



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 جونز (Jones)
در آزمایشگاه بافت شناسی

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

مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی جونز در بافت شناسی

رنگ آمیزی جونز یک رنگ متنامین نقره-اسید پرئودیک-شیف (Methenamine silver-PAS) است که در بافت شناسی به عنوان تکنیکی اختصاصی استفاده می شود. این رنگ آمیزی همچنین با نام متنامین پاس با اختصار MPAS نیز شناخته شده است. تکنیک رنگ آمیزی جونز بر اساس اصول واکنش کاهش-اکسیداسیون (Oxidation-reduction) است که اجزای کربوهیدراتی غشای پایه را اکسید می کند. جونز با رنگ آمیزی غشاهای پایه، فیبرهای رتیلولوم، به طور گسترده در تحقیقات و تشخیص پزشکی بیماری های کلیوی استفاده می شود. در این مقاله با اصول و پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی جونز در بافت شناسی آشنا می شویم.

تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی جونز

جونز در ابتدا استفاده از رنگ همتوکسیلین و ائوزین را پیشنهاد کرد. در طی سال ها، یک رنگ جایگزین SF سبز روشن در اولویت بسیاری از موسسات قرار گرفته شد. در اوایل دهه ۱۹۹۰، در ملبورن، استرالیا، روشی توسعه یافت که از رنگ تری کروم ماسون به عنوان روشی بهبودی برای رنگ همتوکسیلین و ائوزین در نظر گرفته شد، زیرا توانست فیبرین را نشان دهد و وجود رسوبات پروتئین گلومرولی را برجسته کند اما هنوز تغییرات ساختاری گلومرول ها به صورت دقیق و واضح قابل مطالعه نبود. بنابراین در صورت نیاز به نشان دادن ویژگی های دقیق گلومرول، بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی نیاز داشت که جونز رنگ آمیزی جونز را برای افزایش حساسیت با میکروسکوپ نوری ارائه داد.

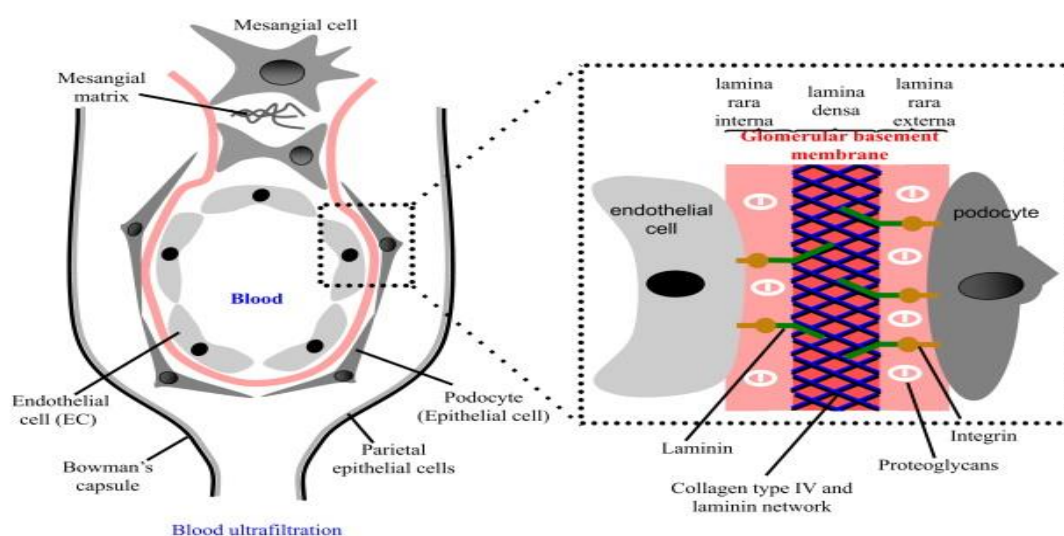
انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی جونز در بافت شناسی

رنگ آمیزی جونز معمولاً در آسیب شناسی کلیه برای نشان دادن جزئیات دقیق گلومرولاروپاتی ها استفاده می شود، از زمانی که Jones برای اولین بار مزایای چنین تکنیکی را توصیف کرد، این امر رایج بوده است. بیماری های مختلف گلومرولونفریت یا التهاب مویرگ های کلیوی از جمله آزوتمی (Azotemia)، نفروز لیپیدی (lipid nephrosis) و غیره با رنگ آمیزی جونز قابل مطالعه می باشد.

نگاهی اجمالی به غشای پایه‌ی رنگ شده با جونز

غشای پایه تقریباً در هر بافتی از بدن قرار دارد. غشاهای پایه می‌تواند در زیر سلول‌های اندوتلیال و اپیتلیال قرار گیرد. سلول‌ها را از بافت همبند زیرین و یا سلول‌های اطراف احاطه کننده مانند ماهیچه‌ها (میوفیبریل‌ها)، چربی، و سلول‌های عصبی (نوروفیبریل) جدا می‌کند. در گلومرول کلیه (یعنی شبکه‌ای از رگ‌های خونی کوچک)، غشای پایه بین لایه اندوتلیال و اپیتلیال قرار دارد تا سد فیلتراسیون گلومرولی را تشکیل دهد. همچنین در ریه‌ها، غشای پایه بین آلوئول‌ها (یعنی کوچکترین کیسه‌های هوایی) و مویرگ‌های ریوی یافت می‌شود. در اتصالات عصبی-عضلانی، غشای پایه در داخل فضای سیناپسی (فضای بین نورون و فیبر عضلانی) یافت می‌شود.

غشای پایه عمدتاً به عنوان پشتیبان ساختاری ایفای نقش می‌کند چرا که به سلول‌ها کمک می‌کند تا به بافت‌های زیرین متصل شوند. همچنین به عنوان یک مانع عمل می‌کند و از حمله سلول‌های سرطانی به لایه‌های بافتی عمیق‌تر جلوگیری می‌کند و در تنظیم رفتار سلولی، مانند تکثیر، تمایز، چسبندگی یا متاستاز ضروری است. آنژیوژنز، که تشکیل عروق خونی جدید است، نیز توسط غشای پایه انجام می‌شود، زیرا اجزای اصلی غشای پایه، مانند کلاژن نوع IV، نقش مهمی در این فرآیند دارند. در برخی از بیماری‌ها تغییرات مورفولوژی و عملکردی در غشای پایه اتفاق می‌افتد که این تغییرات در پاتولوژی به عنوان معیاری جهت بررسی بیماری‌ها در نظر گرفته می‌شود.



شکل ۱: ساختار غشای پایه گلومرول کلیه و اجزای آن نشان داده شده است.

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی جونز

یکی از متداول بافت‌هایی که در تکنیک رنگ‌آمیزی جونز برای غشاء پایه مورد استفاده قرار می‌گیرد، بافت کلیه بصورت بیوپسی از انسان و حیوانات آزمایشگاهی مانند رت، خرگوش، موش و غیره می‌باشد.

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

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی جونز در بافت‌شناسی

جهت انجام تکنیک رنگ‌آمیزی JONES' Method، در ابتدا چند محلول می‌بایست تهیه گردد. برای تهیه محلول ۰٫۲ درصد کلراید طلا، یک سی‌سی کلراید طلا را به ۵۰ سی‌سی آب مقطر اضافه می‌کنیم. محلول Methenamine Silver را از ترکیب ۴۰۰ سی‌سی ۳٪ Methenamine و ۲۰ سی‌سی محلول نقره نیترات تهیه کرده و نهایتاً برای تهیه محلول working، ۵۰ سی‌سی از محلول Methenamine silver را با ۶ سی‌سی از محلول ۵٪ بوراکس (۵ گرم سدیم بورات در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر) مخلوط می‌کنیم.

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ‌آمیزی اختصاصی جونز

۱. 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 ۲-۴ میکرون تهیه می‌کنیم. هر چه برش نازک‌تر باشد، رنگ‌آمیزی غشای پایه بهتر انجام می‌شود.
۲. آبگیری نمونه بافتی: اکنون می‌بایست آب موجود در نمونه‌های بافتی را حذف نموده، بنابراین با اتانول این مرحله انجام میشود یعنی اتانول جایگزین آب در بافت می‌گردد.
۳. 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 مختلف از اتانول نمونه بافتی را آبدهی می‌کنیم.
۴. اکنون لام‌های آماده شده را طبق پروتکل رنگ‌آمیزی رنگ می‌کنیم.

مراحل رنگ‌آمیزی نمونه بافتی در رنگ‌آمیزی اختصاصی جونز

۱. نمونه‌های فیکس شده را در محلول پریودیک اسید ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۰ درجه فور یا حمام آب قرار می‌دهیم.
۲. اسلایدها را دو دقیقه با آب مقطر آبکشی می‌کنیم.
۳. اسلایدها را در جار رنگ‌آمیزی محلول Methenamine Silver در حمام آب یا فور با دمای ۶۰ درجه قرار داده و هر ۵ دقیقه اسلایدها را چک می‌کنیم تا به رنگ قهوه‌ای روشن ظاهر شوند (با میکروسکوپ می‌توانیم رنگ غشاها را بررسی کنیم). نهایتاً اسلایدها را از محلول بیرون آورده و با آب مقطر گرم می‌شویم.
۴. روی هر لام، ۲۰ قطره کلراید طلا ۰.۲٪ ریخته تا خاکستری شود.
۵. ۵ الی ۶ مرتبه لام‌های نمونه را با آب مقطر می‌شویم.
۶. لام‌ها را به مدت ۱ دقیقه در سدیم تیوسولفات ۳٪ انکوبه کرده و مجدداً لام‌ها ۵ مرتبه با آب مقطر می‌شویم.
۷. در این مرحله می‌توانیم از پروتکل رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین جهت رنگ نمودن هسته سلول‌ها استفاده نماییم.
۸. لام‌ها را با لامل و چسب انتلان مونت نموده و نهایتاً پس از اتمام مراحل رنگ‌آمیزی جونز، لام‌های آماده شده را با میکروسکوپ نوری بررسی می‌کنیم.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ‌آمیزی جونز

مواد مورد نیاز

- اتانول مطلق
- پارافین
- آب مقطر
- چسب انتلان
- زایلین
- محلول پریودیک اسید ۱٪
- محلول متنامین ۳٪ (Methenamine)

- نقره نیترات
- سدیم بورات
- کلراید طلا ۰,۲٪
- سدیم تیوسولفات ۳٪

تجهیزات مورد نیاز

- میکروسکوپ نوری
- دستگاه گرمکن اسلاید بافتی
- دستگاه میکروتوم
- جار رنگ آمیزی لام
- لام و لامل
- فور

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

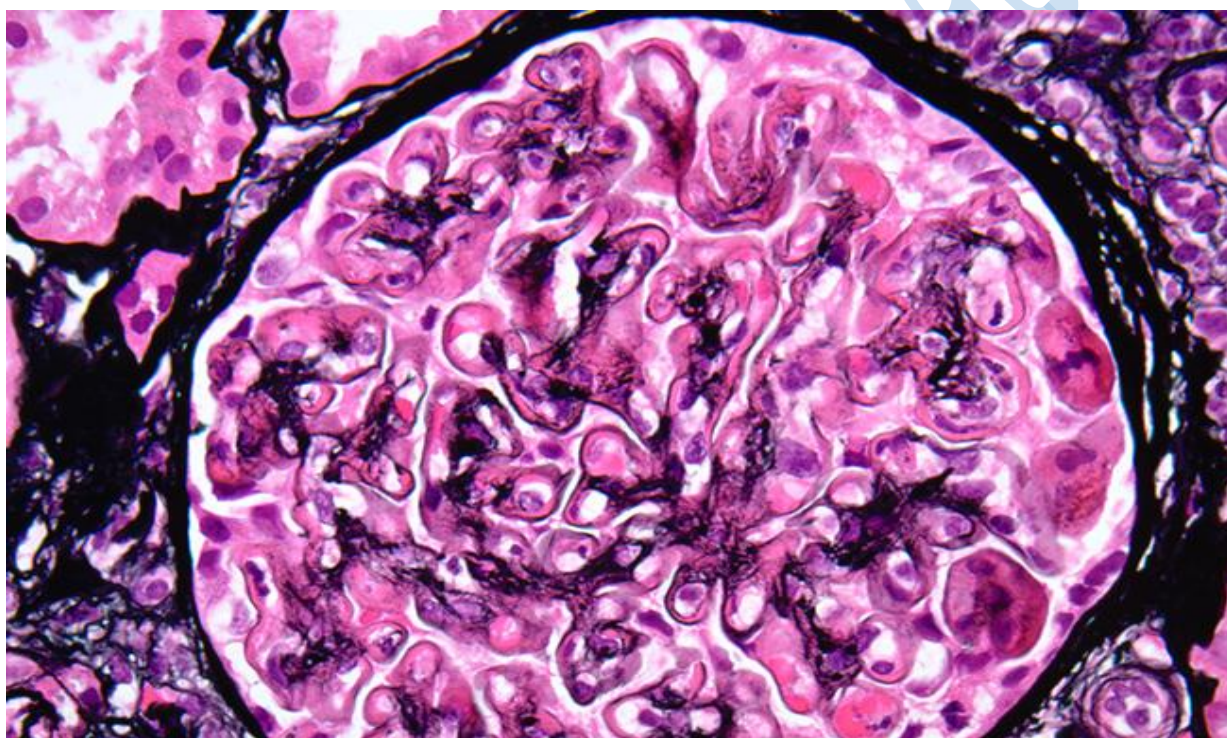
تفسیر نتایج رنگ آمیزی جونز

رنگ آمیزی جونز یا نقره ای متنامین جونز (JMS) برای نشان دادن غشای پایه گلومرولی در بخش های کلیه استفاده می شود. غشاهای پایه نوعی بافت همبند هستند که سلول های اپیتلیال روی آن قرار می گیرند. در کلیه، غشاهای پایه گلومرولی به عنوان فیلتر عمل می کنند. ضخیم شدن غشای پایه گلومرولی اغلب نشانه بیماری کلیوی و دیابت است. تشخیص این غشاها با رنگ آمیزی H&E به طور قابل توجهی دشوار است.

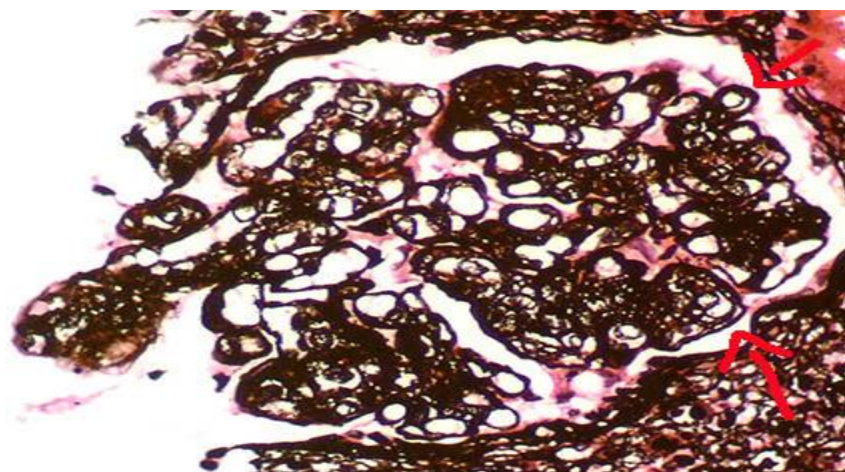
پریودیک اسید از مواد حاوی کربوهیدرات خاص آلدئیدهایی تشکیل می دهد که محلول نقره متنامین را به صورت انتخابی به نقره فلزی کاهش می دهند. از کلراید طلا استفاده می شود که بخش های بافت را رنگ می کند و نقره فلزی را به طلای فلزی تبدیل می کند. سپس نقره احیا نشده و کلراید طلای اضافی توسط تیوسولفات سدیم حذف می شوند. سپس این

بخش با رنگ سبز روشن رنگ آمیزی می شود. نتایج مورد انتظار در رنگ آمیزی جونز بدین صورت می باشد: غشایه پایه به رنگ سیاه، هسته سلول ها آبی، سیتوپلاسم یا پس زمینه با رنگ صورتی.

تغییرات گلومرولی می تواند فقط در برخی از گلومرول ها یا در تقریباً در همه گلومرول ها باشد. اولین گام در ارزیابی تغییرات گلومرولی، تعیین نحوه تغییرات گلومرولی است. گلومرول ها می توانند اسکروز گلومرولی را نشان دهند. وقتی این اتفاق می افتد، تعیین علت آسیب غیرممکن است. به همین در پاتولوژی از رنگ آمیزی های اختصاصی از جمله جونز برای بررسی دقیق تر استفاده می کنند.



شکل ۲: رنگ آمیزی جونز نمونه بافت کلیه. این رنگ آمیزی تکثیر غشاهای پایه گلومرولی و رسوبات زیر اندوتلیال را نشان می دهد.
گلومرولونفریت ممبرونوپرولیفراتیو ضایعه گلومرولی (Membranoproliferative Glomerulonephritis)
با تکثیر اندوکاپیلاری و یا مزانژیال و ضخیم شدن دیواره های مویرگ توسط رسوبات ساب اندوتلیال IgG و یا نوع دیگری از تغییرات ساب اندوتلیال (بین اندوتلیوم و غشای پایه) می باشد. تغییرات غشای پایه با رنگ آمیزی جونز به خوبی قابل آنالیز می باشد. شکل ۳ ضخیم شدن غشای پایه گلومرول ها در بیماری گلومرولونفریت ممبرونوپرولیفراتیو را نشان می دهد.



شکل ۳: رنگ آمیزی جونز نمونه بیوپسی کلیه مبتلا به گلودولونفریت مامرونوپرولیفراتیو. به خطوط دوتایی توجه کنید که برخی از آنها با فلش نشان داده شده اند.

ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی جونز در آزمایشگاه بافت شناسی

روش رنگ آمیزی از تکنیک های باارزش در آزمایشگاه بافت شناسی است و برای ایجاد تمایز نمودن جزئی از بافت جهت آنالیز دقیق نمونه های بافتی مورد نیاز است. یکی از انواع رنگ آمیزی های اختصاصی نمونه های بافتی، رنگ آمیزی اختصاصی غشای پایه در بافت های موجود زنده از جمله حیوان آزمایشگاهی به نام رنگ آمیزی اختصاصی جونز است. در آزمایشگاه بافت شناسی شرکت بافت و ژن پاسارگاد با استفاده از تجهیزات و مواد آزمایشگاهی استاندارد، از نمونه های بافتی مختلف، برش های بافتی با اندازه در حد میکرومتری و دارای کیفیت بالا تهیه کرده و با بکار بردن انواع تکنیک های رنگ آمیزی های عمومی و اختصاصی از جمله خدمات رنگ آمیزی اختصاصی جونز در بافت به بررسی و مطالعه نمونه های بافتی انسان و حیوانات آزمایشگاهی بیمار و سالم تعریف شده در طرح های پژوهشی محققان، اساتید و دانشجویان می پردازد.

جمع بندی

اصطلاح رنگ آمیزی های اختصاصی مدتهاست که برای اشاره به تعداد زیادی از تکنیک های رنگ آمیزی جایگزین استفاده می شود. این رنگ های اختصاصی زمانی استفاده می شوند که رنگ آمیزی های عمومی مانند H&E تمامی اطلاعات مورد نیاز از بافت هدف را در اختیار محقق یا پاتولوژیست قرار نمی دهد. از این رو تکنیک های رنگ آمیزی اختصاصی بافت های بدن می تواند برای تحقیقات پاتولوژی بیماری های مختلف بسیار کمک کننده باشد. همانطور که توضیح داده شد رنگ آمیزی

اختصاصی بافت کلیه و شناسایی بیماری‌های کلیوی، روش رنگ‌آمیزی جونز می‌باشد که در تحقیقات هیستوپاتولوژی بیماری‌های کلیه حائز اهمیت است.

سوالات متداول

۱. در رنگ‌آمیزی جونز کدام بخش از بافت بررسی می‌شود؟

بافت همبندی به نام غشای پایه نمونه های بافت در تکنیک جونز مطالعه می‌شود.

۲. غشای پایه در رنگ‌آمیزی جونز چه رنگ می‌شود؟

در پروتکل رنگ‌آمیزی غشای پایه سیاه رنگ می‌شود.

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

Email: histogenotechlab@gmail.com

www.histogene.ir

www.histogene.co

