



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 پریودیک اسید شیف
(Periodic acid-Schiff) در آزمایشگاه بافت شناسی

- ❖ مقدمه ای از رنگ آمیزی اختصاصی پریودیک اسید شیف در بافت شناسی ۳
- ❖ تاریخچه رنگ آمیزی اختصاصی پریودیک اسید شیف ۳
- ❖ انواع کاربردهای رنگ آمیزی اختصاصی پریودیک اسید شیف در بافت شناسی ۳
- ❖ نگاهی اجمالی به بافت کبد رنگ شده با پریودیک اسید شیف ۴
- ❖ انواع نمونه های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ آمیزی اختصاصی پاس ۵
- ❖ پروتکل رنگ آمیزی اختصاصی پریودیک اسید شیف در بافت شناسی ۵
- مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی پاس ۶
- مراحل رنگ آمیزی نمونه خون و مغز استخوان در رنگ آمیزی اختصاصی پاس ۶
- مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی پاس ۷
- ❖ تجهیزات و مواد آزمایشگاهی مورد نیاز برای تکنیک رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف ۷
- ❖ تفسیر نتایج رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف ۸
- ❖ ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی پریودیک اسید شیف در آزمایشگاه بافت شناسی ۱۱
- ❖ جمع بندی ۱۲
- ❖ سوالات متداول ۱۲

مقدمه‌ای از رنگ‌آمیزی اختصاصی پرئودیک اسید شیف در بافت‌شناسی

در بافت‌شناسی طیف وسیعی از رنگ‌آمیزی‌های تخصصی جهت تشخیص انواع بیماری‌ها و بیومارکرها استفاده می‌شود. یکی از رنگ‌آمیزی‌های متداول رنگ‌آمیزی پرئودیک اسید شیف است که به رنگ‌آمیزی پاس (PAS) شناخته شده است. هنگامی که بین معرف پرئودیک اسید شیف (Periodic acid-Schiff) و کربوهیدرات‌های سلول‌های بافت واکنش اکسیداتیو (Oxidative process) روی می‌دهد. رنگ پاس سبب اکسید شدن پلی ساکاریدها شده و در نتیجه، یک ترکیب اکسیدازی بنام آلدئید تولید می‌گردد. و آلدئیدها به دلیل حضور معرف بی‌رنگ شیف (Schiff Reagent) تغییر رنگ داده و طیف گسترده‌ای از رنگ‌های صورتی تا بنفش را نشان می‌دهند. رنگ‌آمیزی پاس در آزمایشگاه بافت‌شناسی و پاتولوژی جهت رنگ‌آمیزی بافت کبد و تشخیص انواع سرطان‌ها بسیار کاربرد دارد. در ادامه به تفصیل درباره کاربردها و پروتکل رنگ‌آمیزی سخن گفته ایم.

تاریخچه رنگ‌آمیزی اختصاصی پرئودیک اسید شیف

جوزف فورد آنتونی مک‌مانوس ، Joseph Forde Anthony McManus پاتولوژیست کانادایی به خاطر فرمولاسیون یکی از متداول‌ترین رنگ‌آمیزی‌ها یعنی رنگ McManus Periodic acid-Schiff شناخته شده است. جوزف مک‌مانوس در دهه ۱۹۴۰ و ۱۹۵۰ در زمینه پاتولوژی پیشگام بوده است. نتیجه مشاهدات او روی مورفولوژی کلیه و بیماری‌های مرتبط با آن و همچنین دیالیز کلیه پروتکل رنگ‌آمیزی پاس می‌باشد.

انواع کاربردهای رنگ‌آمیزی اختصاصی پرئودیک اسید شیف در بافت‌شناسی

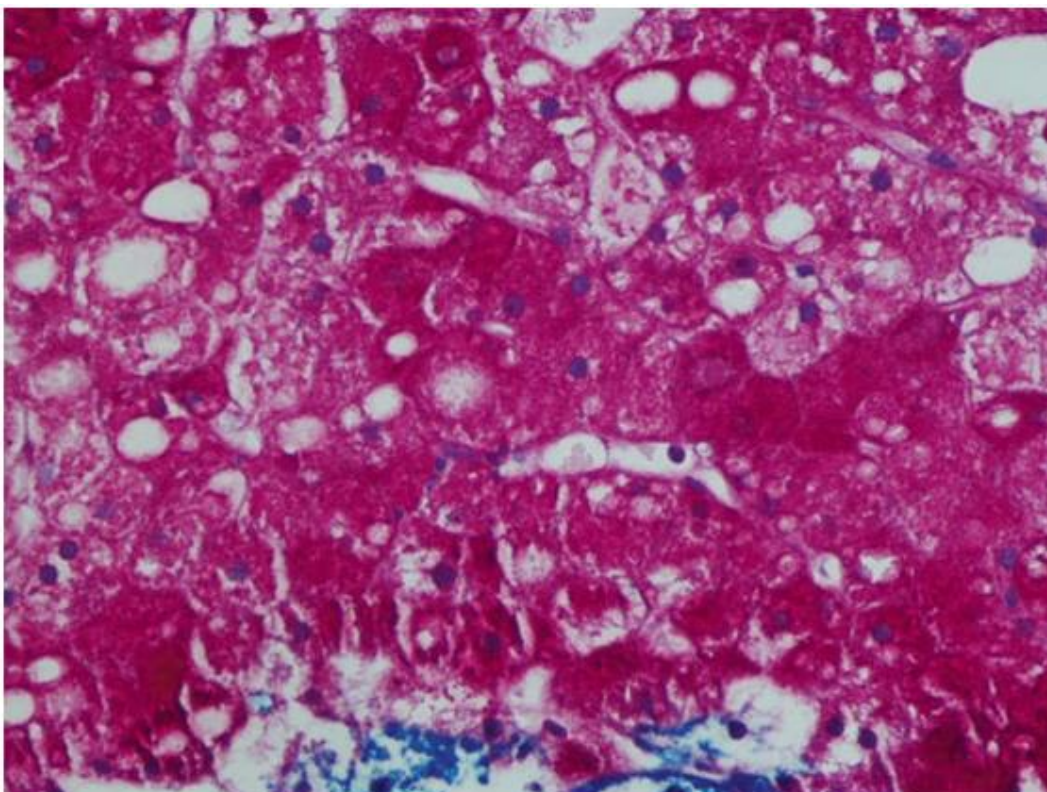
از تکنیک رنگ‌آمیزی PAS در طیف گسترده‌ای از بخش‌های آزمایشگاه‌های تشخیصی و تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفته است. این کاربردها عبارتند از:

در بخش سیتولوژی، این روش رنگ‌آمیزی برای شناسایی غیر افتراقی و تشخیص انواع بافت‌های توموری و سرطانی مانند سرطان پروستات، آدنوکارسینوماهای تولیدکننده موسین‌های خنثی کاربرد دارد.

در حوزه قارچ شناسی برای تشخیص بیماری های قارچی از جمله شناسایی عفونت های کاندیدا آلبیکنس، آسپرژیلوس فومیگاتوس و کریپتوکوکوس نئوفورمانس با نشان دادن هیف های قارچی در نمونه بافتی آلوده از رنگ آمیزی به روش پریودیک اسید شیف (PAS) مورد استفاده قرار می گیرد. البته این نوع رنگ آمیزی فقط روی قارچ های زنده کاربرد دارد. در آسیب شناسی می توان از این تکنیک برای آسیب شناسی کبد، پانکراس و کلیه در نظر گرفته می شود. در نمونه های بیوپسی ریه نوزادان مبتلا به گلیکوژن (Pulmonary interstitial glycogenosis; PIG) برای شناسایی گلیکوژن نیز کاربرد دارد. رنگ پاس جهت شناسایی گلیکوژن، سلولز و نشاسته کاربرد دارد. بنابراین برای یافتن باقیمانده های گلیکوژنی در نمونه کبدی فرد مشکوک به بیماری ذخیره ای گلیکوژن استفاده می شود.

نگاهی اجمالی به بافت کبد رنگ شده با پریودیک اسید شیف

کبد بزرگترین ارگان بدن مهره داران است که مواد سمی را از سیستم گردش خون جمع آوری کرده، حفظ میزان قند خون و چندین فعالیت حیاتی دیگر را انجام می دهد. وظیفه دیگر کبد در متابولیسم شامل تنظیم ذخیره گلیکوژن، تجزیه سلولهای قرمز خون و تولید هورمونها می باشد. گلیکوژن پلی ساکاریدی با واحد مونومری گلوکز است که به عنوان شکلی از ذخیره انرژی در بدن حیوانات، قارچ ها و باکتری ها عمل می کند. عدم متابولیسم صحیح گلیکوژن در کبد ناشی از کمبود آنزیم های لازم برای سنتز و تجزیه گلیکوژن به عنوان بیماریهای ذخیره ای گلیکوژن شناخته شده است. کبد حدودا ۱۰۰ گرم گلیکوژن را از طریق گلیکوژن از لاکتیک اسید (تشکیل کليكوژن از گلوکز) سنتز و نگهداری می کند. زمانی که بدن نیازمند گلوکز است، کبد از طریق فرایند گلیکوژنولیز (شکستن گلیکوژن به گلوکز)، گلوکز را به خون آزاد می کند.



شکل ۱: تجمعات گلیکوژن در هیاتوسیت‌های بافت کبد با رنگ آمیزی پاس نشان داده شده است

انواع نمونه‌های بافتی تشخیصی و مورد مطالعه با رنگ آمیزی اختصاصی پاس

در آزمایشگاه هیستوپاتولوژی، تکنیک رنگ‌آمیزی PAS جهت رنگ‌آمیزی بافت‌هایی که حاوی مقادیر نسبتاً بالایی از پلی‌ساکاریدها مانند گلیکوژن و مواد موکوسی (گلیکوپروتئینها، گلیکولیپیدها و موسین‌ها) هستند، کاربرد دارد. عمده این بافت‌ها، بافت همبند، موکوس، گلیکوکالیکس (Glycocalyx) هستند.

پروتکل رنگ‌آمیزی اختصاصی پریودیک اسید شیف در بافت‌شناسی

پروتکل‌های مختلف برای انجام تکنیک رنگ‌آمیزی پاس وجود دارد که در اینجا یکی از روش‌های ستاپ شده را توضیح

می‌دهیم.

مراحل آماده سازی لام از نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی پاس

۱. برش گیری از بلوک پارافینی: پس از قالب گیری پارافینی نمونه بافتی، در این مرحله از نمونه فیکس شده در پارافین با دستگاه میکروتوم برش های نازک در حد ۳-۵ میکرون تهیه می کنیم.
۲. آبدیاری نمونه بافتی: اکنون می بایست آب موجود در نمونه های بافتی را حذف نموده، بنابراین با اتانول این مرحله انجام می شود یعنی اتانول جایگزین آب در بافت می گردد.
۳. آبدیاری نمونه برش زده: برش های نمونه بافتی را روی لام قرار داده و پارافین اضافی نمونه را با دستگاه گرمکن اسلاید حذف می کنیم و با غلظت های مختلف از اتانول نمونه بافتی را آبدیاری می کنیم.
۴. اکنون لام های آماده شده را طبق پروتکل رنگ آمیزی رنگ می کنیم.

مراحل رنگ آمیزی نمونه خون و مغز استخوان در رنگ آمیزی اختصاصی پاس

۱. گسترش خونی روی لام تهیه می کنیم و در دمای محیط آزمایشگاهی قرار می دهیم تا اسلایدها خشک شوند.
۲. اکنون نمونه های خشک شده را در محلول فیکساسیون اتانول-فرمالین به مدت یک دقیقه انکوبه می کنیم.
۳. لام حاوی نمونه را به مدت یک دقیقه به آرامی با آب شست و شو دهید.
۴. به مدت ۵ دقیقه لام ها را در محلول پریودیک اسید (Periodic Acid) و در دمای محیط انکوبه می کنیم.
۵. نمونه ها را چندین مرتبه با آب مقطر شست و شو می دهیم.
۶. انکوباسیون لام ها را به مدت زمان ۱۵ دقیقه با معرف بی رنگ شیف (Schiff Reagent) و در دمای محیط انجام داده و پس از آن، پنج دقیقه با آبکشی می کنیم.
۷. به مدت ۳۰ ثانیه نمونه ها را در محلول هماتوکسیلین قرار می دهیم.
۸. ۱۵ تا ۳۰ ثانیه اسلایدهای نمونه خونی را شست و شو داده و صبر می کنیم تا کاملاً خشک شوند.
۹. اکنون با استفاده از روغن امولسیون و عدسی با بزرگنمایی X100 بررسی می شوند.

مراحل رنگ آمیزی نمونه بافتی در رنگ آمیزی اختصاصی پاس

۱. ابتدا پارافین زدایی و هیدراسیون با آب دیونیزه انجام می‌دهیم.
۲. به مدت ۵ دقیقه لام‌ها را در محلول پریودیک اسید (Periodic Acid) و در دمای محیط انکوبه می‌کنیم. چنانچه نمونه بافتی پوست و کلیه باشد می‌توانیم زمان انکوبه را تا ۱۵ دقیقه افزایش دهیم.
- محلول پریودیک اسید ۰.۵٪ با حل کردن ۰.۵ گرم از پودر پریودیک اسید در ۱۰۰ سی سی آب مقطر تهیه می‌شود.
۳. اکنون لام‌ها را چندین مرتبه (حداقل چهار بار) با آب مقطر شست‌وشو می‌دهیم.
۴. انکوباسیون لام‌ها را به مدت زمان ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در معرف بی‌رنگ شیف (Schiff Reagent) و در دمای محیط انجام می‌دهیم و سپس پنج دقیقه با آب شست‌وشو می‌دهیم.
- تست تاییدیه معرف شیف به این صورت است که چند قطره از معرف را به ۱۰ سی سی از فرمالین ۱۰ درصد اضافه می‌کنیم. چنانچه تغییر رنگ به بنفش به سرعت انجام شود، کیفیت معرف شیف قابل قبول است. معرف با کیفیت پایین و غیر قابل استفاده، پس از مدت زمان طولانی تری تغییر رنگ را نشان می‌دهد و رنگ آن بنفش مایل به آبی است.
۵. نمونه‌ها را به مدت ۱۵ ثانیه در محلول سدیم بورات ۰.۳٪ (۰.۳ گرم در ۱۰۰ سی سی آب) قرار داده و پس از آن چهار مرتبه با آب مقطر آبکشی می‌کنیم.
۶. به مدت ۳۰ ثانیه نمونه‌ها را در محلول هماتوکسیلین قرار می‌دهیم.
۷. چندین مرتبه با جریان ملایم آب، آبکشی انجام می‌دهیم و اجازه می‌دهیم تا در دمای محیط خشک شوند.
۸. اکنون نمونه‌های پارافینی را دهیدراته کرده و سپس با زایلین و تولوئن شفاف سازی می‌کنیم و پس از مونت کردن لام‌ها با چسب انتلان و لامل، با میکروسکوپ نوری اسلایدها را بررسی می‌کنیم.

تجهیزات و مواد مورد نیاز در تکنیک رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف

مواد مورد نیاز

- پودر پریودیک اسید
- فرمالین ۱۰ درصد

- معرف بی‌رنگ شیف
- محلول اتانول-فرمالین
- رنگ افتراقی هماتوکسیلین
- چسب انتلان
- زایلین
- تولوئن

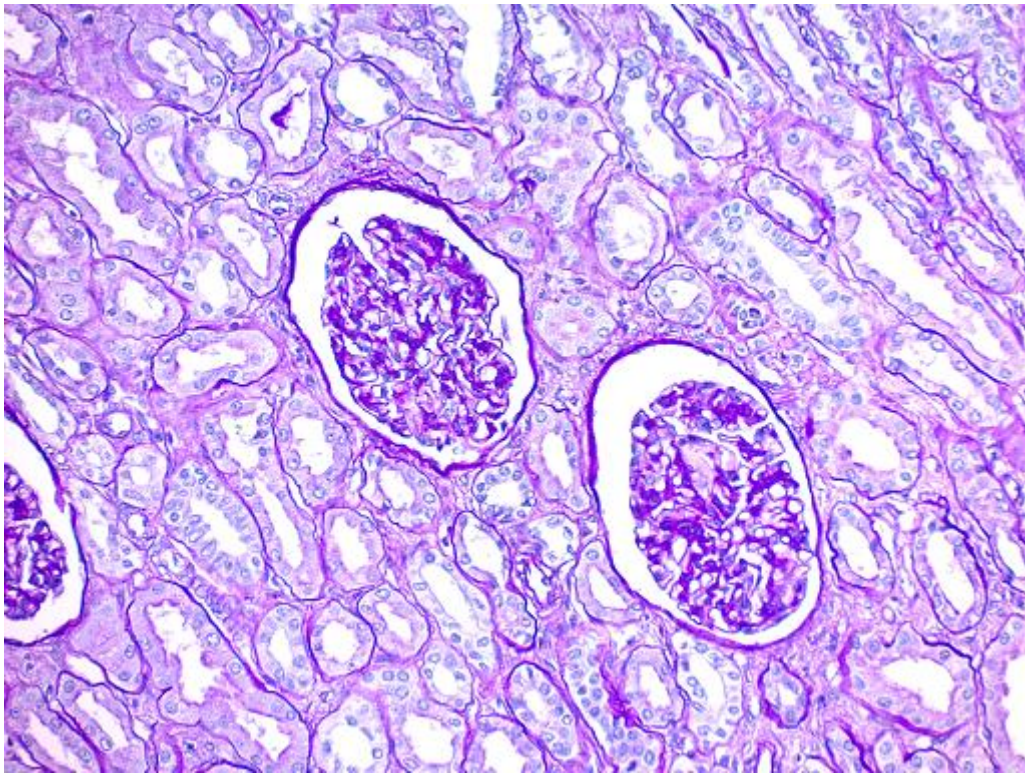
تجهیزات مورد نیاز

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

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

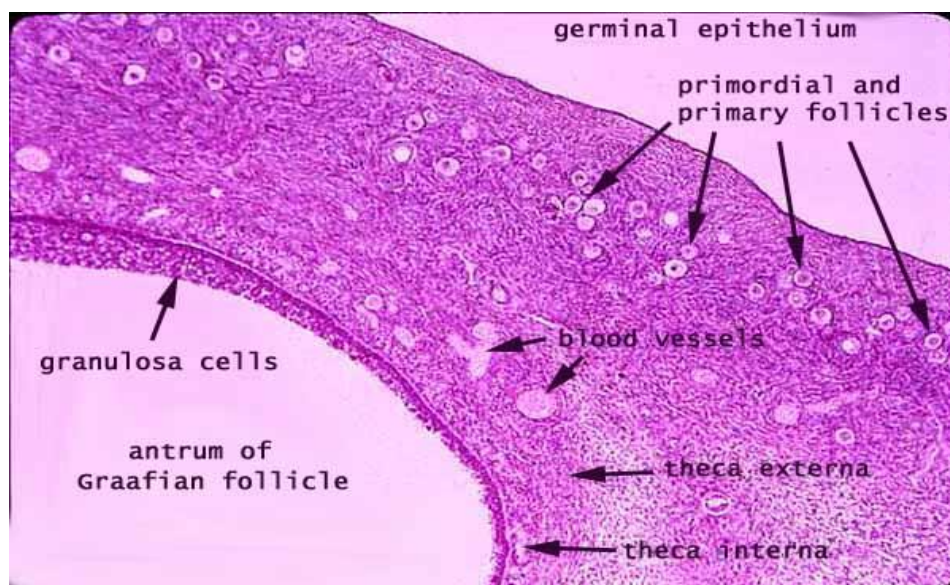
تفسیر نتایج رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف

بررسی و آنالیز لام های رنگ آمیزی شده از نمونه های بیولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ نوری توسط پاتولوژیست انجام می شود. نمونه هایی که نتیجه آن PAS مثبت است از قبیل گلیکوژن، موسین ها و غشاهای پایه، رنگ صورتی تا قرمز را نشان می دهند. هسته سلول ها به رنگ آبی دیده می شود. در نمونه های آلوده به قارچ نتیجه تست به رنگ قرمز قابل مشاهده می باشد. نمونه هایی از بافت های مختلف رنگ آمیزی شده با تکنیک پاس در تصاویر زیر نشان داده شده است.



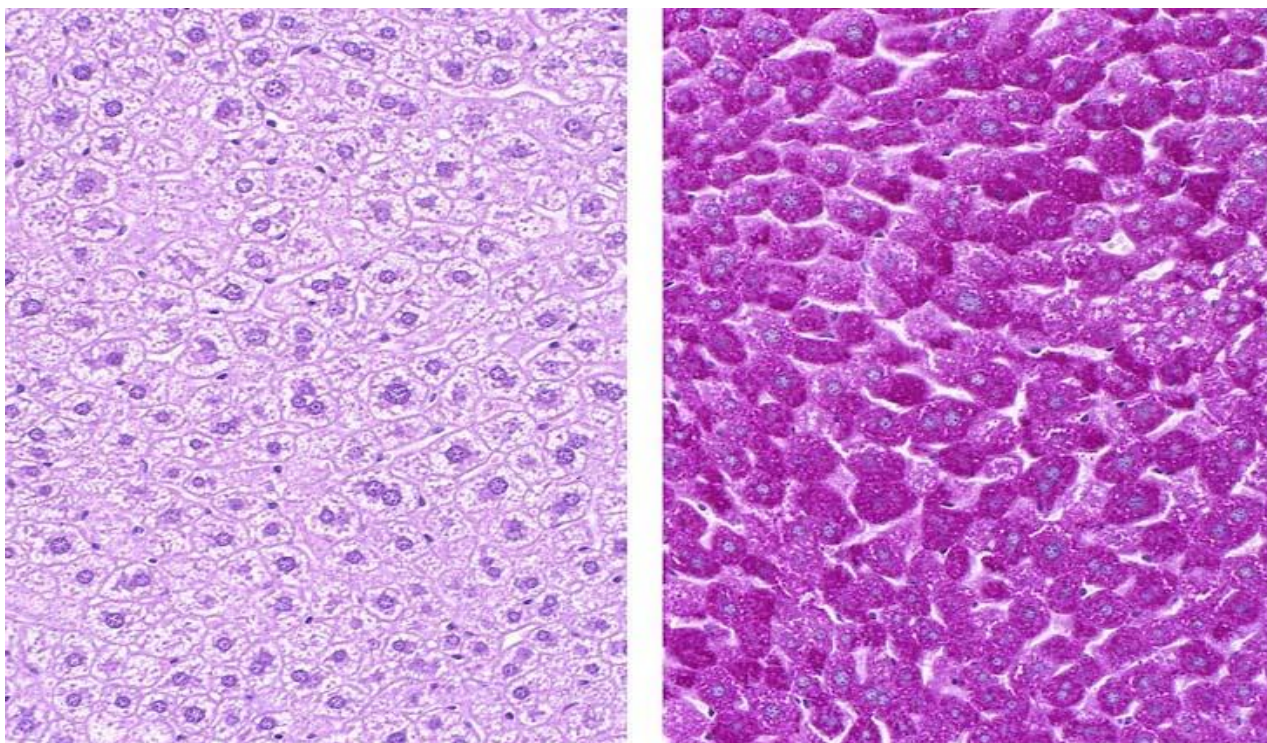
شکل ۲: تشخیص لنفوسیت ها و موکوپلی ساکاریدها با استفاده از رنگ آمیزی PAS

قشر تخمدان حاوی فولیکول های متعددی است که در یک استرومای ضخیم قرار گرفته اند. بیشتر فولیکول ها فولیکول های اولیه در حال استراحت هستند. فولیکول هایی که تحریک شده اند در مراحل اولیه و ثانویه پیشرفت می کنند تا به فولیکول های ثالث یا Graafian بالغ تبدیل شوند، که در آن یک حفره بزرگ پر از مایع به نام آنتروم، توسط لایه های زیادی از سلول های گرانولوزا احاطه شده است. سلول های استرومایی اطراف فولیکول، theca interna که استروژن ترشح می کند و theca interna را تشکیل می دهند. کومولوس اوفوروس حاوی تخمک به ندرت در بخش های تصادفی مانند این ظاهر می شود.



شکل ۳: رنگ آمیزی (PAS) Periodic acid-Schiff برای بررسی تخمدان در مراحل مختلف رشد و نمو

شناسایی گلیکوژن در مقابل ماده مخاطی خنثی در تشخیص افتراقی آدنوکارسینوم در مقابل کارسینوم سلول سنگفرشی ضعیف یا آدنوکارسینوم در مقابل مزوتلیوما مهم است، زیرا گلیکوژن در همه این سرطان ها وجود دارد در حالی که مواد مخاطی خنثی از نظر تئوری فقط در آدنوکارسینوم یافت می شوند. ترکیبی از واکنش رنگ آمیزی PAS و پاس با هضم دیاستاز (PASD) بسیار مفید است. به طور کلی، گلیکوژن را می توان توسط دیاستاز هضم کرد در حالی که مواد مخاطی خنثی نمی توانند از این طریق از بین بروند. از این رو، گلیکوژن یک الگوی رنگ آمیزی پاس مثبت و منفی هضم دیاستاز را نشان می دهد.



شکل ۴: رنگ آمیزی پاس گلیکوژن در نمونه بافتی کبد فیکس شده با فرمالین. تصویر سمت چپ تیمار با دیاستاز و تصویر سمت راست بدون هضم دیاستازی است.

ارائه خدمات رنگ آمیزی اختصاصی پرئودیک اسید شیف در آزمایشگاه بافت شناسی

سلول‌های هر بافتی از بدن موجود زنده یک یا چند رنگ آمیزی اختصاصی خود را دارد که مطالعه و بررسی بافت را در مسیر تحقیقات و تشخیص در زمینه بیماری‌های مختلف تسهیل می‌کند. یکی دیگر از خدمات مجموعه آزمایشگاهی هیستونوتک، رنگ آمیزی‌های تخصصی و عمومی از جمله رنگ آمیزی پرئودیک اسید شیف (PAS) در بخش بافت شناسی توسط کارشناسان آزمایشگاه باتجربه و متخصصین خبره می‌باشد.

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 و پروتکل‌های رنگ آمیزی آماده خدمت رسانی است. آزمایشگاه بافت شناسی هیستونوتک قادر است کلیه مراحل صفر تا صد رنگ آمیزی‌های اختصاصی بافت را روی کلیه بافت‌های حیوانی و انسانی ارسال شده از سوی محققان و آزمایشگاه‌های تشخیصی پزشکی پاتوبیولوژی انجام دهد.

جمع بندی

از جمله رنگ آمیزی های اختصاصی در بافت شناسی، تکنیک PAS است که اساس آن اکسید شدن کربوهیدرات های نمونه های بیولوژیکی در حضور محلول اختصاصی شیف است که نتیجه آن شناسایی کربوهیدرات ها و ترکیبات غنی از کربوهیدرات هستند که نهایتاً منجر به تشخیص و تحقیق انواع بیماریها در بخش های مختلف آزمایشگاههای تشخیص طبی: سیتولوژی، آسیب شناسی، مطالعات قارچ شناسی می باشد. رنگ آمیزی پاس پلی ساکاریدها، موسین، گلیکوژن، گلیکوپروتئین ها ، غشای پایه و برخی قارچ ها در بافت ها را شناسایی می کند.

سوالات متداول

۱. کاربرد رنگ آمیزی پرپودیک اسید شیف چیست؟
در بافت شناسی جهت تشخیص بافت های آلدئیدی و موسینی کاربرد دارد.
۲. شرایط نگهداری معرف شیف به چه صورت است؟
در دمای ۲ الی ۸ درجه سانتیگراد نگهداری 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



۰۹۲۲۶۳۸۳۳۴۱