المحاضرة الرابعة

(الصبغ Staining)

المرحلة الثالثة

م.د.هبة الله عادل الحمداني

2020-2019

11- عملة الصبغ Staining

يجب أن يزال البرافين من القطاعات تماما باستخدام الزيلول ومن ثم يجب التخلص من الزيلول هو الأخر بالكحول المطلق، بعدها يجب نقل القطاعات إلى بيئة مشابهه للبيئة المذابة فيها الصبغة (مائية أو كحولية) فإذا كانت الصبغة مذابة في الماء مثلا يجب تميؤ Hydration القطاعات وذلك بتمريرها على سلسلة متدرجة الانخفاض من محاليل الكحول حتى تصل الى الماء (3 دقائق) لكل مرحلة ، أما إذا كانت العينة مذابة في 50% كحول فيكتفي بتمرير القطاعات في السلسلة الكحولية حتى تصل إلى 50 % قبل تمريرها في محلول الصبغة.

ومدة الصبغ تعتمد على نوع الصبغة وتركيزها وطبيعة النسيج وقد يصبغ النسيج بأكثر من صبغة أو قد يلجا الباحث إلى ما يسمى الصبغ المضاد كاستخدام صبغة الهيماتوكسلين لصبغ الانوية وصبغة الايوسين لصبغ السيتوبلازم.

بعد الانتهاء من عملية الصبغ تبدأ عملية إعداد الشريحة المجهرية للحفظ المستديم باستخدام مادة شمعية أو مادة بلاستيكية حافظة مثل مادة بلسم كندا أو مادة (D.P.X) ثم يوضع غطاء الشريحة Cover slid بزاوية حادة 45 درجة وبحذر شديد حتى لا تتكون فقاعات هوائية Air bubbles وهكذا يتم عمل ما يعرف بالشريحة المستديمة، بعد أن تترك لتجف على مجفف الشرائح يمكن فحص القطاعات تحت المجهر.

في المختبرات الصغيرة ومختبرات أبحاث الدم التي تستخدم عينات قليلة تتم الخطوات السابقة بشكل يدوي بينما في مختبرات الأمراض التي يتم فيها إجراءات فحوصات روتينية لعينات كثيرة تتم باستخدام أجهزة حديثة منها جهاز معاملة الأنسجة الأوتوماتيكي (Tissue Auto processor) .

الصبغات

الغرض من الصبغ هو جعل أجزاء الخلايا أو الأنسجة أكثر وضوحا فعند فحص النماذج أو المقاطع المثبتة وغير المصبوغة يمكن تمييز الأجزاء بسبب معاملات الانكسار المختلفة أما الأجزاء ذات معاملات الانكسار المتشابهة فلا يمكن تمييزها ، ولكن بعد صبغها بصبغة واحدة أو أكثر يمكن تمييز تلك الأجزاء.

إن الظواهر الفيزيائية مثل الامتزاز, والامتصاص , والخاصية الشعرية, والانتشار, والتنافذ تلعب دورا هاما في عملية الصبغ تعقبها بعض الحالات والتفاعلات الكيميائية بين جزيئات الصبغة وبين المكونات الكيميائية للأنسجة منتجة في النهاية الوان مختلفة.

تصنيف الصبغات

جميع الصبغات يجب ان تكون حاوية على مجموعتين اساسيتين هما

1- مجموعة ذرية مرتبطة باللون تدعى حاملات اللون chromophores
2- مجموعة لها القابلية على ربط المركبات الكيميائية للصبغات مع الانسجة وتدعى ماسكات اللون auxochromes

تقسم الصبغات تبعا لتركيز الاس الهيدروجيني للصبغة الى:-

1- الصبغات القاعدية Basostains

تحتوي هذه الصبغة على قاعدة عضوية ملونة تتحد مع الجذور الحامضية غير الملونة للانسجة كجذور الخلات والكلوريدات والكبريتات هذه الصبغات اما ان تذوب في الماء او في الكحول او كليهما مثل صبغة السفرانينوالهيماتوكسيلين

2- الصبغات الحامضية Acidostains

تكون حاوية على جذور حامضية عضوية ملونة تتحد مع الجذور القاعدية المعدنية غير الملونة للانسجة, مثل الصوديوم والبوتاسيوم وهذه الصبغات اما ان تذوب في الماء او الكحول او كليهما مثل الصبغة الخضراء الباهتة, وصبغة الايوسين.

3- الصبغات المتعادلة Nutrostains

وتكون مركبة من صبغات حامضية وقاعدية وتكون فيها كل الايونات السالبة والموجبة حاوية على مجاميع حاملات اللون وهذه الصبغات غالبا تذوب في الكحولات مثل صبغة الاحمر المتعادل

تقسم الصبغات حسب ميل اجزاء البروتوبلازم للاصطباغ بها الى:-

1- الصبغات النووية Stains Nuclear

تميل تلك الصبغات لصبغ النواة وبما ان النواة غنية بالحوامض النووية لذلك تميل للاصطباغ بالأصباغ القاعدية لأن الاجزاء الخلوية ذات الطبيعة الحامضية تكون سريعة الميل للاصباغ القاعدية.

2- الصبغات السايتوبلازميةSytoplasmic stains

هي تلك الصبغات التي تميل لصبغ السايتوبلازم وبما ان السايتوبلازم ذو طبيعة قاعدية فإنه يميل للاصطباغبالاصباغ الحامضية.. ومن الجدير بالذكر ان كريات الدم البيض لها ميل شديد للاصطباغبالاصباغ المتعادلة

مرسخ الالوان Mordant

ان عملية الصبغ سواء كانت ظاهرة فيزيائية او كيميائية فان اللون يتحد بصورة مباشرة مع اجزاء الانسجة او الخلايا.. الا ان هناك بعض الصبغات لا يمكنها الاتحاد بثبات وبصورة مباشرة مع اجزاء الانسجة إلا بوجود بعض المواد الوسطية والتي عادة تكون املاح مثل الالمنيوم, املاح الحديد, املاح الكروم, املاح البوتاسيوم, املاح الاوزميوم والتي تعمل على زيادة اتحاد الصبغات بالانسجة ويطلق على مثل هذه المواد بمرسخات اللون والعملية تدعى الترسيخ Mordanting

هناك 3 طرق لمعاملة الانسجة بالمرسخات

1- معاملة الانسجة بمرسخات الالوان قبل عملية الصبغ, اذ يتم اضافة المرسخ الى المثبت المستخدم كما هو الحال في ترسيخ صبغة الالينين بمرسخ الاوزميوم.
2- معاملة الانسجة بالمرسخات وذلك بمزجه مع الصبغة كما هو الحال في استخدام شب الحديد كمرسخ لصبغة الهيماتوكسيلين

3- معاملة الانسجة بمرسخات اللون بعد عملية الصبغ وهذه قليلة الاستخدام , كإستخدام اليود كمرسخ لصبغة الالينين

تخصص الصبغات وطرق الصبغ

تمتاز بعض الصبغات بتاثيرها على بعض اعضاء الانسجة دون الاعضاء الاخرى وتعرف هذه الظاهرة بالتخصص ومن امثلتها صبغة ويكرت حيث تصبغ الالياف الصفر المطاطة باللون الازرق المائل الى السواد. وصبغة كلوريد الالينك التي تصبغ جميع الانسجة الملكننة بلون اصفر براق.

هناك طرق عامة للصبغ والتي تشكل جزء من التحضيرات المتخصصة وهي:-

1- الصبغ المتزايد progressive stain

تعتمد هذه الطريقة على حقيقة ان بعض الصبغات كصبغة الهيموتوكسيلين تصبغ ,اولا النواة ثم بعدها السايتوبلازم لذلك يوضع النسيج في محلول الصبغة المخففة وتستخدم هذه الطريقة في جميع الصبغات السايتوبلازمية.

2- الصبغ المتناقص Regressive stain

تتلخص هذه الطريقة بوضع الانسجة المراد صبغها في محاليل الصبغات الاساسية المركزة الى ان يتم الحصول على إفراط في الصبغ لأجزاء الانسجة وبعدها تبدأ عملية التمييز وازالة الصبغه الزائدة باستخدام عوامل معينة وتستخدم هذه مع الصبغات النوويه.

3- الصبغ المضاد

غالبا ماتستخدم ظاهرة الصبغ التخصصي في عملية الصبغ المضاد عندما يصبغ جزء من نسيج او خلية بصبغة ملائمة ثم تصبغ بعدها الاجزاء الاخرى باستخدام صبغات ذات الوان مضادة وتتضمن عملية الصبغ بإحلال صبغة محل صبغة ثانية اكثر ملائمة فعند صبغ النسيج بصبغة السفرانين تصبغ جميع اجزاء الانسجة باللون الاحمر وعند استخدام صبغة ثانية مضادة مثل الهيموتوكسيلين فإن واحدة تحل محل الاخرى في المكان الملائم لها.

التمييز Differentation

يقصد بالتمييز زيادة التفريق في شدة درجات الصبغ لأجزاء الخلايا او الانسجة المختلفة وكذلك لإزالة الصبغات الزائدة, ويجري التمييز في حالة الصبغ المتناقص ومن اكثر العوامل المستخدمة في التمييز هو الكحول المحمض والمحضر بنسبة 70% كحول مضاف له 1% حامض الخليك أو 0.5% حامض HCL أو حامض النتريك وهذه العملية خطرة بسبب انتشار الكحول والحامض سريعا للانسجه لذلك لاينصح بها للمبتدءين بالعمل.

التبدل اللوني Metachromation

تمتاز بعض الصبغات القاعدية بقدرتها على صبغ التراكيب الخلوية والنسيجية المختلفة بألوان مختلفة وبنفس الصبغة وتعرف مثل هذه الحاله بالتبدل اللوني ومن امثلتها

صبغة السفرانين / تصبغ السايتوبلازم بدرجات مختلفة من اللون الاحمر وتصبغ ارضية الغضاريف باللون الاصفر.

صبغة الثايونين/ تصبغ الكروماتين بلون ازرق وتصبغ المواد المخاطية وارضية الغضاريف وحبيبات الخلايا البدينة بلون احمر وتفسير ذلك ان الصبغة بمحلولها المائي تظهر لونين لونها الاعتيادي الازرق والثاني اللون المتبدل الاحمر.

صبغة المثيلين البنفسجية , وصبغة الازور A , والازورB , وصبغة ازرق التولودين , ان اكثر الصبغات لاتظهر التبدل اللوني بل تصبغ مباشرة وبنفس لون صبغها وتعرف هذه الصبغات بالصبغات سوية اللون

القصر Bleaching

ان النماذج والمقاطع التي تكون انسجتها ذات الوان قاتمة اللون جدا بسبب التثبيت يتطلب قصرها قبل البدء بعملية الصبغ ويجب التأكد بصورة جيدة بان هذه النماذج تحتاج لعملية قصر وذلك لان هناك العديد من النماذج تكون انسجتها فاتحة اللون طبيعية, فعند قصر مثل هذه النماذج سيؤدي في النهاية الى تحطم انسجتها فمثلا, تكون جميع الانسجة الميكانيكية كالرايبوسومات او رايبوزومات نبات السرخس قاتمة اللون والتي يمكن صبغها بصورة جيدة خاصة اذا تم اختيار الصبغة الملائمة دون الحاجة الى قصرها, يتألف محلول القصر من مزج (ثنائي كرومات البوتاسيوم, حامض الخليك الثلجي, حامض الكروميك).

مميزات تقنية شمع البرافين

1- هذه التقنية تأخذ وقت قصير للإعداد (ليس أكثر من يومين)
2- تعطي سلسلة متتابعة من القطاعات تسمى أشرطة Ribbons متصلة مع بعضها البعض وهذه الأشرطة مهمة للعمل البحثي .
3- تعطي قطاعات رقيقة جدا.
4- قطاعات هذه الطريقة سهلة الصبغ.

عيوب تقنية شمع البرافين

1- هذه الطريقة تستخدم المثبتات والفرن والتي قد تضر بالنسيج وبتفاصيل تركيب الخلايا.
2- استخدام المثبتات قد يذيب المحتوى الدهني للنسيج خلال التحضير لذا لا يمكن دراسة الدهون بهذه الطريقة.
3- هذه الطريقة ليست مثالية في كيمياء الأنسجة لان الحرارة تحطم الإنزيمات مثلا.

المصادر :

1- د.عمر عبد القادر (2012) التحضيرات المجهرية

2- شبكة الانترنيت