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 سودان بلک (Sudan Black)
در آزمایشگاه بافت‌شناسی

❋آنچه در این مطلب خواهید خواند **صفحه**

❋مقدمه ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک در بافت‌شناسی ۳

❋تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک ۳

❋انواع کاربردهای رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک در بافت شناسی ۴

❋نگاهی اجمالی به لیپیدهای رنگ شده با سودان بلک..... ۴

❋انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک..... ۵

❋پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی سودان بلک در بافت‌شناسی..... ۵

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی سودان بلک..... ۶

مراحل رنگ‌آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی سودان بلک..... ۶

❋تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی سودان بلک..... ۷

❋تفسیر نتایج رنگ‌آمیزی سودان بلک..... ۸

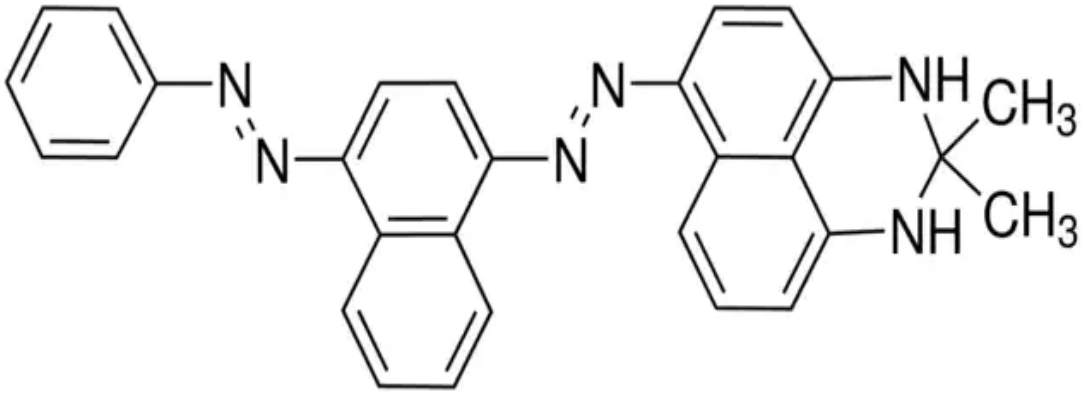
❋ارائه خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک در آزمایشگاه بافت شناسی..... ۹

❋جمع‌بندی..... ۹

❋سوالات متداول..... ۱۰

مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک در بافت‌شناسی

رنگهای خانواده سودان گروهی از رنگ‌های لیپیدی محلول در حلال را تشکیل می دهند که لیزوکروم نامیده می شوند و در طبقه بندی ساختاری آنها جز رنگ های دیازو (diazo) هستند و با گروه اسیدی لیپیدها واکنش می‌دهد. سودان بلک (Sudan Black B) از آنجایی که یک رنگ محلول در چربی است، لیپیدهایی مانند استرول‌ها، چربی‌های خنثی و فسفولیپیدها را رنگ می‌کند. این چربی‌ها در گرانولهای آزوروفیل و گرانولهای ثانویه میلوسیتیک و گرانول‌های لیزوزومی سلولهای مونوسیتی وجود دارند. در طی رنگ‌آمیزی، رنگ به دلیل حلالیت بالای آن در لیپیدها نسبت به حلال، از حلال جدا می‌شود و لیپید بافت موردنظر را رنگ می‌کند. ظاهر پودر رنگ سودان بلک قهوه‌ای تیره با پودر سیاه است و حداکثر جذب ۵۹۶ الی ۶۰۵ نانومتر دارد و همچنین نقطه ذوب آن بین ۱۲۰ الی ۱۲۴ درجه سانتیگراد است.



شکل ۱: ساختار شیمیایی رنگ سودان بلک با فرمول $C_{29}H_{24}N_6$

تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک

معرف های سودانی، از جمله سودان III، IV و سودان سیاه B (SBB)، به طور گسترده ای برای تعیین لیپیدها در حیوانات، گیاهان و مواد آبگریز، برای طیف گسترده ای از کاربردها بین سالهای ۱۹۷۷ الی ۲۰۰۲ استفاده شده است. SBB محبوب‌ترین معرف سودان در سال ۱۹۸۱ توسط Bayliss اعلام گردید. سودان III اولین بار در پایان قرن نوزدهم، در سال ۱۸۹۶ توسط Daddi برای اهداف هیستوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت و همچنین استفاده از SBB به دهه ۱۹۳۰ توسط دو محقق بنام Lison و Dagnelie برمی‌گردد. رنگ‌آمیزی سودان بلک برای تشخیص لیپیدهای ساختاری یا ذخیره‌ای در سلول‌ها، بافت‌ها و موجودات مختلف، به عنوان مثال، در لیپیدهای باکتریایی (Hartman 1940; Burdon et al.

1947) و گرانول‌های لیپیدی موجود در لکوسیت‌ها، مجموعه گلژی (Lillie 1977) و هسته (فردریکس ۱۹۷۷) و همچنین در الاستین (هوروبین و جیمز ۱۹۷۰) و استخوان (نگوما و هامونت ۱۹۷۴) استفاده شده است.

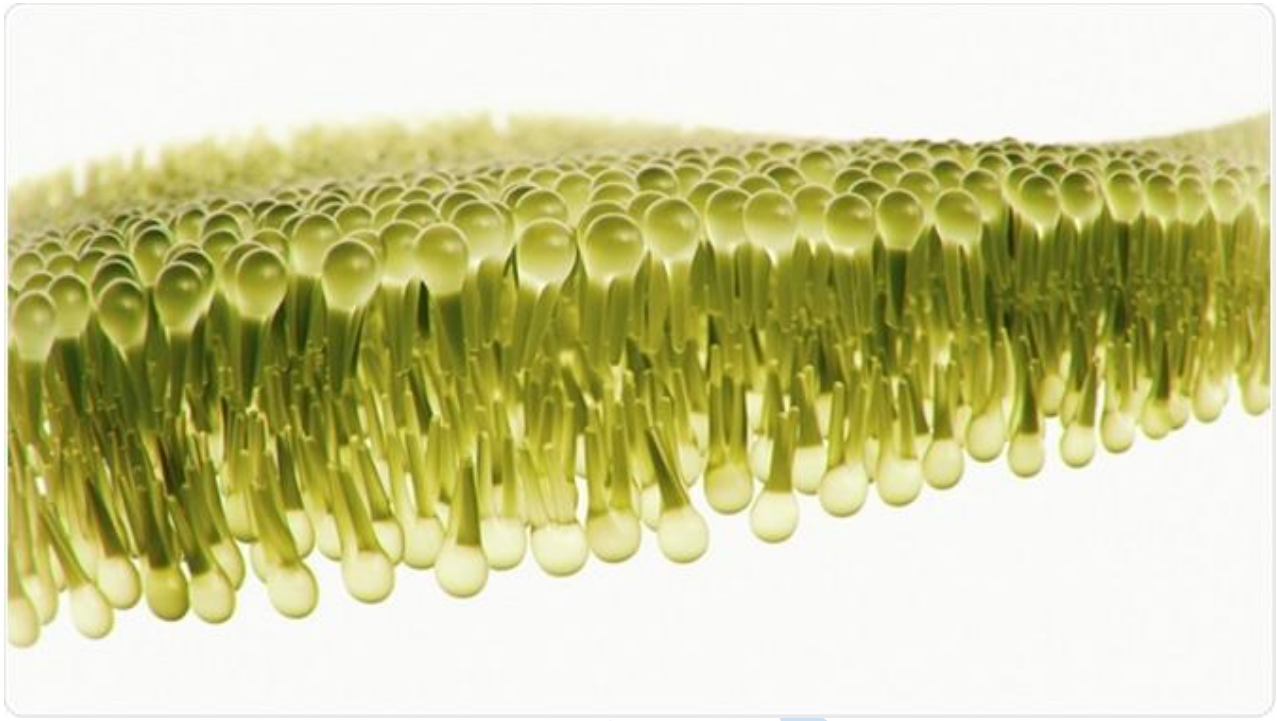
انواع کاربردهای رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک در بافت‌شناسی

سودان بلک B برای رنگ‌آمیزی طیف گسترده‌ای از لیپیدها مانند فسفولیپیدها، استرول‌ها و تری‌گلیسیریدهای خنثی در نمونه های بافتی مختلف و میکروارگانیسم هایی مانند باکتری استفاده می‌شود. سودان سیاه مانند سایر رنگ‌های سودانی اختصاصی لیپید نیست و همچنین می‌تواند برای رنگ‌آمیزی، دستگاه گلژی و گرانول‌های لکوسیت استفاده شود.

در تمایز و تشخیص اختلالات خونی سودان بلک میلوبلاست‌ها (Myeloblast) را رنگ می‌کند، اما نه لنفوبلاست ها را. رنگ‌آمیزی سودان بلک یا SBB برای تمایز لوسمی میلوئید حاد (AML) از لوسمی لنفوئید حاد (ALL) کاربرد دارد که این روش رنگ‌آمیزی سودان بلک شبیه به الگوی رنگ‌آمیزی میلوپراکسیداز لکوسیت ها و مونوسیت ها است.

نگاهی اجمالی به لیپیدهای رنگ شده با سودان بلک

لیپیدهای بدن موجود زنده از جمله انسان از هزاران مولکول چربی ساخته شده است که متنوع‌ترین گروه از مواد بیوشیمیایی، شامل مولکول‌هایی مانند اسیدهای چرب و مشتقات آنها (شامل تری، دی و مونوگلیسریدها و فسفولیپیدها) و همچنین سایر متابولیت‌های حاوی استرول مانند کلسترول می‌باشند. ساختارهای شیمیایی مختلف لیپیدها عملکردهای بیولوژیکی مختلفی از جمله تولید انرژی، داربست ساختاری غشایی، مرتب‌سازی و تنظیم پروتئین‌های غشایی، سیگنال‌دهی سلولی را اعمال می‌کنند. تغییرات لیپیدی غشاء نقش مرتبطی در بسیاری از بیماری‌ها ایفا می‌کند. به عبارتی دیگر در بسیاری از نقص‌های متابولیکی مرتبط با لیپیدها و بسیاری از بیماری‌ها مانند چاقی، نقص‌های عصبی، قلبی عروقی و سرطان تغییرات انواع لیپیدها نقش دارد و مورد بررسی قرار می‌گیرند. با این حال تاکنون بیشتر مطالعات فرآیندهای پاتوفیزیولوژی روی لیپیدها انجام می‌شود.



شکل۲ : تصویر سه بعدی از دولایه لیپید انسانی

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک

انواع بافت‌هایی که دارای انواع چربی‌ها در ساختار سلولی آنها هستند، عمدتا دارای قابلیت رنگ شدن با رنگ‌آمیزی سودان بلک را دارند. نمونه بافت‌های رنگ شده با سودان بلک عبارتند از مغز استخوان، خون تازه، بافت چربی سفید و قهوه‌ای، مغز و غیره. جهت رنگ‌آمیزی تری‌گلیسیریدهای خنثی و لیپید از بافت منجمد و بعضی از لیپوپروتئین ها از بافت های فیکس شده پارافینی استفاده می‌شود.

در این مقاله به یکی از پروتکل‌های ستاپ شده رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک می‌پردازیم.

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک در بافت‌شناسی

جهت تهیه محلول رنگی از پودر سودان بلک، ۰,۷ گرم از سودان بلک B را در ۱۰۰ سی سی پروپیلن گلیکول حل نموده و روی هات پلیت با دمای ۱۰۰ درجه قرار می دهیم تا پودر با گرم شدن کاملا حل شود و سپس محلول رنگی را با کاغذ صافی فیلتر کرده و در ظرف شیشه ای تیره نگهداری می‌کنیم. این محلول رنگی به مدت یک سال در دمای ۶۰ درجه پایدار است.

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی سودان بلک

۱. در دستگاه فروزن سکشن، نمونه بافتی را روی پایه محتوی چسب اختصاصی برش فروزن برای قالبگیری قرار داده و پس از بسته شدن نمونه در دستگاه فروزن سکشن، برش‌های بافتی فروزن با اندازه ۸ الی ۱۰ میلی‌متر تهیه و برش ها را روی لام قرار داده تا با جریان هوا خشک شوند.

۲. اگر نمونه بافتی فیکس شده در پارافین جامد است، پس از تهیه برش از آن، پارافین زدایی می کنیم.

۳. برش‌ها را در فرمالین به مدت ده دقیقه فیکس کرده و سپس برشها را با آب مقطر شستشو می دهیم.

۴. برشهای فیکس شده را در پروپیلن گلیکول ۵ دقیقه انکوبه می‌کنیم

۵. اکنون لام های آماده شده را طبق پروتکل رنگ‌آمیزی رنگ می‌کنیم.

مراحل رنگ‌آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی سودان بلک

۱. نمونه‌های فیکس شده را در جار رنگ‌آمیزی حاوی محلول رنگی سودان بلک به مدت ۶ الی ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه فور قرار می‌دهیم.

۲. اسلایدها را سه دقیقه با پروپیلن گلیکول ۸۵٪ تیمار نموده و پس از آن با آب مقطر شستشو می‌دهیم.

۳. در این مرحله می‌توانیم از رنگ نوکلئار فست رد جهت رنگ نمودن هسته سلول‌ها استفاده نماییم.

۴. لام ها را با لامل و چسب انتلان مونت نموده و نهایتا پس از اتمام مراحل رنگ‌آمیزی سودان بلک، لام‌های آماده شده را با میکروسکوپ نوری بررسی می‌کنیم.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی سودان بلک

مواد مورد نیاز

- پودر رنگ سودان بلک
- پروپیلن گلیکول
- فرمالین
- آب مقطر
- چسب انتلان
- رنگ نوکلئار فست رد
- چسب اختصاصی برش فروزن برای قالبگیری

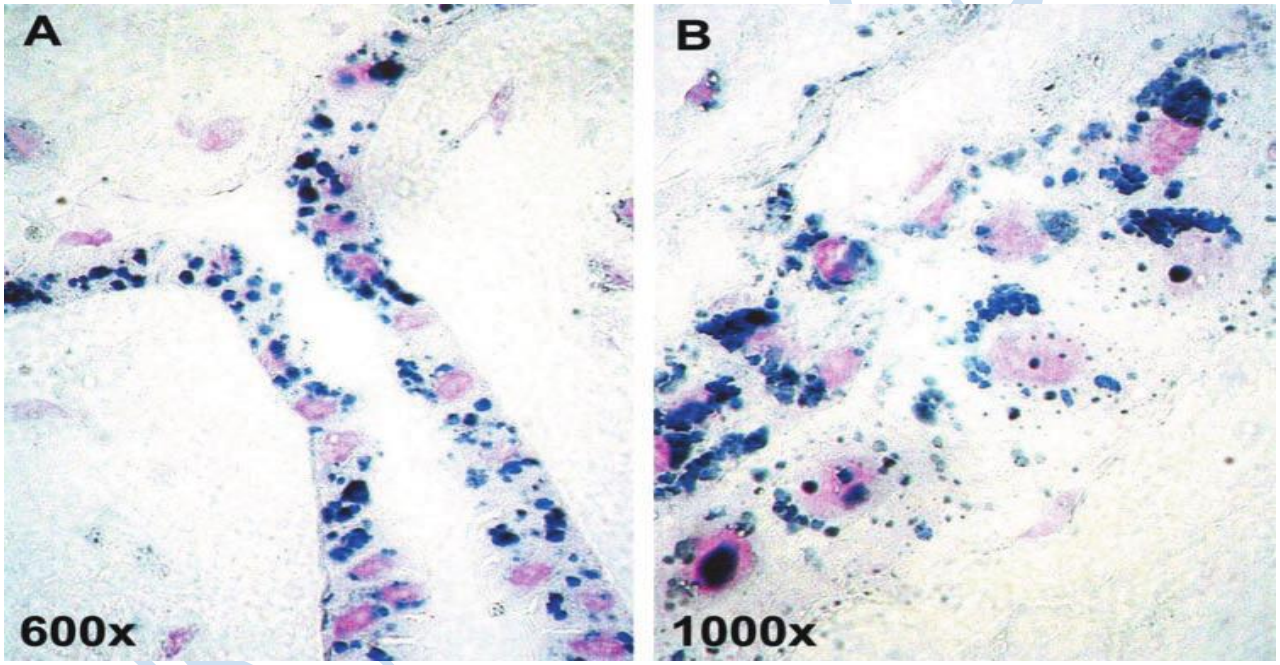
تجهیزات مورد نیاز

- میکروسکوپ نوری
- دستگاه فروزن سکشن
- جار رنگ‌آمیزی لام
- لام و لامل
- فور
- هات پلیت
- کاغذ صافی

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

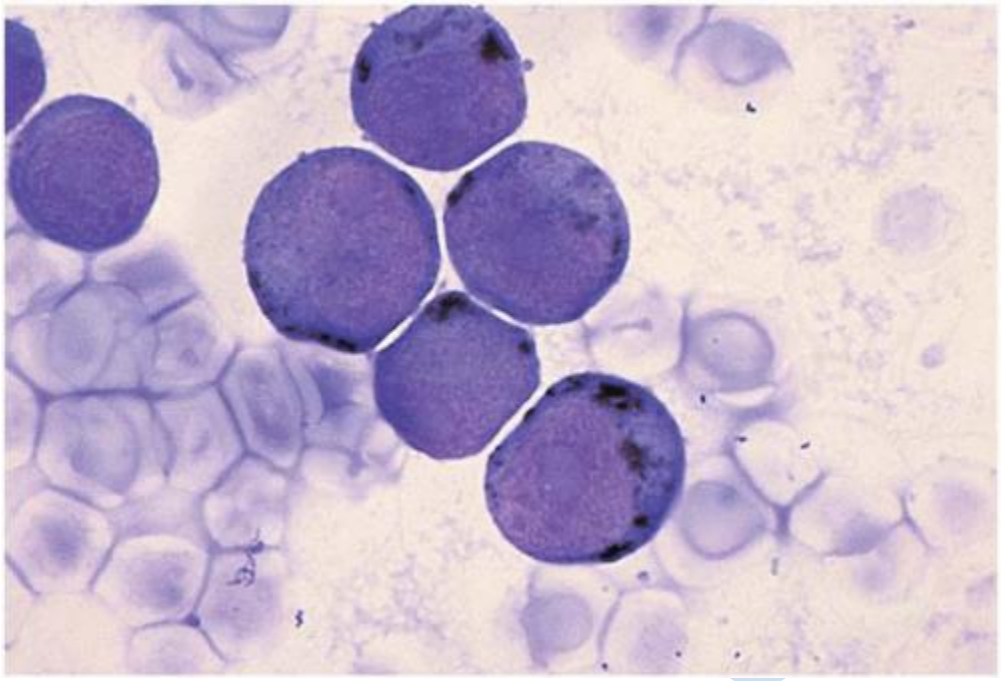
تفسیر نتایج رنگ‌آمیزی سودان بلک

رنگ‌آمیزی لیپیدها به طور کلی رنگ‌آمیزی چربی (Lipid Staining) نامیده می‌شود. لیپیدها شامل گلیسریدها، فسفولیپیدها، گلیکولیپیدها و اسیدهای چرب هستند. در حالی که چربی‌های لیپیدی مختلف رنگ‌های کمی متفاوت را نشان می‌دهند، اما همه آنها رنگ‌پذیری مشابهی از خود نشان می‌دهند. چربی ها با روش رنگ سودان III از قرمز تا قرمز مایل به زرد، Oil Red O قرمز به قرمز مایل به نارنجی و سودان سیاه B سیاه و آبی می‌شود. علاوه بر این، رنگ پاس فسفولیپیدها و گلیکولیپیدها را قرمز تا قرمز مایل به ارغوانی رنگ می کند، در حالی که رنگ‌آمیزی سودان بلک B چربی‌ها را سیاه و آبی رنگ می‌کند.



شکل ۳: رنگ‌آمیزی سودان بلک ذرات لیپیدی در غشاهای جنین. قطرات لیپید به رنگ آبی تیره با سودان سیاه B در اپیتلیوم آمنیون (Amnion Epithelium) (A) و کوریون تروفوبلاست(chorion trophoblast) (B) هسته ها با مایر کارمالوم (Mayer's Carmalum) (صورتی) رنگ‌آمیزی شدند.

در تشخیص و تمایز انواع لوسمی های خون، رنگ‌آمیزی سودان بلک شبیه میلوپراکسیداز (Myeloperoxidase) است. یعنی گرانولوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها را رنگ می‌کند و مونوسیت ها را نه. اما اساس رنگ سودان بلک بر خلاف میلوپراکسیداز آنزیمی نیست. سودان بلک لیپیدها و فسفولیپیدهای داخل سلولی را که در سلول‌های دودمان میلوئیدی هستند و در دودمان لنفوئیدی وجود ندارد یا پراکنده هستند رنگ می‌کند و از این رو می‌توان از آن برای شناسایی دودمان بلاست‌ها استفاده کرد.



شکل ۴: رنگ‌آمیزی سودان بلک در نمونه مبتلا به لوسمی میلوئید حاد، نمونه مغز استخوان است.

ارائه خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک در آزمایشگاه بافت شناسی

بافت شناسی، سیتولوژی و سایر رشته های علمی مرتبط، آناتومی میکروسکوپی بافت ها و سلول ها را مطالعه می‌کنند. برای دستیابی به ساختار بافتی و سلولی، نمونه‌ها باید به روش صحیح، رنگ‌آمیزی شوند. یکی از انواع رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی نمونه‌های بافتی، رنگ‌آمیزی اختصاصی انواع لیپیدها در بافت های موجود زنده از جمله حیوان آزمایشگاهی به نام رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک است.

در آزمایشگاه بافت‌شناسی شرکت بافت و ژن پاسارگاد با استفاده از تجهیزات و مواد آزمایشگاهی استاندارد، برش‌های میکرونی از نمونه‌های بافتی مختلف، تهیه و با تکنیک‌های رنگ‌آمیزی عمومی و اختصاصی از جمله خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی سودان بلک رنگ نموده و نهایتا به بررسی و مطالعه نمونه بافتی انسان و حیوانات آزمایشگاهی بیمار و سالم تعریف شده در طرح‌های پژوهشی محققان، اساتید و دانشجویان می پردازد.

جمع‌بندی

رنگ‌آمیزی تکنیکی جهت افزایش کنتراست در نمونه های مورد بررسی در سطح میکروسکوپی می‌باشد. رنگ‌ها اغلب در بافت‌شناسی، سیتولوژی و در زمینه‌های پزشکی هیستوپاتولوژی، هماتولوژی و سیتوپاتولوژی که بر مطالعه و تشخیص بیماری

ها در سطح میکروسکوپی تمرکز دارند، استفاده می شود. یکی از رنگ‌هایی که در زمینه مطالعات و تشخیص بیماری‌های مرتبط با لیپیدها نقش دارد، سودان بلک است. این نوع از رنگ‌آمیزی انواع لیپیدهای بافت های جانوری را رنگ می‌کند و امکان مطالعه میکروسکوپی آنها را تسهیل می‌بخشد.

سوالات متداول

۱. رنگ‌آمیزی سودان بلک چه کاربردی دارد؟

سودان بلک برای رنگ‌آمیزی طیف گسترده ای از لیپیدها مانند فسفولیپیدها، استرول‌ها و تری‌گلیسیریدهای خنثی استفاده می شود.

۲. کدام نمونه های بافتی را می‌توان با روش رنگ‌آمیزی سودان بلک در بافت شناسی مطالعه نمود؟

نمونه‌های بافتی که در ساختار سلول‌هایشان انواع لیپیدها است مانند مغز استخوان، بافت چربی، خون و غیره قابلیت رنگ‌آمیزی با سودان بلک را دارند.

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی

شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

Email: histogenotechlab@gmail.com
www.histogene.ir
www.histogene.co

۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱