



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 ورهاف (Verhoeff)  
در آزمایشگاه بافت شناسی

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

## مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی ورهاف در بافت‌شناسی

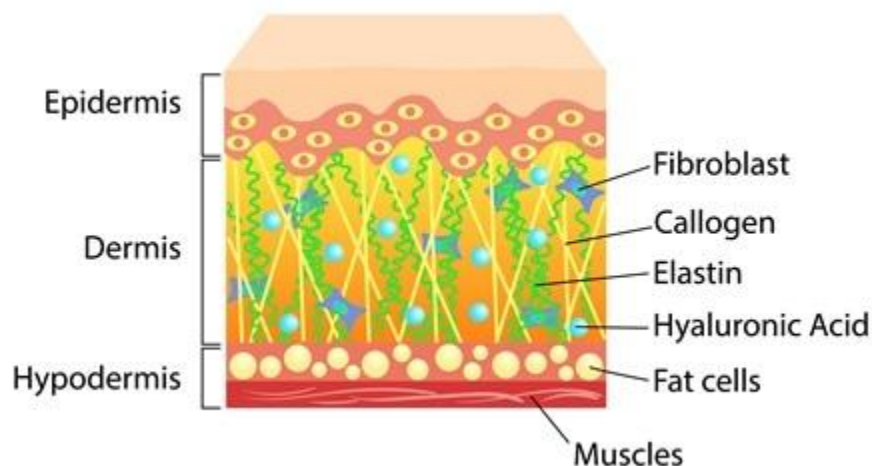
رنگ‌آمیزی ورهاف یا ورهوف (Verhoeff) برای رنگ‌آمیزی الیاف الاستیک و الاستین در بخش‌های برخی بافت‌ها در بافت‌شناسی استفاده می‌شود. این رنگ با نام‌های (Verhoeff's elastic staining (VEG) و Verhoeff-Van Gieson (VVG) staining نیز شناخته شده است. رنگ ورهاف انواع پیوندهای کاتیونی، آنیونی و غیریونی را با الاستین، تشکیل می‌دهد. فیبرهای الاستیکی به کمپلکس‌های آهن - هماتوکسیلینی که توسط معرف‌های موجود در رنگ ایجاد می‌شود، تمایل زیاد دارد و از این رو سبب می‌شود الاستین رنگ شده بماند در حالی که اجزای دیگر بافت رنگ را از دست می‌دهند. در این روش رنگ‌آمیزی معمولاً تیوسولفات سدیم برای از بین بردن ید اضافی و یک ضد رنگ (اغلب رنگ Van Gieson) برای تضاد رنگ اصلی استفاده می‌شود.

## تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی ورهاف

Ira Van Gieson برای اولین بار پروتکل رنگ‌آمیزی ورهاف (VVG) Verhoeff-van Gieson را در سال ۱۸۸۹ به عنوان روشی برای ارزیابی رشته‌های کلاژن در بافت عصبی توصیف کرد. فردریک هرمان ورهاف (Frederick Herman Verhoeff)، جراح و آسیب‌شناس آمریکایی، سپس در سال ۱۹۰۸ این رنگ را به عنوان روشی برای تمایز کلاژن و سایر بافت‌های همبند، و به ویژه متمایز کردن الیاف الاستیک اصلاح کرد.

## انواع کاربردهای رنگ‌آمیزی اختصاصی ورهاف در بافت‌شناسی

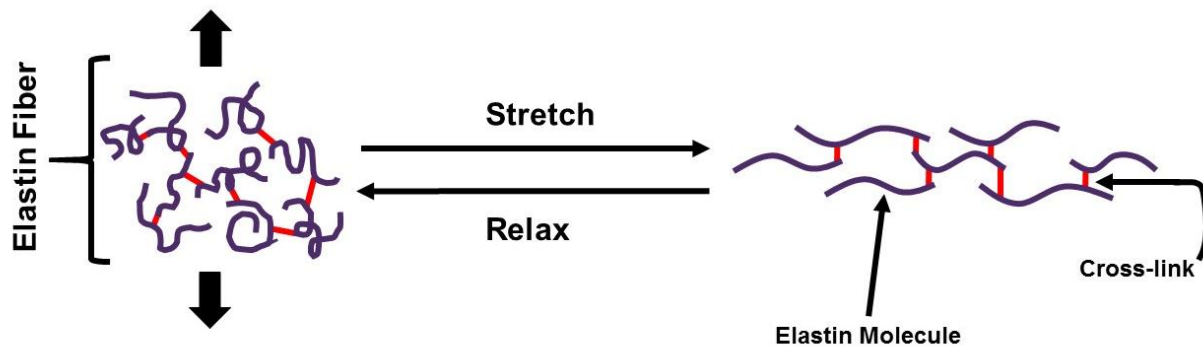
رنگ‌آمیزی ورهاف بافت‌الاستیک در تشخیص پاتولوژی و تحقیقات بافت‌شناسی بیماری‌های متنوع مرتبط با الاستین مانند آمفیزم یا آتروفی بافت‌الاستیک (Emphysema)، تصلب شرایین (نازک شدن و از بین رفتن الیاف الاستیک)، پیری (Aging) و سایر بیماری‌های عروقی مفید است. با افزایش سن، تغییراتی مانند شکافتن و تکه‌تکه شدن فیبرهای الاستیک اتفاق می‌افتد، این تغییرات در پوست بصورت علائم چروکیده و نسبتاً شل نشان داده می‌شود. علاوه بر بررسی تغییرات ساختاری فیبرهای الاستین در بیماری‌ها با رنگ‌آمیزی ورهاف، برای تحقیق و آنالیز تاثیرات مواد شیمیایی، گیاهی و داروهای سنتز شده بر الاستین‌ها در بیماری‌های ذکر شده نیز کاربرد دارد.



شکل ۱: موقعیت قرار گیری الاستین در بافت پوست

## نگاهی اجمالی به فیبرهای الاستیک رنگ شده با ورهاف

الاستین یا فیبرهای زرد یک پروتئین ماتریکس خارج سلولی (ECM) هستند که مسئول انبساط و کشش بسیاری از بافت‌های مهره‌داران، مانند شریان‌های بزرگ، دریچه‌های قلب، بافت‌های ریوی، پوست و برخی رباطها و غضروف‌ها می‌باشند. برای مثال فیبرهای الاستیک فراوانی در آئورت وجود دارند که انعطاف پذیری زیادی را برای این رگ خونی بزرگ فراهم می‌کنند. الیاف الاستیک که محصولات مونومرهای تروپوالاستین (tropoelastin) به صورت آنزیمی و پروتئین‌های میکروفیبریلار هستند، از یک هسته الاستین پلیمریزه نامحلول و میکروالیاف واقع در حاشیه‌ها تشکیل شده اند. الاستین در بافت‌های الاستیک به وفور یافت می‌شود و بافت‌های غنی از الاستین شامل آئورت و رگ‌های خونی اصلی (۲۸ تا ۳۲ درصد)، ریه‌ها (۳ تا ۷ درصد)، رباط‌های الاستیک (۵۰ درصد)، تاندون‌ها (۴ درصد)، و پوست (۲-۳٪) هستند. اسیدهای آمینه اصلی تشکیل دهنده الاستین، پرولین، گلیسین، دسموزین و ایزودسموزین هستند. آنها در توالی‌های کوتاه و مکرر از سه تا نه اسیدآمینه گروه‌بندی می‌شوند که ساختارهای قوی و انعطاف‌پذیری ایجاد می‌کنند.



شکل ۲: ساختار فیبر الاستین

## انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی ورهاف

رنگ آمیزی Verhoeff روی بافت های فیکس شده در هر فیکساتوری قابل انجام است، اگرچه فیکساتورهای مبنی بر فرمالین بیشتر در این تکنیک موفق هستند. کلیه نمونه‌های بافتی که دارای فیبر الاستیک هستند مانند پوست، قلب، ریه، عروق خونی، رحم و غیره بصورت فریز و فیکس از انسان، حیوانات آزمایشگاهی و همچنین سایر موجودات زنده قابل انجام می‌باشد.

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

### پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی ورهاف در بافت‌شناسی

جهت انجام مراحل رنگ‌آمیزی ورهاف پروتکل‌های مختلفی موجود می‌باشد که در این مقاله به یکی از پروتکل‌ها می‌-

پردازیم.

### مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ‌آمیزی اختصاصی ورهاف

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. آبدگیری نمونه بافتی: اکنون می بایست 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. 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 ورهاف

۱. نمونه‌های فیکس شده را در جار رنگ‌آمیزی حاوی محلول رنگی ورهاف 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. لام‌ها را با لامل و چسب انتلان مونت نموده و نهایتاً پس از اتمام مراحل رنگ‌آمیزی ورهاف، لام‌های آماده شده را با میکروسکوپ نوری بررسی می‌کنیم.

## تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی ورهاف

### مواد مورد نیاز

- پودر رنگ ورهاف
- پروپیلن گلیکول
- فرمالین
- آب مقطر
- چسب اتلان
- رنگ نوکلئار فست رد

### تجهیزات مورد نیاز

- میکروسکوپ نوری
- جار رنگ‌آمیزی لام
- لام و لامل
- فور
- کاغذ صافی

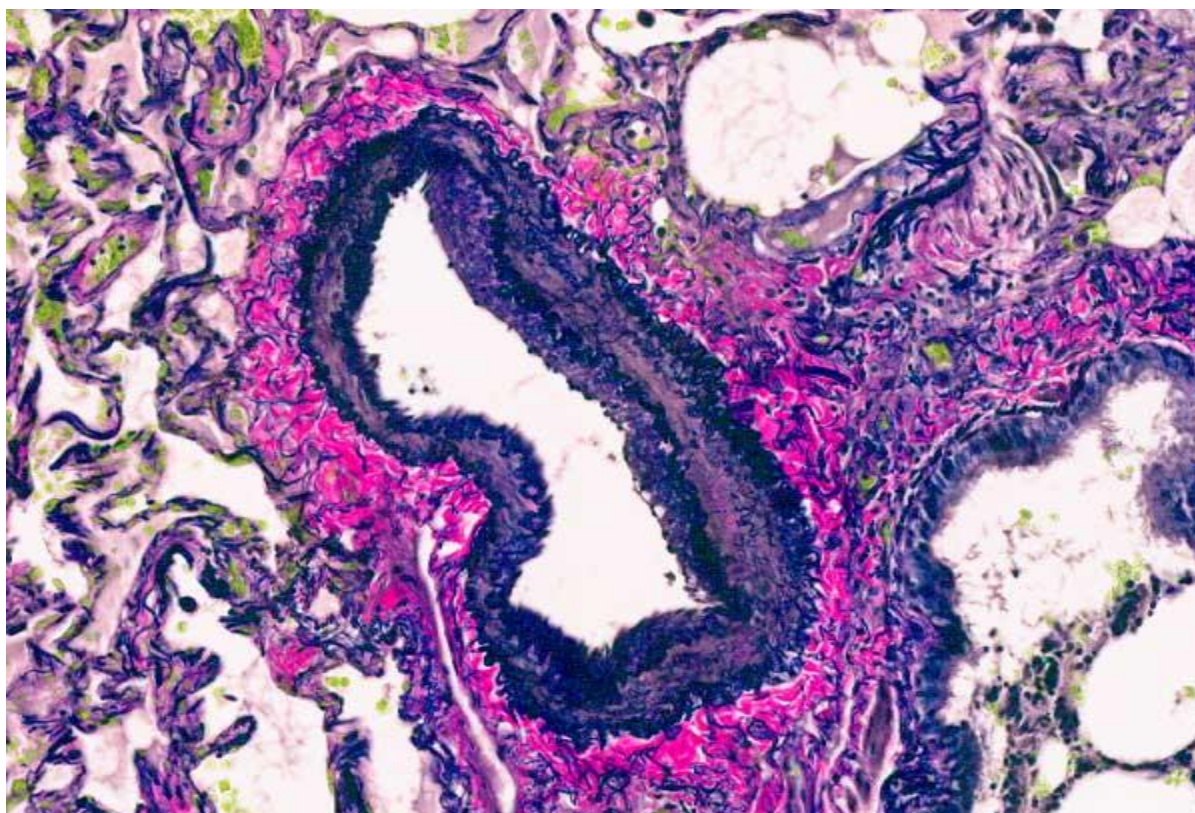
جهت مطالعه بیشتر، تجهیزات عمومی و تخصصی در آزمایشگاه بافت شناسی را کلیک کنید.

### تفسیر نتایج رنگ‌آمیزی ورهاف

الیاف الاستیک با روشهای رنگ‌آمیزی روتین مانند هماتوکسیلین و ائوزین مقاطع بافتی به خوبی متمایز نمی شوند. ممکن است در رنگ‌آمیزی H&E تا حدودی قابل بررسی باشد، اما اغلب نمی توان به وضوح از رشته‌های کلاژن و ماهیچه های صاف تشخیص داد. اما رنگ‌آمیزی ورهاف تجسم این ساختارهای ظریف الاستیک را در زیر میکروسکوپ نوری امکان پذیر



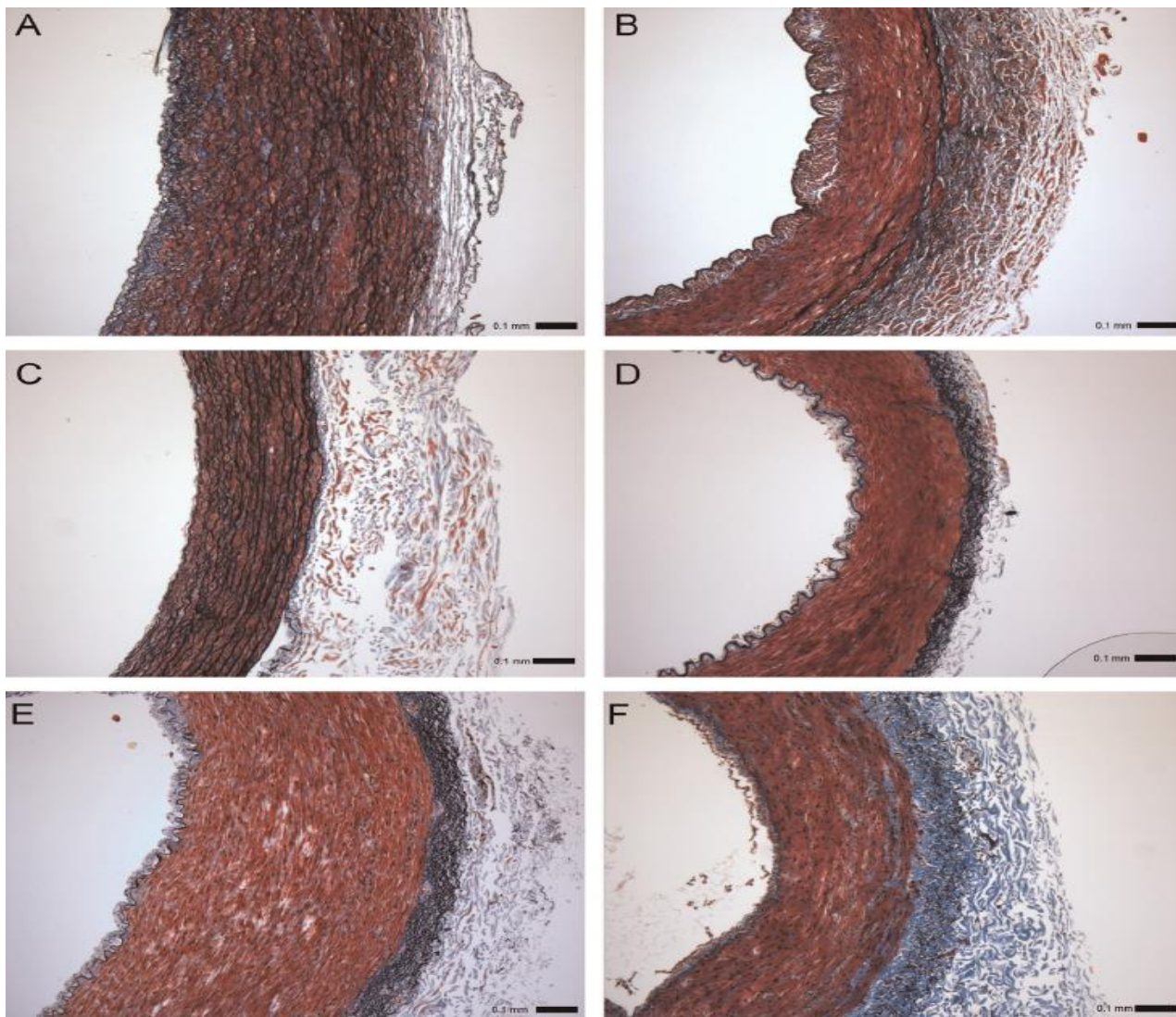
می‌سازد. این روش منجر به رنگ آمیزی الیاف و هسته‌های الاستیک به رنگ سیاه و آبی، کلاژن به رنگ قرمز و اجزای سیتوپلاسمی به رنگ زرد می‌شود.



شکل ۳: رنگ‌آمیزی ورهاف بافت ریه انسان. فیبرهای الاستیک با رنگ‌های آبی/مشکی و کلاژن بصورت قرمز / صورتی مشاهده می‌گردد.

یکی از رنگ‌هایی که همزمان با رنگ‌آمیزی ورهاف قابل انجام است، پروتکل تری کروم ماسون است. ترکیب ماسون-ورهاف برای بررسی رگ‌های خونی مفید است. رنگ ورهاف الاستین (سیاه) را برجسته می‌کند اگرچه رنگ ماسون منجر به رنگ متضاد فیبرهای عضلانی و کراتین قرمز می‌شود، در حالی که کلاژن و استخوان به رنگ سبز یا آبی می‌شوند. استفاده از این تکنیک رنگ‌آمیزی ترکیبی بیشترین کاربرد را برای مطالعه پاتولوژی‌های عروقی مثل انسداد شریان قلب دارد و می‌توان برای تمایز شریان‌هایی که دارای دو یا چند لایه الاستیک هستند از وریدهایی که دارای الاستیک منفرد هستند، استفاده کرد. در نتیجه به پاتولوژیست این امکان را می‌دهد تا به راحتی شریان‌های کوچک (که معمولاً دارای دو لایه الاستیک هستند) و وریدها (که دارای یک لایه الاستیک هستند) را تشخیص دهد.





شکل ۴: مقطع‌های رنگ‌آمیزی ورهاف-تری کرم ماسون در انسداد شریان قلب: (A) شریان پروگزیمال و (B) شریان دیستال نزولی قدامی چپ که تقریباً ۲ سانتی‌متر از هم فاصله دارند. (C) شریان سینه داخلی، (D) شریان رادیال (Radial)، (E) و (F) ورید Saphenous بزرگ و (F) ورید Saphenous جانبی.

## ارائه خدمات رنگ‌آمیزی اختصاصی ورهاف در آزمایشگاه بافت‌شناسی

بافت‌شناسی، سیتولوژی و سایر رشته‌های علمی مرتبط، آناتومی میکروسکوپی بافت‌ها و سلول‌ها 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 الاستین در بافت‌های موجود زنده از جمله حیوان آزمایشگاهی به نام رنگ‌آمیزی اختصاصی ورهاف 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 ورهاف 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.

## جمع‌بندی

رنگ‌آمیزی ورهاف به طور گسترده برای اهداف تشخیصی و تحقیقاتی هیستوپاتولوژی استفاده می‌شود. در آزمایشگاه‌های تشخیصی پزشکی، رنگ ورهاف برای شناسایی وجود یا عدم وجود الیاف الاستیک در بافت‌ها استفاده می‌شود. به عنوان مثال، پاتولوژیست‌ها ممکن است از آن برای تشخیص از دست دادن بافت الاستیک در ریه بیماران مبتلا به آمفیزم (emphysema) و نازک شدن و از دست دادن فیبرهای الاستیک در رگ‌های خونی بیماران مبتلا به تصلب شرایین استفاده کنند.

## سوالات متداول

۱. رنگ‌آمیزی ورهاف (Verhoeff) در بافت‌شناسی چه کاربردی دارد؟  
رنگ‌آمیزی ورهاف ساختارهای الاستیک در نمونه‌های بافتی مختلف مانند پوست، ریه، عروق خونی را متمایز می‌کند.
۲. کدام نمونه‌های بافتی مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی ورهاف قرار می‌گیرد؟  
بافت‌هایی که دارای فیبرهای الاستیک هستند مانند پوست، انواع عروق، ریه و بافت رحم با تکنیک ورهاف مطالعه می‌شود.

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)**

