

الفصل الثالث

المكونات الهستوكيميائية الأساسية
المواد الكربوهيدراتية
CARBOHYDRATES

3

الفصل الثالث

المكونات الهستوكيميائية الأساسية

المواد الكربوهيدراتية

CARBOHYDRATES

الكربوهيدراتات مواد عضوية تتكون بصورة أساسية من العناصر (C كربون - H هيدروجين - O أكسجين) حيث يوجد العنصران الأخيران بنسبة وجودهما في الماء وهي : ١:٢ ($C_6H_{12}O_6$) . وهذه المركبات تتكون في الخلايا والأنسجة النباتية من مصادرها الطبيعية ، وهي ثنائي أكسيد الكربون و الماء عن طريق عملية التمثيل الضوئي Photosynthesis في وجود الضوء و البلاستيدات الخضراء المحتوية على الكلوروفيل . وبذلك تنتج بعض المواد الكربوهيدراتية مثل النشا ، ويحصل الحيوان على هذه المواد بصفة رئيسية عن طريق اغتذائه على هذه النباتات .

وتعرف الكربوهيدراتات كيميائيا بأنها مشتقات الدهيدية 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 في 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 أكسدة جرام واحد من هذه المواد ، هذا بجانب أهميتها في بعض الحالات وذلك مثل السكر الخماسى " Ribose " الذى يعتبر مكونا أساسيا في الأحماض النووية و الجالاكتوز في الدهون و اللاكتوز في اللبن .

تصنيف المواد الكربوهيدراتية :

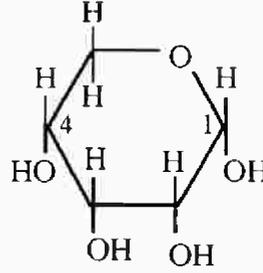
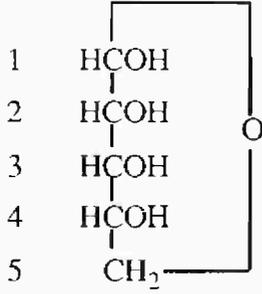
تشتمل المواد الكربوهيدراتية بصورة عامة على ثلاثة أنواع رئيسية ، هي : **وهيدة**
التسكر: monosaccharides - **ثنائية التسكر**: disaccharides و**معديدة التسكر**:
 polysaccharides . ويطلق عادة على النوعين الأول والثاني " السكريات Sugars وذلك نظرا
 لحلاوة طعمها . وهي تتميز بأنها قابلة للذوبان في الماء والكحول مكونة محاليل راتقة شفافة
 لها القدرة على النفاذ خلال الأغشية الخلوية . أما المواد عديدة التسكر ، فإنها لا تذوب في الماء
 ولا في الكحول ، وتكون مواد غروية عند وضعها في الماء وليست لها القدرة على الانتشار
 خلال الأغشية شبه المنفذة مثل الأغشية الخلوية . أما المواد عديدة التسكر ، فإنها لا تذوب في
 الكحول ، وتكون موادا غروية عند وضعها في الماء وليست لها قدرة على الانتشار خلال
 الأغشية المنفذة مثل الأغشية الحلوية . وفيما يلي نبذة عامة عن كل من هذه المجموعات
 الثلاث :

السكريات الأحادية (وحيدة التسكر) : Monosaccharides

وهي أبسط أنواع المواد الكربوهيدراتية ، وهي لا تتحلل إلى أبسط من ذلك ، وتركيبها
 العام : $C_n(H_2O)_n$. إلا أنه يمكن تصنيفها بدورها إلى بعض الأنواع حسب عدد ذرات
 الكربون الموجودة بها ، وكذلك إلى " النوزات Aldoses " أو " كيتونات Ketones " حسب
 احتوائها على أى من النوعين . على أن أهم هذه الأنواع ، هي :

السكريات الأحادية الثلاثية trioses ($C_3H_6O_3$) والخماسية pentoses
 ($C_5H_{10}O_5$) والسداسية hexoses ($C_6H_{12}O_6$)

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

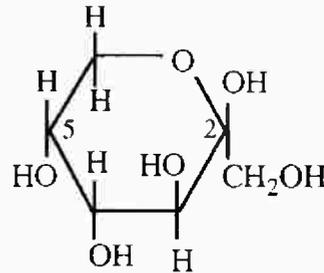
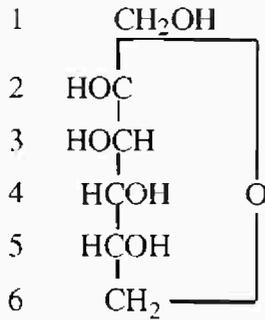


السكر الخماسي (ريبوز) Ribose Sugar

ريبوز (ribose sugar, $C_5 H_{10} O_5$) وهو ضمن المكونات الرئيسية لحمض ريبونيوكليك (ح ن ر) (Ribonucleic acid "RNA") (acid RNA) . أما النوع الثاني فهو سكر ريبوز ناقص ذرة الأكسجين أو دي أكسي ريبوز : (deoxyribose sugar $C_5 H_{10} O_4$) وهو - كما هو واضح - تنقصه ذرة من الأكسجين بالنسبة للسكر الخماسي النموذجي ، وهو أحد مكونات الحامض النووي الآخر " دي أكسي ريبونيوكليك (ح ن د) (Deoxyribonucleic acid DNA) .

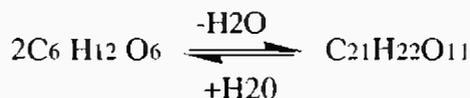
أما السكريات السداسية ، فأنواعها الرئيسية ، هي :

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

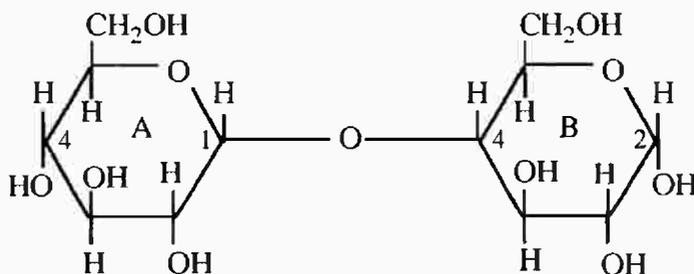


السكريات الثنائية : Disaccharides

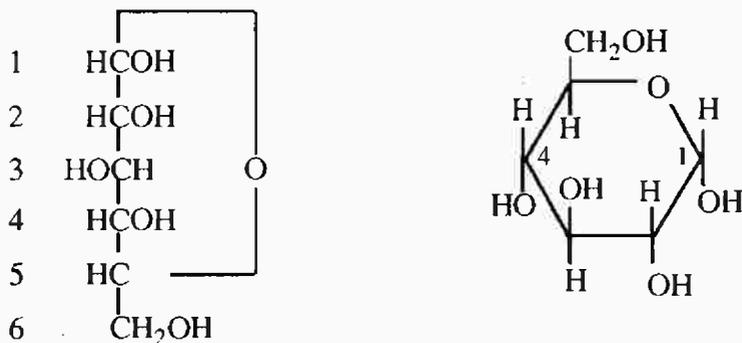
رمزها الكيميائي : (C₁₂ H₂₂ O₁₁) ، وهي تتكون نتيجة اتحاد اثنين من جزئيات أحادية السكر مع فقدان جزيء من الماء . وبالمثل ، فإن أى جزيء منها - عندما يتم هضمه أو تحلله ماثيا يعطى جزيئين أحاديين السكر وذلك مع اكتساب جزيء من الماء . والمعروف أن هاتين العمليتين الانعكاسيتين تحدثان تحت تأثير إنزيمات متخصصة معينة تعمل على البناء synthesis فى الحالة الأولى والتحلل المائى hydrolysis فى الحالة الثانية .



ومن أهم هذه الأنواع :

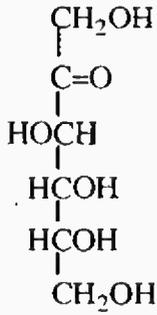


النمط العام لتكوين سكر ثنائى من سكرين أحاديين

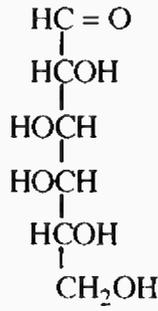


الجلوكوز (جلوكوبيرانوز) (Glucose (gluco pyranose)

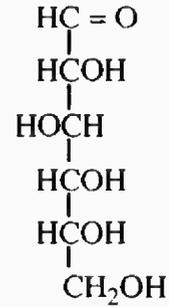
الفركتوز Fructose



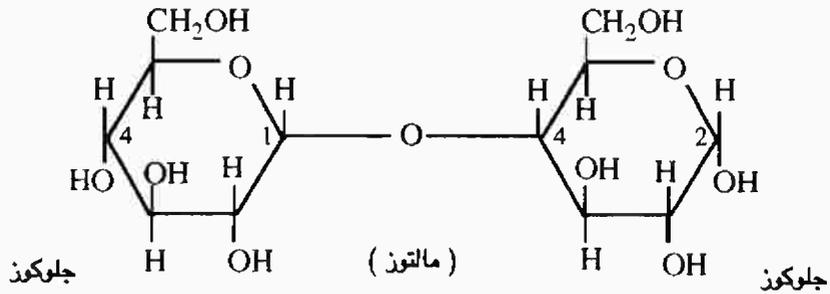
الفركتوز
Fructose



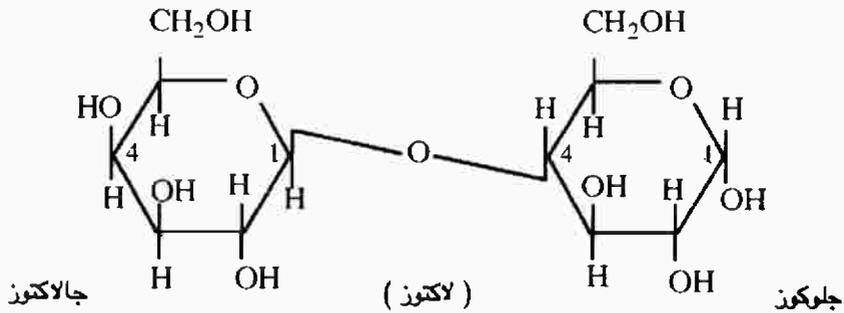
الجالاكتوز
Galactose



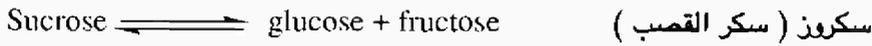
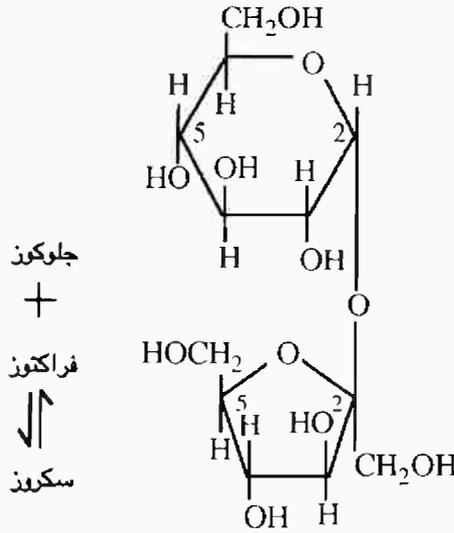
الجلوكوز
Glucose



مالتوز (سكر الشعير)

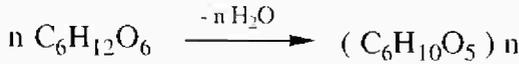


لاكتوز (سكر اللبن الثانى)



عديدات التسكر : Polysaccharides

تتكون هذه المواد نتيجة تكديس أعداد من الجزيئات وحيدة التسكر مع فقدان أعداد مساوية لها من جزيئات الماء :

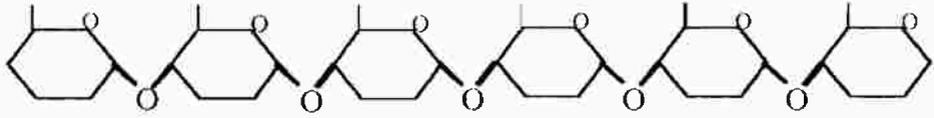


ومن أهم هذه المركبات : النشا في النبات والجليكوجين في الحيوان ، بجانب بعض الأنواع الأخرى ، وفيما يلي نبذة عنها :

النشا : Starch

يمثل المواد الكربوهيدراتية المخزنة في الخلايا والأنسجة النباتية ، وهو ينشأ بصورة أساسية نتيجة اتحاد ثاني أكسيد الكربون والماء مع وجود مادة الكلوروفيل الخضراء وتوفر الضوء ، ويسبق ذلك تكوين النشا تكوين سلاسل كربوهيدراتية أبسط تركيباً ، هي جلوكوسيدات الفا α - glucosides . وعند التحلل المائي للنشا ، فإنه يعطى جزيئات جلوكوزان glucosan .

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



النشا (مثال لتكوين المواد عديدة التسكر)

الإنولين : Inulin

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

الدكسترين : Dextrin

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

السليولوز : 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 . ولاتنوب هذه المواد فى الماء أو المذيبات العادية ولكنها تنوب فى
محلول هيدروكسيد أمونيات النحاس ، كما أنها لا تكتسب أى لون مميز مع محلول الأيودين .

أنواع المواد عديدة التسكر :

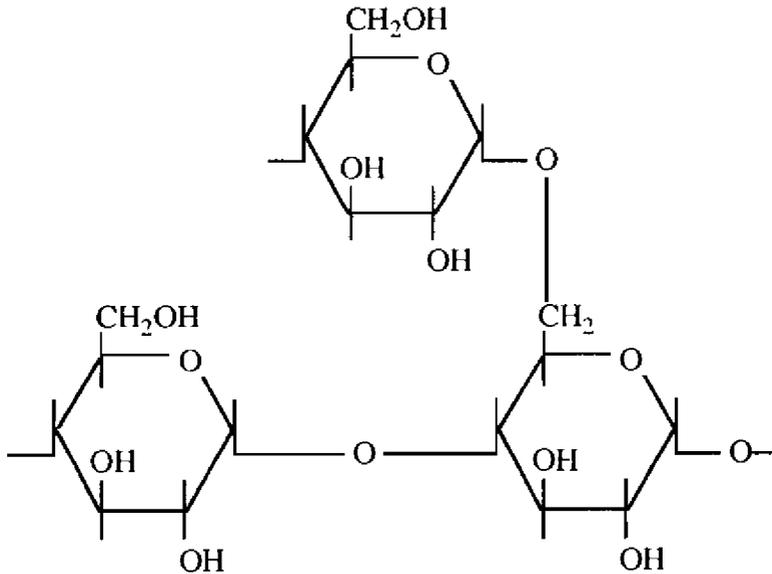
توجد المواد عديدة التسكر على هيئة مختلفة فى الخلايا و الأنسجة الجسمية وهى
تختلف من بعضها فيما يتعلق بطبيعتها ونشاطاتها الفسيولوجية ، ولكنها تتشابه مع بعضها

بالنسبة لاحتوائها المجموعات السكرية أو الكربوهيدراتية ، وهي التي يتم - عن طريقها - أحداث التفاعلات التي تستعمل في 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 سيخذ مثلا توضيحا لتلك المكونات . والمعروف أن جزيء الجليكوجين يتكون من عدد كبير من جزيئات الجلوكوز المتفرعة ، ويحدث هذا التفرع عند ذرة الكربون (٦) من جزيء الجلوكوز.



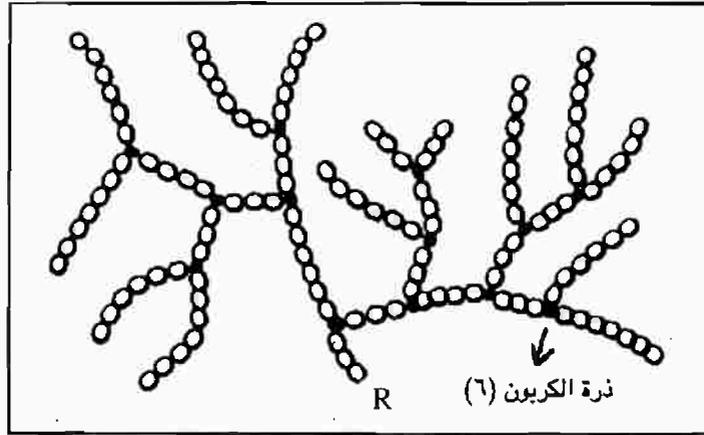
طبيعة الجليكوجين وتوضيحه بصورة عامة :

يمثل الجليكوجين المواد الكربوهيدراتية المخزنة في الخلايا والأنسجة الجسمية . ولذلك يطلق عليه أيضا " النشا الحيواني animal starch " وإن كان يختلف عن النشا النباتي في

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

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

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



شكل عام يوضح جزيء الجليكوجين

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

وفي جميع الحالات ، يتم التأكد من تواجد الجليكوجين بطريقة إثباتية تتم خلالها معاملة القطاعات بإنزيم " دياستيز diastase " أو " أميليز amylase " ، ثم صبغتها 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 والأنسجة .

تواجد الجليكوجين في الخلايا والأنسجة الكبدية :

Glycogen localization in the liver cells and tissues

من المعروف أن الكبد يمثل العضو الجسمي الرئيسي لا خزان الجليكوجين الذي يطلق عليه " جليكوجين الكبد liver glycogen " تميزا له عن الجليكوجين الموجود في الخلايا العضلية والذي يسمى جليكوجين العضلات muscle glycogen " .

كذلك لوحظ وجود نوعين من الجليكوجين في الأنسجة الكبدية ، هما : " الجليكوجين سهل التحلل lyoglycogen " والجليكوجين الثابت " desmoglycogen " وذلك لأن النوع الأول يمثل كمية الجليكوجين التي سرعان ما تتحلل وتفقد من الأنسجة الكبدية عقب موت الحيوان مباشرة أو تعرض الكبد لدرجة حرارة الحجرة ، بينما يبقى النوع الثاني في 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 " التي تمثل نواتج هضم المواد النشوية والسكرية المختلفة

في القناة الهضمية . أما المصدر الثاني ، فهو حامض اللاكتيك الذي يتولد في الخلايا العضلية نتيجة تحلل الجليكوجين الذي يحدث أثناء النشاطات العضلية لتوليد الطاقة الحرارية اللازمة في تلك الحالات . وهذا الحامض ينتشر أو ينفذ بسهولة خلال أغشية الخلايا العضلية حتى يصل إلى الدورة الدموية العامة التي 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 أيضا وحامض اللاكتيك المتولد في الخلايا العضلية .

توزيع الجليكوجين ونمط تواجده في الخلايا الكبدية للتدييات :

Distribution and mode of occurrence of glycogen .

يوجد الجليكوجين في الخلايا الكبدية الحية منتشرا بصورة عامة في أنحاء السيتوبلازم ولكنه لا يتواجد في أنوية تلك الخلايا في الحالات السوية العادية ، غير أنه لا يظهر بهذه الصورة الانتشارية المنتظمة في الخلايا و الأنسجة المثبتة ، ولكن توجد حبيبات هذه المادة متكدسة في 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 في الجهة المقابلة لدخول المثبتات متاخمة لغشاء الخلية في تلك الناحية . وبذلك يمكن الاستدلال على اتجاه دخول المثبتات في تلك الخلايا . ومعنى ذلك أن هذه الصورة تعتبر غير حقيقية لأنها تخالف الصورة الحقيقية في الخلايا الحية ، غير أنها أصبحت معترفا بها إلى حد بعيد ، حتى أنه اطلق عليها تعريف معين هو " هروب الجليكوجين : glycogen flight " بل إنها أصبحت علامة مميزة لظهور الجليكوجين في الخلايا الكبدية . وهناك محاولات لإبطال هذه الظاهرة بفرض الحصول على 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 في الأنسجة الكبدية للتدبيبات في الأحوال العادية وبعض الحالات الفسيولوجية والمرضية :

Glycogen in normal and physiological conditions

عند فحص تحضيرات الجليكوجين في الأنسجة الكبدية للتدبيبات في حالاتها العادية ، يتبين اختلاف كثافة هذه المادة في المناطق المختلفة للفصيصات الكبدية . ، والمعروف أن تلك الفصيصات توضع ثلاث مناطق متباينة النشاط حسب ما اسقر 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 activity " 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 " hepatic vein .

وفى هذا المجال يشاهد أن حبيبات أو محتويات الجليكوجين أكثر تواجدا وكثافة فى المناطق الخارجية للفصيصات الكبدية عنها فى المنطقة الوسيطة عنها أيضا 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

تدرجيا بعد تحليلها . 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 والأنسجة المحتاجة لها ، فى نفس الوقت الذى تناسب 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 أوضحتها الدراسات البيوكيميائية ومرة الإنزيمات بناءة الجليكوجين فى المناطق الفصيصية الخارجية وتناقصها للداخل . وذلك على عكس الإنزيمات التى تعمل على تحليل الجليكوجين حيث تكون أكثر وفرة من المناطق الداخلية للفصيصات الكبدية بالنسبة للمنطقة الوسطية ثم المنطقة الخارجية فى تلك الفصيصات .

بعض التغيرات الفسيولوجية والمرضية الاخرى فى 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 .
- * يخفق الجليكوجين من الأنسجة الكبدية بصورة سريعة بمجرد تعرض الكبد للظروف الجوية (خارج الحيوان) وذلك بسبب نشاط الإنزيمات محللة الجليكوجين .
- * والمعروف أيضا أن الجليكوجين يتحلل ويخفق بصورة عامة عقب موت الحيوان وذلك على الأخص فى الخلايا العضلية الهيكلية . إلا أن تليج الأنسجة سريعا أو تبريدها مع توفر الاكسوجين فإن ذلك يعمل على إبطاء فقدان الجليكوجين والإبقاء عليه لفترة طويلة نسبيا .

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

* وكذلك لوحظ أن الجليكوجين يتأثر بصورة واضحة - خاصة في 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 : (NH₂) بدلا من مجموعة هيدروكسيل في الجلوكوز . لذلك يطلق عليها جلوكوز أمين glucosamine أو السكريات



الامينية amino sugars .

جلوكوز أمين
(glucosamine)

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

أ - عديدة التسكر المخاطية . Mucopolysaccharides

ب - المخاطيات البروتينية . Mucoproteins

ج - السكريات البروتينية . Glycoproteins

(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 acid) أو غير العضوية مثل حامض الكبريتيك المركز $\text{Conc- H}_2\text{SO}_4$.

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 الطليقات مثل دودة الأرض ، وكذلك الرخويات ويرقات الحشرات . ولكن وجودها في النبات يكاد يكون قاصراً علي الفطريات Fungi . وعلي الرغم من أن لفظ " كيتين " يستخدم عادة للدلالة علي الهيكل الخارجي في الكثير من اللافقاريات ، إلا أن مثل هذه الهياكل لا تحتوى حقيقة علي أكثر من نسبة ٥٠ ٪ من مادة الكيتين . أما بقية هذه التراكيب ، فإنها تتركب من البروتينات أو البروتينات وكربونات الكالسيوم .

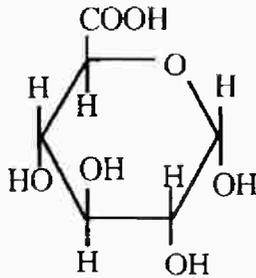
خواص الكيتين :

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

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

(٢) عديدة التسكر المخاطية الحمضية :

تتميز هذه المواد باحتوائها على حامض عضوي ، هو حامض جلوكيورونيك -glucuronic acid . ويكاد يكون وجود هذه المواد قاصراً على الحيوانات حيث توجد بكثرة في الإفرازات المخاطية في القنوات الهضمية . وقد تحتوي بعض



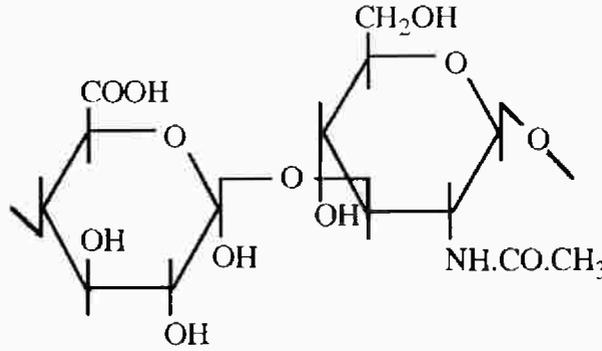
حامض جلوكيورونيك
(Glucuronic acid)

هذه المواد على 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 .

أ - السكريات المخاطية الحامضية البسيطة

Simple acid mucopolysaccharides :

تتكون هذه المواد من وحدات سكرية أمينية + حامض جلوكيوروبونيك ، وأشهر مثال لتلك الأنواع : حامض هيالورونيك : Hyaluronic acid . ويوجد هذا الحامض بصورة وثيقة التجمع أو بالغة البلمرة highly polymerized ، ولذلك يشكل غلافًا واقياً للجلد أو حاجزاً يمنع تخلل أو دخول المواد أو السوائل الخارجية أو الكائنات الدقيقة الضارة إلى الخلايا والأنسجة الداخلية .



حامض هيالورونيك

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

إلا أن هذه المادة قابلة للذابة بواسطة إنزيم معين يطلق عليه إنزيم "هياالورينيداز Hyaluronidase" ، أي الإنزيم الذي يعمل على تحلل هذا الحامض . ويوجد هذا الإنزيم بكثرة في بعض أنواع البكتريا الضارة ، وفي الإفرازات السامة للشعابين أو سموم العقارب وبعض الحشرات مثل النحل والدبابير . وفي حالة عض الثعبان أو لسع العقرب وغيرها ، فإن هذا الإنزيم - وهو أحد مكونات الإفراز السمي - يقوم بإذابة هذه المادة بين الخلوية في أنسجة الجلد بما يؤدي إلى تفكك هذه الخلايا ووصول المادة السامة الفعالة داخل الجسم تفرز أولاً ، حيث يعمل على تحلل أو إذابة جزء من هذا الغطاء الواقى (حامض الهيالورونيك) ، وبذلك يحدث ثقب أو حفرة يقوم الحيوان عندئذ بإفراغ المادة السامة الفعالة فيه حيث تنتشر بذلك داخل الجسم .

وجدير بالذكر في هذا المجال أنه يسبق صب الإنزيم على الجلد أن يقوم الشعبان أو العقرب مثلا بغرس الانياب أو الزيان اللاسع المديب في الحالتين المذكورتين لاختراق الطبقة القرنية التي تغطي الجلد من الخارج حتى تتعرض السطح الخلايا الجلدية المغطاة بطبقة حامض الهيايورينيك ، ثم يتم افراغ إنزيم الهيايورينيديز ثم المادة السامة بعد ذلك .

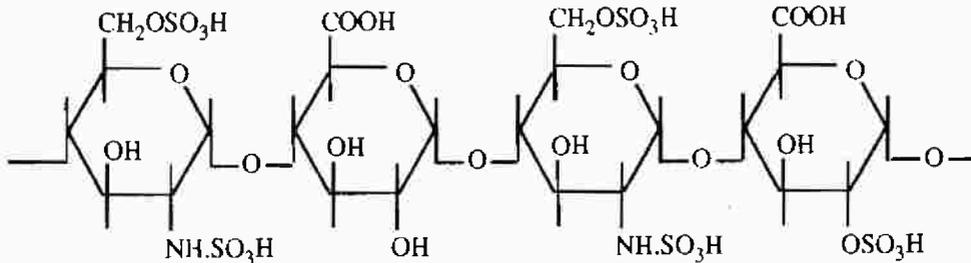
وبالنسبة لأغشية البويضات ، فإنه تتم إذابة هذه المادة المتواجدة بين الخلايا التي تغلف البويضة في منطقة معينة وذلك بتأثير إنزيم الهيايورينيديز الذي يوجد بكثرة أيضا في رؤوس الحيوانات المنوية خاصة في الجسم المخروطي acrosome . وفي هذه الحالة يحدث ثقب في غشاء الخلية يسمح بدخول الخلايا المنوية في البويضات ، وتسهل هذه العملية اختراق طرف الجسم المخروطي للحيوان للسطح الخارجى للبويضات .

ب - السكريات المخاطية الحامضية المركبة

Complex acid mocopolysaccharides :

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

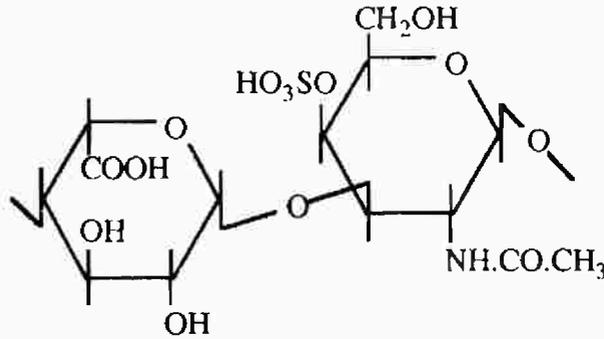
ومن أهم هذه المركبات مادة " هيبارين heparin وتوجد هذه المادة بصورة أساسية في " الخلايا الصارية mast cells " التي توجد بكثرة في الأنسجة الضامة ، وعلى ذلك فإنها واسعة الانتشار في جميع أجزاء الجسم حيث لا يكاد يوجد مكان في الجسم يخلو من هذه المادة .



الهـيبارين

ويظهر الهيبارين على هيئة حبيبات داكنة ، وهي من أهم العوامل التي تمنع تجلط الدم في حالة حدوث قطع أو جرح داخل الجسم ، ولذلك يطلق عليها " مانعة التجلط anticoagulant " .

وهناك أمثلة أخرى من هذه المركبات ، مثل كبريتات الكونديروتين - chondroitin sul- phate " المتواجدة في الأنسجة الضامة أيضا والغضاريف . وكذلك في " الإفرازات المخاطية المعوية gastric secretions " في الحيوانات .



كبريتات الكونديروتين

(ب) المخاطيات البروتينية : Mucoproteins

في 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 في الإفرازات المخاطية في الغدة اللعابية تحت الفكية submaxillary glands " وبعض الإفرازات المخاطية الموجودة في بعض الأعضاء الجسيمة الأخرى ، وبعض الهرمونات الجنسية gonadotrophie hormones " .

(ج) السكريات البروتينية : Glycoproteins

وهي 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 في حالة المخاطيات البروتينية . ولا توجد هذه المواد بكثرة في الخلايا الجسمية ولكنها توجد في مصلى الدم serum albenen وبياض (زلال) البيض ovalbumin

ثالثا : الليبيدات السكرية Glycolipids

يطلق على هذه المواد أيضا " السيربوسيدات Cerbrosides " وهي مواد معقدة التركيب ، تعطى عند تحللها المائي : مادة نيتروجينية قاعدية هي سفنجوسين Sphingosine " + سلسلة طويلة من الأحماض الدهنية + مادة سكرية قد تكون الجلوكوز أو الجالكتوز . ومن أمثلة هذه المواد " فرينوزين phrenosin " و " كيراسين Kerasin " ، وهي مركبات أساسية في الأنسجة العصبية .

وهذه المواد لا تقبل النويان في المادة ولكنها تنوب في 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 الاسكوريك أو فيتامين ج : " Ascorbic acid or vitamin C " وهو أحد مشتقات المواد الكربوهيدراتية ، يتميز بنشاطه في عمليات الأكسدة والاختزال - كإنزيم مساعدة في الخلايا الجسمية .

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

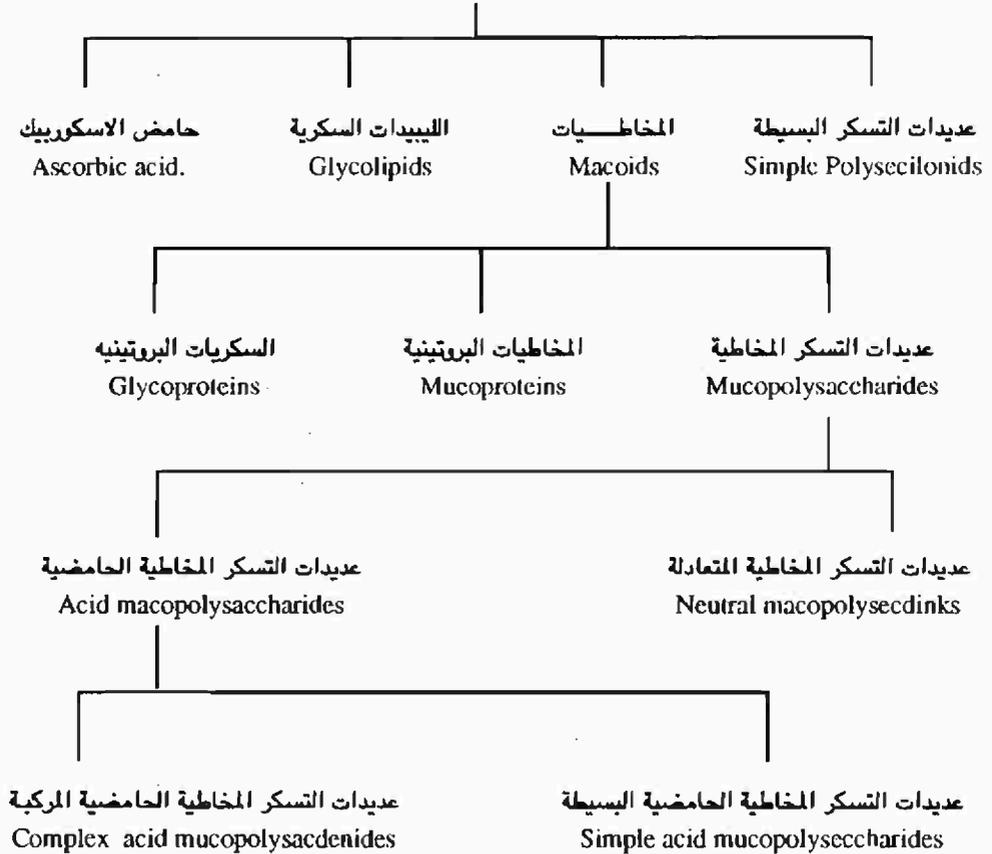
ويتم توضيح حامض الاسكوريك باستخدام محلول نترات الفضة مذابة في حامض

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

شكل عام لتوضيح أنواع المواد عديدة التسكر

عديدات التسكر

Polysaccharides



تقسيم آخر للمواد 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 بورها على الأنواع الآتية :

- | | |
|--|---|
| (a) Homoglycans | (أ) متماثلة الجليكانات (هوموجليكانز) |
| Glycogen | الجليكوچن |
| Starch | النشا |
| Cellulose | السليولوز |
| Dextran | الديكساتران |
| Galactan | جالاكتان |
| (b) Homopolyamino saccharides | (ب) هوموبولى أمينو ساكاريدز
(متماثلات الأمينات السكرية) |
| Chitin | الكيتين |
| (C) Homopoly uronosaccharides | (ج) هوموبولى يورونيك ساكاريدز
(متماثلات اليورينات السكرية) |
| Pectic acid | حامض البكتيك |
| Alginic acid | حامض ألجينيك |
| (d) Heteroglycans | (د) الهيتروجليكانات
(غير متجانسة الجليكانات) |
| A - Glycosaminoglycans | أ- جليكو ز أمينوجليكانز
(جليكانات الجلوكوز الأمينى) |
| Sialoglycans
(Neuraminic acid) | سيالوجليكانز (حامض نورامينيك) |
| Keratan sulphate (ks | كبريتات الكيراتان |
| B - Glucosamino
glucuroglucuron glycans | ب - جليكو ز أمينو جلوكيو يورونيك
جليكانز (جليكانات الجليكو ز
الجلوكيو يورونيك الأمينى) |

Hyaluronic acid (UA)	حامض هياالوورونيك
Heparin	الهيبارين
Heparan (heparitin sulphate)	الهيباران (كبريتك الهيبارتين
Chondroitin - 4 - sulphate (C ₄ S)	كبريتات ٤-كوندرويتين
Chondroitin - 4 - sulphate (C ₆ S)	كبريتات ٦-كوندرويتين
Dermatan sulphate	كبريتات الدرمانان
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 الجليكوپبتيدات
Ovomucoid	المخاطيات البويضية
Fetuin	الفتوين
Salivary gland mucoid	مخاطيات الغدة اللعابية
(Sialoglyco protein)	(سيالوجليكوبروتين)
Fibrinogen	الفيبرينوجين
Immunoglobulins	الأميونوجلوبولينات (الجلوبيولينات المناعية)
Acid glycoprotein	الجليكوبروتينات الحمضية
(oroso mucoid)	(أروزوميوكويد)
Thyroxine - binding protein	البروتينات رابطة الثيروكسين
Propeptides (hormonal)	بدائية الببتيدات (الهرمونية)
Blood group proteins	بروتينات مجموعات الدم
Chorionic gonadotropin	الهرمونات الكرونية
FSH	
TSH	
Ribonuclease	الريبونوكليز
B - glucuronidase	بيتا - جلوكيورونيديز
Pepsin	الببسين
Serum cholinesterase	كولينستيريز المصل
Avidin	الأفيدين
Cell membrane glycoproteins	جليكوبروتينات غشاء الخلية

4 - Glycolipids

Cerebrosides

Gangliosides

٤ - الجليكوليبيدات

السريروسيدات

الجانجليوسيدات

ويذكر هنا أن الجليكانات تتكون من السكريات بصورة كاملة وبالتحديد سداسيات

التسكر (hexoses) مرتبطة ببعضها بصورة جليكو سيديية ، وفيها ترتبط الذرة (c1) - بواسطة ذرة أكسجين - لكل من ذرة الكربون (c₃) ، (c₄) أو (c₆) للسكر الأخر.

ولذلك يطلق على هذه المركبات اسم المادة السكرية المتضمنة فيها ، ولا بد أن يتضمن

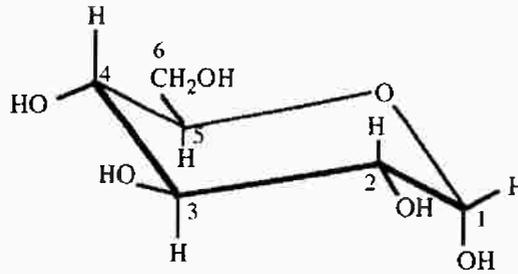
وصف المادة عديدة التسكر التشكيل (ألفا أو بيتا (∞ or B) عند الرابطة الجليكو سيديية (c-1)

والذرة التي ترتبط بها ذرة الكربون (c-1) في الوحدة التالية ، مثل (a-1-4) أو (B - 1→6) .

والاختلاف بين تشكيلي (a nad B) عند (c-1) . على سبيل المثال D- glucose هو ببساطة

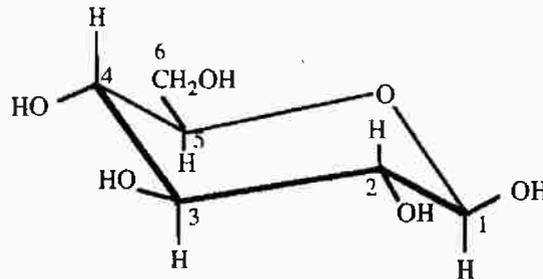
أن المجموعة الهيدروكسيلية تقع أسفل الحلقة بينما توجد في حالة (B) فوق الحلقة كما يوضح

في الشكل التالي :



A - D جلوكوز

تحت وحدات الجليكوجين والنشا



B - D جلوكوز

تحت وحدات السليلوز

الأسس النظرية لتوضيح المواد الكربوهيدراتية هستوكيميائيا :

Theoretical basis of the histochemical illustration of carbohydrates .

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

تعتبر هذه الطريقة من أفضل الطرق الهستوكيميائية المتخصصة لتوضيح المواد الكربوهيدراتية - بصورة عامة - فى الخلايا والأنسجة الجسمية . وتتضمن هذه الطريقة استخدام " حامض بيرايوديك (HIO₄) Periodic acid " ، وهو عامل مؤكسد قوى يعمل على أكسدة مجموعات الجليكولات (HCOH - HCOH) glycol groups التى توجد فى المركبات الكربوهيدراتية وبعض المركبات الأخرى ، وذلك عن طريق كسر الروابط الموجودة بين ذرتى الكربون (C₂ - C₃) الموجودة على هيئة ٢:١ مجموعات الجليكول فتحولها بذلك إلى مجموعات ألدهيدية HCO - HCO - aldehydes . وهناك ميزة أخرى لهذا الحامض ، وهى أنه لا يؤكسد 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 إذابة " 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 أكسيد الكبريت SO₂ ، المتولد فى هذه 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 .

وفي حالة تواجد الألكهيدات ، فإنها تتفاعل بشدة مع محلول الفوكسين عديم اللون ، وتنتج مركبات داكنة الصبغ البنفسجي . وقد عرف الآن أن هذا اللون الناتج لا يدل على إعادة أكسدة الفوكسين عديم اللون ، إنما هو نتيجة تفاعلات معينة تنتهي بتكوين تلك المركبات داكنة الصبغ .

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

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

ثانياً : يلاحظ أن فترة الأكسدة في محلول ٠,٥ ٪ حامض البيرأيوديك (هي المستخدمة عادة) يجب ألا تزيد عن ٥ - ١٠ دقائق ، وأن كان يفضل ألا تزيد عن ٥ دقائق .

ثالثاً : عقب استخدام هذه الطريقة ، يتعين استعمال محلول اختزالي بعد صباغة شف وذلك لإزالة أية آثار متبقية في 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 البنفسجي الداكن ، بينما تصبغ البروتينات السكرية بلون أحمر باهت نسبياً .

طريقة أزرق السيان : Alcian blue method

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

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

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

بعض الطرق الإثباتية في صبغات المواد الكربوهيدراتية :

Some confirmatory procedures for carbolydeste staining

غالبا ما يقتضى الأمر الحصول على مزيد من التأكيد بشأن النتائج الإيجابية التي يتم الحصول عليها في التحضيرات المصبوغة . وأكثرها استعمالا مايلي :

- طرق الإنزيمات : 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 . وفي هذه الحالة يصبغ قطاع من العينة بصبغ الجليكوجين المميز ، مثل " كارمين بست " . ويعمل قطاع مثيله بأحد الإنزيمين سابقى الذكر ، ثم يوضع الإثنان في المحلول الصبغى Best carmine . فإذا جاءت النتيجة سلبية في الحالة الثانية ، كان هذا تأكيدا للصبغة الإيجابية التي ظهرت في القطاع الأول لأن ذلك يعنى أن الجليكوجين قد ذاب تحت تأثير الإنزيمات المختصة بذلك .

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

- طريقة التوقيف أو المحاصرة : Blocking methods

تستخدم هذه الطريقة أيضا لإثبات وجود الكربوهيدرات وغيرها من المواد التي تحتوى على الأدهيدات ، 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 الصبغة 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 بمنع صباغتها .

بعض الطرق شائعة الاستخدام لتوضيح المواد الكربوهيدراتية

Some common histochemical methods used
for Carbohydrates demonstration

توضيح المواد الكربوهيدراتية العامة : Detection of General Carbohydrates
طريقة حامض بيرايوديك شف Periodic Acid Schiff "PAS"
للكربوهيدرات بصورة عامة (Hotchkiss , 1948) for General Carbohydrates
المحاليل المستخدمة :

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

* حامض بيرايوديك : Periodic acid جرام واحد

* ماء مقطر : Distilled water ١٠٠ مليلتر

Schiff reagent : (ب) محلول شف

يتم تحضيره كما يلي :

* يذاب جرام واحد من " الفوكسين القاعدي Basic Fuchsin في ١٠٠ مليلتر من الماء
المغلي ، ثم يرج لمدة خمس دقائق .

* يترك المحلول ليبرد حتى تصل درجة حرارته ٥٠° م .

* يتم ترشيح المحلول ، ويضاف للرشح ٢٠ مليلتر من حامض الهيدروكلوريك (عيارى
١ أو واحد العيارية) .

* يتم تبريد المحلول حتى ٢٠° م ، ويضاف له جرام واحد من " ثيوسلفيت الصوديوم
Soduim thiosulphate " . يلاحظ عندئذ زوال اللون الأحمر الداكن للمحلول

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

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

ملحوظات هامة :

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

الطريقة :

- ١ - يزال الشمع من القطاعات الشمعية بواسطة الزيول .
- ٢ - تمرر القطاعات فى كحولات متدرجة التركيز التنازلى حتى تصل إلى الماء المقطر .
- ٣ - توضع القطاعات فى محلول ٥ ، ١ - ٨٪ حامض بيرايوديك "Periodic Acid" لمدة ٢ - ٣ دقائق لاكسدتها واطلاق الأديهيدات من المواد الكربوهيدراتية .
- ٤ - تغسل الشرائح تحت ماء الصنبور الجارى لمدة ٣ دقائق ثم فى ماء مقطر لمدة دقيقة واحدة .
- ٥ - تنقل الشرائح إلى محلول "شف Periodic Acid" لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة .

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

(فى هذه المرحلة يمكن إجراء صبغة خلفية Counterstaining باستخدام صبغ الهيماتوكسولين "Haematoxylin"

٧ - فى كلتا الحالتين يتم غسل الشرائح لمدة ٢ دقائق فى ماء الصنبور الجارى .

٨ - من المستحسن تمييز القطاعات بعد صياغتها فى محلول ٨٪ كحول محمض (مليلتر واحد من حامض الهيدروكلوريك المركز فى ١٠٠ مليلتر 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 .

النتيجة :

- تظهر المواد الكربوهيدراتية مكتسبة لونا بنفسجيا داكنا (magenta)

- فى حالة صبغة الخلفية أو الإضافية تأخذ الأنوية لونا أزرقا داكنا بواسطة الهيماتوكسولين 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 أيضا ، هى دايميون Dimedone التى تعمل على إعاقه

أو محاصرة الألكايدات أو مجموعات المواد الكربوهيدراتية وتمنع تفاعلها أو صبغتها بمحلول شف ، وذلك فيما عدا الجليكوجين . وفي هذا المجال ينصح بتحضير محلول " شف " حسب طريقة ليللي Lillie , 1951 ، على الوجه التالي :

المكونات :

- * فوكسين قاعدي basic fuchsin جرام واحد
- * ميتابايسلفيت الصوديوم sodium metabisalphite ١٠.٩ جرام
- * حامض هيدروكلوريك (١٥، عيارى) hydrochloric acid ١٠٠ مليلتر
- * فحم حيوانى منشط طازج fresh actirated animal chercoal ٥٠٠ ملليجرام

طريقة الإعداد :

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

ملحوظة :

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

الطريقة :

- ١- يفضل أن تكون القطاعات المستخدمة مأخوذة من عينات تم تثبيتها في أحد المحاليل الآتية : ١٠٪ فورمالين - محلول حامض الخليك - كحول - فورمالين - محلول روزمان .
- ٢- يزال الشمع من القطاعات ، ثم تمرر في سلسلة تنازلية من الكحولات حتى تصل إلى الماء المقطر .
- ٣ - توضع القطاعات في محلول " نيتروسيليلوز nitro cellulose " في خليط من الكحول المطلق والايثير بنسبة ١:٨ .
- ٤ - تنقل القطاعات لأكسدتها في محلول " حامض بيرأيوديك " تركيزه ٥٪ لمدة ١٠ دقائق .
- ٥ - تغسل القطاعات جيدا بماء الصنبور الجارى .
- ٦- تنقل القطاعات إلى محلول " دايميون dimedon " ، تركيزه ٥٪ في الكحول المطلق لمدة ٣ ساعات عند ٦٠° م .
- ٧ - يتم غسل القطاعات بماء الصنبور الجارى .
- ٨ - تصبغ بعد ذلك في محلول " شف " لمدة ١٠ دقائق .
- ٩ - تغمر القطاعات سريعا في محلول مائى من " بايسلفيت الصوديوم Sodium bisulphite (ميتا ثانى كبريتات الصوديوم) بتركيز ٥٪ .
- ١٠ - تغسل القطاعات تحت الماء الجارى لمدة ١٠ دقائق .
- ١١ - ينزع الماء من القطاعات بإمرارها في سلسلة تصاعديّة من الكحولات ، وبعد ذلك يتم ترويقها وتغطيتها بمحلول " بلسم كندا "

النتيجة :

يصبغ الجليكوجين باللون الأحمر الداكن .

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

(تستخدم القطاعات الشمعية والثجية المجمدة).

المواد :

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 مليلتر

- يتم غليان المحلول باحتراس لمدة ٥ دقائق .

- يترك المحلول ليبرد ثم يرشح .

- يضاف للرشيح .

* أمونيا (٨٨٠,٠٠) ammonia (880,00) ١٠ مليلتر

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

* المحلول السابق المخزن	Stock solution ١٢ مليلتر
* أمونيا (٨٨٠,٠٠٠)	Ammonia (880.000) ١٨ مليلتر
* كحول ميثيلي	Methily alcohol ١٨ مليلتر

ج - محلول بست التمييزي : Best's differentiator

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

الطريقة :

- ١ - تنقل القطاعات المجمدة (بعد تمييزها) من الماء الى ٧٠٪ كحول .
- ٢ - أما القطاعات الشمعية ، فيزال منها الشمع ، وتنقل خلال سلسلة تنازلية من الكحولات حتى تصل إلى ٧٠٪ كحول أيضا .
- ٣ - يفضل وضع القطاعات - إذا أمكن - في محلول "سيللويدين Celloidin" تركيزه ١٪ لمدة دقائق .
- ٤ - تغسل القطاعات في ماء الصنبور .
- ٥ - يمكن صبغة الأنوية في محلول "هيماتوكسولين - الشب alum haematoxalin" لمدة ١٠ - ١٥ دقيقة .
- ٦ - الغسيل مرة ثانية في ماء الصنبور .
- ٧ - تترك القطاعات في محلول "كارمين" بست الصبغى (ب) لمدة ٣٠ دقيقة .
- ٨ - يتم تمييز القطاعات في محلول "بست" (ج) ثلاث تغييرات على مدة ٢٠ ثانية .
- ٩ - تغسل القطاعات سريعا في كحول "٩٠٪" .
- ١٠ - تنقل إلى الكحول المطلق (١٠٠٪) .
- ١١ - يتم الترويق في الزيول .
- ١٢ - تغطى القطاعات بإحدى المادتين اللاصقتين : DPX أو بلسم كندا .

النتيجة :

- يكتسب الجليكوجين لونا احمر مميذا .
- تصبغ الأنوية باللون الأزرق .

كاشف دياستيز (الشعير) لإثبات وجود الجليكوجين :

"Diastase digestion for glycogen"

- يتم إعداد المحلول التالي :

- | | | |
|-------------------|-----------------|-----------------------|
| Malt diastase | 500 ملليجرام | * دياستيز الشعير |
| 0.02 M Phosphate | (٠.٢ , جزعين) | * محلول فوسفات المنظم |
| buffer , PH (6.0) | ٥٠ مليلتر | أسه الهيدروجيني (٦) |
| Sodium chloride | ٤٠٠ ملليجرام | * كلوريد الصوديوم |

الطريقة :

- ١ - يتم توصيل القطاعات حتى الماء .
- ٢ - توضع القطاعات في محلول " دياستيز " سابق الذكر لمدة (ساعة) عند ٢٢° م أو (٤٠ دقيقة) عند ٣٧° م
- ٣ - تصبغ القطاعات بصبغ الجليكوجين الذي استخدم في القطاعات المقابلة (أو التي لم تتعرض لتأثير ذلك الإنزيم) .
- ٤ - تشطف القطاعات بالماء .
- ٥ - ينزع الماء ويتم الترويق والتغطية حسب المعتاد .

ملحوظة :

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

انزيم " اميليز amylase " المذيب للجليكوجين أيضا .

النتيجة :

يستدل من عدم ظهور الصبغ في تلك القطاعات أن المادة التي سبقت صبغتها بدون التعرض للإنزيمات هي مادة الجليكوجين وذلك لأنها أنابيب بواسطة تلك الإنزيمات الخاصة بذلك .

صباغة المواد المخاطية : (طريقة سوثجيت ، ١٩٢٧)

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

Staining solution

المحلول الصبغى

المواد :

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

يرج هذا المحلول جيدا ، ثم يضاف له :

* كلوريد الألومنيوم	aluminium chloride	٥٠٠ ملليجرام
---------------------	--------------------	--------------

طريقة التحضير :

- 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 الأصلي 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 بإضافة الماء المقطر .

طريقة الصباغة :

- ١ - إذا كان مطلوباً صباغة الأنوية ، تصبغ أولاً بواسطة الهيماتوكسلين بالطريقة المعتادة ثم تغسل القطاعات بالماء المقطر لمدة ٥ دقائق ويتبع ذلك التمييز في الكحول المحمض Acid alcohol (١٪ حامض هيدروكلوريك مركز في ٧٠٪) ثم الفسيل لمدة ٥ دقائق في ماء الصنبور .
- ٢ - سواء صبغت الأنوية أو لم تصبغ ، توضع القطاعات - بعد غسلها بالماء المقطر في محلول صبغ الكارمين لمدة ٣٠ دقيقة .
- ٣ - تغسل القطاعات في ماء الصنبور لمدة ١٢ دقيقة .
- ٤ - ينزع الماء في سلسلة متصاعدة من الكحولات .
- ٥ - الترويق في الزيلول ، ثم التغطية بمادة DPX .

النتيجة :

- تأخذ المخاطيات لونا أحمر .
- والأنوية اللون الأزرق .

الكشف عن عديدات التسكر المخاطية الحمضية :

Detection of acid mucopolysaccharides (Steedman , 1950)

طريقة أزرق السيان : Alcian blue method

المحلول الصبغى : Staining solution

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

* أزرق السيان Alcian blue جرام واحد

* كحول مطلق (١٠٠٪) Absolute alcohol ٣٠ مليلتر

Distilled Water ٧٠ مليلتر

* ماء مقطر

الطريقة :

- ١ - يتم توصيل القطاعات حتى الماء المقطر .
- ٢ - تصبغ القطاعات في المحلول الصبغى لمدة ١٥ دقيقة .
- ٣ - تمرر القطاعات سريعا في كحول (٩٥٪) .
- ٤ - يتم الترويق كالمعتاد والتغطية بالمحلول اللاحق DPX .

النتيجة :

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

ملحوظة :

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

توضيح وتمييز عديدات التسكر المخاطية الحمضية والمتعادلة :

Illustration and differentiation of acid and reutral mucoids.

طريقة أزرق السيان - شف حامض بيرأبوديك :

Alcian blue - PAS method (Mowry , 1956).

Staining Solution

المحلول الصبغى :

- محلول أزرق السيان (أسه الهيدروجينى ٢,٥)

Alcian blue solution (PH. 2.5)

Schiff's reagent

- محلول شف

1% Periodic

- ١٪ حامض بيرأبوديك

الطريقة :

- ١ - يتم إنزال القطاعات حتى الماء المقطر .
 - ٢ - تصبغ في محلول السيان
 - ٣ - تغسل في الماء المقطر .
 - ٤ - تؤكسد في حامض بيرأبوديك
 - ٥ - تصبغ في محلول شف
 - ٦ - تغسل جيدا في ماء الصنبور الجارى
- ٥ دقائق
- ٥ دقائق
- ٨ دقائق
- ١٠ دقائق

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

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

النتيجة :

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

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

Staining solution

المحلول الصبغى :

silver nitrate ١٠ جرام

* نترات فضة

3% acetic acid ١٠٠ مليلتر

* حامض خليك (بتركيز ٢٪)

الطريقة :

- ١ - يتم تحضير قطاعات شمعية (سمكها حوالى ١٠ ميكرونات).
- ٢ - تلتصق 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 التريوق .
- ٦ - تغطى القطاعات بمحلول لاصق مناسب .

النتيجة :

- يصبغ حامض الاسكوريك باللون البنى الداكن المائل الى السواد .

محلوظة : تحفظ هذه التحضيرات بعد ذلك فى مكان مظلم .

طريقة "باكس" لتوضيح حامض الأسكوربيك :

Bacchu's method for ascorbic acid demonstration .

المحلول الصبغى : Staining solution

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

الطريقة :

- 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 وتكرر خلال كحولات تنازلية حتى تصل إلى الماء (يمكن إجراء صباغة خلفية بواسطة الهيماتوكسيلين) .
- ٨ - بعد الغسيل ، ينزع الماء ، ويتم الترويق فى الزيلول وتلصق عليها الاغطية بواسطة " بلسم كندا " .

النتيجة :

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