الفصـــل الثامن

8

هستوكيميائية المواد غير العضوية

Histochemistry of Inorganic Substances

الفصـــل الثامن

هستوكيميائية المواد غير العضوية

Histochemistry of Inorganic Substances

مازال الكشف عن المركبات والمكونات غير العضوية في الخلايا والأنسجة باستخدام الصبغات والتفاعلات الكيمائية – لكي يمكن رؤيتها بالميكرسكوب – أمرا محدودا وذلك نظرا لوجودها بتركيزات منخفضة كما أن البعض منها يوجد بصورة مستقرة متحدة مع مركبات أخـــري .

علي أنه توجد بعض الطرق الموثوق بها للكشف هستوكيمائيا عن بعض الأنيونات anions مثل الكربونات carbonates والفوسفات phosphates (PO_4) والكلور Cloride CL^- ، وكذلك بعض الكتيونات cations مثل الكالسيوم calcium (Ca^{++}) والحديد iron (Fe^{++}) والنحاس Copper (Cu^{++}) ، والزنك zinc (Zn^{++}) .

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

الفوسفات Phosphates

الكشف عن الفوسفات phosphates

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

النووي ح ن د DNA .

الطريقـــة :

طريقة تشنخ Cheng عام ١٩٥٦ .

- تثبت قطع النسيج في ٥٠٪ فورمالين متعادل .

- يتم إعداد قطاعات مجمدة سمكها (٢-٥ ميكرون) ، علي أنه يمكن استخدام قطاعات شمعية أيضا .

- اغمس القطاعات في محلول خلات منظم متعادل neutral acetate buffer أسه الهيدروجيني ٤,٠٠ تفصل شوبه pH.4

٣- انقل القطاعات الي محلول المواليبدات حيث يتم التحضين لمدة (١٠) دقائق عند درجة ٣٧°م في ١ . ٠-٥ . ١٪ محلول مواليبدات الأمونيوم ammonium molybdate في ٠,٠٠٥ محلول مولاري (N) حامض الكبرتيك . مثبت عند الأس الهيدروجيني pH4.0 وذلك بحجم متساو من الخلات المتعادل neutral acetate buffer ويتم تحضير هذا المحلول قبل الاستعمال مباشرة .

٤- تنقل القطاعات الي الشرائح وتصفي ثم تغطي بقطرات من ٢٪ محلول حامض الاسكوربيك المثبت عند الاس الهيدروجيني $P^{H}4$ وذلك باضافة حجم متساو من محلول الخلات المتعادل .

- تغطي القطاعات بأغطية زجاجية نظيفة وتفحص .

النتيجة :

يدل ظهور الراسب الأزرق علي تواجد الفوسفات غير العضوي .

الكالســـيوم Calcuim

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

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

طريقة الإحلال المعدنى :

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

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

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

طريقة فُون كوسا von Kosse للكشف عن أملاح الكالسيوم :

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

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

منزوعة الشمع في ٥٠٪ كحول وماء .

٣- ضع القطاعات لمدة ١٥-٣٠ دقيقة في محلول ١٪ الي ٥٪ محلول نترات الفضة $AgNO_3$ في الظلام .

٤- اغسل في ماء مقطر .

٥- ضع القطاعات في ٥,٠٪ هيدروكينون hydroquinone أو حامض بيروجاليك pyrogallic acid لمدة ٢-٣ دقائق .

٦ - اغمس في ماء مقطر .

٧- يثبت في محلول ٢٪ الي ٥٪ ثيوكبريتات الصوديوم Soduim thiosulphate لمدة ٥ دقائق .

٨- انزع الماء ثم روق القطاعات وغط بكندا بلسم .

النتيجة :

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

طريقة رسل Russel عام ١٩٥٨:

١- اتبع الخطوتين الأولي والثانية كما سبق .

٢- اصبغ القطاعات لمدة دقيقة في ٢٪ أحمر أليزارين alizarin red المائي مع ضبط محلول الصبغة عند الأس الهيدروجيني ٤,١-٤,٣ بمحلول نوشادر مخفف علي أن يظل اللون الأيودي الداكن للمحلول ثابتًا .

٣ - انزع محلول الصبغة ثم جفف القطاعات بورق ترشيح .

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

٥ - روق في الزيلول وغط بمحلول بلسم كندا .

النتيجة :

يصبغ الكالسيوم بلون برتقالي أحمر والأرضية باللون القرنفلي pink .

الحـــــديد Iron

تنقسم المركبات التي يدخل الحديد في تكوينها الي قسمين رئيسين :

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

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

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

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

وهناك ثلاث طرق معملية للكشف عن الحديد هستوكيمائيا هي :

١- أزرق بروشان Prussian blue

٢- أزرق ترنيول Turnbul blue

٣- كبريتيد الحديد Iron sulphide .

وتعتبر طريقة أزرق بروستان أفضل هذه الطرق .

طريقـــة بروشان الأزرق :

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

الطريقـــة :

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

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

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

٤- اغمس القطاعات في ماء مقطر .

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

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

النتيجـــة :

يدل ظهور الراسب الأزرق أو الأزرق المخضر علي وجود الحديد .

وبمعاملة القطاعات بفوق اكسيد الهيدروجين hydrogen peroxide الذي يظهر أو

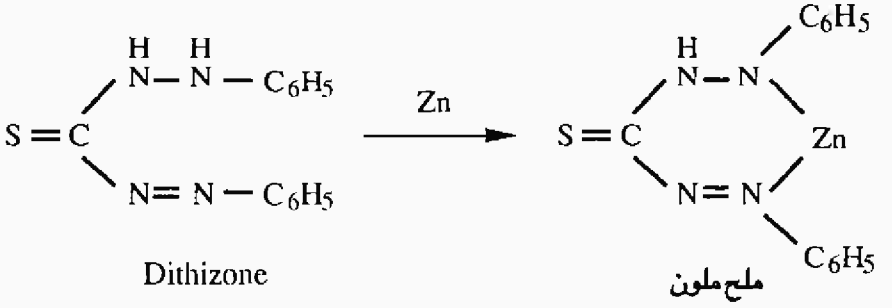
يحرر الحديد المستتر وذلك لتكسير الشق العضوي وينتج أكسيد الحديديك غير القابل للذوبان

الزنـــك Zinc

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

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

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



Dithizone ملح ملون

طريقة ماجر وماك ناري وليونيتى ١٩٥٣ للكشف عن الزنك

Mager, Mc Nary and Lionetti, 1953.

الطـريقة :

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

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

أ- محلول ليثيزون أسيون وماء Lithizone acetone - water . تعوم القطاعات لمدة١٠ دقائق في محلول مخفف من الليثيزون (١٠,٠٪ ليثيزون في أسيتون مطلق مخفف بماء مقطر وخال من الزنك وذلك بنسبة ١: ١٠٥ وذلك قبل الاستخدام مباشرة).

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

أذب ٥٥٠ جم ثيوكبريتات الصوديوم ($Na_2S_2O_2 . 5H_2O$) جم سيانيد البوتاسيوم KCN في ١٠٠ مل ماء مقطر .

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

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

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

٨ . ٥ مل من المحلول المركب المنظم + ٢, مل من ٢٠٪ طرطرات البوتاسيوم .

* عوم القطاعات في المحلول لمدة ١٠ دقائق .

* جفف القطاعات واغسلها بالكلوروفورم .

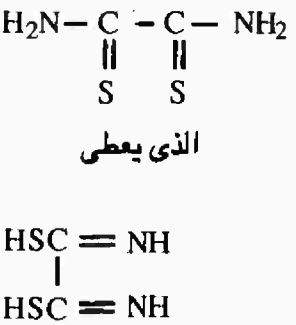
* بعد التجفيف في الهواء ، اغمس في الماء ثم اغمر القطاعات في محلول أباثي أو جيلي جليسرين

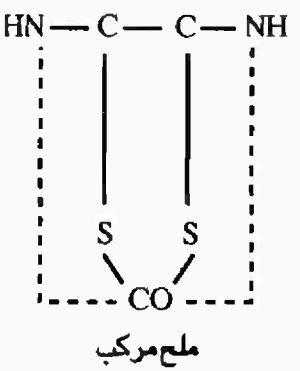
النتيجـــة :

يستدل علي وجود الزنك باللون الأحمر أو الأحمر البنفسجي

النحـــاس Cupper

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





الخطوات المفضلة للكشف عن النحاس :

١- يثبت النسيج في الفورمالين .

٢- انزع الماء وأعد قطاعات شمعية .

٣- احفظ القطاعات لمدة ١٢ ساعة عند درجة ٣٧°م في إناء محكم يحتوي علي المحلول الآتى :

٥ مل حامض الربيانيك + ١,٠٪ حامض ربيانيك في إيثانول مطلق + ١٠٠ مل ١٠٪ محلول مائي من خلات الصوديوم Sodium acetate .

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

٥- اغسل في ايثانول مطلق لبضع ساعات .

٦- روق في الزيلول ثم اطمر فى بلسم كندا .

النتيجـــة :

يظهر النحاس باللون الأحمر القاتم