



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 لوکسال فست بلو
(Luxol Fast Blue) در آزمایشگاه بافت شناسی

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

مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی لوکسال فست بلو در بافت شناسی

رنگ آمیزی لوکسال فست بلو، یکی از رنگ آمیزی های کاربردی در آزمایشگاه پاتولوژی و بافت شناسی برای رنگ آمیزی میلین و آکسونهای میلین در سیستم عصبی مرکزی و مشاهده آنها زیر میکروسکوپ نوری می باشد. لوکسال فست بلو (Luxol Fast Blue) با نام اختصاری LFB به علت تمایل به لیپوپروتئین ها، با روی دادن یک واکنش اسیدی-بازی میلین های نورونها را رنگ آمیزی می کند. لوکسال فست بلو یک رنگ فتالوسیانین مس است که حلال در الکل است و به بازهای موجود در لیپوپروتئین های غلاف میلین متصل می شود.

تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی لوکسال فست بلو

قبل از ارائه روش رنگ آمیزی لوکسال فست بلو یا روش Kluver-Barrera، بیشتر روش های مرسوم رنگ آمیزی غلاف میلین شامل کرومات و استفاده از همتوکسیلین بوده است. بعداً روشی Heinrich Klüber که ارائه داد به هیچ کدام از رنگ های همتوکسیلین و کرومات نیازی نبود. آزاپورفین ها (azaporphins) جهت رنگ آمیزی آزمایش شدند که اکثراً تترابنزوتتراآزاپورین های آبی و سبز بودند که فتالوسیانین نامیده می شوند. Heinrich Klüber دریافت که محصولات سولفات شده می توانند جهت رنگ آمیزی غلاف های میلین در نمونه های بافتی فیکس شده در فرمالین استفاده شوند. از این رو در سال ۱۸۵۶ کشف فتالوسیانین ها جهت رنگ آمیزی بسیار مورد استقبال قرار گرفت. از بین فتالوسیانین هایی که سنتز شد فتالوسیانین مس برای این تکنیک بهترین بود. از آنجا که فتالوسیانین ها نامحلول در آب و حلالهای ارگانیک دیگر هستند، Heinrich Klüber محصولات سولفونه مختلفی را امتحان کرد و نهایتاً بهترین رنگ آمیزی غلاف میلین با لوکسال فست بلو انجام شد که این رنگ نمک آمین فتالوسیانین مس محلول در الکل می باشد.

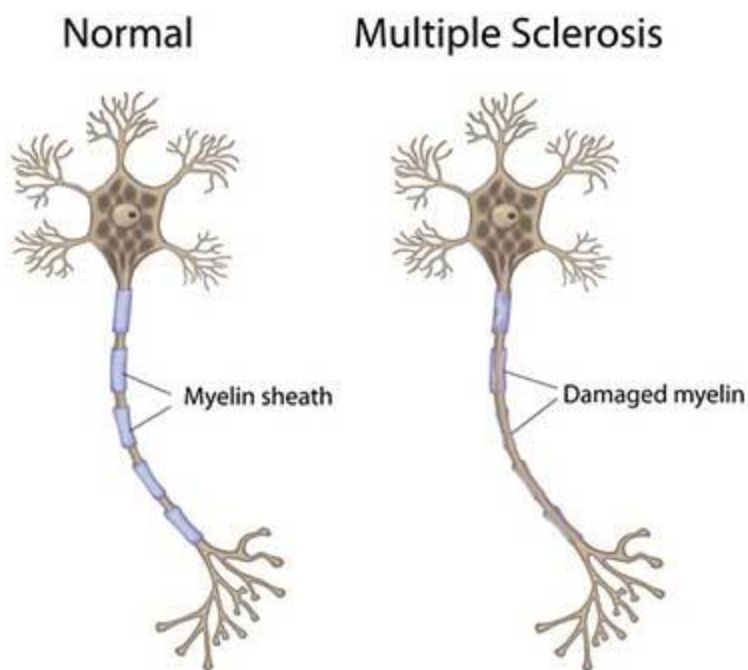
انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی لوکسال فست بلو در بافت شناسی

رنگ آمیزی لوکسال فست بلو (LFB) برای تشخیص و مطالعه بیماریهای مرتبط با از دست دادن میلین در سیستم عصبی مرکزی و محیطی هستند مانند بیماریهای التهابی مورد استفاده قرار می گیرد. یکی از بیماریهای سیستم عصبی مالتیپل اسکلروزیس یا MS است که در پاتولوژی با این روش تشخیص داده می شود. به طور کلی شناسایی بیماریهایی که تخریب میلین نورونهای محیطی و مرکزی را به دنبال دارد با رنگ آمیزی LFB انجام می شود.

برای آشنائی با سایر رنگ آمیزی های مرتبط با مغز کلیک کنید.

نگاهی اجمالی به دستگاه عصبی مرکزی رنگ شده با لوکسال فست بلو

دستگاه عصبی شامل مغز، نخاع، دستگاههای حسی و عصب های اندام های مختلف بدن می باشد. مغز و نخاع جز دستگاه عصبی مرکزی (CNS) و اعصاب و اندام های حسی جز دستگاه عصبی محیطی (PNS) می شوند. دستگاه عصبی محیطی اطلاعات را از مرکز کنترل به سمت بافتها، غدد و اندامها هدایت کرده و عملکرد آنها را تنظیم می کنند. دستگاه عصبی از نورونها یا سلولهای عصبی و سلولهای نوروگلیا تشکیل شده است. مورفولوژی نورونها به علت داشتن زائده های سلولی بلند به نام آکسون نسبت به سلولهای دیگر بدن متفاوت است که با داشتن آنها در انتقال سیگنالهای الکتروشیمیایی به قسمت های مختلف بدن نقش دارند. سلولهای گلیال یا نوروگلیا به عنوان سلول کمک کننده در دستگاه عصبی ایفای نقش می کنند. غلاف های میلین روی سلولهای عصبی به عنوان لایه ای از پروتئین است که هدایت پیام های الکتریکی را در طول نورونها و محافظت از سلولهای عصبی را به عهده دارد. چنانچه میلین دچار آسیب دیدگی شود منجر به اختلال در سیستم عصبی و در نتیجه باعث به وجود آمدن علائم جسمی که بیماریهای التهابی سیستم عصبی نامیده می شوند شده است.



شکل ۱: تفاوت میلین در سلولهای عصبی سیستم مرکزی سالم و بیمار

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ‌آمیزی اختصاصی لوکسال فست بلو

تکنیک رنگ آمیزی لوکسال فست بلو روی سلولهای عصبی بافت های سیستم عصبی مانند نمونه بافتی جسم پینه‌ای، مغز، مخچه، نخاع انجام می‌شود. برای این روش همانند روشهای رنگ‌آمیزی دیگر، نمونه‌های بافتی می‌تواند به صورت تازه (fresh) (فریز شده)، فیکس شده با پارافین یا فرمالین از بخشی یا کل مغز باشد. اگر نمونه بافتی بصورت تازه یا فیکس شده در فرمالین باشد، از آن بلوک بافتی فیکس شده پارافین تهیه می‌شود.

در این مقاله به یکی از پروتکل‌های رنگ آمیزی لوکسال فست بلو می‌پردازیم.

پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی لوکسال فست بلو در بافت‌شناسی

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی لوکسال فست بلو

۱. مرحله قالب‌گیری بافت مغز در رنگ آمیزی LFB: اولین مرحله انجام تست رنگ آمیزی لوکسال، آماده سازی نمونه بیولوژیکی است. آماده سازی و کیفیت نمونه در مطالعه مورفولوژی سلولهای عصبی نمونه هدف بسیار مهم می باشد. منبع نمونه بافتی متنوع است که می تواند از روش بیوپسی، جراحی، مدل حیوانی تهیه شده باشد. بنابراین بافت مورد مطالعه پس از ارسال به آزمایشگاه بافت شناسی، طی انجام چندین مراحل، بصورت بلوک بافتی در پارافین جامد فیکس می‌شود. با دستگاه تیشو پروسسور مراحل پردازش نمونه صورت گرفته و در پارافین قالب بندی می‌شود که بلوک های بافتی را می‌توان برای مدت زمان طولانی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری کرد.

۲. مرحله آماده‌سازی لام و پارافین‌زدایی: از بلوک های بافتی آماده شده با میکروتوم برش های نازک تهیه میکنیم و سپس مراحل پارافین زدایی را انجام می‌دهیم.

۱-۲- لام های دپارافینه را در اتانول ۹۵٪ غوطه ور می‌کنیم. اگر نمونه بافتی فریز شده باشد مستقیماً می‌توانیم برش تهیه کنیم و بقیه مراحل زیر را انجام دهیم. همچنین برخی سکشن های تهیه شده از نمونه فریز و پارافینی نیاز به مرحله چربی زدایی

دارند که بدین صورت عمل می کنیم برش ها را مستقیماً در محلول با نسبت یک به یک کلروفرم / الکل برای چند ساعت یا یک شبانه روز قرار داده و سپس با اتانول ۹۵ درصد هیدراته می کنیم.

مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی لوکسال فست بلو

۱. نمونه ها را در محلول لوکسال فست بلو در دمای ۵۶ درجه فور به مدت یک شب انکوبه می کنیم. برای نمونه های فریز شده این مرحله کمتر از ۱۶ ساعت باشد.
۲. نمونه ها را با اتانول ۹۵٪ شستشو داده تا رنگ اضافی حذف شود.
۳. نمونه ها را در آب مقطر غوطه ور می کنیم.
۴. نمونه های بافتی را به مدت ۵ ثانیه در محلول لیتیم کربنات قرار می دهیم.
۵. برش ها را دو مرتبه و هر بار ۱۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد قرار می دهیم.
۶. در این مرحله با آب مقطر نمونه ها را شستشو می دهیم.
۷. مراحل بندهای ۵ و ۶ را تا حدی تکرار کنید که از میزان شارپ بودن رنگ آبی کاسته شود.
۸. لام ها را در الکل ۷۰ درصد غوطه ور می کنیم.
۹. به مدت ۱ دقیقه در محلول ائوزین قرار می دهیم.
۱۰. لام ها را در آب مقطر شناور می کنیم.
۱۱. اکنون لام ها را یک دقیقه در کریزیل ویوله قرار می دهیم و سپس با آب مقطر شستشو می دهیم.
۱۲. با اتانول ۱۰۰ و ۹۵ درصد لام ها را دهیدراته کرده و سپس با زایلین شفاف سازی می کنیم.
۱۳. در مرحله آخر، مونت نمودن برشهای بافتی را با چسب اتلان انجام داده و نهایتاً زیر میکروسکوپ نوری بررسی و مطالعه می کنیم.

برای آشنائی با جذاب ترین متدهای کاربردی در بافت شناسی کلیک کنید.

تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی لوکسال فست بلو

مواد مورد نیاز

- اتانول مطلق
- پارافین
- آب مقطر
- محلول لوکسال فست بلو
- چسب انتلان
- زایلین
- محلول لیتیم کربنات
- محلول ائوزین

تجهیزات مورد نیاز

- میکروسکوپ نوری
- تیشو پروسسور
- دستگاه میکروتوم
- فور
- جار رنگ آمیزی لام
- لام و لامل

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

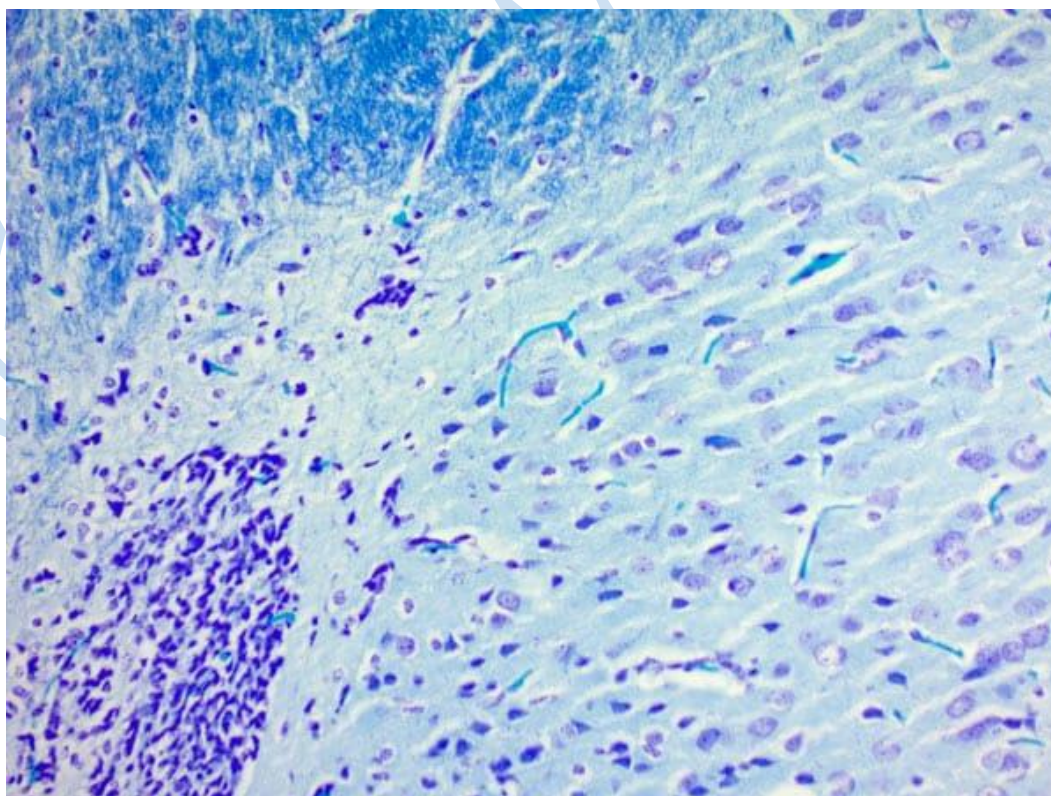
تفسیر نتایج رنگ آمیزی لوکسال فست بلو

روش رنگ آمیزی لوکسال بلو از تکنیک های مورد استفاده برای مطالعه مورفولوژی طبیعی و غیر طبیعی غلاف های میلین نورون ها می باشد. با استفاده از تکنیک LFB، میلین زدایی، تخریب میلین روی آکسون های سلولهای عصبی در مغز حیوانات تحت درمان با دارو و همچنین در مغز پس از مرگ بیماران مبتلا به بیماری های عصبی مورد بررسی قرار می گیرد. رنگ آمیزی لوکسال را نیز می توان با روش های رنگ آمیزی متداول دیگر جهت تشخیص برخی فرایندهای پاتولوژی سیستم عصبی ترکیب نمود. این رنگ آمیزی ها عبارتند از H&E، پاس، oil red و رنگ آمیزی نقره (گلژی). با استفاده از پروتکل رنگ آمیزی لوکسال فست بلو نتایج ذکر شده یا میکروسکوپ نوری قابل مشاهده می باشد.

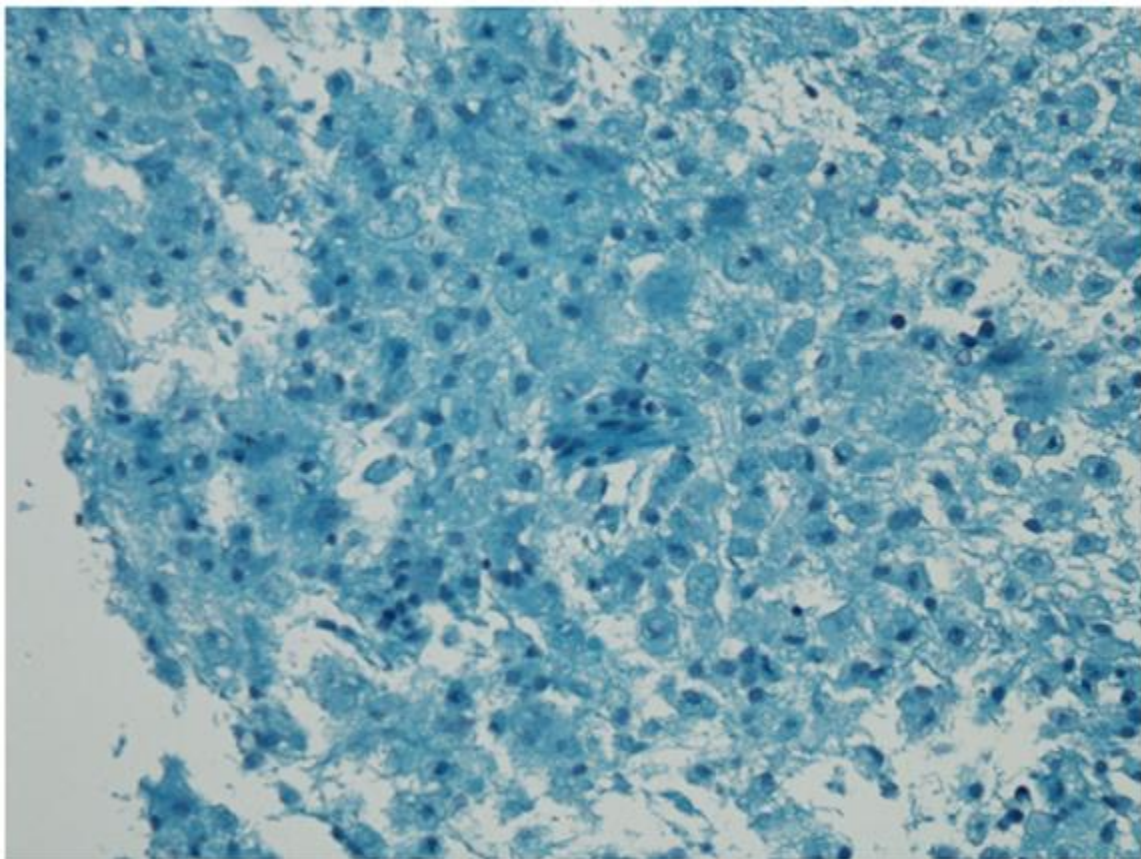
✓ فیبرهای میلین دار یا میلین ها: آبی تا سبز

✓ نوروفیل ها: صورتی

✓ سلولهای عصبی: صورتی تا بنفش یا ویوله



شکل ۲: رنگ آمیزی لوکسال فست بلو مغز موش سالم



شکل ۳: رنگ آمیزی لوکسال فست بلو، نواحی دمیله‌شده با کاهش نسبی آکسون‌ها همراه با برخی تورم‌های آکسون را نشان می‌دهد.

یکی از شناخته شده‌ترین بیماری‌های دمیله‌کننده مولتیپل اسکلروزیس است، یک اختلال خودایمنی که در آن ضایعات دمیله‌کننده سیستم عصبی مرکزی رخ می‌دهد که باعث علائمی مانند درد، اختلال در عملکرد شناختی و حرکتی و بینایی می‌شود. در بیماران مبتلا به بیماری ام‌اس، تجزیه میلین در سیستم عصبی مرکزی اتفاق می‌افتد در نتیجه در رنگ آمیزی لوکسال فست بلو تجمع غلاف‌های میلین آبی نسبت به سیستم عصبی سالم، در نمونه مبتلا کمتر مشاهده می‌شود.

ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی لوکسال فست بلو در آزمایشگاه بافت شناسی

آزمایشگاه بافت شناسی هیستونوتک با استفاده از تجهیزات مطابق با استانداردهای آزمایشگاهی در ارائه خدمات رنگ آمیزی عمومی و اختصاصی بافت شناسی آماده همکاری با محققان، دانشجویان، اساتید می‌باشد. با ارائه نتایج آنالیز شده، کلیپ‌های آموزشی، آموزش حضوری رایگان و پروتکل‌های رنگ آمیزی آماده خدمت رسانی است. آزمایشگاه بافت شناسی

هیستوژنوتک قادر است کلیه مراحل صفر تا صد رنگ آمیزی های اختصاصی بافت را روی کلیه نمونه های بیولوژیکی ارسال شده از سوی محققان و آزمایشگاه های تشخیصی پزشکی پاتوبیولوژی انجام دهد.

جمع بندی

رنگ آمیزی لوکسال فست بلو به عنوان یکی از روش های رنگ آمیزی سیستم عصبی مورد استفاده در آزمایشگاه بافت شناسی جهت بررسی وجود یا عدم غلاف های پروتئینی میلین سلولهای عصبی می باشد. عدم وجود میلین در نمونه بافتی مغز برش زده منجر به عدم مشاهده رنگ آبی در زیر میکروسکوپ نوری می شود. رنگ لوکسال فست بلو با لیوپروتئین های میلین واکنش اسیدی-بازی داده و در نتیجه آن رسوب نمک به رنگ آبی نمایان می شود.

جهت مطالعه سلولهای عصبی مرکزی و محیطی چندین تکنیک وجود دارد. یکی از در دسترس ترین متدهای استاندارد جهت نشان دادن تخریب (degeneration) آکسونی و میلین زدایی (demyelination) در مطالعات بافت شناسی رنگ آمیزی لوکسال فست بلو (LFB) و رنگ آمیزی تولوئیدین آبی است که امکان شناسایی اکثر فیبرهای میلین دار را فراهم می کند. اگرچه بنظر می رسد پروتکل های رنگ آمیزی در پاتولوژی ساده هستند اما ستاپ کردن تکنیک ها بسیار مهم می باشد چرا که عدم ستاپ پروتکل رنگ آمیزی به درستی، سبب عدم دسترسی به نتایج صحیح می شود.

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

Email: histogenotechlab@gmail.com

www.histogene.ir

www.histogene.co

