

الفصل السابع

هستوكيميائية الإنزيمات

Enzymes Histochemistry

7

الفصل السابع

هستوكيميائية الإنزيمات

Enzymes Histochemistry

مقدمة :

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

ويقدر انه يعرف حوالى ٢٠٠٠ انزيم في الكائنات الحية المختلفة ، يوجد منها حوالى اربعمئة انزيم في خلايا وأنسجة الفقاريات ، وان كان عدد الأنزيمات التي يمكن الكشف عنها هستوكيميائيا أو سيتوكيميائيا في الوقت الحالى لا يتجاوز المائة .

والإنزيمات عبارة عن مواد عضوية ذات تركيب كيميائي محدد يتم تخليقها في الثبات والحيوان وفي الكائنات الدقيقة . ولا تتواجد هذه الأنزيمات بطريقة عشوائية داخل الخلايا ولكنها تستقر في حيزات خلوية معينة Compartments أو في بعض العضيات الخلوية . وهي مترتبة بطريقة معينة داخل اطار التنظيم الجزيئى للخلية والعضيات الخلوية . فعلى سبيل المثال توجد أنزيمات " السيتوكروم المؤكسد (سيتوكروم اكسيداز) (Cytochrome oxidase) و"نازع الهيدروجين السكسينى" (سكسينيك دى هيدروجيناز Succinic dehydrogenase) مرتبطة بأغشية الميتوكوندريا . وهناك العديد من الأنزيمات تقع داخل تراكيب خلوية معينة مثل الأغشية البلازمية والكروموسومات والنويات - وبصورة عامة ، فإن الأنزيمات هى اكبر وأكثر البروتينات تخصصا ، وقد امكن الحصول على العديد منها بصورة نقية متبلرة ، ومن المتعارف عليه أن الأنزيمات تعتبر من اهم منتجات الجينات .

تسمية الانزيمات : Nomenclature of Enzymes

تجرى تسمية معظم الانزيمات باضافة المقطع العجزى أو النهائي Suffix (إيزاز) إلى اسم المادة الخاضعة Substrate التي يعمل عليها هذا الانزيم . من امثلة ذلك انزيمات " الفوسفاتيز Phosphatases وانزيم ارجيناز Arginase وانزيم يوريز Urease " وهى تعمل على استيريات الفوسفات Phosphate Esters والارجنين Arginine واليوريا Urea على التوالى . وفي حالات اخري اعطيت الانزيمات اسماء لا تتبع هذا النظام ومن امثلة ذلك انزيم " بيبسين Pepsin " وانزيم " تريسين Trypsin " .

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

TABLE INTERNATIONAL CLASSIFICATION

OF ENZYMES (CLASS NAMES, CODE NUMBERS, AND TYPES OF REACTIONS CATALYZED)

1. OXIDASE - REDUCTASES (OXIDATION, REDUCTION REACTIONS)

1.1 ACTING ON	CH ---- OH
1.2 ACTING ON	C ---- O
1.3 ACTING ON	C ---- CH
1.4 ACTING ON	CH ---- NH ₂
1.5 ACTING ON	CH ---- NH
1.6 ACTING ON	NADH ; NADPH

2. TRANSFERASES (TRANSFER OF FUNCTION GROUPS)

- 2.1 ONE - CARBON GROUPS
- 2.2 ALDEHYDIC OR KETONIC GROUPS
- 2.3 ACYL GROUPS
- 2.4 GLYCOSYL GROUPS
- 2.7 PHOSPHATE GROUPS
- 2.8 S-CONTAINING GROUPS
- 3. HYDROLASES (HYDROLYSIS REACTION)
- 3.1 ESTERS

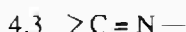
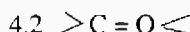
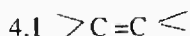
3.2 GLYOSIDIC BONDS

3.2 PEPTIDE BONDS

3.5 OTHER C ---- N BONDS

3.6 ACID ANHYDRIDES

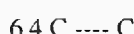
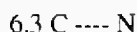
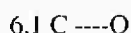
4. LXXSES (ADDITION TO DOUBLE BONDS)



5. LSOMERASES (ISOMERIZATION REACTIONS)

5. IRACEMASES

6. LIGASES (FORMATION OF BONDS WITH ATP CLEAVAGE)



وعلي هذا . ووفقا لهذا النظام تقسم الإنزيمات الي ست مجموعات رئيسية Classes تعطي الارقام من " ١-٦ " (انظر القائمة المرفقة) ويدل الرقم الاول من هذه الارقام علي كل مجموعة من المجموعات الرئيسية التي تحت مجموعات Subclasses ، يدل الرقم الثاني علي كل واحد منها ، وذلك حسب طبيعة التفاعل الذي يتم تخفيده . ثم تقسم كل تحت مجموعة الي تحت تحت مجاميع Sub - subcasses يدل الرقم الثالث علي كل واحدة منها ويشير الرقم الرابع الي الرقم المسلسل الدال على اسم الإنزيم في كل تحت مجموعة .

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

الكشف عن الإنزيمات هستوكيميائياً:

Histochemical Detection of Enzymes

يعتمد الكشف عن نشاطات الإنزيمات هستوكيمياوياً اعتماداً كبيراً علي تفهم وظيفة تلك الإنزيمات كعوامل مساعدة لتفاعل كيميائي معين . ويتخذ ناتج النشاط الإنزيمي كعلامة أو دليل علي تحديد اماكن Sites ومدى نشاط تلك الإنزيمات . على أنه يتعين أن يكون ذلك الناتج

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

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

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

ثالثاً : توفر درجة الحرارة المناسبة لنشاطات الانزيمات وذلك في حدود ٢٧° م .

رابعاً : يراعى توفير الأس الهيدروجيني pH المناسب للانزيمات المختلفة .

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

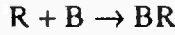
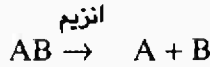
سادساً : يجب الانتدخال الكواشف المساعدة Auxiliary Reagents مع التفاعلات الانزيمية أو أن تعوق تخلل المادة الخاضعة .

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

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

أسس التفاعلات في الطرق الخاصة بالكشف عن الإنزيمات هستوكيميائيا

يمكن تمثيل التفاعلات الانزيمية بالمعادلات التالية :



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

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

ولبعض الانزيمات تخصصية مطلقة لمادة خاضعة شديدة التحديد ، بمعنى انها لاتعمل حتي مع الجزيئات المتشابهة مثل ستريوإيزومر Sterioisomer لنفس الجزيء الاساسي.

- وما سبق يتضح أن أسس الكشف الهستوكيميائي للإنزيمات بصورة خاصة التفاعلات الترسيبية ، ومنها:

١ - التفاعلات الترسيبية بالأيونات المعدنية الموجبة . ومن أمثلتها طرق خومورى Gomori وهي تعتمد على تفلق المادة الخاضعة Splitting of the substrate

٢ - التفاعل الترسيبي في التفلق ويتم الترسيب في نفس الوسط ، وترسيب النواتج في التفاعل الانزيمي يضاف أيونات Ca^{++} , Bb^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{+2}

وكقاعدة عامة فإن تلك الرواسب لا ترى بالمجهر العادي ولكن يمكن رؤيتها بميكروسوب التباين Phase Contrast Microscope أو ميكروسكوب الضوء المستقطب Polarizing Microscope

ملحوظة : المشاهدة لنواتج التفاعل الملون ممكن رؤيته بالمجهر الضوئي باستخدام تفاعل آخر بعد تفاعل الترسيب

أنواع الانزيمات

الانزيمات المحيئة HYDROLASES

وهي الانزيمات التي تعمل كعامل مساعد في اتمام التفاعلات الكيميائية في عمليات الهضم او التحلل مع وجود الماء وذلك علي النحو التالي : $AB + H_2O \rightleftharpoons AH + BOH$ وفي معظم الحالات يسود التفاعل الانشقاعي ويحدث العكس في بعض التفاعلات العكسية ويتكون الماء .

أنواع الإنزيمات المحيئة

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

ESTERASES

١ - انزيمات الاستيريز

GLYCOSIDASES

٢ - انزيمات جليكوسيديز

PEPTIDASES

٣ - انزيمات ببتيديز

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

PHOSPHOMONOESTERASES

أ - فوسفو مونو استيريز

PHOSPHODIESTERASES

ب - فوسفو داي استيريز

CARBOXYLIC ESTERASES

ج- كاربو كسيليك استيريز

SULFATASES

د- سالفاتيز

انزيمات الفوسفاتيز PHOSPHATASES

ويعتمد الكشف الهستوكيمياري عن انزيمات "الفوسفاتيز" وكذلك انزيمات سلفاتيز ، وكولين استيريز علي استخدام طريقة جوموري GOMORI وفيما يلي بعض الامثلة لهذه الانزيمات :

الفوسفاتيزات القلوية ALKALINE PHOSPHATASES

هذه الانزيمات المميّنة هي المسؤولة عن تكسير استيريات ESTERS أو املاح الفوسفات وتشتمل هذه الانزيمات بدورها علي الانواع التالية :

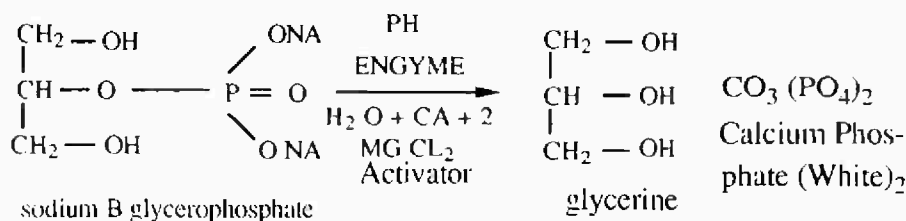
- الفوسفاتيز الاحادي MONOPHOSPHATASES
- الفوسفاتيز الثنائي DIPHOSPHATASES
- الفوسفاتيز الثلاثي TRIPOSPHATASES

والفوسفاتيز الاحادي :

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

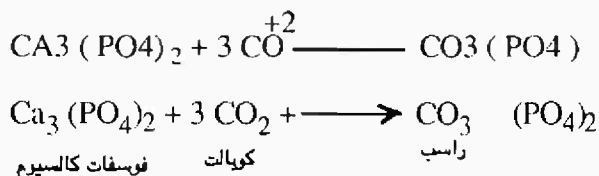
أولا : الانشقاق والترسيب

SPLITTING AND PRECIPITATION REACTION PH_9



وينتهي بتكوين أو ترسيب مادة بيضاء هي فوسفات الكالسيوم

ثانيا : التفاعل الاول للتحويل : FIRST TRANSFORMATION REACTION :

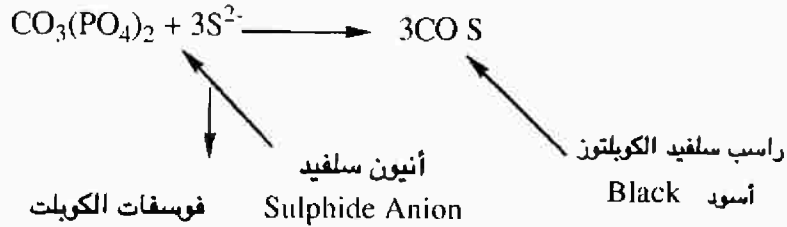


COBALTOUS PHOSPHATE

راسب فوسفات الكوبالت

ثالثا : التفاعل الثاني للتحويل (وسط طازج)

SECOND TRANSFORMATION REACTION



وواضح ان ذلك يؤدي الي تكوين راسب سلفيدكوبالتوز الاسود .

وجدير بالذكر ان التفاعلات السابقة هي التي تحدث عند الكشف عن الفوسفاتيز القاعدي بطريقة جوموري . وقد كان جوموري ١٩٣٩ وتاكاماسو TAKAMATSU ١٩٣٩ أول علماء يكشفون عن الفوسفاتيز القاعدي (القلوي) هستوكيمائيا ، وتعتمد هذه الطريقة علي ترسيب فوسفات الكالسيوم في اماكن نشاطات ذلك الانزيم وذلك عند تحضين IN-CUBATION+ القطاعات مع ملح فوسفاتي عضوي (كمادة خاضعة) في وجود ايونات الكالسيوم CA عند الاس الهيدروجيني PH₉

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

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

SECTIONS في خليط يحتوي علي ملح الفوسفات العضوي وايونات الكالسيوم Ca^{++} وكذا ايونات المغنسيوم Mg^{+} وذلك عند الاس الهيدروجيني PH9 وعند درجة حرارة $37^{\circ}C$ وعندئذ يقوم الانزيم بشق ذلك الملح وفصل مجموعة الفوسفات عنه ، ثم يترسب الفوسفات في القطاعات ويولي ذلك تحضين القطاعات في محلول طازج من ٨٪ نترات الكوبلت COBALT NITRATE الذي يعمل بدوره علي تحويل فوسفات الكالسيوم الي فوسفات الكوبلت.

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

طريقة كالسيوم - كوبلت للفوسفاتيز القلوي (طريقة جوموري) :

THE CALCIUM - COBALT METHOD FOR ALKALINE PHOSPHATASE (GOMORI)

وهي تصلح للقطاعات الشمعية والقطاعات المجمدة .

أولا : بالنسبة للقطاعات الشمعية :

- ١- ازالة الشمع من القطاعات بواسطة الزيلول .
- ٢- تمرر في سلسلة هابطة من الكحولات حتي الماء المقطر .
- ٣- يتم تحضين القطاعات لمدة تتراوح بين نصف الي ١٦ ساعة عند درجة $37^{\circ}C$ في الوسط التالي :
- ١٠ مليلتر من محلول ٣٪ صوديوم بيتاجليسروفوسفات
- + ١٠ مليلتر من محلول ٢٪ داي ايثيل باربيتيوريت الصوديوم NA DIETHYL BARBITURATE
- ٢٠ مليلتر ٢٪ كلوريد الكالسيوم .
- ١ مليلتر ٥٪ كبريتات المغنسيوم .
- ٤- تغسل القطاعات في الماء الجاري .
- ٥- توضع القطاعات في ٢٪ نترات الكوبلت (٣-٥ دقائق) .

- ٦- تغسل في ماء مقطر .
- ٧- تنتقل القطاعات الي محلول مخفف من الكبريتيد الامونيوم لمدة دقيقة - دقيقتين .
- ٨- تغسل القطاعات بالماء ويتم صباغتها بالايوسين (إذا أريد ذلك) لمدة ٥ دقائق .
- ٩- ينزع الماء بالكحول ويتم الترويق بالزيلول ويوضع علي القطاعات الكندا بلسم ويتم تغطيتها بأغطية زجاجية نظيفة .

النتيجة :

تظهر اماكن نشاطات انزيم الفوسفاتيز القلوي باللون الاسود أو البني الداكن .

ثانيا : القطاعات المجمدة : FROZEN SECTIONS

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

- ٢- تجفف في الهواء عند درجة حرارة الغرفة لمدة ١-٢ ساعة .
- ٣- يتم تحضين القطاعات في المادة الخاضعة لمدة ٤ ساعة .
- ٤- تغسل بالماء ثم توضع في ٢٪ محلول الكوبلت وتعامل بمحلول كبريتيد الامونيوم الاصفر .

- ٥- تصبغ - عند اللزوم - في ١٪ ايوسين مائي لمدة ٥ دقائق .
- ٦- تغسل القطاعات بالماء .
- ٧- تعطي القطاعات بالمحلول اللاصق "جلي الجلسرين GLYCERINE GELLY" توضع عليها اغطية زجاجية نظيفة ويتم فحصها في الحال .

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

طريقة التترازوليوم :

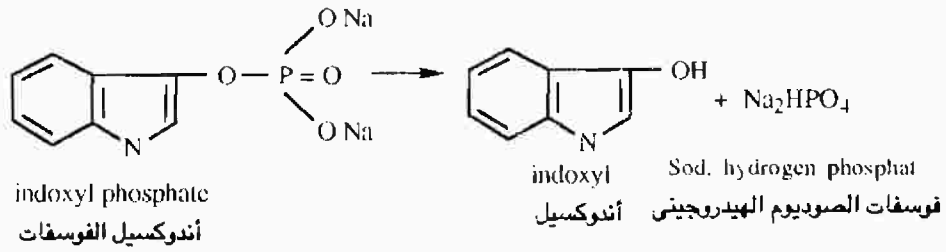
TETRAZOLIUM METHOD CMC GADEY (1970)

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

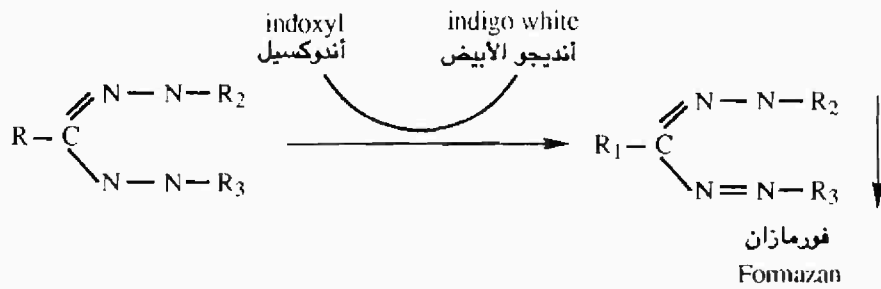
خاضعة للكشف عن انزيمات الفوسفاتيز والجلوكوسيديز وكاربوكسيليك استيريز وكذلك الببتيز

الفوسفاتيز القلوي :

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



٢- التفاعل الثاني (اختزال ملح التترازوليوم)



الطريقة : الوسط الحاضن : INCUBATION MEDIUM

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

BROMO-4 CHLORO3 INDOXYL PHOSPHATE - TOLUIDENE SALT

ب - النيترويترازوليوم الازرق BT, NT

ج - يذاب في داي ميثل فورماميد A-٢ N,N DIMETHYL FORMAMIDE (مليلتر)

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

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

هـ - اخلط جيدا ثم رشح حوالي ١٠ ml3

٢- التحضين INCUBATION

لمدة ٥-٣٠ دقيقة عند درجة حرارة ٣٧°م

٣- اسكب الوسط الحامض :

٤- اغمس القطاعات في ماء مقطر ثم شعها في ٤٪ فورمالدهيد لبضع ساعات ثم

تغمس في ماء صنبور ، ثم الماء المقطر وبعد ذلك تغمر في محلول الطمر الجلسرين

جليلي " او محلول اباثي " APATHY SYRUP

النتيجة :

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

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

الطريقة الثالثة : ازدواج الازو : AZO COUPLING (SIMULTANEOUS)

وهي تصلح للقطاعات الشمعية والقطاعات المجمدة .

الطريقة :

يتم اعداد وسط التحضين كالآتي :

- ملح ألفا نافتثيل فوسفات الصوديوم α -NAPHTHYL PHOSPHATE
SODIUM أو نافتثيل حامض الفسفوريك NAPHTHYL PHOSPHORIC ACID

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

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

- يتم تحضين القطاعات لمدة ٢-٦ دقائق عند ٣٧ ° م

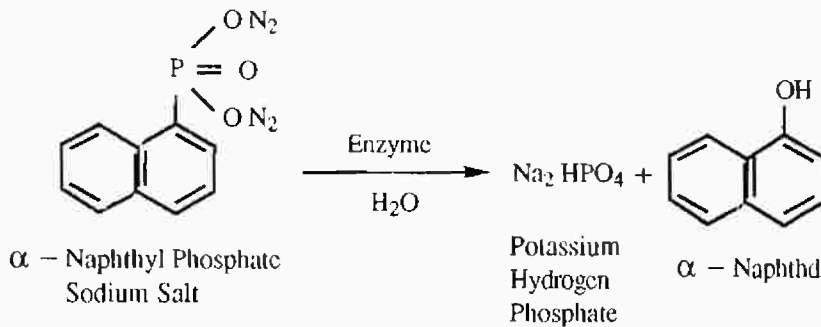
- ازح محلول التحضين واغمس القطاعات في الماء المقطر ثم توضع في ٤٪ فورمالين
لعدة ساعات عند درجة حرارة الحجرة مع تقليل فقاعات الغازات في القطاعات .

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

النتيجة : تظهر اماكن نشاطات الانزيمات كما يلي :

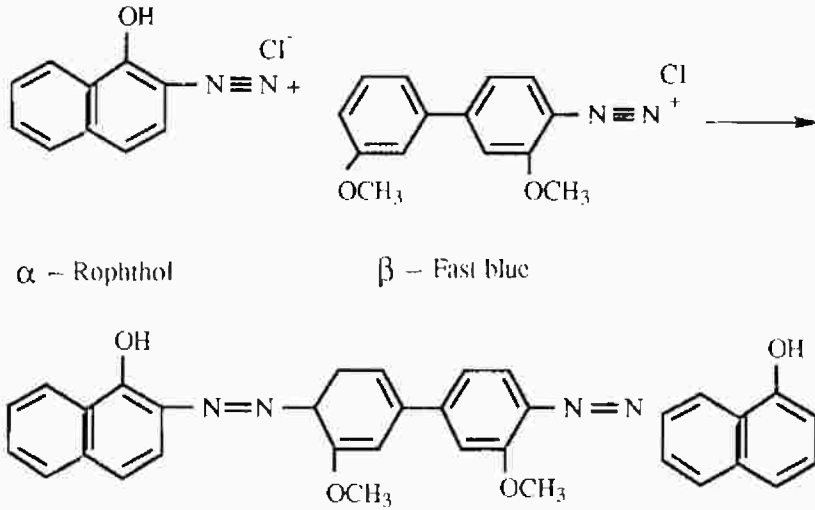
- باللون الاسود عند استخدام ازرق السريع

- اسود بني مع احمر السريع .



١ - التفاعل الابتدائي (التأكسيري الانزيمي)

٢ - التفاعل الثانوي (التفاعل الازدواجي)



أماكن تواجد انزيم الفوسفاتير القلوي :

يتواجد انزيم الفوسفاتير القلوي بصورة خاصة في أغشية الخلايا في مناطق الحواف الفرغونية brush borders في الانيبوبات الكلوية وفي الطلائية الداخلية للشرابين الصغيرة وكذلك الخلايا الكبدية وخلايا البروستاتا والطحال بالإضافة الي موجبة الخلايا والانسجة الاخرى .

الفوسفاتيز الحامضي

ACID PHOSPHATASE

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

Monoester of phosphoric acid + H₂O → Alcohol (phenol) + orthophosphate

ملح احادي الارثوفوسفوريك + ماء $\xrightarrow{\text{الإنزيم}}$ (كحولات أو فينولات) + ارثوفوسفات

أو تنتقل الفوسفات من كحول الي آخر .

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

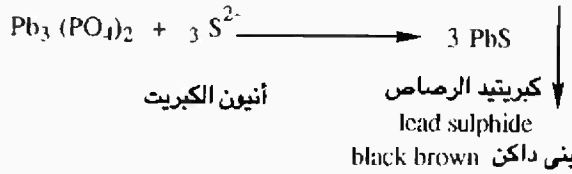
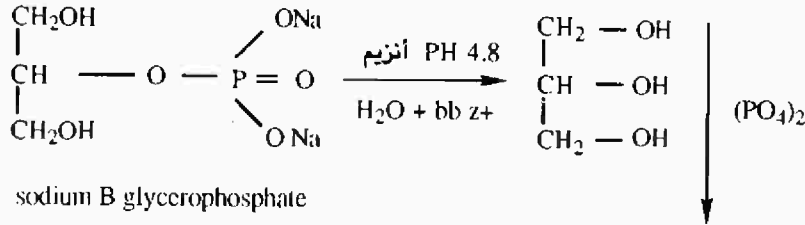
طرق الكشف عن الفوسفاتيز الحامضي :

المعروف أن هذا الانزيم يعمل بفاعلية في الوسط الحامضي عند $\text{pH} 5$ وان كانت توجد منه عدة انواع تعمل عند درجات متفاوتة من الاس الهيدروجيني (في وسط حامضي) ويشبه هذا الانزيم انزيم الفوسفاتيز القلوي في تفاعلاته .

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

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

وفي هذه الحالة تستخدم ذرات الرصاص Lead nitrate مع المادة الخاضعة "فوسفات الجلسرول $\beta\text{-Glycerophosphate}$ وذلك لان فوسفات الرصاص تترسب ولا تنوب في الوسط الحامضي عند $\text{pH} 4.8$ أو $\text{pH} 5$ كما أن فوسفات الكالسيوم تنوب ولا تترسب في الوسط الحامضي ولهذا لاتصلح في ترسيب الفوسفات . وفي هذا التفاعل يتحول راسب فوسفات الرصاص بواسطة كبريتيد الامونيوم الاصفر الي كبريتيد الرصاص LEAD SULPHIDE وهو راسب بني داكن .



طريقة الكشف :

الوسط الحاضن :

١- أدنيوزين أو أدنيوزين O ٢٠ ملليجرام ملح الصوديوم

التحضير :

١٠٠ - ١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة ، أو ٢٧°م وذلك بعد تثبيت الأنسجة في

الالديهيد

ما بعد التحضين :

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

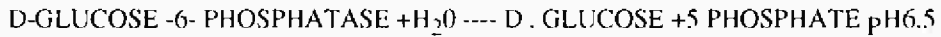
النتيجة :

تظهر اماكن نشاطات الانزيمات باللون البني القاتم

٢- انزيم جلوكوز ٦- فوسفاتيز

pH 6.5 GLUCOSE -6- PHOSPHATASE

يقوم هذا الانزيم بدور فعال في التفاعل الاتي :-



القطاعات المستخدمة مثبتة في الاسيتون المبرد وقطاعات شمعية أو فورمالية في

فوسفات متعادل مبرد أو فورمالين وقطاعات مجمدة .

الطريقة :

١- يتم تحضير القطاعات بالطريقة المختارة .

٢- تحضن القطاعات عند ٣٧°م لمدة ١٥-٢٠ دقيقة في محلول طازج من (٠,٠١

مولار صوديوم بيتا جليسيروفوسفات في ١٠٥ مولار خلات ACETATE محايد

pH5.0 وخلات الرصاص LEAD ACETATE محتويات علي ٠,٠٠٤ مولار

نترات الرصاص).

٣- تغسل القطاعات لمدة دقيقتين ثم تغمس في محلول مخفف من كبريتيد الامونيوم

الاصفر لمدة ١-٢ دقيقة .

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

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

النتيجة :

تظهر مناطق نشاطات انزيم الفوسفاتيز الحامض علي هيئة راسب كبريتيد الرصاص

طريقة نترات الرصاص المحورة للفوسفاتيز الحامضي :

(تاكوشي وتانو)

الطريقة :

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

(حجمين من ٢٪ محلول بيتا جليسيروفوسفات) .

١ جم او مولار خلاات الحديد pH5.0

١ جم ٢٪ خلاات الرصاص Lead acetate

٢ ملليجرام ١-٣ ٪ كلوريد المغنسيوم Mg cl2

٢ - اغمس في ماء مقطر .

٣ - تنقل القطاعات الي محلول نترات الفضة النشاردي Ammoniel Agno3 لمدة ٢

دقائق (وذلك باضافة ٢٨٪ من أو نشادر نقطة بنقطة الي ٥٪ محلول مائي نترات

الفضة حيث يتم نوبان الراسب) .

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

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

الجليسرين .

النتيجة :

تظهر مناطق نشاطات هذا الإنزيم علي هيئة راسب بني .

الطريقة الثانية :

ازدواج الأزو للكشف عن الفوسفاتيز الحامضي

AZO COUPLING FOR ACID PHOSPHATASE

(يتم تحضير القطاعات بواسطة الميكروتوم منخفض الحرارة أو فورمالينمبرد . ويمكن

استخدام القطاعات دون تحميلها علي شرائح .

توضع القطاعات في المحلول الخاص لمدة ٢-٥ دقيقة . ويتكون هذا المحلول من ثلاث

مجاميع من المحاليل :

أ - صوديوم الفنافثيل حامض الفوسفات ٤ مجم / مل

SODIUM α - NAPHTHYI ACID PHOSPHATE

في خلاات / الفيرونال Veronal Acetate متعادل الأس الهيدروجيني (٩.٧١٤ جم)
خلاات الصوديوم + ٣ ماء مقطر + ١٤.٧١٤ نترات الصوديوم في ماء مقطر خالٍ من ثاني
أكسيد الكربون حتي تصل الي ٥٠٠ مل 2N HEL وتسخن بهدوء ، ويتم الترشيح بعد أن
يبرد المحلول .

ب - ٢ جم كلوريد بارا روزانلين تضاف الي ٥٠ مل حامض هيدروكلوريك عياري .

ج - ٤٪ نترات الصوديوم SODIUM NITRITE

والمحلول المستخدم كمحلول خاص هو كما يلي :

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

وتبع ١.٦ مل من محلول ملح زونيم Zonium Salt Sol ويحضر المحلول الاخير
طازجا بخلط كمية متساوية (٨مل) من المحلول في أنبوبة اختبار ، ويكون الأس الهيدروجيني
للسوسط pH5 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم ويرشح المحلول في أنبوبة الصبغة .

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

النتيجة : تبدو اماكن نشاط الانزيم مصبوجة باللون الأحمر .

طريقة انتاج الازو داي بعد حدوث التفاعل

للكشف عن الفوسفاتيز الحمضي

POST COUPLING METHOD For ACID PHOSPHATASE

عن دوتنبرج وسلجمان (AFTER DUTENBURG & SELIGMA)

تحضير المحلول الخاضع SUBSTRATE SOLUTION

اذب ٢٥ ملجم من مادة Sodium-6-Benzoyl - 2-Naphthyl Phosphate في ٨٠

سم^٢ من الماء المقطر ثم اصف ٢٠ سم^٢ من ٠.٥ عياري منظم خلاص أسه الهيدروجيني (٠.٥) اصف ٢٪ من كلوريد الصوديوم الصلب لجعل المحلول زائد التركيز Hypertonic والقطاعات المثبتة في الجلونارلاهديد يمكن تعويمها حره Free Floating .

٣- ما بعد التحضين :

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

النتيجة :

يكون دليل نشاط الانزيم بنياً قاتماً .
ملحوظة : عملية نزع الماء والترويق غير مستحبة حتى لاتؤثر علي كبريتيد الرصاص.

الكشف عن الفوسفاتيز الحمضي باستخدام NAPHTHOLA B

طريقة برستون BriSTONE لعام ١٩٥٨

التي طورها باركا BAARKA عام ١٩٦٠

تحضير المحاليل :

١- محلول المادة الخاضعة : Substrate Solution

- فوسفات نافثول Naphthol A2-B1 Phosphate ٥٠ ميللجرام

- دايميثيل فورماميد Dimsthyl Formamid ٥ سم^٢

٢- المحلول المنظم : BUFFER SOLUTION

- خلّات صوديوم Sodium Acetate ١.١٧ جم
- باربيتون الصوديوم Sodium Barbitons ٢.٩٤ جم
- ماء مقطر Distilled - Water ١٠٠ سم^٣

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

- نيتريت الصوديوم Sodium Nitrite ٤٠٠ ميللجرام
- ماء مقطر Distilled - Water ١٠ سم^٣

٤- محلول بارواروز انيلين - يدكّل :

- هايدروكلوريد بارواروزنيتين Pararosamitin Hydrochloryied ٢ جم
- ٢ عيارية حمض يد كل 2N-Tlydre Chloric Acid ٥٠ سم^٣

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

تحضير محلول التحضين : INCUBATING MEDIUM

- محلول (١) ٠.٥ سم^٣
- محلول (٢) ١.٥ سم^٣
- محلول (٣) ٠.٤ سم^٣ يخلطان معا قبل الاستعمال مباشرة.
- محلول (٤) ٠.٤ سم^٣ ثم يضاف الخليط الي محلول التحضين .
- ماء مقطر ٦.٥ سم^٣ بعد دقيقتين من اجراء الخلط .

ويراعي ان تكون درجة الاس الهيدروجيني لمحلول الحضن بين ٤.٧ - ٥ وان لم يكن ، فيستعمل محلول او عياري هيدروكسيد صوديوم لضبط درجة الاس الهيدروجيني ،

وفي جميع الحالات رشح المحلول .

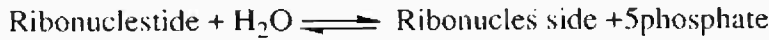
خطوات العمل :

- ١ - يتم الحصول علي قطاعات بالكريوستات لعينات مثبتة .
- ٢ - ضع القطاعات في محلول التحسين عند درجة ٣٧ م لمدة ١٥-٦٠ دقيقة .
- ٣ - اغسل القطاعات في ماء مقطر .
- ٤ - اصبغ أنوية الخلايا في محلول ٢٪ أخضر الميثيل .
- ٥ - اغسل القطاعات في ماء جارٍ
- ٦ - غط القطاعات في الجلسرين جيللي ويمكنك ايضا ان تنزع الماء بسلسلة متصاعدة من الكحول ثم تروق في الزيلول ثم تغطي بصمغ .

النتائج :

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

نيوكليوتيديز NUCLETIDASE



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

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

طريقة الكشف عن الانزيم :

الوسط الحامض

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

الأس الهيدروجيني ٧.٢ () .

- ٥.٢ م (مولاري) ترس ماليت pH7,2 ٢٠ مليلتر .

- ٢٪ نيترات الرصاص ٢ مليلتر .

- ٢.٥٪ كبريتات مغنسيوم ٥ مليلتر .

- ماء مقطر ٢ مليلتر .

اخلط جيدا واترك المحلول بعض الوقت ثم رشح .

التحضين : Incubation

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

مابعد التحضين :

- اسكب سائل التحضين .

- أغمس مرة أو مرتين في ماء مقطر .

- ضع القطاع في ٠.٥٪ أو ١٪ كبريتيد الأمونيوم لمدة دقيقتين .

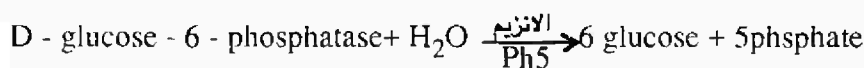
- ضع القطاع في جيلي الجلوسيرين أو صمغ الأباثي (عملية نزع الماء غير مستحبة حتي لا يتغير لون الرصاص) .

النتيجة : تعرف اماكن نشاطات الانزيم باللون البنى الداكن .

انزيم جلوكوز-٦- فوسفات

GLUCOSE - 6 - PHOSPHATASE

يقوم هذا الانزيم بنور أساسى فى التفاعل التالى :



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

المثبتات : فورمالديهيد متعادل - فورمالديهيد كالسيوم .

طريقة المعدن الثقيل Heavy Metal

(شيكوين Chiquoine ١٩٥٢)

المحورة بواسطة واشستين وميسيل ١٩٥٦

Wachstein & Meisel, 1956

للجلوكوز سداسي الفوسفات

الوسط الحاضن :

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

-٢, مولاري M ترس ماليت المحايد

٢٠ مل

0.2 Mtris malite buffer Ph. 6.5

- ٣٪ نترات الرصاص

٣ مل

3% Lead nitrate

٧ مل

- ماء مقطر

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

التحضين :

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

مابعد التحضين :

- يزاح الوسط الحاضن

- تغمس القطاعات في ماء مقطر لمدة دقيقة تقريبا .

- ينقل القطاع الي ٥.٠٪ - ١٪ محلول كبريتيد الأمونيوم الأصفر لمدة دقيقتين .

- يغمس في ماء مقطر .

- يغمر في محلول جيلي الجلسرين أو الالباثي .

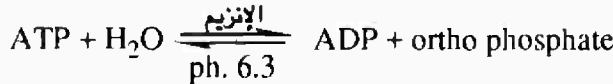
النتيجة : دليل نشاط الإنزيم عبارة عن راسب بني داكن .

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

أدينوزين ثلاثى الفوسفات

Adenosine triphosphatase (ATPase) pH.7.5-9

يعمل هذا الانزيم كوسيط في التفاعل التالي :



والمعروف أنه يوجد العديد من الأدينوزين ثلاثى الفوسفات ، أهمها :

أ - ميوسين أدينوزين ثلاثى الفوسفاتيز Myosin ATPase وهو يتم تنشيطه بواسطة

أيونات الكالسيوم ويعمل عند الأس الهيدروجيني . pH9

ب - أدينوزين ثلاثى الفوسفاتيز في أغشية الخلايا ويتم تنشيطه بواسطة أيونات

الصوديوم أو البوتاسيوم كما يتطلب وجود أيونات المغنسيوم ، وهو يعمل عند

الأس الهيدروجيني pH.7.5

وهذه الانزيمات مستولة عن تكسير الأدينوزين ثلاثى الفوسفات ATP . ويعني هذا

أنهما يميّنان الروابط الفوسفاتية الغنية بالطاقة بما ينتج عنه إطلاق هذه الطاقة ، كما يلعب

فيوسين أدينوزيم ثلاثى الفوسفاتيز دورا هاما في انقباض العضلات كما يلعب الأدينوزين

ثلاثى الفوسفاتيز المتواجد في أغشية الخلايا دورا أساسيا في عملية انتقال أيونات

الصوديوم والبوتاسيوم خلال أغشية الخلايا .

ج - أدينوزين ثلاثى الفوسفاتيز المتواجد في الميتوكوندريا وهو يعمل عند معدلات

مختلفة للأس الهيدروجيني ، ويلزم تكسير الميتوكوندريا للكشف عن هذا الإنزيم وذلك بواسطة

عمليات التجميد ومعاملة الخلايا بمحاليل منخفضة التركيز .

طريقة الكالسيوم - كويات :

(باديكيولا وهرمان 1955 pH.9 Padykula and Herman)

لأدينوزين ثلاثي الفوسفات المتواجد في العضلات

الوسط الحاضن :

- ملح صوديوم أدينوزين ثلاثي الفوسفات ٧٥ مجم
- أذب في ماء مقطر ٢٠ مل
- ثم اضبط الأس الهيدروجيني عند pH9.2 بواسطة هيدروكسيد الصوديوم NaOH
- ٢٪ باربيتال الصوديوم ١٠ مل
- ٢٪ كلوريد الكالسيوم الخالي من الماء (Anhydrous Ca Cl₂) ٥ مل
- ماء مقطر ١٥ مل
- ثم رشح الكمية الكلية ٥٠ مل

التحضير : لمدة ١٥-٦٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة أو ٣٧°م

مابعد التحضير :

- اسكب الوسط الحاضن .
- اغمس القطاع جيدا في ماء مقطر لمدة دقيقة .
- ضع القطاع في ١-٢٪ كلورايد أو خللات الكوبالت Cabalt chloride or cobalt acetate وذلك لمدة خمس دقائق .
- اغسل في ماء جار لمدة دقيقة - دقيقتين .
- ضع القطاع في ١-١٪ محلول كبريتيد النشادر الأصفر .
- اغسل في ماء جاري لمدة ١٠ دقائق .

- اغمس القطاع في جيلي الجليسرين أو محلول أباتي .

النتيجة : يدل ظهور الراسب الأسود على أماكن نشاط الإنزيم .

طريقة ثانية : (طريقة ملح الرصاص)

Washstein and Meisel, 1957 واشستين وميسل

(pH.7.2)

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

الوسط الحاضن :

٢٠ مجم - ملح الصوديوم للأدينوزين ثلاثي الفوسفات

أَذْبُ فِي مَاءٍ مَقْطَرٍ ٢٠. مِلْ

٢- ٢٠ مل (0.2M) ترس مالت المحايـد أو المنتظم (pH.7.2)

٢ - فقرات الرصاص

٥ مل - ٢.٥ ٪ كبريتات المغنسيوم أو ٢٪ كلوريد المغنسيوم

٢ مل - ماء مقطر

اخلط ثم رشح ٥٠ مل

التحضير :

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

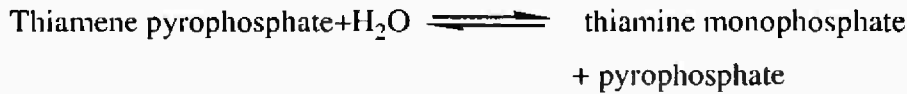
ما بعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن
- اغمس لمدة دقيقة في ماء مقطر .
- ضع القطاع في ١/٨ محلول كبريتيد النشادر الأصفر لمدة دقيقة .
- اغمس في ماء مقطر .
- اغمر في محلول جيلي الجليسرين أو محلول أباتي .
- النتيجة :** ظهور اللون البني الداكن دلالة علي وجود الإنزيم .

ثيامين بيروفوسفاتيز

Thiamine Pyrophosphatase

يقوم هذا الإنزيم بدور العامل الوسيط المساعد في التفاعل الآتي :



يستفاد بطريقة الكشف عن هذا الإنزيم توضح جهاز جولجي في الخلايا دون الحاجة إلي استخدام طرق الفضة والأوزيوم المعتادة في تلك الحالات بما يوفر النفقات والجهد والصعوبات وذلك لأن جهاز جولجي له علاقة وثيقة بهذا الإنزيم ، ويشاهد نشاط هذا الإنزيم بصورة خاصة في الخلايا العصبية والطلائية والبربخ والغدد الصماء .

طريقة الكشف عن الإنزيم :**طريقة الرصاص (نوفيكوف وجولد فيشر)**

Novikoff and Goldfischer, 1961

(pH.7.2)

الوسط الحاضن :

- ثيامين بيروفوسفيت (تتراهيدريت) تذاب في ماء مقطر ويضبط عند pH 7.2 ٢٤
مجم بواسطة هيدروكسيد الصوديوم NaOH ٢.٥ مل
- ٠.٢ ترس ماليت المحايد pH 7.2 ١٤ مل
- ١٪ نترات الرصاص ٢ مل
- ١٪ كلوريد ماغنسيوم خالي من الماء MgCl₂ ٥ مل

اخلط ورشح

التحضين :

من ١٠-١٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الحجرة ٢٧° م .

مابعد التحضين :

أسكب الوسط الحاضن .

- اغمس مرتين لمدة دقيقة في ماء مقطر .

- ضع في ٥-٠.١ كبريتيد النوشادر الأصفر .

- اغمس في ماء مقطر .

- اغمر في جيلي الجلوسرين .

النتيجة :

يستدل علي مكان ونشاط الانزيم باللون البني الداكن .

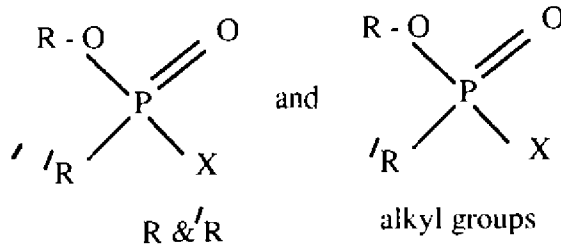
الإنزيمات الممينة الكربوكسيلية

CARBOXYLIC HYDROLASES

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



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



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

الاستيريز غير النوعية Non specific esterases وهي تتضمن بدورها الانواع الآتية :

١ - الاستيريزيس الكريوكسيلية Carboxy esterases

وهي :

أ- أريل استيريز Aryl esterase

وتشتمل :

A - esterase

Aromesterase

Aryl esterase hydrolase

ب - أسيتيل استيريز

وتشتمل علي :

C-esterase

Acetic acidesterhydrolase

وتوجد هذه الإنزيمات في الشبكة الاندوبلازمية - الليسوسومات ، واحتمالا في الميتوكوندريا والهابالوبلازم خاصة في الكبد والكلية والفانقي .

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

طريقة الكشف عن الاستيريزات غير النوعية :

طريقة الازدواج المتزامن للأزومع خلاات الفانافثيل

Azo Coupling with α - naphthyl acetate

Davis and Ornstein (1959).

- يتم إعداد القطاعات المجمدة بالكربوستات .

- الوسط الحاضن Incabation medim

٢.٨٪ فوسفات الصويوم الثنائي ٥٠ مل

هسكازونيم ب - روزانلين

١,٥ - ٤,٥ مل hexazonium P- rosaniline

امزج جيداً واضبط الأس الهيدروجيني عند ٦,٥ - ٧,٤

١٪ الفانافثيل استيت مذاب في الاستون ١-٠.٥ مل

امزج جيداً ورشح

مابعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن ثم اغمس في ماء مقطر .
 - ضع القطاعات في ٤٪ فورمالديهيد لبضعه ساعات عند درجة حرارة الحجرة
 - اغمس في ماء الصنبور ثم أضع بالهياتوكسلين أو أحمر السريع
 - تتم التغطية بمحلول أباتي .
- النتيجة :** يستدل على نشاط الانزيم باللون البنى

الكولين استيريزات

Cholinesterases

تقوم هذه الإنزيمات بدور الوسيط في التفاعلات التالية :



وأيضاً :



وكقاعدة عامة تنقسم الكولين استيريزات الى :

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

إسيتيل الكولين استيريز المحدد

B-Pseudo cholinertease (non specific cholinerterase)

وهو يعرف بأنه كولين استيريز غير الحقيقي أو الكاذب .

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

ويعمل الأسيتيل كولين استيريز عند الأس الهيدروجيني 7-8 pH والكولين استيريز عند 8-8.5 pH

ويستخدم لهذه التحضيرات قطاعات الكريوستات المثبتة في الفورمالين .

طريقة "ثيوكولين للكشف عن الكولين استيريز"

Thiocholine method for choline esterase

(Kamnovsky and Roots, 1964)

النوسط الحاضن :

- بيوتيل أو أسيتيل نيوكولين أيوديد ١٢.٥ مجم

Butyl thiocholine iodide

- تذاب في ماء مقطر ٢.٥ مل

- ٨٢.٠٪ خلات الصوديوم (Sod. acetate) ١٥.٨ مل

- ٦.٠٪ حامض (Acetic acid) ٠.٥ مل

- ٩٤.٢٪ سترات الصوديوم Sod. citrate ١.٥ مل

- ٧٥.٠٪ كبريتات النحاس Copper sulphate ٢.٥ مل

- ١٦٥.٠٪ سيانيد حديدك البوتاسيوم K Ferricyanide ٢.٥ مل

about 25 ml

ويكون لون المحلول أخضر باهتاً والأس الهيدروجيني 5-5.5 pH

التحضير :

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

مابعد التحضير :

- يسكب الوسط الحاضن .
- تغمس القطاعات في الماء المقطر .
- يتم تغطيتها بمحلول جيلي الجليسرين أو آبائي .
- النتيجة :** يدل اللون الاحمر البني علي أماكن وجود الإنزيم .

الكشف عن الأسيتيل كولين استيريز**بطريقة ثيوكولين الرصاص - سيانيد الحديدوز**

Thiocholine - Lead Ferrocyanide method

(Eranko, Käoelle and kaisanen1957)

تحضير المثبت :

٥٠٠ مل فورمالين (٤٠٪ فورمالديهيد) في ٥٠ مل كريس - رنجر - كالسيوم (ويتم

تحضيره كمايلي :

- ١٠٠ مل ٠.٩٪ كلوريد صوديوم Nacl

- ٤ مل ١.١٥٪ كلوريد بوتاسيوم Kcl

- ١.٢٧ مل ١.٢٢٪ كلوريد كالسيوم $Ca\ cl_2$

- ١.٠٠ مل ٢.١١٪ فوسفات بوتاسيوم KH_2PO_4

- ١.٠٠ مل ٣.١٢٪ كلوريد ماغنسيوم $Mg\ cl_2.6H_{10}$

- ٢.٠٠ مل N . HCL

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

الوسط الحاضن :

- يجب أن يكون الماء المقطر المستخدم مغليا لمدة ساعة قبل الاستعمال .
- أضف المواد المذكورة بالترتيب الموضح بين المزج بدقة بعد كل إضافة .
- ترس الخللات المحايد Tris-acetate buffer عند pH6.00 وذلك بإضافة ٢ مل M-acetic acid الي ١٠ مل ٢ M.tris ، ويجب ترشيح محلول خللات الرصاص قبل الاستعمال .
- ويتم ٢٢ مجم اسيتيل كولين أيوديد في ١.٢ مل ماء وإضافة ٤ ، مل من ١ M.lead acetate

ويؤخذ المحلول الرائق بعد عملية الطرد المركزي .

- | | |
|---------|------------------------------------|
| ٤.٩ مل | - ماء مقطر |
| ٤ مل | - Tris acetate buffer (0.17M) |
| ٠.٥ مل | - خللات الرصاص (0.1M) lead acetate |
| ٠.٥ مل | - (0.01M) Potassium ferricyanide |
| ٠.٦ مل | - (0.05M) Acetyl thiocholine |
| ٠.٠١ مل | - (0.05 M) Potassium ferricyanide |

تضاف المادة الاخيرة لتشبيح الوسط بـسيانيد حديدوز الرصاص مكونا راسباً أبيض مصفراً وبعد الترشيح يبرد المحلول في الملح .

التحضير :

- إغمس القطاعات في ٣ تغييرات في ١٧, Mtris acetate buffer لتر أيونات الفوسفات .

- ضع القطاعات في الوسط الحاضن لمدة ١٠-٦٠ دقيقة عند درجة الصفر .

- اغمس في ٣ تغييرات في الماء المقطر عند درجة الصفر .

- انزع الماء وضع في وسط صناعي Synthetic resin .

- عامل بمحلول مخفف من كبريتيد النوشادر المضاف اليه أو M.lead acetate

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

الطريقة المباشرة للكشف عن الاستيل كولين استيريز

(Karnovsky and Roots, 1964)

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

التحضير : توضع القطاعات لمدة ٦٠-١٢٠ دقيقة في المحلول التالي : ٥ مجم أسيتيل

كولين أيوديد أو بيوتيل أسيتيل ثيوكولين أيوديد Acetyl thiocholine iodide or butyl thiocholine iodide

- 0.1 M acetate buffer pH.6 أضف مع التقليب ٥.٦ مل .

- ٥.٥ مل أو مولار سترات الصوديوم Sodium citrate

- ١.٠ 30M cuso4

- ١.٠ ماء مقطر

- ١.٠ 5 mM Potssium ferricyanide

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

ساعات .

ما بعد التحضين :

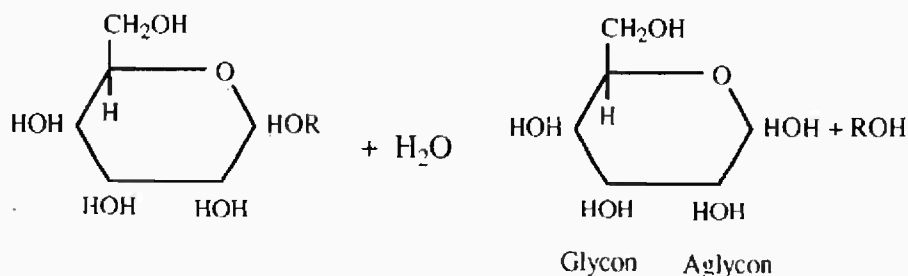
- اغمس في ماء مقطر .
- اصبغ صبغة خلفية بالهيماتوكسلين
- انزع الماء ثم اظهر القطاعات في كندا بلسم

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

الجليكوسيدات

Glycosidases (Glycoside hydrolases)

تقوم هذه الإنزيمات بدور العامل الوسيط في تميؤ الأربطة الجليكوسيدية



وتنقسم الجليكوسيدات الي :

- عديد السكريدين Polysaccharidase Polysaccharidase
- أوليجو سكريدين Oligo saccharidase
- ثنائي السكريدين Disachari dase

الكشف عن الجليكوسيدات

المثبت : فورمول كالسيوم مبرد وتعد القطاعات بالكربونات

الوسط الحاضن :

- اندوكسيل الجلووكوسيد Indoxyl glucoside ٢ مجم
 - داي ميثيل تورثورمايد ٠.٢ مل
 - 0.1M Citrate phosphate buffer ٧ مل
- (pH.3.5-5.5)

قلب مع التحريك بانتظام ، ثم أضف :

- 50 mM K ferricyanide (1.6y) ٠.٥ مل
- 50 mM ferrseyanide (2.11J) ٠.٥ مل

قلب ثم رشح

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

مابعد التحضين :

- اغسل بالماء

- اطمر في محلول جبلي جيلسرين أو آبائي

النتيجة : اللون الازرق يدل علي أماكن نشاط الإنزيم .

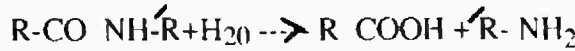
الببتيديزس

Peptidases (Proteolytic Enzymes)

(Peptide hydrolases-hydro lytic enzymes)

تقوم هذه الإنزيمات بدور العامل المساعد والوسيط في التأكسيز المائي لأربطة

الببتيدات كمايلي :



وتشتمل هذه الإنزيمات علي :

أ- الببتيديزات الداخلية : Endopeptidases

وتعمل علي تميق الرباط الببتيدي الموجود وسط الجزئ

ب - الببتيديزات الخارجية : Exopeptidases -

وهي التي تمى الرباط الببتيدي الموجود في طرف الجزئ . ويشتمل النوع الاول علي الإنزيمات المميئة البروتينة في القناة الهضمية مثل الببسين والتربسينوالكيموتريسين بينما يشتمل النوع الثاني علي الكاتيبسين Cathepsin الموجود في الليسوسومات .

مثال للببتيديزات :

الببتيديز الأمينى

Amino Peptidase

يوجد هذا الإنزيم في أغشية الخلايا ، ويقوم بتميةا الببتيدات المختلفة والأريل اميدات مثل : leucyl and alanyl 2naphthyl amide



طريقة الكشف :

(طريقة الأزو المزبوجة المترامنة) (Nachales, 1960) Simltaneous azo-coupling

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

- أذب في N,N dimethyl formamide ٠.٥ مل

- أو M فوسفات وخلات وكاكوديالات أو حامض ستريك فوسفات المنظف ٠.٥ مل

ويضبط عند pH.6.5-7.5

- أزرق السريع fast blue

١٠ مجم

امزج ثم رشح

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

ما بعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن

- اغمس في ماء مقطر .

- ضع القطاع في ٢٪ كبريتات الحديد لمدة ٥ دقائق .

- اغمس في ماء مقطر .

- ضع القطاعات في ٤٪ فورمالين لمدة ساعتين .

- اغمس في ماء مقطر .

- اظهر في جيلي الجليسرين أو الأباتي .

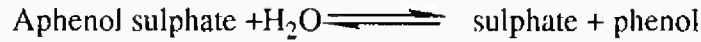
النتيجة :

أماكن نشاط الانزيم تأخذ اللون الأزرق البنفسجي

إنزيمات سلفاتيزيس

Sulfatases

يشار لهذه الانزيمات عادة بأنها "Aryl sulphatase" أريل سلفاتيز، وتقوم بتميئي
التفاعل :



ومنها :

أريل سلفاتيز A ويعمل عند pH4.5-5.2

أريل سلفاتيز B pH5.5-5.9

أريل سلفاتيز C pH8-8.5

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

طريقة الكشف :

طريقة استخدام ملح P-nitro catechol sulphate

تستخدم قطاعات الكريوستات الطازجة . (

الوسط الحاضن :

P-Nitro pyrocatechol sulphate

١٦٠ مل 1,2dihydrox 5-nitro benzene sulphate

٤٠ مل أذب في ماء مقطر .

١٢ مل -أو M مولار خلاات المنتظم pH5.5 0.1 M acetate buffer

٤ مل - ٨٪ نترات الرصاص lead ntrate

يتم ضبط pH عند ٥.٥ بواسطة M.2 حامض الخليك وخلات الصوديوم . يترك لمدة ١٥-٢٠ دقيقة عند درجة ٣٧ °م ثم يرشح .

- يتم التحضين لمدة ٢٠-٦٠ دقيقة عند ٣٧ °م .

مابعد التحضين :

- اسكب الوسط الحاضن

- أغمس في ماء مقطر .

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

- اغمس في ماء مقطر .

- طمر في جيلي الجليسرين أو محلول اباثي .

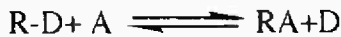
النتيجة : تصبح أماكن نشاط الإنزيم باللون الاسود البني .

الترانسفيريزيس

Transferases

(الإنزيمات الناقلة)

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



ومن هذه الانزيمات :

Carbon transferase

- كاربون ترانسفيريز

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

ويمكن الكشف عن هذه المجموعة بطريقة بالطريقة الآتية :

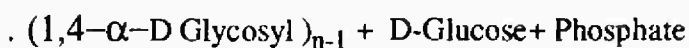
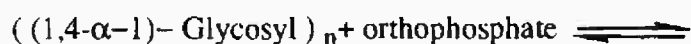
مثال لهذه المجموعة :

جليكوجين فوسفوريلاز

Glycogen phosphorylase

لعل هذا الانزيم كعامل مساعد في تكسير أو يميّز أنواع الاميلوز حسب المعادلة

التالية :



ويفضل الكشف عن هذا الانزيم في الكبد والقلب والعضلات الارادية وتستخدم لهذا

الغرض قطاعات كربوستات غير مثبتة أو معاملة بالاسيتون

طريقة تاكوشي ومارياكو (جولدوسكى ١٩٥٨)

Goldwisky (1968)

للكشف عن هذه الانزيمات

الوسط الحاضن :

١٥ مل

- ماء مقطر

ويضاف بالترتيب التالي

- صوديوم - جلوكوز ١ فوسفات ٥ مجم
- صوديوم أدينو مونوفوسفات ١٠ مجم
- Sodium adeno monophosphate
- صوديوم إيثيلين ديامين تترأسيستيك (EDTA) ٢٠ مجم
- فلوريد صوديوم Sodium fluoride ٢٠ مجم
- جليكوجين (مذاب في الماء) ١٠-٥ مجم
- انسولين Insulin ٢-١ وحدة
- 0.1M acetate buffer pH: 5-7 ١٠ مل
- بوليفينيل بيروليدون Polyvinyl Pyrrolidone ٢-١ مجم

اخلط جيدا واضبط عند pH 5.8 .

التحضير : لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة عند ٣٧ °م

ما بعد التحضير :

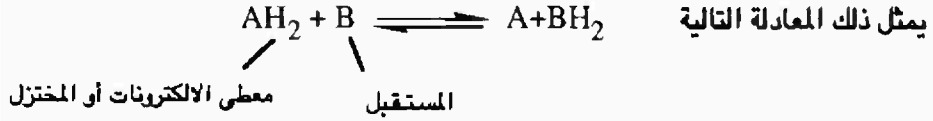
- اغمس في ماء مقطر .
- ضع في ٩٦٪ كحول إيثيلي لمدة ٣ دقائق .
- ضع في محلول . (2gm iodine makeup300) lugol and dil 1:9 before use)
- ضع القطاعات في ٤٪ فورمالدهيد لمدة ٥ دقائق .
- اغمس في ماء مقطر .
- ضع القطاع في جيلي جليسرين .

النتيجة : اللون الازرق يدل علي الجليكوجين فوسفوريلايز (جلوكاجون غير متفرع)

أما اللون البني فيدل علي الجليكوجين فوسفوريلايز جلوكان متفرع

أكسى ريدكتيز Oxyreductases

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



وتنقسم الأكسى ريدكتيز الى الأنواع التالية :

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

٢ - الذى هيدروجينيز Dehydrogenases والتى يكون فيها المستقبل مادة غير الأكسجين ولا يمكن أن يكون الأكسجين .

طريقة الكشف عن الانزيم

Oxidative Coupling Method

بريستون 1959, Burstone

تستخدم قطاعات طازجة من الكريوستات

الوسط الحاضن :

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

- نفتوك AS-LG

(1hydrox-2-naphthoc acid) ١٠ - ١٥ مجم

(naphthol AS-LG) ١٠ - ١٥ مجم

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

0.05 M phosphate or Tris Hcl buffer pH 7.2-7.4 or : solution of 1.48 gm Sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) and 0.43 gm Potassium phosphate (KH_2PO_4) in 110.7 Sodium chloride (adjust pH to 7.2) .

التحضير : يتم تحضير القطاعات لمدة ٦٠-١٢٠ دقيقة عند ٢٧°م

بعد التحضير :

- تنتقل القطاعات الي ١٪ نترات الكوبالت cobalt nitrate لمدة دقيقة .

- اغسل في ماء مقطر .

- طمر القطاعات في جيلي الجليسرين أو محلول أباتي .

النتيجة :

يستدل علي نشاط الانزيم باللون الازرق البني أو البني الاسود .

الإنزيمات المؤكسدة اكسيديزس

Oxidases

وهي تشتمل على :

- سيتوكروم أكسيديز Cytochrome oxidase

- فيرو سيتوكروم Ferro Cytochrome

- أكسجين اكسيو ريديكتير Oxygen oxido reductare

وتقوم هذه الانزيمات بدور العامل المساعد في التفاعل التالي :



والسيتوكروم عبارة عن هيموبروتين يقوم بنقل الالكترونات في السلسلة التنفسية .

وتنقسم السيتوكرومات الى ثلاثة مجاميع اساسية هي : a,b,c وتحتوى كل مجموعة على عدد وآخر من السيوكرومات هي : a_1, a_2, a_3 والخلايا الحيوانية بها . a, a_3, b, b_5, c, c_1 والسيتوكروم C_1, C, b, a_3 متواجد في الغشاء الداخلى للميتوكوندريا ويعرف السيتوكروم a, a_3 باسم اسيتوكروم اكسيداز cytochrome oxidase .

ويتواجد b_5 في الغشاء الخارجى للميتوكوندريا أو أغشية الشبكة الاندوبلازمية .

ويعتبر السيتوكروم أكسيداز الإنزيم المميز لأغشية الميتوكوندريا التى يرتبط بها ارتباطا وثيقا . ويتواجد الإنزيم بكثرة فى الخلايا التى تحتوى على كمية كبيرة من الميتوكوندريا حيث توجد بها العديد من الأنشطة الأيضية . ولهذا فإن هذا الإنزيم يعتبر مقياسا حقيقيا لعمليات الإيض التأكسدى فى الخلايا وذلك واضح بصورة خاصة فى العضلات القلبية والانايبب الكلوية

ويحدث تثبيط السيتوكروم اكسيداز بواسطة السيفيد cyanide والأزيد azide

انزيمات ديهيدروجينيز (النازعة للهيدروجين)

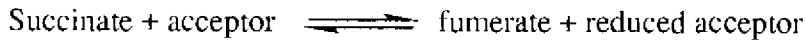
Dehydrogenases

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

سكسينيك ديهيدروجينيز (SDH)

Succinic Dehydrogenase

يقوم هذا الإنزيم بدور العامل المساعد في التفاعل التالي :



وينتمى هذا الإنزيم الى مايسمى نظام انزيمات السكسينيك المؤكسد وهي وحدات

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

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

وهذا الانزيم عالي الحساسية بالنسبة للمثبتات ، ويتم تثبيط نشاطه بواسطة الجلوتار لدهيد ويعتبر التثبيت في الفورمالدهيد لمدة ٥-١٥ دقيقة أنسب المثبتات .

طريقة الكشف عن الإنزيم :

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

طريقة ملح التترازوليوم (لوجد ١-١٩٦٥)

Tetrazolium Salt procedure (Logda,1965) .

0.1	M phosphate or 0.2 m.Tris buffer	محلول التحضين :
١٠ مل	pH.7.2 - 7.4	
0.1	[-0.4] nitro BT	- محلول نترازوليوم
١٠ مل	or tetranitro BT (Dissolve in 0.5 ml add 9.5 ml dist. H ₂ O)	
٤ مل	0.05/ Na cyanide	- ٠.٥٪ سيانيد الصوديوم
0.01	M, adjust pH vuth Hcl to 7.2).	

- ٠.٤٪ كلوريد المغنسيوم

0.47/ anhydrous or 1/ Crystalline magnesium chloride (0.05 M, when Tris Hcl buffer is used 0.6 magnesium sulphae)

٤ مل

٨ مل - ماء مقطر

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

مخزون محلول السكسينيك Stock Sol. of succint

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

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

1 M Succinate , disodium salt hexahydrate- (270 ml/mol adjust H₂O) . -

Adjust pH 7.2-7.4 - store in deep freeze.

التحضير وما بعد التحضير :

٢ مل التحضير : محلول التحضير المائي :

٠.١ - ٠.٢ مل او مولار سكسينات

٣-٢ فقط Memadeion ٠.٠٥ ٪ ماديون

2methyl-1,4 naphtho quinoremeniphthore

Vitamine K₃ dissolved in acetone

أو

فينازين ميثوسلفات

٠.١ - ٠.٢ مجم phenazinemetho suphate (pH₅)

٢ مل Mix check pH 7.2 - 7.6

تحضير القطاعات :

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

وبعد التحضير :

- اسكب الوسط الحاضن .

- اغمس في ماء مقطر .

- ضع القطاع في ٤٪ فورمالين لمدة ١٠ دقائق - ساعة .
- اغمس في ماء مقطر .
- استخدم صبغ حلقي مثل الأحمر السريع .
- يغمز القطاع في جيلي جليسرين أو آبائي .

النتيجة :

يظهر نشاط الانزيم باللون الأزرق أو الأزرق المحمر .

لاكتك ديهيدروجينز

LACTIC DEHYDROGENASE

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

وتلجأ الخلايا العضلية التي تحتاج لمزيد من الاكسجين اثناء نشاطها الي حمض البيروفيك الذي يقوم باكسدة مادة NADH2 CO-ENZYME1-REDUCED وينتج حمض اللبنيك ومادة DPN .

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

وتجدر الاشارة الي أن انزيم لاکتک ديهيدروجينز من الانزيمات الذائبة.

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

انزيمية» ISOZYMES ، يتكون كل «متشابه انزيم» من اربع وحدات من سلاسل عديد الببتيد - فالمتشابه الانزيمي السائد في العضلات الهيكلية يرمز له بالرمز A_4 حيث يتكون من أربع سلاسل متشابهة طراز A ، بينما يشارك في العضلات القلبية B_4 والمتشابهات الانزيمية الثلاث الاخرى ، رموزها $A3B$, $A2B2$, $AB3$.

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

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

طريقة الكشف عن الانزيم :

المحلول الاساسي (محلول التخزين) STOCK SOLUTION

٠,٢ مولار منظم ترس	0.2M TRIS-HCL BUFFER	٦٥ سم ^٢
كلوريد ماغنسيوم	$MGCL_2 \cdot 6 H_2O$	٢٠٠ ملليجرام
ازيد الصوديوم	SODIUM AZIDE (NAN_3)	١٥ ملليجرام
ماء	WATER	٨٥ سم ^٢

ثم أضيف :

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

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

محلل التحضين : INCUBATION MEDEUM :

يحضر محلول التحضين قبل الاستعمال مباشرة ، وهو يتكون من :

المحلل الاساسي : ٥ سم^٢

لاكتات الصوديوم SODIUM DL-LACTATE (NAC3 H503) 5×10^{-4} MOLE

٥٦ ميلليجرام

١ ميلليجرام

– نيتروبلونترازوليم NITRO - BLUE TETRAZOLIUM

١ ميلليجرام

نيكوتين اميد ادنين داينيوكليوتيد NICCTINAMIDE ADENINE

DINUCLEOTIDE

خطوات العمل :

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

٢- حمل القطاعات علي اغطية شرائح أو شرائح زجاجية .

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

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

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

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

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

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

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

النتائج :

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

ميكانيكية طريقة الكشف :

يقوم انزيم NADH2- DIAPHORASE باكسدة $NADH_2$ الي NAD ووسلم الهيدروجين الي مادة TETRAZOLE التي تترسب عندئذ في صورة مادة فورمازان ملونة .