



Basic Medical Sciences Research Center
Histogenotech

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

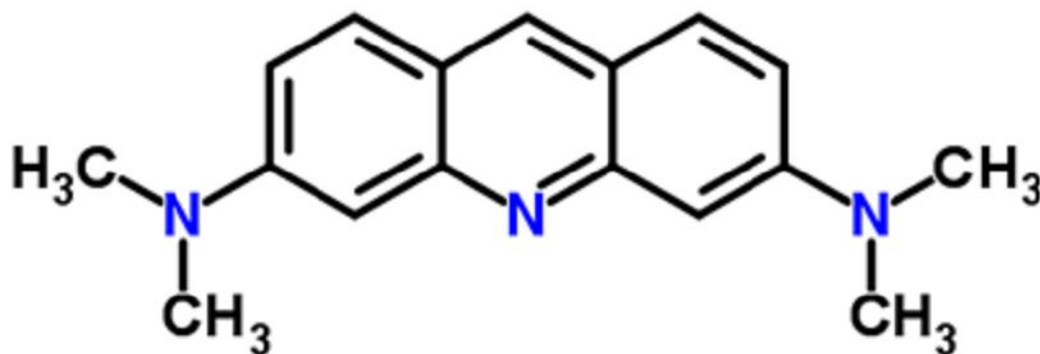
مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی
شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

آموزش جامع رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ
(Acridine Orange) در آزمایشگاه بافت شناسی

- ۳..... *مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ در بافت شناسی
- ۳..... *تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ
- ۴..... *انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ در بافت شناسی
- ۴..... *انواع نمونه های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ
- ۵..... *پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ در بافت شناسی
- ۵..... *مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ
- ۵..... *مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ
- ۶..... *تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی آکریدین اورنژ
- ۷..... *تفسیر نتایج رنگ آمیزی آکریدین اورنژ
- ۸..... *ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ در آزمایشگاه بافت شناسی
- ۹..... *جمع بندی
- ۹..... *سوالات متداول

مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ در بافت شناسی

رنگ آکریدین اورنژ (Acridine Orange یا AO) یک رنگ فلوروکروم با خاصیت بازی ضعیف، چربی دوست است که قادر به نفوذ در ساختار غشای سلولی و اندامک‌ها است. اگرچه کاملاً به شکل خنثی در سلول نفوذ می‌کند، پس از باردار شدن، این رنگ‌ها تمایل دارند در سمت pH پایین سد غشایی به دام بیافتند که منجر به تجمع آنها در ساختارهای اندامک اسیدی مانند لیزوزوم‌ها و فاگولیزوزوم‌ها می‌شود. این رنگ متصل شونده به نوکلئیک اسید هنگامی که به DNA دو رشته ای متصل می‌شود، رنگ فلورسنت سبز ساطع می‌کند و با اتصال به DNA تک رشته‌ای و RNA، فلورسنت قرمز را منتشر می‌کند. این ویژگی منحصر به فرد رنگ آکریدین اورنژ سبب استفاده گسترده آن در مطالعات سلولی شده است.



شکل ۱: ساختار شیمیایی رنگ آکریدین اورنژ با فرمول شیمیایی $C_{17}H_{19}N_3$

تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ

آکریدین اورنژ یا AO عضوی از گروه آمینوآکریدین مشتق شده است و ساختار آروماتیک مشترکی با چندین رنگ آکریدین دارد. آکریدین اورنژ اولین بار در اواخر قرن نوزدهم توسط کارل گراب و هاینریش کارو (Heinrich Caro) از زغال سنگ استخراج شد و سپس برای مدتی به عنوان رنگ در صنعت پارچه و همچنین برای کاربردهای بیولوژیکی استفاده شد. در سال ۱۹۱۲، ارلیش و بندا (Erlich و Beneda) پیشنهاد کردند که از آکریدین‌ها به عنوان ضد مالاریا استفاده شود، بنابراین از جانب گروهی از محققین پیشنهاد داده شد که از آکریدین اورنژ به عنوان یک عامل ضد میکروبی حدود یک دهه استفاده شود. در طول جنگ جهانی اول و دوم، قبل از استفاده گسترده از پنی سیلین، رنگ‌های آکریدین به طور گسترده ای به

عنوان عامل ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفتند. امروزه از رنگ آکریدین اورنج در تحقیقات و تشخیص‌های پاتولوژی و پزشکی استفاده می‌شود.

انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنج در بافت شناسی

آکریدین اورانژ به علت داشتن خواص متاکروماتیکی معمولاً در تجزیه و تحلیل میکروسکوپ فلورسنت و فلوسیتومتری فیزیولوژی سلولی و وضعیت چرخه سلولی انواع سلول‌ها استفاده می‌شود. به عبارت دیگر آکریدین اورنج جهت تشخیص مراحل آپوپتوز، نکروپتوز (necroptosis) و نکروز استفاده می‌شود. در طی آپوپتوز، سلول‌ها با آکریدین اورنج رنگ می‌شود و انقباض هسته‌ای، تکه تکه شدن سلولی و از دست دادن مرزبندی هسته‌ای را نشان می‌دهند.

کاربرد دیگر رنگ‌آمیزی آکریدین اورانژ در باکتری‌شناسی برای تشخیص باکتری مانند هلیکوباکتر پیلوری، مایکوپلاسما در نمونه‌های بالینی بافتی و مایعات بدن می‌باشد. رنگ آمیزی آکریدین اورنج نیز در حوزه انکولوژی به عنوان یک رنگ فلوروسنت در مطالعات بالینی سلول‌های سرطانی بویژه در تصویربرداری سرطان و درمان فوتودینامیک استفاده می‌شود.

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی آکریدین اورنج

نمونه‌هایی که با روش آکریدین اورنج مطالعه می‌شوند، متنوع هستند. از جمله این نمونه‌ها می‌توان به انواع بافت‌های بدن مثل سیستم عصبی، معده، تومورهای ماست سل (mast cell tumors)، مایعات بدن مثل مغز استخوان، مایع مغزی نخاعی (CSF)، مایع سینوویال، مایع صفاقی، انواع سلول‌های جدا شده از بدن انسان و حیوانات آزمایشگاهی و همچنین سلول‌های کشت داده شده در محیط آزمایشگاهی اشاره نمود.

در این مقاله به یکی از پروتکل‌های ستاپ شده رنگ‌آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ می‌پردازیم.

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ در بافت‌شناسی

مراحل رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ برای سلول و نمونه بافتی فیکس شده در فرمالین یا بافت تازه در مراحل آماده سازی لام از نمونه متفاوت است.

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ‌آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ

۱. پس از جدا نمودن بافت موردنظر، جهت جلوگیری از فعالیت آنزیمی، بافت‌ها را در فرمالین ده درصد فیکس می‌کنیم.
۲. در مرحله بعد که پردازش بافتی است، بافت‌ها را در تیشوبسکت‌ها قرارداده و نام یا کد نمونه‌ها را روی تیشو بسکت‌ها می‌نویسیم.
۳. آبگیری نمونه بافتی: اکنون می‌بایست آب موجود در نمونه‌های بافتی را حذف نموده، بنابراین با غلظت‌های افزایشی اتانول این مرحله انجام می‌شود یعنی اتانول جایگزین آب در بافت می‌گردد.
۴. قالب‌گیری بافت: بلوک‌های پارافینی از نمونه‌های بافتی با استفاده از دستگاه پارافین دیسپنسر و دستگاه تیشو امبدینگ و پارافین جامد انجام می‌دهیم.
۵. برش‌گیری از بلوک پارافینی: پس از قالب‌گیری پارافینی نمونه بافتی، در این مرحله از نمونه فیکس شده در پارافین با دستگاه میکروتوم برش‌های نازک در حد ۵ الی ۲۰ میکرومتر تهیه می‌کنیم.
۶. آبدهی نمونه برش‌زده: برش‌های نمونه بافتی را روی لام قرار داده و پارافین اضافی نمونه را با دستگاه گرمکن اسلاید حذف می‌کنیم و با غلظت‌های کاهشی از اتانول نمونه بافتی را آبدهی می‌کنیم.
۷. اکنون لام‌های آماده شده را طبق پروتکل رنگ‌آمیزی رنگ می‌کنیم.

مراحل رنگ‌آمیزی نمونه بافتی در رنگ‌آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ

۱. یک گرم از پودر آکریدین اورنژ را در یک لیتر آب دو بار تقطیر حل می‌کنیم و به عنوان استوک اصلی در ظرف شیشه‌ای تیره نگهداری می‌کنیم. برای تهیه **working solution** یک سی‌سی از استوک اصلی و نیم سی‌سی استیک اسید گلسیال به ۵۰ سی‌سی آب مقطر اضافه و ترکیب می‌کنیم.

۲. اسلایدهای حاوی نمونه بافتی فیکس شده را در جار لام حاوی محلول آکریدین اورانژ با pH: 1.2 به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. برای ستاپ غلظت ایده‌آل رنگ آکریدین اورانژ، چند اسلاید را با غلظت‌های مختلف از رنگ، رنگ آمیزی کرده و با میکروسکوب فلورسنت بررسی می‌کنیم و بهترین غلظت را به عنوان غلظت اصلی انتخاب می‌کنیم.
۳. سپس به مدت ده دقیقه با آب مقطر لام‌ها را شستشو می‌دهیم.
۴. از پروتکل رنگ‌آمیزی هوخست (Hoechst) میتوان برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها استفاده کنیم.
۵. پس از خشک شدن لام‌ها، با چسب انتلان و لامل نمونه‌ها را مونت کرده و با میکروسکوپ فلورسنت بررسی می‌کنیم.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی آکریدین اورانژ

مواد مورد نیاز

- اتانول مطلق
- پارافین
- آب مقطر
- فرمالین ده درصد
- چسب انتلان
- استیک اسید
- پودر آکریدین اورانژ

تجهیزات مورد نیاز

- میکروسکوب فلورسنت
- دستگاه میکروتوم
- دستگاه گرمکن اسلاید بافتی
- دستگاه پارافین دیسپنسر
- دستگاه تیشو امبدینگ
- جار رنگ‌آمیزی لام
- لام و لامل

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

تفسیر نتایج رنگ آمیزی آکریدین اورنج

رنگ آمیزی آکریدین نارنجی و پروپیدیوم یدید (رنگ آمیزی Acridine orange/Propidium iodide) رنگ‌های

زیست‌پذیری سلولی هستند که آکریدین اورنج سبب می‌شود سلول‌های هسته‌دار زنده به رنگ سبز و سلول‌های هسته‌دار غیرزنده

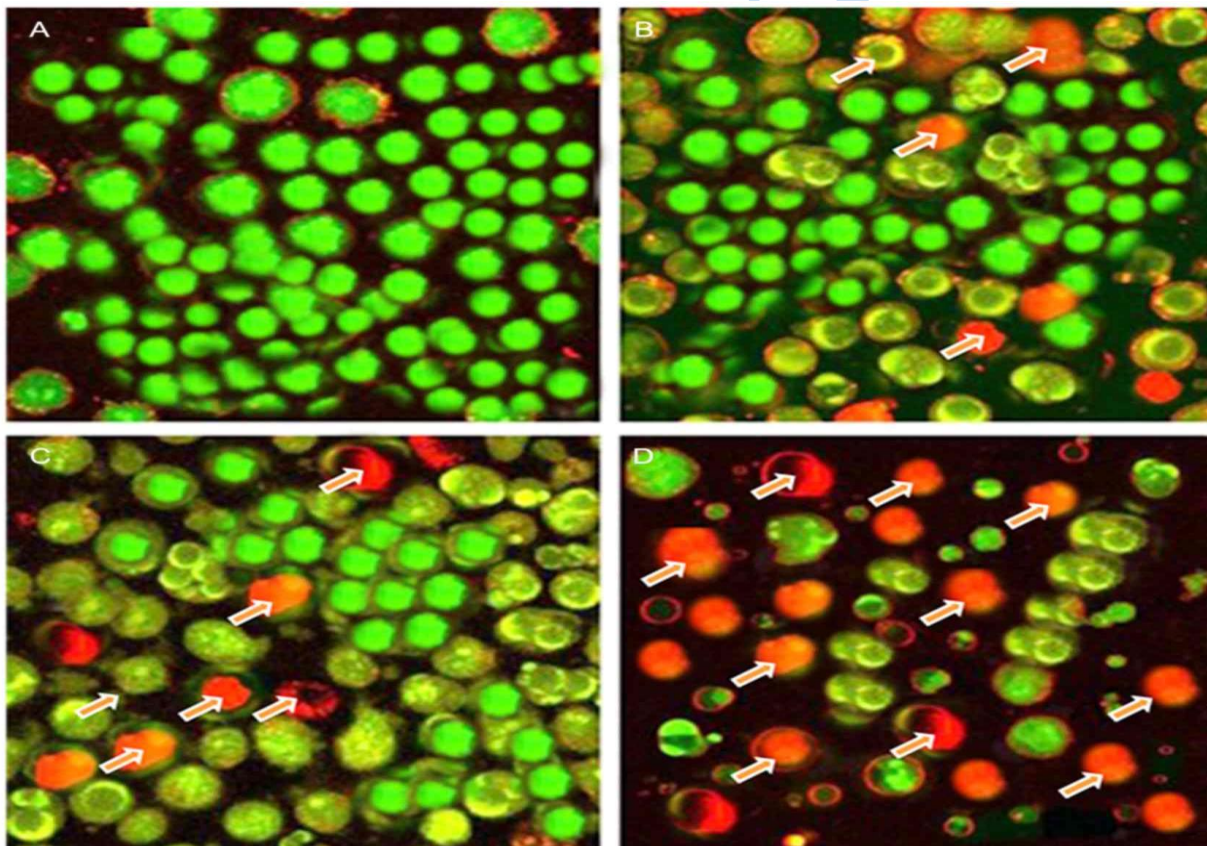
به رنگ قرمز فلورسانس رنگ کنند. آکریدین اورنج به سلول‌های زنده نفوذ کرده و به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شود. اتصال

به dsDNA باعث فلورسانس سبز آکریدین نارنجی و اتصال به ssDNA یا RNA باعث فلورسانس قرمز آن می‌شود.

پروپیدیوم یدید نیز به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شود. اما تفاوت آن با آکریدین اورنج این است که پروپیدیوم یدید قادر به نفوذ

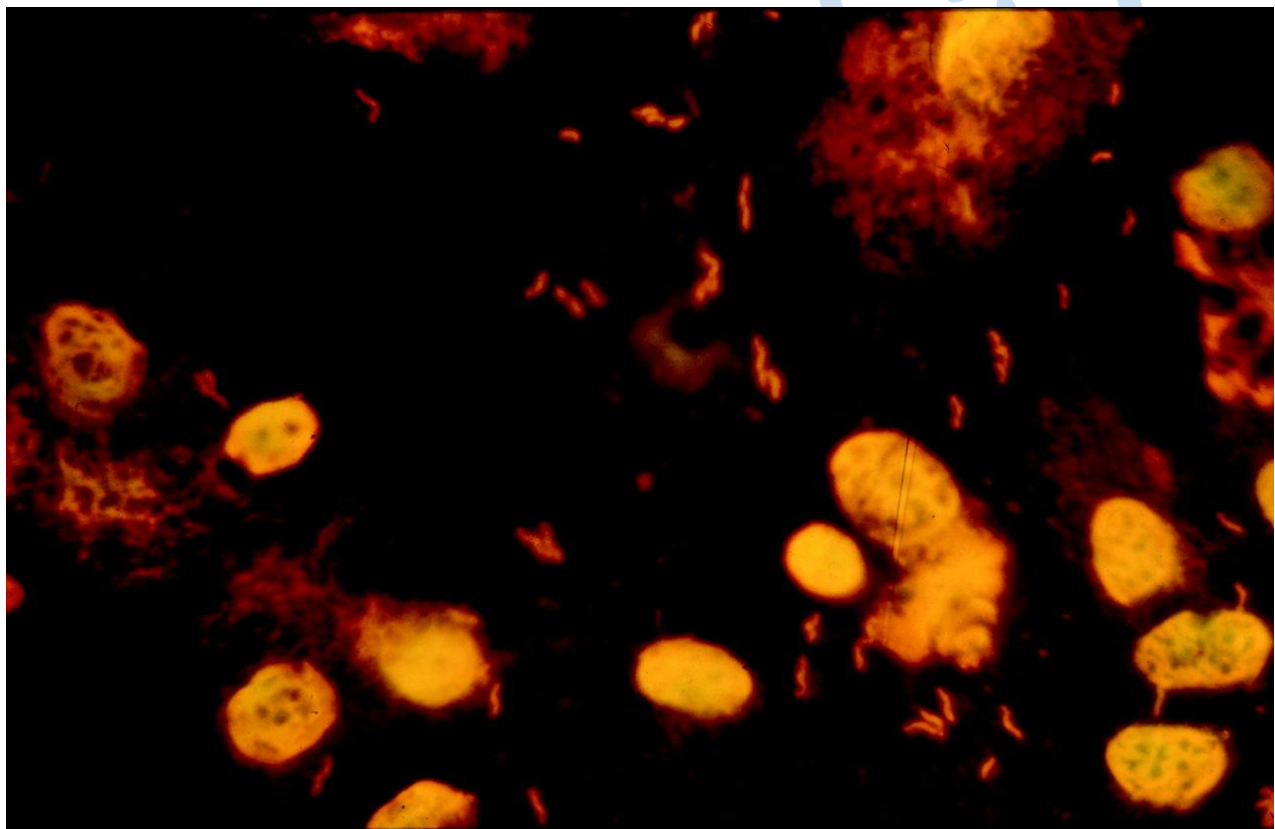
به غشای سلولی دست نخورده نیست، توسط سلول‌های غیر زنده و سلول‌هایی با غشاهای آسیب دیده جذب می‌شود. هنگامی

که به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شود، فلورسانس آن ۲۰-۳۰ برابر می‌شود و باعث فلورسانس قرمز سلول می‌شود.



شکل ۲: بررسی اثر ماده بر نمونه سلولی با رنگ آمیزی آکریدین اورنج. سلول‌های ملانوم بدخیم انسانی با رنگ آمیزی آکریدین اورنج و پروپیدیوم یدید مشخص شده است. سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت از pomolic acid تیمار شده است

هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی میکرواُتروفیل است که در اپیتلیوم معده حداقل ۵۰ درصد از جمعیت جهان کلنی کرده است و در ایجاد گاستریت مزمن، زخم معده، زخم دوازدهه و آدنوکارسینوم معده نقش دارد. از این رو شناسایی این باکتری با تکنیک های آزمایشگاهی معتبر حائز اهمیت می باشد. اثربخشی رنگ آکریدین اورانژ در شناسایی هلیکوباکتر پیلوری در اسمیر بیوپسی بزرگسالان مبتلا به بیماری گوارشی توسط محققان مطالعه شده و نتایج به دست آمده نشان می دهد که رنگ آمیزی آکریدین اورنج می تواند جایگزین رنگ آمیزی گرم (Gram Stain) در شناسایی ارگانسیم این باکتری در نمونه مخاط معده و دوازدهه شود.



شکل ۳: هلیکوباکتر پیلوری مشاهده شده در بیوپسی معده پس از رنگ آمیزی آکریدین اورنج. با بزرگنمایی $\times 1000$

ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ در آزمایشگاه بافت شناسی

انواع روشهای رنگ آمیزی از تکنیک های رایج در آزمایشگاه بافت شناسی است و برای ایجاد تمایز بین اجزای مختلف بافتها و سلولها جهت آنالیز دقیق نمونه ها استفاده می گردد. یکی از انواع رنگ آمیزی های اختصاصی نمونه های بافتی، مایعات بدن و سلولهای مختلف، رنگ آمیزی اختصاصی آکریدین اورنژ یا آکریدین اورنج است.

آزمایشگاه بافت شناسی شرکت بافت و ژن پاسارگاد با استفاده از تجهیزات و مواد آزمایشگاهی استاندارد، آماده ارائه خدمات رنگ آمیزی آکریدین اورنج برای انواع نمونه های انسانی و حیوانات آزمایشگاهی برای طرح های پژوهشی محققان، اساتید و دانشجویان می باشد.

جمع بندی

رنگ آمیزی نمونه های بافتی یک تکنیک استاندارد و قابل استناد برای تشخیص پزشکی و تحقیقات هیستوپاتولوژی بسیاری از بیماری ها است، زیرا اساس این تکنیک آنالیز نمونه ها با میکروسکوپ نوری و فلورسنت است. رنگ آمیزی آکریدین اورنج مدتهاست در تحقیقات بافت و سلولی به عنوان تکنیکی قدرتمند شناخته شده است. تغییرات در مقدار pH داخل لیزوزومی نمونه های بافت و سلول را می توان با استفاده از رنگ های وابسته به pH از جمله آکریدین اورنج مطالعه کرد.

سوالات متداول

۱. رنگ آمیزی آکریدین اورنج برای مطالعه کدام مرحله چرخه سلولی سلول ها استفاده می شود؟
از آکریدین اورنج برای بررسی آپوپتوز، نکروز سلولها در اثر تیمار با داروها و مواد مختلف استفاده می شود.
۲. تفاوت رنگ آمیزی آکریدین نارنجی با رنگ آمیزی پروپیدیوم یدید چیست؟
آکریدین اورنج قابلیت نفوذ به داخل سلولها از غشای سلولی کامل و دست نخورده را دارد ولی پروپیدیوم یدید این توانایی را ندارد و تنها سلول های با غشای آسیب دیده را رنگ می کند.

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

Email: histogenotechlab@gmail.com

www.histogene.ir

www.histogene.co

   ۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱