تقييم ملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم في تلوين الصبغيات[+]

EVALUATION OF BAGHDAD STAIN FOR BLOOD AND BONE MARROW FILMS FOR STAINING THE CHROMOSOMES

روعة عدنان فرج[*] شهرزاد عبد الستارالجنابي [**] زينب حسين[***]

المستخلص :

إن الهدف من هذه التجربة هو المحاولة للاستفادة من ملون بغداد الذي يستخدم روتينياً لتلوين أفلام الدم ونقي العظم في تلوين الصبغيات. لونت ٢٠ شريحة زجاجية حاوية على مسحات خلايا نقي العظم وقسمت إلى أربع مجاميع في كل مجموعة خمسة شرائح ولكل شريحة في المجموعة استخدمت الفترات الزمنية ٥ , ٧, ١٠, ١٥, ٢٠ دقيقة لتلوينها بملون بغداد بعد التخفيف بالماء المقطر وشريحتان لونتا بملون كمزا للسيطرة.

أعطت الفترة الزمنية ١٠ دقائق لتلوين الصبغيات بملون بغداد لأفلام الدم و نقى العظم بعد تخفيفه بالماء المقطرأفضل نتيجة تلوين للصبغيات . إن كفاءة ملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم في تلوين الصبغيات بالإضافة إلى ما يتميز به هذا الملون من صفات ايجابية أخرى تجعل هذا الملون من الملونات الكفوءة في تلوين الصبغيات.

Abstract :

An attempt was made to study the efficiency of Baghdad stain which is routinely used in blood and bone marrow films in staining the chromosomes.

A total of 20 slides of cells of bone marrow films were flooded with the solution of Baghdad stain, then these slides were divided in to 4 groups and 5 slides in each group. Staining periods after dilution of the stain with distilled water for five slides were as follows: 5,7,10,15, and 20 minutes. Two slides were stained with Giemsa stain for control. Best result in staining of the chromosomes with Baghdad stain showed with 10 minutes staining period. In addition to the efficiency of Baghdad stain in staining the chromosomes, it has simple staining procedure, and easy method of preparation.

According to these characteristics it can be suggested that Baghdad stain for blood and bone marrow films is recommended for staining the chromosomes.

المقدمة

إن الغرض من عملية التلوين هو جعل أجزاء الخلايا أو الأنسجة أكثر وضوحاً لذلك جرت في الماضي مناقشات عديدة بين العلماء حول نظريات التلوين. فمنهم من يعتقد أن عملية التلوين هي ظاهرة

[+] تاريخ استلام البحث : ٢٠٠٦/٥/١٤ ، تاريخ قبول النشر : ٢٠٠٧/٦/١٠

[*] مدرس مساعد / المعهد الطبي التقني
[**] استاذ مساعد/ المعهد الطبي التقني
[***] مدرس مساعد/ المعهد الطبي التقني

فيزيائية بحتة ومنهم من يعتقد أنها عملية كيميائية بحتة ولكن ظهر فيما بعد اعتراض على الاعتقادين من قبل علماء آخرين إذ إن عملية التلوين تعتمد على عوامل فيزيائية كيميائية مشتركة بالإضافة إلى إن عملية التلوين تتأثر بواحد أو أكثر من هذه العوامل الآتية:

قدرة الملون , سرعة تأين كل من الأنسجة البروتينية والملونات , الأس الهيدروجيني للملون وللنسيج ألبروتيني , نوع المثبت المستخدم، نوع محلول الملون كحوليا أم مائياً ونوعية الملون إذا كانت مفردة أو مزدوجة وأخيراً تركيز الملون في المحلول ضعيفاً أم قوياً [1،2,3].

على الرغم من وجود عدد من الملونات لتلوين مسحات الدم ونقي العظم مثل Wright stain، Leishman stain إلا إن ملون الكمزا Giemsa هو من الملونات الشائعة جدا وذلك لما تتميز به من كفاءة عالية في تلوين مسحات الدم ونقي العظم وتشخيص أوالي الطفيليات الموجودة بالدم ولا تقتصر على ما ذكرنا وإنما تستخدم لفحص التراكيب الموجودة في أنواع مختلفة من الأنسجة ايضاً [٤،٥،٦،٧،٨] فضلاً عن ما ذكرنا يوجد ملون جديد وهو ملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم يتميز بالكفاءة التلوينية العالية، وسهولة وسرعة عملية التلوين، زهيد الثمن، ولا يترك رواسب في المسحات بعد التلوين , موادها الأولية خالية من المواد السامة ومتوفرة بالسوق المحلية[٢] .

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم ملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم ومدى صلاحيته في تلوين الصبغيات.

<u>المواد وطرائق العمل</u>

- **الحيوانات المستخدمة:**

استخدمت في تجارب البحث [٤] فئران مختبرية بيضاء الون من الذكور والأناث من النوع الضرب *Mus musculus* Balb/c وبمعدل عمر يتراوح بين (٨-١٢) اسبوعاً وبوزن (٢٣-٢٥)غم والتي تم الحصول عليها من البيت الحيواني في كلية الطب- جامعة بغداد.

- **المحاليل المستخدمة:**

حضرت المحاليل المدرجة أدناه في (١-٥) حسب ما جاء في [٩]

١. دارئ الفوسفات الفسيولوجي Phosphate Buffer Saline (PBS).

تم إذابة المكونات أدناه في الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠٠ مليلتر

(١,١٥) غرام من فوسفات الصوديوم أحادية الهيدروجين Na_2HPO_4

(٠,٢) غرام من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4

(٠,٢) غرام من كلوريد البوتاسيوم KCl

(٨) غرام من كلوريد الصوديوم NaCl.

ثبت الأس الهيدروجيني (pH) عند (٧,٢) بعد ذلك عقم المحلول بالموصدة autoclave وحفظ في الثلاجة (٤°م).

٢. محلول الكولجسين Cholchicin solution.

حضر هذا المحلول بإذابة حبة واحدة من الكولجسين ذات وزن (٠,٥) ملغرام في (٠,٥) مليلتر دارئ الفوسفات الفسيولوجي (PBS) المعقم.

٣. محلول ناقص التوتر ((0.075) مولاري Hypotonic solution .

حضر بإذابة (٢,٨٥) غم من كلوريد البوتاسيوم (KCl) في ٥٠٠ مليلتر من الماء المقطر. عقم هذا المحلول بالموصدة وحفظ في الثلاجة (٤°م).

٤. محلول التثبيت Fixative solution.

مزجت ثلاثة حجوم من الكحول المثيلي المطلق CH3OH مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي CH3COOH وحضر آنياً وبرد في الثلاجة (٤°م) قبل الإستعمال.

٥. محلول بيكاربونات الصوديوم Sodium bicarbonate.

حضر هذا المحلول بإذابة (٣,٧٥) غم من بيكربونات الصوديوم (NaHCO3) في ٥٠٠ مليلتر من الماء المقطر. عقم هذا المحلول بالموصدة وحفظ هذا المحلول في الثلاجة (٤°م).

٦. المحلول الخزين لملون الكمزا [٩] Stock solution of Gimza stain.

حضر هذا المحلول من إذابة ١ غم من مسحوق صبغة الكمزا في (٣٣) نمليلتر من الكليسيرين (Glycerin). وضع هذا المحلول في حمام مائي (٦٠°م) مدة ساعتين مع استمرار التحريك والرج بعد ذلك ترك المحلول نصف ساعة في درجة حرارة المختبر (٢٢-٢٥°م) ثم أضيف اليه (٦٦) مليلتر من الكحول المثيلي المطلق CH_3OH مع استمرار الرج. رشحت الصبغة باستخدام ورقة الترشيح (Whattman No.2) ووضعت في قنينة معتمة وحفظت في الحاضنة بدرجة(37°م).

٧. محلول ملون كمزا [١٠] Working solution.

حضر هذا المحلول من مزج (١) مليلتر من المحلول الخزني بصبغة كمزا مع (١,٢٥) مليلتر من الكحول المثيلي المطلق CH_3OH مع (٠,٥) مليلتر من محلول بيكاربونات الصوديوم و (٤٠) مليلتر من الماء المقطر واستخدم آنياً.

٨. محلول ملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم جهز من قبل مالك البراءة المرقمة[٢].

ولتحضير الكروموسومات من الخلايا الجسمية لنقي العظم أتبعت الخطوات التالية[٩]:

١. حقنت الحيوانات بـ (٠,٢٥) مل من محلول الكولجسين (القاهرة فارم/ مصر) تحت غشاء الخلب بعد مضي (٢) ساعة، قتلت الحيوانات وجمع نقي العظم.
٢. غسلت خلايا نقي العظم بمحلول دارئ الفوسفات الفسيولوجي (PBS) الدافئ (٣٧)°م.
٣. نبذت خلايا نقي العظم بسرعة ٢٠٠٠دورة/دقيقة ولمدة ١٠ دقائق. كررت العملية مرتين للحصول على ترسيب كامل للخلايا.
٤. أزيل العالق وأضيف إلى الراسب (٥) مل من محلول (0.075 KCl) وترك في حمام مائي (٣٧) °م لمدة ٢٠ دقيقة ونبذت خلايا نقي العظم بسرعة ٢٠٠٠دورة/دقيقة مدة ١٠ دقائق.

أزيل العالق وأضيف إلى الراسب (٥) مل من محلول التثبيت (Fixative solution) البارد والمحضر آنياً ووضعت الأنابيب في الثلاجة بدرجة (٤) °م.

٥. حضرت (٥) شرائح لكل حيوان وتم إسقاط (٤-٦) قطرات من المحلول الحاوي على الخلايا بصورة عمودية وعلى مسافة ٣ أقدام من الشريحة وذلك لإتاحة الفرصة للأنوية والصبغيات في الانتشار.
٦. وضعت الشرائح على صفيحة ساخنة (٦٠) °م لمدة (٢) دقيقة.

طرق التلوين:

- هيأت ٢٢ شريحة زجاجية حاوية على نماذج خلايا نقي العظم :
- لونت شريحتان بملون كمزا.

- **طريقة التلوين بملون كمزا [١]:**
- غمرت الشريحتان بمحلول ملون الكمزا (Working solution) لمدة (٢٠) دقيقة.
- غسلت بعد التلوين بالماء المقطر لإزالة الملون الزائد بعد ذلك تركت لتجف.

- **طريقة التلوين بملون بغداد:**
- هيأت (٢٠) شريحة زجاجية حاوية على نماذج خلايا نقي العظم.
- قسمت إلى (٥) مجاميع متساوية بالعدد واختلفت بالفترة الزمنية للتلوين بالملون بعد تخفيفه.
- غمرت الشرائح الزجاجية جميعها بملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم لمدة دقيقتين.
- خفف الملون بإضافة حجم مماثل من الماء المقطر وتركت للفترات الزمنية المتباينة وكما يلي في كل مجموعة مع مراعاة مزج الماء بمحلول الملون:

أ- تركت المجموعة الأولى بالملون المخفف لمدة ٥ دقائق.

ب- تركت المجموعة الثانية بالملون المخفف لمدة ٧ دقائق.

ج- تركت المجموعة الثالثة بالملون المخفف لمدة ١٠ دقائق.

د- تركت المجموعة الرابعة بالملون المخفف لمدة ١٥ دقائق.

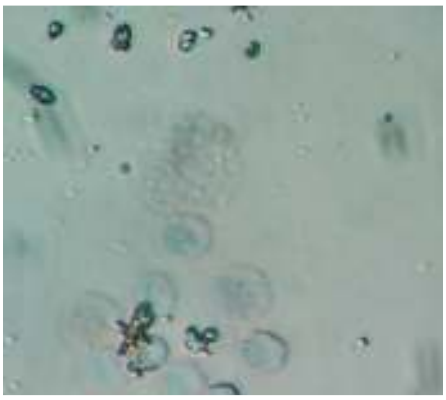
ه- تركت المجموعة الخامسة بالملون المخفف لمدة ٢٠ دقائق.

- بعد انقضاء الفترة الزمنية لكل مجموعة غسلت الشرائح بماء الحنفية وتركت على الهواء لتجف.

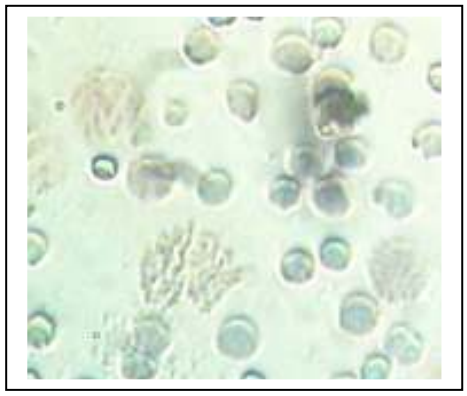
النتائج

* جميع الشرائح ضمن المجموعة الواحدة أعطت نتائجاً متشابهة في التلوين بملون بغداد.

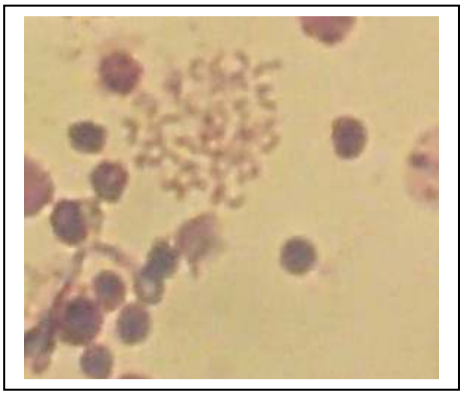
* أفضل نتائج التلوين كانت لمجموعة الشرائح (ج) والتي تركت لمدة (١٠) دقائق في ملون بغداد بعد اجراء عملية التخفيف بالماء المقطر وقد أعطت نتائج تلوين جيدة وكما موضح في الشكل رقم (٣) بالمقارنة مع الشرائح التي لونت بملون كمزا الشكل رقم (٦).



الشكل رقم (١) :الصبغيات بعد تلوينها بملون بغداد لأفلام الدم ونقى العظم، وكانت قد تركت في المحلول بعد التخفيف لمدة ٥ دقائق، ١٠٠X.

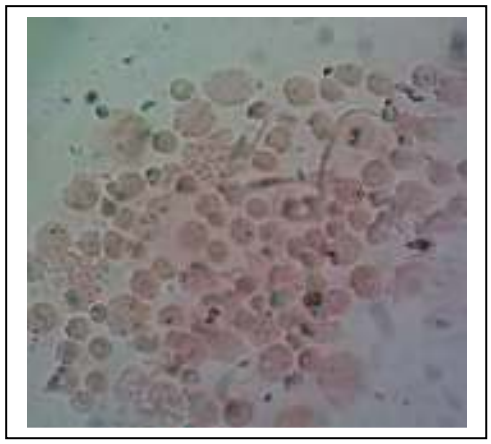


الشكل رقم (٢):الصبغيات بعد تلوينها بملون بغداد لأفلام الدم ونقى العظم، وكانت قد تركت في المحلول بعد التخفيف لمدة ٧ دقائق، ١٠٠X.



الشكل رقم (٣) :الصبغيات بعد تلوينها بملون بغداد لأفلام الدم ونقى العظم، وكانت قد تركت في المحلول بعد التخفيف لمدة١٠دقائق، ١٠٠X.

الشكل رقم (٤):الصبغيات بعد تلوينها بملون بغداد لأفلام الدم ونقى العظم، وكانت قد تركت في المحلول بعد التخفيف لمدة ١٥ دقيقة، ١٠٠X.



الشكل رقم (٥):الصبغيات بعد تلوينها بملون بغداد لأفلام الدم ونقى العظم، وكانت قد تركت في المحلول بعد التخفيف لمدة ٢٠ دقيقة، ١٠٠X.

الشكل رقم(٦): الصبغيات بعد تلوينها بملون كمزا ١٠٠X.

المناقشة

أظهر ملون بغداد كفاءة جيدة في تلوين الصبغيات ليس هذا فقط فعند مقارنة ملون بغداد مع ملون كمزا ذي الكفاءة التلوينية العالية نجد ان لملون بغداد عدداً من الخصائص الايجابية ففي عملية التلوين باستخدام ملون كمزا توضع الشريحة المطلوب تلوينها في Working solution لمدة ٢٠ دقيقة وذلك للتخلص من رواسب الصبغة على الشريحة الزجاجية[٣] في حين أن ملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم عند استخدامه لا يترك أي رواسب ولا تستغرق عملية التلوين أكثر من ١٠ دقائق، يحتاج ملون الكمزا إلى الكحول ألمثيلي النقي وغير حاوياً على الأسيتون [٣] في حين إن تحضير ملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم ليس من الضروري أن يكون الكحول ألمثيلي عالي النقاوة وان محلول ملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم لا يشكل أي خطورة لمستخدميها في حين يعتبر ملون كمزا من المواد المسرطنة.

هذا بالإضافة إلى عدد من الصفات الإيجابية لملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم منها عند تحضير الملون يمكن استخدامه بعد تحضيره مباشرة وانه يمكن أن يحفظ في درجة حرارة الغرفة أو الثلاجة لمدة تجاوزت السبع سنوات في حين إن ملون كمزا لا يستخدم مباشرة بعد التحضير لأن الملون يحتاج إلى فترة إنضاج ويحفظ الملون في قناني معتمة حتى لا يؤثر عليها الضوء[١] نستنتج من هذه الدراسة إن ملون بغداد لأفلام الدم ونقي العظم يمكن أن يعتبر ملوناً ذا كفاءة جيدة في تلوين الصبغيات.

المصادر :

١. العطار، عدنان عبد الأمير,العلاق، سهيلة محمود المختار، كواكب عبد القادر. *التحضيرات المجهرية*، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. بغداد– العراق، ١٩٨٢.

٢. الجنابي، شهرزاد عبد الستار، كوكب. *ملون بغداد لأفلام الدم ونقى العظم*، براءة أختراع، الجهاز المركزي للتقيس والسيطره النوعيه/ الملكيه الصناعيه/ قسم براءات الأختراع. الرقم ٢٧٧٣ ، ١٩٩٩.

3. Davidson, I. M. D. and Henry, J. B. *Tood Sanfod. Clinical Diagnosis by Laboratory method* 15 ed. PP. 137-8 ,1974.
4. Forbes, B. A., Sahm, D. F. , Weissfeld, A. S. ,*Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th edition. Mosby, PP 806, 1998.
5. Baker, F.J., Silverton, R.E., *Introduction to Medical Laboratory Technology* – the English language book society and Butterworth London. PP. 381-385, 1978.
6. Clark, G. *Staining Procedure* 4th edition, Williams & Wilkins Baltimore / London PP. 8, 1980.
7. Marshal, P.N.and Galbraith, W, Microspectrophotometric studies of Romanowsky blood cells III. The action of methylen blue and Azur-B. *Journal Stain Technology* No. 59, PP. 17-36 , 1984.
7. Muller-Walz, R. and Zimmermann, H.W. Romanowsky- farb and RG. Binding with Azur B. To stain DNA. *Journal Histochemistry* No. 87, Pp. 157-172, 1987.

8. Allen, J.; Shuler, C.F.; Mendes, R.W. and Latt, S.A. A simplified technique for in *vivo* analysis of sister chromatid exchanges using 5- bromo-deoxuridine tablets.*Journal of Cytogent. Cell Genet*. No. 18 , PP 231-239, 1977.
9. Shubber, E.K.; Kram, D. and Williams, J.R. In vitro assay of cytogenetic damage induce in bone marrow cells in *vivo* by chemical cavcinogens. *Japan Journal of Med. Science and Biol.* No,38, PP 207-216, .1985.
10. Mualla, A. and Gharib, M. *Laboratory Manual in Technical Haematology*. Baghdad, PP.134, 1999.