الفصل السادس

السحبات والسحقات
Smears and Squashes

تحضيرات السحبات Smear Preparations:

يجهز هذا النوع من التحضيرات بسحب العينة على الشريحة أو الغطاء الزجاجى وذلك قبل عمليتى التثبيت والصباغة. وعادة ما تشتمل هذه التحضيرات على ثلاثة أنواع:

(أ) سحبات الأوليات الحيوانية وسحبات البراز.

(ب) سحبات الدم.

(جـ) سحبات الحيوانات المنوية.

وعادة ما يكون لدينا نوعان من التحضيرات. فى النوع الأول يتم تثبيت العينة بعد أن يجف التحضير فوق الشريحة. ويطلق على مثل هذا النوع السحبة الجافة Dry Smears وفى النوع الثانى يتم تثبيت العينة وهى لا تزال فى حالة مبللة فوق الشريحة، ويطلق على مثل هذا النوع السحبة المبللة Wet Smears.

(أ) سحبات الأوليات الحيوانية وسحبات البراز Smears of Protozoa and Faeces:

تمرين ١٩: تحضير سحبة مبللة من الحيوانات الأولية أو من البراز وصباغتها بواسطة أيرن ألم هيماتوكسيلين:

١ - فى حالة الأوليات:

١ - امسك نملة بيضاء من عند منطقة الرأس أو الصدر والملقط وضعها على ظهرها عند مركز شريحة زجاجية نظيفة.

٢ - امسك بابرة الحلقات الثلاث الأخيرة من البطن واسحب القناة الهضمية للحشرة.

٣ - أضف قطرتين من محلول ٠,٧٥٪ كلوريد الصوديوم على الأمعاء ثم افتحها لاطلاق ما بها من أوليات إلى المحلول الملحى.

٤ - امسك الأمعاء بإبرة تشريح واسحب العينة فوق الشريحة.

٥ - اغمس الشريحة فى إناء غير عميق يحتوى على مثبت شودين Schaudinn بحيث يكون السطح الذى عليه السحبة إلى أسفل وبحيث تبعد بين هذا السطح وقاع الإناء عن طريق وضع

قضيبين زجاجيين أسفل طرفى الشريحة وغط الإناء تجنبًا لتلوثه بالأتربة وأترك العينة لتثبت مدة ٢٠ دقيقة.

٦ - إذا لوحظ أن العينات تهرب من سطح الشريحة فيمكنك التغلب على ذلك بتغطية سطح الشريحة بمحلول ماير ألبيومين ثم ارفع الشريحة من الإناء وأغسلها فى ٧٠٪ كحول لمدة ٥ دقائق لازالة الزائد من المثبت ثم ضع الشريحة لمدة ٢٠ دقيقة فى محلول يتكون من ٥ سم٣ ٧٠٪ كحول مشبع باليود + ٩٥ سم٣ ٧٠٪ كحول لازالة كلوريد الزئبق من العينة ثم أغسل الشريحة لمدة ١٥ دقيقة فى ٧٠٪ كحول لإزالة اليود. ثم تصبغ كما هو موضح بدءًا من الخطوة رقم (٢) فى حالة البراز.

٢ - فى حالة البراز:

١ - اسحب العينة بفرشاه صلبة مثل فرشاة الأسنان على سطح شريحة زجاجية. ضع الشريحة فى وضع رأسى فى إناء يحوى المثبت ثم أجر نفس الخطوات السابق ذكرها فى حالة الأوليات.

٢ - مرر الشريحة فى سلسلة هابطة من الكحولات (٥٠٪، ٣٠٪) ثم إلى الماء المقطر. اترك الشريحة ٥ دقائق فى كل محلول.

٣ - رسخ mordant لتهيئة العينة للصباغة بوضعها فى ٢٪ كبريتات الأمونيوم الحديدية Ferric ammonium sulphate لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة.

٤ - اغسل كل شريحة فى ثلاث تغييرات من الماء المقطر (½ دقيقة لكل تغييره) مع رج الشريحة وهى فى الماء. غير الماء إذا تغير لونه بطريقة واضحة.

٥ - اصبغ العينات فى ٠,٥٪ هيماتوكسيلين لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة أو أكثر. ويحضر محلول الصبغ من محلول أساسى ناضج Ripened Stock Solution من ١٠٪ هيماتوكسيلين فى الكحول المطلق.

ويلاحظ أنه فيما لو لم تغسل الشرائح جيدا قبل وضعها فى محلول الصبغ فإن ذلك سيؤدى إلى تكون راسب أسود يستقر فى قاع آنية الصبغ مخلفا محلولا أصفر مخضرا غير صالح للصباغة. لذا يجب فى هذه الحالة استخدام محلول صباغة جديد وغسل الشرائح بصورة أفضل. أما إذا غسلت الشرائح بصورة زائدة عن الحد فإن ذلك يؤدى إلى عدم صبغ السحبة. ويلاحظ أنه إذا غسلت الشرائح بصورة مناسبة فإن السحبة تأخذ اللون الأسود فى مدى ٥ دقائق من وضعها فى محلول الصبغ. ويجب تغيير المحلول كلما ترسب فيه راسب أسود من كثرة الاستعمال.

٦ - اغسل الشريحة فى تغييرتين من الماء المقطر لإزالة الصبغ من زجاج الشريحة.

٧ - أزل الصبغ الزائد من العينة (تمييز الصبغ) بوضع العينة فى محلول ٢٪ آيرن ألم Iron Alum ويجب هنا أن تقوم بعملية التمييز لكل شريحة على حدة وبالاستعانة بالفحص المجهرى. وذلك بأن تضع الشريحة فى الآيرن ألم لمدة نصف دقيقة ثم تغسلها فى الماء المقطر لتوقف عملية التمييز ثم تضع الشريحة على الميكروسكوب لتفحص مدى التمييز الذى حدث. ويراعى هنا أن تضع لوحا زجاجا نظيفا فوق مسرح الميكروسكوب، توضع عليه الشريحة المبللة وذلك لحماية الميكروسكوب. واحذر أن تجف العينة وذلك بأن ترجعها إلى المحاليل قبل أن تجف.

ملاحظة:

تعتبر العينة جيدة التمييز عندما تظهر فيها محتويات أنوية الخلايا من حبيبات كروماتينية وأنوية بلون أسود مائل للزرقة. أما العينة التى لم تتميز بعد فنجد فيها أن الأنوية كتل سوداء لا تتميز فيها أيه تراكيب. أما العينة التى زادت فيها عملية التمييز عن الحد المناسب فنجد أن تراكيب الأنوية لونها أصفر (لون الآيرن ألم). وإذا لم يكن التمييز قد استكمل بعد فعليك أن ترجع الشريحة إلى محلول الآيرن ألم وإذا كان التمييز زاد عن الحد فعليك أن ترجع الشريحة إلى محلول الصبغ وعموما فإنك تستفيد من الشريحة الأولى فى معرفة التوقيت المناسب لعملية التمييز لكى تنفذه فى الشرائح التالية. ويلاحظ أنه إذا كان لديك على الشريحة عدة طرز من الحيوانات الأولية فعليك أن تجرى عملية التمييز مع الطراز الذى يهمك دراسته، حيث أن الطرز المختلفة تحتاج إلى فترات مختلفة للتمييز. وإذا وجدت قطعا من أمعاء حشرة النمل لازالت عالقة على الشريحة (فى حالة تحضيرات طفيليات أمعاء النمل) فعليك أن تزيلها.

٨ - اغسل الشريحة التى تم تمييز صبغ العينات بها بصورة جيدة فى الماء الجارى لمدة من ٣٠-٤٥ دقيقة لإزالة الآيرن ألم تمامًا وألا يكون على الشريحة عند انتهاء التحضير لون أصفر - بنى.

٩ - انزع الماء من العينات بسلسلة صاعدة من الكحول.. (٣٠٪، ٥٠٪، ٧٠٪، ٨٠٪، ٩٥٪) لمدة ٣ دقائق فى كل محلول، ثم ضع الشرائح فى تغييرتين من الكحول المطلق لمدة ٥ دقائق لكل تغييره.

١٠ - روق العينات بوضعها فى تغييرتين من الزيلول (٥ دقائق لكل تغييره).

١١ - حمل العينات فى الكندا بالسم وغط التحضيرات بالأغطية الزجاجية واحفظها فى سطح مستوفى فرن عند درجة ٣٧°م حتى تجف.

(ب) سحبات الدم: (شكل١٧) :Blood Smears

يمكن تحضير نوعين من سحبات الدم: هما السحبات الرقيقة والسحبات السميكة. وعادة ما تحضر السحبات السميكة فى اللافقاريات حيث يكون عدد كرات الدم قليلا مما يتيح فحص أكبر عدد منها. وتحضر السحبات السميكة فى الفقاريات عندما يراد البحث عن طفيليات الدم حيث أن السحبات السميكة تعطى فرصة أكبر لاكتشاف هذه الطفيليات بجهد أقل مما لو حضرت سحبات رقيقة. كما يمكن أن تجرى السحبة على شريحة زجاجية أو غطاء زجاجى. وسحبات الأغطية الزجاجية هذه تعطى توزيع أفضل لكرات الدم البيضاء.

- عند جمع دم من أحد القوارض فإنه عادة ما يخدر الحيوان ثم يبتر جزء صغير من نهاية الذيل ثم يجمع الدم المنساب من الجرح.

- وفى البرمائيات يستحسن تجنب أخذ الدم من مصدر سطحى بسبب وجود كمية كبيرة من

الإفراز المخاطى على سطح الجلد.. ولذا فإنه ينصح بأخذ الدم من قلب الحيوان بعد تشريحه.

– وعند أخذ عينة من الدم فى الحقل بعيدا عن الظروف المعملية فإن الدم يجمع فى هذه الحالة فى وعاء زجاجى سبق معالجته بمادة مضادة للتجلط مثل الهيبارين. ويحفظ الوعاء فى درجة حرارة منخفضة حتى العودة إلى المعمل وإجراء السحبات المطلوبة.

وعادة ما تصبغ سحبات الدم بصبغة الجمسا Giemsa أو صبغة رايت Wright أو صبغة لشمان Leishman كما يصبغ بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين.

تمرين ٢٠: تحضير سحبة جافة رقيقة على شريحة زجاجية:

١ – جهز شرائح زجاجية نظيفة تماما ومغسولة بالماء والصابون ثم بالكحول ٩٥٪ قبل تجفيفها وتلميعها.

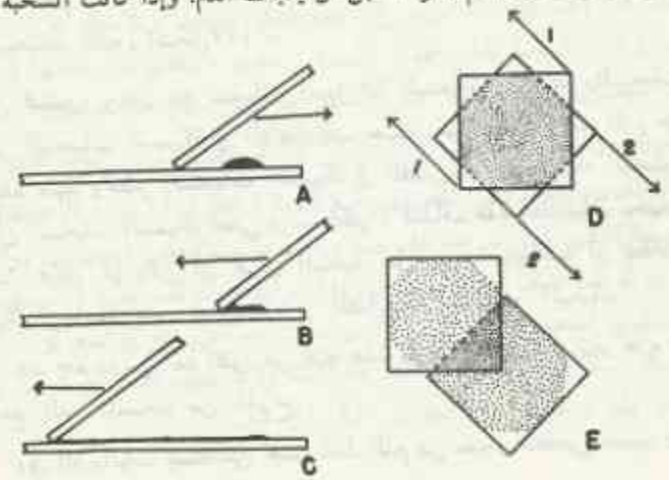
٢ – امسح المنطقة من جسم الحيوان التى ستأخذ منها عينة الدم بقطنة مبللة بالكحول.

٣ – عقم ابرة أو مشرط حاد واجرح جلد الحيوان وامسح قطرة الدم الأولى ولا تستخدمها فى عمل السحبة.

٤ – عند سيل كمية أخرى من الدم اجمع قطرة منه على السطح السفلى لطرف شريحة زجاجية نظيفة.

٥ – امسك بشريحة زجاجية نظيفة أخرى من طرفها وضع طرفها الآخر على سطح الشريحة الأولى بحيث تكون زاوية حادة مع جزء الشريحة الذى تقع عليه قطرة الدم وزاوية منفرجة مع الجزء الآخر من الشريحة (شكل ١٧). ادفع الشريحة الثانية وهى فى وضعها الملامس للشريحة الأولى تجاه قطرة الدم حتى تلمسها برقة وبذا تقع قطرة الدم فى الزاوية الحادة بين الشريحتين (شكل ١٧).

حرك الشريحة الثانية على سطح الشريحة الأولى فى اتجاه عكس الاتجاه الذى سبق أن حركتها فيه، فسيؤدى ذلك الى سحب قطرة الدم على سطح الشريحة الأولى خلف الشريحة الثانية (شكل ١٧). ويجب أن تجرى سحبة الدم بسرعة قبل أن يتجلط الدم. وإذا كانت السحبة سميكة



شكل رقم (١٧)

جدا فعليك أن تعيد السحبة مع قطرة دم أخرى مع تصغير الزاوية المحصور فيها الدم بين الشريحتين أو أن تحرك الشريحة الثانية بسرعة أكبر. أما إذا كانت سحبة الدم رقيقة جدا فعليك أن تعيد الخطوات السابقة مع تكبير الزاوية المشار إليها أو تحريك الشريحة الثانية بسرعة أقل.

٦ - امسك بالشريحة التى عليها سحبة الدم وحركها بقوة فى الهواء حتى تجف السحبة بسرعة.

٧ - ثبت الدم فى الكحول المثيلى لمدة ٥ دقائق.

٨ - اصبغ السحبة بإحدى الصبغات بالطرق التى ستوضح فيما بعد.

تمرين ٢١: تحضير سحبة جافة سميكة للدم على شريحة زجاجية:

١ - أجر الخطوات من ١-٣ فى التمرين السابق.

٢ - ضع عدة قطرات من الدم عند مركز الشريحة ثم اسحب الدم على الشريحة بتحريك قضيب زجاجى فى اتجاه دائرى ثم جفف الشريحة بتحريكها فى الهواء. إذا كان الغرض من التحضير إظهار الطفيليات فيستحسن أن تفجر كرات الدم بوضع الشريحة فى ماء مقطر لمدة ١٥ دقيقة قبل عملية التثبيت.

٣ - ثبت العينة فى الكحول المثيلى لمدة ٥ دقائق.

٤ - اصبغ السحبة بأحد الصبغات بالطرق التى ستوضح فيما بعد.

تمرين ٢٢: تحضير سحبة جافة للدم على غطاء زجاجى:

١ - ضع قطرة من الدم عند مركز غطاء زجاجى نظيف مربع الشكل.

٢ - ضع فوق هذا الغطاء غطاء زجاجيا آخر بحيث يكون فى وضع تبرز فيه أركانه الأربعة عند الجوانب الأربعة للغطاء الأول. وسيؤدى هذا إلى سحب الدم بين الغطائين.

٣ - اسحب الغطاءين بعيدا عن بعضهما وذلك بسحبهما فى اتجاهين مختلفين فى مستوى سطحيهما.

٤ - جفف التحضير فى الهواء.

٥ - ثبت العينة فى الكحول المثيلى لمدة ٥ دقائق.

٦ - اصبغ السحبة بإحدى الصبغات بالطرق التى ستوضح فيما يلى:

صباغة سحبات الدم بالهيماتوكسيلين والأيوسين:

تصبغ السحبات بهذين الصبغين بنفس طريقة صباغة القطاعات الشمعية وسوف يأخذ سنيوبلازم كرات الدم اللون الأحمر وأنويتها اللون الأزرق. وإذا لم يكن من المرغوب فيه عمل تحضيرات دائمة فلا داعى لنزع الماء والترويق والتحميل عند انتهاء التحضير.

صباغة سحبات الدم بصبغة رايت Wright Stain:

(هى خليط من المثيلين الأزرق المؤكسد والأيوسين)

تمرين ٢٣:

١ - اغمر الشريحة أو الغطاء الزجاجي ببضع قطرات من صبغة رايت واتركها لمدة دقيقتين.

٢ - أضف على سطح الشريحة قطرات من الماء المقطر ضعف ما وضعته من الصبغ، اترك الصبغ المخفف على الشريحة لمدة خمس دقائق.

٣ - اغسل الشريحة بالماء المقطر ثم جففها.

٤ - انزع الماء من التحضير بسلسلة صاعدة من الكحولات (٣٠٪، ٥٠٪، ٧٠٪، ٩٠٪، ٩٥٪) ٣ دقائق فى كل تغييرة ثم ضع الشرائح فى الكحول المطلق (٥ دقائق لكل تغييرة).

٥ - روق العينات وانزع الكحول بوضع الشرائح فى تغييرتين من الزيلول.

٦ - حمل التحضيرات فى صمغ متعادل.

ملحوظات:

١ - الصباغة فى صبغة رايت لا تحتاج إلى تثبيت سحبة الدم.

٢ - إذا لم يكن من المرغوب فيه عمل تحضيرات دائمة فلا داعى للخطوات ٤، ٥، ٦.

صباغة سحبات الدم بصبغة ليشمان Leishmann's Stain:

يمكن إعداد المحلول الأساسى للصبغ Stock Solution بإذابة ٠,١٥ جم من بودرة الصبغ فى ١٠٠ سم^{3} من الكحول المثيلى المطلق. ويستحسن عدم استخدام المحلول قبل أسبوعين أو ثلاثة.

تمرين ٢٤:

١ - اغمر الشريحة أو الغطاء الزجاجي بعد جفاف سحبة الدم ببضع قطرات من المحلول الأساسى للصبغ لمدة دقيقة واحدة ثم ضع على الشريحة ضعف عدد قطرات الصبغ من محلول منظم Buffer Solution مضبوط عند أس هيدروجينى قدره ٦,٨، ورج الشريحة حتى يختلط هذا المحلول مع الصبغ السابق وضعه فوق السحبة واترك التحضير لمدة ثمانى دقائق.

٢ - اغسل الشريحة بالماء المقطر حتى تظهر السحبة بلون قرمزى ثم جفف الشريحة فى الهواء.

٣ - انزع الماء من التحضير بسلسلة صاعدة من الكحولات وروق العينة وحملها فى صمغ متعادل كما هو موضح بالخطوات ٤، ٥ المذكورة سابقا عند الصباغة بصبغة رايت.

ملحوظات:

١ - الصباغة فى صبغة ليشمان لا تحتاج إلى تثبيت سحبة الدم.

٢ - إذا لم يكن من المرغوب فيه عمل تحضيرات دائمة فلا داعى للخطوة رقم ٣.

٣ - سيأخذ السيتوبلازم فى هذا التحضير اللون الأزرق مع ظهور بعض الحبيبات التى يضرب لونها بين الأحمر والأزرق، أما أنوية الخلايا فتأخذ اللون البنفسجى.

صباغة سحبات الدم بصبغة جمسا:

تمرين ٢٥:

١ - اغمر الشريحة أو الغطاء الزجاجى بعد جفاف سحبة الدم بمحلول جمسا المخفف (جزء من الصبغ الأساسى + ١٠ أجزاء من الماء) ويمكن تخفيف الصبغ بمحلول منظم فوسفات مضبوط عند أ س هيدروجينى بين ٦,٤-٧,٢ بدلا من الماء (١ جم فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين + ٢ جم فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين + لتر من الماء). اصبغ الشريحة لفترة تتراوح بين ١٥-٤٥ دقيقة مع حفظها فى وضع أفقى فى حيز صغير لتقليل عملية بخر الصبغ.

٢ - اغسل الشريحة فى الماء المقطر ثم جففها فى الهواء.

٣ - انزع الماء من التحضير بسلسلة صاعدة من الكحولات ثم روق التحضير فى الزيلول وحمله فى صمغ متعادل كما هو موضح فى الخطوات ٤، ٥ المذكورة سابقا عند الصباغة بصبغة رايت.

ملحوظات:

١ - إذا لم يكن من المرغوب فيه عمل تحضيرات دائمة فلا داعى للخطوة رقم ٣.

٢ - لون سيتوبلازم كرات الدم يجب أن يكون قرمزيا ولون الأنوية أزرقا أو بنفسجيا. وإذا كانت الألوان باهتة يمكنك زيادة وقت الصباغة والمراجعة بواسطة الميكروسكوب.

٣ - يجب حفظ محلول صبغ جمسا فى زجاجة قاتمة حيث أن الضوء يتلف الصبغ.

٤ - يحضر الصبغ الأساسى لجمسا بإذابة $\frac{1}{2}$ جم من بودرة الجمسا فى ٣٣ سم^3 من الجلسرين مع التسخين لمدة ساعتين فى فرن درجة حرارته ٦٠°م ثم يضاف ٣٣ سم^3 من الكحول المثيلى المتعادل والخالى من الاسيتون.

ملحوظات عامة:

١ - يجب مراعاة أن يكون صمغ التحميل متعادلا وإلا أصبحت الصباغة باهتة اللون بعد وقت قليل.

٢ - تغمر الشرائح بمحلول الصبغ كما ذكر سابقا فى حالة ما إذا كان المراد صباغة عدد محدود من الشرائح وذلك لتوفير كمية الصبغ، أما إذا أريد اعداد عدد كبير من الشرائح فيمكنك الاستعانة بآنية الصباغة كما هو متبع عادة.

٣ - عند فحص شريحة لسحبة دم ليست مغطاة بالغطاء الزجاجى بواسطة عدسة زيتية فيراعى ازالة الزيت من فوق الشريحة بعد الفحص بوضعها فى زيلول دون مسح الزيت حتى لا يتلف ذلك التحضير.

٤ - يراعى عدم تعرض الشرائح المصبوغة بصبغات جمسا أو رايت أو ليشمان للضوء لفترات طويلة حتى لا يؤدى ذلك إلى أن تبهت الصباغة.

(جـ) طريقة عمل سحبة من الحيوانات المنوية: Smears of Sperms:

١ – جهز سحبة من السائل المنوى على شريحة ثم ضع الشريحة قبل أن تجف فى وعاء صبغ كوبلن مغطى بورقة سوداء ويحتوى على بضع سنتيمترات من ١٪ حمض الأوزميك وهذا يعمل على تثبيت العينة ببخار الحمض.

٢ – ضع الشريحة فى محلول شادون لمدة ١٠ دقائق.

٣ – اغسل الشريحة فى الماء لمدة خمس دقائق.

٤ – اصبغ فى ماير هيماتوكسيلين لمدة خمس دقائق. ثم اغسل فى الماء وميز فى الكحول المحمض ثم زرق فى ماء الصنبور (الهيماتوكسيلين يقوم بصباغة انوية رؤوس الحيوانات المنوية).

٥ – اصبغ فى ٥٪ روز بنجال Rose Bengal (لصباغة ذيول الحيوانات). يمكنك إذا لم يتوفر الروز بنجال استخدام صبغ الايوسين.

٦ – اغسل الشرائح فى الماء – إنزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ثم روق فى الزيول وغطى بكندا بلسم.

النتائج:

رؤوس الحيوانات المنوية	زرقاء
ذيول الحيوانات المنوية	قرنفلى زاهى
الأرضيـــة	قرنفلى باهت

سحقات الكروموسومات Chromosomal Squashes:

طريقة الصباغة بالأسيتوكارمين أو الأسيتو – أورسين

Acetcarmine or Aceto – orcein staining

المحاليل:

محاليل الأسيتوكارمين:

محلول خزين الاسيتوكارمين Acetocamine stock solution:

اغل $\frac{1}{2}$ جم كارمين فى محلول ٤٥٪ حمض خليك لمدة ٢–٤ دقيقة ثم برد ورشح.

محلول العمل:

خفف محلول التخزين بنسبة ١ : ٢ باستخدام ٤٥٪ حمض خليك مضافا إليها بضع قطرات قليلة من هيدرات الحديديك Ferric hydrate أضف بعد ذلك ١٪ (بالحجم) من حمض اللاكتيك Lactic Acid لتحسين الصباغة.

محاليل الأسيتو - أورسين:

أضف ١-٢ جم أورسين إلى ٤٥ سم٣ حمض خليك ساخن، وبعد أن يبرد المحلول، أضف ٥٥ سم٣ ماء مقطر. يمكنك أيضا استخدام محلول ٢٪ أورسين فى ٧٠٪ حمض خليك.

طريقة أخرى لتحضير محلول الاسيتو - أورسين:

اخلط ٨٥٪ حمض لاكتيك وحمض خليك بنسب متساوية، سخن حتى الغليان قبل إضافة الصبغ (١-٢ جم لكل ١٠٠ سم٣ من المحلول.

خطوات العمل:

١ - امسك بالطرف الخلفى لبرقة كبيرة ونشطة من برقات حشرة الدروسوفلا (انظر الملحوظة أسفل)، باستخدام الملقط ثم انزع أجزاء فمها بإبرة تشريح ستجد أن الغدد اللعابية متصلة بأجزاء الفم، نظف الغدد من الدهون العالقة.

٢ - ضع الغدد فى مثبت كارنوى ثم فى كمية صغيرة من الصبغ لمدة ١٠ دقائق على شريحة نظيفة مغطاة بالألبيومين (بياض البيض).

٣ - استبدل الصبغ الموضوع فيه التحضير بكمية أخرى من الصبغ النظيف.

٤ - ضع غطاءا زجاجيا على التحضير، ضع على الغطاء ورقة ماصة ثم اضغط فوق مركز الغطاء بالابهام لافا اياه فى الاتجاه الى الخارج حتى يتنشر الصبغ خارج الغطاء وتمتصه الورقة الموضوعة واستمر فى ذلك حتى يتوقف انتشار الصبغ خارج الغطاء. لاحظ عدم دخول الصبغ الذى انتشر خارج الغطاء إلى تحت الغطاء مرة أخرى. إضغط بإصبعك بلطف حتى يتم سحق التحضير وفرده.

٥ - الحم حواف الغطاء بالشمع.

النتائج:

- الصباغة بالأسيتوكارمين حديدية تعطى لونا أحمرا مزرقا داكنا.
- الصباغة بأسيتو - أورسين تعطى لونا قرمزيا داكنا.

ملحوظة:

يمكنك استخدام قطع صغيرة من الخصيات أو المبايض بدلا من الغدد اللعابية لبرقات الدروسوفيلا، وفى هذه الحالة ينصح بصباغة العينات فى انبوبة اختبار بكمية كبيرة من الصبغ لمدة ٢-٧ أيام ثم غير المحلول قبل عملية السحق.

طريقة إعداد سحقة من القمة النامية فى جذور النباتات وصباغتها بطريقة فولجن:

١ - ثبت أطراف جذر النبات (وليكن البصل مثلا) لمدة ١-٢٤ ساعة فى محلول كارنوى ثم اغسل فى سلسلة هابطة من الكحول وأخيرا فى ثلاث تغييرات من الماء.

٢ – اجر عملية تحلل hydrolysis لمدة ٦ دقائق فى محلول عيارى من حمض الهيدروكلوريك ثم تسخينه سلفا حتى درجة ٦٠°م.

٣ – ضع العينات فى أنبوبة اختبار تحتوى على صبغ فولجن وذلك لمدة من ١–٣ ساعة.

٤ – اقطع القمة المرستيمية النامية من العينات وفتتها على شريحة مع قطرة من ٤٥٪ حمض خليك وذلك باستخدام قضيب زجاجى ثم تخلص من أى أجزاء نباتية لا داعى لها.

٥ – غط التحضير بغطاء زجاجى ثم ضع ورقة ماصة ثم اضغط برفق بحيث لا تحرك الغطاء.

٦ – سخن الشريحة على لهب هادئ بهدف لصق العينة على الشريحة.

٧ – جهز طبق بترى يحتوى على ٤٠٪ كحول ثم ضع الشريحة وعليها الغطاء الزجاجى فى وضع مقلوب، مما سيؤدى إلى انفصال الغطاء بعد عدة دقائق.

٨ – مرر الشرائح وعليها العينات وكذلك الأغطية فى سلسلة صاعدة من الكحول لنزع الماء ثم روق فى الزيلول وغط بكندا بالسم.

طريقة إعداد سحقة القمة النامية فى جذور النبات وصباغتها باستخدام الكارمين لتوضيح الكروموسومات:

Demonstration of the chromosomes in carmine-stained squash of the plant root

١ – خذ بصلة Bulb واغمر ساقها فى الماء لتحفيز نمو الجذور وعندما يصل طول الجذور إلى حوالى ١ سم، اقطع القمم النامية للجذور root tips وضعها فى مثبت كارنوى لمدة ٢٤ ساعة.

٢ – انقل أجزاء الجذور إلى الصبغ لمدة خمسة أيام. ويحضر الصبغ كما يلى:

كارمين	Carmine	٤ جم
ماء مقطر	Distilled water	١٤ سم^3
حمض هيدروكلوريك مركز	Conc HS1	١ سم^3

سخن المحلول برفق واتركه يغلى لمدة عشر دقائق ثم برده فجأة ثم أضف ٩٥ سم^3 من ٨٥٪ كحول أثيلى ورج جيدا ثم رشح.

٣ – انقل أجزاء الجذور إلى ٧٠٪ كحول اثيلى، وغير المحلول كل ٢٤ ساعة وذلك لمدة ثلاثة أيام أو أكثر إلى أن لا تؤثر الجذور على لون الكحول.

٤ – خذ أجزاء الجذور وضعها على شريحة زجاجية نظيفة وضع عليها قطرات من ٤٥٪ من حمض الخليك، ثم فتت الجذور باستخدام قضيب زجاجى.

٥ – غط فتات الجذور بغطاء زجاجى ثم ضع ورقة ترشيح ماصة على الغطاء واضغط برفق مع مراعاة عدم زحزحة الغطاء.

٦ – سخن الشريحة على لهب هادئ حتى تلتصق العينة بالشريحة.

٧ – جهز طبق بترى يحتوى على ٤٠٪ كحول اثيلى ثم ضع الشريحة عليها الغطاء الزجاجى فى

وضع مقلوب فى طبق بترى حتى ينفصل الغطاء.

٨ - مرر الشريحة وعليها العينة فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول لنزع الماء ثم روق فى الزيلول وغط باستخدام كندا بالسم.

ملحوظة:

إعداد سحبات الكروموسومات Chromosome Smears فى الفصل التاسع.

مجموعات الدم وعد كريات الدم Blood Groups and Blood Count:

لقد رأينا التعرض لطرق (تحديد مجموعات الدم)، (عد كريات الدم) باعتبار أنها تهدف إلى إعداد عينات حيوانية (الدم) على شرائح ميكروسكوبية لفحصها بالمجهر، ولكثرة الحاجة إلى استخدام هذه الطرق فى كثير من المعامل.

تحديد مجموعات الدم:

من المعروف أن مجموعات الدم أربع فى الإنسان، وهى أ، ب، أب، و(A-B-AB-O) ويتحكم فى تحديد مجموعة الدم مواد الإلصاق antigens تقع على سطح كريات الدم، وكذلك أجسام مضادة antibodies فى سائل البلازما.

مجموعة الدم	مواد الصاق	أجسام مضادة
أ	أ	ب
ب	ب	أ
أب	أب	—
و	—	أب

وقد لوحظ أنه لو خلط دم شخص ما بدم شخص آخر فإن الكريات الدموية قد تظل كما هى بصورتها الطبيعية أو قد تتجمع وتلتصق مع بعضها مما يؤدى إلى مشاكل صحية خطيرة. والجدول الآتى يوضح نتائج خلط الدم بين المجموعات المختلفة حيث تدل علامة (-) على عدم حدوث مشاكل عند نقل الدم بينما تدل علامة (+) على حدوث إلصاق agglutination.

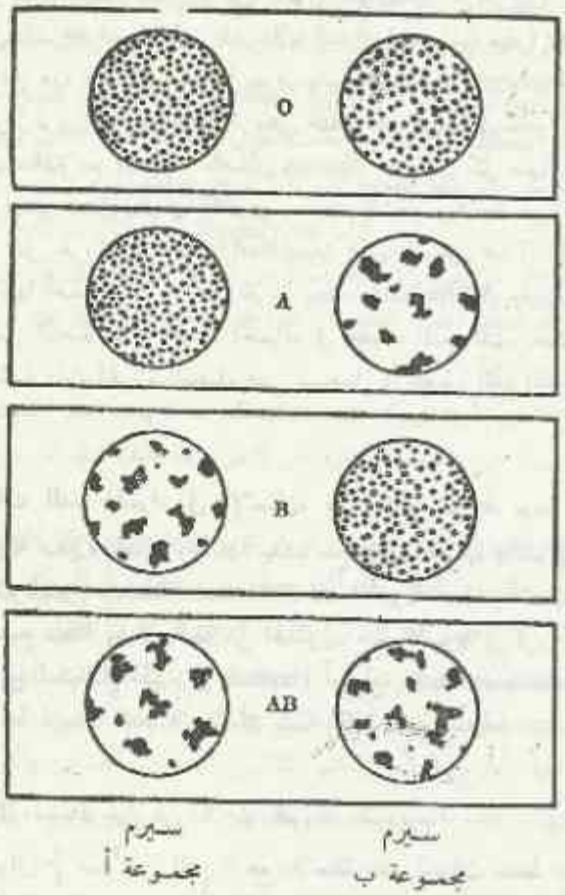
دم الآخذ	دم المعطى			
	O	A	B	AB
O	—	+	+	+
A	—	—	+	+
B	—	+	—	+
AB	—	—	—	—

ومن المعتاد إجراء اختبار تحديد مجموعة الدم فى المستشفيات. ولإجراء ذلك يلزم وجود زجاجتى مصل تحتوى إحداهما على أجسام مضادة أ (مصل A) والأخرى على أجسام مضادة ب (مصل B). ونضع قطرة من كل زجاجة على شريحة زجاجية، ثم نضيف قليل من الدم المراد اختباره إلى كل من قطرتى المصل. وننتظر برهة ثم بناء على حدوث إلصاق من عدمه مع كل مصل يمكن تحديد مجموعة الدم. ويمكن ملاحظة الإلصاق بالعين المجردة أو باستخدام الميكروسكوب. والجدول الآتى يوضح الاحتمالات الأربعة فى هذا الشأن.

عدم حدوث إلصاق مع كل من المصلين أ، ب	مجموعة O
عدم حدوث إلصاق مع المصل A وحدوث إلصاق مع المصل ب	مجموعة A
حدوث إلصاق مع المصل أ وعدم حدوث إلصاق مع المصل ب	مجموعة B
حدوث إلصاق مع كل من المصلين أ، ب	مجموعة AB

عد كريات الدم Blood Counting:

يجرى عد كريات الدم الحمراء والبيضاء للإنسان فى المعامل الطبية عادة لما لذلك من أهمية تشخيصية. كما أن عد كريات الدم فى الحيوانات له أهمية فى الدراسات المقارنة والتجريبية. وتزود المعامل الكبيرة عادة بأجهزة لعد الأنواع المختلفة من كريات الدم ميكانيكيًا Automatic


O
A
B
AB
سيرم
مجموعة أ
سيرم
مجموعة ب

Counting. إلاّ أن عد كريات الدم بالطرق البصرية Visual means لا زال يستخدم فى بعض المعامل حيث يستعان بنوع خاص من الشرائح تقع عند منتصف طولها منطقة أو أكثر تحوى خطوط طولية وعرضية متقاطعة بنظام خاص، تكون كلها شكلاً مربعًا طول ضلعه ٣ مم وعمقه $\frac{١}{١٠}$ مم، ويطلق على الشريحة اسم مقياس عد خلايا الدم أو (هيموسيتوميتر) Haemocytometer). وهناك طرز مختلفة من هذه الشرائح منها ما يعرف باسم طراز ثوما Thoma type – طراز بوركر Bürker type – طراز نوير Neubauer type. وهى تختلف عن بعضها فى نظام المربعات الناتجة عن تقاطع الخطوط. ويستخدم مع الشريحة ماصتان Pipettes خاصتان كل منهما مزودة بانتفاخ عند منتصفها وبخرطوم صغير يتصل بطرفها العلوى يستخدم للشفط ويلاحظ أن انتفاخ أحد الماصتين كبير نسبيًا ويحتوى على خرزة حمراء Red bead ومبين عليها تدريجين هما (0.5)،(101). أما الماصة الأخرى فإن انتفاخها أصغر ويحتوى على خرزة بيضاء White bead، ومبين عليها تدريجين هما (0.5)،(11). وتستعمل الماصة ذات الخرزة الحمراء فى تخفيف الدم الذى سيتم عد كريات الدم الحمراء فيه، أما الماصة ذات الخرزة البيضاء فهى تستعمل فى تخفيف الدم الذى سيتم عد كريات الدم البيضاء فيه.

خطوات عد كريات الدم الحمراء فى الإنسان، باستخدام شريحة ثوما أو بوركر:

١ – أحضر أنبوبة صغيرة بغطاء، وعاملها بهدف منع تجلط الدم بها وذلك بوضع $\frac{١}{١٠}$ سم^٣ من ١٠٪ أو كسالات البوتاسيوم Potassium Oxalate، لف الأنبوبة عدة مرات بهدف التأكد من أن سطحها الداخل أصبح مبللا بطبقة رقيقة من المحلول. ضع الأنبوبة فى فرن عند درجة ١٠٠°م حتى تجف تمامًا. ويمكن استخدام الهيبارين Heparin أو مادة Ethylenediamenetetracetic acid (EDTA) كمواد مانعة لتجلط الدم. لاحظ أن كمية المادة مانعة التجلط تتناسب مع كمية الدم المستعملة.

٢ – جهز محلول فسيولوجى من ٠,٩٪ كلوريد صوديوم.

٣ – اسحب حوالى $\frac{١}{٤}$ سم^٣ من الدم – مع ملاحظة عدم إحداث ضغط على مصدر الدم – بواسطة حقنة ثم احقن الدم بسرعة فى الأنبوبة الصغيرة المذكورة سابقًا.

٤ – اشفط ببطء واحتراس كمية من الدم باستخدام الماصة ذات الخرزة الحمراء حتى علامة (0.5)، وإذا تم سحب كمية أكبر من الدم، أزل الزائد بأن تلمس الطرف السفلى للماصة لورقة ترشيح حتى يصبح مستوى الدم بالماصة عند علامة (0.5) تمامًا.

٥ – اغمس على الفور الطرف السفلى للماصة فى المحلول الفسيولوجى واشفط كمية منه حتى علامة (101)، وبذلك يكون تم تخفيف الدم مئة مرة.

٦ – افصل الأنبوبة المطاط عن الماصة وامسك بطرفى الماصة بين إصبعى الإبهام والسبابة ورجها جيدًا لمدة دقيقة واحدة، ثم اسمح للسائل فى ساق الماصة بالخروج ثم ضع قطرة من السائل فى دفعة واحدة فوق المنطقة المقسمة من (شريحة مقياس عد خلايا الدم) وغط بالغطاء الزجاجى المخصص للشريحة. اترك الشريحة ساكنة لمدة دقيقتين ثم ضعها على منصة الميكروسكوب لعد

كريات الدم بقوة تكبير ٢٤-٤٠ مرة. لاحظ أن التخطيط فى الشريحة من طراز توما Thoma type يكوّن ١٦ مربعًا كبيرًا يفصل بينها خطوط ثلاثية، وكل مربع كبير مقسم إلى ١٦ مربعًا صغيرًا.

لاحظ أيضًا أن التخطيط فى الشريحة من طراز بوركر يكون ٩ مناطق كبيرة مربعة الشكل يفصل بينها خطوط ثلاثية ويوجد فى كل منطقة كبيرة مربعة الشكل ٩ مربعات صغيرة، ١٦ مربعًا كبيرًا.

أما شريحة عد الدم من طراز نوبر Neubauer type فهناك نوع محسن منها (انظر الشكل)، وفيها ينقسم المربع المخطط إلى تسعة مربعات، طول ضلع كل منها ١ مم، وينقسم المربع المركزى إلى ٢٥ مربع ينقسم كل منها بدوره إلى ١٦ مربع صغير.

٧ - فى حالة الشريحة من طراز توما Thoma type، عد كريات الدم الحمراء فى ٨٠ مربع صغير (طول ضلعه $\frac{١}{٢٠}$ مم) هى بالتحديد عبارة عن ١٦ مربع صغير فى كل من خمس مربعات الدم الحمراء فى ٨٠ مربع صغير (طول ضلعه $\frac{١}{٢٠}$ مم) هى بالتحديد عبارة عن ١٦ مربع صغير فى كل من خمس مربعات كبيرة.

فى حالة الشريحة من طراز بوركر Bürker type، عد كريات الدم الحمراء فى ٤٥ مربع صغير (طول ضلعه $\frac{١}{٢٠}$ مم)، هى بالتحديد عبارة عن ٩ مربعات صغيرة فى كل من خمس مناطق كبيرة مربعة.

ولعد كريات الدم الحمراء فى شريحة من طراز نوبر Neubauer type المحسن، عد كريات الدم الحمراء فى خمس مربعات من أمثال تلك التى حولها دائرة صغيرة فى الشكل بحيث يكون أربعة منها واقعة فى الأركان، والخامس فى المركز (طول ضلع المربع $\frac{١}{٥}$ مم).

لاحظ عند عد الكريات فى أى مربع، أن هناك كريات لا تقع كلها داخل المربع ولكنها تلامس خطوطه ويراعى أن يشمل العد تلك الخلايا التى تلامس الضلعين الأيمن والسفلى بينما لا تعد الخلايا التى يقع جزء منها خارج المربع ولكنها تلامس الضلعين العلوى والأيسر.

٨ - بعد انتهاء العد، اغسل شريحة مقياس عد كريات الدم وكذلك الماصتين.

عمليات الحساب:

	فى حالة الشريحة ثوما	فى حالة الشريحة بوركر	فى حالة الشريحة نوبر
تخفيف الدم	١ : ٢٠٠	١ : ٢٠٠	١ : ٢٠٠
عمق ساحة التخطيط بالشريحة	$\frac{١}{١٠}$ مم	$\frac{١}{١٠}$ مم	$\frac{١}{١٠}$ مم
طول ضلع كل مربع	$\frac{١}{٢٠}$ مم	$\frac{١}{٢٠}$ مم	$\frac{١}{٥}$ مم
حجم كل مربع	$\frac{١}{٤٠٠٠} = \frac{١}{١٠} \times \frac{١}{٢٠} \times \frac{١}{٢٠}$ مم^٣	$\frac{١}{٤٠٠٠} = \frac{١}{١٠} \times \frac{١}{٢٠} \times \frac{١}{٢٠}$ مم^٣	$\frac{١}{٢٥٠} = \frac{١}{١٠} \times \frac{١}{٥} \times \frac{١}{٥}$ مم^٣
عدد كريات الدم التى تم عدها	فى ٨٠ مربع = x	فى ٤٥ مربع = x	فى ٥ مربعات = x
عدد كريات الدم فى ١ مم^٣	$٢٠٠ \times ٤٠٠٠ \times \frac{x}{٨٠}$	$٢٠٠ \times ٤٠٠٠ \times \frac{x}{٤٥}$	$٢٠٠ \times ٢٥٠ \times \frac{x}{٥}$

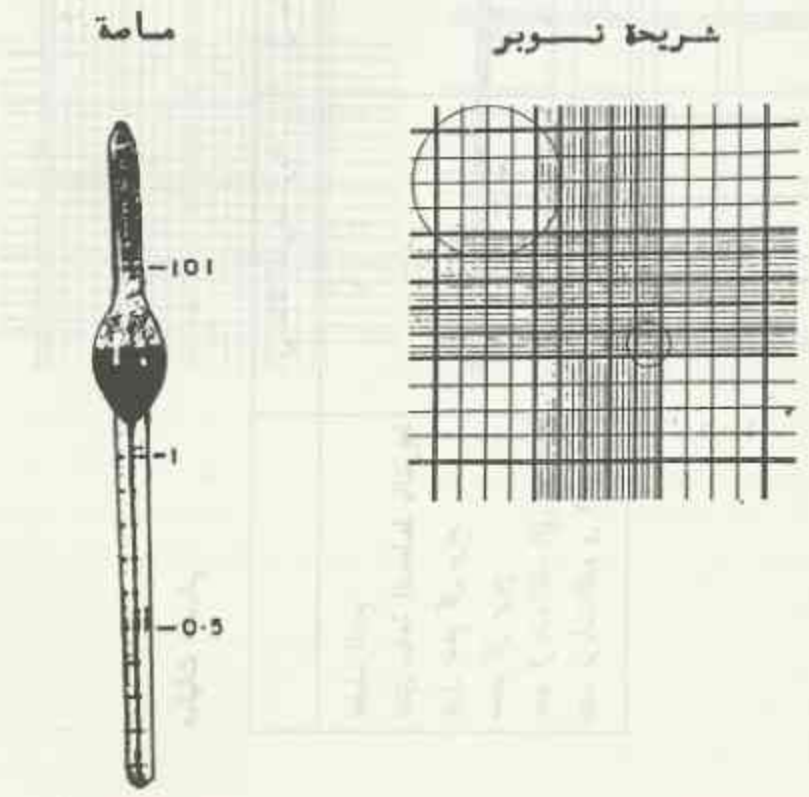
خطوات عد كريات الدم البيضاء فى الإنسان، باستخدام شريحة ثوما أو بوركر:

يتم عد كريات الدم البيضاء عادة بعد التخلص من كريات الدم الحمراء بواسطة حمض الخليك Acetic acid وصباغة كريات الدم البيضاء باستخدام جنتيان فيوليت Gentian violet، ويتم تخفيف الدم بمحلول يتكون من ١٪ حمض خليك مذابًا فيه جنتيان فيوليت بتركيز ١ : ٦٠٠٠. ويراعى أن تخفيف الدم يتم باستخدام الماصة ذات الخرزة البيضاء حيث يصل مستوى المحلول المخفف إلى العلامة (١١) وبذلك يكون تخفيف المحلول بنسبة ١ : ٢٠ فقط.

وبالنسبة للشريحة من طراز ثوما Thoma تعد الكريات البيضاء فى ١٦ مربع كبير (التى تفصل بينها خطوط ثلاثية وطول ضلع كل منها $\frac{١}{٥}$ مم).

وبالنسبة للشريحة من طراز بوركر Bürker، تعد الكريات البيضاء فى ١٦ مربع كبير (طول ضلعه $\frac{١}{٥}$ مم) وذلك فى خمس من المناطق الكبيرة مربعة الشكل (أى ٨٠ مربع).

وبالنسبة للشريحة من طراز نوبر Neubauer، تعد الكريات البيضاء فى أربعة مربعات كبيرة فى أركان المنطقة المخططة (أحد هذه المربعات محاط بدائرة كبيرة فى الشكل).



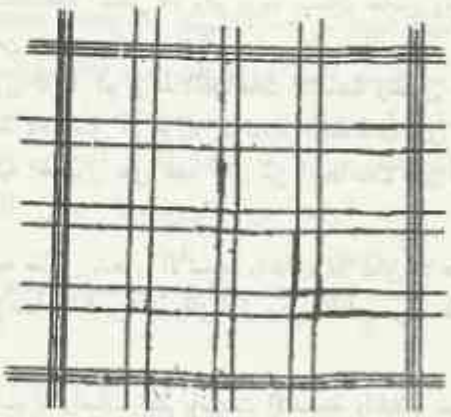
عمليات الحساب:

	فى حالة الشريحة ثوما	فى حالة الشريحة بوركر	فى حالة الشريحة نوبر
تخفيف الدم	١ : ٢٠	١ : ٢٠	١ : ٢٠
عمق ساحة التخطيط بالشريحة	$\frac{١}{١٠}$ مم	$\frac{١}{١٠}$ مم	$\frac{١}{١٠}$ مم
طول ضلع كل مربع	$\frac{١}{٥}$ مم	$\frac{١}{٥}$ مم	١ مم
حجم كل مربع	$\frac{١}{٢٥٠} = \frac{١}{١٠} \times \frac{١}{٥} \times \frac{١}{٥}$ مم^٣	$\frac{١}{٢٥٠} = \frac{١}{١٠} \times \frac{١}{٥} \times \frac{١}{٥}$ مم^٣	$\frac{١}{١٠} = \frac{١}{١٠} \times ١ \times ١$ مم^٣
عدد كريات الدم التى تم عدها	فى ١٦ مربع = س	فى ٨٠ مربع = س	فى ٤ مربعات = س
عدد كريات الدم فى ١ مم^٣	$٢٠ \times ٢٥٠ \times \frac{س}{١٦}$	$٢٠ \times ٢٥٠ \times \frac{س}{٨٠}$	$٢٠ \times ١٠ \times \frac{س}{٤}$

عد كريات الدم فى الحيوانات غير الثديية:

رغم أن طرق عد كريات الدم فى الحيوانات المختلفة تعتمد على أساس واحد، إلاّ أن هناك اختلافات فى بعض التفصيلات مثل أفضلية أنواع وتركيزات المواد المستخدمة لمنع التجلط. كذلك فإن تركيب محاليل التخفيف المستخدمة مع كريات الدم البيضاء والحمراء فى حالة عد كريات الدم فى الحيوانات غير الثديية كالطيور والأسماك تختلف عن تلك الخاصة بالثديات، فضلاً على أن نسبة تخفيف الدم عند عد كريات الدم البيضاء فى هذه الحالة تماثل عادة تلك التى تستعمل عند عد كريات الدم الحمراء. كما أن هناك صعوبة فى فحص تحضيرات دم الحيوانات غير الثديية قد تنشأ عن أن الكريات الحمراء مثل البيضاء لها أنوية. يمكن الرجوع إلى المراجع المتخصصة للتعرف على التقنيات المتعلقة بهذه الطرق.

شريحة بوركر



شريحة ثوما