

الفصل الثامن

هستوكيميائية المواد غير العضوية

Histochemistry of Inorganic Substances

8

obeikandi.com

الفصل الثامن

هستوكيمياء المواد غير العضوية

Histochemistry of Inorganic Substances

ما زال الكشف عن المركبات والمكونات غير العضوية في الخلايا والأنسجة باستخدام الصبغات والتفاعلات الكيميائية - لكي يمكن رؤيتها بالميكروسكوب - أمرا محدودا وذلك نظرا لوجودها بتركيزات منخفضة كما أن البعض منها يوجد بصورة مستقرة متحدة مع مركبات أخرى .

علي أنه توجد بعض الطرق الموثوق بها للكشف هستوكيميائيا عن بعض الأيونات anions مثل الكربونات carbonates والفوسفات phosphates (PO₄) والكلور chloride CL⁻ ، وكذلك بعض الكاتيونات cations مثل الكالسيوم calcium (Ca⁺⁺) والحديد iron (Fe⁺⁺) والنحاس Copper (Cu⁺⁺) ، والزنك zinc (Zn⁺⁺) .

ويمكن الكشف عن العناصر المعدنية بالطرق الهستوكيميائية التي تستخدم في علاج بعض الامراض في الانسان ، ومن الطبيعي أن هذه المكونات يكشف عنها بالطرق الكيميائية والفيزيائية .

الفوسفات Phosphates

الكشف عن الفوسفات phosphates

تستخدم طريقة الموليبيدات molybdates للكشف عن أيونات الفوسفات العضوية وغير العضوية ، والفوسفات غير العضوية تترسب وتتفاعل مع الموليبيدات بصورة سريعة بينما تحتاج الفوسفات العضوية إلى تميؤها كما هو الحال في الشق الفوسفاتي في الحامض

النوي ح ن د DNA .

الطريقة :

طريقة تشنخ Cheng عام ١٩٥٦ .

- تثبت قطع النسيج في ٥٠٪ فورمالين متعادل .
- يتم إعداد قطاعات مجمدة سمكها (٢-٥ ميكرون) ، علي أنه يمكن استخدام قطاعات شمعية أيضا .
- اغمس القطاعات في محلول خلات منظم متعادل neutral acetate buffer أسه الهيدروجيني ٤,٠٠ تفصل شوبه pH.4
- ٣- انقل القطاعات الي محلول الموليبدات حيث يتم التحضين لمدة (١٠) دقائق عند درجة ٣٧°م في ٠,١-١,٥٪ محلول موليبدات الأمونيوم ammonium molybdate في ٠,٠٠٥ محلول مولاري (N) حامض الكبريتيك . مثبت عند الاس الهيدروجيني PH4.0 وذلك بحجم متساو من الخلات المتعادل neutral acetate buffer ويتم تحضير هذا المحلول قبل الاستعمال مباشرة .
- ٤- تنقل القطاعات الي الشرائح وتصفي ثم تغطي بقطرات من ٢٪ محلول حامض الاسكوريك المثبت عند الاس الهيدروجيني PH4 وذلك باضافة حجم متساو من محلول الخلات المتعادل .

- تغطي القطاعات بأغطية زجاجية نظيفة وتفحص .

النتيجة :

يدل ظهور الراسب الأزرق علي تواجد الفوسفات غير العضوي .

الكالسيوم Calcuim

يتواجد الكالسيوم في الأنسجة الحيوانية علي صور متباينة ، ويمثل العظم أكبر

محتوي للكالسيوم ويمكن أن ينتقل منه بسهولة . كما يوجد جزيء الكالسيوم في مصل الدم ، كما يوجد متائناً في السوائل بين الخلوية . ويوجد جزء كبير منه متحدا بالبروتين أو في حالة غروية غالبا مع الفوسفات ، والخلايا لاتحتوي غالبا علي الكالسيوم في الحالة المتأينة (أيونات كالسيوم) ، ولايمكن الكشف عنه في السوائل الخلوية أو النسيجية . والذي يمكن الكشف عنه هو الترسيبات الملحية للكالسيوم Calcium deposits في الحالات الحقيقية والأماكن غير الطبيعية .

طريقة الإحلال المعدني :

تعتمد هذه الطريقة علي الشق الأنوني في ملح الكالسيوم ، وليست خاصة بأيون الكالسيوم . والفوسفات والكربونات هي الأنيونات العامة التي تتحد في الترسيبات بالكالسيوم . والمعاملة بالمعدن ينتج عنها تحول ملح الكالسيوم الي المقابل : الملح المعدني الذي يمكن رؤيته بطريقة أو بأخرى ، وتعتمد عملية التحول transformation علي المقابلة النسبية لنوبان أملاح الكالسيوم والمعدن .

وتستخدم الفضة silver كمعدن الإحلال ، وفي هذه الحالة تتفاعل القطاعات مع نترات الفضة حيث ترسب الفضة ثم تختزل وتشاهد علي أنها فضة معدنية .

وقد استخدم الكوبلت والرصاص والحديد والنحاس في عملية الإحلال . ويشاهد الكوبلت والرصاص علي هيئة كبريتيدات sulphides والحديد بالبروسيان الأزرق prussian blue ويوضح النحاس بالهيماتوكسلين .

طريقة فون كوسا von Kossa للكشف عن أملاح الكالسيوم :

١- تستخدم مثبتات كحولية عند الكشف عن أملاح الكالسيوم ويتم التثبيت لمدة ٢٤ ساعة في خليط من ٢٠ مل فورمالين + ٨٠ مل كحول إيثيلي مطلق absolute alcohol .

٢- انزع الماء بالكحول ، وبعد الترويق يتم الطمر في الشمع ، ثم تغمس القطاعات

منزوعة الشمع في ٥٠٪ كحول وماء .

٢- ضع القطاعات لمدة ١٥-٢٠ دقيقة في محلول ١٪ الي ٥٪ محلول نترات الفضة

$AgNO_3$ في الظلام .

٤- اغسل في ماء مقطر .

٥- ضع القطاعات في ٥٪ هيدروكينون hydroquinone أو حامض

بيروجالليك pyrogallic acid لمدة ٢-٣ دقائق .

٦ - اغمس في ماء مقطر .

٧- يثبت في محلول ٢٪ الي ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم Sodium thiosulphate لمدة ٥

دقائق .

٨- انزع الماء ثم روق القطاعات وغط بكندا بلسم .

النتيجة :

يظهر الكالسيوم علي هيئة راسب ، أسود ، أو أسود بني .

طريقة رسل Russel عام ١٩٥٨ :

١- اتبع الخطوتين الأولى والثانية كما سبق .

٢- اصبغ القطاعات لمدة دقيقة في ٢٪ أحمر أليزارين alizarin red المائي مع ضبط

محلول الصبغة عند الأس الهيدروجيني ١.٤-٣.٤ بمحلول نوسادر مخفف علي

أن يظل اللون الأيودي الداكن للمحلول ثابتاً .

٢ - انزع محلول الصبغة ثم جفف القطاعات بورق ترشيح .

٤ - اغمس في أسيتون ثم خليط أسيتون + زيلول (١:١) لمدة ١٠-٢٠ ثانية .

٥ - روق في الزيلول وغط بمحلول بلسم كندا .

النتيجة :

يصبغ الكالسيوم بلون برتقالي أحمر والأرضية باللون البرتقالي pink .

الحديد Iron

تنقسم المركبات التي يدخل الحديد في تكوينها الي قسمين رئيسين :

مركبات يكون فيها الحديد مرتبطا ارتباطا ضعيفا أو غير ثابت loose مع البروتين ويكون من السهل تخليصه بالمعاملة بحمض مخفف حيث يتفاعل مع أيون الحديدك ferric iron ، ومن أمثلة هذا القسم : هيموسيدرين " haemosiderin . أما القسم الآخر فيكون فيه الحديد مرتبطا قويا مع البروتين ، ويطلق عليه الحديد المستتر أو المقنع masked iron ولا يمكن إطلاقه بالحامض المخفف . ويمكن لجزء من هذا الحديد المستتر أن يتفاعل عن طريق معاملة حادة ، ومن هذا القسم : الهيموجلوبين haemoglobin والفريتين ferritin ، وهما من أهم أشكال الحديد المختزن . ويخترن الحديد الناتج عن تكسر الهيموجلبين - إذا لم يستخدم ثانية - علي هيئة الهيموسيدرين (هيدروكسيد الحديدك متعدد الأصل polymer) أو الفريتين (مركب حديد البروتين الحديدوز ferrous iron protein complex) .

وقد يتكون الهيموسيدرين والفريتين نتيجة الحديد الزائد الذي يترسب في الخلايا البرانشمية والخلايا الشبكية الطلائية الداخلية reticuls endothelial cells حيث يكون مرتبطا بالليسوسومات .

وتوجد الصبغات pigments موجبة الحديد في الخلايا الاكولة الكبيرة macrophages في الحويصلات التنفسية في حالة احتقان الرئتين المزمن .

وتظهر الصبغات التي تحتوي علي الحديد باللون البني . وفي بعض الحالات تكون موجبة تفاعل كاشف شف PAS - positive بما يدل علي أنها مواد كربوهيدراتية ، وهي لاتصبغ بصبغات الدهون . وقد تختزل الفضة النوشادرية ammonical silver . وتوجد الصبغيات موجبة الحديد في الغدد القمية apocrine glands .

وهناك ثلاث طرق معملية للكشف عن الحديد مستوكيميائيا هي :

١- أزرق بروشان Prussian blue

٢- أزرق ترنيول Turnbull blue

٣- كبريتيد الحديد Iron sulphide .

وتعتبر طريقة أزرق بروستان أفضل هذه الطرق .

طريقة بروشان الأزرق :

تتضمن هذه الطريقة تفاعل أيونات الحديد مع سيانيد الحديدوز ferrocyanide في وسط حمضي لتكوين حديدك سيانيد الحديدوز ferric-ferrocyanide .

الطريقة :

١- يتم تثبيت الأنسجة في ١٠٪ مورفالين متعادل الأس الهيدروجيني pH.7 ، أما الوسط الحامضي فإنه يتسبب في فقدان ترسيبات الحديد .

٢- انزع الماء بالكحول واطمر في الشمع لإعداد القطاعات الشمعية .

٣- ضع القطاعات في خليط متساوي الحجم من ٢٪ مطول يتم تحضيره طازجا من ملح "بوتاسيوم سيانيد الحديدوز" K-ferrocyanide في ماء مقطر + ٢٪ (٠,٢٥ مولاري Hcl M لمدة ساعة عند درجة حرارة الحجرة) .

٤- اغمس القطاعات في ماء مقطر .

٥- اصبغ باحدي صبغات الأنوية ، مثل "كارمين الليثوم الأحمر المتعادل" neutral red والسفرانين safranin .

٦- انزع الماء بالكحول وروق في الزيلول وغط ببلسم كندا .

النتيجة :

يدل ظهور الراسب الأزرق أو الأزرق المخضر علي وجود الحديد .

وبمعاملة القطاعات بفوق اكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide الذي يظهر أو

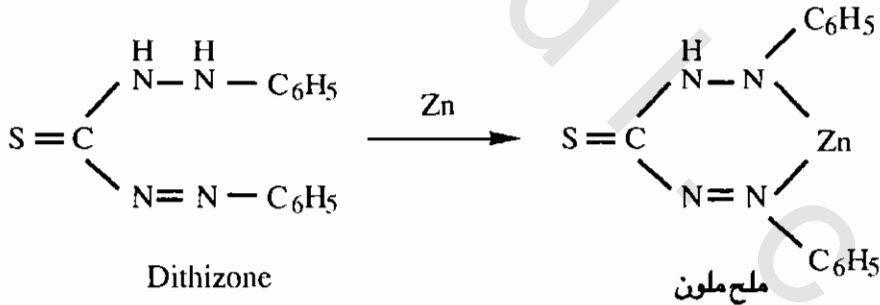
يحرر الحديد المستتر وذلك لتكسير الشق العضوي وينتج أكسيد الحديد غير القابل للنويان

Zinc الزنك

يعتبر الزنك من العناصر الرئيسية في التغذية الحيوانية . ويتسبب نقصه في حدوث أمراض معينة . كما أن هناك بعض انزيمات يعتمد نشاطها علي وجود هذا العنصر ، وذلك مثل إنزيم "كربونيك أنهيدريز" carbonic anhydrase الذي يحتوي علي كمية كبيرة من الزنك. كما أن الزنك يتحد مع الأنسولين ، وقد يوجد الزنك في خلايا جزر لانجرها نز islets of Langerhan وفي الخلايا في الرئيسية المعدة principle cells وخلايا "بانث" Paneth cells في الأمعاء وطلائية غدة البروستاتا وخلايا الدم البيضاء والجهاز العصبي المركزي .

وتستخدم طريقة "الليثيون Lithizone" في الكشف الهستوكيميائي عن الزنك .

والليثيون diphenylthio carbazone يكون ملحا مركبا ملونا مع الفلزات العديدة الثقيلة مثل الرصاص والفضة والنحاس والزنبق والذهب . وملح الزنك ذو لون أحمر بنفسجي ويتكون في المحاليل المتعادلة والقلوية والحمضية . وهذا الملح قابل للنويان في رابع كلوريد الكربون Carbon tetrachloride ويبدون أن يتغير اللون .



طريقة ماجر وماك نارى وليونيتى ١٩٥٣ للكشف عن الزنك

Mager, Mc Nary and Lionetti, 1953.

الطريقة :

١- يفضل استخدام القطاعات المجمدة المجففة في الكريوستات الي تثبيت في الكحول الايثلي لمدة ٦٠ دقيقة أو قطاعات مثبتة في الايثانول أو قطاعات شمعية .

٢- تصبغ القطاعات في أحد المحلولين الآتيين أو المحلولين معا :

أ- محلول ليثيزون أسيون وماء Lithizone acetone - water . تعوم القطاعات لمدة ١٠ دقائق في محلول مخفف من الليثيزون (١٪ ليثيزون في أسيتون مطلق مخفف بماء مقطر وخال من الزنك وذلك بنسبة ١ : ١.٥ وذلك قبل الاستخدام مباشرة) .

ب - مركب ليثيزون مكونا محلول منظما Lithizone complex forming .
buffer solution .

أذب ٥٥٠ جم ثيوكبريتات الصوديوم ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) جم سيانيد البوتاسيوم KCN في ١٠٠ مل ماء مقطر .

اضبط الأس الهيدروجيني لهذا الحلول عند بحامض الخليك الثلج (الثلجي)
glacial acetic acid ثم زد حجم المحلول الي ٢٠٠٠ مل بالماء المقطر .

*أفضل محلول ليثيزون في رابع كلوريد الكريون مستخدما
قمع الفصل separating funnel للتخلص من آثار الزنك في المحلول المستخدم ،
يتكون كمايلي :

*أضف ١٨ مل ماء مقطر الي ٢٤ مل ١٪ ليثيزون في أسيتون مطلق واضبط الأس
الهيدروجيني الي pH3.7 بواسطة محلول عياري N من حامض الخليك ثم أضف

٥.٨ مل من المحلول المركب المنظم + ٢, مل من ٢٠٪ طرطرات البوتاسيوم .

* عوم القطاعات في المحلول لمدة ١٠ دقائق .

* جفف القطاعات واغسلها بالكوروفورم .

* بعد التجفيف في الهواء ، اغمس في الماء ثم اغمر القطاعات في محلول

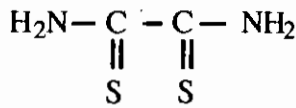
أباتي أو جيلي جليسرين

النتيجة :

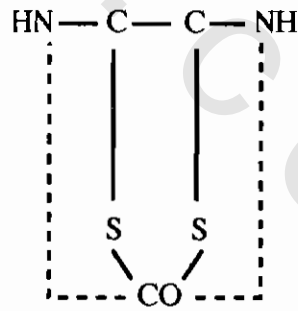
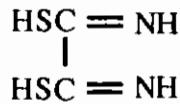
يستدل علي وجود الزنك باللون الأحمر أو الأحمر البنفسجي

النحاس Cupper

يوجد الزنك في كل أنسجة جسم الانسان ولكن بكميات قليلة جدا مما يجعل من الصعب الكشف عنه هستوكيميائيا . والمعروف أنه في الانسان البالغ يحتوي كل جرام من وزن الجسم علي ٧-٨ ميكروجرامات من النحاس . ولكن هذا العنصر يوجد في الحيوانات البدائية بكميات تسمح بالكشف عنه هستوكيميائيا . ويوجد النحاس متحدا غالبا مع البروتين، ويستخدم حامض ريبانيك Rubenic acid في الكشف عن النحاس حيث يستخدم محلول كحولي لحمض الريبانيك . ويتكون راسب أخضر قاتم مع أملاح النحاس مماثل لمعادن النيكل والكوبلت ويكون الملح المتكون كمايلي :



الذي يعطى



ملح مركب

الخطوات المفضلة للكشف عن النحاس :

- ١- يثبت النسيج في الفورمالين .
- ٢- انزع الماء وأعد قطاعات شمعية .
- ٣- احفظ القطاعات لمدة ١٢ ساعة عند درجة ٣٧°م في إناء محكم يحتوي علي المحلول الآتي :

٥ مل حامض الريبانك + ١٪ حامض ريبانك في إيثانول مطلق + ١٠٠ مل ١٠٪ محلول مائي من خلات الصوديوم Sodium acetate .

٤- اغسل مرتين في ٧٠٪ كحول إيثانول لمدة ٣٠ دقيقة

٥- اغسل في إيثانول مطلق لبضع ساعات .

٦- روق في الزيلول ثم اطمر في بلسم كندا .

النتيجة :

يظهر النحاس باللون الأحمر القاتم