الفصـــل الرابــع

4

الليبيدات (الدهون وأشباه الدهون)

LIPIDS

الفصـــل الرابـــع

الليبيدات (الدهون وأشباه الدهون)
LIPIDS

نبـــذة عامـــة : -

هناك ثلاثة مصطلحات تستخدم حديثا للدلالة على المواد التى كان يطلق عليها سابقا المواد الدهنية Fats وهى : " ليبويد Lipoid " - " ليبيد Lipid " و " ليبين Lipine " . وقد استخدم العالم (كين Cain - ١٩٥٠) - فى المرجع الذى وضعه عن النواحى الهستوكيميائية لهذه المواد - لفظ " ليبيد Lipid " فى نفس الموضع الذى استخدمه فيه العالم (بيكر Baker - ١٩٦٤) للدلالة على المواد التى يمكن استخلاصها من الأنسجة بواسطة " البيريدين Pyri-dine " وغير ذلك من مذيبات الدهون مثل الكلوروفورم والكحول والزيلين والبنزين وغيرها ، ولكنها لا تذوب فى الماء . . كذلك استخدم العالم بيكر لفظ " ليبين Lipine" فى نفس هذا المجال ، ولكنه قصر استخدامه على مثل تلك المواد التى تحتوى على النيتروجين وكذلك الكربون والهيدروجين والأكسجين وذلك مثل : الليسيثين Lecithin ، وكيراسين Kerasin وغيرها من المركبات الدهنية أو الليبيدات المشابهة لها .

وعلى أية حال ، فإن لفظ " ليبيد Lipid " هو أوسع المصطلحات انتشارا فى الوقت الحالى ، وهو يشير إلى - أو يدل على - الدهون أو شبيهات الدهون الموجودة بصورة طبيعية والتى لا تذوب فى الماء ولكنها تقبل الذوبان فى مذيبات الدهون المعروفة مثل الايثير والبنزين والزيلن وغيرها كما سبق ذكره .

نمط تواجد الليبيدات في الخلايا والأنسجة الحيوانية :

توجد معظم الليبيدات مرتبطة أو متحدة بالبروتينات ، ومن هذه الزاوية تتميز الليبيدات إلى نوعين أساسيين من الناحية الهستوكيميائية ، وهما :الليبيدات المرئية أو غير المقنعة والليبيدات غير المرئية أو المقنعة .

الليبيدات المرئية أو غير المقنعة : Visible or Unmasked lipids

يتميز هذا النوع بأنه يمكن الكشف عنه وتوضيحه بصورة مباشرة فى الخلايا والأنسجة باستخدام الطرق المميزة والمتخصصة لتلك المواد والتى تدخل فيها المواد الصبغية : " أسود سودان Sudan black " و " سودان -٤ Sudan IV " و" كبريتات الأزرق نيلى Nile blue sulphate ، وغيرها .

الليبيدات المقنعة أو غير المرئية : Masked or Invisible lipids

ويقصد بها الليبيدات التى لا يتم توضيحها أو الكشف عنها مباشرة بالطرق السابقة ، ويطلق هذا المصطلح بصورة خاصة على " الدهون البشرية Human Fats وذلك لأن مثل تلك الليبيدات إما أن تكون مرتبطة ارتباطا وثيقا بالبروتينات ، أو أنها محاطة بطبقة بروتينية ، بما يمنع وصول المواد الصبغية إليها .

على أنه فى كثير من الحالات ، فإن تحويل الليبيدات من مقنعة إلى غير مقنعة أو مرئية يتم بتحويل البروتينات المرتبطة بالليبيدات أو المحيطة بها إلى ليبيدات أيضا ، أو تكسير تلك البروتينات وتحللها واختفاؤها ، وقد يحدث ذلك بصورة طبيعية فى حالة تقدم العمر والشيخوخة كما يشاهد ذلك فى الخلايا العصبية للحيوانات المسنة ، أو عند تسمم الحيوانات بأنواع مختلفة من السموم .

كذلك يمكن تحويل الليبيدات من مقنعة إلى غير مقنعة بطريقة صناعية ، وذلك بمعاملة الخلايا والأنسجة التى توجد بها مثل تلك الليبيدات بالإنزيمات التى تذيب البروتينات مثل البيسين والتريسين وغيرها .

أنواع الليبيدات : Types of lipids

يتم تصنيف الليبيدات عادة إلى الأنواع الأربعة التالية :

(١) الليبيدات البسيطة Simple lipids

(٢) الستروبدات Steroids

(٣) الليبيدات المركبة Compund lipids

(٤) الكاروتينات Carotenoids

أولا : الليبيدات البسيطة : Simple lipids

هذه المواد هى استيرات الأحماض الدهنية مع الكحولات ، وهى تشتمل على أنواع التالية :

(أ) الجليسريدات : Glycerides

يطلق على هذه المواد أيضا " ثلاثيات الجليسريدات "Triglycerides" أو الدهون المتعادلة "Neutral fats" وهى مواد لها أهمية خاصة من الناحية الهستوكيميائية ، وهى استيرات الأحماض الدهنية مع الجليسرول . والجليسرول - كما هو معلوم - كحول ثلاثى ، رمزه الكيميائى :

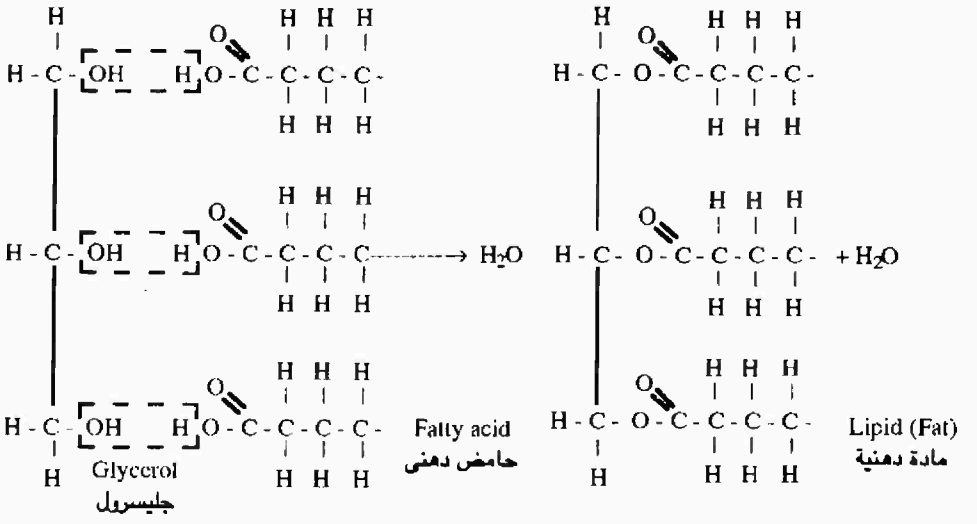
$$\begin{array}{l} .\ CH_2OH \\ .\ CH\ OH \\ .\ CH_2OH \end{array}$$

ويتحد جزىء الجليسرول مع ثلاثة جزيئات من الحمض الدهنى مكونا ثلاثى الجليسرول . فعلى سبيل المثال ، يتحد مع ثلاثة جزيئات من الحامض الدهنى بيوتيرين فى الزبد "butyric acid ($C_3\ H_{2y}\ COOH$) لتكوين المادة الدهنية أو الليبيدية " ثلاثية حامض البيوتيرين " وهو مركب اساسى فى الزبد :

$$\begin{array}{lcl} .\ CH_2\ OH & HOOCC_3\ H_7 & CH2\ .\ O.\ CO\ .\ C_3\ H_7 \\ .\ CH\ \ OH + HOOCC_3\ H_7 & \text{------} & CH.\ \ O.\ CO.\ C_3\ H_7 + {}_3H_2O \\ .\ CH_2\ OH & HOOCC_3\ H_7 & CH_2\ .\ O.\ CO\ .\ C_3\ H_7 \\ .\ \text{Glycerine} & \text{Butyric acid} & \text{Tributyrin} \\ \quad \text{or} & & \\ .\ \text{Glycerol} & & \end{array}$$

(الجليسرين أو الجليسرول) (حامض بيوتيريك) (ثلاثى البيوتيرين)

وبصورة عامة ، فإنه يمكن تمثيل النظام التركيبى للدهون أوالليبيدات على الوجه التالى :



ومن أهم الأحماض الدهنية الموجودة فى الليبيدات متحدة مع الجليسرول هى: الباليتيك Palmitic acid " – أى زيت النخيل – حامض ستياريك Stearic " فى الدهون العادية ، حامض أوليبك Oleic acid " فى زيت الزيتون . وكما سبق القول ، فان الاحماض أحادية التكافؤ ، تتحد ثلاثة جزئيات منها مع جزئ واحد من الجليسرين ، أو الجليسرول . مثل ذلك "ثلاثى البيوتيرين Tributyrin " فى الزبد – ثلاثى الباليتين Tripalmiten" ثلاثى استيارين Tristearin ، وثلاثى الأولين Trioleein " وهكذا . وتتضمن هذه الليبيدات الدهون أو الشحوم "Fats " و" الزيوت Oils " . ويجرى التمييز بينهما على النحو التالى : المواد التى توجد فى حالة صلبة عند درجة ٢٠° م تسمى الدهون او الشحوم وذلك مثل الدهون الجسمية أو الأنسجة الدهنية "adipose tissues " ، أما الزيوت فهى الليبيدات التى تكون فى حالة سائلة عند درجة الحرارة هذه وذلك مثل العديد من الزيوت النباتية والزيوت الحيوانية (زيت كبد الأسماك مثلا). وبصورة عامة ، فإن الدهون أو الشحوم هى فى الحقيقة مزيج أو خليط من تلك الاستيرات المذكورة بنسب متباينة .

(ب) الشـــموع : waxes

وذلك مثل شمع نحل العسل Bees wax " ، وهى عبارة عن ستيرات الأحماض الدهنية مع كحولات بخلاف الجليسرول .

ثانيا : الإستروييدات : Steroids

تتكون الستروييدات بصورة أساسية من حلقة اليفاتية متضمنة رابطة أو أكثر من الروابط المزدوجة من المواد الأليفاتية غير المشبعة بجانب بعض السلاسل الجانبية . ويشتمل هذا النوع على العديد من الموادالجسمية الهامة مثل الهرمونات الجنسية وهرمونات القشرة الكظرية وفيتامين " A" وأحماض الصفراء وغيرها .

وهناك ستروييدات تحتوى على مجموعة (-OH) ، ويطلق عليها " ستيرولات Sterols ، منها ، الكوليستيرول Cholesterol وهى من المكونات الأساسية فى دهون الصوف والغدة الكظرية والجلد والمخ وغيرها .

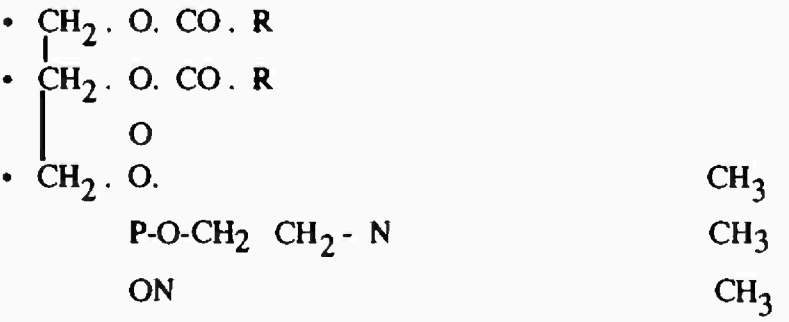
ثالثا : الليبيدات المركبة : Compound lipids

وهى مواد تتكون من أحد الأحماض الدهنية وأحد الكحولات بخلاف الجليسرول ومجموعات إضافية أخرى . وتشتمل هذه المواد بصورة اساسية على الانواع التالية :

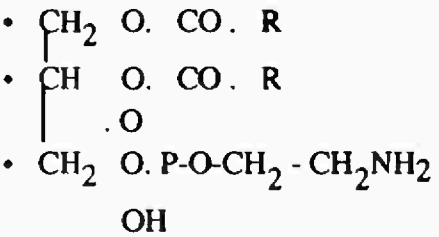
(أ) الفسفوليبيدات أو الليبيدات الفسفورية : Phospholipids

تتكون هذه المواد بصورة عامة من : احماض دهنية + جليسرول (أو أى مادة كحولية أخرى) + حامض فسفوريك + احدى القواعد النيتروجينية التى قد تكون " كولين Choline أو سيرين Serine" أو غيرها . وتكون هذه المواد جزءا أساسيا من تركيب مادة البروتوبلازم ومن أهم هذه المواد : " ليسيتين Lecithin " ، " كيفالين Kephalin ، وهما يتشابهان فى أن رمز الأحماض الدهنية فى كليهما : R. COOH , R. COOH .

ويحتوى ليسيتين على القاعدة النيتروجينية كولين ، كيفالين ولكنها تحتوى على ايثانول أمين ، وفيما يلى التركيب الكيميائى لكل منهما :



ليسيتين Lecithin (كولين)

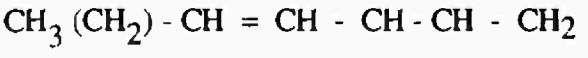


كيفالين Kephalin .

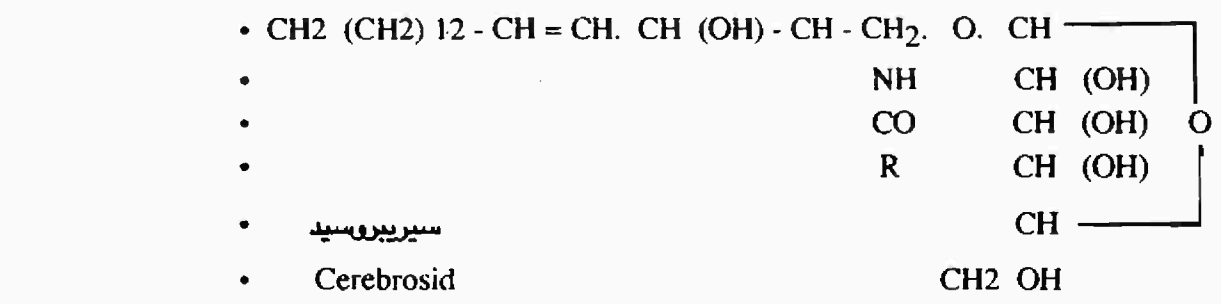
ومن أمثلة هذه المركبات أيضا مادة " سفنجوميلين Sphingomyelin" التى تحتوى على مركب " سفنجوزين Sphingosine 3 وهو أحد الكحولات الغينية + أحد الأحماض الدهنية + القاعدة النيتروجينية " كولين Choline " + حامض الفسفوريك . وتوجد هذه فى المخيخ والاعضاء الاخرى الغنية بالفوسفوتيدات. ويلاحظ فى هذه الحالة أن مادة " سفنجوزين " قد أخذت مكان الجليسرول فى مثل تلك المركبات .

ب – الجليكوليبيدات أو الليبيدات السكرية : Glycolipids

الجيليكوليبيدات أو ماتسمى " سيربيروسيدات Cerebrosides" هى دهون محتوية على أحماض دهنية + مادة كربوهيدراتية (قد تكون جلوكوز أو جالاكتوز + كحول معقد ، مثل "سفنجوزين Sphingosine" ولكنها لا تحتوى على حامض الفسفوريك .



سفنجوزين Sphingosine



ومن أمثلة هذه المركبات : " كيراسين Kerasin ، فرينوزين Phrenosin وهى من المكونات الأساسية للأغشية المبلينية التى تغلف الاعصاب . وكذلك " جانجليوسيدات Gangliosides" التى تعتبر من السيريبروسيدات التى توجد بصورة أساسية فى خلايا العقد العصبية فى الجهاز العصبى .

وتتميز هذه المواد بأنه عند تحللها تعطى : حامض ذهنى + سفنجوزين + سكر أمينى يسمى حامض " نورامين Neuraminic acid + سكر جالاكتوز مع نسبة قليلة من سكر الجلوكوز . وتتركز هذه المواد بصفة خاصة فى المادة السنجابية (الرمادية) فى الجهاز العصبى خاصة المخ والحبل الشوكى وبنسبة محدودة جدا فى المادة البيضاء .

رابعا : الكاروتينات : Carotenoids

تشتمل هذه الليبيدات على الصبغات الحمراء او البرتقالية ، وذلك مثل الصبغ "الكاروتينى Carotene " فى " الجزر Carrot " وصبغ " زانثوفيل Xanthophyl " فى أوراق النبات الخضراء ، وفيتامين (أ) (الذى يوجد فى الارجوان البصرى فى خلايا شبكة العين ، وفى المخ أو صفار البيض وغيرها . وعلى ذلك فإن هذه المواد بصورة أساسية من " الهيدروكاربونات hydrocarbans ورمزها العام C_{40} H_{66}.

كما أن هذه المجموعة تشتمل أيضا على " الفلافينات Flavines" التى تتميز باللون الاصفر وذلك مثل " لاكتوفلافين Lactoflavin" الموجود فى اللبن ، ريبوفلافين Riboflavin " أى فيتامين B_2 الموجود بكثرة فى خلايا الكبد .

أهمية الليبيدات في الخلايا والأنسجة الجسمية :

يختلف دور الدهون وأهميتها فى الأنسجة المختلفة حسب طبيعة تواجدها ومدى انتشارها وكثافتها فى تلك الأنسجة .

- فالجلسرولات تعمل كمخازن للطاقة ، وبذلك تعمل كعناصر واقية ضد البرودة أو أية عوامل ضارة .
- ويلعب الليسيثين دورا هاما فى المناشط الحيوية فى الخلايا والأنسجة الكبدية .
- وتشكل الفسفوليبيدات والسيريبروسيدات جزاء هاما من الأغشية الليلينية التى تغلف الألياف العصبية وتعمل على حمايتها .
- كما أن الإستروبدات ، وبالتحديد أحماض الصفراء تعمل على استحلاب الدهون بما يسهل تأثير الإنزيمات عليها وهضمها .
- ويلعب الكوليسترول دوراً أساسيا فى تنظيم الخواص والنشاطات الميكانيكية فى الجلد والشعر .
- بالإضافة إلى أن الاستروبدات تشكل التركيب الاساسى للهرمونات الجنسية فى المناسل والغدة الكظرية .
- هذا بجانب تواجد الليبيدات واهميتها فى العديد من الخلايا والانسجة النباتية والحيوانية .

والمعروف ان المواد الليبيدية متواجدة بصورة عامة فى معظم الأنسجة ومخازن الدهون المختلفة فى الجسم . ويوجد الدهن المختزن دائما على هيئة دهون متعادلة " neutral fats " أو ثلاثية الجليسرولات ، بينما تتكون دهون الأنسجة من خليط من دهون متعادلة وفسفوليبيدات . ويمثل النوع الأول الدهون أو الليبيدات المختزنة ، بينما تشكل الفسفوليبيدات الدهون الرئيسية أو الأساسية وذلك من مكونات السيتوبلازم فى هذه الخلايا والانسجة .

وفى حالة التصويم أو التجويع طويل المدى ، يحدث تناقص واضح فى الدهون المتعادلة بينما لا تتأثر الفسفوليبيدات كثيرا وذلك لانها تلعب دورا هاما فى النشاطات الخلوية .

وعلى ذلك تتميز هذه الليبيدات الى نوعين رئيسين وهما : الدهون المتغيرة والدهون الثابتة .

أ- **الدهون المتغيرة** : Variable fats

وهى تتكون من الدهون المتعادلة أو ثلاثية الجليسرولات ، وتمثل الدهون المختزنة فى الخلايا والانسجة ، وتتوقف كميتها على الحالة الغذائية للحيوان ، حيث توجد بوفرة فى الحالات عادية التغذية ولكنها تقل تدريجيا فى حالات الصوم أو الجوع .

ب - **الدهون الثابتة** : Constant fats

وتتكون من الفسفوليبيدات ، وتمثل جزءا رئيسيا من تركيب البروتوبلازم ، ولا تتأثر بحالات التصويم ، أو التجويع ، وذلك لاهميتها فى النشاطات الحيوية فى الخلايا والأنسجة .

وفى حالات معينة ، مثل التسمم بالزرنيخ أو الفسفور أو الكلوروفورم ورباعى كلوريد الكربون أو الإصابة بعدوى من الفيروسات أو البكتريا ، يشاهد ارتفاع معدل الدهون فى خلايا الكبد بصورة خاصة ، وذلك لأن الكبد يلعب دورا هاما فى العمليات الحيوية فيما يتعلق بالمواد الدهنية . والمعروف أن الكبد يحتوى على ٤٪ من المواد الدهنية فى الجسم كله ، منها ٥٢٪ دهون مختزنة، ٧٥٪ دهون أساسية ثابتة . ويلاحظ أن معدل الدهون المختزنة يرتفع خلال الفترات الأولى للتصويم أو التجويع ، وذلك لأن الدهون ترد إلى الكبد من المخازن الجسمية فى تلك الحالات لكى تتم أكسدتها وتوزيعها على أجزاء الجسم المختلفة . وعندما تنفذ هذه الدهون المختزنة ، يحدث تناقص تدريجى فى معدلات الدهون فى الخلايا الكبدية .

الكشف عن الليبيدات في الخلايا والأنسجة الجسمية :

تجدر الإشارة الى أن هذه المواد تتطلب طرقا خاصة بها وذلك نظرا لسهولة ذوبانها فى مذيبات الدهون التى تستخدم فى التحضيرات العادية ، ويفضل جدا استعمال القطاعات الثلجية أو المجمدة " ولكن يمكن التميز بين المواد الليبيدية وغير الليبيدية.! تتبع طريقة (بيكر Baker) عام ١٩٤٦ وهى طريقة استخلاص تلك المواد بواسطة البيريدين Pyridine " عند درجة ٦٠م على أنسجة مثبتة فى محلول بوان الضعيف ، وهو مثبت يسمح باستخلاص الفسفوليبيدات بواسطة البيريدين .

وهناك مواد أخرى تعمل على استخلاص تلك الدهون ، وذلك مثل : الاسيتون الذى يزيل أو يستخلص الجليسرولات والكوليسترول عندما يكون باردا . أما اذا استعمل ساخنا سنخلص السريبروسيدات . ويعمل الايثير الساخن على ازالة الليسيثين والكيفالين . بينما يعمل الكلورفورم على استخلاص جمع الدهون أو الليبيدات .

وبصورة عامة تتم عملية الاستخلاص فى هذه الطريقة على مدى ٢٤ ساعة فى ثلاثة تغييرات من مادة الاستخلاص هذه . وبعد اتمام عملية الإذابة أو الاستخلاص توضع الانسجة – بصورة سريعة – فى سلسلة تنازلية من الكحولات حتى تصل الى الماء ، ثم يتم تجميدها وتصبغ تلك القطاعات الثلجية أو المجمدة فى صباغة متخصصة للدهون مثل " اسود سودان " Sudan Black B

بعض الطرق المميزة لأنواع الليبيدات المختلفة :

فيما يلى جدول يبين الانواع الرئيسية لليبيدات وبعض الطرق المميزة لها :

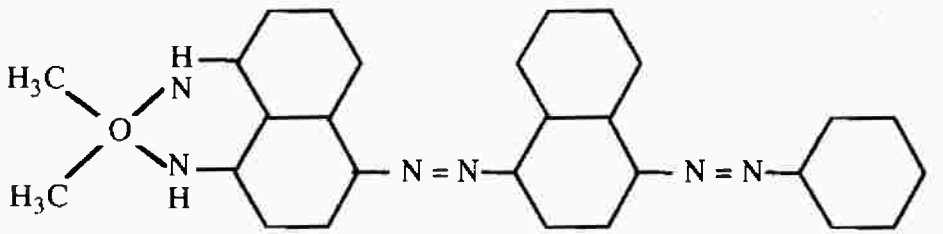
نـــوع الليبيـــدات	الطرق الخاصة بها
أ – الدهون المتعادلة (ثلاثية الجليسرولات)	– أسود سودان ب
• Neutral lipids	• Sudan black B
• (Triglycerides) .	– سودان ٤ •Sudan IV
	– أحمر الزيت أ • Oli red O
ب – الفسفوليبيدات	– أسود سودان ب
• Phospholipids	• Sudan black B
	– الهيماتين الحمضى
	• Acid heametien
جـ – الليبيدات السكرية	– أسود سودان ب
• Glycolipids	• Sudan black B
	– شف – حامض بيرأيوديك
	• Periodic acid schiff

طريقة اسود سودان ب : Sudan black B

(بيكر ١٩٥٦ – Baker 1956)

– تفضل أنسجة خصية الفأر – وأمعاء وكبد فأر حديث التغذية .

– يفضل تثبيت الأنسجة فى محاليل الفورمالين بصورة عامة ، أو محلول أوياما Aoyama أو الكرومات وذلك للقطاعات الثلجية أو المجمدة Frozen Sections .



أسـود ســـودان

المحاليل المستخدمة :

– ١٪ حامض كروميك	(1% Chromic acid)	١٥ جزء
– ٢٪ حامض اوزميك	(2% Osmic acid)	٤ أجزاء

محلول أوياما :

– كلوريد كادميوم	(Caodmium chloride)	جرام واحد
– فورمالين متعادل	(Neutral formalin)	١٥ ملليلتر مكعب
– ماء مقطر	(Disitlled water)	٨٥ ملليلتر مكعب

محلول فلمنج (بدون حامض الخليك)

(Fleming without acetic acid " FWA ")

– ١٪ حامض كروميك	(1% chromic acid)	٦٠ ملليلتر
– ٢٪ حامض اوزميك	(2% osmic acid)	١٦ ملليلتر

الطريقـــة :

بالنسبة لمحلول أوياما :

- يتم تثبيت القطاعات لمدة يومين أو ثلاثة أيام .
- اغسل بالماء الجارى ٥ – ٨ ساعات .

وبالنسبة لمحلول فلمنج :

- يتم التثبيت لمدة ساعتين.
- تغسل بالماء الجارى لمدة ٢٤ ساعة .
- توضع العينات فى محلول جيلاتينى خفيف لمدة ١٢ ساعة .
- ثم فى محلول جيلاتينى ثقيل لمدة ٨ ساعات .
- يتم تقطيع قطاعات ثلجية أو مجمدة بالميكروتوم الثلجى ، ويتم لصقها على شرائح زجاجية نظيفة عليها فيلم جيلاتينى (وذلك عن طريق وضع الشرائح النظيفة فى محلول جيلاتينى مجفف فى فرن دافىء لمدة ٢٤ ساعة ، ثم تصفى وتحفظ فى علبة نظيفة بعد مسح أحد اسطحها جيدا وترك السطح الثانى " مجيليتنا " ومعلوما .
- لكى تلتصق القطاعات جيدا تعرض لبخار فورمالين مركز فترة من الوقت (١٠ – ١٥ دقيقة) .
- تغسل الشرائح فى ماء جار لمدة ١٥ دقيقة .
- تنقل الشرائح إلى ٥٠ ٪ كحول لمدة ٣ دقائق.
- ثم إلى ٧٠٪ كحول لمدة دقيقة واحدة .
- تصبغ القطاعات فى محلول أسود سودان " ب " :

محلول مشبع من الصبغ فى ٧٠٪ كحول (ويفضل ترشيحه قبل الاستخدام) وذلك لمدة ١٠ دقائق .

- يتم تمييز القطاعات (أى ازالة الصبغ الزائد بوضعها فى ٥٠٪ كحول لمدة دقيقة أو أكثر ، ويفضل ضبط ذلك بالفحص الميكروسكوبى حتى يتم التوصل إلى درجة الصبغ المطلوبة) .

- يوقف التمييز بوضع القطاعات فى الماء المقطر .

- يتم تغطية القطاعات بأحد المحاليل اللاصقة المناسبة مثل الجليسرين الجيلاتينى "Giycerine jelly" أو عصير أباثى Apathy syrup .

ويتم تحضيرهما بالصورة الاتية :

محلول الجليسرين الجيلاتيني :

* جيلاتين	Gelatin	١٠ جرام
* ماء مقطر	Distlielled Water	٦٠ ملليلتر
* جلسرين	Glycerine	٧٠ ملليمتر
* بلورات فينول	Phenol crystsls	٢٥٠ ملليجرام

وفى هذه الحالة يذاب الجيلاتين فى الماء المقطر على نار هادئة ثم يضاف الجلسرين الصون المتزجى ويحفظ المحلول فى الثلاجة .

وبالنسبة لعصير أباثي : Apathy syrup

* صمغ عربى	Arabic gum	٥٠ جرام
* سكر (عادى)	Cane sugar	٥٠ جرام
* ماء مقطر	Distilled Water	١٠٠ ملليجرام
* ثيمول	Thymol	١٠٠ ملليجرام

- يذاب الصمغ والسكر فى الماء المقطر بالتسخين عند درجة ٦٠° م ، ثم يضاف الثيمول لحفظ المحلول .

النتيجـــة :

تصبغ الليبيدات بلون أزرق مائل للسواد .

طريقة أحمر زيتي - أ : - Oil Red o

يتكون المحلول الصبغي من :

- أحمر زيتي - أ	Oil Red o ——	جرام واحد
- فوسفات ثلاثي الايثيل	Triethyl Phosphate	٦٠ ملليلتر
- ماء مقطر	Distelled	٤٠ ملليلتر

التحضـــير :

* يضاف الماء المقطر لمحلول الفوسفات ، ثم يضاف الصبغ (أحمر زيتي - أ).
* يتم تسخين هذا الخليط حتى ١٠٠ م لمدة ٥ دقائق مع التحريك المستمر .
* يتم ترشيح المحلول وهو ساخن .
* كما يرشح دائما قبل الاستخدام .

الطريقـة :

١- توضع القطاعات الثلجية (المجمدة) في محلول فوسفات ثلاثي الايثيل تركيزه ٦٠٪ لمدة دقيقتين .

٢ - تصبغ القطاعات في المحلول الصبغي (بعد ترشيحه) في درجة حرارة الحجرة العادية وذلك لمدة ١٥ دقيقة .

٣ - تشطف القطاعات في محلول الفوسفات ثلاثي الإيثيل (بتركيز ٦٠٪) وذلك لمدة نصف دقيقة فقط .

٤ - تشطف القطاعات في الماء المقطر .

٥ - يمكن إجراء صباغة بالهيماتوكسلين لمدة دقيقة واحدة .

٦ - تغسل القطاعات بالماء الجاري لمدة ٥ دقائق .

٧ - تغطى القطاعات بالمحلول اللاصق " الجلسرين الجيلاتيني Glycerine Jelly " .

النتائـــج :

* تصبغ الدهون باللون الأحمر .

- تصبغ الأنوية باللون الأزرق .

صبغات سودان في بروبيلين جليكول " Sudan dyes in Propylene glycol"

(يمكن استخدام " أسود سودان - ب Sudan Black B)

أو (سودان -٤ Sudan IV) .

التحضـــير :

* يتم تحضير المحلول الصبغي بإذابة جرام واحد من صبغ سودان في ١٠٠ ملليلتر من بروبيلين جليكول بالتسخين حتى درجة ١٠٠° م وذلك لمدة بضع دقائق .
* يتم ترشيح المحلول وهو ساخن ، ثم يترك حتى يبرد .
* بعد أن يبرد المحلول الصبغي يتم ترشيحه بواسطة الصوف الزجاجي ويفضل استخدام مضخة مفرغة .

الطريقـــة :

١ - يتم إعداد قطاعات ثلجية .

٢ - ينزع الماء من القطاعات بوضعها في " بروبيلين جليكول" لمدة دقائق .

٣ - تنقل القطاعات إلى المحلول الصبغي لمدة ٥ - ١٠ دقائق .

٤- يتم تمييز القطاعات في (بروبيلين جليكول) دافيء لمدة ٢ - ٣ دقائق .

٥ - تشطف القطاعات في٥٠٪ بروبيلين جليكول .

٦ - تغسل القطاعات في ماء مقطر .

٧ - يمكن اجراء صباغة ارضية او إضافية بالهيماتوكسلين .

٨ - تغسل القطاعات بالماء الجاري لمدة ٢ -٣ دقائق .

٩ - يتم تغطيتها بمحلول الجليسرين الجيلاتيني .

النتيجـة :

- تصبغ الليبيدات باللوان الأسود (فى حالة إستخدام " أسود سودان " أو باللون الأحمر مع سودان - ٤).

- وتصبغ الأنوية باللون الأزرق .

طريقة رباعي أكسيد الأوزميوم (للقطاعات الشمعية) :

Osmium tetroxide method for paraffin sections .

- تستخدم مثبتات " أوياما" أو " ١٠٪ فورمالين متعادل " .

المحـاليل المستخـدمة :

(أ) محلول مختزن من ٥ ٪ بيكرومات البوتاسيوم :

بيكرومات البوتاسيوم	Potossium dichromete	٥ جرام
ماء مقطر	Distelled water	١٠٠ ملليلتر

(ب) محلول مختزن من ٢ ٪ حامض الأوزميك :

رباعى أكسيد الأوزميوم	Osmium tetroxide	٢ جرام
ماء مقطر	Distelled water	١٠٠ ملليلتر

(جـ) محلول بيكرومات البوتاسيوم - رباعي اكسيد الاوزميوم) :

Potossium dichromete - Osmium tetraoxide solution

محلول بيكرومات البوتاسيوم المختزن (أ)	٥٠ ملليلتر
محلول رباعى اكسيد الاوزميوم المختزن (ب)	٥٠ ملليلتر

الطريقـــة :

١ - يتم تشذيب أو توضيب قطعة النسيج أو العضو المثبت حتى لا يزيد سمكه عن ٤ ملليمتر .

٢ - توضع هذه القطع فى المحلول المشترك (جـ) لمدة ساعة إلى ساعتين .

٣ – يزال الماء من العينات بالطريقة المعتادة فى سلسلة كحولات متصاعدة ثم يتم ترويقها وطمرها فى الشمع وإعداد قطاعات شمعية مناسبة السمك .

٤ – يزال الشمع من القطاعات بواسطة الزيلين .

٥ – ممكن إجراء صباغة اضافية باستخدام الايوسين Eosin " سفرانين Safranin

٦ – تغطى بمحلول بلسم كندا أو المحلول اللاصق " بيرمونت "

النتيجـــة :

– تأخذ الليبيدات اللون الأسود .

– تأخذ الارضية السيتوبلازمية اللون الاحمر (فى حالة استخدام صباغة اضافية).

طريقة بيكر لصباغة الفسفوليبيدات بواسطة الهيماتين الحمضى :

"Baker's method for phospholipids by the acid haemtin

للقطاعات الثلجية :

ويفضل استخدام : المخ – الكلية – والأمعاء فى الفأر .

* ممكن استخدام محلول " أوياما " أو (١٠٪ محلول فورمالين متعادل).

المحـاليل المستخـدمة :

(أ) محلول بيكرومات البوتاسيوم – والكالسيوم :

" Potassium dichromate - Calcuim solution

* بيكرومات البوتاسيوم	Potassium dichromate	٥ جرام
* كلوريد كالسيوم	Calcium chloride	جرام واحد
* ماء مقطر	Disetlled water	١٠٠ ملليلتر

(ب) محلول بوراكس فريسيانيد : Ferricu

"Borax -Ferricyenide Solution

* بوراكس	Borax	٢٥, جرام
* فرنسيانيد البوتاسيوم	Potassium Ferricyendie	٢٥, جرام

* ماء مقطر — Disetlled Water — ١٠٠ ملليلتر

(يحفظ هذا المحلول فى الثلاجة).

(جـ) محلول ١ ٪ ايودات الصوديوم :

1% Sodium iodate solution

* ايودات الصوديوم — Sodium iodate — جرام واحد
* ماء مقطر — Distilled Water — ١٠٠ ملليلتر

(د) محلول الهيماتين الحمضي :

* بلورات هيماتوكسلين — Haematoxylin crystals — ٠٥, جرام
* ١٪ أيودات صوديوم — 1% soduim iodate — ملليلتر واحد
* ماء مقطر — Distilled Water — ٤٨ ملليلتر

(يتم تسخين هذا المحلول حتى درجة الغليان ، ثم يترك ليبرد ، وبعد ذلك يضاف له ملليلتر واحد حامض الخليك Acetic Acid) .

الطريقـــة :

١ – تعد قطاعات ثلجية .

٢ – توضع القطاعات فى محلول (بيكرومات البوتاسيوم والكالسيوم (رقم "أ") لمدة ١٦ ساعة .

٣ – تنتقل مرة أخرى الى محلول " بيكرومات البوتاسيوم والكالسيوم ، جديدة عند درجة ٦٠° م لمدة ١٦ ساعة أيضا .

٤ – تغسل القطاعات فى الماء الجارى لمدة ٦ ساعات .

٥ – ثم تغسل فى ماء مقطر لمدة ٥ دقائق .

٦ – تصبغ القطاعات فى محلول الهيماتين الحمضى (د) عند درجة ٣٧° م ، لمدة ٥ ساعات .

٧ – تشطف القطاعات فى الماء المقطر .

٨ – تنتقل القطاعات إلى محلول (بوراكس فريسيانيد " رقم ب " عند درجة ٣٧° م ايضا لمدة ١٦ ساعة .

٩ – تشطف القطاعات فى الماء المقطر لمدة ١٠ دقائق .

١٠ – تغطى القطاعات بمادة اللصق " الجلسرين الجيلاتينى ".

النتيجـــة :

– تصبغ الفسفوليبيدات بلون أسود أو أسود مائل للزرقة .

– تصبغ السريبروسيدات بلون أزرق فاتح أو داكن .

تجربـة اثباتيـة :

طريقة بيكر لا ستخلاص الفسفوليبيدات بواسطة الهيماتين :

Baker's Pyridine Extraction Test for Phosphoipids

(يفضل جدا اجراء هذه التجربة حيث تؤكد النتيجة السلبية وجود الفسفوليبيدات فى التحضير السابق .)

الطريقـــة :

١ – يتم تثبيت قطاعات ثلجية من انسجة لم يسبق تثبيتها فى محلول " بوان " مخفف (٥٠ ملليلتر من محلول حامض بكريك مشبع Saturated picric Acid + ١٠ ملليلتر فورمالين + ٥ ملليلتر حامض خليك + ١٥ ملليلتر ماء مقطر .

وذلك لمدة ٣٠ ساعة.

٢ – تغسل القطاعات فى ٧٠ ٪ كحول لمدة ٦٠ دقيقة .

٣ – تغسل القطاعات فى ٥٠ ٪ كحول لمدة ٣٠ دقيقة .

٤ – تغسل بعد ذلك فى ماء جارٍ لمدة ٣٠ دقيقة .

٥ – ينزع الماء من القطاعات بوضعها فى " البيريدين " تغييرتين متتاليتين درجة حرارة الحجرة العادية لمدة ٢٤ ساعة .

٦ – يتم الاستخلاص بوضع القطاعات فى محلول بيريدين ساخن (٦٠°م) لمدة ٢٤ ساعة .

٧ – تغسل القطاعات فى ماء جارٍ لمدة ساعتين .

٨ – ثم تنتقل بعد ذلك الى صبغ الهيماتين الحمضى كما هو موضح فى الطريقة السابقة .

النتيجـــة :

المفروض أن الفسفوليبيدات التى صبغت فى الطريقة السابقة لا تصبغ فى هذه الحالة لان المفروض أنها قد استخلصت (اذا كانت فسفوليبيدات).

طريقة ريجود لتوضيح الليبيدات في القطاعات الشمعية :

Regaud's method for lipids in Paraffin sections

Regauds fluid

تحضير محلول "ريجود " :

* ٣٪ محلول بيكرومات البوتاسيوم ٨٠ ملليلتر
* فورمالين عادى (تجارى) ٢٠ ملليلتر

الطريقـــة :

١ – يتم تثبيت العينات فى محلول " ريجود" لمدة ٢٤ ساعة .

٢ – تعامل العينات بعد ذلك فى محلول ٤٪ بيكرومات البوتاسيوم لمدة ٣ أيام عند درجة ٣٧° م مع تغيير هذا المحلول يوميا .

٣ – تغسل تحت الماء الجارى لمدة ٢٤ ساعة .

٤ – ينزع منها الماء ويتم ترويقها بالطرق المعتادة واعداد قطاعات شمعية سمكها ٥ ميكرونات تقريبا .

٥ – يزال الشمع من القطاعات ، ثم كحول ١٠٠ ٪ حتى تصل الى ٧٠٪ كحول .

٦ – تصنع القطاعات فى محلول " أسود سودان " مذاب فى ٧٠٪ كحول

لمدة ١٠ دقائق .

٧ – يتم ازالة الصبغ الزائد (التمييز) بوضع القطاعات فى ٥٠٪ كحول لمدة دقيقة.

٨ – تغسل القطاعات فى الماء وتغطى بمحلول " أباثى " اللاصق أو " الجلسرين الجيلاتينى " .

النتيجة :

* تصبغ الدهون بلون أزرق مائل للسواد .
* وتصبغ حبيبات الشيخوخة باللون الاسود .

طريقة أسود – سودان –ب ثلاثي الايثيل :

Sudan black - B - Triethyl Phosphate

تحضير المحلول الصبغي :

– أسود سودان – ب	Sudan Black B	جرام واحد
– فوسفات ثلاثى الايثيل	Triethyl Phosphete	٦٠ ملليلتر
– ماء مقطر	Distilled Water	٤٠ ملليلتر

(يضاف الماء المقطر الى الفوسفات ثلاثى الايثيل ، ثم يضاف اسود سودان – ب لهذا المحلول المشترك ويتم التسخين حتى درجة ١٠٠° م لمدة ٥ دقائق مع التقليب المستمر . يتم ترشيح المحلول وهو ساخن ثم يرشح ثانية قبل الاستعمال مباشرة . يحفظ المحلول فى زجاجة محكمة ويرشح دائما قبل الاستخدام).

الطريقة :

١ – يتم إعداد قطاعات ثلجية بعد تثبيتها فى الفورمالين أو احد مشتقاته .

٢ – تنتقل القطاعات إلى محلول ٦٠٪ فوسفات ثلاثى الإيثيل لمدة ٣ – ٥ دقائق .

٣ – تصبغ فى محلول صبغ أسود سودان – ب عند درجة ٢٠° م لمدة ١٠ دقائق

٤ – تنتقل إلى ٦٠ ٪ فوسفات ثلاثى الايثيل لمدة ٣٠ ثانية .

٥ – يغسل بالماء المقطر .

٦ – يمكن إجراء صباغة إضافية بمحلول " مايركارم ألم Mayer's Carmalum " لمدة ٣ دقائق .

٧ – تغسل بالماء المقطر وتغطى بمادة الجليسرين الجيلاتينى اللاصق .

النتيجـــة :

– تصبغ جميع أنواع الليبيدات باللون الأسود .

– تصبغ الانوية باللون الأحمر .

طريقة كبريتات الأزرق نيلي Nile Blue Sulphate Method

تتبع هذه الطريقة للكشف عن الدهون الحمضية أو الأحماض الدهنية وكذلك المتعادلة – وتستخدم قطاعات ثلجية مثبته فى الفورمالين

المحـــاليل :

(أ) محلول ١ ٪ الأزرق النيلي :

* بلورات الأزرق النيلى	Nile Blue	٥٠٠ ملليجرام
* ماء مقطر	Distilled water	٥٠ ملليلتر

(ب) ٠,٢ ٪ أزرق نيلي :

* بلورات أزرق نيلى	Nile Blue	١٠ ملليجرم
* ماء مقطر	Distilled water	٥٠ ملليلتر

(جـ) محلول التمييز : Differentiator

* حامض خليك مركز	Acetic acid (cor.)	٠,٥ ملليلتر
* ماء مقطر	Distilled Water	٥٠ ملليلتر

الطريقـــة :

يتم إعداد قطاعات ثلجية ، ويستخدم قطاعان معا فى كل مرة ويعاملان كما يلى :

١ – توضع القطاعات فى الماء المقطر لمدة قصيرة .

٢ – يصبغ القطاعان فى محلول (١٪ أزرق نيلى) عند درجة ٦٠° م لمدة ٥ دقائق .

٣ – يتم تمييز القطاعان فى محلول التمييز (رقم " ج") لمدة ٣٠ ثانية .

٤ – يغسل القطاعات فى ماء الصنبور .

٥ – يغطى أحد القطاعين بالماء اللاصق " الجلسرين الجيلاتينى " .

٦ – يوضع القطاع الثانى فى محلول (٠٢ , ٪ أزرق نيلى " رقم ب " لمدة ٥ دقائق عند درجة ٦٠° م).

٧ – يغسل القطاع فى ماء الصنبور .

٨– يتم التمييز فى محلول رقم (ج) لمدة ٣٠ ثانية عند درجة ٦٠° م .

٩ – يغسل القطاع بماء الصنبور ويغطى بالمادة اللاصقة .

النتيجـــة :

* يدل ظهور اللون الأزرق فى القطاع الأول على وجود دهون حمضية
* ويدل ظهور اللون الاحمر فى القطاع الثانى على وجود دهون غير حمضية أو متعادلة.

طريقة أوتان لتوضيح الدهون الحمضية (الفسفوليبيدات والدهون المتعادلة (ثلاثية الجليسرولات) والكوليسترول :

Otan's metted for the detecton of Phospholipids, Triglycerids and cholerteral

(تستخدم قطاعات ثلجية مثبتة فى الفورمالين).

المحاليل :

(أ) محلول رباعى اكسيد الاوزميوم : Osmium terroxide solution

* ١٪ رباعى اكسيد الاوزميوم 1% Osmium teltrroxide solution
* ١٪ محلول بيركلورات البوتاسيوم 1% Potassuim perchlorate

(ب) محلول الفا نافثيل امين

وهو محلول مشبع فى ماء مقطر دافىء .

(ملحوظة : يراعى الحرص فى استخدام هذه المادة لانها من المواد المسرطنة).

الطريقـــة :

١ - توضع القطاعات الثلجية (بصورة طافية) على سطح محلول رباعى اكسيد الاوزميوم (أ) فى وعاء محكم الاغلاق به كمية وفيرة من هذا المحلول .

٢ - تغسل القطاعات جيدا بالماء المقطر لمدة ١٠ دقائق .

٣ - تلتقط القطاعات من الماء وتوضع محلول " الفا نافثيل امين رقم ب لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة ٣٧° م .

٤ - تغسل القطاعات جيدا بالماء المقطر لمدة ٥ دقائق .

٥ - تغطى القطاعات بالمادة اللاصقة (الجليسرين الجيلاتينى) .

النتيجـــة :

- تأخذ الفسفوليبيدات اللون البرتقالى - الاحمر .
- ثلاثية الجيليسرولات اللون الأسود .
- الكارليسترول اللون الأسود .

الكشف عن الليبيدات غير المشبعة باستخدام "حامض بيرفورميك - شف " :

Performic acid - schiff Method for demonstrating Unsaturated lipids .

(قطاعات ثلجية غير مثبتة أو مثبتة بالفورمالين)

المحـــاليل :

(أ) حامض بيرفورميك : Performic Acid

* ٣٠٪ حامض بيرفورميك 30 % Performic acid ٤٠ ملليلتر
* ٣٠ ٪ بيرأكسيد الهيدروجين 30 % Hydrogen Peroxide ٤ ملليلتر
* حامض كبريتيك مركز Conc. sulphuric Acid ٥, ملليلتر
* يترك هذا المزيج لمدة ساعة قبل الاستعمال .

(ب) تفاعل شف : Schiff's reagent

الطريقـــة :

١ – يتم إنزال القطاعات حتى تصل الى ماء صنبور عادى .

٢ – توضع القطاعات فى المحلول (أ) لمدة ٣٠ دقيقة

٣ – تغسل القطاعات فى ماء الصنبور لمدة ١٥ دقيقة

٤ – توضع القطاعات فى محلول شف (ب) لمدة ٤٠ دقيقة

٥ – تغسل فى الماء الجارى لمدة ١٥ دقيقة

٦ – ينزع الماء فى سلسلة متصاعدة من الكحولات .

٧ – يتم ترويق القطاعات فى الزيلين

٨ – تلتصق بواسطة الكندا بلسم

الكشف عن الجليكوليبيدات :Detection of Glycolipids

(قطاعات ثلجية غير مثبتة أو مثبتة بالفورمالين)

المحـــاليل :

(أ) حامض بيرأيوديك (٥, ٪) : Periodic Acid (0.5%)

* حامض بيرأيوديك Periodic Acid ٥٠٠ ملليجرام

* ماء مقطر Distilled Water ١٠٠ ملليلتر

(ب) محلول (كاشف) شف . Schiff's reagent

الطريقـــة :

١ – تصل القطاعات حتى الماء .

٢ – توضع القطاعات فى حامض بيرأيوديك ٥ دقائق

٣ – تغسل فى ماء الصنبور ٣ دقائق

٤ – توضع فى محلول (كاشف) شف ٢٠ دقيقة

٥ – تغسل فى ماء الصنبور ٢٠ دقيقة

٦ – تجرى صباغة ارضية أو اضافته فى كارم ألم ٥ دقائق

٧ – تغسل فى ماء الصنبور .

٨ – يتم تميز القطاعات ٥ ثوانٍ

٩ – تغسل فى ماء الصنبور .

١٠ – تلصق باستخدام الجليسرين الجيلاتينى .

النتيجـــة :

– تصبغ الجليكوليبيدات والمخاطيات باللون الاحمر .

– تصبغ الانوية باللون الازرق .

ملحوظات هامة :

عند استخدام هذه الطريقة لتوضح الجليكوليبيدات بصورة خاصة يراعى الآتى :

(١) استخدام طريقة أحمر زيتى Oil Red أو اسود سودان " للتحقق من اماكن تواجد الجليكوليبيدات .

(٢) يجب توحيد الالدهيدات .

وذلك باستخدام الطريقة الآتية :

المحلـــليل :

(أ) محلول أنهيدريد الخليك Acetic anhydride solution

* انهدريد الخليك Acetic anhydride ١٦ ملليلتر

* بيريدين جاف Dry Pyridine ٢٤ ملليلتر

(ب) محلول هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium hydroxide solution

* هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium hydroxide جرام حد
* كحول مطلق Absolute alcohol ٧٠ ملليلتر
* ماء مقطر Distilled water ٣٠ ملليلتر

(جـ) ١ ٪ حامض بيرايوديك 1% Periodic Acid solution

(د) كاشف شف . Schiff's reagent

الطريقـــة :

١ - يتم توصيل ثلاثة قطاعات مرقمة (١- ٣) إلى الماء المقطر .

٢ - يوضع القطاعان (٢,١) فى محلول انهيدريد الخليك لمدة ١ - ٢٤ ساعة ويترك القطاع الثالث فى الماء المقطر .

٣ - يغسل القطاعان (٢,١) فى الماء المقطر - سريعا .

٤ - يوضع القطاع (رقم ٢) فى هيدروكسيد البوتاسيوم ٣٠ دقيقة .

٥ - ثم يغسل هذا القطاع (رقم ٢) فى الماء المقطر .

٦ - تصبغ القطاعات الثلاثة فى محلول شف بالطريقة العادية .

النتيجـــة :

- ظهور نتيجة موجبة فى القطاعين (١ ، ٣) وسلبية فى القطاع (٢) يدل على أن هذه النتيجة الايجابية اثبات لوجود الجليكوليبيدات .

الكشف عن الكوليسترول والمواد المتعلقة به باستخدام تفاعل حامض بيوكلوريك نافثوكينون :

Cholesterol and related substances : Periodic Acid Napthoquinone reaction

(يفضل استخدام الغدة الكظرية)

المحـــاليل :

- ٤ حامض سلفونيك ١:٢ - نافثوكينون

1 : 2 Naphthoquinone 4 - Salphonic

١٢ ملليجرام

- إيثانول	Ethanol	٦ ملليلتر
- ٦٠٪ حامض بيرأيوديك	60% Periodic acid	٣ ملليلتر
- فورمالين مركز	Conc Formaldehyde	٣, ملليلتر
- ماء مقطر	Distilled Water	٢٠٧ ملليلتر

(يتم تحضير محلول " ايثانول - حامض بيركلوريك - الفورمالين - الماء)

أولا ثم يضاف له التفاعل المذكور اولا بعد ذلك .

الطـــريقة :

١ - يتم اعداد قطاعات ثلجية .

٢ - تترك طافية فى الفورمالين ٧ أيام

٣ - تنقل القطاعات إلى شرائح نظيفة وتترك لكى تجف فى درجة حرارة الغرفة .

٤ - توضع فى محلول التفاعل

٥ - يغلى هذا المحلول وبه القطاعات عند درجة ٦٠ : ٧٠°م لمدة ١٠ دقائق

٦ - تغطى القطاعات بحامض بيركلوريك .

النتيجـة :

- يصبغ الكلوليسترول ومشتقاته باللون الأزرق الداكن .

ملحوظات :

١ - يبقى اللون الداكن ساعات قليلة فقط .

٢ - يلاحظ اثناء الغليان تحول لون القطاعات من الأحمر إلى الأزرق الداكن .

الكشف عن الكوليسترول الحر بواسطة « ديجيتونين» :

Detiction of free cholesterol by Digitonin

المحـــاليل :

(أ) ٥٠ ٪ كحول ايثيلي : 50% Ethyl Alcohol

* كحول ايثيلى	Ethyl alcohol	١٠٠ ملليلتر
* ماء مقطر	Distilled Water	١٠٠ ملليلتر

(ب) محلول ديجيتونين : Digitonin solution

* ديجيتونين	Digitonin	٥٠٠ ملليجرام
المحلول (أ)	Solution A	١٠٠ ملليلتر

الطريقـــة :

١ - يستخدم قطاعان ثلجيان ، احدهما للاثبات ، يضع بطريقة أحمر زيتى - أ Oil Red - O

٢ - يوضع القطاع فى المحلول (ب) لمدة ٣ ساعات فى درجة حرارة الغرفة .

٣ - يوضع فى محلول (أ) .

٤ - يترك طافياً على الشريحة .

٥ - يغطى بالجليسرين الجيلاتينى .

النتيجـــة :

- الكوليسترول يعطى انعكاسات ضوئية : (Birefringent)

الكوليسترول له الإنعكاسات الضوئية واستحضرات الكوليسترول ويصبغ بالون الأحمر الزيتى .