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 آلشین بلو (Alcian blue) در آزمایشگاه بافت‌شناسی

*آنچه در این مطلب خواهید خواند | صفحه

*مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو در بافت‌شناسی ۳

*تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو ۴

*انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو در بافت شناسی ۴

*نگاهی اجمالی به موسین رنگ شده با آلشین بلو..... ۴

*انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو..... ۵

*پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو در بافت‌شناسی..... ۶

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو..... ۶

مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو..... ۶

*تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی آلشین بلو..... ۸

*تفسیر نتایج رنگ آمیزی آلشین بلو..... ۹

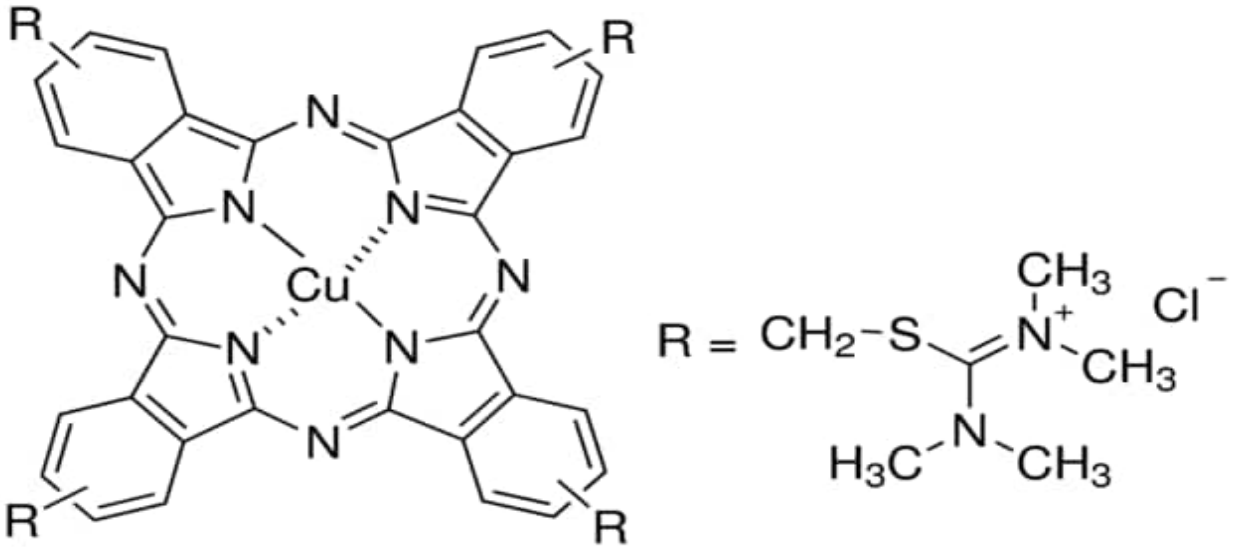
*ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو در آزمایشگاه بافت شناسی..... ۱۱

*جمع بندی..... ۱۲

*سوالات متداول..... ۱۲

مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو در بافت شناسی

یکی از رنگ‌آمیزی های اختصاصی در بافت شناسی تشخیصی و تحقیقاتی ، تکنیک آلشین بلو یا آلسین بلو (Alcian blue) است. آلشین بلو یک مولکول رنگ بزرگ است که از یک حلقه مرکزی فتالوسیانین (Pthalocyanine) حاوی مس تشکیل شده است که از طریق پیوندهای تیواتر به چهار گروه ایزوتیورونیوم متصل شده است. گروه‌های ایزوتیورونیوم پایه‌های نسبتاً قوی هستند که ماهیت کاتیونی آلشین بلو محسوب می شوند. آلشین بلو گروهی از رنگهای پایه چند ظرفیتی محلول در آب هستند که رنگ آبی آن به دلیل وجود مس است. در بافت شناسی، آلشین بلو هم موکوپلی ساکاریدهای اسید سولفاته و کربوکسیله و هم سیالوموسین های سولفاته و کربوکسیله (گلیکوپروتئین) را با ایجاد پیوندهای نمکی با گروه‌های اسیدی آنها، رنگ می کند.



شکل ۱: ساختار مولکولی رنگ آلشین بلو (Alcian blue)

تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو

آلشین بلو در ابتدا در دهه ۱۹۴۰ در صنایع شیمیایی انگلیس تولیده شده و برای رنگ‌آمیزی الیاف در نساجی استفاده می شد. انواع مختلفی از رنگ‌های آلشین بلو در گذشته تولید شده‌اند که از نظر تعداد گروه‌های ایزوتیورونیوم مرتبط و همچنین اجزای رقیق‌کننده متفاوت هستند. آزمایش رنگ آلشین بلو برای اهداف بیولوژیکی در دهه ۱۹۵۰ آغاز شد. محققی به نام Steedman آلشین بلو را برای رنگ آمیزی غضروف و موسین استفاده نمود و در نهایت منجر به ستاپ رنگ Alcian Blue 8GX برای رنگ آمیزی موسین ها در نمونه های بافتی در پاتولوژی شد.

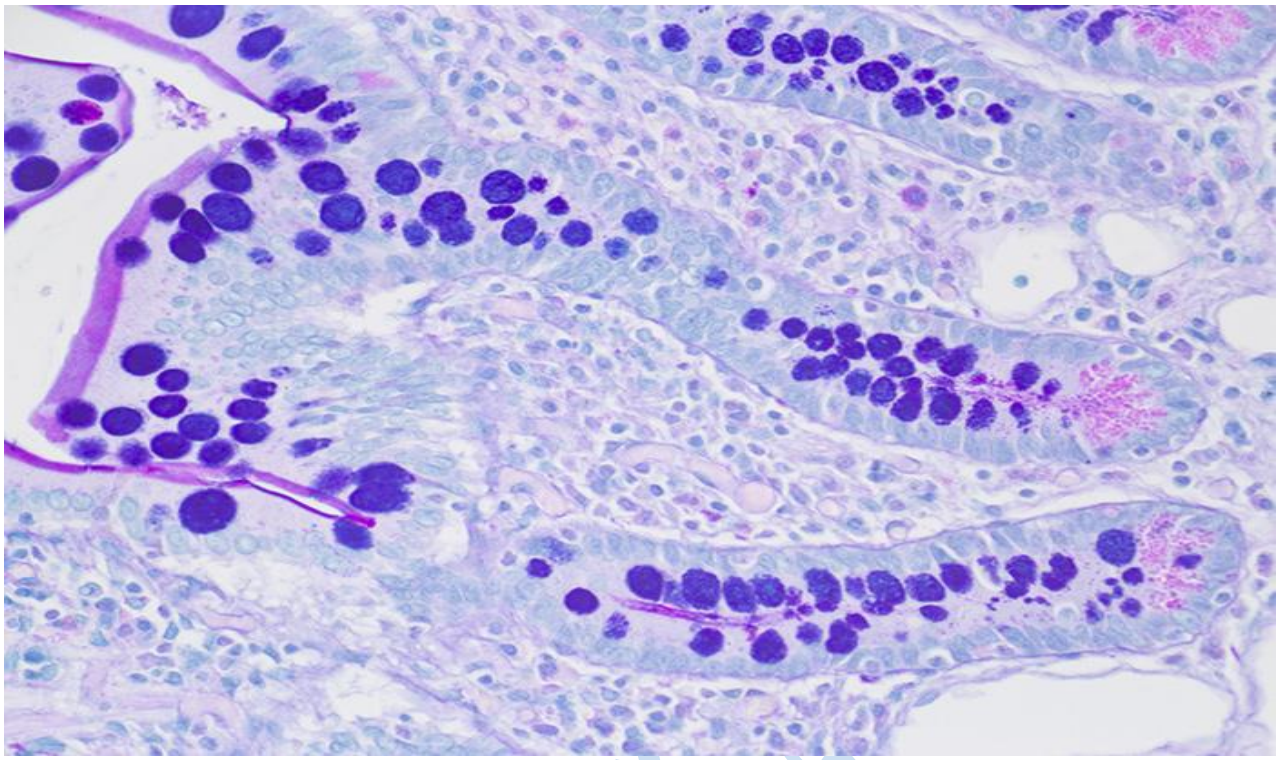
انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو در بافت شناسی

آلشین بلو در آزمایشگاه بافت‌شناسی برای تشخیص موسین‌های اسیدی استفاده می‌شود که توسط تومورهای مختلف بافت همبند و اپیتلیال ترشح شوند. رنگ آلشین بلو بیشتر در نمونه‌های بافتی از دستگاه گوارش استفاده می‌شود و در تشخیص فرآیندهای پاتولوژیک مانند Barrett's esophagus مفید است.

استفاده از محلول های آلسیان بلو با pH های مختلف (۱,۰ و ۲,۵) نیز به تمایز انواع مختلف مواد مخاطی اسیدی کمک می کند.

نگاهی اجمالی به موسین رنگ شده با آلشین بلو

موسین ها گلیکوپروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالا هستند که در اپیتلیوم دستگاه گوارش، تنفس و تولید مثل پراکنده هستند. موسین ها از یک هسته پروتئینی مرکزی با زنجیره های متعددی از کربوهیدرات (پلی ساکارید) به هم متصل، تشکیل شده‌اند. محتوای کربوهیدرات موسین ممکن است ۶۰ تا ۸۰ درصد وزن مولکولی آن را تشکیل دهد. هسته پروتئین حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای آمینه سرین و ترئونین (threonine) است. ساختار تعیین کننده موسین ها، وجود تکرارهای پشت سرهم از توالی‌های اسیدآمینه خاص در هسته پروتئین می‌باشد. از دیدگاه مولکولی، موسین ها بر اساس تفاوت در توالی و اندازه تکرارهای پشت سر هم به خانواده های مجزا (Muc ۱، Muc ۲، Muc ۳، و غیره) طبقه بندی می‌شوند.



شکل ۲: انواع موسین‌های رنگ شده (سولفوموسین و سیالوموسین) با رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو.

از دیدگاه هیستوشیمیایی بافت ها، موسین ها را می توان در یکی از دو گروه کلی بر اساس شیمی و ترکیب اجزای کربوهیدرات موسین قرار داد. موسین های باردار یا "اسیدی" حاوی کربوهیدرات هایی با گروه‌های کربوکسیلات (COO) یا سولفونات (SO3) هستند. هر دو گروه در pH فیزیولوژیک یونیزه شده و بار موسین منفی می شود. زنجیره‌های کربوهیدراتی موسین‌های خنثی فاقد گروه‌های اسیدی هستند و بنابراین بار خالصی ندارند. موسین‌های خنثی عمدتاً در اپیتلیوم سطحی معده، غدد برونر (Brunner’s glands) دوازدهه و در اپیتلیوم پروستات یافت می شوند.

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

در رنگ‌آمیزی اختصاصی آلشین بلو، بافت هایی که در حالت توموری تولید موسین ها را به دنبال دارند، مورد مطالعه قرار می گیرند. این نمونه‌های بافتی عبارتند از بخش‌های مختلف دستگاه گوارش مانند روده کوچک، معده، آپاندیس، بیوپسی پستان، ریه، بخش هایی از دستگاه تولیدمثل مانند پروستات رنگ‌آمیزی می‌شوند.

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

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی آلشین بلو در بافت‌شناسی

دستورالعمل رنگ آمیزی آلشین بلو روی نمونه های بافتی همانند اکثر رنگ آمیزی های اختصاصی دیگر شامل دو مرحله کلی آماده سازی لام و رنگ آمیزی نمونه بافتی می‌باشد.

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

هنگامی که نمونه مورد بررسی بافت است ابتدا می بایست بافت طی یک سری مراحل فیکس گردد.

۱. آبگیری بافت: فرایند آبگیری بافت با غوطه‌ور کردن بافت ها در اتانول انجام می شود. اتانول جایگزین آب در سلولهای نمونه بافتی می شود. از افزایش غلظت اتانول (معمولاً از ۷۰ تا ٪ ۱۰۰) در این مراحل استفاده می‌شود.
۲. قالب‌گیری بافت: بعد از آبگیری، پارافین مذاب با دستگاه پارافین دیسپنسر در تیشوبسکت ها می ریزیم. تکه های بافت را در تیشوبسکت حاوی پارافین مذاب قرار داده و قالب گیری کرده و اضافه های پارافین را حذف می‌کنیم نهایتا بلوکهای پارافینی جامد از بافت داریم. پس از خنک شدن پارافین، قالب نمونه را در آب فرو می بریم. نهایتا پارافین که منجمد شد می بایست آن را از قالب جدا کنیم.
۳. برش‌گیری از بلوک پارافینی: در این مرحله از نمونه پارافینی با دستگاه میکروتوم برشهای نازک در حد ۳–۵ میکرون تهیه می کنیم.
۴. آبدهی نمونه برش زده: برش‌های نمونه بافتی را روی لام قرار داده و سپس پارافین های اضافی نمونه ها را با دستگاه گرمکن اسلاید حذف می کنیم و با غلظت های مختلف از اتانول نمونه ها را آبدهی می‌کنیم.
۵. اکنون لام های آماده شده را طبق پروتکل رنگ آمیزی رنگ می‌کنیم.

مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو

pH محلول رنگی آبی آلسیان (آلشین بلو) برای شناسایی بیشتر زیرگروه‌های موسین‌های اسیدی موجود در یک نمونه بافتی بسیار پراهمیت و مهم است.

۱. ابتدا محلول رنگی آلشین بلو با pH موردنظر طبق فرمولاسیون زیر به صورت زیر تهیه می کنیم.

محلول رنگی آلشین بلو pH:2.5 (۱٪ آلشین بلو در ۳٪ استیک اسید آبی): یک گرم آلشین بلو 8GX در ۹۷ سی‌سی آب مقطر حل نموده و ۳ سی‌سی استیک اسید گلسیال به ترکیب اضافه می نماییم و نهایتا محلول رنگی را با کاغذ صافی واتمن فیلتر کرده و در ظرف تیره نگهداری می کنیم.

محلول رنگی آلشین بلو pH:1: یک گرم آلشین بلو را در ۹۰ سی‌سی آب مقطر حل نموده و ۱۰ سی‌سی هیدروکلریک اسید یک نرمال اضافه می کنیم و پس از فیلتر نمودن در ظرف تیره نگهداری می شود.

محلول رنگی آلشین بلو pH:2: یک گرم آلشین بلو در ۱۰۰ سی‌سی از سولفوریک اسید ۱۰ درصد حل می کنیم و پس از فیلتر محلول، در ظرف شیشه‌ای تیره نگهداری می کنیم.

۲. لام های تهیه شده از نمونه بافتی مورد نظر را به مدت سه دقیقه در استیک اسید ۳٪ قرار داده و سپس با آب مقطر شستشو می‌دهیم.

۳. لام‌ها را با محلول رنگی آلشین بلو به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه رنگ می‌کنیم. جار رنگ آمیزی را از محلول رنگ پر نموده تا رنگ آلشین بلو کاملا سطح لام را بپوشاند.

۴. بعد از رنگ آمیزی، لام ها را ۵ دقیقه با آب جاری شستشو می دهیم تا رنگ‌های اضافی حذف گردد. توجه داشته باشیم که در رنگ آمیزی با رنگ دارای pH کمتر از ۲، شستشوی مختصر داشته باشیم که رنگ از لام کاملا حذف نشود.

۵. لام ها را با آب مقطر به مدت کمتر از ۵ ثانیه غوطه‌ور می شوند.

۶. به سرعت اسلایدهای میکروسکوپی رنگ آمیزی شده را با اتانول مطلق دهیدراته نموده و با چسب انتلان و لامل نمونه را روی لام مونت می‌کنیم و با میکروسکوپ نوری نمونه های فیکس و رنگ شده را بررسی می کنیم.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی آلشین بلو

مواد مورد نیاز

- اتانول مطلق
- پارافین
- آب مقطر
- استیک اسید گلسیال
- چسب انتلان
- زایلین
- سولفوریک اسید
- هیدروکلریک اسید

تجهیزات مورد نیاز

- میکروسکوپ نوری
- پارافین دیسپنسر
- دستگاه میکروتوم
- دستگاه گرمکن اسلاید بافتی
- جار رنگ‌آمیزی لام
- لام و لامل
- کاغذ صافی واتمن
- ظرف شیشه‌ای تیره

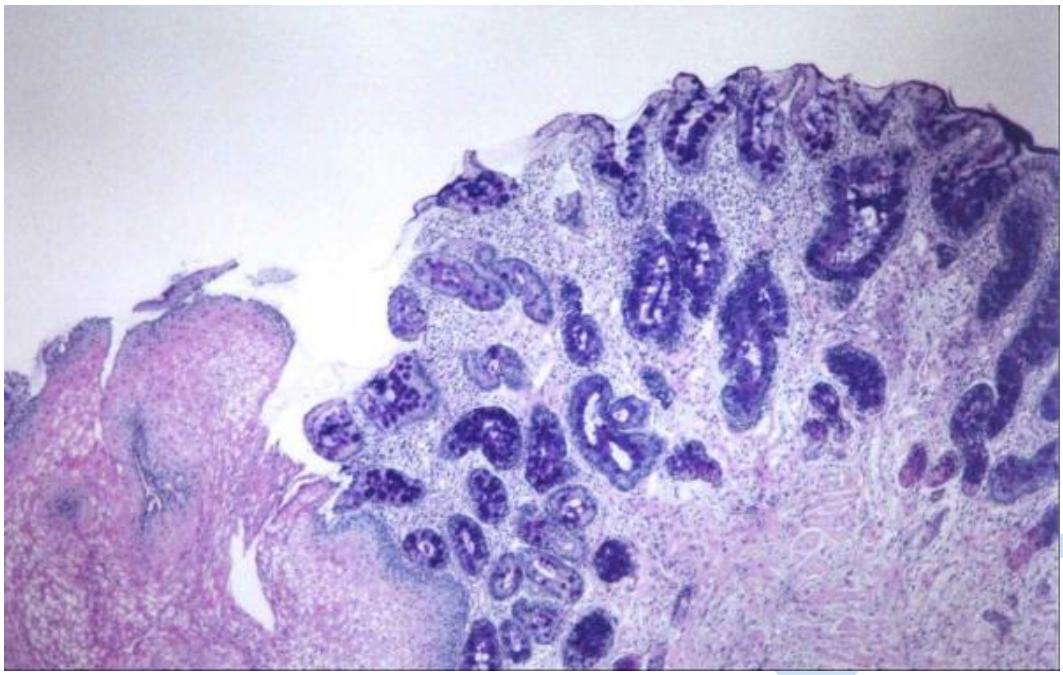
جهت مطالعه بیشتر، تجهیزات عمومی و تخصصی در آزمایشگاه بافت شناسی را کلیک کنید.

بافت و رن پاسارگاد

تفسیر نتایج رنگ آمیزی آلشین بلو

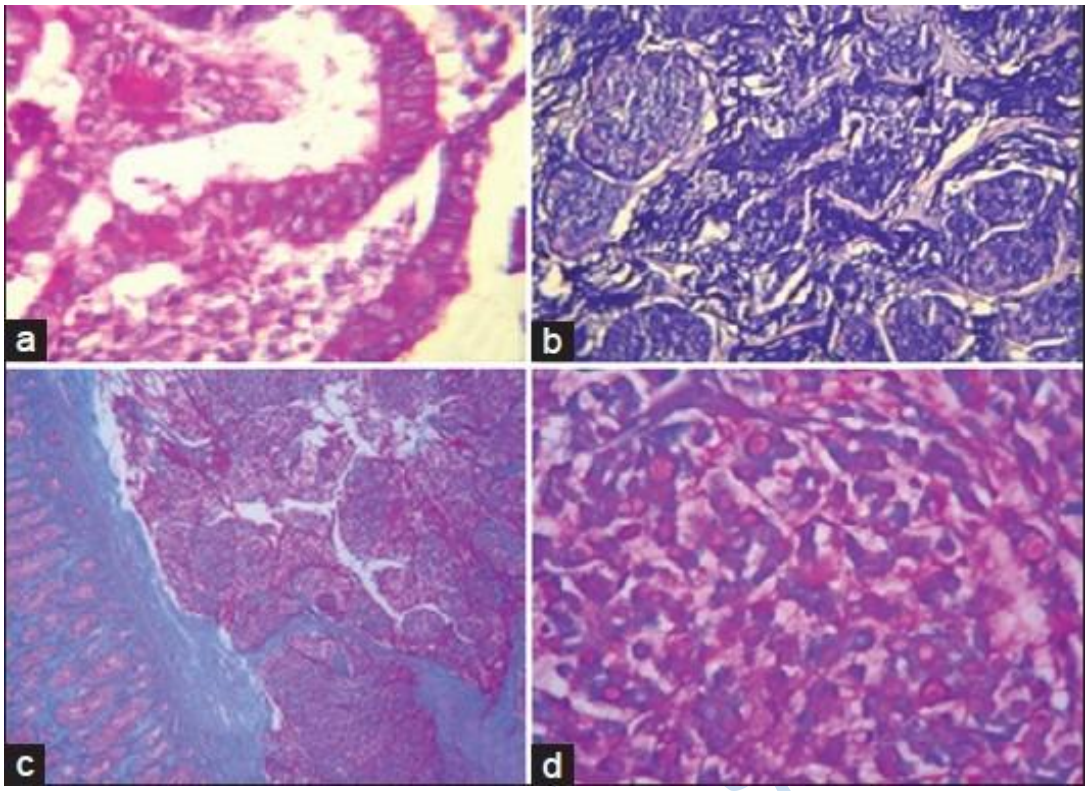
رنگ آمیزی پلی ساکاریدهای اسیدی با آلشین بلو برای تشخیص و شناسایی موسین‌های اسیدی اپیتلیال و بافت همبند استفاده می شود. موسین‌ها نوعی کربوهیدرات هستند و در دستگاه گوارش و دستگاه تنفسی یافت می شوند. موسین‌های اسیدی بار منفی دارند. مولکول رنگ آبی آلشین دارای یک حلقه فتالوسیانین حاوی مس است که به چهار گروه ایزوتیورونیوم که دارای بار مثبت هستند، مرتبط است. مولکول رنگ با گروه‌های گوگرد و یا کربوکسیل موسین بسته به pH مورد استفاده متصل می شود. pH تعیین می کند که کدام موسین رنگ آمیزی شده است. با محلول اسید استیک ۳ درصد با pH ۲.۵، موکوپلی ساکاریدهای اسید سولفاته و کربوکسیله و گلیکوپروتئین‌ها را رنگ می کند. در pH ۱.۰ فقط موکوپلی ساکاریدهای اسید سولفاته را رنگ می کند، بنابراین موسین های بسیار اسیدی‌تر هستند. رنگ آبی توسط مس موجود در مولکول رنگ ایجاد می شود.

آلشین بلو با pH ۲,۵ برای تشخیص مری بارت (Barrett's esophagus) استفاده می‌شود، زیرا سلولهای ترشحی جامی شکل (Goblet)را نیز رنگ آمیزی می کند. آلشین بلو موسین های اسیدی را آبی رنگ می کند اما موسین‌های خنثی را رنگ نمی‌کند. اگر می‌خواهید موسین‌های خنثی را نیز بررسی کنید، آلشین بلو را می‌توان با رنگ PAS ، که موسین‌های خنثی را ارغوانی رنگ می‌کند، استفاده نمود. سلول‌هایی که دارای موسین اسیدی و خنثی هستند ممکن است به رنگ آبی تیره یا بنفش ظاهر شوند.



شکل ۳: سلول های ترشحی جامی شکل با pH ۲٫۵ آلشین بلو آبی پررنگ و موسین‌های خنثی با رنگ آمیزی PAS ارغوانی رنگ شده اند. بزرگنمایی ۴۰×

همانطور که پیش‌تر توضیح داده شد، از روش رنگ‌آمیزی آلشین بلو در تشخیص انواع بیماری‌های مربوط به دستگاه گوارش نیز استفاده می‌گردد. در بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم کولون(Adenocarcinoma colon)، سلول‌های بدخیم با موسین های خنثی و اسیدی توسط رنگ آمیزی پاس و آلشین بلو نشان داده شده اند.



شکل ۴: (a) موسین های خنثی در سلولهای بدخیم با پاس رنگ شده اند. (b) کارسینوم موسینوس که موسین های اسیدی را نشان می‌دهد.
(c) کارسینوم موسینوس (Mucinous carcinoma) که موسین های اسیدی و خنثی را نشان می دهد (ترکیب آلشین آبی و پاس، ۱۰۰ ×).
(d) کارسینوم سلول حلقه (Signet ring cell carcinoma) که موسین خنثی را نشان می دهد (ترکیب آلشین آبی و پاس، ۴۰۰ ×)

ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی آلشین بلو در آزمایشگاه بافت شناسی

رنگ‌آمیزی یکی از تکنیک های بافت شناسی رایج در تشخیص پزشکی و تحقیقاتی بسیاری از بیماری‌ها مانند تومورها است که اگرچه روشی ساده به نظر می‌رسند اما فاکتورهای زیادی از جمله، نحوه ستاپ، کیفیت مواد، کالیبراسیون تجهیزات و تجربه کارشناس آزمایشگاه در طول انجام تکنیک می‌تواند بر نتایج نهایی آنالیز نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده مهم باشد.

در آزمایشگاه پاتولوژی هیستوژنوتک با استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی استاندارد، برشهای بافت میکرومتری با کیفیت تهیه کرده و با بکار بردن انواع رنگ آمیزی های عمومی و اختصاصی از جمله خدمات رنگ آمیزی آلشین بلو، اویل‌رد، گلژی، پاپ اسمیر، تری کروم ماسون، کریزیل ویوله، پاس، لوکسال بلو و غیره به بررسی و مطالعه

نمونه‌های بافتی بیمار و سالم ارسالی از سوی محققان، اساتید و دانشجویان می پردازد و نتایج حاصل را به همراه پروتکل های تکنیک به محقق تحویل داده و همچنین فرصت شرکت در کارگاه های آموزشی رایگان و پاسخ به سوالات محقق مرتبط با طرح پژوهشی برای محقق فراهم شده است.

جمع بندی

جداسازی و شناسایی موسین ها برای دستیابی به دانش و آگاهی در مورد آسیب شناسی مولکولی بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها و فیبروز سیستیک بسیار مهم است. ترکیبی از تکنیک‌های آلشین بلو و پاس می‌تواند به عنوان تکنیکی برای تشخیص موسین‌های خنثی از موسین‌های اسیدی استفاده شود. در اکثر پروتکل ها، نمونه های بافتی با روش استاندارد آلشین بلو (pH۲.۵) رنگ آمیزی می شوند که نیز به دنبال آن از رنگ پاس هم استفاده می شود. کاربرد ترکیبی آلشین بلو و پاس شاید حساس‌ترین یا جامع‌ترین روش برای تشخیص موسین ها باشد، زیرا همه موسین‌ها در یک نمونه همزمان باید بدون درنظر گرفتن ماهیت بار بررسی و مطالعه شوند.

سوالات متداول

۱. موسین ها با رنگ آلشین بلو در pH:2.5 ، چه رنگی مشاهده می شوند؟

موسین های اسیدی با رنگ آمیزی آلشین بلو آبی پررنگ هستند.

۲. چرا در تشخیص سرطان‌های دستگاه گوارش از رنگ‌آمیزی آلشین بلو استفاده می‌شود؟

تومورهای دستگاه گوارش موسین‌های گلیکوپروتئینی را ترشح می‌کنند که با رنگ‌آمیزی آلشین بلو تشخیص داده می-شوند.

۳. کدام رنگ آمیزی اختصاصی را می‌توان همزمان با رنگ آمیزی آلشین بلو برای مطالعه موسین‌ها انجام داد؟

رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف یا پاس و آلشین بلو را همزمان برای رنگ آمیزی موسین‌ها می‌توان استفاده نمود.

مرکز پژوهشی جامع علوم پایه پزشکی

شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد

Email: histogenotechlab@gmail.com
www.histogene.ir
www.histogene.co
۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱