرضية.

ومن المعروف أن لجهاز جولجى قابلية شديدة لترسيب نيترات الفضة ورابع اكسيد الأوزميوم.

وكان العالم الايطالى كاميللوجولجى Camillo Golgi عام ١٨٩٨ هو الذى اكتشف هذا التركيب الخلوى فى الخلايا العصبية للبومة وحيوانات أخرى فى عينات مثبتة فى الكرومات وذلك باستخدام نيترات الفضة. وكان كوبشى Kopsch هو الذى أقر استخدام الازميوم (عام ١٩٠٢) لإظهار هذا الجهاز، فضلا على انه اقترح مثبت جديد سمى باسمه يتكون من الفورمالين والبيكرومات. وخلال الربع الأول من هذا القرن توصل مجموعة من المهتمين بجهاز جولجى الى عدد من المثبتات سميت بأسماء هؤلاء الباحثين مثل مان Mann، كولاتشيف Kolachev، ناسونوف Nassonov، تشامبى Champy (انظر تركيب المثبتات) وهى كلها تستخدم عند الصباغة بالاوزميوم. كما اقترح بعض الباحثين طرقا للصباغة بالفضة مثل طريقة كاهال Cajal method التى يستخدم فيها مادة استيات اليورانيوم Uranium acetate فى عمل المثبت، وطريقة دافانو Da Fana (نترات الكوبلت) التى يستخدم فيها مادة نيترات الكوبالت فى عمل المثبت، وطريقة أوياما Aoyama التى يستخدم فيها كلوريد الكاديوم فى عمل المثبت، وطريقة الفمان Elftmann's method التى يستخدم فيها محلول يحتوى على الفورمالين ونيترات الفضة كمثبت وصبغ فى نفس الوقت.

وسنعرض فيما يلى بعض من الطرق المستعملة لإظهار جهاز جولجى:

طريقة كولاتشيف - ناسونوف Kolachev - Nassonov Method:

١ - ثبت قطع صغيرة من العينة فى المحلول الآتى لمدة ٢٤ ساعة وذلك فى زجاجة داكنة اللون.

٣٪ بيكرومات البوتاسيوم	3% Potassium bichromate	١٠ سم٣
١٪ حمض كروميك	Chromic axid	١٠ سم٣
٢٪ حمض أوزميك	Osmic acid	٥ سم٣

٢ - اغسل العينات فى الماء الجارى لمدة ٢٤ ساعة.

٣ - ضع العينات فى محلول ٢٪ حمض أوزميك لمدة ٨ ساعات عند درجة ٤٠° م أو لمدة ٣-٥ أيام عند درجة ٣٥°م.

٤ - اغسل فى ماء جارى لمدة ١٢ ساعة.

٥ - انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول.

٦ - روق العينات فى زيت الأرز Cedar wood ail ثم اطمر العينات فى الشمع ثم اقطع القطاعات واذا وجدت صعوبة فى عملية التقطيع، لين الشمع فى الماء.

ملحوظة:

إذا تبين أن القطاعات صباغتها داكنة، فإنه يمكن إصلاح الصباغة بعملية تبييض Bleaching

(وهى عملية أكسدة) يستخدم فيها أى من التربنتينا - فوق أكسيد الهيدروجين - برمنجنات البوتاسيوم.

التبييض باستخدام التربنتين Bleaching by Terpentene:

ولتحقيق ذلك الغرض تنقل الشرائح بعد ازالة الشمع بالمذيب إلى التربنتين لمدة تتراوح من ١٥ دقيقة إلى ٤٨ ساعة يتم خلالها فحص الشرائح، وإذا ما تم الحصول على درجة التبييض المطلوبة توقف عملية التبييض عند هذا الحد وتغسل الشرائح بالمذيب ثم تغطى القطاعات بواسطة كندا بلسم.

التبييض باستخدام فوق أكسيد الهيدروجين Bleaching by Hydrogen Peroxide:

بعد إزالة الشمع من على القطاعات تمرر الشرائح فى سلسلة «هابطة» من الكحولات حتى الماء ثم توضع القطاعات فى محلول مخفف من فوق أكسيد الهيدروجين (٤ قطرات من فوق أكسيد الهيدروجين تضاف إلى كل ١٠٠ سم٣ ماء مقطر) وذلك لمدة من ١٥ ثانية إلى دقيقة واحدة. توقف عملية التبييض يغسل الشرائح فى الماء ثم ينزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحولات ثم تروق القطاعات فى الزيلول وتغطى بواسطة كندا بالسم.

التبييض باستخدام برمنجنات البوتاسيوم Bleaching by Potassium Permanganate:

بعد إزالة الشمع من على القطاعات تمرر الشرائح فى سلسلة هابطة من الكحولات حتى الماء ثم توضع القطاعات فى محلول ١٪ برمنجنات البوتاسيوم لمدة تتراوح بين ١٥ ثانية إلى دقيقة واحدة ثم تغسل القطاعات فى الماء المقطر وتوضع فى محلول ١٪ حمض الأوكساليك أو ٢٪ ميتاكبريتيت الصوديوم. تغسل القطاعات جيدا فى ماء صنبور ثم ينزع الماء وتستكمل الخطوات كالمعتاد.

طريقتا رامون كاهال (نيترات اليورانيل) ودافانو (نيترات الكوبالت)
Ramon Y Cajal Method and Dafano Method

١ - ثبت قطعًا صغيرة من النسيج فى مثبت كاهال أو دافانو لمدة تتراوح بين ٦، ٢٤ ساعة فى درجة حرارة الغرفة أو عند ١٠°م.

٢ - اغمس العينات لثوان معدودة فى الماء المقطر.

٣ - اصبغ العينات فى محلول ١٪ نيترات الفضة لمدة تتراوح من ٢٤-٤٨ ساعة فى درجة حرارة الغرفة، وقد يفضل الصباغة عند درجة حرارة ١٠°م.

٤ - اغسل العينات جيدا لمدة تتراوح بين ١٥-٤٥ دقيقة فى ٣-٤ تغيرات من الماء المقطر.

٥ - ضع العينات لمدة ٢٤ ساعة فى المحلول المختزل الآتى (يتم تحضيره قبيل الاستعمال مباشرة):

فورمالين متعادل Neutral formalin	١٥ سم٣
ماء مقطر Dist water	٨٥ سم٣

هيدروكينون	Hydroquinone	١ جم
كبريتيت صوديوم لامائية	Anhydrous sodium sulphite	٠,٣ جم

٦ – اغسل العينات فى ماء جارى.

٧ – انزع الماء من العينات – روق العينات ثم اطمر فى الشمع وجهز قطاعات بسمك ٥ ميكرون ثم أزل من القطاعات ومرر بسلسلة هابطة من الكحول ثم افحص القطاعات فى هذه المرحلة، فإن بدت أرضية سيتوبلازم الخلايا ذات لون بنى داكن، فيمكنك ترويق اللون بوضع القطاعات لمدة دقيقة أو دقيقتين فى محلول ٠,٢٪ كلوريد ذهب ثم اغمسها فى ماء مقطر. ضع القطاعات بعد ذلك فى محلول ١٪ ثيوكبريتات الصوديوم لمدة دقيقة واحدة ثم اغسلها لمدة خمس دقائق فى ماء جارى ثم انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ثم روق فى الزيلول. غط القطاعات بالكندا بلسم.

طريقة أوياما (كلوريد الكادميوم) Aoyama Method:

١ – ثبت قطع صغيرة من العينة لمدة ٣–٥ ساعات فى محلول أوياما وذلك فى درجة حرارة الغرفة.

٢ – اغسل العينات جيدا لمدة خمس دقائق فى عدة تغييرات من الماء المقطر.

٣ – ضع العينات فى محلول ١٪ نيترات الفضة (1% Silver nitrate) لمدة ١٠–١٥ ساعة وذلك فى زجاجة داكنة اللون.

٤ – اغسل العينات بسرعة فى تغييرتين من الماء المقطر.

٥ – ضع العينات فى محلول مختزل لمدة ١٠ ساعات فى درجة حرارة الغرفة. ويتكون المحلول من:

فورمالين متعادل	Neutral formalin	١٥ سم^3
ماء مقطر	Dist water	٨٥ سم^3
هيدروكينون	Hydroquinone	١ جم
كبريتيت صوديوم لامائية	Anhydrous sodium sulphite	٠,٣ جم

٦ – اغسل العينات فى ماء صنبور جارى.

٧ – انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول – روق – اطمر فى الشمع. ثم جهز قطاعات بسمك ٤–٥ ميكرون.

ملحوظة:

قدم «موسى» تعديلا لهذه الطريقة (١٩٤٩) وكان التعديل ينصب أساسا على تغيير توقيتات المراحل المختلفة. حيث مدة التثبيت كانت ٥ ساعات وغسل العينات بعده لمدة ١٠ دقائق ومدة الصباغة بالفضة ٤٨ ساعة ومدة وضع العينات فى المحلول المختزل ٣٠ ساعة. كما أنه اقترح أن

يكون تركيز محلول الفضة ١,٥٪ وقد حصل موسى على نتائج ممتازة باستخدام هذه التعديلات مع العقد العصبية للثدييات الصغيرة.

طريقة الفمان Elftman's Method :

١ – تبت قطع صغيرة من العينة لمدة من ساعتين إلى ثلاثة فى المحلول الآتى فى درجة حرارة الغرفة وذلك باستخدام زجاجة داكنة اللون.

فورمالين متعادل	Neutral formalin	١٠ سم٣
مـاء مقطـر	Dist water	٩٠ سم٣
نيترات فضة	Silver nitrate	٢ جم

٢ – اغمس العينات بسرعة فى ماء مقطر.

٣ – ضع العينات فى المحلول المختزل الاتى لمدة ساعتين:

فورمالين متعادل	Neutral formalin	١٥ سم٣
مـاء مقطـر	Dist water	٨٥ سم٣
هيدروكينون	Hydroquinone	,٠٢ جم

٤ – اغسل فى ماء مقطر.

٥ – أعد عملية التثبت – إذا كان هناك ضرورة لذلك – لمدة ١٠ ساعات فى ١٠٪ فورمالين.

٦ – انزع الماء – روق العينات ثم اطمر فى الشمع وجهز القطاعات للفحص.

الليفات العصبية Neurofibrils

يظهر ما يسمى بالليفات العصبية عند صباغة الخلايا العصبية بالفضة، وهى تبدو كشبكة من الليفات فى الستوبلازم، وتتجه الليفات متوازية داخل التفرعات الشجيرية والمحور. ومن المعتقد أن الليفات العصبية هى ما يظهر نتيجة ترسب أملاح الفضة بين حزم الخيوطات العصبية Neurofilaments. التى لا تظهر إلا بالمجهر الالكترونى.

طريقة رامون يا كاهال Ramon Y Cajal Method :

١ – ضع قطعة نسيج حجمها صغير نسبيا فى محلول يتكون من ٩٥ سم٣ من ٧٠٪ كحول + ٥ سم٣ حمض خليك ثلجى وذلك لمدة ٦ ساعات.

٢ – انقل العينة إلى ٨٠٪ كحول لمدة ستة ساعات.

٣ – انقل العينة إلى كحول امونيومى لمدة ٢٤–٣٦ ساعة.

* إذا كانت العينة نخاع مستطيل أضف ٩ قطرات من الأمونيا إلى ٥٠ سم٣ من ٩٥٪ كحول.

* بالنسبة لأجزاء الجهاز العصبى الأخرى أضف ٤ قطرات فقط من الامونيا إلى ٥٠ سم٣ من ٩٥٪ كحول.

٤ – اغسل العينة بالماء المقطر عدة مرات حتى تجد العينة قد هبطت فى قاع الوعاء.

٥ – ضع العينة فى البيريدين لمدة ١-٢ يوم.

٦ – اغسل فى الماء الجارى لمدة ١٢ ساعة ثم إغسل فى الماء المقطر عدة مرات.

٧ – ضع العينة على روقة ترشيح لتجف ثم ضعها فى محلول ١,٥٪ نيترات فضة لمدة خمسة أيام بعيدا عن الضوء فى درجة رحرارة ٣٨°م.

٨ – اغسل العينة فى الماء المقطر ثم ضعها فى محلول كاهال المختزل:

فورمالين متعادل	Neutral formalin	١٥ سم^3
مـاء مقطـر	Dist water	١٠٠ سم^3
هيدروكينون أو حمض البيروجالك	Hydroquinone or pyrogallic acid	١.٠ جم

٩ – اغمس العينة فى الماء المقطر عدة مرات على مدى ساعة واحدة.

١٠ – انزع الماء من العينة بسلسلة صاعدة من الكحول ثم روقها واطمر فى الشمع.

١١ – جهز قطاعات بسمك حوالى ١٥ ميكرون مع مراعاة أن يكون اتجاه القطع عمود على اتجاه العضو.

١٢ – أزل الشمع وغط بالكندا بلسم.

النتائج:

اللييفات العصبية .... سوداء اللون

تسوية الأرضيـة .... بنية إلى صفراء

أجسام نسل Nissl Bodies

أن ما سمى بأجسام نسل هو عبارة عن تجمعات من أغشية الشبكة الإندوبلازمية المحببة وما بين صهاريجها من ريبوسومات حرة وبوليسومات. وقد وجد أن أجسام نسل غنية بأحماض أمينية معينة وكذلك بالحديد. ويعتبر حمض ح‌رن فى الريبوسومات هو المسئول عن قابلية أجسام نسل للصبغات القاعدية.

صباغة أجسام نسل باستخدام صبغ جمسا Giemsa Method:

١ – ثبت العينة (المحتوية على خلايا عصبية) فى محلول كارنوى.

٢ – جهز قطاعات شمعية بسمك ٥ ميكرون.

٣ – اصبغ القطاعات فى محلول صبغ جمسا لمدة ٢٤ ساعة (انظر ملحوظة ١).

٤ – ميز الصبغ فى ٧٠٪ كحول مستعينا بالميكروسكوب حتى يمكنك تحديد درجة التمييز المناسبة.

٥ – انزع الماء بواسطة ٩٦٪ كحول ثم كحول مطلق.

٦ – روق القطاعات فى الزيلول ثم غطى بالكناد بالسم.

النتائج: تبدو أجسام نسل كحبيبات أو الواح صغيرة منتشرة فى السيتوبلازم وذات لون أزرق.

ملحوظة ١:

يمكنك تحضير صبغ جمسا بغرض إستعماله فى الصباغة بأحد الطريقتين الآتيتين حسب طبيعة مادة جمسا المتوفرة لديك.

الطريقة الأولى:

سائل صبغ جمسا	Giemsa solution	١,٢٥ سم^٣
كحول مثيلى نقى	Methyl alcohol	١,٥ سم^٣
$\frac{١}{٢}$ ٪ بيكربونات صوديوم	Sodium bicarbonate	نقطتين
مـاء مقطـر	Dist. water	٥٠ سم^٣

الطريقة الثانية:

١ – أذب $\frac{١}{٢}$ جم من بودرة صبغ جمسا فى ٣٣ سم^٣ من الجلسرين عند درجة حرارة ٦٠°م لمدة ١,٥–٢ ساعة. أضف بعد ذلك ٣٣ سم^٣ من الكحول المثيلى.

٢ – عند تحضير محلول الصباغة، أضف ٣ سم^{٣}من المحلول السابق تحضيره إلى ٦٠ سم^٣ ماء مقطر.

صباغة أجسام نسل باستخدام الكريزيل فاست فيوليت Cresyl Fast Violet Method:

١ – جهز قطاعات شمعية كما فى الطريقة السابقة.

٢ – اصبغ القطاعات فى صبغ الكريزيل فاست فيوليت لمدة ٣٠ دقيقة فى درجة حرارة الغرفة (يحضر محلول مائى بتركيز ٠,١٪ من الكريزيل فاست فيوليت يضاف إليه ٠,٧ سم^٣ من محلول ١٠٪ حمض خليك لكل ١٠٠ سم^٣ من المحلول بحيث يكون الاس الهيدروجينى للصبغ ٣,٥ـ٣,٨).

٣ – اغسل الشرائح فى الماء ثم ميز الصبغ فى ٩٥٪ كحول حتى تبدو ارضية الخلايا رائقة نسبيا.

٤ – انزع الماء فى كحول مطلق، روق فى الزيلول ثم غطى بالكندا بلسم.

النتائج:

أجسام نسل ..... بنفسجية

الأرضيـة ..... عديم اللون تقريبا

صباغة أجسام نسل باستخدام التولويدين الأزرق Toluidine Blue Method:

١ – جهز قطاعات شمعية كما فى الطرق السابقة.

٢ - اصبغ القطاعات فى صبغ التولويدين الازرق وهو يحضر كما يلى:

تولويدين بلو	Toluidine blue	١ جم
مـاء مقـطر	Distilled water	٢٠٠ سم^{٣}
حمض خليك ثلجى	Glacial acetic acid	١,٠ سم^{٣}

رشح قبل الإستخدام. وإذا كانت نتيجة الصبغ كثيفة، ضف مزيد من حمض الخليك. ومن المفترض أن الاس الهيدروجينى للصبغ يكون حوالى ٤.

٣ - اغسل الشرائح فى الماء ثم إنزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول حتى تصل إلى الكحول الإثيلى المطلق، وإذا أدى ذلك إلى ضياع الصبغ من القطاعات فعليك أن تجفف القطاعات بعد الغسيل بورق ترشيح ثم إغسل القطاعات فى تغييرتين من ن - بيوتانول n-Butanol (كل تغييرة من ٣-٥ دقائق).

٤ - ضع القطاعات فى الزيلول ثم غط باستخدام كندا بلسم.

كروماتين الجنس (جسم بار)
Sex Chromatin (Barr Body)

فى عام ١٩٤٩ اكتشف العالم الكندى بار Barr وتلميـذه برترام Bertram باستخدام الكريزيل فايوليت Cresyl Violet وجود حبيبة صغيرة تقع إلى جانب النواة فى الخلايا العصبية لإناث القطط، وأن هذه الحبيبة غير موجودة فى أنوية خلايا الذكور. وسرعان ما اكتشف أن هذه الحبيبة توجد فى أنوية خلايا الجسم الاخرى لاناث حيوانات ثديية أخرى ولكنها فى هذه الحالات تقع ملاصقة للسطح الداخلى للغشاء النووى. وقد اطلق على هذه الحبيبة اسم كروماتين الجنس.

وقد عرف فيما بعد أن هذه الحبيبة هى عبارة عن أحد الكروموسومين الجنسيين الموجودين فى الخلايا الجسمية للإناث حيث يوجد على صورة مكثفة Condensed Chromatin وبالتالى غير نشيطة فى المرحلة البينية Interphase، بينما يكون الكروموسوم الجنسى الآخر موجود على صورة ممتدة extended فى هذه المرحلة فلا يرى بالميكروسكوب الضوئى. ولابد أن يوجد أحد الكروموسومين فى صورة ممتدة حتى تؤدى ما عليه من جينات دورها الوراثى داخل الخلية.

وسبب عدم وجود جسم بار فى الذكور ان الذكر يحتوى على كروموسوم X واحد فقط، ولابد لهذا الكروموسوم أن يكون موجودا على صورة ممتددة حتى يؤدى نشاطه الوراثى، وهو فى هذه الحالة لا يرى بالميكروسكوب الضوئى.

وقد تم الاستفادة من هذه الظاهرة فى تشخيص حالات الشذوذ الكروموسومى الخاصة بالكروموسومات الجنسية، كما فى حالة كلاينفلتر Kleinfelter's Syndrome فى الذكور حيث نرى بخلاياهم جسم بار، مما يعنى وجود كروموسوما جين جنسيين وتوصف الحالة بأنها كذلك تشاهد فى ظاهرة أخرى تسمى حالة ترنر **Turner's syndrome** فى الإناث حيث لا نرى بخلاياهن جسم بار مما يعنى وجود كروموسوم واحد فقط وتوصف الحالة بأنها XO. كما توجد طرز اخرى للشذوذ الكروموسومى من هذه الناحية.

ويمكن دراسة كروماتين الجنس فى تحضيرات السحبات أو السحقات وكذلك فى القطاعات.. ومن أشهر السحبات تلك المأخوذة من بطانة الفم والمهبل أو الأغشية الامنيوتية المحيطة بالجنين وكذلك سحبات الدم لفحص كريات الدم البيضاء المسماه بالكريات المتعادلة. ويمكن الاستعانة بطرق صباغة تستخدم لأغراض اخرى فى الكشف عن جسم بار مثل طريقة فولجن Fenlgen Method المستخدمة للكشف عن حمض ح د ن D N A وطريقة صباغة أجسام نسل Nissl bodies. باستخدام التولويدين بلو Toluidine blue وسنعرض فيما يلى لبعض الطرق المقترحة لصباغة كروماتين الجنس.

طريقة كلنجر Klinger Method:

١ – إذا كانت العينة عبارة عن سحبة أو غشاء جنينى رقيق ثبت لمدة ½ – ٤ ساعات فى ٩٥٪ كحول. أما إذا كان المطلوب عمل قطاعات شمعية، فعليك أن تثبت فى محلول دفيدسون Davidson Solution وهو يتركب مما يلى:

٩٥٪ كحول	95% Alcohol	٣٠ سم٣
فورمالين	Formalin	٢٠ سم٣
حمض خليك ثلجى	Glacial acetic acid	١٠ سم٣
ماء مقطر	Distilled water	٣٠ سم٣

ثم انقل العينة بعد ذلك إلى ٩٥٪ كحول.

٢ – حضر المحاليل الآتية:

محلول (أ):

جهز محلول مشبع من الثيونين Thionin Solution فى ٥٪ كحول ثم رشح.

محلول (ب):

خلات الصوديوم	Sodium acetate	٩,٧١٤ جم
باربتيورات الصوديوم	Sodium barbitarate	١٤,٧١٤ جم
ماء مقطر خالى من ثانى أكسيد الكربون		٥٠٠ سم٣

محلول (جـ):

حمض هيدروكلوريك (كثافته النوعية ١,١٩)	٨,٥٠ سم٣
ماء مقطر	٩٩١,٥ سم٣

مكونات محلول العمل: (أسه الهيدروجينى ٥,٧)

محلول (أ)	٤٠ سم٣
محلول (ب)	٢٨ سم٣
محلول (جـ)	٣٢ سم٣

openkandi.com

٣ – مرر الشرائح بسلسلة هابطة من الكحولات حتى الماء.

٤ – ضعها بعد ذلك فى محلول قوة ١/٤ عيارى حمض يد كل لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة ٢٠ـ٢٥°م.

٥ – اغسل جيدا فى الماء المقطر بحيث تزيل تماما آثار الحمض.

٦ – اصبغ بمحلول العمل للثيبونين لمدة ١٥ـ٦٠ دقيقة.

٧ – اغسل بالماء المقطر ثم فى ٥٠٪ كحول.

٨ – اغسل فى ٧٠٪ كحول حتى تختفى آثار الصبغ الناتجة عن عملية الغسيل فى الكحول.

٩ – انزع الماء، روق فى الزيلول ثم غطى بالكندا بالسم.

النتائج:

كروماتين الجنس ..... بنفسجى إلى أزرق داكن

كروماتين النواة ..... خفيف الصبغ

السيتوبلازم ..... غير مصبوغ

سحبات الكروموسومات
Chromosome Smears

لقد برزت أهمية الكروموسومات خلال السنوات الأخيرة لارتباطها بالكثير من الأنشطة البيولوجية المتعلقة بعلوم الوراثة والتطور والتقسيم وغيرها .

وقد تمت الإشارة فى الفصل السادس إلى تحضيرات سحقات الكروموسومات. ويتناول الجزء التالى استعراضا سريعا لبعض طرق سحبات الكروموسومات المستمدة من خلايا جسمية. Culturing and Spreading Techniques of Somatic Chromosomes.

وتعتمد طرق سحبات الكروموسومات على زراعة خلايا مأخوذة من أعضاء الجسم المختلفة مثل الجلد أو نخاع العظم أو الدم. وقد اقترح الباحثون طرقا مختلفة لزراعة الخلايا لهذا الغرض تناسب الحيوانات المختلفة .

أولا: توضيح الكروموسومات فى سحبات الدم:

– يجرى فصل لكريات الدم البيضاء ثم تضاف إليها مادة تحفز على الانقسام الخلوى، وأشهر هذه المواد مادة فيتوهيم أجليوتينين **Phytohemagglutinin** ويرمز لها بالرمز PHA، وهى على طرازين P, M وطراز P أقوى تأثيرا من طراز .M ويلاحظ ضرورة حفظ هذه المادة فى حجرة التجميد بالثلاجة Freezer. وبعد ذلك تضاف إلى الخلايا المنقسمة مادة تذيب خيوط المغزل وتمنع تكونها. ومن أشهر هذه المواد الكولشيشين Colchicine والكولسيميد Colcemid ولتحديد تركيز

هذه اللمواد وفترة تعرض الخلايا أهمية قصوى فى نجاح التحضير.

يضاف للخلايا محلول منخفض التركيز Hypotonic مما يجعل الخلايا تنتفخ، كما يعمل على انتشار الكروموسومات بعيدا عن بعضها مما يسهل فحصها والتعرف عليها.

– تجرى عملية تثبيت الخلايا باستخدام أحد المثبتات.

– تؤخذ بعض الخلايا بعد التثبيت وتسحب على شرائح زجاجية وتجفف الشرائح على لوح تسخين.

– يتم صبغ التحضيرات بأحد الاصباغ المناسبة مثل الاسيتوكارمين Acetocarmine أو الاسيتوأورسين Aceto-orcine حيث تصبغ الكروموسومات باللون الأحمر الداكن.

– وقد استحدثت منذ سنوات طرق معملية تؤدى إلى صباغة أجزاء عرضية من الكروموسومات بدرجات متفاوتة، فتبدو وكأنها مخططة عرضيا (صباغة شريطية للكروموسومات Banding Techniques. ويشار إلى هذه الطرق بالحروف Q, G, C, R, T. وقد أضافت هذه الطرق خواص جديدة يعتمد عليها فى التعرف على الكروموسومات وفى تحديد أيسة تغيرات تركيبية بها. ويستخدم صبغ جسما Giemsa stain عادة فى بعض هذه الطرق.

– يفحص التحضير بعد الانتهاء من عملية الصباغة. (والتحضير الجيد هو الذى تظهر فيه كل الكروموسومات سليمة دون فقدان لأى منها، وبحيث تكون متباعدة عن بعضها، دون أن يتراكب أحدها على الآخر).

– يتم تصوير التحضير من خلال الميكروسكوب، وتطبع له صور مكبرة، ويجرى على هذه الصور بحث تحليلى يدرس فى كل كروموسوم من النواحى المختلفة مثل طول ذراعيه والمعامل السنترومرى Centromeric Index وما إذا كان له توابع Satellites أو اختناقات ثانوية Secondary Constrictions وطبيعة الصباغة الشريطية Banding له وغير ذلك وتساعد هذه الخواص فى التعرف على أزواج الكروموسومات. ويطلق على مجموعة الخصائص التى تميز مجموعة كروموسومية لأحد الكائنات الحية لفظ «النظام الكروموسومى Karyotype».

– يحضر فرخ ورق مقوى، ثم تقص ازواج الكروموسومات من أحدى الصور التى تم اخذها للتحضير، وتلصق صور الكروموسومات بجوار بعضها على فرخ الورق المقوى. بحيث ترص حسب أطواله من الأكبر إلى الأصغر. وبعد الانتهاء من لصق صور جميع الكروموسومات تؤخذ صورة لها معا، فنحصل بذلك على صورة لازواج الكروموسومات مرتبة حسب أطوالها، ويطلق على ذلك التحضير اسم الصورة الكروموسومية Idiogram.

طريقة جوه Goh method

١ – اسحب حوالى ١٠ سم^{٣} من الدم الوريدى فى حقنة بلاستيك معقمة تحتوى على ٠,١ سم^{٣} هيبارين. أقلب الحقنة بهدوء ليتم خلط الدم بالهيبارين.

٢ – انقل الدم إلى أنبوبة جهاز الطرد المركزى المعقمة وغطها بسدادة سليكونية معقمة واترك

الأنبوبة فى وضع رأسى فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين حيث تنفصل كريات الدم الحمراء عن كريات الدم البيضاء والبلازما.

٣ – خذ ١ سم^{٣} من معلق كريات الدم البيضاء وضعه فى أنبوبة معقمة لزراعة كريات الدم تحتوى على:

مادة ١٩٩ تى سى	TC 199	٧ سم^{٣}
مادة فيتوهيم أجليوتينين إم	PHA-M	١ سم^{٣}
بلازما فيتوهيم أجليوتينين إم	Autologous Plasma PHA-M..	٢ سم^{٣}

ثم أضف ١٠٠ وحدة بنسلين، ١٠٠ ملجم ستربتوميسين لكل ملليمتر واحد من المحلول النهائى. رج الزجاجة برفق وضعها فى حضانة عند درجة ٣٧,٥°م لمدة ٦٨–٧٢ ساعة.

٤ – أضف ١ سم^{٣} من ١٠$^{-٦}$ عيارى كولشيسين 10^{-6}M Colchinine لكل ١ سم^{٣} من المحلول واترك المحلول لمدة تتراوح بين ١,٥–٤ ساعات عند درجة حرارة ٣٧,٥°م.

٥ – اجر عملية طرد مركزى لمدة ٦–١٠ دقائق بسرعة ٦٠٠ لفة/دقيقة. تخلص من السائل الطافى Supernatant

٦ – أضف ببطء ١ سم^{٣} من ٠,٣٧٪ سترات الصوديوم (أو ٠٠٧٥ محلول جزئى من كلوريد البوتاسيوم إلى ١٧ وحدة هيبارين لكل ١ سم^{٣} من كلوريد البوتاسيوم). رج جيدًا بعد كل بضع قطرات مضافة من المحلول منخفض التركيز Hypotonic. يجب أن تكون الخلايا معلقة وغير متلاصقة. أترك الأنبوبة فيدرجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠ دقيقة مع رجها عند منتصف هذه الفترة. (تعمل هذه الخطوة على انتفاخ الخلايا وتباعد الكروموسومات عن بعضها).

٧ – اجر عملية طرد مركزى لمدة ٦٠ دقيقة بسرعة ٣٠٠ لفة فى الدقيقة ثم تخلص من السائل الطافى.

٨ – أضف ببطء ١ سم^{٣} من محلول مثبت حديث التضحير مكون من كحول مثيلى أو اثيلى مطلق وحمض خليك وكلوروفورم بنسبة ٦ : ١ : ٠٣ رج الأنبوبة جيدا بعد كل بضع قطرات مضافة من المثبت. أترك الأنبوبة لمدة ١٠ دقائق فى درجة حرارة الغرفة، ولكن إذا كنت ستجرى صباغة شريطية band staining ، ثبت لمدة ٢٤ ساعة.

اجر طردا مركزيا للانبوبة لمدة ٥–١٠ دقائق بسرعة ٨٠٠ لفة/دقيقة. أزل السائل الطافى ثم أضف محلولا مثبتا طازجا. كرر هذه الخطوة ثلاث مرات. أترك بضع قطرات من التغيرة الأخيرة من المثبت مع الخلايا.

جهز شرائح مبردة فى ماء مثلج ومبلله بالمثبت وضعها فى وضع مائل على ورقة ترشيح ثم خذ قطرة من المعلق الخلوى Cell Supspension بواسطة ماصة باستير سليكونية، أطلق القطرة من الماصة إلى سطح الشريحة المائل من على ارتفاع جوالى ٢ سم حتى يساعد ذلك على فرد التحضير، وفى نفس الوقت زحلقة السائل إلى ورقة الترشيح.

١١ – جفف الشرائح بتركها فى حضانة لمدة ١٢ ساعة أو عند درجة حرارة تتراوح بين

٥٠ - ٦٠° م لمدة ٤ ساعات. (يمكنك التجفيف السريع على لهب ولكن ذلك لا يناسب تحضيرات الصباغة الشريطة للكروموسومات Banding).

صباغة الكروموسومات:

يمكن اتباع أحد الطريقتين الآتيتين للصباغة حسب الهدف المطلوب من الصباغة.

أولا: الصباغة الكلية العادية:

١٢ - اصبغ التحضيرات لمدة ٣٠ دقيقة فى محلول صبغ الاستيواورسين Aceto-orcein الذى يحضر بإذابة ٢ جم أورسين فى ٤٥ سم٣ حمض خليك. اغلى مع التقليب ثم برد إلى درجة حرارة ٥٠° م واضف ٥٥ سم٣ ماء مقطر. برد إلى درجة حرارة الغرفة ثم رشح. أعد الترشيح قبل الاستعمال تجنبا للرواسب.

١٣ - اغسل الشرائح بغمسها فى ثلاث تغييرات من كحول بيوتيل رباعى Tertiary butyl alcohol.

١٤ - روق فى الزيول وغط بواسطة كندا بلسم.

ثانيا: الصباغة الشريطية للكروموسومات Banding Staining.

هيدروكسيد الصوديوم	Sodium Hydroxide	٢,٨	جم.
كلوريد الصوديوم	Sodium Chloride	٦,٢	جم
ماء مقطر	Distilled water	١٠٠٠	سم٣

محلول (ملحى - سترات) اسه الهيدروجينى ٧,٠

كلوريد صوديوم	Sodium Chloride	١٠٥,٢	جم
سترات ثلاثى الصوديوم	Trisodium Citrate	٥٢,٩	جم.
ماء مقطر	Distilled water	١٠٠٠	سم٣

اضبط الأس الهيدروجينى إذا استلزم الأمر باستخدام ٠,١ عيارى حمض هيدروكلوريك.

محلول جمسا اسه الهيدروجينى ٦,٦.

محلول جمسا الأساسى	Giemsa Stock Solution	٥	سم٣
كحول مثيلى	Methyl alcohol	٣	سم٣
٠,١ عيارى حمضى ستريك	Citric acid	٣	سم٣
ماء مقطر	Distilled water	٨٩	سم٣

يمكنك ضبط الأسس الهيدروجينى إذا استلزم الأمر باستخدام ٠,٢ محلول جزئيى فوسفات ثنائى الصوديوم $Na_2 HPO_4$.

obeikandl.com

الخطوات:

١٢ - اغمس الشرائح فى المحلول القلوى فى درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ثانية.
١٣ - ضع الشرائح فى ٣ تغييرات من محلول (ملحى سترات) لمدة ١٠ دقائق لكل منها.
١٤ - ضع الشرائح لمدة (٢٤ - ٧٢ ساعة) فى محلول (ملحى - سترات) عند درجة حرارة ٦٥°م.
١٥ - ضع الشرائح فى ثلاث تغييرات من ٧٠٪ كحول، وثلاث تغييرات من ٩٥٪ كحول(٣ دقائق لكل تغييره).
١٦ - جفف الشرائح فى الهواء.
١٧ - اصبغ التحضيرات فى محلول صبغ جمسا لمدة خمس دقائق.
١٨ - اغمس الشرائح فى ماء مقطر.
١٩ - جفف الشرائح فى الهواء ثم حمل فى الكندا بلسم.

ثالثًا: تحضير سحبه كروموسومات من خلايا نخاع العظم (طريقة أوك ردج)

Bone Marrow-Chromosome Spread Acoording to Oak Ridge

١ - ضع ١-٥ قطرات من النخاع الطازج خال من الكتل الدموية لمدة ساعة واحدة عند درجة ٣٧°م فى أنبوبة تحتوى على:

مادة ١٩٩ TC عند درجة ٣٧°م		١٠ سم٢
هيبارين	Heparin	١٠ وحدات
٠,٠٠٢٪ كولشيميد	Colchimide	١ سم٣

٢ - اجر طردا مركزيا لمدة ٦ - ١٠ دقائق بسرعة ٦٠٠ لفة/ دقيقة ثم تخلص من السائل الطافى.
٣ - أضف ٢ - ٣ سم٣ من محلول ٠,٠٧٥ز٪ كلوريد بوتاسيوم مع الرج الجيد حتى تضمن تخلل المحلول بين كل الخلايا بصورة جيدة. أترك الأنبوبة لمدة ٧ دقائق.
٤ - اجر طردا مركزيا كما فى الخطوة رقم ٢.
٥ - مع استمرار الرج، أضف محلولا مثبتا مكونا من كحول مثيلى وحمض خليك بنسبة ٣: ١ وتأكد من تخلل المثبت بين كل الخلايا بصورة جيدة.
٦ - كرر الخطوات ٢، ٥ ثلاث مرات.
٧ - عند إضافة آخر تغييرة من المثبت، رج الأنبوبة جيدا ثم خذ قطرة من المحلول وضعها فوق شريحة نظيفة. أقلب الشريحة ومررها على لهب بنزن، وعند اشتعال المحلول، اترك الشريحة فى وضعها الطبيعى حتى تبرد ثم اصبغها بأى من صبغى الأورسين Orcein أو جمسا Giemsa مضبوطة الأسس الهيدروجينى.