



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 وان کوزا  
(Von Kossa) در آزمایشگاه بافت شناسی

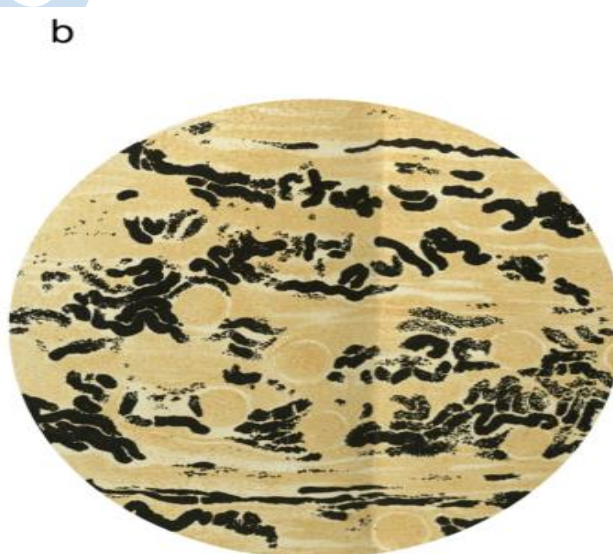
- ۳..... \*مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا در بافت‌شناسی
- ۳..... \*تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا
- ۴..... \*انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا در بافت‌شناسی
- ۴..... \*نگاهی اجمالی به کلسیم رنگ شده با وان کوزا
- ۴..... \*انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا
- ۵..... \*پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا در بافت‌شناسی
- ۵..... \*مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا
- ۵..... \*مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا
- ۶..... \*تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی وان کوزا
- ۷..... \*تفسیر نتایج رنگ آمیزی وان کوزا
- ۸..... \*ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا در آزمایشگاه بافت‌شناسی
- ۸..... \*جمع بندی
- ۹..... \*سوالات متداول

## مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا در بافت شناسی

رنگ آمیزی وان کوزا (Von Kossa) به طور گسترده در بافت شناسی برای تشخیص وجود رسوبات غیرطبیعی کلسیم در بدن استفاده می‌شود، به همین علت با عنوان رنگ کلسیم (Calcium Stain) نیز شناخته شده است. اصل این رنگ آمیزی مبتنی بر تبدیل نمک‌های کلسیم به نمک‌های نقره است: یون‌های کلسیم، متصل به فسفات‌ها، با یون‌های نقره که با محلول نیترات نقره آورده می‌شوند، جایگزین می‌شوند. فسفات‌های نقره که در زیر یک منبع نور قرار می‌گیرند، دچار تخریب فتوشیمیایی می‌شوند که منجر به مشاهده رسوبات فلزی نقره می‌شود.

## تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا

بیش از یک قرن پیش، پزشک مجارستانی جولیوس وان کوزا (Julius von Kossa) یک روش رنگ‌آمیزی کلاسیک را برای تشخیص رسوبات معدنی در بافت‌های حیوانی ابداع کرد. از آن زمان، این روش به طور گسترده استفاده شده و با ضد رنگ‌های مختلف ترکیب شده است. وان کوزا در یکی از اولین تحقیقات خود، بخش‌هایی از کلیه را با محلول‌های ۱ تا ۵ درصد نیترات نقره تیمار کرد که منجر به رنگ زرد رسوبات کلسیم شد. این رنگ موقت بود و به تدریج از رنگ خاکستری به سیاه تغییر کرد. برای نشان دادن یافته‌های خود، او تصویری از کلیه اسب مسموم شده با سولفات مس ارائه داد.



شکل ۱: Julius von Kossa؛ b: رنگ آمیزی کلیه اسب مسموم شده با سولفات مس با وان کوزا

## انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا در بافت شناسی

این رنگ برای تشخیص کلسینوز (Calcinosis) مانند کندروکلسینوز (Chondrocalcinosis)، نفروکلسینوز (Nephrocalcinosis)، کلسینوز جلدی (Cutaneous Calcinosis) مفید است. همچنین می‌توان از آن برای تشخیص کلسیفیکاسیون در تومورها استفاده کرد.

سنجش میزان رسوب کلسیم داخل سلولی به روش رنگ‌سنجی در تمایز سلولهای مزانشیمی به استئوبلاست نیز با رنگ آمیزی وان کوزا انجام می‌شود.

### نگاهی اجمالی به کلسیم رنگ شده با وان کوزا

کلسیم برای همه موجودات زنده ضروری است، جایی که جداسازی و انتشار  $Ca^{2+}$  در داخل و خارج سیتوپلاسم به عنوان یک سیگنال برای بسیاری از فرآیندهای سلولی عمل می‌کند. ۹۹ درصد کلسیم در استخوان‌ها و دندان‌ها و ۱ درصد باقی‌مانده در خون و بافت نرم یافت می‌شود. سطح کلسیم سرم به شدت کنترل می‌شود (۸,۴-۱۱,۴ میلی گرم در دسی لیتر) و هر گونه تغییر خارج از این محدوده می‌تواند اثرات جدی داشته باشد. کلسیم در انقباض و شل شدن عروق خونی، انتقال پالس‌های عصبی، انقباض عضلانی و ترشح هورمون نقش دارد. کانال‌های یون کلسیم، مهاجرت یون‌های کلسیم را در غشای سلولی کنترل می‌کنند و امکان فعال‌سازی و مهار طیف وسیعی از آنزیم‌ها را فراهم می‌کنند. علل سطوح پایین کلسیم عبارتند از نارسایی مزمن کلیه، کمبود ویتامین D و سطوح پایین منیزیم خون که می‌تواند در اعتیاد شدید به الکل رخ دهد.

### انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی وان کوزا

رنگ‌آمیزی وان کوزا را می‌توان روی انواع بافت‌هایی که ممکن است دارای رسوب غیرطبیعی کلسیم باشند استفاده کرد. اغلب بافت‌هایی مانند مفاصل، رگ‌های خونی و کلیه‌ها می‌توانند جز این موارد هستند.

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

## پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی وان کوزا در بافت‌شناسی

در این پروتکل برای رنگ‌آمیزی هسته سلولها و سیتوپلاسم، از رنگ Nuclear red استفاده می‌شود.

### مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ‌آمیزی اختصاصی وان کوزا

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. آبیگری 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 ۱۰ 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 وان کوزا

۱. لام‌های آماده شده را در محلول ۵٪ نقره نیترات یا محلول رنگی وان کوزا شناور می‌کنیم.
۲. لام‌ها را در معرض نور طبیعی یا لامپ UV به مدت ۲۰ دقیقه قرار می‌دهیم و پس از آن لام‌ها را با آب مقطر شستشو می‌دهیم.
۳. لام‌ها را در محلول سدیم تیوسولفات ۲ درصد به مدت ۲ دقیقه انکوبه می‌کنیم و با جریان آب شستشوی مختصر می‌دهیم.
۴. نمونه‌های بافتی را اکنون با محلول رنگی ۱٪ Nuclear red به مدت ۲ دقیقه تیمار نموده و سریعاً دهیدراته می‌کنیم.

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 وان کوزا

### مواد مورد نیاز

- اتانول مطلق
- پارافین
- آب مقطر
- فرمالین ده درصد
- چسب انتلان
- نقره نیترات
- لامپ UV
- سدیم تیوسولفات
- Nuclear red

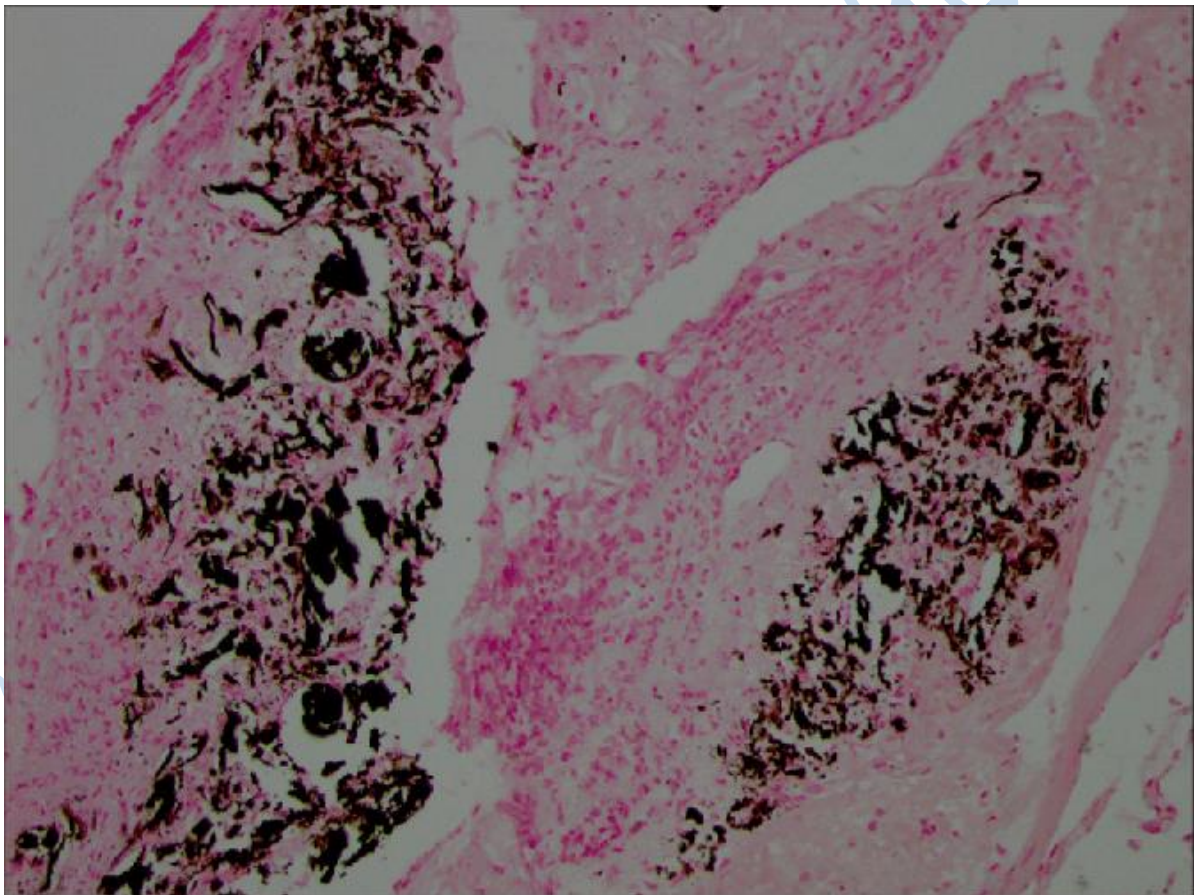
### تجهیزات مورد نیاز

- میکروسکوپ
- دستگاه میکروتوم
- دستگاه گرمکن اسلاید بافتی
- دستگاه پارافین دیسپنسر
- دستگاه تیشو امبدینگ
- لام و لامل

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

## تفسیر نتایج رنگ آمیزی وان کوزا

تکنیک رنگ آمیزی وان کوزا یک واکنش دو مرحله‌ای است: اول، کاتیون‌های نقره با اجزای رسوبات کلسیم واکنش می‌دهند که منجر به رنگ زرد ناپایدار می‌شود، در حالی که در مرحله دوم، مواد آلی نقره متصل شده را به نقره فلزی سیاه با کمک نور تغییر می‌دهند. Nuclear red اجازه می‌دهد تا هسته سلول‌ها به رنگ قرمز و سیتوپلاسم آنها به رنگ صورتی رنگ آمیزی شود. یکی از روش‌های تشخیص انواع کلسینوز در پاتولوژی، رنگ آمیزی وان کوزا است به عنوان مثال در کلسینوز دستگاه گوارش از جمله کلسینوز مخاط مری که یک بیماری نادر است رسوبات کلسیمی به راحتی قابل شناسایی است.



شکل ۲: رنگ آمیزی وان کوزا نشان‌دهنده رسوبات کلسیم سیاه رنگ متعدد در مخاط سنگفرشی و ترشحات فیبرین چرکی در کلسینوز مری. (بزرگنمایی  $\times 200$ )

در برخی از پروتکل‌ها، علاوه بر اینکه رسوبات کلسیمی، به رنگ سیاه مشاهده می‌شود، کلاژن و استئوید (Osteoid) نیز قرمز رنگ می‌شوند که سبب تشخیص و بررسی دقیقتر نمونه بافتی می‌شود.



شکل ۳: در رنگ آمیزی وان کوزا، بافت استخوانی معدنی شده سیاه، جزء استوئیدی صورتی و هسته های سلول آبی/سیاه رنگ می شوند.

## ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی وان کوزا 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 وان کوزا است.

آزمایشگاه بافت شناسی شرکت بافت و ژن پاسارگاد با استفاده از تجهیزات و مواد آزمایشگاهی استاندارد، آماده ارائه خدمات رنگ آمیزی وان کوزا برای انواع نمونه های انسانی و حیوانات آزمایشگاهی مطرح شده در طرح های پژوهشی می باشد.

### جمع بندی

کلسیفیکاسیون بافت در مشکلات فرآیندهای متابولیکی بدن و در تومورها نیز نقش بسزایی دارد. بنابراین تکنیکهای معتبر بررسی رسوبات کلسیم به تشخیص دقیق پزشکی و تحقیقاتی پاتولوژی کمک می کند. همانطور که توضیح داده شد یکی از این تکنیک ها، رنگ آمیزی وان کوزا در آزمایشگاه پاتولوژی است که به بررسی کلسیم در نمونه بافتی می پردازد.



## سوالات متداول

۱. رنگ آمیزی وان کوزا برای چه مواردی در آزمایشگاه پاتولوژی استفاده می شود؟

رنگ آمیزی وان کوزا به طور گسترده در بافت شناسی برای تشخیص وجود رسوبات غیر طبیعی کلسیم در بدن استفاده می شود.

۲. اساس تکنیک رنگ آمیزی وان کوزا در بافت شناسی چیست؟

اصل این رنگ آمیزی مبنی بر تبدیل نمک های کلسیم به نمک های نقره است: یون های کلسیم، متصل به فسفات ها، با یون های

نقره در محلول نیترات جایگزین می شوند و نهایتاً رسوبات کلسیمی به رنگ سیاه حاصل می شود.

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)

   ۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱