حيوان 5

(كيمياء أنسجة وفسيولوجي)

302 عل ح

(الجزء العملي)

الفصل الدراسي الأول

إعداد

أ.م.د. أمنه محمد مصطفي

د. علي منصور فضل الله

كلية العلوم

قسم علم الحيوان

2023-2022

بيانات الكتاب

الكلية: التربية

الفرقة: الثالثة

التخصص: العلوم البيولوجبة والجيولوجية

تاريخ النشر: الفصل الدراسي الأول

2023-2022 م

عدد الصفحات: 37 صفحة

كيمياء الأنسجة

المحتوى

الموضوع	رقم الصفحه
الفصل الآول	1
تجهيذ العينات الهستوكيميائيه للفحص الميكروسكوبى	
طريقة التقطيع	
الفصل الثانى	7
طريقة تحضير المواد الكربوهيدراتيه	
1- طريقة حامض البيرأيودك للكشف عن المواد الكربوهيدراتيه العامه:	
2- طريقة البست كارمين لتوضيح الجليكوجن	
الفصل الثالث	9
طريقة توضيح المواد الدهنيه	
• طريقة أسود سودان (ب)	
الفصل الرابع	10
طريقة توضيح المواد البروتينيه	
• طريقة الزئبق بروموفينول الأزرق	

الفصل الاول

تجهيز العينات الهستوكيميائيه للفحص الميكروسكوبى

(التحضيرات المجهريه)

طريقة التقطيع Sectioning Method
وهي الأهم لدراسة العينات على مستواها النسيجي والخلوي والغرض منها الحصول
على مقطع نسيجي رقيق جدا,ويعرف المقطع Section بأنه شريحة رقيقة تقطع من جزء مأخوذ من كائن حي لغرض دراسة تركيب او ترتيب الخلايا المكونة لها. اما طرق القطع Method of sectioning يستخدم فيها
1- جهاز التقطيع الدوار Rotary microtome .
2- جهاز التقطيع الدقيق او المستدق Ultramicrotome .
يستخدم لعمل مقاطع فائقة السمك للفحص بالمجهر الالكتروني .
3- جهاز التقطيع الجليدي(Freezing microtome (Cryostat .
و فيما يلي الخطوات المتبعة لعمل مقاطع نسجية محملة على شرائح زجاجية :
1 الحصول على العينةObtaining the specimen(Sampling)
2 تثبيت العينة Fixation
3 غسل العينة Washing
4 نزع الماء من العينةDehydration
5 ترويق العينةClearing
6 تخليل أو تشرب العينةInfiltration
7 طمر العينةEmbedding
8 التشذيبTrimming
9 القطعSectioning
10 صبغ القطاعاتStaining
11تغطية الشرائح Mounting لعمل شريحة مستديمة Permanent slide.
12تنظيف ورسم(تعليم) الشرائح Labelling& Cleaning
و سوف نتطرق لكل خطوة بشيء من التفصيل:
1-<u>الحصول على العينة:</u>
نحصل على العينة اما بشكل خزعة Biopsy من الإنسان المريض خلال العملية الجراحية ومن الحيوان بعد قتله مباشرة .يعرف القتل بأنه إيقاف دائم وسريع لجميع العمليات الحيوية . و تتم عملية القتل بعدة وسائل منها –

التنخيع –ضرب مؤخرة الرأس –التخدير.

2-<u>التنخيع:</u>

ويقصد بها شل الحيوان شلا كاملا وذلك بفصل الحبل الشوكي عن الجهاز العصبي المركزي أو المخ وبذلك لا يحس الحيوان بالألم أثناء عملية التشريح وكثيرا ما يطبق على الضفادع.

ضرب مؤخرة الرأس : وتهدف إلى ارتجاج مخي مفاجئ بحيث يصبح الحيوان بعدها في حالة غيبوبة.

التخدير: هو إيقاف مؤقت لجميع العمليات الحيوية بإستخدام مادة مخدرة مثل: الكلورفورم

3-<u>التثبيت</u>

الخطوة الأولى في تحضير الأنسجة من أجل إخضاعها للفحوصات النسجية والكيميانسجية وتهدف هذه الخطوة إلى المحافظة على النسيج ومحتوياته على الحالة التي كان عليها في جسم الكائن الحي أو قريبة من ذلك وتتم عملية التثبيت من خلال التفاعلات الكيميائية والتداخلات الفيزيائية بين المجاميع الفعالة للمثبت والمجاميع الفعالة للمواد الكيميائية الموجودة في النسيج (كربوهيدرات – بروتين –دهون – إنزيمات - أملاح معدنية- صبغات) و تقوم عملية التثبيت الناتجة بإيقاف عملية التفتت والتفسخ Disintegration والتعفن Putrefaction الناتجة عن نشاط البكتيريا والفطريات وكذلك إيقاف عملية التحلل الذاتي للنسيج بفعل الإنزيمات. هذا بالاضافة الى فوائد اخرى ابرزها :-

1- تقسية الانسجة لتصمد امام العمليات التالية وخاصة القطع بأقل قدر من التشوه .

2- حفظ خلايا النسيج من الانتفاخ او الانكماش عند تعرضها لعمليات تالية مثل ازالة الماء والتشرب بالشمع .

3- تحسين قدرة اجزاء النسيج على تقبل الصبغ بشكل أفضل .

4- تعديل معامل الانكسار لبعض مكونات النسيج بحيث يسهل التمييز بينها .

5- جعل النسيج اكثر مقاومة للحرارة اثناء تعرضه للشمع الساخن .

وحتى تتحقق الأهداف المرجوة من التثبيت لابد من مراعاة النقاط التالية:

1 اختيار المثبت المناسب للعمل حسب الغرض من الدراسة.

2 وضع العينة في المثبت مباشرة بعد أخذها من الجسم لمنع عملية التحلل والتفسخ.

3 إن يكون حجم العينة صغير بحيث يسمح للمثبت بالنفاذ خلال العينة في وقت قصير)سمك- العينة لا يزيد على 2-5 ملم)

4إن يكون حجم المثبت عدة أضعاف حجم العينة (10-20ضعف).

5ضرورة التقيد بالفترة الزمنية اللازمة للتثبيت حسب المثبت المستخدم

6الأخذ في الاعتبار الآثار التي سيتركها المثبت على مكونات النسيج وتركيب

الخلايا بعد التثبيت.
7إذا لم يتوفر المثبت المناسب في حاله طارئة يجب وضع العينة في السائل النيتروجيني إلى حين توفر المثبت المناسب.
8يجب غمر العينة بأكملها في المثبت وذلك برج المثبت عدة مرات بعد وضع العينة فيه حتى تتبلل جميع أسطح العينة بالمثبت.

المثبت

هو عبارة عن وسط سائل يحتوي على مواد كيميائية بعضها يعمل على تثبيت المحتوى الكيميائي للخلايا والمواد بين الخلوية عن طريق التخثير والترسيب والمحافظة على خلايا النسيج من التشوه. من المثبتات الشائعة للفحص بالمجهر الضوئي : الفورمالين Formalin 10% ، محلول زنكر Zinker Solution ، محلول بوان او بوين Bouin Solution ، محلول كارنوي Carnoy ، ومن المثبتات الشائعة للفحص بالمجهر الالكتروني : محلول الكلوترالديهايد Gluteraldehyde ورابع اوكسيد الازميوم Osmium tetraoxide

شروط المثبت الجيد:

1 يتخلل الأنسجة بسهولة وبسرعة.
2 يعمل في درجة الحرارة العادية.
3 لا يحدث ضرر بالنسيج.
4 يعمل على تيبس النسيج نوعا ما بحيث يصبح قوامه سهل التقطيع.
5 لا يتعارض مع الصبغات المختلفة عند صبغ العينة.
6 يستمر مفعولة لمدة طويلة.
7 يقتل الجراثيم والفطريات التي تساعد على تحلل الأنسجة.
8 أن لا يترك المثبت أي آثار جانبيه سيئة أو أصباغ على النسيج.
9 أن يكون سعره مناسبا ومتوفرا باستمرار.

العوامل المؤثرة على عملية التثبيت:

1الأس الهيدروجيني للمثبت: يجب أن يكون ما بين 6-8 لأن زيادة الأس الهيدروجيني أو النقصان يتلف الأنسجة ويمكن الحصول على درجة الحموضة باستخدام محلول منظم .Buffer
2 درجة حرارة المكان: تزداد سرعة النفاذ بزيادة درجة حرارة المكان والعكس صحيح ألا
أن الحرارة العالية تتلف الأنسجة لذا يفضل أن تكون درجة الحرارة (25) درجة مئوية.
3 تركيز المثبت وكميته: يتناسب مع حجم العينة طرديا (10-20ضعفا).
4 مدة التثبيت: تتناسب مع حجم العينة طرديا ويجب مراعاة نوع المثبت .

4عملية الغسل Washing

يجب غسل العينة بعد التثبيت و ذلك لإزالة ما تبقى من أثر المثبت على العينة .مثلاً العينات المثبتة في مثبت بوان يغسل بالكحول 70 % حتى يزول اللون الأصفر. تغسل العينات المثبتة في زنكر بالكحول 96 % مشبع باليود ومدة الغسيل تتروا ح من5- 8 ساعات . العينات المثبتة في مثبت روسمان تغسل بالكحول 96% . العينات المثبتة في الفورمالين تغسل بماء الصنبور الجاري لمدة 24 ساعة .

5عملية نزع الماء(الانكار) :Dehydration

و هي الطريقة التي يتم بواسطتها إحلال مادة محل الماء الموجود في النسيج هذه المادة تذوب فيها المحاليل والمواد المستعملة في الخطوات القادمة مع عدم تشويه النسيج وتتم هذه العملية بتمرير العينة في سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من الكحول الإثيلي ethanol(ethyl alchohol) لمنع انكماش الأنسجة في حالة لو وضعت في كحول مطلق مباشرة ويفضل الكحول لأنه يمتزج بسهوله مع الماء ومع مادة الزايلول (الزايلينxylene) المروقة والتي بدورها تمتزج جيدا مع مادة الطمر البرافينية.

لا يمتزج الماء مع شمع البرافين لذلك يجب التخلص من الماء الموجود في النسيج الخلوي حتى تسهل عملية نفاذ البرافين المصهور إلى داخل الأنسجة وتتم عملية نزع الماء بتمرير العينة على سلسلة متدرجة الارتفاع في التركيز من محاليل الكحول الايثيلي(50% ،70%، 90% ، 100%) وتتروا ح المدة اللازمة لترك العينة في كل خطوة من خطوات نزع الماء في محاليل الكحول المختلفة التركيز من 30 دقيقة إلى ثلاث ساعات .

6عملية الترويق:Clearing

هي العملية التي بواسطتها يتم إحلال ماده محل مادة نزع الماء حيث تقوم هذه العملية بالسماح لمادة شمع البرافين بالدخول إلى الأنسجة في الخطوة اللاحقة لأن الكحول المستخدم في نزع الماء لا يمتزج مع شمع البرافين لذا تستخدم ماده مروقه تذوب في الكحول وشمع البرافين وكذلك تجعل النسيج شفافا . من أمثلة المواد المروقه (الزايلول – الكلورفورم – تولوين – بنزين–زيت خشب الأرز) وعند استخدام الزايلول والتولوين يحدث أحيانا أن يتعكر لون محلول مادة الترويق وهذا دليل على عدم اكتمال نزع الماء من نسيج العينة في هذه الحالة يجب إرجاع العينة إلى سلسلة الكحولات للتأكد من عملية نزع الماء بشكل تام أما المدة الكافية لترك العينة في المحلول المروق فهذا يعتمد على نوع وحجم العينة فكلما زاد حجم العينة كلما زادت مدة الترويق.

لا يمتزج الكحول مع شمع البرافين لذا يعتبر محلول الزيلول من أنسب المحاليل المروقة لسهولة امتزاجه مع البرافين والكحول وهناك مواد يمكن استخدامها كمروقات مثل التولوين والبنزين والكلوروفورم ولكنها سريعة التطاير .

7عملية التشرب أو التخلل. Impregnation or Infiltration

عبارة عن إحلال كامل للمادة المستخدمة في الطمر مكان المادة المروقة، ويعتبر شمع البرافين من أشهر المواد المستخدمة في تشريب النسيج حيث أنه يتخلل العينة بسرعة دون إحداث ضرر بتركيبها النسيجي، كما أنه يكسبها دعامة قوية لتهيئتها للقطع بالميكروتوم، ويساعد على حفظها في الظروف العادية لفترة طويلة دون أي أذى. وتتم العملية بتمرير العينة في مزيج متساوي من الشمع والمادة المروقة (1:1) ثم تنقل العينة إلى شمع البرافين المطلق المنصهر داخل الفرن وتكرر هذه العملية لعدة مرات(2-3 مرات) وكل مرة لمدة نصف ساعة، كما تعتمد عدد مرات تغيير الشمع حسب نوع العينة بحيث تقل كلما كانت العينة رخوة وتزداد كلما كانت العينة صلبة. من الامثلة على اوساط التشرب شمع البرافين Paraffin wax بينما تستعمل اللدائن البلاستيكية مثل Araldite في عملية التشرب للنماذج المحضرة للفص=حص بالمجهر الالكتروني .

8 عملية الطمر

وهي عملية الغرض منها عمل قالب من العينة بحيث تحيط بها المادة الطامرة وتدعمها لتتكوّن طبقة متماسكة من كليهما لتكون جاهزة للتقطيع بثبات اثناء مرورها على سكينة التقطيع وفي الغالب تكون المواد المستخدمة للطمر هي نفس المادة المستخدمة في عملية التشرب . توضع العينة باستخدام ملقط و توضع العينة بالاتجاه المرغوب به، بعدها يترك القالب على سطح ثلجي فترة قصيرة ليبرد سطحه استعداداً للتقطيع .

9عملية التشذيب

بعد تحضير القوالب الشمعية يستحسن تشذيبها بشفرة حادة حتى تصبح العينة في وضع
مناسب للتقطيع بحيث تصبح أطرافها متوازية و يمكن أن تنطبق على حافة سكين الميكروتوم.

10تقطيع العينة

تثبت العينة على حامل العينة specimen holder في الميكروتوم كما يجب أن يزود جهاز القطع بسكين حادة جدا ويحدد سمك القطاع المرغوب فيه(3-7 ميكرون) للبارافين وبسمك (10-15 ميكرون) للسللويدين) تستعمل سكاكين زجاجية glass knives لقطع مقاطع المجهر الالكتروني وتحمل على مشبك نحاسي grid ، القطاعات الجيدة عادة تكون على شكل أشرطة Ribbons أو سلسله من القطاعات ويفضل أن توضع هذه الأشرطة على صفيحه سوداء حتى يسهل تمييز القطاعات وأخذ المناسب منها لوضعه على الشريحة الزجاجية .

11عملية الصبغ

عملية التصبيغ مرحلة حاسمة جدا في التحضير المجهري ذلك لانه بدون

صبغ مناسب للانسجة فانه يصعب تمييز مكوناتها وبالتالي تفقد عملية التحضير اهميتها لان عملية التصبيغ تزيد من الفروق في معامل انكسار مكونات النسيج والخلية مما يؤدي الى تمايزها ويحدث هذا نتيجة الفرق في ميل بعض مكونات الخلية او النسيج لمعظم الصبغات .توجد نظريتان لتفسير صبغ الانسجة هي :

1- النظرية الكيمياوية : تنص على " ان الصبغ عبارة عن تفاعل كيمياوي يعتمد على تكوين مادة ملحية بين الشق الموجب cation أو الشق السالب anion للصبغة وبين مجموعات كيمياوية معينة في الخلية او النسيج" وعلى هذا الاساس تكون الانسجة اما محبات للحامض acidphilic وتحتوي مجموعات قاعدية وفي هذه الحالة تتفاعل مع الصبغ الحامضي او محبات للقاعدة basophilic وتحتوي مجموعات حامضية تتفاعل مع الصبغة القاعدية .

2- النظرية الطبيعية : ترتكز هذه النظرية على افتراضات تنص على " ان التصبيغ يتم بوسائل طبيعية مثل الامتصاص والخاصية الشعرية والانتشار والتنافذ.

ان الفكرة السائدة في الوقت الحاضر هو ان الصبغ ينتج عن عمليات كيمياوية وطبيعية في ان واحد .

تصنيف الصبغات

أ- تقسيم الصبغات تبعا لتركيز الاس الهايدروجيني للصبغة :

1- الصبغات القاعدية basic stains وذلك عندما تكون الصبغة حاوية على قاعدة عضوية ملونة تتحد مع الجذور الحامضية غير الملونة للانسجة كجذر الخلات او الكلوريدات او الكبريتات ومن امثلتها صبغة السفرانين Safranin والهيماتوكسلين Haematoxylin .

2- الصبغات الحامضية acidic stains هي تلك الصبغات التي تكون حاوية على جذور حامضية عضوية ملونة تتحد مع قاعة معدنية metallic base غير ملونة للانسجة مثل صبغة الخضراء الباهتة Light green وصبغة الايوسين Eosin.

3- الصبغات المتعادلة neutral stains وتكون مركبة من صبغات حامضية وقاعدية مثل الاحمر المتعادل neutral red .

ب- تقسيم الصبغات حسب ميل اجزاء البروتوبلازم للاصطباغ بها :

1- الصبغات النووية nuclear stains هي تلك الصبغات التي تميل لصبغ النواة وبما ان النواة غنية بالحوامض النووية لذا تميل للاصطباغ بالصبغات القاعدية لذا فان جميع الصبغات النووية هي صبغات قاعدية.

2- الصبغات السايتوبلازمية cytoplasmic stains هي تلك الصبغات التي تميل لصبغ السايتوبلازم ونظرا لكون السايتوبلازم ذو طبيعة اكثر

قاعدية لذا فانه يميل للاصطباغ بالصبغات الحامضية أي ان الصبغات السايتوبلازمية هي صبغات حامضية .
عند استعمال شمع البرافين يجب أن يزال شمع البرافين من القطاعات تماما باستخدام الزايلول ومن ثم يجب التخلص من الزيلول هو الآخر بالكحول المطلق، بعدها يجب نقل القطاعات إلى بيئة مشابهه للبيئة المذابة فيها الصبغة(مائية أو كحولية). ومدة الصبغ تعتمد على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج وقد يصبغ النسيج بأكثر من صبغه أو قد يلجأ الباحث إلى ما يسمى الصبغ المضاد كاستخدام صبغة الهيماتوكسلين لصبغ الأنوية (صبغة نووية) وصبغة الأيوسين لصبغ السيتوبلازم (صبغة سايتوبلازمية). من الصبغات المستعملة في صبغ عينات المجهر الالكتروني صبغة خلات اليورانيل Uranyl acetate وصبغة سترات الرصاص Lead citrate .

12- تحميل القطاعات :Mounting

يقصد بها وضع القطاع النسيجي على الشريحة الزجاجية، و jتم هذه العملية بعد الانتهاء من عملية الصبغ اذ تبدأ عملية إعداد الشريحة المجهرية للحفظ المستديم باستخدام مادة شمعية أو مادة بلاستيكية حافظه مثل مادة بلسم كنداCanada balsam أو مادة (D.P.X) ثم يوضع غطاء الشريحة Cover slip)) بزاوية حادة 45 درجة وبحذر شديد حتى لا تتكون فقاعات هوائية Air bubbles وهكذا يتم عمل ما يعرف بالشريحة المستديمة permanent slide . بعد أن تترك لتجف على مجفف الشرائح يمكن فحص القطاعات تحت المجهر. ان الغرض من تغطية الشرائح لتسهيل دراستها تحت المجهر لأن التحضيرات المصبوغة وغير المغطاة لاتظهر الا قليلا من التفاصيل لكون معامل انكسار كل من زجاج الشريحة ومكونات النسيج مختلفة تماماً وتتحسن امكانية رؤية مكونات النسيج اذا غطيت بمادة شفافة يكون معامل انكسارها قريبا من معامل انكسار الزجاج . كما ان الغطاء يحمي التحضير وخاصة المقاطع من التهتك والازالة من على الشريحة كما يقلل الغطاء من اكسدة الصبغة وبالتالي يمنع فسادها. ويكمن ان تكون وسائط التغطية دائمية مثل مادة بلسم كندا او مؤقتة مثل الجليسرول glycerol.

13- تنظيف ووسم(تعليم) الشرائح Labelling& Cleaning

تنظف الشرائح ويزال وسط التحميل الزائد من حول جوانب الغطاء وبالنسبة لتعليم الشريحة توضع ورقة مناسبة على طرف الشريحة يكتب عليها معلومات عن نوع النسيج والمثبت والصبغة وتاريخ التحضير .
تتم الخطوات السابقة بشكل يدوي بينما في مختبرات الأمراض التي يتم فيها أجراء فحوصات روتينية لعينات كثيرة تتم باستخدام أجهزة حديثة منها جهاز معاملة الأنسجة الأوتوماتيكي Tissue Auto processor.

- تقنية التجميد

في هذه الطريقة النسيج الطري أو المثبت يجمد ويصلب ويعمل منه قطاعات

بالميكروتوم الثلجي أو ما يسمى بالكريوستات .(cryostat) مميزاتها:
1- طريقة سريعة وبسيطة تستخدم عادة خلال العمليات الجراحية التي تطلب تشخيص سريعا للسرطانات.
2- المواد الكيميائية الموجودة في النسيج لا تتغير بسبب عدم استخدام الحرارة .
3- تستخدم في كيمياء الأنسجة لدراسة فعالية الأنزيمات الخلوية والكشف عن الدهون التي تذوب في الكحول والزايلين وتفاعل الأجسام المضادة مع الأنتيجينات.

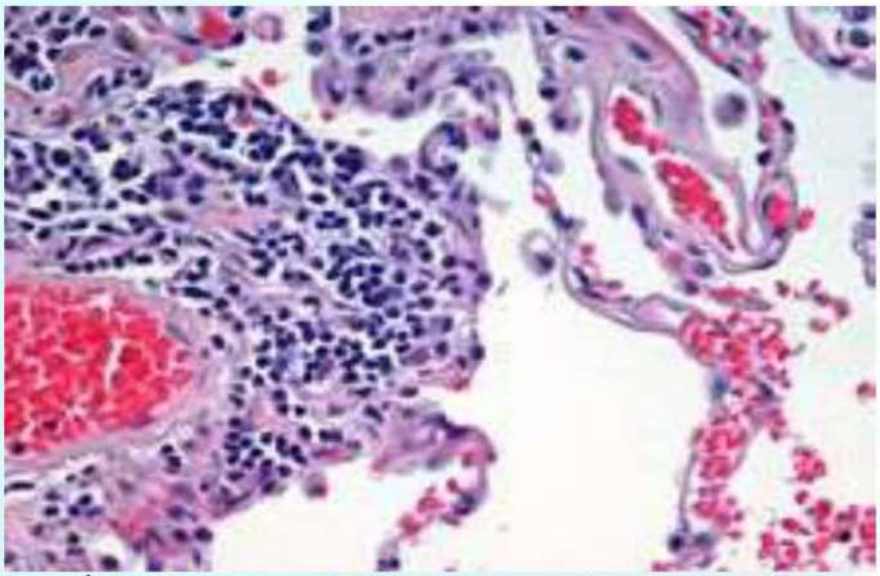
عيوبها:
1- لا تعطي سلسله من المقاطع .
2- تعطي قطاعات سميكه بسبب صعوبة القطع و التصبيغ .

الجزء العملي :

المواد والاجهزة المستعملة:
انسجة مأخوذة مباشرة من الكائن الحي، فورمالين 10%،ايثانول ، زايلين ،شمع برافين،فرن كهربائي ،مايكروتوم ،مجهر مركب ، شرائح زجاجية واغطيتها ،صفيحة تسخين ،هيماتوكسلين ،ايوسين ،اح ماير(1 البومين : 1 كليسرول) ،كندا بلسم...

1- حضر شريحة حاوية على مقاطع لأنسجة حيوانية.
2- ارسم في دفترك كل مرحلة على حدة.

مقارنة بين العمليات المختلفة لتحضير العينات للفحص بالمجهر الضوئي والالكتروني



شريحة لنسيج من رئة إنسان مصبوغة **بالهيماتوكسيلين**(الأزرق) **والأيوزين** (الوردي) أو (الأحمر)

https://www.youtube.com/watch?v=sHeHC_0-BDw

الفصل الثانى
طريقة تحضير المواد الكربوهيدراتيه

1- طريقة حامض البيرأيودك للكشف عن المواد الكربوهيدراتيه العامه:

المحاليل المستخدمه:

أ) حامض البيرأيودك 1%

- 1 جرام من حامض البيرأيودك
- 100 ملى ماء مقطر

ب) محلول شف

- يذاب 1 جرام من الفوكسين القاعدى فى 100 ملى ماء مغلى ويرج لمدة 5 ق
- يترك المحلول ليبرد حت درجة 50
- يرشح المحلول ويضاف اليه 100 ملى من حامض الهيدروكلوريك العيارى
- يبرد المحلول السابق حت درجة 20 ثم يضاف اليه 1جم من سيوسلفيت الصوديوم يلاحظ ذوال اللون الاحمر تدريجيا ويصبح لون المحلول اصفر باهت بلون القش
- يترك هذا المحلول ليله كامله فى الظلام ويفضل وضعه فى زجاجه داكنة اللون ثم يضاف اليه 2جم من الفحم الحيوانى النشط ثم يرج لمدة دقيقه ثم يرشح ويتم حفظه فى الزجاجه الداكنه عند درجة 5

الطريقه:

1- يذال الشمع من القطاعات بوضعه فى الزيلول مده كافيه
2- تمرر القطاعات فى سلسله هابطه من الكحولات المتدرجه حتى الماء
3- توضع فى محلول البيرأيودك لمدة من 2-3 ق لاكسدتها واطلاق الالدهيدات من المواد الكوبوهيدراتيه
4- تغسل فى ماء الصنبور الجارى لمدة 3ق وبعدها الماء المقطر لمدة 1ق
5- تنقل الى محلول شف لمدة 10-15ق
6- تغسل فى ماء الصنبور الجارى لمدة 1ق
7- ممكن تمييز القطاعات فى ماء اول كحول محمض (1ملى من حامض الهيدروكلوريك فى 100ملى كحول 70%
8- تغسل فى ماء جارى لمدة 5ق

9- يتم نزع الماء من القطاعات بتمريرها فى سلسله متصاعده متدرجه من الكحولات حتى 100%

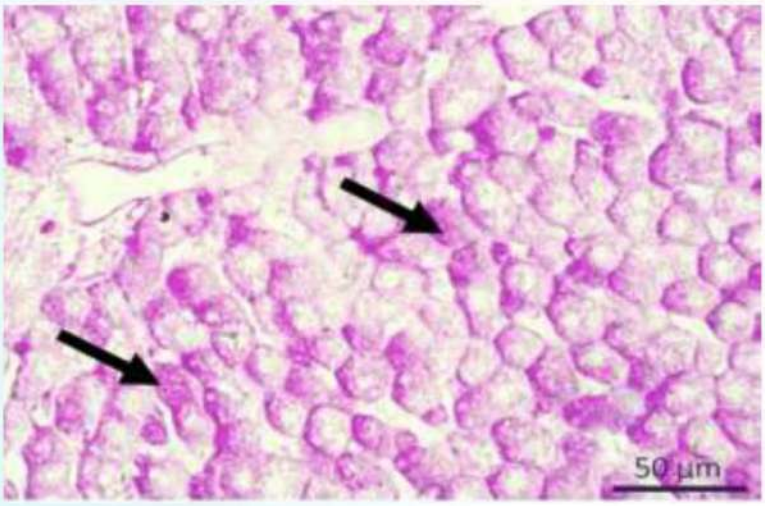
10- ترويق القطاعات فى الزيلول ويفضل وضعها مده اطول للحصول على نتيجه افضل

11- يوضع عليها مادة DPX ثم تغطى بغطاء الشراح وتترك فى فرن 37درجه للتجفييف

النتيجه:

تظهر المواد الكربوهيدراتيه مكتسبة اللون البنفسجى الداكن (لون الماجنتا)

https://www.youtube.com/watch?v=XLQAkW7sP98



2- طريقة البست كارمين لتوضيح الجليكوجن

المواد:

أ) محلول البست كارمين المخزن

- 2جم كارمين
- 1جم كربونات بوتاسيوم
- 5جم كلوريد البوتاسيوم
- 60ملى ماء مقطر

- يتم غليان المحلول لمدة 5ق
- يترك ليبرد ثم يرشح
- يضاف للرشيح 10 ملل أمونيا

ب) محلول البست كارمين الصبغى

- 12ملل من المحلول السابق

- 18ملل أمونيا
- 18ملل كحول ميثيلى

ج) محلول بست التميذى

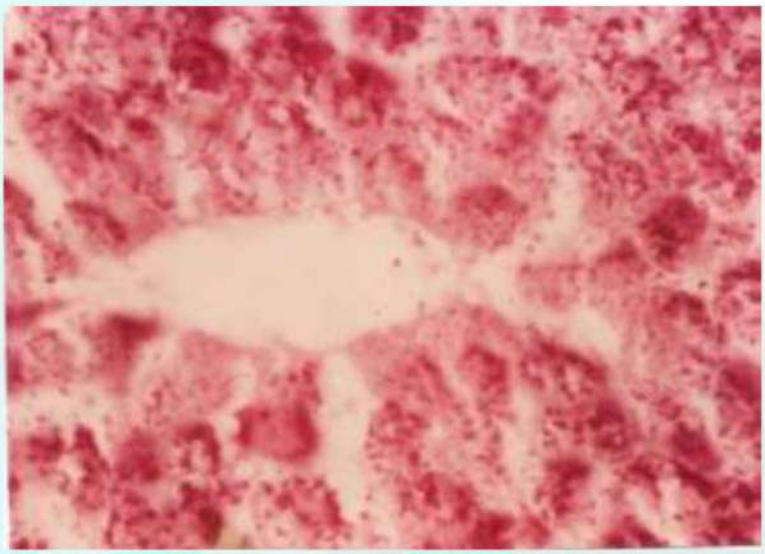
- 8ملل كحول مطلق
- 4ملل كحول ميثيلى
- 10ملل ماء مقطر

الطريقه:

1- يذال الشمع من القطاعات بوضعه فى الزيلول مده كافيه
2- تمور القطاعات فى سلسله هابطه من الكحولات المتدرجه حتى 70%
3- تغسل فى ماء الصنبور
4- يمكن صباغة الأنويه الهيماتوكسلين
5- تغسل مره ثانيه فى الماء
6- توضع فى محلول البست الصبغى (ب) لمدة 20ق
7- يتم تمييز القطاعات فى محلول بست (ج) ثلاث تغيرات على مدار 20 ثانيه
8- تغسل القطاعات فى كحول 90%
9- تنقل الى كحول 100%
10- يتم الترويق فى الزيلول
11- تغطى القطاعات أما بالكندا بلسم أو DPX ثم بغطاء الشرائح وتترك لتجف

النتيجه:

يصبغ الجليكوجن بالون الأحمر المميز بينما تصبغ الأنويه بالون الأزرق



الفصل الثالث
طريقة توضيح المواد الدهنيه

طريقة أسود سودان (ب)

المحاليل المستخدمه

15 جزء من 1% حامض الكوروميك

4 أجزاء من 2% حامض اوزميك

محلول اوياما

1جم كلوريد كادميوم

15 ملل مكعب فورمالين متعادل

85 ملل مكعب ماء

محلول فلمنج بدون حامض الخليك

60 ملل من 1% حامض كروميك

16 ملل من 2% حامض الأزوميك

الطريقه

بالنسبه لمحلول اوياما يتم تثبيت القطاعات لمدة 2 الى 3 أيام ثم الغسيل بالماء الجارى من 5 الى8 ساعات

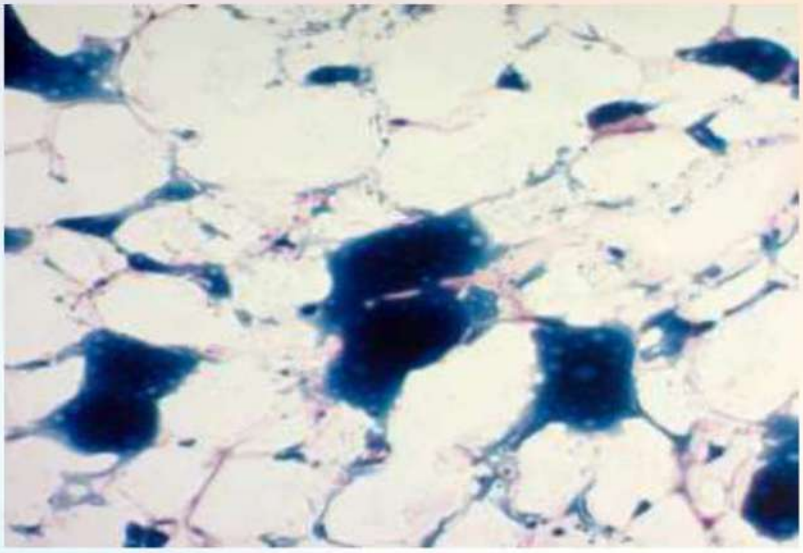
بالنسبه لمحلول فلمنج:

- يتم التثبيت لمدة ساعتين
- تغسل بالماء الجارى لمدة 24 ساعه
- توضع فى محلول جيلاتين خفيف لمدة 12 ساعه
- ثم فى محلول جيلاتين ثقيل لمدة 8 ساعات
- يتم تقطيع قطاعات مجمده باستخدام الكريوستات ثم تلصق على شرائح عليها فلم جيلاتينى
- تغسل فى ماء جارى لمدة 15ق
- تنقل الى كحول 50% لمدة 3ق
- ثم الى 70% لمدة دقيقه واحده
- تصبغ بمحلول أسود سودان ب وهو محلول مشبع من الصبغ فى 70% كحول ويفضل ترشيه قبل الإستخدام لمدة 10ق
- يتم تمييز القطاعات بوضعها فى 50% كحول لمدة ق أو أكثر
- يوقف التميز بوضع القطاعات فى ماء مقطر
- تغطى القطاعات بالجلسرين الجيلاتينى

النتيجه:

تصبغ الليبيدات بلون ازرق مائل للسواد

https://www.youtube.com/watch?v=n6wtidc0LDw&list=TLPQMjIxMDIwMjEvJW4aIULZdg&index=2



الفصل الرابع
طريقة توضيح المواد البروتينيه

طريقة الزئبق بروموفينول الأزرق
محلول الصباغه

1- 1% بروموفينول الآزرق فى الكحول ثم يضاف اليه كلوريد الزئبقوز حتى درجة التشبع
2- أو 2% حامض خليك مائى يحتوى على1% كلوريد زئبقوز و 05% بروموفينول الأزرق

الطريقة:

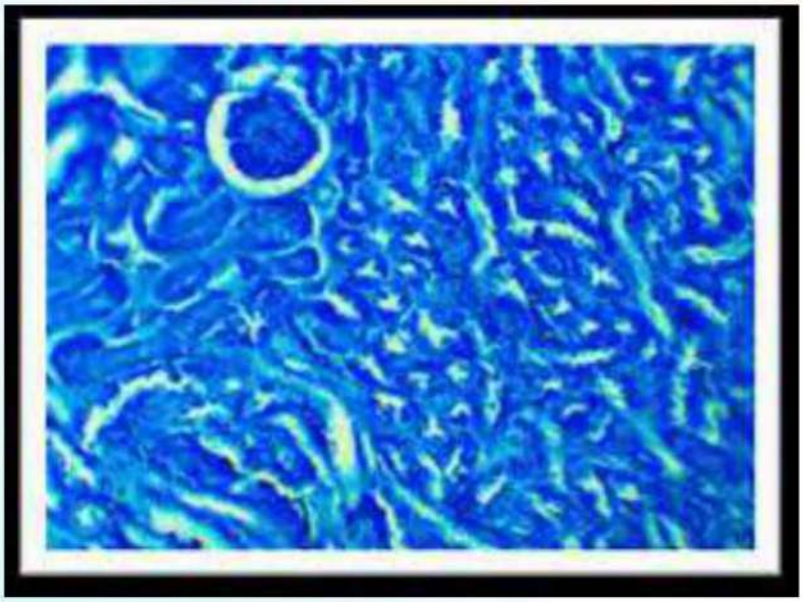
1- ثبت العينات فى كارنوى أو الفورمالين متجنبا أى مثبت يحتوى على حامض الأوزميك
2- الصق القطاعات بدون بياض البيض
3- مرر القطاعات فى الزيلول لإزالة الشمع ثم فى سلسله هابطه من الكحولات حتى الماء
4- اصبغ فى محلول الصبغ لمدة ساعتان فى درجة الغرفه
5- ضع الشرائح فى 05% حامض خليك

6- انقل الى كحول بيوتايل رباعى وبذلك يتحول الأس الهيدروجينى الحامضى للقطاعات الى درجة التعادل
7- روق فى الزيلو وغطى بالكندا بلسم ثم بغطاء الشرائح واتركها لتجف

النتيجه:

تصبغ البروتينات بلون أزرق داكن

https://www.youtube.com/watch?v=TVSXoE2kbxg



الفسيولوجي

عد كريات الدم الحمراء

ألأدوات المستخدمة:

- هيموسيتوميتر يتكون من شريحة للعد مقسمة بطريقة معينة الي عدد من المربعات
- ماصة كريات دم حمراء لها تدريج رقمي يبدأمن 0.5 الي 101 و لها خرزة حمراء تستخدم للمزج بين الدم ومحلول التخفيف كما أن لها قطعة بلاستيكية عند منطقة السحب ذات لون أحمر
- مجهر ضوئي

محلول التخفيف:

يستخدم NaCl 0.9% كمحلول تخفيف متعادل ، وهو محلول ذو ضغط اسموزي مساوي للضغط الاسموزي الخاص بكريات الدم الحمراء (أيزوتونيك) حتي لا يتسبب في انكماشها او انتفاخها ومن ثم انفجارها.

خطوات العمل:

1. ينظف جهاز Haemocytometer ويجفف ويفحص تحت المجهر للتعرف على المربعات ومن ثم ضبطها علي منطقة عد كريات الدم الحمراء.
2. يسحب الدم بواسطة الماصة الخاصة الى العلامة 0.5 (وتمسك الماصة بشكل افقي).
3. ينظف طرف الماصة من الخارج ويوضع في محلول التخفيف ويسحب الى العلامة 101.

4.يتم غلق الماصة بطوي الجزء المطاطي ومسك الماصة افقياً ثم يخلط المزيج عدة مرات لمدة ثلاث دقائق.

5. يوضع غطاء شرائح Cover Slip على منطقة مربعات عد كريات الدم الحمراء الموجودة علي Neubauer chamber تحت عدسة المجهر.

6. يتم التخلص من اول قطرات من الدم المخفف(وذلك لأن الدم الموجود عند طرف الماصة يكون مخفف بدرجة أكبر من باقي أجزائها بعد سحب محلول التخفيف فلابد من التخلص منه لضمان الحصول علي نتائج جيدة لعدد كريات الدم الحمراء).

7. يوضع طرف الماصة عند حافة الغطاء ثم يسمح لقطرة من المزيج بالنزول بعدها يترك الشريحة لمدة 1-2 دقائق (لاكتمال انتشار القطرة).

8. يتم فحص الشريحة تحت عدسة المجهر للتأكد من انتشار الخلايا في المربعات بصورة متساوية .

9. تحسب الخلايا الحمراء في خمس مربعات وسطية فقط اذ يتم اختيار اربع مربعات تقع في الزوايا ومربع يقع في الوسط.

الحسابات:

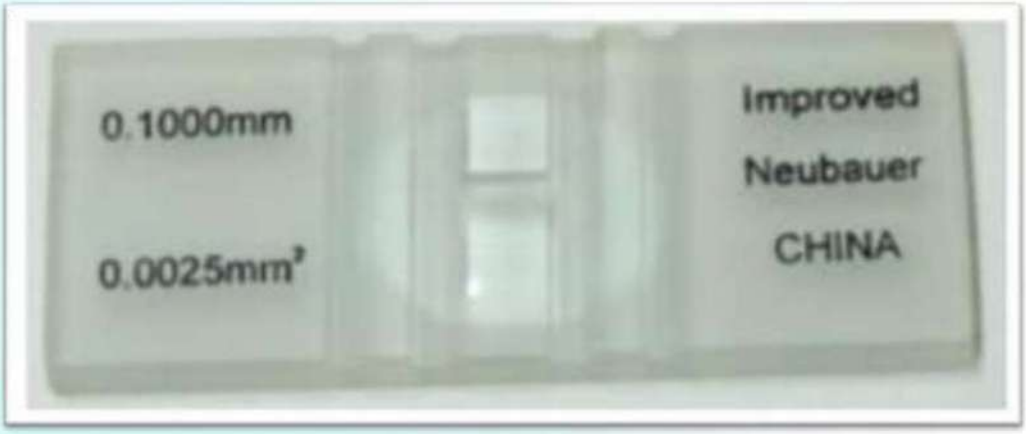
تم الحساب في خمس مربعات من المربع الوسطي المخصص لعد خلايا الدم الحمراء أي ان مجموع المربعات=5×16= 80 مربع.

وبما انه حجم كل مربع 4000 mm3 / 1 اذن الحجم في 80 مربع= 4000 / 1 ×80= 1/50 mm3

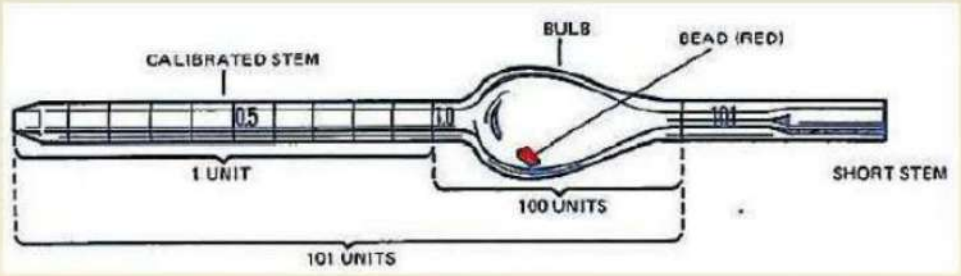
تم حساب عدد كريات الدم الحمراء في 1 مليمتر مكعب من الدم ولنفرض ان عددها في 80 مربع=س

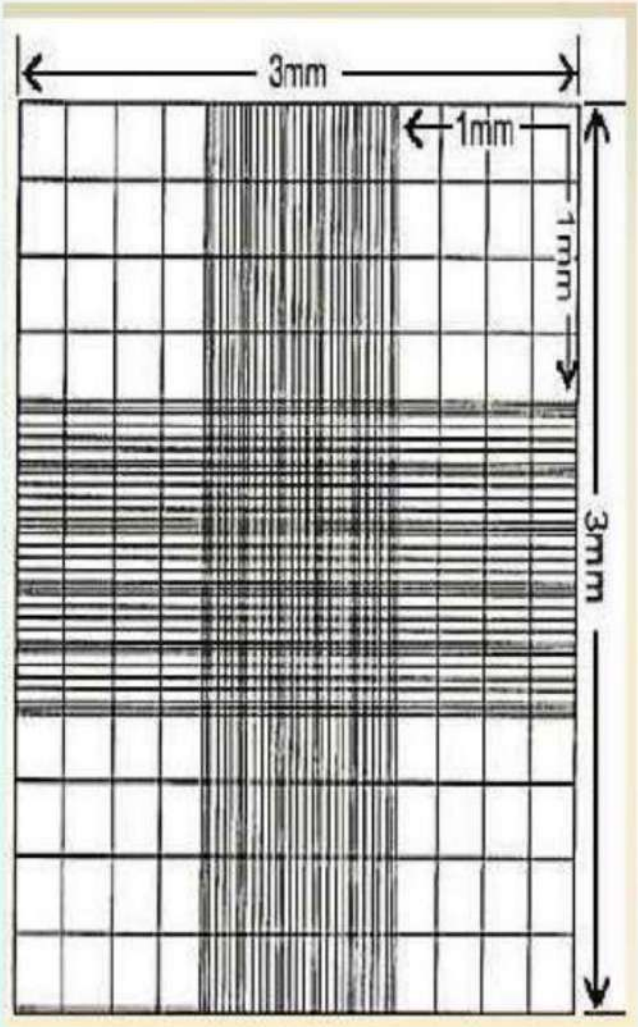
وبما ان الدم تم تخفيفه 200 مرة

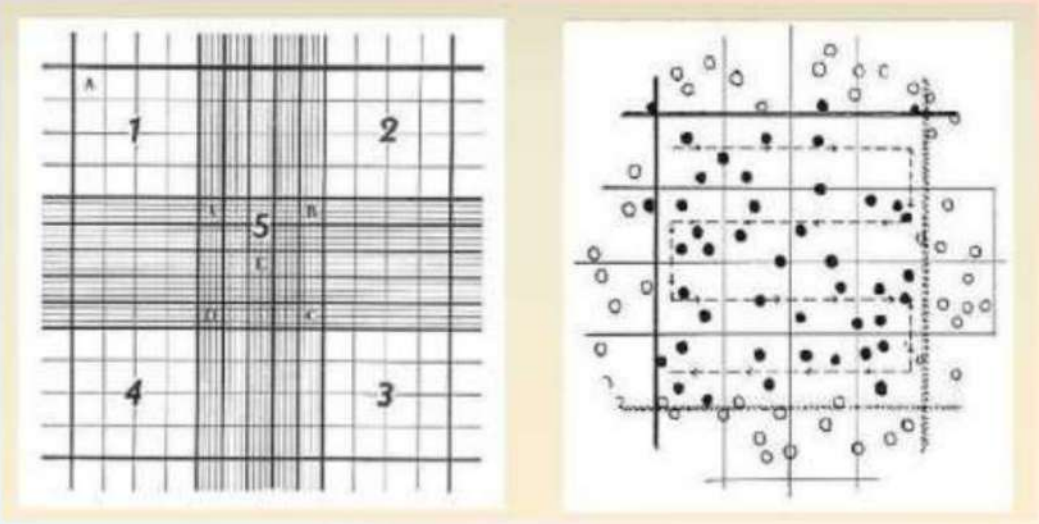
اذن عدد كريات الدم الحمراء في 1 mm3 من الدم = س * 200 * 50 = س * 10000

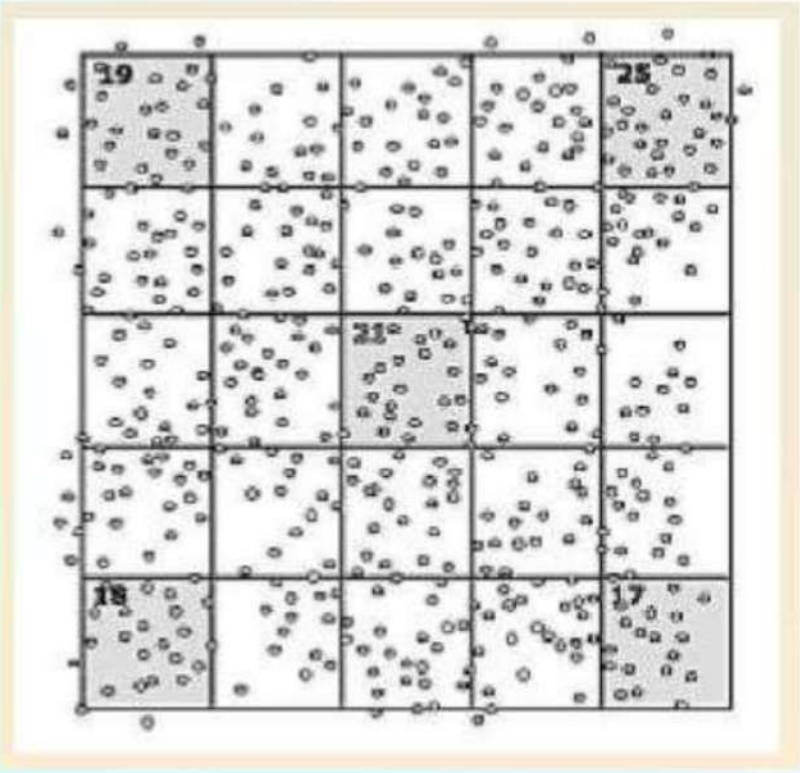


RBC Pipette


BULB
BEAD (RED)
CALIBRATED STEM
0.5
0.0
101
1 UNIT
SHORT STEM
100 UNITS
101 UNITS


3mm
1mm
1mm
3mm


1
2
5
4
3


19
25
18
17

عد كريات الدم البيضاء

ألأدوات المستخدمة:

- هيموسيتوميتر يتكون من شريحة للعد مقسمة بطريقة معينة الي عدد من المربعات

- ماصة كريات دم بيضاء لها تدريج رقمي يبدأمن 0.5 الي 11 و لها خرزة بيضاء تستخدم للمزج بين الدم ومحلول التخفيف والصبغة المستخدمة لصباغة كريات الدم البيضاء كما أن لها قطعة بلاستيكية عند منطقة السحب ذات لون أبيض

- مجهر ضوئي

محلول التخفيف:

يستخدم لتخفيف عينة الدم أثناء تجربة عد الكريات البيضاء وهو يتألف من حمض الخليك مضافا اليه صبغة جنشيانا، يقوم حمض الخليك بتكسير الكريات الحمراء وحلها بحيث لا تعيق عملية عد الكريات البيضاء، أما الصبغة فتلون أنوية الكريات البيضاء ويجعلها تبدو قاتمة بحيث تبدو واضحة تحت المجهر.

يستخدم لعد الكريات البيضاء نفس العداد الذي سبق استخدامه في عد الكريات الحمراء، ولكن منطقة العد على الشبكة ليست هي نفسها حيث يتم عد الكريات البيضاء في المربعات الكبيرة الأربعة الطرفية من شبكة العد

خطوات العمل:

1. ينظف جهاز Haemocytometer ويجفف ويفحص تحت المجهر للتعرف على المربعات ومن ثم ضبطها علي منطقة عد كريات الدم البيضاء.

2. يسحب الدم بواسطة الماصة الخاصة الى العلامة 0.5 (وتمسك الماصة بشكل افقي).

3. 3. ينظف طرف الماصة من الخارج ويوضع في محلول التخفيف ويسحب الى العلامة 11.

4.يتم غلق الماصة بطوي الجزء المطاطي ومسك الماصة افقياً ثم يخلط المزيج عدة مرات لمدة ثلاث دقائق.

5. يوضع غطاء شرائح Cover Slip على منطقة مربعات عد كريات الدم البيضاء الموجودة علي Neubauer chamber تحت عدسة المجهر.

6. يتم التخلص من اول قطرات من الدم المخفف(وذلك لأن الدم الموجود عند طرف الماصة يكون مخفف بدرجة أكبر من باقي أجزائها بعد سحب محلول التخفيف فلابد من التخلص منه لضمان الحصول علي نتائج جيدة لعدد كريات الدم البيضاء).

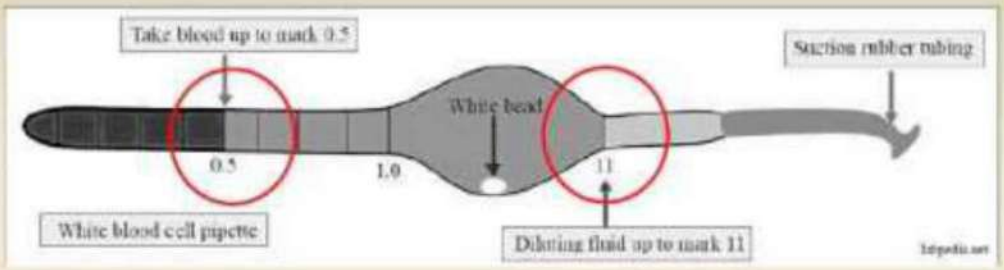
7. 7. يوضع طرف الماصة عند حافة الغطاء ثم يسمح لقطرة من المزيج بالنزول بعدها يترك الشريحة لمدة 1-2 دقائق (لاكتمال انتشار القطرة).

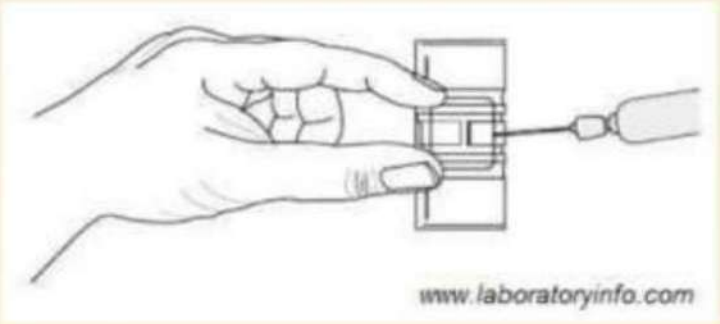
8. يتم فحص الشريحة تحت عدسة المجهر للتأكد من انتشار الخلايا في المربعات بصورة متساوية .

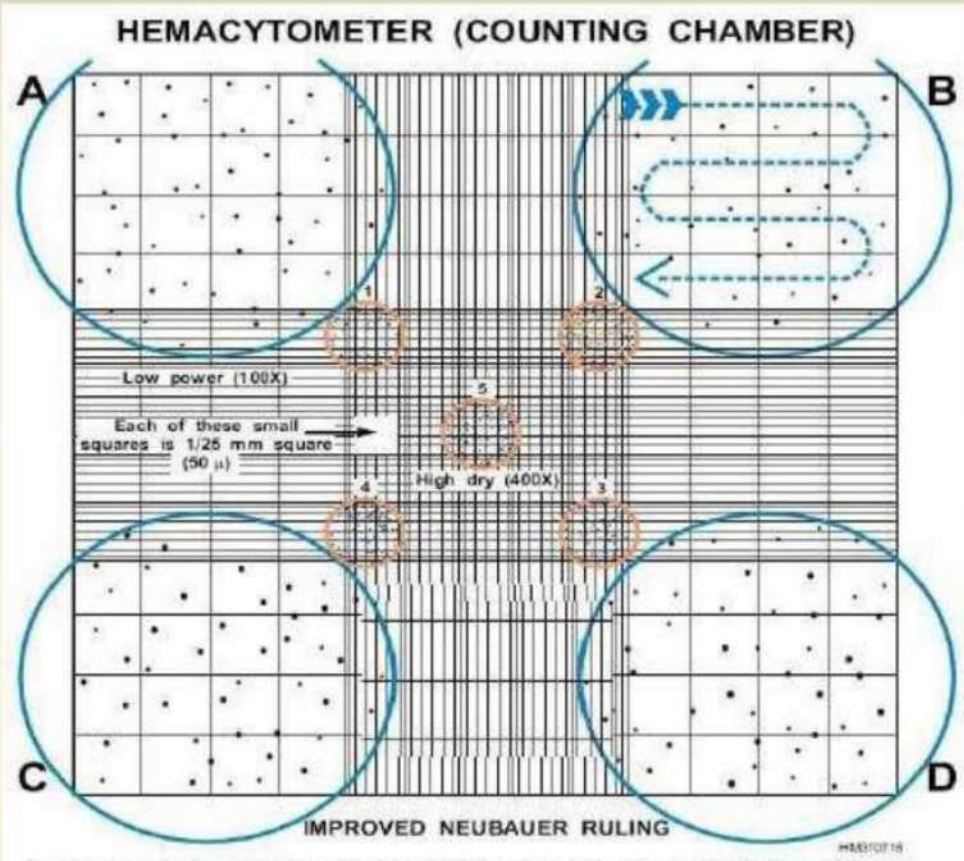
9. تحسب الخلايا البيضاء في الأربع مربعات الطرفية الكبيرة من شريحة العد.

الحسابات:

- ✓ مساحة المربعات التي تم عد الكريات البيضاء عليها 4 مم^3
- ✓ ارتفاع عينة الدم الموجود تحت الشريحة 1/10 مم
- ✓ حجم العينة المفحوصة 4/10 مم^3
- ✓ نسبة تخفيف عينة الدم 1/20 مم
- ✓ وهكذا فإن حجم الدم الموجود في المنطقة التي تم إجراء العد فيها هو 4/10 ×1/20= 4/200 =1/50مم
- ✓ وبالتالي فإن العد الكلي للكريات البيضاء (= س * 50 كرية/ مم^3 دم)


Take blood up to mark 0.5
Suction rubber tubing
White bead
0.5
1.0
11
White blood cell pipette
Diluting fluid up to mark 11


www.laboratoryinfo.com


HEMACYTOMETER (COUNTING CHAMBER)
A
B
C
D
1
2
3
4
5
Low power (100X)
Each of these small squares is 1/25 mm square (50 μ)
High dry (400X)
IMPROVED NEUBAUER RULING
A - B - C - D ARE FIELDS USED IN DOING THE WHITE BLOOD CELL COUNT.
1 - 2 - 3 - 4 - 5 ARE FIELDS USED IN DOING THE RED BLOOD CELL COUNT.

تقدير الهيموجلوبين

(طريقة سهلي لقياس الهيموجلوبين)

تعتمد هذه الطريقة على مقارنة الألوان وفيها يتحول الهيموجلوبين بواسطة حامض الهيدروكلوريك إلى هيماتين حامضي.

ويتكون هذا الجهاز من ثلاثة أنابيب- اثنتان ملونتان والثالثة (التي توجد بالمنتصف) تستعمل لإجراء الاختبار وهذه مدرجه لكي تعطي قراءة الهيموجلوبين بطريقتين : اما بالنسبة المئوية (%) أو بالجرام (جم).

الأدوات المستخدمة :

1- جهاز سهلي

2- حامض الهيدروكلوريك HCL مخفف بتركيز 0.1

3- عينة الدم

4- محلول فسيولوجي او ماء مقطر.

طريقة العمل:

1- نقوم بوضع كمية من الدم في الأنبوب. حوالى 20ميكرون بواسطة الماصة الخاصة المدرجة.

2- نضع قطرات من محلول HCL(من 7-8قطرات) ونمزج الدم مع الحامض بواسطة ساق زجاجي.

3-نقوم بوضع قطرات من المحلول الفسيولوجي حتى نحصل على اللون القياسي في الأنبوبتين وتتم المقارنة معهما وذلك بوضع أنبوب الدم بين الإنبوبين القياسيين.

4-للمقارنة الصحيحة يتم رفع الجهازنحو الضوء حتى تتم المقارنة بين الانبوب القياسي وأنبوب عينة الدم.

5-نسجل القراءة ثم نعيد هذه التجربة ثلاث مرات حتى نحصل على متوسط القراءات.

تقدير حجم الخلايا المجمعة او الهيماتوكريت

الأدوات المستخدمة:

1- عينة دم

2- أنابيب شعرية

3- جهاز طرد مركزي

4- شمع او معجون .

5- مسطرة قياس

خطوات العمل:

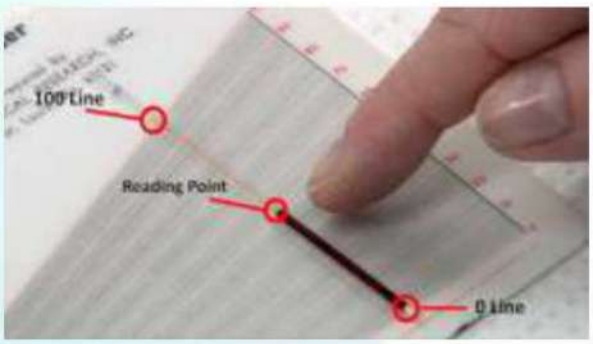
1- نقوم بسحب عينة الدم المراد تقدير قيمة الهيماتوكريت لها بواسطة الانبوب الشعري.

2- نغلق أحد طرفي الانبوبة بالشمع.

3- نقوم بعمل طرد مركزي للانبوب لمدة ربع ساعة بسرعة 3000 لفة بالدقيقة.

4- نخرج الانبوب ثم نقوم بقياس حجم كريات الدم الحمراء المترسبة.

5-نقوم بوضع الانبوب علي المسطرة الخاصة لتحديد حجم كريات الدم الحمراء المتجمعة.



مؤشرات الدم

فصائل الدم (نظام ABO):

تحمل كريات الدم الحمراء تركيبة خاصة من البروتينات تدعي مولد الضد وهي عبارة عن مادة تثير استجابة الجهاز المناعي و بالمقابل يحمل البلازما ايضا مادة اخري تسمي الاجسام المضادة

ان الدمج بين المستضدات والاجسام المضادة هو ما يجعل الدم ينتمي لفئة رئيسية معينة مختلفة عن الاخري وهي:

- الفئة الاولي تحتوي فيها كريات الدم الحمراء علي مولد Aلذا تدعي A
- الفئة الثانية تحتوي فيها كريات الدم الحمراء علي مولد Bلذا تدعي B
- الفئة الثالثة تحتوي فيها كريات الدم الحمراء علي مولد Aو B لذا تدعي AB
- الفئة الرابعة لا تحتوي فيها كريات الدم الحمراء علي أي مولد لذا تدعي O

عامل ريسس:

بالاضافة الي المستضدات والاجسام المضادة، هناك مستضد اخر يدعي RHاو عامل ريسس، وتم تسميته بهذا الاسم طبقا لاكتشافه لاول مرة في فصيلة من القرود تدعي ريسس، وهو اما ان يكون سالبا او موجبا، ويتم اضافته الي نظام ABO.

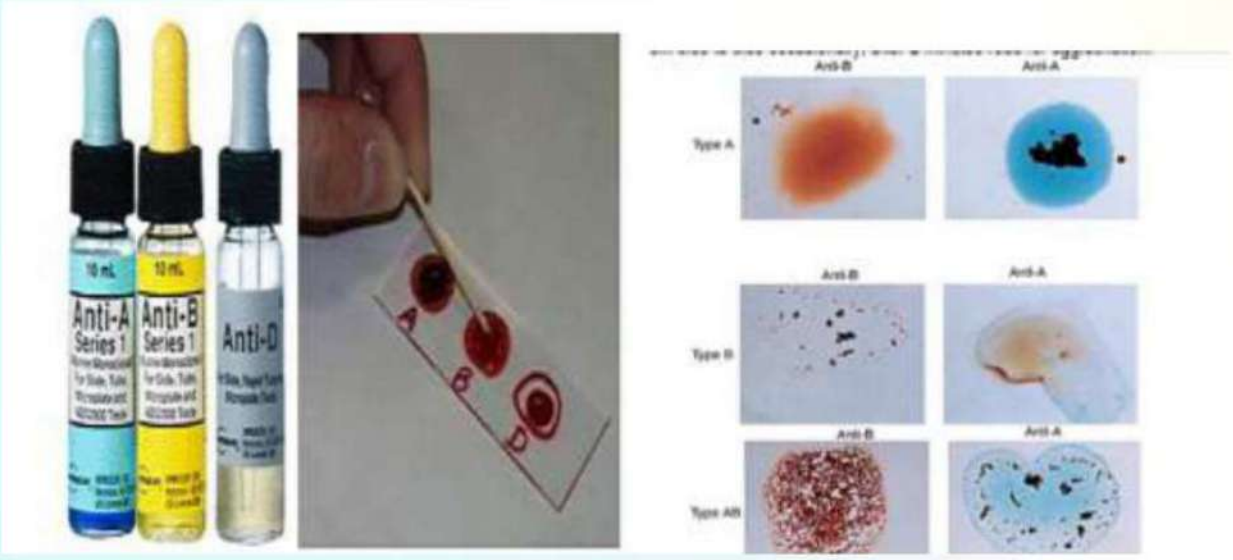
خطوات العمل:

1. الحصول على قطرة دم من وخز الإصبع في كل دائرة من دوائر شريحة فصيلة الدم التي يمكن التخلص منها.

2. أضف قطرة واحدة من Anti A (زرقاء) وقطرة من Anti B (أصفر) وقطرة من Anti D sera في الدوائر المناسبة على شريحة فصيلة الدم التي يمكن التخلص منها.

3. يتم استخدام ساق زجاجي نظيف (غير ملوث) لخلط الدم بالمصل المضاد.

4. قم بإمالة الشريحة من جانب إلى آخر من حين لآخر ، بعد دقيقتين من القراءة من أجل التلزن.



تحديد زمن النزف

عند إصابة أحد الأوعية الدموية ، يخرج الدم لبعض الوقت ثم يتوقف بسبب تكوين سدادة الصفائح الدموية. مدة النزيف هي وقت النزف. القيمة الطبيعية لوقت النزف هي 1-3 دقائق.

الأدوات المستخدمة:

معقم ، قطن ، إبرة ، قطعة من ورق منتفخ ، ساعة توقف.

خطوات العمل:

1) يتم تعقيم طرف الإصبع ويتم عمل وخز بإبرة معقمة لتدفق الدم بحرية.

2) بدء تشغيل ساعة الإيقاف وتسجيل الوقت.

3) يتم طي قطعة من الورق المنتفخ إلى نصفين وفي كل 15 ثانية تمامًا يتم مسح الدم الخارج من الثقب.

4) تتكرر الخطوة السابقة حتى يتوقف تدفق الدم.

5) يتم تسجيل الوقت الذي توقف فيه تدفق الدم.

6) يتم تحديد وقت النزف من بيانات الوقت المسجلة.

تحديد زمن التجلط

كلما تمزق وعاء دموي كبير ، يستمر النزيف. في غضون دقائق قليلة يفقد الدم سيولته ويتحول إلى كتلة شبه صلبة. يشار إلى الكتلة باسم الجلطة والظاهرة باسم التخثر.

يُعرَّف وقت التخثر بأنه الفترة الزمنية بين بداية النزيف وظهور كتلة شبه صلبة ، أي الجلطة. المدة الطبيعية للتخثر هي 3-4 دقائق.

الأدوات المستخدمة:

معقم ، قطن ، إبرة ، أنبوب شعري ، ساعة توقف.

خطوات العمل:

1. يتم تعقيم طرف الإصبع ويتم عمل وخز في طرف الإصبع بإبرة معقمة لتدفق الدم بحرية.

2. يُسحب الدم في أنبوب زجاجي شعري طوله 15 سم.

3. ثم يتم الاحتفاظ بالأنبوب غير مهتز أفقيًا لمدة 1-2 دقيقة تقريبًا.

4. يتم كسر جزء صغير من الأنبوب الزجاجي كل 30 ثانية حتى يظهر خيط رفيع من الدم المتخثر بعد كسر الأنبوب الشعري بالكامل.

5. عندما يظهر الخيط تتوقف ساعة التوقف. هذا أعطانا وقت التخثر. تم أخذ الفترة بين ظهور الدم في الإصبع وتشكيل الجلطة على أنها وقت التخثر.

ضغط الدم

يتم قياس ضغط الدم الشرياني بشكل أكثر شيوعًا عن طريق مقياس ضغط الدم ، والذي استخدم تاريخياً ارتفاع عمود من الزئبق ليعكس ضغط الدوران. يتم الإبلاغ عن قيم ضغط الدم بشكل عام بوحدات ملليمتر من الزئبق (mmHg) ، على الرغم من أن الأجهزة الإلكترونية لا تحتوي على الزئبق.

لكل نبضة قلب ، يتفاوت ضغط الدم بين الضغط الانقباضي والضغط الانبساطي. الضغط الانقباضي هو ذروة الضغط في الشرايين ، والتي تحدث بالقرب من نهاية الدورة القلبية عندما يتقلص البطينان. الضغط الانبساطي هو الضغط الأدنى في الشرايين ، والذي يحدث بالقرب من بداية الدورة القلبية عندما تمتلئ البطينات بالدم. مثال على القيم المقاسة الطبيعية للإنسان البالغ السليم المستريح هو 120 ملم زئبقي للضغط الانقباضي و 80 ملم زئبقي انبساطي (مكتوب على هيئة 80/120 ملم زئبقي).

References

1- Bain B.J., Bates I., Laffan M.A. 2016. Dacie and Lewis Practical Haematolog. Elsevier.

2- Health Sciences, Philadelphia, USA Singh T. 2017. Text and Practical Haematology for MBBS. Arya Publications, New Delhi, India.

3- Kale R.R. & Kale S.R. 2002. Haematology, Practical Human Anatomy and Physiology. Eight Edition. Nirali Prakashan, Pune, India.

4- Singh T. 2017. Text and Practical Haematology for MBBS. Arya Publications, New Delhi, India.