



Basic Medical Sciences Research Center
Histogenotech

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

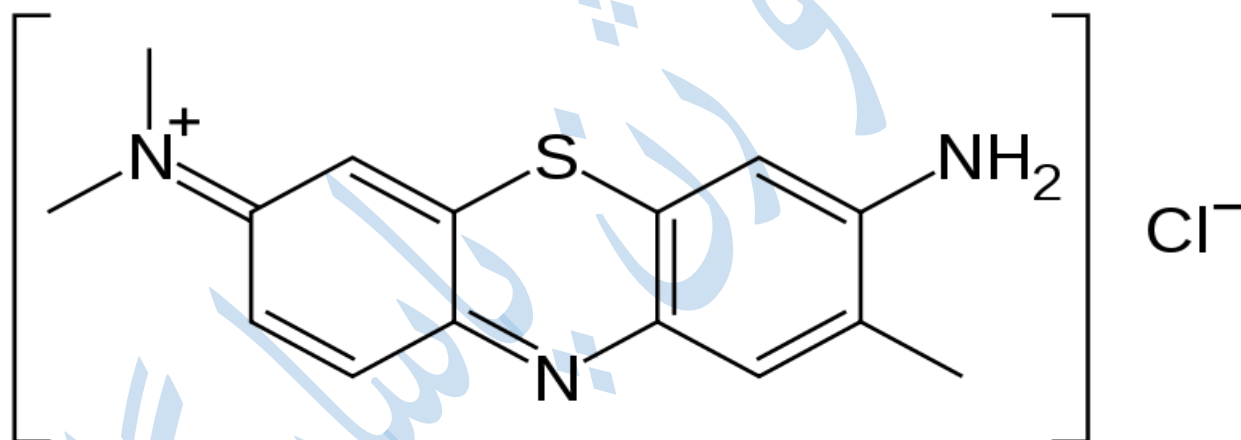
مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی
شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

آموزش جامع رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو (Toluidine Blue)
در آزمایشگاه بافت شناسی

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

مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو در بافت‌شناسی

تولوئیدین بلو (Toluidine Blue; TBO) همچنین به عنوان کلرید تولونیوم (Tolonium Chloride) شناخته می‌شود یک رنگ متاکروماتیک اسیدوفیل است که به صورت انتخابی اجزای بافت اسیدی (سولفات‌ها، کربوکسیلات‌ها و رادیکال‌های فسفات) را رنگ می‌کند. همچنین به عنوان متیل آنالین یا آمینوتولون شناخته می‌شود، اساساً دارای ۳ ایزوform به نام‌های ارتوتولوئیدین، پاراتولوئیدین و متاتولوئیدین است. رنگ تولوئیدین بلو (TBO) میل ترکیبی به اسیدهای نوکلئیک دارد و بنابراین به محتویات هسته‌ای بافت‌هایی با محتوای DNA و RNA بالا متصل می‌شود. این رنگ یکی از اعضای گروه تiazine (thiazine) است و تا حدی در آب و الکل محلول است. رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو بر اساس اصل متاکرومازی، بافت‌ها را رنگ می‌کند. رنگ با بافت‌ها واکنش می‌دهد تا رنگ متفاوتی از رنگ اصلی و از بقیه بافت تولید کند.

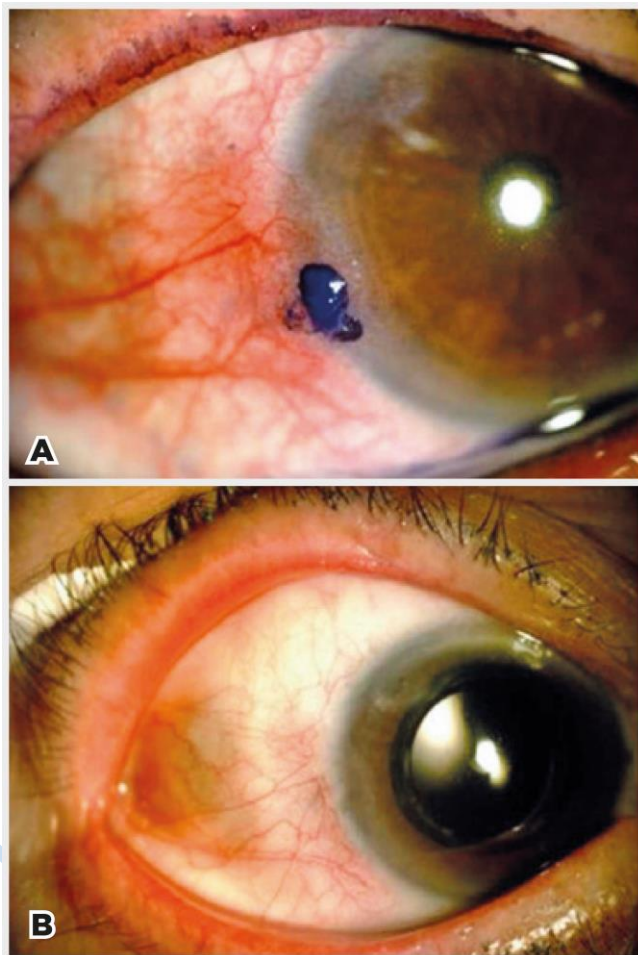


شکل ۱: ساختار شیمیایی رنگ تولوئیدین بلو با فرمول شیمیایی $C_{15}H_{16}N_3S^+$ و جرم مولکولی $270,374 \text{ g/mol}$

تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو

رنگ‌آمیزی تولوئیدین آبی از زمان کشف آن توسط ویلیام هنری پرکین (William Henry Perkin) در سال ۱۸۵۶ برای کاربردهای مختلف پزشکی شناخته شد و پس از آن عمده‌تاً توسط صنعت رنگ استفاده شد. رنگ آمیزی حیاتی (Vital Staining) رنگ آمیزی سلول‌ها یا بافت‌ها در حالت زنده است. اولین تکنیک توسعه یافته توسط پل ارلیش در سال ۱۸۸۵ شامل غوطه‌وری بافت تازه برداشته شده در آبی متیله بود. Neibel و Chomet و Shedd اولین محققانی بودند که کاربرد

حیاتی تولوئیدین بلو را برای تشخیص ضایعات پیش بدخیم و بدخیم حفره دهان گزارش کردند. آنها خاصیت رنگ TBO را برای تأیید ضایعات مشکوک بالینی به عنوان نئوپلاستیک، تعیین حاشیه رشد پیش بدخیم و بدخیم و تشخیص تومورها تأیید کردند.



شکل ۲: نمونه ای از رنگ آمیزی Vital تولوئیدین بلو در بافت چشم

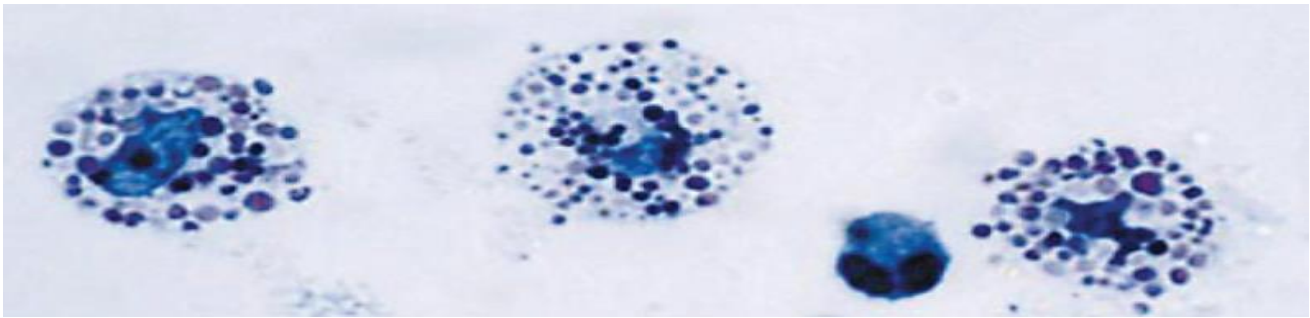
انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو در بافت شناسی

رنگ آمیزی تولوئیدین بلو به طور گسترده به عنوان یک رنگ حیاتی برای ضایعات مخاطی مورد استفاده قرار گرفته است و همچنین به دلیل خاصیت متاکروماتیک آن در بخش های بافتی برای رنگ آمیزی خاص اجزای خاص کاربرد دارد. تولوئیدین بلو در داخل بدن برای شناسایی دیسپلازی و کارسینوم حفره دهان استفاده شده است. استفاده از آن در داخل بدن مبتنی بر این

واقعیت است که سلول‌های دیسپلاستیک و نئوپلاستیک ممکن است از نظر کمی اسیدهای نوکلئیک بیشتری نسبت به بافت‌های طبیعی داشته باشند. همچنین اپیتلیوم بدخیم احتمال دارد حاوی کانال‌های داخل سلولی باشد که پهن‌تر از اپیتلیوم طبیعی هستند و نفوذ رنگ را تسهیل می‌کند. استفاده از تولوئیدین بلو در مقاطع بافتی با هدف مشخص کردن اجزایی مانند گرانول‌های ماست سل (به دلیل وجود هپارین و هیستامین)، موسین و غضروف نیز انجام می‌شود. در باکتری شناسی، کورنی باکتریوم دیفتیری (*Corynebacterium diphtheriae*) حاوی گرانول‌هایی با پلی فسفات معدنی پلیمریزه شده است که با تولوئیدین بلو بنفش یا قرمز را رنگ می‌کند. رنگ تولوئیدین توسط جراحان برای کمک به متمایز نمودن نواحی دیسپلازی مخاط از بافت طبیعی استفاده می‌شود. از این تکنیک رنگ‌آمیزی برای انتخاب بهترین محل ضایعه در حین جراحی و برداشتن آن کمک می‌کند.

نگاهی اجمالی به ماست سل‌های رنگ شده با تولوئیدین بلو

ماست سل‌ها نوعی گلبول سفید که در بافت‌های همبند در سراسر بدن، به ویژه زیر پوست، نزدیک رگ‌های خونی و رگ‌های لنفاوی، در اعصاب، در ریه‌ها و روده‌ها یافت می‌شود. ماست سل‌ها نقش مهمی در نحوه واکنش سیستم ایمنی به باکتری‌ها و انگل‌های خاص دارند و به کنترل انواع دیگر پاسخ‌های ایمنی کمک می‌کنند. آنها حاوی مواد شیمیایی مانند هیستامین، هپارین، سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد هستند. آنها این مواد شیمیایی را در طی واکنش‌های آلرژیک و برخی پاسخ‌های ایمنی آزاد می‌کنند. این مواد شیمیایی اثرات زیادی از جمله گشاد شدن عروق خونی و رگ‌زایی دارند. در طی یک پاسخ آلرژیک، آنها می‌توانند باعث گرگرفتگی و خارش شوند. در مقادیر زیاد نیز می‌توانند باعث گرفتگی شکم، درد عضلانی، حالت تهوع، استفراغ، اسهال، فشار خون پایین و شوک شوند. ماست سل‌ها برای اولین بار به دلیل ویژگی متاکرومازی در سال ۱۸۷۷ توسط Paul Ehrlich شناسایی شدند. ترکیب مسئول متاکرومازی به عنوان هپارین، یک هتروگلیکان غنی از استرهای نیمه سولفات می‌باشد که در پاتولوژی مورد هدف رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو قرار می‌گیرد.



شکل ۳: ماست سل ها

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو

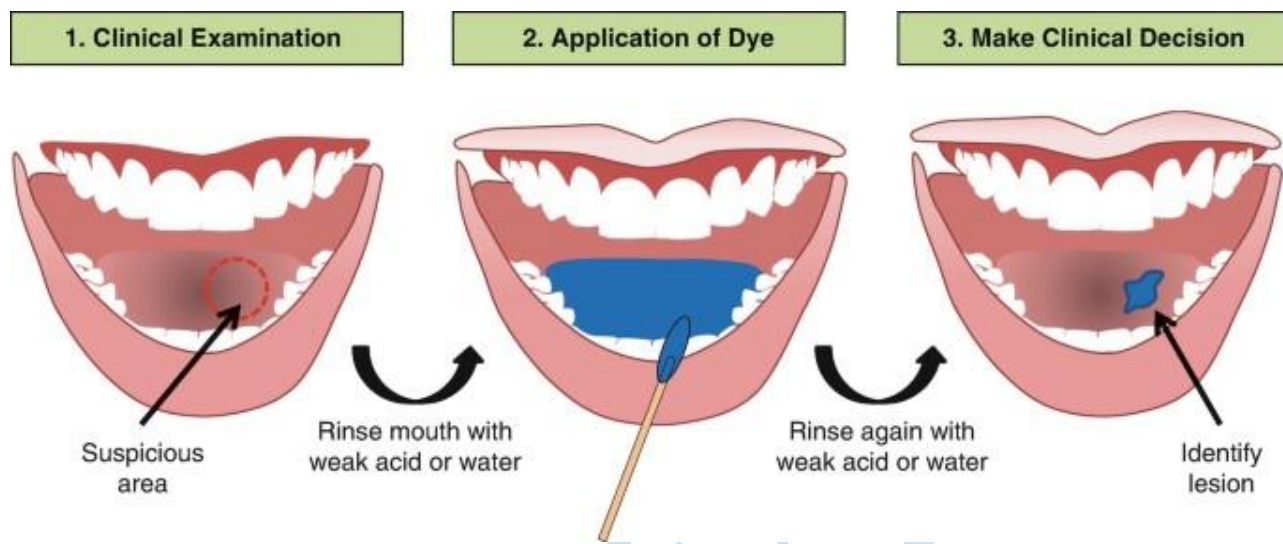
انواع بافت های بدن موجود زنده که در ساختارشان از بافت‌های همبند، موسین‌ها، مواد پایه‌ای غضروف، گرانول‌های ماست سل و بسیاری از موسین‌های اپیتلیال کاربرد دارد، می‌توانند کاندیدای مطالعه با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو باشند. از جمله این بافت ها می‌توان به بافت پوششی دهان، پوست، چشم، مفصل، استخوان، تیموس و غیره اشاره نمود.

در این مقاله به یکی از پروتکل‌های ستاپ شده رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو می‌پردازیم.

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو در بافت‌شناسی

رنگ تولوئیدین بلو بر اساس اصل متاکرومازی (ویژگی برخی رنگ‌ها که یک بافت را با چندین رنگ مختلف رنگ می‌کند)، بافت‌ها را رنگ‌آمیزی می‌کند. رنگ با بافت‌ها واکنش می‌دهد تا رنگی متفاوت از رنگ اصلی و بقیه بافت ایجاد کند. متاکرومازی یا متاکروماسی در سال ۱۸۷۵ توسط کورنیل، یورگنس و رانویر کشف شد. متاکرومازی بصورت انتخابی، فقط ساختارهای بافتی خاصی را رنگ می‌کنند. پدیده‌ای است که در آن رنگ ممکن است بسته به غلظت و محیط اطراف خود نور را در طول موج‌های مختلف جذب کند و این توانایی را دارد که بدون تغییر در ساختار شیمیایی خود رنگ خود را تغییر دهد. تغییرات فیزیکی که باعث این تغییر رنگ می‌شود، شکل تخصصی و منظمی از تجمع رنگ است. برای ایجاد متاکرومازی باید گروه‌های الکترونگاتیو آزاد در سطح بافت‌ها وجود داشته باشد. به عنوان مثال، متیلن بلو، تولوئیدین آبی، سافرانین از رنگ‌های متاکروماتیک هستند که قادر به رنگ‌آمیزی بافت‌ها با رنگ‌هایی متفاوت از خود رنگ است.

جهت تهیه محلول تولوئیدین بلو، یک گرم از پودر رنگ را در ۱۰۰ سی سی از اتانول ۷۰ درصد حل نموده و پس از حل شدن کامل در ظرف شیشه‌ای تیره نگهداری می‌کنیم. از این رنگ تهیه شده برای رنگ‌آمیزی نمونه‌های بافتی به دو روش استفاده می‌شود که یک روش رنگ‌آمیزی سلول و بافت‌های زنده هستند و روش دوم مطالعه و بررسی نمونه‌های بافتی جدا شده از موجود و فیکس شده می‌باشد که در این پروتکل، به روش دوم با ذکر جزئیات بیشتر می‌پردازیم.



شکل ۴: پروتکل کلی تکنیک رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو روی بافت زنده

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو

۱. پس از جدا نمودن بافت موردنظر، جهت جلوگیری از فعالیت آنزیمی، بافت‌ها را در فرمالین ده درصد یا بصورت فریز شده 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. آبیگری نمونه بافتی: اکنون می‌بایست آب موجود در نمونه‌های بافتی را حذف نموده، بنابراین از غلظت‌های افزایشی اتانول استفاده می‌شود یعنی اتانول جایگزین آب در بافت می‌گردد.
۴. قالب‌گیری بافت: بلوک‌های پارافینی از نمونه‌های بافتی با پارافین جامد و طبق دستورالعمل‌های دستگاه پارافین دیسپنسر و دستگاه تیشو امبدینگ تهیه می‌کنیم.

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 ۱۰ میکرومتر آماده می‌کنیم.

۶. بعد از تهیه لام از سکشن‌های بافتی و حذف پارافین اضافی نمونه‌ها، لام‌ها را با غلظت هایکاهشی اتانول آبدهی می‌کنیم.

۷. اکنون لام‌های آماده شده را طبق پروتکل رنگ‌آمیزی رنگ می‌کنیم.

مراحل رنگ‌آمیزی نمونه بافتی در رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو

۱. اولین مرحله، تهیه محلول working solution تولوئیدین بلو با pH: 2-2.5 است. ۵ سی سی از استوک اصلی

رنگ را با ۴۵ سی سی سدیم کلراید یک درصد میکس کرده pH محلول می‌بایست حدوداً ۲,۳ و کمتر از ۲,۵ باشد.

۲. برش‌های نمونه‌های بافتی را در جار رنگ آمیزی حاوی محلول working solution به مدت ۲-۳ دقیقه انکوبه می‌کنیم و سپس نمونه‌ها را ۳ مرتبه با آب مقطر شستشو می‌دهیم.

۳. نمونه‌های بافتی رنگ شده را با اتانول ۹۵٪ و دو مرتبه با اتانول ۱۰۰ درصد سریعاً دهیدراته می‌کنیم.

۴. در این مرحله دو مرتبه (هر بار ۳ دقیقه) عمل شفاف‌سازی نمونه‌های بافتی را با انکوبه در زایلین انجام می‌دهیم.

۵. لام‌ها را با لامل و چسب انتلان مونت نموده و نهایتاً پس از اتمام مراحل رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، لام‌های آماده شده

را با میکروسکوپ نوری بررسی می‌کنیم.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو مواد مورد نیاز

- پودر رنگ تولوئیدین بلو
- فرمالین
- آب مقطر
- سدیم کلراید یک درصد
- زایلین
- اتانول
- چسب اتلان

تجهیزات مورد نیاز

- میکروسکوپ نوری
- جار رنگ‌آمیزی لام
- لام و لامل
- میکروتوم
- پارافین دیسپنسر
- تیشو امبدینگ
- تیشوبسکت

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

تفسیر نتایج رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو

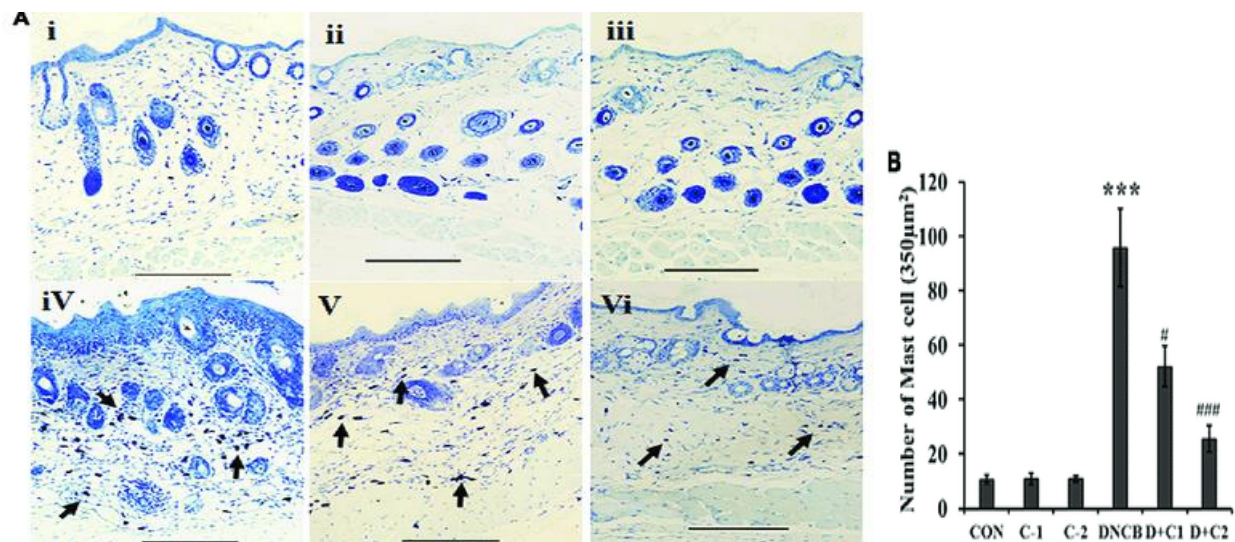
همانطور که در بخش‌های قبل توضیح داده شد یکی از کاربردهای رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو، رنگ نمودن بافت‌های زنده است. هنگامی که در پاتولوژی هدف مطالعه بخش‌های مختلف بافت زنده در بدن موجود زنده است می‌بایست از موادی استفاده گردد که به سلول آسیبی وارد نکند، به همین علت به این مواد رنگ‌های حیاتی می‌گویند. نکته حائز اهمیت و مهم در این پروتکل استفاده از محلول رنگی تازه است و استفاده از محلول رنگی مانده نتایج اشتباه را به دنبال دارد.



شکل ۵: نمونه‌ای از رنگ‌آمیزی حیاتی تولوئیدین بلو در دهان. تصاویر A و C بافت بدون زخم است و تصاویر B و D وجود زخم با تولوئیدین آبی را نشان می‌دهد.

ماست سل‌ها در بافت همبند یافت می‌شوند و سیتوپلاسم آنها حاوی گرانول‌هایی (متاکروماتیک) متشکل از هیپارین و هیستامین است. تولوئیدین آبی باید ماست سل‌ها را به رنگ قرمز-بنفش (رنگ‌آمیزی متاکروماتیک) و پس زمینه آبی (رنگ‌آمیزی ارتوکروماتیک) رنگ کند. متاکرومازی، رنگ‌آمیزی عناصر بافتی با رنگ متفاوت از محلول رنگ، به دلیل pH، غلظت رنگ و

درمای رنگ پایه است. رنگ‌های آبی یا بنفش تغییر رنگ قرمز و رنگ‌های قرمز تغییر رنگ زرد با عناصر بافت متاکروماتیک را نشان می‌دهند.



شکل ۶: رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو ماست سل‌ها. (A): فلش‌ها ماست سل‌ها را در اپیدرم موش نشان می‌دهند. نمودار میله ای B شمارش ماست سل‌ها را در طی التهاب و دگرانولاسیون ماست سل‌ها در اپیدرم را بررسی می‌کند.

ارائه خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو در آزمایشگاه بافت شناسی

بافت شناسی، سیتولوژی و سایر رشته‌های علمی مرتبط به مطالعه آناتومی میکروسکوپی بافت‌ها و سلول‌ها می‌پردازند. برای دستیابی به ساختار بافتی و سلولی معتبر و استاندارد، نمونه‌ها باید به روش صحیح رنگ‌آمیزی شوند. یکی از انواع رنگ-آمیزی‌های اختصاصی نمونه‌های بافتی، رنگ‌آمیزی اختصاصی انواع الاستین در بافت‌های موجود زنده از جمله حیوان آزمایشگاهی به نام رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو 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 تولوئیدین بلو رنگ نموده و نهایتاً به بررسی و مطالعه نمونه بافتی انسان و حیوانات آزمایشگاهی بیمار و سالم تعریف شده در طرح‌های پژوهشی محققان، اساتید و دانشجویان می‌پردازد.

جمع بندی

تولوئیدین بلو (TB) عضوی از گروه رنگ‌های متاکروماتیک تیازین است و تا حدی هم در آب و هم در اتانول قابلیت حل شدن را دارد. رنگ TB به عنوان یک رنگ حیاتی برای مشخص کردن ضایعات بالقوه بدخیم دهان استفاده شده است و ممکن است ضایعات اولیه را که ممکن است در معاینه بالینی نادیده گرفته شوند، شناسایی کند. تولوئیدین بلو در داخل بدن برای شناسایی دیسپلازی و کارسینوم حفره دهان استفاده شده است. استفاده از تولوئیدین بلو در مقاطع بافتی با هدف برجسته کردن اجزایی مانند گرانول‌های ماست سل، موسین و غضروف انجام می‌شود.

سوالات متداول

۱. کدام ویژگی رنگ تولوئیدین بلو (Toluidine Blue)، کاربرد آن را حائز اهمیت کرده است؟
ویژگی متاکرومازی رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو در بافت شناسی سبب پرکاربرد شدن این تکنیک شده است.
۲. کدام نمونه‌های بافتی مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو قرار می‌گیرد؟
انواع نمونه‌های بافتی سالم و توموری از انسان و حیوانات آزمایشگاهی مانند کبد، کلیه، قلب، طحال و غیره با رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو بررسی می‌شود.

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

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

   ۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱