مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد 19 (4) 2006

طريقة محورة لتصبيغ الخزع العضلية بالاعتلال العضلي بصبغة الــ NADH

عذراء حميد حسون

قسم علوم الحياة، كلية التربية أبن- الهيثم ، جامعة بغداد

الخلاصة

هدف هذا البحث إلى استخدام تركيز جديد من مادة Nitro Blue (Teterazolium NBT) المستخدمة في صبغة NADH) Nicotinic adenine dehydrogenase (dinucleotide باستعمال ثمانية تراكيز مختلفة تراوحت ما بين0.2 % وحتى 0.6 % في تصبيغ عضلات بعض المرضى المصابين بأنواع مختلفة من الاعتلالات العضلية وآخرين أصحّاء بهذه الصبغة التي تعد صبغة مايتوكوندرية وسايتوبلازمية في الوقت نفسه، وتعطي معلومات مهمة عن طرز الألياف العضلية باختزال مادة NBT وأكسدة NADH، حيث تترسب مادة NBT المختزلة في مواقع عمل الانزيم فتكسبه اللون الأزرق وبدرجات لونية متفاوتة حسب نوع الطراز الليفي سواء أكان (I) أم (II) .

وقد لوحظ أن تركيز0.1 % أعطى نتائج جيدة وغير مختلفة عن التركيز0.2% المستخدم سابقاً من حيث التركيز اللوني وشكل الليف العضلي وتمييزه الى الطراز الأول (I) والطراز الثاني (II). وهذا يعني إمكانية استخدام نصف تركيز هذه المادة مما يؤدي الى مضاعفة عدد العينات المصبوغة باستخدام الكمية نفسها من NBT المستخدمة سابقاً .

المقدمة

ان الكيمياء النسيجية هي خليط من دراسات لشكل النسيج فضلاً عن الانزيمات الموجودة فيه حيث يتطلب ذلك استخدام المقاطع النسيجية المجمدة للحفاظ على حيوية هذه الانزيمات وفعاليتها (2,1). أكثر هذه الانزيمات أهمية هي انزيمات الأكسدة

والاختزال والتي تعد مهمة للخلية حيث تستخدم في أيض الكاربوهيدرات والسكريات وكوسيط في دورة كريبس حيث تقوم بنقل الألكترون من المادة الأساس الى المستقبل لغرض انتاج مركب الطاقة ATP (Adenosine tri phosphate) لذلك فان فحص مثل هذه الانزيمات يعطينا صورة واضحة حول مصدر الطاقة في العضلات (4,3)، ومن هذه الانزيمات المرافق الانزيمي NAD (Nicotin adenine dinucleotide) حيث يتألف من حوالي 12 سلسلة ببتيدية تتقبل ألكتروناً من NADH وتمرره عبر UQ (Ubiqinon) وهذا الأخير هو عبارة عن جزيئة دهن ذائبة صغيرة والتي تنقل ألكتروناتها الى المعقد الانزيمي التنفسي الثاني والذي يدعى (Complex C1) (5).

أي ان الـ NADH يعمل كحامل لامرار الألكترونات الى الأوكسجين (6) حيث يتم الكشف عنها باستخدام أملاح ذائبة هي (Nitrobluetetrazolium) NBT والتي تتحول الى مركبات لونية غير ذائبة تترسب بهيئة Formazan في أماكن فعالية الانزيم في المقطع العضلي (7). وبذلك صنفت الألياف العضلية الى طرازين وهي الطراز الأول (I) والطراز الثاني (II) حيث تكون متواجدة بنسب متساوية في العضلة الطبيعية الناضجة (8). يكون الطراز الأول (I) ذو قطر صغير ويعطي تفاعلاً قوياً جداً لتلك الانزيمات، أما الطراز (II) فعادة ما تكون أقطار أليافه أكبر من الأول وتعطي تفاعلاً ضعيفاً جداً لكل اختبارات الأكسدة ــ الاختزال (9).

ونظراً لصعوبة الحصول على مادة الـ NBT وغلاء ثمنها، فان استخدام تركيز 0.1 % يساعدنا في تصبيغ عينات عضلية أكثر باستخدام نفس كمية NBT المستخدمة سابقاً.

المواد وطرائق العمل

– **جمع العينات :** تم جمع عشر عينات عضلية من مرضى تم تشخيصهم سريرياً وبتخطيط العضلات على كونهم مصابين باعتلال العضلات الأولي من قبل اختصاصي الأمراض العصبية؛ من مستشفى حماد شهاب العسكري سبعة مرضى ، ومن مستشفى اليرموك التعليمي ثلاثة مرضى بالإضافة إلى خمس عينات عضلية من أصحاء (مرضى الكسور) في مستشفى الدكتور عبد المجيد.

– **تقطيع العضلات :** تم إخضاع المرضى لأجراء فحص الخزعة العضلية للتخدير الموضعي في مختبر العلوم العصبية في مستشفى حماد شهاب العسكري والتخدير العام في المستشفيات الأخرى.

أخذت قطعة من العضلات الهيكلية بحجم 1 × 0,5 × 0,5 سم تقريباً غمرت بحافظة النيتروجين السائل لمدة خمسة دقائق ثم قطعت إلى مقاطع بسمك 0,7 مايكروميتر بجهاز التقطيع الأنجمادي تحت درجة - 25 م^{O} ووضعت المقاطع بعدها على غطاء الشريحة الزجاجية cover – slip وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة عشرين دقيقة (10) ثم هيأت للفحصين التاليين :

- فحص النسيجي الاعتيادي بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين (H & E).
- فحص الكيمياء النسيجية لأنزيم NADH.

تم الفحص الأول كما مذكور في المصدر (10) أما الفحص الثاني فاستخدم نفس المصدر الأخير ولكن باستخدام ثمانية تراكيز مختلفة من NBT هي 0.2% - 0.18% - 0.16% - 0.14% - 0.12% - 0.1% - 0.08% - 0.06% . بالإضافة إلى استخدام تركيز 0.03غم بدلاً من 0.05 غم من مادة NADH، لتصبيغ الخز ع العضلية المأخوذة من المرضى والأصحاء.

النتائج والمناقشة

شخصت حالات الاعتلال العضلي سريرياً من قبل كادر طبي متخصص في المستشفيات المذكورة آنفا واعتمدت بعد ذلك طرائق الكيمياء النسيجية لتأكيد التشخيص، صبغة (H & E) أفادت في دراسة المظهر الكلي للخزعة العضلية وكذلك حجم الألياف وهي ضرورية لإكمال صورة الفحص بصبغة NADH (10) التي تظهر هذه الأخيرة الألياف العضلية باللون الأسود المزرق ويمكن تمييز طرز الألياف حيث إن طراز I يظهر لوناً غامقاً والطراز II أفتح لوناً.

لقد أضاف استخدام صبغات الكيمياء النسيجية معلومات دقيقة عن حالة الأنسجة العضلية لمرضى الاعتلال العضلي حيث إن استخدام صبغة H & E للتعرف على شكل وحجم وعدد الألياف العضلية ومواقع النوى والتمييز بين العضلات السليمة شكل (1) والعضلات المريضة إضافة إلى مدى تواجد الخلايا الالتهابية فيها والتي تظهر باللون

الأزرق الغامق شكل (2)، أي أنها تساعد على أن تكمل الصورة مــع صــبغة NADH حيث تعمل الأخيرة علــى اختزال مادة NBT مع أكسدة NADH حيث تترسـب مـادة NBT المختزلــة فــي مواقــع الأنــزيم NADH dehydrogenase المتواجـد فــي سايتوبلازم و مايتوكوندريا الليف العضلي فتكسبه اللون الأزرق وبدرجات لونية متفاوتــة معتمدة علــى نوع الليف العضلي. فالطراز I يبدو غامقاً وهذا دليل على تواجد عضيات المايتوكوندريا بكثرة فيه وقلتها في الطراز II الذي يبدو فاتح اللون (11 ، 12) حيــث يتواجد انزيم NADH dehydrogenase فــي المايتوكوندريا أكثر مما في السايتوبلازم (13). فالتراكيز المستخدمة بدءاً بـــ 0.2% شكل (3 و4) ووصولاً إلى 0.1% شــكل (5و6) أظهرت كلها تشابهاً واضحاً جداً ولم يختلف تركيز عن الآخر في إظهار الطراز I غامق اللون والطراز II فاتح اللون إضافة إلى نفس شدة اللون وتركيزه في كل تركيز من مادة NBT . ولكن التركيزين {0.08 % , 0.06 % }بدأت شدتهما وتركيزهمـا اللوني يخفت قليلاً قليلاً وبالتدريج حيث تظهر الألياف العضليــة بنوعيها تشابهاً في اللون وقلة في شدة هذا اللون مما يصعب تمييز الألياف إلى الطراز I والطراز II. وهذا إن دل علــى شيء فإنما يدل علــى إن تركيزي أل NBT (0.08% و 0.06% وما تحتهمـا) غير كــاف للتفاعل مع جزئيات الانزيم المتواجدة في مقطع الليف العــضلــي ولهــذا لا ينصح باستعمال هذين التركيزين لانهما لا يعطيان صورة واضحة عن أنمــاط الأليــاف العضلية.

بالإضافة إلى تقليل تركيز مادة NBT إلى 0.1% , تم تجربــة تقليــل تركيــز أل NADH حتى 0.03% باعتبار أن NADH يكون مرتبطاً مــع NBT حيــث يختــزل الثانــي نتيجة أكسدة الأول بفعل الأنزيم NADH dehydrogenase (11)،وتوضــح النتائج أعلاه بالجدول (1) .حيث يلاحظ أن التراكيز رقم (1-6) أعطت نفس الشدة اللونية للطرازين I وII، أما التركيز رقم (7) فقد بدأت شدة اللون تخفت في الطراز I وتصبح مقاربة لشدة اللون في الطرازII ولهذا يصبح من الصعب التمييز بينهما. وأصبح التركيز رقم (6) هو الأفضل بين التراكيز المختزلة.

فاستخدام هذه التراكيز المختزلــة أصبحت تمكننا من فحص مقاطع عــضلية مــضاعفة بنفس الكمية من NBT المستخدمة لصبغ نفس العدد في السابق.

المصادر

1. Dubowitz, V. and Paerse, A.G.E. (1960).Histochemie., 2 : 105 – 117.
2. Wallace, D.C. (1999). Science., 238 : 1482 – 88.
3. Hess, R. and Pearse, A.G.E. (1958). Proc. Soci. Exper. Biol. Med., 107 : 569 – 575.
4. Walton, J.N. (1981). Disorders of voluntary muscle. 4th ed, Chrchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New Yourk.
5. Zeviani, M. and Antozzi, C. (1997). Mol. Hum. Reprod., 3(2) :133 – 148.
6. sarast, M. (1999). de. Siecle. Science., 283 : 1488 – 1493.
7. Gregory, C.E. and Griffin, J. L. (1994). Enzyme histochemistry of skeletal muscle. In : Mikel, U.V. (1994). Advanced laboratory methods in histology and pathology. 3th. Armed Forces Institute of Pathology.Washington, D.C.
8. Kibrstis, P.A. (1999). Science., 183 : 1475 – 1486.
9. Reichman, H. ; Gold, R. and Boux, F. (1999).Eur. Heart. J., 12 suppl D : 169 – 70.
10. Hassun, A. H. (2001). Genetic and molecular study of patients with myopathy. Ph.D. Thesis, University of Baghdad.
11. Harper, H.A. ; Rodwell, V.W. and Mayes, P.A. (1979). Review of physiological chemistry. 17th. ed. Lange Medical Publications. Canada.
12. Zubay, G.(1993).Biochemistry .3rd.ed. W.M.C. Brown Communication, U.S.A.
13. Shoffiner , J.M. and Wallace, D.C. (1995). In the metabolic and muscular bases of inherited disease 7th ed. PP. 535 – 1610, Mc Graw – Hill U.S.A.

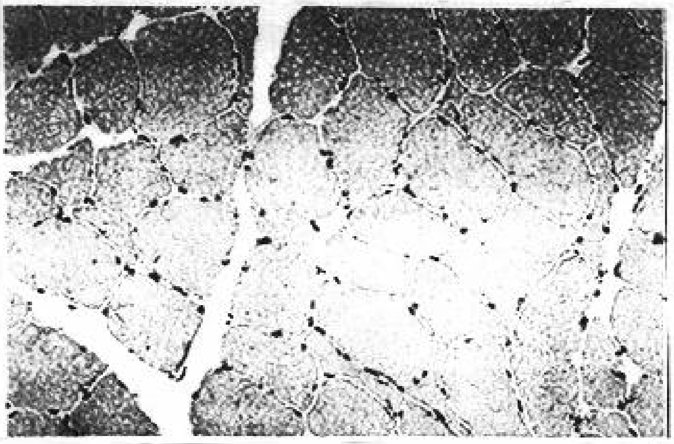
جدول (1) يبين تأثير تركيز مادة NBTو NADH على شدة اللون للانمــاط العــضلية Iو II

ت	تركيز NBT %	تركيز/غم NADH	شدة اللون، فعالية الصبغة	
			نمط I	نمط II
1	0.2	0.05	++++	++
2	0.18	0.05	++++	++
3	0.16	0.04	++++	++
4	0.14	0.04	++++	++
5	0.12	0.03	++++	++
6	0.1	0.03	++++	++
7	0.08	0.03	(+) (++)	+
8	0.06	0.02	(-)	(-)

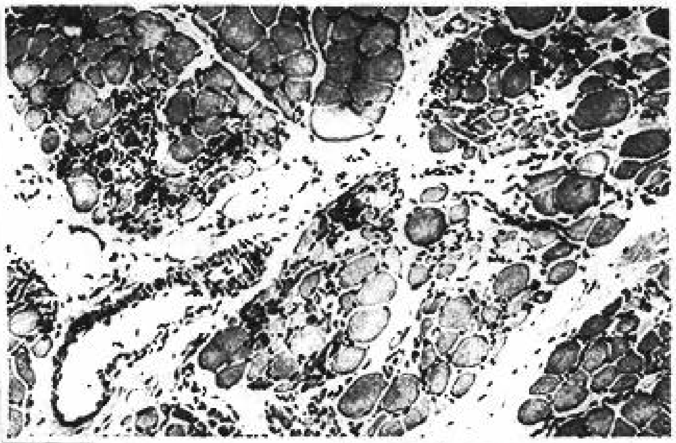
+ الشدة اللونية للصبغة.

- لاتوجد فعالية. (قسم من الاليـاف العـضلية مــن طــراز II غيــر مصبوغةوقــسم آخر صبغة باهتة جداً).

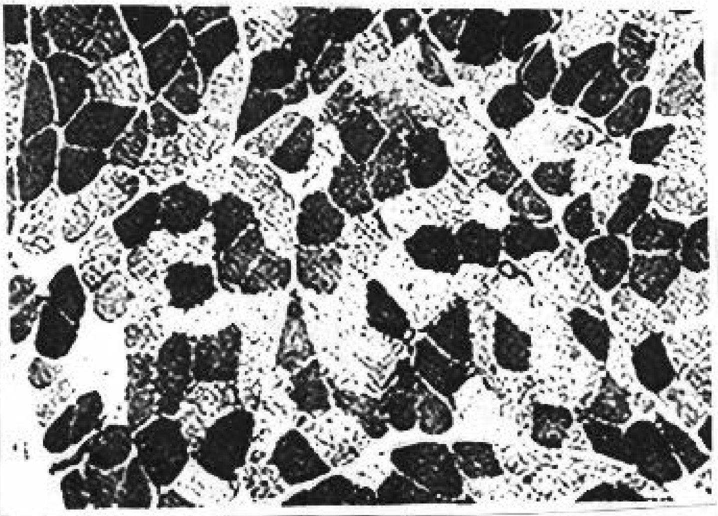
(+)، (++) قسم من الالياف العضلية مصبوغة بشدة (+) والاخرى بشدة (++) من نفس النوع.



شكل (1) عينة عضلية طبيعية مصبوغة (H&E) (قوة التكبير 20x)

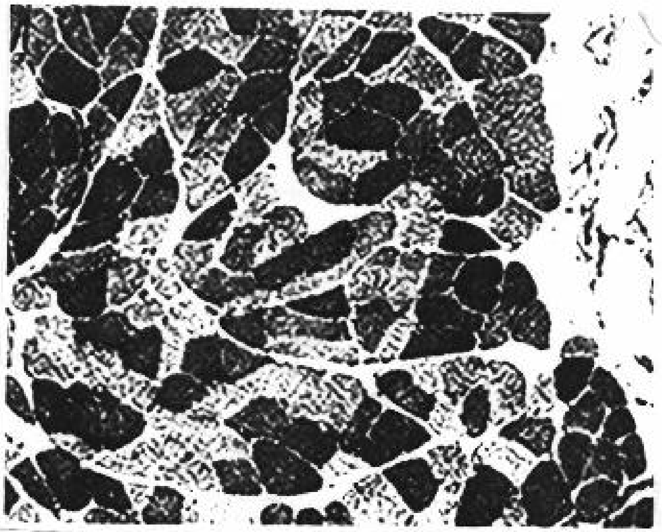


شكل (2) عينة عضلية مصبوغة (H&E) لمريض مصاب بأعتلال عضلي (قوة التكبير 20x)



شكل (3) عينة عضلية طبيعية مصبوغة بصبغة NADH بأستخدام تركيز NBT%0.2 و 0.05 غم NADH (قوة التكبير 20x)

شكل (4) عينة عضلية لمريض مصاب بأعتلال عضلي مصبوغة بصبغة NADH بأستخدام تركيز NBT%0.2 و 0.05 غم NADH (قوة التكبير 20x)



شكل (5) عينة عضلية طبيعية مصبوغة بصبغة NADH بأستخدام تركيز 0.1 %NBT و 0.03 غم NADH (قوة التكبير 20x)

شكل (6) عينة عضلية لمريض مصاب بأعتلال عضلي مصبوغة بصبغة NADH بأستخدام تركيز 0.1%NBT و 0.03 غم NADH (قوة التكبير 20x)

IBN AL- HAITHAM J. FOR PURE & APPL. SCI.   VOL.19 (4) 2006

A Modified Method for NADH Stain That is Used to Stain a Muscle Sample From Myopathic Patient

A. H. Hasoon
Department of Biology, College of Education, University of Baghdad

Abstract

This study aimed to use a new concentration from NBT (Nitroblue tetrazolium) which using NADH stain (by used eight different concentrations from (0.2% to 0.06%).

That stain is a mitochondrial and cytoplasmic histochemical stain which gives more information about the metabolic activity of muscle fiber, so it is valuable in determining the types of muscle fibers and good fiber differentiation type (I) and type (II) fibers), by reducing NBT in the location of enzyme and gives a blue color in different degrees according to the types of muscle fibers, and we noticed that the concentration 0.1% from NBT gives a good result and different from the concentration 0.2% that was used before. Which meaus that we can use this low concentration from NBT to stain a double samples from patient muscle samples by using the same concentration that was used before .