الفصل العاشر

التحضيرات الهستوكيماوية

The Histochemical preparations

تعتبر كيمياء الأنسجة Histochemistry من العلوم الحديثة، فحتى عام ١٩٥٠ لم تكن هناك دوريات علمية مخصصة لكيمياء الأنسجة بينما نجد الآن أكثر من خمس عشرة دورية عالمية تعالج هذا العلم.

ويهدف علم كيمياء الأنسجة إلى الكشف عن المكونات الكيمائية المختلفة فى الخلايا والأنسجة وتحديد مواقعها، وكذلك كمياتها وفهم العلاقات فيما بينها من ناحية وبينها وبين طبيعة النشاط الوظيفى للنسيج من ناحية أخرى.

وتعطى دراسة كيمياء الأنسجة فكرة واضحة عن النشاط البيولوچى للخلايا والأنسجة، وعلى ذلك فأن هذه الدراسة تتكامل مع علوم الكيمياء الحيوية ووظائف الاعضاء والانسجة وغيرها من العلوم المتقاربة.

وقد أمكن بدراسة كيمياء الأنسجة فى الحيوانات، التوصل إلى فروق هامة فى طبيعة النشاط البيولوچى لعضو ما فى المجموعات المختلفة من الحيوانات أضافت الكثير إلى علم الانسجة المقارن.

كما أفاد كيمياء الأنسجة بعض العلوم الأخرى بما له من دور فى توضيح التغيرات التى تحدث فى الخلايا والأنسجة الجسمية نتيجة التعرض لبعض المؤثرات البيئية المختلفة مثل الإشاعات أو الكيماويات الضارة وبعض الحالات المرضية التى تصيب الجسم مما جعل كيمياء الأنسجة تهم أيضا المشتغلين بالدراسات البيئية وعلوم الأمراض.

وقد كانت البدايات الأولى لهذا العلم على يد العالم راسبيل F. V. Raspail (عام ١٨٠٠) الذى يعتبر من أوائل الذين طرقوا هذا المجال فى ذلك الوقت. ثم تقدمت الدراسات حثيثا بعد ذلك، وقد كان بيل Beale أول من كشف عن الانزيمات بالطرق الهستوكيماوية عام ١٨٦١. وقد شهد الربع الأول من القرن العشرين تقدما ملموسا فى هذه الدراسة. وفى عام ١٩٣٦ أصدر ليسون Lison كتابا فى هذا المجال. وفى عام ١٩٥٢ أصدر بورن Bourne كتابا آخر ثم أصدر جليك Glick عام ١٩٥٣ مؤلفا عن الطرق المتبعة فى كيمياء الأنسجة. ويوجد الآن عدد لا بأس به من الكتب المخصصة لكيمياء الأنسجة، أشهرها كتب بيرس Pearse، باركا وأندرسون Barka and Anderson، وجاب Gabe. وقد تعددت وتنوعت طرق الكشف الهستوكيمائى فى السنوات الأخيرة بدرجة كبيرة، وتطور بعضها إلى مجال المجهر الالكترونى. كما استخدمت حديثا الأجسام المضادة فى بعض طرق الكشف الهستوكيماوى فيما يعرف الآن باسم كيمياء الأنسجة المناعى Immunohistochemistry.

البروتينات The Proteins

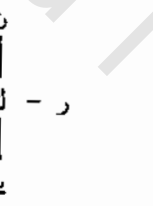
مقدمة:

تعتبر البروتينات من أكثر المكونات البيولوجية أهمية وتعقيدا فى التركيب، وهى تكون المادة الأساسية لبناء بروتوبلازم الخلايا، كما أن الكثير من الانشطة البيولوجية تعتمد على الانزيمات وكثير من الهرمونات التى تعتبر موادا بروتينية ومن المعروف أيضا أن البروتينات تدخل فى تركيب كثير من الافرازات الخلوية.

وتتكون البروتينات من أحماض أمينية يبلغ عددها حوالى ثلاثة وعشرون، كما أن هناك أحماضا أمينية تتواجد فى الخلايا ولكنها لا تدخل فى بناء البروتين.

وتختلف البروتينات فيما بينها اختلافا كبيرا نتيجة الاختلاف فى أنواع وترتيب وعدد الأحماض الأمينية الداخلة فى تركيب البروتين مما يعطى عددا هائلا من الاحتمالات لتكوين مختلف البروتينات تبعا لنوع النبات أو الحيوان، وكذلك تبعا لأعضاء الجسم المختلفة. وهناك كثير من المؤثرات الكيماوية والطبيعية التى تساعد على تنشيط عملية تخليق البروتينات أو تثبيطها، كما أن هناك الكثير من العوامل التى يمكن أن تؤثر فى طبيعة المواد البروتينية.

وباستثناء الحامض الأمينى برولين وهيدروكسى برولين، فإن الأحماض الأمينية الداخلة فى بناء البروتينات تتميز بوجود مجموعة أمينية فى موضع ألفا بالنسبة لمجموعة الكربوكسيل ولذا تسمى هذه الأحماض بالأحماض ألفا – أمينية، وصيغتها العامة هى:



حيث تمثل (ر) الهيدروجين أو سلسلة كربونية متفرعة أو غير متفرعة أو حلقة فينولية أو أنواعا أخرى من التركيب الحلقى، وهذا ما يميز حامض أمينى عن آخر.

ويمكن تقسيم الأحماض الأمينية الداخلة فى تركيب البروتينات على أساس عدد مجاميع الأمين وعدد مجاميع الكربوكسيل كما يلى:

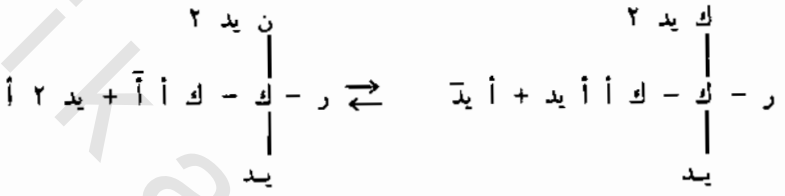
١ – **أحماض أمينية متعادلة:** أى تحتوى على عدد مساو من مجامع الأمين ومجاميع الكربوكسيل. ومن الأحماض الأمينية المتعادلة ما يحتوى على سلسلة جانبية هيدروكربونية مثل جليسين – ألانين – فالين – ليوسين – أيزوليوسين، ومنها ما يحتوى على الكبريت مثل سستئين الذى يحتوى على مجموعة كب – يد (S – H) وستين الذى يحتوى على مجموعة كب – كب (S – S) والميثايونين، ومنها ما يحتوى على مجموعة هيدروكسيل مثل سيرين وثريونين.

٢ - أحماض أمينية حامضية: تحتوى على أكثر من مجموعة كربوكسيل ومجموعة أمين واحدة. ومن أمثلة هذه المجموعة حامض الأسبرتيك وحامض الجلوتاميك.

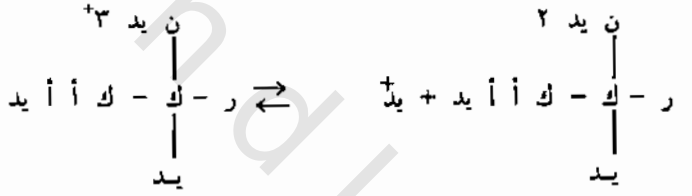
٣ - أحماض أمينية قاعدية: تحتوى على أكثر من مجموعة أمين ومجموعة كربوكسيل واحدة. ومن أمثلة هذه الأحماض الأمينية الليسين - هيدروكسى ليسين والأرجنين.

وتحتوى بعض الأحماض الأمينية على حلقة بنزين مثل فينايل آلانين - تيروسين - كما يحتوى بعضها على حلقات غير البنزين مثل التربتوفان الذى يحتوى على حلقة إندول ومثل الهستدين الذى يحتوى على حلقة إيميدازول. ويحتوى الحمض الأمينى برولين على مجموعة إيمينية (ن يد) بدلا من مجموعة الأمين (ن يد ٢).

ومن الخواص الهامة للأحماض الأمينية أن كلا منها يتصرف كأمفوليت بمعنى أنه يتأين كحامض وأيضا يتأين كقاعدة، ففى المحاليل القلوية تتصرف كأحماض كالآتى:



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



الكشف عن البروتينات
Demonstration of Proteins

طريقة البرومفينول الأزرق الزئبقى Mercuric Bromphenol Blue Method

(عن بوناج عام ١٩٥٥ - After Bonhag, 1955)

تحضير محلول الصباغة:

يحضر محلول الصبغ بإحدى الطريقتين الآتيتين:

١ - ١٪ برومفينول الأزرق Bromphenol blue فى الكحول ثم يضاف إليه كلوريد الزئبقوز $HgCl_2$.

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

خطوات العمل:

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

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

٣ – مرر القطاعات فى الزيلول لإزالة 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 الهيدروچينى الحامضى للقطاعات إلى نقطة التعادل.

٧ – روق القطاعات فى الزيلول وغط بصمغ مناسب.

النتائج: تصبغ البروتينات بلون أزرق داكن.

طريقة اكرولين – شف للبروتينات Acrolein Schiff Method for Proteins

(فان دوجن Van Duijn. 1961–1961)

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 ثلاث تغييرات من الكحول الاثيلى المطلق، خمس دقائق لكل تغييرة ثم مرر إلى 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 نهدرين – شف للبروتينات الحاوية على مجموعات أمين نشطة

Ninhydrin – Schiff Method for Protein – bound NH_2

(ياسوما وإتشيكاوا ١٩٥٣ Yasuma & Itchikawa 1953)

١ – ثبت العينات فى محلول زنكر أو كارنوى.

٢ – مرر القطاعات الشمعية حتى الماء.

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

٤ – اغسل القطاعات فى ماء جار لمدة ثلاث دقائق.

٥ – ضع القطاعات فى محلول شف Schiff's reagent لمدة ٢٥ دقيقة.

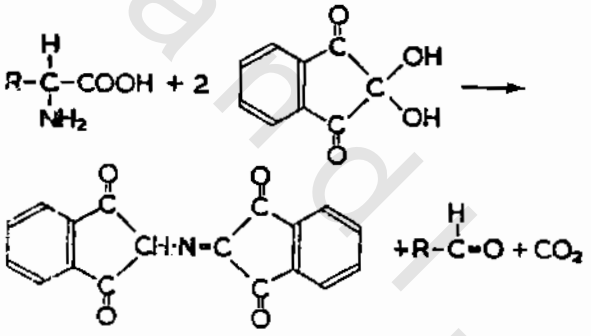
٦ – اغسل بالماء الجارى لمدة عشرة دقائق.

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

٨ – مرر القطاعات بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول ثم روق فى الزيلول وغط باستخدام كندا بلسم.

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

ملحوظة: تعتمد هذه الطريقة على تفاعل النينهيدرين مع مجموعات الأمين الحرة فى الأحماض الأمينية فينتج مركب ذو لون أزرق وثانى أكسيد الكربون بالإضافة إلى مركب يحتوى على ألدهيد Aldehyde (انظر الشكل) يتفاعل مع مركب شف وينتج بذلك لون أحمر أرجوانى.



الكشف عن البروتينات المحتوية على مجموعات الأمين النشطة بطريقة هيدروكس نافثالدهيد (وايز – تسو وسلجمان – ١٩٥٤)

Hydroxy naphtaldehyde 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 إلى 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	٢٠ سم^3

ثم أضف ٣٠ سم^3 من منظم ٠,١ محلول جزئى فيرونال–خلات.
(0.1m-veronal acetate buffer) أسة الهيدروجينى ٨,٥.

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

٤ – ضع القطاعات فى منظم (٠,١) محلول جزئى – خلات
(0.1M. Veronal Acetate buffer) أسة الهيدروجينى ٧,٤.
أضف إلى سطح المحلول ٢٥ ملجم تنائى أورثو أنيسيدين تترازوتيزيد Tetrazotized diorthoanisidine (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 بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق فى الزيلول وغط فى كندا بلسم.

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

(طريقة ميلون (١٨٤٩) للكشف عن البروتينات المحتوية على التيروسين (محورة عن بيكر – ١٩٥٦)

Millon Reaction (1849) for Tyrosine-containing Proteins (Baker Modification, 1956)

تحضير الكاشف:

١ – أضف ١٠ جم كبريتات الزئبق $HgSO_4$ إلى ١٠٠ سم^3 من ١٠٪ حمض كبريتيك وسخن حتى يذوب الملح. ثم أضف ماء حتى يصل الحجم الكلى إلى ٢٠٠ سم^3.

٢ – لكل ٥٠ سم^3 من هذا المحلول، أضف ٥ سم^3 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 دقيقتين.

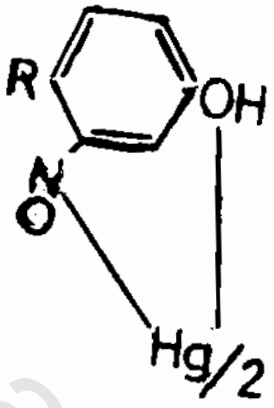
٣ – اترك الكأس ليبرد حتى تصل حرارته إلى درجة حرارة الغرفة.

٤ – اغسل القطاعات ثلاث مرات بالماء المقطر لمدة دقيقتين فى كل مرة.

٥ – غط باستخدام الجلسرين جيللى أو انزع الماء بسلسلة من الكحولات ثم روق وغط باستخدام أحد الأصماغ.

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

ويفسر هذا التفاعل (جبس عام ١٩٢٧ – Gibbs, 1927) على أساس تكون نيتروفينول بإحلال مجموعة ن أ (NO) محل الهيدروجين (H) فى موقع (أورثو) أو (بيتا) بالنسبة لمجموعة الهيدروكسيل فى الفينول. وعقب ذلك يدخل الزئبق (Hg^{++}) فى حلقة جديدة تشمل نيتروجين مجموعة النيتروزو Nitroso group ويتكون بذلك مركب أحمر اللون. ويطلق على عملية إدخال الزئبق هنا Chelation.



طريقة ساكاجوتشى (١٩٢٥) للكشف عن الأرجنين (محورة عن بيكر ١٩٤٧)

The Sakaguchi Reaction (1925) for Arginine (Modified by Baker, 1947).

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 والأثير.

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 ألفا نافثول هيبوكلوريت α–Naphthol hypochlorite واتركه لمدة ١٥ دقيقة.

٧ – صفى الشريحة وجفف القطاع بورقة ترشيح.

٨ – ضع الشريحة فى خليط من أجزاء متساوية من البيريدين والكلوروفورم.

٩ – غط القطاع بخليط من البيريدين والكلوروفورم.

النتائج: البروتينات الحاوية على الأرجنين تأخذ لونا برتقاليا محمرا.

طريقة دم أب – نيتريت للكشف عن التربتوفان (عن آدمز – ١٩٥٧)

The DMAB-Nitrite method for Tryptophan (After Adams, 1957)

١ – ثبت لمدة تتراوح من ٦–٢٤ ساعة فى فورمالين متعادل.

٢ – حمل القطاعات على شرائح معاملة بالالبيومين.

٣ – مرر القطاعات إلى الكحول المطلق ثم جففها فى الهواء، واغمسها بسرعة فى محلول ٥٪ بارا داى مثيل أمينو بنز الدهيد P-dimethylamino benzaldehyde فى حمض ايدروكلوريك كثافته النوعية ١,١٨ لمدة دقيقة واحدة.

٤ – انقل الشرائح إلى 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 روذيندول للاندولات (عن جلنر – ١٩٥٧)

The Rosindole Reaction for Indoles (Clenner 1957)

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

٢ – أزل الشمع من القطاعات ثم ضعها فى كحول مطلق.

٣ – جفف الشرائح فى الهواء لمدة ٣٠ ثانية.

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

حمض فوق الكلور	Perchloric Acid	٦٠ سم^{٣}
حمض خليك	Acetic Acid	٣٤ سم^{٣}
حمض هيدروكلوريك مركز	Hydrochloric Acid	١ سم^{٣}
بارادای مثيل أمينو بنزالدهيد	P-dimethylaminobenzaldehyde	١ جم

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

حمض خليك	Acetic Acid	٣٥ سم^{٣}
حمض أيدروكلوريك	Hydrochloric Acid	٥ سم^{٣}
نيتريت الصوديوم	Sodium nitrite	٠,٥ 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 بإستخدام صمغ مناسب.

النتائج: تصبغ الاندولات بلون أزرق داكن.

طريقة حمض بيرفورمك - شف للكشف عن البروتينات الغنية فى مجموعات ثنائى الكبريت - ستين (بيرس ١٩٥١)

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

تحضير المحاليل:

محلول حمض فوق الفورميك Performic Acid

أضف ٤ سم^{٣} من ٣٠٪ ماء أوكسجين، ½ سم^{٣} من حمض كبريتيك مركز إلى ٤٠ سم^{٣} من ٩٨٪ حمض فورميك، استخدم المحلول فى الفترة الواقعة بين مرور ساعة واحدة، ٢٤ ساعة من تحضيره، لاحظ ألا تستخدم ماء أوكسجين 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 دافئ لمدة ١٠ دقائق.
٦ - مرر القطاعات فى سلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق فى الزيلول وغط فى دى بى أكس .D.P.X

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

الكشف عن البروتينات المحتوية على ثنائى الكبريت (الستين) باستخدام حمض فوق الفورميك والألسيان الأزرق: (آدمز وسلوبر ١٩٥٦)

Performic Acid-Alcian blue Method for S-S groups (Cystine).(Adams & Sloper, 1956)

تحضير المحاليل:

تحضير حمض فوق الفورميك Performic Acid

٣٠٪ فوق أكسيد الهيدروجين	Hydrogen Peroxide	٤ سم^{٣}
حمض كبريتيك مركز	Sulphuric Acid	٠,٥ سم^{٣}
حمض فورميك (٩٨٪)	Formic Acid	٤٠ سم^{٣}

استخدم المحلول فى الفترة الواقعة بين مرور ساعة واحدة، ٢٤ ساعة من تحضيره.

obeikandl.com

صبغ الألسيان الأزرق: Alcian blue

ذوب بالتسخين عند درجة ٧٠°م مقدار ٣ جم من صبغ الألسيان الأزرق فى ١٠٠ سم^3 من ٢ عيارى حمض كبريتيك. أترك المحلول ليبرد ثم رشح (الاس الهيدروچينى حوالى ٠,٢ – ٠,٣).

خطوات العمل:

١ – ثبت العينات فى الفورمالين أو الفورمول كالسيوم.
٢ – مرر القطاعات الشمعية حتى الماء.
٣ – جفف القطاعات برفق باستخدام ورق ترشيح.
٤ – اغمس القطاعات فى كاشف حمض فوق الفورميك لمدة خمس دقائق بعد هز الحمض جيدا.
٥ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور لمدة عشر دقائق.
٦ – اغمس القطاعات فى ٧٠٪ كحول ثم كحول مطلق.
٧ – جفف القطاعات بورق ترشيح.
٨ – اغمس القطاعات فى ماء صنبور.
٩ – جفف القطاعات بالتسخين حتى درجة ٥٠ – ٦٠°م.
١٠ – اغمس القطاعات فى كحول مطلق ثم فى ماء صنبور لمدة دقيقة.
١١ – اصبغ القطاعات فى محلول الألسيان الأزرق لمدة ساعة واحدة.
١٢ – اغسل القطاعات لمدة خمس دقائق فى ماء صنبور.
١٣ – انزع الماء بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول ثم روق فى الزيلول وغط باستخدام كندا بلسم.

النتيجة: تبدو البروتينات المحتوية على السستين بلون أزرق تعتمد دكنته على الكمية الموجودة من هذا الطراز من البروتينات.

الكشف عن البروتينات المحتوية على مجموعات سلفيدريل (كبريت – هيدروچين) مثل السستئين باستخدام كبريتات الحديديك وسيانيد الحديد البوتاسيومية (طريقة تشيفريمونت وفريديريك).

The Ferric Ferricyanide Method for Cysteine (Sulphydryl groups) After Chevremont & Frederic

تحضير الكاشف:

٠,١٪ سيانيد الحديد البوتاسيومية (طازجة التحضير) Potassium Ferricyanide $K_3Fe(CN)_6$	٢٠ سم^3
١٪ كبريتات الحديديك Ferric sulphate $Fe_2(So_4)_3$	٦٠ سم^3

أضبط الاس الهيدروچينى عند ٢,٤

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة لبضع ساعات فقط فى الفورمالين.
٢ – حضر قطاعات ثلجية أو قطاعات شمعية بعد التخلل بالشمع لفترة قصيرة.
٣ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر.
٤ – ضع القطاعات فى ثلاث تغييرات من الكاشف تستغرق كلها ١٠ – ٢٠ دقيقة فى حالة القطاعات الثلجية أو ٢٠ – ٢٥ دقيقة فى حالة القطاعات الشمعية.
٥ – اغسل القطاعات بالماء المقطر ثم ميز فى ٢٪ هيدروكسيد صوديوم فى ٦٠٪ كحول ثم أغسل بالماء المقطر.
٦ – اصبغ الأنوية – إذا أردت – باستخدام كارم ألم Carmalum لمدة ٦ – ١٨ ساعة.
٧ – غط القطاعات الثلجية بالجلسرين، أما القطاعات الشمعية فانزع منها الماء وروقها وغط بالكندا بلسم بالطريقة المعتادة.

النتيجة: تبدو البروتينات المحتوية على مجموعات سلفيدريل باللون الأزرق. أما الأنوية – إذا صبغت – فتبدو حمراء اللون.

الأميلويدات The Amyloids

مقدمة:

هناك اتفاق بصفة عامة على أن الأميلويدات تتركب من جليكوبروتينات وميوكوبروتينات ومواد كربوهيدراتية. وتزيد الاميلويدات فى بعض أعضاء الجسم 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 غيرطبيعية فى بعض أعضاء الجسم مثل الكبد والطحال والكلى وغدد الكظر وجدر الأوعية الدموية بها وينتج بذلك مايعرف باسم (تفسخ أميلويدى Amyloid degeneration) وتعتبر زيادة الاميلويدات مؤشرا لاضطرابات فى التحول الغذائى للمواد البروتينية يلعب فيها الجهاز المناعى بصفة عامة وخلايا البلازما بصفة خاصة دورا أساسيا. وترجع زيادة الأميلويدات إلى خلل فى الآلية التى تتحكم فى ضبط تخليقها. وقد وجد أن مصدر معظم الاميلويدات المترسبة فى هذه الأعضاء هو الدم، وأن طبيعة بروتينات مصل الدم تتغير فى هذه الحالة. وتلقى الاميلويدات أهمية كبيرة لدى المشتغلين بعلم الأمراض لأهميتها فى كثير من الحالات المرضية مثل الروماتويد. وقد أمكن تجريبيا زيادة الاميلويدات فى بعض الحيوانات باستخدام عددا من المواد مثل الكازين Casein.

ومن المعروف أن فيرشو Virchow هو أول من أعطى (فى عام ١٨٥١) لفظ Amyolid هذه المواد عندما لاحظ أن تفاعلها مع اليود يشبه تفاعل النشا معه، إلا أنه اتضح بعد ذلك أن تركيب الاميلويدات بعيدا عن طبيعة تركيب النشا.

الكشف عن الاميلويدات باستخدام مثيل فيوليت (محوره عن بنكروفت 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 العمل:

١ - جهز قطاعات للعينة مثبتة فى الفورمالين وذلك باستخدام الميكرونوم الثلجى أو الكريوستات.
٢ - اغسل القطاعات فى الماء.
٣ - اصبغ 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 جيدا بورق ترشيح ثم روق فى الزيلول ثم غط باستخدام صمغ مناسب.

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

الكشف عن الاميلويدات باستخدام صبغ كونغورد (محورة عن هايمان عام ١٩٤٦)
Congo Red Method for Amyloid (Modified by Highman, 1946.)

محلول الصبغ: Staining Solution

- كونغورد	Congo Red	٥٠٠ ملجم
- كحول مطلق	Absolute alcohol	٥٠ سم^3
- ماء مقطر	Distilled water	٥٠ سم^3

محلول التمييز: Differentiator

- أيدروكسيد البوتاسيوم	Potassium hydroxide	٢٠٠ ملجم

- كحـول مطلق Absolute alcohol ٨٠ سم^{٣}
- مـاء مقطـر Distilled water ٢٠ سم^{٣}

خطوات العمل:

١ – مرر القطاعات حتى الماء.
٢ – اصبغ فى محلول صبغ كونغورد 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 الهياتوكسيلين.
٧ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور.
٨ – انزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول.
٩ – روق فى الزيلول.
١٠ – غط باستخدام صمغ مناسب.

النتائج:

- الاميلويدات .... برتقالية إلى حمراء
- الانوية .... زرقاء
- الا لاستين .... برتقالية

الأحماض النووية The Nucleic Acids

توجد الأحماض النووية فى جميع الأنسجة الحيوانية والنباتية وهى غالبا ما تكون متحدة مع بروتينات قاعدية لتكون ما يعرف باسم البروتينات النووية Nucleoproteins وتتكون الأحماض النووية من حمض فسفوريك Phosphoric acid وقواعد نيتروجينية Nitrogenous bases (بيورينات Purines، وبيريميدينات Pyrimidines) وسكر خماسي.

ومن المعروف أنه يوجد نوعان من الأحماض النووية هما حمض ح ر ن RNA الذى يوجد عادة فى السيتوبلازم والنويات Nucleoli وحمض ح د ن DNA الذى يوجد عادة فى الأنوية Nuclei، ويختلف الحمضان فى التركيب الكيماوى من حيث طبيعة القواعد النيتروجينية والسكر الخماسى الداخل فى تركيبها.

obeikandl.com

طريقة فولجن للكشف عن حمض ح د ن
Feulgen Method for DNA demonstration

تعتبر هذه الطريقة من أفضل الطرق للكشف عن حمض ح د ن D A N وهى تعتمد على إجراء تحليل مائى بسيط Mild hydrolysis للحمض باستخدام محلول عيارى من حمض الهيدروكلوريك عند درجة ٦٠°م. وتؤدى عملية التحليل المائى إلى تحرير الالدهيدات من السكر الخماسى، وتنقل الشرائح بعد ذلك إلى كاشف (شف) الذى يتحد مع مجموعات الألدهيدات، فينتج لون أرجوانى يحدد توزيع وكثافة حمض ح د ن فى النسيج. وينصح بعد ذلك بوضع الشرائح فى محلول كبريتى يزيل أى لون آخر قدي ينتج من أكسدة محلول شف فى القطاعات إلى لون الصبغ الأصلى.

وتجب الإشارة إلى أن الوقت اللازم والمناسب لعملية التحليل المائى بواسطة محلول عيارى واحد من حمض الهيدروكلوريك N – HCI يعتمد على نوع المثبت المستخدم، ويجب الالتزام به دون زيادة أو نقصان ويتضح ذلك من الجدول الآتى:

المثبت	الزمن بالدقيقة
كارنوى (٣ : ١)	٦
كارنوى (٦ : ٣ : ١)	٨
فلمنج	٨
فورمالين	٨ – ١٠
سوزا	١٨
زنكر	٥
تشامبى	٢٥
فورمال سبلميت	٨
هيللى	٨
ريجود	١٤

خطوات العمل:

١ – تثبت قطع النسيج فى أحد المثبتات، ويفضل استخدام مثبت كارنوى Carnoy أوفورمول ملحى Formol Saline درجة أسه الهيدروچينى ٧,٢. تجنب استخدام محلول بوان لأنه يسبب تحلل الأحماض النووية.

٢ – جهز قطاعات شمعية.

٣ – أزل الشمع من على الشرائح باستخدام الزيلول.

٤ – مرر القطاعات بسلسلة متناقصة التركيز من الكحول حتى تصل إلى الماء.

٥ – اغمس القطاعات فى محلول عيارى من حمض الهيدروكلوريك 1-N-HCl فى درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة.

٦ – ضع القطاعات فى محلول عيارى من حمض الهيدروكلوريك درجة حرارته ٦٠°م لمدة تعتمد على المثبت الذى ثبت فيه النسيج (أنظر الجدول السابق).

٧ – اغمس الشرائح فى محلول عيارى من حمض الهيدروكلوريك فى درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة.

٨ – ضع الشرائح فى محلول كاشف (شف) Schiff's reagent لمدة ٤٥ د قيقة (تحضيره صفحة).

٩ – مرر القطاعات فى ثلاث تغييرات (كلها لمدة ٦ دقائق) من المحلول الآتى.

١٠٪ ميتاباى سلفيت الصوديوم	Sodium Metabisulphite	٥ سم٣
محلول عيارى حمض هيدروكلوريك	N-Hydrochloric Acid	٥ سم٣
ماء مقطر	Distilled water	٩٠ سم٣

١٠ – اغسل جيدا فى الماء المقطر.

١١ – اصبغ سيتوبلازم الخلايا – إذا أردت ذلك – فى ١٪ صبغ لايت جرين لمدة دقيقتين.

١٢ – اغسل الشرائح بالماء.

١٣ – انزع الماء بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول ثم روق فى الزيلول وغط القطاعات بالكندا بلسم.

النتائج:

حمض ح د ن	أرجوانى محمر
السيتوبلازم (إن صبغ)	أخضر فاتح.

الكشف عن الحمضين النووين ح د ن، ح ر ن باستخدام المثيل جرين بيرونين

DNA & RNA Demonstration by Methyl Green - Pyronin Method

تعرف هذه الطريقة أيضا باسم طريقة أنا بابنهايم Ynna-Pappenheim وهى تعتمد على صباغة القطاعات بمحلول يحتوى على صبغ مثيل جرين Methyl Green (أخضر اللون) يصبغ حمض ح د ن، وصبغ البيرونين Pyronin (أحمر اللون) يصبغ حمض ح ر ن.

ويلاحظ أن مسحوق صبغ المثيل جرين يحتوى على كمية من المثيل فيوليت Methyl violet يجب ازالتها من المسحوق قبل تحضير الصبغ باستخدام الكلورفورم أو الكحول الأميلى Amyl Alcohol وذلك بالطريقة الآتية:

غسيل صبغ المثيل جرين لإزالة المثيل فيوليت:

Methyl Green Washing To Remove Methyl Violet

ذوب ٢ جم مثيل جرين فى ١٠٠ سم٣ ماء مقطر مع الرج الجيد ثم صب المحلول فى قمع فصل

Separating Funnel ثم أضف ١٠٠ سم^3 كلوروفورم ورج جيدا. ستجد أن الكلوروفورم يكون الطبقة الأثقل وسيحتوى على المثيل فيوليت. تخلص من الكلوروفورم المحتوى على المثيل فيوليت. أضف كلوروفورم جديد وكرر ذلك حوالى عشر مرات حتى يتم استخلاص اللون الفيوليت. لاحظ أن المحلول المائى للصبغ بعد تمام عملية استخلاص المثيل فيوليت صالح للاستخدام لمدة ٥ سنوات.

تحضير صبغ مثيل جرين - بيرونين Methyl Green - Pyronin Stain

محلول مائى ٢٪ بيروتين	Pyroniny	١٢,٥ سم^3
محلول مائى ٢٪ مثيل جرين	Methyl Green	٧,٥ سم^3
مـاء مقـطر	Distilled Water	٣٠ سم^3

خطوات العمل:

(طريقة كيرنك ١٩٥٥ Kurnick, 1955)

١ - اجر الخطوات من ١ - ٤ فى طريقة فولجن.

٢ - ضع القطاعات لمدة ٦ دقائق فى محلول صبغ مثيل جرين - بيرونين.

٣ - امسح الشرائح وجفف القطاعات باحتراس شديد باستخدام ورق ترشيح.

٤ - ضع القطاعات لمدة ١٠ دقائق فى تغيرتين من ن - كحول البيوتايل N-butyl alcohol (لا تستخدم كحول بيوتايل رباعى Tertiary butyl alcohol).

٥ - ضع القطاعات فى تغيرتين من الزيلول، كل منهما لمدة ٥ دقائق ثم غط باستخدام كندا بالسم.

النتائج:

- حمض ح د ن ..... أخضر.
- حمض ح ر ن ..... أحمر.

استخلاص حمض ح د ن من القطاعات: DNA-extraction

يستخلص حمض ح د ن باستخدام أنزيم دى أوكسى ريبونيوكليز Deoxyribonuclease ويحضر محلول الاستخلاص كما يلى:

أنزيم دى أوكسى ريبونيكوكليز	Deoxyribonuclease	١٠ ملجم
مـاء مقطـر	Distilled Water	٥٠ سم^3
٠,٢ محلول جزئى منظم تراس أسه الهيدروچينى ٧,٦	Tris buffer	١٠ سم^3

طريقة العمل:

١ - نفذ الخطوات من ١-٤ فى طريقة فولجن.

٢ - ضع مجموعة القطاعات المراد استخلاص حمض ح د ن منها فى محلول الاستخلاص. ضع

القطاعات الضابطة Control Sections فى محلول منظم تراس Tris buffer أسه الهيدروچينى ٧,٦ عند درجة حرارة ٣٧°م وذلك لمدة ٤ ساعات.

٣ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى.

٤ - اصبغ القطاعات حسب طريقة فولجن.

النتائج: القطاعات التى وضعت فى محلول الاستخلاص تعطى نتيجة سلبية والقطاعات الضابطة يظهر فيها حمض ح د ن مصبوغا بلون أرجوانى محمر.

استخلاص حمض ح ر ن RNA extraction

يستخلص حمض ح ر ن باستخدام انزيم ريبو نيوكليز Ribonuclease.

خطوات العمل:

١ - اجر الخطوات من ١ - ٤ فى طريقة فولجن.

٢ - ضع مجموعة القطاعات المراد استخلاص حمض ح ر ن منها فى محلول مائى ٠,٠٨٪ ريبونيوكليز بينما توضع القطاعات الضابطة فى ماء مقطر عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ساعة واحدة.

٣ - اغسل القطاعات فى ماء مقطر.

٤ - اصبغ القطاعات بصبغ مثيل جرين - بيرونين.

النتائج:

- حمض ح ر ن ..... سالب الصباغة
- حمض ح د ن ..... أخضر

القطاعات الضابطة:

- حمض ح ر ن ..... أحمر
- حمض ح د ن ..... أخضر

المواد الكربوهيدراتية
The Carbohydrates

توجد المواد الكربوهيدراتية ضمن المكونات الطبيعية للخلايا وإفرازاتها، ويتأثر توزيع وطبيعة المواد الكربوهيدراتية فى كثير من الانسجة والخلايا حسب الحالات الفسيولوچية والمرضية المختلفة. ومن الناحية الهستوكيماوية، فإن الكشف عن المواد الكربوهيدراتية يقتصر على المواد عديدة التسكر فقط. أما بقية المواد الكربوهيدراتية فلا يمكن الكشف عنها بسبب قابليتها السريعة للذوبان وذلك مثل السكريات الأحادية ومنها الجلوكوز والجالاكتوز، أو السكريات الثنائية مثل المالتوز والسكروز.

obeikandl.com

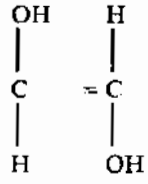
الكشف العام عن المواد عديدة التسكر بطريقة حمض بيرايوديك - شف (ب أ س)

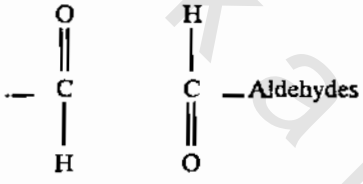
Demonstration of Polysaccharides by Periodic Acid-Schiff (P A S) Method

تعد طريقة حمض البير أيوديك - شف (ب أ س) (Periodic Acid Schiff (PAS من أشهر الطرق الهستوكيماوية المستخدمة للكشف عن المواد عديدة التسكر.

ميكانيكية التفاعل: من المعروف أن كاشف (شف) عديم اللون، ويحضر من صبغ الفوكسين الحامضى أحمر اللون وعند صباغة القطاعات بهذه الطريقة تعامل أولا بحمض فوق الأوديك (Periodic Acid, HI04) وهو عامل مؤكسد قوى يقوم بكسر الروابط بين مجموعات الجليكول المتجاورة.

فى سلسلة المادة عديدة التسكر محولا إياها إلى مجموعات الألدهيدات





وبعد ذلك تنقل القطاعات إلى محلول شف (عديم اللون) الذى له قابلية للتفاعل مع مجموعات الألدهيدات ويدخل مكان الروابط التى سبق وأن تكسرت بين مجموعات الجليكول المتجاورة فى سلسلة المادة عديدة التسكر فيكون مركبا ذا لونا أحمر أرجوانى Magenta Compound ويمكن إعتمادا على توزيع اللون الناتج ودرجة كثافته التعرف على توزيع وكثافة المواد عديدة التسكر داخل النسيج.

ويجب مراعاة غسيل الشرائح فى (ماء كبريتى) حيث أن الزيادة من محلول شف فى القطاعات تتأكسد بسرعة إلى لون الفوكسين الأحمر (لا علاقة له بمركب شف) مما يسبب زيادة كثافة اللون الناتج فى القطاعات والتى لا علاقة لها بوجود المواد الكربوهيدراتية. ولذا فان غسيل الشرائح بمحلول مائى يحتوى على ثانى أكسيد الكبريت SO_2-Water يزيل اللون الناتج بهذه الطريقة وذلك بالاتحاد معه وتكوين مادة لا لون لها. ومن هنا فإنه لا ينصح بغسيل الشرائح بالماء (فقط) بعد معاملتها بكاشف (شف).

خطوات العمل:

١ - ثبت قطع النسيج فى مثبت جندر Gendre's Fluid أو بوان كحولى Alcoholic Bouin أو كحول مطلق أو مثبت كارنوى Carnoy's Fluidويستحسن استخدام مثبت مبرد. ويتم التثبيت فى درجة حرارة منخفضة (حوالى ٤°م).

٢ – جهز قطاعات شمعية ذات سمك مناسب.

٣ – أزل الشمع بالزيلول ثم مرر القطاعات فى سلسلة متناقصة التركيز من الكحول حتى ٧٠٪ كحول ثم أنقل القطاعات إلى الماء.

٤ – ضع القطاعات لمدة ٥–٨ دقائق فى محلول ١٪ حمض فوق الأوديك Periodic acid.

٥ – اغسل الشرائح فى ماء صنبور لمدة ٣ دقائق ثم فى الماء المقطر لمدة دقيقة واحدة.

٦ – ضع الشرائح فى محلول شف Schiff's reagent لمدة ١٥ دقيقة.

٧ – اغسل الشرائح فى تغييرتين (٤ دقائق) من محلول حمض كبريتوز الذى يحضر كما يلى:

١٠٪ ميتاباى سلفيت الصوديوم	Sodium Metabisulphite	٥ سم٣
محلول عيارى من حمض هيدروكلوريك	Hydrochloric Acid	٥ سم٣
ماء مقطر	Distilled Water	٩٠ سم٣

٨ – إذا أردت صباغة أنوية الخلايا، إغسل الشرائح بماء صنبور ثم ضعها فى صبغ الهياتوكسيلين لمدة ١٠ دقائق ثم أغسلها فى ماء صنبور لمدة ٥ دقائق.

٩ – انزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول حتى الكحول المطلق ثم روق فى الزيلول وغط القطاعات بصمغ كندا بالسم.

النتيجة: تبدو المواد السكرية بلون قرمزى أحمر وإذا صبغت أنوية الخلايا فستبدو زرقاء داكنة.

صباغة الجليكوچين:

يعتبر الجليكوچين من المواد عديدة التسكر البسيطة Simple Polysaccharides. ويستحسن الكشف عنه فى الكبد حيث يحتوى عادة على كميات كبيرة منه. وسنعرض هنا لطريقتين يمكن بهما الكشف على الجليكوچين.

الكشف عن الجليكوچين باستخدام صبغ بست كارمين

Demonstration of Glycagen: Best's Carmine Method.

١ – اجر الخطوات من ١–٣ من الطريقة السابقة.

٢ – إذا أردت صباغة أنوية الخلايا. اغمس الشرائح فى ماء صنبور ثم ضعها فى صبغ الهياتوكيين لمدة ١٠ دقائق ثم اغسلها فى ماء صنبور.

٣ – اصبغ الشرائح فى محلول بست كارمين لمدة ٣٠ دقيقة.

٤ – اغمس الشرائح لمدة ٢٠ ثانية فى محلول تمييز بست Best's differentiator الذى يتكون من:

كحول إيثيلى مطلق	Ethyl alcohol	٨ سم٣
كحول مثيلى	Methyl alcohol	٤ سم٣
ماء مقطر	Distilled water	١٠ سم٣

٥ – اغسل الشرائح فى الكحول المطلق (٣ تغييرات لمدة ١٠ دقائق).

٦ – روق القطاعات فى الزيلول ثم غطها باستخدام الكندا بالسم.

النتائج:

الجليكوجين ..... أحمر

الأنوية (إن صبغت) ..... زرقاء

ملحوظة: ينصح البعض بوضع القطاعات بعد الخطوة رقم (١) فى ١٪ سيللودين 1% Celloidin لمدة خمس دقائق ثم ترك الشرائح فى الهواء لمدة دقيقتين ثم غمسها لمدة دقيقتين فى ٧٠٪ كحول، وذلك لأن تكوين سحبة من السيللودين على القطاع يقلل تسرب السكريات إلى المحاليل التى توضع فيها القطاعات أثناء الصباغة. وفى هذه الحالة تزال هذه السحبة بعد أنتهاء عملية التمييز المشار إليها فى الخطوة رقم (٤) وذلك بوضع الشرائح فى ٧٠٪ كحول ثم فى محلول (إثير - كحول بنسبة ١ : ١) لمدة دقيقتين، ثم تغسل الشرائح فى ٨٠٪ كحول ثم تستكمل بقية الخطوات المذكورة سابقا.

الكشف عن الجليكوجين باستخدام طريقة باور - فولجن

Demonstration of Glycogen: Bauer – Feulgen Method

يفضل استخدام هذه الطريقة مع القطاعات الثلجية أو القطاعات المجهزة بالكريوسنات.

١ - اغمس القطاعات فى الماء.

٢ - ضع القطاعات لمدة ٣٠ دقيقة فى محلول ٤٪ حمض الكروميك (عامل مؤكسد)، وهو يحضر بإذابة ٤ جم من ثالث أكسيد الكروميوم Chromium trioxide فى ١٠٠ سم^3 ماء مقطر. ويلاحظ أن هذه الخطوة تؤدى إلى أكسدة زائدة over oxidation للمواد الكربوهيدراتية غير الجليكوجينية مما يؤدى إلى عدم صباغتها بواسطة كاشف (شف).

٣ - اغسل الشرائح جيدا لمدة ١٠ دقائق فى ماء صنبور.

٤ - ضع القطاعات لمدة ١٥ دقيقة فى كاشف (شف) Schiff's Reagent.

٥ - اغسل الشرائح فى تغييرتين (٤ دقائق) من محلول حمض الكبريتوز الذى يحضر كما يلى:

١٠٪ ميتاباى سلفيت الصوديوم	Sodium Metabisulphite	٥ سم^3
محلول عيارى من حمض الايدروكلوريك	N. Hydrochloric Acid	٥ سم^3
ماء مقطر	Distilled Water	٩٠ سم^3

٦ - اغسل الشرائح فى ماء صنبور لمدة خمس دقائق.

٧ - إذا أردت صباغة الأنوية، ضع الشرائح فى صبغ الهيماتوكسيلين لمدة ٢ - ٥ دقائق.

٨ - اغسل الشرائح فى ماء صنبور لمدة ٢ - ٥ دقائق.

٩ - انزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول حتى تصل إلى تغييرتين من الكحول المطلق.

١٠ - روق فى ايزيلول وغط القطاعات بواسطة كندا بلسم.

النتائج:

الجليكوچين ..... أحمر

أنوية الخلايا ..... زرقاء

التمييز بين الجليكوچين والمواد الكربوهيدراتية غير الجليكوچينية

Differentation between glycogen and non-glycogenic Carbohydrates

قسم شرائح شمعية مجهزة لنفس العضو بنفس الطريقة إلى ثلاث مجموعات.

عامل المجموعة الأولى حسب طريقة حمض فوق الأيوديك - شف.

وعامل المجموعةو الثانية من الشرائح حسب طريقة بست كارمين.

أما مجموعة الشرائح الثالثة فعاملها حسب الخطوات الآتية:

١ - مرر الشرائح بالزيلول وسلسلة متناقصة التركيز من الكحول حتى تنتهى بالماء المقطر.

٢ - اغمر الشرائح فى محلول ١٪ إنزيم الديساتيز Diastase المذاب فى محلول منظم فوسفاتى Phosphate buffer أسه الهيدروچينى ٧ (pH. 7) أو ضعها فى محلول اللعاب (٥٠ سم^{٣} لعاب طازج + ٥٠ سم^{٣} ماء مقطر + بلورة من كلوريد الصوديوم)، وذلك عند درجة حرارة ٣٧°م لمدة ٣٠ دقيقة لأى من المحلولين.

٣ - اغسل الشرائح فى الماء المقطر لمدة دقيقة واحدة.

٤ - عامل الشرائح حسب طريقة حمض فوق الايوديك - شف.

النتائج: قطاعات المجموعة الأولى توضح المواد الكربوهيدراتية عديدة التسكر بأنواعها المختلفة، وقطاعات المجموعة الثانية توضح الجليكوچين. أما قطاعات المجموعة الثالثة فقد تم هضم الجليكوچين فيها باستخدام الدياستيز أو اللعاب وبالتالى فهى بعد صباغتها حسب طريقة حمض فوق الأيوديك شف تظهر المواد الكربوهيدراتية غير الجليكوچينية. وعلى ذلك فإن مقارنة شرائح المجموعات الثلاث تعطى فكرة واضحة عن توزيع وكثافة Density المواد الكربوهتيدراتية المختلفة فى العضو موضوع الدراسة.

الكشف الهستوكيماوى عن المواد عديدة التسكر المخاطية

Histochemical Demonstration of Mucopolysaccharides

هى مواد عديدة التسكر غير مرتبطة بالبروتينات ولكنها تحتوى على سكريات أمينية Amino-Sugars، بمعنى أنها تتكون من مواد سكرية استبدلت فيها مجموعة هيدروكسيل بواسطة مجموعة أمينية Amino-Group. وتنقسم هذه المواد إلى مجموعتين هما:

(أ) مواد عديدة التسكر مخاطية حمضية: Acid Mucopolysaccharides وهى تتميز بوجود أحماض فى تركيبها مثل حمض الكبريتيك Sulphuric acid وحمض اليورنيك Uronic Acid .

(ب) مواد عديدة التسكر مخاطية متعادلة: Neutral Mucopolysaccharides
وهى لا تحتوى على أحماض فى تركيبها.

الكشف عن المواد عديدة التسكر المخاطية الحامضية

Demonstration of Acid Mucopolysaccharides

طريقة السيان الأزرق (عن ستيدمان ١٩٥٠):

Alcian blue method (steedman, 1950)

١ – اجر الخطوات من ١ – ٤ فى طريقة حمض فوق الأوديك – شف.
٢ – ضع الشرائح لمدة ١٠ دقائق فى محلول صباغة السيان بلو الذى يحضر كما يلى:

السيان بلو	Alcian blue	١٠٠ ملجم
حمض خليك ثلجى	Acetic Acid (glacial)	٣ سم^{٣}
مـاء مقطـر	Distilled Water	٩٧ سم^{٣}

ويلاحظ أن تكون درجـة الأس الهيدروچينى لمحلول الصبـغ أقل من ٣ كـما يجب ترشيـح المحلول قبل الاستعمال.
٣ – اغسل الشرائح فى ماء مقطر لمدة نصف دقيقة.
٤ – يمكنك صباغة أنوية الخلايا باستخدام ماير كارم ألم Mayer's carmalum.
٥ – اغسل الشرائح بماء جار لمدة ٣ دقائق.
٦ – انزع الماء بسلسلة متزايدة التركيز من الكحول.
٧ – روق القطاعات فى الزيلول وغطها بالكندا بلسم.

النتائج:

المواد عديدة التسكر المخاطية الحامضية ..... زرقاء مخضرة
الأنوية ..... حمراء

طريقة التلويدين بلو لصباغة المواد عديدة التسكر المخاطية الحمضية

Toluidine blue method for acid mucopolysaccharides

١ – أجر الخطوات من ١ – ٤ فى طريقة ب أ س PAS.
٢ – ضع الشرائح لمدة ١٥ دقيقة فى محلول صباغة التلويدين بلو وهو يحضر كما يلى:

تلويدين بلو	Toluidine blue	١٠٠ ملجم
كحـول مطلـق	Absolute Alcohol	٣٠ سم^{٣}
مـاء مقطـر	Distilled water	٧٠ سم^{٣}

٣ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر وافحص القطاعات للتعرف على نتائج الصباغة.
٤ – إذا أردت التحميل فى كندا بلسم، أغمس القطاعات فى ٩٤٪ كحول ثم فى كحول مطلق ثم روق فى الزيلول وحمل فى كندا بلسم.

وإذا أردت التحميل فى الجلسرين جيللى، أغسل القطاعات فى ماء مقطر ثم حمل.
يمكنك اجراء طريقتى التحميل ومقارنة ذلك مع نتائج الفحص الذى أجريته قبل التحميل.

النتائج:

المواد عديدة التسكر المخاطية الحمضية ..... قرنفلية

ملحوظة:

يمكن استخدام صبغ آزور (أ) Azure A بدلا من صبغ التلويدين بلو.

طريقة الميوسى كارمين لصباغة المواد عديدة التسكر المخاطية الحامضية
Mucicarmine Method for Acid Mucopolysaccharides

تحضير صبغ الميوسى كارمين Mucicarmine Staining Solution

ضع فى قارورة سعة ٢٥٠ سم^3، ١ جم كارمين Carmine، ١ جم هيدوكسيد الألومونيوم Aluminium Hydroxide، ٥٠ سم^3 ماء مقطر، ٥٠ سم^3 كحول مطلق. رج جيدا ثم أضف ٥٠٠ ملجم كلوريد ألومنيوم Aluminium Chloride أغلى المحلول لمدة ثلاث دقائق. برد المحلول إلى درجة حرارة الغرفة ثم أضف كمية من ٥٠٪ كحول حتى يعود المحلول إلى حجمه الأصلى ثم رشح. هذا المحلول يمكن استعماله خلال ١٢ شهرا. يحضر محلول الصباغة من هذا المحلول الأساسى بتخفيفه بنسبة ١:٤ بالماء المقطر.

خطوات العمل:

١ – اجر الخطوات من ١ – ٤ فى طريقة ب أ س PAS.
٢ – اصبغ أنوية الخلايا بالهيماتوكسيلين لمدة ١٠ دقائق. ثم أغسل القطاعات بماء الصنبور لمدة ٥ دقائق، وبعد ذلك ميز الصبغ باستخدام ١٪ كحول محمض باستخدام الميكروسكوب.
٣ – اغسل القطاعات بماء صنبور جارى لمدة خمس دقائق.
٤ – ضع القطاعات لمدة ٣٠ دقيقة فى محلول صبغ الميوسى كارمين.
٥ – اغسل القطاعات لمدة دقيقتين فى ماء صنبور.
٦ – انزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول، ثم روق فى الزيلول وغط بالكندا بلسم.

النتائج:

المواد عديدة التسكر المخاطية الحمضية ..... حمراء
أنوية الخلايا ..... زرقاء

obeikandl.com

الكشف عن المواد عديدة التسكر المخاطية المتعادلة

Demonstration of Neutral Mucopolysaccharides

توجد المواد عديدة التسكر المخاطية المتعادلة فى الطبقة المخاطية لمعدة الخنزير والكلب. ويعتبر الكيتين Chitin من أبسط المواد عديدة التسكر المخاطية المتعادلة.

وتعطى المواد عديدة التسكر المخاطية المتعادلة صباغة موجبة مع تفاعل كاشف (شف) ولكنها تعطى صباغة سالبة مع صبغ تلويدين بلو.

الكشف عن حمض الاسكوربيك Demonstration of Ascorbic Acid

يوجد حمض الاسكوربيك أو فيتامين ج بوفرة فى بعض أعضاء الجسم مثل غدة الكظر، الكبد، الغدة التيموسية، والجسم الأصفر فى المبيض. ولهذا الحمض وظائف هامة متعددة فى الجسم. والرمز الكيماوى له ك٦ يد٨ أ٦ $C_6 H_8 C_6$ ولهذا الفيتامين القدرة على اختزال أيونات الفضة إلى الصورة المعدنية فى وسط معتم عند أس هيدروجينى ٢,٥ وفقا للمعادلة الآتية:

$C_6 H_8 C_6 + 2 Ag^+$ (5% $AgNo_3$ in 3% acetic acid) $\xrightarrow{60C°,\ 1h}$ $C_6 H_6 O_6$ (dehydro-ascorbic acid) $+ 2H^+ + 2Ag\downarrow$

وقد استخدمت هذه الخاصية فى الكشف عن هذا الحمض هستوكيماويا.

الكشف عن حمض الأسكوربيك بطريقة بورن

Demonstration of Ascorbic Acid: Bourne Method

١ - ضع قطاعات طازجة من العضو المراد دراسته فى محلول نيترات الفضة المحمض (٥ سم٣ حمض خليك ثلجى +١٠٠ سم٣ من ٥٪ نيترات فضة) لمدة ٥-١٠ دقائق.

٢ - ضع القطاعات فى مكان معتم فى ٥٪ أمونيا لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة.

٣ - اغسل القطاعات فى ماء مقطر.

٤ - حمل القطاعات فى الجليسرين.

النتائج: تظهر حبيبات سوداء فضية تمثل حمض أسكوربيك مختزل.

الكشف عن حمض الأسكوربيك بطريقة باكاس:

Demonstration of Ascorbic Acid: Bacchus Method

١ - ضع قطع من العضو المراد دراسته فى زجاجة قاتمة بها ٥٪ نيترات فضة عند أس هيدروجينى ٢-٢,٥ وفى درجة حرارة ٥٦°م لمدة ٤٥ - ٦٠ دقيقة.

٢ - اغسل العينات فى تغييرتين من الماء المقطر (كلها ١٠ - ١٥ دقيقة) وذلك فى زجاجة قاتمة.

٣ - ضع العينات فى ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم Sodium Thoiosulphate لمدة ٣٠-٤٥ دقيقة وذلك فى زجاجة قاتمة أيضا.

٤ – انزع الماء فى الديوكسان.
٥ – اطمر العينات فى الشمع.
٦ – جهز قطاعات سمكها ٦ – ١٠ ميكرون.
٧ – أزل الشمع من القطاعات بالزيلول وغط بالكندا بلسم.

النتائج: الحبيبات السوداء تمثل حمض أسكوربيك مختزل.

الكشف عن حمض الأسكوربيك بطريقة جنسن وكافالجان
Demonstration of Ascorbic Acid: Jensen & Kavaljian Method

١ – ضع قطاعات شمعية سمكها ١٠ ميكرون على شرائح عليها مسحة من الألبيومين فى الحضانة عند درجة ٣٧°م لمدة ١٢ ساعة.
٢ – بدون إزالة للشمع من على الشرائح، ضع القطاعات فى ١٠٪ نيترات فضة فى ٣٪ حمض خليك لمدة ٨ – ١٤ ساعة.
٣ – اغسل الشرائح فى ٩٥٪ كحول ثم أنزع الماء بالكحول المطلق.
٤ – أزل الشمع من على الشرائح بالزيلول.
٥ – غط القطاعات بصمغ غير مختزل. وراعى تخزين القطاعات فى مكان معتم حيث أن وصول الضوء إليها يسبب تلف التفاعل الناتج.

النتائج: حبيبات الفضة المختزلة تدل على وجود حمض الأسكوربيك.

اللبيدات (الدهون) The Lipids

تشتمل اللبيدات بصورة عامة على الدهون وشبيهات الدهون وإن كان يطلق عليها لفظ «الدهون» بصورة عامة. وتشمل هذه المواد مركبات غير متشابهة من ناحية التركيب الكيماوى ولكنها متشابهة فى خاصية عدم الذوبان فى الماء، غير أنها تذوب فى مذيبات الدهون مثل الكحول والزيلول والبنزين والكلوروفورم وغيرها. ومن ذلك يتضح أهمية عدم استعمال مثبتات تحتوى على كيماويات مذيبة للدهون عندما يراد الكشف عنها هستوكيماويا.

وتوجد الدهون فى مختلف أجزاء النبات والحيوان، وتختلف كمياتها ونوعياتها فى الانسجة المختلفة، فهى توجد بنسبة ٥٠٪ فى ثمرة الزيتون وبنسبة ٣٠٪ فى بذرة الفول السودانى، وبنسبة أقل من ٥٪ فى الأوراق الخضراء – أما فى الحيوانات، فتوجد الدهون بنسب مرتفعة فى الأنسجة الضامة التى توجد تحت الجلد وفى نخاع العظم الأصفر وفى غشاء المساريقا وبالقرب من الكليتين حيث تعتبر الدهون مصدرا للطاقة، كما أنها مادة عازلة للمحافظة على حرارة الجسم، ولحماية الأعضاء الداخلية. كما يلاحظ أن الدهون قد تختزن بكثرة داخل خلايا بعض الأعضاء الجسمية مثل الكبد.

أنواع الدهون:

لا يوجد اتفاق عام على طريقة لتصنيف الدهون. إلا أن بعض المشتغلين بعلم كيمياء الأنسجة يتبعون عادة التقسيم الآتى:

أولاً: دهون بسيطة Simple Lipids

وهى استرات الأحماض الدهنية مع الكحول وتنقسم إلى مجموعتين:

(أ) الدهون المتعادلة أو الجلسريدات، وهى عبارة عن استرات الأحماض الدهنية والجلسرين. وتكون هذه المجموعة الدهون المختزنة.

(ب) الشموع: وهى استرات الأحماض الدهنية مع كحولات غير الجلسرين.

ثانيًا: الدهون المركبة Compound Lipids

وهى تنقسم إلى مجموعتين:

(أ) الدهون الفوسفورية: Phospholipids

وهى تعطى عند تحللها أحماضا دهنية وجلسرين أو كحولا آخر وحمض الفوسفوريك ومادة قاعدية مثل السرين Serine أو الكولين Choline. وتوجد هذه الدهون بوفرة فى النسيج العصبى. ومن أمثلتها الليسيثين Lecithin، والكيفالين Kephalins، سفنجوميلين Sphingomyelin، بلازمالوجين Plasmalogen.

(ب) جليكوليبدات (دهون سكرية) أو سربروسيدات: Glycolipids or Cerebrosides.

وهى تحتوى على أحماض دهنية وكحول مركب مثل سفنجوسين Sphingosine بالإضافة إلى مادة كربوهيدراتية قد تكون الجلوكوز أو الجالاكتوز. وهى توجد بوفرة فى الأنسجة العصبية أيضا.

ثالثًا: دهون مشتقة Derived Lipids

تشتمل هذه المجموعة على نواتج تحلل المجموعات السابقة مثل الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة والجليسرين والكحولات الأخرى والستيرويدات Steroids. وتضم الستيرويدات موادا هامة مثل هرمونات المناسل وهرمونات الغدد جار الكلية. وتسمى الستيرويدات المحتوية على مجموعة هيدروكسيل (OH group) باسم ستيرولات Sterols ومن أشهرها الكوليسترول الذى يوجد بوفرة فى الجلد والصوف والمخ وغدد جار الكلية وله أهمية خاصة فى بعض الحالات المرضية.

رابعًا: الكاروتينات Carotenoids

وهى صبغيات خلوية ذات الوان حمراء أو برتقالية وينتمى إلى هذه المجموعة أيضا الفلافين.

ومن ناحية أخرى، فإنه يمكن تمييز طرازين من الدهون هما:

(أ) دهون سهلة التمييز Visible Lipids

ويمكن بسهولة الكشف عنها بالاصباغ الخاصة بالدهون مثل سودان بلاك Sudan Black, وأويل رد أو Red Oil O

(ب) دهون مقنعة Invisible or masked lipids

وهى محاطة بغلالة من مادة بروتينية مما يجعل الكشف عنها عملية متعذرة ومن هنا سميت بالدهون المقنعة، وللكشف عنها يلزم أولا إزالة الغلالة البروتينية باستخدام انزيمات خاصة.

وقد لوحظ أن التقدم فى العمر وبعض المواد السامة تؤدى إلى تحول الدهون المقنعة إلى دهون سهلة التمييز.

ومن الملاحظ أن دهون الكبد تزداد مع بداية فترة تجويع الحيوان ويرجع ذلك إلى أن الدهون المختزنة بالجسم تمر إلى الكفد لاجراء بعض التحولات الكيماوية ومن ثم تحدث هذه الزيادة المؤقتة لدهون الكبد. أما مع زيادة فترة التجويع فإن دهون الكبد تقل تدريجيا بعد ذلك.

ومن المعروف أن الدهون فى الكبد مثلا تزداد كثيرا فى حالة الحرمان من مادة الكولين Choline فى الغذاء وكذلك فى حالة نقص المثيونين Methionine أو تناول المشروبات الكحولية لمدة طويلة. كما أن بعض المواد الكيماوية مثل الفوسفور ورابع كلوريد الكربون والكلوروفورم تؤدى إلى تحلل دهنى Fatty degeneration يبدو سيتولا بلازم الخلايا فيه محتويا على الفجوات وذلك فى التحضيرات الروتينية. ومن ناحية أخرى فإنه من المعروف أن حالات التحلل الخلوى autolysis تؤدى إلى ظهور الكولسترول فى الخلايا بعد أن كان مقنعا وغير ظاهر فى الخلايا السليمة.

ويلاحظ أن بعض المواد الكيماوية تستخلص بعض المواد الدهنية دون البعض الآخر فمثلا:

الاسيتون البارد : يزيل الجلسريدات، الكولسترول.
الاسيتون الساخن : يزيل السريروسيدات.
الاثير الساخن : يزيل اللسيسين والكيفالينات.
الكلوروفورم الساخن : يزيل كل الدهون.

طرق الكشف عن الدهون هستو كيماويا:

تثبت العينات المراد الكشف فيها عن الدهون فى مثبتات لا تحتوى على كيماويات مذيبة للدهون مثل الكحولات أو الكلوروفورم أو الاسيتون. ومن أشهر مثبتات الدهون الفورمالين، فورمال كالسيوم - ريجو وغيرها. وبعد التثبيت تجهز قطاعات بالكربوستات أو قطاعهات ثلجية ويفضل تجنب القطاعات الشمعية التى تتعرض فيها العينات للكحولات والزيلول.

ومن أشهر طرق الكشف عن الدهون بصفة عامة طريقة الصباغة باستخدام صبغ السودان الأسود Sudan Black وطريقة الصباغة باستخدام صبغ أويل رد أو Oil Red O

كما يستخدم صبغ نايل بلوسلفات Nile Blue Sulphate للتمييز بين الدهون الحمضية التى تعطى لونا أزرقا. والدهون المتعادلة التى تعطى لونا أحمرا.

وعادة ما تستخدم طريقة الهيماتين الحامضى Acid haematin test للكشف عن الفوسفوليبدات (دهون حمضية) حيث تعطى لونا أزرقا داكنا. ويمكن إذابة الفوسفوليبدات من عينات مثبتة فى محلول البوان المخفف وذلك بمعاملتها بالبيريدين Pyridine فى حرارة ٦٠°م.

وإذا ما أعطت المادة الدهنية تفاعلا موجبا مع كاشف شف Schiff's reagent فإن ذلك يعطى دليلا على أنها جليكوليبدات (دهون غير حمضية).

ويمكن الكشف هستو كيماويا عن الكولسترول باستخدام تفاعل حمض فوق الكلور – نافثوكينون Perchloric Acid-Naphthoquinone ومن المعروف أن الكولسترول ثنائى انكسار الضوء birefringence إذا ما فحصت القطاعات الثلجية المثبتة (التى ثبت وجود الدهون فيها) باستخدام الميكروسكوب المستقطب.

كما يمكن الكشف عن الأحماض الدهنية (دهون مشتقة حمضية غير فوسفورية هستوكيماوية بتفاعل (النحاس – حمض الروبينك). وهى تعطى تفاعلا موجبا مع صبغ السودان الأسود أو أويل رد أو ولونا أزرقا مع صبغ نايل بلوسلفات Nile blue sulphate وتفاعلا سلبيا مع صبغ الهيماتين الحمضى.

صباغة الدهون باستخدام صبغ السودان الأسود ب: (ليزون وداجنيلى ١٩٣٥)

Staining of Lipids by Sudan Black B (Lison and Dagnelie, 1935)

تحضير محلول الصباغة:

أضف ٤٠ سم^3 ماء مقطر إلى ٦٠ سم^3 ثلاثى اثيل فوسفات Triethyl phosphate ثم أضف ١ جم من صبغ السودان الأسود ب Sudan Black B ثم سخن إلى درجة ١٠٠°م لمدة خمس دقائق مع الرج المستمر. رشح الخليط وهو لا يزال ساخنا. يستخدم الرشيح للصباغة مع مراعاة ترشيحه قبيل كل استعمال.

خطوات العمل:

١ – ثبت العينات فى محلول الفورمالين.
٢ – اغسل العينات بالماء الجارى ٤ ساعات على الأقل.
٣ – جهز قطاعات ثلجية بالميكروتوم الثلجى أو بالكريوستات.
٤ – اغسل القطاعات بالماء المقطر.
٥ – اغمس القطاعات فى ٦٠٪ ثلاثى أثيل فوسفات.
٦ – ضع القطاعات فى محلول الصبغ لمدة عشر دقائق عند درجة ٢٠°م.
٧ – ميز الصبغ فى ٦٠٪ ثلاثى أثيل فوسفات.
٨ – اغسل القطاعات بالماء المقطر.
٩ – إذا أردت صباغة الأنوية ضعها فى محلول ماير كارم ألم Mayer's Carmalum لمدة ثلاث دقائق ثم أغسل الشرائح بالماء المقطر.
١٠ – غط القطاعات باستخدام جليسرين جيللى.

النتائج: المواد الدهنية تصبغ باللون الأسود المائل للزرقة. الأنوية – إن صبغت – تبدو حمراء اللون.

ملحوظة:

يمكن إذابة مسحوق الصبغ فى ٧٠٪ كحول اثيلى للحصول على محلول مشبع يرشح قبيل كل استعمال، مع مراعاة تمرير الشرائح فى ٧٠٪ كحول قبل الصباغة كما تجرى عملية تمييز الصبغ فى محلول ٧٠٪ كحول.

صباغة الدهون باستخدام صبغ أويل رد أو (محوره عن ليللى وأشبرن ١٩٤٣)

Staining of Lipids by Oil Red O (Lillie and Ashburn 1943).

تحضير محلول الصباغة:

أضف ٤٠ سم^{٣} ماء مقطر إلى ٦٠ سم^{٣} ثلاثى أثيل الفوسفات Triethyl Phosphate ثم أضف ١ جم أويل رد أو Oil Red O ثم سخن إلى درجة ١٠٠°م لمدة خمس دقائق مع الرج المستمر. رشح الخليط وهو لا يزال ساخنا. يستخدم الرشيح للصباغة مع مراعاة ترشيحه مرة أخرلاى قبيل كل استعمال.

خطوات العمل:

١ – ثبت العينات فى محلول الفورمالين.
٢ – اغسل العينات بالماء الجارى لازالة الفورمالين الزائد.
٣ – جهز قطاعات ثلجية.
٤ – اغسل القطاعات بالماء المقطر.
٥ – اغمس القطاعات فى ٦٠٪ ثلاثى أثيل الفوسفات. Triethyl phosphate.
٦ – ضع القطاعات فى محلول الصبغ لمدة عشر دقائق عند درجة ٢٠°م.
٧ – ميز الصبغ فى ٦٠٪ ثلاثى أثيل الفوسفات Triethyl Phosphate.
٨ – اغسل القطاعات بالماء المقطر.
٩ – إذا أردت صباغة الأنوية ضع القطاعات فى محلول الهيماتوكسيلين لمدة دقيقة واحدة.
١٠ – اغسل القطاعات بماء الصنبور لمدة خمس دقائق.
١١ – غط القطاعات باستخدام جليسرين جيللى.

النتائج:

المواد الدهنية ..... حمراء.
الأنوية – إن صبغت – ..... زرقاء.

obeikandl.com

طريقة نايل بلوسلفات للتمييز بين الدهون الحمضية وغير الحمضية (المتعادلة) (سمث - دترتش محورة عن كين - ١٩٤٧)

Nile Blue Sulphate for Acidic Lipids. (Smith-Dietrich, Modified by Cain, 1947)

المحاليل:

محلول (١) ١٪ محلول مائى من نايل بلوسلفات: Nile Blue Sulphate

محلول (٢) ٠,٠٢٪ محلول مائى نايل بلوسلفات: Nile Blue Sulphate.

محلول (٣) محلول تمييز ١٪ حمض خليك ثلجى: Glacial acetie Acid

خطوات العمل:

١ - جهز قطاعات ثلجية لعينات مثبتة فى الفورمالين.
٢ - تعامل مع قطاعين فى كل مرة.. ضع القطاعين فى الماء.
٣ - اصبغ القطاعين فى ١٪ نايل بلوسلفات لمدة خمس دقائق عند درجة ٦٠°م.
٤ - ميز القطاعين فى محلول التمييز لمدة نصف دقيقة عند درجة ٦٠°م.
٥ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور.
٦ - غط أحد القطاعين بواسطة جليسرين جيللى.
٧ - ضع القطاع الثانى فى محلول ٠,٠٢٪ نايل جلوسلفات لمدة خمس دقائق عند درجة ٦٠°م.
٨ - اغسل فى ماء صنبور.
٩ - ميز القطاع فى محلول التمييز لمدة نصف دقيقة عند درجة ٦٠°م.
١٠ - اغسل القطاع فى ماء الصنبور.
١١ - غط القطاع بواسطة جليسرين جيللى.

النتائج: من المفترض أن يكون لديك من نفس العينة قطاع سبق صباغته بصبغ السودان بلاك ب أو أويل رد أو، وذلك للتعرف على المواد الدهنية الموجودة بالعينة بصفة عامة. وإذا أعطينا هذه الشريحة رقم (٣)، فإن أية تراكيب نجدها مصبوغة فى القطاعين الأول والثالث تعتبر دهونا حمضية، كذلك فإن أية تراكيب نجدها مصبوغة فى القطاعين الثانى والثالث تعتبر دهونا متعادلة (غير حمضية).

طريقة استخلاص الدهون الفوسفورية باستخدام البيريدين (عن بيكر ١٩٤٦)

Extraction of phospholipids by pryidine (Baker, 1946)

١ - ثبت العينة فى محلول بوان مخفف لمدة ٢٠ ساعة وهو يحضر كما يلى:

حمض بكريك مائى مشبع	Saturated aqueous picric acid	٥٠ سم٣
فورمالين	Formalin	١٠ سم٣
حمض خليك ثلجى	glacial acetic acid	٥ سم٣
ماء مقطر	Distilled water.	٣٥ سم٣

٢ – اغسل العينة فى ٧٠٪ كحول لمدة ساعة واحدة.
٣ – ضع العينة فى ٥٠٪ كحول لمدة ثلاثين دقيقة.
٤ – اغسل العينة فى ماء صنبور جارى لمدة ثلاثين دقيقة أيضا.
٥ – ضع العينة لمدة ساعة واحدة فى البيريدين pyridine عند درجة ٢٢°م.
٦ – انقل العينة إلى محلول بيريدين جديد عند درجة ٢٢°م واتركها فيه لمدة ساعة واحدة.
٧ – انقل العينة إلى محلول بيريدين جديد عند درجة ٦٠°م واتركها لمدة ٢٤ ساعة.
٨ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى لمدة ساعتين.
٩ – اصبغ القطاعات بصبغ الهيماتين الحامضى الذى يصبغ الدهون الفوسفورية.

النتائج: من المفترض أن صبغة القطاعات بصبغ الهيماتين الحامضى بعد معاملتها بالبيريدين ستعطى نتيجة سلبية حيث يكون قد تم استخلاص الدهون الفوسفورية عند المعاملة بالبيريدين حسب الخطوات المبينة.

طريقة الهيماتين الحمضى للكشف عن الدهون الفوسفورية (بيكر عام ١٩٤٦)
Acid hematin method for Phospholipids (Baker, 1946)

تحضير المحاليل:

١ – المثبت Fixative

فورمالين	Formalin	١٠ سم^3
كلوريد كالسيوم (لامائى	calcium Chloride (anhydrous)	١٠ جم
مـاء مقطـر	Distilled water.	٩٠ سم^3

٢ – محلول ما بعد استخدام الكروم: Postchroming solution

بيكرومات البوتاسيوم	Potassium dichromate	٥ جم
كلوريد كالسيوم	Calcium chloride	١ جم
مـاء مقطـر	Distilled water	١٠٠ سم^3

٣ – محلول الهيماتين الحمضى: Acid haematin solution

هيماتين	Haematin	٥٠ ملجم
١٪ أيودات الصوديوم	1% Sodium iodate	١ سم^3
مـاء مقطـر	Distilled water	٤٩ سم^3

سخن المحلول حتى الغليان ثم اتركه ليبرد ثم أضف ١ سم^3 من حمض الخليك الثلجى.

٤ – محلول التمييز Differentiator

فيرى سيانيد البوتاسيوم	Potassium ferricyanide	٢٥٠ ملجم
رباعى بورات الصوديوم (البوراكس)	Sodium tetraborate (Borax)	٢٥٠ ملجم
مـاء مقطـر	Distilled water.	١٠٠ سم^3

obeikandi.com

خطوات العمل:

١ – ضع العينة فى المثبت لمدة ٦–١٢ ساعة عند درجة ٢٢°م.
٢ – انقل العينة مباشرة إلى محلول بعد الكروم Postchroming solution لمدة ١٨ ساعة عند درجة ٢٢°م.
٣ – انقل العينة إلى كمية جديدة من (محلول بعد الكروم) طازج لمدة ٢٤ ساعة عند درجة ٦٠°م.
٤ – اغسل العينة فى ماء صنبور جار لمدة ٦ ساعات.
٥ – جهز قطاعات ثلجية سمكها ١٠ ميكرون.
٦ – ضع القطاعات فى (محلول بعد الكروم) لمدة ساعة واحدة عند درجة ٦٠°م.
٧ – اغسل القطاعات جيدا فى الماء المقطر لمدة خمس دقائق.
٨ – ضع القطاعات فى محلول الهيماتين الحمضى acid haematin solution لمدة خمس ساعات عند ٦٠°م.
٩ – اغسل القطاعات فى ماء مقطر.
١٠ – انقل الشرائح إلى محلول تمييز الصبغ لمدة ١٨ ساعة عند درجة ٣٧°م.
١١ – اغسل الشرائح فى ماء صنبور لمدة عشر دقائق.
١٢ – غط القطاعات بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج: تأخذ الدهون الفوسفورية لونا أزرقا داكنا بينما تأخذ بقية التراكيب لونا أقل زرقة.

ملحوظة:

يستحسن اجراء استخلاص بالبيريدين فى مجموعة أخرى من الشرائح حيث ستعطى نتيجة سالبة مع هذه الطريقة للصباغة.

طريقة حمض فوق الكلور – نافثوكينون للكشف عن الكوليسترول (آدمز ١٩٦١)
Perchloric Acid Naphthoquinone Reaction for Cholosterol (Adams, 1981)

تحضير المحلول:

كحول اثيلى مطلق	Ethanol	٦ سم^3
٦٠٪حمض فوق الكلور	Perchloric Acid	٣ سم^3
فورمالين	Formalin	٠,٣ سم^3
ماء مقطر	Distilled water	٢,٧ سم^3

ثم أضف ١٢ ملليجرام من مادة ١ : ٢ نافثوكينون – ٤ – حمض سلفونيك:
1 : 2 Naphthoquinone – 4 – Sulphonic Acid.

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة فى فورمال كالسيوم أو فورمال ملحى ثم جهز قطاعات ثلجية. يمكنك استخدام غدة الكظر (جار الكلية) كقطاعات ضابطة حيث يتوفر الكولسترول فى هذه الغدة.
٢ – ضع القطاعات فى فورمالين واتركها فيه ٧ أيام.
٣ – حمل القطاعات على الشراح واتركها تجف فى درجة حرارة الغرفة.
٤ – ضع قطرات من المحلول الكاشف على القطاع.
٥ – سخن القطاعات لمدة عشر دقائق عند درجة ٦٠ – ٧٠°م. وخلال هذه الفترة يتغير لون القطاع من الأحمر إلى الأزرق الداكن.
٦ – غط القطاعات بواسطة ٦٠٪ حمض فوق الكلور.

النتائج: يأخذ الكوليسترول لونا أزرقا داكنا. ويبقى هذا اللون لساعات قليلة فقط.

الكشف عن الأحماض الدهنية باستخدام طريقة (النحاس– حمض الروبينك) هولستجر – ١٩٥٩

Copper-Rubeanic Acid Method for Fatty Acids (Holczinger, 1959)

تحضير المحاليل:

محلول ٠,٠٠٥٪ خلات النحاس:

خلات النحاس	Copper Acetate	٥	ملجم
ماء مقطر	Distilled water	١٠٠	سم^3

محلول اى دى تى أيه (0.1% E. D. T. A.)

حمض اثيلين دياميين رباعى خليك		٥	ملجم
Ethylenediamene tetra-acetic Acid			
ماء مقطر	Distilled water	٥٠	سم^3

محلول ٠,١٪ حمض روبينك:

حمض روبينك	Rubeanic Acid	٥٠	ملجم
كحول مطلق	Absolute Alcohol	٣٣	سم^3
ماء مقطر	Distilled water	١٥	سم^3

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة فى الفورمالين وجهز قطاعات ثلجية أو قطاعات بالكريوستات.
٢ – ضع القطاعات لمدة ٣ – ٥ ساعات فى محلول خلات النحاس.
٣ – اغسل القطاعات فى تغييرتين من محلول E. D. T. A. كل منها لمدة عشر ثوان لازالة النحاس المتص الزائد.

obeikandl.com

٤ – اغسل القطاعات فى ماء مقطر لمدة عشر دقائق.
٥ – ضع القطاعات لمدة ٣٠ دقيقة فى محلول حمض الروبينك.
٦ – اغسل القطاعات لمدة ٣ دقائق فى ٧٠٪ كحول.
٧ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى.
٨ – غط القطاعات بواسطة جليسرين جيللى أو أنزع الماء من القطاعات بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول وغط بصمغ دى بى أكس D. P. X.

النتائج: تأخذ الأحماض الدهنية لونا أسودا مخضرا.

الانزيمات The Enzymes

مقدمة عامة:

تعتبر الانزيمات موادا بروتينية متخصصة للقيام بدور العوامل المساعدة فى التفاعلات البيولوجية. ويعرف الآن أكثر من ألفى أنزيم، إلا أن عددا قليلا منها يمكن الكشف عنه بالطرق الهستوكيماوية. وقد تنوعت طرق تسمية وتصنيف الانزيمات إلى حد كبير. ومن المتفق عليه الآن تقسيم الانزيمات إلى ست مجموعات، تنقسم كل مجموعة إلى مجموعات أصغر فأصغر حسب خصائص معينة، ويعطى كل أنزيم رقما خاصا به يتكون من أربعة أعداد للدلالة عليه، مما يساعد على تحديد الانزيم والتعرف على بعض خصائصه، ويطلق على هذا الرقم اسم (رقم لجنة الانزيمات Enzyme Commission No.).

وتعطى دراسة أى أنزيم هستوكيماويا صورة عن طريقة توزيعه فى الأنسجة والخلايا ومدى كثافة نشاط الانزيم فى المناطق التركيبية المختلفة، ومن ذلك يمكن استنباط الدور الوظيفى الذى تلعبه تراكيب معينة بالانسجة والخلايا.

كما أن دراسة الانزيمات فى بعض الحالات المرضية وغير السوية ضرورية لتفهم آلية الخلل الحادث فى مثل هذه الحالات. فمن المعروف مثلا أن انزيم الفوسفاتيز الحمضى يزداد كثيرا فى غدة البروستاتا المصابة السرطان، كما أن انزيم أستيل كولين استيريز يقل كثيرا فى الخلايا العصبية فى الحيوانات المسممة بمبيدات عضوية فوسفورية، وتساعد المعرفة بذلك فى اجراء التشخيص الطبى فى هذه الحالات.

ويراعى فى طرق الكشف عن الانزيمات – بصفة عامة – عدم تعريض النسيج لدرجات حرارة عالية تجنبا لتكسر وتلف الانزيمات، ولذا يلاحظ تجنب طريقة القطاعات الشمعية وتجهيز قطاعات بالكريوستات أو بالميكروتوم الثلجى. كما يراعى تهيئة الأس الهيدروجينى المناسب لعمل الانزيم، ولذا فإن القطاعات توضع عادة فى محلول منظم مناسب مما يساعد على قيام الانزيم بدوره فى اجراء التفاعل الكيماوى المطلوب.

وفى مجال كيمياء الأنسجة، تدل نواتج التفاعل على مدى نشاط الانزيم. وعادة ما تكون نواتج

التفاعل غير ملونة مما يتعذر معه تحديدها بالميكروسكوب. وعلى ذلك تضاف – فى معظم الحالات – مادة معينة أو أكثر إلى نواتج التفاعل، تتفاعل مع احدها لتعطى لونا يمكن تعيينه بالفحص المجهرى وذلك وفقا للمعادلة العامة الآتية:

$$AB \xrightarrow{E} A + B$$

$$B + R \longrightarrow BR \text{ (Coloured)}$$

حيث (AB) هى المادة التى توضع فيها القطاعات لكى يعمل عليها الانزيم (E)المفترض وجوده فى النسيج. أما (R) فهو المادة التى تضاف إلى نواتج التفاعل لكى تعطى لونا.

وسوف نتناول هنا بعض طرق الكشف الهستوكيماوى عن بعض مجموعات الإنزيمات وهى:

أولاً: إنزيمات الفوسفاتيز Phosphatases
ثانيًا: إنزيمات الاستيريز Esterases
ثالثًا: إنزيمات نزع الهيدروچين Dehydrogenases
رابعًا: إنزيمات الأكسدة Oxidases

أولاً: إنزيمات الفوسفاتيز Phosphatase Enzymes

تقوم هذه الأنزيمات بعملية تحلل مائى Hydrolysis لاسترات المواد العضوية الفوسفورية. وتعمل بعض انزيمات الفوسفاتيز على مادة خاضعة Substrate واحدة ويطلق عليها اسم «أنزيمات الفوسفاتيز المتخصصة Specific Phosphatases مثل انزيم أدينوزين ثلاثيلأ الفوسفاتيز Adenosine triphosphatase وانزيم جلوكوز – ٦ – فوسفاتيز Glucose – 6 – Phosphatase. أما البعض الآخر من هذه الأنزيمات، فيمكن أن يعمل كل منها على عدد من المواد الخاضعة Substrates ويطلق عليها اسم انزيمات الفوسفاتيز غير المتخصصة Nonspecific Phosphatases وهى تنقسم إلى مجموعتين، أولهما تعمل فى وسط قاعدى (حوالى ٩,٢) ويطلق عليها اسم «أنزيمات الفوسفاتيز القاعدية Alkaline Phosphatases، وتعمل المجموعة الثانية فى وسط حمضى (حوالى ٥) ويطلق عليها اسم انزيمات الفوسفاتيز الحمضى Acid Phosphatases.

وتوجد انزيمات الفوسفاتيز القاعدى بوفرة عند الحافة المخططة Striated border للخلايا العمودية الامتصاصية بالأمعاء الرفيعة وكذلك عند الحافة الفرجونية Brush border لخلايا الأنيبيبات الملتفة القريبة فى الكلى. ويدل هذا التوزيع للانزيم على علاقته الوثيقة بعملية الامتصاص ومرور المواد عبر الغشاء الخلوى. كما وجد أن هذا الانزيم يقع عند حواف الخلايا العصبية مما يدل على أنه يلعب دورا هاما فى التبادل الأيونى الحادث عند الغشاء الخلوى لهذه الخلايا.

وتوجد أنزيمات الفوسفاتيز الحمضى داخل الليزوسومات حيث تلعب دورا هاما فى عملية الهضم الخلوى فى الحالات السوية والمرضية.

obeikandl.com

الكشف عن انزيمات الفوسفاتيز القاعدى Demonstration of alkaline phosphatases

طريقة جومورى وتاكاماتسو Method of Gomori and Takamatsu

اقترح هذه الطريقة جومورى Gomori من الولايات المتحدة الأمريكية وتاكاماتسو Takamatsu من اليابان، كل على حدة فى عام ١٩٣٩، وهى تعرف للاختصار بطريقة جومورى الذى عدلها سنة ١٩٥٢. وتبعا لهذه الطريقة تثبت العينات فى محلول فورمال كالسيوم، ثم تجهز قطاعات ثلجية أو بالكريوستات، وتوضع القطاعات لمدة حوالى ساعة عند درجة ٣٧°م فى محلول يحتوى على المادة الخاضعة Substrate (بيتا جلسروفوسفات الصوديوم Sodium Beta Glycerophosphate) ونيترات الكالسيوم ومنظم Buffer لضبط الأس الهيدروچينى عند حوالى ٩,٢ كما تضاف مادة كلوريد الماغنسيوم التى تعمل كمنشط Activator. وتجرى التفاعلات وفقا للمعادلات الآتية:

$$\text{Sodium beta glycerophosphate} \xrightarrow[\text{PH } 9.2]{\text{Alkaline Phosphatase}} \text{Phosphate ions}$$

$$\text{Phosphate ions} + \text{Calcium ions} \longrightarrow \text{Calcium phosphate}$$

ثم تغسل القطاعات وتغمس فى محلول ٢٪ نيترات الكوبالت فيتم التفاعل وفقا للمعادلة الآتية:

Calcium Phosphate + Cobalt ions → Cobalt Phosphate

ثم يعاد غسيل القطاعات وتعامل بمحلول ٢٪ كبريتيد الأمونيوم الصفراء Yellow ammonium sulphide فينتج راسب أسود فى النسيج يدل على كثافة وموقع النشاط الانزيمى وذلك وفقا للمعادلة الآتية:

Cobalt Phosphate + Sulphide ions → Cobalt sulphide

وتجرى طريقة العمل وفقا للخطوات الآتية:

محلول الحضن: Incubating medium

٢٪ صوديوم بيتاجلسروفوسفات	Sodium beta glycerophosphate	٢٠ سم^3
٢٪ فيرونال الصوديوم	Sodium Veronal	٢٠ سم^3
٢٪ نيترات الكالسوم	Calcium nitrate	٤٠ سم^3
١٪ كلوريد ماغنسيوم	Magnesium chloride	٢ سم^3
ماء مقطر	Distilled water	١٠ سم^3

من المفترض أن تكون درجة الأس الهيدروچينى حوالى ٩,٢.

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة فى فورمال كالسيوم عند درجة ٤°م. وأزل الزائد من الفورمالين بماء جارى.
٢ – جهز قطاعات ثلجية.
٣ – اغسل القطاعات بالماء.
٤ – ضع القطاعات فى محلول الحضن عند درجة ٣٧°م لمدة ساعة واحدة.
٥ – اغسل القطاعات فى تغييرتين من الماء المقطر.
٦ – ضع القطاعات لمدة ثلاث دقائق فى ٢٪ نيترات الكوبالت.
٧ – اغسل القطاعات جيدا فى تغييرتين من الماء المقطر.
٨ – ضع القطاعات لمدة دقيقتين فى ١٪ كبريتيد الأمونيوم الصفراء.
٩ – اغسل القطاعات جيدا بالماء المقطر.
١٠ – اصبغ الأنوية – إذا أردت – فى ٢٪ مثيل جرين Methyl green(مستخلصة بالكلوروفورم).
١١ – اغسل بماء صنبور جار.
١٢ – غط القطاعات بالجلسرين جيللى.

النتائج: يبدو نشاط انزيمات الفوسفاتيز القاعدى بلون أسود يميل للبنى الأنويه – أن صبغت – تبدو خضراء اللون.

طرق الآزو داى للكشف عن انزيمات الفوسفاتيز القاعدى

Azo-dye Methods for Alkaline Phosphatases

هناك ثلاثة أساليب لطرق الآزوداى للكشف عن انزيمات الفوسفاتيز القاعدى.

(أ) طريقة التفاعلات الآتية: Simultaneous Coupling Methods

فى هذه الطريقة توضع القطاعات فى محلول يحتوى على المنظم buffer لضبط الأس الهيدروچينى عند ٩,٢ وعلى ملح الديازونيم Diazonium Salt وعلى صوديوم ألفا نافثيل Sodium-alpha Naphthyl. يعمل الانزيم على مادة صوديوم ألفا نافثيل حيث يحرر منها ألفا نافثول الذى يتفاعل فى الحال مع ملح ديازونيم مثل فاست بلو ار ار Fast blue RR أو فاست رد تى آر Fast Red TR، وينتج عن ذلك آزو داى غير ذائب فى موقع نشاط الانزيم وبذلك يمكن تحديده بالميكروسكوب. وذلك وفقا للمعادلتين الآتيتين:

$$\text{Sodium alpha Naphthyl acid phosphate} + H_2O \xrightarrow{E} \text{alpha Naphthol} + \text{Sodium phosphate}$$

$$\text{Alpha Naphthol} + \text{diazonium salt} \rightarrow \text{Azo dye} + H_2O$$

طريقة العمل:

محلول الحضن	Incubating Medium	١٠ ملجم
فوسفات صوديوم ألفانافثيل	Sodium naphthyl phosphate	
٠,١ جزىء جرامى من منظم ترس أسه الهيدروچينى (١٠)		١٠ سم^{٣}
0.1 M Tris buffer, pH 10.0		
ملح ديازونيم (فاست رد تى آر)	Diazonium salt (Fast red TR)	١٠ ملجم

ويلاحظ أن صوديوم ألفا نافثيل فوسفات تذاب أولا فى المنظم ثم يضاف ملح ديازونيم ويخلط جيدا ثم يرشح المحلول ويستخدم فى الحال. الاس الهيدروچينى للمحلول النهائى سيكون حوالى ٩,٢.

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة فى فورمال كالسيوم.
٢ – جهز قطاعات ثلجية.
٣ – اغسل القطاعات بالماء.
٤ – ضع القطاعات لمدة من ١٠ – ٦٠ دقيقة فى محلول الحضن فى درجة حرارة الغرفة.
٥ – اغسل القطاعات فى ماء مقطر.
٦ – اذا أردت صباغة الأنوية، ضع القطاعات فى ٢٪ ميثيل جرين methyl green (مستخلص بالكلوروفورم).
٧ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى.
٨ – غط القطاعات فى جلسرين جيللى.

النتائج: نشاط أنزيم الفوسفاتيز القاعدى يظهر بلون بنى محمر، الأنوية – إن صبغت – تبدو بلون أخضر.

(ب) طريقة إنتاج الآزو داى بعد حدوث التفاعل للكشف عن انزيمات الفوسفاتيز القاعدى Azo-dye Post-coupling Method for Alkaline Phosphatases

فى هذه الطريقة توضع القطاعات فى محلول يحتوى على منظم أسه الهيدروچينى ٩,٢ وعلى صوديوم ألفا نافثول. فيعمل الانزيم فى القطاعات على تحرير مادة ألفا نافثول. ثم تنقل القطاعات إلى محلول يحتوى على ملح ديازونيم حيث تتفاعل معه مادة ألفا نافثول فينسج بذلك الآزو داى. وبهذا فإن الآزو داى ينتج فى خطوة مستقلة بعد تمام حدوث الخطوة الأولى الخاصة بالتفاعل الانزيمى.

ولهذه الطريقة ميزات عن الطريقة السابقة، منها تجنب التأثير التثبيطى لملح الديازونيم على

النشاط الانزيمى، وكذلك عدم التقيد بأس هيدروچينى واحد يحدث عنده التفاعلان. كما أنه يمكننا من أتاحة أطول وقت ممكن للتفاعل الأول دون الخوف من إنتشار الآزو داى الناتجة من التفاعل الثانى عن مكانها الأصلى المحدد لموقع الإنزيم.

ولضمان دقة ما نحصل عليه من نتائج فى هذه الطريقة يجب أن نتأكد من أن نواتج نشاط الانزيم هى مواد غير ذائبة وأنها تبقى فى مكانها (مكان النشاط الانزيمى) طوال فترة وجود القطاعات فى المحلول الأول.

(جـ) طريقة استخدام بدائل لمادة صوديوم ألفا نافثول فى تفاعلات آنية:

Azo-dye Simultaneous coupling method using substituted naphthols

اقترح هذه الطريقة (برستون) Burstone عامى ٥٨، ١٩٦١، حيث استخدم أربع من استرات للنافثول هى:

Naphthol As – BI phosphate

Naphthol AS – MX phosphate

Naphthol AS – CI phosphate

Naphthol AS U TR phsophate

وتتميز هذه الاسترات بسرعة تحللها بواسطة الإنزيم الواقع داخل النسيج معطية مشتقات للنافثول تتميز بعدم ذوبانها، وهى تتحد فى الحال مع ملح ديازونيام لتعطى آزو داى غير ذائب فى مكان نشاط الإنزيم.

خطوات العمل:

تحضير المحاليل:

محلول النافثول الأساسى: Naphthol AS – BI stock solution

نافثول AS-BI فوسفات	Napthol AS-BI phosphate	٢٥ ملجم
ن ن – داى مثيل فورماميد	N:N – Dimethyl formamide	١٠ سم^{٣}
مـاء مقطـر	Distilled water	١٠ سم^{٣}

محلول جزئى جرامى من كربونات الصوديوم Molar sodium carbonate ٢ – ٦ قطرات.

يلاحظ إضافة المواد حسب الترتيب الموضح أعلاه. وتستخدم قطرات كربونات الصوديوم حتى يتم ضبط الاس الهيدروچينى عند (٨) ثم أضف ٣٠٠ سم^{٣} مـاء مقـطر، ١٨٠ سم^{٣} من محلول ٠,٢ جزيئى من منظم ترس Tris buffer. والمحلول يمكن استخدامه لعدة شهور.

محلول الحضن: Incubating medium

المحلول الأساسى	Stock solution	١٠ سم^{٣}
فاست رد تى آر	Fast Red TR	١٠ ملجم

رج جيداء رشح ثم استخدم المحلول فى الحال.

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة فى محلول فورمال كالسيوم ثم أزل الزائد من الفورمالين.
٢ – جهز قطاعات ثلجية.
٣ – اغسل القطاعات بالماء.
٤ – ضع القطاعات فى محلول الحضن لمدة من ٥ – ١٥ دقيقة فى درجة حرارة الغرفة.
٥ – اغسل القطاعات بالماء.
٦ – إذا أردت صباغة الأنوية ضع القطاعات فى محلول ٢٪ مثيل جرين methyl green (مستخلص بالكلوروفورم).
٧ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور جار.
٨ – غط القطاعات بجلسرين جيللى.

النتائج: تبدو مناطق نشاط إنزيمات الفوسفاتيز القاعدى بلون أحمر والأنوية بلون أخضر.

الكشف عن انزيمات الفوسفاتيز الحمضى

طريقة جومورى (١٩٤١) Gomori Method (1941):

تختلف هذه الطريقة قليلا عن تلك المستخدمة فى حالة الفوسفاتيز القاعدى، ذلك أن فوسفات الكالسيوم الناتجة من التفاعل مع الإنزيم الأخير لا يمكن استخدامها هنا حيث أنها تذوب فى الوسط الحمضى. لذلك تستخدم نيترات الرصاص lead nitrate لترسيب أيونات الفوسفات. وعلى ذلك فإن المحلول الذى سيوضع فيه القطاعات يحتوى على صوديوم بيتا جلسروفوسفات ونيترات الرصاص، بالإضافة إلى المحلول المنظم. وبعد ذلك تغسل القطاعات بالماء وتعامل بمحلول ½٪ كبريتيد الأمونيوم الصفراء yellow ammonium sulphide فينتج راسب أسود من كبريتيد الرصاص يمكن رؤيته بالميكروسكوب وبذلك يتحدد لنا كثافة الإنزيم وتوزيعه. وتحدث التفاعلات وفقا للمعاملات الآتية:

$$\text{Sodium Beta glycerophosphate} \xrightarrow[\text{pH:5}]{\text{Acid phosphatases}} \text{phosphate}$$

$$\text{Phosphate} + \text{lead} \rightarrow \text{lead phosphate}$$

$$\text{lead phosphate} + \text{sulphide} \rightarrow \text{lead sulphide}$$

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة فى محلول فورمال كالسيوم ثم أزل الفورمالين الزائد.
٢ – جهز قطاعات ثلجية.
٣ – ضع القطاعات فى محلول حضن طازج التحضير عند درجة ٣٧°م لمدة تتراوح بين ٣٠ دقيقة إلى ٤ ساعات. ويتكون محلول الحضن من ٠,٠١ جزىء جرامى من بيتا جلسروفوسفات الصوديوم فى ٠,٠٥ جزىء جرامى من منظم خلات Acetate buffer أسه

الهيدروچينى (٥) يحتوى على ٠,٠٠٤ جزىء جرامى نيترات رصاص. ويمكنك تحضير محلول الحضن بإذابة ١٣٢,٤ ملجم نيترات رصاص فى ١٠٠ سم^3 منظم خلات: أسه الهيدروچينى (٥)، ثم تضيف باحتراس مع الرج ٢٢٩ ملجم من بيتا جلسرو فوسفات الصوديوم. ويحضر منظم الخلات المشار إليه بأخذ ٠,٣٨ سم^3 من حمض خليك ثلجى ثم تكملها إلى ١٠٠ سم^3 بالماء المقطر ثم أخذ ٠,٨٢٠ جم خلات الصوديوم وإذابتها فى ٢٠٠ سم^3 ماء مقطر ثم تضيف المحلولين بعضهما إلى بعض وتأخذ من المحلول الناتج مقدار ١٠٠ سم^3 المطلوبة.

يراعى ألا يتكون فى محلول الحضن أى راسب.

٤ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر.

٥ – ضع القطاعات فى $\frac{1}{2}$٪ محلول كبريتيد الأمونيوم الصفراء لمدة تتراوح من دقيقة إلى دقيقتين.

٦ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر.

٧ – إذا أردت صباغة سيتوبلازم الخلايا، ضعها فى ١٪ محلول أيوسين Eosin لمدة خمس دقائق.

٨ – اغسل القطاعات وغط بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج: يستدل على نشاط انزيمات الفوسفاتيز الحمضى بوجود راسب من كبريتيد الرصاص ذو لون أسود. ومن الممكن أن يكون الراسب على شكل حبيبات أو أن يكون الراسب موجودا بصورة انتشارية.

طريقة الآزو داى للكشف عن انزيمات الفوسفاتيز الحمضى

Azo-dye Method for Acid phosphatases

تحضير محلول التحضين:

صوديوم ألفا نافثيل فوسفات	Sodium–alphanaphthyl phosphate	١٠ ملجم
٠,١ جزىء جرامى منظم خلات ذو أس هيدروچينى (٥) 0.1 M-acetate buffer		١٠ سم^3
فاست جارنت (ملح ديازونيم)	Fast Garnet G.B.C.	١٠ ملجم

حيث يذاب صوديوم ألفا نافثيل فوسفات فى منظم الخلات ثم يضاف ملح الديازونيم يرشح المحلول ويستخدم فى الحال.

خطوات العمل:

١ – ثبت العينات فى فورمال كالسيوم ثم أزل الزائد من الفورمالين.

٢ – جهز قطاعات ثلجية.

٣ – ضع القطاعات فى محلول التحضين عند درجة ٣٧°م لمدة ١٥ – ٦٠ دقيقة.

٤ – اغسل القطاعات فى ماء مقطر.

obeikandl.com

٥ – غط القطاعات بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج: تظهر مناطق نشاط أنزيمات الفوسفاتيز الحمضى بلون أحمر

الكشف عن انزيم (٥ نيوكليوتايديز): Demonstration of 5-Nucleotidase

طريقة ووتشستاين وميسيل – ١٩٥٧ Wachstein and Meisel, 1957

يعمل هذا الانزيم على تحلل استرات الفوسفات الواقعة على ذرة الكربون رقم ٥ فى الريبونيوكليوسيدات Ribonucleosides والدى ريبو نيو كليوسيدات Deoxyribonucleosides. وذلك وفقا للمعادلة الآتية: adenosine 5-phosphate + H_2O → adensine + phosphate

تحضير محلول التحضين: Preparation of Incubating Medium

١,٢٥٪ ادينوزين – ٥ – فوسفات	Adenosine-5-phosphate	٤ سم^3
٠,٢ جزىء جرامى منظم تراس أسه الهيدروچينى ٧,٢	Tris-buffer	٤ سم^3
٢٪ نيترات رصاص	Lead nitrate	٠,٦ سم^3
٠,١ جزىء جرامى كبريتات ماغنسيوم	Magnesium sulphate	١ سم^3
ماء مقطر	Distilled water	٠,٥ سم^3

خطوات العمل:

١ – ثبت العينات فى محلول فورمال كالسيوم عند درجة حرارة ٤°م، ثم أزل الفورمالين الزائد. ثم جهز قطاعات بالكريوستات. يفضل عمل قطاعات بدون اجراء تثبيت سابق.
٢ – ضع القطاعات فى محلول الحضن عند درجة ٣٧°م لمدة ساعة واحدة.
٣ – إذا لم يكن قد سبق تثبيت العينة، ثبت القطاعات فى فورمال ملحى.
٤ – انقل القطاعات بقضيب زجاجى إلى الماء المقطر.
٥ – كرر غسيل القطاعات فى الماء المقطر.
٦ – ضع القطاعات فى محلول ١٪ كبريتيد الأمونيوم لمدة ٣ دقائق.
٧ – اغسل القطاعات جيدا فى الماء المقطر.
٨ – كرر غسل القطاعات فى الماء المقطر.
٩ – ضع القطاعات على شرائح زجاجية واتركها برهة لتجف ثم غط القطاعات بجلسرين جيللى.

النتائج: يبدو نشاط انزيم 5-nucleotidase على صورة راسب بنى مسود.

الكشف عن إنزيم (جلوكوز – ٦ – فوسفاتيز) Demonstration of glucose-6-phosphatase

طريقة ووتشستاين وميسيل (١٩٥٦) Wachstein and Meisel, 1956

يوجد إنزيم (جلوكوز – ٦ – فوسفاتيز) بوفرة فى الكبد حيث يعمل على مركب

جلوكوز – ٦ – فوسفات لتحرير الجلوكوز إلى الدورة الدموية. ولا يوجد هذا الانزيم فى العضلات أو المخ. ويزيد الانزيم فى أكباد الحيوانات المصابة بمرض السكر.

تحضير محلول التحضين: Preparation of Incubating medium

١٢٥٪ جلوكوز – ٦ – فوسفات	glucose–6–Phosphate	٤ سم٣
منظم تراس ماليت	Tris maleate	٤ سم٣
٢٪ نيترات رصاص	Lead nitrate	٠,٦ سم٣
ماء مقطر	Distilled water	١,٤ سم٣

خطوات العمل:

١ – جهز قطاعات بالكريوستات سمكها ١٥ ميكرون دون تثبيت مسبق.
٢ – ضع القطاعات فى محلول الحضن عند درجة ٣٧°م لمدة ٥ – ٢٠ دقيقة.
٣ – اغسل القطاعات جيدا فى تغييرتين من الماء المقطر لمدة دقيقتين لكل تغييره.
٤ – ضع القطاعات فى ١٪ كبريتيد الأمونيوم لمدة دقيقتين.
٥ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر.
٦ – ثبت القطاعات فى ١٠٪ فورمالدهيد لمدة ١٥ – ٣٠ دقيقة.
٧ – اغسل القطاعات فى ماء مقطر.
٨ – غط القطاعات بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج: يبدو نشاط انزيم جلوكوز – ٦ – فوسفات بلون أسود يميل للبنى.

الكشف عن إنزيم ادينوزين ترای فوسفاتير

Demonstration of Adenosine Triphosphatase

طريقة ووتشستاين وميسيل – ١٩٦٠ Wachstein and Meisel, 1960.

يعمل هذا الإنزيم على مادة ادينوزين ترای فوسفات التى تعتبر مخزنا للطاقة.

تحضير محلول التحضين Preparation of Incubating Medium

٠,١٢٥ أدينوزين ترای فوسفات	Adenosine Triphosphate	٤ سم٣
منظم تراس	Tris buffer	٤ سم٣
٢٪ نيترات الرصاص	Lead nitrate	٠,٦ سم٣
ماء مقطر	Distilled water	٠,٤ سم٣

خطوات العمل:

١ – جهز قطاعات بواسطة الكريوستات دون تثبيت سابق.
٢ – ضع القطاعات فى محلول الحضن عند درجة ٣٧°م لمدة ١٠ – ٦٠ دقيقة.
٣ – اغسل القطاعات فى تغييرتين من الماء المقطر، لمدة دقيقة واحدة لكل تغييره.

obeikandi.com

٤ – ضع القطاعات فى محلول ١٪ كبريتيد الأمونيوم لمدة دقيقتين.
٥ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور لمدة دقيقتين.
٦ – غط القطاعات بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج: يبدو نشاط انزيم أدينوزين تراى فوسفاتيز فى صورة راسب أسود يميل إلى البنى.

ثانيًا: إنزيمات الإستيريزات
Esterases

تعمل إنزيمات الإستيريزات على تحلل إسترات أحماض الكربوكسيل Esters of Carboxylic Acids، ويمكن تصنيف هذه الانزيمات من الناحية الهستوكيماوية إلى:

أولاً: الليبيز Lipase

وهو بصفة عامة يعمل على تحلل استرات الأحماض الدهنية ذات السلاسل الطويلة.

ثانيًا: الإستيريزات غير المتخصصة: Non-Specific Esterases

وهى تحلل استرارت الكولين فقط ومن ثم تعتبر استيريزات مخصصةSpecific Esterases وهى تنقسم بدورها إلى:

(أ) أستيل كولين استيريز Acetyl Cholinesterases

وهو يحلل مادة الأستيل ثيوكولين Acetyl thiocholine وكذلك مادة خلات ألفا نافثيل ∝–Naphthyl acetate

(ب) كولين استيريزات غير متخصصة Non-Specific Cholinesterases

وهى تحلل استرات الكولين غير الأستيل أسرع مما يقوم به الاستيل كولين استيريز.

ومن المعروف أن إنزيمات الكولين استيريز يقل نشاطها كثيرا تحت تأثير المركبات العضوية الفوسفورية.

الكشف عن إنزيمات الإستيريز غير المتخصصة (طريقة جومورى – ١٩٥٠)
Non-Specific Esterase (Gomori, 1950)

باستخدام خلات ألفا نافثيل: ... ∝ – Naphthyl Acetate Method

تحضير محلول التحضين: Preparation of Incabating Medium

خلال ألفا نافثيل	∝–Naphthyl acetate	٥	ملجم
أستيون	Acetone	٠,١	سم^{٣}
٠,٢ جزىء جرامى منظم فوسفات أسه ٧,٤	Phosphate buffer	١٠	سم^{٣}
فاست بلوبى	Fast blue B	٣٠	ملجم

حيث تذاب خلات ألفا نافثيل فى الأسيتون ثم يضاف منظم الفوسفات ويرج الجميع جيدا. أضف مادة فاست بلو بى ثم رشح المحلول واستخدمه فى الحال.

خطوات العمل:

١ - ثبت العينات ثم جهز قطاعات بالكريوستات، أو ثبت القطاعات. ثم مررها إلى الماء.

٢ - ضع القطاعات فى محلول الحضن فى درجة حرارة الغرفة لمدة تتراوح من ثلاثين ثانية حتى ١٥ دقيقة.

٣ - اغسل القطاعات فى ماء صنبور جارى لمدة ثلاث دقائق.

٤ - غط القطاعات بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج: يعطى نشاط إنزيمات الإستيريز لونا بنيا يميل للحمرة.

الكشف عن إنزيم الليبيز باستخدام مادة التوين (جوموري، ١٩٥٢)

Demonstration of Lipase by Tween Method (Gomori, 1952)

تحضير المحاليل:

محلول رقم (١)

منظم تراس أسه الهيدروچينى ٧,٢	Tris buffer

محلول رقم (٢):

ستوين ٦٠	Tween 60	٥ جم
منظم تراس أسه الهيدروچينى ٧,٢	Tris buffer	١٠٠ سم^3
ثيمول	Thymol	بلورة واحدة

محلول رقم (٣):

كلوريد الكالسيوم	Calcium chloride	٢٠٠ ملجم
ماء مقطر	Distilled water	١٠ سم^3

محلول رقم (٤):

نيترات الرصاص	Lead nitrate	١ جم
ماء مقطر	Distilled water	٥ سم^3

تحضير محلول الحضن: Preparation of Incubating Medium

محلول رقم (١)	٩ سم^3
محلول رقم (٢)	٠,٦ سم^3
محلول رقم (٣)	٠,٣ سم^3

oberkandl.com

خطوات العمل:

١ – ثبت العينة ثم جهز قطاعات بواسطة الكريوستات ثم مررها إلى الماء.
٢ – ضع القطاعات فى محلول الحضن عند درجة ٣٧°م لمدة تتراوح بين ساعتين إلى ثمان ساعات.
٣ – اغمس القطاعات فى ثلاث تغييرات من الماء المقطر.
٤ – سخن محلول نيترات الرصاص حتى درجة ٥٥°م ثم ضع القطاعات فى المحلول لمدة عشر دقائق.
٥ – اغمس القطاعات فى الماء المقطر لمدة دقيقتين.
٦ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور لمدة عشر دقائق.
٧ – ضع القطاعات فى محلول ١٪ كبريتيد الأمونيوم لمدة ثلاث دقائق.
٨ – اغمس القطاعات فى ماء مقطر.
٩ – اغسل القطاعات فى ماء صنبور.
١٠ – غط القطاعات بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج: نشاط انزيم الليبيز يظهر بلون أسود يميل إلى البنى المصفر.

الكشف عن الكولين استيريز باستخدام الثيوكولين (جومورى – ١٩٥٢)
Demonstration of Cholinesterase by the Use of Thiocholine (Gomori, 1952)

تحضير محلول الأساس: Preparation of Stock Solution

كبريتات النحاس	Copper Sulphate ($CuSO_4$-5H2O)	٠,٣ جم
جليسين	Glycine	٠,٣٧٥ جم
كلوريد ماغنسيوم	Magnesium Chloride ($MgCl_2.6H_2O$)	١ جم
حمض ماليك	Maleic Acid	١,٧٥ جم
٤٪ هيدروكسيد صوديوم	Sodium hydroxide.	٣٠ سم^3
٤٠٪ كبريتات صوديوم ساخن ومشبع	Sodium Sulphate	١٧٠ سم^3

ودرجة الأس الهيدروچينى لهذا المحلول (٦) وهو يصلح للاستعمال لفترات طويلة.

تحضير محلول التحضين: Preparation of Incubating Medium

أذب ٢٠ ملجم من يوديد أستيل ثيوكولين فى بضع قطرات من الماء ثم أضف ١٠ سم^3 من محلول الأساس.

خطوات العمل:

١ - ثبت العينات فى الفورمالين البارد ثم جهز قطاعات بالميكروتوم الثلجى أو بالكربوستات واغسل القطاعات بالماء.

٢ - ضع القطاعات فى محلول الحضن عند درجة ٣٧°م لمدة تتراوح بين عشر دقائق وستين دقيقة.

٣ - اغمس القطاعات فى ثلاث تغييرات من محلول مشبع من كبريتات الصوديوم.

٤ - ضع القطاعات فى محلول مخفف من كبريتيد الأمونيوم الصفراء لمدة دقيقتين.

٥ - اغسل القطاعات بالماء المقطر ثم غطها باستخدام جليسيرين جيللى.

النتائج: يبدو موقع نشاط انزيم الكولين استيريز بلون بنى.

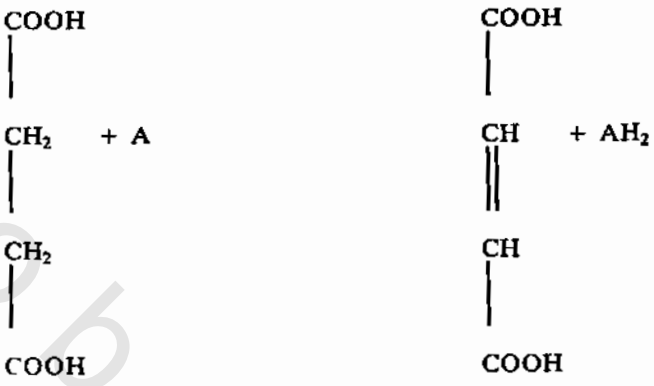
ثالثًا: إنزيمات نزع الهيدروچين

Dehydrogenases

تقوم هذه الإنزيمات بأكسدة المواد الخاضعة Substrates عن طريق نزع الهيدروچين. وينتقل الهيدروچين إلى مادة خاضعة أخرى توصف بأنها مستقبلة للهيدروچين Hydrogen acceptor، وهى عادة فلافوبروتين Flavoprotein أو نيوكليوتيدات يطلق عليها اسم مصاحبات الإنزيمات Coenzymes، وهى مصاحب الإنزيم ١ Coenzyme واسمه الكيماوى Diphosphopyridine nucleotide (DPN) وأيضا: Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) ومصاحب الإنزيم ٢ Coewnzyme II واسمه الكيماوى Triphosphopyridine nucleatide (TPN) وأيضًا Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP). وفى بعض الأحيان يعمل الإنزيم نفسه كمادة مستقبلة للهيدروچين وذلك مثل انزيم سكسنك دبهيدروجنيز. Succinic dehydrogenase وفى الطرق الهستوكيماوية تجهز قطاعات بالكربوستات دون تثبيت وتوضع فى درجة حرارة ٣٧°م فى وسط يحتوى على المادة الخاضعة Substrate التى سيعمل عليها الإنزيم، ومصاحب للإنزيم Co-enzyme الذى يستقبل الهيدروچين من المادة الخاضعة بتأثير الإنزيم، ويضاف أيضا مادة منشطة activator وملح تترازوليم الذى سينتقل إليه الهيدروچين فيتم اختزاله. وتتميز أملاح تترازوليم بأنها عديمة اللون تقريبا، وبأنها تذوب فى الماء، إلا أنه عند اختزالها فإنها تتحول إلى فورمازانات formazans ملونة لا تذوب فى الماء ومن أملاح التترازوليم شائعة الإستعمال ملح نيوتترازوليم neotetrazolium وملح نيتروبلوتترازوليم. Nitro-blue tetrazolium (NBT) وملح M.T.T. وملح INT

إنزيم سكسنك دبهيدروجينيز Succinic dehydrogenase

يقوم إنزيم سكسنك دبهيدروجنيز بدور أساسى فى دورة كربس Krebs tricarboxlic acid cycle وعلى ذلك فإن التجويف الداخلى matrix للميتوكوندريا غنى بهذا الانزيم. ويقوم هذا الانزيم بأكسدة السكسنات Succinates كما يلى:



Succinic acid Fumaric acid

حيث A مادة مستقبلة للهيدروجين. وقد وجد أن هذا الانزيم يتأثر كثيرا فى الحالات المرضية للعضلات القلبية فى الإنسان.

الكشف عن إنزيم سكسنك ديهدروجينيز (بيرس ١٩٦٠)

Demonstration of Succinic Dehydrogenase (Pearse, 1960)

تحضير المحاليل:

محلول السكسنات Succinate Solution

سكسنات الشوديوم	Sodium Succinate	١,٦٢ جم
مـاء مقطـر	Distilled water	٨ سم^{٣}
حمض هيدروكلوريك عيارى	N-Hydrochloric acid	٠,٠٥ سم^{٣}

حيث تذاب السكسنات فى الماء ثم يضاف الحمض، وتضبط درجة الأس الهيدروچينى عند ٧,١، المحلول صالح لعدة أشهر إذا ما حفظ فى حالة تجمد.

٢ - محلول الديهيدروجينيز الأساسى Dehydrogenase Stock Solution

ذوب ٢,٥ ملجم من ملح ام تى تى M.T.T. فى ٢,٥ سم^{٣} من الماء المقطر ثم أضف ٢,٥ سم^{٣} منظم ترس Tris buffer ذا أس هيدروچينى ٧,٤، $\frac{١}{٢}$ سم^{٣} من ٠,٥ جزىء جرامى كلوريد كوبالت ثم أضف ٣,٥ سم^{٣} ماء مقطر. تضبط درجة الأس الهيدروچينى النهائية للمحلول عند (٧,٠). المحلول صالح لعدة أشهر إذا ما حفظ فى حالة تجمد.

٣ - محلول التحضين Incubating Medium

محلول الديهيدروجنيز	Dehydrogenase Solution	٠,٩ سم^{٣}
محلول سكسنات	Succinate Solution	٠,١ سم^{٣}

obeikandl.com

خطوات العمل:

١ – جهز قطاعات باستخدام الميكروتوم الثلجى أو الكريوستات دون تثبيت سابق للعينة.
٢ – ضع القطاعات فى محلول الحضن عند درجة ٣٧°م لمدة ثلاثين دقيقة.
٣ – ضع القطاعات فى محلول ١٠٪ فورمال ملحى لمدة ١٥ دقيقة.
٤ – اغسل القطاعات جيدا فى ماء صنبور.
٥ – غط القطاعات بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج:

يبدو نشاط انزيم سكسنك ديهيدروجينيز على صورة راسب الفورمازان الأسود.

إنزيم جلوكوز – ٦ – فوسفات ديهيدروجنيز

Glucose – 6 – Phosphate dehydrogenase

يوجد هذا الإنزيم فى النطاق السائل من السيتوبلازم خارج الميتوكوندريا وهو يعمل على التفاعل الآتى:

$$\text{Glucose-6-phosphate} + \text{NADP} \rightleftharpoons \text{6-phosphogluconolactone} + \text{NADPH} + H^+$$

ويعمل هذا التفاعل على توفير مادة $NADPH_2$ اللازمة لعدد من التفاعلات الخلوية الهامة، كما أن هذا التفاعل يعتبر خطوه فى مسار ينتهى بتكوين سكر البنتوز Pentose الذى يدخل فى تكوين الأحماض النووية.

الكشف عن الإنزيم Demonstraton of the Enzyme

تحضير المحاليل: (بيرس ١٩٦٠ – Pearse, 1960)

محلول (١)

جلوكوز – ٦ – فوسفات (ملح ثنائى الصوديوم Glucose -6- phosphate (disoduim salt)		٣٠٤ ملجم
ماء مقطر	Distilled water	٨ سم^3
حمض هيدروكلوريك عيارى	N-Hydrochloric Acid	٠,٠٦ سم^3

حيث يذاب الملح فى الماء المقطر ثم تضبط درجة الأس الهيدروجينى إلى ٧,١ باستخدام حمض الهيدروكلوريك.

محلول (٢) (محلول ديهيدروجينيز):

ذوب ٢,٥ ملجم من .M.T.T فى ٢,٥ سم^3 ماء مقطر ثم أضف ٢,٥ سم^3 منظم ترس Tris buffer أسه الهيدروجينى ٧,٤، سم^3 من ٠,٥ جزىء جرامى كلوريد الكوبالت، ثم أضف ٣,٥ سم^3 ماء مقطر. يجب أن يضبط الاس الهيدروجينى للمحلول عند ٧,٠.

obeikandi.com

محلول التحضين:

محلول ديهيدروجنيز	Stock dehydrogenase Solution	٠,٩	سم^{٣}
محلول جلوكوز – ٦ – فوسفات	Glucose – 6 – Phosphate Solution	٠,١	سم^{٣}
مصاحب الإنزيم	Co-enzyme NADP	٢	ملجم

خطوات العمل:

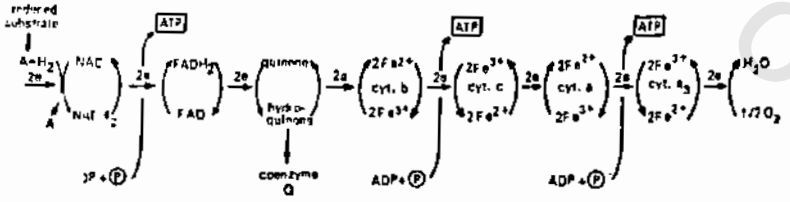
١ – جهز قطاعات بالميكروتوم الثلجي أو بالكربوستات دون تثبيت سابق.
٢ – ضع القطاعات فى محلول الحضن عند درجة ٣٧°م لمدة ٤٠ دقيقة.
٣ – ضع القطاعات فى ١٠٪ فورمال ملحى لمدة ١٥ دقيقة.
٤ – اغسل القطاعات جيدا فى ماء صنبور.
٥ – غط القطاعات بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج: يبدو نشاط انزيم جلوكوز – ٦ – فوسفات ديهيدروجينيز على صورة راسب فورمازان أسود.

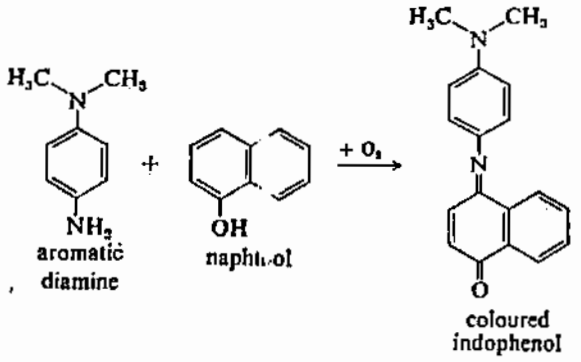
رابعًا: إنزيمات الأكسدة Oxidases

تقوم أنزيمات الأكسدة بأكسدة المواد الخاضعة Substrates وهى فى هذا تشبه انزيمات نزع الهيدروجين، إلا أن انزيمات الأكسدة لاتعمل فى غياب الأوكسجين ومن هذه الانزيمات السيتوكرومات Cytochromes التى تلعب دورا أساسيا فى عملية الأكسدة المفسفرة Phosphorylation Oxidative (أنظر الشكل) والتى تشكل جزءا من عملية التنفس الخلوى. وتقع السيتوكرومات فى الغشاء الداخلى للميتوكوندريا ويرمز لها بالحروف b, c, a, a_3. وعادة يعرف إنزيم سيتوكروم a_3 باسم سيتوكروم أوكسيديز Cytochrome Oxidase.

ومن المعروف أن نشاط هذا الإنزيم ينخفض كثيرا فى معظم الحالات السرطانية.



وقد وجد أن انزيم سيتوكروم أوكسيديز يعمل – كعامل مؤكسد – على تفاعل مادة النافثول Naphthol مع مادة ديامين الحلقية Aromatic diamine لتنتج مادة اندوفينول الملونة Coloured Indophenol وفقا للتفاعل الآتى:



ويعتمد الكشف الهستوكيماوى عن هذا الانزيم على هذا التفاعل الذى يعرف باسم «تفاعل نادى Nadi Reaction» وذلك اختصار لكلمتى Naphthol, Diamine.

الكشف الهستوكيماوى عن إنزيم سيتوكروم أوكسيديز (برستون ١٩٥٩):

Demonstration of Cytochrome Oxidase (Burstone, 1959)

تحضير المحاليل:

محلول (١):

هيدروكسى ٢ – أسيتونافثون	1 – Hydroxy 2 – acetonaphthone	١٠ ملجم
ن– فنيل ٢– ب – فنيلين ديامين	N-Phenyl-P-Phenylenediamine	١٠ ملجم
كحول مطلق	Absolute Alcohol	½ سم٣
مـاء مقطـر	Distilled water	٣٥ سم٣
٠,٢ جزىء جرامى منظم تراس أسه الهيدروچينى ٧,٤	Tris buffer	١٥ سم٣

حيث تذاب المادتان الأولتان فى الكحول المطلق ثم يضاف الماء والمنظم.

محلول (٢):

خلات الكوبالت	Cobalt Acetate	½ ملجم
فورمالدهيد	Formaldehyde	٥ سم٣
مـاء مقطـر	Distilled water	٤٥ سم٣

خطوات العمل:

١ – جهز قطاعات بالكريوستات دون تثبيت سابق.
٢ – ضع القطاعات فى محلول الحضن لمدة تتراوح بين ١٥ دقيقة إلى ساعتين.
٣ – انقل القطاعات إلى المحلول رقم (٢)لمدة ساعة واحدة.
٤ – اغسل القطاعات فى الماء المقطر.
٥ – غط القطاعات بواسطة جلسرين جيللى.

النتائج: يبدو نشاط انزيم سيتوكروم أو كسيديز بلون أسود يميل للزرقة.

obeikandi.com