كلية العلوم

القسم : علم الحياة

السنة : الثالثة

المادة : كيمياء النسج الحيوانية

المحاضرة : الخامسة/نظري/

{{ مكتبة A to Z }}

Facebook Group : مكتبة A to Z

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر (What's app-Telegram) على الرقم 0931497960

تلوين الأنسجة الحيوانية Staining of tissues

عند فحص المحضرات النسيجية قبل التلوين فانه لا يتضح منها إلا بعض التفاصيل كالنواة و حدود الخلية.تعمل الملونات على زيادة الفرق في معامل انكسار مكونات الخلية و النسيج مما يؤدي إلى رؤية الأجزاء بوضوح و يحدث هذا نتيجة الفرق في ميل مكونات الخلية او النسيج لمعظم الملونات.

بدا تطبيق استعمال الملونات التجارية في تحضير المقاطع النسيجية المجهرية في النصف الثاني من القرن التاسع عشر و يعود أول استعمال لتلوين النواة إلى Gerlach عام 1858 عندما حاول تلوين الخلايا العصبية و في عام 1865 نجح Bohmer في مزج الهيماتوكسيلين Hematoxylin مع الشب alum لتلوين النواة و بعدها طورت ملونات الانيلين aniline و ما تزال الملونات القديمة تستعمل حتى الآن و لكن طرائق الكيمياء النسيجية هي التي تعتبر حديثة إلى حد ما.

تعريف الملون هو عبارة عن مواد تستخدم لتلوين مكونات النسيج وتزيد من فروق معامل الانكسارلهذه المكونات مما يساعد على التمييز فيما بينها والملون مادة عضوية مكونة من شقين:

1- حامل اللون وهو الشق الذي يعزى اليه لون الصبغة

2- مساعد اللون وهو الذي يقوم بربط حامل اللون مع المركبات المُراد تلوينها.

آلية التلوين:

وضع الباحثون اكثر من تفسير لتلوين الأنسجة الأول كيميائي و الثاني طبيعي

1- التفسير الكيميائي:

ذكر Ehrlich 1880 أن التلوين عبارة عن تفاعل كيميائي يعتمد على تكوين مادة (ملح) بين الشق الموجب cation أو الشق السالب anion للملون و بين زمر كيميائية معينة في النسيج و على هذا الأساس تكون الأنسجة أما محبة للحموض و تحتوي زمرة قاعدية تتفاعل مع الملونات الحامضية أو تكون محبة للقاعدة (الأساس) و تحتوي زمرة حمضية تتفاعل مع الملونات القاعدية.

2- التفسير الطبيعي (الفيزيائي):

يعتمد على افتراض بان التلوين يحدث بوسائل طبيعية مثل الامتصاص و الادمصاص و الانتشار و الاسموزية و لكن في الوقت الحالي يعتقد بان التلوين يتم بعمليات كيميائية و طبيعية معا.

تصنيف الملونات:

يعتمد في تصنيف الملونات على العديد من الأسس منها المصدر و التفاعل و الميل نحو النسيج وغيرها

1- تصنيف الملونات حسب مصدرها:

الملونات الطبيعية: Natural Dyes

يتم الحصول على الملونات الطبيعية أما من مصدر نباتي أو حيواني و يمكن استخدام أنواع مختلفة من الملونات الطبيعية في تحضير المقاطع المجهرية منها القرمز cochineal وكارمن carmine وهيماتوكسيلين hematoxylin و اورسين orcein وصبغة الزعفران او سافرون saffron و صبغة النيلة (Indigo)

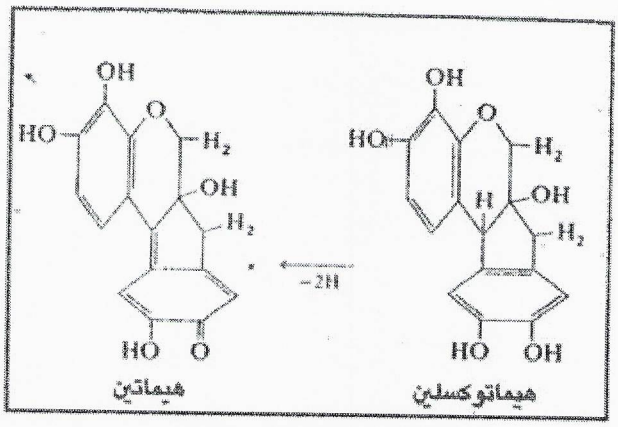
- **القرمز و الكارمن Cochineal &Carmine**

تستخرج هذه الملونات من جسم حشرة صغيرة اسمها Coccus cacti تعيش على نبات الصبار و يوجد الملون على شكل رحيق ارجواني في إناث هذه الحشرة و للحصول على الملون تجمع الإناث وتجفف ثم نحصل على القرمز بشكل مسحوق و إذا لم يضاف مرسخ mordant للملون كالحديد أو الألمنيوم فلا يكون للقرمز أي ميل للأنسجة. عند غلي القرمز مع ملح الشب ينتج راسبا لا يذوب في الماء يدعى كارمين و لا يستعمل هذا الراسب كملون إلا بعد إذابته بمحلول حمض الخل ليتكون كارمين الخل acetocarmine الذي يستعمل كملون شائع للنواة.

- **الهيماتوكسيلين Hematoxylin**

هو من الملونات الشائعة في التحضيرات المجهرية و تستخرج من خشب شجرة بقوليه صغيرة اسمها Hematoxylin campechianum تزرع في أمريكا الجنوبية و الوسطى و تستخلص المادة الملونة من الجذع بواسطة الايثر ثم تجفف و تنقع بالماء و بعدها ترشح و هنا خطوات طويلة و مكلفة لذلك يعتبر الملون غالي الثمن و هو يستعمل كملون بعد أكسدته ليكون هيماتين hematein و ذلك بفقدانه ذرتي هيدروجين تتم اكسدة الهيماتوكسيلين في وسط كحولي او مائي و تسمى بعملية

التعتيق و تستمر من ثلاثة حتى أربعة أشهر و ملون الهيماتوكسيلين المعتق هي عبارة عن خليط من الهيماتوكسيلين و الهيماتين و نواتج أكسدة الهيماتوكسلين .كما يمكن ان تتم الاكسدة صناعيا بوجود مؤكسدات صناعية تستخدم كعوامل أكسدة ثابتة القيمة من اجل عمر الملون مثل فوق اكسيد الهيدروجين H2O2 و اكسيد الزئبق HgO يبين الجدول الكميات المطلوبة لتعتيق الملون.



شكل 1. تاكسد هيماتوكسلين إلى هيماتين

كمية الهيماتوكسلين	عامل الأكسدة	كمية عامل الأكسدة
1 غ	HgO أكسيد الزئبق	0.500 غ
1غ	KIO4 ايودات البوتاسيوم	0.050غ
1غ	H2O2 أكسيد الهيدروجين	2.000مل
1غ	KMnO4 برمنغنات البوتاسيوم	0.175غ

ملاحظة: يحضر الهيماتوكسيلين حسب صيغ مختلفة و تسمى كل صيغة باسم أول من استعماله و عليه يمكن تحضير صبغة هيماتوكسيلين حسب صيغة ايرليخ Ehrlich أو هاريس Harris أو ماير Mayer أو جل Gill و الذي يجمع بينها هو احتوائها على مسحوق الصبغة و مادة مذيبة و وسط مرسخ مثل شب الامونيا أو شب البوتاسيوم.

ملونات طبيعية أخرى:

1-اورسين Orcein يستخلص هذا المحلول من اشنة تسمى Rocella و يحضر بعملية غلي النبات في الماء مما يسبب انفصال حمض ليكانوريك Lecanoric acid إلى اورسينول Orceinol الذي يكون الاورسين عند إضافة الامونيا بوجود الأكسجين الجوي و تلون هذه الصبغة ألياف الأنسجة الضامة.

2-سفرون Saffron يستخلص من زهرة نبات الزعفران Crocus نبات زرعه اليونانيون القدماء وكانت تستخدم أعضاء التأنيث في الزهرة في استخراج صبغة صفراء .

3-نيلة Indigo تستخلص من نبات الجنس Indigofera نبات ينمو بصفة رئيسية في المناخ الحار الاستوائي لون صبغته زرقاء مشتقة من الأوراق .

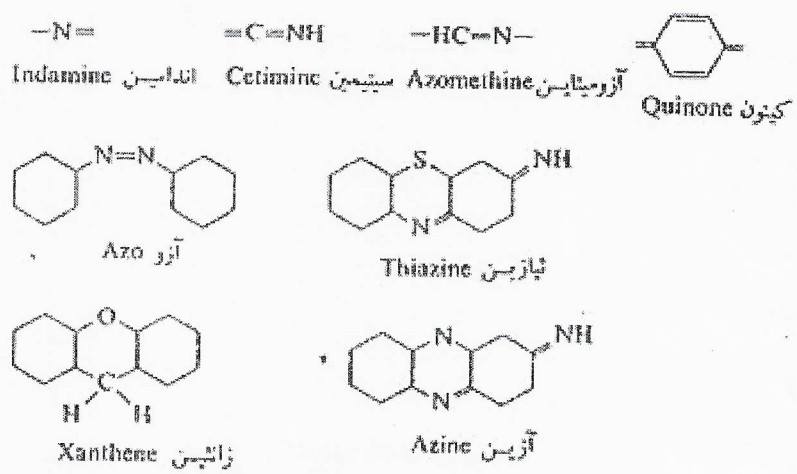
4-عرف الإنسان القديم الملونات الحيوانية ولكنها كانت مكلفة ولذلك استعملها فقط الأغنياء . وألوانها كانت أكثر كثافة وتعطي ثباتا أكثر منها حراشف الاسماك :صبغة رخيصة الثمن باللون الأرجواني.

الملونات المركبة كيميائيا:

هي مركبات عضوية تشتق من البنزين و توفرت في منتصف القرن التاسع عشر عندما وجد بيركن Perkin طريقة لتحضير ملونات الانيلين.

لتحضير ملون مشتق من البنزين يجب ربط مجموعات كيميائية معينة تسمى حاملات الألوان Chromospheres بحلقة البنزين (شكل 2) فتكون حلقة البنزين و حامل اللون مادة تدعى مولد اللون Chromogen.

تجدر الإشارة إلى أن مولد اللون لا يقوم بدور التلوين و لكي يقوم بهذا الدور يجب أن يحتوي مولد اللون مادة قاعدية و أخرى حمضية و يكون له بالتالي قدرة على تكوين ملح. تدعى مجموعات الشق الكيميائي التي تضيف هذه الخاصية لمولد اللون مساعدات اللون Auxochromes و منها زمرة هيدروكسيل -OH و امينو –NH2 و الكربوكسيل –COOH و الكبريت –SO3 . .



التركيب الكيميائي لبعض حاملات اللون

تصنيف الملونات حسب حاملات الألوان: تصنف الملونات إلى ملونات:

1- الكينونويد Quinonoid 2- ملونات الازو Azo ملونات النترو Nitro.

1- ملونات الكينونويد Quinonoid Dyes : أهمها

1- ملونات هيماتين Hematein

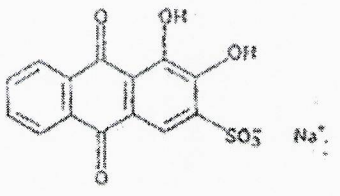
2 - انثراكينونويد Anthraquinonoid

3-زانتين Xanthene

4- ثيازين Thiazine

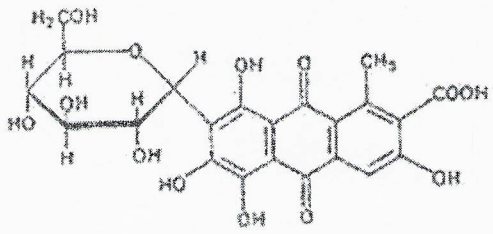
1-**ملونات هيماتين Hematein Dyes :** هذه مجموعة صغيرة من الملونات المستخرجة من نبات بقولي يدعى Hematoxylon campechianum لونه احمر إلى بني و بوساطة مرسخ الصبغة يصبح من أهم ملونات التحضيرات المجهرية الضوئية. و الهيماتين هو حالة مؤكسدة للهيماتوكسيلين

2-**ملونات انثراكينونويد Anthraquinonoid Dyes** : ابسط مثال عن هذه المجموعة ملون اليزارين Alizarine (شكل 3 أ).يشتق من المركب السابق حمض الكارمن Carminic acid (شكل 3 ب) ذو الأهمية الخاصة في التحضيرات النسيجية. توجد هذه الصبغة في أجسام أنثى حشرة تدعى Dacytylopius cacti التي تعيش على عصارة نبات الصبار و المركب كارمن هو المادة الخام لهذه الصبغة و يتم إنتاجه بترسيب الخلاصة المائية لصبغة القرمز Cochineal مع شب كبريتات البوتاسيوم و الالمنيوم و الكارمن لا يذوب في الماء إلا انه يذوب بإضافة حمض أو قاعدي و يستعمل ملون كارمن الخلي Acetocarmine في إظهار الصبغيات.



أ

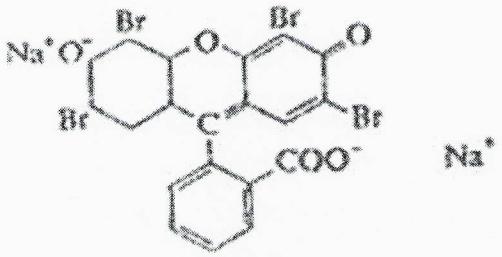
اليزارين



ب

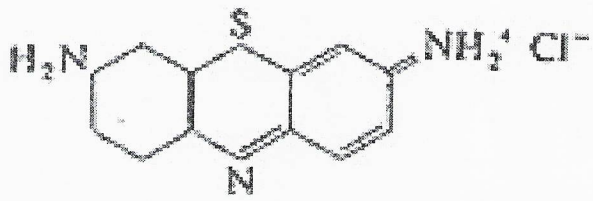
حمض الكارمن

3-ملونات زانتين Xanthene Dyes :يربط عنصرا الكربون و الأكسجين في هذا الملون بين حلقتين و تمثل صبغة السيتوبلاسما ايوزين Eosin (شكل 4) احد الأمثلة عن هذه المجموعة التي يشير اسمها إلى اللون الوردي. تعتبر صبغة الايوزين أكثر استعمالا و هي تضم الايوزين Eosin Y و الايوزين Eosin B و الفلوكسين Phloxin و يعتبر الأول الأكثر استعمالا و هو يذوب في الماء بنسبة 44% و يذوب في الكحول الايتيلي بنسبة 2%.يستعمل محلول الصبغة المائي بتركيز 1% و تتراوح مدة التلوين فيه بين 1-3 دقائق.



شكل (4): صيغة صبغة الايوزين Y

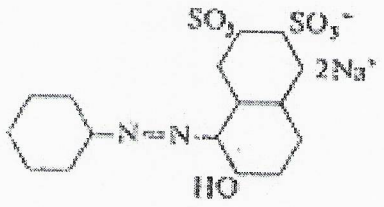
4-ملونات ثيازين Thiazine Dyes : يربط عنصرا الكبريت و النتروجين بين حلقتين و ملون الثيونين Thionine هو ابسطها (شكل 5).تستخدم هذه المجموعة في تلوين البروتينات النووية و العديد من هذه الملونات محولة للألوان أي أنها تلون النسيج بألوان مختلفة عن لون الصبغة نفسها .



شكل (5): صبغة ثيونين

ملونات الآزو Azo -Dyes:

هي مجموعة صغيرة منها احمر كونغو Congo red و ازرق تريبان Trepan blue و اورانج جي Orange G و اخضر جانوس Janus green و هي تلون السيتوبلاسما .و حامل اللون هنا هو زمرة –N=N- و يشير الاسم إلى ذرتي الازوت اللتان تربط بين حلقتين و قد تحتوي ملونات هذه المجموعة على زمرة واحدة أو أكثر(شكل 6).



شكل (6): صيغة ملون اورانج جي

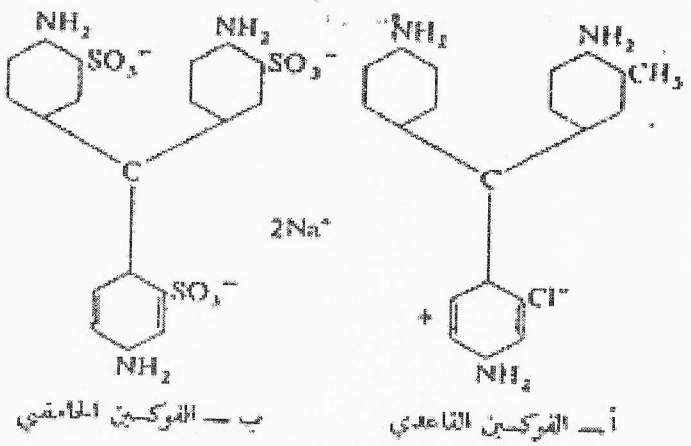
تصنيف الملونات حسب مساعدات اللون: تقسم الملونات إلى القاعدية و الحمضية و المتعادلة

1- الملونات القاعدية: Basic Stains

يحمل مساعد اللون فيها شحنة موجبة و تباع هذه الملونات على شكل كبريتات أو كلوريدات و مثال عليها الفوكسين القاعدي Basic fuchsine الذي يتكون من قاعدة روزانيلين Rosaniline ملونة و شق كلور كما في (شكل 8 أ) و تلون هذه الصبغة مكونات الخلية الحمضية كالنواة.

2- الملونات الحمضية Acidic Stains

يحمل مساعد اللون فيها شحنة سالبة و تتوفر هذه الملونات كأملاح صوديوم أو كالسيوم و مثالها الفوكسين الحامضي Acidic fuchsine و هو ملح صوديوم لمشتق من روزانيلين حمض الكبريت (شكل 8 ب) و هو يلون المكونات القاعدية من الخلية كالسيتوبلازما.



3- الملونات المتعادلة Neutral Stains:

نحصل على هذه الملونات من تفاعل ملون حمضي و أخر قاعدي و هي غالبا لا تذوب أو هي قليلة الذوبان في الماء و تذوب في مذيبات عضوية و مثال عليها ملونات رومانوفسكي Romanovsky التي تستعمل لتلوين الدم و هي تنتج من تفاعل الايوزين و ازرق الميتلين.

تصنيف حسب تاثير الملون كما يلي:

1-تلوين بسيط: تتلون مكونات النسيج الخلوي بلون واحد

2-تلوين متخصص: تلون مكونات خلوية محددة بلون خاص مثال: ملون فولغن لتلوين DNA في النواة.

3-تلوين مضاد: تلون اجزاء محددة من العينة بلون خاص وتلون بقية الاجزاء بلون اخر معاكس مثال استخدام ملون الايوزين والهيماتوكسيلين.

4-تلوين متعدد: تلوين مكونات العينة النسيجية بالوان مختلفة في ان واحد سواء بملون واحد او مزيج من العديد من الملونات مثال ملون مالوري وليشمان.

مرسخات الصبغة Mordants:

تساعد هذه المواد في تثبيت الملون بالأنسجة و هي ضرورية في حالة الهيماتوكسيلين و غالبا ما تكون هذه المواد أملاحا أو هيدروكسيدات لمعادن ثنائية أو ثلاثية التكافؤ و تتفاعل كهيدروكسيدات مع الملون بأخذ ذرة الهيدروجين منها.و

يرتبط معقد المرسخ و الملون مع مجموعات الفوسفات للأحماض النووية للأنسجة و يسمى المركب الناتج من الملون و المرسخ البحيرة Lake. وتستعمل الكبريتات و الكلوريدات كمرسخات.

تستعمل المرسخات بثلاث طرائق هي:

1-وضع النسيج بالمرسخ قبل إجراء عملية التلوين
2-خلط المرسخ بمحلول التلوين و وضع الشرائح فيه
3-وضع النسيج بالمرسخ بعد إجراء عملية التلوين

من اجل الحصول على محاليل تحتوي التلوين و المرسخ و لها فعالية لمدة طويلة يجب استعمال مرسخات ذات قوة أكسدة قليلة بل و حتى معدومة و من هذه المرسخات: شب الامونيا Ammonium alum و شب البوتاسيوم Potassium alum و حمض فوسفوتنغستيك.

أما إذا كان الهدف تحضير خليط من المرسخ و الملون صالح الاستعمال لفترة قصيرة فيمكن استعمال مرسخات مثل شب الحديد Ferric alium و كلوريد الحديد Ferric chloride.تجدر الإشارة إلى أن اغلب المرسخات تمزج في محاليل الهيماتوكسيلين و لكن بعض أنواع الهيماتوكسيلين مثل Heidenhains iron hematoxylin يتطلب وضع الشرائح في المرسخ قبل نقلها إلى محلول التلوين.

طرائق التلوين Methods of Staining

توجد عدة طرائق لتلوين المحضرات المجهرية النسيجية و هي التلوين التقدمي و التلوين التراجعي و التلوين المباشر و التلوين غير المباشر.

التلوين التقدمي: تفحص المقاطع بين الحين والاخر الى ان يتم التلوين بالقدر الكافي من الملون مثال السيتوبلازما.

التلوين التراجعي: يتم زيادة تلوين النسيج ثم يزال الملون الزائد عن الحاجة باستعمال عوامل مناسبة تسمى عوامل التمييز مثال النواة

التلوين المباشر: يكون تلوين الانسجة كاف عند وضعها في محلول مائي او كحولي من الملون دون الحاجة الى وسيط مثال الايوزين وازرق الميثيلين.

التلوين غير المباشر: لا تتلون الانسجة بكثير من الملونات الا بوجود وسيط(المرسخ) كما في الهيماتوكسيلين ويكون معا (هيماتوكسيلين ايرليخ) او منفصل (هيماتوكسيلين هايدنهين).

التحول اللوني Metachromasy:

تقوم الملونات في كثير من الحالات بتلوين الانسجة بظلال الوانها ولكن هناك حالات تتلون فيها مكونات النسيج بالوان تختلف عن لون محلول التلوين نفسه وقد لوحظت هذه الظاهرة عام 1875م من قبل جيركنز Jurgens وسماها التحول اللوني ويسمى جزء النسيج الذي يغير اللون محول اللون Chromotrope.

العوامل المؤثرة على عملية التلوين:

1-تركيز أيونات الهيدروجين (PH) بما أن الأصباغ حمضية أو قاعدية فمن المؤكد بأنها تتأثر بالأس الهيدروجيني. فمثلا يصطبغ البروتين جيدا عند PH = 3 في حالة الصبغ بالأخضر السريع وعند PH =8 في حالة أزرق الميثلين.

2-نوع المثبت لان مكونات الانسجة ترتبط مع الملونات الحمضية والقاعدية بعد التثبيت. وذلك بسبب الترابط بين المثبت ومجموعات خاصة في النسيج الملون مما يجعل هذه المجموعات غير قابلة للتفاعل مع ملونات أخرى. العينات المثبتة بالفورم الدهيد تتلون جيدا مع الملونات القاعدية بينما المثبتة بكلوريد الزئبق تتلون مع الملونات الحمضية.

3-الترابط الكيميائي حيث يعتمد على العلاقة بين مكونات الأنسجة والأصباغ أساسا وذلك حسب نوع هذه المكونات. وبما أن الغالبية العظمى للمكونات الخلوية تتفاعل مع أية صبغة ولكن بتفاوت فلقد استغلت هذه الظاهرة في تحديد مدة الصبغ حسب طريقة الصبغ المتدرج او الصبغ الرجعي .

4-تركيز الملون فنتيجة الصبغ تزداد كلما زاد تركيز المادة الكيميائية في النسيج .-

5-نفاذية الصبغة داخل الأنسجة وهي تظهر بالتجربة العملية. فهناك ملونات سريعة النفاذية مثل الإيوسين وصبغة البرتقالي ج . وهناك ملونات بطيئة النفاذية مثل أزرق الميثلين.

الطرائق الشائعة في تلوين الانسجة بدراسات كيمياء النسج

ان اهم التفاعلات الشائعة والمستخدمة في كيمياء النسج هي تفاعلات فولكن feulgen و شيف Schiff. تعود جذور التفاعلين الى عام 1866 عندما اكتشف بان التلوين يظهر باضافة ثاني اكسيد الكبريت (so2) لصبغة روزا نيلين الحمراء مما يؤدي الى تكوين مركب فوكسين عديم اللون و بعد اضافة عدة قطرات من محلول الدهيدي يعود اللون

والعكس صحيح. ونظرا لان انتقائية الانسجة للملونات القاعدية او الحامضية ليست مطلقة فان عملية التمييز تعتبر ضرورية ومن ناحية ثانية يمكن الاستفادة من خاصية التمييز لإزالة الملون الباهت من الشرائح القديمة اذ باستعمال وسط تمييز مناسب يزال الملون القديم ويتم إعادة تلوين تلك الشرائح

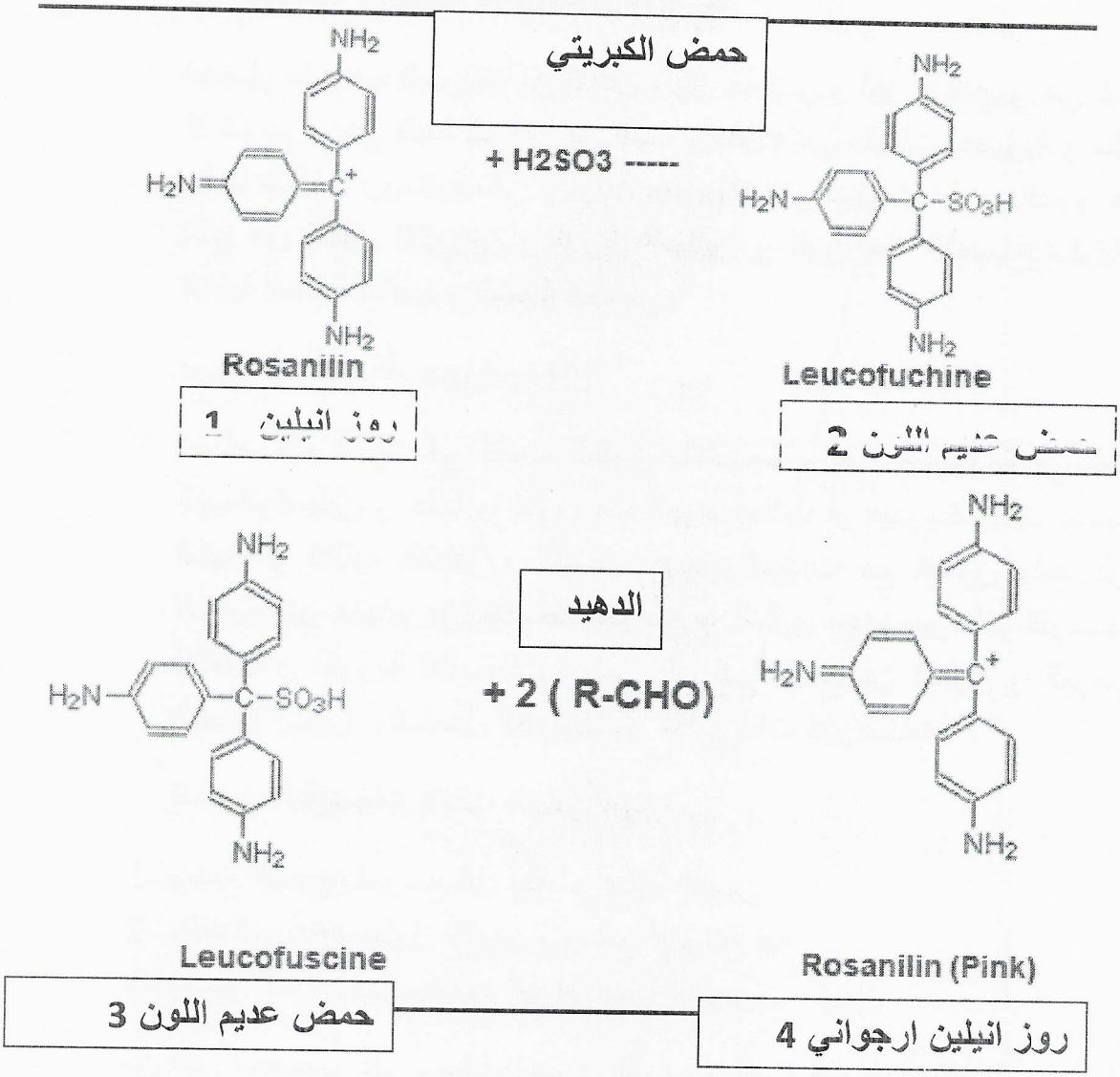
التحول اللوني Metachromasy:

تقوم الملونات في كثير من الحالات بتلوين الانسجة بظلال الوانها ولكن هناك حالات تتلون فيها مكونات النسيج بالوان تختلف عن لون محلول التلوين نفسه وقد لوحظت هذه الظاهرة عام ١٨٧٥م من قبل جيركنز Jurgens وسماها التحول اللوني ويسمى جزء النسيج الذي يغير اللون محول اللون Chromotrope.

الطرائق الشائعة للتلوين في دراسات كيمياء النسج

1- تفاعل فولكن Feulgen,s Reaction

ان اهم التفاعلات الشائعة و المستخدمة في كيمياء النسج هي تفاعلات فولكن feulgen و شيف Schiff تعود جذور التفاعلين الى عام 1866 عندما اكتشف بان التلوين يظهر باضافة ثاني اكسيد الكبريت (so2) لصبغة روزا نيلين الحمراء و هي احدى المكونات الاساسية للفوكسين القاعدي مما يؤدي الى تكوين مركب فوكسين عديم اللون و بعد اضافة عدة قطرات من محلول الدهيدي يعود اللون الاحمر الى الفوكسين عديم اللون و لقد ارتبط اسم شيف بالمركب الناتج من اضافة ثاني اكسيد الكبريت الى الفوكسين القاعدي.



قدم العالمان Feulgen و Rossenbeck عام 1924 هذا التفاعل كطريقة محددة لاظهار الحمض النووي DNA في الانسجة ويعتمد هذا التفاعل على معاملة الانسجة المثبتة بحمض كلور الماء لكي تطلق مجموعات الدهيد من السكر الخماسي ريبوز منقوص الاكسجين من DNA. وبعد غسل المقاطع ووضعها بمحلول شيف تتفاعل مجموعات الدهيد المنطلقة مع متفاعل شيف ليتكون صبغ ارجواني في النواة. لقد ادى استعمال تفاعل فولكن الى فهم الكثير عن كمية وانتشار الحمض DNA في انواع كثيرة من الانسجة السليمة والمريضة وكذلك الى كشف مبادىء اساسية بعلم الوراثة مثل الانقسام الخلوي.

2- تفاعل شيف Periodic Acid Schiff Reaction (PAS)

استعمل حمض فوق اكسيد اليود Periodic Acid (HIO4) للكشف عن الغلايكولات (Glycols CH2OH.CHOH) لما يقرب من 50 عاما واستخدم هذا العامل المؤكسد في الدراسات الكيميائية النسيجية لاول مرة عام 1946 من قبل مك مانوس لاظهار المخاط (Mucin الميوسين) والغليكوجين ولا يزال هذا التفاعل يستخدم لاظهار عدد كبير من السكريات المتعددة في الانسجة.