الفصـــل السابع

7

هستوكيميائية الإنزيمات

Enzymes Histochemistry

obeikandl.com

obeikandl.com

الفصــل السابع

هستوكيميائية الإنزيمات

Enzymes Histochemistry

مقدمــة :

من المعروف ان التفاعلات الكيميائية التي تحدث في الخلايا تتم بواسطة الإنزيمات أو الخمائر ENZYMES ، ففي عمليات الابيض المختلفة - من بناء أو هدم . تقوم هذه الأنزيمات بدور المحرك او المحفز للتفاعلات الكيميائية أو تعمل على إسراع واتمام هذه التفاعلات . وبعد اتمام هذه التفاعلات تبقى هذه الانزيمات على صورتها الأصلية التي كانت عليها قبل دخولها هذه التفاعلات دون ان تستهلك اثناء ذلك او تكون جزءا من نواتج تلك التفاعلات ، ولذلك تعتبر الإنزيمات عوامل مساعدة في التفاعلات البيولوجية

ويقدر انه يعرف حوالى ٢٠٠٠ انزيم في الكائنات الحية المختلفة ، يوجد منها حوالى اربعمائة انزيم في خلايا وانسجة الفقاريات ، وان كان عدد الانزيمات التي يمكن الكشف عنها هستوكيميائيا او سيتوكيميائيا في الوقت الحالى لا يتجاوز المائة .

والانزيمات عبارة عن مواد عضوية ذات تركيب كيميائي محدد يتم تخليقها في النبات والحيوان وفي الكائنات الدقيقة . ولا تتواجد هذه الانزيمات بطريقة عشوائية داخل الخلايا ولكنها تستقر في حيزات خلوية معينة Compartments او في بعض العضيات الخلوية . وهي مترتبة بطريقة معينة داخل اطار التنظيم الجزيئى للخلية والعضيات الخلوية . فعلى سبيل المثال توجد انزيمات " السيتوكروم المؤكسد (سيتوكروم اكسيديز)Cytochrome oxidase) و"نازع الهيدروجين السكسينى" (سكسينيك دى هيدروجينيز Succinic dehydrogenase) مرتبطة باغشية الميتوكندريا . وهناك العديد من الانزيمات تقع داخل تراكيب خلوية معينة مثل الاغشية البلازمية والكروموسومات والنويات - وبصورة عامة ، فإن الانزيمات هى اكبر واكثر البروتينات تخصصا ، وقد امكن الحصول علي العديد منها بصورة نقية متبلرة ، ومن المتعارف عليه أن الانزيمات تعتبر من اهم منتجات الجينات .

تسمية الانزيمات : Nomenclature of Enzymes

تجـرى تسمية معظم الانزيمات باضافة المقطع العجزى أو النهائي Suffix(إيزase) إلي اسم المادة الخاضعة Substrate التي يعمل عليها هذا الانزيم . من امثلة ذلك انزيمات " الفوسفاتيز Phosphatases وانزيم ارجنيـز Arginase وانزيم يـوريز Urease " وهى تعـمل على استيرات الفوسـفات Phosphate Esters والارجنين Arginine واليـوريا Urea على التوالى . وفي حالات اخري اعطيت الانزيمـات اسمـاء لا تتبع هذا النظام ومن امثلة ذلك انزيم " بيبسين Pepsin " وانزيم "تربسين Trypsin" .

وقد زاد الموقف تعقيدا تزايد عدد الانزيمات التي يتم الكشف عنها بصورة مستمرة . وقد دفع هذا الموقف اللجنة العلمية العالمية المختصة بتسمية الانزيمات "Commission on Enzyme Nomoenclature" عام ١٩٧٢ الي اقتراح نظام جديد لتسمية الانزيمات ثم نشره عام ١٩٧٣ ويقضي هذا النظام باعطاء كل انزيم اربعة ارقام تدل عليه وعلى طبيعته .

TABLE INTRENATIONAL CLASSIFICATION
OF ENZYMES (CLASS NAMES. CODE NUMBERS. AND TYPES OF REACTIONSCATALYZED)

---

1. OXIDI - REDUCTASES (OXIDATION. REDUCTION REACTIONS)	
1.1 ACTING ON	CH ---- OH
1.2 ACTING ON	C ----- O
1.3 ACTING ON	C ----- CH
1.4 ACTING ON	CH ----- NH2
1.5 ACTING ON	CH----- NH
1.6 ACTING ON	NADH ; NADPH
2. TRANSFERASES (TRANSFER OF FUNCTION GROUPS)	
2.1 ONE - CARBON GROUPS	
2.2 ALDEHYDIC OR KETONIC GROUPS	
2.3 ACYL GROUPS	
2.4 GLYCOSYL GROUPS	
2.7 PHOSPHATE GROUPS	
2.8 S-CONTAINING GROUPS	
3. HYDROLASES (HYDROLYSIS REACTION)	
3.1 ESTERS	

obeikandl.com

3.2 GLYOSIDIC BONDS
3.2 PEPTIDE BONDS
3.5 OTHER C ---- N BONDS
3.6 ACID ANHYDRIDES
4. LXXSES (ADDITION TO DOUBLE BONDS)
4.1 $>C=C<$
4.2 $>C=O<$
4.3 $>C=N-$
5. LSOMERASES (ISOMERIZATION REACTIONS)
5. IRACEMASES
6. LIGASES (FORMATION OF BONDS WITH ATP CLEAVAGE)
6.1 C ----O
6.2 C ---- S
6.3 C ---- N
6.4 C ---- C

وعلي هذا . ووفقا لهذ النظام تقسم الانزيمات الي ست مجموعا ت رئيسية Classes تعطي الار قـا م من " ١-٦ " (انظر القـائمة المرفقـة) ويدل الرقم الاول من هذه الارقـام علي كل مجموعة من المجموعات الرئيسية التي تحت مجموعات Subclasses ، يدل الرقـم الثاني علـي كل واحد منـهـا ، وذلك حسب طبيبعة التفاعل الذي يتم تخفيره . ثم تقسم كل تحت مجموعة الي تحت تحت مجاميع Sub - subcasses يدل الرقم الثالث علي كل و احد ة منهـا ويشـير الرقم الرابع الي الرقم المسلسل الدال عل اسم الانزيم في كل تحت مجموعة .

وكمثال ذلك فإنه يرمز لانزيم كرباتين كايينز Creatine kinase بالارقام EC,2,7,3,2 ويدل الحرفان EC على أن هذا الرقم معتمد وفقاً لنظام الإنزيمات سابقة الذكر .

الكشف عن الانزيمات هستوكيميائيا:

Histochemical Detection of Enzymes

يعتمد الكشف عن نشاطات الانزيمات هستوكيماويا اعتمادا كبيرا علي تفهم وظيفة تلك الانزيمات كعوامل مساعدة لتفاعل كيميائي معين . ويتخذ ناتج النشاط الانزيمى كعلامة أو دليل علي تحديد اماكن Sites ومدى نشاط تلك الانزيمات . على انه يتعين أن يكون ذلك الناتج

مركبا ملونا لكى يمكن مشاهدته بالميكروسكوب الضوئي . واذا لم يتيسر ذلك ، فإنه يلزم تحويل هذا المركب عديم اللون الي مركب ملون ولكي يتم الكشف عن هذه الانزيمات وتوضحيها هستوكيميائيا في الخلايا والانسجة يجب توفير العوامل التالية :

أولاً : مراعاة عدم احداث اية تاثيرات في تركيب وتوزيع ونشاطات الانزيمات اثناء اعداد التحضيرات الميكروسكوبية الخاصة بها .

ثانيا : يتعين ضمان نفاذ المادة الخاضعة Substrate (اي التي تؤثر عليها الانزيمات وتعتبر طعما لها) والمواد المساعدة داخل كل الخلايا بسرعة متساوية.

ثالثا : توفر درجة الحرارة المناسبة لنشاطات الانزيمات وذلك في حدود ٣٧°م .

رابعا : يراعي توفير الأس الهيدروجيني p^H المناسب للانزيمات المختلفة .

خامسا : يجب ان تنشق Split المادة الخاضعة بانزيم واحد هو الانزيم المستهدف الكشف عنه وذلك عند درجة حرارة معينة وأس هيدروجيني محدد

سادسا : يجب الاتتداخل الكواشف المساعدة Auxiliary Reagents مع التفاعلات الانزيمية أو أن تعوق تخلل المادة الخاضعة .

سابعا : لابد من ضمان الحصول علي ناتج التفاعلات الانزيمي بسرعة فائقة والا يترسب هذا المنتج النهائي سريعا وهذا يعني انه يجب أن يكون غير قابل للذوبان في المحاليل المائية وفي الدهون وان يكون غير متبلور Amorphous وثابتا في طبيعته .

ثامنا : يجب الا ترتبط أو تلتصق او يحدث ادمصاص Adsorption للمواد المشتركة في التفاعل بمركبات اخري .

اسس التفاعلات فى الطرق الخاصة بالكشف عن الإنزيمات هستوكيمائيا

يمكن تمثيل التفاعلات الانزيمية بالمعادلات التالية :

$$AB \xrightarrow{\text{انزيم}} A + B$$

$$R + B \rightarrow BR$$

حيث تمثل AB المادة الخاضعة Substrate التي تتفاعل مع هذا الانزيم ،A+B هي نواتج هذا التفاعل ويمثل R الكاشف المستخدم ، BR المنتج النهائي الذي يكون عادة ملونا لكي يمكن مشاهدته بالميكروسكوب واذا لم يكن هذا المنتج ملونا فيتعين العمل علي تحويله الي مركب ملون بوسائل معينة .

ومن الظواهر الهامة في الكشف عن النشاطات الانزيمية خصوصية المادة الخاضعة Substrate Specifity وهذا يعني ان انزيما معينا يعمل علي مادة خاضعة محددة.

وبعض الانزيمات تخصصية مطلقة لمادة خاضعة شديدة التحديد ، بمعني انها لاتعمل حتي مع الجزيئات المتشابهة مثل ستريوأيزومر Sterioisomer لنفس الجزئ الاساسي.

- ومما سبق يتضح أن أسس الكشف الهستوكيميائى للانزيمات بصورة خاصة التفاعلات الترسيبيه ، ومنها:

١ - التفاعلات الترسيبيه بالأيونات المعدنة الموجبه . ومن أمثلتها طرق خومورى Gomori وهى تعتمد على تفلق المادة الخاضعة Splitting of the substrate

٢ - التفاعل الترسيبى فى التفلق ويتم الترسيب فى نفس الوسط . والترسيب النواتج فى التفاعل الانزيمى يضاف أيونات Ca^{++} , Bb^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{+2}

وكقاعدة عامة فإن تلك الرواسب لاترى بالمجهر العادى ولكن يمكن رؤيتها بميكروسوب التباين Phase Contrast Microscope أو ميكروسكوب الضوء المستقطب Polarizing Microscope

ملحوظة : المشاهدة لناتج التفاعل الملون ممكن رؤيته بالمجهر الضوئى باستخدام تفاعل آخر بعد تفاعل الترسيب

أنواع الانزيمات

الانزيمات المميئة HYDROLASES

وهي الانزيمات التي تعمل كعامل مساعد في اتمام التفاعلات الكيميائية في عمليات الهضم او التحلل مع وجود الماء وذلك علي النحو التالي : $AB+H2O \rightleftharpoons AH + BOH$

وفي معظم الحالات يسود التفاعل الانشقاقي ويحدث العكس في بعض التفاعلات العكسية ويتكون الماء .

أنواع الإنزيمات المميئة

تشتمل الانزيمات المميئه علي عدة مجموعات حسب نوع المادة الخاضعة Substrate التي تعمل عليها وأهمها :

١ – انزيمات الاستيريز ESTERASES

٢ – انزيمات جليكوسيديز GLYCOSIDASES

٣ – انزيمات ببتيديز PEPTIDASES

وتعتبر مجموعة الاستيريز " أكبر هذه المجموعات الانزيمية وهي تنقسم بدورها الي انواع متباينة منها :

أ – فوسفو مونو استيريز PHOSPHOMONOESTERASES

ب – فوسفو داي استيريز PHOSPHODIESTERASES

جـ– كاربو كسيليك استيريز CARBOXYLIC ESTERASES

د– سالفاتيز SULFATASES

انزيمات الفوسفاتير PHOSPHATASES

ويعتمد الكشف الهستوكيماوي عن انزيمات "الفوسفاتيز " وكذلك انزيمات سلفاتيز ، وكولين استيريز علي استخدام طريقة جوموري GOMORI

وفيما يلي بعض الامثلة لهذه الانزيمات :

obeikandi.com

الفوسفاتيزات القلوية ALKALINE PHOSPHATASES

هذه الانزيمات المميئة هي المسئولة عن تكسير استيرات ESTERS أو املاح الفوسفات وتشتمل هذه الانزيمات بدورها علي الانواع التالية :

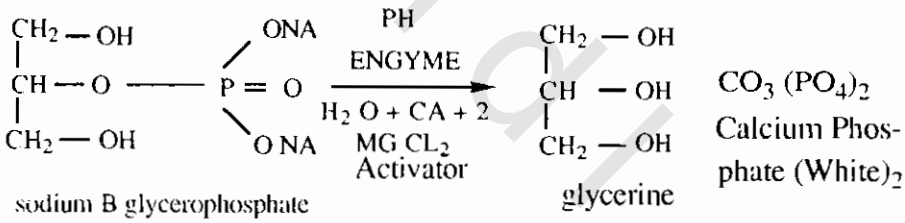
- الفوسفاتيز الاحادي MONOPHOSPHATASES
- الفوسفاتيز الثنائي DIPHOSPHATASES
- الفوسفاتيز الثلاثي TRIPOSPHATASES

والفوسفاتيز الاحادى :

غير محدد أو مقيد عادة بنوع الكحول الجذري RADICAL الذي يكون متحدا بحمض الفوسفوريك للمادة الخاضعة . ولذلك فإن له القدرة علي تميؤ HYDROLYSE انواع كثيرة من المركبات الفوسفاتية العضوية ويتم الكشف عن هذا الانزيم بالوسائل التالية :

أولا : الانشقاق والترسيب

SPLITTING AND PRECIPITATION REACTION PH_9



وينتهي بتكوين أو ترسيب مادة بيضاء هي فوسفات الكالسيوم

ثانيا : التفاعل الاول للتحويل FIRST TRANSFORMATION REACTION :

$$CA3(PO4)_2 + 3\,CO^{+2} \longrightarrow CO3(PO4)$$

$$Ca_3(PO_4)_2 + 3\,CO_2 + \longrightarrow CO_3 \quad (PO_4)_2$$

فوسفات كالسيوم — كوبالت — راسب

راسب فوسفات الكوبالت COBALTOUS PHOSPHATE

ثالثا : التفاعل الثانى للتحويل (وسط طازج)

SECOND TRANSFORMATION REAOTION

$$CO_3(PO_4)_2 + 3S^{2-} \longrightarrow 3CO\,S$$

فوسفات الكوبلت — أنيون سلفيد Sulphide Anion — راسب سلفيد الكوبلتوز أسود Black

وواضح ان ذلك يؤدي الي تكوين راسب سلفيدكوبلتوز الاسود .

وجدير بالذكر ان التفاعلات السابقة هي التي تحدث عند الكشف عن الفوسفاتيز القاعدي بطريقة جوموري . وقد كان جوموري ١٩٣٩ وتاكاماسو TAKAMATSU ١٩٣٩ أول علماء يكشفون عن الفوسفاتيز القاعدي (القلوى) هستوكيمائيا ، وتعتمد هذه الطريقة علي ترسيب فوسفات الكالسيوم في اماكن نشاطات ذلك الانزيم وذلك عند تحضين IN-CUBATION† القطاعات مع ملح فوسفاتي عضوي (كمادة خاضعة) في وجود ايونات الكالسيوم CA عند الاس الهيدروجيني PH_9

ويلزم جميع تفاعلات املاح الفوسفات العضوية تواجد ايونات المغنسيوم كمنشط للانزيمات التي تعمل علي مواد خاضعة فوسفاتية ولذلك يجب اضافة تركيزات قليلة من كبريتات المغنسيومأو كلوريد المغنسيوم .

والمعتقد ان هذا المعدن قد يقوم بتنشيط الانزيم وذلك عن طريق تغيير الشحنة السطحية علي السطح البروتيني ، وبالتالي تغير الجهد الكهربائي الحركي ELECTRO INETIC POTENTIAL في تلك المجالات "كذلك يستخدم مركب" بيتاجليسبروفوسفات" β–GLYCEROPHOSPHATE كمادة خاضعة في الكثير من الاحوال ، وذلك لانه من السهل ان تتميأ في الوسط القلوي وكذلك في الوسط الحامضي وفي هذه الحالة يتم تحضين القطاعات التي سبق تجهيزها بواسطة التجميد اي القطاعات الثلجية او المجمدة FROZEN

SECTIONS في خليط يحتوي علي ملح الفوسفات العضوي وايونات الكالسيوم CA^{++} وكذا ايونات المغنسيوم MG^{+} وذلك عند الاس الهيدروجيني PH9 وعند درجة حرارة ٣٧م وعندئذ يقوم الانزيم بشق ذلك الملح وفصل مجموعة الفوسفات عنه ، ثم يترسب الفوسفات في القطاعات ويلي ذلك تحضين القطاعات في محلول طازج من ١٪ نيترات الكوبلت COBALT NITRATE الذي يعمل بدوره علي تحويل فوسفات الكالسيوم الي فوسفات الكوبلت.

وبعد غسل القطاعات جيدا بالماء المقطر لازالة الزائد من نترات الكوبلت توضع في محلول كبريتيد الامونيوم AMMONIUM SUILPHIDE الذي يحول فوسفات الكوبلت الي كبريتيد الكوبلت COBALT SUOLPHIDE وهو راسب اسود يدل علي مواقع الانزيم ونشاطاته في الخلايا والانسجة.

طريقة كالسيوم - كوبلت للفوسفاتيز القلوى (طريقة جومورى) :

THE CALCIUM - COBALT METHOD FOR ADKALINE PHOSPHATASE (GOMORI)

وهي تصلح للقطاعات الشمعية والقطاعات المجمدة .

أولا : بالنسبة للقطاعات الشمعية :

١- ازالة الشمع من القطاعات بواسطة الزيلول .

٢- تمرر في سلسلة هابطة من الكحولات حتي الماء المقطر.

٣- يتم تحضين القطاعات لمدة تتراوح بين نصف الي ١٦ ساعة عند درجة ٣٧ م في الوسط التالي :

- ١٠ ملليلتر من محلول ٣٪ صوديوم بيتاجليسروفوسفات

+ ١٠ملليلتر من محلول ٢٪ داي ايثيل باربيتيوريت الصوديوم NA DIETHYL BARBITURATE

- ٢٠ملليلتر ٢٪ كلوريد الكالسيوم .

- ١ ملليتر ٥٪ كبرتيات المغنسيوم.

٤- تغسل القطاعات في الماء الجاري .

٥- توضع القطاعات في ٢٪ نترات الكوبلت (٣-٥ دقائق) .

٦- تغسل في ماء مقطر .

٧- تنتقل القطاعات الي محلول مخفف من الكبرتيد الامونيوم لمدة دقيقة - دقيقتين .

٨- تغسل القطاعات بالماء ويتم صباغتها بالايوسين (إذا أريد ذلك) لمدة ٥ دقائق .

٩- ينزع الماء بالكحول ويتم الترويق بالزيلول ويوضع علي القطاعات الكندا بلسم ويتم تغطيتها بأغطية زجاجية نظيفة .

النتيجـة :

تظهر اماكن نشاطات انزيم الفوسفاتيز القلوي باللون الاسود أوالبني الداكن .

ثانيا : القطاعات المجمدة : FROZEN SECTIONS

١- تنتقل قطاعات سمكها (١٠ - ١٥ميكرون) علي شرائح زجاجية نظيفة بدون مادة لاصقة .

٢- تجفف في الهواء عند درجة حرارة الغرفة لمدة ١-٢ ساعة .

٣- يتم تحضين القطاعات في المادة الخاضعة لمدة ٤ ساعة .

٤- تغسل بالماء ثم توضع في ٢٪ محلول الكوبلت وتعامل بمحلول كبريتيد الامونيوم الاصفر .

٥- تصبغ - عند اللزوم - في ١٪ ايوسين مائي لمدة ٥ دقائق .

٦- تغسل القطاعات بالماء .

٧- تعطي القطاعات بالمحلول اللاصق "جيلي الجلسرين "GLYCERINE GELLY توضع عليها اغطية زجاجة نظيفة ويتم فحصها في الحال .

النتيجة : تتخذ اماكن نشاطات الانزيمات ايضا اللون الاسود ، البني الداكن .

طريقة التترازوليوم :

TETRAZOLIUM METHOD CMC GADEY (1970)

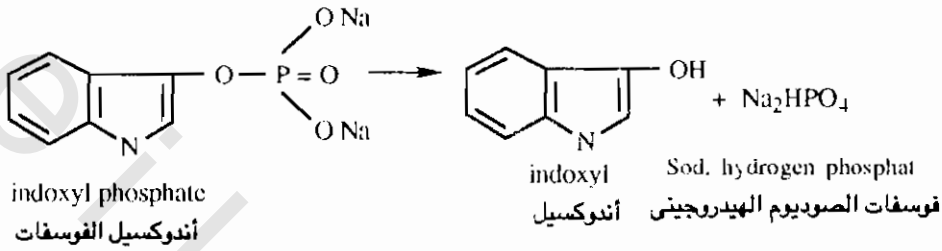
في هذه الحالة تستخدم مادة الاندوكسيل "INDOXYL " أو الاندوكسيل امين INDOXYL AMINE او مادة فينازين مثيوسلفيت phenazine metho sulphate كمادة

obeikandl.com

خاضعة للكشف عن انزيمات الفوسفاتيز والجلوكوسيديز وكاربوكسيليك استيريز وكذلك الببتديز

الفوسفاتيز القلوى :

١- التفاعل الابتدائي (تفاعل التكسير الانزيمي) Enzyme splitting reaction

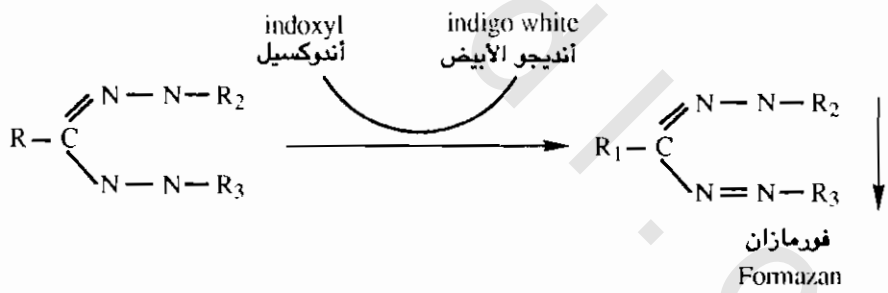


indoxyl phosphate
أندوكسيل الفوسفات

indoxyl
أندوكسيل

Sod. hydrogen phosphat
فوسفات الصوديوم الهيدروجيني

٢- التفاعل الثاني (اختزال ملح التترازوليوم)



فورمازان
Formazan

الطريقة : الوسط الحاضن : INCUBATION MEDIUM

أ- ٥ برومو - ٤- كلورو - ٣ أندوكسيل الفوسفات - ملح التولويدين (١-٣)

BROMO-4 CHLORO3 INDOXYL PHOSPHATE - TOLUIDENE SALT

ب - النيتروتترازوليوم الازرق BT، NT

جـ - يذاب في داي ميثل فورماميد N,N DIMETHYL FORMAMIDE ٢-٨ ملليلتر)

د - أو في ٢، ترس HCL المولاري (العياري)

او خلات الفيرونال VERONAL ACETATE BUFFER, PH 4-2-9.4

هـ - اخلط جيدا ثم رشح حوالي ١٠ ml3

٢- التحضين INCUBATION

لمدة ٥-٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٣٧°م

٣- اسكب الوسط الحامض :

٤- اغمس القطاعات في ماء مقطر ثم شعها في ٤٪ فورمالدهيد لبضع ساعات ثم تغمس في ماء صنبور ، ثم الماء المقطر وبعد ذلك تغمر في محلول الطمر الجلسرين جيلي " او محلول اباثي" APATHY SYRUP

النتيجـــة :

تعتمد نتيجة التفاعل علي نوع الترازوليوم ، فاللون الازرق يدل علي نشاط الانزيم في حالة استخدام نيترو NITRO - BT - BT بينما لكون اللون اسود في حالة استخدام الترازوليوم الرباعي .

وبالمقارنة بطريقة جوموري ، فإن طريقة الترازوليوم تعطي نتيجة افضل وذلك لانها توضح نشاط الفوسفاتيز القاعدي بوضوح وثبات ولاتوجد شوائب تتداخل في الفورمازان المتكون في اماكن نشاطات الانزيم كما انها تصلح في القطاعات المجمدة وقطاعات الفورملين المطمورة في الشمع .

openkanal.com

الطريقة الثالثة : ازدواج الازو : AZO COUPLING (SIMULTANEOUS)

وهي تصلح للقطاعات الشمعية والقطاعات المجمدة .

الطريقـــة :

يتم اعداد وسط التحضين كالاتي :

- ملح ألفا نافثيل فوسفات الصوديوم &-NAPHTHYL PHOSPHATE SODIUM أو نافثيل حامض الفسفوريك NAPHTHYL PHOSPHORIC ACID

- اذب في او - ٢ ومحلول مولاري فيرونال الخليل أو المحلول المنظم " ترس" TRIS HCL BUFFER ٥٠ ملليلتر عند pH ٩.٢ - ٩.٤

- ازرق السريع FAST BLUE أو احمر السريع FAST RED ٥٠ ملليلتر .

- يتم تحضين القطاعات لمدة ٣-٦ دقائق عند ٣٧° م

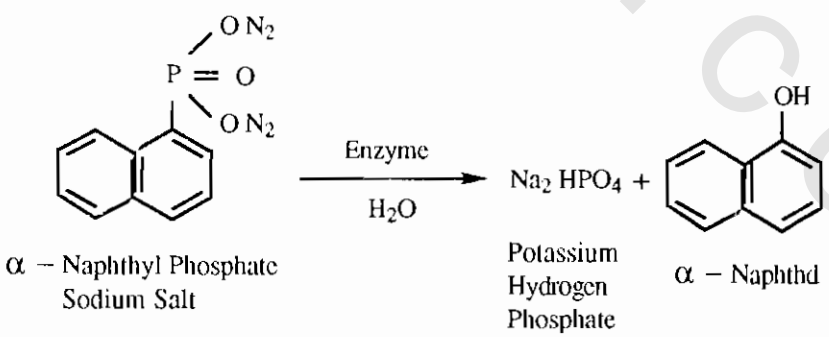
- ازح محلول التحضين واغمس القطاعات في الماء المقطر ثم توضع في ٤٪ فورمالين لعدة ساعات عند درجة حرارة الحجرة مع تقليل فقاعات الغازات في القطاعات .

- تغمس القطاعات في ماء الصنبور ثم تصبغ بصباغة خلفية COUNETR STAINING مثل الهيماتوكسيلين وذلك لتوضيح الانوية .

النتيجـة : تظهر اماكن نشاطات الانزيمات كما يلي :

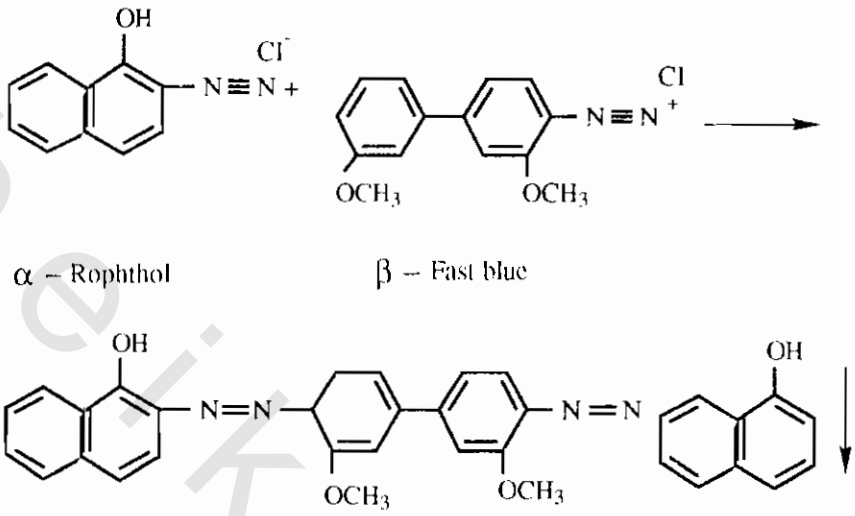
- باللون الاسود عند استخدام ازرق السريع

- اسود بني مع احمر السريع .



١ – التفاعل الابتدائى (التكسيرى الانزيمى)

٢ – التفاعل الثانى (التفاعل الازدواجى)



أماكن تواجد انزيم الفوسفاتير القلوى :

يتواجد انزيم الفوسفاتير القلوى بصورة خاصة في أغشية الخلايا في مناطق الحواف الفرجونية brush borders في الانيبيبات الكلوية وفي الطلائية الداخلية للشرايين الصغيرة وكذلك الخلايا الكبدية وخلايا البروستاتا والطحال بالإضافة الي موجبة الخلايا والانسجة الاخري .

الفوسفاتيز الحامضي

ACID PHOSPHATASE

يلعب هذا الانزيم دورا اساسيا كعامل مساعد في التحليل او التكسير المائي لملح حامض الارثوفوسفوريك مع انواع مختلفة من الكحولات او الفينولات . طبقا للمعادلات الاتية.

Monoester of phosphoric acid + H_2O → Alcohol (phenol) + orthophosphate

ملح احادي الارثوفوسفوريك + ماء $\xrightarrow[\text{وسط حامضى}]{\text{الإنزيم}}$ (كحولات أو ڤينولات) + ارثوفوسفات

أو تنتقل الفوسفات من كحول الي اخر .

ويوجد هذا الانزيم بكثرة في الليسوسومات والشبكة الاندوبلازمية في العديد من انواع الخلايا الجسمية .

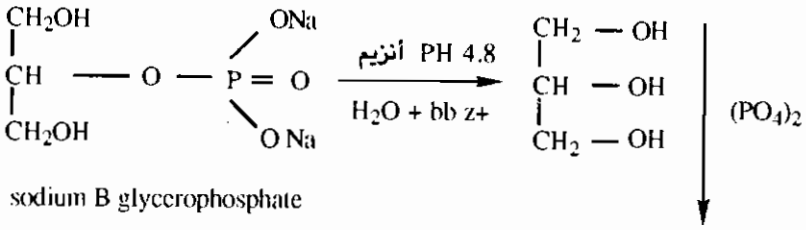
طرق الكشف عن الفوسفاتيز الحامضى :

المعروف أن هذا الانزيم يعمل بفاعلية في الوسط الحامضي عند Ph5 وان كانت توجد منه عدة انواع تعمل عند درجات متفاوتة من الاس الهيدروجيني (في وسط حامضي) ويشبه هذا الانزيم انزيم الفوسفاتيز القلوي في تفاعلاته .

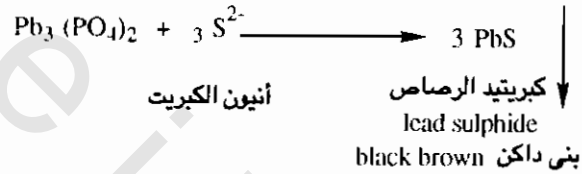
ويفضل الان استخدام الفورمالين المتعادل البارد (٤٪) كمثبت لفترة قصيرة ثم استخدام القطاعات مباشرة .

وتعتبر طريقة جوموري (١٩٥٠) Gomeri هي الطريقة الشائعة الآن للكشف عن هذا الانزيم هستوكيميائيا وتعتمد هذه الطريقة علي ترسيب فوسفات الرصاص Lead phosphate .

وفي هذه الحالة تستخدم ذرات الرصاص Lead nitrate مع المادة الخاضعة "فوسفات الجلسرول β- Glycerophosphate وذلك لان فوسفات الرصاص تترسب ولاتنوب في الوسط الحامضي عند pH4.8 أو pH5 كما أن فوسفات الكالسيوم تنوب ولاتترسب في الوسط الحامضي ولهذا لاتصلح في ترسيب الفوسفات . وفي هذا التفاعل يتحول راسب فوسفات الرصاص بواسطة كبريتيد الامونيوم الاصفر الي كبريتيد الرصاص LEAD SULPHIDE وهو راسب بني داكن .



sodium B glycerophosphate



طريقة الكشف :

الوسط الحاضن :

١- ادنيوزين أو أدنيوزين O ٢٠ ملليجرام ملح الصوديوم

التحضير :

١٠٠ - ١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة ، أو ٣٧°م وذلك بعد تثبيت الانسجة في الاليديهيد

مابعد التحضين :

- اسكب سائل التحضين .
- اغمس مرة أو مرتين في ماء مقطر .
- ضع القطاعات في ٥ , ٠٪ أو ١٪ كبرتيد الالومنيوم (النوشادر) لمدة دقيقتين .
- اغمس في ماء مقطر .
- يغطي القطاع بواسطة جيلي جليسرين او صمغ الاباثي (عملية نزع الماء غير مستحبة لكي لايتغير كبريتيد الرصاص) .

obeikandl.com

النتيجـــة :

تظهر اماكن نشاطات الانزيمات باللون البني القاتم

٢- انزيم جلوكوز ٦- فوسفاتيز

pH 6.5 GLUCOSE -6- PHOSPHATASE

يقوم هذا الانزيم بدور فعال في التفاعل الاتي :-

D-GLUCOSE -6- PHOSPHATASE +H_2O ---- D . GLUCOSE +5 PHOSPHATE pH6.5

القطاعات المستخدمة مثبتة في الاسيتون المبرد وقطاعات شمعية أو فورمالية في فوسفات متعادل مبرد او فورمالين وقطاعات مجمدة .

الطريقـــة :

١- يتم تحضير القطاعات بالطريقة المختارة .

٢- تحضن القطاعات عند ٣٧°م لمدة ١٥-٣٠ دقيقة في محلول طازج من (٠,٠١ مولار صوديوم بيتا جليسروفوسفات في ١٠٥ مولار خلات ACETATE محايد pH5.0 وخلات الرصاص LEAD ACETATE محتويات علي ٠,٠٠٤ مولار نترات الرصاص).

٣- تغسل القطاعات لمدة دقيقتين ثم تغمس في محلول مخفف من كبريتيد الامونيوم الاصفر لمدة ١-٢ دقيقة .

٤- تغسل وتصبغ صباغة خلفية في محلول ١٪ ايوسين مائي .

٥- تغسل مرة ثانية ويوضع عليها الجلسرين وتغطي بغطاء نظيف .

النتيجـــة :

تظهر مناطق نشاطات انزيم الفوسفاتيز الحامض علي هيئة راسب كبريتيد الرصاص

طريقة نترات الرصاص المحورة للفوسفاتيز الحامضى :

(تاكوشى وتانو)

obeikandl.com

الطريقـــة :

١- تحضن القطاعات لمدة ٢/١ - ٢ ساعة في المحلول التالى :

(حجمين من ٢٪ محلول بيتا جليسروفوسفيت).

١ جم او مولار خلات الحديد pH5.0

١ جم ٢٪ خلات الرصاص Lead acetate

٣ ملليجرام ١-٣ ٪ كلوريد المغنسيوم Mg cl2

٢ - اغمس في ماء مقطر .

٣ - تنقل القطاعات الي محلول نترات الفضة النشادري Ammonicl Agno3 لمدة ٣ دقائق (وذلك باضافة ٢٨٪ من أو نشادر نقطة بنقطة الي ٥٪ محلول مائي نترات الفضة حيث يتم نوبان الراسب) .

٤ - اغمس في ٥٪ ميثوسلفات الصوديوم لمدة ٥ دقائق .

٥ - يتم نزع الماء ويتم ترويق القطاعات ثم تغمس في محلول الطمر المناسب مثل الجليسرين .

النتيجـــة :

تظهر مناطق نشاطات هذا الإنزيم علي هيئة راسب بني .

الطريقة الثانية :

ازدواج الأزو للكشف عن الفوسفاتيز الحامضى

AZO COUPLING FOR ACID PHOSPHATASE

(يتم تحضير القطاعات بواسطة الميكروتوم منخفض الحرارة أو فورماليبرمبرد . ويمكن استخدام القطاعات دون تحميلها علي شرائح .

توضع القطاعات في المحلول الخاص لمدة٣-٥ دقيقة . ويتكون هذا المحلول من ثلاث مجاميع من المحاليل :

أ – صوديوم الفنافثيل حامض الفوسفات ٤ مجم / مل

SODIUM α - NAPHTHYI ACID PHOSPHATE

في خلات / الفيرونال Veronal Aceteae متعادل الأس الهيدروجيني (٩,٧١٤ جم) خلات الصوديوم + ٣ ماء مقطر + ١٤,٧١٤ نترات الصوديوم في ماء مقطر خالٍ من ثاني اكسيد الكربون حتي تصل الي ٥٠٠ مل 2N HEL وتسخن بهدوء ، ويتم الترشيح بعد أن يبرد المحلول .

ب – ٢ جم كلوريد بارا روزانلين تضاف الى ٥٠ مل حامض هيدروكلوريك عيارى .

جـ – ٤٪ نتريت الصوديوم SODIUM NITRITE

والمحلول المستخدم كمحلول خاص هو كما يلي :

٥ مل من المحلول "أ" يضاف الي ١٣ مل ماء مقطر .

وتبع ١,٦ مل من محلول ملح زونيم Zonium Salt Sol ويحضر المحلول الاخير طازجا بخلط كمية متساوية (٨مل) من المحلول في أنبوبة اختبار ، ويكون الأس الهيدروجيني للوسط pH5 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم ويرشح المحلول في أنبوبة الصباغة .

٣– اغمس القطاعات في ماء مقطر ويتم نزع الماء ثم الترويق بواسطة الزيلول والتغطية ببلسم كندا .

النتيجة : تبدو اماكن نشاط الانزيم مصبوغة باللون الأحمر .

طريقة انتاج الازو داى بعد حدوث التفاعل

للكشف عن الفوسفاتيز الحمضى

POST COUPLING METHOD For ACID PHOSPHATASE

عن دوتنبرج وسلجمان (AFTER DUTENBURG & SELIGMA)

تحضير المحلول الخاضع SUBSTRTE SOLUTION

اذب ٢٥ ملجم من مادة Sodium-6-Benzoy - 2 -Naphthy Phosphate في ٨٠

obeikandl.com

سم٣ من الماء المقطر ثم اضف ٢٠ سم٣ من ٠.٥ عياري منظم خلات أسه الهيدروجيني (٥٠) اضف ٢٪ من كلوريد الصوديوم الصلب لجعل المحلول زائد التركيز Hypertonic والقطاعات المثبتة في الجلوتارلدهيد يمكن تعويمها حره Free Floating .

٣- مابعد التحضين :

- يزاح الوسط الحاضن .
- يغمس القطاع لمدة دقيقة في ماء مقطر .
- توضع القطاعات في ٢/١-١٪ كبرتيد الامونيوم الاصفر لمدة دقيقتين ثم تغمر القطاعات في جيلي جلسرين او الاباثي

النتيجة :

يكون دليل نشاط الانزيم بنيًا قاتمًا .

ملحوظة : عملية نزع الماء والترويق غير مستحبة حتى لاتؤثر علي كبريتيد الرصاص.

الكشف عن الفوسفاتيز الحمضى باستخدام NAPHTHOLA B

طريقة برستون BriSTONE لعام ١٩٥٨

التى طورها باركا BAARKA عام ١٩٦٠

تحضير المحاليل :

١- محلول المادة الخاضعة : Substrate Solution

- فوسفات نافثول Naphthol A2-B1 Phosphate ٥٠ ميللجرام
- دايميثيل فورماميد Dimsthyl Formamid ٥ سم٣

obeikandl.com

٢- المحلول المنظم: BUFFER SOLUTION

- خلات صوديوم Sodium Acetate ١,١٧ جم
- باربيتون الصوديوم Sodium Barbitons ٢,٩٤ جم
- ماء مقطر Distilled - Water ١٠٠ سم٣

٣- محلول نيتريت الصوديوم (يحضر قبل الاستعمال مباشرة) :

- نيتريت الصوديوم Sodium Nitrite ٤٠٠ ميللجرام
- ماء مقطر Distilled - Water ١٠ سم٣

٤- محلول باروازوز انيلين - يدكل :

- هايدروكلوريد باراروزنيتين Pararosamitin Hydrochloryied ٢ جم
- ٢ عيارية حمض يد كل ٠ 2N-Tlydre Chloric Acid ٥٠ سم٣

سخن علي لهب هادئ ثم برد الي درجة حرارة الغرفة ورشح .

تحضير محلول التحضين : INCUBATING MEDIUM

- محلول (١) ٠,٥ سم٣
- محلول (٢) ١,٥ سم٣
- محلول (٣) ٠,٤ سم٣ يخلطان معا قبل الاستعمال مباشرة.
- محلول (٤) ٠,٤ سم٣ ثم يضاف الخليط الي محلول التحضين .
- ماء مقطر ٦,٥ سم٣ بعد دقيقتين من اجراء الخلط .

ويراعي ان تكون درجة الاس الهيدروجيني لمحلول الحضن بين ٤,٧ - ٥ وان لم يكن ، فيستعمل محلول او عياري هيدروكسيد صوديوم لضبط درجة الاس الهيدروجيني ،

obeikandl.com

وفي جميع الحالات رشح المحلول .

خطـوات العمـــل :

١ – يتم الحصول علي قطاعات بالكريوستات لعينات مثبتة .

٢ – ضع القطاعات في محلول التحصين عند درجة ٣٧ م لمدة ١٥–٦٠ دقيقة .

٣ – اغسل القطاعات في ماء مقطر .

٤ – اصبغ أنوية الخلايا في محلول ٢٪ أخضر المثيل .

٥ – اغسل القطاعات في ماء جارٍ

٦ – غط القطاعات في الجلسرين جيللي ويمكنك ايضا ان تنزع الماء بسلسلة متصاعدة من الكحول ثم تروق في الزيلول ثم تغطي بصمغ .

النتائـــج :

تظهر اماكن نشاط انزيم الفوسفاتير الحمضي – مصبوغة باللون الاحمر وتضع الانوية باللون الاخضر .

نيوكليوتيديز NUCLETIDASE

$$\text{Ribonuclestide} + H_2O \rightleftharpoons \text{Ribonucles side} + 5\text{phosphate}$$

ويعمل هذا الإنزيم كوسيط في التحلل المائي لفوسفات ريبونيوكليوتيد والكثير من دي أكسي ريبونيوتيدات من الانزيمات المتماثلة Isozymes .

يوجد هذا الانزيم مرتبطا بأغشية الخلايا ، ويعزي اليه القيام بدور معين في تكسير الأحماض النووية وفي انتقال النيوكليوتيدات خلال غشاء الخلية .

طريقة الكشف عن الانزيم :

الوسط الحامضن

– أدينوزين أحادي الفوسفات ملح الصوديوم ٢٠ ملج (أذب في ماء مقطر واضبط عند

الأس الهيدروجيني ٧.٢) .

- ٥.٢ م (مولاري) ترس ماليت pH7,2 ٢٠ ملليلمتر .
- ٢٪ نيترات الرصاص ٢ ملليلتر .
- ٢.٥٪ كبريتات مغنسيوم ٥ ملليلتر .
- ماء مقطر ٢ ملليلتر .

اخلط جيدا واترك المحلول بعض الوقت ثم رشح .

التحضين : Incubation

وذلك لمدة ١٠٠-١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة أو عند ٣٧°م

مابعد التحضين :

- اسكب سائل التحضين .
- أغمس مرة أو مرتين في ماء مقطر .
- ضع القطاع في ٥٠ ٪ أو ١٪ كبريتيد الأمونيوم لمدة دقيقتين .
- ضع القطاع في جيلي الجلسيرين أو صمغ الأباثي (عملية نزع الماء غير مستحبة حتي لايتغير لون الرصاص) .

النتيجة : تعرف اماكن نشاطات الانزيم باللون البنى الداكن .

انزيم جلوكوز -٦- فوسفات

.GLUCOSE - 6 - PHOSPHATASE

يقوم هذا الانزيم بدور أساسى فى التفاعل التالى :

$$\text{D - glucose - 6 - phosphatase} + H_2O \xrightarrow[Ph5]{\text{الانزيم}} 6\ \text{glucose} + 5\text{phsphate}$$

وبجانب هذا يقوم الانزيم بنقل مجاميع الفوسفات من النيوكليوتيد ثنائى الفوسفات وثلاثى الفوسفات إلى الجلوكوز أو سكريات أخرى ويوجد هذا الانزيم فى الشبكة الاندوبلازمية فى خلايا الكبد والكليه والأمعاء بصورة خاصة .

obeikandl.com

المثبتات : فورمالديهيد متعادل – فور مالديهيد كالسيوم .

طريقة المعدن الثقيل Heavy Metal

(شيكوين Chiquoine ١٩٥٣)

المحورة بواسطة واشستين وميسيل ١٩٥٦

Wachstein & Meisel,1956

للجلوكوز سداسي الفوسفات

الوسط الحاضن :

– ١٢٥و٪ صوديوم دي جلوكوز -٦- فوسفات D-oglucese -6-phosphate sodium أو بوتاسيوم ٢٠ مل .

-٢, مولاري M ترس ماليت المحايد

0.2 Mtris malite buffer Ph. 6.5 ٢٠ مل

– ٣٪ نترات الرصاص

3% Lead nitrate ٣ مل

– ماء مقطر ٧ مل

بعد مزج هذه المكونات تترك لكي تستقر في اناء مغلق لمدة ٥ –١٠ دقائق عند درجة حرارة محلول التحضين .

التحضين :

يتم التحضين لمدة ٥–١٠ دقائق عند درجة حرارة الحجرة أو درجة حرارة ٣٧°م. (وتستخدم لذلك قطاعات مثبتة في محلول جلوتارلديهيد ويمكن تعويمها علي سطح محلول التحضين) .

مابعد التحضين :

– يزاح الوسط الحاضن

– تغمس القطاعات في ماء مقطر لمدة دقيقة تقريبا .

obeikandl.com

- ينقل القطاع الي ٥ . ٠٪ -١٪ محلول كبريتيد الأمونيوم الأصفر لمدة دقيقتين .

- يغمس في ماء مقطر .

- يغمر في محلول جيلي الجلسرين أو الاباثي .

النتيجـة : دليل نشاط الإنزيم عبارة عن راسب بنى داكن .

ملحوظة : عملية نزع الماء والترويق غير مستحبة لكى لاتؤثر علي لون كبريتيد الرصاص .

أدينوزين ثلاثى الفوسفات

Adenosine triphosphatase (ATPase) pH.7.5-9

يعمل هذا الانزيم كوسيط في التفاعل التالي :

$$ATP + H_2O \underset{\text{ph. 6.3}}{\overset{\text{الإنزيم}}{\rightleftharpoons}} ADP + \text{ortho phosphate}$$

والمعروف أنه يوجد العديد من الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ، أهمها :

أ - ميوسين أدينوزين ثلاثي الفوسفاتيز Myosin ATPase وهو يتم تنشيطه بواسطة أيونات الكالسيوم ويعمل عند الأس الهيدروجيني . pH9

ب - أدينوزين ثلاثي الفوسفاتيز في أغشية الخلايا ويتم تنشيطه بواسطة أيونات الصوديوم أو البوتاسيوم كما يتطلب وجود أيونات المغنسيوم ، وهو يعمل عند الأس الهيدروجيني pH.7.5

وهذه الانزيمات مسئولة عن تكسير الأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP . ويعني هذا أنهما يمدان الروابط الفوسفاتية الغنية بالطاقة بما ينتج عنه إطلاق هذه الطاقة ، كما يلعب ميوسين أدينوزيم ثلاثي الفوسفاتيز دورا هاما في انقباض العضلات كما يلعب الأدينوزين ثلاثي الفوسفاتيز المتواجد في أغشية الخلايا الخلايا دورا أساسيا في عملية انتقال أيونات الصوديوم والبوتاسيوم خلال أغشية الخلايا .

جـ - أدينوزين ثلاثي الفوسفاتيز المتواجد في الميتوكندريا وهو يعمل عند معدلات مختلفة للأس الهيدروجيني ، ويلزم تكسير الميتوكندريا للكشف عن هذا الإنزيم وذلك بواسطة عمليات التجميد ومعاملة الخلايا بمحاليل منخفضة التركيز .

obeikandi.com

طريقة الكالسيوم – كوبالت :

(باديكيولا وهرمان Padykula and Herman1955 pH.9)

لأدينوزين ثلاثي الفوسفات المتواجد في العضلات

الوسط الحاضن :

– ملح صوديوم أدينوزين ثلاثي الفوسفات	٧٥ مجم
أذب في ماء مقطر	٢٠ مل
ثم اضبط الأس الهيدروجيني عند pH9.2 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم NaOh	
– ٢٪ باربيتال الصوديوم	١٠ مل
– ٢٪ كلوريد الكالسيوم الخالي من الماء (Anhydrous Ca Cl_2)	٥ مل
– ماء مقطر	١٥ مل
ثم رشح	الكمية الكلية ٥٠ مل

التحضين : لمدة ١٥–٦٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة أو ٣٧°م

مابعد التحضين :

– اسكب الوسط الحاضن .

– اغمس القطاع جيدا في ماء مقطر لمدة دقيقة .

– ضع القطاع في ١–٢٪ كلورايد أو خلات الكوبلت Cabalt cloride or cobalt acetate وذلك لمدة خمس دقائق .

– اغسل في ماء جار لمدة دقيقة – دقيقتين .

– ضع القطاع في ١و–١٪ محلول كبريتيد النشادر الأصفر .

– اغسل في ماء جاري لمدة ١٠ دقائق .

obeikandi.com

- اغمس القطاع في جيلي الجليسرين أو محلول أباثي .

النتيجـــــة : يدل ظهور الراسب الأسود علي أماكن نشاط الإنزيم .

طريقة ثانية : (طريقة ملح الرصاص)

واشستين وميسل Washstein and Meisel, 1957

(pH.7.2)

تستخدم هذه الطريقة للكشف عن الأدينوزين ثلاثي الفوسفات في بعض الأعضاء والأنسجة الجسمية (بخلاف العضلات)

الوسط الحاضن :

- ملح الصوديوم للأدينوزين ثلاثي الفوسفات	٢٠ مجم
أذب في ماء مقطر	٢٠ مل
- ٢, مولار(0.2M) ترس ماليت المحايد أوالمنتظم (pH.7.2)	٢٠ مل
- ٢٪ نترات الرصاص	٣ مل
- ٢.٥ ٪ كبريتات المغنسيوم أو ٢٪ كلوريد المغنسيوم	٥ مل
- ماء مقطر	٢ مل
اخلط ثم رشح	٥٠ مل

التحضـــين :

من ١٠-١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة أو ٣٧°م

obeikandl.com

مابـعد التحضـين :

- اسكب الوسط الحاضن
- اغمس لمدة دقيقة في ماء مقطر .
- ضـع القطاع في ١٪ محلول كبريتيد النشادر الأصفر لمدة دقيقة .
- اغمس في ماء مقطر .
- اغمر في محلول جيلي الجليسرين أو محلول أباثي .

النتيجـة : ظهور اللون البني الداكن دلالة علي وجود الإنزيم .

ثيامين بيروفوسفاتيز

Thiamine Pyrophosphatase

يقوم هذا الإنزيم بدور العامل الوسيط المساعد في التفاعل الآتي :

$$\text{Thiamene pyrophosphate} + H_2O \rightleftharpoons \text{thiamine monophosphate} + \text{pyrophosphate}$$

يستفاد بطريقة الكشف عن هذا الإنزيم توضح جهاز جولجي في الخلايا دون الحاجة إلي استـخدام طرق الفضـة والأوزويوم المعتـادة في تلك الحـالات بما يوفر النفـقات والجهـد والصـعوبات وذلك لأن جهاز جولجي له علاقة وثيقة بهذا الإنزيم ، ويشاهد نشاط هذا الإنزيم بصورة خاصة في الخلايا العصبية والطلائية والبربخ والغدد الصماء .

طريقة الكشف عن الإنزيم :

طريقة الرصاص (نوفيكوف وجولد فيشر)

Novikoff and Goldfischer,1961

(pH.7.2)

obeikandl.com

الوسـط الحاضن :

- ثيامين بيروفوسفيت (تتراهيدريت) تذاب في ماء مقطر ويضبط عند ph7.2 ٢٤ مجم بواسطة هيدروكسيد الصوديوم NaOH ٢.٥ مل
- ٠.٢ ترس ماليت المحايد pH.7.2 ١٤ مل
- ١٪ نترات الرصاص ٣ مل
- ١٪ كلوريد ماغنسيوم خالي من الماء Mgcl2 ٥ مل

اخلط ورشح

التحضـين :

من ١٠-١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة ٣٧°م .

مابعد التحضين :

أسكب الوسط الحاضن .

- اغمس مرتين لمدة دقيقة في ماء مقطر .
- ضع في ٥ ٠.- ١٪ كبريتيد النوشادر الأصفر .
- اغمس في ماء مقطر .
- اغمر في جيلي الجلسرين .

النتيجة :

يستدل علي مكان ونشاط الانزيم باللون البني الداكن .

obeikandl.com

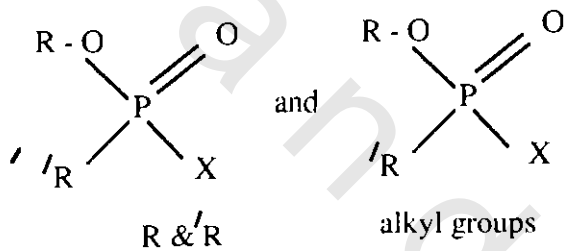
الإنزيمات المميئة الكربوكسيلية

CARBOXYLIC HYDROLASES

تساعد هذه الإنزيمات وتقوم بدور الوسيط في بعض التفاعلات مثل النموذج التالي :

$$RCOOR' + H_2O \rightleftharpoons R'COOR + RCH$$

ويحدث هذا التفاعل في اتجاهين ، علي أن هذه الانزيمات تعمل علي التميؤ والتكسير في اتجاه ، كما تساعد في البناء في الاتجاه الآخر. والملاحظ أن تقسيم هذه الإنزيمات أمر بالغ الصعوبة لكثرة أنواعها واختلاف ميكانيكيتها حسب العضو الذي توجد به ، وكذا حسب حساسيتها بالنسبة للمثبطات . وبعض الإنزيمات المميئة الكربوكسيلية يتم تثبيطها بواسطة التركيزات المنخفضة نسبيا للفوسفات العضوية تبعا للمعادلة الآتية :



وكذلك الأمر بالنسبة للسيانيد Cyanide والفلوريد Fluoride وتعرف مثل هذه الإستيريزات بأنها : استيريزات غير نوعية . وتشمل هذه الاستيريزات الانواع التالية :

الاستيريز غير النوعية Non specific esterases وهى تتضمن بدورها الانواع الأتية :

١- الاستيريزيس الكربوكسيلية Carboxy esterases

وهي :

أ- أريل استيريز Aryl esterase

وتشتمل :

A - esterase

Aromesterase

Aryl esterase hydroluse

ب - أسيتيل استيزيز

وتشتمل علي :

C-esterase

Acetic acidesterhydrolase

وتوجد هذه الإنزيمات في الشبكة الاندوبلازمية – الليسوسومات ، واحتمالا في الميتوكندريا والهيالوبلازم خاصة في الكبد والكلية واللفائفي .

وتعمل معظم هذه الإنزيمات غير النوعية عند pH.5-8 ، وإن كان دورها في النشاطات الخلوية غير معروف بدقة .

طريقة الكشف عن الاستيريزات غير النوعية :

طريقة الازدواج المتزامن للأزو مع خلات الفانافثيل

Azo Coupling with α - naphthyl acetate
Davis and Ornstein (1959).

- يتم إعداد القطاعات المجمدة بالكريوستات .
- الوسط الحاضن Incabation medim

٢,٨٪ فوسفات الصوديوم الثنائى ٥٠ مل

هسكازونيم ب – روزانلين

hexazonium P- rosaniline ١,٥ – ٤,٥ مل

امزج جيدا واضبط الاس الهيدروجنى عند ٦,٥ – ٧,٤

١٪ الفانافثيل استيت مذاب فى الاستون ٠,٥–١ مل

امزج جيدا ورشح

مابعد التحضين :

– اسكب الوسط الحاضن ثم اغمس فى ماء مقطر .

– ضع القطاعات فى ٤٪ فورمالديهيد لبضعه ساعات عند درجة حرارة الحجرة

– اغمس فى ماء الصنبور ثم أضع بالهياتوكسلين أو أحمر السريع

– تتم التغطية بمحلول أباثى .

النتيجة : يستدل على نشاط الانزيم باللون البنى

الكولين استيريزات
Cholinesterases

تقوم هذه الإنزيمات بدور الوسيط في التفاعلات التالية :

$$A\text{-Acetylcholine} + H_2O \rightleftharpoons \text{Choline} + \text{acetate}$$

وأيضاً :

$$B\text{-Acetylcholine} + H_2O \rightleftharpoons \text{Choline} + \text{Carboxylic acid}$$

وكقاعدة عامة تنقسم الكولين استيريزات الى :

A-Acetylcholinesterase(acetylcholine hydrolase) which is a specific cholinesterase.

إسيتيل الكولين استيريز المحدد

B-Pseudo cholinertease (non specific cholinerterase)

obeikandl.com

وهو يعرف بأنه كولين استيريز غير الحقيقي أو الكاذب .

- ويوجد هذا الانزيم في خلايا الدم الحمراء وأجسام الخلايا العصبية وكذلك في التشابكات العصبية والنهايات الحركية للأعصاب في العضلات الإرادية .

ويعمل الأسيتيل كولين استيريز عند الأس الهيزروجيني pH.7-8 والكولين استيريز عند pH.8-85 .

ويستخدم لهذه التحضيرات قطاعات الكريوستات المثبتة في الفورماليهيد .

طريقة "ثيوكولين للكشف عن الكولين استيريز"

Thiocholine method for choline esterase

(Kamnovsky and Roots, 1964)

الوسط الحاضن :

- بيوتيل أو أسيتيل نيوكولين أيوديد Butyl thiocholine iodide	١٢,٥مجم
- تذاب فى ماء مقطر	٢,٥ مل
- ٠,٨٢٪ خلات الصوديوم (Sod. acetate)	١٥,٨ مل
- ٦,٠٪ حامض (Acetic acid)	٠,٥ مل
- ٢,٩٤٪ سترات الصوديوم Sod. citrate	١,٥ مل
- ٠,٧٥٪ كبريتات النحاس Copper sulphate	٢,٥ مل
- ٠,١٦٥ ٪ سيانيد حديديك البوتاسيوم K Ferricyanide	٢,٥ مل
about 25 ml	

ويكون لون المحلول أخضر باهتًا والأس الهيدروجيني pH.5-5

obeikandl.com

التحضـــين :

ضع القطاعات في المحلول لمدة ١٠-١٨٠ دقيقة عند ٣٧°م .

مابعد التحضين :

- يسكب الوسط الحاضن .
- تغمس القطاعات في الماء المقطر .
- يتم تغطيتها بمحلول جيلي الجليسرين أو آباثي .

النتيجة : يدل اللون الاحمر البني علي أماكن وجود الإنزيم .

الكشف عن الأسيتيل كولين استيريز
بطريقة ثيوكولين الرصاص - سيانيد الحديدوز

Thiocholine - Lead Ferrocyanide method

(Eranko, Käoelle and kaisanen1957)

تحضير المثبت :

٥.٠٠ مل فورمالين (٤٠٪ فورمالديهيد) في ٥٠ مل كريس - رنجر - كالسيوم) ويتم تحضيره كمايلي :

- ١٠٠ مل ٠.٩ ٪ كلوريد صوديوم Nacl
- ٤ مل ١.١٥ ٪ كلوريد بوتاسيوم Kcl
- ١.٢٧ مل ١.٢٢ ٪ كلوريد كالسيوم $Ca\ cl_2$
- ١.٠٠ مل ٢.١١ فوسفات بوتاسيوم KH_2PO_4
- ١.٠٠ مل ٣.١٣ كلوريد ماغنسيوم $Mg\ cl_2.6H_{10}$

obeikandl.com

- ٢,٠٠ مل N . HCL

- يتم تثبيت قطع النسيج في المحلول عند درجة ٤°م لمدة ٢-٤ ساعات ويتم التقطيع بالكريوستات .

الوسط الحاضن :

- يجب أن يكون الماء المقطر المستخدم مغليا لمدة ساعة قبل الاستعمال .

- أضف المواد المذكورة بالترتيب الموضح بين المزج بدقة بعد كل إضافة .

- ترس الخلات المحايد Tris-acetate buffer عند pH6.00 وذلك بإضافة ٢ مل M-acetic acid الي ١٠ مل ٢، M.tris ، ويجب ترشيح محلول خلات الرصاص قبل الاستعمال .

ويتم ٢٣ مجم اسيتيل كولين أيوديد في ١,٢ مل ماء واضافة ٤، مل من ١, M.lead acetate

ويؤخذ المحلول الرائق بعد عملية الطرد المركزي .

- ماء مقطر	٤,٩ مل
- Tris acetate buffer (0.17M)	٤ مل
- خلات الرصاص (0.1M) lead acetate	٠,٥ مل
- (0.01M) Potassium ferricyanide	٠,٥ مل
- (0.05M) Acetyl thiocholine	٠,٦ مل
- (0.05 M) Potassium feirricyanide	٠,٠١ مل

تضاف المادة الاخيرة لتشبيع الوسط بسيايند حديدوز الرصاص مكونا راسبًا أبيض مصفراً وبعد الترشيح يبرد المحلول في الملح .

التحضـــين :

- إغمس القطاعات في ٣ تغييرات في ١٧, Mtris acetate buffer لتر أيونات الفوسفات .
- ضع القطاعات في الوسط الحاضن لمدة ١٠-٦٠ دقيقة عند درجة الصفر .
- اغمس في ٣ تغييرات في الماء المقطر عند درجة الصفر .
- انزع الماء وضع فى وسط صناعى Synthetic resin .
- عامل بمحلول مخفف من كبريتيد النوشادر المضاف اليه أو M.lead acetate

النتيجـة : ظهور راسب أصفر أو بني في أماكن نشاط الإنزيم .

الطريقة المباشرة للكشف عن الاسيتيل كولين استيريز

(Karnovsky and Roots, 1964)

المثبت : فورمول كالسيوم المبرد وتعد القطاعات بالكريوستات (٥-١٠ ميكرون)

التحضين : توضع القطاعات لمدة ٦٠-١٢٠ دقيقة في المحلول التالي : ٥ مجم أسيتيل كولين أيوديد أو بيوتيل أسيتيل ثيوكولين أيوديد Acetyl thiocholine iodide or butyl thiocholine iodide

- pH.6 acetate buffer M0.1 أضف مع التقليب ٦.٥ مل .
- ٠.٥ مل أو مولار سترات الصوديوم Soduim citrate
- ١.٠ 30M cuso4
- ١.٠ ماء مقطر
- ١.٠ 5 mmM Potssium ferricyanide

يلاحظ أن المحلول الحاضن النهائي يكون رائقا مائلاً للخضرة ، ويظل ثابتا لبضعة

obeikandl.com

ساعات .

مابعد التحضين :

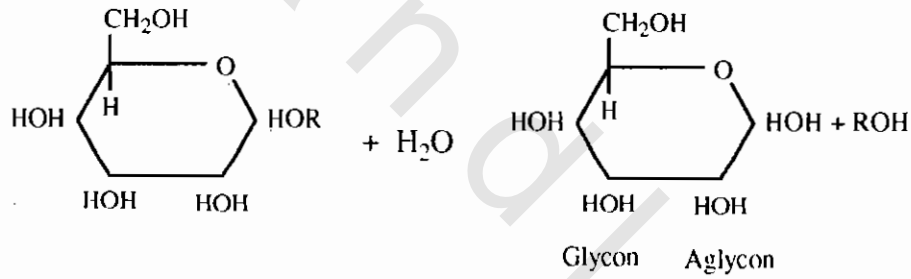
- اغمس في ماء مقطر .
- اصبغ صباغة خلفية بالهيماتوكسلين
- انزع الماء ثم اظهر القطاعات في كندا بلسم

النتيجة : ظهور راسب أحمر يدل علي أماكن نشاط انزيم كولين استيريز .

الجليكوسيدات

Glycosidases (Glycoside hydrolases)

تقوم هذه الإنزيمات بدور العامل الوسيط في تميؤ الأربطة الجليكوسيدية



وتنقسم الجليكوسيدات الي :

- عديد السكريديز Polysaccharidase Polysaccharidase
- أوليجو سكريديز Oligo saccharidase
- ثنائي السكريديز Disachari dase

obeikandi.com

الكشف عن الجليكوسيدات

المثبت : فورمول كالسيوم مبرد وتعد القطاعات بالكريوستات

الوسط الحاضن :

– اندوكسيل الجلوكوسيد Indoxyl glucoside	٣ مجم
– داي ميثيل تورثورمايد	٠,٣ مل
– 0.1M Citrate phosphate buffer	٧ مل

(pH.3.5-5.5)

قلب مع التحريك بانتظام ، ثم أضف :

50 mM K ferricyanide (1.6y)	٠,٥ مل
50 mM ferrscyanide (2.11)	٠,٥ مل

قلب ثم رشح

– ضع القطاعات في المحلول ٣٠ دقيقة – ٢٤ ساعة عند درجة ٣٧°م .

مابعد التحضين :

– اغسل بالماء

– اطمر في محلول جيلي جيلسرين أو آباثي

النتيجة : اللون الازرق يدل علي أماكن نشاط الإنزيم .

البيتيديزس

Peptidases (Proteolytic Enzymes)

(Peptide hydrolases-hydro lytic enzymes)

تقوم هذه الإنزيمات بدور العامل المساعد والوسيط في التكسير المائي لأربطة البيتيدات كمايلي :

obeikandl.com

$$R\text{-}CO\ NH\text{-}R + H_2O \rightarrow R\ COOH + R\text{-}NH_2$$

وتشتمل هذه الإنزيمات علي :

أ- البيتيديزات الداخلية : Endopeptidases

وتعمل علي تميؤ الرباط البيتيدي الموجود وسط الجزئ

ب - البيتيديزات الخارجية :- Exopeptidases

وهي التي تميؤ الرباط الببتدي الموجود في طرف الجزئ . ويشتمل النوع الاول علي الإنزيمات المعينة البروتينة في القناة الهضمية مثل الببسين والتربسينوالكيموتريسين بينما يشتمل النوع الثاني علي الكاتبيسن Cathepsin الموجود في الليسوسومات .

مثال للببتيديزات :

الببتديز الأمينى

Amino Peptidase

يوجد هذا الإنزيم في أغشية الخلايا ، ويقوم بتميأة الببتيدات المختلفة والأريل امبدات

مثل : leucyl and alanyl 2naphthyl amide

$$\text{Alanyl-2 naphtylamide} + H_2O \longrightarrow \text{L-alanine} + \text{2naphthylamine}$$

طريقة الكشف :

(طريقة الآزو المزدوجة المتزامنة)Simltaneous azo-coupling (Nachales, 1960)

الوسط الحاضن : L-alanyl or L-leucyl-4 methoxy 2- naphthylamide

- أذب في N,N dimethyl formamide ٠,٥ مل
- او M فوسفات وخلات وكاكوديلات أو حامض ستريك فوسفات المنظم ٠,٥ مل

وبضبط عند pH.6.5-7.5

- أزرق السريع fast blue ١٠ مجم

امزج ثم رشح

- يتم التحضين لمدة ٥-٤٥ دقيقة عند ٣٧°م

مابعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن
- اغمس في ماء مقطر .
- ضع القطاع فى٢٪ كبريتات الحديد لمدة ٥ دقائق .
- اغمس في ماء مقطر .
- ضع القطاعات في ٤٪ فورماليهيد لمدة ساعتين .
- اغمس في ماء مقطر .
- اظهر في جيلي الجليسرين أو الآباثي .

النتيجة :

أماكن نشاط الانزيم تأخذ اللون الازرق البنفسجي

obeikandl.com

إنزيمـات سـلفاتيزيس

Sulfatases

يشار لهذه الانزيمات عادة بأنها "Aryl sulphatase" آريل سلفاتيز، وتقوم بتميئى التفاعل :

$$\text{Aphenol sulphate} + H_2O \rightleftharpoons \text{sulphate} + \text{phenol}$$

ومنها :

أريل سلفاتيز A	ويعمل عند pH4.5-5.2
آريل سلفاتيز B	pH5.5-5.9
آريل سلفاتيز C	pH8-8.5

ويتواجد كل من آريل سلفاتيز B,A في الليسوسومات فقط ، أما آريل سلفاتيز C فيتواجد في الشبكة الاندوبلازمية .

طريقـة الكشـف :

طريقة استخدام ملح P-nitro catechol sulphate

تستخدم قطاعات الكريوستات الطازجة .)

الوسط الحاضن :

P-Nitro pyrocatechol sulphate

1,2dihy drox 5-nitro benzene sulphate	١٦٠ مل
أذب في ماء مقطر .	٤٠ مل
-أو M مولار خلات المنتظم 0.1 M acetate buffer pH5.5	١٢ مل
- ٨٪ نترات الرصاص lead ntrate	٤ مل

obeikandl.com

يتم ضبط pH عند ٥.٥ بواسطة M,2 حامض الخليك وخلات الصوديوم . يترك لمدة ١٥-٣٠ دقيقة عند درجة ٣٧ °م ثم يرشح .

- يتم التحضين لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة عند ٣٧°م .

مابعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن

- أغمس في ماء مقطر .

- ضع القطاعات في ٠,٥ -١٪ محلول كبريتيد النوشادر الأصفر لمدة دقيقة - دقيقتين

- اغمس في ماء مقطر .

- طمر في جيلي الجليسرين أو محلول اباثي .

النتيجة : تصبغ أماكن نشاط الإنزيم باللون الاسود البني .

الترانسفيريزيس

Transferases

(الإنزيمات الناقلة)

تقوم هذه المجموعة الكبيرة كعامل مساعد ووسيط لنقل مجموعات معينة من مركب المعطي "donor" الي المركب الآخر المستقبل "receptor" كما توضح المعادلة التالية :

$$R\text{-}D + A \rightleftharpoons RA + D$$

ومن هذه الانزيمات :

- كاربون ترانسفيريز Carbon transferase

obeikandl.com

- اسبارتيت كارباميل ترانسفيريز	Aspartate carbamyl
- أورنثين كاربوميل ترانسفيريز	Ornithine Carbomyl transferase
- اسباريت امينو ترانسفيريز	Aspartate amino transferase
- كولين اسيتيل ترانسفيريز	Choline acetyl transferase

ويمكن الكشف عن هذه المجموعه بطريقة بالطريقة الآتية :

مثال لهذه المجموعة :

جليكوجين فوسفوريليز

Glycogen phosphorylase

لعل هذا الانزيم كعامل مساعد في تكسير أو يميق انواع الاميلوز حسب المعادلة التالية :

$$((1,4\text{-}\alpha\text{-}1)\text{- Glycosyl})_n + \text{orthophosphate} \rightleftharpoons$$

$$.\ (1,4\text{-}\alpha\text{-D Glycosyl})_{n-1} + \text{D-Glucose} + \text{Phosphate}$$

ويفضل الكشف عن هذا الانزيم فى الكبد والقلب والعضلات الارادية وتستخدم لهذا الغرض قطاعات كريوستات غير مثبتة أو معاملة بالاسيتون

طريقة تاكوشى ومارياكو (جولدوسكى ١٩٥٨)

Goldwisky (1968)

للكشف عن هذه الانزيمات

الوسط الحاضن :

- ماء مقطر ١٥ مل

ويضاف بالترتيب التالي

– صوديوم – جلوكوز ١ فوسفات	٥ مجم
– صوديوم أدينو مونوفوسفيت Soduim adeno monophosphate	١٠ مجم
– صوديوم إثيلين ديامين تتراأسيتيك (EDTA)	٢٠ مجم
– فلوريد صوديوم Soduim fluoride	٢٠ مجم
– جليكوجين (مذاب في الماء)	٥–١٠ مجم
– انسيولين Insulin	١–٢ وحدة
0.1M acetate buffer pH: 5-7	١٠ مل
– بوليفينيل بيروليدون Polyvinyl Pyrroldone	١–٢ مجم

اخلط جيدا واضبط عند pH 5.8 .

التحضين : لمدة ٣٠–٦٠ دقيقة عند ٣٧ °م

مابعد التحضين :

- اغمس في ماء مقطر .
- ضع في ٩٦٪ كحول إيثيلي لمدة ٣ دقائق .
- ضع في محلول . (2gm iodine makeup300) lugol and dil 1:9 before use) .
- ضع القطاعات في ٤٪ فورماليهيد لمدة ٥ دقائق .
- اغمس في ماء مقطر .
- ضع القطاع في جيلي جليسرين .

النتيجة : اللون الازرق يدل علي الجيلكوجين فوسفوريليز (جلوكاجون غير متفرع)
أما اللون البني فيدل علي الجليكوجين فوسفوريليز جلوكان متفرع

اكسى ريدكتيز Oxyreductases

وهى تشتمل على مجموعة كبيرة من الإنزيمات التى تقوم وتساعد فى أكسده مختلف المواد الخاضعة substrates وتعتبر الطاقة المنطلقة ضرورية وأساسية فى أيض الخلايا والأنسجة .

يمثل ذلك المعادلة التالية $AH_2 + B \rightleftharpoons A+BH_2$

معطى الالكترونات أو المختزل — المستقبل

وتنقسم الأكسى ريدكتيز الى الأنواع التالية :

١ - الانزيمات المؤكسدة Oxidases والتى يكون فيها الاكسجين هو المستقبل كما فى المعادلة السابقة .

٢ - الدى هيدروجينيز Dehydrogenases والتى يكون فيها المستقبل مادة غير الاكسجين ولايمكن أن يكون الاكسجين .

طريقة الكشف عن الانزيم

Oxidative Coupling Method

بريستون Burstone,1959

تستخدم قطاعات طازجة من الكريوستات

الوسط الحاضن :

- بارافينيل - بارا - فينلين ديامين p-phenyl-p-phenylenediamine
(p-amino diphenyl amine)

- نفثوك AS-LG

١٠ - ١٥ مجم (1hydrox-2-naphthoc acid)

١٠ -١٥ مجم (naphthol AS-LG)

obeikandl.com

- ٠,٠٥ مولار فوسفات أو ترس Hcl منظم pH.7.2-7.4 ٥٠ مل

0.05 Mphosphate or Tris Hcl buffer pld 7.2-7.4 or : polution of 1.48 gm Soduim phosphte (N_2PO_4 12 H_2O) and 0.43 gm Potassium phosphate (KH_2PO_4) in 11 0.7 Soduim chloride (adjust pH to 7.2) .

التحضين : يتم تحضين القطاعات لمدة ٦٠-١٢٠ دقيقة عند ٣٧°م

بعد التحضين :

- تنتقل القطاعات الي ١٪ نترات الكوبالت cobalt nitrate لمدة دقيقة .
- اغسل في ماء مقطر .
- طمر القطاعات في جيلي الجليسرين أو محلول أباثي .

النتيجـــة :

يستدل علي نشاط الانزيم باللون الازرق البني أو البنى الاسود .

الإنزيمات المؤكسدة اكسيديزس

Oxidases

وهى تشتمل على :

- سيتوكروم أكسيديز Cytochrome oxidase
- فيرو سيتوكروم Ferro Cytochrome
- أكسجين اكسيدو ريدكتير Oxygen oxido reductare

وتقوم هذه الانزيمات بدور العامل المساعد فى التفاعل التالى :

$$4 \text{ Ferro cytochrome C} + O_2 \longrightarrow 4 \text{ Ferro cytochrome C} + 2H_2O$$

والسيتوكروم عبارة عن هيموبروتين يقوم بنقل الالكترونات فى السلسة النفسية .

obeikandl.com

وتنقسم السيتوكرومات الى ثلاثة مجاميع اساسية هى : a,b,c وتحتوى كل مجموعة على عدد وآخر من السيوكرومات هى : a_1, a_2, a_3 والخلايا الحيوانية بها . a , a_3 , b, b_5 , c , c_1 والسيتوكروم a, a_3 , b , C, C_1 متواجد فى الغشاء الداخلى للميتوكندريا ويعرف السيتوكروم a , a_3 باسم اسيوكروم اكسيديز oyto chrome oxrdase

ويتواجد b_5 فى الغشاء الخارجي للميتوكندريا أو أغشية الشبكة الاندوبلازمية .

ويعتبر السيتوكروم أكسيديز الانزيم المميز لاغشية الميتوكندريا التى يرتبط بها ارتباطا وثيقا . ويتواجد الانزيم بكثرة فى الخلايا التى تحتوى على كمية كبيرة من الميتوكندريا حيث توجد بها العديد من الأنشطة الأيضيه . ولهذا فإن هذا الأنزيم يعتبر مقياسا حقيقيا لعمليات الإيض التاكسدى فى الخلايا وذلك واضح بصورة خاصة فى العضلات القلبية والانابيب الكلوية

ويحدث تثبيط السيتوكروم اكسيديز بواسطة السيافيد cyanide والأزيد azide

انزيمات ديهيدروجينيز (النازعة للهيدروجين)

Dehydrogenases

تعمل هذه الإنزيمات كإنزيمات مؤكسدة وذلك عن طريق نقل أو نزع الهيدروجين H^+ (أكسدة مختزلة oxidoreduction) وذلك مثل : سكسينيك ديهيدروجنيز Ssuccinic dehydrogenase

سكسينيك ديهيدروجنيز (SDH)

Succinic Dehydrogenase

يقوم هذا الانزيم بدور العامل المساعد في التفاعل التالي :

Succinate + acceptor $\rightleftharpoons$ fumerate + reduced acceptor

وينتمي هذا الانزيم الي مايسمي نظام انزيمات السكسينيك المؤكسد وهي وحدات

obeikandl.com

مفردة من مجموعة انزيمات منتظمة في سلسلة داخل الميتوكندريا ، وبعد السكسينيك ديهيدروجنيز أول هذه السلسلة والأخير هو السيتوكروم أكسيديز . وانزيم (SDH) عبارة عن انزيم فلافو بروتين Flavoprotein ، ويرتبط الفلافين بالبروتين وكل مجموعة فلافية بها ٤ ذرات من الحديد ، كما يحتوي الإنزيم علي مجموعة "SH" التي يعتمد عليها نشاط الإنزيم .

ويعمل السكسينيك ديهيدروجنيز عند pH.7.6-8.5 ويشارك هذا الانزيم في دائرة كربس Krebs Cycle ويعطي نشاط هذا الإنزيم دلالة علي نشاط دورة كربس .

وهذا الانزيم عالى الحساسية بالنسبة للمثبتات ، ويتم تثبيط نشاطه بواسطة الجلوتار لديهيد ويعتبر التثبيت في الفورمالديهيد لمدة ٥-١٥ دقيقة أنسب المثبتات .

طريقة الكشف عن الإنزيم :

- تستخدم قطاعات كريوستات أوقطاعات مبينة في الفورمالين لمدة ٥-١٥ دقيقة .

طريقة ملح التترازوليوم (لوجد ١-١٩٦٥)

Tetrazolium Salt procedure (Logda,1965) .

محلول التحضين :

0.1 M phosphate or 0.2 m.Tris buffer	
pH.7.2 - 7.4	١٠ مل
- محلول نترازوليوم ∫ -0.4 ∫ nitro BT	0.1
or tetranitro BT (Dissolve in 0.5 ml	١٠ مل
add 9.5 ml dist. H_2O)	
- ٠,٥٪ سيانيد الصوديوم 0.05/ Na cyanide	٤ مل
0.01 M, adjust pH vuth Hcl to 7.2).	
- ٤٧,٠٪ كلوريد المغنسيوم	
0.47/ anhydrous or 1/ Crystalline magnesium chloride (0.05 M, when Tris Hcl buffer is used 0.6 magnesium sulphae)	٤ مل

openkandil.com

- ماء مقطر ٨ مل

ويمكن اختزان هذا المحلول في ثلاجة عند ٤ °م . ٣٦ مل

مخزون محلول السكسينيك Stock Sol. of succint

١ مولار سكسينات الصوديوم سداسي الماء ٢٧٠ مجم/١ مل ماء مقطر

اضبط الـ pH عند ٧.٤ أو ٧.٢ ويخزن في ثلاجة عميقة التجميد .

- 1 M Succinate , disoduim salt hexahydrate- (270 m/l mol adjust H_2O) . Adjust pH 7.2-7.4 - store in deep freeze.

التحضين ومابعد التحضين :

التحضين : محلول التحضين المائى : ٢ مل

او مولار سكسينيات ٠,١ - ٠,٢ مل

٠,٠٥ ٪ مماديون Memadeion ٢-٣ فقط

2methyl-1,4 naphtho quinoremeniphthore

Vitamine K_3 dissolved in acetone

أو

فينازين ميثوسلفات

phenazinemetho suphate (pH_5) ٠,١-٠,٣ مجم

Mix check pH 7.2 - 7.6 ٢ مل

تحضين القطاعات :

من ٥-٤٥ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة في الظلام أو الضوء الأحمر .

وبعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن .

- اغمس في ماء مقطر .

obeikandi.com

- ضع القطاع في ٤٪ فورمالين لمدة ١٠ دقائق - ساعة .

- اغمس في ماء مقطر .

- يستخدم صبغ حلقي مثل الأحمر السريع .

- يغمر القطاع في جيلي جليسرين أو أباثي .

النتيجة :

يظهر نشاط الانزيم باللون الازرق أو الأزرق المحمر .

لاكـتك ديهـيدروجينز

LACTIC DEHYDROGENASE

المعروف ان نظام نقل الالكترونات لايحدث في عمليات تكسير الجلوكوز لاهوائيا ANAEROBIC GLYCOLYSIS وذلك بسبب غياب الاكسجين ، وعوضا عن ذلك يعمل نظام آخر لتوليد مادة DPN اللازمة في هذه العمليات باستخدام البيروفيت . وفي هذه الحالة يعمل انزيم لاكتك ديهيدروجنيز كوسيط في هذا التفاعل :

وتلجأ الخلايا العضلية التي تحتاج لمزيد من الاكسجين اثناء نشاطها الي حمض البيروفيك الذي يقوم باكسدة مادة NADH2 CO-ENZYMEI-REDUCED وينتج حمض اللبنيك ومادة DPN .

ويأخذ حمض اللبنيك طريقه الي الكبد - عن طريق الدم - حيث يتم الاستفادة به في بناء جزئيات الجلوكوز .

وتجدر الاشارة الي أن انزيم لاكتك ديهيدروجنيز من الانزيمات الذائبة.

ويتكون هذا الانزيم من طرازين من سلاسل عديد الببتيديز ويرمز لهما بالرمزين A,B، ويرجعان الي اثنين من الجينات ويتواجد هذا الانزيم علي صورة خمسة «متشابهات

انزيمية» ISOZYMES ، يتكون كل «متشابه انزيم» من اربع وحدات من سلاسل عديد الببتيد – فالمشابه الانزيمي السائد في العضلات الهيلكية يرمز له بالرمز A_4 حيث يتكون من أربع سلاسل متشابهة طراز A ، بينما يشارك في العضلات القبلية B_4 والمتشابهات الانزيمية الثلاث الاخري ، رموزها A3B, A2B2, AB3.

ومن الجدير بالذكر ان لكل نسيج متشابهاً انزيمياً خاصاً به يتواجد بمعدل عال في الدم في حالات الخلل التي تصيب النسيج ، مما يجعل لتحليل الفصل كالكهربائي ELECTRO-PHORESIS للمصل SERUM أهمية في تشخيص العضو المصاب بالضرر .

وعادة مايرتفع معدل انزيم لاكتك ديهيدروجنيز في الخلايا السرطانية . ومن المعروف ان هذه الخلايا تستهلك كمية كبيرة من الجلوكوز وتحولها في وجود الاوكسجين الي لاكتيك مع انتاج كمية محدودة من الطاقة .

طريقة الكشف عن الانزيم :

المحلول الاساسي (محلول التخزين) STOCK SOLUTION

٠,٢ مولار منظم ترس 0,2M TRIS-HCL BUFFER	٦٥ سم^3
كلوريد ماغنسيوم $MGCL_2$-6 H_2O	٢٠٠ ملليجرام
ازيد الصوديوم SODIUM AZIDE (NAN_3)	١٥ ملليجرام
ماء WATER	٨٥ سم^3

ثم أضف :

بولي فينيلي الكحول (PVA) POLYVINY ALCOHOL (M.W-30.000)	٤٠ جم
او بولى فينيل بروليدون (PVP) POLY VINYL PYROLLIDON	١٥ جم

ويلاحظ ان مادة «ازيد الصوديوم» توقف التنفس الهوائي للخلايا كما ان اضافة مادة PVP أو مادة PVA اللتان تتميزان بانهما غرويتان تلزم وجود احداهما لكون الانزيم ذائبا . ويراعي وضع مقلب مغناطيسي Magnetic Stirrer في قاع وعاء تحضير المحلول لضمان بقاء المادة الغروية طافية علي السطح حتي تنوب دون رسوبها علي القاع مما يؤدي الي صعوبة نوبانها .

محلول التحضين : INCUBATION MEDEUM

يحضر محلول التحضين قبل الاستعمال مباشرة ، وهو يتكون من :

المحلول الاساسي : ٥ سم^{3}

لاكتات الصوديوم SODIUM DL-LACTATE (NAC3 H5O3) 5X10^{-4} MOLE

٥٦ ميلليجرام

– نيتروبلونترازوليم NITRO - BLUE TETRAZOLIUM ١ ميلليجرام

نيكوتين اميد ادنين داينيوكليوتيد NICCTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE ١ ميلليجرام

خطـوات العمـل :

١– يتم الحصول علي قطاعات ثلجية (مجمدة) سمكها ٤–١٠ ميكرونات من عينة طازجة ويثبت القطاعات لمدة (٥–١٠) دقائق في اسيتون بارد (٤م) أو فورمالين متعادل بمنظم الفوسفات .

٢– حمل القطاعات علي اغطية شرائح أو شرائح زجاجية .

٣– اغسل القطاعات بالماء لمدة حوالي ١٥ ثانية مع الرج .

٤– احضر طبق بتري وضع في قاعه ورقة ترشيح مبللة بالماء ثم ضع اغطية الشرائح او الشرائح (والقطاعات ملصقة علي سطحها العلوي) علي ورقة الترشيح المبللة +

obeikandl.com

ضع كل قطاع من محلول التحضين الطازج . غط طبق بترى ثم ضعه في حضانه عند درجة ٣٧°م .

٥- اختبر تكون راسب ملون داخل الخلايا ، وذلك كل عشر دقائق مع ملاحظة ألا يزيد وقت التحضين عن ساعة واحدة .

٦- امسك الشرائح أو الأغطية بملقاط مع تصفية قطرة محلول التحضين .

٧- ضع الشرائح او الاغطية وعليها القطاعات في فورمالين متعادل بمنظم الفوسفات لمدة عشر دقائق في درجة حرارة الغرفة -هذه الخطوة تضمن ايقاف التفاعل الهستوكيميائي مع مزيد من التثبيت لنسيج القطاع .

٨- اغسل الشرائح او الاغطية في الماء ، انزع الماء بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول ثم روق وغط بأحد الأصماغ .

النتـــائج :

يتكون راسب فورمازان FORMAZAN احمر او ازرق اللون في اماكن نشاطات الانزيم

ميكانيكية طريقة الكشف :

يقوم انزيم NADH2- DIAPHORASE بأكسدة $NADH_2$ الـي NAD ويسلم الهيدروجـين الي مادة TETRAZOLE التي تترسب عندئذ في صورة مادة فورمازان ملونة .