الفصـــل الثالث

3

المكونات الهستوكيميائية الأساسية
المـــــواد الكربوهـيدراتيـــة
CARBOHYDRATES

obeikandl.com

obeikandl.com

الفصـــل الثالث

المكونات الهستوكيميائية الأساسية

المـــــواد الكربوهـيدراتيـــة

CARBOHYDRATES

الكربوهيدراتات مواد عضوية تتكون بصورة أساسية من العناصر (C كربون – H هيدروچين – O أكسچين) حـيث يوجد العنصـــران الأخيران بنسـبة وجودهـــما فى الماء وهى : ١:٢($C_6H_{12}O_6$) . وهذه المركبات تتكون فى الخلايا والأنسجة النباتية من مصادرها الطبـيـعـيـة ، وهى ثانى اكـسـيـد الكربون و الماء عن طريق عـملية التـمـثـيل الضـوئى Photosynthesis فى 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 يعنى أن هذه المركبات تعطى هذه المشتقات عند تحللها .

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

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

تصنيف المواد الكربوهيدراتية :

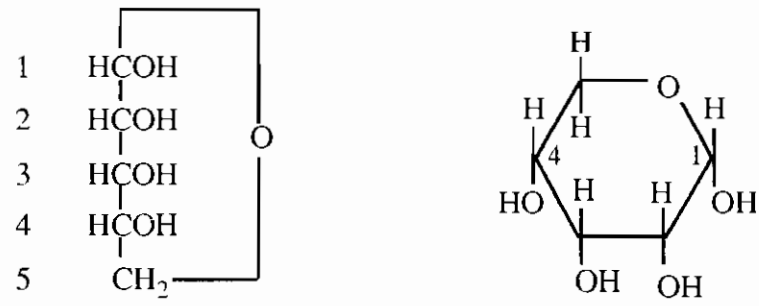
تشتمل المواد الكربوهيدراتية بصورة عامة على ثلاثة أنواع رئيسية ، هى : **وحيدة التسكر:** monosaccharides – **ثنائية التسكر:** disaccharides **وعديدة التسكر:** polysaccharides . ويطلق عادة على النوعين الأول و الثانى " السكريات Sugars وذلك نظرا لحلاوة طعمها . وهى تتميز بأنها قابلة للذوبان فى الماء و الكحول مكونة محاليل رائقة شفافة لها القدرة على النفاذ خلال الأغشية الخلوية . أما المواد عديدة التسكر ، فإنها لاتنوب 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 لاتنوب 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

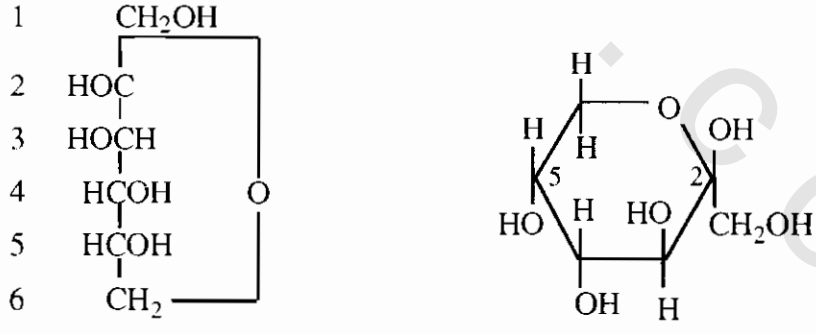


السكر الخماسى (ريبوز) Ribose Sugar

ريبـوز (ribose sugar, $C_5 H_{10} O_5$) وهو ضـمن المكـونات الرئيسـية لحـامض ريبـونيوكليك (ح ن ر) (Ribonucleic acid "RNA") (acid RNA) . أما النـوع الثانى فهو سكر ريبوز ناقـص ذرة الأكسـچين أو دى اكسى ريـبوز : (deoxyrbose sugar C_5 $H_{10} O_4$) وهـو - كما هو واضـح – تنقصـه ذرة من الأكـسچين بالنسبة للسـكر الخماسى النمـوذجى ، وهو أحـد مكـونات الحـامـض النـووى الآخـر " دى أكـسى ريـبـونيـوكلـيك (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 .

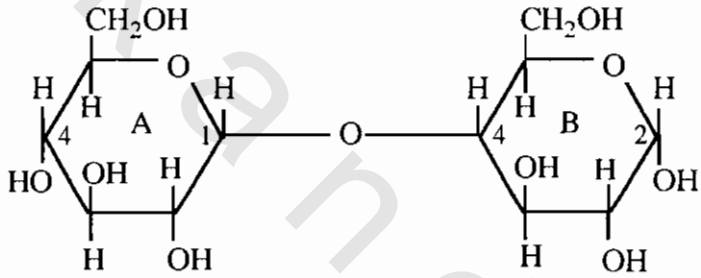


السكريات الثنائية : Disaccharides

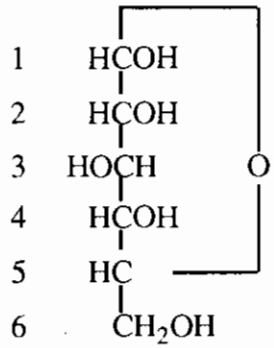
رمزها الكيميائى : ($C_{12}H_{22}O_{11}$) ، وهى تتكون نتيجة اتحاد اثنين من جزئيات أحادية التسكر مع فقدان جزىء من الماء . وبالمثل ، فإن أى جزىء منها – عندما يتم هضمه أو تحلله مائيا يعطى جزيئين أحاديى التسكر وذلك مع اكتساب جزىء من الماء . والمعروف أن هاتين العمليتين الانعكاسيتين تحدثان تحت تأثير إنزيمات متخصصة معينة تعمل على البناء synthesis فى الحالة الأولى والتحلل المائى :hydrolysis فى الحالة الثانية .

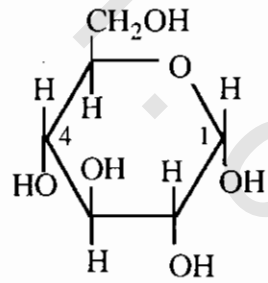
$$2C_6H_{12}O_6 \underset{+H2O}{\overset{-H2O}{\rightleftharpoons}} C_{21}H_{22}O_{11}$$

ومن أهم هذه الأنواع :



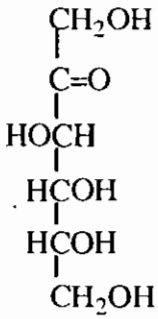
النمط العام لتكوين سكر ثنائى من سكرين أحاديين



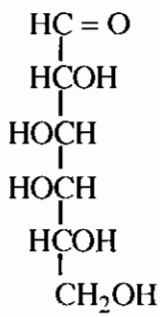


الجلوكوز (جلوكوبيرانوز) Glucose (gluco pyranose)

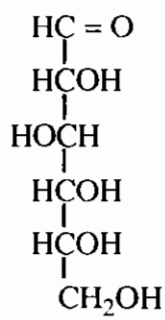
Fructose الفركتوز



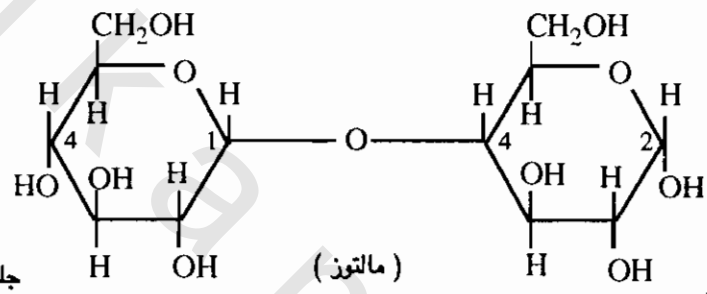
الفركتوز
Fructose



الجالاكتوز
Galactose



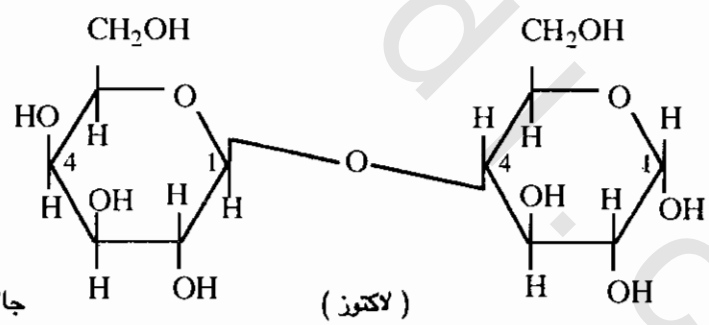
الجلوكوز
Glucose



جلوكوز (مالتوز) جلوكوز

Maltosa ⇌ glucose + glucose

مالتوز (سكر الشعير)

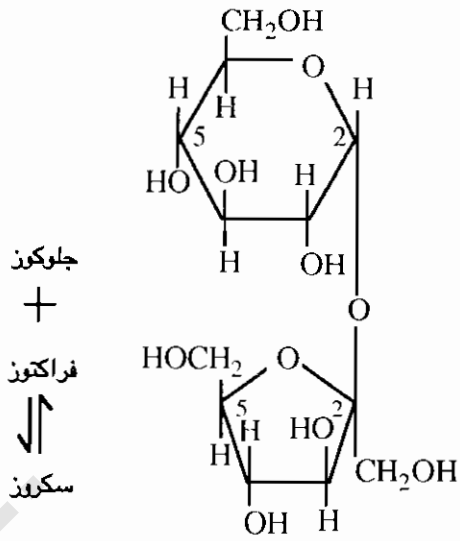


جالاكتوز (لاكتوز) جلوكوز

Lactose ⇌ glucose + galactose

لاكتوز (سكر اللبن الثنائى)

obeikandl.com



$$\text{Sucrose} \rightleftharpoons \text{glucose} + \text{fructose}$$

سكروز (سكر القصب)

عـديدات التسـكر : Polysaccharides

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

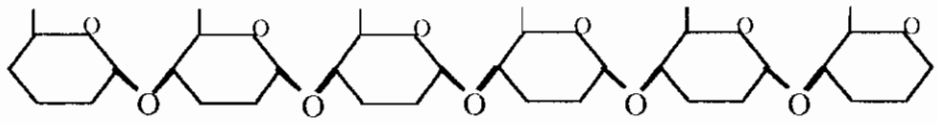
$$n\ C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{-n\ H_2O} (C_6H_{10}O_5)_n$$

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 الضوء ، ويسبق ذلك تكوين النشا تكوين سلاسل كربوهيدراتية أبسط تركيبا ، هى جلوكوسيدات الفا α – glucosides . وعند التحلل المائى للنشا ، فإنه يعطى جزيئات 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 المـادة 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 :

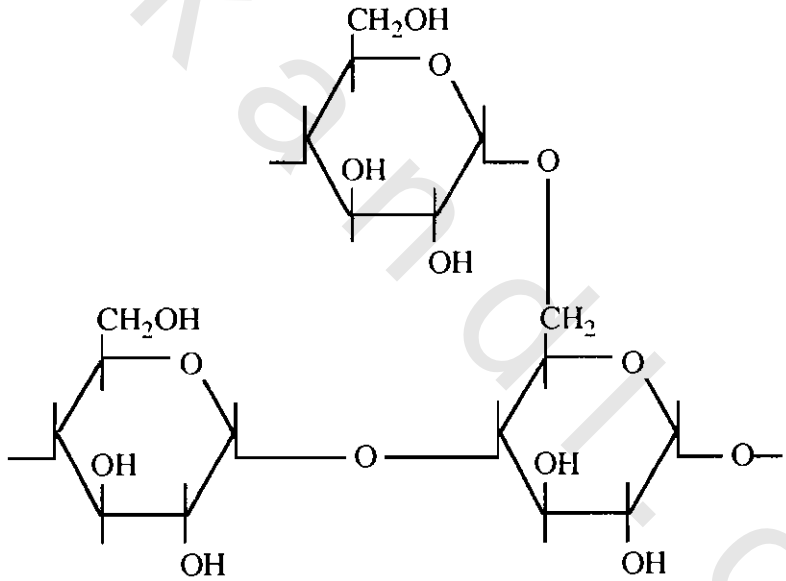
توجد المواد عديدة التسكر على هيئات مختلفة فى الخلايا و الأنسجة الجسمية وهى تختلف من بعضها فيما يتعلق بطبيعتها ونشاطاتها الفسيولوجية ، ولكنها تتشابه مع بعضها

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.



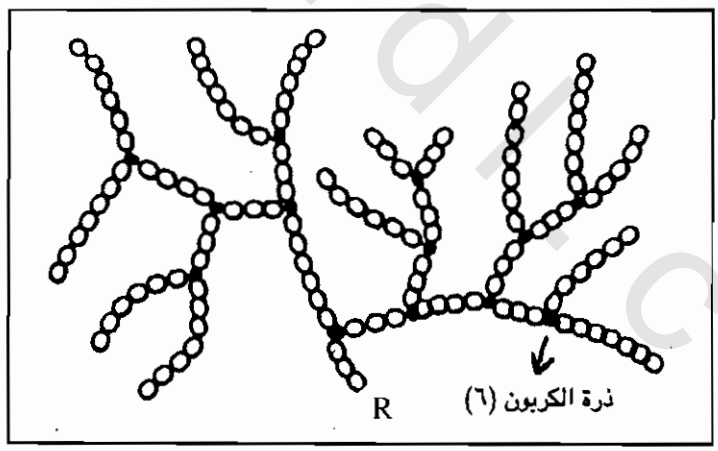
طبيعة الجليكوجين وتوضيحه بصورة عامة :

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 تأثير 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 استقر عليه رأى العديد من الباحثين من" نويل"١٩٢٣ " وهو عالم هستولوجى وفسيولوجى (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 اختزان الجليكوجين مع تقدم العمر .

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

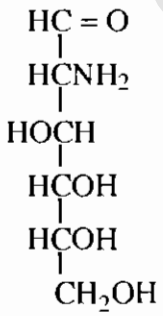
* والمعروف أيضا أن الجليكوجين يتحلل ويختفى بصورة عامة عقب موت الحيوان وذلك على الأخص فى الخلايا العضلية الهيكلية . إلاأن تثليج الأنسجة سريعا أو تبريدها مع توفر الأكسوجين فإن ذلك يعمل على إبطاء فقدان الجليكوجين والإبقاء عليه لفترة طويلة نسبيا .

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

obeikandl.com

(أ) عديدة التسكر المخاطية :

تتكون هذه المواد من وحدات سكرية أمينية فقط ، غير مرتبطة بأية مواد عضوية مثل البروتينات ، وإن كان البعض منها متحدا ببعض الأحماض العضوية مثل حامض (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 وبرقات 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 .

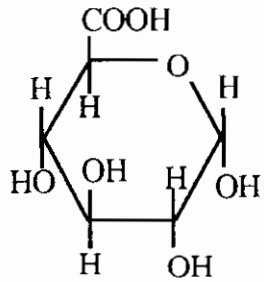
خواص الكيتين :

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 تركيبياً 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 glucu-ronic 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 .

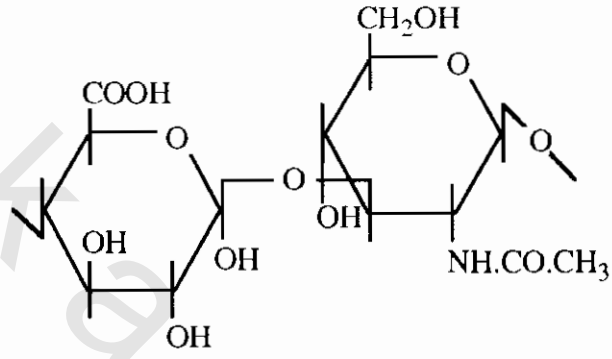


حامض جلوكيورونيك
(Glucuronic acid)

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 بفرس 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 .

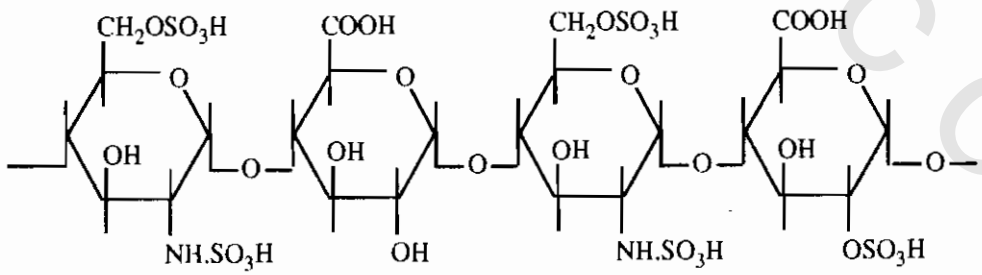
وبالنسبة لأغشية البويضات ، فإنه تتم إذابة هذه المادة المتواجدة بين الخلايا التى تغلف البويضة فى منطقة معينة وذلك بتأثير إنزيم الهياليورينيديز الذى يوجد بكثرة أيضا فى رؤوس الحيوانات المنوية خاصة فى الجسم المخروطى acrosome . وفى هذه الحالة يحدث ثقب فى غشاء الخلية يسمح بدخول الخلايا المنوية فى البويضات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

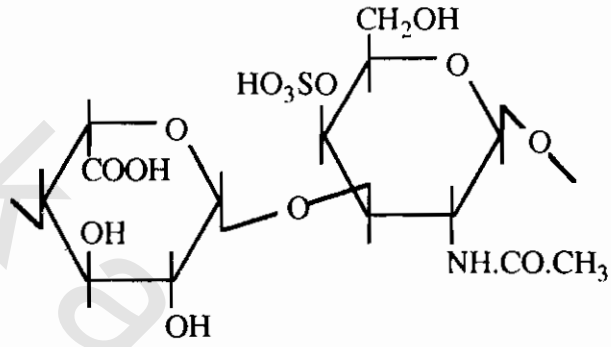
ومن أهم هذه المركبات مادة " هيبارين heparin وتوجد هذه المادة بصورة أساسية فى " الخلايا الصارية mast cells " التى توجد بكثرة فى الأنسجة الضامة ، وعلى ذلك فإنها واسعة الانتشار فى جميع أجزاء الجسم حيث لايكاد يوجد مكان فى الجسم يخلو من هذه المادة .



الهـــــيبارين

ويظهر الهيبارين على هيئة حبيبات داكنة ، وهى من أهم العوامل التى تمنع تجلط الدم فى حالة حدوث قطع أو جرح داخل الجسم ، ولذلك يطلق عليها " مانعة التجلط 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 البروتينية : Mucoproteins

فى هذه المواد تكون السكريات الأمينية متحدة بمواد ثنائية الببتيدات dipeptides . وتشكل السكريات أكثر من ٤٪ من هذه المواد بصورة عامة . وتعطى هذه المواد تفاعلات 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 "

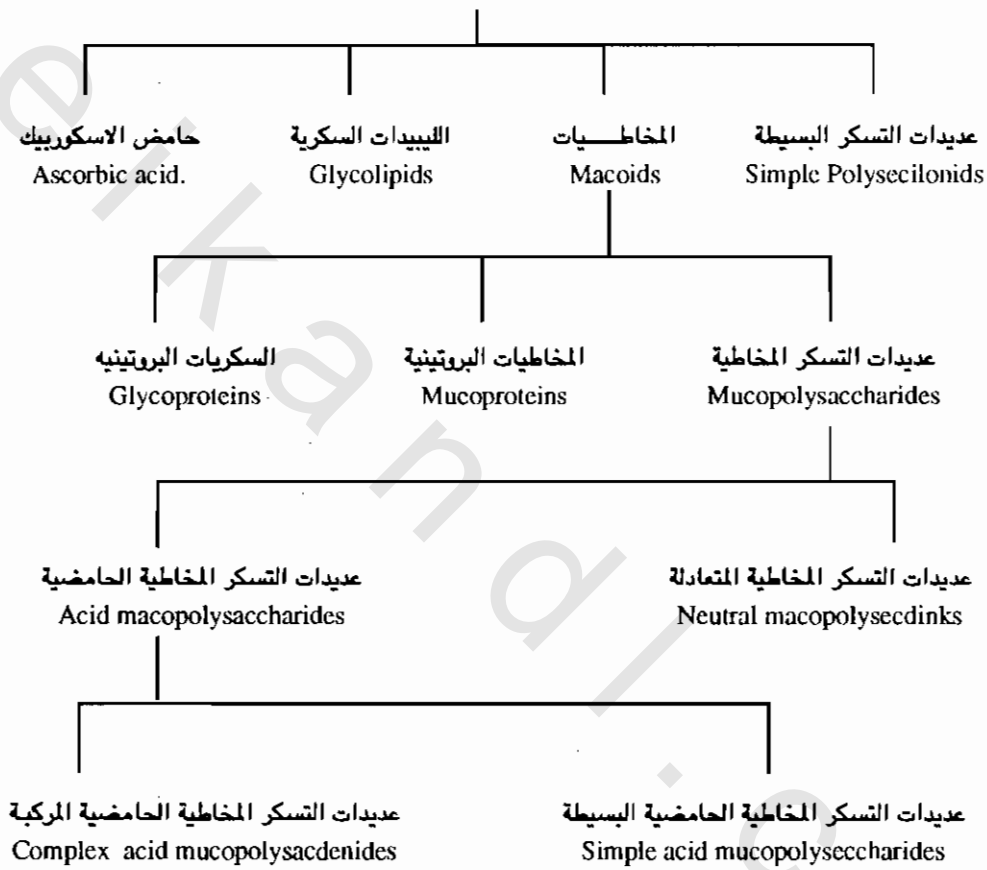
وهو أحد مشتقات المواد الكربوهيدراتية ، يتميز بنشاطه فى عمليات الأكسدة والاختزال – كإنزيم مساعدة فى الخلايا الجسمية .

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 ألجينيك
(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)

openkandle.com

Hyaluronic acid (UA)	حامض هيالوبورونيك
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 -جلوكيورونيديز
Pepsin	الببسين
Serum cholinesterase	كولينسيتريز المصل
Avidin	الأفيدين
Cell membrane glycoproteins	جليكوبروتينات غشاء الخلية

obeikandi.com

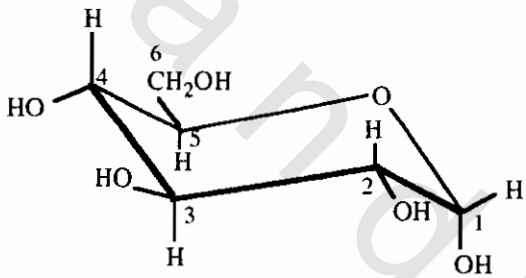
٤ - الجليكوليبيدات — 4 - Glycolipids

السريبروسيدات — Cerebrosides

الجانجليوسيدات — Gangliosides

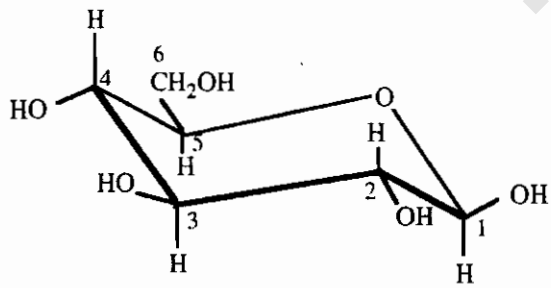
ويذكر هنا أن الجليكانات تتكون من السكريات بصورة كاملة وبالتحديد سداسيات التسكر (hexoses) مرتبطة ببعضها بصورة جليكو سيدية ، وفيها ترتبط الذرة (c_1) - بواسطة ذرة أكسجين - لكل من ذرة الكربون (c_3) ، (c_4) أو (c_6) للسكر الأخر.

ولذلك يطلق على هذه المركبات اسم المادة السكرية المتضمنة فيها ، ولابد أن يتضمن وصف المادة عديدة التسكر التشكيل (ألفا أو بيتا ($\propto$ 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$\rightarrow$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 .

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

تعتبر هذه الطريقة من أفضل الطرق الهستوكيمائية 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 Modification 1948," Hotchkiss ، 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 ٠,٥ ٪ 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 .

obeikandl.com

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 الأحمـر الداكن للمـحلول

obeikandi.com

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 .

ملحوظـات هامـة :

- 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 .

الطـــريقة :

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 ٠,٥ - 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 .

obeikandl.com

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 صباغتها 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 .

النتيجـــة :

– تظهر المواد الكربوهيدراتية مكتسبة لونا بنفسجيا داكنا (magenta)

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

توضيح الجليكوجين : Glycogen Demonstration

طريقة بلمر : 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 :

المكـــــونات :

* 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 الإعـــداد :

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 "

obeikandl.com

النتيجـــة :

يصبغ الجليكوجين باللون الأحمر الداكن .

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

(تستخدم القطاعات الشمعية والثلجية المجمدة).

المـــــواد :

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 (٨٨٠,٠٠٠) Ammonia (880.000) ١٨ ملليلتر
* كحول ميثيلى Methily alcohol ١٨ ملليلتر

obeikandl.com

جـ - محلول بست التمييزي : Best's differentiator

* كحول مطلق Absolute alcohol ٨ ملليلتر
* كحول ميثيلى 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 - فى محلول " سيللويدين Celloidin" تركيزه ١٪ لمدة دقائق .

٤ - تغسل القطاعات فى ماء الصنبور .

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

٦ - الغسيل مرة ثانية فى ماء الصنبور .

٧ - تترك القطاعات فى محلول " كارمين " بست الصبغى (ب) لمدة ٣٠ دقيقة .

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

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

١٠ - تنقل إلى الكحول المطلق (١٠٠٪) .

١١ يتم الترويق فى الزيلول .

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

obeikandl.com

النتيجـــة :

- 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) 0.02 M Phosphate
أسه الهيدروجينى (٦) buffor , PH (6.0) ٥٠ ملليلتر
* كلوريد الصوديوم Soduim chloride ٤٠٠ ملليجرام

الطريقـــة :

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 .

ملحوظـة :

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

obeikandl.com

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 التحضـير :

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 .

obeikandl.com

طريقـة الصباغـة :

١ – إذا كان مطلوبا صباغة 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 الهيدروجيني٢,٥) Alcian blue solution (PH . 2.5)

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

obeikandi.com

* ماء مقطر Distilled Water ٧٠ ملليلتر

الطريقـــة :

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 .

النتيجـــة :

- تصبغ السكريات المخاطية الحمضية باللون البنفسجى .
- تصبغ الأنوية باللون الأزرق .

ملحوظـــة :

(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)

obeikandl.com

- محلول شف — Schiff's reagent
- ١٪ حامض بيرأيوديك — 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 .

النتيجـــة :

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

obeikandl.com

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 الترويق .

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 .

obeikandl.com

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 الأنوبة باللون الأزرق المميز .

obeikandl.com