الفصل الثامن

نماذج من صباغة التحضيرات الهستولوجية

١ ـ الصباغة بمحلولى الهيماتوكسيلين والأيوسين
Staining with Hematoxylin & Eosin

الغرض منها:

هذه الطريقة هى أكثر الطرق استعمالا على الاطلاق خاصة فى مجال التحضيرات التى تعد للدراسات المطلابية، وهى طريقة سهلة وتقليدية كما أن تمرس الطلاب عليها يعطيهم تمرينا أساسيا فى مجال التقنية المجهرية. وتعطى هذه الطريقة تمييزا واضحا بين السينوبلازم والنواه كما أنها تعطى فكرة طيبة عن التركيب النسيجى للعينة موضوع الدراسة وتكشف إلى حد كبير عن بعض الحالات المرضية إن وجدت.

الخطوات:

١ – ثبت العينة فى أى من المثبتات التى تحفظ التركيب النسيجى بصورة جيدة مثل زنكر، زنكر فورمال ـ بوان ـ سوزا ـ كارنوى، وذلك لمدة ٢٤ ساعة مع أى من هذه المثبتات فيما عدا كارنوى حيث تتراوح مدة التثبيت فيه من ساعتين إلى ثلاث ساعات.

٢ – عالج العينة لإزالة الزيادة من المثبت أو بعض مكوناته.

٣ – انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحولات تنتهى بالكحول المطلق.

٤ – ضع العينة فى خليط من الكحول المطلق والزيلول ثم انقلها إلى الزيلول لترويقها ثم ضعها فى الفرن فى خليط من الزيلول والشمع المنصهر (يمكن استخدام التربنيول بدلا من الزيلول).

٥ – انقل العينة إلى ثلاث تغييرات من الشمع (شمع ١، شمع ٢، شمع ٣).

٦ – اطمر العينة فى الشمع.

٧ – شذب قالب الشمع ثم اقطع العينة بالميكروتوم إلى قطاعات بسمك ٦ ميكرون.

٨ – الصق القطاعات على شرائح نظيفة واحفظها فى الحضانة عند درجة ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة على الأقل.

٩ – أزل الشمع من على الشرائح فى تغييرتين من الزيلول ثم انقل الشرائح إلى خليط من الزيلول والكحول المطلق ثم إلى الكحول المطلق (كل تغييرة ٥ دقائق).

١٠ – انقل الشرائح إلى سلسلة هابطة من الكحولات (٩٥٪، ٧٠٪، ٣٠٪) ثم إلى الماء المقطر (دقيقتان لكل تغييرة).

١١ – ضع الشرائح فى صبغ الهيماتوكسيلين (هاريس أو ايرلش) وذلك لمدة ٤٥ دقيقة.

١٢ – إغسل الشرائح فى الماء المقطر واتركها فيه ثم تعامل مع كل شريحة على حدة عند إجراء عملية تمييز وتزريق الصبغ كما سيتضح فى الخطوات التالية.

١٣ – مستخدما شريحة واحدة، أزل الزائد من الصبغ فى القطاع بغمرها فى $\frac{1}{2}$٪ حمض هيدروكلوريك فى الماء لمدة ٢٠ ثانية مع هزها أثناء ذلك. أغسل الشريحة فى الماء المقطر ثم أغمرها لمدة من ١ – ٣ دقائق فى ماء صنبور أو فى محلول مائى قلوى ($\frac{1}{4}$٪ بيكربونات الصوديوم) وذلك بغرض تزريق حبيبات الكروماتين فى أنوية الخلايا وإظهارها بوضوح ويمكن الحكم على انتهاء هذه العملية من عدمه بفحص الشريحة بالميكروسكوب. ولاحظ ما يأتى.

(أ) إذا ظهر السيتوبلازم بلون أزرق فهذا يعنى أن خطوة إزالة الصبغ الزائد بواسطة الماء المحمض لم تستكمل بالصورة المطلوبة. وفى هذه الحالة اغمر الشريحة فى الماء المقطر وأعدها إلى الماء المحمض لمدة مناسبة ثم اغمرها فى الماء المقطر ثم زرقها فى الماء القلوى ثم أعد فحصها بالميكروسكوب.

(ب) إذا لم يزرق الكروماتين بالقدر الكافى فهذا يعنى أن خطوة التزريق بالماء القلوى لم تستكمل بالصورة المطلوبة وفى هذه الحالة ضع الشريحة فى الماء القلوى لفترة مناسبة ثم أعد الفحص بالميكروسكوب.

احذر استخدام محلول قلوى قوى ذلك أنه على الرغم من أنه يساعد على التزريق بسرعة أكبر إلا أنه قد يتسبب فى سقوط القطاع من فوق الشريحة.

سجل الوقت المناسب لعمليتى إزالة الصبغ والتزريق حتى تستخدمه مع بقية الشرائح بصورة روتينية.

١٤ – أزل الصبغ الزائد فى القطاعات الباقية ثم زرقها.

١٥ – اغسل الشرائح بالماء.

١٦ – اصبغ القطاعات من ٠,٢٪ أيوسين Y أو G مائى وذلك لمدة ١٥ ثانية ثم أغسل الشرائح بسرعة فى تغييرتين من ٩٥٪ كحول ثم استكمل إزالة الماء من القطاعات بوضعها فى الكحول المطلق لمدة ٥ دقائق.

١٧ – روق القطاعات فى تغيرتين من الزيلول (كل تغييرة ٥ دقائق).

١٨ – حمل القطاعات بالكاندا بالسم.

١٩ – جفف الشرائح فى الحضانة عند ٣٧°م لمدة ٢٤ ساعة.

النتائج: سيتوبلازم الخلايا وكافة التراكيب القاعدية كيماويا ستأخذ اللون الأحمر، أما كروماتين الأنوية وكافة التراكيب الحامضية فستأخذ اللون الأزرق.

٢ - الصباغة بطريقة مالورى الثلاثية
Staining with Mallory's Triple Stain

الغرض منها:

تستخدم هذه الطريقة فى صباغة الأعضاء أو التراكيب التى تحوى عددا من الأنسجة المختلفة وبذلك يمكن تمييز كل منها بوضوح، غير أنه لا يوصى باستخدام هذه الطريقة فى مجال الدراسات الخلوية.

الخطوات:

١ - ثبت العينة فى زنكر أو سوزا لمدة ٢٤ ساعة ثم اغسلها فى ٥٠٪ كحول.

٢ - أزل بلورات كلوريد الزئبقيك من النسيج.

٣ - اغسل العينة فى ٧٠٪ كحول.

٤ - انزع الماء من العينة فى سلسلة صاعدة من الكحول.

٥ - ضع العينة فى خليط من الكحول والزيلول (١ : ١).

٦ - روق العينة فى الزيلول.

٧ - ضع العينة فى الفرن فى خليط من الزيلول والشمع عند درجة ٦٠°م.

٨ - ضع العينة فى ٣ تغييرات من الشمع المنصهر.

٩ - اطمر العينة فى الشمع ثم شذب القالب الشمعى.

١٠ - إقطع العينة بالميكروتوم إلى قطاعات بسمك ٦ ميكرونات.

١١ - الصق القطاعات على الشرائح الزجاجة واتركها فى الحضانة لمدة يوم واحد عند درجة ٣٧°م قبل استكمال الخطوات.

١٢ - ضع القطاعات فى تغييرتين من الزيلول لإذابة الشمع (٥ دقائق لكل تغييرة).

١٣ - ضع القطاعات فى خليط من الزيلول والكحول المطلق ثم فى الكحول المطلق فقط (٥ دقائق فى كل منهما).

١٤ - مرر القطاعات فى سلسلة متناقصة التركيز من الكحول (٩٦٪، ٧٠٪، ٣٠٪). ثم فى الماء المقطر.

١٥ - استكمل خطوات التأكد من إزالة بلورات كلوريد الزئبقيك كما هو مبين.

١٦ - ضع الشرائح فى محلول مالورى I (صفحة) ٥-١٠ دقائق وعندئذ ستأخذ الأنسجة اللون الأحمر الزاهى. إغمس الشريحة فى الماء المقطر.

١٧ - ضع القطاعات فى ١٪ حمض الفوسفوموليدك أو حمض الفوسفوتنجستك (١٠ دقائق).

وهذا المحلول يعمل على إزالة اختيارية للصبغ. حيث سيبدو النسيج الضام غير مصبوغ بينما سيكون السيتوبلازم ذا لون قرنفلي ويكون لون حبيبات الكروماتين أحمرا زاهيا.

١٨ - ضع الشرائح مباشرة فى محلول مالورى II لمدة ٥-٣٠ دقيقة.

١٩ - إغمس القطاعات فى محلول حمض الفوسفومولبدك ثم افحص الشرائح بالميكروسكوب حتى يأخذ النسيج الضام اللون الأزرق وتأخذ كرات الدم الحمراء اللون البرتقالى أما السيتوبلازم فسيظل لونه قرنفليا والكروماتين أحمرا. وإذا لزم الأمر فيمكنك أن ترجع الشرائح إلى الصبغة.

٢٠ - انزع الماء من القطاعات بسرعة فى ٩٥٪ كحول. وإذا وجدت أن الصبغ الأزرق قد فقد من القطاع فارجع إلى حمض الفوسفومولبيدك ثم أعد الصباغة.

٢١ - أكمل نزع الماء من القطاعات بوضعها فى الكحول المطلق. وإذا كان لون صبغ الفوكسين داكنا فيمكن جعله أقل دكنة بأن تطيل مدة وضع الشرائح فى الكحول المطلق.

٢٢ - روق القطاعات فى الزيلزل ثم حمل فى الكاندا بلسم.

٢٣ - جفف القطاعات بوضعها فى الحضانة لمدة يوم واحد عند درجة ٣٧°م

النتائج: النسيج الضام سيأخذ اللون الأزرق، وكرات الدم الحمراء تأخذ اللون البرتقالى. أما السينويلازم فسيكون لونه قرنفليا Pink والكروماتين لونه أحمر.

٣ - الصباغة بطريقة ماسون الثلاثية
Staining with Masson's Triple Stain

الغرض منها:

تستخدم هذه الطريقة للدراسات الهستولوجية العامة وتعطى تمييزا واضحا للعضلات وألياف النسيج الضام. ويطلق على هذه الطريقة اسم الطريقة الثلاثية رغم أنه يستخدم فيها أربع صبغات.

الخطوات:

١ - اتبع الخطوات ١-١٥فى طريقة مالورى الثلاثية.

٢ - ضع الشرائح فى محلول ٤٪ شب الحديد Iron alum (مرسخ) لمدة $\frac{1}{2}$ ساعة.

٣ - اغسل الشرائح فى ماء جارى لمدة ٥ دقائق.

٤ - اصبغ فى ديلافيليد هيماتوكسلين لمدة نصف ساعة ثم إغسل فى ماء جارى لمدة خمس دقائق.

٥ - ميز الصبغ فى محلول مائى مشبع بحمض البكريك.

٦ - اغسل جيدا فى الماء الجارى لمدة عشر دقائق.

٧ - اصبغ فى محلول الفوكسين الحمضى لمدة خمس دقائق (١ جم فوكسين حمضى acid fuchsin + ١٠٠ سم^3 ماء مقطر + ١ سم^3 حمض خليك ثلجى).

٨ – اغمس فى الماء المقطر حتى يزول الصبغ الزائد واستعن فى تقدير ذلك باستخدام الميكروسكوب.

٩ – اصبغ فى محلول زيليدين بونكو Ponceau de xylidine لمدة من ١–٥ دقائق (١ جم زيلدين بونكو + ١٠٠ سم٣ ماء مقطر + ١ سم٣ حمض خليك ثلجى).

١٠ – اغمس الشرائح فى ماء صنبور ثم أعد الفحص بالميكروسكوب لتتأكد من الدرجة المناسبة للصبغ بالفوكسين الحامض والزيلدين بونكو.

١١ – ميز الصبغ فى محلول مائى من ١٪ حامض الفوسفومولبدك لمدة دقيقة واحدة.

١٢ – ضع الشرائح مباشرة فى محلول فاست جرين Fast green لمدة دقيقتين (٢ جم فاست جرين Fast green) (١٠ سم٣ ماء مقطر + ٢ سم٣ حمض خليك ثلجى).

١٣ – ميز صبغ فاست جرين فى محلول مائى ١٪ حمض خليك ثلجى.

١٤ – انزع الماء بسلسلة ذات تركيزات متزايدة من الكحول حتى الكحول المطلق.

١٥ – روق القطاعات فى الزيلول ثم حمل فى الكندا بلسم.

النتائج: تصبغ العضلات باللون الأحمر وألياف الكولاجين والمخاط باللون الأخضر. أما سيتوبلازم الخلايا فيأخذ اللونين الأحمر والموف وتصبغ أنوية الخلايا بلون بين الموف المزرق الداكن إلى الأسود.

٤ – طريقة مان للصباغة بالمثيل الأزرق والأيوسين
Mann's Methyl Blue – Eosin

الغرض منها:

صباغة عامة للمكونات المختلفة فى الأنسجة الجسمية.

الخطوات:

١ – اجر الخطوات من ١–١٠ فى التمرين رقم (١).

٢ – اصبغ القطاعات لمدة ١٢ ساعة فى صبغ المثيل الأزرق ـ أيوسين وهو يتكون مما يلى:

١٪ مثيل بلو (وليس مثيلين بلو) فى الماء methyl blue (not methylene blue)		٣٥ سم٣
١٪ أيوسين مائى	Eosin	٤٥ سم٣
مـاء مقطـر		١٠٠ سم٣

وأضف قطرات من الفورمالين.

٣ – اغسل فى الماء المقطر لمدة نصف دقيقة.

٤ – ميز الصبغ فى محلول مكون من ٧٠٪ كحول مضافا إليه قطرة من محلول مشبع من الأورانج ج Orange G لكل ١ سم٣ من الكحول (سائل التميز دوبل Dobell's differentiator).

٥ – انزع الماء بسرعة فى كحول مطلق متعادل.

٦ – حمل فى الايوبارال أو روق فى الزيلول ثم حمل فى الكندا بلسم.

ملحوظة:

يمكنك اختصارًا للوقت الصباغة لمدة ١٠–٣٠ دقيقة ثم التمييز فى ماء صنبور ثم انزع الماء بسرعة وحمل.

النتائج:

الخلايا المخاطية، النسيج الضام ـ الأنويه ـ الكيتين ..... زرقاء
الخلايا القاعدية ـ الحبيبات القاعدية ..... زرقاء
الخلايا الحمضية ـ الحبيبات الحمضية ..... حمراء
العضلات ..... حمراء باهته

٥ – الصباغة بطريقة هايدن هان آزان
Staining with Heidenhain-Azan Method

(لفظة Azan مركبة من الحروف الأولى من كلمتى Azokarmin B and aniline blue w).

الغرض منها:

يوصى باستخدام هذه الطريقة لصباغة النسيج الضام وكذلك الغدة النخامية والبنكرياس حيث يمكن تمييز الخلايا الحامضية والقاعدية وعديمة التلوين.

الخطوات:

١ – ثبت العينة فى زنكر فورمول Zenker formol لمدة ٢٤ ساعة ثم إغسلها فى ٥٠٪ كحول.

٢ – نفذ الخطوات من ٢–١٥ فى الطريقة رقم ٣.

٣ – ضع القطاعات فى محلول أنيلين كحولى لمدة ٤٥ دقيقة (١ سم٣ انيلين + ١٠٠٠ سم٣ من ٩٠٪ كحول اثيلى).

٤ – ضع القطاعات فى محلول كحولى محمض لمدة ١–٢ دقيقة (١ سم٣ حمض خليك ثلجى + ١٠٠ سم٣ من ٩٠٪ كحول اثيلى).

٥ – اصبغ القطاعات فى محلول أزوكارمين عند درجة ٥٦°م لمدة ساعة (٠,٢–١,٠ جم من آزوكارمين ج azocarmine G تغلى فى ١٠٠ سم٣ ماء مقطر لمدة ٥ دقائق ثم برد ورشح، ثم أضف ١ سم٣ حمض خليك ثلجى. ولاحظ انضباط درجة الحرارة أثناء الصباغة، فالحرارة العالية تجعل عملية تمييز الصبغ غير جيدة).

٦ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر.

٧ – ميز الصبغ فى محلول الاينيلين الكحولى. مع مراجعة عملية التمييز بالميكروسكوب بحيث تكون أنوية الخلايا حمراء زاهية والسيتوبلازم أحمرا باهتا جدا.

٨ – ضع القطاعات فى محلول الكحول المحمض لمدة دقيقة إلى دقيقتين.

٩ – ضع القطاعات فى محلول حمض الفوسفوتنجستك لمدة ٣ ساعات (٥ جم حمض فوسفوتنجستك + ١٠٠ سم٣ ماء).

١٠ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر.

١١ – اصبغ القطاعات فى محلول صبغ الأنيلين الأزرق لمدة ساعتين (½ جم صبغ أنيلين أزرق aniline blue W.S. + ٢ جم صبغ أورانج ج orange G. + ٢ جم حمض أوكساليك + ١٠٠ سم٣ ماء مقطر + ١ سم٣ من ½٪ حمض الفوسفوتنجستك).

١٢ – اغمس الشرائح فى الماء المقطر.

١٣ – ضع القطاعات فى محلول مائى ½٪ حمض فوسفوتنجستك لمدة ٣–٥ دقائق.

١٤ – اغمس الشرائح فى الماء المقطر.

١٥ – ضع الشرائح فى ماء محمض لمدة ١–٢ دقيقة (١ سم٣ حمض خليك ثلجى فى ١٠٠ سم٣ ماء مقطر).

١٦ – اغمس الشرائح فى ٧٠٪ ثم ٩٥٪ كحول.

١٧ – انزع الماء المتبقى فى القطاعات فى الكحول المطلق.

١٨ – روق القطاعات فى الزيلول ثم حمل فى كندا بلسم.

النتائج:

* الياف الكولاجين والرتكيولين تصبغ باللون الأزرق.
* العضلات تصبغ باللون الأحمر والأصفر.
* أنوية الخلايا باللون الأحمر الزاهى.
* السيتوبلازم قاعدى الصباغة (basophilic) اللون الأزرق.
* السنيوبلازم حامض الصباغة (acidophilic) باللون البرتقالى الأحمر.
* الخلايا عديمة الصباغة تبدو رمادية أو عديمة اللون.

٦ – الصباغة بطريقة فان جيسون لصباغة ألياف الكولاجين
Van Gieson Method for the Collagen Fibers

الغرض منها:

صباغة ألياف الكولاجين (البيضاء) بطريقة مميزة.

الخطوات:

١ – ثبت العينة فى أى مثبت يحتوى على كلوريد الزئبقيك.

٢ – نفذ الخطوات من ٢ ـ ١٥ فى طريقة مالورى الثلاثية.

٣ – اصبغ الأنوية بمحلول صبغ فيجرت أيرن هيماتوكسيلين أو محلول صبغ سلستين بلو Weigert's iron hamatoxylin or celestin blue.

٤ – اغسل القطاعات جيدا فى ماء الصنبور.

٥ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر.

٦ – اصبغ القطاعات فى محلول صبغ فان جيسون لمدة ٢–٥ دقائق (١٠٠ سم^3 من محلول مائى مشبع فى حمض البكريك + ٥–١٠ سم^3 من ١٪ فوكسين حامضى فى الماء المقطر).

٧ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر.

٨ – انزع الماء من القطاعات فى ٩٥٪، ١٠٠٪ كحول.

٩ – روق القطاعات فى الزيلول ثم حمل فى كندا بلسم.

النتائج:

الكولاجين يصبغ باللون الأحمر.
العضلات وكرات الدم الحمراء وسيتوبلازم الخلايا باللون الأصفر.
أنوية الخلايا بلون بين البنى والأسود.

٧ – الصباغة بطريقة فايجرت ريزورسين فوكسين لصباغة الألياف المرنة
Weigert's Resorcin-Fuchsin Method for Elestic Fibers

الغرض منها:

صباغة الألياف المرنة (الصفراء) بطريقة مميزة.

الخطوات:

١ - ثبت العينة فى ١٠٪ فورمالين أو زنكراسيتيك.

٢ - نفذ عملية إزالة الزائد من المثبت من العينة.

٣ - اجر الخطوات من ٣-١٤ فى طريقة مالورى الثلاثية.

٤ - ضع القطاعات فى محلول فايجرت أيرن هيماتوكسيلين Weigert's iron haematoxylin لمدة ١-٣ دقائق (صباغة أنوية الخلايا).

٥ - اغسل الشرائح فى الماء.

٦ - اصبغ القطاعات فى محلول ريزورسين فوكسين لمدة ١-٣ ساعات. راجع درجة صباغة الألياف المرنة بالميكروسكوب ويراعى أن اقتضت الحالة زيادة وقت الصباغة حتى تصبغ الألياف المرنة باللون الأسود.

٧ - أزل الزائد من الصبغ بغسل الشرائح فى ٩٥٪ كحول.

٨ - اغسل الشرائح فى ماء صنبور.

٩ - (اختيارية). ضع الشرائح فى محلول صبغ فان جيسون لمدة دقيقة واحدة وذلك لصباغة ألياف الكولاجين.

١٠ - ضع الشرائح فى ٩٥٪ كحول (تغييرتين كل منهما ٥ دقائق) ثم استكمل نزع الماء بوضع الشرائح فى الكحول المطلق (تغييرتين كل منهما ٥ دقائق).

١١ - روق القطاعات فى الزيلول ثم حمل فى كندا بلسم.

النتائج:

- الألياف المرنة (الصفراء) زرقاء مسودة أو سوداء.
- الأنوية زرقاء إلى سوداء.
- ألياف الكولاجين (البيضاء) حمراء إلى قرنفلية.
- العناصر الأخرى بالنسيج صفراء.

٨ - الصباغة بطريقة هورتيجا للكشف عن ألياف الرتكيولين

del Rio-Hortega Method for Reticulin

الغرض منها:

صباغة الياف الرتكيولين بطريقة مميزة.

الخطوات:

١ – ثبت العينة فى أى مثبت عام ثم أزل الزائد من المثبت إن تطلب الأمر ذلك.

٢ – نفذ الخطوات من ٣–١٤ فى طريقة مالورى الثلاثية.

٣ – ضع القطاعات فى محلول ٠,٢٪ برمنجات البوتاسيوم لمدة ٣ دقائق.

٤ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر لمدة دقيقتين.

٥ – ضع القطاعات فى محلول ٥٪ حمض الأوكساليك لمدة ٣ دقائق.

٦ – اغسل القطاعات جيدا فى الماء المقطر (عدة تغييرات لمدة ١٠ دقائق).

٧ – ضع القطاعات فى كربونات الفضة النشادرية Ammoniacal silver carbonate فى درجة حرارة ٣٧°م لمدة ١٥–٣٠ دقيقة. لا تعرض المحلول لضوء شديد. كذلك احذر ملامسة أية أدوات معملية للمحلول.

٨ – اغمس القطاعات بسرعة فى ماء مقطر.

٩ – ضع القطاعات فى محلول مائى ٢٠٪ فورمالين لمدة ٣ دقائق ثم اغسل فى الماء المقطر لمدة ٣ دقائق.

١٠ – ضع القطاعات فى محلول كلوريد الذهب gold chloride (١٢,٥ سم^3 ١٪ كلوريد ذهب + ٥٠ سم^3 ماء مقطر) حتى يتحول لون المحلول من الأصفر إلى الرمادى المائل إلى البنفسجى.

١١ – اغمس فى الماء المقطر لفترة وجيزة.

١٢ – ضع القطاعات فى ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم Sodium thiosulphate (hypo) لمدة ٣ دقائق.

١٣ – اغسل القطاعات فى الماء الجارى لمدة ٥ دقائق.

١٤ – (اختيارية) يمكنك صباغة أنوية الخلايا بفيجرت هيماتوكسيلين وصباغة ألياف الكولاجين بواسطة بكروبونكو.

١٥ – انزع الماء من العينة بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول (٧٠٪، ٨٠٪، ٩٥٪) ثم فى تغييرتين فى الكحول المطلق (٥ دقائق لكل تغييرة).

١٦ – روق القطاعات فى تغييرتين من الزيلول (٥ دقائق لكل تغييرة) ثم حمل القطاعات فى كندا بلسم.

النتائج:

الرتكيولين ..... أسود

الكولاجين ..... أحمر

الأنويـة ..... سوداء – زرقاء أو بنى

obeikan.com

السيتوبلازم ..... أصفر رمادى
العضلات والألياف المرنة ..... أصفر فاتح

تحضير محلول كربونات الفضة النشادرية Ammoniacal Silver Carbonate:

- أضف ١٠ سم^3 من محلول مائى مشبع من كربونات اللثيوم إلى ١٠ سم^3 من محلول نيترات الفضة.

- رج ثم اسمح للراسب بالتجمع - رشح - ثم إغسل الراسب بالماء المقطر خمس مرات.

- أضف ٢٥ سم^3 من الماء المقطر ثم أضف محلول الأمونيا قطرة قطرة لتذيب الراسب مع الرج (الامونيا ٢٨٪) مع استبقاء عدد قليل من الحبيبات مترسبة.

- أضف ٩٥٪ كحول حتى تصل الكمية إلى ١٠٠ سم^3 ثم رشح.

- سخن مع عدم التغطية عند ٥٠°م لمدة عشرين دقيقة. احتفظ بالناتج فى زجاجة بنية اللون مع العلم بأنه صالح للاستعمال ويستعمل عدة مرات بشرط التسخين عند ٥٠°م والترشيح قبل كل استعمال.

٩ - طريقة جوموري لصباغة الخلايا العصبية الإفرازية
Gomori Method for the Neurosecretory Materials

الغرض منها:

الغرض من هذه الطريقة هو الحصول على صباغة مميزة للمواد الإفرازية التى تفرزها بعض الخلايا العصبية.

الخطوات:

١ - ثبت فى أى مثبت جيد لتثبيت البروتينات. ثم أزل الزائد من المثبت فى العينة إن تطلب الأمر ذلك.

٢ - اجر الخطوات من ٣-١٤ فى طريقة مالورى الثلاثية.

٣ - ضع القطاعات فى المرسخ الآتى لمدة ٤٨-٧٢ ساعة عند درجة ٣٧°م. (أضف ٧٥ سم^3 محلول مائى مشبع بحمض البكريك + ٢٥ سم^3 فورمالين + ٥ سم^3 حمض خليك ثلجى + ٤ جم شب الكروم على درجة عالية من النقاوة Chromium potassium sulphate (Merk) ثم سخن الجميع تسخينا هينا عند درجة ٥٠°م حتى الذوبان.

٤ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى حتى تصبح عديمة اللون.

٥ - ضع القطاعات فى المحلول المؤكسد الآتى لمدة خمس دقائق (١٠ سم^3 من ٢,٥٪ برمنجنات البوتاسيوم + ١٠ سم^3 من ٥٪ حمض الكبريتيك + ٧٠ سم^3 ماء مقطرة).

٦ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر.

٧ – ضع القطاعات فى ١٪ حمض أوكساليك.

٨ – اغسل القطاعات فى ماء جارى لمدة ١٠ دقائق ثم اغمس القطاعات فى الماء المقطر.

٩ – اصبغ فى المحلول الآتى لمدة ٣٠–٤٠ دقيقة عند درجة ٤م فى الثلاجة (٥٠ سم^3 من ١٪ من محلول هيماتوكسيلين (يحضر بتخفيف ١٠٪ من المحلول الكحولى بواسطة الماءالمقطر) + ٥٠ سم^3 من ٤٪ من محلول شب الكروم + ٢ سم^3 من محلول ٥٪ بيكرومات البوتاسيوم + ١ سم^3 من محلول ٥٪ حمض كبريتيك). يترك هذا المحلول فى ضوء الشمس لمدة أسبوعين ليتم نضجه ثم يخزن عند حرارة ٤°م ويجب ترشيح المحلول قبل استخدامه. المحلول صالح فترة شهرين ويجب اختبار صلاحيته بصباغة قطاعات مثلى (control sections).

١٠ – ميز القطاعات فى $\frac{1}{2}$٪ محلول كحولى محمض لمدة ٣٠ ثانية.

١١ – اغمس فى ماء صنبور جارى لمدة دقيقتين.

١٢ – اصبغ القطاعات فى $\frac{1}{2}$٪ محلول فلوكسين لمدة دقيقتين.

١٣ – ضع القطاعات فى محلول ٥٪ حمض فوسفوتنجستك لمدة دقيقتين.

١٤ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى لمدة ٥ دقائق على الأقل.

١٥ – ميز صبغ الفوكسين فى ٩٠٪ كحول.

١٦ – ينزع الماء من القطاعات ثم روق فى الزيلول وحمل فى صمغ زام Xam.

النتائج:

الإفرازات العصبية ..... بنفسجية إلى سوداء
المكونات الأخرى بالنسيج ..... حمراء إلى قرنفلية

١٠ – طريقة ثلاثى الكروم مع البيرايوديت شيف لصباغة خلايا البنكرياس

Trichrome-PAS to Demonstrate Alpha, Beta and Delta Cells of the Pancreas

الغرض منها:

هو التمييز بين الخلايا المختلفة لجزر لانجرهانز.

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة فى محلول زنكر فورمول (هلى) أو فى محلول ١٠٪ فورمالين متعادل بمحلول

منظم Buffer (لا تستخدم محلول بوان ما لم تحذف منه حمض الخليك). ثم أغسل العينة فى ٥٠٪ كحول.

٢ – نفذ الخطوات من ٢–١٥ فى طريقة مالورى الثلاثية.

٣ – ضع القطاعات فى محلول ٠,٦٪ حمض بيرادويك لمدة ٢٠ دقيقة.

٤ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى لمدة ٥ دقائق.

٥ – ضع القطاعات فى محلول شيف Schiff لمدة ٢٠ دقيقة.

٦ – ضع القطاعات فى ٣ تغييرات من حمض الكبريتوز Sulphorous acid (كل تغييره لمدة $\frac{1}{2}$ دقيقة).

٧ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى لمدة ١٠ دقائق.

٨ – ضع القطاعات فى محلول صبغ فيجرت أيرن هيماتوكسيلين لمدة ١٠ دقائق.

٩ – اغمس القطاعات فى ٩٥٪ كحول ثم ميز الصبغ فى كحول محمض.

١٠ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى لمدة ١٠ دقائق.

١١ – اصبغ فى محلول بونكو أورانج ج Ponceau-Orange G لمدة ساعتين. (٠,٢ جم بونكو Orange G + ١٠٠ سم^3 ماء مقطر + ١ سم^3 حمض خليك ثلجى).

١٢ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر.

١٣ – ميز الصبغ فى محلول ١٪ حمض فوسفوموليدك مستعينا بالميكروسكوب حتى تصبغ ألياف الكولاجين وخلايا دلتا فى جزر لانجرهانز.

١٤ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر ثم اصبغ بصبغ لايت جرين لمدة من ٥–٣٠ دقيقة (١ جم لايت جرين Light green SF yellowish + ١٠٠ سم^3 ماء مقطر + ١ سم^3 حمض خليك ثلجى).

١٥ – اغسل القطاعات عدة مرات فى محلول ١٪ حمض خليك لمدة ١–٢ دقيقة.

١٦ – ميز الصبغ فى محلول $\frac{1}{2}$٪ حمض فوسفوموليدك لمدة $\frac{1}{2}$ – ٥ دقائق.

١٧ – اغسل القطاعات فى محلول ١٪ حمض خليك لمدة ٢٠ دقيقة.

١٨ – انزع الماء من القطاعات فى تغييرتين من الكحول المطلق كل منهما ٥ دقائق.

١٩ – روق القطاعات فى الزيلول ثم حمل فى صمغ كندا بلسم.

النتائج:

حبيبات خلايا بيتا ..... برتقالية صفراء باهتة

سنيوبلازم خلايا بيتا ..... صفراء مخضرة باهتة

خلايا ألفا ..... برتقالية

خلايا دلتا ..... خضراء

الجليكوجين – المخاط – الجليكوبروتينات ..... حمراء إلى بنفسجية
الأنوية ..... سوداء
الكولاجين ..... أخضر
كرات الدم الحمراء ..... صفراء

١١ – طريقة شيهان لصباغة الكرومافين فى نخاع الغدة الكظرية
Sheehan Method for Chromaffin Cells of the Adrenal Gland

الغرض منه:

صبغ الخلايا الكرومافينية الموجودة فى نخاع الغدة الكظرية بطريقة مميزة.

الخطوات:

١ – ثبت العينة فى محلول أورث Orth's fluid.

٢ – أزل الزائد من بيكرومات البوتاسيوم والفورمالين من العينة.

٣ – اجر الخطوات من ٣ إلى ١٤ فى طريقة مالورى الثلاثية.

٤ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى لمدة ١٠ دقائق.

٥ – اصبغ القطاعات فى صبغ الهيماتوكسيلين بالشب Alum haematoxylin لمدة من ٣–٥ دقائق (أذب ١ جم من صبغ الهيماتوكسيلين فى ١٠٠ سم^3 ماء مقطر بمساعدة حرارة هادئة ثم أذب ٢٠ جم من كبريتات الألومنيوم الأمونيومية أو كبريتات الألومونيوم البوتاسية فى ٣٠٠ سم^3 من الماء المقطر بمساعدة حرارة هادئة. أضف المحلولين إلى بعضهما وأضف على الخليط ١ جم ثيمول عرض المحلول إلى الهواء والضوء فى زجاجة شفافة ذات سدادة قطنية. والمحلول سيصبح ناضجا وجاهزا للاستعمال بعد حوالى ١٠ أيام ويمكن استعماله لمدة من شهرين إلى ثلاثة. ويمكن انضاج المحلول بسرعة لو أضفنا إليه ٠,١٧٧ جم برمنجنات البوتاسيوم).

٦ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى لمدة ١٠–١٥ دقيقة واستخدم الميكروسكوب فى فحص الشرائح فى هذه المرحلة حتى تظهر محتويات أنوية الخلايا باللون الأزرق.

٧ – انزع الماء من القطاعات باستخدام تغييرتين من ٩٥٪ كحول ثم تغييرتين من الكحول المطلق.

٨ – روق القطاعات فى تغييرتين من الزيلول ثم حمل فى صمغ كندا بلسم.

النتائج:

خلايا الكرومافين صفراء إلى بنية.

أنوية الخلايا زرقاء.

obeikandl.com

١٢ – طريقة أزرق التولويدين لصباغة الخلايا العصبية وخلايا الفراء العصبى
Toludine Blue for Nerve Cells and Glia

الغرض منها:

صباغة الخلايا العصبية وخلايا الفراء العصبى.

الخطوات:

١ – ثبت العينة المأخوذة من الجهاز العصبى فى مثبت كحولى أو فى الفورمالين ثم أزل الزائد من المثبت فى العينة إذا أجريت التثبيت فى الفورمالين.

٢ – نفذ الخطوات من ٣ إلى ١٣ فى طريقة مالورى الثلاثية.

٣ – انقل الشرائح إلى ٩٥٪ كحول.

٤ – ضع الشرائح فى محلول الكوفونيوم الكحولى لمدة من ٣–٥ دقائق (١٠ جم كلوفونيم Colophonium + ١٠٥ سم^{٣} ٩٥٪ كحول).

٥ – ضع القطاعات فى تغييرين من ٩٥٪ كحولى (٣ دقائق لكل تغييره).

٦ – اصبغ القطاعات فى محلول التولويدين الأزرق لمدة $\frac{1}{2}$ دقيقة. (٠,١ جم صبغ توليويدين الأزرق + ١٠٠ سم^{٣} ماء مقطر).

٧ – ميز الصبغ فى محلول أنيلين كحولى (١٠٪ أنيلين فى ٩٥٪ كحول) حتى تصبح أرضية القطاع رائقة.

٨ – ضع القطاعات فى عدة تغييرات من زيت كاجيت Cajput oil لترويقها ثم ضعها فى تغييرتين من الزيلول وحمل فى كندا بلسم.

النتائج:

الخلايا العصبية Nerve cells:

حبيبات نسل	Nissl bodies	زرقاء داكنة
أنوية الخلايا	Nuclei	زرقاء باهتة.

خلايا الفراء العصبى Glia:

الخلايا قليلة الزوائد الشجيرية	Oligodendroglia	زرقاء داكنة جدا
الخلايا النجمية	Astrocytes	زرقاء باهتة

obeikandl.com

١٣ - طريقة جولجى السريعة لصباغة الخلايا العصبية
The Rapid Golgi Method for the Nerve Cells

الغرض منها:

تتيح هذه الطريقة الحصول على قطاعات سميكة مصبوغ فيها بعض الخلايا العصبية ويلاحظ عدم اصطباغ جميع الخلايا وهذا يقلل من ازدحام الخلايا المصبوغة وتراكبها على بعضها مما يتيح فرصه أفضل فى الفحص.

الخطوات:

١ - خذ عددًا من القطع الصغيرة من المخ أو الحبل الشوكى وضعها فى محلول جولجى (٤ أجزاء من ٤٪ بيكرومات البوتاسيوم + جزء واحد من ١٪ حمض أوزميك)، وإذا تعكر المحلول خلال هذه الفترة فيجب تغييره.

٢ - فى كل من اليوم الثانى والثالث والرابع والخامس من وضع العينات فى المحلول خذ أحدى القطع واغمسها فى الماء المقطر وجفف سطحها بورقة ترشيح. ثم اغمسها فى كمية قليلة من محلول مائى ١٪ نترات فضة حتى لا يظهر أى راسب من جراء ذلك، وبعد ذلك ضعها فى كمية مناسبة من محلول نترات الفضة فى زجاجة قاتمة لمدة يومين.

٣ - اغمس العينة فى عدة تغييرات من ٨٠٪ كحول.

٤ - جهز قطاعات ثلجية بسمك من ٥٠-١٠٠ ميكرون أو قطاعات شمعية بعد إجراء عملية طمر سريعة. ثم حمل القطاعات فى صمغ كندا بالسم ثم سخن الشريحة على لهب هادئ حتى يتطاير المذيب وقبيل جفاف الصمغ ضع عليه غطاءا زجاجيا ساخنا واضغط عليه برفق.

النتائج: بعض الخلايا العصبية تبدو واضحة داكنة الصباغة.

١٤ - طريقة جولجى كوكس لصباغة الخلايا العصبية
The Golgi-Cox Method for the Nerve Cells

الغرض منها:

هذه إحدى طرق جولجى لإظهار الخلايا العصبية ولكن تم تحويرها بواسطة كوكس. وتتيح هذه الطريقة الحصول على قطاعات سميكة مصبوغ فيها بعض الخلايا العصبية.

خطوات العمل:

١ - ضع عدة قطع من عينة من الجهاز العصبى فى كمية وفيرة من محلول المثبت عند درجة ٣٧°م فى الظلام مع ملاحظة أن تستقر العينة على قطعة من الصوف الزجاجى فى قاع آنية التثبيت

لضمان تخلل المثبت للعينة. غير محلول التثبيت مرة بعد ٢٤ ساعة وأخرى بعد ٤٨ ساعة ثم احكم إغلاق زجاجة التثبيت واحفظها عند ٣٧°م فى الظلام لمدة شهرين (لتحضير المثبت أضف ١٠ سم^{٣} من ٥٪ بيكرومات البوتاسيوم إلى ٢٠ سم^{٣} ماء مقطر. اخلط الكميتين معا ورج الزجاجة جيدا وإلا فقد يتكون لديك راسب).

٢ – خذ احدى القطع واعمل بها قطاعا يدويا بشفرة حادة لتحديد ما إذا كان التثبيت قد تخلل العينة بصورة جيدة أم أن التثبيت يحتاج إلى المزيد من الوقت.

٣ – اعمل قطاعات ثلجية بسمك من ٥٠–١٠٠ ميكرون (وهى أفضل كثيرا من القطاعات الشمعية فى هذه الحالة).

٤ – ضع القطاعات لمدة حوالى ساعة واحدة فى محلول ٥٪ كربونات الصوديوم أو ٥–١٠٪ محلول الأمونيا.

٥ – اغسل القطاعات جيدا فى الماء المقطر.

٦ – انزع الماء من القطاعات بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول.

٧ – روق القطاعات فى زيت خشب الأرز Cedar wood oil.

٨ – حمل القطاعات فى خليط من صمغ كندا بلسم والزيلول السابق تغليظ قوامه بتسخينه عند درجة ٤٠–٤٥°م وذلك بدون وضع غطاء زجاجى وقد لوحظ أن التحضيرات المحملة فى بلسم كندا العادية والمغطاة بالغطاء الزجاجى تبهت صباغتها سريعا.

١٥ – طريقة كاهال لصباغة الخلايا العصبية فى المخيخ
Cajal Cerebellar Method

الغرض منها:

صباغة المكونات الخلوية المختلفة فى المخيخ.

خطوات العمل:

١ – ثبت عينة من المخيخ فى الفورمالين لمدة ٣ أيام على الأقل ثم أزل الفورمالين الزائد من العينة.

٢ – جهز قطاعات ثلجية بسمك ٣٠–٤٠ ميكون.

٣ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر لعدة دقائق.

٤ – ضع القطاعات فى محلول الفضة (١٢ سم^{٣} من ٢٪ نترات فضة + ٨ قطرات من البيريدين + ٥,٥ سم^{٣} من ٩٦٪ كحول إيثيلى) لمدة ٤–٦ ساعات عند درجة ٣٧°م أو لمدة ١٢ ساعة فى درجة

حرارة الغرفة. ولاحظ أن القطاعات سيكون لونها بنيا فاتحا بعد انتهاء هذه الخطوة.

٥ – اغسل القطاعات فى الكحول المطلق لمدة ٢–٤ ثانية مع تغيير الكحول بعد غسل كل ٣ قطاعات.

٦ – اختزل الفضة بمحلول الهيدروكينون لمدة ١–٣ دقائق (٠,٣ جم هيدروكينون + ٢٠ سم^{٣} فورمالين + ١٥ سم^{٣} أسيتون + ٧٠ سم^{٣} ماء مقطر).

٧ – اغسل القطاعات جيدا فى الماء المقطر.

٨ – يمكنك تقوية اللون فى القطاعات بوضعها فى ٠,٢٪ كلوريد ذهب ثم اغسل فى الماء المقطر ثم ضع القطاعات لمدة ٣–٥ دقائق فى ٥٪ ثيوكبرتات الصوديوم ثم أغسل فى الماء المقطر مرة ثانية.

٩ – الصق القطاعات على شرائح عليها سحبة جيلاتينية تساعد على اللصق.

١٠ – انزع الماء من القطاعات ثم روقها وحملها فى كندا بلسم.

النتائج:

الخلايا العصبية والألياف العصبية	Cytons and nerve fibers	سوداء
اللبيفات العصبية	Neurofibrils	سوداء
خلايا بركنجة	Purkinje cells	سوداء
الخلايا السلالية	Basket cells	سوداء

١٦ – طريقة هولمز لصباغة الألياف العصبية
Holmes Method for Nerve Fibers

الغرض منها:

صباغة الألياف العصبية بطريقة مميزة.

الخطوات:

١ – ثبت العينة فى مثبت يحتوى على كلوريد الزئبقيك ثم نفذ الخطوات من ٢–١٥ فى طريقة مالورى الثلاثية مع ملاحظة أن يكون سمك القطاعات حوالى ٢٠ ميكرون.

٢ – ضع القطاعات فى محلول ٢٠٪ نترات فضة فى الظلام فى درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين.

٣ – اغسل القطاعات لمدة ١٠ دقائق فى ٣ تغيرات من الماء المقطر.

٤ – ضع القطاعات فى كمية وفيره من محلول فضة فى محلول منظم فى إناء زجاجى مغطى لمدة ٢٤ ساعة عند ٣٧°م (٥٥ سم^{٣} من محلول منظم أ + ٤٥ سم^{٣} من محلول منظم ب + ١ سم^{٣} من ١٪ نترات فضة + ١٠٪ بيريدين + ٣٩٤ سم^{٣} ماء مقطر. والمحلول المنظم أ يتكون من ١٢,٤ جم

حمض يوريك + ١٠٠٠ سم٣ ماء مقطر). (أما المحلول المنظم ب، فيتكون من ١٩ جم بوراكسى + ١٠٠٠سم٣ ماء مقطر).

٥ – اخرج الشرائح من المحلول السابق وصفها ثم ضعها فى إناء زجاجى به محلول مختزل وذلك عند درجة ٢٥°م لمدة دقيقتين على الأقل (المحلول المختزل يتكون من ١ جم هيدروكينون + ١٠ جم كبرتيت الصوديوم Sodium sulphite + ١٠٠ سم٣ ماء مقطر) وهذا المحلول يمكن استخدامه عدة مرات ولكنه لا يستعمل سوى مدة سبعة أيام على الأكثر).

٦ – اغسل الشرائح فى الماء الجارى لمدة ٣ دقائق ثم إغسلها فى الماء المقطر.

٧ – قوى لون الصباغة بوضع القطاعات فى ٠,٢٪ كلوريد ذهب لمدة ٣ دقائق أو حتى يصل لون الصباغة إلى حده الأقصى.

٨ – اغمس القطاعات لفترة قصيرة فى الماء المقطر.

٩ – ضع القطاعات فى محلول ٢٪ حمض أوكساليك وافحص الشرائح بالميكروسكوب على فترات وانقل الشرائح إلى الخطوه التالية عندما تصبح محاور الألياف العصبية سوداء – زرقاء اللون وذلك قبل أن تأخذ الأرضية لونا داكنا.

١٠ – اغمس القطاعات فى ماء مقطر.

١١ – ضع القطاعات فى محلول ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم لمدة ٥ دقائق.

١٢ – اغسل القطاعات فى ماء الصنبور لمدة ١٠ دقائق ثم أغمسها فى الماء المقطر.

١٣ – انزع الماء من القطاعات بسلسلة متزايدة من الكحول ثم روق فى الزيلول واطمر فى صمغ كندا بلسم.

النتائج:

الألياف العصبية ..... سوداء

أرضية القطاع ..... رمادية إلى بنفسجية باهتة

١٧ – طريقة مارشى لصباغة الغمد الميلينى المتحلل

Marchi Method for Degeneated Myelin

الغرض منها:

تميز الميلين المتحلل من جراء بعض المسببات المرضية. وتعتمد هذه الطريقة على أن الميلين السوى يتأكسد بسهولة بواسطة أملاح الكروم وبهذا فإنه لن يختزل رابع أوكسيد الأوزميوم بعد المعاملة بأملاح الكروم، بينما الميلين المتحلل – لن يتأكسد بأملاح الكروم ومن ثم فإنه سيأخذ اللون الأسود إذا عومل بعد ذلك برابع أكسيد الأوزميوم.

الخطوات:

١ – ثبت العينة فى محلول أورث Orth's fluid أو ١٠٪ فورمالين لمدة ٢٤–٤٨ ساعة.

٢ – اقطع العينة إلى أجزاء صغيرة بسمك ٢ مم وضع القطع فى محلول ٢,٥ بيكرومات البوتاسيوم فى الظلام لمدة ٧–١٤ يوما، وغير المحلول مرتين أثناء هذه الفترة.

٣ – ضع العينات فى محلول مارشى Marchi fluid فى آنية زجاجية مغلقة لمدة أسبوع إلى أسبوعين حسب حجم العينة مع ملاحظة أن يكون حجم المحلول يساوى ٢٠ مرة حجم العينات وأن تستقر العينات على قطعة من القطن فى قاع الآنية وأن ترج الزجاجة يوميا (محلول مارشى: (½ جم حمض الاوزميك + ١,٥ جم كلورات البوتاسيوم + ٣٠ سم٣ فورمالين + ٢,٥ سم٣ حمض خليك + ٢٠٠ سم٣ ماء مقطر).

٤ – اغسل العينات فى الماء الجارى لمدة ٢٤ ساعة.

٥ – انزع الماء من العينات فى أربع تغييرات من الاسيتون ثم روق العينة فى الكلوروفورم (لا تستعمل الزيلول لتتجنب تأثيره المذيب على حمض الأوزميك).

٦ – اطمر العينات فى الشمع ثم أعمل قطاعات شمعية.

٧ – ذوب الشمع من على الشرائح باستخدام الكلوروفورم ثم حمل القطاعات فى صمغ يذوب فى الكورفورم (Chlorform balsam).

النتائج:

الميلين المتحلل ..... أسود

الخلفية والميلين السوى..... صفراء إلى بنية

١٨ – طريقة هورتيجا لصباغة خلايا الغراء العصبى (الميكروجليا والأوليجود ندروجليا)

Hortega Method for Microglia and Oligodendroglia

الغرض منها:

صباغة الميكروجليا والأوليجود ندروجليا بطريقة مميزة.

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة فى محلول الفورمالين – بروميد الأمونيوم) لمدة ١–٣ أيام فى درجة حرارة الغرفة (٠,٦ جم بروميد الأمونيوم + ١٤ سم٣ فورمالين + ١٠٠ سم٣ ماء مقطر). ويطلق على هذا المحلول اختصارا لفظ FAB.

obeikandl.com

٢ – اعمل قطاعات ثلجية بسمك من ٢٠–٣٠ ميكرون.

٣ – اغسل القطاعات لمدة ٣٠ ثانية بماء مقطر عليه قطرات قليلة من الأمونيا.

٤ – اغسل القطاعات بسرعة فى تغييرتين من الماء المقطر.

٥ – ضع القطاعات فى محلول كربونات الفضة (٥ سم٣ من محلول ١٠٪ نيترات الفضة + ١٥ سم٣ من محلول ٥٪ كربونات صوديوم) ثم إنقل أحد القطاعات كل نصف دقيقة إلى محلول ١٠٪ فورمالين.

٦ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر.

٧ – قوى لون الصباغة بوضع القطاعات فى محلول ٠,٢٪ كلوريد فضة لمدة ١٠ دقائق.

٨ – ضع القطاعات فى محلول ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم لمدة ٥ دقائق.

٩ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر ثم الصقها على شرائح عليها سحبه من محلول الجيلاتين اللاصق.

١٠ – انزع الماء من القطاعات ثم روقها وحملها فى صمغ كندا بلسم.

النتائج:

الميكروجليا وأوليجود ندروجليا ..... لونها أسود

خلفية القطاع ..... رمادية اللون

١٩ – طريقة نومنكووفيجين المحورة عن طريقة كاهال لصباغة خلايا الغراء العصبى (أستروسيت)

Naoumenko and Feigin's Modification of Cajal's Method for Astrocytes

الغرض منها:

صباغة خلايا الأستروسيت White matter بطريقة مميزة. ويلاحظ فى هذه الطريقة أن الاستروسيت الليفية فى الماء البيضاء Grey matter تصبغ أفضل من الاستروسيت البروتوبلازمية فى المادة السنجابية فى المخ والحبل الشوكى.

الخطوات:

١ – ثبت العينة فى محلول ١٠٪ فورمالين أو ٢٪ محلول حمض خليك فى ١٠٪ فورمالين أو فى محلول الفورمالين – بروميد الأمونيوم (مبين تركيبه فى التمرين السابق).

٢ – اعمل قطاعات شمعية بسمك ١٠–٢٠ ميكرون.

٣ – أزل الشمع من على القطاعات ثم ضع القطاعات فى سلسلة متناقصة التركيز من الكحول حتى تصل إلى الماء.

٤ – ضع القطاعات فى محلول (الفورمالين – بروميد الأمونيوم).

٥ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر.

٦ – ضع الشرائح فى محلول (كلوريد الذهب – كلوريد الزئبقيك) فى الظلام لمدة ٦ ساعات عند درجة حرارة الغرفة (٨ سم٣ من محلول ١٪ كلوريد الذهب + ٤٠ سم٣ ماء مقطر ثم أضف فى الحال ٦,٤ سم٣ من محلول مائى من كلوريد الزئبقيك ورج جيدا).

٧ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر لمدة ٢–٥ دقائق.

٨ – ضع القطاعات فى محلول ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم لمدة ٥ دقائق.

٩ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر لمدة ٢–٥ دقائق.

١٠ – انزع الماء من القطاعات – روق ثم حمل القطاعات فى كندا بلسم.

النتائج:

الأستروسيت ..... سوداء بنفسجية

خلفية القطاع ..... قرنفلية

٢٠ – طريقة نومنكو وفيجين
لصباغة خلايا الغراء العصبى (الميكروجليا)

Naoumenko and Feigin's Method for Microglia in Paraffin Sections

الغرض منها:

صباغة الميكروجليا بطريقة مميزة.

خطوات العمل:

١ – اعمل القطاعات الشمعية بسمك ٢٠ ميكرون وألصقها على الشرائح التى سبق عمل سحبة من الجيلاتين (٠,٠٧٪) عليها.

٢ – أزل الشمع من على القطاعات ثم مررها فى سلسلة ذات تركيزات متناقصة من الكحول حتى تصل إلى الماء.

٣ – ضع القطاعات فى محلول ٣٪ حمض هيدروكلوريك لمدة ساعة واحدة عند درجة حرارة الغرفة.

٤ – اغمس القطاعات فى تغييرتين من الماء المقطر.

٥ – ضع القطاعات فى محلول ٥٪ كربونات الصوديوم لمدة ساعتين فى درجة حرارة الغرفة، وإذا لم تلصق القطاعات فى الشرائح بسحبه الجيلاتين فإنها سوف تنفصل عن الشرائح بفعل كربونات الصوديوم ويجب بعد هذه الخطوة معاملة كل قطاع على حدة.

obeikandl.com

٦ – ضع القطاع فى محلول كربونات فضه لمدة دقيقه واحده (٢٥ سم٣ من محلول ٢٠٪ نيترات فضة + ٢٠٠ سم٣ من محلول ٥٪ كربونات صوديوم ثم أضف قطرات من محلول أمونيا قويه حتى يصبح المحلول رائقا تقريبا. رشح المحلول قبل الاستعمال مباشرة باستخدام طبقه مزدوجه من ورق الترشيح حتى تتجنب لمس الطبقة الداخلية).

٧ – ضع القطاع مباشرة فى تغييرتين من ٠,٢٪ فورمالين ورج المحلول، ومن المفروض أن القطاع سيأخذ اللون البنى الفاتح أو الرمادى بعد حوالى ١٠ ثوان.

٨ – اغسل القطاع فى تغييرتين من الماء المقطر لمدة دقيقة واحدة.

٩ – قوى لون الصبغه بوضع القطاع فى محلول ٠٢٪ كلوريد ذهب لمدة دقيقة واحدة (تجنب التقويه الزائده).

١٠ – اغسل القطاع فى الماء المقطر لمدة دقيقه واحده.

١١ – ضع القطاع فى محلول ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم لدقيقه واحدة.

١٢ – اغسل القطاع ثم أنزع منه الماء بواسطة الكحول ثم روق وحمل القطاع.

النتائج:

الميكروجليا ..... لونها أسود

خلفية القطاع ..... رمادية

تحضير قطاعات ميكروسكوبية فى العظم

Microscopic Preparations of Bone

إن الأنسجه المتكلسة مثل العظم والأسنان لا يمكن أن تقطع بالميكروتوم العادى. ويمكن التغلب على هذه المشكلة والحصول على القطاعات بإحدى الطرق الآتية.

(أ) تحضير قطاع فى العظم بالنشر Sawing والشحذ Grinding.

(ب) نزع الكالسيوم (الأملاح غير الذائبة له) المسئولة عن صلابة العظم Decalcification.

(جـ) استخدام ميكروتومات الخدمه الشاقة المزوده بسكين أزميلية الشكل مصنوعه من الصلب والتنجستين وهذه يمكنها قطع العظام إلى شرائح رقيقة دون نزع الكالسيوم.

تحضير قطاع فى العظم بالنشر والشحذ

Preparation of Bone Sections by Sawing and Grinding

وتعتمد هذه الطريقة على أخذ قطعة رقيقة من العظم بالاستعانة بمنشار دقيق ثم شحذ هذه القطعة يدويا على مسن مع استخدام ٧٠٪ كحول أو الماء. وبعد أن تصل القطعة العظمية إلى أرق

obeikandl.com

سمك ممكن، تغسل ثم تجفف وتحمل على شريحة. (انظر تحضير قطاعات العظم فى الفصل الرابع تمرين ٧).

٢١ - طريقة نزع الكالسيوم من العظم وتحضير قطاعات مصبوغة
Decalcification and Preparation of Stained Section of Bone

لا تستخدم هذه الطريقة بطبيعة الحال فى حالة الكشف عن أملاح الكالسيوم بالطرق الهستوكيماوية. ومعظم طرق نزع الكالسيوم تعتمد على الأحماض مثل حمض النيتريك وحمض الفورميك وحمض ثلاثى كلور الخليك.

١ - اقطع بمنشار دقيق رقاقه من العظم لا يزيد سمكها عن ٣ مم.

٢ - ثبت العينة فى ١٠٪ فورمول ملحى لمدة ٦٠ ساعة.

٣ - انزع الكالسيوم من العظم بأحد المحاليل الآتية:

(أ) محلول بيرنى Perenyi's fluid:

١٠٪ حمض نيتريك	10% nitric acid	٤٠ سم٣
كحول مطلق	Abs. alcohol	٣٠ سم٣
٤٠,٥ حمض كروميك	Chromic acid	٣٠ سم٣

والمحلول يحضر قبل الاستعمال مباشرة. وتحتاج عملية نزع الكالسيوم لأيام قليله تنقل بعدها العينات إلى ٧٠٪ كحول.

(ب) محلول حمض الفورميك - سترات الصوديوم (Evans and Krajian):

حمض فورميك	Formic acid	٣٥ سم٣
٢٠٪ سترات صوديوم	Sodium	٦٥ سم٣

تحتاج عملية نزع الكالسيوم من ٢-١٠ أيام تنقل بعدها العينات إلى ٧٠٪ كحول.

(جـ) حمض ثلاثى كلور الخليك Trichloracetic acid:

يحضر ٥٪ من حمض ثلاثى كلور الخليك قبل الاستعمال مباشرة، وتنقل العينات منه إلى ٧٠٪ كحول.

(د) محلول إثيلين ديامين ترا أستيك المتعادل

:Ethylene diamine tetra acetic acid (E.D.T.A.)

وهو Chelating agent ويفضل على الطرق الثلاثة السابقة التى تعتمد على الأحماض المذكوره وتأخذ عملية نزع الكالسيوم من ٤-٤٠ يوما.

ويحضر المحلول كما يلى:

إثيلن دياميين تترا اسيتك أسد	Ethylene diamine tetra acetic acid	٢٥٠ جم
مـاء مقـطر	Dist Water	١٧٥٠ سم٣

ويراعى ضبط الأسى الهيدروجينى للمحلول عند ٧ (التعادل) باستخدام أقراص هيدروكسيد الصوديوم. ويراعى تغيير المحلول كل خمسة أيام. وتنقل العينات منه إلى ٧٠٪ كحول.

ويراعى عدم ترك العينات فى الأحماض الثلاثة الأولى وقت أكثر من اللازم والا أثر ذلك تأثيرا سيئا على النسيج فضلا على التأثير السيء لذلك على عمليات الصباغه اللاحقه. وعموما إذا أمكن قطع العظم بمشرط فإن ذلك يكون دليلا على تمام نزع الكالسيوم. إلا أن هناك اختبارا كيماويا يمكن به معرفة ذلك بدقة أكبر. ويعتمد الأختبار على أنه مادام لازال هناك كالسيوم فى محلول نزع الكالسيوم فإن ذلك يعنى أن عمليه نزع الكالسيوم لم تنته بعد. ويصلح هذا الإختبار مع أى من المحاليل الأربعة.

ويتم الاختبار كما يلى:

١ - أضف قطرات من محلول أمونيا قوى إلى ٥ سم٣ من محلول نزع الكالسيوم المستخدم حتى يصبح المحلول قلويا.

٢ - أضف ٥ سم٣ من محلول مائى مشبع من أكسالات الأمونيوم (حوالى ٣٪ تقريبا) واترك المحلول لمدة ٣٠ دقيقة.

٣ - إذا لم يتكون راسب أبيض بعد هذا الوقت فإن ذلك يعنى عدم وجود أيونات كالسيوم أى أن عملية نزع الكالسيوم قد تمت.

٤ - بعد وضع العينات فى ٧٠٪ كحول، مررها فى سلسلة نزع الماء اذا كنت ستطمر فى الشمع أو السيللودين أو مررها إلى الماء إذا كنت ستطمر فى الجيلاتين. ويراعى فى الحاله الأولى وضع العينات لفترة طويلة فى سلسله الكحولات. ويعتبر الطمر فى السيلودين هو أفضل الطرق.

٥ - يراعى عند تقطيع قالب الشمع تعريض سطح القطع إلى ماء بارد كما يراعى التقطيع بواسطة سكين كبيرة ثقيلة وميكروكتوم ثقيل أيضا.

٦ - تقطع بسمك ٦-٨ ميكرون ويستعمل لاصق فى تحميلها على الشرائح.

٧ - اصبغ بواسطة ايرلش هيماتوكسيلين وايوسين.

٨ - انزع الماء وروق وحمل كالعادة مع استخدام كندا بلسم غليظ القوام.