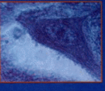
أسس

كيمياء الأنسجة

(الهستوكمستري)

النظري والعملي



الأستاذ الدكتور محمود أحمد البنهاوي

الأستاذ الدكتور فهمي إبراهيم خطاب

الأستاذ الدكتور منير علي الجنزوري

المكتبة الأكاديمية

بسم الله الرحمن الرحيم

مقـــــدمة الكــــتاب

إن إصدار مؤلف باللغة العربية في مجال الهستوكمستري " أو " كيمياء الأنسجة " عملية لا يستطيع أي منصف أن يهون من شأنها أو يقلل من قدرها ، فهي عملية بالغة الصعوبة .إن هذا العلم من أحدث العلوم البيولوچية قاطبة ، ويمكن القول - بأمان تام - أنه لم يكتمل من العمر غير الأربعين عاما تقريبا بعد وذلك لأن المؤرخ لهذا العلم لابد أن يربط بينه وبين صدور أول مؤلف في هذا الشأن عام ١٩٥٣ علي يد العالم الإنجليزى " إيفرسون بيرس Everson Pearse" والذي أورد المؤلف في عنوانه أنه « هستوكمسترى : نظري وعملى" ، وإن كانت الناحية العملية تطغى عليه إلي حد كبير . وتلاه بعد عشرة أعوام تقريبا مؤلف مماثل للعالمين الأمريكيين " باركا واندرسون Barka and Anderson" عام١٩٦٣ ، علي نفس المنوال الي حد كبير. علي أنه من المعروف أنه قد سبق ذلك صدور بعض المؤلفات التي تتناول النواحى المعملية أو التقنوية في هذه المجالات ، ولكن الناحية النظرية لم يبدأ التعامل معها - علي الأقل في نطاق الدراسات البيولوجية المتقدمة سوى ابتداء من صدور كتاب الأستاذ بيرس عام ١٩٥٣ ، كما ذكر آنفا . والغريب في هذا المجال ، أنه في حدود علم المؤلفين لم تصدر مراجع أخري علي هذا المنوال باستثناء بعض المؤلفات المحدودة . ومن هنا كانت عملية تجميع تلك المادة - لكي ترسى قواعدها النظرية باللغة العربية - عملية في حاجة إلي جهد خاص وعناء بالغ والاعتماد الأكبر علي ما ينشر تباعا من بحوث علمية في هذه النواحـى لانتقاء ما يفيد منها فى هذا الغرض .

أما السبب الآخر في صعوبة اقتحام ذلك المجال أنه لحداثة هذا العلم وما أتي به من اصطلاحات ومصطلحات علمية جديدة أو مستحدثة ، فإن من المتعين ترجمة تلك المصطلحات او تعريبها بصورة مقبولة وذلك لأن الغالبية العظمى منها لم تدخل قواميس اللغة العربية ولم تصبح بعد متداولة علي نطاق واسع يسمح بالاستفادة منها بيسر وسهولة .

وعلي ذلك كان من المحتم – بعد الاعتماد علي الله سبحانه وتعالى – تجميع مشابهات تلك المصطلحات التي سبق أن وردت في بعض الأفرع السابقة مثل الكيمياء الحيوية وغيرها وترجمة ما يمكن ترجمته أو تعريبه منها بأسلوب مستساغ مستعينين بخبرتهم الطويلة في هذا المجال من الدراسات والبحوث ومعايشة المؤلفين لها منذ بزوغ فجر هذا العلم تقريبا ، وهذا اجتهاد من المؤلفين لعله يحتسب لهم ولعله يحظي بالتوفيق والقبول ، ويرجى أن يفتح الباب أمام زملاء آخرين لإثراء المكتبة العربية في تلك النواحي .

ولعل هناك سؤالاً يتبادر إلي أذهان الكثيرين ، البعيدين نسبيا عن تلك المجالات ، ما هي الأهمية الملحة لهذا العلم ، وما هي أهمية توفره في المكتبة العربية ؟ . وقد يحتاج الرد علي هذا التساؤل الكثير من الشرح والتعليق ، ولكن يمكن إيجاز ذلك بالإشارة إلي أن هذا العلم – علي قصرعمره وحداثه عهده – إلا أنه قد قفز إلي الأمام بخطى سريعة متلاحقة جعلت منه عنصرا أساسيا في الدراسات والبحوث البيولوجية المختلفة سواء منها التركيبية اى الهستولوجية والفسيولوجية والتصنيفية والبيئية والكيميائية الحيوية وغيرها . ولعل ذلك من الأسباب الرئيسية التي تقتضى تدريس تلك المادة والتعامل معها في نهاية المرحلة التعليمية البيولوجية الجامعية بعد أن يكون الطالب قد حظى بقسط وافر من تلك المواد التي تأتي علي قمتها وتتوجها الدراسات الهستوكيميائية ، وعندئذ يمكن للطالب ان يتذوق طعمها ويدرك أهميتها ويحسن الإفادة منها .

وغنى عن القول أن هذا العلم يهدف بصورة أساسية إلي تحديد وتوضيح المكونات الكيمائية المختلفة في أماكنها الحقيقية في الخلايا والأنسجة الجسمية والربط بينها وبين النشاطات الحيوية التي تقوم بها تلك الخلايا والأنسجة ومتابعة التغيرات التي تحدث فيها تحت اي ظروف او عوامل غير عادية تجريبية كانت أو مرضية ومعنى ذلك أن اى انحراف عن صورتها السوية لابد أن يستدل منه علي حدوث خلل في تركيب هذه الخلايا والأنسجة ونشاطاتها . ومن هنا بدأ اتجاه عارم إلى الاستفادة بهذا العلم في المجال التشخيصى للعديد من الحالات المرضية ، خاصة فيما يتعلق بالأورام السرطانية . وعلي ذلك فإنه ليس من الغريب ان الوحدات التي تتعامل مع هذا العلم وجدت وتتواجد بصورة رئيسية في المستشفيات

الجامعية الكبري ، مثل وحدة الأستاذ بيرس في مستشفى « هامرسميث » التابع لجامعة لندن ، والوحدة المماثلة الشهيرة التي هي مقر عمل الأستاذين "باركا واندرسون " في مستشفي "ستوني بروك " التابع لجامعة " ستوني بروك " في نيويورك وغيرها .

وهناك أيضا ناحية أخرى أضفت علي هذا العلم أهمية غير عادية ، وهو أنه أصبح يشكل أحد الأسس الهامة لعلوم اكثر حداثة ، هي علوم الساعة ، متمثلة في البيولوچيا الجزيئية والوراثة الجزيئية والهندسة الوراثية وما يرتبط بها من نواح أخري بالغة الخطورة . وهذا بالاضافة الي المناعة الهستوكيميائية وغيرها.

إن المؤلفين – بإقدامهم علي هذه الخطوة – ليرجون أن يكون قد حالفهم التوفيق في إضافة مؤلف جامع في هذه المادة باللغة العربية بذلوا فيه جهدا كبيرا لكى يستوعب أقصى مايمكن استيعابه في تلك النواحي بإسلوب حاولوا جهد طاقتهم أن يكون مقبولا مستساغا من الدارسين والباحثين .

وعلي الله قصد السبيل .

المؤلفـــــون

بسم الله الرحمن الرحيم

تمهـــــــــــيد

كما سبق القول ، فإن علم " كيمياء الأنسجة " أو " الهستوكمستري " يعتبر من أحدث العلوم البيولوجية ، وهو يتناول بالدراسة أنماط تواجد وتوزيع المكونات الكيماوية المختلفة في الأنسجة والخلايا الجسمية والدور الذي تقوم به فى النشاطات الحيوية المختلفة .

وعلي الرغم من حداثه هذا العلم ، إلا أنه يمكن القول أن إرهاصاته تعود إلي عام ١٨٠٠ حيث بدأت في الظهور علي هيئة دراسات متناثرة تناولت محاولة الربط بين المكونات الكيماوية مقابل التراكيب المورمولوجية ، كما تبدو في التحضيرات الميكروسكوبية لهذه الأنسجة .

وفي عام ١٨٣٠ بدأت هذه المعلومات تتبلور علي هيئة دراسات قائمة بذاتها وإن ظلت حتي عام ١٨٥٥ قاصرة علي تناول الأنسجة النباتية . وخلال الفترة ١٨٥٥ – ١٨٧٠ بدأ الاهتمام بمقارنة تلك الدراسات بمثيلتها في الأنسجة الحيوانية ، وإن كانت تتخذ نمطا كان يعرف باسم " الكيمياء البيولوجية " . وكانت لغالبية التقنيات المستخدمة في تلك المجالات تأثيرات هدمية وتحللية علي الأنسجة التي كانت تتم دراستها .

وبعد عامين تقريبا ، أي في عام ١٨٧٢ ، تفرع هذا العلم الوليد إلي فرعين أساسيين ، فرع منهما ترك علي هيئة " الهستولوچيا " أو " علم الأنسجة " وبقى الفرع الاخر علي هيئة "الكيمياء البيولوچية ".

وخلال الربع الأول من القرن الحالى ، ازداد الاهتمام بالدراسات المرضية النسيجية أو " الهستوباثولوچية " وصاحب ذلك اهتمام ملحوظ لإيجاد صبغات نسيجية جديدة في تلك المجالات . غير أنه لم يصحب ذلك اهتمام مماثل بالمكونات الكيماوية في الانسجة . وقد أجري العديد من الدراسات في تلك النواحى صنفت علي أنها علوم " كيميائية دقيقة ، أو

"ميكروبيولوجية .

تلا ذلك عودة تلك الدراسات إلي مجال " الهستولوجيا " وذلك خلال الفترة من عام ١٩٣٠ حتي عام ١٩٤٤ ، وأثناء ذلك كان العالم ليسون Iison" قد نشر في عام ١٩٣٦ علي وجه التحديد مؤلفه الشهير " الهستوكيمياء الحيوانية " " Histochemie Animale " الذي أعلن فيه عن ظهور علم " كيمياء أنسجة " جديد يتحاشي إتلاف الأنسجة المستخدمة . وبعد ذلك ظهر كتاب العالم " جليك Glick " عام ١٩٥٣ تحت عنوان "تقنيات كيمياء الأنسجة وكيمياء الخلية "Techniques of Histochemistry and Cytochemistry " وكان من أهم ماتضمنه هذا الكتاب الأسس النظرية والطرق الهستوكيميائية المعملية من زاوية العاملين في المجالات الهستولوجية ، وعلي الرغم من أن هذا الكتاب لا يعتبر مؤلفا هستوكيميائيا خالصا إلا أنه كان يهتم بصورة أساسية باستخدام التقنينات الهستوكيميائية .

وفي عام ١٩٥٢ ظهر كتاب للعالم جومورى Gomori تحت عنوان كيمياء الأنسجة المجهرية "Microscorpic Histochemistry" .

وفي عام ١٩٥٣ ظهر كتاب بعنوان كيمياء الخلية "Cytochemistry" للعالم دانيللى Danielli . وفي نفس العام ظهرت الطبعة الأولي لكتاب العالم الإنجليزي بيرس Pearse التي لقيت اهتماما واسعا من الباحثين ، كما ظهر كتاب العالم بورن Bourne بعنوان " علم الانسجة الوظيفى "Functional . وفي عام ١٩٦٠ ظهرت الطبعة الثانية لكتاب بيرس والذي يعتبر أنه وضع الأسس الحديثة لهذا العلم . وفي عام ١٩٦٣ ظهر كتاب العالمين باركا واندرسون Barka and Anderson.

وقد كان لظهورهذه المراجع الأساسية لكيمياء الأنسجة دور كبير في اهتمام الباحثين بدراساته وتطبيقاته في مختلف معامل البحوث .

وقد توالت طبعات كتاب العالم بيرسى بعد ذلك حيث ظهرت الطبعة الثالثة في عام ١٩٦٨. وفي التسعينيات ظهرت الطبعة الرابعة له . وقد كان لتوالي طبعات كتاب بيرس وترجماتها الي عدة لغات وما أعطته من اهتمام متزايد بالجوانب النظرية والأسس والتطبيقات العملية ومايستحدث أو يطور منها دور كبير في مساعدة الباحثين في وضع بناء ثابت لهذا

العلم وتطبيقاته في الدراسات البيولوجية والطبية .

ومن ناحية أخري بدأ منذ عام ١٩٥٠ ظهور دوريات عالمية متخصصة لنشر البحوث في تلك المجالات تضمنت في البداية :

- Experimental Cell Research (1950).
- Journal of Histo - and Cytochemistry (1953).
- Acta Histochemica (1954).
- Journal of Biophysical and Biochemical Cylology (1955).
- Revists di Istochemica (1955).
- Annals d'Histochemie (1956).
- Histochemistry (1958).

ومازالت هذه الدوريات المتخصصة في تزايد في العديد من أنحاء العالم .

وفيما يتعلق بالتقنيات المستخدمة في مجال كيمياء الأنسجة ، فإن أولها كانت الطريقة التي قدمها العالم " راسبيل Raspail" عام ١٨٤٣ مستخدما الأيودبين لتوضيح مادة النشا ، ، كما اكتشف واستخدم بعد ذلك العديد من الطرق الهستوكيماوية التي مازال الكثير منها يحتفظ بأهميته حتي الآن . وقد تضمنت هذه الطرق توضيح البروتينات والحديد وبعض المكونات الهستوكيميائية الاخري .

ومن زاوية استعمال الإنزيمات في مجال كيمياء الأنسجة فإن الفضل يعود إلي" بيلز Beals"عام ١٨٦٠ ، الذي استخدم العصارة المعدية لاستبعاد الأنسجة غير المرغوبة أو المتطلبة من الألياف العصبية التي كان يقوم بدراستها .

وبعد سبع سنوات من ذلك التاريخ ، أي في عام ١٨٦٧ توصل " كلبس Klebs" إلي طريقة توضح الإنزيمات في الأنسجة الحيوانية عندما قام بإظهار إنزيمات " البيروكسيديز Peroxidares " في خلايا الدم البيضاء .

وكان أول من قام بتوضيح إنزيم " سيتوكروم المؤكسدCytochrome Oxidese" العالم

" إيرلش Ehrlich " عام ١٨٨٥ الذي استخدم تفاعل " نادي Nadi reaction " في الحالات الحية عندما قام بحقن " الفا – نافثول Alpha Naphthol" في الحيوانات ، ولا حظ تكوين مادة " أزرق اندوفينول Indophenol Blue" في المواقع التي كان يوجد بها " سيتوكروم اكسيويز " .

وبجانب ذلك بدأت بعض الطرق الأخرى للظهور في المجالات الهستوكيميائية ، فقد تمكن " هيدينهين Hedenhain" من توضيح مواد معينة ذات قابلية شديدة للصبغات القاعدية متركزة في المناطق القاعدية للخلايا الغدية الافرازية ، كما لاحظ أن هذه المادة يمكن ترسيبها بواسطة حمض الخليك ، كذلك تمكن " ميتشر "Meischer" من فصل الكرومانين النووى عن طريق الإفادة من قابليته الاختيارية لصبغ أخضر الميثيل Methyl Green"علي أن هذه الصبغات – وإن كانت تستخدم علي نطاق واسع ، إلا أنها لم تعن عناية واضحة بالربط بين طبيعتها الكيماوية وبين المكونات النسيجية التي كان يتم صياغتها ، علي الرغم من وجود اتجاه معين للربط بين اللون ألذي يظهر عندئذ مع التركيب الهستولوچي بالمعنى المحدد .

وقد بدأ هذا الاتجاه اكثر وضوحا فيما بعد عندما اجريت دراسات وفيره لتفسير كيفية ارتباط تلك الصبغات بالأنسجة المختلفة . وقد أعلن بعض الباحثين أن ذلك يحدث نتيجة لامتصاص الأنسجة لتلك الصبغات ، بينما كان يميل البعض الآخر إلي الإعتقاد بأن تلك الصياغة تظهر نتيجة تفاعلات كيماوية معينة بين الصبغات المستخدمة والأنسجة التي كانت تتم صباغتها . وفي هذا المجال أعلن العالم" مان Mann " أن الغرض الاساسى من الصباغة يتلخص فيما يلى :

أولا : تحديد الخصائص أو الحقائق المورفولوچية .

ثانيا : التعرف علي تواجد وتوزيع المواد التي كان يعرف تواجدها عن طريق استخدام الجزيئات الكبيرة ، أي Macromoleculas .

هذا ، ومازالت هناك محاولات متعددة لتجويد تلك التقنيات وإستحداث تقنيات أكثر فعالية في تلك المجالات المتعددة .

الفصــــل الأول

1

إعداد التحضيرات (العينات) الهستوكيمائية للفحص الميكروسكوبي

Preparation of histochemical specimens

الفصـــل الأول

إعداد التحضيرات (العينات) الهستوكيمائية* للفحص الميكروسكوبي

Preparation of histochemical specimens for microscopic examination

مقدمـــــــة :

لاشك أن الدراسات الهستوكيميائية تعتمد بصورة أساسية علي التحضيرات الميكروسكوبية التي يتم إعدادها بطرق مختلفة ؛ منها بعض الطرق المتخصصة التي يقتصر استخدامها علي هذا النوع من الدراسات فقط . وبصورة عامة ، فإنه يمكن تصنيف هذه الطرق في الأنماط الرئيسية التالية :

أ - التحضيرات الشمعية Paraffin Preparations

ب - العينات الحية Vital Specimens

جـ - التحضرات الثلجية أو المجمدة Frozen Preparations

أ - التحضيرات الشمعية Paraffin Preparations

يمكن استخدام العينات المطمورة في الشمع بالطريقة الروتينية وذلك لإعداد بعض التحضيرات في مجال كيمياء الأنسجة مثل تحضير الحمضين النووين ح د ن ، ح ر ن أو الكشف عن المواد عديدة التسكر أو بعض البروتينات . وفي هذه الطريقة تؤخذ العينة من الحيوان ، وتثبت في المثبتات العادية ثم تغسل وتجري لها عملية نزع الماء في سلسلة متصاعدة من الكحولات حتي الكحول المطلق (١٠٠٪) ثم تنتقل إلي سائل ترويق مثل الزيلول ، وبعد ذلك

* أنظر ايضا كتاب « التقانين المجهرية » تأليف البنهاوى والجنزورى ، إصدار دار المعارف عام ١٩٨٩ .

إلي الشمع المنصهر في الفرن لإجراء عملية التخلل وأخير تطمر العينة في قالب من الشمع، ثم يقطع قالب الشمع المحتوي علي العينة بواسطة الميكروتوم . وتلصق القطاعات علي شرائح زجاجية ثم تصبغ القطاعات بالطرق المطلوبة .

ومن ميزة الطريقة المذكورة إمكانية الحصول علي عدد كبير من القطاعات دون فقد أي منها وذلك بسهولة ويسر . غير أنه عند إجراء الدراسات التي تهتم بوجه خاص بالدهون في الأنسجة والخلايا فلا يمكن الاعتماد علي هذه الطريقة لأن النسيج يتعرض أثناء الإعداد للكحولات والزيلول وهي بالطبع مواد مذيبة للدهون . كما أن القطاعات الشمعية لا تصلح إذا كانت الدراسات متطلبة للكشف عن أماكن نشاطات الإنزيمات في الأنسجة والخلايا حيث أن الطمر في الشمع المنصهر يعرض النسيج لدرجات حرارة عالية نسبيا مما يعرض هذه الإنزيمات للتحلل .

وعلي هذا الأساس ، فإنه عند دراسة الدهون او الإنزيمات في الأنسجة يلجأ الباحثون إلي اعداد أنواع أخرى من التحضيرات كما سيرد ذلك في الجزء التالى .

ب - العينات الحية Vital Specimens

مفهوم هذه العينات أو التحضيرات أنها تؤخذ من أنسجة أو أعضاء حية ، وتعد للفحص الميكروسكوبى بطرق بسيطة وإن كانت تتطلب الدقة والتأني واستخدام الأدوات النظيفة المعقمة بما في ذلك الأوعية الزجاجية وأدوات التشريح والشرائح وأغطيتها وغيرها . وتبقى هذه العينات في حالتها الحية فترة مناسبة تتروا ح بين ساعة وساعتين تظل خلالها تؤدي أعمالها ونشاطاتها الحيوية المعتادة بما يسمح بفحصها وتصويرها فوتوغرافيا أو سينمائيا . بل إنه يمكن إجراء تجارب معينة عليها بإضافة بعض المواد إليها أو بقطع أجزاء منها أو تحريك بعض عضياتها ومكوناتها ومتابعة ما يحدث فيها أثناء ذلك أو بعد ذلك . ويستخدم لذلك الغرض جهاز التشريح اليدوى الميكروسكوبي Micromanipulator .

وهذا الجهاز عبارة عن ميكروسكوب مزدوج العينية مزود بإبر تشريحية دقيقة وشفرات حادة وحقن بالغة الدقة لتحقيق تلك الأغراض السابقة ولا شك أن لهذه الوسيلة أهمية بالغة عندما يراد تجربة ومتابعة تأثيرات بعض المواد أو العقاقير الخطيرة أو السامة علي خلايا

وأنسجة الإنسان بما لا يتيسر إجراؤه داخل الجسم .

والمعروف انه بعد الحصول علي العينات الحية المطلوبة من الجسم بالطرق المناسبة ، فإنها تقطع إلي قطع صغيرة توضع علي شرائح زجاجية معقمة عليها قطرات من المحلول الملحى الفسيولوچى المعقم أيضا ، ويجري تنسيلها أو هرسها أو فردها علي الشريحة ثم تغطيتها بالأغطية الزجاجية المعقمة وفحصها ميكروسكوبيا .

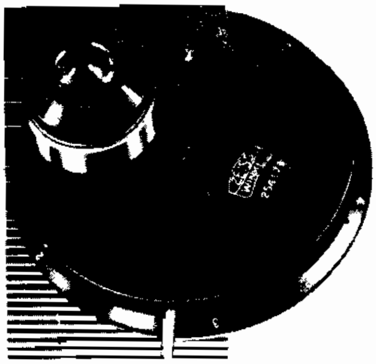
على أنه لكى يمكن مشاهدة هذه العينات ، فإن الميكروسكوب الضوئي العادي لايصلح لتلك الأغراض بسبب عدم وجود تباين بين التراكيب الخلوية والنسيجية . وعلي ذلك يتحتم فحصها باستخدام ميكروسكوب التضاد أو التباين Phase contrast microscope * الذي يعمل علي زيادة الفروق بين معدلات الانكسار الضوئية لتلك التراكيب بما يؤدي إلي حدوث تباين واضح بينها يمكن من مشاهدتها وتمييزها عن بعضها .

وفي أحيان أخري ، تتم صياغة هذه العينات الحية بصبغات معينة تمكن من فحصها بالميكروسكوب الضوئي العادي . وعلي ذلك يشتمل هذا النوع من التحضيرات الحية علي الأنماط التالية :

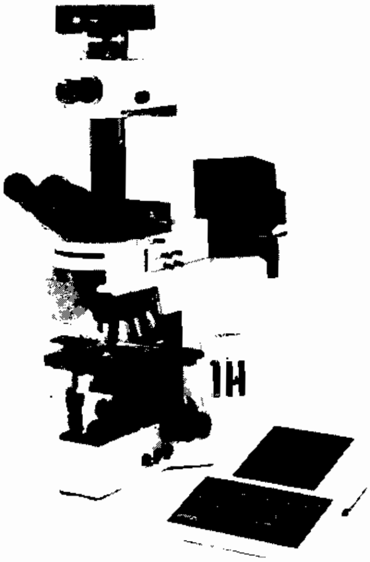
١ – تحضيرات حية غير مصبوغة Unstained vital preparations

٢ – تحضيرات حية مصبوغة Stained vital preparations

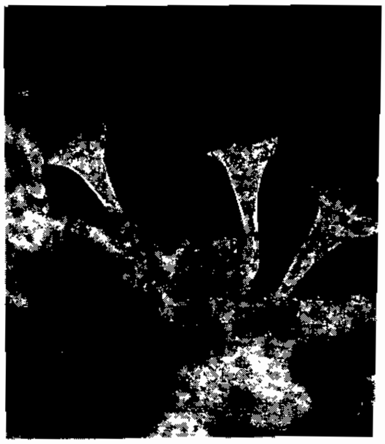
* انظر كتاب « علم الخلية » للبنهاوى وزملائه (الناشر دار المعارف) عام ١٩٩١ .



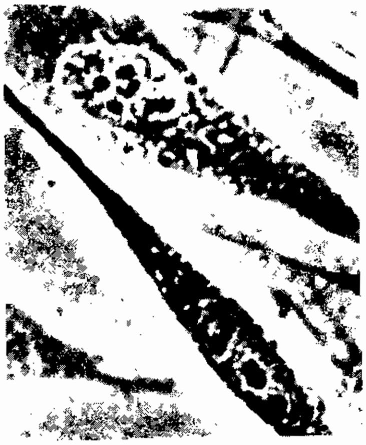
مكثف خاص بميكروسكوب
التضاد أو التباين
Ph. c. m. condenser



ميكرسكوب التضاد أو التباين
Phase contrast microscope



بعض البولبيات الحية



خلايا ليفية حية
(صورة بميكروسكوب التضاد

١ - التحضيرات الحية غير المصبوغة :

وهي التي سبق عرضها وشرحها فيما سبق .

٢ - التحضيرات الحية المصبوغة :

وهي التحضيرات التي تتضمن صياغة العينات الحية بصبغات خاصة يطلق عليها "الصبغات الحيوية " Vital stains or dyes مثل أزرق الميثلين Methylene blue والأحمر المتعادل Neutral red وأخضر جانسي Janus Green وأسود جانسي Janus black والثيونين Thionin وأزرق التلودين Toluidine blue

وتذاب هذه الصبغات في محلول ملحى فسيولوجي Physiolgical saline solution تتوقف درجة تركيزه علي نوعية الحيوانات المستخدمة (فهو مثلا بنسبة ٩,٪ بالنسبة للحيونات الثديية ، ولكنه حوالي ٦٥, ٪ في حالات البرمائيات) . وتكون نسبة المادة الصبغية في هذا المحلول حوالي ٠٠٠١, ، وهي نسبة - كما هو واضح - مخففة جدا وذلك يسمح ببقاء الخلايا والأنسجة في حالة حيه لفترة تتراوح بين ٣٠ - ٤٥ دقيقة، ولكن إذا طالت هذه الفترة تسببت تلك الصبغات في تسمم الخلايا وموتها .

وهناك طريقتان تتبعان عادة في هذه الحالة :

الصباغة الحيوية الداخلية : Intravital Staining

وفيها تحقن الحيوانات في تجويفها البريتوني بكمية من المحلول الصبغي حسب وزن الحيوان ، ويتم الحصول علي العينات المطلوبة من تلك الحيوانات بعد نصف ساعة تقريبا ، وتوضع هذه العينات بعد فردها أو تنسيلها أو نسرها علي شرائح زجاجية نظيفة معقمة عليها قطرات من المحلول الصبغي ، ثم تفحص مباشرة بالميكروسوب الضوئي حيث تبدو مصبوغة بالصبغ المستخدم

الصباغة الحيوية الخارجية : Supravital Staining

وفيها يتم الحصول علي العينات المطلوبة من الحيوانات وفردها أو تنسيلها أو نسرها علي شرائح زجاجية نظيفة معقمة عليها قطرات من المحلول الصبغي، يراعي أن تكون درجة

حرارته مماثلة لدرجة حرارة الجسم ويحفظ عند هذه الدرجة بضع دقائق ، ثم يتم فحصها ميكروسكوبيا . وهذه الطريقة أكثر شيوعا عن الطريقة الأولي .

وفي كلتا الحالتين ، فإن فحص مثل تلك العينات يكون أفضل جدا عند وضع مرشح حراري ، وذلك بوضع كأس مملوء بالماء أمام المصباح الكهربائي الذي يضيء الميكروسكوب .

وفيما يلى بعض الخطوات التفصيلية لتلك التحضيرات :

– في بداية العمل يجب التأكد تماما من تنظيف الشرائح والأغطية الزجاجية تنظيفا جيدا (كيماويا) وذلك – علي سبيل المثال – بوضعها في كحول محمض يتكون من :

(١٠٠) ملليلتر كحول بتركيز (٧٠٪) + ملليلتر واحد من حامض هيدروكلوريك مركز . وبعد ذلك يتم شطف الشرائح عدة مرات (في ماء مقطر) حتي تتم إزالة آثار الكحول المحمض ، ويلى ذلك غسل الشرائح في الماء المقطر عدة مرات . وبعد فترة معينة يتم مسح الشرائح جيدا بقطعة الشاش او الحرير الناعم المعقم .

– بعد قتل الحيوان او تخديرة وتشريحه أو الحصول علي العينات منه بأية صورة أخري ، وذلك في أسرع وقت ممكن ، يتم وضعها في زجاجة ساعة أو طبق بتري به المحلول الصبغى المستخدم .

– يتم صباغة العينات وفحصها بعد معاملتها بإحدي الوسائل الآتية :

* **التنسيل (أو النسر)** : Teasing

وفي هذه الحالة ، يوضع حيز صغير من العينة علي الشريحة الزجاجية النظيفة ، عليها قطرات من المحلول الصبغى ، ويتم تنسيلها أو نسرها بإبر التشريح المعقمة حتى يصل سمكها إلي سمك الخلية الواحدة تقريبا . وهذه الطريقة ملائمة جدا المعظم الأنسجة الحيوانية خاصة العضلية والعصبية واللمفاوية وغيرها من الأنسجة المماثلة .

* **الهـــــرس** : Squashing

حيث يوضع أيضا جزء صغير من العينة علي الشريحة الزجاجية التى تحمل نقطا من المحلول الصبغى ، وتتم تغطيتها بغطاء زجاجى نظيف ، ويتم الضغط عليها بأصبع الإبهام بعد

تنظيفه حتي يتم فرد العينة بطريقة مناسبة . وهي أيضا مناسبة للعديد من الأنسجة والخلايا خاصة عندما يراد فحص الكروموسومات بها .

جـ العينات (القطاعات) المجمدة

Frozen Sections

تتضمن دراسات كيمياء الأنسجة فحص بعض المكونات الكيميائية التي يصعب الحفاظ عليها وتوضيحها في التحضيرات الشمعية المعتادة ، وذلك مثل المواد الدهنية أو الليبيدية بصورة عامة ، وكذلك معظم الإنزيمات لأنها تتكسر وتضيع فاعليتها في تلك الأحوال نتيجة درجة الحرارة التي تتعرض لها أثناء إعداد مثل هذه التحضيرات . ولذلك استخدمت طرق معينة تتضمن الحفاظ علي تلك المكونات ، وتعرف هذه الطرق بالتقنيات التجميدية أو الثلجية Freezing methods . ومن أهم مميزات هذه الطرق – بجانب الحفاظ علي المركبات الكيميائية – سابقة الذكر – فإنها توفر استخدام الكيماويات المتطلبة في التحضيرات الشمعية مثل الكحول والزيلول وغيرها من المواد ، بالإضافة إلي سرعة الحصول علي القطاعات المطلوبة ؛ وكل ما هو متطلب في تلك الحالات هو سرعة تجميد العينات المطلوبة بالتبريد الشديد كهربائيا أو باستخدام غاز ثاني أكسيد الكربون . ويعني ذلك أن العينات تصبح هنا مطمورة embedded في الثلج بدلا من أن تكون مطمورة في الشمع . ويتم تقطع هذه العينات في هذه الحالة بواسطة ميكروتومات معينة يطلق عليها الميكروتومات الثلجية Freezing Microtomes والكريوسيتات : Cruostat وفيما يلى نبذة عن بعض هذه الميكروتومات .

أولا : الميكروتومات الثلجية :

* **ميكروتوم شولتز** : Schultze Microtome

قام العالم شولتز بتصميم هذا الميكروتوم لأول مرة عام ١٩٣٢ وهو ميكروتوم عادي تقريبا تم تزويده بوسائل معينة تعمل علي تجميد العينة وتبريد سكين التقطيع وذلك باستعمال قذائف متتالية من غاز ثاني أكسيد الكربون Jets of Carbon Dioxide . وكان الغرض الأساسى من ذلك إعداد قطاعات شبه متتابعة Semi-serial sections لدراسة بعض النواحي المستولوجية والهستوكيمائية .

* **ميكروتوم آدمستون وتايلور** : Adamstone and Taylor

يمثل هذا الميكروتوم تطويرا للميكروتوم السابق حيث قام هذان الباحثان بإيجاد وسيلة للتبريد المستمر للميكروتوم المستخدم وذلك بوضع قطع ثلجية بكميات مناسبة علي حاجز معين فوق سكين التقطيع وكذلك علي جانبي الميكروتوم . وكان الدافع الرئيسي وراء ذلك عزل السكين والميكروتوم ومنطقة التقطيع – بصورة عامة – عن البيئة العملية المحيطة بما قد يكون فيها من حرارة (أكثر من ١٨° مئوية) أو رطوبة مرتفعة تؤثر علي جودة القطاعات الناتجة . وفي هذه الحالة كان يتم دفع القطاعات المجمدة أو الثلجية Frozen Sections من علي سطح سكين التقطيع بواسطة ملعقة معدنية معينة بها فتاة من الثلج حتي منتصفها تقريبا ، ثم وضعها علي شرائح زجاجية بالغة النظافة . وحالما يبدأ الثلج المحيط بالقطاع في الانصهار ، ويأخذ القطاع في التمدد علي الشريحة ، تغمر الشريحة وعليها القطاع في وعاء زجاجى به محلول مثبت أومحلول تفاعلى أو كشفى .

وقد حذر هذان الباحثان من ترك القطاعات حتي تنفرد أو تتمدد أكثر مما يلزم علي الشريحة خاصة إذا كان المطلوب فحص وتوضيح البنيان الأساسي والتراكيب الرئيسية في تلك القطاعات حتي لا يحدث فيها أي تمزق أو اختلال في تلك التراكيب وتفقد ملامحها المميزة.

* **ميكروتوم آدمستون** : Adamstone

لا يكاد هذا الميكروتوم يختلف كثيرا عن الميكروتوم السابق ، إلا أن العالم آدمستون قد أدخل عليه عام ١٩٥١ تطويرا معينا متضمنا استخدام وسيلة معينة تعمل علي سرعة أخذ القطاعات من علي سكاكين التقطيع وغمرها في الحال في المحاليل المطلوبة لتحاشى أي تمزق في أجزائها . وقد أدت هذه الطريقة بالفعل إلي تحسين واضح في الأداء أمكن معه الحصول علي قطاعات أفضل مما سبق .

ملحوظة هامة :

علي الرغم من محاولات ضمان درجات الحرارة والرطوبة المناسبة للميكروتوم والمنطقة المحيطة به ، إلا أن هذه الضمانات لم تكن كافية تماما ، وعلي ذلك كان ينصح دائما

بتخصيص حجرة خاصة أو معمل مناسب تتوفر فيها درجات الحرارة والرطوبة الملائمة أو – كان – ومازال البعض يستخدمون سقفا من السلك الشبكى عليه قطع من الثلج فوق الميكروتوم والشخص الذي يقوم باستخدامه بجانب كتلتين ثلجيتين علي جانبى هذا الشخص . ولا شك أن هذه الطريقة ليست مريحة تماما بالنسبة لمن يستخدمون تلك الطريقة ولذلك استحدث بعض التحويرات التي سيتم استعراضها فيما يلى :

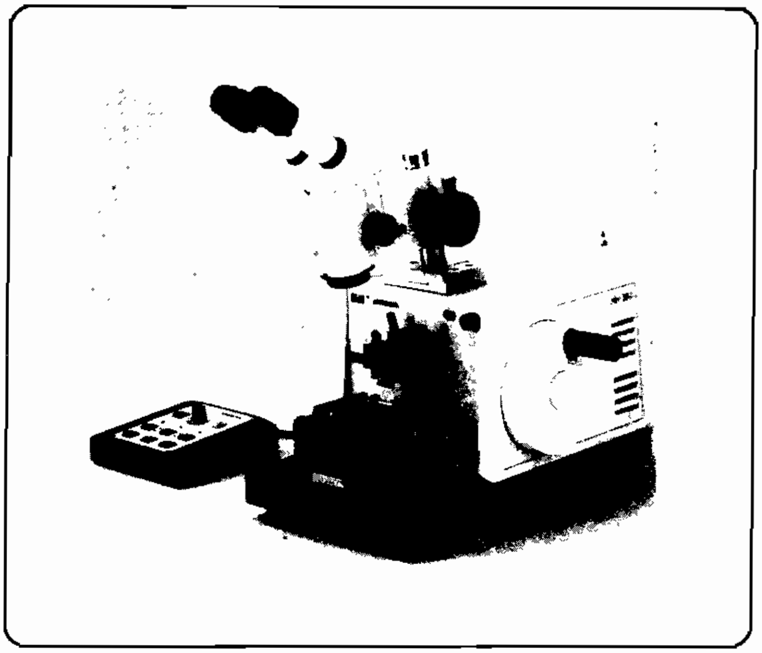
* **ميكروتوم شميزو** : Schimizo

في عام ١٩٥٦ ، قام العالم شميزو بإدخال بعض التطوير علي الوسائل السابقة ، حيث استخدام ميكروتوما انزلاقيا Sliding Microtome ، عمل علي عزله عن البيئة المحيطة عن طريق وضعه في ثلاجة منزلية Domestic refrigerator يتم فيها تبريد سكين الميكروتوم بواسطة وضع كتل من الثلج علي جانبيه – وكان حجم هذه الثلاجة خمسة أقدام تقريبا ، وقد استبدل بابها المعدني بآخر خشبى مزود بفتحتين لكل منهما قفاز (أو كم) من القماش Gloved armholes لإدخال اليدين من خلالهما عند تشغيل الميكروتوم داخل الثلاجة . وكذلك أوجدت في ذلك الباب الخشبى فتحة صغيرة لإدخال أنبوبة توصل غاز ثانى أكسيد الكربون لتجميد العينات . كما تضمن هذا الجهاز توفير إضاءة داخلية من مصدر كهربائي ، كما زود باب الجهاز بنافذة زجاجية صغيرة لمتابعة ما يتم داخله .

وفي هذه الحالة كان يتم إلصاق القطاعات المجمدة الناتجة علي شرائح زجاجية نظيفة داخل الجهاز ، ثم إخراجها بعد ذلك ووضعها في الحال في المحاليل المتطلبة .

ثانيا : أجهزة الكريوستات : Cryostats

يعنى لفظ "كريوستات " أنه جهاز لحفظ درجة البرودة ، وتختلف اجهزة وطريق الكريوستات عن طريقة السكين البارد Cold knife سابقة الذكر – والتي استخدمت منها ميكروتومات لتلك التي وصفت باختصار آنفا – في أن كلا من الميكروتوم وسكين التقطيع والعينات المراد تقطيعها تكون جميعها عند درجة حرارة ثابتة تتراوح بين (-١٢ الي -٢٢° مئوية) وفي هذه الحالة يتم تقطيع تلك العينات وهي مجمدة دون الحاجة إلي إدخال مصادر تبريد خارجية . وفي هذا المجال تم تصميم العديد من أنواع الكريوستات التي مازالت تتطور



ميكروتوم ثلجى
Freezing microtome

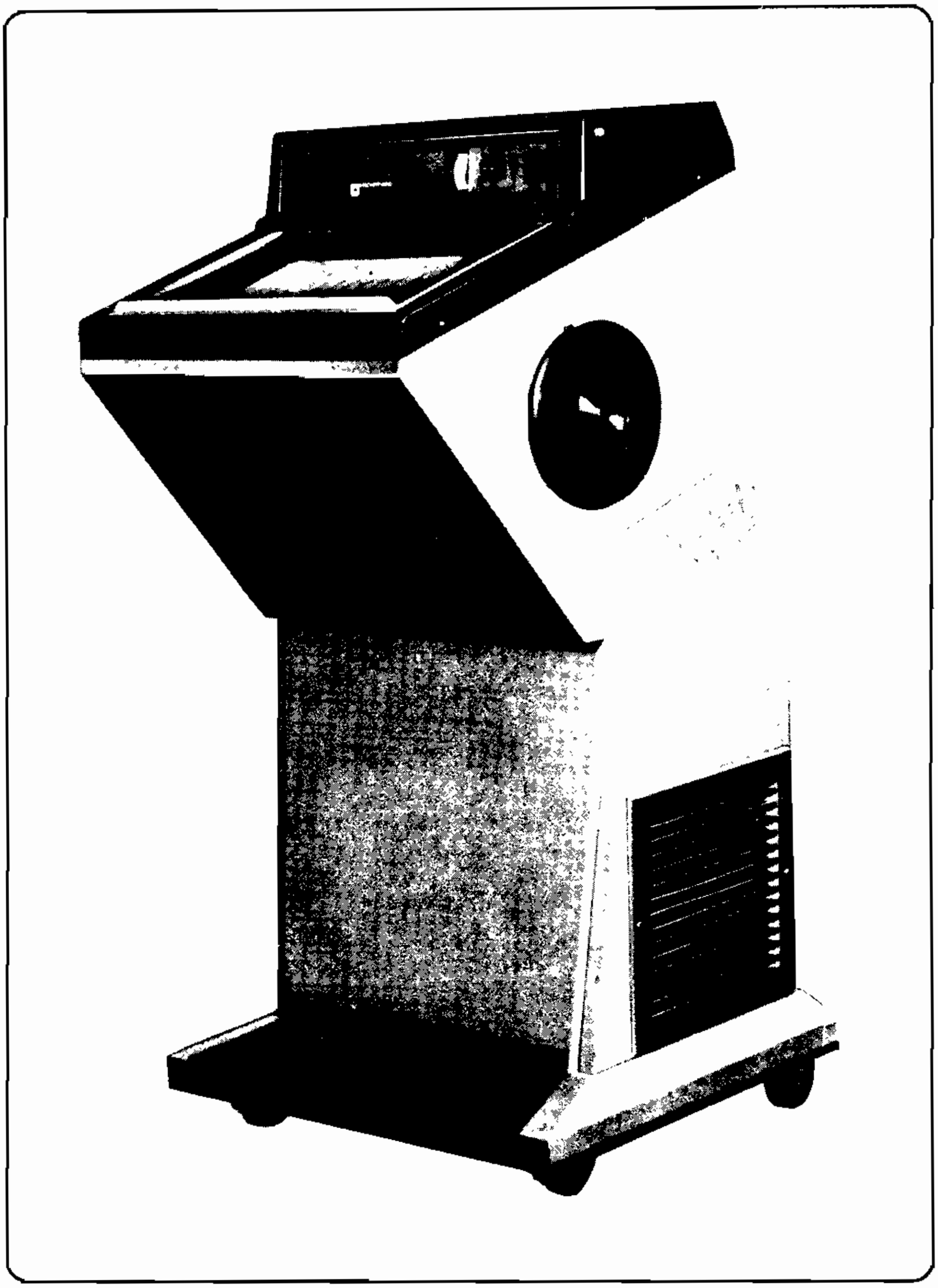
خطوة بعد خطوة حتي وقتنا الحالى ، وفيما يلى نبذة عن بعض الأنواع :

* كريوستات لانج (١٩٤٨) : Lang Cryostat

كان لانج " الدانماركى " أول من صمم أجهزة الكريوستات هذه وذلك بعرض إجراء بعض الدراسات والتجارب في مجال ما كان يسمى " كيمياء الأنسجة الكمية Quantitative histochemistry حيث كان يحصل علي قطاعات مجمدة أو ثلجية للفحص الهستولوجى وأخري للتحليل البيوكيميائي المذكورة .

وفي البداية كان توفير البرودة اللازمة داخل كابينة الكريوستات بواسطة كميات كبيرة من القطع الثلجية المجمدة ، لكنها سرعان ما استبدلت بالانابيب الملتفة المبردة : Refrigerating Coils .

كذلك تم وضع لوح زجاجى صغير امام حافة سكين التقطيع للعمل علي منع التفاف او



أحد أنواع الكريوستات

Cryostat

كرمشة (تجعد) القطاعات الناتجة .

* **كريوستات كونز (١٩٥١) : Coon's Cryostat**

تم انتاج هذا الجهاز علي نطاق واسع في ألمانيا ومازال مستخدما حتى الوقت الحالى خاصة بعد أن استحدثت به تعديلات معينة جعلته جهازا متميزا .

ويحتوي هذا الجهاز علي ميكروتوم من صلب لا يصدأ ، وروعى أن يتم تقليل معدلات الرطوبة الداخلية فيه إلي اقصى حد ممكن لضمان عدم حدوث أي صدأ لهذا الميكروتوم . كما روعى أيضا الحد من فتح واغلاق الكريوستات فيما عدا ما تتطلبه الحالات الضرورية . وعلى ذلك كان يتم إدخال الأيدي لتشغيل الميكروتوم خلال الفتحات القفازية التي سبقت الإشارة اليها سابقا . كذلك تم وضع الميكروتوم بطريقة خاصة تسمح بنزعه من مكانه وإعادته إليه بسهولة ويسر بعد تنظيفه وتجفيفه أو إصلاح أي خلل فيه .

كما احتفظ هذا الجهاز باللوح الزجاجى الصغير الذي يوضع أمام حافة سكين التقطيع لمنع التفاف وتجعد أو كرمشة القطاعات الناتجة .

وبالإضافة إلي ذلك تم تزويد هذا الكريوستات بمسامير محواة خاصة تستخدم في ضبط مدى ارتفاع العينة المراد تقطيعها والمسافة بينها وبين سكين التقطيع وزاوية التقطيع الملائمة .

وفيما يتعلق بمصادر التبريد أو التجميد المستخدمة في هذا الجهاز ، فإن ذلك كان يتم إما عن طريق التبريد الميكانيكي أو بإدخال غاز ثانى اكسيد الكربون من الاسطوانات الخاصة بذلك . وفي معظم الأحوال كان يتم استخدام المصدرين معا في وقت واحد ؛ المصدر الأول لتامين درجة البرودة المتطلبة داخل هذا الجهاز ، والمصدر الثاني لسرعة تثليج وتجميد العينات المراد التعامل معها وإعداد القطاعات منها .

وكانت درجات البرودة في ذلك الجهاز متراوحة بين (-١٤° الى - ١٦° مئوية) يتم ضبطها عن طريق منظم حرارى معين . غير أنه إذا أريد تقطيع العديد من العينات ، فإنه كان يتعين تخفيض درجة الحرارة حتى (-٥م° مئوية) بصفة مستمرة .

ولضمان تقليل معدلات الرطوبة أو منعها داخل الكريوستات كان يتم وضع كيس يحتوي علي " **جيلاتين السيليكا** : Silica jel" لامتصاص الرطوبة علي أن يجري استبداله بين وقت وآخر .

الأنواع الحديثة للكريوستات : Modern Cryostats

لم تعد هذه الأجهزة تنسب في الوقت الحالي إلي مصمميها بعد أن تزايدت أنواعها وكثر تداولها ، وأصبحت تقوم بتصميمها وتطويرها شركات ومؤسسات صناعية علمية منتشرة في العديد من الدول الصناعية المتقدمة . وكانت ملامح التحسين والتطوير في هذه الأجهزة مرتبطة بنواح معينة من أهمها التحكم في درجات البرودة المستخدمة وسرعة تجميد العينات والتقليل - لأقصى حد ممكن - من فتح واغلاق تلك الأجهزة . وفيما يلي بعض امثلة لذلك :

- أصبح تشغيل الميكروتوم يتم عن طريق الاحتفاظ بعجلة (ذراع) تشغيله خارج الكريوستات وبذلك ألغيت الفتحات القفازية تماما .
- يتم التبريد والتجميد داخليا بالتوصيلات الكهربائية المبردة امثلتها في ذلك مثل جهاز " التجميد العميق Deep Freezer " .
- هذا بجانب تواجد الإضاءة الداخلية الكافية واللوح الزجاجي الموضوع أمام سكين التقطيع ، ومسامير ضبط المسافات وارتفاع العينات وغيرها .
- وقد ظلت هذه الأجهزة مجالا واسعا للتحسين والتطوير حتي تم في الوقت الحالى تصنيع كريوستات كامل التشغيل الذاتى تقريبا Automatic Cryostats ، حيث لم يعد الميكروتوم مزودا بأي ذراع للتشغيل . وقد تم تزويد مثل تلك الأجهزة بالعديد من مسامير الضبط ، والتشغيل لتنظيم وتحديد درجات البرودة المتطلبة (والتي تتم كهربائيا داخل الجهاز) وكذلك درجات برودة الكابينة الداخلية وتجميد العينات وأبعاد العينات وزواياها بالنسبة لسكين التقطيع وسمك القطاعات المطلوبة وعددها أيضا .

وفي هذه الحالة يسمح بفتح الكريوستات مرة واحدة عند بدء الحاجة لاستخدامه

واعـداده لذلك . وتوضـع العـينة علي الحـامل "Holder " الخــاص بذلك ثم يغلق الكريوسـتـات . ويتم تحـديد كل العـوامل المتطلبـة عن طريق المسـامـيـر أو الأزرار المذكورة . وحالما تصل درجات البرودة المختلفة إلي المدي المتطلب ويتم تجميد العينة إلي الحد الخاص بذلك ، تتـحـرك سكين التقطيع تلقـائيـا أو ذاتيـا ، ويتـحـرك ذراع داخلي حاملا شريحة زجاجية نظيفة من الشرائح التي تم حفظها في مكان معين داخل هذا الجـهـاز – وبعـد أن يلتـصق القطاع بـهذه الشـريحـة يتـحـرك ذلك الذراع حاملا تلك الشريحة إلي مكان مقابل يتم فيه حفظ هذه الشرائح ثم يعود ذلك الذراع إلي مكانه الأول مرة أخري ليعـود بقطاع آخر يتم تخزينه بنفس الطريقة ، وهكذا حتي يتم الحصول علي العدد المطلوب من القطاعات . وبعد ذلك تتوقف السكين عن التقطيع وتحفظ الشرائح بما عليها من قطاعات في " درج صغير " أو علبة خاصة داخلة الجهاز وتظل في هذا المحيط البارد حتي يتم إخراجها والتعامل معها حسب الأعراض المطلوبة .

الطرق المثلى أو المناسبة لإعداد القطاعات المجمدة :

Optimum conditions for frozen sectioning

في أول دراسة من نوعها قام بها العالمان " تورنبرج ، ومييننجس "Thornburg and Menings" عام ١٩٥٩ فيما يتعلق بتحليل عمليات إعداد القطاعات الثلجية أو المجمدة ذكرا أن الماء يمثل وسط الطمر مقابل الشمع في القطاعات العادية . وعلي ذلك ، فإن التقطيع في تلك القوالب المجمدة (المحتوية علي العينات) هو بمثابة التقطيع في الثلج .

وقد ألمح الباحثان أيضا الي أن درجات الحرارة المثلى أو الأكثر موافقة لكل من سكين التقطيع والكابينة التي يتم فيها التقطيع والنسيج المراد تقطيعه تختلف كلها حسب طبيعة هذا النسيج خاصة حسب طراوته أو قساوته . علي أنها ذكرا أيضا أن عملية التقطيع يمكن أن تتم بدرجة معقولة في حدود مدي واسع من درجات الحرارة المنخفضة .

وفيما يلى نبذة تفصيلية في هذا الخصوص :

درجة حرارة النسيج : Tissue Temperature

كما هو الحال - في كل الميكروتومات الثلجية - عندما تنخفض درجة حرارة الكتلة الثلجية (المحتوية علي النسيج) إلي أقل من - ٤٥°م ، فإن تلك الأنسجة تصبح جافة ، هشة، سهلة التفتت بما يجعلها غير صالحة للتقطيع بينما لوحظ أنه خلال درجات الحرارة التي تتراوح بين - ٤٠° ، - ١٥° مئوية (بالنسبة للنسيج) ، فإن عملية التقطيع تكون عادة سهلة ميسرة . علي أنه قد تحدث بعض المقاومة لعملية التقطيع ، بجانب بعض الكرمشة أو التجاعيد التي تظهر في القطاعات وهي علي سكين التقطيع . فإذا ما رتفعت درجة حرارة النسيج إلي مدي - ٥° م ، فانه يمكن الحصول - غالبًا - علي قطاعات رقيقة متتابعة جيدة .

وبصورة عامة ، فإنه عند توفر درجة حرارة متماثلة بالنسبة لكل من سكين التقطيع والنسيج المراد تقطيعه ، فإن الحصول علي قطاعات جيدة يمكن أن يتم خلال درجات حرارة تتراوح بين - ٣٠° الي - ١٠° مئوية .

درجة حرارة كابينة التقطيع : Chamber Temperature

لوحظ أنه عندما تتروا ح درجات حرارة كابينة التقطيع بين درجة الصفر ، - ١٠° مئوية ، فإن ذلك يعتبر من أفضل ظروف التقطيع . فاذا ما انخفضت درجة الحرارة هذه إلي أقل من ١٠° مئوية فإن نوعية القطاعات الناتجة تبدأ في التدهور . وعلي ذلك فإنه روعي في معظم أنوا ع الكبائن أو الكريوستاتات أن تكون درجة حرارتها الداخلية مضبوطة بصورة عامة عند - ٢٠°م لضمان جودة القطاعات .

تناول القطاعات المجمدة بعد تقطيعها :

Handling of sections after cutting

تعتبر عملية تناول القطاعات الثلجية ، من سطح سكين التقطيع ، من أكثر العمليات دقة. وقد ابتدع البحاث عدة وسائل للقيام بهذه العملية بصورة ملائمة ، فيما يلي نبذة عن أكثرها ملاءمة :

* يتم التقاط القطاعات علي شرائح زجاجية دافئة أو علي الأغطية الزجاجية وغمرها

في الحال في الوسط المطلوب علي أن يكون عند درجة برودة مناسبة . وهذه أصلح الطرق لتوضيح الإنزيمات .

* تنتقل القطاعات مباشرة إلي المحلول التفاعلى Reaction meduim وذلك في حالة دراسة بعض المكونات الكيميائية النسيجية مثل البروتينات وغيرها .

* تجفيف القطاعات المجمدة "Freezing Dryiing" لاستخدامها فيما بعد للتحايل الكيميائية والبيوكيميائية .

الفصـــل الثانى

2

الأسس النظرية للتثبيت الهستوكيميائى

Theoritical basis of histochemical fixation

الفصـــل الثانى

الأسس النظرية للتثبيت الهستوكيميائى

Theoritical basis of histochemical fixation

أغراض التثبيت المستوكيميائي .

عملية تثبيت الخلايا والأنسجة عملية رئيسية لإعدادها للصباغة والفحص الميكروسكوبى. على أنه - بصورة أشمل - فإن هذه العملية تخدم أغراضاً متباينة يمكن تلخيصها فيما يلى :

أولاً : حفظ الأنسجة : Preservation of Tissues

من الأهداف الأساسية لعملية التثبيت حفظ الخلايا والأنسجة فى حالة أقرب ما يكون ، أو طبق الأصل ، لما هو موجود داخل الجسم الحى . وفى نفس الوقت ، فإن المثبت المستخدم يجب ألا يتسبب فى إحداث أية تغيرات فى التركيب الكيميائى أو انماط تواجد المكونات الخلوية والنسيجية .

وتجدر الاشارة هنا إلى أنه حال خروج الأنسجة واستخلاصها من الجسم فإنها تتعرض إلى حالات معينة يتعين اخذها بعين الاعتبار ، منها :

(أ) عند تركها فى الهواء ، فإنها تجف وتتكرمش ، وتحدث فيها تغيرات بكتريولوجية وتحلل ذاتى (وذلك بسبب التفاعلات الكيميائية التى تحدث تحت تأثير إنزيمات محللة معينة متواجدة فى خلايا تلك الأنسجة) والمعروف أن هذه الإنزيمات تؤدى دورها بصورة منتظمة ومنضبطة فى الخلايا داخل الجسم ، ولكن تعرض تلك الخلايا للهواء خارج الجسم يؤدى إلى حدوث ارتفاع غير عادى فى نشاطات تلك الإنزيمات المحللة .

(ب) اذا وضعت تلك الأنسجة فى الماء ، فإنها سرعان ما تنتفخ وتفقد ملامحها

المميزة .

ولكى يتم تحاشى أوجه الاضرار هذه ، فإنه يتعين اتباع ما يلى :

١ – تثبيت الأنسجة بأسرع ما يمكن لمنع عمليات التحلل وغيرها .

٢ – حسن اختيار المثبتات التى تعمل على وقف التفاعلات الكيميائية التى قد تحدث تحت تأثير الإنزيمات المحللة دون أستبعاد تلك الإنزيمات أو القضاء عليها .

٣ – مراعاة ألا يتسبب المثبت المستخدم فى انتفاخ أو كرمشة الخلايا والأنسجة .

ثانياً : منع انتشار أو فقدان المحتويات النسيجية :

Prevention of diffusion or loss of tissue materials

فى بعض الأحيان قد يتسبب المثبت المستخدم فى تغير نمط تواجد المواد الخلوية أو النسيجية أو فقدانها خارج الأنسجة . وهنا تجدر الإشارة إلى ما تحدثه معظم المثبتات فى نمط تواجد الجليوكوجين بصورة متجانسة فى الخلايا ، وبالتحديد الخلايا الكبدية ، حيث تفقد ذلك التواجد المنتظم وتتكتل فى مناطق معينة فى تلك الخلايا ، بينما تبقى بقية المناطق خالية تقريباً من هذه المحتويات ، وهى ظاهرة تطلق عليها " هروب الجليكوجين ، Glycogen Flight " وهذه بالطبع صورة زائفة أو غير حقيقية تخالف ما هو موجود أصلاً داخل الخلايا الأصلية ، ويمكن تحاشى حدوث هذه الحالة غير العادية – ولو إلى حد ما – عن طريق استخدام قطاعات ثلجية مجففة يتم تثبيتها بواسطة بخار الفورمالين ، كما وجد أيضاً أن تعريض القطاعات النسيجية – لفترة قليلة – إلى محلول مخفف من حامض الأوزميك Osmic acid قبل التثبيت بالمثبتات العادية ، قد يؤدى إلى تقليل مدى ظاهرة هروب الجليكوجين هذه .

كما أنه قد يكون المطلوب فى بعض الأحيان تحويل المكونات الخلوية إلى مركبات غير ذائبة لا تتأثر بالمحاليل الأخرى . وعندئذ يصبح من المتيسر صباغتها وتوضيحها داخل الخلايا والأنسجة . وعلى ذلك فإن اختيار المثبت المستخدم له أهميته القصوى فى تلك الحالات ، مثال ذلك ، إذا أريد الحفاظ على الدهون أو الليبيدات بصورة عامة ، فإنه يتعين استخدام مثبتات الفورمالين (الفورمالديهيد) أو مثبت " فلمنج بدون حامض الجليك – Flemming without acetic acid" أو محلول " ريجود – Regaud's solution أو محلول "

أوياما Aoyama " .

أما إذا استخدمت مثبتات محتوية على الكحول ، فإن ذلك سيؤدى إلى استخلاص الليبيدات من الخلايا .

ثالثاً : تخلل المثبت فى الأنسجة : Penetration of the fixatives

تختلف المثبتات عن بعضها فى قدرتها على اختراق الأنسجة وتخللها ، كما أن ذلك يتوقف أيضاً على أنواع الانسجة المراد تثبيتها ، وهناك مثبتات معينة معروفة بسرعة تخللها للأنسجة بصورة عامة ، وذلك مثل الفورمالين بالمقارنة بمثبتات أخرى ، مثل محلول " بوان " الذى يعرف بأنه بطىء التخلل وأبطأ منه مثبت " حامض الأوزميك " . وبصورة عامة ، فإن المثبت الجيد هو الذى يتخلل الأنسجة بصورة سريعة حتى يعمل على وقف عمليات التحلل الذاتى التى قد تحدث داخل الخلايا والانسجة فى حالة بطء المثبت فى تخللها .

رابعاً : مناسبة المثبتات للمراحل التالية لاعداد العينات :

Preparation of material for the successive treatments

المفروض أنه بعد تثبيت الأنسجة ، تتبع الخطوات المناسبة لإعدادها كتحضيرات شمعية أو مجمدة . فى الحالة الأولى ، تتعرض الأنسجة لمعاملتها بمواد تتسبب فى فقدان بعض محتويات هذه الأنسجة أو انسيابها خارج الخلايا ، كما يحدث فى الحالة الثانية . وعلى ذلك فإنه يتعين الحرص فى استخدام المثبت المناسب فى تلك الحالات والذى يعمل على حفظ تلك المحتويات داخل الخلايا .

ومثال ذلك استخدام مثبتات الفورمالين قبل تقطيع الأنسجة المجمدة لتوضيح الجسيمات المعروفة باسم"الليزوسومات dysosomes " الغنية بالإنزيمات .

خامسا : تقسية الانسجة في التحضيرات الشمعية :

Hardening of paraffin specimens

من فوائد التثبيت تقسية الأنسجة أو جعلها صلبة متماسكة ، قبل تعرضها لخطوات الإعداد التالية ، بحيث يسهل تناول تلك الأنسجة خاصة ما كان منها سهل التفتت ، على أنه

يراعى أن إطالة مدة التثبيت تتسبب عادة فى زيادة تقسية أو جفاف العينات مما يجعل من الصعب تقطيعها .

سادساً : تأثير التثبيت والمثبتات على عمليات الصباغة :

Influence of fixation and fixatives on the staining procedures

من النواحى الهامة التى يجب أخذها فى المقام الأول عند اختيار المثبت المناسب هو نوع الصباغة أو التفاعل الذى سوف تتعرض لها تلك الأنسجة المثبتة فيما بعد . فمثلا ، إذا كانت العينة فى سبيل إعدادها لتوضيح الجليكوجين مثلا ، فإن أفضل المثبتات عندئذ هى محلول " بوان " أو محلول " جندر " "Bouin " or " Gendre " solutions .

بينما لا يصلح محلول " بوان " هذا نفسه عندما يكون المطلوب معاملة هذه الأنسجة بتفاعل " فويلجين " Feulgen reaction " لتوضيح حامض دى أكسى ريبونيوكليك "DNA " (ح د ن) ، وذلك لأن محلول بوان سيعمل على رفع معدلات التحلل المائى فى الأنسجة إلى أكثر مما هو متطلب ، وعلى ذلك فإن الأمر يتطلب أحياناً استخدام الصبغات المطلوبة ، وهى تعمل على إيجاد ترابط وثيق بين المادة الصبغية والتراكيب المراد صباغتها . على سبيل المثال ، فإن استخدام الزئبق يرفع من كفاءة الأنسجة على الصباغة بصبغات " الكروم الثلاثية " Trichrome Stains .

سابعاً : تجميد القطاعات النسيجية بدلاً من تثبيتها :

Hardening of tissue sections instead op their fixation

يتطلب الأمر فى حالة إعداد بعض التحضيرات الهستوكيميائية تجميد الأنسجة بمجرد استخلاصها من الجسم وذلك للمحافظة على كل محتوياتها الكيميائية وتسهيل تقطيعها فى الوقت المناسب .

المثبتات الهستوكيميائية

Histochemical Fixatives

يتناول الجزء التالى نبذة عامة عن بعض المثبتات الرئيسية التى يوصى باستخدامها فى إعداد بعض التحضيرات الهستوكيميائية .

الفورمـــالين : Formalin

هو محلول من غاز الفورمالديهيد Formaldehyde مذاباً فى الماء ، بنسبة ٤٠ ٪ . وقد يستخدم محلول الفورمالين بصورة منفردة أو يدخل فى تركيب بعض المثبتات المركبة ، والمعروف أن نسبة التركيز المذكورة تمثل التركيز المطلق فى هذه الحالة ، أى ١٠٠ ٪ . وعلى ذلك ، إذا أريد الحصول على تركيز مقداره ١٠ ٪ ، فإنه يؤخذ مقدار خمسة وعشرون جزاء من هذا المحلول المركز ويضاف له خمسة وسبعون من الماء المقطر .

طبيـعة الفورمـالين :

المعروف أن محاليل الفورمالين حمضية التفاعل وذلك بسبب تكوين حامض الفورميك "Formic Acid " بها . وفى حالة الأغراض الهستوكيميائية تستخدم محاليل منظمة " Buffer solution " مثل محلول فوسفات الصوديوم أو عن طريق وضع كمية من مسحوق الطباشير أو كربونات الكالسيوم فى الزجاجة المحتوية على الفورمالين ، على أن يتم ترشيح هذا المحلول قبيل الإستعمال ، على أنه يلاحظ أن إطالة مدة التثبيت فى الفورمالين تؤدى إلى تكون مواد صبغية من الفورمالين تجعل من الصعب صباغة التحضيرات بعد ذلك بصبغات حمضية معينة مثل صبغ الايوسين .

وبصورة عامة ، فإن الفورمالين يستخدم عادة بتركيزات مختلفة تتراوح بين ١٠ - ٤٠ ٪، بجانب استخدام بخار الفورمالين فقط فى تثبيت بعض العينات الهستوكيميائية .

استخدامات الفورمالين :

يعتبر الفورمالين من أفضل المثبات بالنسبة لتوضيح الليبيدات ، وذلك لأن تلك المواد

لاتحدث فيها تغيرات ملموسة تحت تأثير الفورمالين .

وعند إضافة الكالسيوم للفورمالين فإنه يصبح مثبتاً جيداً للفسفوليبيدات (الليبيدات الفسفورية) . كذلك فإنه عند استخدام الفورمالين ومعه الكالسيوم أيضاً - بما يسمى "فورمالين - كالسيوم " Formol calcuim فإنه يعمل على الحفاظ بصورة كبيرة على الإنزيمات المحللة المائية Hydrolytic engyan خاصة عند hستخدامها تحت درجة ٤ مئوية . على أنه يراعى فى تلك الحالات عدم إطالة فترة التثبيت أو التثبيت عند درجة الحرارة العادية لأن ذلك سيقلل من معدلات النشاطات الإنزيمية .

كذلك ، فإن استخدام الفورمالين لتثبيت التحضيرات المجمدة الجافة ، فإنه يعطى نتائج متميزة فى التحضيرات الهستوكيميائية خاصة بالنسبة للجيلكوجين والمواد المخاطية والبروتينات والأحماض النووية .

تفاعلات الفورمالين :

تفاعلات الفورمالين عديدة ومعقدة وذلك لأنه يتفاعل مع العديد من البروتينات التى يتم ترسيبها فى الخلايا والأنسجة . وبعض هذه التفاعلات انعكاسية والبعض الاخر ليس كذلك ، وتحدث الحالات الأولى نتيجة الغسيل بالماء .

ولعل أهم تفاعلات الفورمالين هى التى تتضمن تحويل المركبات الى تحتوى على ذة هيدروجين تفاعلية الى مركب هيدروكسيلى .

(مجموعة ميثيلول $CH_2 . OH$)

$$RH + CH_2O \rightleftharpoons R.\,CH_2\,(OH)$$

وبالمثل ، فإن مجموعة الهيدروكسيل هى مجموعة تفاعلية أيضاً ، تتحد مع ذرة هيدروجين لتكون قنطرة أو وصلة ميثيلينية (CH_2) تعمل على ربط الجزئيات البروتينية .

$$R.\,CH_2\,(OH) + HR \rightleftharpoons R - CH_2 - R + H_2O$$

وهذه الوصلات الميثيلينية قابلة للتمزق بواسطة التحلل المائى ، وقد تكون وصلة

ميثيلينية بين مجموعتين متشابهتين ، مثل مجموعة امينية (NH_2) أو بين مجموعة أمينية ومجموعة "ببتيديد " ثنائى الببتيد (CONH) أو بين (NH_2) ومجموعة (NH) .

والمعروف أن الفورمالين يتحد – فى وسط يتراوح أسه الهيدروجينى بين ٦ – ٨ مع الكرباتين ، وهو البروتين الأساسى فى الجلد والشعر دون التأثير فى ارتباط ذرتى الكبريت (S-S) فى " السيستين Cystine " وعند وجود وسط أكثر قاعدية ، فإنه يعمل على اختزال مجموعة (S-S) الى مجموعتى كبرتيد هيدروجينى (SH) ، ويؤدى ذلك إلى تفاعله على هذه المجموعات مكونا وصلة ميثيلينية فى بعض الحالات : ($8 - CH_2 - S$) وذلك مكان الارتباط أو الوصلة بين ثنائى الكبريتيد (Disulphide link) .

وتعتبر المجموعات التى تدخل – بصورة خاصة – فى تثبيت البروتينات هى : الببتيدات والهيدروكسيل والكاربوكسيل كذلك والمجموعات المحتوية على الكبريت .

وبالنسبة للفورمالين الذى يظل مرتبطاً بالبروتينات بعد عملية التثبيت ، فإنه يمكن استخلاصه بالغسيل بالماء الجارى لفترة قد تصل إلى ٢٤ ساعة ، إلا أنه على الرغم من ذلك ، فإن نسبة معينة من الفورمالين تظل موجودة فى تلك الأنسجة المثبتة . وعلى ذلك يتعين غسل القطاعات جيداً بالماء المقطر لإزالة ذلك الفورمالين الذى قد يكون عائقاً فى العمليات السائدة.

مجالات أخرى لاستخدامات الفورمالين :

يرجع التعرف على خصائص الفورمالين فى حفظ المواد وتثبيتها إلى وقت مبكر عندما استخدم فى صناعة ودباغة الصوف حيث يعتبر الكولاجين والريتيكيولين من أهم مكونات الصوف . وقد أجرى الكثير من الدراسات على الفورمالين تحت ظروف هستولوجية متباينة ، على سبيل المثال ، عند معدلات مختلفة من الأس الهيدروجينى تتراوح بين ٤ – ١٠ ، وعند درجات متباينة . وقد وجد أن كمية الفورمالين التى تظل مرتبطة بالعديد من البروتينات تتناقص بشدة فى حالة ارتفاع الأس الهيدروجينى إلى معدل أعلى من ١٠ .

كما أن الفورمالين يستخدم فى الأغراض الهستولوجية والهستوكيميائية فى محاليل عازلة أو فوق نقطة التعادل ويعمل ذلك على تقوية تأثير الفورمالين . ويمكن أن يعزى ذلك إلى

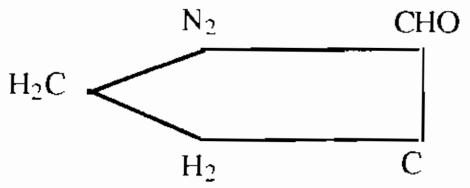
أن التركيب المتماسك للفورمالين يوجد فى الماء بصورة متميئة مثل حالة " ميثيلين جليكول $(OH)_2$ (CH_2) الذى يعتبر مثبتا بالغ التأثير . ويستدل من تلك المشاهدات فى مجالات الدراسات الخلوية والهستوكيميائية ان معاملة البروتينات بالفورمالين ، والتى يعقبها الغسيل بالماء ، فانه يعمل على جعل معظم المواد النشطة فى حالة أكثر قابلية للتفاعل على أية مادة تفاعلية .

والخلاصـــة :

إن تفاعلات الفورمالين بالغة التعدد والتعقيد ، لأنه يمكن أن يرتبط بالعديد من المجموعات الكيميائية حيث يعمل على إيجاد وصلات أو روابط بين هذه المجموعات ، وهذا مايقلل من كفاءة الفورمالين كمحلول أو مثبت يعمل على تركيز أو تكدس المواد فى الخلايا على الخلية ، أما المجموعات الملائمة ، فانها تشتمل على المجموعات الأمينية والبيتيدات والهيدروبسيلات والكابوكسيلات والمجموعات الكبريتيدية والهيدروجينية والحلقات الاروماتية .

الجلوتارالديهيد : Glutaraldehyde

الجلوتارالديهيد رمزه الكيميائى CHO . CHO $(CH_2)_3$) ويمثل نمطه التركيبى كما يلى :



ويعتبر من أفضل المثبتات بالنسب لتحضيرات الميكروسكوب الالكترونى وذلك لأن هذه المادة تعمل على الحفاظ على التركيب العام للخلايا والأنسجة مع عدم فقدان أية كمية ملموسة من الإنزيمات ، وذلك على شريطة عدم اطالة مدة التثبيت فى هذه المادة . كما وجد أنه يعطى أفضل النتائج فى حالة إنزيمات الفسفاتيز والاستيريز بصورة خاصة .

الأســيتون : Acetone

يستخدم الأسيتون أحياناً فى بعض التحضيرات الهستوكيميائية فى القطاعات المجمدة

وذلك عند درجات حرارة تتراوح بين صفر الى - ٤° مئوية ، وكذلك فى القطاعات الشمعية المتطلبة لتوضيح نشاطات الإنزيمات المحللة المائية .

والأسيتون سريع المفعول كمثبت ولكنه يتسبب فى تجعيد أو كرمشة القطاعات وهذا يجعل استخدامه محدوداً جداً .

الكحـــول : Alcohol

يعتبر الكحول أفضل نسبياً من الاسيتون فى الأغراض الهستوكيميائية بالنسبة للقطاعات المجمدة وذلك لتعيين نشاطات الانزيمات حيث لوحظ أنها لا تتأثر عندما يستخدم تحت درجة ٤ م فيما عدا الاستيريز .

كذلك يستخدم الكحول عند تركيز ٨٠ ٪ لتوضح الجليكوجين ، وإن كان لا يحافظ على البنيان العام للخلايا والأنسجة . على أنه عند استخدامه فى المثبتات المركبة يرفع من كفاءة تلك المثبتات خاصة بالنسبة للبروتينات ، لكنه يتسبب فى استخلاص الليبيدات ، كما أنه يجعل من الصعب تجميد الأنسجة واعداد القطاعات الثلجية منها .

كذلك فإنه من عيوب الكحول أيضاً إتلاف الميتوكوندوريا وجهاز جولجى والحبيبات الأفرازية وإذابة المواد الدهنية ، ولكنه - كما سبق القول - مفيد جداً فى تواجده فى بعض المثبتات مثل محلول (كحول - فورمالين - حامض الخليك) : (AAF) وكارنوى وجندر وغيرها .

والمعروف بصورة عامة أن كلا من الكحول والأسيتون يستخدمان بكفاءة فى ترسيب البروتينات ، كما أن لهما فاعلية واضحة فى مجال دراسة الإنزيمات هستوكيميائياً ، وعلى الرغم مما ينجم عن استخدامهما من تغيرات موروفلوجية فى اشكال الخلايا والأنسجة إلا انهما لا ينقصان من فاعلية مثل تلك الإنزيمات . إلا أنه يجب ملاحظة أن تأثيرات هاتين المادتين انعكاسية ، ومن الممكن أن تستعيد البروتينات خصائصها الاساسية عن تلك المواد .

حامض الاوزميك : Osmic Acid

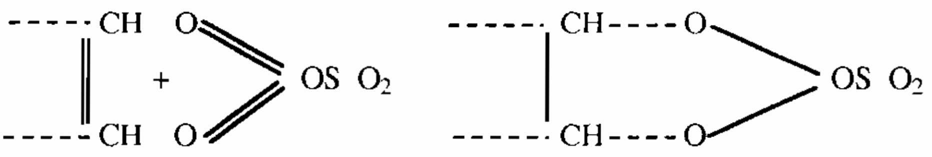
ويعرف أيضاً بأسم **رباعى اكسيد الأوزميوم** smiom tetraoxide OsO_4

وهو يشكل مثبتا مانعاً للتجلط ، وهو مفيد جداً فى تثبيت التراكيب المحتوية على

الليبيدات ، كما أنه متطلب بصورة أساسية فى تحضيرات الميكروسكوب الإلكترونى حيث يستخدم بتركيز ١ ٪ فى محلول منظم ، وعندئذ يعمل على بقاء الدهون فى حالة غير ذائبة . وعلم الرغم من تلك الأهمية ، بجانب تميزه فى حفظ بعض التراكيب الخلوية مثل الميتوكندريا وجهاز جولجى ، الا أنه يعيبه بطء تخلله للخلايا والأنسجة . وإذا ما تركت فيه العينات فترة طويلة فإنها تصبح جافة هشة سهلة التفتت ، وإذا تركت لفترة قصيرة ، فإن الأجزاء الداخلية من تلك العينات تبقى غير مثبتة . ولذلك يتعين أخذ هذه النواحى فى الاعتبار عند استخدامه فى التثبيت ومراعاة الفترات الملائمة بالنسبة لأنواع العينات المختلفة بجانب تأثيراته الضارة على حاستى الشم والبصر نظراً لأبخرته المتصاعدة ، بجانب أنه مادة سامة الى حد كبير ، مما يستوجب الحرص التام أثناء التعامل معه .

تأثيرات حامض الأوزميك :

فيما يتعلق بهذه النواحى ، فقد افترض أن الدهون غير المشبعة Unsuturated Fats يمكن أن تختزل حامض الأوزميك (رباعى اكسيد الأوزميوم) حيث تنتج عن ذلك مركبات سوداء اللون تحتوى على عنصر الأوزميوم أو هيدروكسيد الأوزميوم ، كما أفترض أيضاً أن ذلك يحدث نتيجة أكسدة الروابط المزدوجة بين ذرات الكربون المتجاورة .



وقد لوحظ أن محلول حامض الأوزميك (٢٪) يكون مادة جيلاتينية مع الالبومين والتيبرينوجين .

حامض البكريك : Picric Acid

يعتبر حامض البكريك من أهم المثبات وأكثرها انتشارا، وهو يعمل على تثبيت العينات بصورة جيدة مع تقسيمها وعدم حدوث كرمشة فيها وهو يستعمل عادة فى المثبتات المركبة مثل محاليل "بوان" و "جندر" ويوصى باستخدامه (فى المثبتات المركبة) للحفاظ على الجليكوجين بصورة خاصة ، كما أنه يعمل ايضا على ترسيب البروتينات والاتحاد مع

بعضها.

على أنه يتعين عند استخدام مثبتات حامض البكريك ، فإنه يتعين العمل على إزالة بلونه الأصفر من العينات بعد تثبيتها ، وذلك لأن بقاء الزائد منه فى العينات يعوق عملية التقطيع ويحدث نوعاً من الجذب الكهربائى بين القطاعات و الميكروتوم وسكين التقطيع .

المثبتات المحتوية على الزئبق : Mercury - containing fixatives

تستخدم هذه المثبات بصورة خاصة فى العديد من الاغراض الهستوكيميائية والمعروف أن محلول "كلوريد الزئبق " Mercurie Cloride ، وهو الذى يستعمل فى المثبتات المركبة ، بطىء النفاذية . ولذا يتعين إعداد قطع صغيرة وغير سميكة من العينات لتثبيتها بصورة جيدة ، على أنه لا يصلح لتثبيت الجليكوجين .

وتسبب هذه المثبتات انكماشا فى الأنسجة المثبتة ، وذلك بسبب عدم استخدام املاح الزئبق منفردة فى عمليات التثبيت ، ولكنها تدخل ضمن مكونات المثبتات المركبة على الفورمالين أو حامض الخليك على سبيل المثال .

ويعيب هذه المثبتات أنه تتخلف عنها ترسيبات لعنصر الزئبق ، ولذلك يجب معاملة العينات بعد ذلك فى محلول مخفف من ايوديد البوتاسيوم Potassium iodide الذى يجب أن يزال بدوره فى محلول "ثيوكبريتات الصوديوم أو الهيبو "Soduim thiosulphate or hypo" ثم الغسيل الجيد بالماء المقطر"

الكرومــيوم : Chromium

تكمن أهمية محاليل الكروميوم فى قدرتها على الاتحاد بالماء مكونة مركبات معينة تتحد بدورها مع الرويتنات مثل تلك التى تنتج تحت تأثير الفورمالين .

ويعتمد تأثير الكروميوم – إلى حد كبير – على تركيز الأس الهيدروجينى للمثبت . فعلى سبيل المثال ، عندما يقع هذا التركيز بين ١ –٤ ، فان ذلك يعطى نتيجة جيدة مع الكولاجين. وبصورة عامة ، فانه يتعين ضبط هذا الأس بحيث لا يتجاوز ٩ر٢ فى حالة استخدام مثل هذه المثبتات فى الاغراض السيتولوجية و الهستوكيمائية ، وعلى أية حال فانه يوصى باستخدامها لكل من الجيلكوجين و الليبيدات والأحماض النووية و الميتوكندريا .

الفصــــل الثالث

3

المكونات الهستوكيميائية الأساسية

المـــــواد الكربوهـيدراتيــة

CARBOHYDRATES

الفصـــل الثالث

المكونات الهستوكيميائية الأساسية

المـــــــواد الكربوهـيدراتيـــة

CARBOHYDRATES

الكربوهيدراتات مواد عضوية تتكون بصورة أساسية من العناصر (C كـربون – H هيدروچين – O أكسچين) حـيث يوجد العنصـــران الأخيران بنسـبة وجودهـــما في الماء وهي : ١:٢($C_6H_{12}O_6$) . وهذه المركبات تتكون في الخلايا والأنسجة النباتية من مصادرها الطبـيـعـيـة ، وهي ثاني اكـسـيـد الكربون و الماء عن طريق عـمليـة التـمـثـيل الضـوئي Photosynthesis في وجود الضوء و البلاستيدات الخضراء المحتوية على الكلوروفيل . وبذلك تنتج بعض المواد الكربوهيدراتية مثل النشا ، ويحصل الحيوان على هذه المواد بصفة رئيسية عن طريق اغتذائه على هذه النباتات .

وتعرف الكربوهيدراتات كيميائيا بأنها مشتقات الديهيدية أو كيتونية من الكحولات عالية أو متعددة الهيدروكسيلات (أكثر من وحدة هيدروكسيل) وذلك يعني أن هذه المركبات تعطي هذه المشتقات عند تحللها .

ولكي يتمكن الجسم من الإفادة من هذه المواد ، فإنه يتعين هضمها أو تحللها مائيا في القناة الهضمية متحولة إلى مواد بسيطة سهلة ذائبة مثل الجلوكوز والفركتوز يحملها الدم إلى أجزاء الجسم المختلفة .

وتعتبر المواد الكربوهيدراتية المصدر الرئيسي للحصول على الطاقة الحرارية حيث تتولد طاقة حرارية مقدارها ٤.٢ – ٤.٣ كيلو كالوري نتيجة احتراق أو اكسدة جرام واحد من هذه المواد ، هذا بجانب أهميتها في بعض الحالات وذلك مثل السكر الخماسي "ريبوز Ribose " الذي يعتبر مكونا أساسيا في الأحماض النووية و الجالاكتوز في الدهون و اللاكتوز في اللبن .

تصنيف المواد الكربوهيدراتية :

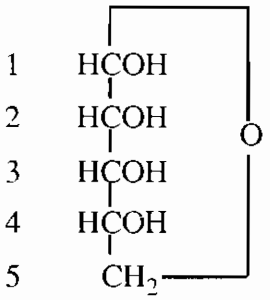
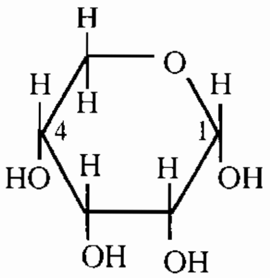
تشتمل المواد الكربوهيدراتية بصورة عامة على ثلاثة أنواع رئيسية ، هى : **وحيدة التسكر:** monosaccharides - **ثنائية التسكر:** disaccharides **وعديدة التسكر:** polysaccharides . ويطلق عادة على النوعين الأول و الثانى " السكريات Sugars وذلك نظرا لحلاوة طعمها . وهى تتميز بأنها قابلة للذوبان فى الماء و الكحول مكونة محاليل رائقة شفافة لها القدرة على النفاذ خلال الأغشية الخلوية . أما المواد عديدة التسكر ، فإنها لاتذوب فى الماء ولا فى الكحول ، وتكون مواد غروية عند وضعها فى الماء وليست لها القدرة على الانتشار خلال الأغشية شبه المنفذة مثل الأغشية الخلوية . أما المواد عديدة التسكر ، فإنها لاتذوب فى الكحول ، وتكون موادا غروية عند وضعها فى الماء وليست لها قدرة على الانتشار خلال الأغشية المنفذة مثل الأغشية الحلوية . وفيما يلى نبذة عامة عن كل من هذه المجموعات الثلاث :

السكريات الأحادية (وحيدة التسكر) : Monosaccharides

وهى أبسط أنواع المواد الكربوهيدراتية ، وهى لا تتحلل إلى أبسط من ذلك ، وتركيبها العام : $C_n (H_2 O)n$. إلا أنه يمكن تصنيفها بدورها إلى بعض الأنواع حسب عدد ذرات الكربون الموجودة بها ، وكذلك إلى " الدوزات Aldoses" أو " كيتونات Ketones " حسب احتوائها على أى من النوعين . على أن أهم هذه الأنواع ، هى :

السكريات الأحادية الثلاثية trioses $(C_3 H_6 O_3)$ والخماسية pentoses $(C_5 Hm O_5)$ والسداسية hexoses $(C_6 H_{12} O_6)$

ويعتبر النوعان الاخران أكثر هذه الأنواع تواجدا و انتشارا فى الخلايا و الأنسجة الحيوانية ، وقد تكون متحدة مع البروتينات أوالليبيدات . وتوجد الأنواع الخماسية - على وجه التحديد - ضمن المكونات الأساسية للأحماض النووية الموجودة بصورة رئيسية فى المواد الكروماتينية والكروموسومات . ويوجد منها نوعان ، هما : سكر

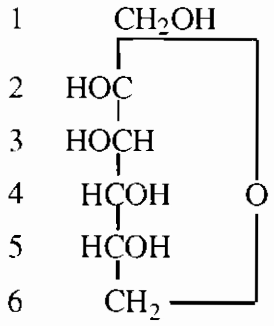
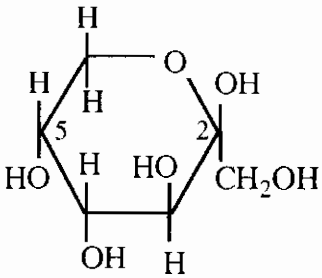



السكر الخماسى (ريبوز) Ribose Sugar

ريبوز (ribose sugar, $C_5 H_{10} O_5$) وهو ضمن المكونات الرئيسية لحامض ريبونيوكليك (ح ن ر) (Ribonucleic acid "RNA") (acid RNA) . أما النوع الثانى فهو سكر ريبوز ناقص ذرة الأكسچين أو دى اكسى ريبوز : (deoxyrbose sugar C_5 $H_{10} O_4$) وهو - كما هو واضح - تنقصه ذرة من الأكسچين بالنسبة للسكر الخماسى النموذجى ، وهو أحد مكونات الحامض النووى الآخر " دى أكسى ريبونيوكليك (ح د ن) (Deoxyribonudeic acid DNA) .

أما السكريات السداسية ، فأنواعها الرئيسية ، هى :

الجلوكوز Glucose ، وهو سكر العنب - سكر جالاكتوز Calactose المعروف باسم سكر اللبن الأحادى وسكر فركتوز Fractose وهو سكر الفاكهة .

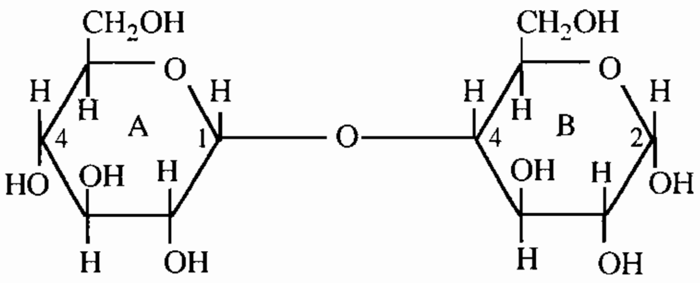



السكريات الثنائية : Disaccharides

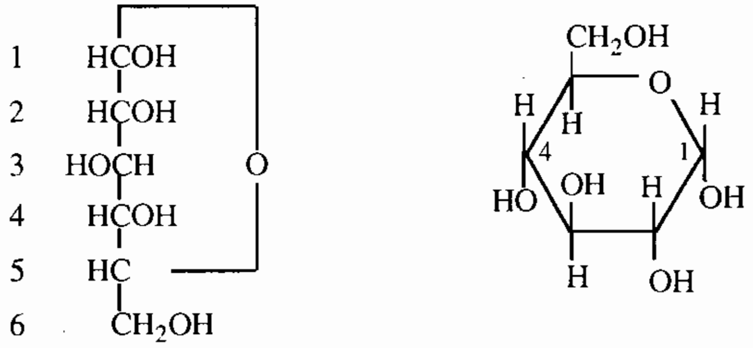
رمزها الكيميائي : ($C_{12} H_{22} O_{11}$) ، وهي تتكون نتيجة اتحاد اثنين من جزئيات أحادية التسكر مع فقدان جزيء من الماء . وبالمثل ، فإن أي جزيء منها - عندما يتم هضمه أو تحلله مائيا يعطي جزيئين أحاديي التسكر وذلك مع اكتساب جزيء من الماء . والمعروف أن هاتين العمليتين الانعكاسيتين تحدثان تحت تأثير إنزيمات متخصصة معينة تعمل على البناء synthesis في الحالة الأولى والتحلل المائي :hydrolysis في الحالة الثانية .

$$2C_6 H_{12} O_6 \underset{+H20}{\overset{-H2O}{\rightleftharpoons}} C_{21}H_{22}O_{11}$$

ومن أهم هذه الأنواع :

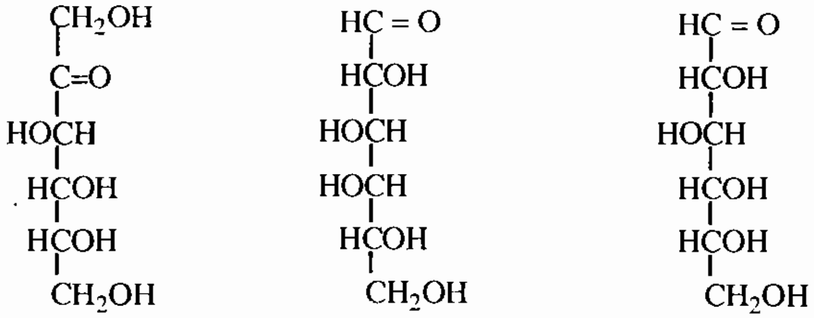


النمط العام لتكوين سكر ثنائي من سكرين أحاديين

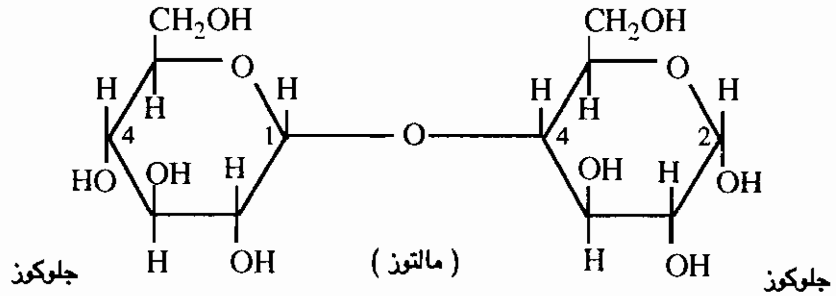


الجلوكوز (جلوكوبيرانوز) Glucose (gluco pyranose)

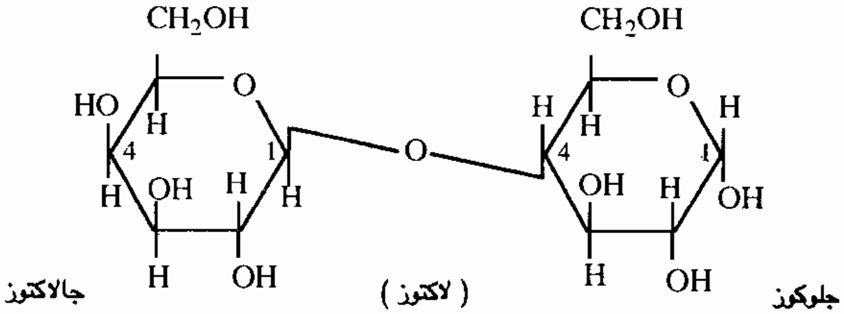
Fructose الفركــتوز



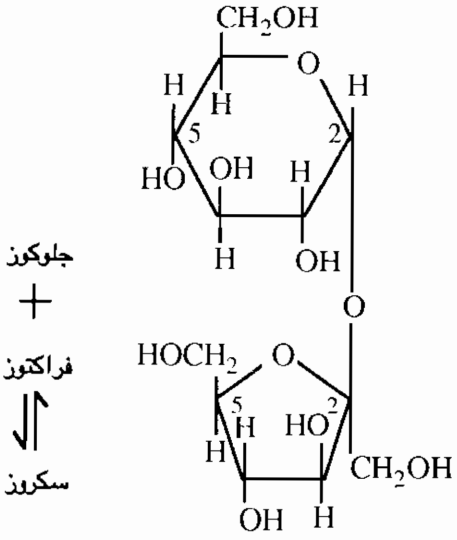
الفركتوز Fructose | الجالاكتوز Galactose | الجلوكوز Glucose



Maltosa ⇌ glucose + glucose مالتوز (سكر الشعير)



Lactose ⇌ glucose + galactose لاكتوز (سكر اللبن الثنائى)



سكروز (سكر القصب) $\text{Sucrose} \rightleftharpoons \text{glucose} + \text{fructose}$

عـديدات التسـكر : Polysaccharides

تتكون هذه المواد نتيجة تكدس أعداد من الجزيئات وحيدة التسكر مع فقدان أعداد مساوية لها من جزئيات الماء :

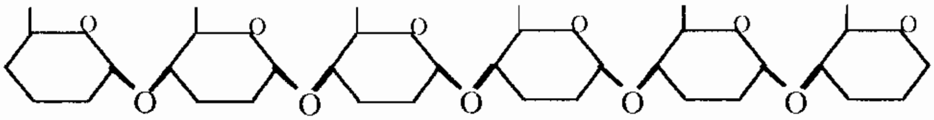
$$n\ C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{-n\ H_2O} (C_6H_{10}O_5)\ n$$

ومن أهم هذه المركبات : النشا فى النبات والجليكوجين فى الحيوان ، بجانب بعض الأنواع الأخرى ، وفيما يلى نبذة عنها :

النشـــا : Starch

ويمثل المواد الكربوهيدراتية المختزنة فى الخلايا والأنسجة النباتية ، وهو ينشأ بصورة أساسية نتيجة اتحاد ثانى أكسيد الكربون والماء مع وجود مادة الكلوروفيل الخضراء وتوفر الضـوء ، ويسـبق ذلك تكوين النشـا تكوين سـلاسل كـربوهيـدراتيـة أبسط تركـيـبـا ، هى جلوكوسيدات الفا α – glucosides . وعند التـحلل المائى للنشـا ، فـإنه يعطى جـزيئـات جلوكوزان glucosan .

ويتم الكشف عن النشا بواسطة محلول الأيودين حيث يظهر لون أزرق فى تلك الحالات.



النشا (مثال لتكوين المواد عديدات التسكر)

الإنيـــولين : Inulin

وهو نوع من النشا يكون مختزنا فى درنات وجذور بعض النباتات مثل : **الداليا** dahlia وتتحلل هذه المادة إلى الفركتوز ، ولكن يطلق عليه بالتحديد أيضا فركتوزان Fructosan . ولا ينتج من هذه المادة أى لون مع الأيودين . نيولين يذوب فى الماء الدافىء وهو يستخدم بكثرة لتحديد معدل الرشح فى الكلى .

الدكســترين : Dextrin

تتكون هذه المواد نتيجة التحلل المائى للنشا كمرحلة وسيطة فى هضم النشا . وتعطى هذه المركبات لونا أحمرا مع محلول الأيودين .

الســليلوز : Cellulose

تتكون هذه المواد الكربوهيدراتية من وحدات جليكوسيدات بيتا B- glucosides وهى إحدى المكونات الرئيسية لجدران الخلايا النباتية ، وعلى ذلك ، فإنها تعتبر مواد اعمادية أو دعامية للنباتات بأكملها . ولاتذوب هذه المواد فى الماء أو المذيبات العادية ولكنها تذوب فى محلول هيدروكسيد أمونيات النحاس ، كما أنها لا تكتسب أى لون مميز مع محلول الأيودين .

أنواع المواد عديدة التسكر :

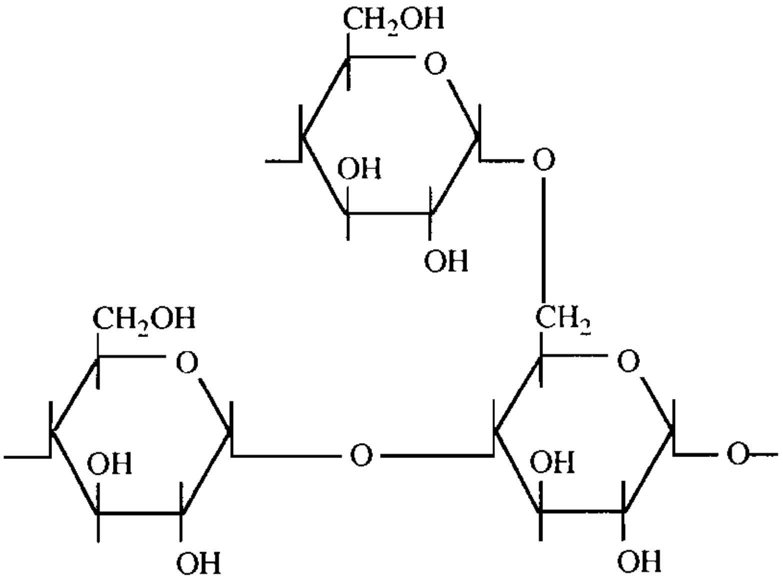
توجد المواد عديدة التسكر على هيئات مختلفة فى الخلايا و الأنسجة الجسمية وهى تختلف من بعضها فيما يتعلق بطبيعتها ونشاطاتها الفسيولوجية ، ولكنها تتشابه مع بعضها

بالنسبة لاحتوائها المجموعات السكرية أو الكربوهيدراتية ، وهى التى يتم - عن طريقها - إحداث التفاعلات التى تستعمل فى الكشف عن هذه المواد وتوضيحها .

هذا ، وقد تتكون هذه المواد من السكريات فقط ، وقد توجد بها مواد ليبيدية أو بروتينية (متحدة مع المواد السكرية) . وعلى ذلك يمكن تقسيم هذه المواد إلى الأنواع التالية:

أولا : المواد عديدة التسكر البسيطة : Simple polysaccharides

من أكثر هذه المواد أهمية وأوفرها نشاطا ، مادة الجليكوجين glycogen ، ولذلك سيتخذ مثالا توضيحيا لتلك المكونات . والمعروف أن جزىء الجليكوجين يتكون من عدد كبير من جزيئات الجلوكوز المتفرعة ، ويحدث هذا التفرع عند ذرة الكربون (٦) من جزىء الجلوكوز.



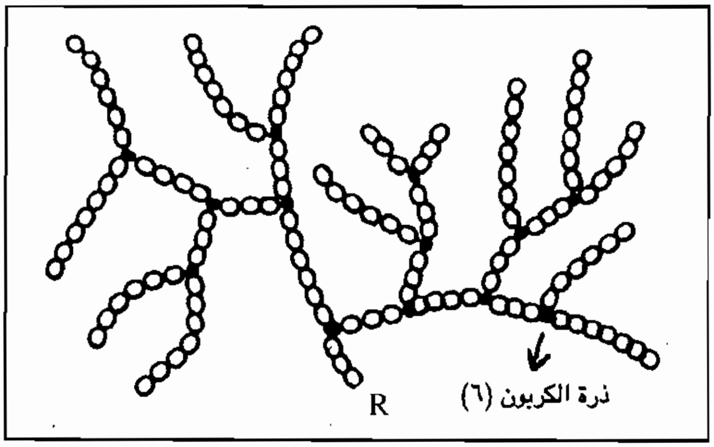
طبيعة الجليكوجين وتوضيحه بصورة عامة :

يمثل الجليكوجين المواد الكربوهيدراتية المختزنة فى الخلايا والأنسجة الجسمية ، ولذلك يطلق عليه أيضا " النشا الحيوانى animal starch " وإن كان يختلف عن النشا النباتى فى

أن له نشاطاً حيوياً أعلى عن النشا ، كذلك يمكن استخلاص النشا من الخلايا والأنسجة النباتية بسهولة أكبر بالنسبة لاستخلاص الجليكوجين الذى يحتاج إلى طرق معينة مثل غليان الأنسجة الطازجة فى الماء لفترة معينة حيث يعمل ذلك على تخزين البروتينات المرتبطة بالجليكوجين وبذلك يسهل استخلاصه .

ويختزن الجليكوجين بصورة خاصة فى الخلايا الكبدية ، وإلى حد ما فى الخلايا العضلية ، كما يوجد بمعدلات قليلة فى بعض الأنسجة الأخرى وبعض الطحالب البدائية . ويتكون الجليكوجين نتيجة تكدس أو بلمرة المواد احادية التسكرتحت تأثير إنزيمات بناءة معينة glycogenic and glyconeogenic enzymes ويبدو الجليكوجين متكونا من سلاسل متشعبة ولذلك يظهر كتركيب متفرع من جزيئات الجلوكوز . ويحدث هذا التفرع عند ذرة الكربون (٦) فى جزىء الجلوكوز .

ويوجد الجليكوجين على هيئة حبيبات صغيرة مرتبطة بالبروتينات بصورة أساسية . وعلى ذلك ، فإن أى مثبت صالح للبروتينات ، يصلح أيضا لتثبيت الجليكوجين ، وهو يذوب بنسبة ضئيلة فى الماء (١٠- ١٥٪) .



شكل عام يوضح جزىء الجليكوجين

ويمكن توضيح الجليكوجين فى الخلايا الحية بواسطة محلول الأيودين حيث يعطى لونا بنيا محمرا . وفى الخلايا والأنسجة المثبتة ، يتم إظهار الجليكوجين بصبغ " كارمين بست Best carmine " ، حيث يكتسب لونا أحمرا داكنا . كذلك يأخذ الجليكوجين لونا بنفسجيا داكنا مع تفاعل "شف " Schiff's reagent .

وفى جميع الحالات ، يتم التأكد من تواجه الجليكوجين بطريقة إثباتية تتم خلالها معاملة القطاعات بإنزيم " دياستيز diastase " أو " أميليز amylase " ، ثم صباغتها بعد ذلك بصبغات الجليكوجين المميزة حيث يفترض الحصول على نتائج سلبية ، وعندئذ تظهر هذه القطاعات غير مصبوغة لأن هذه الإنزيمات تعمل على إذابة الجليكوجين واستخلاصه من الخلايا و الأنسجة .

تواجد الجليكوجين في الخلايا والأنسجة الكبدية :
Glycogen localization in the liver cells and tissues

من المعروف أن الكبد يمثل العضو الجسمى الرئيسى لا ختزان الجليكوجين الذى يطلق عليه " جليكوجين الكبد liver glycogen " تمييزا له عن الجليكوجين الموجود فى الخلايا العضلية والذى يسمى جليكوجين العضلات muscle glycogen "

كذلك لوحظ وجود نوعين من الجليكوجين فى الأنسجة الكبدية ، هما : " الجليكوجين سهل التحلل " lyoglycogen " والجليكوجين الثابت " desmoglycogen " وذلك لأن النوع الأول يمثل كمية الجيليكوجين التى سرعان ما تتحلل وتفقد من الأنسجة الكبدية عقب موت الحيوان مباشرة أو تعرض الكبد لدرجة حرارة الحجرة ، بينما يبقى النوع الثانى فى تلك الأنسجة لفترة ما بعد ذلك .

مصادر الجليكوجين الأساسية : Principle sources of glycogen

المعروف ان الجليكوجين يصل الكبد بصورة رئيسية من مصدرين رئيسيين ، هما : " المواد السكرية البسيطة أو الأحادية " التى تمثل نواتج هضم المواد النشوية والسكرية المختلفة

فى القناة الهضمية . أما المصدر الثانى ، فهو "حامض اللاكتيك " الذى يتولد فى الخلايا العضلية نتيجة تحلل الجليكوجين الذى يحدث أثناء النشاطات العضلية لتوليد الطاقة الحرارية اللازمة فى تلك الحالات . وهذا الحامض ينتشر أو ينفذ بسهولة خلال أغشية الخلايا العضلية حتى يصل إلى الدورة الدموية العامة التى تقوم بتوزيع الدم على الخلايا و الأنسجة الجسمية المختلفة ولكن أيا منها لا يسمح بنفاذ هذه المادة (حامض اللاكتيك) خلال أغشية تلك الخلايا فيما عدا أغشية الخلايا الكبدية وذلك لأنها تملك القدرة – بما فيها من إنزيمات معينة – على تكثيف جزيئات هذه المادة إلى جليكوجين ، وعلى ذلك ، فإن هناك مصدرا واحدا لجليكوجين العضلات هو السكريات البسيطة الواردة من الأمعاء . أما جليكوجين الكبد فله مصدران ، هما : السكريات البسيطة ايضا وحامض اللاكتيك المتولد فى الخلايا العضلية .

توزيع الجليكوجين ونمط تواجده في الخلايا الكبدية للثدييات :

Distribution and mode of occurrence of glycogen .

يوجد الجليكوجين فى الخلايا الكبدية الحية منتشرا بصورة عامة فى أنحاء الستيوبلازم ولكنه لا يتواجد فى أنوية تلك الخلايا فى الحالات السوية العادية ، غير أنه لايظهر بهذه الصورة الانتشارية المنتظمة فى الخلايا و الأنسجة المثبتة ، ولكن توجد حبيبات هذه المادة متكدسة فى جزء معين من الخلية متخذة شكلا هلاليا . ويفسر ذلك أن المثبتات المستخدمة – وإن كانت لا تذيب الجليكوجين – ولكنها تعمل على زحزحته أمامها أثناء انتشارها داخل الخلايا حتى تتكوم أو تتكدس فى الجهة المقابلة لدخول المثبتات متاخمة لغشاء الخلية فى تلك الناحية . وبذلك يمكن الاستدلال على اتجاه دخول المثبتات فى تلك الخلايا . ومعنى ذلك أن هذه الصورة تعتبر غير حقيقية لأنها تخالف الصورة الحقيقية فى الخلايا الحية ، غير أنها اصبحت معترفا بها إلى حد بعيد ، حتى أنه اطلق عليها تعريف معين هو " هروب الجليكوجين : glycogen flight" بل إنها أصبحت علامة مميزة لظهور الجليكوجين فى الخلايا الكبدية . وهناك محاولات لإبطال هذه الظاهرة بغرض الحصول علي صورة حقيقية تماثل تلك الموجودة في الخلايا الحية ، ومن ذلك استخدام القطاعات الثلجية أو المجمدة أو وضع العينات صغيرة الحجم من الكبد في محلول (١ ٪ من حامض الأوزميك) لمدة دقيقة أو

دقيقتين قبل استخدام المثبتات المعتادة ، ويعمل ذلك علي صعوبة إزاحة أو زحزحة حبيبات الجليكوجين من أماكنها الطبيعية تحت تاثير تلك المثبتات .

تباين صورة الجليكوجين فى الأنسجة الكبدية للثدييات فى الأحوال العادية وبعض الحالات الفسيولوجية والمرضية :

Glycogen in normal and phyisological canditions

عند فحص تحضيرات الجليكوجين في الأنسجة الكبدية للثدييات في حالاتها العادية ، يتبين اختلاف كثافة هذه المادة فى المناطق المختلفة للفصيصات الكبدية . ، والمعروف أن تلك الفصيصات توضح ثلاث مناطق متباينة النشاط حسب ما اسقر عليه رأى العديد من الباحثين من" نويل"١٩٢٣ " وهو عالم هستولوجي وفسيولوجي (1923) Nöel " والعالم الأمريكى " نوفيكوف "١٩٥٦ " Novikoff " وغيرهم : منطقة خارجية يطلق عليها " منطقة بالغة النشاط zone of maximan activty " ومنطقة وسيطة متوسطة النشاط zone of intermediate activity " ومنطقة داخلية شديدة الخمول : zone of maximan repose " ، وذلك حسب موقع تلك المناطق من الإمداد الدموى الذى يصل الكبد من الأمعاء عن طريق الوريد الكبدى البابى hepatic portal vein " الذى يأتى محملا بالمواد الغذائية وتنتهى تفرعاته عند حواف الفصيصات الكبدية بما يجعل تلك المناطق شديدة النشاط لاستقبال وامتصاص تلك المواد من الدم ، ويقل هذا النشاط تدريجيا نحو الداخل فى اتجاه الوريد الفصيصى المركزى centrolobular vein الذى يحمل المواد الزائدة عن الاستيعاب إلى الدورة الدموية العامة عن طريق الوريد المعروف باسم " الوريد الكبدى " hopatue veen .

وفى هذا المجال يشاهد أن حبيبات أو محتويات الجليكوجين أكثر تواجدا وكثافة فى المناطق الخارجية للفصيصات الكبدية عنها فى المنطقة الوسيطية عنها ايضا فى المنطقة الداخلية المحيطة بالوريد المركزى .

أما فى حالة التصويم أو التجويع fasting or starvation conditions ، فإن هذه الصورة تختلف بشكل واضح ، حيث تبدأ الخلايا والأنسجة الكبدية فى فقدان تلك المحتويات

تدريجيا بعد تحللها . وعند فحص القطاعات الكبدية عندئذ ، يبدو كأن المناطق الخارجية فى الفصيصات الكبدية هى التى تفقد تلك المحتويات أولا ، لكن الواقع أن المناطق الداخلية لتلك الفصيصات هى التى تفقد تلك المحتويات أولا حيث تنزاح إلى الوريد المركزى (الوريد الكبدى) الذى ينقلها بدوره إلى الدورة الدموية العامة التى تقوم بتوزيع تلك المواد على الخلايا و الأنسجة المحتاجة لها ، فى نفس الوقت الذى تنساب فيه تلك المواد من المناطق الخارجية للفصيصات الكبدية إلى المناطق الداخلية لها ويستمر ذلك حتى تفقد الخلايا الكبدية هذه المحتويات بصورة تامة عند إطالة مدة التصويم أو التجويع .

ومن الإثباتات التى قدمت فى هذا المجال ، ما أوضحته الدراسات البيوكيميائية ومرة الإنزيمات بناءة الجليكوجين فى المناطق الفصيصية الخارجية وتناقصها للداخل . وذلك على عكس الإنزيمات التى تعمل على تحلل الجليكوجين حيث تكون أكثر وفره من المناطق الداخلية للفصيصات الكبدية بالنسبة للمنطقة الوسطية ثم المنطقة الخارجية فى تلك الفصيصات .

بعض التغيرات الفسيولوجية والمرضية الاخري في الجليكوجين :

Physiological and pathological changes of glycogen

بالإضافة الى حالات التصويم والتجويع – سابقة الذكر – تحدث فى الجليكوجين تغيرات واضحة فى بعض الحالات الفسيولوجية الأخرى المرضية ، منها بعض الأمثلة الآتية :

* تفقد الأنسجة الكبدية قدرتها المألوفة على اختران الجليكوجين مع تقدم العمر .

* يختفى الجليكوجين من الأنسجة الكبدية بصورة سريعة بمجرد تعرض الكبد للظروف الجوية (خارج الحيوان) وذلك بسبب نشاط الإنزيمات محللة الجليكوجين .

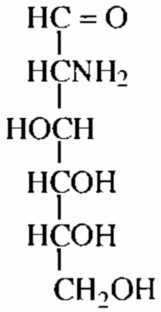
* والمعروف أيضا أن الجليكوجين يتحلل ويختفى بصورة عامة عقب موت الحيوان وذلك على الأخص فى الخلايا العضلية الهيكلية . إلاأن تثليج الأنسجة سريعا أو تبريدها مع توفر الأكسوجين فإن ذلك يعمل على إبطاء فقدان الجليكوجين والإبقاء عليه لفترة طويلة نسبيا .

وقد لوحظ أن فقدان هذه المادة يحدث ببطء فى الحيوانات ذات الدم البارد مثل الأسماك والبرمائيات عنها فى ذوات الدم الحار مثل الثدييات .

* وكذلك لوحظ أن الجليكوجين يتأثر بصورة واضحة - خاصة فى الأنسجة الكبدية - تحت تأثير بعض العوامل المختلفة مثل المبيدات الحشرية وبعض العقاقير الطبية والتعرض للإشعاعات المختلفة ، إلا أن هذه التغيرات قد تكون بالزيادة أو النقصان حسب طبيعة تلك العوامل الكيميائية والفيزيائية المختلفة والجرعات المستخدمة منها طوال فترة تعرض الحيوانات لها .

ثانياً : المواد المخاطية : Mucoid substances

هي مواد كربوهيدراتية ، تتكون أيضاً من جزيئات وحيدة التسكر (مثل الجلوكوز في المواد عديدة التسكر) ، ولكنها تحتوي علي وحدات أمينية : (NH_2) بدلا من مجموعة هيدروكسيل في الجلوكوز . ولذلك يطلق عليها جلوكوز امين glucosamine أو السكريات الأمينية amino sugars .



جلوكوز أمين
(glucosamine)

والمعروف أن هذه المواد تلعب دوراً أساسياً في امتصاص الماء وتنشيط الحركة الدورية في الأمعاء وتفريغ الفضلات البرازية ، وتشتمل هذه المركبات علي الأنواع الرئيسية الآتية :

أ - عديدة التسكر المخاطية . Mucpolysaccharides

ب - المخاطيات البروتينية . Mucoproteins

جـ - السكريات البروتينية . Glycoproteins

(أ) عديدة التسكر المخاطية :

تتكون هذه المـــواد من وحدات سكرية أمـينية فقط ، غير مـرتبطة بأية مواد عضـــوية مثل البروتينـــات ، وإن كـان البعـض منها متحداً ببعض الأحماض العضـــوية مثل حامـض (يورونيك uranic ocid) أو غير العضوية مثل حامض الكبريتيك المركز Conc- H_2SO_4 .

وعلي ذلك ، تنقسم هذه المواد إلي نوعين :

١ – عديدات التسكر المخاطية المتعادلة Neutral mucopolysacharides

٢ – عديدات التسكر المخاطية الحمضية Acid mucopolysacharides

(١) عديدة التسكر المخاطية المتعادلة :

تختلف هذه المواد عن بعضها بالنسبة لدرجة تميئوها (أي محتوياتها المائية) . وعلي ذلك فإن البعض منها يبدو كمواد سائلة أو سوائل مثل الإفرازات المخاطية لبعض الغدد ، أو سوائل لزجة متوسطة الصلابة تقريباً مثل المواد الجيلاتينية في الحبل السري . أو مواد صلبة مثل تلك الموجودة في الغضاريف . كذلك تتواجد بعض هذه المواد كنواتج خارج الخلايا مثل المواد بين الخلوية في الأنسجة الضامة . كما أن لهذه المواد أهمية خاصة في تحديد مجموعات الدم .

ومن أكثر هذه المواد انتشاراً الكيتين Chitin ، الذي يمثل أبسط هذه المواد تركيباً . وتوجد هذه المواد بصورة خاصة في الهيكل الخارجي exoskeleton في الحشرات وغيرها من المفصليات ، كذلك توجد هذه المواد في " جليد " cuticle الحلقيات مثل دودة الأرض ، وكذلك الرخويات ويرقات الحشرات . ولكن وجودها في النبات يكاد يكون قاصراً علي الفطريات Fungi . وعلي الرغم من أن لفظ " كيتين " يستخدم عادة للدلالة علي الهيكل الخارجي في الكثير من اللافقاريات ، إلا أن مثل هذه الهياكل لا تحتوى حقيقة علي أكثر من نسبة ٥٠ ٪ من مادة الكيتين . أما بقية هذه التراكيب ، فإنها تتركب من البروتينات أو البروتينات وكربونات الكالسيوم .

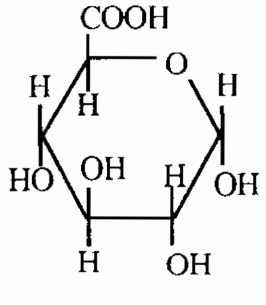
خواص الكيتين :

يعتبر الكيتين من أقل المواد العضوية قابلية للذوبان ، لكنه قد يذوب في كل من حامضى الكبريتيك أو الهيدروكلوريك الدافئين . ويقارن الكيتين دائماً بمادة السليلوز cellulose الموجودة فى جدر الخلايا النباتية على اعتبار أن كلا منهما مادة غطائية أو وقائية . إلا أنهما يختلفان عن بعضهما فى أن الكيتين لا يذوب فى محلول " هيدروكسيد أمونيات النحاس cupric ammonium hydroxide مثل السليلوز ". كما أنهما ، وان كانا يتشابهان تركيبيًا فيما يتعلق بأن كليهما يتكونان من سلاسل طويلة من المواد أحادية التسكر ، الا أنهما يختلفان كذلك فى هذه الناحية اختلافا معينا ، من حيث أن وحدات السليلوز هى " الجلوكوز" ، بينما يشكل " الجلوكوز الأمينى " الوحدات البنائية للكيتين . وعلى ذلك يمكن القول أن الكيتين هو فى الأصل مادة سليلوزية ، حلت فيها المجموعة ($NHCOH_2$ -) محل مجموعة الهيدروكسيل : (OH) المرتبطة ببؤرة الكربون الثانية (C_2) فى الجلوكوز .

ويمكن الكشف عن الكيتين بواسطة " تفاعل شف " حيث يظهر لون بنفسجى أميل للاحمرار فى حالة تواجد هذه المادة .

(٢) عديدة التسكر المخاطية الحمضية :

تتميز هذه المواد باحتوائها على حامض عضوى ، هو حامض جلوكيورونيك glucuronic acid . ويكاد يكون وجود هذه المواد قاصراً علي الحيوانات حيث توجد بكثرة في الإفرازات المخاطية في القنوات الهضمية . وقد تحتوي بعض هذه المواد علي حامض غير عضوي أيضاً قد يكون حامض الكبريتيك أو حامض الفسفوريك . وعلى ذلك تتميز هذه المواد إلى نوعين : سكريات مخاطية بسيطة وسكريات مخاطية حامضية معقدة أو مركبة .

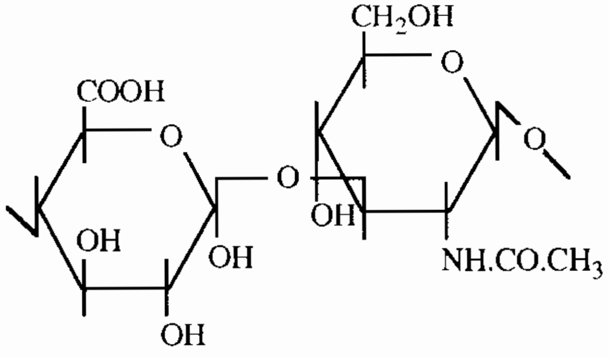


حامض جلوكيورونيك
(Glucuronic acid)

أ - السكريات المخاطية الحامضية البسيطة

Simple acid mucopolysaccharides :

تتكون هذه المواد من وحدات سكرية أمينية + حامض جلوكيورونيك ، وأشهر مثال لتلك الأنواع : حامض هياليورونيك : Hyaluronic acid . ويوجد هذا الحامض بصورة وثيقة التجمع أو بالغة البلمرة highly polymerized ، ولذلك يشكل غلافا واقيا للجلد أو حاجزا يمنع تخلل أو دخول المواد أو السوائل الخارجية أو الكائنات الدقيقة الضارة الى الخلايا والأنسجة الداخلية .



حامض هياليورونيك

ولذلك ، فإنه - كما سبقت الإشارة - يوجد بصورة خاصة كغطاء خارجي للأنسجة الجلدية حيث يطلق عليه لفظ الكؤيس Calyx أو الغطاء الكربوهيدراتي glycocaalyx ، وكذلك يشكل غطاء خارجيا للبويضات .

إلا أن هذه المادة قابلة للاذابة بواسطة إنزيم معين يطلق عليه انزيم" هيالورينيديز Hyaluronidase "، أى الإنزيم الذى يعمل على تحلل هذا الحامض . ويوجد هذا الإنزيم بكثرة فى بعض أنواع البكتريا الضارة ، وفى الإفرازات السامة للثعابين أو سموم العقارب وبعض الحشرات مثل النحل والدبابير . وفى حالة عض الثعبان أو لسع العقرب وغيرها ، فإن هذا الإنزيم - وهو أحد مكونات الإفراز السمى - يقوم باذابة هذه المادة بين الخلوية فى أنسجة الجلد بما يؤدى الى تفكك هذه الخلايا ووصول المادة السامة الفعالة داخل الجسم تفرز أولا ، حيث يعمل على تحلل أو اذابة جزء من هذا الغطاء الواقى (حامض الهياليورينيك) ، وبذلك يحدث ثقب أو حفرة يقوم الحيوان عندئذ بإفراغ المادة السامة الفعالة فيه حيث تنتشر بذلك داخل الجسم .

وجدير بالذكر فى هذا المجال أنه يسبق صب الإنزيم على الجلد أن يقوم الثعبان أو العقرب مثلا بغرس الانياب أو الزبان اللاسع المدبب فى الحالتين المذكورتين لاختراق الطبقة القرنية التى تغطى الجلد من الخارج حتى تتعرض السطح الخلايا الجلدية المغطاة بطبقة حامض الهياليورينيك ، ثم يتم افراغ إنزيم الهياليورينيديز ثم المادة السامة بعد ذلك .

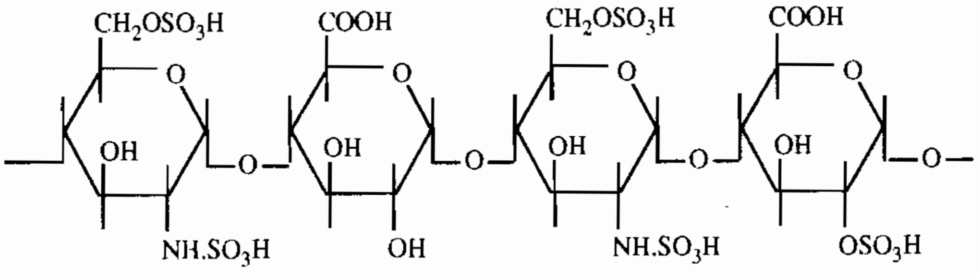
وبالنسبة لأغشية البويضات ، فإنه تتم إذابة هذه المادة المتواجدة بين الخلايا التى تغلف البويضة فى منطقة معينة وذلك بتأثير إنزيم الهياليورينيديز الذى يوجد بكثرة أيضا فى رؤوس الحيوانات المنوية خاصة فى الجسم المخروطى acrosome . وفى هذه الحالة يحدث ثقب فى غشاء الخلية يسمح بدخول الخلايا المنوية فى البويضات ، وتسهل هذه العملية اختراق طرف الجسم المخروطى للحيوان للسطح الخارجى للبويضات .

ب - السكريات المخاطية الحامضية المركبة

Complex acid mocopolysaccharides :

تتكون هذه المواد من سكريات أمينية + الحامض العضوى " جلوكيورونيك glocuronic acid" + أحد الأحماض غير العضوية : حامض الكبريتيك أو حامض الفسفوريك .

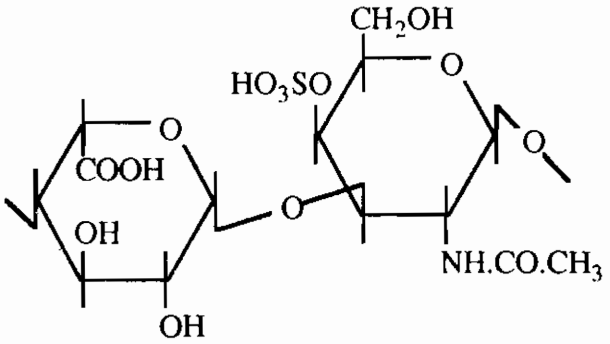
ومن أهم هذه المركبات مادة " هيبارين heparin وتوجد هذه المادة بصورة أساسية فى " الخلايا الصارية mast cells " التى توجد بكثرة فى الأنسجة الضامة ، وعلى ذلك فإنها واسعة الانتشار فى جميع أجزاء الجسم حيث لايكاد يوجد مكان فى الجسم يخلو من هذه المادة .



الهيبارين

ويظهر الهيبارين على هيئة حبيبات داكنة ، وهى من أهم العوامل التى تمنع تجلط الدم فى حـالة حـدوث قطع أو جـرح داخل الجسم ، ولذلك يطلق عليـها " مـانعـة التـجلط anticoagulant " .

وهناك أمثلة أخرى من هذه المركبات ، "مثل كبريتات الكوندريوتين chondroitin sulphate " المتواجدة فى الأنسجة الضامة أيضا والغضاريف . وكذلك فى " الإفرازات المخاطية المعدية gastric secretions " فى الحيوانات .



كبريتات الكوندريوتين

(ب) المخاطيات البروتينيـة : Mucoproteins

فى هذه المواد تكون السكريات الأمينية متحدة بمواد ثنائية الببتيدات dipeptides ، وتشكل السكريات أكثر من ٤٪ من هذه المواد بصـورة عـامـة . وتعطى هذه المواد تفـاعـلات ايجابية مع محلول (شف) كما تصبغ أيضا بمحلول " أزرق البروموفينول bromophenol blue " الخاص بتمييز البروتينات .

وتوجد هذه المواد بكثرة فى الإفرازات المخاطية فى الغدة اللعابية تحت الفكية submaxillary glands " وبعض الإفرازات المخاطية الموجودة فى بعض الأعضاء الجسيمة الأخرى ، وبعض الهرمونات الجنسية gonadatrophie hormones " .

(جـ) السكريات البروتينية : Glycoproteins

وهى مركبات تتكون أيضا من السكريات الأمينية متحدة مع البروتينات ، وعلى ذلك فإنها لا تختلف كثيرا عن النوع السابق فيما عدا أن نسبة السكريات ، أقل منها فى حالة المخاطيات البروتينية . ولا توجد هذه المواد بكثرة فى الخلايا الجسمية ولكنها توجد فى مصل الدم serum albenen وبياض (زلال) البيض ovalbumin

ثالثا : الليبيدات السكرية Glycolipids

يطلق على هذه المواد أيضا " السربروسيدات Cerbrosides " وهى مواد معقدة التركيب ، تعطى عند تحللها المائى : مادة نيتروجينية قاعدية هى سفنجوسين Sphingosine " + سلسة طويلة من الأحماض الدهنية + مادة سكرية قد تكون الجلوكوز أو الجالاكتوز .

ومن أمثلة هذه المواد " فرينوزين phrenosin " و " كيراسين Kerasin " ، وهى مركبات أساسية فى الأنسجة العصبية .

وهذه المواد لا تقبل النوبان فى المادة ولكنها تنوب فى المادة العضوية " بيريدين Pyridine " والكحول الساخن .

وتعطى هذه المواد تفاعلا موجبا مع محلول شف ، كما أنها تقبل الصباغة أيضا بصباغات الدهون أو الليبيدات .

رابعا :حامض الاسكوربيك أو فيتامين ج : " Ascorbic acid or vitamin " C

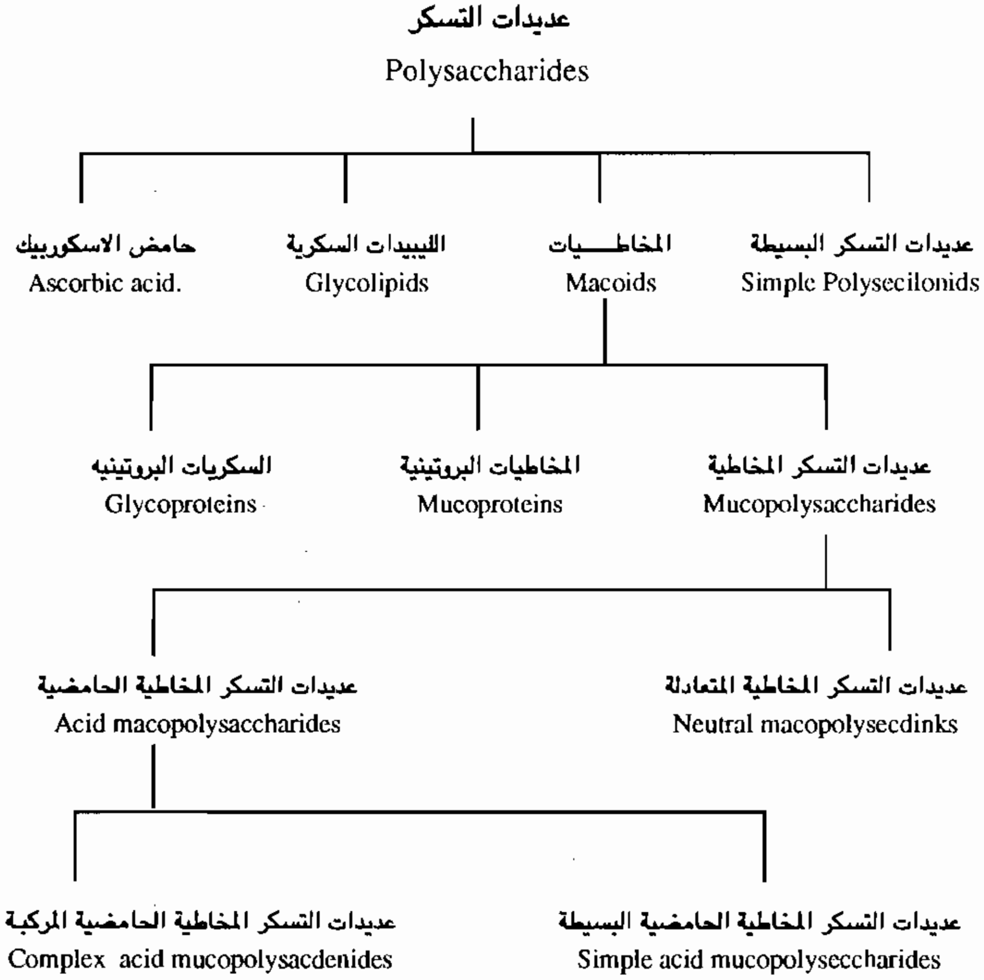
وهو أحد مشتقات المواد الكربوهيدراتية ، يتميز بنشاطه فى عمليات الأكسدة والاختزال – كإنزيم مساعدة فى الخلايا الجسمية .

توجد هذه المادة بكثرة فى بعض الخلايا و الأنسجة النباتية خاصة الفواكه الحمضية ، وبصورة نادرة فى الأنسجة الحيوانية مثل القشرة الكظرية التى لها القدرة على تخليق أو تخزين تلك المواد .

ويتم توضيح حامض الاسكوربيك باستخدام محلول نترات الفضة مذابة فى حامض

الخليك . . acid silver nitrate sol . ويمتلك حامض الأسكوربيك القدرة على اختزال تلك المحاليل إلى حبيبات أو مواد داكنة اللون .

شكل عام لتوضيح أنواع المواد عديدة التسكر



تقسيم آخرللمواد الكربوهيدراتية :

يرى بعض الباحثين تقسيم المواد عديدة التسكر (Polysaccharides) على النحو التالى :

١ - الجليكانات (عديدة التسكر أو قليلة التسكر)

1 - Glycans (Polysaccharides or Glycosaccharides .

وتشتمل بدورها على الأنواع الآتية :

(a) Homoglycans	(أ) متماثلة الجليكانات (هوموجليكانز)
Glycogen	الجليكوجن
Starch	النشا
Cellulose	السليلوز
Dexatran	الديكساتران
Galactan	جالاكتان
(b) Homopolyamino saccharides	(ب) هوموبولى أمينو ساكاريدز (متماثلات الأمينات السكرية)
Chitin	الكيتين
(C) Homopoly uronosaccharides	(جـ) هوموبولى يورونيك ساكاريدز (متماثلات اليورينات السكرية)
Pectic acid	حامض البكتيك
Alginic acid	حامض آلچينيك
(d) Heteroglycans	(ء) الهيتروجليكانات (غير متجانسة الجليكانات)
A - Glycosaminoglycans	أ- جليكوز أمينوجليكانز (جليكانات الجلوكوز الأمينى)
Sialoglycans (Neuraminic acid)	سيالوجليكانز (حامض نورأمينيك)
Keratan sulphate (ks	كبريتات الكيراتان
B - Glucosamino glucuroglucuron glycans	ب - جليكوز أمينو جلوكيورونيك جليكانز(جليكانات الجليكوز الجلوكيورونيك الأمينى)

Hyaluronic acid (UA)	حامض هيالويورونيك
Heparin	الهيبارين
Heparan (heparitin sulphate)	الهيباران (كبرتيك الهيبارتين
Chondroitin - 4 - sulphate (C_4S)	كبريتات -٤-كوندرويتين
Chondroitin - 4 - sulphate (C_6S)	كبريتات -٦- كوندرويتين
Dermatan sulphate	كبريتات الدرماتان
2 - Protes glycans	**٢ - البروتيوجليكانات**
Protein (CS)	البروتين (CS)
Protein (HA)	البروتين (HA)
Protein (DS)	البروتين (DS)
Protein (KS)	البروتين (KS)
3 - Glycoproteins and Glycopeptides	**٣ - الجليكوبروتينات و الجليكوببتيدات**
Ovomucoid	المخاطيات البويضية
Fetuin	الفتوين
Salivary gland mucoid	مخاطيات الغدة اللعابية
(Sialoglyco protein)	(سيالوجليكوبروتين)
Fibrinogen	الفيبرينوچين
Immunoglobulins	الأميونوجلوبيولينات(الجلوبيولينات المناعية)
Acid glycoprotein	الجليكوبروتينات الحمضية
(oroso mucoid)	(أوروزوميوكويد)
Thyroxine - binding protein	البروتينات رابطة الثيروكسين
Propeptides (hormonal)	بدائية الببتيدات (الهرمونية)
Blood group proteins	بروتينات مجموعات الدم
Chorionic gonadotropin	الهرمونات الكربونية
FSH	
TSH	
Ribonuclease	الريبونيوكليز
B - glucuronidase	بيتا -جلوكيوروونيديز
Pepsin	البيبسين
Serum cholinesterase	كولينسيتريز المصل
Avidin	الأفيدين
Cell membrane glycoproteins	جليكوبروتينات غشاء الخلية

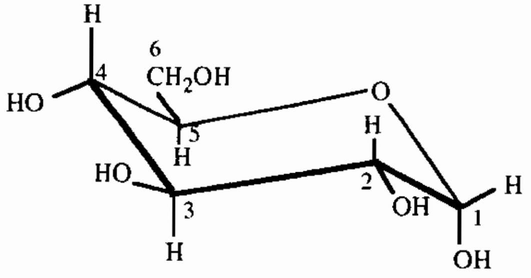
٤ - الجليكوليبيدات — 4 - Glycolipids

السريبروسيدات — Cerebrosides

الجانجليوسيدات — Gangliosides

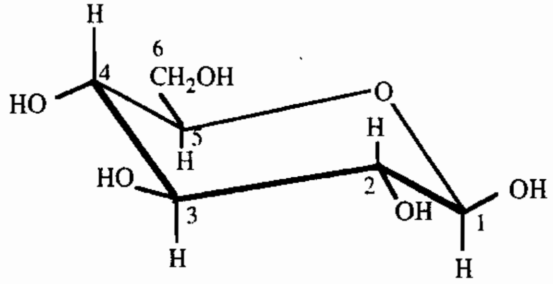
ويذكر هنا أن الجليكانات تتكون من السكريات بصورة كاملة وبالتحديد سداسيات التسكر (hexoses) مرتبطة ببعضها بصورة جليكوسيدية ، وفيها ترتبط الذرة (c_1) - بواسطة ذرة أكسجين - لكل من ذرة الكربون (c_3) ، (c_4) أو (c_6) للسكر الأخر.

ولذلك يطلق على هذه المركبات اسم المادة السكرية المتضمنة فيها ، ولابد أن يتضمن وصف المادة عديدة التسكر التشكيل (ألفا أو بيتا (∝ or B) عند الرابطة الجليكوسيدية (c-1) والذرة التى ترتبط بها ذرة الكربون (c-1) فى الوحدة التالية ، مثل (a-1-4) أو (B - 1→6) . والاختلاف بين تشكيلى (a nad B) عند (c-1) . على سبيل المثال D- glucose هو ببساطة أن المجموعة الهيدروكسيلية تقع أسفل الحلقة بينما توجد فى حالة (B) فوق الحلقة كما يوضح فى الشكل التالى :



جلوكوز A - D

تحت وحدات الجليكوجين والنشا



جلوكوز B - D

تحت وحدات السليلوز

الأسس النظرية لتوضيح المواد الكربوهيدراتية هستوكيميائيا :

Theoritical basis of the histochemical ilbustration of carbohydrates .

Periodic Acid Schiff (PAS) reaction. : تفاعل شف حامض بيرأيوديك

تعتبر هذه الطريقة من أفضل الطرق الهستوكيميائية المتخصصة لتوضيح المواد الكربوهيدراتية – بصورة عامة – فى الخلايا والأنسجة الجسمية . وتتضمن هذه الطريقة استخدام " حامض بيرايوديك (HIO_4) "Periodic acid ، وهو عامل مؤكسد قوى يعمل على أكسدة مجموعات الجيلكولات (-HCOH - HCOH) glycol groups التى توجد فى المركبات الكربوهيدراتية وبعض المركبات الأخرى ، وذلك عن طريق كسر الروابط الموجودة بين ذرتى الكربون $(C_2 - C_3)$ الموجودة على هيئة ٢:١ مجموعات الجليكول فتحولها بذلك إلى مجموعات ألدهيدية aldehydes - HCO - HCO . وهناك ميزة اخرى لهذا الحامض ، وهى أنه لايؤكسد عادة الألدهيدات الناتجة . وعلى ذلك تبقى هذه المواد جاهزة للتفاعل مع صبغ " شف "، وينتج عن ذلك لون بنفسجى كثيف الصبغ magenta colouration

أما محلول " شف " ، فإنه كما – هو معلوم – يتم إعداده عن طريق اذابة " الفوكسين القاعدى Basic fuchsin فى الماء المغلى وبذلك يتكون محلول له لون أحمر أو بنفسجى داكن . ثم يضاف له " ميتابايسلفيت الصوديوم أو البوتاسيوم "Sodium or Potassium metabisalydydete + حامض هيدروكلوريك عيارى " Normal Hcl " ويعمل ثانى اكسيد الكبريت SO_2 ، المتولد فى هذة الحالة على اختزال لون هذا المحلول الصبغى ، الذى يتحول عندئذ إلى محلول عديم اللون أو بلون القش الأصفر الباهت Paele Straw Yellow يطلق عليه محلول " الفوكسين الابيض أو عديم اللون Leucofuchsin " . ولضمان عودة اللون الداكن لهذا المحلول الصبغى يضاف له بعض الفحم الحيوانى المنشط activated animal chercoal . ويحفظ هذا المحلول فى زجاجة محكمة الاغلاق فى درجة حرارة منخفضة .

وفى حالة تواجد الألدهيدات ، فإنها تتفاعل بشدة مع محلول الفوكسين عديم اللون ، وتنتج مركبات داكنة الصبغ البنفسجى . وقد عرف الآن أن هذا اللون الناتج لايدل على إعادة اكسدة الفوكسين عديم اللون ، انما هو نتيجة تفاعلات معينة تنتهى بتكوين تلك المركبات داكنة الصبغ .

وهناك نقاط هامة يتعين أخذها فى الاعتبار عند استخدام هذه الطريقة، منها :

أولا : يمكن استخدام " تحوير هوتشكس ، ١٩٤٨ Hotchkiss Modification 1948," ، الذى يتضمن استعمال حامض نيتريك مخفف بدلا من بيرأيوديك على أن تذاب فيه بيرأيودات الصوديوم (I_6) Sodium Periodate وذلك لانه سيتولد عندئذ حامض بيرأيوديك بطريقة طازجة حال استعمال هذه الطريقة .

ثانيا : يلاحظ أن فترة الأكسدة فى محلول ٥, ٠٪ حامض البيرايوديك (هى المستخدمة عادة) يجب ألا تزيد عن ٥ - ١٠ دقائق ، وأن كان يفضل ألا تزيد عن ٥ دقائق .

ثالثا : عقب استخدام هذه الطريقة ، يتعين استعمال محلول اختزالى بعد صباغة شف وذلك لإزالة أية آثار متبقية فى الأنسجة من البيرأيوديت أو الأيوديت وذلك لأنها تتداخل مع تلك الصباغة .

استخدامات تفاعل شف - بيرأيوديك :

تعمل هذه الطريقة على توضيح المواد الكربوهيدراتية بصورة عامة ، والبروتينات المخاطية وعديدات التسكر المخاطية المتعادلة وذلك باللون البنفسجى الداكن ، بينما تصبغ البروتينات السكرية بلون أحمر باهت نسبيا .

طريقة أزرق السيان : "Alcian blue method

كان ستيدمان ، ١٩٥٠ Steedman ، أول من استخدم هذه الطريقة لتوضيح المواد

المخاطية ، وقد ثبت أنها طريقة فعالة وسريعة فى هذا المجال . وهذه المادة الصبغية هى إحدى مشتقات النحاس وتكسب هذه المركبات لونا أزرقا متميزا .

ويعتمد على هذه الطريقة – إلى حد كبير – لتوضيح المخاطيات الموجودة فى الأنسجة الضامة والغضاريف ، ومن هذه المركبات – على وجه الخصوص – عديدات التسكر المخاطية الحمضية ، بجانب بعض المخاطيات التى تقوم بإفرازها بعض الخلايا الغدية .

بعض الطرق الإثباتية في صباغات المواد الكربوهيدراتية :

Some confirmatory procedures for carbolydeste staining

غالبا ما يقتضى الأمر الحصول على مزيد من التأكيد بشأن النتائج الإيجابية التى يتم الحصول عليها فى التحضيرات المصبوغة . وأكثرها استعمالا مايلى :

- **طـرق الإنزيمـات** : Enzyme applications

يستخدم إنزيم الشعير " دياستيز Diastase " أو "أميليز amylose " الغدد اللعابية بنسبة ٥, – ١٪ ، حيث يعمل كل منهما على إذابة الجليكوجين بصورة محددة ، وذلك بالطبع مع توفر الوسط المناسب ودرجة الحرارة الملائمة . وفى هذه الحالة يصبغ قطاع من العينة بصبغ الجليكوجين المميز ، مثل " كارمين بست " . ويعمل قطاع مثيله بأحد الإنزيمين سابقى الذكر ، ثم يوضع الإثنان فى المحلول الصبغى Best carmine . فاذا جاءت النتيجة سلبية فى الحالة الثانية ، كان هذا تأكيدا للصباغة الإيجابية التى ظهرت فى القطاع الأول لأن ذلك يعنى أن الجليكوجين قد ذاب تحت تأثير الإنزيمات المختصة بذلك .

كذلك يستخدم إنزيم " هياليورينيديز hyaluronidase الذى يتوفر فى إفرازات الخصية، ويعمل على إذابة بعض المواد السكرية المخاطية مثل حامض هياليورينيك ، وهو يستعمل عادة بنسبة ١,٪ فى محلول الفوسفات المنظم .

- **طريقة التوقيف أو المحاصرة : Blocking methods**

تستخدم هذه الطريقة أيضا لإثبات وجود الكربوهيدراتات وغيرها من المواد التى تحتوى على الألدهيدات ، وفى هذه الحالة تستخدم مواد معينة مثل " أنهيدريد الخليك Acetic anhydride" الذى يعمل على محاصرة أو وقف فاعلية مجموعات الجليكولات . وعلى ذلك فإن النتيجة السلبية (عدم ظهور لون فى التحضيرات) يؤكد أن الصباغة التى ظهرت باستخدام تفاعل "شف" فى تحضير مماثل (لم يتعرض لهذه المادة) نتيجة وجود مركبات محتوية على الالديهيدات .

كذلك يستخدم محلول " حامض الهيدروكلوريك الميثانولى "Methanol hydrochloric acid" للتأكد من وجود المخاطيات السكرية، لأن المحلول يعمل على محاصرة معظم المجموعات النشطة فى تلك المواد وذلك يمنع صباغتها .

بعض الطرق شائعة الاستخدام لتوضيح المواد الكربوهيدراتية

Some common histochemical methods used for Carbohydrates demonstration

توضيح المواد الكربوهيدراتية العامة : Detection of General Carbohydrates

طريقة حامض بيرايوديك شف Periodic Acid Schiff "PAS"

للكربوهيدراتات بصورة عامة for General Carbohydrates (Hotchkiss, 1948)

المحاليل المستخدمة :

(أ) حامض بيرايوديك (١ ٪) : Periodic Acid (1%)

* حامض بيرايوديك : Periodic acid جرام واحد
* ماء مقطر Distilled water ١٠٠ ملليلتر

(ب) محلول شف : Schiff reagent

يتم تحضيره كما يلى :

* يذاب جرام واحد من " الفوكسين القاعدى Basic Fuchsin فى ١٠٠ ملليتر من الماء المغلى ، ثم يرج لمدة خمس دقائق .
* يترك المحلول ليبرد حتى تصل درجة حرارته ٥٠°م .
* يتم ترشيح المحلول ، ويضاف للرشح ٢٠ ملليلتر من حامض الهيدروكلوريك (عيارى ١ أو واحد العيارية) .
* يتم تبريد المحلول حتى ٢٠° م ، ويضاف له جرام واحد من " ثيوسلفيت الصوديوم Soduim thiosulphate " . يلاحظ عندئذ زوال اللون الأحمر الداكن للمحلول

الصبغى الذى يصبح عديم اللون أو أصفر باهتا بلون القش الجاف ، ويطلق على هذا المحلول " الفوكسين الأبيض أو عديم اللون Leucofuchsin .

* يترك هذا المحلول فى الظلام ليلة كاملة ، ثم يضاف له ٢جرام من الفحم الحيوانى المنشط Activated animal charcoal" . ويرج جيدا لمدة دقيقة واحدة ، ثم يرشح، ويتم حفظ الرشيح (وهو المحلول الصبغى) فى زجاجة بنية اللون محكمة الإغلاق عند درجة ٥ ° م تقريبا .

ملحوظات هامة :

- عند استخدام هذا المحلول الصبغى ، يترك أولا حتى تصل درجة حرارته درجة حرارة المعمل أو الحجرة التى ستتم فيها عملية الصباغة .
- يراعى أن يكون المحلول لايزال عديم اللون أو اصفر باهتا ، فإذا كان لونه محمرا أومائلا للاحمرار فإنه لا يصلح للاستعمال .
- عند استخدام كمية من هذا المحلول الصبغى . فإنه لايعاد ثانية للزجاجة الأصلية حتى لا يفسد المحلول فيها .

الطريقة :

١ - يزال الشمع من القطاعات الشمعية بواسطة الزيلول .

٢ - تمرر القطاعات فى كحولات متدرجة التركيز التنازلى حتى تصل إلى الماء المقطر .

٣ - توضع القطاعات فى محلول ٥, - ١٪ حامض بيرايوديك Periodic Acid" لمدة ٢ - ٣ دقائق لاكسدتها واطلاق الألديهيدات من المواد الكربوهيدراتية .

٤ - تغسل الشرائح تحت ماء الصنبور الجارى لمدة ٣ دقائق ثم فى ماء مقطر لمدة دقيقة واحدة .

٥ - تنقل الشرائح إلى محلول " شف Periodic Acid" لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة .

٦ – تغسل الشرائح فى ماء الصنبور الجارى لمدة ١٠ دقائق .

(فى هذه المرحلة يمكن إجراء صباغة خلفية Counterstaining باستخدام صبغ الهيماتوكسلين "Haematoxylin

٧ – فى كلتا الحالتين يتم غسل الشرائح لمدة ٣ دقائق فى ماء الصنبور الجارى .

٨ – من المستحسن تمييز القطاعات بعد صياغتها فى محلول ١٪ كحول محمض (ملليلتر واحد من حامض الهيدروكلوريك المركز فى ١٠٠ ملليتر كحول تركيزه ٧٠٪).

٩ – تغسل القطاعات فى ماء الصنبور الجارى لمدة ٥ دقائق .

١٠ – يتم نزع الماء من القطاعات بتمريرها فى سلسلة متصاعدة من الكحولات حتى الكحول المطلق (١٠٠٪).

١١– يلى ذلك ترويق القطاعات فى الزيلول .

١٢ تغطى القطاعات بمادة (DPX) ويوضع عليها غطاء زجاجى نظيف .

النتيجـــــة :

– تظهر المواد الكربوهيدراتية مكتسبة لونا بنفسجيا داكنا (magenta)

– فى حالة صباغة الخلفية أو الإضافية تأخذ الأنوية لونا أزرقا داكنا بواسطة الهيماتوكسلين المستخدم .

توضيح الجليكوجـين : Glycogen Demonstration

طريقـة بلـمر : Bulmer's Method (1959)

تتضمن هذه الطريقة استخدام محلول "شف " أيضا لإظهار الجليكوجين بصورة محددة بشرط استعمال مادة معينة ايضا ، هى دايميدون Dimedone التى تعمل على إعاقة

أو محاصرة الألديهيدات أو مجموعات المواد الكربوهيدراتية وتمنع تفاعلها أو صباغتها بمحلول شف ، وذلك فيما عدا الجليكوجين . وفى هذا المجال ينصح بتحضير محلول " شف" حسب طريقة "ليللى Lillie , 1951 ، على الوجه التالى :

المكـــونات :

* فوكسين قاعدى	basic fuchsin	جرام واحد
* ميتابايسلفيت الصوديوم	sodium metabisalphite	١٠٩ جرام
* حامض هيدروكلوريك (١٥, عيارى)	hydrochloric acid	١٠٠ ملليلتر
* فحم حيوانى منشط طازج	fresh actirated animal chercoal	٥٠٠ ملليجرام

طريقـــة الإعــــداد :

١ - يتم خلط هذه المكونات مع بعضها فيما عدا الفحم .

٢ - يستمر رج هذا الخليط - بين وقت وآخر - على مدى ساعتين .

٣ - يضاف الفحم ويستمر الرج مرة أخرى لمدة دقيقتين تقريبا .

٤ - يتم ترشيح المحلول ويقاس حجمه .

٥ - يضاف له ماء مقطر (يمرر خلال الرشيح المتواجد على ورق الترشيح حتى يصل حجمه ١٠٠ ملليلتر) .

٦ - يتم تخزين هذا المحلول فى زجاجة بنية محكمة الاغلاق ويحفظ عند درجة ٥° م .

ملحـــوظـة :

إذا اكتسب هذا المحلول الرائق لونا بنفسجيا ، فإن ذلك يعنى أنه لم يعد صالحا للاستعمال ويستغنى عنه .

الطريقـــة :

١- يفضل أن تكون القطاعات المستخدمة مأخوذة من عينات تم تثبيتها فى أحد المحاليل الآتية : ١٠٪ فورمالين - محلول حامض الخليك - كحول - فورمالين - محلول روزمان .

٢- يزال الشمع من القطاعات ، ثم تمرر فى سلسلة تنازلية من الكحولات حتى تصل إلى الماء المقطر .

٣ - توضع القطاعات فى محلول " نيتروسليلوز nitro cellulose" فى خليط من الكحول المطلق والايثير بنسبة ١:١ .

٤ - تنقل القطاعات لاكسدتها فى محلول " حامض بيرأيوديك " تركيزه ٠,٥٪ لمدة ١٠ دقائق .

٥ - تغسل القطاعات جيدا بماء الصنبور الجارى .

٦- تنقل القطاعات إلى محلول " دايميدون dimedon" ، تركيزه ٥٪ فى الكحول المطلق لمدة ٣ ساعات عند ٦٠° م .

٧ - يتم غسل القطاعات بماء الصنبور الجارى .

٨ - تصبغ بعد ذلك فى محلول " شف " لمدة ١٠ دقائق .

٩ - تغمر القطاعات سريعا فى محلول مائى من " بايسلفيت الصوديوم Sodium bisulphite (ميتا ثانى كبريتات الصوديوم) بتركيز ٠,٥٪ .

١٠ - تغسل القطاعات تحت الماء الجارى لمدة ١٠ دقائق .

١١ - ينزع الماء من القطاعات بإمرارها فى سلسلة تصاعدية من الكحولات ، وبعد ذلك يتم ترويقها وتغطيتها بمحلول " بلسم كندا "

النتيجـــة :

يصبغ الجليكوجين باللون الأحمر الداكن .

طريقة كارمين بست : Best's carmine method (Best , 1905)

(تستخدم القطاعات الشمعية والثلجية المجمدة).

المـــواد :

أ – محلول كارمين بست المختزن : Best's carmine stock solution

* كارمين	Carmine	٢ جرام
* كربونات البوتاسيوم	Potassium carbonate	جرام واحد
* كلوريد البوتاسيوم	Potassium chloride	٥ جرام
* ماء مقطر	distilled water	٦٠ ملليلتر

– يتم غليان المحلول باحتراس لمدة ٥ دقائق .

– يترك المحلول ليبرد ثم يرشح .

– يضاف للرشيح .

* أمونيـا (٨٨٠,٠٠)	ammonia (880,00)	١٠ ملليلتر

ب – محلول كارمين بست الصبغي : Best's carmine staining solution

* المحلول السابق المخزن	Stock solution	١٢ ملليلتر
* أمونيا (٨٨٠.٠٠)	Ammonia (880.000)	١٨ ملليلتر
* كحول ميثيلى	Methily alcohol	١٨ ملليلتر

جـ - محلول بست التمييزي : Best's differentiator

* كحول مطلق	Absolute alcohol	٨ ملليلتر
* كحول ميثيلي	Methily alcohol	٤ ملليلتر
* ماء مقطر	Distilled water	١٠ ملليلتر

الطريقـــــة :

١ - تنقل القطاعات المجمدة (بعد تميؤها) من الماء الى ٧٠٪ كحول .

٢ - أما القطاعات الشمعية ، فيزال منها الشمع ، وتنقل خلال سلسلة تنازلية من الكحولات حتى تصل إلى ٧٠٪ كحول أيضا .

٣ - يفضل وضع القطاعات - إذا أمكن - في محلول " سيللويدين "Celloidin" تركيزه ١٪ لمدة دقائق .

٤ - تغسل القطاعات في ماء الصنبور .

٥ - يمكن صباغة الأنوية في محلول " هيماتوكسلين - الشب alum haematoxalin لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة .

٦ - الغسيل مرة ثانية في ماء الصنبور .

٧ - تترك القطاعات في محلول " كارمين " بست الصبغي (ب) لمدة ٣٠ دقيقة .

٨ - يتم تمييز القطاعات في محلول " بست " (جـ) ثلاث تغييرات على مدة ٢٠ ثانية .

٩- تغسل القطاعات سريعا في كحول " ٩٠٪ " .

١٠ - تنقل إلى الكحول المطلق (١٠٠٪) .

١١ يتم الترويق في الزيلول .

١٢ - تغطى القطاعات بإحدى المادتين اللاصقتين : DPX أو بلسم كندا .

النتيجــــة :

- يكتسب الجيليكوجين لونا احمر مميزا .
- تصبغ الأنوية باللون الأزرق .

كاشف دياستيز (الشعير) لإثبات وجود الجليكوجين :

"Diastase digestion for glycogen

- يتم إعداد المحلول التالى :

* دياستيز الشعير	Malt diastase	٥٠٠ ملليجرام
* محلول فوسفات المنظم (٠٢, جزءين) أسه الهيدروجينى (٦)	0.02 M Phosphate buffor , PH (6.0)	٥٠ ملليلتر
* كلوريد الصوديوم	Soduim chloride	٤٠٠ ملليجرام

الطريقــــة :

١ - يتم توصيل القطاعات حتى الماء .

٢ - توضع القطاعات فى محلول " دياستيز " سابق الذكر لمدة (ساعة) عند ٢٢° م أو (٤٠ دقيقة) عند ٣٧° م

٣ - تصبغ القطاعات بصبغ الجليكوجين الذى استخدم فى القطاعات المقابلة (أو التى لم تتعرض لتأثير ذلك الإنزيم) .

٤ - تشطف القطاعات بالماء .

٥ - ينزع الماء ويتم الترويق والتغطية حسب المعتاد .

ملحوظــة :

يمكن استخدام اللعاب بدلا من دياسيتز الشعير لنفس الغرض نظرا لاحتوائه على

انزيم " اميليز amylase " المذيب للجليكوجين أيضا .

النتيجـــة :

يستدل من عدم ظهور الصبغ فى تلك القطاعات أن المادة التى سبقت صباغتها بدون التعرض للانزيمات هى مادة الجليكوجين وذلك لأنها أنابيب بواسطة تلك الإنزيمات الخاصة بذلك .

صباغة المواد المخاطية : (طريقة سوثجيت ، ١٩٢٧)

Staining of Mucosubstances (Mucins or mucopolysaccharides) - Sowthgate , 1927.

المحـلول الصبغـي Staining solution

المـــــــواد :

* كارمين Carmine جرام واحد
* هيدروكسيد الألومنيوم aluminium hydroxide جرام واحد
* ماء مقطر distilled water ٥٠ ملليلتر

يرج هذا المحلول جيدا ، ثم يضاف له :

* كلوريد الألومنيوم aluminium chloride ٥٠٠ ملليجرام

طريقـة التحضـــير :

١ – يتم غليان هذا الخليط لمدة ٣ دقائق .

٢ –يترك حتى يبرد وتصل درجة حرارته درجة حرارة الحجرة أو المعمل .

٣ – يضاف كحول تركيزه ٥٠٪ حتى يستعاد الحجم الأصلى للمحلول .

٤ – يتم ترشيح المحلول . وبذلك يصبح صالحا للاستعمال .(يظل هذا المحلول بحالة صالحة لمدة عام كامل بشرط حفظه عند ٤° م .)

٥ – يراعى عند استعمال تخفيف المحلول بنسبة ١:٤ باضافة الماء المقطر .

طريقـة الصباغـة :

١ – إذا كان مطلوبا صبـاغة الأنوية ، تصبغ أولا بواسطة الهيماتوكسلين بالطريقة المعتادة ثم تغسل القطاعات بالماء المقطر لمدة ٥ دقائق ويتبع ذلك التمييز فى الكحول المحمض Acid alcohol (١٪ حامض هيدروكلوريك مركز فى ٧٠٪) ثم الغسيل لمدة ٥ دقائق فى ماء الصنبور .

٢ – سواء صبغت الأنوية أو لم تصبغ ، توضع القطاعات – بعد غسلها بالماء المقطر فى محلول صبغ الكارمين لمدة ٣٠ دقيقة .

٣ – تغسل القطاعات فى ماء الصنبور لمدة ١٢ دقيقة .

٤ – ينزع الماء فى سلسلة متصاعدة من الكحولات .

٥ – الترويق فى الزيلول ، ثم التغطية بمادة DPX .

النتيجـــة :

- تأخذ المخاطيات لونا أحمرا .
- .... والأنوية اللون الأزرق .

الكشف عن عديدات التسكر المخاطية الحمضية :

Detection of acid mucopolysaccharides (Steedman , 1950)

طريقة أزرق السيان : Alcian blue method

المحـــلول الصبغـي : Staining solution

أ – محلول السيان (أسه الهيدروجيني ٢,٥) Alcian blue solution (PH . 2.5)

* أزرق السيان Alcian blue جرام واحد
* كحول مطلق (١٠٠٪) Absolute alcohol ٣٠ ملليلتر

* ماء مقطر Distilled Water ٧٠ ملليلتر

الطريقــــة :

١ – يتم توصيل القطاعات حتى الماء المقطر .

٢ – تصبغ القطاعات فى المحلول الصبغى لمدة ١٥ دقيقة .

٣ – تمرر القطاعات سريعا فى كحول (٩٥٪) .

٤ – يتم الترويق كالمعتاد والتغطية بالمحلول اللاحق DPX .

النتيجــــة :

– تصبغ السكريات المخاطية الحمضية باللون البنفسجى .

– تصبغ الأنوية باللون الأزرق .

ملحوظــــة :

(ظاهرة وضوح لونين مختلفين نتيجة استخدام محلول صبغى واحد يطلق عليها " تعدد الصبغ أو ميتاكروماسيا Metachromasia ، وهى تحدث مع صبغات معينة ومع مواد وتراكيب معينة).

توضيح وتمييز عديدات التسكر المخاطية الحمضية والمتعادلة :

Illustraction and differentiation of acid and reutral mucoids.

طريقة أزرق السيان – شف حامض بيرأيوديك :

Alcian blue - PAS method (Mowry , 1956).

المحلـول الصبغـي : Staining Solution

– محلول أزرق السيان (أسه الهيدروجينى ٢,٥)

Alcian blue solution (PH. 2.5)

- محلول شف — Schiff's reagent
- ١٪ حامض بيرأبوديك — 1% Periodic

الطريقـــة :

١ - يتم إنزال القطاعات حتى الماء المقطر .

٢ - تصبغ فى محلول السيان — ٥ دقائق

٣ - تغسل فى الماء المقطر .

٤ - تؤكسد فى حامض بيرأيوديك — ٥ دقائق

٥ - تصبغ فى محلول شف — ٨ دقائق

٦ - تغسل جيدا فى ماء الصنبور الجارى — ١٠ دقائق

(يمكن عند اللزوم اجراء صباغة خلفية فى محلول هيماتوكسلين - ماير Mayers haematoxylin وعندئذ يتم التمييز فى ١٪ كحول محمض (ملليلتر واحد من حامض الهيدروكلوريك المركز فى ١٠٠٠ ملليلتر كحول ٧٠٪).

٧ - فى كلتا الحالتين ، يتم انتزاع الماء كالمعتاد فى سلسلة متصاعدة من الكحولات ، والترويق فى الزيلول ثم التغطية بمحلول DPX .

النتيجــة :

* تصبغ المخاطيات الحمضية باللون الأزرق .
* وتصبغ المخاطيات المتعادلة باللون الأحمر .
* وتصبغ الخليط منهما باللون البنفسجي.

توضيح حامض الاسكوربيك : Detection of Ascorbic acid (Jensen , 1956)

المحلول الصبغي : Staining solution

* نترات فضة	silver nitrate	١٠ جرام
* حامض خليك (بتركيز ٣٪)	3% acetic acid	١٠٠ ملليلتر

الطريقـــة :

١ – يتم تحضير قطاعات شمعية (سمكها حوالى ١٠ بيكرونات).

٢ – تلصق القطاعات على شرائح اسطحها مغطاة بمادة الاليومين اللاصقة ، وتترك ليلة كاملة عند درجة حرارة ٣٧°م.

٣ – توضع القطاعات (بما عليها من شمع) فى المحلول الصبغى (١٠٪ نترات الفضة فى حامض الخليك) لمدة ٦ – ١٤ ساعة .

٤ – تغسل الشرائح فى ٩٥٪ كحول ، ثم تنتقل الى كحول مطلق (١٠٠٪) .

٥ – توضع فترة كافية فى الزيلول لازالة الشمع واتمام التروبق .

٦ – تغطى القطاعات بمحلول لاصق مناسب .

النتيجـــة :

– يصبغ حامض الاسكوربيك باللون البنى الداكن المائل الى السواد .

ملحوظة : تحفظ هذه التحضيرات بعد ذلك فى مكان مظلم .

طريقة "باكس" لتوضيح حامض الأسكوربيك :

Bacchu's method for ascorbic acid demonstration .

المحلول الصبغي : Staining solution

أ –	– نترات فضة	Silver nitrate	٥ جرام
	– ماء مقطر	Distilled water	١٠٠ ملليلتر
ب –	– ثيوسلفيت الصوديوم	Sodium thiosulphate	٥ جرام
	– ماء مقطر	Distilled water	١٠٠ ملليلتر

الطريقـــة :

١ – توضع عينات الأنسجة فى زجاجة داكنة اللون بها محلول ٥٪ نترات الفضة (اسه الهيدروجينى ٢,٥٪) لمدة ٤٥ – ٦٠ دقيقة . فى فرن حرارى عند ٥٦° م .

٢ – تغسل بالماء المقطر ١٠ – ١٥ دقيقة .

٣ – توضع فى ٥٪ محلول سلفيت الصوديوم ٥٠ دقيقة

٤ – يتم انتزاع الماء من هذه العينات بواسطة " ديوكسان "

٥ – تطهر العينات فى شمع البرافين كالمعتاد .

٦ – تعد منها قطاعات سمكها : ٦ – ١٠ ميكرونات وتلصق على شرائح نظيفة .

٧ – تترك القطاعات حتى تجف ، ثم يزال منها الشمع وتمرر خلال كحولات تنازلية حتى تصل إلى الماء (يمكن إجراء صباغة خلفية بواسطة الهيماتوكسلين).

٨ – بعد الغسيل ، ينزع الماء ، ويتم الترويق فى الزيلول وتلصق عليها الاغطية بواسطة " بلسم كندا " .

النتيجـــة :

* يأخذ حامض الاسكوربيك اللون البنى الداكن (المائل الى السواد).
* تصبغ الأنوية باللون الأزرق المميز .

الفصـــل الرابـــع

4

الليبيدات (الدهون وأشباه الدهون)

LIPIDS

الفصـــل الرابـــع

الليبيدات (الدهون وأشباه الدهون)
LIPIDS

نبــذة عامـــة : -

هناك ثلاثة مصطلحات تستخدم حديثا للدلالة على المواد التى كان يطلق عليها سابقا المواد الدهنية Fats وهى : " ليبويد Lipoid " - " ليبيد Lipid " و " ليبين Lipine " . وقد استخدم العالم (كين Cain - ١٩٥٠) - فى المرجع الذى وضعه عن النواحى الهستوكيميائية لهذه المواد - لفظ " ليبيد Lipid " فى نفس الموضع الذى استخدمه فيه العالم (بيكر Baker - ١٩٦٤) للدلالة على المواد التى يمكن استخلاصها من الأنسجة بواسطة " البيريدين Pyri-dine " وغير ذلك من مذيبات الدهون مثل الكلوروفورم والكحول والزيلين والبنزين وغيرها ، ولكنها لا تذوب فى الماء . . كذلك استخدم العالم بيكر لفظ " ليبين Lipine" فى نفس هذا المجال ، ولكنه قصر استخدامه على مثل تلك المواد التى تحتوى على النيتروجين وكذلك الكربون والهيدروجين والأكسجين وذلك مثل : الليسيثين Lecithin ، وكيراسين Kerasin وغيرها من المركبات الدهنية أو الليبيدات المشابهة لها .

وعلى أية حال ، فإن لفظ " ليبيد Lipid " هو أوسع المصطلحات انتشارا فى الوقت الحالى ، وهو يشير إلى - أو يدل على - الدهون أو شبيهات الدهون الموجودة بصورة طبيعية والتى لا تذوب فى الماء ولكنها تقبل الذوبان فى مذيبات الدهون المعروفة مثل الايثير والبنزين والزيلن وغيرها كما سبق ذكره .

نمط تواجد الليبيدات في الخلايا والأنسجة الحيوانية :

توجد معظم الليبيدات مرتبطة أو متحدة بالبروتينات ، ومن هذه الزاوية تتميز الليبيدات إلى نوعين أساسيين من الناحية الهستوكيميائية ، وهما :الليبيدات المرئية أو غير المقنعة والليبيدات غير المرئية أو المقنعة .

الليبيدات المرئية أو غير المقنعة : Visible or Unmasked lipids

يتميز هذا النوع بأنه يمكن الكشف عنه وتوضيحه بصورة مباشرة فى الخلايا والأنسجة باستخدام الطرق المميزة والمتخصصة لتلك المواد والتى تدخل فيها المواد الصبغية : " أسود سودان Sudan black " و " سودان -٤ Sudan IV " و" كبريتات الأزرق نيلى Nile blue sulphate ، وغيرها .

الليبيدات المقنعة أو غير المرئية : Masked or Invisible lipids

ويقصد بها الليبيدات التى لا يتم توضيحها أو الكشف عنها مباشرة بالطرق السابقة ، ويطلق هذا المصطلح بصورة خاصة على " الدهون البشرية Human Fats وذلك لأن مثل تلك الليبيدات إما أن تكون مرتبطة ارتباطا وثيقا بالبروتينات ، أو أنها محاطة بطبقة بروتينية ، بما يمنع وصول المواد الصبغية إليها .

على أنه فى كثير من الحالات ، فإن تحويل الليبيدات من مقنعة إلى غير مقنعة أو مرئية يتم بتحويل البروتينات المرتبطة بالليبيدات أو المحيطة بها إلى ليبيدات أيضا ، أو تكسير تلك البروتينات وتحللها واختفاؤها ، وقد يحدث ذلك بصورة طبيعية فى حالة تقدم العمر والشيخوخة كما يشاهد ذلك فى الخلايا العصبية للحيوانات المسنة ، أو عند تسمم الحيوانات بأنواع مختلفة من السموم .

كذلك يمكن تحويل الليبيدات من مقنعة إلى غير مقنعة بطريقة صناعية ، وذلك بمعاملة الخلايا والأنسجة التى توجد بها مثل تلك الليبيدات بالإنزيمات التى تذيب البروتينات مثل البيسين والتريسين وغيرها .

أنواع الليبيدات : Types of lipids

يتم تصنيف الليبيدات عادة إلى الأنواع الأربعة التالية :

(١) الليبيدات البسيطة Simple lipids

(٢) الستروريدات Steroids

(٣) الليبيدات المركبة Compund lipids

(٤) الكاروتينات Carotenoids

أولا : الليبيدات البسيطة : Simple lipids

هذه المواد هى استيرات الأحماض الدهنية مع الكحولات ، وهى تشتمل على أنواع التالية :

(أ) الجليسريدات : Glycerides

يطلق على هذه المواد أيضا " ثلاثيات الجليسريدات Triglycerides" أو الدهون المتعادلة " Neutral fats" وهى مواد لها أهمية خاصة من الناحية الهستوكيميائية ، وهى استيرات الأحماض الدهنية مع الجليسرول . والجليسرول - كما هو معلوم - كحول ثلاثى ، رمزه الكيميائى :

$$\begin{array}{l} CH_2OH \\ | \\ CH\ OH \\ | \\ CH_2OH \end{array}$$

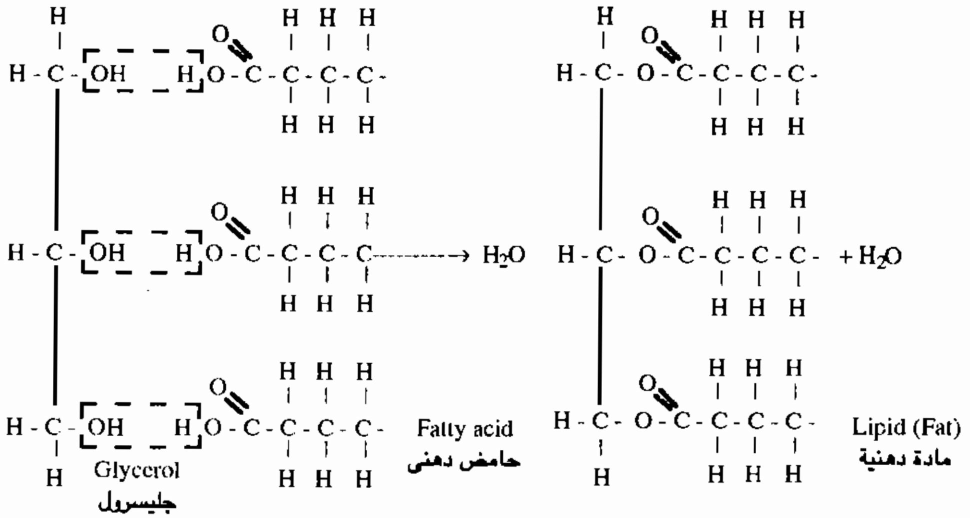
ويتحد جزىء الجليسرول مع ثلاثة جزيئات من الحمض الدهنى مكونا ثلاثى الجليسرول . فعلى سبيل المثال ، يتحد مع ثلاثة جزيئات من الحامض الدهنى بيوتيرين فى الزبد butyric acid ($C_3\ H_2y$ COOH"لتكوين المادة الدهنية أو الليبيدية " ثلاثية حامض البيوتيرين " وهو مركب اساسى فى الزبد :

$$\begin{array}{lcll} CH_2\ OH & HOOCC_3\ H_7 & CH2\ .\ O.\ CO\ .\ C_3\ H_7 & \\ | & & | & \\ CH\ \ OH\ + & HOOCC_3\ H_7\ \text{------} & CH.\ \ O.\ CO.\ C_3\ H_7 & +\ \ 3H_2O \\ | & & | & \\ CH_2\ OH & HOOCC_3\ H_7 & CH_2\ .\ O.\ CO\ .\ C_3\ H_7 & \end{array}$$

. Glycerine or . Glycerol — Butyric acid — Tributyrin

(الجليسرين أو الجليسرول) (حامض بيوتيريك) (ثلاثى البيوتيرين)

وبصـورة عامة ، فإنه يمكن تمـثيل النظام التركيبى للدهون أواللبيدات على الوجه التالى :



ومن أهم الأحماض الدهنية الموجودة فى الليبيدات متحدة مع الجليسرول هى: الباليتيك " Palmitic acid " – أى زيت النخيل – حامض ستياريك " Stearic " فى الدهون العادية ، حامض أوليك " Oleic acid " فى زيت الزيتون . وكما سبق القول ، فان الاحماض أحادية التكافؤ ، تتحد ثلاثة جزئيات منها مع جزئ واحد من الجليسرين ، أو الجليسرول . مثل ذلك "ثلاثى البيوتيرين Tributyrin " فى الزبد – ثلاثى الباليتين "Tripalmiten" ثلاثى استيارين Tristearin ، وثلاثى الأولين Trioleein " وهكذا . وتتضمن هذه الليبيدات الدهون أو الشحوم "Fats " و" الزيوت Oils " . ويجرى التمييز بينهما على النحو التالى : المواد التى توجد فى حالة صلبة عند درجة ٢٠° م تسمى الدهون او الشحوم وذلك مثل الدهون الجسمية أو الأنسجة الدهنية "adipose tissues " ، أما الزيوت فهى الليبيدات التى تكون فى حالة سائلة عند درجة الحرارة هذه وذلك مثل العديد من الزيوت النباتية والزيوت الحيوانية (زيت كبد الأسماك مثلا). وبصورة عامة ، فإن الدهون أو الشحوم هى فى الحقيقة مزيج أو خليط من تلك الاستيرات المذكورة بنسب متباينة .

(ب) الشـموع : waxes

وذلك مثل شمع نحل العسل Bees wax " ، وهى عبارة عن ستيرات الأحماض الدهنية مع كحولات بخلاف الجليسرول .

ثانيا : الإسترويدات : Steroids

تتكون السترويدات بصورة أساسية من حلقة اليفاتية متضمنة رابطة أو أكثر من الروابط المزدوجة من المواد الأليفاتية غير المشبعة بجانب بعض السلاسل الجانبية . ويشتمل هذا النوع على العديد من الموادالجسمية الهامة مثل الهرمونات الجنسية وهرمونات القشرة الكظرية وفيتامين " A" وأحماض الصفراء وغيرها .

وهناك سترويدات تحتوى على مجموعة (OH-) ، ويطلق عليها " سترولات Sterols ، منها ، الكوليستيرول Cholesterol وهى من المكونات الأساسية فى دهون الصوف والغدة الكظرية والجلد والمخ وغيرها .

ثالثا : الليبيدات المركبة : Compound lipids

وهى مواد تتكون من أحد الأحماض الدهنية وأحد الكحولات بخلاف الجليسرول ومجموعات إضافية أخرى . وتشتمل هذه المواد بصورة اساسية على الانواع التالية :

(أ) الفسفوليبيدات أو الليبيدات الفسفورية : Phospholipids

تتكون هذه المواد بصورة عامة من : احماض دهنية + جليسرول (أو أى مادة كحولية أخرى) + حامض فسفوريك + احدى القواعد النيتروجينية التى قد تكون " كولين Choline أو سيرين Serine" أو غيرها . وتكون هذه المواد جزءا أساسيا من تركيب مادة البروتوبلازم ومن أهم هذه المواد : " ليسيتين Lecithin " ، " كيفالين Kephalin ، وهما يتشابهان فى أن رمز الأحماض الدهنية فى كليهما : R. COOH , R. COOH .

ويحتوى ليسيتين على القاعدة النيتروجينية كولين ، كيفالين ولكنها تحتوى على ايثانول أمين ، وفيما يلى التركيب الكيميائى لكل منهما :

• $CH_2 . O. CO . R$

• $CH_2 . O. CO . R$

O

• $CH_2 . O.$ CH_3

$P-O-CH_2$ $CH_2 - N$ CH_3

ON CH_3

ليسيتين Lecithin (كولين)

• CH_2 O. CO . R

• CH O. CO . R

. O

• CH_2 O. $P-O-CH_2 - CH_2NH_2$

OH

كيفالين Kephalin .

ومن أمثلة هذه المركبات أيضا مادة " سفنجوميلين Sphingomyelin" التى تحتوى على مركب " سفنجوزين Sphingosine 3 وهو أحد الكحولات الغينية + أحد الأحماض الدهنية + القاعدة النيتروجينية " كولين Choline " + حامض الفسفوريك . وتوجد هذه فى المخيخ والاعضاء الاخرى الغنية بالفوسفوتيدات. ويلاحظ فى هذه الحالة أن مادة " سفنجوزين " قد أخذت مكان الجليسرول فى مثل تلك المركبات .

ب - الجليكوليبيدات أو الليبيدات السكرية : Glycolipids

الجيليكوليبيدات أو ماتسمى " سيربيروسيدات Cerebrosides" هى دهون محتوية على أحماض دهنية + مادة كربوهيدراتية (قد تكون جلوكوز أو جالاكتوز + كحول معقد ، مثل "سفنجوزين Sphingosine" ولكنها لا تحتوى على حامض الفسفوريك .

$CH_3 (CH_2) - CH = CH - CH - CH - CH_2$

OH NH_2 OH

سفنجوزين Sphingosine

- CH2 (CH2) 12 - CH = CH. CH (OH) - CH - CH_2. O. CH
- NH CH (OH)
- CO CH (OH) O
- R CH (OH)
- سيريبروسيد CH
- Cerebrosid CH2 OH

ومن أمثلة هذه المركبات : " كيراسين Kerasin ، فرينوزين Phrenosin وهى من المكونات الأساسية للأغشية المبلينية التى تغلف الاعصاب . وكذلك " جانجليوسيدات Gangliosides" التى تعتبر من السيريبروسيدات التى توجد بصورة أساسية فى خلايا العقد العصبية فى الجهاز العصبى .

وتتميز هذه المواد بأنه عند تحللها تعطى : حامض ذهنى + سفنجوزين + سكر أمينى يسمى حامض " نورامين Neuraminic acid + سكر جالاكتوز مع نسبة قليلة من سكر الجلوكوز . وتتركز هذه المواد بصفة خاصة فى المادة السنجابية (الرمادية) فى الجهاز العصبى خاصة المخ والحبل الشوكى وبنسبة محدودة جدا فى المادة البيضاء .

رابعا : الكاروتينات : Carotenoids

تشتمل هذه الليبيدات على الصبغات الحمراء او البرتقالية ، وذلك مثل الصبغ "الكاروتينى Carotene " فى " الجزر Carrot " وصبغ " زانثوفيل Xanthophyl " فى أوراق النبات الخضراء ، وفيتامين (أ) (الذى يوجد فى الارجوان البصرى فى خلايا شبكة العين ، وفى المخ أو صفار البيض وغيرها . وعلى ذلك فإن هذه المواد بصورة أساسية من " االهيدروكاربونات hydrocarbans ورمزها العام $C_{40} H_{66}$.

كما أن هذه المجموعة تشتمل أيضا على " الفلافينات Flavines" التى تتميز باللون الاصفر وذلك مثل " لاكتوفلافين Lactoflavin" الموجود فى اللبن ، ريبوفلافين Riboflavin " أى فيتامين B_2 الموجود بكثرة فى خلايا الكبد .

أهمية الليبيدات في الخلايا والأنسجة الجسمية :

يختلف دور الدهون وأهميتها فى الأنسجة المختلفة حسب طبيعة تواجدها ومدى انتشارها وكثافتها فى تلك الأنسجة .

- فالجلسرولات تعمل كمخازن للطاقة ، وبذلك تعمل كعناصر واقية ضد البرودة أو أية عوامل ضارة .
- ويلعب الليسيثين دورا هاما فى المناشط الحيوية فى الخلايا والأنسجة الكبدية .
- وتشكل الفسفوليبيدات والسيريبروسيدات جزاء هاما من الأغشية الليلينية التى تغلف الآلياف العصبية وتعمل على حمايتها .
- كما أن الإسترويدات ، وبالتحديد أحماض الصفراء تعمل على استحلاب الدهون بما يسهل تأثير الإنزيمات عليها وهضمها .
- ويلعب الكوليسترول دوراً أساسيا فى تنظيم الخواص والنشاطات الميكانيكية فى الجلد والشعر .
- بالإضافة إلى أن الاسترويدات تشكل التركيب الاساسى للهرمونات الجنسية فى المناسل والغدة الكظرية .
- هذا بجانب تواجد الليبيدات واهميتها فى العديد من الخلايا والانسجة النباتية والحيوانية .

والمعروف ان المواد الليبيدية متواجدة بصورة عامة فى معظم الأنسجة ومخازن الدهون المختلفة فى الجسم . ويوجد الدهن المختزن دائما على هيئة دهون متعادلة " neutral fats " أو ثلاثية الجليسرولات ، بينما تتكون دهون الأنسجة من خليط من دهون متعادلة وفسفوليبيدات . ويمثل النوع الأول الدهون أو الليبيدات المختزنة ، بينما تشكل الفسفوليبيدات الدهون الرئيسية أو الأساسية وذلك من مكونات السيتوبلازم فى هذه الخلايا والانسجة .

وفى حالة التصويم أو التجويع طويل المدى ، يحدث تناقص واضح فى الدهون المتعادلة بينما لا تتأثر الفسفوليبيدات كثيرا وذلك لانها تلعب دورا هاما فى النشاطات الخلوية .

وعلى ذلك تتميز هذه الليبيدات الى نوعين رئيسين وهما : الدهون المتغيرة والدهون الثابتة .

أ- الدهون المتغيرة : Variable fats

وهى تتكون من الدهون المتعادلة أو ثلاثية الجليسرولات ، وتمثل الدهون المختزنة فى الخلايا والانسجة ، وتتوقف كميتها على الحالة الغذائية للحيوان ، حيث توجد بوفرة فى الحالات عادية التغذية ولكنها تقل تدريجيا فى حالات الصوم أو الجوع .

ب - الدهون الثابتة : Constant fats

وتتكون من الفسفوليبيدات ، وتمثل جزءا رئيسيا من تركيب البروتوبلازم ، ولا تتأثر بحالات التصويم ، أو التجويع ، وذلك لاهميتها فى النشاطات الحيوية فى الخلايا والأنسجة .

وفى حالات معينة ، مثل التسمم بالزرنيخ أو الفسفور أو الكلوروفورم ورباعى كلوريد الكربون أو الإصابة بعدوى من الفيروسات أو البكتريا ، يشاهد ارتفاع معدل الدهون فى خلايا الكبد بصورة خاصة ، وذلك لأن الكبد يلعب دورا هاما فى العمليات الحيوية فيما يتعلق بالمواد الدهنية . والمعروف أن الكبد يحتوى على ٤٪ من المواد الدهنية فى الجسم كله ، منها ٢٥٪ دهون مختزنة، ٧٥٪ دهون أساسية ثابتة . ويلاحظ أن معدل الدهون المختزنة يرتفع خلال الفترات الأولى للتصويم أو التجويع ، وذلك لأن الدهون ترد إلى الكبد من المخازن الجسمية فى تلك الحالات لكى تتم أكسدتها وتوزيعها على أجزاء الجسم المختلفة . وعندما تنفذ هذه الدهون المختزنة ، يحدث تناقص تدريجى فى معدلات الدهون فى الخلايا الكبدية .

الكشف عن الليبيدات في الخلايا والأنسجة الجسمية :

تجدر الإشارة الى أن هذه المواد تتطلب طرقا خاصة بها وذلك نظرا لسهولة ذوبانها فى مذيبات الدهون التى تستخدم فى التحضيرات العادية ، ويفضل جدا استعمال القطاعات الثلجية أو المجمدة " ولكن يمكن التميز بين المواد الليبيدية وغير الليبيدية.! تتبع طريقة (بيكر Baker) عام ١٩٤٦ وهى طريقة استخلاص تلك المواد بواسطة البيريدين Pyridine " عند درجة ٦٠م على أنسجة مثبتة فى محلول بوان الضعيف ، وهو مثبت يسمح باستخلاص الفسفوليبيدات بواسطة البيريدين .

وهناك مواد أخرى تعمل على استخلاص تلك الدهون ، وذلك مثل : الاسيتون الذى يزيل أو يستخلص الجليسرولات والكوليسترول عندما يكون باردا . أما اذا استعمل ساخنا سنخلص السريبروسيدات . ويعمل الايثير الساخن على ازالة الليسيثين والكيفالين . بينما يعمل الكلورفورم على استخلاص جمع الدهون أو الليبيدات .

وبصورة عامة تتم عملية الاستخلاص فى هذه الطريقة على مدى ٢٤ ساعة فى ثلاثة تغييرات من مادة الاستخلاص هذه . وبعد اتمام عملية الإذابة أو الاستخلاص توضع الانسجة – بصورة سريعة – فى سلسلة تنازلية من الكحولات حتى تصل الى الماء ، ثم يتم تجميدها وتصبغ تلك القطاعات الثلجية أو المجمدة فى صباغة متخصصة للدهون مثل " اسود سودان " Sudan Black B

بعض الطرق المميزة لأنواع الليبيدات المختلفة :

فيما يلى جدول يبين الانواع الرئيسية لليبيدات وبعض الطرق المميزة لها :

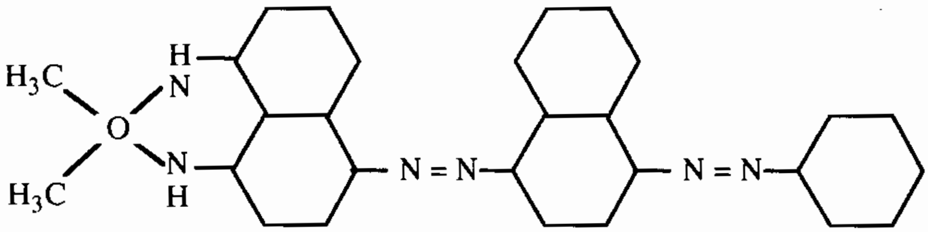
نـوع الليبيـدات	الطرق الخاصة بها
أ – الدهون المتعادلة (ثلاثية الجليسرولات) • Neutral lipids • (Triglycerides) .	– أسود سودان ب • Sudan black B – سودان ٤ •Sudan IV – أحمر الزيت أ • Oli red O
ب – الفسفوليبيدات • Phospholipids	– أسود سودان ب • Sudan black B – الهيماتين الحمضى • Acid heametien
جـ – الليبيدات السكرية • Glycolipids	– أسود سودان ب • Sudan black B – شف – حامض بيرأيوديك • Periodic acid schiff

طريقة اسود سودان ب : Sudan black B

(بيكر ١٩٥٦ - Baker 1956)

- تفضل أنسجة خصية الفأر - وأمعاء وكبد فأر حديث التغذية .

- يفضل تثبيت الأنسجة فى محاليل الفورمالين بصورة عامة ، أو محلول أوياما Aoyama أو الكرومات وذلك للقطاعات الثلجية أو المجمدة Frozen Sections .



أسـود سـودان

المحاليل المستخدمة :

- ١٪ حامض كروميك (1% Chromic acid) ١٥ جزء
- ٢٪ حامض اوزميك (2% Osmic acid) ٤ أجزاء

محلول أوياما :

- كلوريد كادميوم (Caodmium chloride) جرام واحد
- فورمالين متعادل (Neutral formalin) ١٥ ملليلتر مكعب
- ماء مقطر (Disitlled water) ٨٥ ملليليتر مكعب

محلول فلمنج (بدون حامض الخليك)

(Fleming without acetic acid " FWA ")

- ١٪ حامض كروميك (1% chromic acid) ٦٠ ملليليتر
- ٢٪ حامض اوزميك (2% osmic acid) ١٦ ملليليتر

الطريقـــة :

بالنسبة لمحلول أوياما :

- يتم تثبيت القطاعات لمدة يومين أو ثلاثة أيام .
- اغسل بالماء الجارى ٥ – ٨ ساعات .

وبالنسبة لمحلول فلمنج :

- يتم التثبيت لمدة ساعتين.
- تغسل بالماء الجارى لمدة ٢٤ ساعة .
- توضع العينات فى محلول جيلاتينى خفيف لمدة ١٢ ساعة .
- ثم فى محلول جيلاتينى ثقيل لمدة ٨ ساعات .
- يتم تقطيع قطاعات ثلجية أو مجمدة بالميكروتوم الثلجى ، ويتم لصقها على شرائح زجاجية نظيفة عليها فيلم جيلاتينى (وذلك عن طريق وضع الشرائح النظيفة فى محلول جيلاتينى مجفف فى فرن دافىء لمدة ٢٤ ساعة ، ثم تصفى وتحفظ فى علبة نظيفة بعد مسح أحد اسطحها جيدا وترك السطح الثانى " مجيليتنا " ومعلوما .
- لكى تلتصق القطاعات جيدا تعرض لبخار فورمالين مركز فترة من الوقت (١٠ – ١٥ دقيقة) .
- تغسل الشرائح فى ماء جارٍ لمدة ١٥ دقيقة .
- تنقل الشرائح إلى ٥٠ ٪ كحول لمدة ٣ دقائق.
- ثم إلى ٧٠٪ كحول لمدة دقيقة واحدة .
- تصبغ القطاعات فى محلول أسود سودان " ب " :

محلول مشبع من الصبغ فى ٧٠٪ كحول (ويفضل ترشيحه قبل الاستخدام) وذلك لمدة ١٠ دقائق .

- يتم تمييز القطاعات (أى ازالة الصبغ الزائد بوضعها فى ٥٠٪ كحول لمدة دقيقة أو أكثر ، ويفضل ضبط ذلك بالفحص الميكروسكوبى حتى يتم التوصل إلى درجة الصبغ المطلوبة) .

- يوقف التمييز بوضع القطاعات فى الماء المقطر .

- يتم تغطية القطاعات بأحد المحاليل اللاصقة المناسبة مثل الجليسرين الجيلاتينى "Giycerine jelly" أو عصير أباثى Apathy syrup .

ويتم تحضيرهما بالصورة الاتية :

محلول الجليسرين الجيلاتيني :

* جيلاتين	Gelatin	١٠ جرام
* ماء مقطر	Distlielled Water	٦٠ ملليلتر
* جلسرين	Glycerine	٧٠ ملليمتر
* بلورات فينول	Phenol crystsls	٢٥٠ ملليجرام

وفى هذه الحالة يذاب الجيلاتين فى الماء المقطر على نار هادئة ثم يضاف الجلسرين الصون اتلزجى ويحفظ المحلول فى الثلاجة .

وبالنسبة لعصير أباثي : Apathy syrup

* صمغ عربى	Arabic gum	٥٠ جرام
* سكر (عادى)	Cane sugar	٥٠ جرام
* ماء مقطر	Distilled Water	١٠٠ ملليجرام
* ثيمول	Thymol	١٠٠ ملليجرام

- يذاب الصمغ والسكر فى الماء المقطر بالتسخين عند درجة ٦٠° م ، ثم يضاف الثيمول لحفظ المحلول .

النتيجـــة :

تصبغ الليبيدات بلون أزرق مائل للسواد .

طريقة أحمر زيتي - أ : Oil Red o -

يتكون المحلول الصبغى من :

- أحمر زيتى - أ	Oil Red o —	جرام واحد
- فوسفات ثلاثى الايثيل	Triethyl Phosphate	٦٠ ملليلتر
- ماء مقطر	Distelled	٤٠ ملليلتر

التحضـــير :

* يضاف الماء المقطر لمحلول الفوسفات ، ثم يضاف الصبغ (أحمر زيتى - أ).
* يتم تسخين هذا الخليط حتى ١٠٠ م لمدة ٥ دقائق مع التحريك المستمر .
* يتم ترشيح المحلول وهو ساخن .
* كما يرشح دائما قبل الاستخدام .

الطريقـة :

١- توضع القطاعات الثلجية (المجمدة) فى محلول فوسفات ثلاثى الايثيل تركيزه ٦٠٪ لمدة دقيقتين .

٢ - تصبغ القطاعات فى المحلول الصبغى (بعد ترشيحه) فى درجة حرارة الحجرة العادية وذلك لمدة ١٥ دقيقة .

٣ - تشطف القطاعات فى محلول الفوسفات ثلاثى الإيثيل (بتركيز ٦٠٪) وذلك لمدة نصف دقيقة فقط .

٤ - تشطف القطاعات فى الماء المقطر .

٥ - يمكن إجراء صباغة بالهيماتوكسلين لمدة دقيقة واحدة .

٦ - تغسل القطاعات بالماء الجارى لمدة ٥ دقائق .

٧ - تغطى القطاعات بالمحلول اللاصق " الجلسرين الجيلاتينى Glycerine Jelly " .

النتائـــج :

* تصبغ الدهون باللون الأحمر .

- تصبغ الأنوية باللون الأزرق .

صبغات سودان في بروبيلين جليكول " Sudan dyes in Propylene glycol"

(يمكن استخدام " أسود سودان - ب Sudan Black B)

أو (سودان -٤ Sudan IV) .

التحضـــير :

* يتم تحضير المحلول الصبغى بإذابة جرام واحد من صبغ سودان فى ١٠٠ ملليلتر من بروبيلين جليكول بالتسخين حتى درجة ١٠٠° م وذلك لمدة بضع دقائق .

* يتم ترشيح المحلول وهو ساخن ، ثم يترك حتى يبرد .

* بعد أن يبرد المحلول الصبغى يتم ترشيحه بواسطة الصوف الزجاجى ويفضل استخدام مضخة مفرغة .

الطريقـــة :

١ - يتم إعداد قطاعات ثلجية .

٢ - ينزع الماء من القطاعات بوضعها فى " بروبيلين جليكول" لمدة دقائق .

٣ - تنقل القطاعات إلى المحلول الصبغى لمدة ٥ - ١٠ دقائق .

٤- يتم تمييز القطاعات فى (بروبيلين جليكول) دافىء لمدة ٢ - ٣ دقائق .

٥ - تشطف القطاعات فى ٥٠٪ بروبيلين جليكول .

٦ - تغسل القطاعات فى ماء مقطر .

٧ - يمكن اجراء صباغة ارضية او إضافية بالهيماتوكسلين .

٨ - تغسل القطاعات بالماء الجارى لمدة ٢ -٣ دقائق .

٩ - يتم تغطيتها بمحلول الجليسرين الجيلاتينى .

النتيجـة :

- تصبغ الليبيدات باللوان الأسود (فى حالة إستخدام " أسود سودان " أو باللون الأحمر مع سودان - ٤).
- وتصبغ الأنوية باللون الأزرق .

طريقة رباعي أكسيد الأوزميوم (للقطاعات الشمعية) :

Osmium tetroxide method for paraffin sections .

- تستخدم مثبتات " أوياما" أو " ١٠٪ فورمالين متعادل " .

المحاليل المستخدمة :

(أ) محلول مختزن من ٥ ٪ بيكرومات البوتاسيوم :

بيكرومات البوتاسيوم	Potossium dichromete	٥ جرام
ماء مقطر	Distelled water	١٠٠ ملليلتر

(ب) محلول مختزن من ٢ ٪ حامض الأوزميك :

رباعى أكسيد الأوزميوم	Osmium tetroxide	٢ جرام
ماء مقطر	Distelled water	١٠٠ ملليلتر

(جـ) محلول بيكرومات البوتاسيوم - رباعي اكسيد الاوزميوم) :

Potossium dichromete - Osmium tetraoxide solution

محلول بيكرومات البوتاسيوم المختزن (أ)	٥٠ ملليلتر
محلول رباعى اكسيد الاوزميوم المختزن (ب)	٥٠ ملليلتر

الطريقـة :

١ - يتم تشذيب أو توضيب قطعة النسيج أو العضو المثبت حتى لا يزيد سمكه عن ٤ ملليمتر .

٢ - توضع هذه القطع فى المحلول المشترك (جـ) لمدة ساعة إلى ساعتين .

٣ – يزال الماء من العينات بالطريقة المعتادة فى سلسلة كحولات متصاعدة ثم يتم ترويقها وطمرها فى الشمع وإعداد قطاعات شمعية مناسبة السمك .

٤ – يزال الشمع من القطاعات بواسطة الزيلين .

٥ – ممكن إجراء صباغة اضافية باستخدام الايوسين Eosin " سفرانين Safranin

٦ – تغطى بمحلول بلسم كندا أو المحلول اللاصق " بيرمونت "

النتيجـــة :

– تأخذ الليبيدات اللون الأسود .

– تأخذ الارضية السيتوبلازمية اللون الاحمر (فى حالة استخدام صباغة اضافية).

طريقة بيكر لصباغة الفسفوليبيدات بواسطة الهيماتين الحمضى :

"Baker's method for phospholipids by the acid haemtin

للقطاعات الثلجية :

ويفضل استخدام : المخ – الكلية – والأمعاء فى الفأر .

* ممكن استخدام محلول " أوياما " أو (١٠٪ محلول فورمالين متعادل).

المحــاليل المستخـدمة :

(أ) محلول بيكرومات البوتاسيوم – والكالسيوم :

" Potassium dichromate - Calcuim solution

* بيكرومات البوتاسيوم	Potassium dichromate	٥ جرام
* كلوريد كالسيوم	Calcium chloride	جرام واحد
* ماء مقطر	Disetlled water	١٠٠ ملليلتر

(ب) محلول بوراكس فريسيانيد : Ferricu

"Borax -Ferricyenide Solution

* بوراكس	Borax	٢٥, جرام
* فرنسيانيد البوتاسيوم	Potassium Ferricyendie	٢٥, جرام

* ماء مقطر	Disetlled Water	١٠٠ ملليلتر

(يحفظ هذا المحلول في الثلاجة).

(جـ) محلول ١ ٪ ايودات الصوديوم :

1% Sodium iodate solution

* ايودات الصوديوم	Sodium iodate	جرام واحد
* ماء مقطر	Distilled Water	١٠٠ ملليلتر

(د) محلول الهيماتين الحمضي :

* بلورات هيماتوكسلين	Haematoxylin crystals	٠,٥ جرام
* ١٪ أيودات صوديوم	1% soduim iodate	ملليلتر واحد
* ماء مقطر	Distilled Water	٤٨ ملليلتر

(يتم تسخين هذا المحلول حتى درجة الغليان ، ثم يترك ليبرد ، وبعد ذلك يضاف له ملليلتر واحد حامض الخليك Acetic Acid) .

الطريقـــة :

١ - تعد قطاعات ثلجية .

٢ - توضع القطاعات في محلول (بيكرومات البوتاسيوم والكالسيوم (رقم "أ")
لمدة ١٦ ساعة .

٣ - تنتقل مرة أخرى الى محلول " بيكرومات البوتاسيوم والكالسيوم ، جديدة
عند درجة ٦٠° م لمدة ١٦ ساعة أيضا .

٤ - تغسل القطاعات في الماء الجارى لمدة ٦ ساعات .

٥ - ثم تغسل في ماء مقطر لمدة ٥ دقائق .

٦ - تصبغ القطاعات في محلول الهيماتين الحمضى (د) عند درجة ٣٧° م ،
لمدة ٥ ساعات .

٧ - تشطف القطاعات في الماء المقطر .

٨ - تنتقل القطاعات إلى محلول (بوراكس فريسيانيد " رقم ب " عند درجة ٣٧° م

ايضا لمدة ١٦ ساعة .

٩ - تشطف القطاعات فى الماء المقطر لمدة ١٠ دقائق .

١٠ - تغطى القطاعات بمادة اللصق " الجلسرين الجيلاتينى ".

النتيجـــة :

- تصبغ الفسفوليبيدات بلون أسود أو أسود مائل للزرقة .
- تصبغ السريبروسيدات بلون أزرق فاتح أو داكن .

تجربـة اثباتيـة :

طريقة بيكر لا ستخلاص الفسفوليبيدات بواسطة الهيماتين :

Baker's Pyridine Extraction Test for Phosphoipids

(يفضل جدا اجراء هذه التجربة حيث تؤكد النتيجة السلبية وجود الفسفوليبيدات فى التحضير السابق .)

الطريقـــة :

١ - يتم تثبيت قطاعات ثلجية من انسجة لم يسبق تثبيتها فى مجلول " بوان " مخفف (٥٠ ملليلتر من محلول حامض بكريك مشبع Saturated picric Acid + ١٠ ملليلتر فورمالين + ٥ ملليلتر حامض خليك + ١٥ ملليلتر ماء مقطر .

وذلك لمدة ٣٠ ساعة.

٢ - تغسل القطاعات فى ٧٠ ٪ كحول لمدة٦٠ دقيقة .

٣ - تغسل القطاعات فى ٥٠ ٪ كحول لمدة ٣٠ دقيقة .

٤ - تغسل بعد ذلك فى ماء جار لمدة ٣٠ دقيقة .

٥ - ينزع الماء من القطاعات بوضعها فى " البيريدين " تغييرتين متتاليتين

درجة حرارة الحجرة العادية لمدة ٢٤ ساعة .

٦ - يتم الاستخلاص بوضع القطاعات فى محلول بيريدين ساخن (٦٠°م)

لمدة ٢٤ ساعة .

٧ – تغسل القطاعات فى ماء جارٍ لمدة ساعتين .

٨ – ثم تنتقل بعد ذلك الى صبغ الهيماتين الحمضى كما هو موضح فى الطريقة السابقة .

النتيجـــة :

المفروض أن الفسفوليبيدات التى صبغت فى الطريقة السابقة لا تصبغ فى هذه الحالة لان المفروض أنها قد استخلصت (اذا كانت فسفوليبيدات).

طريقة ريجود لتوضيح الليبيدات في القطاعات الشمعية :

Regaud's method for lipids in Paraffin sections

Regauds fluid

تحضير محلول "ريجود " :

* ٣٪ محلول بيكرومات البوتاسوم ٨٠ ملليلتر
* فورمالين عادى (تجارى) ٢٠ ملليلتر

الطريقـــة :

١ – يتم تثبيت العينات فى محلول " ريجود" لمدة ٢٤ ساعة .

٢ – تعامل العينات بعد ذلك فى محلول ٤٪ بيكرومات البوتاسيوم لمدة ٣ أيام عند درجة ٣٧° م مع تغيير هذا المحلول يوميا .

٣ – تغسل تحت الماء الجارى لمدة ٢٤ ساعة .

٤ – ينزع منها الماء ويتم ترويقها بالطرق المعتادة واعداد قطاعات شمعية سمكها ٥ ميكرونات تقريبا .

٥ – يزال الشمع من القطاعات ، ثم كحول ١٠٠ ٪ حتى تصل الى ٧٠٪ كحول .

٦ – تصنع القطاعات فى محلول " أسود سودان " مذاب فى ٧٠٪ كحول لمدة ١٠ دقائق .

٧ – يتم ازالة الصبغ الزائد (التمييز) بوضع القطاعات فى ٥٠٪ كحول لمدة دقيقة.

٨ – تغسل القطاعات فى الماء وتغطى بمحلول " أباثى " اللاصق أو " الجلسرين الجيلاتينى " .

النتيجـــة :

* تصبغ الدهون بلون أزرق مائل للسواد .
* وتصبغ حبيبات الشيخوخة باللون الاسود .

طريقة أسود – سودان –ب ثلاثي الايثيل :

Sudan black - B - Triethyl Phosphate

تحضير المحلول الصبغي :

– أسود سودان – ب	Sudan Black B	جرام واحد
– فوسفات ثلاثى الايثيل	Triethyl Phosphete	٦٠ ملليلتر
– ماء مقطر	Distilled Water	٤٠ ملليلتر

(يضاف الماء المقطر الى الفوسفات ثلاثى الايثيل ، ثم يضاف اسود سودان – ب لهذا المحلول المشترك ويتم التسخين حتى درجة ١٠٠° م لمدة ٥ دقائق مع التقليب المستمر . يتم ترشيح المحلول وهو ساخن ثم يرشح ثانية قبل الاستعمال مباشرة . يحفظ المحلول فى زجاجة محكمة ويرشح دائما قبل الاستخدام).

الطريقـــة :

١ – يتم إعداد قطاعات ثلجية بعد تثبيتها فى الفورمالين أو احد مشتقاته .

٢ – تنتقل القطاعات إلى محلول ٦٠٪ فوسفات ثلاثى الإيثيل لمدة ٣ – ٥ دقائق .

٣ – تصبغ فى محلول صبغ أسود سودان – ب عند درجة ٢٠° م لمدة ١٠ دقائق

٤ – تنتقل إلى ٦٠ ٪ فوسفات ثلاثى الايثيل لمدة ٣٠ ثانية .

٥ – يغسل بالماء المقطر .

٦ – يمكن إجراء صباغة إضافية بمحلول " مايركارم ألم Mayer's Carmalum " لمدة ٣ دقائق .

٧ – تغسل بالماء المقطر وتغطى بمادة الجليسرين الجيلاتينى اللاصق .

النتيجـــة :

– تصبغ جميع أنواع الليبيدات باللون الأسود .

– تصبغ الانوية باللون الأحمر .

طريقة كبريتات الأزرق نيلي Nile Blue Sulphate Method

تتبع هذه الطريقة للكشف عن الدهون الحمضية أو الأحماض الدهنية وكذلك المتعادلة – وتستخدم قطاعات ثلجية مثبته فى الفورمالين

المحــاليل :

(أ) محلول ١ ٪ الأزرق النيلي :

* بلورات الأزرق النيلى	Nile Blue	٥٠٠ ملليجرام
* ماء مقطر	Distilled water	٥٠ ملليلتر

(ب) ٢٠, ٪ أزرق نيلي :

* بلورات أزرق نيلى	Nile Blue	١٠ ملليجرم
* ماء مقطر	Distilled water	٥٠ ملليلتر

(جـ) محلول التمييز : Differentiator

* حامض خليك مركز	Acetic acid (cor.)	٥, ملليلتر
* ماء مقطر	Distilled Water	٥٠ ملليلتر

الطريقـــة :

يتم إعداد قطاعات ثلجية ، ويستخدم قطاعان معا فى كل مرة ويعاملان كما يلى :

١ – توضع القطاعات فى الماء المقطر لمدة قصيرة .

٢ – يصبغ القطاعان فى محلول (١٪ أزرق نيلى) عند درجة ٦٠° م لمدة ٥ دقائق .

٣ – يتم تمييز القطاعان فى محلول التمييز (رقم " ج") لمدة ٣٠ ثانية .

٤ – يغسل القطاعات فى ماء الصنبور .

٥ – يغطى أحد القطاعين بالماء اللاصق " الجلسرين الجيلاتينى " .

٦ – يوضع القطاع الثانى فى محلول (٠٢ , ٪ أزرق نيلى " رقم ب " لمدة ٥ دقائق عند درجة ٦٠° م).

٧ – يغسل القطاع فى ماء الصنبور .

٨– يتم التمييز فى محلول رقم (ج) لمدة ٣٠ ثانية عند درجة ٦٠° م .

٩ – يغسل القطاع بماء الصنبور ويغطى بالمادة اللاصقة .

النتيجـــة :

* يدل ظهور اللون الأزرق فى القطاع الأول على وجود دهون حمضية

* ويدل ظهور اللون الاحمر فى القطاع الثانى على وجود دهون غير حمضية أو متعادلة.

طريقة أوتان لتوضيح الدهون الحمضية (الفسفوليبيدات والدهون المتعادلة (ثلاثية الجليسرولات) والكوليسترول :

Otan's metted for the detecton of Phospholipids, Triglycerids and cholerteral

(تستخدم قطاعات ثلجية مثبتة فى الفورمالين).

المحاليل :

(أ) محلول رباعى اكسيد الاوزميوم : Osmium terroxide solution

* ١٪ رباعى اكسيد الاوزميوم 1% Osmium teltrroxide solution

* ١٪ محلول بيركلورات البوتاسيوم 1% Potassuim perchlorate

(ب) محلول الفا نافيثيل امين

وهو محلول مشبع فى ماء مقطر دافىء .

(ملحوظة : يراعى الحرص فى استخدام هذه المادة لانها من المواد المسرطنة).

الطريقـــة :

١ - توضع القطاعات الثلجيـة (بصـورة طافيـة) على سطح محلول رباعى اكسيد الاوزميوم (أ) فى وعاء محكم الاغلاق به كمية وفيرة من هذا المحلول .

٢ - تغسل القطاعات جيدا بالماء المقطر لمدة ١٠ دقائق .

٣ - تلتقط القطاعات من الماء وتوضع محلول " الفا نافثيل امين رقم ب لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة ٣٧° م .

٤ - تغسل القطاعات جيدا بالماء المقطر لمدة ٥ دقائق .

٥ - تغطى القطاعات بالمادة اللاصقة (الجليسرين الجيلاتينى) .

النتيجـــة :

- تأخذ الفسفولييبدات اللون البرتقالى - الاحمر .
- ثلاثية الجيليسرولات اللون الأسود .
- الكارليسترول اللون الأسود .

الكشف عن الليبيدات غير المشبعة باستخدام "حامض بيرفورميك - شف " :

Performic acid - schiff Method for demonstrating Unsaturated lipids .

(قطاعات ثلجية غير مثبتة أو مثبتة بالفورمالين)

المحـــاليل :

(أ) حامض بيرفورميك : Performic Acid

* ٣٠٪ حامض بيرفورميك	30 % Performic acid	٤٠ ملليلتر
* ٣٠ ٪ بيرأكسيد الهيدروجين	30 % Hydrogen Peroxide	٤ ملليلتر
* حامض كبريتيك مركز	Conc. sulphuric Acid	٠,٥ ملليلتر

* يترك هذا المزيج لمدة ساعة قبل الاستعمال .

(ب) تفاعل شف : Schiff's reagent

الطريقـــة :

١ – يتم إنزال القطاعات حتى تصل الى ماء صنبور عادى .

٢ – توضع القطاعات فى المحلول (أ) لمدة ٣٠ دقيقة

٣ – تغسل القطاعات فى ماء الصنبور لمدة ١٥ دقيقة

٤ – توضع القطاعات فى محلول شف (ب) لمدة ٤٠ دقيقة

٥ – تغسل فى الماء الجارى لمدة ١٥ دقيقة

٦ – ينزع الماء فى سلسلة متصاعدة من الكحولات .

٧ – يتم ترويق القطاعات فى الزيلين

٨ – تلتصق بواسطة الكند ابلسم

الكشف عن الجليكوليبيدات :Detection of Glycolipids

(قطاعات ثلجية غير مثبتة أو مثبتة بالفورمالين)

المحـــاليل :

(أ) حامض بيرأيوديك (٠,٥ ٪) : Periodic Acid (0.5%)

* حامض بيرأيوديك	Periodic Acid	٥٠٠ ملليجرام
* ماء مقطر	Distilled Water	١٠٠ ملليلتر

(ب) محلول (كاشف) شف . Schiff's reagent

الطريقـــة :

١ – تصل القطاعات حتى الماء .

٢ – توضع القطاعات فى حامض بيرأيوديك ٥ دقائق

٣ – تغسل فى ماء الصنبور ٣ دقائق

٤ – توضع فى محلول (كاشف) شف ٢٠ دقيقة

٥ – تغسل فى ماء الصنبور ٢٠ دقيقة

٦ – تجرى صباغة ارضية أو اضافته فى كارم ألم ٥ دقائق

٧ – تغسل فى ماء الصنبور .

٨ – يتم تميز القطاعات ٥ ثوانٍ

٩ – تغسل فى ماء الصنبور .

١٠ – تلصق باستخدام الجليسرين الجيلاتينى .

النتيجـــة :

– تصبغ الجليكوليبيدات والمخاطيات باللون الاحمر .

– تصبغ الانوية باللون الازرق .

ملحوظات هامة :

عند استخدام هذه الطريقة لتوضح الجليكوليبيدات بصورة خاصة يراعى الآتى :

(١) استخدام طريقة أحمر زيتى Oil Red أو اسود سودان " للتحقق من اماكن تواجد الجليكوليبيدات .

(٢) يجب توحيد الالدهيدات .

وذلك باستخدام الطريقة الآتية :

المحاليل :

(أ) **محلول أنهيدريد الخليك** Acetic anhydride solution

* انهدريد الخليك Acetic anhydride ١٦ ملليلتر

* بيريدين جاف Dry Pyridine ٢٤ ملليلتر

(ب) **محلول هيدروكسيد البوتاسيوم** Potassium hydroxide solution

* هيدروكسيد البوتاسيوم	Potassium hydroxide	جرام حد
* كحول مطلق	Absolute alcohol	٧٠ ملليلتر
* ماء مقطر	Distilled water	٣٠ ملليلتر

(جـ) ١ ٪ حامض بيرايوديك 1% Periodic Acid solution

(د) كاشف شف . Schiff's reagent

الطريقـــة :

١ - يتم توصيل ثلاثة قطاعات مرقمة (١- ٣) إلى الماء المقطر .

٢ - يوضع القطاعـان (٢,١) فى محلول انهيـدريد الخليك لمدة ١ - ٢٤ سـاعـة ويتـرك القطاع الثالث فى الماء المقطر .

٣ - يغسل القطاعان (٢,١) فى الماء المقطر - سريعا .

٤ - يوضع القطاع (رقم ٢) فى هيدروكسيد البوتاسيوم ٣٠ دقيقة .

٥ - ثم يغسل هذا القطاع (رقم ٢) فى الماء المقطر .

٦ - تصبغ القطاعات الثلاثة فى محلول شف بالطريقة العادية .

النتيجـــة :

- ظهور نتيجة موجبة فى القطاعين (١ . ٣) وسلبية فى القطاع (٢) يدل على أن هذه النتيجة الايجابية اثبات لوجود الجليكوليبيدات .

الكشف عن الكوليسترول والمواد المتعلقة به باستخدام تفاعل حامض بيوكلوريك نافثوكينون :

Cholesterol and related substances : Periodic Acid Napthoquinone reaction

(يفضل استخدام الغدة الكظرية)

المحـــاليل :

- ٤ حامض سلفونيك ١:٢ - نافثوكينون

1 : 2 Naphthoquinone 4 - Salphonic

١٢ ملليجرام

– إيثانول	Ethanol	٦ ملليلتر
– ٦٠٪ حامض بيرأيوديك	60% Periodic acid	٣ ملليلتر
– فورمالين مركز	Conc Formaldehyde	٣, ملليلتر
– ماء مقطر	Distilled Water	٢٠٧ ملليلتر

(يتم تحضير محلول " ايثانول – حامض بيركلوريك – الفورمالين – الماء)
أولا ثم يضاف له التفاعل المذكور اولا بعد ذلك .

الطـــريقة :

١ – يتم اعداد قطاعات ثلجية .

٢ – تترك طافية فى الفورمالين ٧ أيام

٣ – تنقل القطاعات إلى شرائح نظيفة وتترك لكى تجف فى درجة حرارة الغرفة .

٤ – توضع فى محلول التفاعل

٥ – يغلى هذا المحلول وبه القطاعات عند درجة ٦٠ : ٧٠°م لمدة ١٠ دقائق

٦ – تغطى القطاعات بحامض بيركلوريك .

النتيجـــة :

– يصبغ الكلوليسترول ومشتقاته باللون الأزرق الداكن .

ملحوظات :

١ – يبقى اللون الداكن ساعات قليلة فقط .

٢ – يلاحظ اثناء الغليان تحول لون القطاعات من الأحمر إلى الأزرق الداكن .

الكشف عن الكوليسترول الحر بواسطة « ديجيتونين» :

Detiction of free cholesterol by Digitonin

المحـــاليل :

(أ) ٥٠ ٪ كحول ايثيلي : 50% Ethyl Alcohol

* كحول ايثيلى	Ethyl alcohol	١٠٠ ملليلتر
* ماء مقطر	Distilled Water	١٠٠ ملليلتر

(ب) محلول ديجيتونين : Digitonin solution

* ديجيتونين	Digitonin	٥٠٠ ملليجرام
المحلول (أ)	Solution A	١٠٠ ملليلتر

الطريقـــة :

١ – يستخدم قطاعان ثلجيان ، احدهما للاثبات ، يضع بطريقة أحمر زيتى – أ Oil Red - O

٢ – يوضع القطاع فى المحلول (ب) لمدة ٣ ساعات فى درجة حرارة الغرفة .

٣ – يوضع فى محلول (أ) .

٤ – يترك طافياً على الشريحة .

٥ – يغطى بالجليسرين الجيلاتينى .

النتيجـــة :

– الكلوليسترول يعطى انعكاسات ضوئية : (Birefringent)

الكوليسترول له الإنعكاسات الضوئية واستحضرات الكوليسترول ويصبغ بالون الأحمر الزيتى .

الفصـــل الخامس

5

البروتينــــــــات

Proeteins

الفصـــل الخامس

البروتينــــــــــات

Proeteins

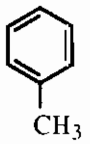
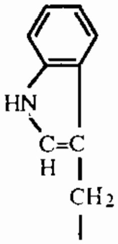
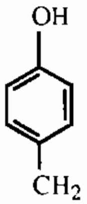
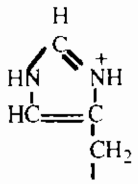
توصف المواد البروتينية بأنها مركبات "بانية للأنسجة " ، ذلك لأنها تتواجد فى جميع الخلايا والأنسجة الجسمية ، حيث تلعب دورا أساسيا فى جميع النواحى التركيبية والوظيفية لها ، وتدخل عناصر الكربون والهيدروچين والأوكسچين والنتروچين بصفة أساسية فى تكوين المركبات البروتينية ، بالإضافة إلى عناصر أخرى فى بعض الأحيان ، مثل الكبريت والفوسفور واليود والحديد . وقد ساعدت الطرق العلمية التى استحدثت خلال الحرب العالمية الثانية وبعدها مثل " الإظهار اللونى Chromatography " ، والفصل الكهربى " Electrophoresis " ، و" الترشيح الجيلاتينى " Gel Filtration فى تفهم أكثر لطبيعة تركيب البروتينات والتى تتميز بتعقيد بالغ فى معظم الأحيان .

تتكـون البـروتيـنـات من وحـدات بنائية هى " الأحـمـاض الأمـيـنيـة Amino Acids " وهى أحماض عضوية تتصل فيها ذرة كربون ألفا (المجاورة لمجموعة الكربوكسيل (-COOH) بمجموعة أمينية ($-NH_2$)، كما تتصل ذرة الكربون نفسها بشق جانبى (R) يختلف فى الطرز المختلفة من الأحماض الأمينية .

$$\begin{array}{ccc} & H & \\ & | & \\ H_2N & C & COOH \\ & | & \\ & R & \text{(side radicle)} \end{array}$$

المعادلة العامة للأحماض الأمينية

جدول (١) يوضح تركيب الأحماض الأمينية

Amino acid	Symbol	Side chain	Amino acid	Symbol	Side chain
alanine	Ala	CH_3	lysine	Lys	$\overset{+}{N}H_3$ $(CH_2)_4$
arginine	Arg	H_2N $\overset{+}{N}H_2$ C NH $(CH_2)_3$	methionine	Met	CH_3 S $(CH_2)_2$
asparagine	Asn	$CONH_2$ CH_2	phenyl-alanine	Phe	
aspartic acid	Asp	COO- CH_2	proline*	Pro	*
Cysteine	Cys	SH CH2	serine	Ser	OH CH_2
glutamic acid	Glu	COO- $(CH_2)_2$	threonine	Thr	OH CH -- CH_3
glutamic	Gln	CONH2 (CH2)2	tryptophan	Trp	
glycin	Gly	H	tyrosine	Tyr	
histidine	His		valine	Val	CH_3 CH_3 CH
isoleucine	Ile	CH_3 CH_2 CH_3 CH			
leucine	Leu	CH_3 CH_3 CH CH_2			

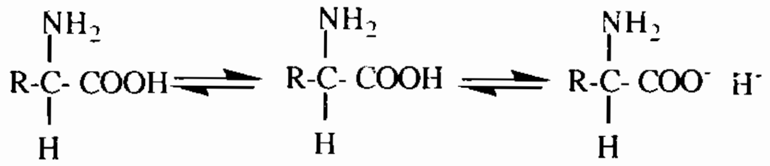
وتتكون البروتينات من سلسلة أو أكثر من الأحماض الأمينية ، مثال ذلك " هرمون الإنسولين " ، الذى توصل سانجر Sanger عام ١٩٦٤ إلى معرفة ترتيب الأحماض الأمينية داخله ، حيث وجد أن الجزىء يتركب من ٥١ حمضا أمينيا مرتبة فى سلسلتين تربط بينهما قناطر ثنائية الكبريتيد .

ويعرف فى الطبيعة عشرون من الأحماض الأمينية التى تدخل فى تركيب البروتينات (انظر الجدول رقم ١) ، فضلا عن أكثر من ثمانية من الأحماض الأمينية غير داخلة فى بناء البروتينات مثل حامض جاما أمينو بيوتريك والسترولين والأورنيثين .

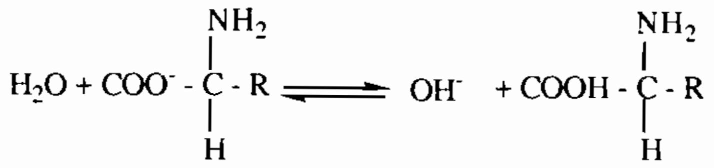
وباستعراض الأحماض الأمينية المختلفة نجد أن بعضها يحتوى على شق جانبى أليفاتى Aliphatic side chain مثل جليسين – الانين – فالين – ليوسين – أيزوليوسين ، كما يحتوى كل من : أرجنين – ليسين على مجموعتى أمين Diamino ". وعلى ذلك فهما قاعديان بينما يحتوى كل من حمض جلوتاميك وحمض أسبارتك على مجموعتى كاربوكسيل ، وعلى ذلك فهما حامضيان . ويحتوى حمضا جلوتامين – أسباراجين على المجموعة الأميدية Amide Group وحمضا ثريونين وسيرين على مجموعة هيدروكسيل ، كما يحتوي حمضا سستايين ، مثيونين علي عنصر الكبريت . ويتميز كل من : فينيل الآنين – تيروسين باحتوائه علي مجموعة أروماتية Aromatic ، أما الأحماض الأمينية : تربتوفان – برولين – هستدسين فإنها تحتوى على حلقات غير البنزين Heterocyclic .

وحيث أن المجموعتين الحامضية (الكربوكسيلية) والمجموعة القاعدية (أمينو) تتواجدان فى نفس الوقت فى جميع الأحماض الأمينية (فيما عدا البرولين الذى يحتوى على المجموعة الأمينية NH بدلا من المجموعة الأمينية NH_2) فإن للحمض الأمينى شحنة موجبة وأخرى سالبة ، وعلى ذلك فإنها كثيرا ما توصف بأنها جزيئات مزدوجة التأين Amphoteric molecules .

وعلى ذلك فالحامض الأمينى يتصرف على أقل مزدوج التأين ، بمعنى أنه يتأين كحامض ، وأيضا يتأين كقاعدة كالاتى :

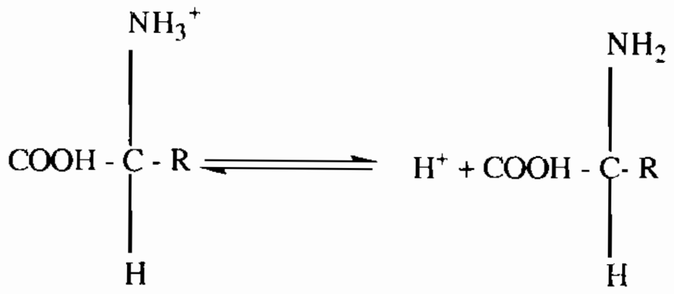


ففى المحاليل القلوية تتصرف كأحماض كالآتى :



وإذا مرر تيار كهربى خلال مثل هذا المحلول فإن أنيون الحامض الأمينى سيهاجر ناحية القطب الموجب Anode .

وعلى العكس من ذلك ، فإن الأحماض الأمينية تتصرف كقواعد فى المحاليل الحامضية كالآتى :



وإذا مرر تيار كهربى خلال المحلول فإن كاتيون الحامض الأمينى سيهاجر إلى القطب السالب Cathode .

وعلى ذلك ، فإن هجرة الأحماض الأمينية فى مجال كهربى يمكن التحكم فيها عن طريق التغيير فى درجة الحموضة أو القلوية لبيئة التفاعل . وتجدر الإشارة إلى أن لكل حامض

أمينى تركيزاً معيناً من أيون الهيدروجين . تكون عليه درجة تأين كل من المجاميع الحامضية والمجاميع القاعدية متساوية ، وتسمى بنقطة التعادل الكهربى ، عليه لا يهاجر الحامض الأمينى فى المجال الكهربى الى أى من الاتجاهين السالب أو الموجب .

الأحماض الأمينية المكونة للبروتينات :

يمكن تقسيم الأحماض الأمينية المكونة للبروتين كما يلى :

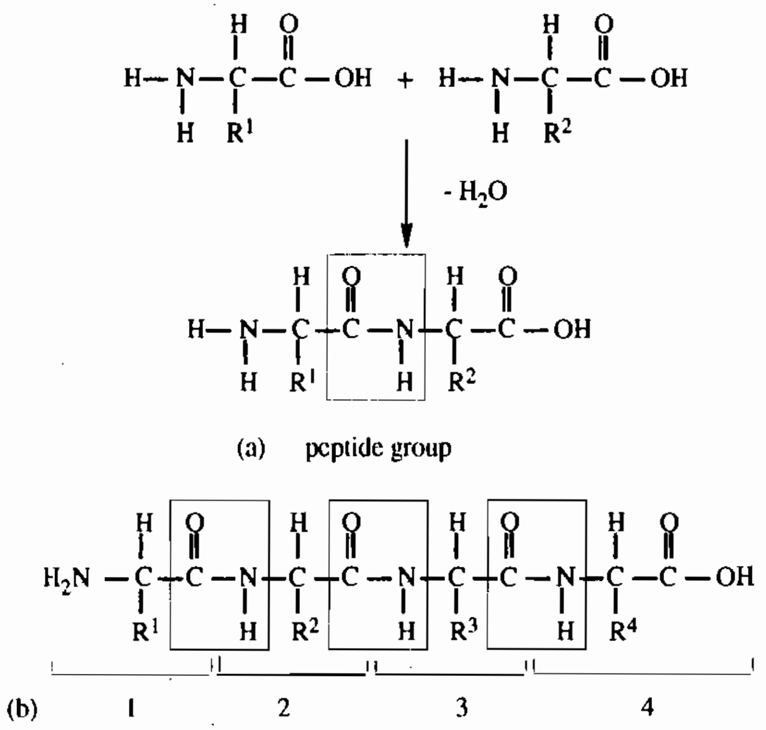
١- أحماض أمينية متعادلة ، أى تحتوى على عدد متساو من مجاميع الأمين ومجاميع الكربوكسيل ، ومن أمثلتها : جليسين – ألانين – فالين – ليوسين – أيزوليوسين – سستايين – مثيونين – سيرين – ثريونين –برولين – فينيل آلانين – تربتوفان – تيروسين – أسباراجين – جلوتامين .

٢- أحماض أمينية حامضية ، أى تحتوى على أكثر من مجموعة كربوكسيل ، ومن أمثلتها : حمض الأسبرتيك وحمض الجلوتاميك .

٣- أحماض أمينية قاعدية ، أى تحتوى على أكثر من مجموعة أمين مثل : ليسين – أرجنين – هستيدين .

ومن ناحية أخرى ، فإن كل الأحماض الأمينية تذوب فى الماء فيما عدا التيروسين الذى يذوب بقلة فى الماء الساخن . كما أن الأحماض الأمينية باستثناء البرولين تذوب فى الكحول والإثير . كما أنها لا تذوب جميعها فى محاليل الأحماض والقواعد القوية .

ويتم تكثف الأحماض الأمينية لتكوين جزىء البروتين عن طريق اتحاد المجموعة الحمضية لحمض أمينى مع المجموعة القاعدية للحمض الأمينى المجاور ، مع فقد جزىء من الماء ، وتسمى الرابطة بين - CO - NH - بالرابطة الببتيدية Peptide bond ، ويحتفظ الجزىء المتكون بخاصية التأين المزدوج ، حيث تتواجد مجموعة حامضية عند أحد طرفيه ، وتتواجد مجموعة قاعدية عند الطرف الآخر ، بالإضافة إلى وجود شق جانبى Radicle قد يكون قاعديا أو حامضيا . على ذلك فإن البروتين يعتبر مادة مجمعة أو " بوليمر Polymer " وحدته هى الحمض الأمينى .



تكوين ثنائى الببتيد وعديد الببتيد وخروج جزيئات الماء لتكوين الروابط الببتيدية

(جدول ٢) الوزن الجزيئى لبعض البروتينات :

البروتيـــن	الوزن الجزيئى
الانسولين	١٢,٠٠٠
تربسين	٢٣,٨٠٠
ببسين	٣٥,٥٠٠
البيومين المصل البقرى	٦٨,٠٠٠
الهيموجلوبين البشرى	٦٧,٠٠٠
جاما جلوبيولين البشرى	١٠٠,٠٠٠
ثيروجلوبيولين الخنزير	٦٥٠,٠٠٠
بيروفيت ديهيدروجينيز (كلية الأبقار)	٧,٠٠٠,٠٠٠
فيروس الطباق	٤٠,٠٠٠,٠٠٠

ويطلق على المركب المتكون من حمضين أمينيين اسم " ثنائى الببتيد Dipeptide ، كما أن المركب الناتج عن اتحاد عـدد قليل من الأحماض الأمـينية يوصف بأنه " قليل الببتـيد Oligopeptide ، أما اذا اتحد عدد كبير من الأحماض الأمينية ، فان المركب الناتج يسمى "عديد الببتيد Polypeptide "

وتتكون المادة البروتينية من سلسلة أو عدة سلاسل من عديد البيتيد ، وهناك عدة آلاف من الطرز المختلفة للبروتينات ، وهى تختلف فيما بينها من عدة وجوه ، منها العدد الكلى للأحماض الأمينية المشتركة فى تكوينها ، وطرز هذه الأحماض الأمينية ، وكذلك نظام ترتيبها فى جزىء البروتين ، كما ينفرد كل منها بتركيب "ثلاثى الأبعاد " Tridimentional structure " ولعل هذا التنوع العظيم للمواد البروتينية هو الذى يمكنها من القيام بآلاف العمليات الوظيفية المتباينة ، وتتميز معظم البروتينات بأنها ذات أوزان جزيئية كبيرة .

وفيما يلي موجز يوضح طرز البروتينات من الناحية الوظيفية :

١- تعتبر الإنزيمات مـوادا بروتينية ذات طبيعة خاصة تعمل كعوامل مساعدة فى التفاعلات الكيمائية التى تحدث داخل الجسم . فاذا أخذ فى الاعتبار آلاف التفاعلات الكيميائية التى تحدث فى جميع خلايا وسوائل الجسم وتراكيبه المختلفة لضمان الأداء الوظيفى لمختلف الأنشطة البيولوجية ، لأدركنا الأهمية القصوى لدور الإنزيمات . ويزيد عدد الإنزيمات المعروفة عن ألفى إنزيم . ومن أمثلة الإنزيمات "السيتوكرومات" Cytochromes التى تلعب دورا هاما فى نقل الالكترونات ، "ح د ن بوليميريز" DNA polymerase الذى يساعد فى عملية تضاعف وإصلاح حمض ح د ن ، هكسوكاينيز Hexokinase اللازم لفسفرة الجلوكوز .

٢- **البروتينات التركيبية : The Structural Proteins**

من أمثلة البروتينات التركيبية " ألفا كيراتين α – keratin " الذى يدخل فى تركيب الجلد وريش الطيور والأظافر والحوافر ، وكذلك الإلاستين Elastin "والكولاجين " Collagen اللذان يدخلان فى تكوين الأنسجة الضامة ، وكذلك مادة " سكليروتين Sclerotin التى تدخل فى تكوين الهيكل الخارجي للحشرات ، ومادة فيبروين Fibroin التى تدخل فى تكوين شرانق الحشرات وغزل العناكب .

٣- البروتينات الواقية : Protective Proteins

توجدالبروتينات الواقية ذات الطبيعة البروتينية فى دم الفقاريات وذلك مثل الأجسام المضادة Antibodies التى تحمى الجسم من الجراثيم وإفرازاتها ، والفيبرينوجين Fibriongen وهو المادة الأولية للفيبرين الذى يساعد على تجلط الدم عند النزف ، الثرومبين Thrombin اللازم لحدوث تجلط الدم أيضا .

٤- الهرمونات : The hormones

معظم الهرمونات بروتينية التركيب ، وتلعب الهرمونات دورا هاما فى تنظيم الكثير من العلميات البيولوجية ، ومن أمثلتها " الإنسولين " الذى تفرزه خلايا بيتا فى جزر لانجرهان فى البنكرياس الذى ينظم أيض السكر " وهرمون النمو " الذى تفرزه الغدة النخامية الذى ينظم نمو العظام .

٥- البروتينات الانقباضية : The Contractile Proteins

ومن أمثلها " الميوسين " و "الأكتين " Myosin and Actin والتى تكون الليفات العضلية ، وكذلك بروتين " داينين " الذى يدخل فى تركيب الأهداب والأسواط .

٦- برتينات النقل : Transport Proteins

وهى البروتينات الموكل إليها نقل بعض المركبات أو العناصر من مكان الى آخر فى الجسم وفقا لما يتطلبه النظام الفسيولوجى . ومن أمثلة ذلك " الهيموجلوبين " الذى يقوم بنقل الأكسجين فى دم الفقاريات ، و"الهيموسيانين " الذى يتولى عملية نقل الأكسجين فى بعض اللافقاريات ، الميوجلوبين " الذى يقوم بنقل الأكسجين فى الخلايا العضلية .

٧- السموم : The Toxins

تكون بعض الكائنات الحية مواد سامة ذات طبيعة بروتينية ، ومن أمثلة ذلك سموم الثعابين والسموم البكترية وسم " جوسيبين" Gossypin فى بذور القطن .

٨- البروتينات المختزنة : The Storage Proteins

قد يتم أحيانا تخزين المواد البروتينية ، مثال ذلك بروتين " البيومن (بياض) البيض Egg-white Protein "" كازين" اللبن Casein ، " الفريتين " Ferritin الذى يختزن من خلاله

الحديد فى الطحال ،" زين Zein " المختزن فى بذور نبات الذرة .

وتجدر الإشارة إلى أن عملية تخليق البروتينات تتحكم فيها الچينات الواقعة على حمض ح د ن DNA والتى يتم نسخها فى حمض ح ر ن الرسول Messenger-RNA على صورة شفرات معينة يتراوح عددها بين شفره واحدة إلى ست شفرات لكل حمض أمينى . ويتحكم حمض ح ر ن الرسول فى حجم البروتين المخلق ونوعية الأحماض الامينية الداخلة فى تكوينه وكذلك فى نظام ترتيبها . وقد وجد أن هذه الآلية لتخليق البروتينات آلية عامة ، بمعنى أنها واحدة فى كافة المخلوقات فيما عدا الڤيروسات التى لها آلية تختلف عن ذلك فى بعض التفصيلات ، ويتضح . مما سبق أن البروتينات هى المرآة التى يظهر فيها الدور الوظيفى للجينات ، ولاتقف أهمية البروتينات عند حدود وظائفها المباشرة ، بل تتعدى ذلك إلى التحكم فى تخليق ووظائف المكونات الأخرى للخلايا والأنسجة كالمواد الكربوهيدراتية والمواد الدهنية . ومن ناحية أخرى فقد وجد أن البروتينات المتناظرة فى أنواع الحيوانات المتقاربة تكون أكثر شبها لبعضها فى التركيب عن نظائرها فى الحيوانات المتباعدة تصنيفيا . ولهذا فإن تتابع الأحماض الأمينية فى جزىء البروتين له أهمية فى الدراسات التطورية والتصنيفية .

بنيان الجزيئات البروتينية :

تتباين طريقة بناء جزىء البروتين تباينا كبيرا ، ويؤثر نمط هذا البناء على الأداء الوظيفى للجزىء . وقد اوضحت الدراسات المتعددة على طريقة "انعطاف أو حيود أشعة X " X-ray diffraction بصورة أساسية أن هناك اربعة مستويات لبناء جزىء البروتين ، نوجزها فيما يلى :

أ- **البناء الأولي** : The Primary Structure

يقصد بذلك تتابع الأحماض الأمينية فى السلسلة الببتيديه التى تكون جزىء البروتين ، ويكون للسلسلة بذلك نهايتان ؛ الأولى تحمل مجموعة NH_2 حرة وتسمى " النهاية الأمينية Amino or N-terminal والثانية تحمل مجموعة COOH- حرة وتسمى النهاية الكربوكسيلية "Carboxyl or C- terminal "

ب - البناء الثانوي : The Secondary Structure

وهو نمط ثنى وامتداد السلسلة الببتيدية فى اتجاه واحد ، ويؤدى هذا الثنى إلى قصرها إلى حد كبير ، ويمكن تمييز طرازين للبناء الثانوى :

١- طراز الحلزون الفا The α - helix :

وفيه تلتف سلسلة عديد الببتيد فى مدار اهليلجى لتكون شكلاً اسطوانياً ، ترتبط فيه كل مجموعة ببتدية برابطة هيدروجينية مع مجموعتين أخريين تسبقه إحداهما بثلاث وحدات ، والثانية تليها بثلاث وحدات اخرى . ويبلغ قطر المقطع الاهليلجى ٢٣ر٠ نانوميتر ، ويحتوى على ٦ر٣ حمض أمينى لكل لفة . وتمتد السلاسل الجانبية Radicles إلى الخارج من الشكل الاسطوانى حيث أنها لا تلعب دورا فى ثباته ، بينما يضمن هذا الثبات الروابط الهيدروجينية سالفة الذكر والواقعة بين الهيدروجين المرتبط مع النيتروجين فى حامض أمينى وبين الأكسجين المرتبط مع الكربون فى الحامض الأمينى الاخر . ويتميز البروتين المكون من السلاسل من طراز الحلزون الفا (هلكس) بأنه يكون جامدا Rigid وليفيا Fibrous . ويوجد هذا الطراز فى الفا كيراتين والميوسين وجزئيا فى الهيموجلوبين .

٢- طراز بيتا B- Structure :

ويكون فيه الجزىء ممتدا تماما ويربط بين سلاسل الببتيد المتجاورة روابط هيدروجينية وقد يتكون البروتين من سلسلتين متوازيتين parallel عندما يبدأ طرفا N- terminal فى الجهة نفسها وينتهى طرفا الـ C-terminal معاً فى الجهة الأخرى . اما اذا كان الطرف N-terminal لسلسلة واقعا فى نفس جهة الطرف C-terminal للسلسلة الأخرى فان السلسلتين تكونان متعاكستى التوازى Antiparallel وكثيرا ما يتكون البروتين من عدد السلاسل متعاكسة التوازى تكون معا صفيحة Sheet ، وقد تتراص عدة طبقات فوق بعضها وترتبط معا بروابط كارهة للماء Hydrophobic ، ويطلق على التركيب عندئذ مايسمى " صفائح بيتا " B-sheets ويوجد هذا الطراز فى الياف الحرير وبيتا كيراتين الموجود فى الريش و الاظافر .

وتجدر الإشارة إلى قلة البروتينات ذات البناء الثانوى (فقط) وهى بروتينات تركيبية عموما ومن امثلتها الياف الكولاجين .

جـ - البناء الثلاثي : The Tertiary structure

يقصد بالبناء الثلاثى التركيب ثلاثى الأبعاد لجزىء البروتين . والمعروف ان لكثير من البروتينات تركيبًا عالى الاندماج Compact حيث تكون أشكالا كرية أو بيضاوية ويطلق البروتينات الكرية Globular Proteins . ويحتوى جزىء البروتين على مناطق طاوية للجزىء بطريقة غير منتظمة وذلك بصفة أساسية ، وهذه تتبادل مع مناطق قصيرة تحوى طراز حلزون الفا (هلكس) وطراز بيتا . وتوفر المناطق الطاوية ومناطق تراكيب بيتا المرونة للجزىء بينما تمثل المناطق الحاوية على تراكيب الفا هلكس الاجزاء الجامدة منه . ويربط اجزاء الجزىء بعضها ببعض روابط معينه (انظرالشكل ٤) :

* الروابط الأيونية Ionic bonds بين المجموعات متضادة الشحنة فى الاحماض الأمينيه المتقابلة مثل الليسين موجب الشحنة مع حمض الجلوتاميك سالب الشحنة .

$$-NH_3^+ \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ {}^-OOC-$$

* الروابط الهيدروجينية Hydrogen bonds بين مجموعة هيدروكسيل Hydroxyl فى التيروسين مثلا ومجموعة كربوكسيل متأينه فى حمض اسبارتك أوحمض جلوتامك .

$$-OH \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ {}^-OOC$$

* تفاعلات كارهة للماء Hydrophobic interactions بين السلاسل الهيدروكربوتية فى الفنيل آلانين ، ليوسين، أيزوليوسين ، فالين .

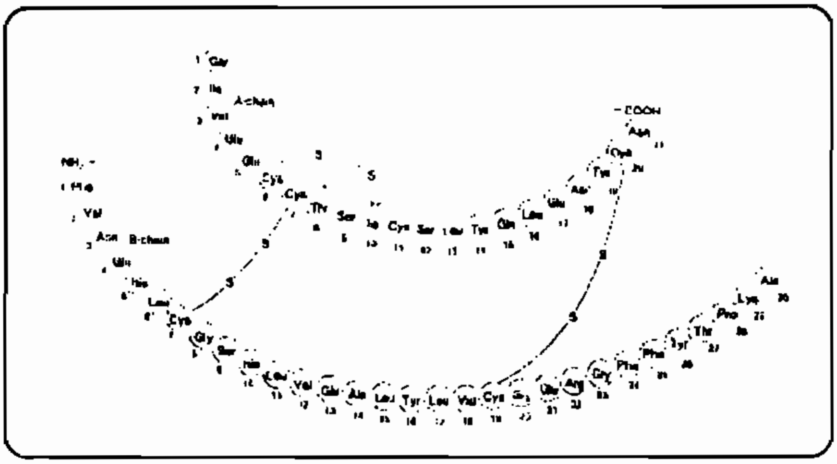
* روابط ثنائية الكبريت (قناطر) Disulphide bonds (bridges) بين مركبات السستايين Cysteine ، وهى روابط تساهمية Covalent وعلى ذلك فهى تمثل أقوى الروابط الموجودة .

وتكون المناطق الطاوية للجزىء ومناطق تراكيب الفا هلكس وبيتا بالإضافة إلى الروابط سالفة الذكر ما يطلق عليه البناء الثلاثى لجزىء البروتين . ويعزى ثبات الجزىء ونشاط البيولوجى إلى وجود هذه الروابط .كما أن هذه الروابط تؤمن أو تؤكد تشابك أحماض أمينية بعيدة عن بعضها اذا نظرنا اليها حسب البناء الأولى لسلسلة عديد الببتيد .

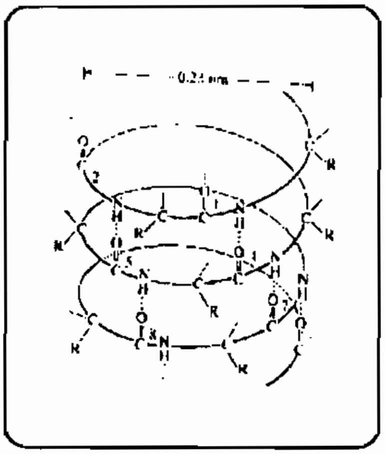
ومن أمثلة البروتينات ذات البناء الثلاثي الأجسام المضادة و البروتينات التنظيمية Regulatory proteins مثل الإنزيمات ، وهى تكون ما يسمى " البروتينات الكرية " Globular proteins ويمكن إفقاد تماسك Denaturation البناء الثلاثي لجزىء البروتين بطرق معينة ،ومثال ذلك تجارب Anfinsen Christian على إنزيم " ريبونيوكليز " RNAase، والبناء الأولى لهذا الإنزيم يوضح أنه يتكون من ١٢٤ حمضا أمينيا منها ثمانية من الحمض الأميني سستايين Cysteine يتفاعل كل اثنين منهما لتكوين اربع روابط ثنائية الكبريتيد Disulphide bridges ، ويتضح من ذلك أن البناء الأولى يحدد الشكل ثلاثي الأبعاد لجزىء البروتين (انظر الشكل ٥) ، وعند معاملة الإنزيم باليوريا وبيتا " ميركابتو ايثانول " B- mercaptoethanol فإن البناء الثلاثي للجزىء يختفى وينتج لدينا شريط ذو بناء عشوائى Random coil نتيجة تكسر الروابط ثنائية الكبريتيد سالفة الذكر، ويصاحب ذلك فقدان الجزىء لنشاطه البيولوجى أى فقدان قدرته الانزيمية (انظر الشكل ٦) ويؤدى التطرف فى درجة الأس الهيدروجينى ودرجة الحرارة العالية عادة إلى فقد تماسك الكثير من البروتينات . كما يمكن إعادة التماسك Renaturation فى بعض الحالات .

د - البناء الرباعي : Quaternary Structure

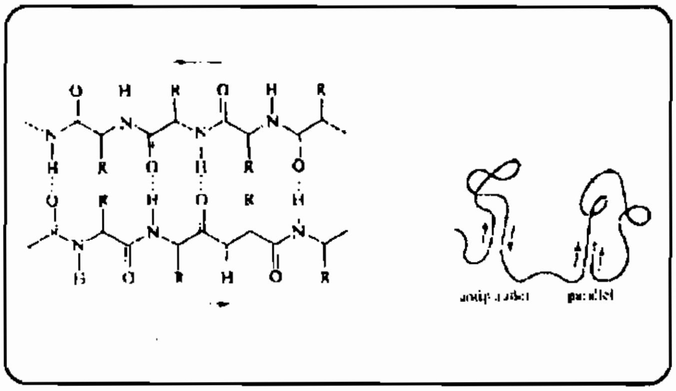
يتكون الكثير من البروتينات من أكثر من سلسلة من عديد الببتيد ، وهى تكون بذلك بناءً ارباعيا ، ولهذا البناء درجة كبيرة جدا من التنوع فى البروتينات المختلفة . ومن هذا التنوع " البلمرة Polymerization عندما يشترك فى البلمرة سلستان من عديد الببتيد ينتج لدينا " دايمر Dimer " وكثيرا ما تشترك ثلاث سلاسل أو أربع أوخمس أو ست أو أكثر مكونة البوليمر Polymer فعندما تنثنى سلسلة عديدالببتيد فإن ذلك يتم بجعل الجوانب الكارهة للماء Hydrophobic , nonpolar بعيدة عن السطح (داخلية) ، وعادة ما يتم ذلك باستثناء قدر صغير من الجزىء تظل جوانبه الكارهة للماء معرضة للخارج ، مكونه بقعة تسمى " بقعة كارهة للماء " Hydrophobic patch ، ويتم الاتحاد عند هذه البقعة فى كل سلسلة فيتكون بذلك Dimer اذا تم الاتحاد بين سلسلتين فقط (شكل ٧) . ويلاحظ أن الهيموجلوبين مثلا ذو تركيب رباعى من طراز " تتراميريك "Tetrameric" حيث أنه يتكون من تحت وحدتى الفا two alpha Subunits ، وتحت وحدتى بيتا two beta Subunits وترتبط كل واحدة من تحت الوحدات الاربع بمجموعة الهيم haem (انظر شكل ٨) ، وتحتوى كل سلسلة على حوالى ١٤٠ حمضاً أمينياً .



شكل (1) : الانسولين البشرى .

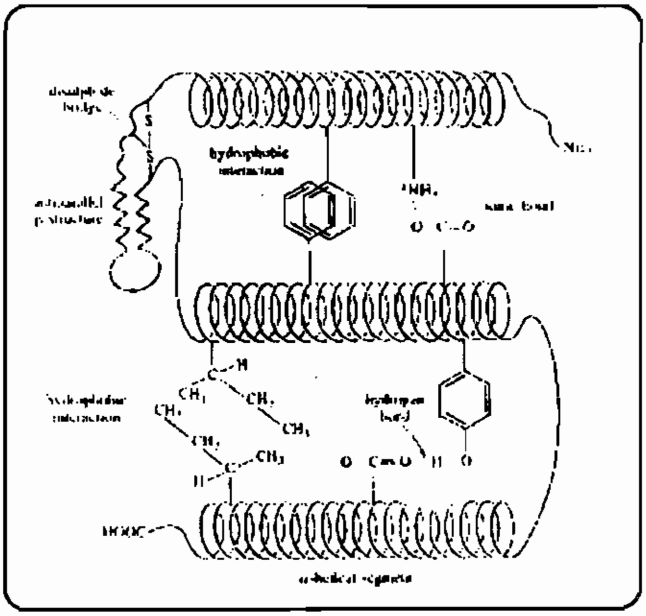


شكل (٢) : الطراز التركيبى ألفا هلكس :
لاحظ أن المجموعة الببتيدية رقم ٤ تتصل بكل من المجموعة رقم ١ والمجموعة رقم ٧ .

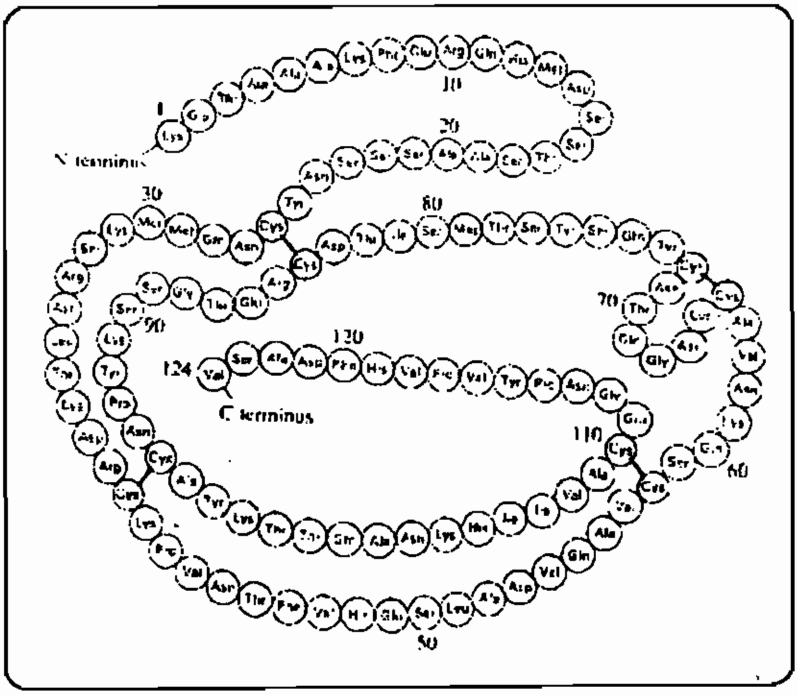


(أ) (ب)

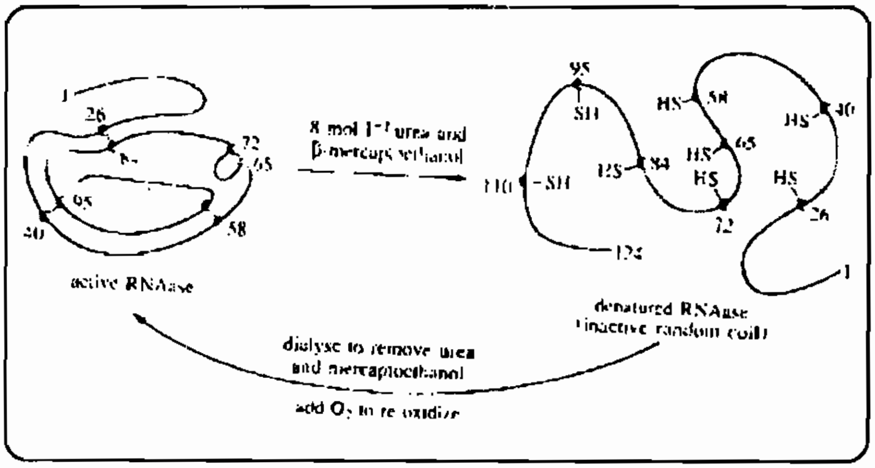
شكل (٣) : الطراز التركيبى بيتا
(أ) اتصـــال سلسلتين ممتدتين ومتوازتين عكسياً بروابط هيدروجينية .
(ب) جـــزىء واحـــد يلاحظ أن بعض أجزائه تكون متوازية وبعضها الآخر غير متوازية. لاحظ أن الأسهم تشير الى اتجاه C-terminal.



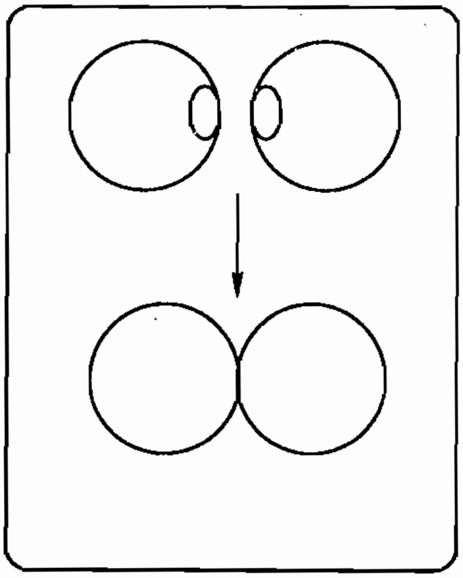
شكل (٤) :
التركيب الرباعى لبروتين كرى .
لاحظ أن النسب بين الأجزاء فى
الرسم غير مرعية.



شكل (٥) : التركيب الأولى لإنزيم ريبونيوكليز RAN-ase يوضح تتابع ١٢٤ حمضاً أمينياً . لاحظ تفاعل أربعة ازواج من السستايين لتكون اربع قناطر ثنائية الكبريتيد.

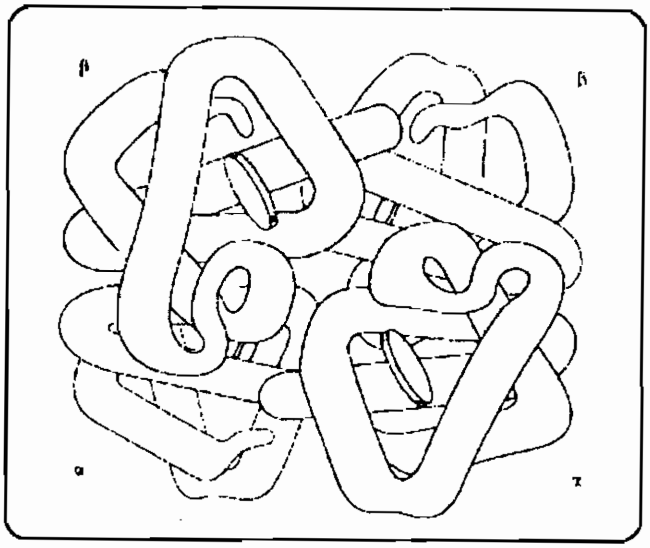


شكل (٦) : فقد تماسك إنزيم ريبونيوكليز RNA-ase ثم اعادة تماسكه .



شكل (٧) :

رسم مـبـسط يمثل تكوين الدايمر وذلك باتحـاد البقـعتين الكارهتين للماء في سلسلتين متثنيتين من عديد الببتيد



شكل (٨) : التركيب الرباعى للهيموجلوبين يتكون من وحيدتين الفا ، ووحيدتين بيتا ، الاقراص بالرسم توضح مجموعات الهيم .

تصنيف البروتينات : Classification of Proteins

يمكن تصنيف البروتينات على اسس متعددة ولا يوجد تصنيف واحد يرسم خطوطا فاصلة تماما بين المجموعات المختلفة ، والتصنيف التالى هو أكثر المتفق عليه بين المشتغلين بعلم كيمياء الأنسجة :

أولا : البروتينات البسيطة : Simple proteins

وهى تلك التى تعطى عند تحللها أحماضا أمينية أو مشتقاتها فقط . وهذه يمكن تمييزها الى مجموعتين :

١- البروتينات الليفية : Fibrous proteins

وفيها تترتب سلاسل عديد الببتيد فى الفا هلكس أو طراز بيتا " على هيئة صفائح وهى تشمل "" الكولاجين Collagen ، "و الريتكيولين Reticulin " و"الكيراتين Keratin، "والميوسين Myosin ، و"الإلاستين " Elastin ، " الفيبرووينوجين Fibrinogen "و"الفيبرين Fibrin . وهذه كلها مواد تركيبية جامدة Rigid Structural materials لا تذوب فى الماء أو المحاليل الملحية المختلفة ، فيما عدا الميوسين والفيبرووينوجين فهما يذوبان فى المحاليل المائية.

٢ – البروتينات الكرية : Gloubular poreins

وهى ذات بناء ثلاثى أو رباعى مكونة أشكالا كروية أو بيضاوية .

وهى تشمل "البروتامينات" Protamines و"الالبيومينات" Albumins و"الجلوبيولينات" Globulins و"الجلوبينات" Globins و" الهستونات " Histones . وهذه كلهـا تنوب فى المحاليل المائية وتمر بسهولة من الأغشية الحيوانية . ومما يذكر أن كثيرا من البروتينات الكرية التى كان يعتقد أنها بسيطة ثبت أنها تحتوى على مواد كربوهيدراتية فى تركيبها ، ومن ثم رؤى اعتبارها من البروتينات المرتبطة .

وقد وجد أنه من الممكن تحويل بعض البروتينات الكرية إلى ليفية تحت ظروف معينة ، فالإنسولين مثلا – وهو من البروتينات الكرية – يمكن تحويله إلى الطراز الليفى اذا عرض إلى درجات حرارة معينة وأس هيدروجينى محدد . وبتغيير هذه الظروف المحيطة يمكن إعادته إلى حالته الأولى .

ثانيا : البروتينات المرتبطة : Conjugated Proteins

وقد يطلق عليها البروتينات المركبة ، وهى تحتوي علي جزيء أو أكثر من مكونات اخرى تسمى المجموعة المرتبطة Prosthetic group

ويوضح (جدول ٣) أمثلة لبعض من البروتينات المرتبطة

وفيما يلي نبذة عن بعض طرز البروتينات :

Class	*Prosthetic group components*
Nucleoprotein systems	
Ribosomes	RNA
Tobacco mosaic Virus	RNA
Lipoproteins	
Plasma β1 - lipoproteins	Phpspholipid , cholesterol , neutral lipid
Glycoproteins	
γ - Globulin	Hexosamine , galactose , mannose, sialic acid
Plasma orosomucoid	Galactose , mannose , N- acetylgalactosamine N- acetylneuraminic acid
Phosphoproteins	
Casein (milk)	Phosphate esterified to serine residues
Hemoproteins	
Hemoglobin	Iron protoporphyrin
Cytochrome c	Iron protoporphyrin
Catalase	Iron protoporphyrin
Flavoproteins	
Succinate dehydrogenase	Flavin adenine dinucleotide
D - Amino acid oxidase	Flavin adenine dinucleotide
Metalloproteins	
Ferritin	$Fe(OH)_3$
Cytochrome oxidase	Fe and Cu
Alcohol dehydrogenase	Zn
Xanthine oxidase	Mo and Fe

جدول (٣) : نماذج للبروتينات المرتبطة ومجموعاتها المميزة .

الكولاجـــــين : Collagen

الكولاچين بروتين ليفي وهو أوفر البروتينات في جسم الانسان ، حيث يكوّن حوالي ٣٠٪ من الوزن الجاف له كما أنه أوفر البروتينات في المملكة الحيوانية بصورة عامة . ويتميز الكولاچين بأنه يكون مادة جيلاتينية في الماء المغلي . ويتكون الكولاچين من أحماض امينية ، أكثرها شيوعا هو الجليسين والبرولين والهيدروكسي برولين والهيدروكسي ليسين ، ولا يوجد الأخيران إلا في الكولاچين ، وهما يتكونان من اضافة مجموعة الهيدروكسيل (OH) إلي كل من البرولين والليسين في سلسلة عديد الببتيل بعد تخليقها في الشبكة الإندوبلازمية للخلايا المنتجة للكولاچين . ويعرف الان عدة انواع من الكولاچين يرمز لها بالارقام الرومانية I, II, III, ... , .. وهكذا.

وقد لقى الكولاچين اهتماما كثيرا من الدراسات التي استخدمت فيها طرق التحليل الكيميائي و"حيود اشعة اكس " X - ray diffraction والمجهر الالكتروني ودراسات الانكسار الضوئي في الضوء المستقطب Birefringence وكيمياء الانسجة . وقد كان أول من قام بدراسة الكولاچين ، اولئك المهتمون بالابحاث المتعلقة باستخدام جلود الحيوانات في الصناعة.

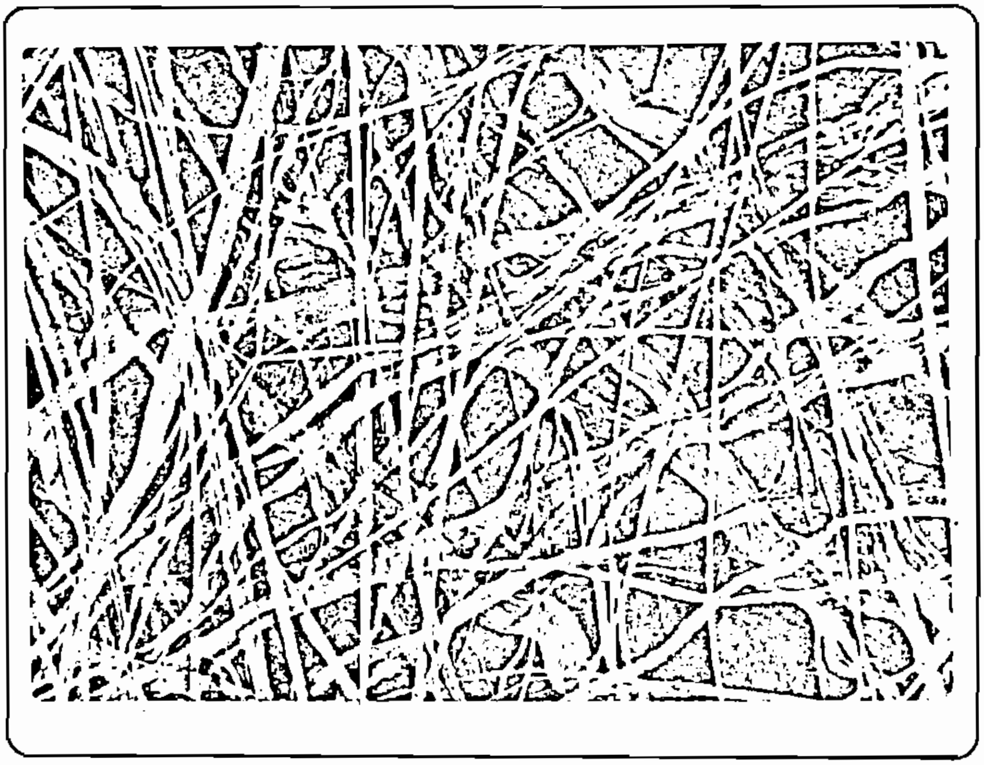
ويمكن مشاهدة الكولاچين في تحضير مفرود لغشاء المساريقا ، حيث يرى الكولاچين على هيئة ألياف متماوجة مختلفة السمك (انظر الشكل ٩) والألياف الفرادى عديمة اللون ولكنها عند تجمعها تبدو بيضاء اللون . والياف الكولاچين حامضية الصباغة فهي تصبغ باللون الاحمر في طريقة "فان جيسون " Van Gieson التي يستخدم فيها "الفوكسين الحامضي وحمض البكريك" كما تصبغ باللون القرنفلي Pink بواسطة "الإيوسين " ، وباللون الأزرق باستخدام "صبغ مالوري ثلاثي الكروم " ، وباللون الأخضر مع "صبغ ماسون ثلاثي الكروم " وباللون الأحمر مع صبغ " سيروس" Sirius

وألياف الكولاجين عالية المرونة Flexible ، ولكنها غير مطاطة inelastic ، وهي تتميز بتحملها الفائق للشد بدرجة تفوق مادة الصلب ، فقد قدر أن السنتيمتر المربع الواحد يستطيع تحمل الضغط الناشيء من ثقل عدة مئات من الكيلوجرامات .

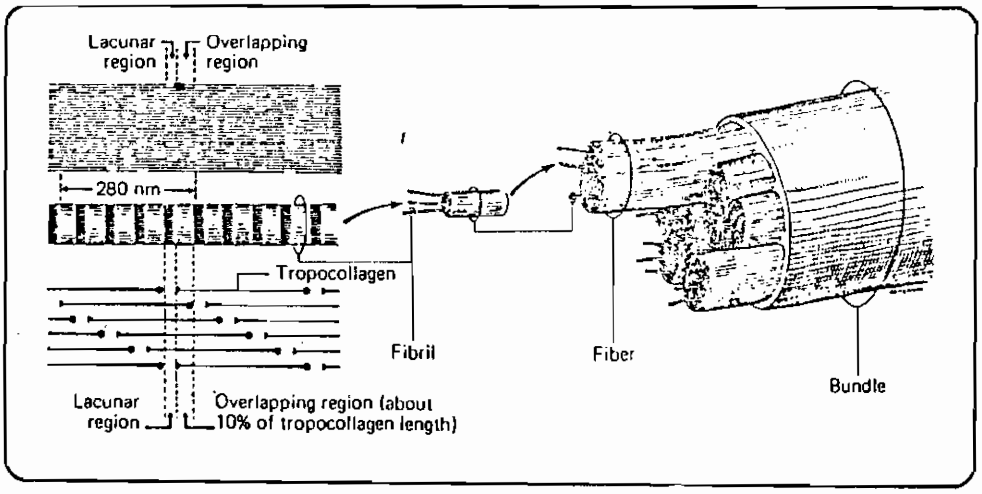
وكثيرا ما تساهم ألياف الكولاچين في تكوين محافظ أو أغطية لبعض أعضاء الجسم مثل الكلى وغدد جار الكلى والعقد اللمفاوية والخصيات وغيرها . وتتكون الأوتار العضلية أساسا من حزم من ألياف الكولاچين ، وفي هذه الحالات تتكون كل حزمة من ألياف Fibers، وهذه بدورها تتكون من لييفات Fibrils يبلغ متوسط أقطارها في الثدييات حوالى ٧٥ نانوميتر (انظر شكل ١٠) . وعند فحص هذه اللييفات بالمجهر الالكترونى أو بواسطة ميكروسكوب الاستقطاب الضوئي ترى مخططة عرضيا علي مسافات ٦٤ نانوميتر . (انظر شكل ١١) ، وتتكون اللييفات من وحدات بنائيه طولها ٢٨٠ نانوميتر ويطلق عليها اسم "تروبوكولاجين Tropocollagen" وهي تترتب بطريقة خاصة يعزى إليها ظهور التخطيط العرضى في الليفات . وقد وجد أن جزيء "التروبوكولاجين" يتكون من ثلاث سلاسل من عديد الببتيد ، يطلق علي اثنين منها اسم الفا (١) Alpha1 والثالثة اسم الفا (٢) Alpha2 وتتوالى الأحماض الامينية في سلسلة الفا وفقا للترتيب الأتي : (Gly - x - Pro) ، حيث يمثل (Gly) الجليسين ، (Pro) يمثل البرولين أو الهيدروكسي برولين ، ويمثل (X) أي حمض امينى بما في ذلك البرولين . وتلتف السلاسل الثلاث حول بعضها حلزونيا في شكل ضفيره ، كما ترتبط السلاسل الثلاث بعضها لبعض بواسطة روابط هيدروجينية واتحادات كارهه للماء Hydrophobic interactions وفيما عدا نوع الكولاچين I , II ، فإن السلاسل الثلاث تربطها أيضا روابط ثنائية الكبريتيد Disulphide bonds ويبلغ امتداد اللفة الكاملة في الحلزون ٨,٦ نانوميتر (انظر شكل ١٢) .

وقد اوضحت الدراسات الحديثة أن الكولاچين يمثل مجموعة من مركبات بروتينية تختلف فيما بينها في عدد من الاعتبارات ، منها : الخلايا التي تقوم بتخليقها ، أماكن تواجدها في الجسم ودرجة تعضيها ، وغير ذلك من العوامل المختلفة (انظر شكل ٤).

وقد أظهرت الدراسات التي أجريت علي الكولاچين باستخدام ميكروسكوب الاستقطاب الضوئي " Polarizing Microscope أنه ايجابى ثنائية الانكسار الضوئي Positive birefringence .

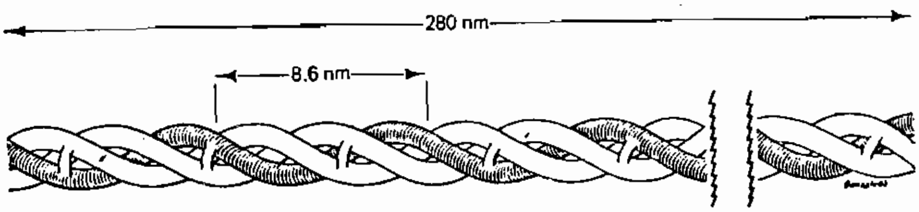


شكل (٩)


Lacunar region
Overlapping region
280 nm
Tropocollagen
Fibril
Fiber
Bundle
Lacunar region
Overlapping region (about 10% of tropocollagen length)

شكل (١٠)

شكل (١١)



شكل (١٢)

الطراز	اماكن تواجده بالجســـم	الخلايا التي تقوم بتخليقه	درجة التعضى
I	الأدمــــه – الـعظـام – الأوتـار – الدنتين الصفـاق – صلبة العين – مــحــافظ اعـضـاء الجـسـم – الغضروف الليفى .	فيبروبلاست Fibroblasts اوستيوبلاست Osteoblasts أودنتوبلاست Odontoblasts كوندروبلاست Chondroblasts	يكون الياف كولاچـــين وهذه تتجمع لتكون حزماً .
II	الغضروف الزجاجى – الغضروف المرن	كوندروبلاست	من لييفات
III	العـضـلات الملسـاء – الدعـامـة الداخليـة للعـصب – الشـرايين – الرحم – الكبد – الطحال – الكلى – الرئات .	العـضـلات الملسـاء فـيـبـرروبلاست الخـلايا الشـبكيـة خـلايا شـفـان الخـلايا الكبـدية	
IV	الأغشية القاعدية للخلايا الطلائية	الخلايا الطلائية	جزئيـات تروبوكولاچين
V	الأغشية القاعدية للمشيمة	غير معروفة	جزئيات تروبوكولاجين

جدول (٤) : يوضح الطرز المختلفة للكولاچين وخصائصه .

وجدير بالذكر ان عملية تخليق الكولاچين تحدث في خطوات معقدة تحتاج إلي كثير من الإنزيمات والعوامل المساعدة ، ويطلق علي الجزئيات الحلزونية ثلاثية السلاسل اسم "بروكولاچين Procollagen " وهي الصورة التي يتم عليها الافراز الي خارج الخلايا .

وفي الحيزات بين الخلوية تتحول هذه الجزئيات إلي كولاچين بعد استقطاع القطع الطرفيه الحاوية علي النهايات الكربوكسيلية والأمينية N,and C terminal segments .

ومن المعروف أن الخلل الذي يحدث في الكولاچين أو عمليات تخليقه يسبب كثيرا من الأمراض المزمنة التي يصعب علاجها (Kivirikko and Risteli,1976 Minor,1980) .

الرتكـــيولين : Reticulin

الرتكيولين بروتين ليفى ، تتميز اليافه برقتها ، حيث تتراوح أقطارها بين ١/٢ – ٢ ميكرون ، وهى عادة تكون شبكة كثيفة داخل بعض أعضاء الجسم مثل الكبد والكلى والطحال والعقد الليفيه ونخاع العظم فتدعم بذلك بناءها الخلوى ومن ثم تعرف الالياف باسم " الالياف الشبكية " .

ومن الجدير بالذكر أن هذه ألاليـاف لا ترى في التحضيرات الروتينية المصبوغة بالهيماتوكسيلين والايوسين ، ولكنها تشاهد بوضوح في التحضيرات المعاملة بأملاح الفضة ، ولهذا تسمى أيضا :ألياف محبة للفضة Argyrophilic Fibres ويعتقد البعض أن الألياف الشبكية هى الياف كولاچين غير تامة التكوين .

وقد وجد أن الألياف الشبكية تتكون أساسا من مادة كولاچين III ، وذلك علي عكس ألياف الكولاچين التي تتكون من مادة كولاچين I .

وتتكون الألياف الشبكية من لييفات منتظمة عشوائيا (قطرها حوالى ٤٥ نانوميتر) ترتبط مع بعضها البعض بوصلات bridges من مواد جليكوبروتينية Glycoproteins ، ومواد بروتيوجليكانية Proteoglycans وتحتوى الالياف الشبكية علي قدر يتراوح بين ٦ – ١٢٪ من السكريات السداسيه مقارنة بقدر ١٪ فقط في الياف الكولاچين .

ومن الجدير بالذكر أن الالياف الشبكية تعطى تفاعلا موجبا في تفاعل "كاشف شف"

ب أ س PAS ، كما أنها لا تكون جيلاتينا بالغليان . وقد وجد أن الرتكيولين يحتوى على نسبة من الحمض الدهنى (هيدرستيك) Myristic acid .

وقد كان بعض العلماء ، ومنهم العالم الإنجليزى بيرس A.G.E.Pearse يظنون ان الرتكيولين ليس له خاصة ثنائية الانكسار الضوئي birefringence في الضوء المستقطب ، إلا ان الدراسات القديمة التي قام بها Mollendroff, والعالم Brewer, أوضحت انه ، مثل الكولاجين ، ايجابى ثنائية الانكسار الضوئي ، ولكنه يختلف عنه في خواص بصرية أخري في الضوء المستقطب . ويتفق العلماء حاليا علي صحة هذه الدراسات .

الألاستين : The Elastin

الإيلاستين بروتين ليفى يطلق على اليافه اسم : الألياف المرنة Elastic fibres و هى تتميز بأنها أقل سمكا من الياف الكولاجين ، كما تتفرع وتتحد مع بعضها خلال مسارها ، ويمكنها أن تتمدد تحت تأثير ميكانيكى إلي اكثر من طولها الأصلى بمقدار مرة ونصف المرة ، ثم ترجع إلى حالتها الأولى بعد زوال المؤثر . وتميز الألياف أيضاً بلونها الأصفر ومن ثم يطلق عليها اسم "الالياف الصفراء" Yellow fibres . وهى تتواجد في جدر الشرايين وجدر الحويصلات الهوائية والأنسجة الضامة .

ولا يتأثر الإيلاستين بالغليان او الأحماض والقلويات المخففة ، كما أنه لا يهضم بالتربسين ، ولكنه يهضم ببطء بواسطة البيسين عند أس هيدروجينى (٢) ويهضم بسهولة بواسطة إنزيم إلا ستيز " Elastase البنكرياسى .

ويحتوى الإبلاستين علي كميات اكبر من الأحماض الأمينية "فالين " Valine "الآنين " Alanine مما هو في الكولاجين ، كما يحتوي علي الجليسين و"البرولين " . وبالإضافة إلي ذلك يحتوى الإيلاستين علي أحماض امينية لا تتوجد إلا فيه ، وهى "الدزموسين " Desmosine ، "أيزودزموسين " Isodesmosine

وقد وجد أنه في الجلد والاورتاريتم تخليق الايلاستين عن طريق الخلايا الليفية "الفيبروبلاست" Fibroblasts ، وفي جدر الشرايين بواسطة الخلايا العضلية الملساء ،

smooth muscle cells

ويبدى الإيلاستين خاصية ثنائية الانكسار الضوئي بصورة ضعيفة ، Romhanyi) 1964) ولكنها تزيد كثيرا عندما يعامل بالبرمنجنات ، ثم بالبايسلفيت ثم صبغ باستخدام "التلويدين الأزرق" (Fischer, 1979) .

وتعترى الالياف الصفراء تغيرات واضحة مع تقدم العمر حيث تتشقق طوليا وتنكسر ثم تتفتت في النهاية إلي حبيبات ، ويصاحب ذلك تغيرات كيمياوية أهمها زيادة في بعض الأحماض الأمينية مثل حمض الجلوتامك وحمض الأسبرتك ، كما تزيد الدهون وأملاح الكالسيوم .

ويصبغ الايلاستين بطريقة " جوموری " المستخدم فيها الألدهيدفوكسين ، وقد اقترحت طرق متعددة أخرى ، ولازالت آلية صباغة الإيلاستين بالاصباغ المختلفة محل خلاف بين الباحثين .

الكـــيراتين : Keratin

الكيراتين بروتين ليفى ، يتواجد بصفة أساسية في خلايا البشرة في الزواحف والطيور والثدييات ، وكذلك في الزوائد الجلدية مثل الشعر والريش ، وللكيراتين خواص تجعله يوفر كبيرا من الحماية الميكانيكية والكيميائية للانسجة الواقعة أسفله .

الكيراتين له خاصية ثنائية الانكسار الضوئي في الضوء المستقطب Birefringent ، وهو يقاوم الهضم بالبيسين والتربسين ولا يذوب في الماء والاحماض والقواعد المخففة . ويتميز بأنه غنى بالكبريت ، ويتكون من نسبة عالية من السستين Cystine ، بالاضافة إلي الأحماض الامينية القاعدية : ارجنين – ليسين – هستدين ، وأيضا الحمضية مثل : حمض الجلوتامك وحمض الاسبرتك ، وعلى ذلك فان للكيتين قابلية قوية لكلا الاصباغ القاعدية والحمضية .

ويتكون الكيراتين من خيوط كيراتينية (قطرها حوالى ٨٠ انجستروم ، وطولها حوالى ٣٠ ميكرون)، وينتظم البناء التركيبى لهذه الخيوط على شكل سلاسل عديد الببتيد من طراز "الفاهلكس " α - helix .

وعند دراسة مراحل تكوين الكيراتين في بشرة الجلد يتضح أن "الطبقة القرنية " Stratum corneum تتكون من خلايا تحتوي علي وفرة من الكيراتين . ويبدو الكيراتين – وهو الغنى بالروابط ثنائية الكبريت – مكونا من خيوط مجمعة في حزم سمكها ١٠ نانوميتر يحيط بها وسط مكون من مادة كثيفة عديمة الشكل يطلق عليها اسم " المادة بين الخيطية " Interfilamentous matrix ويلاحظ في هذه الخلايا غياب كثير من العضيات والتراكيب السيتوبلازمية المعروفة تحت تأثير تكون الأجسام " الابتلاعية أو البلعمية الذاتية " Autophagosomes الغنية بإنزيمات التحليل الليزوسومية . Lysosomal hydrolytic enzymes

والواقع أن بداية تخليق الكيراتين في البشرة تحدث في الخلايا العميقة منه وتستمر وتزداد هذه العملية كلما اقتربنا من سطح الجلد ، حيث تزيد كمية الكيراتين إلي اقصى حد لها في الخلايا القرنية . وتشمل عملية تكوين الكيراتين تأكسد الروابط الهيدروكبريتية (SH (Sulfhydry في الحمض الأميني " سستاييسن Cysteine " إلي روابط ثنائية الكبريتيد (SS (disulphide متكونا بذلك السستين Cysteine. ويلاحظ في خلايا الطبقة " المحببة " Stratum granulosum في البشرة تواجد حبيبات قاعدية غير محاطة بأغشية وتحتوى علي بروتين غنى بالحمض الأمينى هستدين " ، والواقع أن هذه الحبيبات هى المادة التي تتكون منها المادة بين الخيطية للكيراتين سالفة الذكر . ويطلق على هذه الحبيبات اسم " الحبيبات الكيراتوزجاجية " Keratohyaline granules ، والواقع ان التركيب الكيميائي لهذه الحبيبات لايزال غير معروف علي وجه الدقة .

والمعروف أن الشعر يتكون أساسا من الكيراتين . وقد وجد العالم بونتنج Bonting عام ١٩٥٠ ان السستين يتناقص في البشرة خلال فترة التحول من الصبى الى البلوغ . وقد عزا ذلك إلي انتقال السستين من البشرة إلي الشعر النامي خلال هذه الفترة .

وقد وجد الباحثان " صن وجرين " Sun and Green عام ١٩٧٨ ان الكيراتين يختلف تركيبه في المراحل المختلفة من تميز الجلد ، كما وجد الباحث "لي" Lee ومساعدوه عام ١٩٧٩ ان الكيراتين يختلف تركيبه ايضا في الأنسجة المختلفة لنفس الحيوان . وكان "كمب "

Kemp قد أعلن عام ١٩٧٥ انه في الطيور تختلف كيراتين الريش عن كيراتين البشرة .

وقد استطاع فوكس وجرين Fuchs and Green عام ١٩٧٩ أن يفصلا جزءًا معينًا من حمض ح ر ن الرسول ؛ m - RNA أمكن بواسطته تخليق الكيراتين في الآنية الزجاجية in vitro .

ويمكن تمييز طرازين من الكيراتين : هما كيراتين الفا α - Keratin وكيراتين بيتا β- Keratin . ويوجد كيراتين الفا في القرون والاظافر ، وهذا يكون اكثر صلابة وقابل للكسر ويحتوى علي نسبة عالية (حتى ٢٢٪) من الحمض الأميني سستين . ويتواجد كيراتين ألفا ايضا في الجلد والشعر والصوف في صورة اكثر ليونة وقابلة للثنى حيث يحتوى علي ١٠ - ١٤٪ سستين . أماكيراتين بيتا فهو يكون غزل العنكبوت وديدان القز وفي الحراشيف والمخالب ومناقير الزواحف والطيور وهولا يحتوى علي سستين او سستايين ولكنه غنى بالاحماض الامينية ذات السلاسل الجانبية القصيرة خاصة الجليسين والالانين والسيرين . ويتميز كيراتين الفا بقدرته علي التمدد بالتسخين ، ومثال ذلك استرسال الشعر عند تعريضه لبخار الماء ، اما كيراتين بيتا فانه لا يتم فرده تحت هذه الظروف .

الهستونات : Histones

الهستونات بروتينات بسيطة كروية Globular ، تحتوى علي كميات كبيرة من الأحماض الامينية القاعدية خاصة الأرجنين والليسين ، والهستيدين . وتتواجد الهستونات بصفة اساسية في انوية الخلايا متحدة مع حمض ح د ن لتكون الكروماتين والكروموسومات في الأيوكاريوتات Eukaryotes أي حقيقيات الأنوية .

وتتواجد الهستونات في أنوية الايوكاريوتات علي صور أربع يرمز اليها بالحروف، H_2A ، H_2B ، H_3 ، H_4 يمكن فصلها باستخدام الفصل الكهربائي علي جيلاتين بولى اكريلاميد Polyacrylamide gels يحتوى علي كبريتات دودسيل الصوديوم Sodum dodecyl sulphate ولا توجد الهستونات في البروكاريوتات Prokaryotes

وتذوب الهستونات في الماء الأحماض والقلويات المخففه ولكنها لا تذوب في محاليل الامونيا المخففة .

البروتامينـــات : Protamines

البـروتامـينات قـاعـدية بسـيطة وكـروية Globular وقـد تم اكـتـشـافـهـا لأول مـرة في الحيوانات المنوية الناضجة في الأسماك . وتشبه البروتامينات مجموعة الهستونات في كونها تنوب في الماء وفي الأحماض المخففة .

البروتينات فى الخلايا الحيوانية :

جدير بالذكر أن طبيعة المواد البروتينية تتباين في خلايا الأعضاء والانسجة المختلفة ، ويعـتـمـد هذا إلي حـد كـبـير علي وظائف هذه الخـلايا ، فـالبـروتينات في الخـلايا الكـاسـيـة Goblet cells المفرزة للمخاط Mucus تختلف عنها في خلايا بيتا في جزر لانجرمانز التي تفـرز الإنسـولين ، وكـذلك عن تلك في الخـلايا العـصـبـيـة التي تفـرز العـصـبـيـة Neurotransmitters، أو في الخلايا الهـضـمية Peptic cells التي تفـرز انزيم البيسين .

فمن المعروف مثلا أن الخلايا المنوية والحيوانات المنوية في الثدييات تحتوي علي كميات عالية من الهستونات الغنى بالارجنين .. وهكذا .

ومن المفـترض ان الجينات المتوافرة في كل خـلايا جسم الفرد واحـدة ، ولكن مـا يكون منها نشطا في خلايا مـعينة هو مميز لهذه الخـلايا ، وهذا يعنى أنه ليست كل الجينات نشطة في أي طراز من طرز خلايا الجسم . ويستتبع ذلك أن البناء البروتينى (وما يترتب عليه) لكل طراز من الخلايا يختلف عنه في الطرز الاخري .

وبصـفـة عامـة يتـأثر المحتوى البروتينى للخلايا فـي حـالات التـعرض لبـعض المؤثرات الطبيعية والكيميائية ونقص التغذية . كما أن طبيعة المواد البروتينية تتغير في الطراز الخلوى الواحد اثناء عملية التكوين .

الأميلويـدات The Amyloids

هناك اتفاق بصفة عامة على أن الأميلويدات تتركب من جليكوبروتينات وميوكوبروتينات ومـواد كربوهيـدراتيـة . وتكثر الامـيلويدات في بعض أعضـاء الجسـم مثل القلب دون ظواهر

مرضية ، ويطلق على الحالة عندئذ "الأميلويد الأولى Primary Amyloid " أما الأميلويد الثانوى Secondary Amyloid فينتج مع بعض الأمراض المزمنة حيث تترسب الاميلويدات بصورة غير طبيعية في بعض أعضاء الجسم مثل الكبد والطحال والكلى وغدد الكظر وجدر الأوعية الدموية بها وينتج بذلك ما يعرف باسم (تفسخ أميلويدى Amyloid degeneration) وتعتبر زيادة الاميلويدات مؤشرا لاضطرابات في التحول الغذائي للمواد البروتينية يلعب فيها الجهاز المناعى بصفة عامة وخلايا البلازما بصفة خاصة دورا أساسيا وترجع زيادة الأميلويدات إلي خلل في الآلية التي تتحكم في ضبط تخليقها . وقد وجد أن مصدر معظم الاميلويدات المترسبة في هذه الأعضاء هو الدم . وأن طبيعة بروتينات مصل الدم تتغير في هذه الحالة . وتلقى الاميلويدات أهمية كبيرة لدى المشتغلين بعلم الأمراض لأهميتها في كثير من الحالات المرضية مثل الروماتويد . وقد أمكن تجريبيا زيادة الاميلويدات في بعض الحيوانات باستخدام عدد من المواد مثل الكازين Casein ومن المعروف أن فيرشو Virchow هو أول من أعطى (في عام ١٨٥١) لفظ Amyolid لهذه المواد عندما لاحظ أن تفاعلها مع اليود يشبه تفاعل النشا معه ، إلا أنه اتضح بعد ذلك أن تركيب الاميلويدات بعيدا عن طبيعة تركيب النشا .

الاسس الهستوكيميائية لبعض الطرق المستخدمة للكشف عن المواد البروتينية

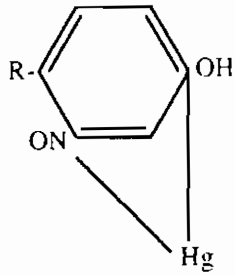
فيما يلى الأسس الهستوكيميائية لبعض الطرق المستعملة للكشف عن المواد البروتينية.

١ - تفاعل ميلون : Millon's Reaction

يعتمد هذا التفاعل علي "كشاف ميلون" الذي يتكون من نترات الزئبقوز في حامض النيتريك . وقد اقترح هذا التفاعل ميلون في عام ١٨٤٩ للكشف عن البروتينات المحتوية علي "مجموعة فينولية " Phenolic group (وهى أساسا الداخل فيها التيروسين المحتوى علي هيدوكسى فينول) ، وقد طورت هذه الطريقة علي يد بنسلى وجرش Bensley and Gersh عام ١٩٣٣ وسيرا Serra عام ١٩٤٦ وبيكر Baker عام ١٩٥٦ .

ويتم التفاعل في هذه الطريقة على مرحلتين ؛ ففي المرحلة الأولى ينتج "نيتروفينول " Nitrophenol باحلال مجموعة NO محل الهيدروجين الموجود في الموقع أورثو بالنسبة لهيدروكسيل الفينول .

وفي المرحلة الثانية يدخل الزئبق في حلقة جديدة تحتوى علي نيتروجين مجموعة النيتروز ويتكون بذلك مركبا أحمر اللون .



٢ – طريقة الزئبق بروموفينول الأزرق :

The Mercury - Bromphenol Blue Method (HgBpB)

يحضر محلول الصبغ من كلوريد الزئبقوز وصبغ البرومفينول الأزرق ، حيث تصبغ البروتينات باللون الازرق الداكن .

وقد ابتدع هذه الطريقة "درم " Durrum عام ١٩٥٠ ، ثم طورها مازيا وبروير والفيرت Mazia , Brewer , Alfert في عام ١٩٥٣ وبونهاج Bonhag عام ١٩٥٦ . وقد استخدمها هاريس ومازيا عام ١٩٥٩ مع عينات فحصت بالمجهر الالكتروني .

وقد أعلن " مازيا " وزملاؤه أن درجة كثافة الصبغ في النسيج تتناسب طرديا مع كمية البروتينات – علي كافة صورها – المتواجدة فيه .

وقد لوحظ في بعض الحالات أن الصباغة تعطى لونا يميل إلي الحمرة . وقد اختلف الباحثون في تفسير ذلك ، فقد أعلن رامالنجام ورافندورانات Ramalingam and Ravindranath (عام ١٩٧٢) أن ذلك يرجع إلي الصبغة مخالفة التلوين

Metachromatic ، بينما من رأي تشابمان Chapman (عام ١٩٧٥) أن ذلك يرجع الي ان الصبغة ثنائية اللون Dichromatic

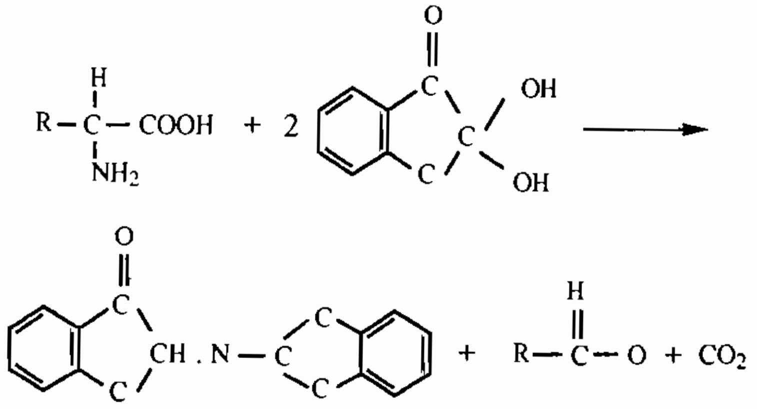
٣ – طريقة أكرولين شف : The Acrolein - Schiff Method

اقترح هذه الطريقة فان دوجن Van Duijn عام ١٩٦١ ، وهي تصبغ البروتينات بصفة عامة ويعتمد التفاعل على معامله القطاعات بالاكرولين ($H_2C = CHCHO$) حيث تتفاعل الرابطة المزدوجة في الاكرولين مع NH_2 , NH , SH الاليفاتية ، والاميدوزولات Imidazoles تاركة الالدهيدات الحرة لتتفاعل مع محلول شف Shciff's reagent لتعطى لونا أرجوانياً محمر .

٤ – طريقة ننهيدرين شف : Ninhydrin - Schiff Method

اقترح هذه الطريقة " ياسوما واتشيكاوا " Yasuma and Ichikawa (١٩٥٢ ، ١٩٥٣) للكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعات امين نشطة ، حيث تعامل القطاعات بمحلول النهيدرين الذي يتفاعل مع مجموعات الامين الحرة في الاحماض الامينية ، فينتج مركب ذو لون أزرق وثاني اكسيد الكربون بالاضافة الي مركب يحتوي على مجموعة الدهيد . تغسل القطاعات بالماء ثم توضع في محلول شف الذى يتفاعل مع مركب الالدهيد لينتج لونا أحمر أرجوانياً .

وأحيانا يستخدم الالوكسان Alloxan بدلا من النهيدرين ، الا أن العالم الانجليزى بيرس Pearse قرر أن اللون الناتج عند استخدام النهيدرين كان أكثر وضوحا .

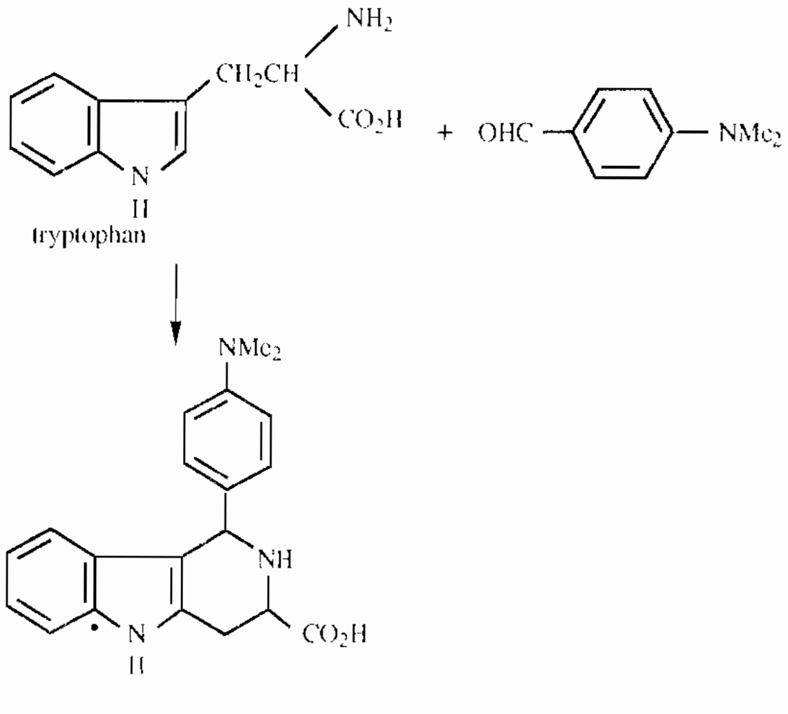


٥ – طريقة د م أ ب – نيتريت للكشف عن التربتوفان :

The D M A B -Nitrite Method for Tryptophane

اقترحت طرق الكشف عن التربتوفان منذ الثلاثينيات من هذا القرن ، وقد تم تطويرها بعد ذلك بطرق مختلفة بواسطة الكثير من الباحثين ، وتعتبر الطريقة التي أوصى بها آدمز Adams في عام ١٩٥٧ هى أفضل الطرق .

وتعتمد هذه الطريقة على معاملة القطاعات بمحلول من مادة بارا داى ميثيل امينو بنزالدهيد P - dimethylamino - benzaldehyde (D M A B) فينتج بذلك مركبا يسمى بيتاكاربولين β-Carboline تتم اكسدته باستخدام نيتريت الصوديوم Sodium nitrite لكى يتكون مركب ذو لون أزرق ، يسمى كاربولين الازرق Carboline blue ، تركيبه الكيميائي غير معروف علي وجه الدقة .



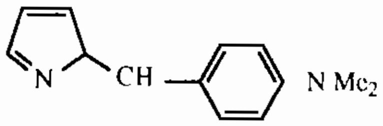
substituted tetrahydro - β - carboline carboxylic acid

٦ – طريقــة تفــاعل روزيندول للاندولات (البــروتينات المحــتــوية على التريتوفان) .

The Rosindole Reaction for Tryptophane-Containing Proteins

اقترح هذه الطريقة جلنر عام ١٩٥٧ ، وهي تشبه طريقة أدمز . وفي الطريقة الحالية يذاب الألدهيد P - dimethylamino - benzaldehyde (DMAB) في خليط من حمض الخليك – وحمض فوق الكلوريك مع كمية قليلة من حمض الهيدروكلوريك المركز . كما أن نيتريت الصوديوم تذاب في حمض الخليك وحمض الهيدروكلوريك معا .

تعامل القطاعات بالالدهيد ، فيتحد جزيء من التربتوفان مع جزيء من الالدهيد فيتكون مركب phenylindolyl-methane .



ثم تعامل القطاعات بمحلول نيتريت الصوديوم المؤكسد فيتكون صبغ روزيندول Rosindole الاحمر اللون .

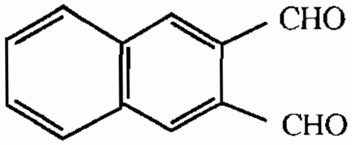
٧ – طريقة ٣ – هيدروكسي – ٢ – نفثالدهيد للكشف عن البروتينات المحتوية علي مجموعات امين NH_2 نشطة :

3- Hydroxy - 2- Naphthaldehyde Method for Active NH_2 groups:

تعتمد هذه الطريقة علي معاملة القطاعات بمحلول ٣ – هيدروكسي –٢– نفثالدهيد المذاب في الاسيتون والمضاف اليه محلول منظم عند أس هيدروجين ٨,٥ ثم تعامل القطاعات بمادة Tetrazotised diorthoanisidine المذابة في محلول منظم أسه الهيدروجيني ٧,٤ .

وتوضح هذه الطريقة التراكيب الغنية بمجموعات الامين النشطة باللون الازرق . وبصفة عامة ينصح بعدم استخدام الفورمالين في عملية التثبيت .

وقد اقترح هذه الطريقة وايز – تسو – سلجمان Weiss , Tsou , Seligman في عام ١٩٥٤، كما أوصى باستخدامها بيرسى Pearse .



٣ – هيدروكسى ٢ – نفثاليدهيد

٨- تفاعل حمض فوق الفورميك – شف للكشف عن السستين :

Performic acid - Schiff (PFA) Reaction for Cystine :

في هذه الطريقة تعامل القطاعات بفوق أكسيد الفورميك Performic acid الذي يؤكسد السستين Cystine في النسيج وينتج عن ذلك جواز تحرر ثلاث مجموعات كيميائية (بيرسى ١٩٥١) هي :

Sulphonic So_3 H

Sulphinic So_2 H

Aldehyde CHO

وعند معاملة القطاعات بكاشف شف Schiff's reagent فان مجموعات Sulphinic & Aldehyde تتفاعل معه لتعطى لونا قرنفليا مميزا .

وقد دلت إحدى الدراسات علي إمكانية ان تعطى مجموعات Sulphonic نفس اللون بتفاعلها مع كاشف شف .

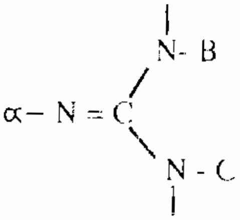
٩ – طريقة ساكاجوتشي للكشف عن الارجنين :

The Sakaguchi Reaction for Arginine

قدم " ساكاجوتشى " هذه الطريقة عام ١٩٢٥ وقد طورها كل من بيكر Baker

(١٩٤٤) وسيرا Serra (١٩٤٤) ، وثوماس Thomas (١٩٤٦) .

وقد توصل بيكر الي ان هذه التفاعل يعطي نتيجة ايجابية مع المركبات المحتوية علي التركيب العام الآتي :



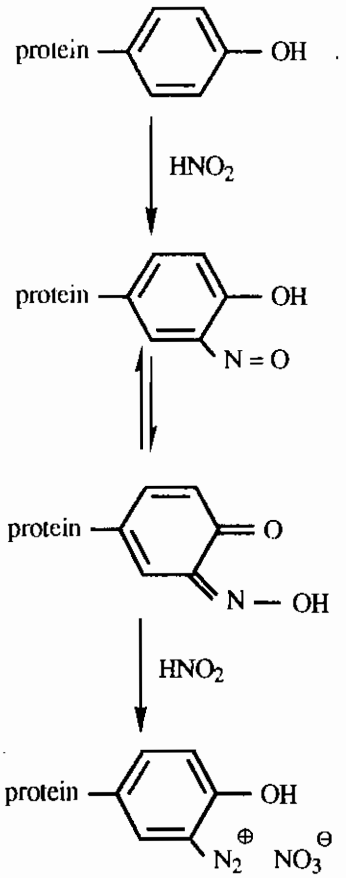
حيث B ، ∝ يمثلا اما ذرة هيدروجين أو المجموعة CH_3 . وعلي ذلك فإن هذا التركيب يمكن أن يمثل بالاحماض الأمينية Galegine , Agmatine , Arginine والتي لا يوجد منها في الأنسجة البشرية سوى " الارجنين " .

وفي هذا التفاعل ينتج لونا احمر - برتقاليا - من تفاعل الارجنين علي ألفانافثول هيبوكالوريت .

١٠ -طريقة النترتة - الازدواجية للكشف عن التيروسين :

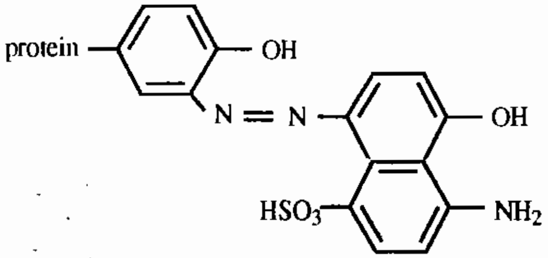
Diazotisation - Coupling Method for Tyrosine :

اقترح هذه الطريقة للي Lillie عام ١٩٥٧ ثم طورها جلنر وللي Glenner and Lillie (١٩٥٩) . وهي تعتمد على نترتة قطاعات شمعية مثبتة في الفورمالين أو خليط ساخن من الكلوروفورم والميثانول . وتجرى عملية النترتة باستخدام HNO_2 (الناتج من نيتريت الصوديوم وحمض الخليك في الماء المقطر) وذلك لمدة ١٨ - ٢٤ ساعة عند درجة حرارة منخفضة (٣ °م) وبعيداًعن الضوء . يؤدى الي سلسلة من التفاعلات الكيميائية بين التيروسين ، و HNO_2 تنتهى بتكوين ميترات الديازونيم وفقا لما يلى :



diazotyrosine

ثم تعامل القطاعات فى وسط قلوى ودرجة حرارة منخفضة بمادة 8 - amino - 1 - naphthol - 5 - sulphonic Acid (S - acid) التى تكون مع نيترات الديازونيم مركب ازدواجات نيتروجينية ذو لون أحمر قرنفلى .



pinkish red compound

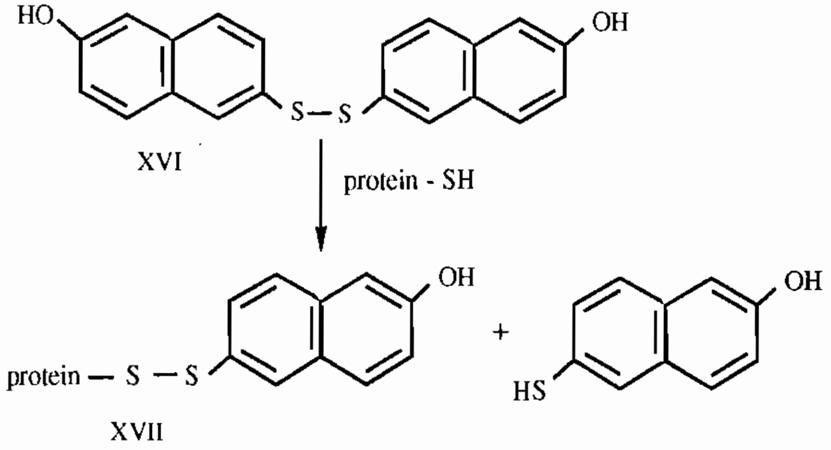
١١- طريقة داي هيدروكسي - داي نافثيل - داي سلفيد - (د . د. د.) للكشف عن مجموعات السلفهيدريل

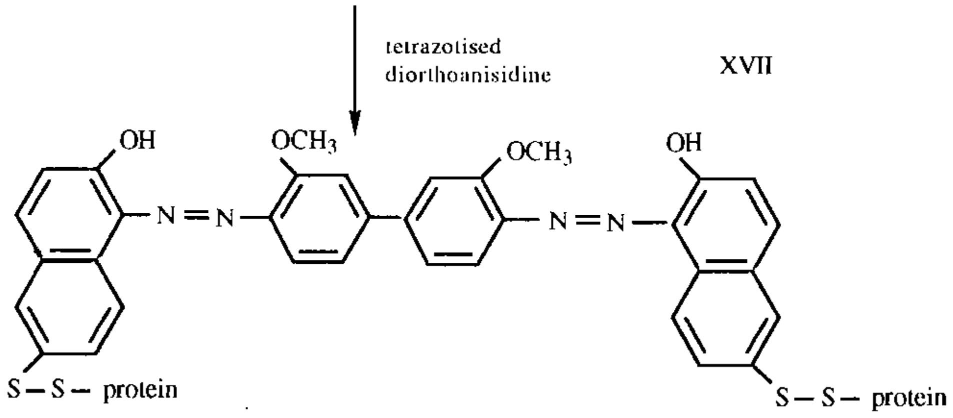
The Dihydroxy - Dinphthly - Disulphide (DDD) Method for SH - Groups:

في هذه الطريقة تستخدم مادة كيمائية خاصة لهذا الغرض هي داى هيدروكسى - داى نافثيل - داى سلفيد(د . د . د .2,2 Dihydroxyl-6-6- dinaphthyl). وتقوم الداى سلفيد فى هذا المركب باختزال مجموعة السلفهيدريل فى البروتين حيث ينشق المركب (د . د . د .) الى قسمين أحدهما هو (بروتين نافثيل داى سلفيد) والثانى (نافثيل ميركابتان) كمايلى :

تغسل الشرائح بعد ذلك لإزالة مركب نافثيل ميركابتان وأيضا الزيادة من مركب (د. د. د.) وذلك باستخدام الكحول .

لإنتاج اللون تعامل القطاعات بملح ديازونيم (مثل فاست الأزرق ب Fast Blue B) الذى يتحد مع مركب (بروتين - نافثيل داى سلفيد) المتكون ، لينتج فى النهاية آزو داى Azo dye أزرق اللون .





XVII

وقد اقترح هذه الطريقة بارنت وسلجمان Barnett and Seligman فى عام ١٩٥٢ .

ولإجراء تجارب ضابطة فإن هذا التفاعل يعطى نتيجة سلبية إذا سبقته أكسدة لمجموعات السلفهيدريل بإستخدام اليود أو بإستخدام أيودوأستيت Iodoacetate أو (ن – اثيل ماليميد N-ethyl maleimide) .

طرق الكشف الهستوكسيميائى عن البروتينات

– 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 – ١٥ فى طريقة مالورى الثلاثية .

٣– اصبغ الأنوية بمحلول صبغ فيجرت أيرن هيماتوكسلين أو محلول صبغ سلستين

Weigert's iron hematoxylin or celesein blue بلو

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 سم٣ من محلول مائى مشبع فى حمض البكريك + ٥ -١٠ سم٣ 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 .

النتائـــج

الكولاچين يصبغ باللون الأحمر .

العضلات وكرات الدم الحمراء وستوبلازم الخلايا باللون الأصفر .

أنوية الخلايا بلون بين البنى والأسود .

طريقة ثنائية الانكسار الضوئى باستخدام بكروسيرياس لفحص الكولاجين (جنكورا وآخرين ١٩٧٩) .

Picro- Sirius - Birefringence for Collagen after Junqueira et al , 1979

١ - جهز قطاعات شمعية بسمك ٥ ميكرون لعينات مثبتة فى الفورمالين أو البوان .

٢ - مرر القطاعات حتى الماء

٣ - اصبغ القطاعات لمدة ستين دقيقة فى ٠,١٪ سيرياس الأحمر Sirius red F 3BA فى محلول مائى مشبع (أسه الهيدروجينى ٢) .

٤ - اغسل مرتين لمدة دقيقة واحدة فى ٠,٠١ عيارى من حمض يدكل .

* انظر أيضاً كتاب التقنية المجهرية تأليف البنهاوى والجنزورى ، اصدار دار المعارف عام ١٩٨٩ .

٥ – انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ، ثم روق وغط بالبالسم .

واذا كانت القطاعات فى غضروف ، فإنها تعالج أولا لمدة ٩٠ دقيقة باستخدام ٠,٥ ٪ (بابان) Papin(IVF VIII Difco) فى ٠,٠٢ مولار منظم فوسفات عند أس هيدروجينى ٧,٤ وتحتوى على ٠,٠٠٠٥ مولار ثانى كبريتيد الصوديوم ، ٠,٠٠٠٥ مولار إ د ت أ (EDTA) ثم أغسل القطاعات بالماء المقطر .

النتائـــج :

عند فحص القطاعات فى الضوء المستقطب يبدو الكولاجين ثنائى الانكسار Birefringent يصبغ الكولاجين من الطرز III ، II ، I وكذلك حبيبات الكيراتوزجاجية Keratohyaline granules باللون الأحمر .

– 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 اقتضيت الحالة زيادة وقت الصباغة حتى تصبغ الألياف المرنة باللون الأسود .

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

٨- أغسل 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 .

النتـائـج :

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

طريقة أزرق ١٥٢ المباشرة لصباغة الالياف المرنة
(هوروبن وجيمس ١٩٧٠)

Direct blue 152 method for elastic fibres

(Horobin and James , 1970)

تحضير محلول الصبغ :

أضف ٢٥ سم٣ من فيرونال الصوديوم أو أى محلول منظم آخر (أسه الهيدروجينى ٩) إلى ٢٥ سم٣ من محلول الازرق ١٥٢ فى داى مثيل سلفواكسيد Direct blue 152 in

. dimethylsulphoxide

ويستخدم هذا المحلول فى مدى سبعة أيام من تاريخ تحضيره .

الطريقــة :

١- جهز قطاعات شمعية لعينات مثبتة فى ١٠٪ فورمالين متعادل .

٢- مرر القطاعات حتى الماء

٣- اصبغ القطاعات لمدة ٨ - ١٠ ساعات .

٤- اغسل القطاعات فى ماء الصنبور .

٥- انزع الماء فى سلسلة متصاعدة التركيز من الايثانول ثم روق فى الزيلول وغط بصمغ تخليقى مناسب .

الصباغة بطريقة هورتيجا للكشف عن أليفا 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 ٢ ,٠٪ 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 تغيرات لمدة ١٠ دقائق) .

٧- ضع القطاعات فى كربونات الفضة النشادرية Ammoniacal silver carbonate في درجة حرارة ٣٧ °م لمدة ١٥-٣٠ . دقيقة - لاتعرض 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 (٥ . ١٢ سم٣ ١٪ كلوريد ذهب + ٥٠ سم٣ ماء مقطر) حتى يتحول لون المحلول من الأصفر إلى الرمادى المائل الى البنفسجى .

١١- اغمس فى الماء المقطر لفترة وجيزة .

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

١٣- اغسل القطاعات فى الماء الجارى لمدة ٥ دقائق .

١٤- (اختيارية) يمكنك صباغة أنوية الخلايا بفيجرت هيماتوكسلين 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 .

النتائـــج :-

الرتكيولين .... أسود

الكولاجين .... أحمر

الأنوية .... سوداء - زرقاء أو بنى

السيتوبلازم .... أصفر رمادى

العضلات والألياف المرنة .... أصفر فاتح

تحضير محلول كربونات الفضة النشادرية Ammoniacal Silver Carbonate

- أضف ١٠ سم٣ من محلول مائى مشبع من كربونات اللثيوم الى ١٠ سم٣ من محلول نيترات الفضة .
- رج ثم اسمح للراسب بالتجمع - رشح - ثم اغسل الراسب بالماء المقطر خمس مرات
- أضف ٢٥ سم٣ 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 سم٣ 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 ٥٠م والترشيح قبل كل استعمال .

(طريقة ميلون (١٨٤٩) ، للكشف عن البروتينات المحتوية علي التيروسين (محورة عن بيكر - ١٩٥٦)

Milon Reaction (1984) for Tyrosine-containing Proteins)

(Baker Modification 1956)

تحضير الكاشـف :

١- أضف ١٠ جم كبريتات الزئبق $HgSO_4$ إلى ١٠٠ سم٣ من ١٠٠٪ حمض كبريتيك وسخن حتى يذوب الملح ، ثم أضف ماء حتى يصل الحجم الكلى إلى ٢٠٠ سم٣ .

٢- لكل ٥٠ سم٣ من هذا المحلول ، أضف ٥ سم٣ من ٠,٢٥٪ نيتريت صوديوم .

خطوات العمل :

١- ثبت العينات فى الفورمالين وجهز قطاعات شمعية .

٢- ضع القطاعات فى كأس زجاجى صغير يحتوى على الكاشف وسخن حتى الغليان برفق لمدة دقيتين .

٣- اترك الكأس ليبرد حتى تصل حرارته إلى درجة حرارة الغرفة .

٤- اغسل القطاعات ثلاث مرت بالماء المقطر لمدة دقيقتين فى كل مرة .

٥- غط باستخدام الجلسرين جيللى أو انزع الماء بسلسة من الكحولات ثم روق وغط باستخدام أحد الاصماغ .

النتيجـــة : تظهر البروتينات المحتوية على التيروسين بلون أحمر إلى قرنفلى أو أحمر يميل للصفرة .

طريقة البرومفينول الأزرق الزنبقي Mercuric Bromphenol Blue Method

(عن بوناج عام ١٩٥٥ - After Bonhag)

تحضير محلول الصباغة :

يحضر محلول الصبغ بإحدى الطريقتين الآتيتين :

١- ١٪ برومفينول الازرق Bromphenol blue فى الكحول ثم يضاف إليه كلوريد الزئبقوز $HgCl_2$ حتى درجة التشبع .

٢- ٢٪ حمض خليك مائى يحتوى على ١٪ كلوريد زئبقور ٠,٠٥٪ برومفينول الأزرق

.

خطـوات العمـل :

١- ثبت العينات فى محلول كارنوى أو الفورمالين أو أى مثبت عادى متجنبًا المثبتات المحتوية على حمض الأوزميك .

٢- الصق القطاعات الشمعية على شرائح غير معاملة بلاصق يحتوى على بياض البيض .

٣- مرر القطاعات فى الزيلول لازالة الشمع ثم فى سلسلة متناقصة التركيز من الكحول حتى تصل إلى الماء .

٤- اصبغ القطاعات فى أحد محلولى الصبغ لمدة ساعتين فى درجة حرارة الغرفة .

٥- ضع الشرائح لمدة خمس دقائق فى ٠,٥٪ حمض خليك .

٦- انقل القطاعات إلى كحول بيوتايل رباعى Tertiary butyl alcohol وبذلك يتحول الأس الهيدروجينى الحامضى للقطاعات الى نقطة التعادل .

٧- روق القطاعات فى الزيلول وغط بصبغ مناهسب .

النتائج : تصبغ البروتينات بلون أزرق داكن .

طريقة آكرولين – شف للبروتينات

Acrolein Schiff Method For Proteins

(Van Duijn, 1961 - 1961 فان دوجن)

١ – ثبت العينات فى محلول كارنوى أو الفورمالين .

٢ – أزل الشمع من القطاعات ثم مرر فى الكحول المطلق الإثيلى ثم ٩٥٪ كحول إيثيلى.

٣ – ضع القطاعات لمدة ١٥-٦٠ دقيقة فى محلول طازج من ٥٪ أكرولين Acrolein فى ٩٥٪ كحول اثيلى .

٤ – مرر القطاعات فى ثلاثة تغييرات من الكحول الاثيلى المطلق ، خمس دقائق لكل تغييرة ثم مرر الى الماء .

٥ – ضع القطاعات فى محلول شف لمدة ١٠ – ٢٠ دقيقة .

٦ – اغسل القطاعات فى الماء .

٧- مرر القطاعات فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق وغط باستخدام كندا بلسم .

النتيجة : تصبغ البروتينات بلون أرجوانى محمر .

طريقة ننهدرين - شف للبروتينات الحاوية علي مجموعات أمين نشطة

Ninhydrin - Schiff Method for Protein - bound NH_2

(ياسوما وإتشيكاوا ١٩٥٢ Yasuma & Itchikawa)

١- ثبت العينات فى محلول زنكر أو كارنوى .

٢- مرر القطاعات الشمعية حتى الماء .

٣- ضع القطاعات فى ٠,٥٪ ننهيدرين Ninhydrin فى كحول مطلق لمدة ١٦-٢٠ ساعة عند درجة حرارة ٣٧° م .

٤- اغسل القطاعات فى ماء جار لمدة ثلاث دقائق .

٥- ضع لقطاعات فى محلول شف Schiff's reagent لمدة ٢٥ دقيقة .

٦- اغسل بالماء الجارى لمدة عشرة دقائق .

٧- اصبغ الانوية - إذا أردت - باستخدام محلول ماير هيم ألم Mayer's Haemalum ثم ميز باستخدام ١٪ كحول محمض .

٨- مرر القطاعات بسلسة متزايدة التركيز من الكحول ثم روق الزيلول وغط باستخدام كندا بلسم .

النتائج : تصبغ البروتينات الحاوية على مجموعة أمين نشطة باللون الأحمر القرنفلى .

طريقة د م أ ب - نيتريت للكشف عن التريبتوفان (عن آدمز - ١٩٥٧)

The D M A B - Nitrite method for Tryptophan (After Adams, 1957)

١- ثبت لمدة تتروح من ٦-٢٤ ساعة فى فورمالين متعادل .

٢- حمل القطاعات على شرائح معاملة بالالبيومين .

٣- مرر القطاعات الى الكحول المطلق ثم جففها فى الهواء . واغمسها بسرعة فى محلول ٥٪ باردای مثیل أمینو بنز الدهید P-dimethylamino benzaldehyde فى حمض ايدروكلوريك كثافته النوعية ١٨ . ١ لمدة دقيقة واحدة .

٤- انقل الشرائح الى ١٪ نيتريت الصوديوم فى حمض هيدروكلوريك مركز واتركها لمدة دقيقة واحدة .

٥- اغسل لمدة ٣٠ ثانية فى ماء الصنبور .

٦- اغمس القطاعات فى ١٪ كحول محمض .

٧- مرر القطاعات فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول لنزع الماء ثم روق وغط القطاعات .

النتائج : تظهر البروتينات المحتوية على التربتوفان بلون أزرق ويبدو التفاعل قويا فى بعض خلايا المعدة والأمعاء وخلايا الجيوب البنكرياسية والعضلات .

تفاعل "روزيندول للاندولات" (عن جلنر ١٩٥٧)

The Rosindol Reaction for Indoles (Clenner 1957)

١ - ثبت العينات فى محلول ١٠٪ خلات الكالسيوم فى الفورمالين لمدة ٣ -٦ ساعات .

٢ - ازل الشمع من القطاعات ثم ضعها فى كحول مطلق .

٣ - جفف الشرائح فى الهواء لمدة ٣٠ ثانية .

٤ - ضع القطاعات لمدة ثلاث دقائق فى درجة ٢٥° م فى المحلول الآتى :

حمض فوق الكلور	Perchloric Acid	٦٠ سم٣
حمض خليك	Acetic Acid	٣٤ سم٣
حمض هيدروكلوريك مركز	Hydrochloric Acid	١سم٣
بارادى مثيل أمينو بنزالدهيد		١ جم

٥ – ضع القطاعات لمدة دقيقة واحدة فى محلول يحضر قبل الاستعمال مباشرة يحتوى على :

حمض خليك	Acetic Acid	٣٥ سم٣
حمض ايدروكلوريك	Hydrochloric Acid	٥ سم٣
نيتريت الصوديوم	Sodium nitrite	٥ ,٠٪ جم

٦– اغسل القطاعات ثلاث مرات فى حمض الخليك ثم فى محلول حمض خليك وزيلول بنسبة ١:١ ثم فى محلول الزيلول .

٧ – غط القطاعات باستخدام صمغ مناسب .

النتائج : تصبغ الانبولات بلون أزرق داكن .

الكشف عن البروتينات المحتوية علي مجموعات الأمين النشطة بطريقة هيدروكسي نافثالدهيد وايز – تسو وسلجمان – ١٩٥٤) .

Hydroxy naphthaldehyde method for active NH_2 groups (Weiss, Tsou and Seligman 1954)

إذا أريد الكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعات الأمين النشطة فى السيتوبلازم يوصى بإجراء التثبيت فى محلول كارنوى أما إذا أريد الكشف عن البروتينات الحاوية على مجموعات الأمين النشطة فى أنوية الخلايا فيوصى باستخدام محلول زنكر مع مراعاة عدم معاملة العينات أو القطاعات بمحاليل الثيوكبريتات أو اليود فى هذه الحالة .

١– مرر القطاعات الى الماء عبر سلسلة متناقصة التركيز من الكحول .

٢– ضع القطاعات لمدة ساعة فى محلول طازج التحضير ، يحضر بالطريقة الآتية :

٣– هيدروكسى –٢ نفثالدهيد	3hydroxy -2naphthaldehyde	٢٠ ملجم
أسيتون	Acetone	٢٠سم٢

ثم أضف ٣٠سم٢ من منظم ١ ,٠ محلول جزئى فيرونال– خلات .

(0.I m-veronal acetate buffer) أسه الهيدروجينى ٥ ,٨ .

٣– اغسل القطاعات فى ثلاث تغييرات من الماء المقطر لمدة خمس دقائق لكل تغييره

٤- ضع القطاعات فى منظم (٠,١) محلول جزئى - خلات

(0.I m-veronal acetate buffer) أسة الهيدروجينى ٧,٤

أضف إلى سطح المحلول ٢٥ ملجم ثنائى أورثو أنيسيدين تترازوتيزيد Tetrazotized diorthoanisidne (ملح فاست بلو " ب " Fast blue B Salt) هز المحلول .

٥ - بعد خمس دقائق اغسل القطاعات بماء صنبور جارى لمدة خمس دقائق أخرى

٦- مرر القطاعات بسلسة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق فى الزيلول وغط فى كندا بلسم .

النتائج : تصبغ التراكيب الغنية بمجموعات الأمين النشطة باللون الازرق بينما تصبغ باللون الاحمر القرنفلى التراكيب التى تحتوى على قليل من هذه المجموعات الكيماوية .

طريقة حمض بيرفورمك - شف للكشف عن البروتينات الغنية في مجموعات ثنائي الكبريت - ستين (بيرسي ١٩٥١)

The Performic Acid-Schiff Method (PFA)for SS groups (Pearse, 1951)

تحضير المحاليل :

محلول حمض فوق الفورميك Performic Acid

أضف ٤ سم³ من ٣٠٪ ماء أوكسجين ٢/١سم³ من حمض كبرتيك مركز الى ٤٠سم³ من ٩٨٪ حمض فورميك . استخدم المحلول فى الفترة الواقعة بين مرور ساعة واحدة ,٢٤ ساعة من تحضير لاحظ ألا تستخدم ماء أوكسيجين فتحت زجاجته منذ مدة أكثر من ٣ أسابيع .

كاشف شف Schiff's Reagent

الطريقة :

١- مرر القطاعات الشمعية حتى الماء .

٢- ضع القطاعات لمدة ١٠-٣٠ دقيقة فى حمض فوق الفورميك .

٣- اغسل القطاعات فى الماء لمدة ٢-٥ دقائق .

٤- ضع القطاعات فى محلول شف لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة .

٥- اغسل فى ماء جارى دافىء لمدة ١٠ دقائق .

٦- مرر القطاعات فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق الزيلول وغط فى دى بى اكس . D . P . X

النتائج : البروتينات المحتوية على ثنائى الكبريت مثل الكيراتين تأخذ لونا قرنفليا الى الأحمر الأرجوانى .

طريقة ساكاجوتشي (١٩٢٥) للكشف عن "الأرجنين"

(محورة عن بيكر ١٩٤٧)

١ - ثبت العينات فى زنكر - بوان - سوزا أوفورمال سبلمت .

٢ - أزل الشمع من القطاعات ثم مرر القطاعات فى كحول مطلق ثم خليط من الكحول المطلق والآثير .

٣ - ضع الشرائح فى محلول ١٪ سيللودين لمدة دقيقتين ثم أترك الشرائح تجف فى الهواء

٤ - مرر القطاعات فى سلسلة متناقصة التركيز من الكحولات حتى الماء .

٥ - حرك الشريحة فى الهواء حتى تجف .

٦- ضع على القطاعات قطرات من محلول آلفا نافثول هيبوكلوريت α- Naphthol hypochlorite واتركه لمدة ١٥ دقيقة .

٧ - صفى الشريحة وجفف القطاع بورقة ترشيح .

٨ - ضع الشريحه فى خليط من أجزاء متساوية من البيريدين والكلوروفورم .

٩ - غط القطاع بخليط من البيريدين والكلورفورم

النتائج : البروتينات الحاوية على الارجنين تاخذ لونا برتقاليا محمرا .

طريقة النترته - الازدواجية للكشف عن التيروسين

Diazotisation - Coupling Method for Tyrasine

(Glenner and lillie, 1959)

١- جهز قطاعات شمعية مثبتة فى الفورمالين أو خليط ساخن من الكلوروفورم والميثانول .

٢- ازل شمع القطاعات وأوصلها حتى الماء .

٣- إجر عملية النترتة فى الظلام بوضع القطاعات لمدة ١٨-٢٤ ساعة عند درجة حرارة ٣° م فى خليط يحتوى على ٦.٩ جم نيتريت الصوديوم ، ٨.٥ سم^3 حمض خليك، ثم أكمل الى ١٠٠ سم^3 بالماء المقطر .

٥ - عامل القطاعات لمدة ساعة واحدة عند درجة ٣°م بخليط يحتوى على ١جم هيدروكسيد البوتاسيوم ، ١جم سلفمات الامونيوم ammonium sulphamate ، ١ جم (8-amino -1-naphthol-5-sulphonic acid).Sacid

٦ - اغسل القطاعات فى ثلاث تغييرات من $\frac{١}{١٠}$ عيارى من حمض الهيدروكلوريك ٠,١ N-HCl ، لمدة خمس دقائق لكل تغييرة .

٧ - انزع الماء بسلسلة صاعدة من الكحول ، روق بالزيلول ثم غط بالصمغ .

النتيجة : تعطى البروتينات المحتوية على التيروسين لونا أحمر قرنفليا .

طريقة داي هيدروكسي - داي نافثيل - داي سلفيد (د . د. د.) للكشف عن مجموعات السلفهيدريل (عن بارنت وسلجمان سنة ١٩٥٢)

The dihydroxyl-dinaphthyl-disulphide (DDD)method for SH groups

(after Barnett and Seligman,1952)

١- ثبت العينات فى الفورمالين أو كارنوى أو بوان أو فى خليط من حمض تراى كلورو أستيك والايثانول .

٢- جهز قطاعات شمعية .

٣- ضع القطاعات لمدة ساعة واحدة عند درجة ٥٠°م في محلول يحتوى على ٢٥ سم^{٣} فى ٠,١ مولار فيرونال أستيت 0.1 M Veronal acetate أو فى ٠,١ مولار منظم ترسى 0.1M Tris buffer (الأس الهيدروجينى ٨,٥)، ٢٥سم^{٣} كحول إثيلى مطلق مذابا فيه مسبقا ٢٥ ملجم من الكاشف (د.د.د.) 2, 2 dihydroxyl- 6, 6 dinaphthyl disuphide (DDD)

٤- برد حتى درجة حرارة الغرفة .

٥- اغسل فى ٥٠٪ منظم كحولى اثيلى لمدة ١٥ دقيقة .

٦- اغسل القطاعات فى ماء مقطر .

٧- ضع القطاعات لمدة دقيقتين فى محلول طازج من ٥٠ ملجم من ملح فاست بلو ب (تترازوتايزد داى أورثو أنزيد (Tetrazotised diorthoanisidine, Fast blue B salt) فى ٥٠ سم^{٣} من ٠,١ مولار منظم فوسفاتى عند أس هيدروجينى ٧,٤ .

٨ - اغسل فى ماء صنبور جارى .

٩- انزع الماء بالكحول - روق فى الزيلول ثم غط بالبالسم .

النتيجة : البروتينات المحتوية على مجموعات سلفهيدريل تعطى لونا أزرق .

الكشف عن الامنيلويدات باستخدام مثيل فيوليت
(محورة عن بنكوروفت عام ١٩٦٣).

Methyl Violet Method for Amyloid (Modified by Bancroft , 1963)

تحضير المحاليل :

١- ١٪ محلول مائى مثيل فيوليت Methyl violet .

٢- ٢٪ محلول مائى مثيل جرين Methyl green ، مع ملاحظة ضرورة التخلص مما يحتويه من ميثيل فيوليت بالغسيل بواسطة الكلوروفورم (راجع صفحة ١٨٧).

٣- ١٪ حمض خليك .

خطوات العمـل :

١- جهز قطاعات للعينة مثبتة فى الفورمالين وذلك باستخدام الميكروتوم الثلجى أو الكروبوستات

٢ - اغسل القطاعات فى الماء .

٣ - أصبغ القطاعات باستخدام محلول مثيل فيوليت لمدة ١ - ٢ دقيقة .

٤ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور لمدة دقيقة واحدة .

٥ - اغمس القطاعات حوالى ١٥ ثانية فى محلول ١ ٪ حمض خليك .

٦ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور لمدة دقيقة .

٧ - اصبغ القطاعات فى محلول المثيل جرين لمدة خمس دقائق .

٨ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور لمدة ٣٠ ثانية .

٩ - غط باستخدام جلسرين جيللى أو جفف القطاع جيداً بورق ترشيح ثم روق فى الزيلول ثم غط باستخدام صمغ مناسب .

النتائج : تصبغ الاميلويدات لبلون قرنفلى إلى أحمر ، بينما تصبغ الأنوية بلون أخضر .

الكشف عن ، الاميلويدات ، باستخدام صبغ كونغورد (محورة عن هايمان عام ١٩٤٦) .

Conogo Red Method for Amyloid (Modified by Highman 1946 .)

محلول الصبغ : Staining Solution

- كونغو رد	Congo Red	٥٠٠ ملجم
- كحول مطلق	Absolute alcohol	٥٠ سم^{2}
- ماء مقطر	Distilled water	٥٠ سم^{3}

محلول التمييز : Differentiator .

- هيدروكسيد البوتاسيوم	Potassium hydroxide	٢٠٠ ملجم
- كحـول مطـــلق	Absolute alcohol	٨٠ سم

- مـــــاء مـقـطر Distilled water ٢٠ سم ٣

خطوات العمل :

١ – مرر القطاعات حتى الماء .

٢ – اصبغ فى محلول صبغ كونغو رد لمدة ثلاث دقائق .

٣ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور .

٤ – ميز الصبغ بواسطة محلول التمييز الموضح أعلاه ، مع استخدام الميكروسكوب لضبط التمييز .

٥ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور .

٦ – اصبغ الانوية باستخدام صبغ الهيماتوكسيلين .

٧ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور .

٨ – انزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول .

٩ – روق فى الزيلول .

١٠ – غط باستخدام صمغ مناسب .

النتائـــج :

- الاملويدات .... برتقالية إلى حمراء
- الأنوية .... زرقاء
- الإلاستين .... برتقالية

الفصل السادس

6

الأحماض النووية

Nucleic Acids

الفصـــل السادس

الأحمـــاض النوويـــة

Nucleic Acids

الأحماض النووية جزيئات كبيرة توجد فى كل الكائنات الحية ، وهى نوعان ، أولهما حمض دى اوكسى ريبونيوكليك (ح ن د) Deoxyribonucleic acid (DNA) ، والآخر حمض ريبونيوكليك (ح ن ر) Ribonucleic acid (RNA) ، وللحمضين أهمية بيولوجية قصوى ، حيث يمثل ح ن د المادة الوراثية التى تختزن فيها المعلومات الوراثية ، كما أن المواد البروتينية تتكون فى الخلايا بناء على آلية معينة يتحكم فيها الحمض النووى (ح ن ر) . وتمثل المعادلة الآتية جوهر علم البيولوجيا منذ مايقرب من أربعين عاما وحتى الوقت الحالى :

$$DNA \rightarrow RNA \rightarrow Protein$$

وبناء على ذلك فإن الدراسة الهستوكيميائية للأحماض النووية فى الكائنات المختلفة تعتبر ذات أهمية بالغة سواء فى الحالات السوية أو المرضية .

وكان العالم الألمانى فردرتش مايشر (١٨٤٤ - ١٨٩٥) أول من استطاع فصل حمض ح ن د ، وكان ذلك عام ١٨٦٨ من أنوية خلايا صديدية ، وقد حصل على المادة نفسها من الحيوانات المنوية لأسماك السالمون ، ووجد أن كميات ح ن د فى الأنسجة المختلفة لحيوان ما - ماعدا المناسل - ثابتة ولكنها تختلف من نوع لآخر . وقد عرف بعد ذلك أنه يوجد فى الخلايا حمض نووى آخر هو ح ن ر ، وأن كميات هذا الحمض تختلف عن بعضها فى خلايا الأنسجة المختلفة ، كما تختلف في الخلية نفسها من وقت لآخر حسب دورة أنشطتها البيولوجية المختلفة . وقد تتابعت جهود العلماء عبر سنوات طويلة للكشف عن طبيعة تركيب الأحماض النووية ، وقد عرف فيما بعد أن النيوكليوتيدات Nucleotides تمثل الوحدات البنائية لجزىء الحمض النووى ، وتتركب كل نيوكليوتيد من جزىء سكر خماسى ، يرتبط من ناحية ذرة الكربون رقم ٥َ بمجموعة الفوسفات ، ومن ناحية ذرة الكربون رقم ١َ بقاعدة

نيتروجينية . والقواعد النيتروجينية على طرازين ؛ أحدهما هو البيورينات Purines ، وهى مركبات عضوية " ثنائية الحلقات dicyclic وهى تشمل الأدنين Adenine والجوانين Gua-nine ، أما الطراز الثانى فهو «البيريميدينات » Pyrimidines ، وهى مركبات عضوية «أحادية الحلقة » monocyclic وتشمل الثايمين Thymine والسيتوسين Cytosine واليوراسيل Uracil .

وقد قام Chargaff فيما بين عامى ١٩٤٩ ، ١٩٥٣ بدراسة القواعد النيتروجينية لمادة ح ن د بالتفصيل ووجد أن نسبها لبعضها البعض تختلف كثيرا من نوع لآخر ، على أنه وجد أن هناك نظاماً حاكماً لها وهو أن كمية الأدنين تساوى كمية الثايمين ، بينما كمية السيتوسين تساوى كمية الجوانين ، وبمعنى آخر أن كمية C + G تساوى كمية A + G وعلى ذلك ، فإن $\frac{A + T}{C + G}$ ثابتة للنواع الواحد .

وقد عرف أن الأحماض النووية تمتص أشعة الضوء فوق البنفسجى عند موجة طولها ٢٨٠ نانوميتر وأن ذلك يرجع إلى وجود القواعد النيتروجينية .

وتجدر الإشارة إلى أن الثايميدين المشع يستخدم للاستدلال على وجود ح ن د ، ويستخدم اليوريدين المشع للاستدلال على وجود ح ن ر .

ويلاحظ أنه إذا نزعت مجموعة الفوسفات من النيوكليوتيد ، أطلق على المركب الباقى اسم «نيوكليوسيد» Nucleoside ، وعلى ذلك فالنيوكليوسيدات المعروفة هى : أدينوزين Adenosine ، جوانوزين Guanosine ، سيتيدين Cytidine ، يوريدين Uridine ، ثايميدين Thymidine ، ويضاف المقطع الأولى دى أوكسى -- Deoxy للدلاله على ال دى أوكسى ريبونيوكليوسيدات Deoxyribonucleosides .

البناء الجزيئى لحمض دي أوكسى ريبونيوكليك

Molecular Organization of DNA

لتوضيح التنظيم الجزيئى لحامض دى اكسى ريبونيوكليك ، قدمت عدة مقترحات أو نظريات كانت من أهمها نظرية العالم «ليفين» Livine (١٩٥٠) ، عرفت باسم نظرية «رباعية النيوكليتيدات» (Tetranucleotide theory) التى تشير الى أن جزىء هذا الحامض يتكون

من وحدات متتابعة من القواعد النيتروجينية الأربع (أدنين - جوانين - ثيمين - سيتوسين) بكميات أو اعداد متساوية ، أى (١ : ١ : ١ : ١) .

إلا أن العالم «دافيدسون Davidson» عارض هذه النظرية فيما بعد (١٩٥٢) وإن كان ذلك بصورة جزئية ، حيث أعلن أن كمية هذه القواعد ليست متساوية كلها مع بعضها ، ولكن كمية الأدنين تساوى كمية الثيمين (١ : ١) وكمية الجوانين تساوى كمية السيتوسين (١ : ١) غير أن مجموع كميتى الأدنين والثيمين قد يكون أكثر أو أقل من مجموع كميتى الجوانين والسيتوسين .

أى أن $A = T$ ، $G = C$

ولكن $A + T \lesseqgtr G + C$

كذلك وجد أن كمية أو أعداد اليوارسيل (u) مساوية لأعداد الثيمين ، أى إن $T = U$

وبصورة نهائية ، فإن $A + G = T + C$

وكذلك $U = C$

وقد استدل من ذلك على وجود ترابطات معينة بين هذه القواعد النيتروجينية المختلفة .

نموذج واطسن وكريك (الحلزوني المزدوج)

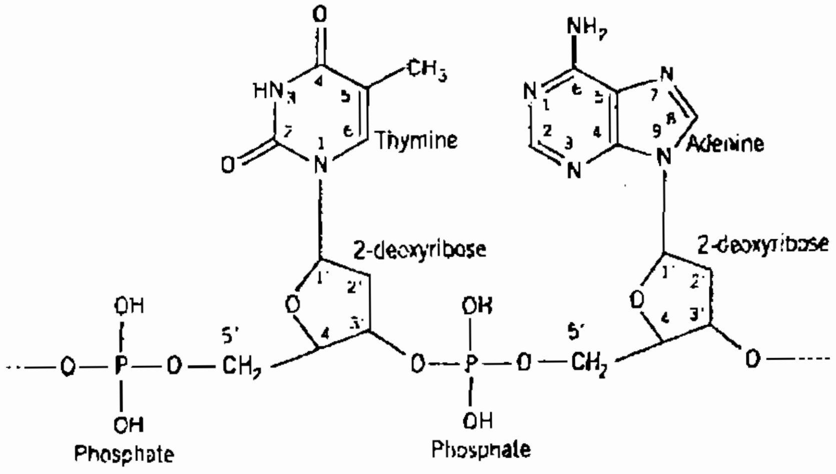
Model of Watson & Crick (Double hellix)

وفى عام ١٩٥٤ ، وفى جامعة كمبردج بانجلترا ، قدم البيولوجيان واطسون (الأمريكى) James Watson ، وكريك (البريطانى) Francis Crick بتقديم نموذج للتركيب الجزيئى لمادة ح ن د ، كما أيدت تجارب عالم الفيزياء ولكنز (النيوزلندى) Maurice Wilkins هذا النموذج. وقد فتح هذا الاكتشاف آفاقاً جديدة فى علم الأحياء ، ومن أجل هذا الانجاز العلمى الكبير منحت جائزة نوبل فى الطب وعلم وظائف الأعضاء للعلماء الثلاثة فى عام ١٩٦٢ ، وكان لهذا الاكتشاف أثر عظيم في مجال علم « البيولوجيا الجزيئية» ، وعلم الوراثة ، «الهندسة الوراثية» .

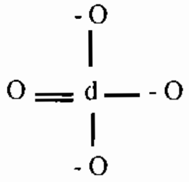
وحسب هذا النموذج ، فإن جزىء ح ن ر يتكون من شريطين أو سلسلتين Strands جانبيتين تتكون كل منهما من السكر الخماسي والفوسفات بطريقة متتابعة بينما توجد القواعدالنيتروجينية من هاتين السلسلتين بصورة محددة . وبذلك يبدو هذا التنظيم على هيئة السلم الخشبى ، الذى يتكون من جانبين (من السكر والفوسفات) بينما تتكون درجات السلم من القواعد النيتروجينية . غير أن هذا السلم يلتف حول بعضه متخذا شكل السلم الحلزونى . ونظرا لأنه يتكون من جانبين أو سلسلتين ، فإنه يشار إليه باسم اللولب أو "الحلزون المزدوج" double helix .

وقد وجد أن سمك هذا الحلزون حوالى ١٠ أنجستروم وهو سمك منتظم بالنسبة للتركيب باكمله ، بينما يبلغ طول اللفة الواحدة حوالى ٣٤ أنجستروم gyte وقد وجد أن جزىء الحامض يتكون من عدة آلاف من هذه اللفات وتحتوى اللفة الواحدة على عشرة أزواج من القواعد النيتروجينية .

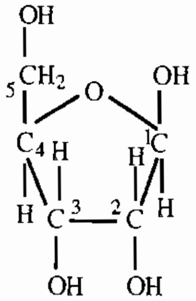
ومن الواضح أن الوحدة البنائية فى جزىء ح ن د هى النيوكليوتيد ، ويتكون جزىء ح ن د من آلاف منها ولذلك يطلق عليه أحياناً عديد النيوكليوتيدات Polynucleotide . ويلاحظ أن حمض الفوسفوريك يستخدم مجموعتين من مجموعاته الحمضية الثلاث فى روابط الداى استر diester ٣َ ، ٥َ ، وتعزى الخواص الحمضية لحمض ح ن د إلى المجموعة السالبة الثالثة ، وهى تمكن ح دن د من الاتحاد بالهستونات ، كما يعزى اليها قابلية حمض ح ن د للاصباغ القاعدية .



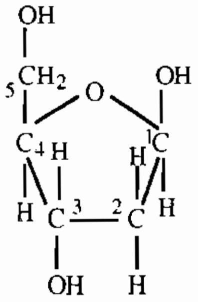
جزء من جزىء ح ن د لتوضيح الروابط الفوسفاتية بين نيوكليوتيدات متتالية



مجموعـة الفوسـفات
Phosphate group

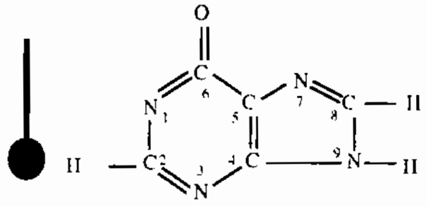


السكر الخماسى « ريبوز»
Pentose sugar
(ribose)

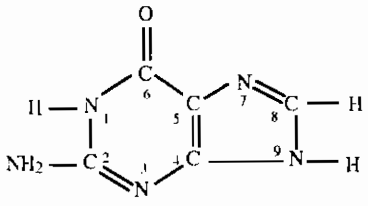


السكر الخماسى «دى أكسى ريبوز»
Pentose sugar
(deoxyribose)

البيـورينـات
Purine bases

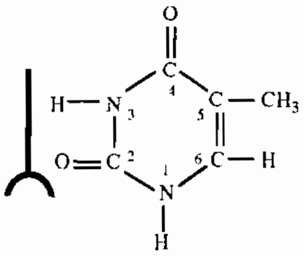


أدينـين
Adenine

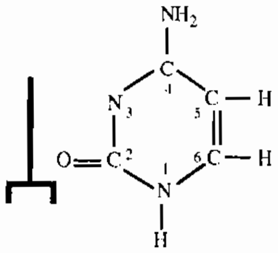


جـوانين
Guanine

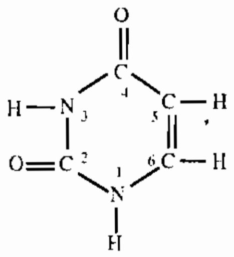
البيريمـيدينـات
Pyrimidine bases



ثيمـين
Thymine



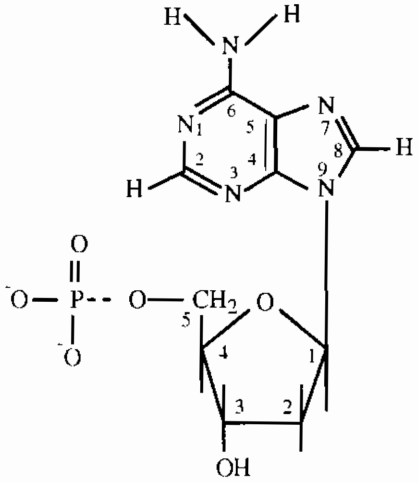
سيتوسين
Cytosine



يوراسـيل
Uracil

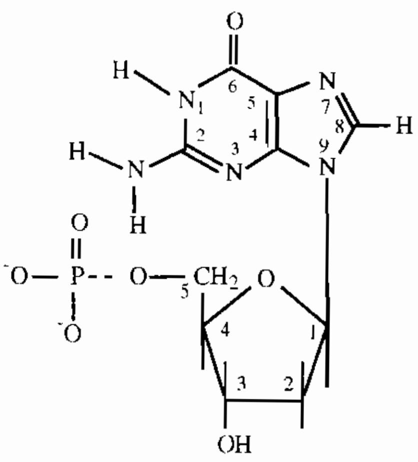
نيوكليوتيدات البيورينات

Purine nucles tides



نيوكليوتيدة أدنين

Adenine nucleotide

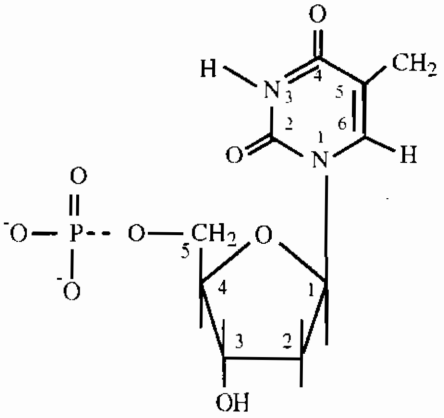


نيوكليوتيدة جوانين

Guanine nucleotide

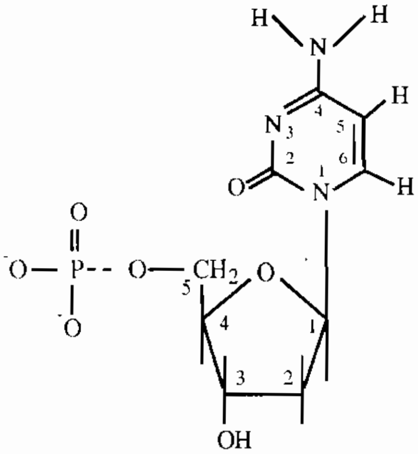
نيوكيلوتيدات البريميدينات

Pyrimidine nucleotides



نيوكليوتيدة ثيمين

Thymine nucleotide



نيوكليوتيدة سيتوسين

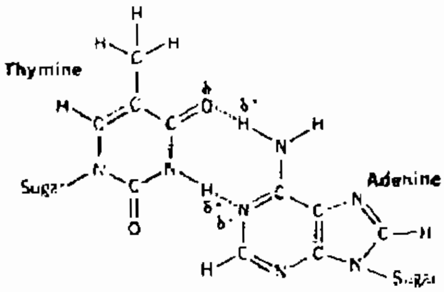
Cytosine nucleotide

Part of DNA mslecule showing Phosphite dicster

linkage between successive nucleotides

تكوين الروابط الهيدروجينية بين القواعد النيتروچينية

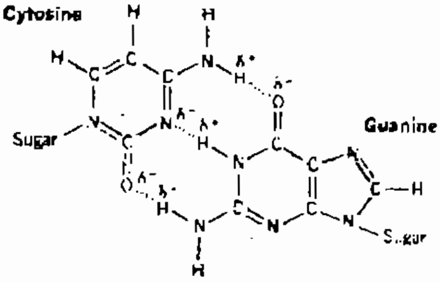
Formation of hydrogen bonds between the nucleotides .



رابطتا هيدروچين بين الأدنين والثيمين

Two hydrogen bonds between

adenine and thymine



ثلاث روابط هيدروچينية بين الجوانين والسيتوسين

Three hydrogen bonds

between guanine and cytssine

القواعد النيتروچينية ودورها في تثبيت النموذج الحلزوني لحامض دي أكسي ريبونيوكليك

Significance of nitrogensus bases in stabilizing the helical structure of DNA: إن توصل العالمين واطسن وكريك لهذا النموذج اللولبى أو الحلزونى لم يتم هكذا عن طريق الصدفة أو بيسر وسهولة ، ولكنه تم بعد دراسات مستفيضة من النواحى السيتولوچية والبيوكيميائية والميكروسكوبية المختلفة بما فيها الميكروسكوب الألكترونى لتوضيح كيفية تماسك شريطى أو سلسلتى ح ن د ببعضهما والدور الذى تلعبه القواعد النيتروچينة فى هذا المجال . وبطبيعة الحال ، فإن هذين العالمين قد استفادا أيضا فائدة مؤكدة من جميع الدراسات والبحوث السابقة فى هذا الخصوص .

وبداية ، فقد أصبح مؤكدا أن جزيء هذا الحامض يتكون هيكله الأساسى من شريطى السكر والفوسفات بطريقة متتابعة بالغة الدقة ، وتفصل بينهما مسافة محددة . وقد أدى ذلك إلى الاستنتاج بضرورة وجود القواعد النيتروچينية بين هاتين السلسلتين . وبقى السؤال : كيف تنتظم هذه القواعد مع بعضها لتحقيق هذا النمط المتماسك المنتظم ؟

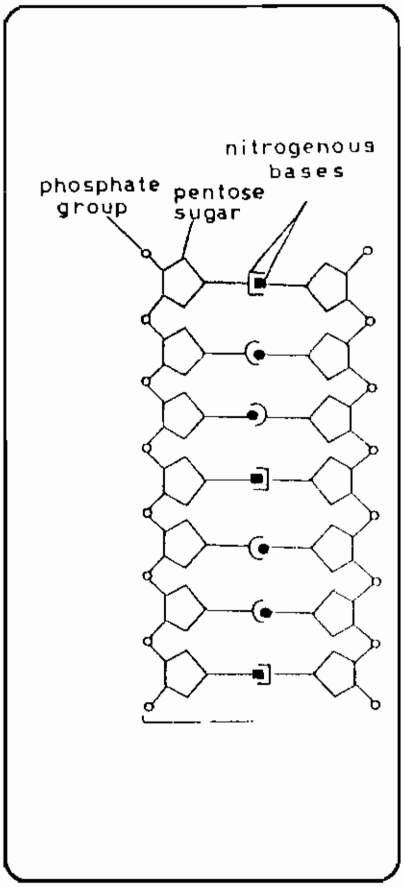
وقد اقترحت فى هذا الشأن اقتراحات مختلفة يمكن إجمالها فيما يلى :

أ - يوجد كل اثنين من البيورينات بجوار بعضهما فى المسافة أو الحيز بين السلسلتين، ولكن هذا الافتراض استبعد لأن أبعاد هاتين القاعدتين (وكل منهما ثنائى الحلقة) لاتكفى لهما تلك المسافة المحددة .

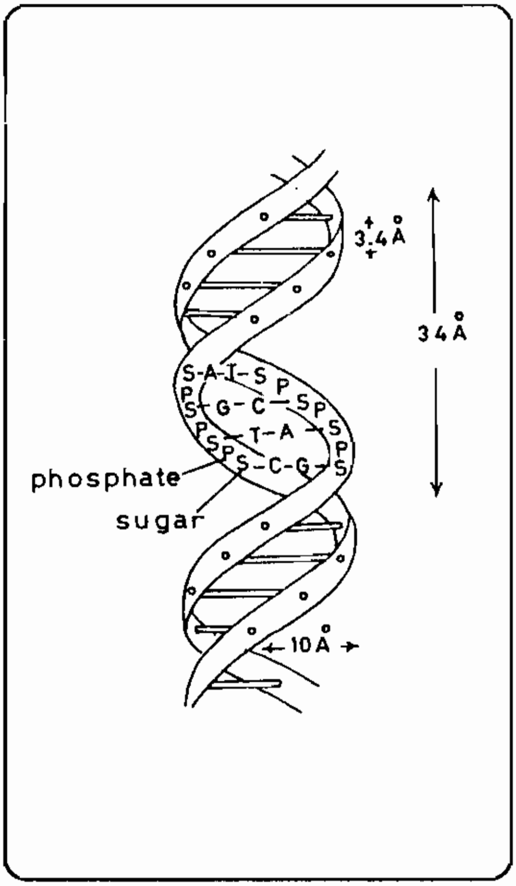
ب - افترض بدلا من ذلك أن هذه المسافه يشغلها اثنان من البيريميدينات (وكل منهما أحادى الحلقة) ولكن المسافة بين السلسلتين أكثر اتساعا بما لايسمح بثبات هاتين القاعدتين.

جـ - كان الافتراض الثالث أن هذه المسافة يشغلها أحد البيورينات (ثنائى الحلقة) وأحد البيريميدينات (أحادى الحلقة) ووجد أن هناك تطابقاً تاماً بين المساحة التى يحتلانها والمسافة الموجودة بين سلسلتى جزىء الحامض .

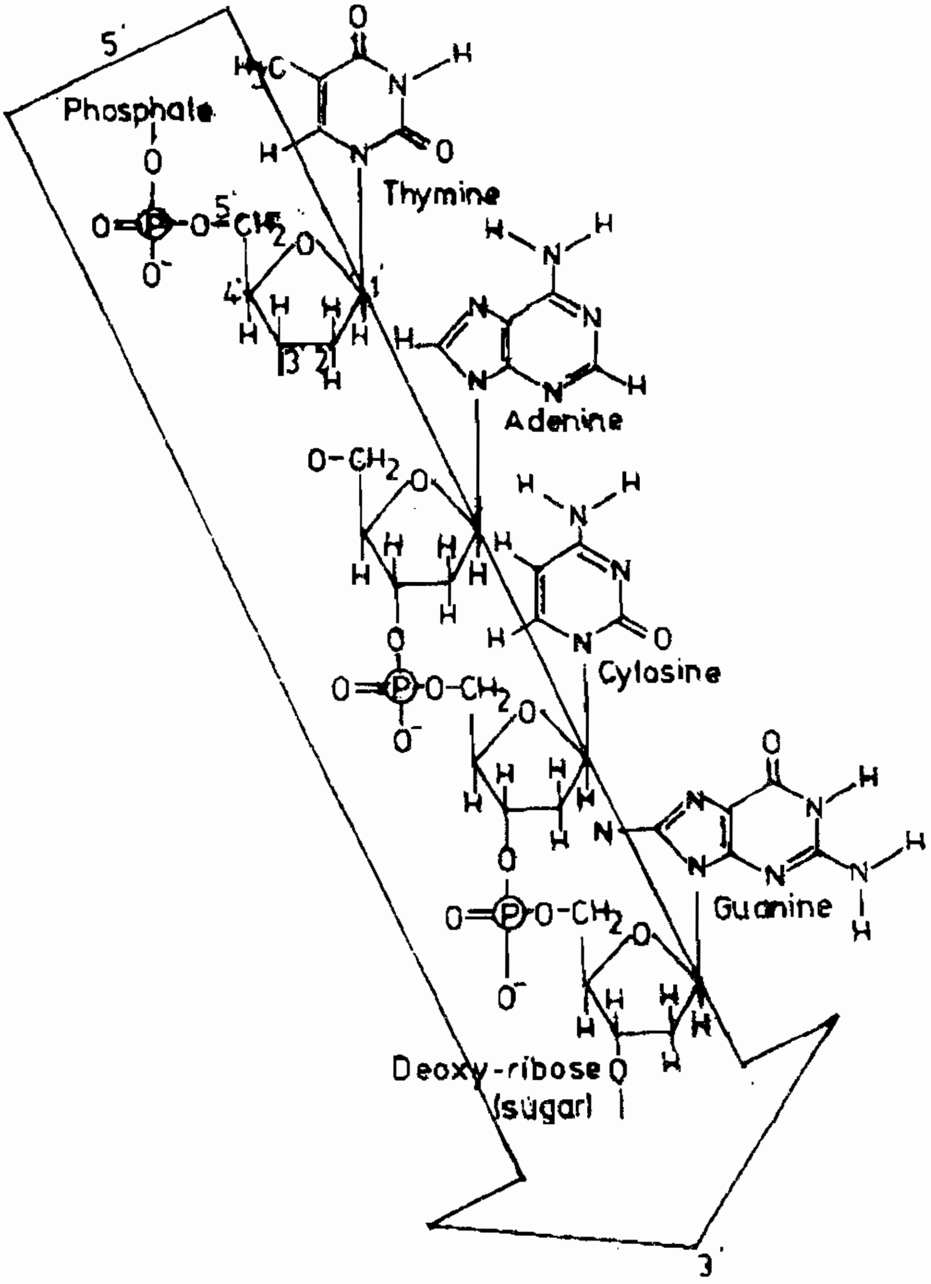
وبذلك تم تحديد هذا التنظيم ولكنه وجد أنه ليس أى بيورين يمكن أن يتماسك مع أى بيريدين . وبعد عدة تجارب ومحاولات تبين أنه لابد من تواجد البيورين (أدنين " A " بجوار البيريميدين (ثيمين "T") لكى يتماسكان معا وتنشأ بينهما روابط هيدروچينية بعد تفاعلات حيوية معينة تلعب فيها الإنزيمات دورا أساسيا . وبالمثل لابد من تواجد البيورين (جوانين " G ") بجوار البيريميدين (سيتيوسين "C") حتى ترتبطان معا أيضا بالروابط الهيدروچينية ، وتكون هناك رابطتان بين الأدنين والثيمين وثلاث روابط بين الجوانين والسيتوسين $A = T \quad G \equiv C$.



جزء غير ملتف من جزىء « ح ن د »
Uncoilled part of DNA molecule



جزء من الحلزون المزدوج لجزىء « ح ن د »
Part of the double helix of DNA .



قطعة من جزيء ح ن د

part of DNA ms le cule

ويتبين مما تقدم أنه إذا كان تتابع القواعد النيتروچينية فى جزء من أحد الشريطين مثلا 3 TCCAA 5َ ، فإن قطعة الشريط الآخر التى تتكامل معها يكون ترتيب قواعدها النيتروجينية 5 AGGTT 3َ . ويتضح من ذلك أن شريطى جزىء ح ن د متوازيان عكسيا Antiparaller حيث إن الطرف ٣َ لأحد الشريطين والطرف ٥َ للشريط الآخر يكونان فى الناحية نفسها .

نماذج بنائية أخرى :

أوضحت تجارب بعض العلماء بعد ذلك وجود طرز بنائية أخرى لجزىء حمض ح ن د تختلف فى بعض التفاصيل عن النموذج الذى قدمه واطسون وكريك ، فمثلا ، بينما تحتوى الدورة الكاملة فى حلزون واطسون وكريك على عشرة أزواج من القواعد النيتروجينية فإن تجارب هؤلاء العلماء قدمت نماذج تحوى 11 زوجا من القواعد النيتروجينية فى الدورة الكاملة من الحلزون .

ومن الجدير بالذكر أن العالم رتش Rich أكد فى عام ١٩٧٩ ما قال به من قبل العالمان " بول وجوفين " F.M.Pohl & T.Jovin بوجود حمض ح ن د يسارى الالتفاف ، على عكس النموذج الذى قال به واطسون وكريك اليمينى الالتفاف والذى يوصف بأنه B-DNA .

ويلاحظ أنه فى الطراز يسارى الالتفاف يتبع شريطا سلسلة (فوسفات – سكر) نظاما متعرجا ، ويوصف هذا الطراز بأنه Z- DNA وهو يوجد مثلا فى " كروموسومات البوليتين " Polytene للغدد اللعابية لذبابة الدروسوفلا Salivary glands of Drosophila ، حيث يوصف جزىء ح ن د المرتبط شريطاه معا بالصورة العادية أو الأصلية native .

فصل (فك) والتحام شريطى ح ن د :

أمكن للعلماء – اعتماداً على أن الروابط بين القواعد النيتروجينية لشريطى حمض ح ن د ضعيفة (هيدروجينية) فك شريطى الجزىء باستخدام المثبتات أو الحرارة أو درجة pH قاعديه فى ظروف معينة ، ويطلق على عملية فصل الشريطين اسم " الفك " Denaturation أو التنويب أو الانصهار Melting .

وقد وجد أن درجة الحرارة التى تحدث عندها عملية الفك تختلف اعتمادا على مقدار

نصيب الجزىء من ثنائيات القواعد النيتروجينية GC/AT وذلك أنه كلما أحتوى ح ن د على G/C (ذو الثلاث روابط هيدروجينية) أكثر ، ارتفعت درجة الحرارة التى يتم عندها فك الجزىء وذلك لاحتياجها لكمية أكبر من تلك الطاقة . ويمكن بعد ذلك إعادة التحام Annealing أوا عادة ربط Renaturation الشريطين معا واستعادة نمط أو شكل جزىء ح ن د الأصلى . وقد كان ذلك من العوامل الأساسية لتثبيت نظرية واطسن وكريك فى هذا الخصوص .

ويتصل حمض ح ن د فى حقيقيات النواة (الإيوكاريوتات Eukaryotes) بالهستونات الغنية بالليسين وكذلك الغنية بالأرجنين وفق نظام معين وكذلك بالبروتينات غير الهستونية لتكوين الكروماتين ، ولازال العلماء يبحثون الكثير من الاسرار عن عملية تنشيط الكروماتين ، وآلية العلاقة بين حمض ح ن د والهستونات فى حالات مضاعفه جزىء ح ن د ونسخ حمض ح ن ر .

ومما هو جدير بالذكر أنه في أوليات النواه (البروكاريوتات Prokaryotes) فإن حمض ح ن د يشاهد على شكل جزىء واحد حلقى الشكل يستند إلى غشاء البلازما ، دون ان تتصل به أية هستونات أو بروتينات أخرى ، ويوصف عندئذ بأنه "عار" naked ، وبذلك لايوجد كروماتين بالمعنى المعروف فى حقيقيات النواة .

العلاقة بين حامض دي أكسي ريبونيوكليك والكروموسومات :

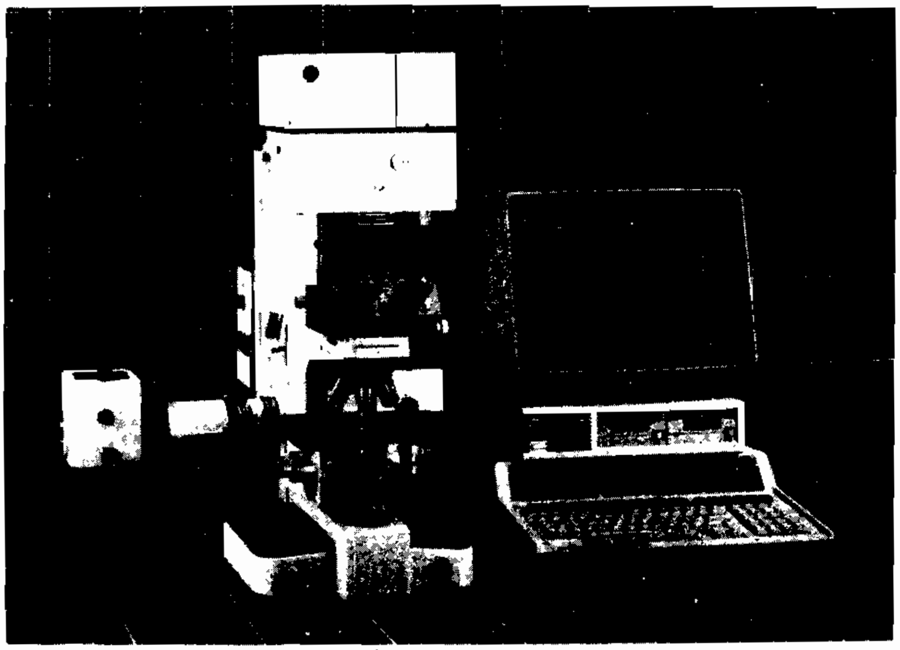
Relation between DNA and Chromosomes :

من المعروف الآن أن كل كروموسوم يتكون بصورة رئيسية من جزىء أو أكثر من ح ن د . وعلى ذلك فإنه توجد علاقة اساسية بين هذه المادة وتكاثر الكروموسومات أو تضاعفها أثناء عملية الأنقسام .

وكما سبقت الآشارة فإن دورة الأنقسام تبدأ بظاهرة لا يمكن مشاهدتها ميكروسكوبيا وهى المرحلة التى يشار إليها بالرمز " S " وهى مرحلة تضاعف أو تناسخ جزيئات ح ن د قبل أن تبدأ فى الكروموسومات ذاتها .

تناسخ ح ن د : Replication of DNA

يفضل فى هذا المجال استخدام لفظ تناسخ أو استنساخ للدلالة على تكوين نسخ جديدة من النموذج الأصلى وليس انقسام أو تضاغف النموذج الأصلى ، وإن كانت المحصلة النهائية هي وجود ضعف عدد أو كمية ح ن د فى الكروموسومات فى المرحلة البينية ، التى لا يزال بها العدد الزوجى (٢ ن) من الكروموسومات ، حتى إذا انقسمت هذه الخلية إلى خليتين بنويتين daughter cells ، احتوت كل منهما على نصف هذا العدد أو تلك الكمية من ح ن د . وبعبارة أخرى ، فإن كل خلية ناتجة سوف تحتوى على نفس العدد أو نفس الكمية من ح ن د . هذا فى الخلايا الجسدية Somatic cells ، أما الخلايا الجنسية التى تحتوى على العدد الفردى من الكروموسومات فإنها ستحتوى على نصف كمية ح ن د التى كانت موجودة فى الخلية الأم .



جهاز القياس الخلوى الضوئى

(لقياس كمية الأحماض النووية)

Cytophotometer

والمعروف أن عملية الاستنساخ هذه تستخدم العديد من الإنزيمات التى تتوفر فى الخلايا المختلفة . وقد تمكن العالم " كورنبرج" Kornberg فى أواخر الخمسينات من عزل العديد من هذه الإنزيمات ، منها (4- deoxyribonucleotide triphosphatases) التى تشتمل على « دى أكسى أدينورين» deoxyadenosine و « دى أكسى سيتوتيدين » deoxycytotidine «ودى أكسى جوانين» deoxyguanine وإنزيم «ثلاثى فوسفات ثيميدين» thymidine triphoshatase وغيرها .

ميكانيكة تناسخ ح ن د : Mechanism of DNA replication

يمكن تلخيص عملية التناسخ هذه على النحو التالى :

أولا : يبدأ خيط أو شريط كل جزىء من جزيئات ح ن د فى الكروموسومات فى إزالة التفافهما حول بعضهما ، ويبدأ ذلك فى أية منطقة معينة من هذا الجزىء ولكنه يستمر حتى يصبح الشريطان منفصلين عن بعضهما تماما . والمعروف أن ذلك يحدث تحت تأثير إنزيمات خاصة معينة .

ثانيا : يبدأ كل شريط – بمساعدة إنزيمات أخرى – فى تكوين أو تخليق نسخة مكملة له تماما Complementary جهاز القياس الخلوى الضوئى (لقياس كمية الأحماض النووية) Cytophotometer بنفس نظام التكامل المألوف بحيث يأتى " أدنين " مقابل " ثيمين " والعكس بالعكس ، كما يأتى " جوانين " مقابل " سيتوسين " والعكس بالعكس أيضا وترتبط كل قاعدتين متجاورتين مع بعضهما بالروابط الهيدروجينية كما سبق ذكره

ثالثا : تستمر عملية البناء هذه وعندما يتم تكوين النسختين أو الشريطين الجديدين ، فإن الشريطين المتكاملين يلتفان حول بعضهما وبذلك يتكون جزىء جديد من ح ن د . ويلاحظ أن هذا الجزىء يتكون من « شريط أصلى أو قديم» old strand وشريط جديد new strand

وتجدر الإشارة إلى أن عملية الاستنساخ هذه متطلب رئيسى وأساسى لانقسام الخلية بحيث يحتوى كل كروموسوم على جزيئين بدلا من جزىء واحد من ح ن د ، حتى إذا انشق كل كروموسوم بعد ذلك إلى كروماتيدتين أو كروموسومين بنويين فإن كلا منهما يحتوى مرة

أخرى على جزىء واحد كما كان الحال فى الكروموسوم الأصلى . وعلى العكس من ذلك ، فإن عملية الاستنساخ هذه قد تحدث خدمة لغرض آخر ليس هو انقسام الخلية .

وهنا تجدر الاشارة مرة أخرى إلى أن هناك ارتباطا شديدا بين دورة الانقسام الخلوية وعملية الاستنساخ هذه . فالمعروف أن الفترة الأولى فى هذه الدورة وهى المرحلة البينية interphase فإنه يشار إلى الفترة الأولى فيها بالرمز " ج١ " "G_1" وهى مرحلة ماقبل الاستنساخ لأنه لا تحدث فيها عمليات التناسخ هذه لأن ح ن د يكون عندئذ فى الأجسام الكروماتينية ولم تتميز بعد الى الكروموسومات .

وتلى ذلك الفترة " س أو S" وهى التى تحدث خلالها عملية النسخ هذه ، وتأتى بعد ذلك الفترة " ج٢ " "G_2" وهى التى تفصل ما بين عملية تناسخ ح ن د وبداية عملية الانقسام الحقيقية والتى يشار اليها بصورة عامة بالرمز "M" والتى « تبدأ بالمرحلة التمهيدية » Prophase .

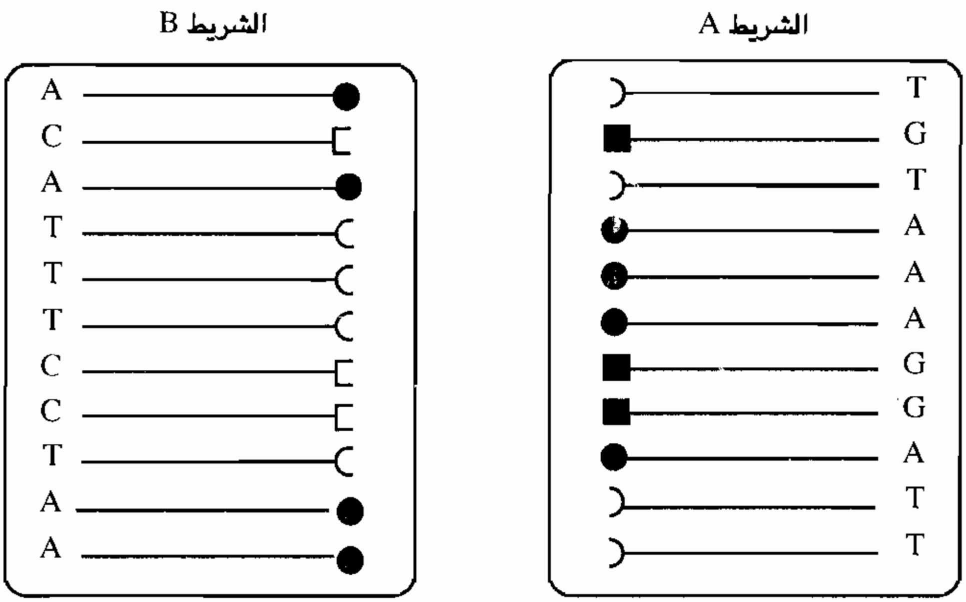
إثبات عملية تناسخ ح ن د :

أجرى العديد من التجارب لإثبات حدوث هذه العملية ، كان من أهمها الطريقة التى استخدمت فيها النظائر المشعة :

Application of radioactive isotopes as an evidence of DNA replication

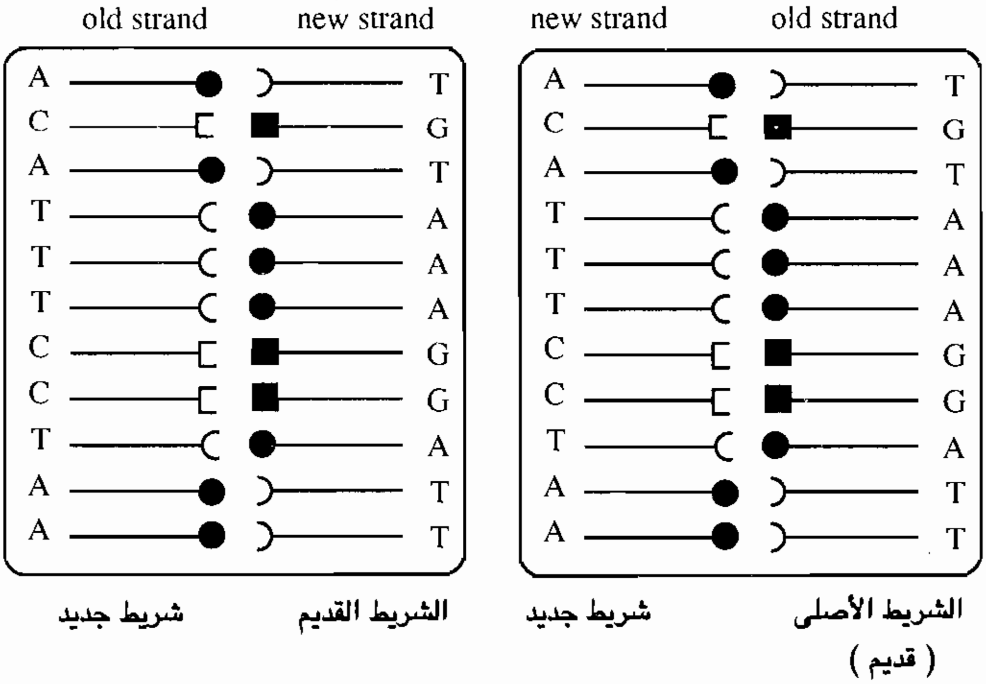
استخدم فى هذه الطريقة عنصر «ثيمدين» المشع ، ثم وضعه مع بقية مكونات ح ن د والإنزيمات البنائية الخاصة به . وتم وضع عدد من الكروموسومات النشطة فى الانقسام من البكتريا أو غيرها فى هذا الوسط . وبعد مرور فترة تعادل استكمال عملية الانقسام ، تم فحص الكروموسومات الناتجة . وقد وجد أنها تحتوى جميعها على العنصر المشع . وقد دل ذلك على أن كل كروموسوم منها يحتوى على شريط جديد مستنسخ من "ح ن د" دخل فى تركيبه هذا العنصر المشع .

وفى المرحلة الثانية من هذه التجارب ، تم نقل هذه الكروموسومات إلى وسط جديد لايحتوى علي العنصر المشع ولكنه يحتوى على جميع مكونات "ح ن د" وإنزيماته البناءة . وبعد اتمام عملية انقسام هذه الكروموسومات تم فحص الكروموسومات الناتجة ميكروسكوبيا حيث تبين أن نصفها فقط يحتوى على العنصر المشع بينما لا يحتوى عليه النصف الأخر . ومعنى ذلك أن النوع الأول هو الذى كان به الشريط الذى يحتوى على العنصر المشع . أما الشريط الجديد فلا يحتوى بالطبع على العنصر المشع . أما النوع الثانى ، فأحد الشريطين فيه لا يحتوى أصلاً على العنصر المشع وكذلك الشريط الجديد المستنسخ .



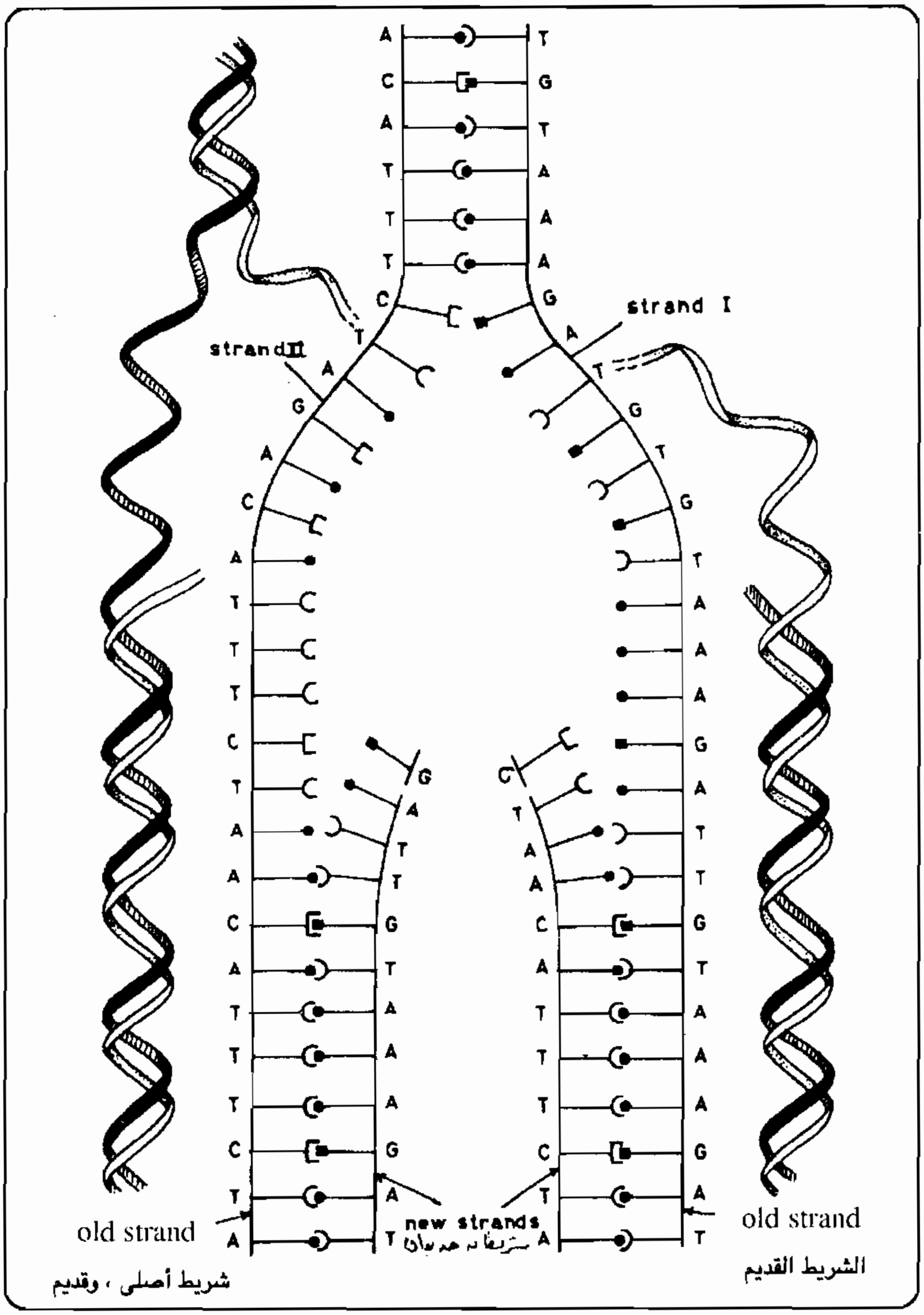
Two separated strands of part of DNA molecule

شريطان منفصلان عن جزىء من ح ن د



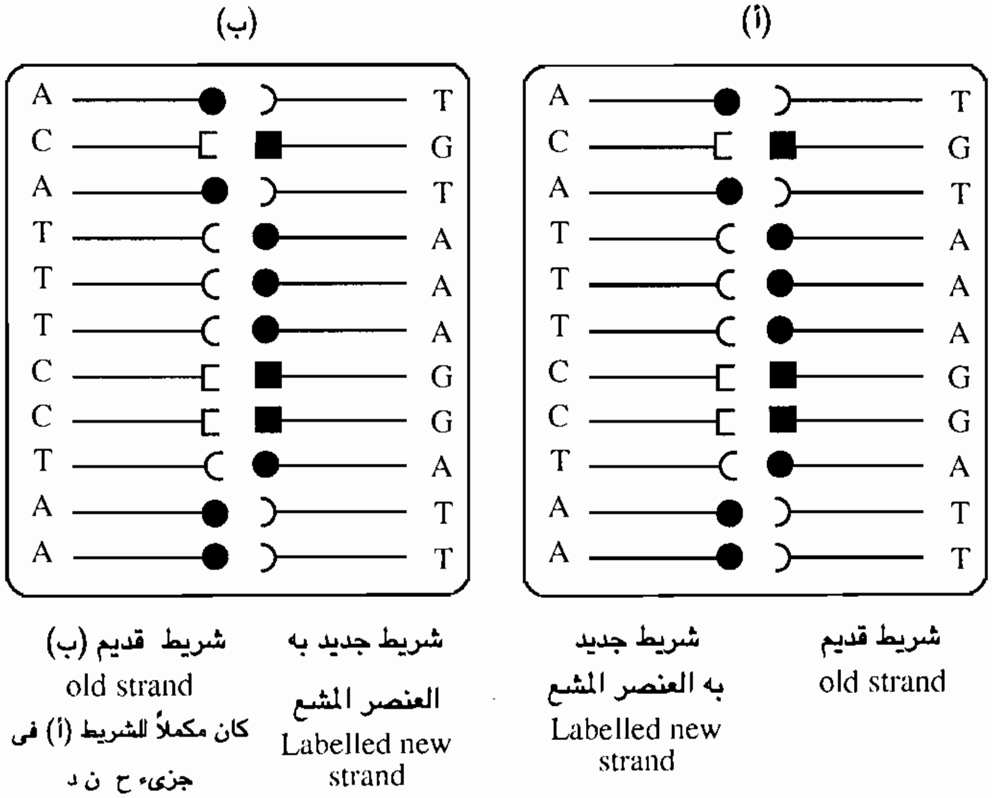
Formation of two molecules of DNA from the original molecule

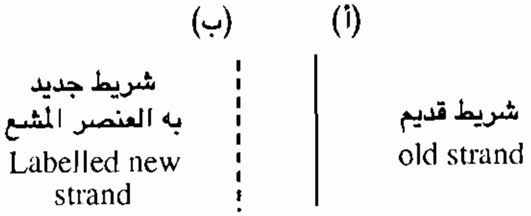
تكوين جزيئين من ح ن د من الجزىء الأصلى



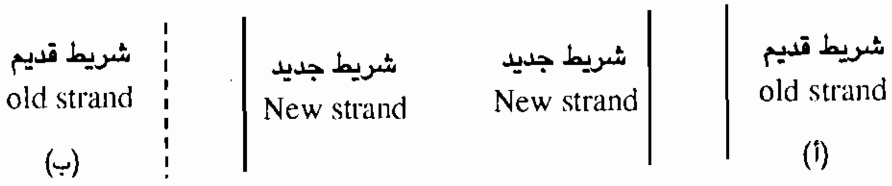
REPLICATION OF DNA

شكل يوضح تناسخ جزىء ح ن د

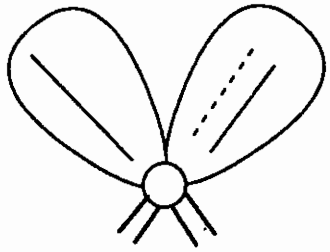




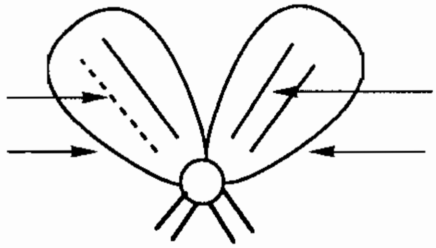
الجيل الأول للكروموسومات



الجيل الثانى للكروموسومات



الجيل الأول للكروموسومات جميعها بها العنصر المشع Lbelled Chromosomes



الجيل الثانى للكروموسومات نصفها فقط به العنصر المشع

الجيل الثانى للكروموسومات

الأحماض النووية ودورها في العمليات الوراثية :

Role of nucleic acids in genetic activities.

أصبح من المؤكد الآن أن الأحماض النووية تقوم بالدور الأساسى فى تحديد وانتقال الصفات الوراثية حتى أنه أصبح يشار اليها عامة على أنها « المادة الوراثية » genetic material . وقد جاء ذلك بعد سلسلة طويلة من الدراسات والتجارب . لعله من المناسب الإشارة إلى احدى التجارب المبدئية فى تلك المجالات ، وتضمنت الآتى بصورة مختصرة :

- تم استخلاص ح ن د بصورة نقية من أحد أنواع البكتريا التى تتميز بخاصية وراثية معينة ، وهى وجود وقشرة كربوهيدارتية محيطة بها.
- وضع ح ن د المستخلص فى وسط نقلت إليه بعض البكتريا العارية من تلك الخاصية الوراثية ، أى لا تحتوى على القشرة الكربوهيدراتية ، وتركت حتى إتمام عمليات الانشقاق أو التكاثر
- وجد أن جميع أفراد البكتريا الناتجة قد احتوت على القشرة الكربوهيدراتية ، ومعنى ذلك أن مادة ح ن د قد أكسبت هذه البكتريا صفة وراثية جديدة لم تكن موجودة بها.

- عند ما تركت هذه البكتريا لتتكاثر ، ظل النسل الناتج عنها مكتسبا لتلك الخاصية الوراثية الجديدة .

شـفرة الـوراثة Genetic code

بداية ، فـإن الاحـمـاض النووية هى المسئولة عن تحديد أنماط البروتينات التى يتم تخليقها أو تكوينها ، وهذه البروتنيات هى التى تنعكس على هيئة خصائص وراثية .

والأساس فى ذلك ، أو الذى يتحكم بصورة أساسية فى تلك العمليات هو نمط تواجد وترتيب القواعد النيتروجينة الموجودة فى جزيئات ح ن د الموجود داخل كروموسومات كل فرد . ومعنى ذلك أن كمية ح ن د التى تعادل (٢٠×١٠^{-١٢}) الموجودة فى البويضة المخصبة فى الانسـان هى المسـتولة عن تحـديد أنواع البـروتينات فى الفـرد الناتج ، وبالتـالى تحـديد خصائصه الوراثية .

ويقـود هذا الى التسـاؤل : "كـيف يقـوم ح ن د بالتـحكم فى تحـديد تلك الأنواع من البروتينات التى تؤدى الى تحديد الخصـائص الوراثية أو بعبارة أخرى ، **ما هى طبيعة الشفرة الوراثية التى تلعب ذلك الدور ؟**

وللإجابة عن ذلك السؤال ، تتعين الإشارة الى أن أية تعليمات أو معلومات إنما تتم عن طريق استـخدام إشـارات أو كلمـات معينة . والمعروف أن كل كلمة تتكون من أحرف معينة ، وأن هذه الكلـمات تعبر عن معـان مختـلفة ، ليس فقط لأنها تتكون من أحرف متباينة ولكن قد يكون ذلك بسـبب اخـتـلاف ترتيب أو تتابـع نفس الحـروف فى الكلمـات المخـتلفـة . مـثـال ذلك الأحرف الثلاثة : (T , A , R) يمكن أن تعبر عن معـان مختلفة حسب تتابعـها ، وذلك مثل (ART - TAR - RAT) وهكذا .

وقياسا على ذلك ، فإن كل جزىء من جزيئات ح ن د ، إنما يتكون بصورة أساسية من أربعة أحرف أبجدية أو عناصر كيميائية ، وهى القواعد النيتروچينية :" أدينين A" وثيمين T "جوانين G" و"سيتوسين C" . ولاشك أن نمط تتابع هذه الأحرف فى كلمات معينة تعطى معان مختلفة . فإذا كانت كل كلمة فى هذا المجال تتكون من ثلاثة أحرف ، فإن هذه الأحرف الأربعة تعطى أعداداً لانهاية لها من المعانى .

وهنا تجدر الاشارة الى حالة مماثلة هى "شفرة مورس" Morse Code التلغرافية التى تتكون من علامتين فقط (نقطة . وشرطة –) . ولكنه من الممكن بهاتين العلامتين فقط إعطاء معان أو معلومات يمكن أن تعطى قاموسا لغويا باكمله . على أنه فى حال الشفرة genetic Code n أو قاموس الوراثة . ومن الناحية الرياضية فإن عدد الشفرات التى يمكن أن تتكون من أربع قواعد نيتروجينة (الأدنين – الثيمين – الجوانين – السيتوسين – والبوراسيل) هى (٤)^{٣} = ٦٤ شفرة مختلفة . ومن الناحية العملية ، فإنه وجد أن ٦١ شفرة فقط من هذه الشفرات هى التى تدل على الأحماض الأمينة وتعرف الشفرات الثلاث المتبقية بانها " شفرات غير دالة none sense codons وبما أن عدد الأحماض الأمينية الأسياسية هو عشرون ، فإن لمعظم الأحماض الأمينية أكثر من شفرة واحدة حيث قد يتراوح عددها بين ١ – ٦ للحمض الأمينى .

التجارب البكترية .

للتحقق من ذلك قام العديد من الباحثين باجراء بعض التجارب على أنواع مختلفة من البكتريا خاصة بكتريا « نوروسبورا » تبين منها فاعلية مثل تلك الكلمات (القواعد النيتروچينة) فى تحديد أنواع الاحماض الأمينية التى تندمج مع بعضها مكونة أنواعا من البروتينات المختلفة مشتملة على الإنزيمات التى تلعب دورا أساسيا فى تلك النواحى ، على أنه يجب ملاحظة أن هذا الأمر لا يتوقف على ح ن د فقط ، وإنما تتم هذه العمليات الوراثية فى مجملها عن طريق تداخل أو تعاون الحامضين النوويين معا . على أنه يلاحظ أن بعض الكائنات التى لا يوجد بها ح ن د ولكنها تحتوى على ح ن فقط ، فإن ح ن ر هو الذى يقوم بتجديد وتكوين أنماط البروتينات المختلفة .

الشفرات الوراثية الثلاثة Triplet Csdons	الحامض الأمينى	Amino acid
CGU - CCG	آلانين	Alanine
CCG	أرچينين	Arginine
CAA - GAU	حامض اسبارتيك	Asparfic acid
CAU - AAU - AAC	اسباراچين	Asparagine
GUU	سيستين	Cysteine
GAA - GAU	حامض جلوتاميك	Glutamic acid
ACC - GAU	جلوتامين	Glut amine
GUU	جليسين	Glycine
CAC - CAU	هستدين	Histidene
AUU	أيسوليسين	Isoleucine
CUU - GUU - AUU	ليوسين	Leucine
AUU - AAA	لسين	Lysine
GAU	مثيونين	Methionine
UUU	فينيل آلانين	Phenylolanine
CCU - ACC	برولين	Proline
CCU - CUU	سيرين	Serine
ACC - AAC	ثريونين	Threonine
GGU	تربتوفان	Tryptophane
AUU	تيروسين	Tyrosine
UGU	ڤالين	Valine

جدول يوضح الشفرات الوراثية الثلاثية
Triplet Codo ns

- كما سبق القول ، فإن التعليمات الوراثية (الخاصة بتجديد أنماط تكوين البروتينات، والتى ستنعكس على هيئه خصائص وراثية ، توجد فى الكروموسومات فى أنوية الخلايا ، وهى بالتجديد النظام الذى توجد به البنتروچينات القاعدية فى جزيئات ح ن د فى تلك الكروموسومات.

وبصورة عامة يمكن إيجاز العمليات الوراثية على النحو التالى :

التعاون أو التداخل ح ن د ، ح ر ن في العمليات الوراثية :

Interrelation between DNA and RNA in genetics operations .

كما سبقت الاشارة فإن مادة ح ن د الموجودة فى الكروموسومات (فى أنوية الخلايا) هى التى تصدر التعليمات الخاصة بنمط تكوين البروتينات المتطلبة . والمعروف أن عملية تكوين البروتينات هذه تحدث فى السيتوبلازم

والسؤال الآن : **كيف تنتقل التعليمات الموجودة في الكروموسومات في أنوية الخلايا الي المنطقة الخاصة بتكوين هذه البروتينات وهي سيتوبلازم الخلية ؟**

وردا على هذ السؤال ، تجب الاشارة الى أن أنوية الخلايا - بجانب احتوائها على جزيئات ح ن د فى الكرموسومات - فانها تحتوى أيضا على العديد من الإنزيمات التى تلعب الدور الاساسى فى تكوين مواد معينة ، أهمها جزيئات "ح ن ر" التى وجد أنها تقوم بنقل التعليمات الوراثية (أى التعليمات الخاصة بتحديد أنواع الاحماض الأمينية وبالتالى البروتينات) من النواة الى السيتوبلازم حيث يتم تكوين أو تخليق هذه المركبات طبقا لتلك المعلومات أو التعليمات .

حامض ريبونيوكليك (ح ن ر) وأنواعه :

RNA and its different types :

هو النوع الثانى من الأحماض النووية يتواجد بصورة أساسية فى سيتوبلازم ونويات الخلية . والمعروف أن هذا الحامض ينشأ أساسا من جزيئات ح ن د بنفس طريقة التناسخ التى سبقت الاشارة إليها فى حالة ح ن د . ويتم ذلك فى النواه ثم تأخذ شرائط ح ن ر طريقها الى السيتوبلازم عن طريق الثقوب الموجودة فى الأغشية النووية . معنى ذلك أن شريط ح ن د فى النواة يعمل على تكوين شريط ح ن د كما يعمل على تكوين شريط ح ن ر .

يقوم هذا الحمض بتخليق البروتينات فى السيتوبلازم وهو يختلف فى عدة أمور أساسية عن مادة ح ن د ، ويتضح ذلك مما يلى :

١ - ان السكر الموجود فى حمض ح ن ر RNA هو سكر الريبوز Ribose بينما الموجود فى حمض ح ن د DNA هو سكر دى أوكسى ريبوز Deoxyribose.

٢ - أن القواعد النيتروجينية فى حمض (ح ن ر) هى : الأدنين والجوانين والسيتوسين والبوراسيل ، بينما القواعد النتروجينية فى حمض ح ن د هى الادينين والجوانين والسيتوسين والثايمين .

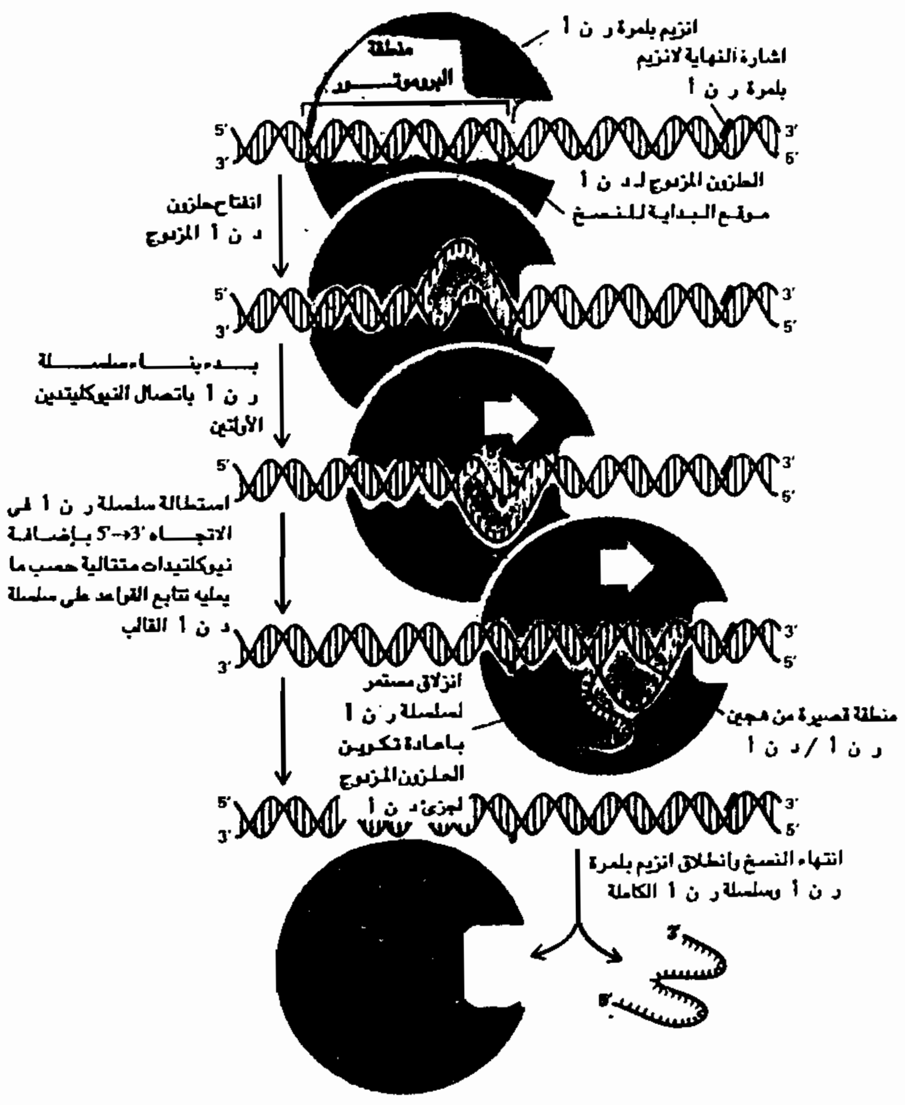
٣ - أن جزىء حمض ح ن ر يتكون من شريط واحد قد يلتف فى بعض المواقع على بعضه ، أما جزىء حمض ح ن د فهو يتكون من شريطين متواجهين ويتكاملان مع بعضهما .

٤ - يكون حمض ح ن د المادة الأساسية فى الكروموسومات ، وهو يعتبر بذلك المادة الوراثية ، كما يوجد هذا الحمض ايضا فى الميتوكوندريا والبلاستيدات أما حمض ح ن ر فهو ينشأ فى منطقة النوية ، ويدخل فى تكوين الريبوسومات فى السيتوبلازم كما يوجد فى الميتوكوندريا

والمعروف أنه يوجد من ح ن ر الأنواع الرئيسية التالية :

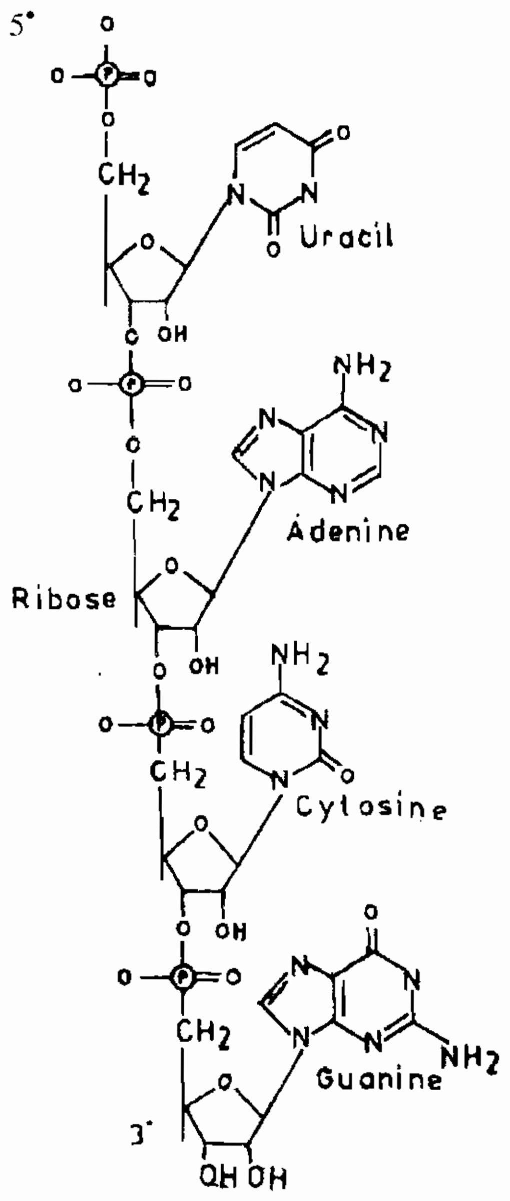
حمض ح ن ر الرسول : - Messenger RNA

يتميز جزىء حمض ح ن ر الرسول بشكله البسيط ، حيث أنه يتكون من شريط واحد ، ويكون هذا الحمض حوالى ١٪ من كمية حمض الريبونيوكليك فى الخلية ويتكون جزىء حمض ح ن ر الرسول بعملية نسخ Tramscription من شريط حمض ح ن د ، ويعتمد تتابع النيوكليوتيدات فيه حسب تتابع النيوكليوتيدات على شريط حمض ح ن د . كما يعتمد طول جزىء حمض ح ن ر الرسول على طول الجزء من حمض ح ن د المراد نسخه ، ويطلق على المجموعات التى تتكون من ثلاث قواعد نيتروجينية متتابعة لنيوكليوتيدات حمض ح ن ر الرسول اسم " الشفرات الوراثية " Genetic codons أو الثلاثية Triplet codons ويلاحظ أن نسخ هذا الجزىء فى الاتجاه ٥ - ٣ أمام جزىء ح ن د المراد نسخه . ويتكسرهد الحامض سريعا بعد اتمام عمله تكوين البروتين .



رسم تخطيطي لعملية بناء ح ن ر بواسطة إنزيم بلمرة ح ن ر

يبدأ الإنزيم عملية البناء من نفس نقط بداية نوعية على ح ن ر تسمى الأيزوموتور ويستكمل البناء عند نقطة إنهاء (توقف) حيث يتحرر عندها الأنزيم وتنزلق سلسة ح ن ر



جزئ ح ن ر
RNA mslecule

حمض ح ن ر الناقل : Transfer RNA (t-RNA)

يوجد من هذا الحمض ٢٠ طرازاً على الأقل ، ويتكون كل منها من حوالى ٧٥ – ٨٠ نيوكليوتيد – ويبلغ وزن الجزىء حوالى ٢٥,٠٠٠ ، كما أن حوالى ١٠٪ من قواعده النيتوجينية ليست مألوفة ، ويلاحظ أن سلسلة هذا الحمض ليست مستقيمة ولكنها تلتف حول نفسها لتكون شكلا يشبه ورقة البرسيم Clover - shaped

حمض ح ن ر الريبوسومي : Ribosomal RNA (r - RNA)

يعتبر حمض ح ن ر الريبوسومى هو المكون الرئيسى للريبوسومات حيث تحتوى كل ريبوسومة على جزيئين من حمض ح ن ر ، أحدهما تقريبا ضعف الآخر – ومن الناحية الشكلية تبدو الريبوسومة مكونة من وحدتين Two subunits أحدهما أصغر من الاخرى ، وكل منهما تتكون من جزىء حمض ح ن ر الريبوسومى وسلسلة من عديد الببتيد ، ويعتقد أنه فى الكائنات حقيقية النواة (الايوكاريوت) Eukaaaryotes . تقوم الريبوسومات الحره (فى ارضية السيتوبلازم) بتحليق البروتينات التى ستقوم بوظيفتها داخل الخلية ، بينما تقوم الريبوسومات المتصلة بالشبكة الانوبلازمية بتخليق البروتينات التى تفرزها الخلية وتقوم بوظيفة ما خارج الخلية ، وتحتوى الريبوسومات على معظم حمض ح ن ر بالخلية ، وهى ضرورية فى تخليق البروتينات .

وعلى ذلك توجز هذه العمليات بصورة عامة فيما يلى :

- تصدر عن شريط ح ن د فى النواه نسخة مكملة من ح ن ر الرسول RNA messenger مكملة لذلك الشريط وتمثل أو تدل على نظام ترتيب هذه القواعد فى شريط ح ن د ، وعلى ذلك فانها تحمل رسالة معينة عنه وبعد أن يتم نسخ هذا الشريط فى النواة حاملا تلك المعلومات يترك النواة الى السيتوبلازم عن طريق الثقوب الموجودة فى الاغلفة النووية

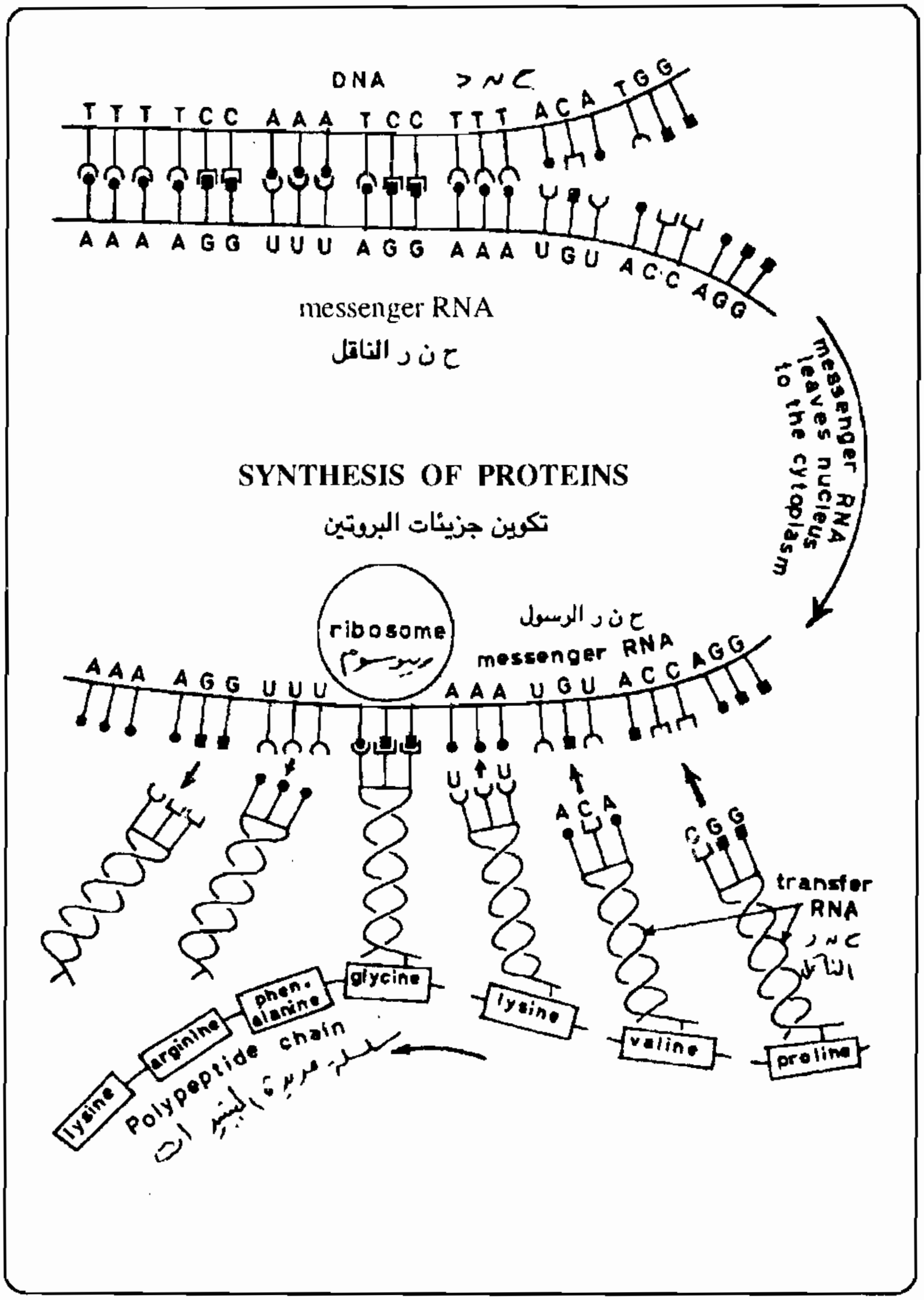
فى السيتوبلازم ، يلتقط كل جزىء من جزيئات ح ن ر الناقل حمضا أمينيا معينا حسب الشفرة الوراثية الثلاثية الموجودة فى إحدى نهايتيه Triplet Code n مثال ذلك يقوم ح ن ر الناقـل الذى يحمل الكوردون الثلاثى "CGG" بالتقاط الحامض الأمينى " برولين Proline " ، كما يلتقط ح ن ر الرسول الذى يوجه به الكوردون "ACA" الحامض الأمينى ڤالين Valine كما هو موضح فى الجدول السابق .

- يتحرك ح ن ر الناقل والمتصل به الحامض الأمينى الذى تم تحديده والتقاطه على طول شريط ح ن ر الرسول في السيتوبلازم حتى تصادف شفرته الثلاثية الحرة شفرة ثلاثية مقابلة (معاكسة) ومكملة له anti-Codo n ؛ حيث يرتبط بها (A٢٢، VGU فى الحالتين السابقتين) ، وبذلك يتم تحديد وضع ذلك الحامض الأمينى . وهكذا ، حتى تصطف الأحماض الأمينية المختارة على شريط ح ن ر الرسول .

- عندما يتم ترتيب هذه المجموعة من الأحماض الأمينية بالطريقة المسنطيلة والمحددة ، فإنها تتحد مع بعضها تحت تاثير إنزيمات بناءة معينة ، وبذلك تتكون جزيئات البروتينات الى سوف تنعكس على هيئة خصائص وراثية .

- المعروف أن أندماج هذه الاحماض الأمينة يتم فى أماكن تواجد ح ن ر الريبوسومى RNA المتواجد بصورة أساسية على حواف الشبكة الاندوبلازمية ، ثم تدخل تلك الأحماض الأمينية متحدة مع الريبوسومات فى تجاويف الشبكة الاندوبلازمية حيث يتم تصنيع المواد البروتينية المطلوبة .

- بالنسبة لجزيئات ح ن ر الناقل ، فإنها - بعد أن أدت وظيفتها فى نقل الاحماض الأمينية الى اماكنها المحددة - تتفتت وتنتشر فى النويات والسيتوبلازم .



تكوين جزيئات البروتين

Synthesis of protein mole cules

توضيح الآحماض النووية في الخلايا والأنسجة الحيوانية

Identification of Nucleic Acids in Animal cells and Tissues :

قدم العديد من الطرق الهستوكيميائية لهذا الغرض ، ولكن أهمها ما يلى :

طريقة فويلجن وروزينبك — Feulgen and Rossenbeck

(حامض بيرايوديك – شف) — (Periodic Acid , Schiff PAS,.)

تعتمد هذه الطريقة على استخدام حامض بيرايوديك Periodic Acid الذى يعمل على أكسدة الوحدات السكرية فى ح د ن إلى مجموعات الجليكول glycol groups - HCOH- HCOH- التى تتأكسد بدورها إلى مجموعات الديهيدية aldehyde groups - HCO - HCO ويلى ذلك استخدام محلول أو تفاعل شف Schiff's reagent الذى يتم تحضيره بصورة أساسية بإذابة الفوكسين القاعدى basic fachsin فى الماء المغلى ، ثم اضافة ميتابيسلفيت الصوديوم أو البوتاسيوم Na or K metabisulphite- وحامض هيدروكلوريك عيارى NHCL حيث يتولد غاز أكسيد الكبريت مختزلا للون الصبغى الآحمر الداكن إلى محلول عديم اللون يطلق عليه " الفوكسين الآبيض " عديم اللون Leucofuchsin . وتتفاعل الآلديهيدات مع هذا المحلول مكونة مركبا بنفسجيا داكنا magenta compounds ، تتخذ عندئذ دليلا واضحا على وجود مكونات ح د ن .

الطرق المعملية للكشف عن الاحماض النووية

قدم الباحثون منذ اكثر من سبعين عاما حتى وقتنا الحاضر الكثير من الطرق الهستوكيميائي عن الاحماض النووية ، كما قاموا بكثير من التعديلات على الطرق المقترحة بهدف تحسينها وقدموا الدراسات المستفيضة عن الجوانب النظرية لآليات صياغتها . ومن أشهر الطرق المعروفه في هذا الصدد مايلى :

طريقة فولجن للكشف عن ح ن د : Feulgen Method for DNA

طريقة فولجن وروسنبك ١٩٢٤ : Feulgen and Rossenbeck , 1924

١ – مرور القطاعات الشمعية حتي الماء ، وأزل الزئبق من القطاعات اذا كان المثبت يحتوى عليه .

٢ – اغمس القطاعات لفترة قصيرة في محلول N - HCl

٣ – ضع القطاعات – لفترة تعتمد علي نوع المثبت في N - HCl عند ٦٠°م لاجراء عملية تحلل مائي حسب الجدول التالي .

٤ – اغمس القطاعات لفترة قصيرة في N - HCl بارد ثم في ماء مقطر .

٥ – ضع القطاعات في محلول شف Schiff's solution .

(في حالة استخدام محلول دى توماسى de Tomasi تتوضع الشرائح فيه لمدة تتراوح بين ٣٠ – ٦٠ دقيقة ، ولكن توضع الشرائح لفترة أطول اذا استخدم محلول بارجر و دى لاماتر (Barger and De Iamater

٦ – صفِ الشرائح واغمسها في ثلاث تغييرات من محلول طازج من بيكبريتات الصوديوم أو البوتاسيوم (٥ سم٣ من ١٠٪ بيكبريتات البوتاسيوم + ٥ سم٣ + ٩٠ سم٣ ماء مقطر)

٧– اغمس القطاعات في الماء .

٨ – اصبغ أرضية الخلايا – اذا أردت – باستخدام ١٪ لايت جرين Light green في الماء لمدة دقيقة واحدة أو باستخدام ١/٢٪ فاست جرين Fast green لمدة من ٣٠ – ٦٠ ثانية).

٩ – روق باستخدام الزيلول وغط باستخدام بلسم كندا .

النتيجـــــة :

يبدو (ح ن د) بلون بنفسجى يميل للحمرة .

ملحوظـــات :

يعتمد الوقت اللازم لاجراء عملية التحلل Hydrolysis على نوع المثبت . وفي حالة استعمال محلول عيارى يدكل N- Hcl تراعى التوقيتات الموضحة في الجدول التالى :
K. Bauer (1932)

الزمن بالدقيقة	المثبت	الزمن بالدقيقة	المثبت
٨	Formalin	٥	Apáthy
٨	Formol sublimate	لاينصح به	Bouin
٨	Helly	١٤	Carnoy (3 :1)
١٤	Regaud	٦	Carnoy (6:3:1)
١٨	Susa	٦	Champy
٥	Zenker	١٤	Flemming
٥	Zenker formol		

يمكن استعمال – لغرض عملية التحلل المائي – محلول ٥ عيارى يدكل 5N - HCL وذلك عند درجة حرارة ٢٠ – ٢٢° م .

وفي هذه الحالة أيضا فان فترة التحلل تعتمد علي نوع المثبت وفقا لما يلي :

– المثبتات المحتوية علي الكحول ...... ٢٠ دقيقة الي ساعتين.

– المثبتات المحتوية علي الفورمالين ... ٢٥ دقيقة الي ٤ ساعات .

طرق تحضير صبغ شف : Prepartion of Schiff's reagent

طريقة دي توماسي : de Tomasi ,1936

ذوب ١ جم فوكسين قاعدى في ٢٠٠ سم ٣ في ماء مقطر يغلى ، رج لمدة خمس دقائق وبرد الي درجة ٥٠° م بالضبط . رشح ثم أضف الي الرشيح ٢٠ سم٣ حمض يد كل عيارى . برد الي ٢٥° م ثم اضف ١ جم من صوديوم (أو بوتاسيوم) ميتابايسلفيت ($Na_2 S_2 O_5$) اترك المحلول في الظلام لمدة ١٤ – ٢٤ ساعة ثم اضف ٢ جم فحم نباتى نشط ، ورج لمدة دقيقة واحدة ثم رشح . احفظ الرشيح في الظلام عند درجة حرارة صفر – ٤° م. راع أن تستعمل المحلول وهو في درجة حرارة الغرفة .

طريقة بارجر و ديلاماتر : Barger and Delamater , 1948

ذوب ١ جم فوكسين قاعدي في ٤٠٠ سم ٣ ماء مقطر يغلى . برد الي درجة حرارة ٥٠° م ثم رشح ، أضف الي الرشح ١ سم٣ كلوريد ثيونيل Thionyl Chloride (socl2) اترك المحلول في الظلام لمدة ١٢ ساعة . أضف ١ جم نباتي نشط ورج ثم رشح . احفظ الرشيح في الظلام عند درجة حرارة صفر - ٤ °م . راع أن تستعمل المحلول وهو في درجة حرارة الغفة .

اقترح هوروبن وكيفل دافز : Horobin and Kevill - Davies عام ١٩٧١ استعمال الفوكسين القاعدي محل محلول شف . وتتلخص طريقة تحضير محلول الصباغة فيما يلى :

ذوب ٠,٥ جم فوكسين قاعدى في ١٠٠ سم٣ من (ايثانول - ماء - حمض يد كل مركز بنسب٨٠ : ٢٠ : ١ بالحجم) . ويستعمل هذا الخليط بدلا من محلول شف ، ويستغرق وقت الصباغة حوالى عشرين دقيقة .

وقد وجد بصفة عامة أن حفظ محلول شف فى درجة حرارة بين ١ - ٥ م فى زجاجة معتمة محكمة القفل ، واستخدام المحلول فى الظلام (أو داخل وعاء معتم مغلق) يساعد على اطالة صلاحية المحلول حتى مدة ستة أشهر .

وقد أفادت طريقة فولجن كثيراً من الدراسات التى أجريت فى مجال الاورام أو الدراسات المتعلقة بالدورة الخلوية .

وقد أمكن استغلال القطاعات المصبوغة بطريقة فولجن فى التقدير الكمى Quantitative Estimation لكمية حمض ح ن د باستخدام طريقة القياسات الضوئية Cytophotometric method- وكان من أوائل من استخدموا هذه الطريقة Stowell and Cooper , 1945 وبذلك اصبح من الممكن قياس كمية ح ن د فى الخلية الواحدة ، واستقر مبدأ ثبات كمية ح ن د فى أنوية خلايا النوع الواحد . وغنى عن القول أن هذه الطريقة اثبتت كميًا احتواء الخلايا الجسدية على ضعف ما تحتويه الجاميطات من مادة ح ن د والمعروف أن هذه الطريقة تعتمد على قابلته الأحماض النووية للأشعة فوق البنفسجية عن طول موجات معبة تتراوح بين ٢٤٠ - ٢٨٠ نانومتر . ويوضح جهاز السيتوموتومتر الموضح تحديد معدلات

امتصاص تلك الاشعة على شاشة معينة ، ويمكن بعد ذلك أجراء عمليات بإستخدام مادة Ianthanum ، كما استخدم Watson املاح اليورانيوم والرصاص لهذا الغرض وخلايا فترة السبعينيات وحتى الان جرت العديد من المحاولات لابتكار وسيلة تطبق بها طريقة فولجن باستخدام المجهر الالكترونى لدراسة ح ن د . وقد اقترح Gautier and Schreyer, 1970 مادة ruthenium المعاملة بثاني اكسيد الكبريت بدلا من كاشف (شف) .كما اقترح (Cgli-ati and Gautier , 1973 , Gautier and Fakan , 1974) مادة Osmium ammine التى استخدامها Moyne (1980) بنجاح فى الكشف عن ح ن د باستخدام المجهر الالكترونى .

طريقة مثيل جرين - بيرونين للكشف عن ح ن د ، ح ن ر :

The Methyl Green - Pyronin Method for DNA & RNA :

اقترح هذه الطريقة براشت Brachet في أوائل الخمسينيات وهى تعتمد على استخدام خليط من صبغى المثيل جرين Methyl Green والبيرونين Pyronin ، علي اساس أن الميثيل جرين له قابلية لمادة ح ن د ، والبيرونين لمادة ح ن ر . وحسب طريقة براشت تستخدم قطاعان، يعامل أحدهما بانزيم ريبونيوكليز Ribonuclaese ثم يصبغ القطاعات بصبغ مثيل جرين بيرونين . ومن المفترض عندئذ أن القطاع الذى عومل بإنزيم الريبونيوكليز يصبغ فيه ح ن د فقط . وقد فسر Kurnick في نهاية الخمسينيات آلية الصباغة على أساس أن البيرونين يصبغ الحمض النورى الاقل في درجة التبلمر ، حيث وجد أن ح ن د اذا انقصت بلمرته فانه يصبغ بالبيرونين تماما مثل ح ن ر . وعلى العكس من هذا الاتجاه ، وجد Taft (1951) أن معامله بدرجات أس هيدروجينى pH 3 & pH 11 .7 ودرجات حرارة 1°c & 24°c أدي الي تقليل بلمرة ح ن د دون أن يوثر ذلك علي قابليته للاصطباغ بالميثيل جرين . وقد فسر ذلك على اساس أن مثل هذه المعاملات تقلل البلمرة عن طريق كسر الروابط الهيدروجينية ، وأن ذلك التأثير ينعكس فسرعان ما تستعاد هذه الروابط مرة أخرى . وقد فسر Rosenkranz and & Bendich (1958) قابلية ح ن د لصبغ الميثيل جرين على اساس بقاء الاول فى حالته كشريط مزدوج وان هذه القابلية تفقد اذا اختلت هذه الحالة .

ومن الجدير بالذكر أن ماير Mayer (1897) أشار بوجود شوائب في صورة ميثيل فيوليت Methyl violet في صبغ الميثيل جرين ، وقد استخدم ينا Unna (1913) كلوروفورم في استخلاص هذه الشوائب ، وقد استعرض كاستن Kasten and & Sandritter (1962) الطرق المختلفة لتنقية الميثيل جرين ، ومن ناحية أخرى قال آلكفت Alqvist and Andersson (1972) بضرور تنقية صبغ البيرونين عن طريق غسله بالكلوروفورم ٢٠ مرة ،كما أكد Kasten (1962) على ضرورة التخلص من الشوائب البيرونين .

طريقة فولجن – هيكسامين – فضة (عن كورسون ١٩٦٤) :

Feulgen - Hexamine - Silver (Feulgen - Silver Methenamine) After Korson , 1964

تعتمد هذه الطريقة على استخدام محاليل الفضة القاعدية بدلا من محلول (شف) في التفاعل مع مجموعات الالدهيد الناتجة من عملية التحلل المائي ، وقد اقترح جوموري طريقة تحضير محلول Hexamine (Methenamine) - Silver لهذا الغرض ، وقال بفاعلية الطريقة مع الجليكوجين والمخاطيات Mucins فقط ، ولكن كورسون Korson برهن عام ١٩٦٤ على تميز هذه الطريقة في الكشف عن (ح ن د) خاصة اذا استخدم محلول عياري لحمض الستريك .

طريقة جالوسيانين كروم ألم : The gallocyanin - chromalum Method (GCA)

اقترح هذه الطريقة اينارسون Einarson (1936 , 1939 , 1949 , 1951) لصباغة الأحماض النووية بصفة عامة ، وفي عام ١٩٥١ قال بامكانية استخدامها للتقدير الكمى للاحماض النووية عن طريق القياسات الضوئية Cytophotometric ويعتبر الجالوسيانين صبغ أو كسازنيني Oxazine dye ، وعندما يخلط مع الكروم ألم يتكون ثلاثة أملاح ، هى :

- lake cation (gallocyanin - Cr $(H_2 O)_4$)
- lake hydroxide (gallocyanin - Cr $(H_2O)_4$ OH)
- lake sulphate (gallocyanin - Cr $(H_2O)_4$ $)_2$ SO_4

ويعتقد ان الملح الاول أحمر اللون يتحد مع مجموعات الفوسفات في الاحماض النووية ليكون ملحا ازرق داكنا يتميز بمقاومته لعمليات نزع الماء بالكحول والترويق بالزيلول . ويعطي

الصبغ أفضل نتائجه عند درجة أس هيدروجينى بين ١,٥ - ١,٧٥ وقد قام de Boer and Sarnaker بتعديل الطريقة الاصلية عام ١٩٥٦ .

طريقة الصباغة بواسطة اكريدين أورانج والفحص بميكروسكوب الاستشعاع :

Staining with Acridine orange and examination with Fluorecent Microscope

بدأ استخدام " الاكريدين أورانج " في صباغة البروتينات النووية عام ١٩٤٠ بواسطة Bukatsch and Haitinger وفي عام ١٩٦٦ أجرى Rigler دراسة مستفيضة عن استشعاع هذا الصبغ عند موجة طولها ٥٣٠ نانوميتر في قطاعات مثبتة . وقد قام Darzynkiewicz عام ١٩٧٩ بعمل استعراض كامل للابحاث التي أجريت عن استخدام هذا الصبغ للكشف عن الاحماض النووية .

وعادة يستشع ح ن د باللون الاخضر ، بينما يستشع ح ن ر باللون الاحمر ، ويستخدم الاكريدين اورانج بتركيز ١,٠٪ في منظم فوسفات درجة أسه الهيدروجينى (٦) . ويراعى تجنب بعض المثبتات مثل البوان والفورمالين.

طرق صباغة تخصصية أخرى :

تطورت طرق الصباغة كثيرا في السنوات الاخيرة بغرض تحقيق تمييز لاجزاء معينة من المادة الكروماتينية . ومن أمثلة ذلك الصباغة الشريطية للكروموسومات Chromosome banding techniques حيث تبدو الكروموسومات مخططة عرضيا ، ويختلف نظام التخطيط في الكروموسومات المختلفة مما يسمح بالتمييز بينها بسهولة . وتفيد هذه الطريقة في التعرف علي البتر الكروموسومى Deletion في بعض الحالات المرضية ، كما تفيد احيانا في تصنيف الحيوانات في الحالات التي يتعذر فيها تحديد الوضع التصنيفى في المجموعات المتقاربة . ويلاحظ ان نظام التخطيط يختلف حسب نوع الصبغة المستخدمة . ومن أشهر الاصباغ المستعملة: (Quinacrine , Giemsa) .

كما استحدثت طرق لصباغة السنتروميرات Centromeres والتوابع الكروموسومية Satellites ومناطق تنظيم النوية Nucleus - Organizer Regions وكذلك طرق استشعاع Fluorescene لصباغة أجسام بار Barr Bodies .

طرق استخلاص الاحماض النووية :

Extraction Techniques for Nucleic Acids

طبقت عدة طرق لاستخلاص الاحماض النووية هستوكيميائيا اعتماداً علي ما هو معروف في مجال علم الكيمياء . وتختلف استجابة كل من الحمضين النووين لعمليات الاستخلاص وفقا لظروف معينة . وفيما يلى باختصار نبذة عن هذه الطرق :

الاستخلاص بمحاليل كلوريد الصوديوم :

وجد أن حفظ قطاعات مثبته في الفورمالين أو الفورمالين مع حمض الخليك والكحول لمدة خمس ساعات عند درجة حرارة ٣٧° م أو لمدة ساعتين عند درجة ٥٦° م في محلول ٠,١٧ عيارى كلوريد صوديوم يؤدى الي استخلاص ح ن د تماما . بينما لم يتأثر هذا الحمض فى القطاعات اذا وضعت في محلول واحد عيارى أو نصف عيارى (1.0 M or 0.5 M) من كلوريد الصوديوم . وقد وجد Mirsky and Pollister (١٩٤٢ ، ١٩٤٣ ، ١٩٤٦) أن محلول ٠,١٥ عيارى كلوريد صوديوم يستخلص ح ن ر ، بينما يؤدى محلول واحد عيارى كلوريد صوديوم الي استخلاص ح ن د .

حمض فوق الكلوريك : Perchloric Acid

اقترح Erickson et al عام ١٩٤٩ طريقة لاستخلاص ح ن ر من قطاعات مثبتة في الكحول باستخدام محلول مخفف من حمض فوق الكلوريك لفترات من ٤ – ١٢ ساعة . كما استخدموا حمض فوق الكلوريك الساخن لمدة عشرين دقيقة لاستخلاص ح ن د ، ح ن ر من القطاعات . ويعتقد العالم الانجليزى Pearse , 1960 أن حمض فوق الكلوريك البارد – بالاضافة الي قيامه باستخلاص ح ن ر – فإنه يودي الي فك بلمرة ح ن د واستخلاص بعض البروتينات والمواد عديدة التسكر والليبوبروتينات .

حمض ثلاثي كلوروخليك : Trichloroacetic Acid

قام Schneider في عام ١٩٤٥ باستخدام ٥٪ محلول مائي عند درجة ٩٠° م لمدة ١٥ دقيقة في استخلاص الاحماض النووية من الأنسجة . وقد استخدمت هذه الطريقة مع بعض العينات النباتية وسحبات نخاع العظم وغير ذلك بواسطة عدد من الباحثين .

الاستخلاص باستخدام انزيمات تكسير الأحماض النووية The Nucleases

يمكن تمييز إنزيمات هضم الاحماض النووية الى :

أ – إنزيمات تكسير الأحماض النووية (أو" نيوكليزس" Nucleases) وهى تكسر الاحماض النووية الي مكوناتها من النيوكليوتيدات .

ب – إنزيمات تكسر النيوكليوتيدات (أو نيوكليوتيديزس Nucleotidases الي نيوكليوسيدات Nucleosides).

جـ – إنزيمات تكسر النيوكليوسيدات (أو نيوكليوسيديزس Nucleosidases الي مكوناتها من قواعد نيتروجينية وسكر).

ومن الناحية الهستوكيميائية فإن المجموعة الأولى هى التي تعنينا ، وهى تنقسم إلى طرازين :

أ – ريبونيوكلييزس Ribonucleases وهى تكسر ح ن ر .

ب – دى أوكسى ريبونيوكلييزس Deoxyribouncleases وهى تكسر ح ن د .

ريبونيوكلييزس : Ribonucleases

قام Van Herwerden في عام ١٩١٣ بالحصول على مستخلص من الطحال واستخدمه في هضم الحبيبات القاعدية في سينوبلازم بويضات نجم البحر . ولا شك – حسب معلوماتنا الآن – ان هذا المستخلص يحتوي علي انزيم ريبونيوكلييز الذى قام بتكسير ح ن ر في سيتوبلازم هذه البويضات . وفي عام ١٩٤٠ استطاع Kunitz أن يفصل الإنزيم في صورة بلورات من بنكرياس الثور . وكان براشت Brachet أول من قام باستخلاص الأجسام القاعدية من السيتوبلازم في عينات مثبتة في مثبت " هللى " Helly وقد أجريت الكثير من الدراسات عن طرق الحصول على الانزيم بصورة نقية وعن أحسن الظروف لاجراء عملية الاستخلاص وعن أفضل المثبتات التي تستعمل عندئذ لتثبيت العينات . ونذكر من ذلك الدراسة التي اجراها Amano (1962) ، وقد خلصت هذه الدراسة الي تفضيل تثبيت العينات لمدة ٢٤ ساعة فى مثبت كارنوي الطازج ثم حفظ القطاعات لمدة ٤ ساعات عند درجة ٤٠° م في ١ ملجم من بلورات الانزيم مذابة في ١سم^{٣} ماء مقطر .

دي أوكسي ريبونيوكليز : Deoxyribonuclease

كان فيشر وآخرون Fischer et al , 1941 and Mccarty , 1946 أول من استخدموا انزيم دي أوكسي ريبونيوكليز للاغراض الهستوكيميائية ، وان كان الانزيم الذي استعملوه لم يكن نقيا تماما . وفي عام ١٩٤٨ حصل Kunitz على عينات نقيه من الانزيم . وتنشط بلورات الإنزيم بأيونات الماغنسيوم والمنجنيز . ويمكن تثبيط الانزيم المنشط بالماغنسيوم باستخدام 0.01 M - citrate ، أما الانزيم المنشط بالمنجنيز فإنه لايتأثر .

وقد أمكن منذ أوائل الستينيات ابتكار طرق لاستخدام إنزيمات تكسير الاحماض النووية في مجال الدراسات بالمجهر الالكترونى . ويعتبر (1960) Leduc وزملاءه أول من طرق هذا المجال .

طريقة فولجن – هيكسامين – فضة (عن كورسون ١٩٦٤) :

Feulgen - Hexamine - Silver method method (after Korson , 1964)

١ – ثبت العينات في فورمالين متعادل او محلول كارنوى .

٢ – ضع الشرائح في محلول واحد عيارى 1- M - citric acid .

مسخن مسبقا الي درجة ٦٠° م لمدة ٣٠ دقيقة عند درجة الحرارة نفسها .

٣ – اغسل الشرائح في ماء مقطر لمدة خمس دقائق .

٤ – ضع الشرائح في محلول Gomori's methenamine silver مسخن مسبقا عند درجة ٦٠° م لمدة ٣٠ دقيقة – احفظ درجة الحرارة ثابتة لمدة ساعة .

٥ – اغسل الشرائح في الماء المقطر .

٦ – ضع الشرائح في ٠,٢٪ كلوريد ذهب لمدة خمس دقائق .

٧ – اغمس القطاعات في الماء ، وروق في الزيول ثم غط .

النتيجة :

يبدو ح ن د بلون أسود .

تحضير محلول هيكسامين - فضة (جوموري) :

ضف ٥ سم^3 من ٥٪ نيترات الفضة الي ١٠٠ سم^3 من ٣٪ هيكسامين ، عندئذ سيتكون راسب ثم يذوب . ضف ٥ سم^3 من منظم بورات Borate buffer عند أس هيدروجيني (٨) . ضف قطرة من فينول فيثالين الي ٣٪ حمض البوريك ثم عايرها titrate باستخدام محلول عيارى من هيدروكسيد الصوديوم حتى يصبح اللون قرنفليًا . ضف ماء مقطر حتى يصل الحجم الي ٢٠٠ سم^3 .

طريقة ميثيل جرين - بيرونين لبراشت (١٩٤٢) للكشف عن ح ن د،ح ن ر :

The Methyl green - Pyronin Method for DNA &RNA (Brachet, 1942)

١ - ثبت العينات في ١٠٪ فورمالين أسه الهيدروجينى (٧) لمدة من ٤ - ١٦ ساعة .

٢ - مرر القطاعات حتى الماء .

٣ - اصبغ في محلول صبغ ميثيل جرين - بيرونين لمدة تتراوح بين ١٠ دقائق ، ٢٤ ساعة .

٤ - اغمس القطاعات في الماء المقطر .

٥ - جفف القطاعات بورق ترشيح .

٦ - انزع الماء في الأسيتون بسرعة .

٧ -اغمس في خليط بنسب متساوية من الأسيتون والزيلول .

٨ - اغمس في خليط من ١٠٪ أسيتون ، ٩٠٪ زيلول .

٩ - روق في تغييرتين من الزيلول .

النتيجـــة :

ح ن د	أخضر يميل للزرقة
ح ن ر	أحمر .

تحضير صبغ ميثيل جرين – بيرونين :

محلول (أ) :

٥٪ محلول مائي من البيرونين ١٧,٥ سم٣

٢٪ محلول مائي من ميثيل جرين مغسول لمدة ٣ أيام بالكوروفورم ١٧,٥ سم٣ وكحول

أميل ١٠ سم٣ ....١٠ سم٣

ماء مقطر ٢٥٠ سم٣

محلوب (ب) :

٠,٢ عيارى منظم خلات أسه الهيدروجينى ٤,٨

أو منظم سترات أسه الهيدروجينى (٥) يحضر باضافة ٥١,٥ سم٣ من ٠,٢ عيارى فوسفات ثنائي الصوديوم الهيدروجينية + ٤٨,٥ سم٣ من ٠,١ عيارى حمض الستريك .

محلول الاستعمال :

يحضر محلول الصباغة من أحجام متساوية من محلول أ ، محلول ب .

طريقة ميثيل جرين – بيرونين لكيرنيك (١٩٥٥) للكشف عن ح ن د،ح ن ر:

The Methyl green - Pyronin Method for DNA and RNA (Kurnick, 1955):

تحضير صبغ ميثيل جرين – بيرونين :

٢ ٪ محلول مائي من بيرونين[Y] المغسول بالكوروفورم ١٢,٥ سم٣

٢٪ محلول مائي ميثيل جرين المغسول بالكلوروفوم ٧,٥ سم٣

ماء مقطر ٣٠ سم٣

طريقـة الصـباغة :

١ – ثبت العينات في محلول كارنوى

٢ – مرر القطاعات حتى الماء .

٣ – اصبغ لمدة ست دقائق في محلول الصبغ .

٤ – جفف القطاعات باستخدام ورق ترشيح .

٥ – ضع القطاعات في تغييرتين من ن – بيوتانول n - butyl alcohol لمدة خمس دقائق لكل تغييرة .

٦ – ضع الشرائح في الزيلول لمدة خمس دقائق .

٧ – ضع الشرائح في زيت السيدار Cedar oil لمدة خمس دقائق .

٨ – غط بصمغ بلسم كندا .

النتيجـــة :

ح ن د   أخضر يميل الى الزرقة .

ح ن ر   احمر .

طريقة اكردين أورانج الاستشعاعية للكشف عن ح ن د ، ح ن ر (بيرتالانفي وناجي ١٩٦٢)

Acridne orange fluorescence method for DNA & RNA (Bertalanffy and Nagy , 1962)

١ – ثبت القطاعات مع مراعاة تجنب الفورمالين .

٢ – مرر القطاعات حتى الماء المقطر .

٣ – اغمس القطاعات في ١٪ حمض خليك لمدة ١٥ ثانية .

٤ – اغمس القطاعات في الماء المقطر لمدة ١٥ ثانية .

٥ – اصبغ القطاعات في محلول اكردين اورانج (١٢٥ ملجم / ١٠٠ سم^{٣}) لمدة عشر ثوان .

٦ – عامل القطاعات بمنظم فوسفات أسه الهيدروجينى (٦) لمدة دقيقة واحدة .

٧ – ميز الصبغ في ٢٢٪ كلوريد كالسيوم لمدة عشرين ثانية .

٨ – عامل القطاعات بمنظم الفوسفات اسه الهيدروجينى (٦) لمدة عشر ثوان .

٩ – غط القطاعات وهى مبلولة وافحصها باستخدم ميكروسكوب الاستشعاع .

النتيجـــة :

ح ن د اخضر فاتح .

ح ن ر أحمر

طرق استخلاص الأحماض النووية :

الاستخلاص باستخدام حمض فوق الكلوريك (اركسون وزملاؤه ١٩٤٩) :

Extration With Perchloric Acid (Erickson et al , 1949)

– ثبت العينات في الفورمالين أو فورمول سبلمت .

–لازالة ح ن ر بمفرده مرر القطاعات حتى الماء ثم أزل كلوريد الزئبق اذا لزم الامر . عامل القطاعات بمحلول ١٠٪ حمض فوق الكلوريك عند ٤ ° م لمدة ١٢ – ١٨ ساعة.

– لازالة ح ن ر ، ح ن د عامل القطاعات بمحلول ٥٪ حمض فوق الكلوريك عند ٦٠ ° م لمدة ٢٠ – ٣٠ دقيقة .

– ضع القطاعات في اي من الحالتين ١ – ٥ دقائق في محلول ١٪ كربونات الصوديوم لمعادلة الحمض ، اغسل في الماء ثم اصبغ القطاعات باستخدام محلول مائي ١٪ أزرق التولويدين Toluidine blue

الاستخلاص باستخدام حمض ثلاثي كلور الخليك (شفيدر ١٩٤٥) :

Extraction with Trichloroacetic acid (Schneider , 1945)

تستخلص هذه الطريقة مادتى ح ن د ، ح ن ر

– مرر القطاعات حتى الماء .

– عامل القطاعات بمحلول ٤٪ حمض ثلاثى كلورخليك عند درجة ٩٠° م تماما لمدة ١٥دقيقة .

– اغسل القطاعات بالماء .

– اصبغ باستخدام ازرق التولويدين .

الاستخلاص باستخدام حمض الهيدروكلوريك (دمسي وزملاؤه ١٩٥٠) :

Extraction with Hydrochloric acid (Dempsey et al , 1950)

تستخلص هذه الطريقة مادتى ح ن د ، ح ن ر

- مرر القطاعات حتى الماء .
- عامل القطاعات بمحلول واحد عيارى يدكل N-Hcl لمدة ثلاث ساعات عند درجة حرارة ٣٧°م
- اغسل القطاعات بالماء .
- اصبغ القطاعات 2mmol methylene blue عند درجة اس هيدروجينى (٥,٧) لمدة ١٢ - ٢٤ ساعة .

طريقة استخلاص ح ن ر باستخلاص إنزيم ريبونيوكلييز :

Extraction of RNA by Ribonuclease :

١ - مرر القطاعات الشمعية للعينات المثبتة في محلول كارنوى الي الماء .

٢ - احفظ القطاعات لمدة ساعة واحدة عند درجة ٣٧° م في محلول الانزيم في الماء المقطر (١/٢ -١ ملج / سم٣).

٣ - اغسل القطاعات في ماء جار .

٤ - اصبغ القطاعات المعاملة والقطاعات الضابطة بأي صبغ متخصص لصباغة ح ن ر .

النتائج : التراكيب التي تزال بإنزيم ريبونيوكليز تعتبر ح ن ر .

طريقة استخلاص ح ن د باستخدام انزيم دي اوكسي ريبونيوكلييز :

Extraction of DNA by Deoxyribonuclease:

١ - مرر القطاعات الشمعية للعينات المثبتة في محلول كارنوى الي الماء .

٢ - احفظ القطاعات لمدة ٣ -٦ ساعات عند درجة ٣٧° م بمحلول دي اوكسى ريبونيوكلييز متبلر في الماء (٠,٠٥ ملجم / سم٣) . لاترج الانزيم تجنبا لتكسره .

٣ - اغسل القطاعات فى الماء .

٤ - انزع الماء بالكحول ثم ضع القطاعات في خليط كحول / أثير .

٥ - غط القطاعات بطبقة رقيقة من ١٪ سيللودين .

٦ - اجرخطوات تفاعل فولجن الخاص بمادة ح ن د

النتيجـــة :

ح ن د لن يظهر في القطاعات المعاملة بالإنزيم ، علي عكس القطاعات الضابطة .

الفصـــل السابع

7

هستوكيميائية الإنزيمات

Enzymes Histochemistry

الفصـــل السابع

هستوكيميائية الإنزيمات

Enzymes Histochemistry

مقدمـــة :

من المعروف ان التفاعلات الكيميائية التي تحدث في الخلايا تتم بواسطة الإنزيمات أو الخمائر ENZYMES ، فـفـي عـمليـات الابيض المخـتلفـة - من بناء أو هدم . تقـوم هذه الأنزيمات بدور المحرك او المحفز للتفـاعـلات الكيـمـيـائيـة أو تعمل على إسـرا ع واتمام هذه التفاعلات . وبعد اتمام هذه التفاعلات تبقى هذه الانزيمات على صـورتها الأصلية التي كانت عليـهـا قبل دخـولها هذه التـفـاعـلات دون ان تسـتـهلك اثناء ذلك او تكون جزءا من نواتج تلك التفاعلات ، ولذلك تعتبر الإنزيمات عوامل مساعدة في التفاعلات البيولوجية

ويقدر انه يعرف حوالى ٢٠٠٠ انزيم في الكائنات الحية المختلفة ، يوجد منها حوالى اربعمائة انزيم في خلايا وانسجة الفقاريات ، وان كان عدد الانزيمات التي يمكن الكشف عنها هستوكيميائيا او سيتوكيميائيا في الوقت الحالى لا يتجاوز المائة .

والانزيمات عبارة عن مواد عضوية ذات تركيب كيميائي محدد يتم تخليقها في النبات والحيوان وفي الكائنات الدقيقة . ولا تتواجد هذه الانزيمات بطريقة عشوائية داخل الخلايا ولكنها تستقر في حيزات خلوية معينة Compartments او في بعض العضيات الخلوية . وهي مترتبة بطريقة معينة داخل اطار التنظيم الجزيئى للخلية والعضيات الخلوية . فعلى سبيل المثال توجد انزيمات " السيتوكروم المؤكسد (سيتوكروم اكسيديز)(Cytochrome oxidase و"نازع الهيدروجين السكسينى" (سكسينيك دى هيدروجينيز Succinic dehydrogenase) مرتبطة باغشية الميتوكندريا . وهناك العديد من الانزيمات تقع داخل تراكيب خلوية معينة مثل الاغشية البلازمية والكروموسومات والنويات - وبصورة عامة ، فإن الانزيمات هى اكبر واكثر البروتينات تخصصا ، وقد امكن الحصول علي العديد منها بصورة نقية متبلرة ، ومن المتعارف عليه أن الانزيمات تعتبر من اهم منتجات الجينات .

تسمية الانزيمات : Nomenclature of Enzymes

تجــرى تسمية معظم الانزيمات باضـافة المقطع العجزى أو النهائي Suffix(إيزase) إلي اسم المادة الخاضـعة Substrate التي يعمل عليـها هذا الانـزيم . من امثلة ذلك انزيمات " الفوسفاتيز Phosphatases وانزيم ارجنيـز Arginase وانزيم يـوريز Urease " وهـى تعـمل على استيرات الفوسـفات Phosphate Esters والارجنـين Arginine واليـوريا Urea علـى التـوالى . وفـي حـالات اخـري اعطـيت الانزيمــات اسـمـاء لا تتـبـع هذا النظام ومن امـثلة ذلك انزيم " بيبسين Pepsin " وانزيم "تربسين Trypsin" .

وقد زاد الموقف تعقيدا تزايد عدد الانزيمات التي يتم الكشف عنها بصـورة مستـمرة . وقد دفع هذا الموقف اللجنة العلمية العالمية المختصة بتسمية الانزيمات "Commission on Enzyme Nomoenclature" عام ١٩٧٢ الي اقتراح نظام جديد لتسمية الانزيمات ثم نشره عام ١٩٧٣ ويقضي هذا النظام باعطاء كل انزيم اربعة ارقام تدل عليه وعلى طبيعته .

TABLE INTRENATIONAL CLASSIFICATION

OF ENZYMES (CLASS NAMES. CODE NUMBERS. AND TYPES OF REACTIONSCATALYZED)

I. OXIDI - REDUCTASES (OXIDATION. REDUCTION REACTIONS)

1.1 ACTING ON	CH ---- OH
1.2 ACTING ON	C ----- O
1.3 ACTING ON	C ----- CH
1.4 ACTING ON	CH ----- NH2
1.5 ACTING ON	CH----- NH
1.6 ACTING ON	NADH ; NADPH

2. TRANSFERASES (TRANSFER OF FUNCTION GROUPS)

2.1 ONE - CARBON GROUPS

2.2 ALDEHYDIC OR KETONIC GROUPS

2.3 ACYL GROUPS

2.4 GLYCOSYL GROUPS

2.7 PHOSPHATE GROUPS

2.8 S-CONTAINING GROUPS

3. HYDROLASES (HYDROLYSIS REACTION)

3.1 ESTERS

3.2 GLYOSIDIC BONDS

3.2 PEPTIDE BONDS

3.5 OTHER C ---- N BONDS

3.6 ACID ANHYDRIDES

4. LXXSES (ADDITION TO DOUBLE BONDS)

4.1 $>C=C<$

4.2 $>C=O<$

4.3 $>C=N-$

5. LSOMERASES (ISOMERIZATION REACTIONS)

5. IRACEMASES

6. LIGASES (FORMATION OF BONDS WITH ATP CLEAVAGE)

6.1 C ----O

6.2 C ---- S

6.3 C ---- N

6.4 C ---- C

وعلي هذا . ووفقا لهذ النظام تقسم الانزيمات الي ست مجمو عا ت رئيسية Classes تعطي الار قا م من " ١-٦ " (انظر القائمة المرفقة) ويدل الرقم الاول من هذه الارقام علي كل مجموعة من المجموعات الرئيسية التي تحت مجموعات Subclasses ، يدل الرقم الثاني علي كل واحد منها ، وذلك حسب طبيعة التفاعل الذي يتم تخفيره . ثم تقسم كل تحت مجموعة الي تحت تحت مجاميع Sub - subcasses يدل الرقم الثالث علي كل و احد ة منها ويشير الرقم الرابع الي الرقم المسلسل الدال عل اسم الانزيم في كل تحت مجموعة .

وكمثال ذلك فإنه يرمز لانزيم كرياتين كايينز Creatine kinase بالارقام EC,2,7,3,2 ويدل الحرفان EC على أن هذا الرقم معتمد وفقاً لنظام الإنزيمات سابقة الذكر .

الكشف عن الانزيمات هستوكيميائيا:

Histochemical Detection of Enzymes

يعتمد الكشف عن نشاطات الانزيمات هستوكيماويا اعتمادا كبيرا علي تفهم وظيفة تلك الانزيمات كعوامل مساعدة لتفاعل كيميائي معين . ويتخذ ناتج النشاط الانزيمى كعلامة أو دليل علي تحديد اماكن Sites ومدى نشاط تلك الانزيمات . على انه يتعين أن يكون ذلك الناتج

مركبا ملونا لكى يمكن مشاهدته بالميكروسكوب الضوئي . واذا لم يتيسر ذلك ، فإنه يلزم تحويل هذا المركب عديم اللون الي مركب ملون ولكي يتم الكشف عن هذه الانزيمات وتوضحيها هستوكيميائيا في الخلايا والانسجة يجب توفير العوامل التالية :

أولاً : مراعاة عدم احداث اية تاثيرات في تركيب وتوزيع ونشاطات الانزيمات اثناء اعداد التحضيرات الميكروسكو بية الخاصة بها .

ثانيا : يتعين ضمان نفاذ المادة الخاضعة Substrate (اي التي تؤ ثر عليها الانزيمات وتعتبر طعما لها) والمواد المساعدة داخل كل الخلايا بسرعة متساوية.

ثالثا : توفر درجة الحرارة المناسبة لنشاطات الانزيمات وذلك في حدود ٣٧°م .

رابعا : يراعي توفير الأس الهيدروجيني p^H المناسب للانزيمات المختلفة .

خامسا : يجب ان تنشق Split المادة الخاضعة بانزيم واحد هو الانزيم المستهدف الكشف عنه وذلك عند درجة حرارة معينة وأس هيدروجيني محدد

سادسا : يجب الاتتداخل الكواشف المساعدة Auxiliary Reagents مع التفاعلات الانزيمية أو أن تعوق تخلل المادة الخاضعة .

سابعا : لابد من ضمان الحصول علي ناتج التفاعلات الانزيمي بسرعة فائقة والا يترسب هذا المنتج النهائي سريعا وهذا يعني انه يجب أن يكون غير قابل للذوبان في المحاليل المائية وفي الدهون وان يكون غير متبلور Amorphous وثابتا في طبيعته .

ثامنا : يجب الا ترتبط أو تلتصق او يحدث ادمصاص Adsorption للمواد المشتركة في التفاعل بمركبات اخري .

اسس التفاعلات فى الطرق الخاصة بالكشف عن الإنزيمات هستوكيمائيا

يمكن تمثيل التفاعلات الانزيمية بالمعادلات التالية :

$$AB \xrightarrow{\text{انزيم}} A + B$$

$$R + B \rightarrow BR$$

حيث تمثل AB المادة الخاضعة Substrate التي تتفاعل مع هذا الانزيم، A+B هي نواتج هذا التفاعل ويمثل R الكاشف المستخدم ، BR المنتج النهائي الذي يكون عادة ملونا لكي يمكن مشاهدته بالميكروسكوب واذا لم يكن هذا المنتج ملونا فيتعين العمل علي تحويله الي مركب ملون بوسائل معينة .

ومن الظواهر الهامة في الكشف عن النشاطات الانزيمية خصوصية المادة الخاضعة Substrate Specifity وهذا يعني ان انزيما معينا يعمل علي مادة خاضعة محددة.

وابعض الانزيمات تخصصية مطلقة لمادة خاضعة شديدة التحديد ، بمعني انها لاتعمل حتي مع الجزيئات المتشابهة مثل ستريوأيزومر Sterioisomer لنفس الجزئ الاساسي.

– ومما سبق يتضح أن أسس الكشف الهستوكيميائى للانزيمات بصورة خاصة التفاعلات الترسيبيه ، ومنها:

١ – التفاعلات الترسيبيه بالأيونات المعدنية الموجبه . ومن أمثلتها طرق خومورى Gomori وهى تعتمد على تفلق المادة الخاضعة Splitting of the substrate

٢ – التفاعل الترسيبى فى التفلق ويتم الترسيب فى نفس الوسط . ولترسيب النواتج فى التفاعل الانزيمى يضاف أيونات Ca^{++} , Bb^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{+2}

وكقاعدة عامة فإن تلك الرواسب لاترى بالمجهر العادى ولكن يمكن رؤيتها بميكروسوب التباين Phase Contrast Microscope أو ميكروسكوب الضوء المستقطب Polarizing Microscope

ملحوظة : المشاهدة لناتج التفاعل الملون ممكن رؤيته بالمجهر الضوئى باستخدام تفاعل آخر بعد تفاعل الترسيب

أنواع الانزيمات

الانزيمات المميئة HYDROLASES

وهي الانزيمات التي تعمل كعامل مساعد في اتمام التفاعلات الكيميائية في عمليات الهضم او التحلل مع وجود الماء وذلك علي النحو التالي : $AB+H_2O \rightleftharpoons AH + BOH$ وفي معظم الحالات يسود التفاعل الانشقاقي ويحدث العكس في بعض التفاعلات العكسية ويتكون الماء .

أنواع الإنزيمات المميئة

تشتمل الانزيمات المميئه علي عدة مجموعات حسب نوع المادة الخاضعة Substrate التي تعمل عليها وأهمها :

١ - انزيمات الاستيريز ESTERASES

٢ - انزيمات جليكوسيديز GLYCOSIDASES

٣ - انزيمات ببتيديز PEPTIDASES

وتعتبر مجموعة الاستيريز " أكبر هذه المجموعات الانزيمية وهي تنقسم بدورها الي انواع متباينة منها :

أ - فوسفو مونو استيريز PHOSPHOMONOESTERASES

ب - فوسفو داي استيريز PHOSPHODIESTERASES

جـ- كاربو كسيليك استيريز CARBOXYLIC ESTERASES

د- سالفاتيز SULFATASES

انزيمات الفوسفاتيز PHOSPHATASES

ويعتمد الكشف الهستوكيماوي عن انزيمات "الفوسفاتيز " وكذلك انزيمات سلفاتيز ، وكولين استيريز علي استخدام طريقة جوموري GOMORI

وفيما يلي بعض الامثلة لهذه الانزيمات :

الفوسفاتيزات القلوية ALKALINE PHOSPHATASES

هذه الانزيمات المميئة هي المسئولة عن تكسير استيرات ESTERS أو املاح الفوسفات وتشتمل هذه الانزيمات بدورها علي الانواع التالية :

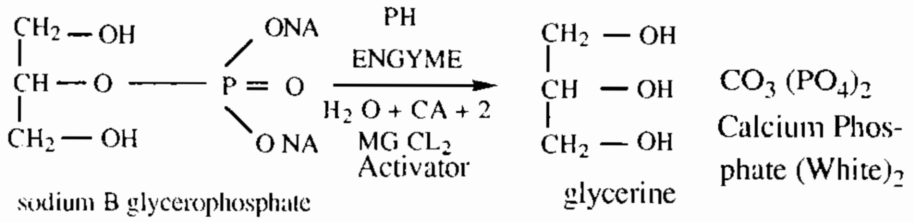
- الفوسفاتيز الاحادي MONOPHOSPHATASES
- الفوسفاتيز الثنائي DIPHOSPHATASES
- الفوسفاتيز الثلاثي TRIPOSPHATASES

والفوسفاتيز الاحادى :

غير محدد أو مقيد عادة بنوع الكحول الجذري RADICAL الذي يكون متحدا بحمض الفوسفوريك للمادة الخاضعة . ولذلك فإن له القدرة علي تميؤ HYDROLYSE انواع كثيرة من المركبات الفوسفاتية العضوية ويتم الكشف عن هذا الانزيم بالوسائل التالية :

أولا : الانشقاق والترسيب

SPLITTING AND PRECIPITATION REACTION PH_9



وينتهي بتكوين أو ترسيب مادة بيضاء هي فوسفات الكالسيوم

ثانيا : التفاعل الاول للتحويل : FIRST TRANSFORMATION REACTION

$$CA3\ (PO4)_2 + 3\ CO^{+2} \longrightarrow CO3\ (PO4\ )$$

$$\underset{\text{فوسفات كالسيوم}}{Ca_3\ (PO_4)_2} + \underset{\text{كوبالت}}{3\ CO_2} + \longrightarrow \underset{\text{راسب}}{CO_3}\ \ (PO_4)_2$$

راسب فوسفات الكوبالت COBALTOUS PHOSPHATE

ثالثا : التفاعل الثانى للتحويل (وسط طازج)

SECOND TRANSFORMATION REAOTION

$$CO_3(PO_4)_2 + 3S^{2-} \longrightarrow 3CO\ S$$

فوسفات الكوبلت

أنيون سلفيد Sulphide Anion

راسب سلفيد الكوبلتوز أسود Black

وواضح ان ذلك يؤدي الي تكوين راسب سلفيدكوبلتوز الاسود .

وجدير بالذكر ان التفاعلات السابقة هي التي تحدث عند الكشف عن الفوسفاتيز القاعدي بطريقة جوموري . وقد كان جوموري ١٩٣٩ وتاكاماسو TAKAMATSU ١٩٣٩ أول علماء يكشفون عن الفوسفاتيز القاعدي (القلوى) هستوكيمائيا ، وتعتمد هذه الطريقة علي ترسيب فوسفات الكالسيوم في اماكن نشاطات ذلك الانزيم وذلك عند تحضين IN-CUBATION† القطاعات مع ملح فوسفاتي عضوي (كمادة خاضعة) في وجود ايونات الكالسيوم CA عند الاس الهيدروجيني PH_9

ويلزم جميع تفاعلات املاح الفوسفات العضوية تواجد ايونات المغنسيوم كمنشط للانزيمات التي تعمل علي مواد خاضعة فوسفاتية ولذلك يجب اضافة تركيزات قليلة من كبريتات المغنسيومأو كلوريد المغنسيوم .

والمعتقد ان هذا المعدن قد يقوم بتنشيط الانزيم وذلك عن طريق تغيير الشحنة السطحية علي السطح البروتيني ، وبالتالي تغير الجهد الكهربائي الحركي ELECTRO INETIC POTENTIAL في تلك المجالات "كذلك يستخدم مركب" بيتاجليسيروفوسفات" β–GLYCEROPHOSPHATE كمادة خاضعة في الكثير من الاحوال ، وذلك لانه من السهل ان تتميأ في الوسط القلوي وكذلك في الوسط الحامضي وفي هذه الحالة يتم تحضين القطاعات التي سبق تجهيزها بواسطة التجميد اي القطاعات الثلجية او المجمدة FROZEN

SECTIONS في خليط يحتوي علي ملح الفوسفات العضوي وايونات الكالسيوم CA^{++} وكذا ايونات المغنسيوم MG^{+} وذلك عند الاس الهيدروجيني PH9 وعند درجة حرارة ٣٧م وعندئذ يقوم الانزيم بشق ذلك الملح وفصل مجموعة الفوسفات عنه ، ثم يترسب الفوسفات في القطاعات ويلي ذلك تحضين القطاعات في محلول طازج من ١٪ نيترات الكوبلت COBALT NITRATE الذي يعمل بدوره علي تحويل فوسفات الكالسيوم الي فوسفات الكوبلت.

وبعد غسل القطاعات جيدا بالماء المقطر لازالة الزائد من نترات الكوبلت توضع في محلول كبريتيد الامونيوم AMMONIUM SUILPHIDE الذي يحول فوسفات الكوبلت الي كبريتيد الكوبلت COBALT SUOLPHIDE وهو راسب اسود يدل علي مواقع الانزيم ونشاطاته في الخلايا والانسجة.

طريقة كالسيوم - كوبلت للفوسفاتيز القلوى (طريقة جومورى) :

THE CALCIUM - COBALT METHOD FOR ADKALINE PHOSPHATASE (GOMORI)

وهي تصلح للقطاعات الشمعية والقطاعات المجمدة .

أولا : بالنسبة للقطاعات الشمعية :

١- ازالة الشمع من القطاعات بواسطة الزيلول .

٢- تمرر في سلسلة هابطة من الكحولات حتي الماء المقطر.

٣- يتم تحضين القطاعات لمدة تتراوح بين نصف الي ١٦ ساعة عند درجة ٣٧ م في الوسط التالي :

- ١٠ ملليلتر من محلول ٣٪ صوديوم بيتاجليسروفوسفات

+ ١٠ملليلتر من محلول ٢٪ داي ابثيل بارييتيوريت الصوديوم NA DIETHYL BARBITURATE

- ٢٠ملليلتر ٢٪ كلوريد الكالسيوم .

- ١ ملليتر ٥٪ كبرتيات المغنسيوم.

٤- تغسل القطاعات في الماء الجاري .

٥- توضع القطاعات في ٢٪ نترات الكوبلت (٣-٥ دقائق) .

٦- تغسل في ماء مقطر .

٧- تنتقل القطاعات الي محلول مخفف من الكبرتيد الامونيوم لمدة دقيقة - دقيقتين .

٨- تغسل القطاعات بالماء ويتم صباغتها بالايوسين (إذا أريد ذلك) لمدة ٥ دقائق .

٩- ينزع الماء بالكحول ويتم الترويق بالزيلول ويوضع علي القطاعات الكندا بلسم ويتم تغطيتها بأغطية زجاجية نظيفة .

النتيجـة :

تظهر اماكن نشاطات انزيم الفوسفاتيز القلوي باللون الاسود أوالبني الداكن .

ثانيا : القطاعات المجمدة : FROZEN SECTIONS

١- تنتقل قطاعات سمكها (١٠ - ١٥ميكرون) علي شرائح زجاجية نظيفة بدون مادة لاصقة .

٢- تجفف في الهواء عند درجة حرارة الغرفة لمدة ١-٢ ساعة .

٣- يتم تحضين القطاعات في المادة الخاضعة لمدة ٤ ساعة .

٤- تغسل بالماء ثم توضع في ٢٪ محلول الكوبلت وتعامل بمحلول كبريتيد الامونيوم الاصفر .

٥- تصبغ - عند اللزوم - في ١٪ ايوسين مائي لمدة ٥ دقائق .

٦- تغسل القطاعات بالماء .

٧- تعطي القطاعات بالمحلول اللاصق "جيلي الجلسرين "GLYCERINE GELLY توضع عليها اغطية زجاجة نظيفة ويتم فحصها في الحال .

النتيجة : تتخذ اماكن نشاطات الانزيمات ايضا اللون الاسود ، البني الداكن .

طريقة التترازوليوم :

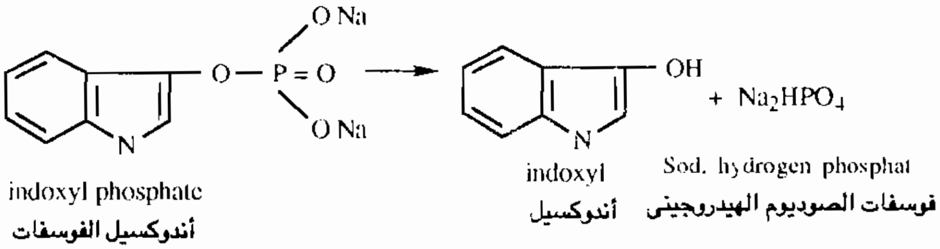
TETRAZOLIUM METHOD CMC GADEY (1970)

في هذه الحالة تستخدم مادة الاندوكسيل "INDOXYL " أو الاندوكسيل امين INDOXYL AMINE او مادة فينازين مثيوسلفيت phenazine metho sulphate كمادة

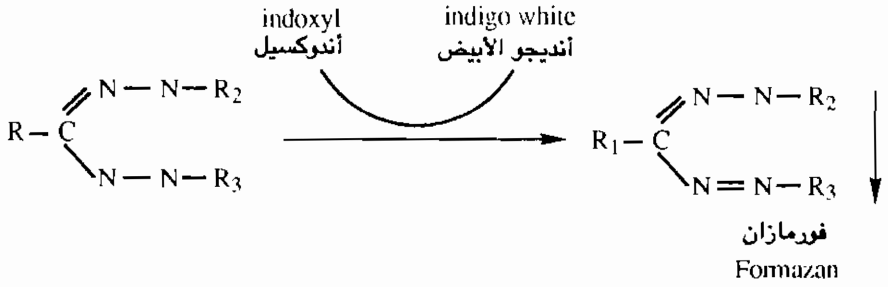
خاضعة للكشف عن انزيمات الفوسفاتيز والجلوكوسيديز وكاربوكسيليك استيريز وكذلك الببتديز

الفوسفاتيز القلوى :

١- التفاعل الابتدائي (تفاعل التكسير الانزيمي) Enzyme splitting reaction



٢- التفاعل الثاني (اختزال ملح التترازوليوم)



الطريقة : الوسط الحاضن : INCUBATION MEDIUM

أ- ٥ برومو - ٤- كلورو - ٣ أندوكسيل الفوسفات - ملح التولويدين (١-٣)

BROMO-4 CHLORO3 INDOXYL PHOSPHATE - TOLUIDENE SALT

ب - النيتروتترازوليوم الازرق BT، NT

جـ - يذاب في داي ميثل فورماميد N,N DIMETHYL FORMAMIDE ٢-٨ ملليلتر)

د - أو في ٢، ترس HCL المولاري (العياري)

او خلات الفيرونال VERONAL ACETATE BUFFER, PH 4-2-9.4

هـ - اخلط جيدا ثم رشح حوالي ١٠ ml3

٢- التحضين INCUBATION

لمدة ٥-٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٣٧°م

٣- اسكب الوسط الحامض :

٤- اغمس القطاعات في ماء مقطر ثم شعها في ٤٪ فورمالدهيد لبضع ساعات ثم تغمس في ماء صنبور ، ثم الماء المقطر وبعد ذلك تغمر في محلول الطمر الجلسرين جيلي " او محلول اباثي" APATHY SYRUP

النتيجـــة :

تعتمد نتيجة التفاعل علي نوع الترازوليوم ، فاللون الازرق يدل علي نشاط الانزيم في حالة استخدام نيترو NITRO - BT - BT بينما لكون اللون اسود في حالة استخدام الترازوليوم الرباعي .

وبالمقارنة بطريقة جوموري ، فإن طريقة الترازوليوم تعطي نتيجة افضل وذلك لانها توضح نشاط الفوسفاتيز القاعدي بوضوح وثبات ولاتوجد شوائب تتداخل في الفورمازان المتكون في اماكن نشاطات الانزيم كما انها تصلح في القطاعات المجمدة وقطاعات الفورملين المطمورة في الشمع .

الطريقة الثالثة : ازدواج الازو : AZO COUPLING (SIMULTANEOUS)

وهي تصلح للقطاعات الشمعية والقطاعات المجمدة .

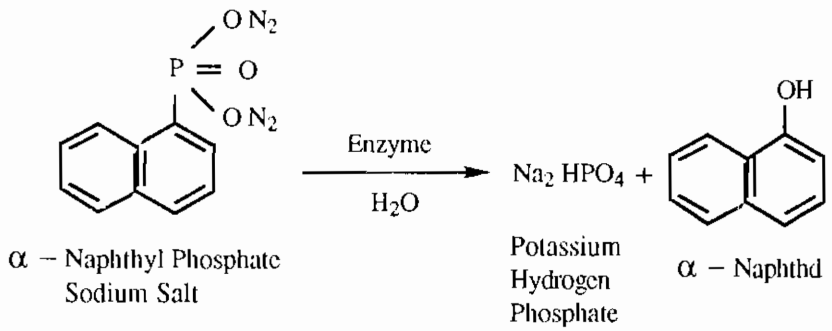
الطريقـــة :

يتم اعداد وسط التحضين كالاتي :

- ملح ألفا نافثيل فوسفات الصوديوم &-NAPHTHYL PHOSPHATE SODIUM أو نافثيل حامض الفسفوريك NAPHTHYL PHOSPHORIC ACID
- اذب في او – ٢ ومحلول مولاري فيرونال الخليل أو المحلول المنظم " ترس" TRIS HCL BUFFER ٥٠ ملليلتر عند pH ٩.٢ – ٩.٤
- ازرق السريع FAST BLUE أو احمر السريع FAST RED ٥٠ ملليلتر .
- يتم تحضين القطاعات لمدة ٣-٦ دقائق عند ٣٧° م
- ازح محلول التحضين واغمس القطاعات في الماء المقطر ثم توضع في ٤٪ فورمالين لعدة ساعات عند درجة حرارة الحجرة مع تقليل فقاعات الغازات في القطاعات .
- تغمس القطاعات في ماء الصنبور ثم تصبغ بصباغة خلفية COUNETR STAINING مثل الهيماتوكسيلين وذلك لتوضيح الانوية .

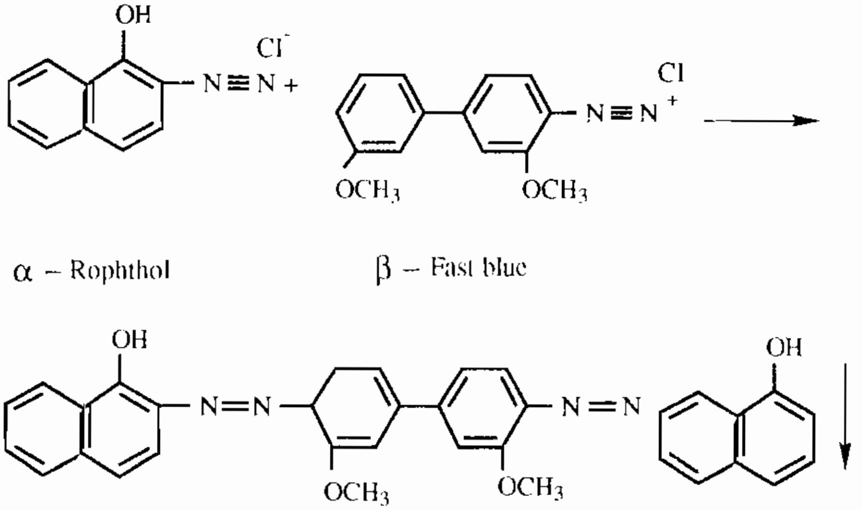
النتيجـــة : تظهر اماكن نشاطات الانزيمات كما يلي :

- باللون الاسود عند استخدام ازرق السريع
- اسود بني مع احمر السريع .



١ – التفاعل الابتدائى (التكسيرى الانزيمى)

٢ – التفاعل الثنائى (التفاعل الازدواجى)



أماكن تواجد انزيم الفوسفاتير القلوى :

يتواجد انزيم الفوسفاتير القلوى بصورة خاصة في أغشية الخلايا في مناطق الحواف الفرجونية brush borders في الانيبيبات الكلوية وفي الطلائية الداخلية للشرايين الصغيرة وكذلك الخلايا الكبدية وخلايا البروستاتا والطحال بالإضافة الي موجبة الخلايا والانسجة الاخري .

الفوسفاتيز الحامضي

ACID PHOSPHATASE

يلعب هذا الانزيم دورا اساسيا كعامل مساعد في التحليل او التكسير المائي لملح حامض الارثوفوسفوريك مع انواع مختلفة من الكحولات او الفينولات ، طبقا للمعادلات الاتية.

Monoester of phosphoric acid + H_2O → Alcohol (phenol) + orthophosphate

ملح احادي الارثوفوسفوريك + ماء $\xrightarrow[\text{وسط حامضى}]{\text{الإنزيم}}$ (كحولات أو فينولات) + ارثوفوسفات

أو تنتقل الفوسفات من كحول الي اخر .

ويوجد هذا الانزيم بكثرة في الليسوسومات والشبكة الاندوبلازمية في العديد من انوا ع الخلايا الجسمية .

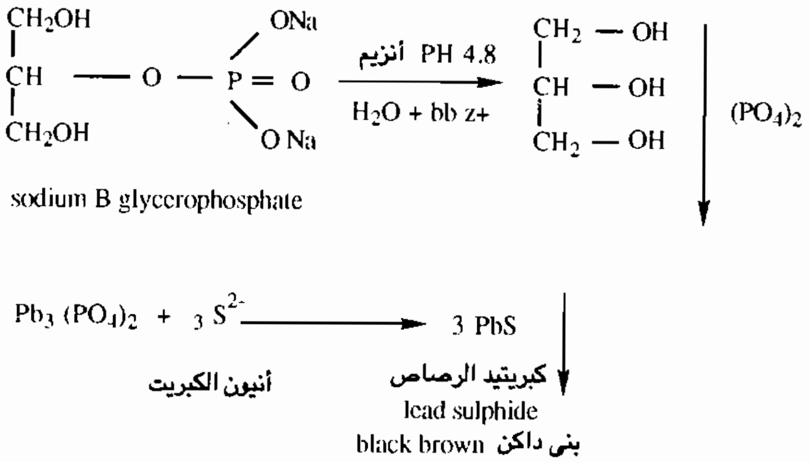
طرق الكشف عن الفوسفاتيز الحامضى :

المعروف أن هذا الانزيم يعمل بفاعلية في الوسط الحامضي عند Ph5 وان كانت توجد منه عدة انوا ع تعمل عند درجات متفاوتة من الاس الهيدروجيني (في وسط حامضي) ويشبه هذا الانزيم انزيم الفوسفاتيز القلوي في تفاعلاته .

ويفضل الان استخدام الفورمالين المتعادل البارد (٤٪) كمثبت لفترة قصيرة ثم استخدام القطاعات مباشرة .

وتعتبر طريقة جوموري (١٩٥٠) Gomeri هي الطريقة الشائعة الآن للكشف عن هذا الانزيم هستوكيميائيا وتعتمد هذه الطريقة علي ترسيب فوسفات الرصاص Lead phosphate .

وفي هذه الحالة تستخدم ذرات الرصاص Lead nitrate مع المادة الخاضعة "فوسفات الجلسرول β- Glycerophosphate وذلك لان فوسفات الرصاص تترسب ولاتذوب في الوسط الحامضي عند pH4.8 أو pH5 كما أن فوسفات الكالسيوم تذوب ولاتترسب في الوسط الحامضي ولهذا لاتصلح في ترسيب الفوسفات . وفي هذا التفاعل يتحول راسب فوسفات الرصاص بواسطة كبريتيد الامونيوم الاصفر الي كبريتيد الرصاص LEAD SULPHIDE وهو راسب بني داكن .



طريقة الكشف :

الوسط الحاضن :

١- ادنيوزين أو أدنيوزين O　　　　٢٠ ملليجرام ملح الصوديوم

التحضير :

١٠٠ - ١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة ، أو ٣٧°م وذلك بعد تثبيت الانسجة في الاليديهيد

مابعد التحضين :

- اسكب سائل التحضين .
- اغمس مرة أو مرتين في ماء مقطر .
- ضع القطاعات في ٠,٥٪ أو ١٪ كبرتيد الالومنيوم (النوشادر) لمدة دقيقتين .
- اغمس في ماء مقطر .
- يغطي القطاع بواسطة جيلي جليسرين او صمغ الاباثي (عملية نزع الماء غير مستحبة لكي لايتغير كبريتيد الرصاص) .

النتيجــة :

تظهر اماكن نشاطات الانزيمات باللون البني القاتم

٢- انزيم جلوكوز ٦- فوسفاتيز

pH 6.5 GLUCOSE -6- PHOSPHATASE

يقوم هذا الانزيم بدور فعال في التفاعل الاتي :-

D-GLUCOSE -6- PHOSPHATASE +H_20 ---- D . GLUCOSE +5 PHOSPHATE pH6.5

القطاعات المستخدمة مثبتة في الاسيتون المبرد وقطاعات شمعية أو فورمالية في فوسفات متعادل مبرد او فورمالين وقطاعات مجمدة .

الطريقــة :

١- يتم تحضير القطاعات بالطريقة المختارة .

٢- تحضن القطاعات عند ٣٧°م لمدة ١٥-٢٠ دقيقة في محلول طازج من (٠,٠١ مولار صوديوم بيتا جليسروفوسفات في ١٠٥ مولار خلات ACETATE محايد pH5.0 وخلات الرصاص LEAD ACETATE محتويات علي ٠,٠٠٤ مولار نترات الرصاص).

٣- تغسل القطاعات لمدة دقيقتين ثم تغمس في محلول مخفف من كبريتيد الامونيوم الاصفر لمدة ١-٢ دقيقة .

٤- تغسل وتصبغ صباغة خلفية في محلول ١٪ ايوسين مائي .

٥- تغسل مرة ثانية ويوضع عليها الجلسرين وتغطي بغطاء نظيف .

النتيجــة :

تظهر مناطق نشاطات انزيم الفوسفاتيز الحامض علي هيئة راسب كبريتيد الرصاص

طريقة نترات الرصاص المحورة للفوسفاتيز الحامضى :

(تاكوشى وتانو)

الطريقـــة :

١- تحضن القطاعات لمدة ٢/١ - ٢ ساعة في المحلول التالى :

(حجمين من ٢٪ محلول بيتا جليسروفوسفيت).

١ جم او مولار خلات الحديد pH5.0

١ جم ٢٪ خلات الرصاص Lead acetate

٣ ملليجرام ١-٣ ٪ كلوريد المغنسيوم Mg cl2

٢ - اغمس في ماء مقطر .

٣ - تنقل القطاعات الي محلول نترات الفضة النشادري Ammonicl Agno3 لمدة ٣ دقائق (وذلك باضافة ٢٨٪ من أو نشادر نقطة بنقطة الي ٥٪ محلول مائي نترات الفضة حيث يتم نوبان الراسب) .

٤ - اغمس في ٥٪ ميثوسلفات الصوديوم لمدة ٥ دقائق .

٥ - يتم نزع الماء ويتم ترويق القطاعات ثم تغمس في محلول الطمر المناسب مثل الجليسرين .

النتيجـــة :

تظهر مناطق نشاطات هذا الإنزيم علي هيئة راسب بني .

الطريقة الثانية :

ازدواج الأزو للكشف عن الفوسفاتيز الحامضى

AZO COUPLING FOR ACID PHOSPHATASE

(يتم تحضير القطاعات بواسطة الميكروتوم منخفض الحرارة أو فورماليبرمبرد . ويمكن استخدام القطاعات دون تحميلها علي شرائح .

توضع القطاعات في المحلول الخاص لمدة٢-٥ دقيقة . ويتكون هذا المحلول من ثلاث مجاميع من المحاليل :

أ – صوديوم الفنافثيل حامض الفوسفات ٤ مجم / مل

SODIUM α - NAPHTHYI ACID PHOSPHATE

في خلات / الفيرونال Veronal Aceteae متعادل الأس الهيدروجيني (٩.٧١٤ جم) خلات الصوديوم + ٣ ماء مقطر + ١٤.٧١٤ نترات الصوديوم في ماء مقطر خالٍ من ثاني اكسيد الكربون حتي تصل الي ٥٠٠ مل 2N HEL وتسخن بهدوء ، ويتم الترشيح بعد أن يبرد المحلول .

ب – ٢ جم كلوريد بارا روزانلين تضاف الى ٥٠ مل حامض هيدروكلوريك عيارى .

جـ – ٤٪ نتريت الصوديوم SODIUM NITRITE

والمحلول المستخدم كمحلول خاص هو كما يلي :

٥ مل من المحلول "أ" يضاف الي ١٣ مل ماء مقطر .

وتبع ١.٦ مل من محلول ملح زونيم Zonium Salt Sol ويحضر المحلول الاخير طازجا بخلط كمية متساوية (٨مل) من المحلول في أنبوبة اختبار ، ويكون الأس الهيدروجيني للوسط pH5 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم ويرشح المحلول في أنبوبة الصباغة .

٣– اغمس القطاعات في ماء مقطر ويتم نزع الماء ثم الترويق بواسطة الزيلول والتغطية ببلسم كندا .

النتيجة : تبدو اماكن نشاط الانزيم مصبوغة باللون الأحمر .

طريقة انتاج الازو داى بعد حدوث التفاعل

للكشف عن الفوسفاتيز الحمضى

POST COUPLING METHOD For ACID PHOSPHATASE

عن دوتنبرج وسلجمان (AFTER DUTENBURG & SELIGMA)

تحضير المحلول الخاضع SUBSTRTE SOLUTION

اذب ٢٥ ملجم من مادة Sodium-6-Benzoy - 2 -Naphthy Phosphate في ٨٠

سم^3 من الماء المقطر ثم اضف ٢٠ سم^3 من ٠.٥ عياري منظم خلات أسه الهيدروجيني (٠٥) اضف ٢٪ من كلوريد الصوديوم الصلب لجعل المحلول زائد التركيز Hypertonic والقطاعات المثبتة في الجلونارلدهيد يمكن تعويمها حره Free Floating .

٣- مابعد التحضين :

- يزاح الوسط الحاضن .
- يغمس القطاع لمدة دقيقة في ماء مقطر .
- توضع القطاعات في ٢/١-١٪ كبرتيد الامونيوم الاصفر لمدة دقيقتين ثم تغمر القطاعات في جيلي جلسرين او الاباثي

النتيجة :

يكون دليل نشاط الانزيم بنيًا قاتمًا .

ملحوظة : عملية نزع الماء والترويق غير مستحبة حتى لاتؤثر علي كبريتيد الرصاص.

الكشف عن الفوسفاتيز الحمضى باستخدام NAPHTHOLA B

طريقة برستون BriSTONE لعام ١٩٥٨

التى طورها باركا BAARKA عام ١٩٦٠

تحضير المحاليل :

١- محلول المادة الخاضعة : Substrate Solution

- فوسفات نافثول Naphthol A2-B1 Phosphate ٥٠ ميللجرام
- دايميثيل فورماميد Dimsthyl Formamid ٥ سم^3

٢- المحلول المنظم: BUFFER SOLUTION

- خلات صوديوم Sodium Acetate ١,١٧ جم

- باربيتون الصوديوم Sodium Barbitons ٢,٩٤ جم

- ماء مقطر Distilled - Water ١٠٠ سم٣

٣- محلول نيتريت الصوديوم (يحضر قبل الاستعمال مباشرة) :

- نيتريت الصوديوم Sodium Nitrite ٤٠٠ ميللجرام

- ماء مقطر Distilled - Water ١٠ سم٣

٤- محلول باروازوز انيلين - يدكل :

- هايدروكلوريد باراروزنيتين Pararosamitin Hydrochloryied ٢ جم

- ٢ عيارية حمض يد كل ٠ 2N-Tlydre Chloric Acid ٥٠ سم٣

سخن علي لهب هادئ ثم برد الي درجة حرارة الغرفة ورشح .

تحضير محلول التحضين : INCUBATING MEDIUM

- محلول (١) ٠,٥ سم٣

- محلول (٢) ١,٥ سم٣

- محلول (٣) ٠,٤ سم٣ يخلطان معا قبل الاستعمال مباشرة.

- محلول (٤) ٠,٤ سم٣ ثم يضاف الخليط الي محلول التحضين .

- ماء مقطر ٦,٥ سم٣ بعد دقيقتين من اجراء الخلط .

ويراعي ان تكون درجة الاس الهيدروجيني لمحلول الحضن بين ٤,٧ - ٥ وان لم يكن ، فيستعمل محلول او عياري هيدروكسيد صوديوم لضبط درجة الاس الهيدروجيني .

وفي جميع الحالات رشح المحلول .

خطـوات العمـــل :

١ – يتم الحصول علي قطاعات بالكريوستات لعينات مثبتة .

٢ – ضع القطاعات في محلول التحصين عند درجة ٣٧ م لمدة ١٥–٦٠ دقيقة .

٣ – اغسل القطاعات في ماء مقطر .

٤ – اصبغ أنوية الخلايا في محلول ٢٪ أخضر المثيل .

٥ – اغسل القطاعات في ماء جارٍ

٦ – غط القطاعات في الجلسرين جيللي ويمكنك ايضا ان تنزع الماء بسلسلة متصاعدة من الكحول ثم تروق في الزيلول ثم تغطي بصمغ .

النتائــج :

تظهر اماكن نشاط انزيم الفوسفاتير الحمضي – مصبوغة باللون الاحمر وتضع الانوية باللون الاخضر .

نيوكليوتيديز NUCLETIDASE

Ribonuclestide + H_2O ⇌ Ribonucles side +5phosphate

ويعمل هذا الإنزيم كوسيط في التحلل المائي لفوسفات ريبونيوكليوتيد والكثير من دي أكسي ريبونيوتيدات من الانزيمات المتماثلة Isozymes .

يوجد هذا الانزيم مرتبطا بأغشية الخلايا ، ويعزي اليه القيام بدور معين في تكسير الأحماض النووية وفي انتقال النيوكليوتيدات خلال غشاء الخلية .

طريقة الكشف عن الانزيم :

الوسط الحامضن

– أدينوزين أحادي الفوسفات ملح الصوديوم ٢٠ ملج (أذب في ماء مقطر واضبط عند

الأس الهيدروجيني ٧.٢) .

- ٠.٢ م (مولاري) ترس ماليت pH7,2 ٢٠ ملليمتر .

- ٢٪ نيترات الرصاص ٢ ملليلتر .

- ٢.٥٪ كبريتات مغنسيوم ٥ ملليلتر .

- ماء مقطر ٢ ملليلتر .

اخلط جيدا واترك المحلول بعض الوقت ثم رشح .

التحضين : Incubation

وذلك لمدة ١٠٠-١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة أو عند ٣٧°م

مابعد التحضين :

- اسكب سائل التحضين .

- أغمس مرة أو مرتين في ماء مقطر .

- ضع القطاع في ٠.٥ ٪ أو ١٪ كبريتيد الأمونيوم لمدة دقيقتين .

- ضع القطاع في جيلي الجلسيرين أو صمغ الأباثي (عملية نزع الماء غير مستحبة حتي لايتغير لون الرصاص) .

النتيجة : تعرف اماكن نشاطات الانزيم باللون البنى الداكن .

انزيم جلوكوز -٦- فوسفات

.GLUCOSE - 6 - PHOSPHATASE

يقوم هذا الانزيم بدور أساسى فى التفاعل التالى :

$$\text{D - glucose - 6 - phosphatase} + H_2O \xrightarrow[\text{Ph5}]{\text{الانزيم}} \text{6 glucose + 5phsphate}$$

وبجانب هذا يقوم الانزيم بنقل مجاميع الفوسفات من النيوكليوتيد ثنائى الفوسفات وثلاثى الفوسفات إلى الجلوكوز أو سكريات أخرى ويوجد هذا الانزيم فى الشبكة الاندوبلازمية فى خلايا الكبد والكليه والأمعاء بصورة خاصة .

المثبتات : فورمالديهيد متعادل – فور مالديهيد كالسيوم .

طريقة المعدن الثقيل Heavy Metal

(شيكوين Chiquoine ١٩٥٣)

المحورة بواسطة واشستين وميسيل ١٩٥٦

Wachstein & Meisel,1956

للجلوكوز سداسي الفوسفات

الوسط الحاضن :

– ١٢٥و٪ صوديوم دي جلوكوز –٦– فوسفات D-oglucese -6-phosphate sodium أو بوتاسيوم ٢٠ مل .

–٢, مولاري M ترس ماليت المحايد

0.2 Mtris malite buffer Ph. 6.5 ٢٠ مل

– ٣٪ نترات الرصاص

3% Lead nitrate ٣ مل

– ماء مقطر ٧ مل

بعد مزج هذه المكونات تترك لكي تستقر في اناء مغلق لمدة ٥ –١٠ دقائق عند درجة حرارة محلول التحضين .

التحضين :

يتم التحضين لمدة ٥–١٠ دقائق عند درجة حرارة الحجرة أو درجة حرارة ٣٧°م. (وتستخدم لذلك قطاعات مثبتة في محلول جلوتارلديهيد ويمكن تعويمها علي سطح محلول التحضين) .

مابعد التحضين :

– يزاح الوسط الحاضن

– تغمس القطاعات في ماء مقطر لمدة دقيقة تقريبا .

- ينقل القطاع الي ٠.٥٪ -١٪ محلول كبريتيد الأمونيوم الأصفر لمدة دقيقتين .

- يغمس في ماء مقطر .

- يغمر في محلول جيلي الجلسرين أو الاباثي .

النتيجـة : دليل نشاط الإنزيم عبارة عن راسب بني داكن .

ملحوظة : عملية نزع الماء والترويق غير مستحبة لكى لاتؤثر علي لون كبريتيد الرصاص .

أدينوزين ثلاثى الفوسفات

Adenosine triphosphatase (ATPase) pH.7.5-9

يعمل هذا الانزيم كوسيط في التفاعل التالي :

$$ATP + H_2O \xrightarrow[\text{ph. 6.3}]{\text{الإنزيم}} ADP + \text{ortho phosphate}$$

والمعروف أنه يوجد العديد من الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ، أهمها :

أ - ميوسين أدينوزين ثلاثي الفوسفاتيز Myosin ATPase وهو يتم تنشيطه بواسطة أيونات الكالسيوم ويعمل عند الأس الهيدروجيني pH9 .

ب - أدينوزين ثلاثي الفوسفاتيز في أغشية الخلايا ويتم تنشيطه بواسطة أيونات الصوديوم أو البوتاسيوم كما يتطلب وجود أيونات المغنسيوم ، وهو يعمل عند الأس الهيدروجيني pH.7.5

وهذه الارنزيمات مستولة عن تكسير الأوينوزين ثلاثي الفوسفات ATP . ويعني هذا أنهما يميثان الروابط الفوسفاتية الغنية بالطاقة بما ينتج عنه إطلاق هذه الطاقة ، كما يلعب ميوسين أدينوزيم ثلاثي الفوسفاتيز دورا هاما في انقباض العضلات كما يلعب الأدينوزين ثلاثي الفوسفاتيز المتواجد في أغشية الخلايا الخلايا دورا أساسيا في عملية انتقال أيونات الصوديوم والبوتاسيوم خلال أغشية الخلايا .

جـ - أدينوزين ثلاثي الفوسفاتيز المتواجد في الميتوكندريا وهو يعمل عند معدلات مختلفة للأس الهيدروجيني ، ويلزم تكسير الميتوكندريا للكشف عن هذا الإنزيم وذلك بواسطة عمليات التجميد ومعاملة الخلايا بمحاليل منخفضة التركيز .

طريقة الكالسيوم - كوبالت :

(باديكيولا وهرمان Padykula and Herman1955 pH.9)

لأدينوزين ثلاثي الفوسفات المتواجد في العضلات

الوسط الحاضن :

- ملح صوديوم أدينوزين ثلاثي الفوسفات ٧٥ مجم

أذب في ماء مقطر ٢٠ مل

ثم اضبط الأس الهيدروجيني عند pH9.2 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم NaOh

- ٢٪ باربيتال الصوديوم ١٠ مل
- ٢٪ كلوريد الكالسيوم الخالي من الما ء (Anhydrous Ca Cl_2) ٥ مل
- ماء مقطر ١٥ مل

ثم رشح الكمية الكلية ٥٠ مل

التحضين : لمدة ١٥-٦٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة أو ٣٧°م

مابعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن .
- اغمس القطاع جيدا في ماء مقطر لمدة دقيقة .
- ضع القطاع في ١-٢٪ كلورايد أو خـلات الكوبلت Cabalt cloride or cobalt acetate وذلك لمدة خمس دقائق .
- اغسل في ماء جار لمدة دقيقة - دقيقتين .
- ضع القطاع في ١و-١٪ محلول كبريتيد النشادر الأصفر .
- اغسل في ماء جاري لمدة ١٠ دقائق .

- اغمس القطاع في جيلي الجليسرين أو محلول أباتي .

النتيجـــــة : يدل ظهور الراسب الأسود علي أماكن نشاط الإنزيم .

طريقة ثانية : (طريقة ملح الرصاص)

واشستين وميسل Washstein and Meisel, 1957

(pH.7.2)

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن الأدينوزين ثلاثي الفوسفات في بعض الأعضاء والأنسجة الجسمية (بخلاف العضلات)

الوسط الحاضن :

- ملح الصوديوم للأدينوزين ثلاثي الفوسفات	٢٠ مجم
أذب في ماء مقطر	٢٠ مل
- ٢, مولار(0.2M) ترس ماليت المحايد أوالمنتظم (pH.7.2)	٢٠ مل
- ٢٪ نترات الرصاص	٣ مل
- ٢.٥ ٪ كبريتات المغنسيوم أو ٢٪ كلوريد المغنسيوم	٥ مل
- ماء مقطر	٢ مل
اخلط ثم رشح	٥٠ مل

التحضـــين :

من ١٠-١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة أو ٣٧°م

مابعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن
- اغمس لمدة دقيقة في ماء مقطر .
- ضع القطاع في ١٪ محلول كبريتيد النشادر الأصفر لمدة دقيقة .
- اغمس في ماء مقطر .
- اغمر في محلول جيلي الجليسرين أو محلول أباثي .

النتيجة : ظهور اللون البني الداكن دلالة علي وجود الإنزيم .

ثيامين بيروفوسفاتيز

Thiamine Pyrophosphatase

يقوم هذا الإنزيم بدور العامل الوسيط المساعد في التفاعل الآتي :

$$\text{Thiamene pyrophosphate} + H_2O \rightleftharpoons \text{thiamine monophosphate} + \text{pyrophosphate}$$

يستفاد بطريقة الكشف عن هذا الإنزيم توضح جهاز جولجي في الخلايا دون الحاجة إلي استخدام طرق الفضة والأوزميوم المعتادة في تلك الحالات بما يوفر النفقات والجهد والصعوبات وذلك لأن جهاز جولجي له علاقة وثيقة بهذا الإنزيم ، ويشاهد نشاط هذا الإنزيم بصورة خاصة في الخلايا العصبية والطلائية والبربخ والغدد الصماء .

طريقة الكشف عن الإنزيم :

طريقة الرصاص (نوفيكوف وجولد فيشر)

Novikoff and Goldfischer,1961

(pH.7.2)

الوسـط الحاضن :

- ثيامين بيروفوسفيت (تتراهيدريت) تذاب في ماء مقطر ويضبط عند ph7.2 ٢٤ مجم بواسطة هيدروكسيد الصوديوم NaOH ٢.٥ مل

- ٠.٢ ترس ماليت المحايد pH.7.2 ١٤ مل

- ١٪ نترات الرصاص ٣ مل

- ١٪ كلوريد ماغنسيوم خالي من الماء Mgcl2 ٥ مل

اخلط ورشح

التحضـين :

من ١٠-١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة ٣٧°م .

مابعد التحضين :

أسكب الوسط الحاضن .

- اغمس مرتين لمدة دقيقة في ماء مقطر .

- ضع في ٥ .٠- ١٪ كبريتيد النوشادر الأصفر .

- اغمس في ماء مقطر .

- اغمر في جيلي الجلسرين .

النتيجة :

يستدل علي مكان ونشاط الانزيم باللون البني الداكن .

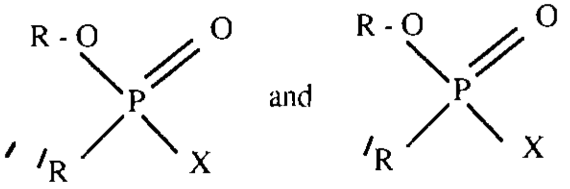
الإنزيمات المميئة الكربوكسيلية

CARBOXYLIC HYDROLASES

تساعد هذه الإنزيمات وتقوم بدور الوسيط في بعض التفاعلات مثل النموذج التالي :

$$RCOOR' + H_2O \rightleftharpoons R'COOR + RCH$$

ويحدث هذا التفاعل في اتجاهين ، علي أن هذه الانزيمات تعمل علي التميؤ والتكسير في اتجاه ، كما تساعد في البناء في الاتجاه الآخر. والملاحظ أن تقسيم هذه الإنزيمات أمر بالغ الصعوبة لكثرة أنواعها واختلاف ميكانيكيتها حسب العضو الذي توجد به ، وكذا حسب حساسيتها بالنسبة للمثبطات . وبعض الإنزيمات المميئة الكربوكسيلية يتم تثبيطها بواسطة التركيزات المنخفضة نسبيا للفوسفات العضوية تبعا للمعادلة الآتية :



R &'R alkyl groups

وكذلك الأمر بالنسبة للسيانيد Cyanide والفلوريد Fluoride وتعرف مثل هذه الإستيريزات بأنها : استيريزات غير نوعية . وتشمل هذه الاستيريزات الانواع التالية :

الاستيريز غير النوعية Non specific esterases وهي تتضمن بدورها الانواع الآتية :

١ – الاستيريزيس الكربوكسيلية Carboxy esterases

وهي :

أ– أريل استيريز Aryl esterase

وتشتمل : A - esterase

Aromesterase

Aryl esterase hydroluse

ب – أسيتيل استيزيز

وتشتمل علي : C-esterase

Acetic acidesterhydrolase

وتوجد هذه الإنزيمات في الشبكة الاندوبلازمية – الليسوسومات ، واحتمالا في الميتوكندريا والهيالوبلازم خاصة في الكبد والكلية واللفائفي .

وتعمل معظم هذه الإنزيمات غير النوعية عندpH.5-8 ، وإن كان دورها في النشاطات الخلوية غير معروف بدقة .

طريقة الكشف عن الاستيريزات غير النوعية :

طريقة الازدواج المتزامن للأزو مع خلات الفانافثيل

Azo Coupling with α - naphthyl acetate
Davis and Ornstein (1959).

– يتم إعداد القطاعات المجمدة بالكربوستات .

– الوسط الحاضن Incabation medim

٢,٨٪ فوسفات الصوديوم الثنائى ٥٠ مل

هسكازونيم ب – روزانلين

hexazonium P- rosaniline ١,٥ – ٤,٥ مل

امزج جيدا واضبط الاس الهيدروجنى عند ٦,٥ – ٧,٤

١٪ الفانافثيل استيت مذاب فى الاستون ٠,٥–١ مل

امزج جيدا ورشح

مابعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن ثم اغمس فى ماء مقطر .
- ضـع القطاعات فى ٤٪ فورمالديهيد لبضعه ساعات عند درجة حرارة الحجرة
- اغمس فى ماء الصنبور ثم أضع بالهياتوكسلين أو أحمر السريع
- تتم التغطية بمحلول أباتى .

النتيجة : يستدل على نشاط الانزيم باللون البنى

الكـولين استيريزات

Cholinesterases

تقوم هذه الإنزيمات بدور الوسيط في التفاعلات التالية :

A-Acetylcholine +H_2O $\rightleftharpoons$ Choline+ acetate

وأيضاً :

B-Acetylcholine +H_2O $\rightleftharpoons$ Choline + Carboxylic acid

وكقاعدة عامة تنقسم الكولين استيريزات الى :

A-Acetylcholinesterase(acetylcholine hydrolase) which is a specific cholinesterase.

إسيتيل الكولين استيريز المحدد

B-Pseudo cholinertease (non specific cholinerterase)

وهو يعرف بأنه كولين استيريز غير الحقيقي أو الكاذب .

– ويوجد هذا الانزيم في خلايا الدم الحمراء وأجسام الخلايا العصبية وكذلك في التشابكات العصبية والنهايات الحركية للأعصاب في العضلات الإرادية .

ويعمل الأسيتيل كولين استيريز عند الأس الهيزروجيني pH.7-8 والكولين استيريز عند pH.8-85 .

ويستخدم لهذه التحضيرات قطاعات الكريوستات المثبتة في الفورماليهيد .

طريقة "ثيوكولين للكشف عن الكولين استيريز"

Thiocholine method for choline esterase

(Kamnovsky and Roots, 1964)

الوسط الحاضن :

– بيوتيل أو أسيتيل نيوكولين أيوديد Butyl thiocholine iodide	١٢,٥مجم
– تذاب فى ماء مقطر	٢,٥ مل
– ٠,٨٢٪ خلات الصوديوم (Sod. acetate)	١٥,٨ مل
– ٦,٪ حامض (Acetic acid)	٠,٥ مل
– ٢,٩٤٪ سترات الصوديوم Sod. citrate	١,٥ مل
– ٠,٧٥٪ كبريتات النحاس Copper sulphate	٢,٥ مل
– ٠,١٦٥ ٪ سيانيد حديديك البوتاسيوم K Ferricyanide	٢,٥ مل
	about 25 ml

ويكون لون المحلول أخضر باهتًا والأس الهيدروجيني pH.5-5

التحضـــين :

ضع القطاعات في المحلول لمدة ١٠-١٨٠ دقيقة عند ٣٧°م .

مابعد التحضين :

- يسكب الوسط الحاضن .
- تغمس القطاعات في الماء المقطر .
- يتم تغطيتها بمحلول جيلي الجليسرين أو آباتي .

النتيجة : يدل اللون الاحمر البني علي أماكن وجود الإنزيم .

الكشف عن الأسيتيل كولين استيريز
بطريقة ثيوكولين الرصاص - سيانيد الحديدوز

Thiocholine - Lead Ferrocyanide method

(Eranko, Käoelle and kaisanen1957)

تحضير المثبت :

٥.٠٠ مل فورمالين (٤٠٪ فورمالديهيد) في ٥٠ مل كريس - رنجر - كالسيوم) ويتم تحضيره كمايلي :

- ١٠٠ مل ٠.٩ ٪ كلوريد صوديوم Nacl
- ٤ مل ١.١٥ ٪ كلوريد بوتاسيوم Kcl
- ١.٢٧ مل ١.٢٢ ٪ كلوريد كالسيوم $Ca\ cl_2$
- ١.٠٠ مل ٢.١١ فوسفات بوتاسيوم KH_2PO_4
- ١.٠٠ مل ٣.١٣ كلوريد ماغنسيوم $Mg\ cl_2.6H_{10}$

- ٢,٠٠ مل N . HCL

- يتم تثبيت قطع النسيج في المحلول عند درجة ٤°م لمدة ٢-٤ ساعات ويتم التقطيع بالكريوستات .

الوسط الحاضن :

- يجب أن يكون الماء المقطر المستخدم مغليا لمدة ساعة قبل الاستعمال .

- أضف المواد المذكورة بالترتيب الموضح بين المزج بدقة بعد كل إضافة .

- ترس الخلات المحايد Tris-acetate buffer عند pH6.00 وذلك بإضافة ٢ مل M- acetic acid الي ١٠ مل ٢، M.tris ، ويجب ترشيح محلول خلات الرصاص قبل الاستعمال .

ويتم ٢٣ مجم اسيتيل كولين أيوديد في ١,٢ مل ماء واضافة ٤، مل من ١, M.lead acetate

ويؤخذ المحلول الرائق بعد عملية الطرد المركزي .

- ماء مقطر	٤,٩ مل
- (0.17M) Tris acetate buffer	٤ مل
- خلات الرصاص (0.1M) lead acetate	٠,٥ مل
- (0.01M) Potassium ferricyanide	٠,٥ مل
- (0.05M) Acetyl thiocholine	٠,٦ مل
- (0.05 M) Potassium feirricyanide	٠,٠١ مل

تضاف المادة الاخيرة لتشبيع الوسط بسيايند حديدوز الرصاص مكونا راسبًا أبيض مصفراً وبعد الترشيح يبرد المحلول في الملح .

التحضـــين :

- إغـمس القطاعـات في ٣ تغـيـيـرات في ١٧, Mtris acetate buffer لتـر أيونات الفوسفات .

- ضـع القطاعات في الوسط الحاضن لمدة ١٠-٦٠ دقيقة عند درجة الصفر .

- اغمس في ٣ تغييرات في الماء المقطر عند درجة الصفر .

- انزع الماء وضـع في وسط صناعى Synthetic resin .

- عامل بمحلول مخفف من كبريتيد النوشادر المضاف اليه أو M.lead acetate

النتيجـــة : ظهور راسب أصفر أو بني في أماكن نشاط الإنزيم .

الطريقة المباشرة للكشف عن الاسيتيل كولين استيريز

(Karnovsky and Roots, 1964)

المـثبت : فورمول كالسيوم المبرد وتعد القطاعات بالكريوستات (٥-١٠ ميكرون)

التحضين : توضـع القطاعات لمدة ٦٠-١٢٠ دقيقة في المحلول التالي : ٥ مجم أسيتيل كولين أيوديد أو بيوتيل أسيتيل ثيوكولين أيوديد Acetyl thiocholine iodide or butyl thiocholine iodide

- pH.6 acetate buffer M0.1 أضف مع التقليب ٦,٥ مل .

- ٠,٥ مل أو مولار سترات الصوديوم Soduim citrate

- ١,٠ 30M cuso4

- ١,٠ ماء مقطر

- ١,٠ 5 mmM Potssium ferricyanide

يلاحظ أن المحلول الحاضن النهائي يكون رائقا مائلاً للخضرة ، ويظل ثابتا لبضـعة

ساعات .

مابعد التحضـين :

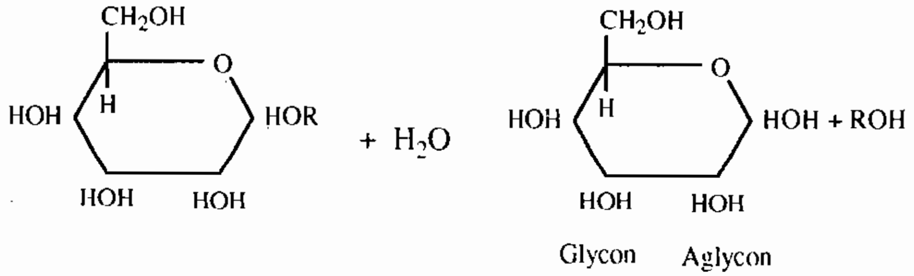
- اغمس في ماء مقطر .
- اصبغ صباغة خلفية بالهيماتوكسلين
- انزع الماء ثم اظهر القطاعات في كندا بلسم

النتيجة : ظهور راسب أحمر يدل علي أماكن نشاط انزيم كولين استيريز .

الجليكوسيدات

Glycosidases (Glycoside hydrolases)

تقوم هذه الإنزيمات بدور العامل الوسيط في تميؤ الأربطة الجليكوسيدية



وتنقسم الجليكوسيدات الي :

- عديد السكريديز Polysaccharidase Polysaccharidase
- أوليجو سكريديز Oligo saccharidase
- ثنائي السكريديز Disachari dase

الكشف عن الجليكوسيدات

المثبت : فورمول كالسيوم مبرد وتعد القطاعات بالكريوستات

الوسط الحاضن :

- انديكسيل الجلوكوسيد Indoxyl glucoside ٣ مجم
- داي ميثيل تورثورمايد ٠,٣ مل
- 0.1M Citrate phosphate buffer ٧ مل

(pH.3.5-5.5)

قلب مع التحريك بانتظام ، ثم أضف :

50 mM K ferricyanide (1.6y) ٠,٥ مل

50 mM ferrscyanide (2.11أ) ٠,٥ مل

قلب ثم رشح

- ضع القطاعات في المحلول ٣٠ دقيقة – ٢٤ ساعة عند درجة ٣٧°م .

مابعد التحضين :

- اغسل بالماء
- اطمر في محلول جيلي جيلسرين أو آباتي

النتيجـة : اللون الازرق يدل علي أماكن نشاط الإنزيم .

الببتيـديزس

Peptidases (Proteolytic Enzymes)

(Peptide hydrolases-hydro lytic enzymes)

تقـوم هذه الإنزيمات بدور العـامل المسـاعـد والوسـيط في التكسـيـر المائي لأربطة البيتيدات كمايلي :

R-CO NH-R´+H_2O --> R COOH +R´- NH_2

وتشتمل هذه الإنزيمات علي :

أ- **البيتيديزات الداخلية** : Endopeptidases

وتعمل علي تميؤ الرباط البيتيدي الموجود وسط الجزئ

ب - **البيتيديزات الخارجية** :- Exopeptidases

وهي التي تميء الرباط الببتدي الموجود في طرف الجزئ . ويشتمل النوع الاول علي الإنزيمات المميئة البروتينة في القناة الهضمية مثل الببسين والتربسينوالكيموتريسين بينما يشتمل النوع الثاني علي الكاتبيسن Cathepsin الموجود في الليسوسومات .

مثال للبيتيديزات :

الببتديز الأمينى

Amino Peptidase

يوجد هذا الإنزيم في أغشية الخلايا ، ويقوم بتميأة الببتيدات المختلفة والأريل امبدات **مثل** : leucyl and alanyl 2naphthyl amide

Alanyl-2 naphtylamide+H_2O ——► L-alanine + 2naphthylamine

طريقة الكشف :

Simltaneous azo-coupling (Nachales, 1960)(طريقة الآزو المزدوجة المتزامنة)

الوسط الحاضن : L-alanyl or L-leucyl-4 methoxy 2- naphthylamide

- أذب في N,N dimethyl formamide ٠,٥ مل

- او M فوسفات وخلات وكاكوديلات أو حامض ستريك فوسفات المنظL ٠,٥ مل

ويضبط عند pH.6.5-7.5

- أزرق السريع fast blue ١٠ مجم

امزج ثم رشح

- يتم التحضين لمدة ٥-٤٥ دقيقة عند ٣٧°م

مابعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن
- اغمس في ماء مقطر .
- ضع القطاع فى٢٪ كبريتات الحديد لمدة ٥ دقائق .
- اغمس في ماء مقطر .
- ضع القطاعات في ٤٪ فورماليهيد لمدة ساعتين .
- اغمس في ماء مقطر .
- اظهر في جيلي الجليسرين أو الآباثي .

النتيجة :

أماكن نشاط الانزيم تأخذ اللون الازرق البنفسجي

إنزيمــات ســلفاتيزيس

Sulfatases

يشـار لهذه الانزيمـات عادة بأنها "Aryl sulphatase" آريل سلفاتيز، وتقوم بتميئى التفاعل :

Aphenol sulphate +H_2O ⇌ sulphate + phenol

ومنها :

أريل سلفاتيز A	ويعمل عند pH4.5-5.2
آريل سلفاتيز B	pH5.5-5.9
آريل سلفاتيز C	pH8-8.5

ويتواجد كل من آريل سلفاتيز B,A في الليسـوسـومات فقط ، أما آريل سلفاتيز C فيتواجد في الشبكة الاندوبلازمية .

طريقــة الكشــف :

طريقة استخدام ملح P-nitro catechol sulphate

تستخدم قطاعات الكريوستات الطازجة .)

الوسـط الحاضن :

P-Nitro pyrocatechol sulphate	
1,2dihy drox 5-nitro benzene sulphate	١٦٠ مل
أذب في ماء مقطر .	٤٠ مل
-أو M مولار خلات المنتظم 0.1 M acetate buffer pH5.5	١٢ مل
– ٨٪ نترات الرصاص lead ntrate	٤ مل

يتم ضبط pH عند ٥.٥ بواسطة M,2 حامض الخليك وخلات الصوديوم . يترك لمدة ١٥-٣٠ دقيقة عند درجة ٣٧ °م ثم يرشح .

- يتم التحضين لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة عند ٣٧°م .

مابعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن
- أغمس في ماء مقطر .
- ضع القطاعات في ٠,٥ -١٪ محلول كبريتيد النوشادر الأصفر لمدة دقيقة - دقيقتين
- اغمس في ماء مقطر .
- طمر في جيلي الجليسرين أو محلول اباثي .

النتيجة : تصبغ أماكن نشاط الإنزيم باللون الاسود البني .

الترانسفيريزيس

Transferases

(الإنزيمات الناقلة)

تقوم هذه المجموعة الكبيرة كعامل مساعد ووسيط لنقل مجموعات معينة من مركب المعطي "donor" الي المركب الآخر المستقبل "receptor" كما توضح المعادلة التالية :

$$R\text{-}D + A \rightleftharpoons RA + D$$

ومن هذه الانزيمات :

- كاربون ترانسفيريز Carbon transferase

– اسبارتيت كارباميل ترانسفيريز	Aspartate carbamyl
– أورنثين كاربوميل ترانسفيريز	Ornithine Carbomyl transferase
– اسباريت امينو ترانسفيريز	Aspartate amino transferase
– كولين اسيتيل ترانسفيريز	Choline acetyl transferase

ويمكن الكشف عن هذه المجموعه بطريقة بالطريقة الآتية :

مثال لهذه المجموعة :

جليكوجين فوسفوريليز

Glycogen phosphorylase

لعل هذا الانزيم كعامل مساعد في تكسير أو يميؤ انواع الاميلوز حسب المعادلة التالية :

$$((1,4\text{-}\alpha\text{-}1)\text{- Glycosyl})_n + \text{orthophosphate} \rightleftharpoons$$

$$.\ (1,4\text{-}\alpha\text{-D Glycosyl})_{n-1} + \text{D-Glucose} + \text{Phosphate}$$

ويفضل الكشف عن هذا الانزيم فى الكبد والقلب والعضلات الارادية وتستخدم لهذا الغرض قطاعات كريوستات غير مثبتة أو معاملة بالاسيتون

طريقة تاكوشى ومارياكو (جولدوسكى ١٩٥٨)

Goldwisky (1968)

للكشف عن هذه الانزيمات

الوسط الحاضن :

– ماء مقطر ١٥ مل

ويضاف بالترتيب التالي

- صوديوم - جلوكوز ١ فوسفات	٥ مجم
- صوديوم أدينو مونوفوسفيت Soduim adeno monophosphate	١٠ مجم
- صوديوم إثيلين ديامين تتراأسيتيك (EDTA)	٢٠ مجم
- فلوريد صوديوم Soduim fluoride	٢٠ مجم
- جليكوجين (مذاب في الماء)	٥-١٠ مجم
- انسيولين Insulin	١-٢ وحدة
0.1M acetate buffer pH: 5-7	١٠ مل
- بوليفينيل بيروليدون Polyvinyl Pyrroldone	١-٢ مجم

اخلط جيدا واضبط عند pH 5.8 .

التحضين : لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة عند ٣٧ °م

مابعد التحضين :

- اغمس في ماء مقطر .
- ضع في ٩٦٪ كحول إيثيلي لمدة ٣ دقائق .
- ضع في محلول . (2gm iodine makeup300) lugol and dil 1:9 before use)
- ضع القطاعات في ٤٪ فورماليهيد لمدة ٥ دقائق .
- اغمس في ماء مقطر .
- ضع القطاع في جيلي جليسرين .

النتيجة : اللون الازرق يدل علي الجيلكوجين فوسفوريليز (جلوكاجون غير متفرع) أما اللون البني فيدل علي الجليكوجين فوسفوريليز جلوكان متفرع

اكسى ريدكتيز Oxyreductases

وهى تشتمل على مجموعة كبيرة من الإنزيمات التى تقوم وتساعد فى أكسده مختلف المواد الخاضعة substrates وتعتبر الطاقة المنطلقة ضرورية وأساسية فى أيض الخلايا والأنسجة .

يمثل ذلك المعادلة التالية $AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$

AH_2: معطى الالكترونات أو المختزل — B: المستقبل

وتنقسم الأكسى ريدكتيز الى الأنواع التالية :

١ – الانزيمات المؤكسدة Oxidases والتى يكون فيها الاكسجين هو المستقبل كما فى المعادلة السابقة .

٢ – الدى هيدروجينيز Dehydrogenases والتى يكون فيها المستقبل مادة غير الاكسجين ولايمكن أن يكون الاكسجين .

طريقة الكشف عن الانزيم

Oxidative Coupling Method

بريستون Burstone,1959

تستخدم قطاعات طازجة من الكريوستات

الوسط الحاضن :

– بارافينيل – بارا – فينلين ديامين p-phenyl-p-phenylenediamine (p-amino diphenyl amine)

– نفثوك AS-LG

(1hydrox-2-naphthoc acid) ١٠ – ١٥ مجم

(naphthol AS-LG) ١٠ –١٥ مجم

- ٠,٠٥ مولار فوسفات أو ترس Hcl منظم pH.7.2-7.4 ٥٠ مل

0.05 Mphosphate or Tris Hcl buffer pld 7.2-7.4 or : polution of 1.48 gm Soduim phosphte (N_2PO_4 12 H_2O) and 0.43 gm Potassium phosphate (KH_2PO_4) in 11 0.7 Soduim chloride (adjust pH to 7.2) .

التحضين : يتم تحضين القطاعات لمدة ٦٠-١٢٠ دقيقة عند ٣٧°م

بعد التحضين :

- تنتقل القطاعات الي ١٪ نترات الكوبالت cobalt nitrate لمدة دقيقة .
- اغسل في ماء مقطر .
- طمر القطاعات في جيلي الجليسرين أو محلول أباثي .

النتيجـــة :

يستدل علي نشاط الانزيم باللون الازرق البني أو البنى الاسود .

الإنزيمات المؤكسدة اكسيديزس

Oxidases

وهى تشتمل على :

- سيتوكروم أكسيديز Cytochrome oxidase
- فيرو سيتوكروم Ferro Cytochrome
- أكسجين اكسيدو ريدكتير Oxygen oxido reductare

وتقوم هذه الانزيمات بدور العامل المساعد فى التفاعل التالى :

$$4 \text{ Ferro cytochrome C} + O_2 \longrightarrow 4 \text{ Ferro cytochrome C} + 2H_2O$$

والسيتوكروم عبارة عن هيموبروتين يقوم بنقل الالكترونات فى السلسة النفسية .

وتنقسم السيتوكرومات الى ثلاثة مجاميع اساسية هي : a,b,c وتحتوى كل مجموعة على عدد وآخر من السيوكرومات هي : a_1, a_2 , a_3 والخلايا الحيوانية بها . a , a_3 , b, b_5 , c , c_1 والسيتوكروم a, a_3 , b , C, C_1 متواجد فى الغشاء الداخلى للميتوكندريا ويعرف السيتوكروم a , a_3 باسم اسيوكروم اكسيديز oyto chrome oxrdase

ويتواجد b_5 فى الغشاء الخارجي للميتوكندريا أو أغشية الشبكة الاندوبلازمية .

ويعتبر السيتوكروم أكسيديز الانزيم المميز لاغشية الميتوكندريا التى يرتبط بها ارتباطا وثيقا . ويتواجد الانزيم بكثرة فى الخلايا التى تحتوى على كمية كبيرة من الميتوكندريا حيث توجد بها العديد من الأنشطة الأيضيه . ولهذا فإن هذا الأنزيم يعتبر مقياسا حقيقيا لعمليات الإيض التاكسدى فى الخلايا وذلك واضح بصورة خاصة فى العضلات القلبية والانابيب الكلوية

ويحدث تثبيط السيتوكروم اكسيديز بواسطة السيافيد cyanide والأزيد azide

انزيمات ديهيدروجينيز (النازعة للهيدروجين)

Dehydrogenases

تعمل هذه الإنزيمات كإنزيمات مؤكسدة وذلك عن طريق نقل أو نزع الهيدروجين H^+ (أكسدة مختزلة oxidoreduction) وذلك مثل : سكسينيك ديهيدروجنيز Ssuccinic dehy-drogenase

سكسينيك ديهيدروجنيز (SDH)

Succinic Dehydrogenase

يقوم هذا الانزيم بدور العامل المساعد في التفاعل التالي :

$$\text{Succinate + acceptor} \rightleftharpoons \text{fumerate + reduced acceptor}$$

وينتمي هذا الانزيم الي مايسمي نظام انزيمات السكسينيك المؤكسد وهي وحدات

مفردة من مجموعة انزيمات منتظمة فى سلسلة داخل الميتوكندريا ، وبعد السكسينيك ديهيدروجنيز أول هذه السلسلة والأخير هو السيتوكروم أكسيديز . وانزيم (SDH) عبارة عن انزيم فلافو بروتين Flavoprotein ، ويرتبط الفلافين بالبروتين وكل مجموعة فلاقية بها ٤ ذرات من الحديد ، كما يحتوي الإنزيم علي مجموعة "SH" التي يعتمد عليها نشاط الإنزيم .

ويعمل السكسينيك ديهيدروجنيز عند pH.7.6-8.5 ويشارك هذا الانزيم في دائرة كربس Krebs Cycle ويعطي نشاط هذا الإنزيم دلالة علي نشاط دورة كربس .

وهذا الانزيم عالى الحساسية بالنسبة للمثبتات ، ويتم تثبيط نشاطه بواسطة الجلوتار لديهيد ويعتبر التثبيت في الفورمالديهيد لمدة ٥-١٥ دقيقة أنسب المثبتات .

طريقة الكشف عن الإنزيم :

- تستخدم قطاعات كريوستات أوقطاعات مبينة في الفورمالين لمدة ٥-١٥ دقيقة .

طريقة ملح التترازوليوم (لوجد ١-١٩٦٥)

Tetrazolium Salt procedure (Logda,1965) .

محلول التحضين :	M phosphate or 0.2 m.Tris buffer	0.1
	pH.7.2 - 7.4	١٠ مل
- محلول نترازوليوم	∫ -0.4 ∫ nitro BT	0.1
	or tetranitro BT (Dissolve in 0.5 ml	١٠ مل
	add 9.5 ml dist. H_2O)	
- ٠.٠٥٪ سيانيد الصوديوم	0.05/ Na cyanide	٤ مل
	M, adjust pH vuth Hcl to 7.2).	0.01
- ٠.٤٧٪ كلوريد المغنسيوم		
	0.47/ anhydrous or 1/ Crystalline magnesium chloride (0.05 M, when Tris Hcl buffer is used 0.6 magnesium sulphae)	٤ مل

- ماء مقطر 				٨ مل

ويمكن اختزان هذا المحلول في ثلاجة عند ٤ °م .				٣٦ مل

مخزون محلول السكسينيك Stock Sol. of succint

١ مولار سكسينات الصوديوم سداسي الماء ٢٧٠ مجم/١ مل ماء مقطر

اضبط الـ pH عند ٧,٤ أو ٧,٢ ويخزن في ثلاجة عميقة التجميد .

- 1 M Succinate , disoduim salt hexahydrate- (270 m/l mol adjust H_2O) .
Adjust pH 7.2-7.4 - store in deep freeze.

التحضين ومابعد التحضين :

التحضين : محلول التحضين المائي :	٢ مل
او مولار سكسينيات	٠,١ - ٠,٢ مل
٠,٠٥ ٪ مماديون Memadeion	٢-٣ فقط
2methyl-1,4 naphtho quinoremeniphthore	
Vitamine K_3 dissolved in acetone	
أو	
فينازين ميثوسلفات	
phenazinemetho suphate (pH_5)	٠,١-٠,٣ مجم
Mix check pH 7.2 - 7.6	٢ مل

تحضين القطاعات :

من ٥-٤٥ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة في الظلام أو الضوء الأحمر .

وبعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن .

- اغمس في ماء مقطر .

- ضع القطاع في ٤٪ فورمالين لمدة ١٠ دقائق - ساعة .

- اغمس في ماء مقطر .

- يستخدم صبغ حلقي مثل الأحمر السريع .

- يغمر القطاع في جيلي جليسرين أو أباتي .

النتيجة :

يظهر نشاط الانزيم باللون الازرق أو الأزرق المحمر .

لاكـتك ديهـيدروجينز

LACTIC DEHYDROGENASE

المعروف ان نظام نقل الالكترونات لايحدث في عمليات تكسير الجلوكوز لاهوائيا ANAEROBIC GLYCOLYSIS وذلك بسبب غياب الاكسجين ، وعوضا عن ذلك يعمل نظام آخر لتوليد مادة DPN اللازمة في هذه العمليات باستخدام البيروفيت . وفي هذه الحالة يعمل انزيم لاكتك ديهيدروجنيز كوسيط في هذا التفاعل :

وتلجأ الخلايا العضلية التي تحتاج لمزيد من الاكسجين اثناء نشاطها الي حمض البيروفيك الذي يقوم بأكسدة مادة NADH2 CO-ENZYMEI-REDUCED وينتج حمض اللبنيك ومادة DPN .

ويأخذ حمض اللبنيك طريقه الي الكبد - عن طريق الدم - حيث يتم الاستفادة به في بناء جزئيات الجلوكوز .

وتجدر الاشارة الي أن انزيم لاكتك ديهيدروجنيز من الانزيمات الذائبة.

ويتكون هذا الانزيم من طرازين من سلاسل عديد الببتيديز ويرمز لهما بالرمزين A.B، ويرجعان الي اثنين من الجينات ويتواجد هذا الانزيم علي صورة خمسة «متشابهات

انزيمية» ISOZYMES ، يتكون كل «متشابه انزيم» من اربع وحدات من سلاسل عديد الببتيد – فالمشابه الانزيمي السائد في العضلات الهيلكية يرمز له بالرمز A_4 حيث يتكون من أربع سلاسل متشابهة طراز A ، بينما يشارك في العضلات القبلية B_4 والمتشابهات الانزيمية الثلاث الاخري ، رموزها .A3B, A2B2, AB3

ومن الجدير بالذكر ان لكل نسيج متشابهاً انزيمياً خاصاً به يتواجد بمعدل عال في الدم في حالات الخلل التي تصيب النسيج ، مما يجعل لتحليل الفصل كالكهربائي ELECTRO-PHORESIS للمصل SERUM أهمية في تشخيص العضو المصاب بالضرر .

وعادة مايرتفع معدل انزيم لاكتك ديهيدروجنيز في الخلايا السرطانية . ومن المعروف ان هذه الخلايا تستهلك كمية كبيرة من الجلوكوز وتحولها في وجود الاوكسجين الي لاكتيك مع انتاج كمية محدودة من الطاقة .

طريقة الكشف عن الانزيم :

المحلول الاساسي (محلول التخزين) STOCK SOLUTION

٠,٢ مولار منظم ترس 0,2M TRIS-HCL BUFFER	٦٥ سم^3
كلوريد ماغنسيوم $MGCL_2$-6 H_2O	٢٠٠ ملليجرام
ازيد الصوديوم SODIUM AZIDE (NAN_3)	١٥ ملليجرام
ماء WATER	٨٥ سم^3

ثم أضف :

بولي فينيلي الكحول (PVA) POLYVINY ALCOHOL (M.W-30.00O)	٤٠ جم
او بولى فينيل بروليدون (PVP) POLY VINYL PYROLLIDON	١٥ جم

ويلاحظ ان مادة «ازيد الصوديوم» توقف التنفس الهوائي للخلايا كما ان اضافة مادة PVP أو مادة PVA اللتان تتميزان بانهما غرويتان تلزم وجود احداهما لكون الانزيم ذائبا . ويراعي وضع مقلب مغناطيسي Magnetic Stirrer في قاع وعاء تحضير المحلول لضمان بقاء المادة الغروية طافية علي السطح حتي تذوب دون رسوبها علي القاع مما يؤدي الي صعوبة ذوبانها .

محلول التحضين : INCUBATION MEDEUM

يحضر محلول التحضين قبل الاستعمال مباشرة ، وهو يتكون من :

المحلول الاساسي : ٥ سم٣

لاكتات الصوديوم SODIUM DL-LACTATE (NAC3 H5O3) 5X10^{-4} MOLE

٥٦ ميلليجرام

– نيتروبلوتترازوليم NITRO - BLUE TETRAZOLIUM ١ ميلليجرام

نيكوتين اميد ادنين داينيوكليوتيد NICCTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE ١ ميلليجرام

خطـوات العمـل :

١- يتم الحصول علي قطاعات ثلجية (مجمدة) سمكها ٤-١٠ ميكرونات من عينة طازجة ويثبت القطاعات لمدة (٥-١٠) دقائق في اسيتون بارد (٤م) أو فورمالين متعادل بمنظم الفوسفات .

٢- حمل القطاعات علي اغطية شرائح أو شرائح زجاجية .

٣- اغسل القطاعات بالماء لمدة حوالي ١٥ ثانية مع الرج .

٤- احضر طبق بتري وضع في قاعه ورقة ترشيح مبللة بالماء ثم ضع اغطية الشرائح او الشرائح (والقطاعات ملصقة علي سطحها العلوي) علي ورقة الترشيح المبللة +

ضع كل قطاع من محلول التحضين الطازج . غط طبق بترى ثم ضعه في حضانه عند درجة ٣٧°م .

٥- اختبر تكون راسب ملون داخل الخلايا ، وذلك كل عشر دقائق مع ملاحظة ألا يزيد وقت التحضين عن ساعة واحدة .

٦- امسك الشرائح أو الأغطية بملقاط مع تصفية قطرة محلول التحضين .

٧- ضع الشرائح او الاغطية وعليها القطاعات في فورمالين متعادل بمنظم الفوسفات لمدة عشر دقائق في درجة حرارة الغرفة -هذه الخطوة تضمن ايقاف التفاعل الهستوكيميائي مع مزيد من التثبيت لنسيج القطاع .

٨- اغسل الشرائح او الاغطية في الماء ، انزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق وغط بأحد الأصماغ .

النتــــائج :

يتكون راسب فورمازان FORMAZAN احمر او ازرق اللون في اماكن نشاطات الانزيم

ميكانيكية طريقة الكشف :

يقوم انزيم NADH2- DIAPHORASE بأكسدة $NADH_2$ الى NAD ويسلم الهيدروجين الي مادة TETRAZOLE التي تترسب عندئذ في صورة مادة فورمازان ملونة .

الفصـــل الثامن

8

هستوكيميائية المواد غير العضوية

Histochemistry of Inorganic Substances

الفصـــل الثامن

هستوكيميائية المواد غير العضوية

Histochemistry of Inorganic Substances

مازال الكشف عن المركبات والمكونات غير العضوية في الخلايا والأنسجة باستخدام الصبغات والتفاعلات الكيمائية - لكي يمكن رؤيتها بالميكرسكوب - أمرا محدودا وذلك نظرا لوجودها بتركيزات منخفضة كما أن البعض منها يوجد بصورة مستقرة متحدة مع مركبات أخـــري .

علي أنه توجد بعض الطرق الموثوق بها للكشـــف هســتوكيمائيا عن بعض الأنيونات anions مثل الكربونات carbonates والفوسفات phosphates (PO_4) والكلـور Cloride CL^- ، وكذلك بعض الكتيونات cations مثل الكالسيوم calcium (Ca^{++}) والحديد iron (Fe^{++}) والنحاس Copper (Cu^{++}) ، والزنك zinc (Zn^{++}) .

ويمكن الكشف عن العناصر المعدنية بالطرق الهستوكيمائية التي تستخدم في علاج بعض الامراض في الانسان ، ومن الطبيعي أن هذه المكونات يكشف عنها بالطرق الكيمائية والفيزيائية .

الفوسفات Phosphates

الكشف عن الفوسفات phosphates

تستخدم طريقة المولبيدات molybdates للكشف عن أيونات الفوسفات العضوية وغير العضوية ، والفوسفات غير العضوية تترسب وتتفاعل مع المولبيدات بصورة سريعة بينما تحتاج الفوسفات العضوية إلى تميؤها كما هو الحال في الشق الفوسفاتي في الحامض

النووي ح ن د DNA .

الطريقــة :

طريقة تشنخ Cheng عام ١٩٥٦ .

- تثبت قطع النسيج في ٥٠٪ فورمالين متعادل .

- يتم إعداد قطاعات مجمدة سمكها (٢-٥ ميكرون) ، على أنه يمكن استخدام قطاعات شمعية أيضا .

- اغمس القطاعات في محلول خلات منظم متعادل neutral acetate buffer أسه الهيدروجيني ٤,٠٠ تفصل شوبه pH.4

٣- انقل القطاعات الي محلول الموليبدات حيث يتم التحضين لمدة (١٠) دقائق عند درجة ٣٧°م في ١,٠-٥,٠٪ محلول موليبدات الأمونيوم ammonium molybdate في ٠,٠٠٥ محلول مولاري (N) حامض الكبرتيك . مثبت عند الأس الهيدروجيني pH4.0 وذلك بحجم متساو من الخلات المتعادل neutral acetate buffer ويتم تحضير هذا المحلول قبل الاستعمال مباشرة .

٤- تنقل القطاعات الي الشرائح وتصفي ثم تغطي بقطرات من ٢٪ محلول حامض الاسكوربيك المثبت عند الاس الهيدروجيني $p^{H}4$ وذلك باضافة حجم متساو من محلول الخلات المتعادل .

- تغطي القطاعات بأغطية زجاجية نظيفة وتفحص .

النتيجة :

يدل ظهور الراسب الأزرق علي تواجد الفوسفات غير العضوي .

الكالســيوم Calcuim

يتواجد الكالسيوم في الأنسجة الحيوانية علي صور متباينة ، ويمثل العظم أكبر

محتوي للكالسيوم ويمكن أن ينتقل منه بسهولة . كما يوجد جزيء الكالسيوم في مصل الدم ، كما يوجد متأيناً في السوائل بين الخلوية . ويوجد جزء كبير منه متحدا بالبروتين أو في حالة غروية غالبا مع الفوسفات . والخلايا لاتحتوي غالبا علي الكالسيوم في الحالة المتأينة (أيونات كالسيوم) ، ولايمكن الكشف عنه في السوائل الخلوية أو النسيجية . والذي يمكن الكشف عنه هو الترسيبات الملحية للكالسيوم Calcium deposits في الحالات الحقيقية والأماكن غير الطبيعية .

طريقة الإحلال المعدنى :

تعتمد هذه الطريقة علي الشق الأنيوني في ملح الكالسيوم ، وليست خاصة بأنيون الكالسيوم . والفوسفات والكربونات هي الأنيونات العامة التي تتحد في الترسيبات بالكالسيوم. والمعاملة بالمعدن ينتج عنها تحول ملح الكالسيوم الي المقابل : الملح المعدني الذي يمكن رؤيته بطريقة أو بأخري ، وتعتمد عملية التحول transformation علي المقابلة النسبية لذوبان أملاح الكالسيوم والمعدن .

وتستخدم الفضة silver كمعدن الإحلال ، وفي هذه الحالة تتفاعل القطاعات مع نترات الفضة حيث تترسب الفضة ثم تختزل وتشاهد علي أنها فضة معدنية .

وقد استخدم الكوبلت والرصاص والحديد والنحاس في عملية الإحلال . ويشاهد الكوبلت والرصاص علي هيئة كبريتيدات sulphides والحديد بالبروسيان الأزرق prussian blue ويوضح النحاس بالهيماتوكسلين .

طريقة ڤون كوسا von Kosse للكشف عن أملاح الكالسيوم :

١- تستخدم مثبتات كحولية عند الكشف عن أملاح الكالسيوم ويتم التثبيت لمدة ٢٤ ساعة في خليط من ٢٠ مل فورمالين + ٨٠ مل كحول إيثيلي مطلق absolute alcohol .

٢- انزع الماء بالكحول ، وبعد الترويق يتم الطمر في الشمع ، ثم تغمس القطاعات

منزوعة الشمع في ٥٠٪ كحول وماء .

٣- ضع القطاعات لمدة ١٥-٣٠ دقيقة في محلول ١٪ الي ٥٪ محلول نترات الفضة $AgNO_3$ في الظلام .

٤- اغسل في ماء مقطر .

٥- ضع القطاعات في ٥,٪ هيدروكينون hydroquinone أو حامض بيروجاليك pyrogallic acid لمدة ٢-٣ دقائق .

٦ - اغمس في ماء مقطر .

٧- يثبت في محلول ٢٪ الي ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم Soduim thiosulphate لمدة ٥ دقائق .

٨- انزع الماء ثم روق القطاعات وغط بكندا بلسم .

النتيجة :

يظهر الكالسيوم علي هيئة راسب ، أسود ، أو أسود بني .

طريقة رسل Russel عام ١٩٥٨:

١- اتبع الخطوتين الأولي والثانية كما سبق .

٢- اصبغ القطاعات لمدة دقيقة في ٢٪ أحمر أليزارين alizarin red المائي مع ضبط محلول الصبغة عند الأس الهيدروجيني ٤,١-٤,٣ بمحلول نوشادر مخفف علي أن يظل اللون الأيودي الداكن للمحلول ثابتًا .

٣ - انزع محلول الصبغة ثم جفف القطاعات بورق ترشيح .

٤ - اغمس في أسيتون ثم خليط أسيتون + زيلول (١:١) لمدة ١٠-٢٠ ثانية .

٥ - روق في الزيلول وغط بمحلول بلسم كندا .

النتيجة :

يصبغ الكالسيوم بلون برتقالي أحمر والأرضية باللون القرنفلي pink .

الحـــديد Iron

تنقسم المركبات التي يدخل الحديد في تكوينها الي قسمين رئيسين :

مركبات يكون فيها الحديد مرتبطا ارتباطا ضعيفا أو غير ثابت loose مع البروتين ويكون من السهل تخليصه بالمعاملة بحمض مخفف حيث يتفاعل مع أيون الحديديك ferric iron ، ومن أمثلة هذا القسم : هيموسيدرين " haemosiderin . أما القسم الآخر فيكون فيه الحديد مرتبطا قويا مع البروتين ، ويطلق عليه الحديد المستتر أو المقنع masked iron ولايمكن إطلاقه بالحمض المخفف . ويمكن لجزء من هذا الحديد المستتر أن يتفاعل عن طريق معاملة حادة ، ومن هذا القسم : الهيموجلوبين haemoglobin والفريتين ferritin، وهما من أهم أشكال الحديد المختزن . ويختزن الحديد الناتج عن تكسر الهيموجلبين – إذا لم يستخدم ثانية – علي هيئة الهيموسيدرين (هيدروكسيد الحديديك متعدد الأصل polymer) أو الفريقين (مركب حديد البروتين الحديدوز ferrous iron protein complex) .

وقد يتكون الهيموسيدرين والفريتين نتيجة الحديد الزائد الذي يترسب في الخلايا البرانشمية والخلايا الشبكية الطلائية الداخلية reticuls endothelial cells حيث يكون مرتبطا بالليسوسومات .

وتوجد الصبغات pigments موجبة الحديد في الخلايا الأكولة الكبيرة macrophages في الحويصلات التنفسية في حالة احتقان الرئتين المزمن .

وتظهر الصبغات التي تحتوي علي الحديد باللون البني . وفي بعض الحالات تكون موجبة تفاعل كاشف شف PAS - positive بما يدل علي أنها مواد كربوهيدراتية ، وهي لاتصبغ بصبغات الدهون . وقد تختزل الفضة النوشادرية ammonical silver . وتوجد الصبغيات موجبة الحديد في الغدد القمية apocrine glands .

وهناك ثلاث طرق معملية للكشف عن الحديد هستوكيميائيا هي :

١- أزرق بروشان Prussian blue

٢- أزرق ترنيول Turnbul blue

٣- كبريتيد الحديد Iron sulphide .

وتعتبر طريقة أزرق بروستان أفضل هذه الطرق .

طريقـــة بروشان الأزرق :

تتضمن هذه الطريقة تفاعل أيونات الحديديك مع سيانيد الحديدوز ferrocyanide في وسط حمضي لتكوين حديديك سيانيد الحديدوز ferric-ferrocyanide .

الطريقـــة :

١- يتم تثبيت الأنسجة في ١٠٪ مورفالين متعادل الأس الهيدروجيني pH.7 ، أما الوسط الحامضي فإنه يتسبب في فقدان ترسيبات الحديد .

٢- انزع الماء بالكحول واطمر في الشمع لإعداد القطاعات الشمعية .

٣- ضع القطاعات في خليط متساوي الحجم من ٢٪ محلول يتم تحضيره طازجا من ملح "بوتاسيوم سيانيد الحديدوز" K-ferrocyanide في ماء مقطر + ٢٪ (٠,٢٥ مولاري Hcl M لمدة ساعة عند درجة حرارة الحجرة).

٤- اغمس القطاعات في ماء مقطر .

٥- اصبغ باحدي صبغات الأنوية ، مثل "كارمين الليثوم الأحمر المتعادل" neutral red والسفرانين safranen .

٦- انزع الماء بالكحول وروق في الزيلول وغط ببلسم كندا .

النتيجـــة :

يدل ظهور الراسب الأزرق أو الأزرق المخضر علي وجود الحديد .

وبمعاملة القطاعات بفوق اكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide الذي يظهر أو

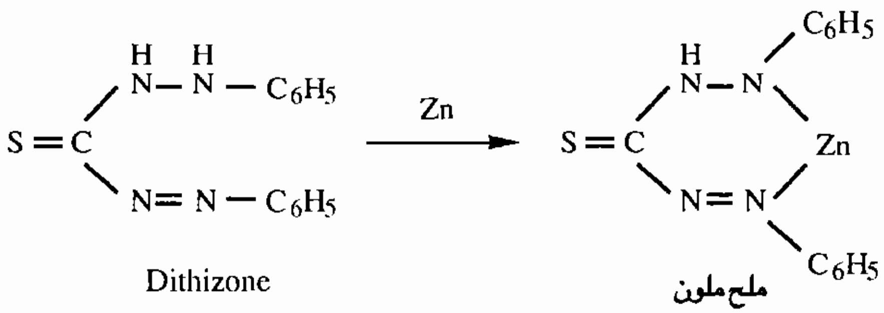
يحرر الحديد المستتر وذلك لتكسير الشق العضوي وينتج أكسيد الحديديك غير القابل للذوبان

الزنـــك Zinc

يعتبر الزنك من العناصر الرئيسية في التغذية الحيوانية . ويتسبب نقصه في حدوث أمراض معينة . كما أن هناك بعض انزيمات يعتمد نشاطها علي وجود هذا العنصر ، وذلك مثل إنزيم "كربونيك أنهيدريز" carbonic anhydrase الذي يحتوي علي كمية كبيرة من الزنك. كما أن الزنك يتحد مع الأنسولين ، وقد يوجد الزنك في خلايا جزر لانجرها نز islets oflangerhan وفي الخلايا فى الرئيسية المعدة principle cells وخلايا "بانت" Paneth cells في الأمعاء وطلائية غدة البروستاتا وخلايا الدم البيضاء والجهاز العصبي المركزي .

وتستخدم طريقة "الليثيزون Lithizone " في الكشف الهستوكيميائي عن الزنك .

والليثيزون diphenylthio carbazone يكون ملحا مركبا ملونا مع الفلزات العديدة الثقيلة مثل الرصاص والفضة والنحاس والزئبق والذهب . وملح الزنك ذو لون أحمر بنفسجي ويتكون في المحاليل المتعادلة والقلوية والحمضية . وهذا الملح قابل للذوبان في رابع كلوريد الكربون Carbon tetrachloride وبدون أن يتغير اللون .



طريقة ماجر وماك نارى وليونيتى ١٩٥٣ للكشف عن الزنك

Mager, Mc Nary and Lionetti, 1953.

الطـريقة :

١- يفضل استخدام القطاعات المجمدة المجففة في الكريوستات الي تثبيت في الكحول الايثلي لمدة ٦٠ دقيقة أو قطاعات مثبتة في الايثانول أو قطاعات شمعية .

٢- تصبغ القطاعات في أحد المحلولين الآتيين أو المحلولين معا :

أ- محلول ليثيزون أسيون وماء Lithizone acetone - water . تعوم القطاعات لمدة١٠ دقائق في محلول مخفف من الليثيزون (١,٠٪ ليثيزون في أسيتون مطلق مخفف بماء مقطر وخال من الزنك وذلك بنسبة ١: ٥ . ١ وذلك قبل الاستخدام مباشرة).

ب – مركب ليثيزون مكونا محلول منظما Lithizone complex forming buffer solution .

أذب ٥٥٠ جم ثيوكبريتات الصوديوم ($Na_2S_2O_2 . 5H_2O$) جم سيانيد البوتاسيوم KCN في ١٠٠ مل ماء مقطر .

اضبط الأس الهيدروجيني لهذا المحلول عند بحامض الخليك المثلج (الثلجي) glacial acetic acid ثم زد حجم المحلول الي ٢٠٠٠ مل بالماء المقطر .

*أفضل محلول ليثيزون في رابع كلوريد الكربون مستخدما قمع الفصل separating funnel للتخلص من آثار الزنك في المحلول المستخدم ، يتكون كمايلي :

*أضف ١٨ مل ماء مقطر الي ٢٤ مل ١و٪ ليثيزون في أسيتون مطلق واضبط الأس الهيدروجيني الي pH3.7 بواسطة محلول عياري N من حامض الخليك ثم أضف

٨ . ٥ مل من المحلول المركب المنظم + ٢, مل من ٢٠٪ طرطرات البوتاسيوم .

* عوم القطاعات في المحلول لمدة ١٠ دقائق .

* جفف القطاعات واغسلها بالكلوروفورم .

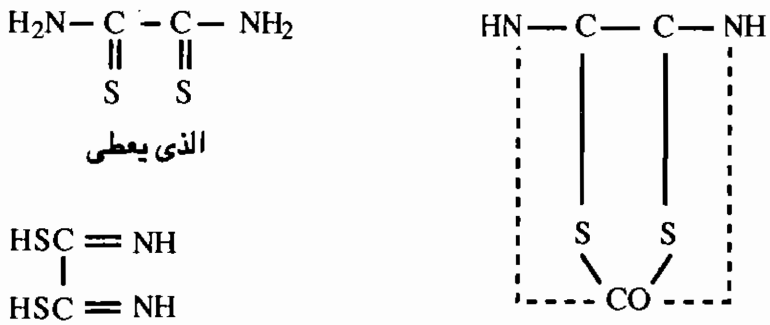
* بعد التجفيف في الهواء ، اغمس في الماء ثم اغمر القطاعات في محلول آباثي أو جيلي جليسرين

النتيجــــة :

يستدل علي وجود الزنك باللون الأحمر أو الأحمر البنفسجي

النحــــاس Cupper

يوجد الزنك في كل أنسجة جسم الانسان ولكن بكميات قليلة جدا مما يجعل من الصعب الكشف عنه هستوكيمائيا . والمعروف أنه في الانسان البالغ يحتوي كل جرام من وزن الجسم علي ٧-٨ ميكروجرامات من النحاس . ولكن هذا العنصر يوجد في الحيوانات البدائية بكميات تسمح بالكشف عنه هستوكيمائيا . ويوجد النحاس متحدا غالبا مع البروتين، ويستخدم حامض ربيانيك Rubeanic acid في الكشف عن النحاس حيث يستخدم محلول كحولي لحمض الربيانيك . ويتكون راسب أخضر قاتم مع أملاح النحاس مماثل لمعادن النيكل والكوبلت ويكون الملح المتكون كمايلي :



ملح مركب

الخطوات المفضلة للكشف عن النحاس :

١- يثبت النسيج في الفورمالين .

٢- انزع الماء وأعد قطاعات شمعية .

٣- احفظ القطاعات لمدة ١٢ ساعة عند درجة ٣٧°م في إناء محكم يحتوي على المحلول الآتى :

٥ مل حامض الربيانيك + ١,٪ حامض ربيانيك في إيثانول مطلق + ١٠٠ مل ١٠٪ محلول مائي من خلات الصوديوم Sodium acetate .

٤- اغسل مرتين في ٧٠٪ كحول إيثانول لمدة ٣٠ دقيقة

٥- اغسل في ايثانول مطلق لبضع ساعات .

٦- روق في الزيلول ثم اطمر فى بلسم كندا .

النتيجـــة :

يظهر النحاس باللون الأحمر القاتم

9

الفصـــل التاسع

الصبغـــــيات

Pigments

الفصـــل التاسع

الصبغـــــيات

Pigments

الميلانــين : Melanin

يتميز الميلانين باللون البني الأسود ، وهو يتكون من مركب معقد من المواد المتجمعة والمتحدة بالبروتين ويتعلق الميلانين بالتيروسين tyrosine أو المركبات التي تحتوي علي التيروسين . ويتواجد الميلانين بصفة خاصة في أدمة الجلد epidermis والشعر وحويصلات الشعر hair Rollides وخلايا قزحية العين iris والشبكية retina وبعض الخلايا العصبية وحاملات الصبغيات في الأم الحنون في المخ والجسم الهدبي .

ولاينوب الميلانين في المحاليل العضوية أو الأحماض والقواعد الضعيفة ولكنه ينوب في القواعد القوية . ويمكن تبييض الميلانين بالمواد المؤكسدة مثل ١٠٪ بيرأكسيد الهيدروجين" hydrogen peroxide خلال يوم أو يومين ، وكذلك برمنجنات البوتاسيوم الحمضي acid Potassium Permanganate

والميلانين محب للفضة argentophilic ويختزل نترات الفضة في الوسطين الحمضي والمتعادل وكذلك القلوي . ويصبغ الميلانين باللون الأخضر مع محلول " أزرق النيلي"Nile bule في حامض الكبريتيك واللون الأزرق الداكن في حالة الليبوفكسين lipofuchsin ويمكن استخلاص الليبوفكسين بواسطة الأسيتون ، ويبقي اللون الأخضر المميز للميلانين .

ويكون الميلانين مركبات مع أيونات الحديدوز والتي يمكن الكشف عنها بواسطة سيانيد حديديك البوتاسيوم K. ferricyanide .

ويشبه الميلانين الليبوفكسين في أنه يعطي تفاعلا موجبا مع محلول" شمورل"

Schmorl وهو يختزل سيانيد الحديدوز ويكون الأزرق البروسي Prussian blue في وجـود أيونات الحديديك .

ويعطي الميلانين تفاعلا سلبيا مع الحديد ولايقبل الصباغة بصبغات الدهون أو تفاعل شف PAS .

طـريقة الكشـف عن الميلانـــين :

التبييـض Bleaching

– تعامل القطاعات ، إما في المحلول (أ) : ١٠٪ ثنائي أكسيد الهيدروجين H_2O_6 لمدة يوم أو يومين ، أو المحلول (ب) : برمنجنات البوتاسيوم الحمضي (٣,٪ برمجنات البوتاسيوم + ٣,٪ حامض الكبريتيك) لمدة ١٠ دقائق الي بضع ساعات ، وبعدها تغسل بالماء المقطر ثم ١٪ حامض الأكساليك حتي يضيع اللون البني .

– تعامل القطاعات بحامض الفورميك Formic acid لبضع ساعات .

النتيجـة : اختفاء لون الميلانين .

الطريقة الثانية : (استخدام أيونات الحديدوز)

– ينزع الشمع من القطاعات ويتم توصيلها للماء .

– توضع في ٢.٥٪ محلول كبريتات الحديدوز Ferrous sulphate .

– تغسل في ٤ تغيرات من الماء المقطر (٥ دقائق كل مرة) .

– تصبغ القطاعات في محلول ١٪ حديديك سيانور البوتاسيوم في ١٪ حامض الخليك لمدة ٣٠ دقيقة .

– يصبغ صباغة خلفية Counter stain مثل صبغ " فان جيسون " van Gieson .

- ينزع الماء ويتم الترويق كالمعتاد ويتم تغطيتها ببلسم كندا .

النتيجة : يأخذ الميلانين اللون الأخضر الداكن .

الطريقة الثالثة : طريقة "شميرول" Schmerol

١- ينزع الشمع من القطاعات ويتم توصيلها للماء .

٢- توضع القطاعات في محلول سيانور الحديديك لمدة ٥ دقائق ، وهو يتكون من : ٣ أجزاء من ١٪ كلوريد الحديديك أو كبريتات الحديديك + جزء من محلول طازج التحضير من ١٪ سيانور حديديك البوتاسيوم K. ferricyanide ويمزج قبل الاستعمال .

- تغسل القطاعات في ماء الصنبور الحار لبضع دقائق .

- تصبغ صباغة خلفية للأنوية (١٪ أحمر المتعادل neutral red لمدة ٣ دقائق .

- ينزع الماء ويتم الترويق والتغطية بواسطة بلسم كندا .

النتيجة : تصبغ حبيبات الميلانين باللون الأزرق .

الهيموسيدرين Hemosiderin

صبغ يحتوي علي الحديد وهو غير فلورسيني ويتكون من الهيموجلوبين أو الحديد الغروي في التجويف البطني ، ويتجمع الهيموسيدرين في الأغشية التي تحيط بالعضيات الخلوية . وتعطي المواد المتحدة في الهيموسيدرين تفاعلا موجبا مع محلول شف PAS ، كما يعطي الحديد تفاعلا موجبا مع كاشفات الحديد .

البيلوروبين Bilurubin

المعروف أن البيلوروبين يتحول إلي "بيلوفردين" biloverdin بواسطة عمليات الأكسدة .

ويذوب هذا الصبغ بدرجات متفاوتة في الكحول والفورمالين والكلوروفورم .

وتستخدم القطاعات غير المثبتة في عمليات الكشف الهستوكيماوي عنه . ويستخدم حامض النيتريك والأيودين في عمليات الأكسدة . وقد استخدم أيضا خليط من حامض النيتريك والهيدروكلوريك و"الداي كرومات dichromate " لتحويل البيلوروبين الي بيلوفردين .

ويتفاعل البيلوروبين مع أملاح الدياز ويتم في القطاعات المجمدة الطازجة ، وليس في القطاعات الشمعية . كما يصبغ البيلوروبين بصبغ " أزرق الميثيلين methylene blue "

طريقــة جيمـلن Gmelin method

- يزال الشمع من القطاعات .
- تغمر القطاعات في حمض النيتريك المركز والإيثانول المطلق بكمية متساوية .
- يوضع غطاء علي القطاع وينزع الماء الزائد من الخليط .
- يتم الفحص بعد لحام القطاع .

النتيجة : يتحول البيلوروبين من الأحمر البنفسجي الي الأخضر .

طريقــة جـلنر Glenner 1957

البيلوروبن – الهيموسيدرين – الليبوفوسين

Bilurubin - hemssiderin - lepofuscin

- توضع قطاعات مجمدة غير مثبتة علي شرائح جافة ويضاف لها ٢٪ بوتاسيوم فيروسيانيد K . ferrocyanide لمدة ٥ دقائق .
- توضع القطاعات في خليط مكون من أجزاء متساوية من ٢٪ بوتاسيوم فيروسيانيد + ٥٪ حامض الخليك لمدة ٢٠ دقيقة .
- تغسل بماء الصنبور ثم توضع لمدة ١٥ دقيقة في المحلول التالي : ٢٥ مل ٢٪

بيكرومات البوتاسيوم + ٢٥مل محلول منظم أسه الهيدروجيني pH2.2

– يصبغ القطاعات فى أزرق الزيت "oil red 0.0" لمدة ٢٠ دقيقة .

– تغسل بالماء وتغطي بمحلول آباثي .

النتيجة : البيلوروبين ←—— أخضر قاتم .

الهيموسيدرين ←—— أزرق داكن .

الليبوفوسين ←—— أحمر برتقالى .

الليبوفوسين Lipofuscin

هي مواد معقدة غير متجانسة تترسب في العضويات الخلوية مثل الهيموسيدرين والفيريتين وتصحبها أيضا بعض الإنزيمات مثل الفوسفاتيز الحامضي والاستيريز والكاتبسين بما يشير الي انها تتواجد في الليسوسومات وقد وجدت أنها تتكون داخل الليسوسومات ثم تتركها بعد ذلك الي الخارج متحولة الي حبيبات صبغية .

وهذا الصبغ بني اللون سالب بالنسبة للحديد ، قابل للاتحاد بالصبغات القلوية وموجب بالنسبة لكاشف "شف" PAS كما أنها تقاوم عملية نزع الماء بالكحول والطمر في الشمع ، وتصبغ بصبغات الدهون ، كما أنها تختزل أملاح الفضة .

REFERENCES

1 - Bancroft, J.D. (1967) "An introductioon to histochemical techniques", Butter Worths, London.

2 - Barka, T. and Anderson, P. (1963) . "Histochemistry, Practice and Bibliography", Harper & Row Pub N.Y.

3 - Chagen, J. Bitensky, L. and Butcher, R. (1973). " Practical Histochemistry " John Wiley & Sons , London and N.Y .

4 - Change, L. (1979). "A Color Atlas and Manual for Applied Histochemistry" . Charles and Thomas , Illinois, U.S.A.

5 - Davenport, H.A. (1963) "Histological and histochemical techniques" W.B. Saunders Comp, Philedelplia, U.S.A.

6 - El-Asser, A.M. and Hassanein, S.H. (1975) . Acta Biol Acad Sci . Hung., *28* :105 (Quoted form Moussa *et al.*,) .

7 - El-Asser, A.A and Mokhtar, N.M. (1982) . J. Egypt . Nat. Cancer Instit., *4* :217 (Quoted from Moussa *et al.*,).

8 - El-Banhawy, M.A., (1964). Histschemical effects of X-ray irradiation on the activity of succinic dehydrogenase in the hepatsma cells as compared to the normal liver cells . Proc-Egypt . Acad Sci, *18* : 76-83 .

9 - El-Banhawy , M.A; Al-Zahaby, A-S and Shalaby, A. (1986). Histochemical changes in the nucleic acid (DNA) and lipid contents of the ileal mucosal cells of fishes as a result of organs phosphorus intoxication. Bull Fac. Sci. Zagazigi Univ .

10 - El-Banhawy, M.A. and El-Ganzuri, M.A. (1983) . Nucleic acids response to treatment with insecticides . Ain Shams Sci. Bull. 24 .

11 - El-Banhawy, M.A, and Khattab , F.I. (1991). "The Cell. Structure and Function" Dar El-Maaref, Egypt.

12 - El-Banhawy , M.A. and Riad , N.H. (1982) . Some observations on the localization of glycogen in the mammalian liver cells. Proc. Zool Soc. U.A.R. *3* : 41- 62 .

13 - El-Banhawy, M.A. and Riad , N.H. (1972) . The influence o development, aging and fasting on the histochemical localization of proteins in the liver cells of guinea pigs. Proc Zool . Soc (U.A.R) *6* : 257 - 260

14 - El- Barhawy, M.A; Mohallel, M.E; Hassan, F.M. Mekkawy, H. A. and Tawfik, M.N (1992) Histochemical effects of the narcotic drug (Butarphenol tartarate) on some nzymes correlated with carbohydrate metabolism. in the rat liver tissues . Egypt. J. Soc Toxicol., *6* :36-42 .

15 - El-Banhawy, M.A.; Shahin, M.A. and El-Shennawy, W.W., (1993). Lipid localization in the vertebrate adrenal glands with special reference to their role in the process of steroids genesis . J. Egypt Ger. Soc Zool., o c: 17-28 .

16 - El-Ganzuri, M.,A. (1975) : "Cytological and histochemical studies on the mammalian nerve and liver cells" Ph.D. Thesis, Faculty of Science Ain Shams University .

17 - Faukner, W. and Willington, E. (1970) "Manual of clinical laboratory procedures" Rober Comp Ohis, U.S.A .

18 - Grossran,Z and Scheibler, H. (1979) . "Enzyme histochemistry.A Lab. Manual". Betz Berlin .

19 - Gurr, G.(1969) "Biological staining methods "Scarle Sci Service High Wycombe, London .

20 - Khattab - F.I. El-Banhawy M; A. and El-Ganzuri M.A. (1980)

Pathological effects of insecticides on acit Phosphatose partides in verve cells of rat . Ain Shams Sci. Bull., *22* : 169 - 179 .

21 - Klerman, J. (1981) . "Histological and histochemical methods : theory and Practice" pergamon press, N.Y .

22 - Mc Manus, J. and Mowry, R., (1960) "Staining methods : Histological and histochemical . Harper and Row Comp. N.Y .

23 - Moussa, T-; Al - Asser, A. and El-Banhawy, M.A ( ) "Histochemistry ".

24 - Pearse, E (1977). Theory and Practice of histochemistry". Churchil, Livingstone London.

25 - Sheehan, D. and Harpchalk, B. (1973) : "Theory and Practice of histotechnology" . The Mosby comp. st. Louis, U.S.A.

26 - Stoward, P. and Polck, J. (1973)" Fixction in histochemisty". Chapman and Hall London .

27 - Stoward , P. A Polck, J (1981) " Histochemustry the Widening horizon of its application in the Biochemical Sciences". The willy and of Sons:N.Y.

28 - Summer, A. and summer , B. (1961) "Alaboratory manual of microtechnique and histochemistry". Blackwell , Sci. Pub., Oxford .

اللوحـــــة الأولي
المواد الكربوهيدراتية

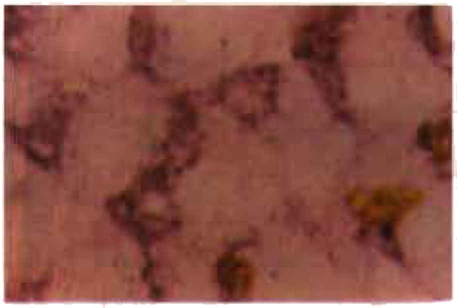
توزيع الجليكوجين فى الخلايا الكبدية العادية

صورة مكبرة توضح ظاهرة « هروب الجليكوجين »

الجليكوجين فى خلايا كبدية أنويتها مصبوغة بالهيماتوكسلين

تناقص الجليكوجين فى بعض الحالات الفسيولوجية

مرحلة تصويم أو تجويع متأخرة تبين إنخفاض معدل الجليكوجين فى المنطقة المحيطة بالوعاء المركزى



صورة مكبرة للحالة السابقة

اللوحـــــة الثانية

صورة للمواد الكربوهيدراتية في الانسجة الكلوية

صورة مكبرة لجزء من الشكل السابق

المواد الكربوهيدراتية (المخاطية) فى أنسجة المعدة

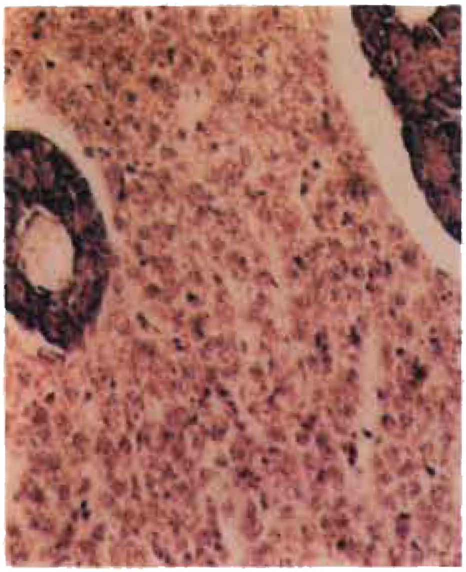
العضلات القلبية ومحتوياتها الكربوهيدراتية

المواد المخاطية فى الخلايا المبطنة للأمعاء

حامض الأسكوربيك فى أنسجة الغدة الكظرية

اللوحـــــة الثالثة

الكربوهيدراتات (المخاطيات) فى الأنسجة المعدية



الكربوهيدراتات فى الكبد والبنكرياس فى الأسماك

حبيبات حامض دى أكسى ريبو نيوكليك فى
الخلايا الكبدية

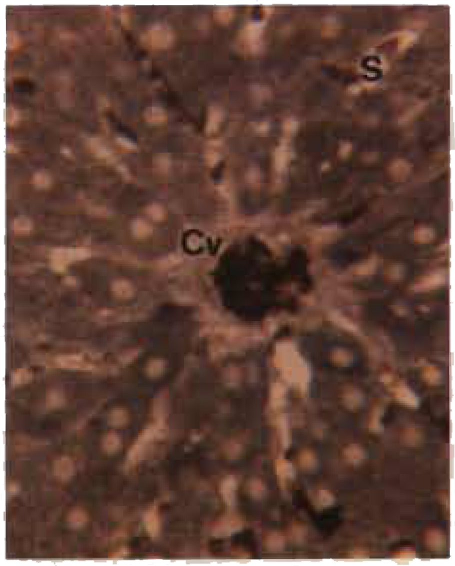
المواد الكربوهيدراتية فى خلايا طلائية فى القناة
الهضمية

اللوحـــــة الرابعة

المواد الليبيدية (الدهنية)

الدهون فى خلايا كبدية عادية

الانسجة الكلوية ومحتوياتها الدهنية



تناقص الدهون فى كبد حيوان جائع

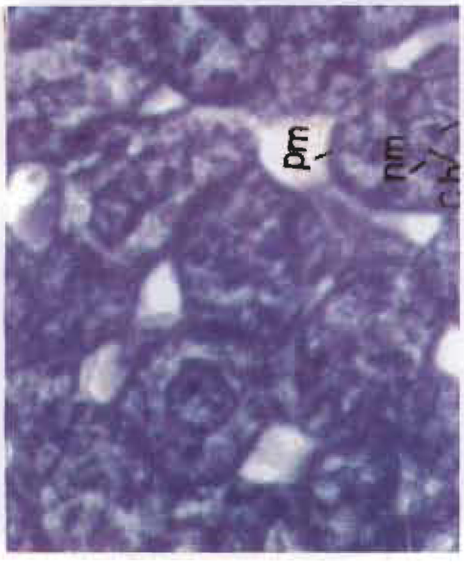
المحتويات الدهنية فى أنسجة الغدة الكظرية

اللوحـــــة الخامسة
المحتويات البروتينية

البروتينات فى أنسجة الكلية

خلية عصبة مكبرة بها المواد البروتينية

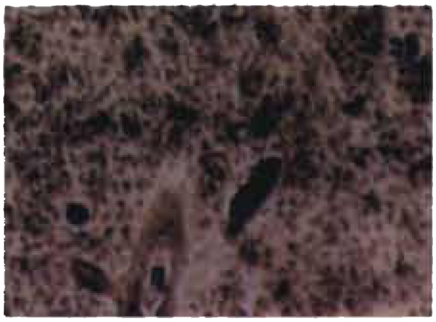
البروتينات فى خلايا الامعاء



البروتينات فى خلايا كبدية

اللوحـــــة السادسة

الإنزيمـــــــات



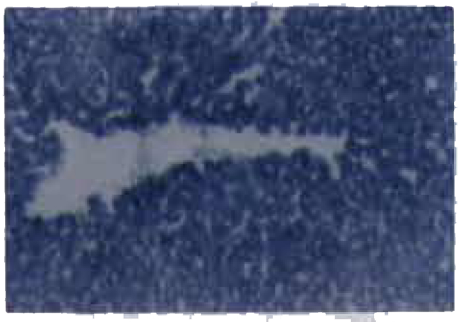
الفوسفاتير القلوى فى الأنسجة الكبدية

توزيع الفوسفاتير الحمض فى خلايا الكبد

الأدينوزين ثلاثى الفوسفات فى الأنسجة المعدية

لاكتيك ديهيدروجينيز فى الأمعاء

سكسينيك ديهيدروجينيز فى الكبد



الجلوكوز - ٦ - فوسفات فى أنسجة الكبد