



Basic Medical Sciences Research Center
Histogenotech

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

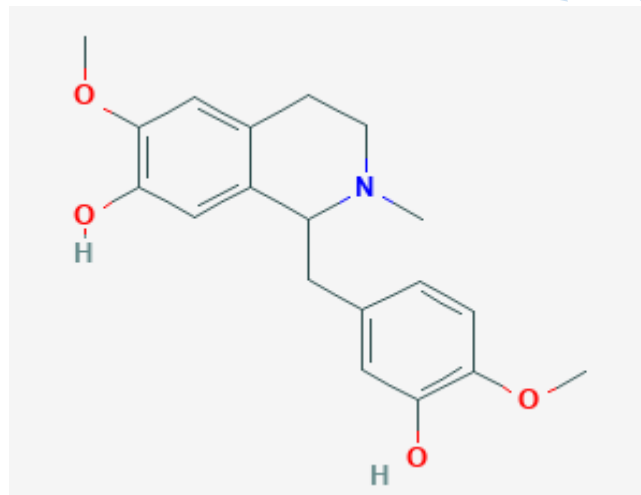
مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی
شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

آموزش جامع رنگ آمیزی اختصاصی رتیلولین (Reticulin)
در آزمایشگاه بافت شناسی

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

مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی رتی‌کولین در بافت‌شناسی

رنگ رتی‌کولین فیبرهای رتی‌کولین که با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) قابل مشاهده نیستند را رنگ می‌کند. الیاف رتی‌کولین آژیروفیلیک (agyrophilic) هستند، به این معنی که این الیاف در نمونه‌های بافتی با استفاده از یک کاهنده شیمیایی، با محلول نقره سیاه رنگ می‌شوند که فیبرها را به شکل قابل مشاهده در می‌آورد. انواع مختلفی از رنگ‌آمیزی رتی‌کولین مانند Gordon & Sweets, Wilder, Gridley, Snook, Laidlaw, and Gomori قابل ارائه می‌باشد که با این حال، همه روش‌ها مراحل رنگ‌آمیزی یکسانی دارند که الیاف رتی‌کولین رنگ می‌کند.



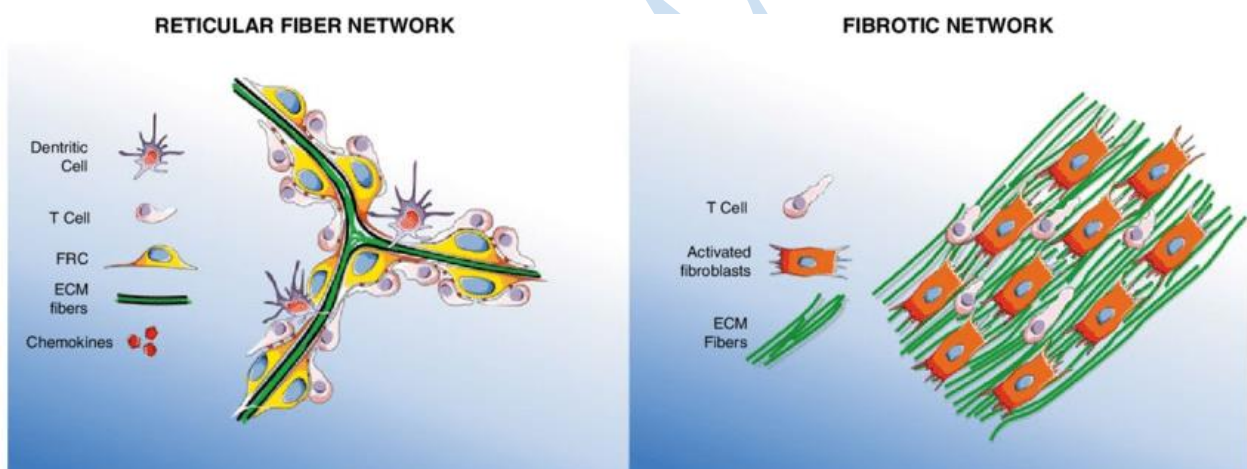
شکل ۱: ساختار شیمیایی رنگ رتی‌کولین

انواع کاربردهای رنگ‌آمیزی اختصاصی رتی‌کولین در بافت‌شناسی

فیروز یا تشکیل بیش از حد بافت فیروزی معمولاً در نمونه‌های بیوپسی مغز استخوان که دارای اختلالات میلوپرولیفراتیو (Myeloproliferative) مانند پلی‌سیتمی ورا (Polycythemia Vera)، میلو فیروز اولیه یا ایدیوپاتیک (primary or idiopathic myelofibrosis)، ترومبوسیتوز ضروری (essential thrombocytosis)، لوسمی میلوئید مزمن (chronic myeloid leukemia) با رنگ‌آمیزی اختصاصی رتی‌کولین نشان داده می‌شود. علاوه بر این، فیروز را می‌توان در نمونه‌های مغز استخوان که متاستاز تومور قابل توجهی دارند، مشاهده کرد. از آنجایی که چندین وضعیت پاتولوژی نئوپلاستیک و غیرنئوپلاستیک می‌تواند با افزایش فیروز رتی‌کولین همراه باشد، پاتولوژیست باید مطمئن باشد که هم کمیت و هم ضخامت الیاف را ارزیابی می‌کند.

نگاهی اجمالی به فیبرهای رتیکولین رنگ شده با رتیکولین

اجزای فیبری ماتریکس خارج سلولی از نظر آنالیز میکروسکوپ نوری به سه نوع فیبر طبقه‌بندی می‌شوند: کلاژن، رتیکولار و الاستیک. رشته‌های رتیکولین نوعی فیبر در بافت همبند است که از کلاژن نوع III که توسط سلول‌های شبکه‌ای یا رتیکولار ترشح می‌شود، تشکیل شده است. از نظر میکروسکوپ الکترونی، الیاف رتیکولین به صورت منفرد یا دسته کوچکی از فیبریل‌ها مشاهده می‌شوند، اگرچه قطر فیبریل‌ها نازک (حدود ۳۰ نانومتر) و یکنواخت است. فیبرهای رتیکولار از طریق فیبریل‌ها با فیبرهای کلاژن متصل هستند. الیاف رتیکولین به صورت متقاطع به هم متصل می‌شوند تا شبکه‌ای ظریف (رتیکولین) را تشکیل دهند. این شبکه به عنوان یک شبکه پشتیبان در بافت‌های نرم مانند کبد، مغز استخوان و بافت‌ها و اندام‌های سیستم لنفاوی عمل می‌کند. آنها معمولاً زیر اپیتلیوم قرار می‌گیرند و سطح سلول‌های عضلانی، سلول‌های چربی و سلول‌های شوان (Schwann) را می‌پوشانند. اختلال در روند سنتز و یا مقدار رتیکولین در بافت‌ها می‌تواند عامل ایجاد بیماری مانند فیروز و سیروز کبدی گردد، بنابراین یکی از روش‌های تشخیص این بیماری‌ها مطالعه فیبرهای رتیکولین است.



شکل ۲: شبکه فیبر رتیکولار و اجزای آن در بافت لنفوئید

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی رتیکولین

رنگ‌آمیزی رتیکولین، یک تکنیک مهم در مطالعه ضایعات مؤثر بر بافت‌هایی مانند کبد، طحال، گره‌های لنفاوی و مغز استخوان است که ساختمان آن‌ها غنی از رتیکولین است. ای نمونه‌های بافتی می‌تواند بصورت تازه، فریز یا فیکس شده در فرمالین جهت انجام تکنیک رنگ رتیکولین استفاده گردد.

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

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی رتیکولین در بافت‌شناسی

جهت انجام پروتکل رنگ‌آمیزی رتیکولین، ابتدا می‌بایست محلول نقره نیترات تهیه کنیم. ۵ سی سی از محلول نیترات نقره را در ظرف شیشه ای تیره ریخته و در حالی که روی استیرر میکس می‌شود، آمونیوم هیدروکسید را قطره قطره به محلول اضافه کرده تا رسوبات کاملاً حل شود. پس از آن ۵ سی سی از محلول سدیم هیدروکساید ۳٪ را با احتیاط اضافه کرده و رسوب را مجدداً با هیدروکسید آمونیوم حل می‌کنیم تا زمانی که فقط یک کدری ضعیف مشاهده شود. سپس محلول حاصل را با آب مقطر تا ۵۰ میلی لیتر رقیق کنید و در یک شیشه تمیز فیلتر کنید.

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی رتیکولین

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 بسکت-ها می‌نویسیم.
۳. آبگیری 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 ۴ الی ۵ میکرومتر آماده 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 رتیکولین

۱. ابتدا اسلایدهای آماده شده را در محلول پتاسیم پرمنگنات به مدت ۵ دقیقه قرار می‌دهیم و سپس به مدت دو دقیقه با آب مقطر شستشو می‌دهیم.
۲. اسلایدها را در محلول اگزالیک اسید قرار داده تا برش‌های بافتی بی‌رنگ شود و با آب مقطر شستشوی مختصر می‌دهیم.
۳. لام‌ها را به مدت حداقل ده دقیقه در محلول سولفات آمونیوم فریک انکوبه می‌کنیم و پس از آن سه بار با آب جار شسته و با آب مقطر آبکشی می‌کنیم.
۴. اکنون روی هر اسلاید ۷ قطره محلول نیترات نقره اضافه کرده و محلول اضافی را با تکان دادن اسلایدها دور می‌ریزیم و نهایتاً دو مرتبه سریع با آب مقطر شستشوی مختصر می‌دهیم.
۵. لام‌ها را محلول فرمالین ده درصد به مدت ۳۰ تا ۱۲۰ ثانیه انکوبه کرده تا رنگ سیاه یا خاکستری مشاهده گردد و با آب مقطر آبکشی می‌کنیم.
۶. لام‌ها را در ۰٫۲٪ کلرید طلا به مدت حداقل ۱ دقیقه قرار داده تا رنگ پس‌زمینه زرد حذف گردد و با آب مقطر شستشو می‌دهیم.
۷. نمونه‌ها را در محلول ۵٪ تیوسولفات سدیم به مدت یک دقیقه قرار داده تا نقره‌های احیا نشده حذف گردد.
۸. پس از شستشوی با آب مقطر، جهت رنگ شدن هسته سلول‌ها، برش‌های بافتی را با محلول رنگ Nuclear Fast Red به مدت ۵ دقیقه انکوبه می‌کنیم و پس از شستشو با آب جاری، اجازه می‌دهیم برش‌های رنگ شده خشک شود.
۹. لام‌ها را با لامل و چسب انتلان مونت نموده و نهایتاً پس از اتمام مراحل رنگ‌آمیزی رتیکولین، لام‌های آماده شده را با میکروسکوپ نوری بررسی می‌کنیم.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی رتیکولین مواد مورد نیاز

- محلول نیترات نقره
- آمونیوم هیدروکساید
- محلول سدیم هیدروکساید ۳٪
- پتاسیم پرمنگنات
- اگزالیک اسید
- سولفات آمونیوم فریک
- کلرید طلا
- محلول ۵٪ تیوسولفات سدیم
- رنگ Nuclear Fast Red
- آب مقطر
- فرمالین ده درصد
- پارافین جامد
- اتانول مطلق
- چسب انتلان

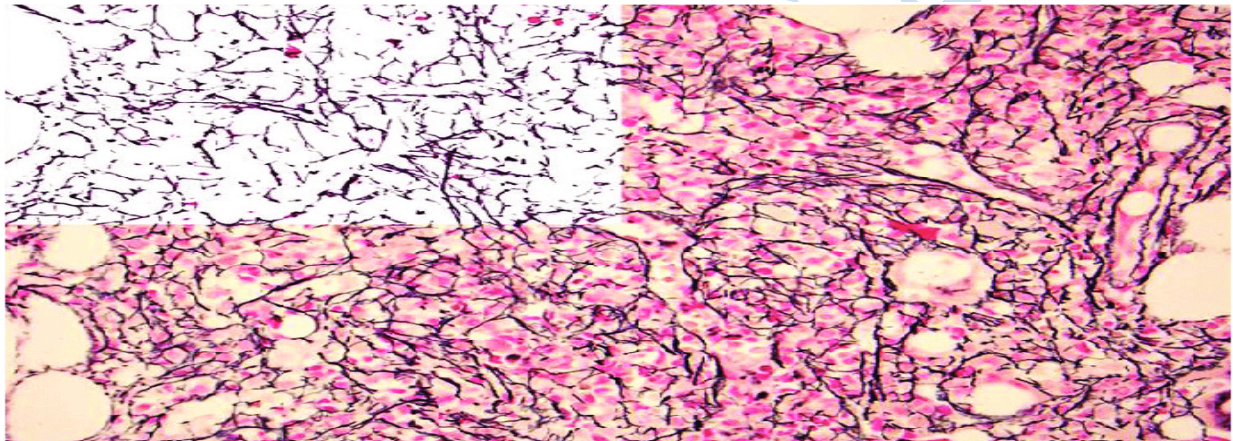
تجهیزات مورد نیاز

- استیرر
- دستگاه تیشو امبیدینگ
- دستگاه پارافین دیسپنسر
- دستگاه میکروتوم
- دستگاه گرمکن اسلاید
- میکروسکوپ نوری
- جار رنگ‌آمیزی لام
- لام و لامل
- تیشو بسکت

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

تفسیر نتایج رنگ آمیزی رتیلولین

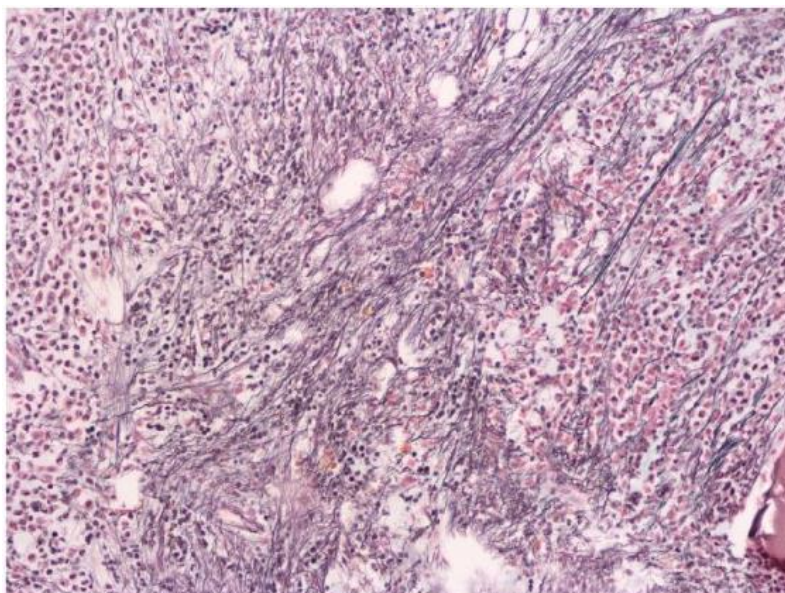
فیبرهای رتیلولین میل طبیعی کمی برای محلول‌های نقره دارند، بنابراین باید با پرمنگنات پتاسیم تیمار شوند تا نقاط حساس روی الیاف رتیلولین جهت رسوب نقره ایجاد شود. نقره به شکلی است که به راحتی می‌تواند به صورت نقره فلزی رسوب کند. یک عامل کاهش‌دهنده (Reduction)، فرمالین، باعث رسوب نقره به شکل فلز می‌شود و نهایتاً یک رنگ سیاه خنثی با شدت بالا ایجاد می‌کند. الیاف رتیلولوم در کبد، طحال و کلیه به وفور یافت می‌شود. در یک کبد نرمال، رتیلولین رشته‌های مشخص و منظمی هستند، اما کبد نکروزه و سیروز دارای الگوهای ناپیوسته هستند. رتیلولین همچنین الگوهای مشخصی را در ارتباط با سلول‌های تومور خاص تشکیل می‌دهد.



شکل ۳: رنگ آمیزی اختصاصی رتیلولین و تری کروم فیبروز مغز استخوان بیمار مبتلا به میلو فیبروز

فیبروز مغز استخوان در انواع بیماری‌های بدخیم و غیر بدخیم دیده می‌شود، رسوب رتیلولین و فیبروز کلاژن در مغز استخوان بیماران مبتلا به میلو فیبروزیس به واسطه سلول بنیادی/پیش ساز خونساز میلو فیبروز ایجاد می‌شود و به اختلال کمک می‌کند.

نتیجه پروتکل رنگ آمیزی رتیلولین در زیر میکروسکوپ نوری بدین صورت است: در بگ‌راند صورتی رشته‌های رتیلولین به رنگ سیاه و هسته سلول‌های نمونه به رنگ قرمز مشاهده می‌گردد.



شکل ۴: رنگ آمیزی اختصاصی رتیلولین نمونه بیوپسی مغز استخوان

ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی رتیلولین در آزمایشگاه بافت شناسی

بافت شناسی مطالعه میکروسکوپی بافت های حیوانی و گیاهی از طریق تکنیک رنگ آمیزی و بررسی آنها در زیر میکروسکوپ (الکترونی یا نوری) است. روش های مختلفی برای مطالعه ویژگی های بافتی و ساختار میکروسکوپی سلول ها استفاده می شود. مطالعات بافت شناسی در علوم تشریح پزشکی قانونی، تحقیقات، تشخیص پزشکی و در آموزش کاربرد دارد. علاوه بر این، بافت شناسی به طور گسترده در پزشکی به ویژه در مطالعه بافت های بیمار برای کمک به درمان استفاده می شود. در هیستوپاتولوژی جهت آنالیز و تشخیص ساختار بافت های انسان و حیوانات آزمایشگاهی، نمونه ها باید با روش ستاپ شده، رنگ آمیزی شوند. یکی از انواع رنگ آمیزی های اختصاصی نمونه های بافتی، رنگ آمیزی اختصاصی فیبرهای رتیلولین در بافت های موجود زنده به نام رتیلولین است. در آزمایشگاه بافت شناسی شرکت بافت و ژن پاسارگاد با استفاده از تجهیزات و مواد آزمایشگاهی استاندارد، برش های میکرونی از نمونه های بافتی مختلف، تهیه و با تکنیک های رنگ آمیزی عمومی و اختصاصی از جمله خدمات رنگ آمیزی اختصاصی رتیلولین رنگ نموده و نهایتاً به بررسی و مطالعه نمونه بافتی انسان و حیوانات آزمایشگاهی بیمار و سالم تعریف شده در طرح های پژوهشی محققان، اساتید و دانشجویان می پردازد.

جمع بندی

تاریخچه بافت شناسی نشان می دهد که تغییرات قابل توجهی در تکنیک های مورد استفاده برای رنگ آمیزی بافت شناسی از طریق سنجش های شیمیایی، زیست شناسی مولکولی و تکنیک های ایمونولوژیک، که در مجموع به عنوان

هیستوشیمی نامیده می شود، وجود داشته است. بافت شناسان اولیه از مواد شیمیایی در دسترس برای آماده سازی بافت ها جهت مطالعات میکروسکوپی استفاده می کردند. این مواد شیمیایی آزمایشگاهی دی کرومات پتاسیم، الکل و کلرید جیوه برای سخت شدن بافت های سلولی بودند. تکنیک های رنگ آمیزی مورد استفاده شامل نیترات نقره، گیمسا، رنگ آمیزی- های تریکروم، رنگ آمیزی گرم و هماتوکسیلین بودند که تا به امروز چند رنگ آمیزی اختصاصی دیگر به مجموعه تکنیک های رنگ آمیزی بافت شناسی اضافه شده است. از جمله رنگ آمیزی رتیکولین که از نقره برای تشخیص فیبرهای رتیکولین استفاده می کند. رتیکولین های ساخته شده از کلاژن نوع ۳، در پس زمینه خاکستری تا صورتی روشن سیاه مشاهده می شوند. این رنگ آمیزی برای ارزیابی چنین فیبرهایی در بافت های کبد، مغز استخوان و کلیه استفاده می شود.

سوالات متداول

۱. رنگ آمیزی رتیکولین در بافت شناسی چه کاربردی دارد؟

از رنگ آمیزی اختصاصی رتیکولین جهت تشخیص و بررسی فیبرهای رتیکولین در بافت های مختلف حیوانات آزمایشگاهی و انسان استفاده می شود.

۲. کدام نمونه های بافتی مورد مطالعه با رنگ آمیزی رتیکولین قرار می گیرد؟

نمونه های بافتی حاوی رتیکولوم مانند کبد، طحال، مغز استخوان و کلیه با رنگ آمیزی رتیکولین مطالعه می شوند.

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی

شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

Email: histogenotechlab@gmail.com

www.histogene.ir

www.histogene.co

