



Basic Medical Sciences Research Center
Histogenotech

Basic Medical Sciences Research Center Histogenotech Co., Tehran, Iran

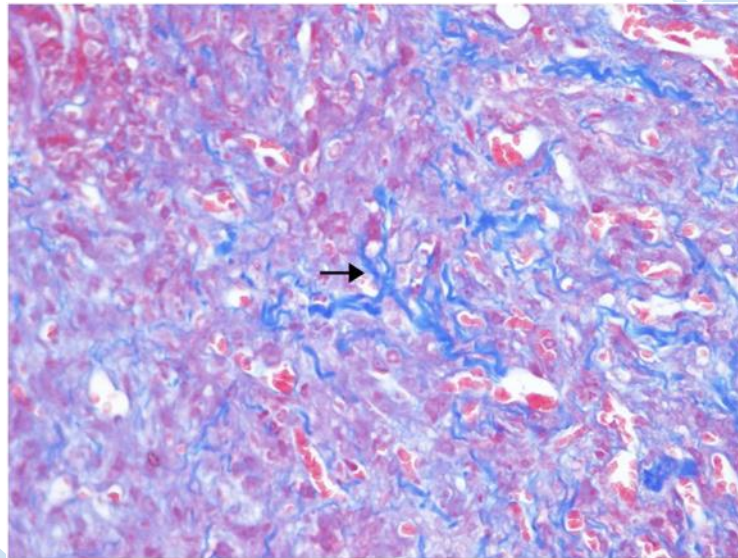
مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی
شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

آموزش جامع رنگ آمیزی اختصاصی تری کروماسون
(Trichrome masson) در آزمایشگاه بافت شناسی

- ۳..... *مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون در بافت‌شناسی
- ۴..... *تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون
- ۴..... *انواع کاربردهای رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون در بافت‌شناسی
- ۴..... *نگاهی اجمالی به پروتئین کلاژن رنگ شده با تری کروم ماسون
- ۵..... *انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون
- ۵..... *پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون در بافت‌شناسی
- ۶..... *تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون
- ۷..... *تفسیر نتایج رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون
- ۷..... بررسی میزان کلاژن به وسیله ی اسپکتروفتومتری
- ۸..... اندازه گیری کلاژن جهت بررسی میزان ترمیم استخوان
- ۱۰..... *ارائه خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون در آزمایشگاه بافت شناسی
- ۱۱..... *جمع بندی
- ۱۱..... *سوالات متداول

مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون در بافت‌شناسی

رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون، مهمترین و کاربردی ترین رنگ‌آمیزی اختصاصی در آزمایشگاه پاتولوژی و بافت‌شناسی برای اندازه‌گیری کلاژن و فیبر جهت بررسی و تشخیص بافت‌های همچون پوست، قلب، کلیه، کبد، عروق می‌باشد. رنگ تری کروم (Trichrome) از رایج‌ترین رنگ‌های انجام شده در آزمایشگاه بافت‌شناسی و دانشگاه‌ها جهت تحقیق و توسعه دانشجویان به حساب می‌آید. واژه تری کروم همانطور که از نام آن پیداست، از سه رنگ انتخابی و افتراقی تشکیل شده است. بنابراین برای انجام آن نیازمند استفاده از رنگ می‌باشد.



شکل ۱: رنگ‌آمیزی تری کروم برای نمایش و بررسی کلاژن

عمده این سه رنگ استفاده شده در تکنیک رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون شامل اول رنگ هماتوکسیلین که بواسطه آن هسته‌ها با همون مایر یا هماتوکسیلین توسط هریس رنگ می‌گیرند، دوم رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم توسط مخلوط دقیق اسید فوشین و کولورت قرمز که رنگهای اسیدی هستند و در نهایت رنگ‌آمیزی انتخابی کلاژن با لایت گرین (light green) و گاهی اوقات با آبی آنیلین (Aniline Blue) می‌باشد. ایاف کلاژن با استفاده از میکروسکوپ نوری و رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون یا با استفاده میکروسکوپ فلورسانس و رنگ‌های نشاندار ایمونو فلورسانس مشاهده می‌شوند. البته برخی کیت‌ها تری کروم برای دقت بالاتر در رنگ‌آمیزی کلاژن از مواد بیشتری نیز استفاده می‌کنند.

تاریخچه رنگ آمیزی تری کروم ماسون

اولین زمان استفاده از رنگ سه تایی در این تکنیک جهت افزایش مقایسه و بهبود شناسایی به سال ۱۸۸۰ بر می‌گردد. یکی از متدهای اولیه رنگ آمیزی بافت ها برای هیستولوژی توسط Claude Pierre Masson توسعه یافته است. دستور العمل های رنگ آمیزی تخصصی تری کروم ماسون تکامل یافته از فرمول اصلی (Claude L. Pierre Masson (1880-1959) کاربردهای خاص متفاوتی دارند، اما همه برای تشخیص سلول ها از بافت همبند اطراف مناسب هستند.

انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون در بافت شناسی

رنگ آمیزی تری کروم ماسون جهت تشخیص و شناسایی کلاژن از ماهیچه استفاده می‌گردد و در تشخیص تغییرات فیبری مانند تغییرات در سیروز کبدی و بیماری های کلیوی کمک می‌کند. این تکنیک جهت تمایز و تشخیص تومورهایی که منشا آنها سلولهای ماهیچه ای مشتق شده از فیبروبلاست ها است نیز کاربرد دارد. علاوه بر این تکنیک رنگ آمیزی تری کروم ماسون برای مطالعه و بررسی پاتولوژی های عضلانی (دیستروفی عضلانی)، آسیب شناسی قلبی (انفارکتوس)، آسیب شناسی کبدی (سیروز) یا آسیب شناسی کلیه (فیروز گلومرولی) در آزمایشگاه های پاتولوژی تشخیصی و تحقیقاتی توسط پاتولوژیست ها، پژوهشگران و اساتید حوزه های بیولوژی، پیراپزشکی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نگاهی اجمالی به پروتئین کلاژن رنگ شده با تری کروم ماسون

کلاژن (Collagen) پروتئینی است که در محیط خارج از سلولی موجودات مختلف سنتز شده و به صورت رشته های کلاژن مشاهده می‌گردد. سنتز و تولید کلاژن توسط سلول های استئوبلاست در استخوان، سلولهای کندروبللاست غضروف، سلول های ماهیچه صاف موجود در دیواره رگ های خونی و سلولهای اپیتلیال انجام می‌شود. عمدتاً اسید آمینه های موجود در کلاژن ها یکسان است. کلاژن در کلیه انواع بافت های پیوندی بجز خون موجود می‌باشد.

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون

رنگ‌آمیزی تری کروم برای بافت‌های فریز شده و بیوپسی‌های کبد و کلیه استفاده می‌گردد. بافت‌های فیکس شده

در فرمالین نیز کاربرد دارد.

در این مقاله به یکی از پروتکل‌های ستاپ شده رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون می‌پردازیم.

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون در بافت‌شناسی

مراحل رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون به این صورت می‌باشد.

۱. مقاطع بافتی با ضخامت ۵ میکرومتر به وسیله‌ی دستگاه میکروتوم برش زده شده و بر روی لام‌های میکروسکوپی استاندارد قرار داده می‌شوند. لام‌ها را با استفاده از درجات نزولی الکل، به آب رسانده (آبدهی)، سپس در محلول بوئن به مدت یک ساعت در فور ۵۶ درجه قرار داده می‌شوند.

۲. لام‌ها را با آب جاری شستشو داده تا زردی بوئن گرفته شود. سپس با آب مقطر شستشو و به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه محلول همتوکسیلین وایگرت روی بافت ریخته می‌شود.

۳. لام‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با آب جاری و بعد از آن با آب مقطر شستشو و مجدد به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در جار رنگ‌آمیزی لام حاوی محلول ببریچ اسکارلت - اسید فوشین قرار داده می‌شوند. پس از شستشو با آب مقطر، حدود ۱۰-۱۵ دقیقه محلول اسید فسفوتنگستیک و اسید فسفومولیبیدیک را روی لام ریخته و به مدت ۲۵-۳۰ دقیقه داخل محلول آنیلین بلو قرار گرفته می‌شود.

۴. نمونه‌ها با آب مقطر شسته و حدود ۵-۲ دقیقه در محلول اسید استیک ۱٪ آغشته می‌شوند. در انتها لام‌ها را با آب مقطر شستشو داده و آن‌ها را با الکل آبگیری و پس از گذراندن از زایلن، لامل را با چسب اتلان می‌چسبانیم و با میکروسکوپ نوری بررسی می‌کنیم.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی الیزارین رد مواد مورد نیاز

- اتانول مطلق
- آب مقطر
- محلول بوئن
- زایلن
- هماتوکسیلین و ایگرت
- محلول اسید استیک ۱٪
- اسید فسفوتنگستیک
- اسید فسفومولبیدیک
- محلول آنیلین بلو
- محلول ببریج اسکارلت - اسید فوشین
- چسب انتلان

تجهیزات مورد نیاز

- میکروسکوپ نوری
- دستگاه میکروتوم
- جار رنگ آمیزی لام
- لام و لامل
- فور

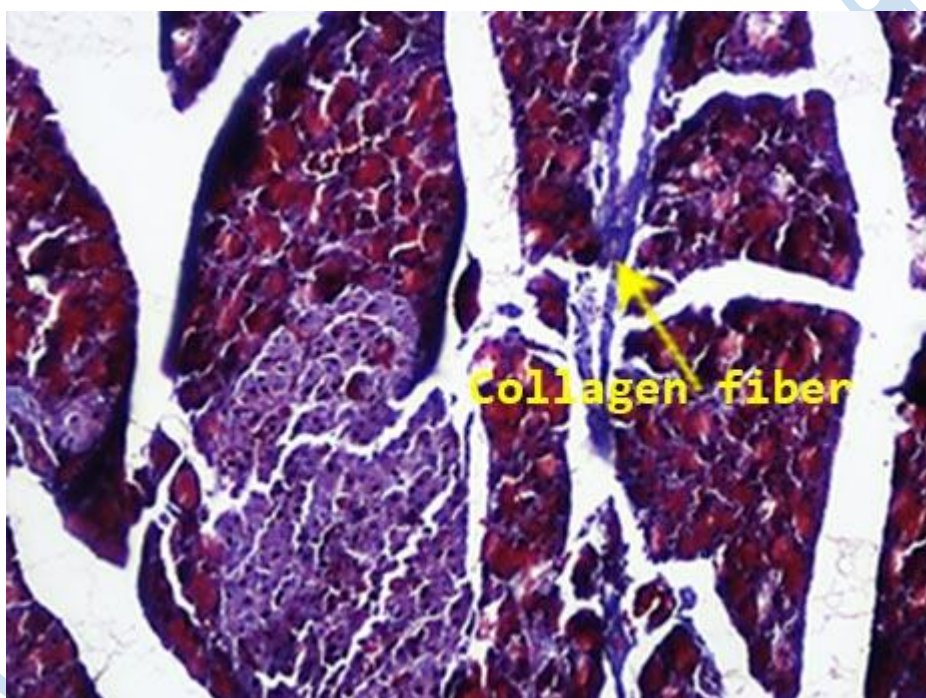
جهت مطالعه بیشتر، تجهیزات عمومی و تخصصی در آزمایشگاه بافت شناسی را کلیک کنید.

تفسیر نتایج رنگ آمیزی تری کروم ماسون

نتایج رنگ آمیزی تری کروم ماسون در تمام لام های رنگ آمیزی شده مطالعه بافت شناسی و آزمایشگاه پاتولوژی به این صورت

است که :

- ✓ فیبرهای ماهیچه ای به رنگ قرمز
- ✓ کلاژن و استخوان را به رنگ آبی یا سبز
- ✓ سیتوپلاسم را به رنگ قرمز روشن یا صورتی
- ✓ هسته ها را به رنگ بنفش تیره رو به سیاه رنگ آمیزی می شوند.

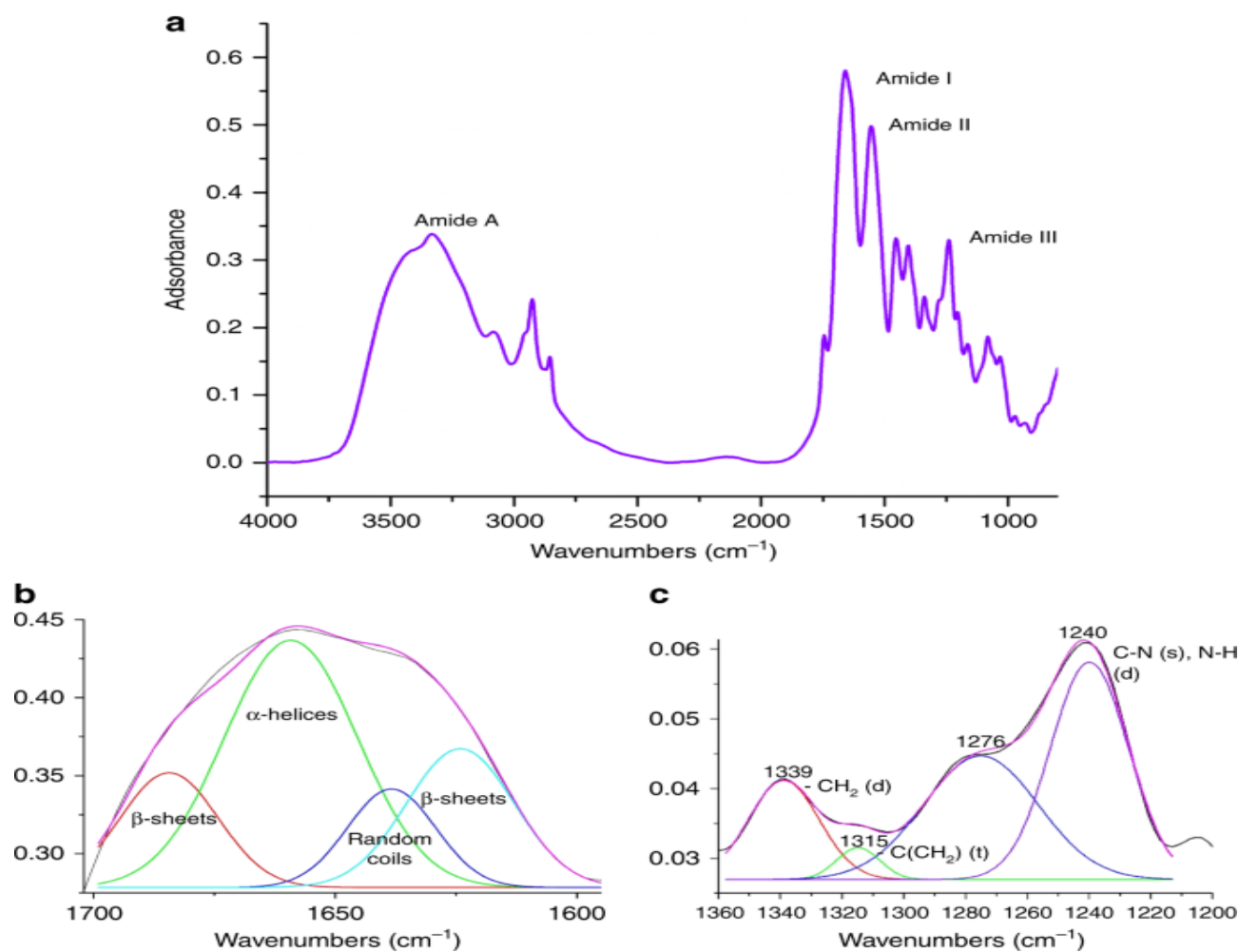


شکل ۲: رنگ آمیزی تری کروم ماسون بافت پانکراس

بررسی میزان کلاژن به وسیله ی اسپکتروفتومتری

سنجش هیدروکسی پرولین مبتنی بر اسپکتروفتومتری یکی از محدود سنجش هایی است که امکان کمی سازی واقعی محتوای کلاژن و غلظت آن در چندین اندام از جمله کلیه را فراهم می کند. این سنجش برای اولین بار در سال ۱۹۵۰ معرفی شد، اساس این روش بر این پایه است که همه انواع کلاژن دارای دامین های کروی هستند و موتیف ساختاری مشترک بخش های مارپیچ سه گانه را دارند. این ساختار مارپیچ سه گانه از سه زنجیره α تشکیل شده است که از ۱۰ تا ۱۵۰ کیلو دالتون در هر زنجیره متغیر است.

هر زنجیره از یک توالی اسید آمینه سه گانه تکرار شونده $(\text{Gly-X-Y})_n$ تشکیل شده است که X و Y می توانند هر اسید آمینه ای باشند، اما اغلب به ترتیب پرولین و هیدروکسی پرولین هستند. کلاژن یکی از معدود پروتئین های حاوی اسید آمینه هیدروکسی پرولین است. بنابراین، بر اساس کمیت مطلق هیدروکسی پرولین (که درصد ثابتی از ترکیب اسید آمینه کلاژن در اکثر اندام های پستانداران را نشان می دهد)، می توان میزان محتوای کلاژن و غلظت آن در بافت ها را به دست آورد.



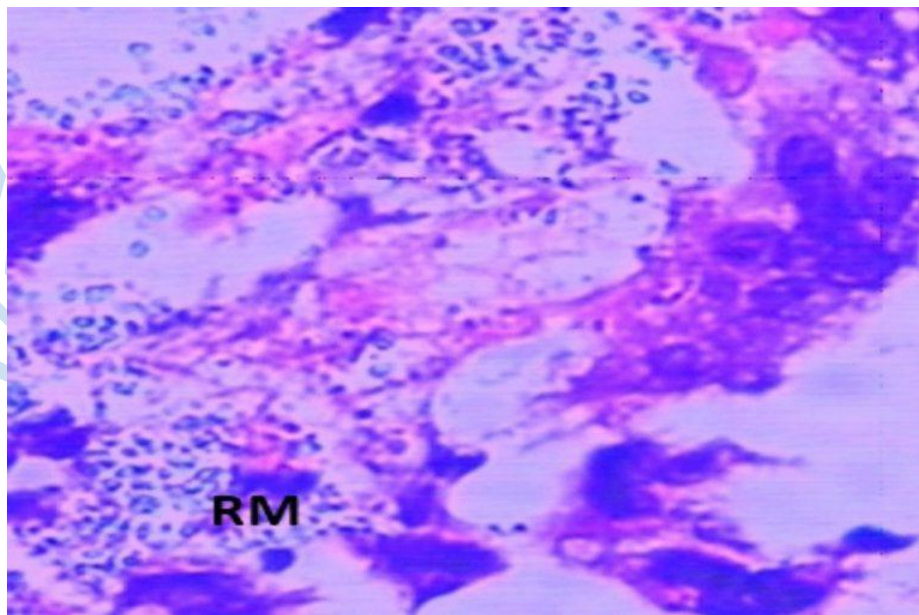
شکل ۳: جداسازی و تفکیک هیدروکسی پرولین مبتنی بر طیف سنجی جرمی کلاژن نوع II (Isolation and mass spectrometry)

اندازه گیری کلاژن جهت بررسی میزان ترمیم استخوان

استخوان بافتی حاوی کلاژن است که در طول چرخه زندگی فرد برای سازگاری با استرس مکانیکی و حفظ یکپارچگی بافت های اسکلتی بازسازی می شود. عدم تعادل بین تحلیل استخوان و تشکیل استخوان در پوکی استخوان، نقایص استخوانی همراه با

ترومای شدید، برداشتن جراحی و ناهنجاری‌های مادرزادی همگی به جایگزین‌هایی برای معکوس کردن روند تحلیل استخوان و بازسازی استخوان‌ها نیاز دارند. رویکردهای سنتی ترمیم استخوان عمدتاً بر استفاده از پیوندهای استخوانی از منابع اتولوگ، آلوژنیک تمرکز دارند. با این حال، چندین عارضه مانند عوارض ناحیه اهداکننده، رد سیستم ایمنی میزبان و انتقال بیماری، کاربرد این پیوندهای استخوانی را محدود می‌کند و انگیزه ایجاد مواد زیست سازگار مصنوعی از جمله سرامیک‌ها، پلیمرها، فلزات و کامپوزیت‌ها را فراهم می‌کند. بیوسرامیک‌های فسفات کلسیم، مانند هیدروکسی آپاتیت (HA) و تری کلسیم فسفات، به دلیل زیست سازگاری، امکان ترمیم بافت استخوانی در مجاورت بیوسرامیک‌ها و شباهت شیمیایی به فاز معدنی استخوان‌های انسان، به طور گسترده‌ای به عنوان داربست‌های موقت برای بازسازی استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرند.

ارزیابی ترمیم استخوان با استفاده از بیوسرامیک هیدروکسی آپاتیت میکرو متخلخل دو فازی کلسیم فسفات و بتاتری کلسیم فسفات در طرح‌های پژوهشی که در آنها ترمیم استخوان به وسیله مواد زیست سازگاری مانند بیوسرامیک‌های فسفات کلسیم، مانند هیدروکسی آپاتیت (HA) و تری کلسیم فسفات استفاده می‌شود شباهت شیمیایی به فاز معدنی استخوان‌های انسان مدنظر پژوهشگران است با این حال، کاربردهای بالینی این پژوهش‌ها با چالش‌هایی همچون انعطاف پذیری پلیمرهای آلی، ریزساختارهای استخوان‌ها و نرخ تخریب مناسب روبرو است.



شکل ۴: ارزیابی ترمیم استخوان با استفاده از بیوسرامیک هیدروکسی آپاتیت میکرو متخلخل دو فازی کلسیم فسفات و بتاتری کلسیم فسفات

ارائه خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون در آزمایشگاه بافت شناسی

سلول‌های هر بافتی از بدن موجود زنده یک یا چند رنگ‌آمیزی اختصاصی خود را دارد که مطالعه و بررسی بافت را در مسیر تحقیقات در زمینه بیماری‌های مختلف آسان می‌کند. لازم به ذکر است یکی از خدمات ارائه شده در بخش پاتولوژی شرکت بافت و ژن پاسارگاد، رنگ‌آمیزی‌های تخصصی انواع بافت‌های انسانی و حیوانات آزمایشگاهی می‌باشد که با تجهیزات آزمایشگاهی استاندارد و باکیفیت‌ترین مواد توسط کارشناسان باتجربه انجام می‌شود.

مواد موجود در کیت‌ها تری کروم هیستوژنوتک یا بافت و ژن پاسارگاد شامل :

- ✓ محلول بوئن
- ✓ محلول هماتوکسیلین و ایگرت
- ✓ محلول ببریج اسکارلت-اسید فوشین
- ✓ محلول اسیدفسفوتنگستیک و اسیدفسفومولیبديک
- ✓ محلول آنیلین بلو

آزمایشگاه بافت‌شناسی هیستوژنوتک با استفاده از تجهیزات مطابق با استانداردهای آزمایشگاهی در ارائه خدمات رنگ‌آمیزی عمومی و اختصاصی بافت‌شناسی آماده همکاری با محققان، دانشجویان، اساتید می‌باشد. با ارائه نتایج آنالیز شده، کلیپ‌های آموزشی و پروتکل‌های رنگ‌آمیزی آماده خدمت‌رسانی است. آزمایشگاه بافت‌شناسی هیستوژنوتک قادر است کلیه مراحل صفر تا صد رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی بافت را روی کلیه بافت‌های حیوانی و انسانی ارسال شده از سوی محققان و آزمایشگاه‌های تشخیصی پزشکی پاتوبیولوژی انجام دهد.

جمع بندی

رنگ آمیزی تری کروم ماسون (Masson's trichrome) در آزمایشگاه های بافت شناسی و پاتولوژی یکی از پر اهمیت ترین و کاربردی ترین رنگ آمیزی های بافت شناسی جهت تشخیص تمایز فیبرهای عضلانی و کلاژن در مطالعات گوناگون درمانی برای پاتولوژیست ها و طرح های پژوهشی و پایان نامه ای برای دانشجویان می باشد. رنگ آمیزی تری کروم ماسون تمایز بین کلاژن و ماهیچه صاف در تومورها و افزایش کلاژن در بیماری هایی مانند سیروز استفاده می شود. در بافت شناسی برای تمایز فیبرهای عضلانی و کلاژن در مطالعه آسیب شناسی بافت های قلب (انفارکتوس)، کبد (سیروز)، کلیه (فیبروز گومرولی) استفاده می شود.

این روش همچون دیگر انواع تکنیک های بافت شناسی، نیاز به دقت و تجربه بسیار بالا و همچنین تجهیزات مناسب می باشد تا بتواند نتایج معتبر در پی داشته باشد. شرکت بافت و ژن پاسارگاد با داشتن آزمایشگاه بافت شناسی مجهز و کادری مجرب، می تواند به آزمایشگاه های پاتولوژی و همچنین دانشجویان و اساتید جهت به سرانجام رساندن طرح های پژوهشی در انجام آزمایشات پایان نامه ای در محیط مناسب کمک کند.

سوالات متداول

۱. رنگ آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون برای رنگ نمودن کدام نمونه های بافتی استفاده می شود؟
رنگ آمیزی تری کروم ماسون جهت رنگ آمیزی کلاژن موجود در بافت هایی مانند پوست، قلب، کلیه، کبد و عروق کاربرد دارد.
۲. رنگ آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون برای مطالعه کدام بیماری ها کاربرد دارد؟
این رنگ آمیزی برای بررسی و تشخیص بیماری هایی همچون سیروز کبدی، آسیب شناسی قلبی، دیستروفی عضلانی کاربرد دارد.

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی
شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

Email: histogenotechlab@gmail.com

www.histogene.ir

www.histogene.co

   ۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱