



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 رنگ‌آمیزی اختصاصی گلژی (Golgi)  
در آزمایشگاه بافت شناسی

- ۳..... \*مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی گلژی در بافت شناسی
- ۳..... \*تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی گلژی
- ۴..... \*انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی گلژی در بافت شناسی
- ۵..... \*نگاهی اجمالی به دستگاه عصبی رنگ شده با نقره
- ۶..... \*انواع نمونه های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ آمیزی اختصاصی گلژی
- ۶..... \*پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی گلژی در بافت شناسی
- ۷..... \*مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی گلژی
- ۸..... \*مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی گلژی
- ۹..... \*تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی گلژی
- ۱۰..... \*تفسیر نتایج رنگ آمیزی گلژی
- ۱۱..... \*ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی گلژی در آزمایشگاه بافت شناسی
- ۱۲..... \*جمع بندی
- ۱۲..... \*سوالات متداول

## مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی نقره در بافت‌شناسی

رنگ‌آمیزی اختصاصی گلژی یا همان رنگ‌آمیزی اختصاصی نقره شامل روش‌های متنوع رنگ‌آمیزی است که بر اساس اصول مختلفی پایه‌گذاری شده است. پنج گروه از رنگ‌های نقره‌ای که توسط روش‌های فیزیکوشیمی تعریف شده‌اند، در این نوع از رنگ‌آمیزی دخیل هستند. این پنج دسته بندی عبارتند از روش‌های *argyrophil argentaffin*، رنگ‌های *impregnation*، اکسیداسیون-کاهش نقره (*silver oxidation-reduction*) (رنگ‌آمیزی قارچ، ریکولوم و باکتری)، برهمکنش‌های متالیک-متالیک، برای مثال سلول‌های نورواندوکرین با تکنیک‌های *argyrophil* و *argentaffin* و شناسایی شده در حالی که آکسون‌ها، گره‌های عصبی فیبریلاری و پلاک‌های وابسته به پیری با تکنیک‌های اشباع نقره (*impregnation*) تشخیص داده می‌شود.

رنگ‌آمیزی نقره از حساس‌ترین روش‌های رنگ‌سنجی جهت تشخیص پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در نمونه‌های بیولوژی است. این تکنیک شامل رسوب نقره فلزی روی سطح ژل در محل باندهای پروتئینی است. یون‌های نقره (از نیترات نقره موجود در معرف رنگ‌آمیزی) با گروه‌های عملکردی پروتئین خاصی برهم‌کنش داده و متصل می‌شوند.

### تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی گلژی

یافتن نقره نیترات جهت رنگ‌آمیزی مواد ارگانیک به قرن ۱۲ میلادی برمی‌گردد اما استفاده از نقره نیترات از اواخر قرن ۱۹ در تحقیقات علمی گسترده‌تر شد. حدوداً در همین زمان، استفاده از نقره در رنگ‌آمیزی بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. سپس در دهه ۱۹۷۰، *Kerenyi* و *Gallyas* این تکنیک را به عنوان روشی حساس جهت یافتن مقادیر پروتئین‌ها با ژل معرفی کرده‌اند. رنگ‌آمیزی کوماسی بلو معمولاً برای یافتن باندهای پروتئینی تا ۵۰ نانوگرم کاربرد دارد در حالی که رنگ‌آمیزی نقره تا ۵۰ برابر این مقدار هم شناسایی می‌کند.

*Camillo Golgi* پاتولوژیست ایتالیایی رنگ‌آمیزی نقره را برای مطالعه سیستم عصبی مرکزی ستاپ کرد. متد گلژی تعداد محدودی از سلول‌ها را رنگ‌آمیزی می‌کند. *Ramón y Cajal* و *Camillo Golgi* برنده جایزه نوبل به خاطر همکاری‌شان در نورواناتومی با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی نقره شدند. با تکنیک *Golgi silver*

impregnation مورفولوژی سه بعدی سلولهای عصبی را نشان دادند. این متد بر اساس تشکیل رسوب های داخل سلولی مات نقره کرومات حاصل از برهمکنش دی کرومات پتاسیم و نقره نیترات می باشد. در سال ۱۸۷۳، Camillo Golgi نشان داد که بافت مغز به پتاسیم دی کرومات نسبت به نقره نیترات مقاومتر است به همین علت از نیترات نقره در رنگ آمیزی استفاده شد و سبب انقلابی در نوروساینس و علوم اعصاب گردید. یک درصد کمی از نوروها با نقره آغشته شدند و با کیفیت ترین جزئیات از آکسون و دندریتها قابل مشاهده گردید و و نهایتا ثابت شد که ساختار پایه ای سیستم عصبی مرکزی دندریت ها و آکسونها هستند.

## انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی گلژی در بافت شناسی

این نوع از رنگ آمیزی و نقره کاربردهای متنوع در آزمایشگاه های تشخیصی و تحقیقاتی دارد. از جمله کاربردهای آن عبارتند از:

- کاربرد رنگ آمیزی نقره در پاتولوژی: رنگ آمیزی نقره روشی میکروسکوپی نوری برای تشخیص و ردیابی degeneration عصبی است که بر اساس حقیقتی که نورونهای در حال degeneration آرژیروفیل می شوند یعنی اینکه میل به ترکیب با نقره دارند. رنگ آمیزی نقره در پاتولوژی با نام رنگ آمیزی گلژی شناخته شده است که بیش از یک قرن است برای مشاهده و بررسی دقیق سلولهای عصبی مورد استفاده قرار گرفته است.

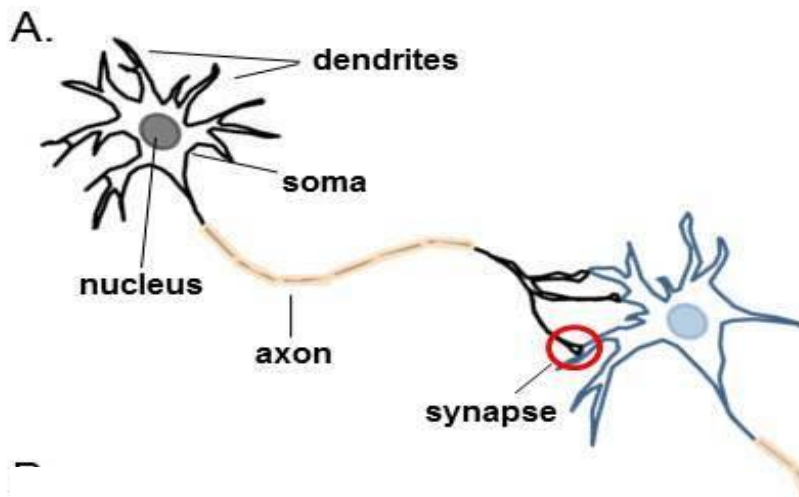
### در این مقاله سعی بر این است به کاربرد رنگ آمیزی نقره در پاتولوژی و نوروساینس پرداخته شود.

- کاربرد رنگ آمیزی نقره در بخش پروتئومیکس و ژنومیک: رنگ آمیزی نقره به قابل رویت شدن هدفهای موردنظر از جزئیات داخل و خارج سلولی مانند DNA و پروتئین ها از جمله کلاژن نوع ۳ و فیبرهای رتیکولوم از طریق رسوب پارتیکل های نقره متالیک روی هدف ها با تکنیک ژل الکتروفورز کمک می کند. یونهای نقره از نقره نیترات با گروه های عملکردی پروتئین ها برهمکنش می دهند. قوی ترین برهمکنشها با گروه کربوکسیلیک اسید (Glu و Asp)، ایمیدازول (His)، آمین ها (Lys) پروتئین ها با یونهای نقره اتفاق می افتد. یافتن پروتئین ها در حد نانوگرم بر اساس الکتروفورز با رنگ آمیزی نقره نیترات انجام می شود که در نهایت منجر به دقیق ترین بررسی سلول های مغزی، آکسون، دندریت، خارهای دندریتی (درخت زندگی) می باشد.

- کاربرد رنگ آمیزی نقره در میکروبیولوژی و قارچ شناسی: در تشخیص های میکروبیولوژی، جهت رنگ آمیزی باکتری های متنوع مانند سودوموناس (*Pseudomonas*)، *Bartonella Legionella* و *Treponema* و قارچ ها از قبیل *Candida*، *Cryptococcus*، *Pneumocystis* با استفاده از رنگ های نقره *impregnation* رنگ آمیزی باکتری هایی انجام می شود که با روش های دیگر رنگ آمیزی دیگر به سختی رنگ آمیزی می شوند.
- کاربرد رنگ آمیزی نقره در آزمایشگاه ژنتیک پزشکی: کاربرد دیگر رنگ آمیزی نقره در آزمایش کاربوتایپ می باشد. نقره نترات پروتئین مناطق سازمان دهنده هسته ای NOR (Nucleolar organization region) رنگ می کند. کروموزوم های انسانی شماره ۲۱، ۱۵، ۱۴، ۱۳ و ۲۲ ناحیه NOR را دارند. برخی از این پروتئین ها، پروتئین های غیر هیستونی نقره دوست (Ag-NOR proteins) هستند که به یه یونهای نقره متصل شده و سبب رسوب نقره در این نواحی می شود.

### نگاهی اجمالی به دستگاه عصبی رنگ شده با نقره

دستگاه عصبی شامل مغز، نخاع، دستگاههای حسی و عصب های اندام های مختلف بدن می باشد. مغز و نخاع جز دستگاه عصبی مرکزی (CNS) و اعصاب و اندام های حسی جز دستگاه عصبی محیطی (PNS) محسوب می شوند. دستگاه عصبی محیطی اطلاعات را از مرکز کنترل به سمت عضلات، غدد و اندامها هدایت کرده و عملکرد آنها را تنظیم می کند. دستگاه عصبی از نورونها یا سلولهای عصبی و سلولهای نوروگلیا تشکیل شده است. مورفولوژی نورونها به علت داشتن زائده های سلولی بلند به نام آکسون نسبت به سلولهای دیگر بدن متفاوت است که با داشتن آنها در انتقال سیگنالهای الکتروشیمیایی به قسمت های مختلف بدن نقش دارند. سلولهای گلیال یا نوروگلیا به عنوان سلول کمک کننده در دستگاه عصبی ایفای نقش می کنند. هر سلول عصبی حدودا با ۱۰ تا ۶۰ سلول گلیال احاطه شده و در محافظت، تغذیه و عایق نورونها عمل می کند.



شکل ۱: در تصویر ، قسمت های مختلف یک سلول عصبی مشاهده می شود.

برای آشنائی با سایر رنگ آمیزی های مرتبط با مغز کلیک کنید

## انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی گلژی

تکنیک رنگ‌آمیزی نقره و گلژی روی سلولهای عصبی بافت های سیستم عصبی مرکزی (مخ، مخچه) انجام می‌شود.

نمونه های بافتی می‌تواند به صورت تازه (fresh)، فریز شده، فیکس شده با پارافین یا فرمالین از بخشی یا کل مغز باشد.

## پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی گلژی در بافت‌شناسی

پروتکل های رنگ‌آمیزی اختصاصی گلژی در پاتولوژی متنوع می باشند که اساس و پایه کلیه پروتکل ها یکسان است.

در تست رنگ‌آمیزی گلژی در سیستم عصبی غلظت ها و کیفیت مواد مورد استفاده بسیار مهم می باشد چرا که در این تست

فقط تعداد اندکی از میان انبوه نورونها رنگ‌آمیزی شده و در نتیجه سبب مطالعه دقیق مورفولوژی نورونها می شود.

در این مقاله به یکی از پروتکل های رنگ‌آمیزی گلژی می پردازیم.

## مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی گلژی

۱. استخراج و فیکس کردن بافت هدف: اولین مرحله انجام تست رنگ آمیزی گلژی، آماده سازی نمونه بیولوژیکی است. آماده سازی و کیفیت نمونه در مطالعه مورفولوژی سلولهای عصبی نمونه هدف نقش مهمی ایفا می کند. منبع نمونه بافتی متنوع است که می تواند از روش بیوپسی، جراحی، مدل حیوانی و یا اتوپسی (autopsy) تهیه شده باشد. در سه نوع اول، بافت تازه را در اختیار پاتولوژیست قرار داده ولی در روش اتوپسی حداکثر تا دو ساعت بعد از مرگ موجود هدف، بافت تهیه می شود. بنابراین می بایست فوری بافت تهیه شده به روش اتوپسی را جهت جلوگیری از تجزیه آنتی ژن، فیکس کرد. بنابراین بافت مورد مطالعه می تواند فیکس شده با پارافین جامد، محلول فرمالدئید یا فریز شده باشد. اکثر بافت های مورد استفاده در تکنیک رنگ آمیزی تازه (fresh) هستند.

نکته: اگر نمونه مورد مطالعه مغز کامل مثلاً مغز رت باشد، می بایست پس از خارج کردن مغز از جمجمه، آن را با تیغ جراحی به قطعات ۵ الی ۱۰ میلی متر تقسیم کرده و سپس با آب مقطر به آرامی شستشو داده تا بافت عاری از خون گردد. بلوکهای بافتی با ضخامت کمتر از یک سانتی متر را در فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت یا بیشتر انکوبه می کنیم.

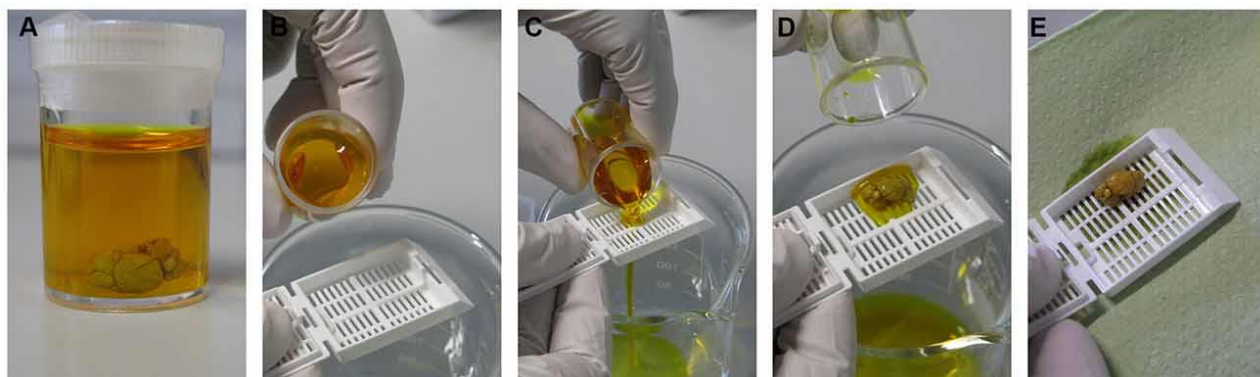
۲. نمونه مورد نظر را در محلول اشباع (impregnation) تهیه شده در جار رنگ آمیزی حاوی کیت رنگ آمیزی گلژی غوطه ور می کنیم و به مدت دو هفته در مکان تاریک و در دمای محیط انکوبه می کنیم. برای هر ۳ سانتی متر بافت مغز، حداقل ۵ سی سی از محلول اشباع در نظر می گیریم. محلول اشباع می بایست تازه تهیه شود.



شکل ۲. نمونه مغز تازه حیوان آزمایشگاهی (هیستونوتک)

روش دیگر بری این مرحله بدین صورت است که نمونه های بافتی را در پتاسیم بی کرومات ۳٪ به مدت ۳ تا ۷ روز در دمای محیط و در مکان تاریک انکوبه کرده و پس آن تیشو بسکت های حاوی نمونه ها را به محلول نقره نترات انتقال داده و یک تا سه روز انکوبه می کنیم. کیفیت نقره نترات و زمان انکوباسیون بسیار مهم می باشد و می بایست این زمان ستاپ شود.

۳. پس از ۲۴ ساعت انکوبه، محلول اشباع استفاده شده را با محلول جدید جایگزین می کنیم و ظرف حاوی نمونه را کمی تکان می دهیم. بهتر است هر چند روز یک بار نمونه ها را به آرامی تکان دهید. مدت زمان انکوبه می تواند تحت تاثیر اندازه بافت قرار گیرد هر چه سایز بافت نمونه بزرگتر باشد، زمان انکوباسیون بیشتر می شود.



شکل ۳: نحوه انتقال نمونه مغز به تیشو بسکت و همچنین تعویض محلول اشباع در تکنیک رنگ آمیزی گلژی (هیستونوتک)

۴. اکنون نمونه های مغز درون تیشو بسکت ها را روی دستمال کاغذی قرار داده و سپس پارافین ذوب شده را در قالب ها می ریزیم به گونه ای که نمونه های مغز را بپوشاند و پس از بسته شدن پارافین، اضافه های آن را برش می زنیم.

۵. اکنون از قالب های پارافینی نمونه های مغز برش های نازک و با کیفیت با استفاده از دستگاه میکروتوم تهیه می کنیم.

۶. قطعات برش زده را به لام انتقال می دهیم. پس از چسبیدن برش بافت به لام، بایستی پارافین را از بافت جدا کنیم که نیاز به آبدهی بافت می باشد. مرحله آبدهی برعکس مرحله آبدهی انجام می شود. از غلظت های زیاد به کم اتانول استفاده می کنیم. ۷. لام ها را در زایلین به مدت ۵ دقیقه قرار می دهیم و سپس لام ها را دو مرتبه و هر بار به مدت ۳ دقیقه در اتانول ۱۰۰ درصد و سپس یک بار و به مدت ۳ دقیقه در هر یک از غلظت های ۵۰، ۷۰ و ۹۵ اتانول قرار می دهیم. نهایتاً اجازه می دهیم بافت ها به مدت یک شب در دمای اتاق خشک شوند.

### مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی گلژی

۱. پس از خشک شدن لام ها، آنها را رنگ آمیزی می کنیم. به این ترتیب که لام ها را دو مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه در آب دیونیزه انکوبه می کنیم.

۲. سپس در اتانول ۵۰ درصد به مدت ۵ دقیقه انکوبه می کنیم.

۳. اکنون لام ها را در محلول آمونیاک با نسبت ۱ به سه رقیق شده به مدت ۸ دقیقه قرار می دهیم.



۴. مجدداً لام‌ها را دو مرتبه و هر بار به مدت ۵ دقیقه در آب دیونیزه غوطه‌ور می‌کنیم.
۵. لام‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه و در مکان تاریک در سدیم تیوسولفات ۵ درصد غوطه‌ور کرده و پس از آن دو مرتبه و هر بار به مدت یک دقیقه با آب دیونیزه شست و شو می‌دهیم.
۶. به مدت ۶ دقیقه در هر کدام از غلظت‌های ۷۰٪، ۹۵٪ و ۱۰۰٪ اتانول، لام‌ها شناور شده و نهایتاً لام‌ها را به مدت ۵ دقیقه در زایلین انکوبه می‌کنیم.
۷. لام‌های آماده شده را با چسب انتلان و لامل مونت می‌کنیم و لام‌ها را در مکان تاریک نگهداری می‌کنیم.
۸. اکنون لام‌ها را می‌توان زیر میکروسکوپ نوری بررسی و آنالیز کنیم و از نمونه‌های رنگ شده به روش گلژی تصاویر با کیفیت تهیه کنیم.

جهت مطالعه به روزترین تکنیک‌های ارائه‌دهنده بافت شناسی کلیک کنید

## تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی گلژی

### مواد مورد نیاز

- اتانول مطلق
- پارافین
- آب مقطر
- فرمالین ۱۰ درصد
- چسب انتلان
- کیت رنگ‌آمیزی گلژی
- محلول نقره نترات

- پتاسیم بی کرومات ۳٪
- محلول آمونیاک
- سدیم تیوسولفات ۵ درصد

### تجهیزات مورد نیاز

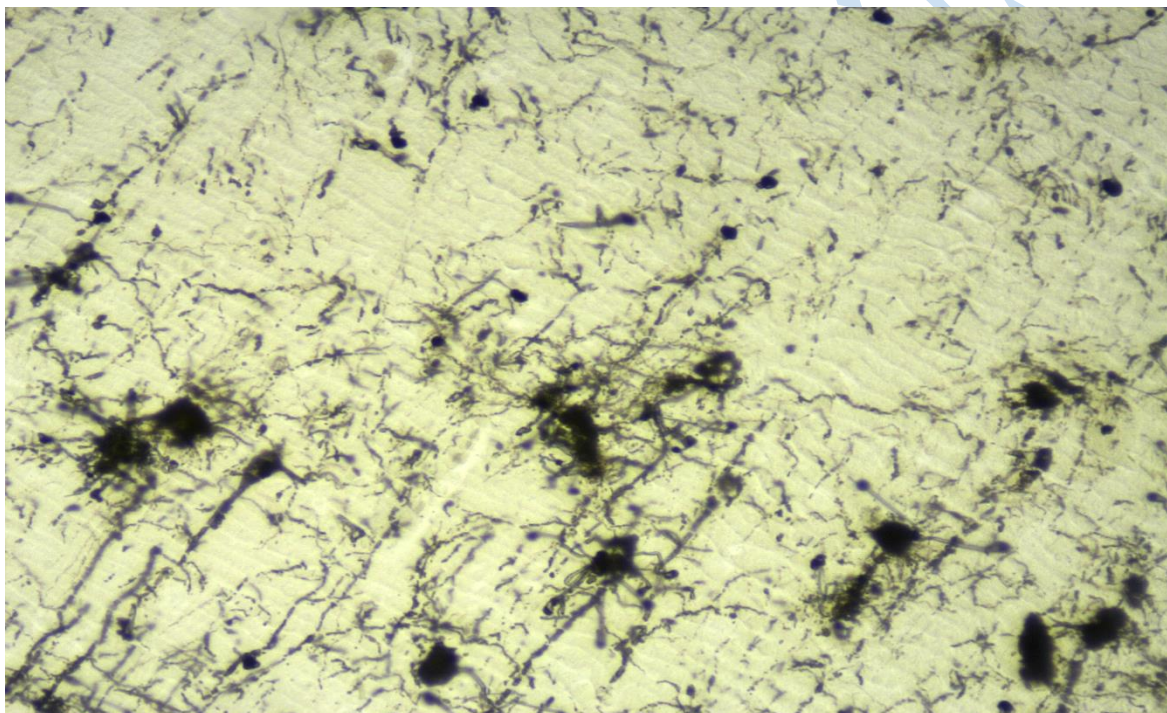
- میکروسکوپ نوری
- دستگاه میکروتوم
- جار رنگ آمیزی لام
- لام و لامل
- تیشوبسکت

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

### تفسیر نتایج در رنگ آمیزی گلژی

رنگ آمیزی اختصاصی گلژی همان رنگ آمیزی نقره تغییر یافته، به عنوان متدی مهم جهت مطالعه مورفولوژی نورونها می باشد. اساس این تکنیک رسوب فلز در گروهی رندم از نورونها در نمونه های بافتی می باشد. چند پروتکل مختلف از جمله Golgi-Kopsch ، Rapid ، Golgi-Cox برای رنگ آمیزی اختصاصی وجود دارد. اگر برشی نازک از مغز تهیه شود و با میکروسکوپ نوری پس از رنگ آمیزی های دیگر بجز رنگ آمیزی گلژی بررسی گردد سلولهایی قابل مشاهده هستند که حداکثر تا ۴ میکرون اطراف سلولها مشخص است و بقیه آن قابل مشاهده نمی باشد و چنانچه قطر برش افزایش داده شود تعداد زیادی از آکسون های نورونها در هم تنیده شده و قابل بررسی نیستند چرا که اگر رشته ای از آکسون را ادامه داده نمیتوانیم متوجه شویم که به سلول می رسد یا نه. رنگ آمیزی نورونها با رسوب نقره که همان رنگ آمیزی گلژی است در حل این مشکل به محققان حوزه نوروساینس کمک کرده است.

روش رنگ‌آمیزی گلژی-کاکس (COX-Golgi) یکی از بهترین تکنیک‌ها برای مطالعه مورفولوژی طبیعی و غیر طبیعی نورون‌ها و همچنین سلول‌های گلیال می‌باشد. با استفاده از تکنیک گلژی، تغییرات مورفولوژیکی در دندریت سلول‌های عصبی و خارهای دندریتیک در مغز حیوانات تحت درمان با دارو و همچنین در مغز پس از مرگ بیماران مبتلا به بیماری‌های عصبی مورد بررسی قرار می‌گیرد. با استفاده از پروتکل رنگ‌آمیزی گلژی، آکسون‌ها و دندریت‌های سلول‌های عصبی با رسوب فلز نقره روی آنها به رنگ مشکی زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده و مطالعه می‌باشد.



شکل ۴: مطالعه سلول‌های عصبی در بافت مغز سالم رت با رنگ‌آمیزی گلژی. آکسون و دندریتهای نورونها به رنگ مشکی مشاهده می‌شود.

## ارائه خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی گلژی 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 تسهیل می‌کند. لازم به ذکر است یکی از خدمات ارائه شده مرتبط با طرح‌های پژوهشی محققین در بخش پاتولوژی شرکت بافت و ژن پاسارگاد، رنگ‌آمیزی‌های تخصصی انواع بافت‌های انسانی و حیوانات آزمایشگاهی از جمله رنگ‌آمیزی اختصاصی سیستم عصبی مرکزی می‌باشد که با تجهیزات آزمایشگاهی استاندارد و باکیفیت‌ترین مواد توسط کارشناسان باتجربه انجام می‌شود.

## جمع بندی

آنالیز ساختار عصبی و ارتباطات نورونی یک ابزار قوی در نوروساینس تشخیصی و پایه ای است. تغییرات در مورفولوژی نورونی مرکز تکوین و شکل پذیری مغز است و همچنین نشاندهنده بیماری های سیستم عصبی مرکزی می باشد. بنابراین در حوزه مطالعات پاتولوژی و آسیب شناسی، تکنیک های رنگ آمیزی اختصاصی با کیفیت بالا در نوروساینس از جمله رنگ آمیزی گلژی بسیار حائز اهمیت می باشد. رنگ آمیزی گلژی یک تکنیک مرسوم بر پایه رسوب فلزی به نام نقره در سلولهای عصبی است که مدت هاست از آن در تشخیص پزشکی و مطالعات بیماریهای سیستم عصبی مرکزی کاربرد دارد. به عنوان مثال تحقیقات گسترده ای در شناخت بیماری آلزایمر با ترکیب تکنیک رنگ آمیزی گلژی با نشاندار کردن فلورسنت (Fluorescent Labeling) در مدل های بیماری آلزایمر انجام شده است.

## سوالات متداول

۱. ماده اصلی در رنگ آمیزی گلژی چیست؟  
محلول نیترات نقره نقش اساسی را در پروتکل رنگ آمیزی گلژی ایفا می کند.
۲. کدام گروه از بیماری ها در رنگ آمیزی گلژی مطالعه می شود؟  
در حوزه نوروساینس، تکنیک گلژی برای مطالعه بیماری های سیستم عصبی کاربرد دارد.

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

**Email: [histogenotechlab@gmail.com](mailto:histogenotechlab@gmail.com)**

**[www.histogene.ir](http://www.histogene.ir)**

**[www.histogene.co](http://www.histogene.co)**

