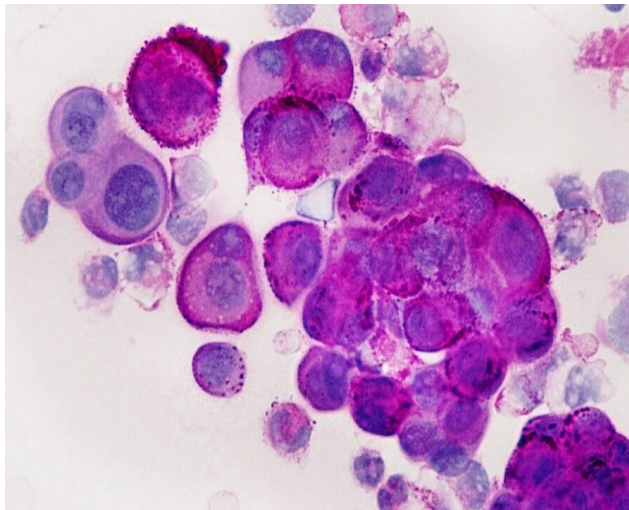
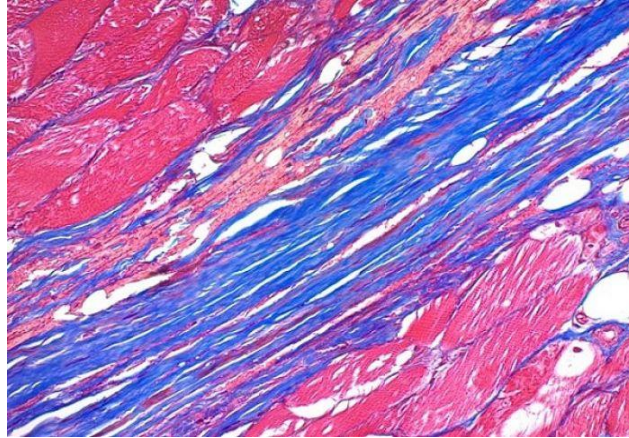


الرحمة الرحمة

- ❖ استاد مربوطه: دکتر مریم تقی زاده
- ❖ نام و نام خانوادگی: لیلا عبداللهی
- ❖ مشخصه درس: آزمایشگاه بافت شناسی (سکشن صبح)
- ❖ عنوان: مراحل رنگ آمیزی بافت ها

-عنوان: مقایسه‌ی تکنیک‌های PAS، تری کروم ماسون و نقره**-مقدمه:**

رنگ‌آمیزی اختصاصی در بافت‌شناسی تشخیصی، یکی از ارکان مهم در تفکیک ساختارهای سلولی و خارج‌سلولی بافت‌ها به شمار می‌رود. برخلاف رنگ‌آمیزی‌های عمومی مانند هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) که نمایی کلی از ساختار بافت را ارائه می‌دهند، تکنیک‌های خاص رنگ‌آمیزی امکان شناسایی دقیق‌تر اجزای ویژه‌ای از بافت، مانند پلی‌ساکاریدها، الیاف همبند، رتیلولین یا عناصر خاص سلولی را فراهم می‌سازند. این رنگ‌آمیزی‌ها به عنوان ابزار مکمل در آسیب‌شناسی، نقش کلیدی در تشخیص بسیاری از بیماری‌ها، از جمله سرطان‌ها، بیماری‌های متابولیک، فیبروزها و اختلالات بافت همبند ایفا می‌کنند. سه روش شناخته‌شده و پرکاربرد در این حوزه شامل رنگ‌آمیزی PAS (Periodic acid-Schiff)، تری کروم ماسون (Masson's Trichrome) و رنگ‌آمیزی نقره برای الیاف رتیلولین هستند. هر یک از این روش‌ها بر پایه واکنش‌های شیمیایی خاصی طراحی شده‌اند که امکان برجسته‌سازی ساختارهای ویژه‌ای را در بافت مهیا می‌سازند. در روش PAS، که بر پایه اکسیداسیون گروه‌های گلیکول در کربوهیدرات‌ها و تبدیل آن‌ها به آلدئیدهای واکنش‌پذیر با معرف شیف (Schiff reagent) عمل می‌کند، ساختارهایی مانند گلیکوپروتئین‌ها، گلیکوز آمینوگلیکان‌ها، و غشای پایه به‌وضوح قابل مشاهده می‌گردند. این تکنیک در تشخیص بیماری‌هایی نظیر بیماری کلیوی، اختلالات ذخیره‌ای و برخی تومورها بسیار مفید است. رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون، با استفاده از سه رنگ متفاوت، امکان تمایز بین عناصر عضلانی، بافت همبند و سیتوپلاسم را فراهم می‌سازد. رنگ آبی یا سبز معمولاً برای کلاژن، قرمز برای عضله یا سیتوپلاسم، و رنگ سوم برای هسته سلول استفاده می‌شود. این تکنیک در تشخیص فیبروز، بیماری‌های عضلانی و تمایز بین تومورهای مزانشیمی اهمیت بالایی دارد. در مقابل، رنگ‌آمیزی نقره – که معمولاً بر پایه احیا نقره آمونیاکی انجام می‌شود – برای نمایان ساختن الیاف رتیلولین یا عناصر عصبی به کار می‌رود. این روش در بررسی الگوی شبکه رتیلولین در مغز استخوان، کبد و بافت لنفاوی کاربرد فراوان دارد و می‌تواند به تمایز بین انواع لنفوم‌ها یا آسیب‌های کبدی کمک کند. با توجه به تنوع کاربردهای این روش‌ها و اهمیت آن‌ها در آسیب‌شناسی مدرن، هدف از این تحقیق بررسی کامل این سه تکنیک رنگ‌آمیزی، مقایسه ویژگی‌های آن‌ها، بررسی مراحل انجام، مزایا و محدودیت‌ها و نیز ارائه تصاویری میکروسکوپی از نمونه‌های رنگ‌شده است. این مطالعه می‌تواند به درک بهتر روش‌های تخصصی رنگ‌آمیزی و انتخاب مناسب‌ترین تکنیک در شرایط مختلف بالینی و تحقیقاتی کمک شایانی نماید.



-مراحل دقیق و تخصصی سه روش رنگ‌آمیزی بافتی (PAS (Periodic Acid-Schiff ، تری کروم ماسون (Masson's Trichrome) و رنگ‌آمیزی نقره برای الیاف رتیکولین (Gordon & Sweet's)

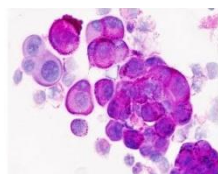
۱. رنگ‌آمیزی (PAS (Periodic Acid-Schiff

هدف:

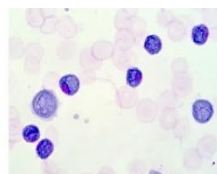
شناسایی پلی‌ساکاریدها مانند گلیکوژن، گلیکوپروتئین‌ها، گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و دیواره قارچ‌ها در بافت‌ها.

مراحل:

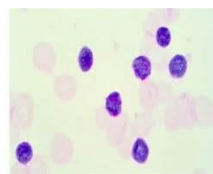
- I. آماده‌سازی نمونه:
 - برش‌های پارافینه‌شده با ضخامت ۴-۵ میکرون تهیه کنید.
 - برش‌ها را در زایلن قرار دهید تا پارافین زدایی شود.
 - برش‌ها را از طریق الکل‌های نزولی (۱۰۰٪، ۹۵٪، ۷۰٪) به آب مقطر منتقل کنید.
- II. اکسیداسیون
 - برش‌ها را به مدت ۵ دقیقه در محلول ۰/۵٪ اسید پریودیک قرار دهید تا گروه‌های دیول اکسید شوند.
- III. شستشو:
 - برش‌ها را با آب مقطر به مدت ۲ دقیقه شستشو دهید.
- IV. رنگ‌آمیزی با معرف شیف (Schiff):
 - برش‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در معرف شیف قرار دهید تا آلدئیدها با آن واکنش دهند و رنگ صورتی-ارغوانی ایجاد شود.
- V. شستشو:
 - برش‌ها را به مدت ۵ دقیقه در آب جاری شستشو دهید تا رنگ تثبیت شود.
- VI. رنگ‌آمیزی هسته‌ها (اختیاری):
 - برش‌ها را به مدت ۱ دقیقه در هماتوکسیلین هریس قرار دهید.
 - سپس با آب جاری شستشو دهید.
- VII. دهیدراسیون و تثبیت:
 - برش‌ها را از طریق الکل‌های صعودی (۷۰٪، ۹۵٪، ۱۰۰٪) دهیدراته کنید.
 - در زایلن شفاف‌سازی کرده و با چسب مناسب پوشش دهید.
- VIII. نتایج مورد انتظار:
 - ساختارهای حاوی کربوهیدرات (مانند گلیکوژن و مخاط) به رنگ صورتی-ارغوانی دیده می‌شوند.
 - هسته‌ها به رنگ آبی یا بنفش مشاهده می‌شوند.



Glycogen granules



B lymphoblastic leukemia



۲. رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون (Masson's Trichrome)

هدف:

تمایز بین کلاژن، عضله، سیتوپلاسم و هسته‌ها در بافت‌ها.

مراحل:

I. آماده‌سازی نمونه:

- برش‌های پارافینه‌شده با ضخامت ۴-۵ میکرون تهیه کنید.
- برش‌ها را در زایلن قرار دهید تا پارافین زدایی شود.
- برش‌ها را از طریق الک‌های نزولی به آب مقطر منتقل کنید.

II. فیکساسیون با محلول بوئن (Bouin's):

- برش‌ها را به مدت ۶۰ دقیقه در محلول بوئن گرم‌شده در ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا فیکساسیون و مورفولوژی بهبود یابد.
- سپس با آب جاری شستشو دهید تا رنگ زرد محلول بوئن از بین برود.

III. رنگ‌آمیزی هسته‌ها:

- برش‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در هماتوکسیلین آهن ویگرت قرار دهید.
- سپس با آب جاری شستشو دهید.

IV. رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم و عضله:

- برش‌ها را به مدت ۵ دقیقه در محلول بیبریچ اسکارلت-اسید فوشین قرار دهید.
- سپس با آب مقطر شستشو دهید.

V. تمایز کلاژن:

- برش‌ها را به مدت ۵ دقیقه در محلول فسفوتنگستیک/فسفومولیبدیک اسید قرار دهید.
- سپس در محلول آبی آنیلین بلو به مدت ۵ دقیقه قرار دهید.

VI. تثبیت رنگ:

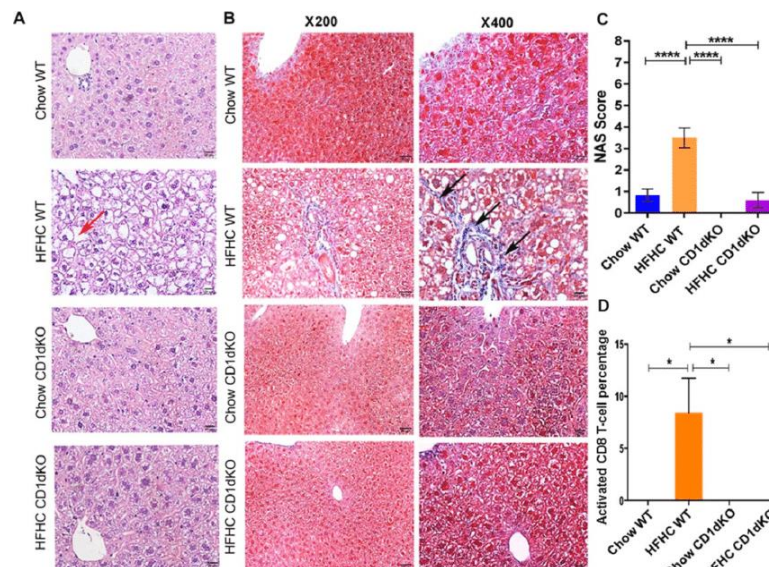
- برش‌ها را به مدت ۱ دقیقه در محلول ۱٪ اسید استیک قرار دهید.
- سپس با آب مقطر شستشو دهید.

VII. دهیدراسیون و تثبیت:

- برش‌ها را از طریق الک‌های صعودی دهیدراته کنید.
- در زایلن شفاف‌سازی کرده و با چسب مناسب پوشش دهید.

نتایج مورد انتظار:

- کلاژن به رنگ آبی یا سبز دیده می‌شود.
- عضله و سیتوپلاسم به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند.
- هسته‌ها به رنگ سیاه یا قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند.



تصویر رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون در بافت کبد با فیروز

۳. رنگ‌آمیزی نقره برای الیاف رتی‌کولین (Gordon & Sweet's)

هدف:

شناسایی الیاف رتی‌کولین (کلاژن نوع III) در بافت‌ها، به‌ویژه در کبد، مغز استخوان و بافت لنفاوی.

مراحل:

I. آماده‌سازی نمونه:

- برش‌های پارافینه‌شده با ضخامت ۴-۵ میکرون تهیه کنید.
- برش‌ها را در زایلن قرار دهید تا پارافین زدایی شود.
- برش‌ها را از طریق الکل‌های نزولی به آب مقطر منتقل کنید.

II. اکسیداسیون:

- برش‌ها را به مدت ۲ دقیقه در محلول ۱٪ پرمنگنات پتاسیم قرار دهید.

III. بی‌رنگ‌سازی:

- برش‌ها را به مدت ۲ دقیقه در محلول ۲٪ اسید اگزالیک قرار دهید تا رنگ قهوه‌ای پرمنگنات از بین برود.
- سپس با آب مقطر شستشو دهید.

IV. حساس‌سازی:

- برش‌ها را به مدت ۱ دقیقه در محلول ۲/۵٪ آهن آلوم قرار دهید.
- سپس با آب مقطر شستشو دهید.

V. آماده‌سازی محلول نقره آمونیاکی:

- محلول نیترات نقره ۱۰٪ را با آمونیاک مخلوط کنید تا رسوب حل شود و محلول شفاف به‌دست آید.

VI. آغشته‌سازی با نقره:

- برش‌ها را به مدت ۱ تا ۳ دقیقه در محلول نقره آمونیاکی قرار دهید.

VII. شستشو:

- برش‌ها را با آب مقطر شستشو دهید.

VIII. احیا:

- برش‌ها را به مدت ۳ دقیقه در محلول ۱۰٪ فرمالین قرار دهید تا نقره به حالت فلزی احیا شود.

IX. شستشو:

- برش‌ها را با آب جاری شستشو دهید.

X. تثبیت رنگ:

- برش‌ها را به مدت ۳ دقیقه در محلول ۵٪ تیوسولفات سدیم قرار دهید تا نقره‌های آزاد حذف شوند.

XI. رنگ‌آمیزی هسته‌ها (اختیاری):

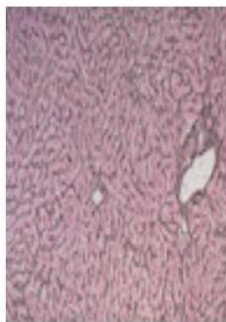
- برش‌ها را در رنگ سریع قرمز قرار دهید تا هسته‌ها رنگ بگیرند.

XII. دهیدراسیون و تثبیت:

- برش‌ها را از طریق الک‌های صعودی دهیدراته کنید.
- در زایلن شفاف‌سازی کرده و با چسب مناسب پوشش دهید.

نتایج مورد انتظار:

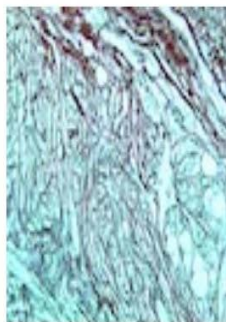
- الیاف رتیلولین به رنگ سیاه دیده می‌شوند.
- هسته‌ها به رنگ قرمز مشاهده می‌شوند.
- زمینه بافتی به رنگ خاکستری روشن دیده می‌شود.



Normal liver



Normal spleen



Leiomyosarcoma

-روش‌های خاص رنگ‌آمیزی بافت‌ها: مقایسه تکنیک‌های PAS ، تری کروم ماسون و نقره

رنگ‌آمیزی بافتی یکی از ابزارهای اساسی در آسیب‌شناسی و تشخیص بیماری‌هاست. در حالی که رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین (H&E) کاربرد وسیع و عمومی دارد، اما نمی‌تواند همه ساختارهای سلولی و بافتی را به‌طور دقیق از هم متمایز کند. برای شناسایی دقیق‌تر اجزای خاص مانند کربوهیدرات‌ها، الیاف کلاژن، غشاهای پایه و الیاف رتیلولین، باید از رنگ‌آمیزی‌های خاص (Special Stains) استفاده کرد.

در این تحقیق، به بررسی دقیق سه روش مهم و پرکاربرد در رنگ‌آمیزی بافتی خواهیم پرداخت:

۱. رنگ‌آمیزی PAS (Periodic Acid–Schiff) برای تشخیص کربوهیدرات‌ها
۲. رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون (Masson's Trichrome) برای شناسایی کلاژن
۳. رنگ‌آمیزی نقره برای الیاف رتیلولین

هدف ما بررسی مراحل انجام این تکنیک‌ها، ویژگی‌های ساختاری قابل مشاهده، و کاربرد تشخیصی آن‌ها در آسیب‌شناسی است.

۱. رنگ‌آمیزی PAS و مراحل آن

- هدف:
تشخیص پلی‌ساکاریدها (مانند گلیکوژن)، گلیکوپروتئین‌ها، گلیکولیپیدها، غشای پایه، و قارچ‌ها.
- اصل واکنش:
اسید پریودیک گروه‌های دیول را به آلدئید تبدیل می‌کند و معرف شیف (Schiff) با این آلدئیدها واکنش داده و رنگ صورتی-ارغوانی تولید می‌کند.

مراحل کامل:

- I. زدودن پارافین و آب‌رسانی
- با زایلن و الکل‌های کاهش‌یابنده
- II. اکسیداسیون با اسید پریودیک (۰٫۵-۱٪)
- ۵-۱۰ دقیقه

III. شستشو با آب مقطر

IV. درمان با معرف شیف

• ۱۰-۱۵ دقیقه

IX. شستشو در آب لوله‌کشی (۵-۱۰ دقیقه)

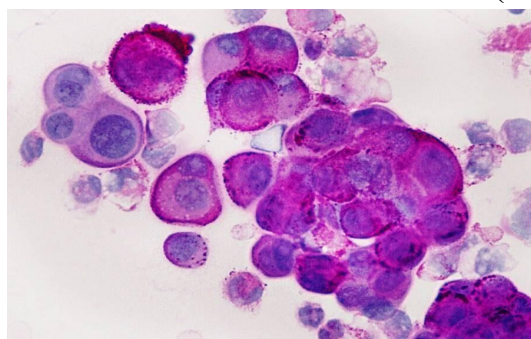
X. اختیاری: هماتوکسیلین برای رنگ‌آمیزی هسته

XI. آب‌گیری، شفاف‌سازی، نصب لامل

• نتیجه میکروسکوپی:

• گلیکوژن، قارچ، غشای پایه: ارغوانی تا صورتی

• هسته‌ها (با هماتوکسیلین): آبی



۲. رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون (Masson's Trichrome)

• هدف:

تمایز بین عضله، کلاژن، و سلول‌های اپیتلیال – مخصوصاً برای بررسی فیبروز، التهاب مزمن و بافت‌های متراکم کلاژن‌دار.

• اصل واکنش:

• ترکیبی از سه رنگ برای تمایز بین:

- ✓ سیتوپلاسم / عضله (قرمز)
- ✓ کلاژن / بافت همبند (آبی یا سبز)
- ✓ هسته‌ها (آبی تیره یا سیاه)

✓ مراحل کامل:

I. آبرسانی تا آب مقطر

II. هماتوکسیلین هریس (برای هسته)

✓ ۵ دقیقه

III. شستشو با آب و اسید فسفومولیبدیک / فسفوتنگستیک

✓ برای آماده‌سازی جذب رنگ دوم

IV. اسید فوشین

✓ برای رنگ‌آمیزی عضله و سیتوپلاسم

V. شستشو و استفاده از آنیلین بلو یا لایت گرین

✓ برای رنگ‌آمیزی کلاژن

VI. آب‌گیری، شفاف‌سازی و نصب لامل

نتیجه میکروسکوپی:

- کلاژن: آبی یا سبز
- عضله، سیتوپلاسم: قرمز
- هسته‌ها: آبی تیره

۳. رنگ‌آمیزی نقره برای الیاف رتیکولین

• هدف:

برجسته‌سازی الیاف رتیکولین که از (نوع III) کلاژن هستند در بافت‌هایی مانند کبد، مغز استخوان و غدد لنفاوی.

- اصل واکنش:
الیاف رتیکولین توانایی خاصی در احیای یون‌های نقره دارند که به آن‌ها رنگ سیاه می‌دهد.

- مراحل کامل (روش Gomori یا Gordon & Sweet):

I. آبرسانی تا آب مقطر

II. اکسیداسیون با پتاس پرمنگنات

✓ ۵ دقیقه

✓ اکسیداسیون ساختارهای غیرضروری

VII. سفید کردن با اسید اگزالیک

✓ ۲ دقیقه

VIII. آماده‌سازی الیاف برای جذب نقره با Ferricyanide یا Sensitizer

IX. آغشته‌سازی با نیترات نقره آمونیاکی

✓ در حرارت کنترل‌شده

X. احیا با فرمالین یا Developer

XI. تونینگ با طلاکلرید (اختیاری)

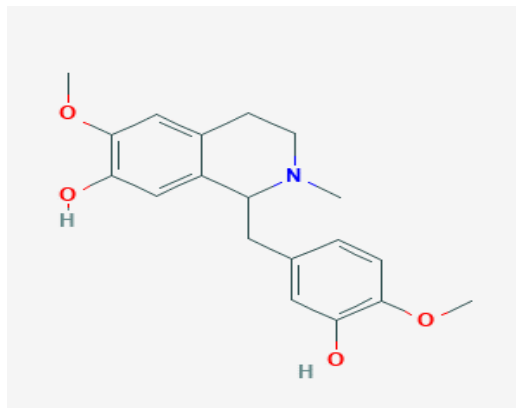
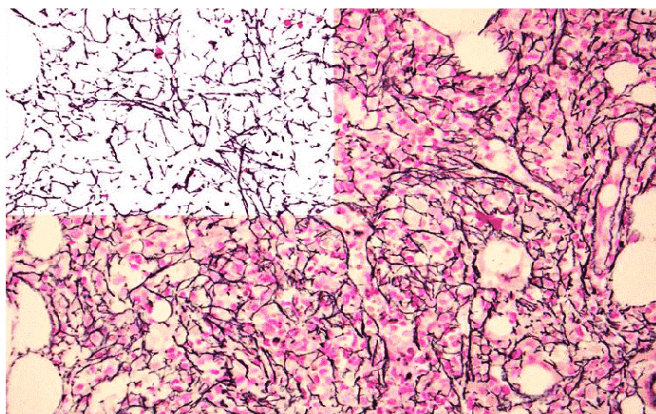
XII. تثبیت با هیپوسولفیت سدیم (Sodium thiosulfate)

XIII. شستشو، آب‌گیری، نصب لامل

- نتیجه میکروسکوپی:

✓ الیاف رتیکولین: سیاه

✓ زمینه: خاکستری روشن یا بی‌رنگ



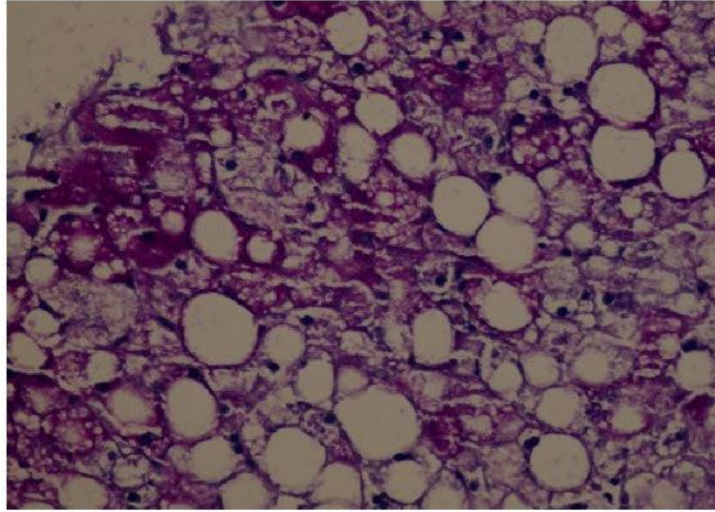
مقایسه کاربردها در بافت‌شناسی تشخیصی

کاربرد تشخیصی اصلی	ساختار هدف	روش رنگ‌آمیزی
تشخیص نفروپاتی، بیماری‌های قارچی، آدنوم	گلیکوژن، غشای پایه، قارچ‌ها	PAS
تمایز بین فیبروز و عضله، التهاب مزمن	کلاژن و عضله	تری کروم ماسون
ارزیابی معماری کبد، مغز استخوان، تومورها	الیاف رتیکولین کلاژن (نوع III)	نقره (رتیکولین)

• تصاویر رنگ‌آمیزی‌های خاص روی انواع بافت

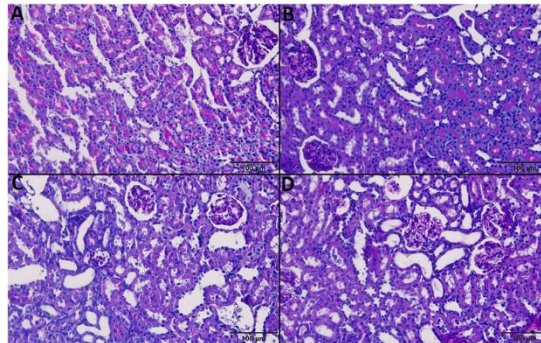
رنگ‌آمیزی (PAS) (Periodic Acid-Schiff)

I. بافت کبد



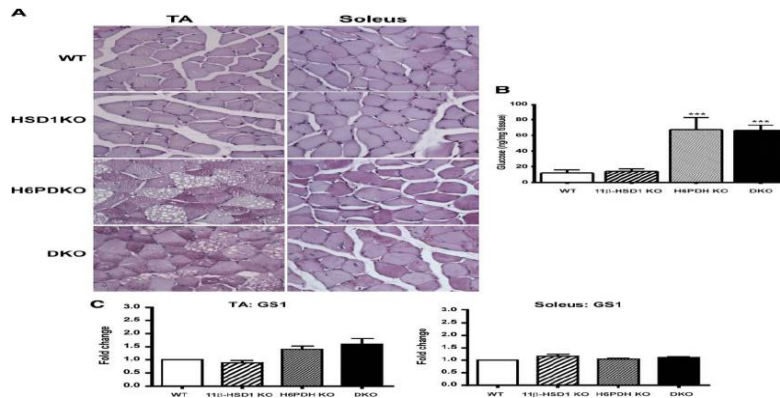
در این تصویر، رنگ‌آمیزی PAS در بافت کبد نشان‌دهنده تجمع گلیکوژن در هپاتوسیت‌ها است. مناطق ارغوانی رنگ، نشان‌دهنده حضور کربوهیدرات‌ها و گلیکوژن هستند که در بیماری‌های متابولیک مانند دیابت و بیماری‌های ذخیره گلیکوژن مشاهده می‌شوند.

II. بافت کلیه



در این تصویر، رنگ‌آمیزی PAS در بافت کلیه غشای پایه گلومرولی را به‌صورت ارغوانی برجسته کرده است. این ویژگی در تشخیص بیماری‌های کلیوی مانند نفروپاتی دیابتی و گلومرولواسکلروز اهمیت دارد.

III. بافت عضله



در این تصویر، رنگ‌آمیزی PAS در بافت عضله نشان‌ده.

-رفرنس:

1. StatPearls - PAS Stain

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554411/>

۲. منبع علمی معتبر پزشکی با توضیح عملکرد و کاربرد PAS در آسیب‌شناسی.

3. ResearchGate - PAS in gastrointestinal tissue Kulkarni A, et al.

[https://www.researchgate.net/figure/Histological-analysis-of-periodic-acid-Schiff-PAS-stained-tissues-Stomach-small-and_fig4_307549840](https://www.researchgate.net/figure/Histological-analysis-of-periodic-acid-Schiff-PAS-stained-tissues-Stomach-small-and_fig4_307549840)

۴. تصاویر میکروسکوپی PAS در بافت‌های دستگاه گوارش

5. University of Pennsylvania – Histology Core

<https://pathbio.med.upenn.edu/pbr/portal/hist/F6-Trichrome-skin.html>

۶. تصاویر و اطلاعات تخصصی درباره رنگ‌آمیزی پوست با تری کروم.

7. ResearchGate - Masson's Trichrome in wound tissue

Liu X, et al.

[https://www.researchgate.net/figure/Histology-images-of-Masson-trichrome-staining-of-the-wounds-a-In-the-control-group-the_fig5_318206481](https://www.researchgate.net/figure/Histology-images-of-Masson-trichrome-staining-of-the-wounds-a-In-the-control-group-the_fig5_318206481)

8. ResearchGate - Reticulin stain of pituitary
[https://www.researchgate.net/figure/Images-stained-using-silver-stain-for-reticulin-fibers-and-counterstained-using-nuclear_fig2_328325654](https://www.researchgate.net/figure/Images-stained-using-silver-stain-for-reticulin-fibers-and-counterstained-using-nuclear_fig2_328325654)

9. Histology Guide – Reticulin stain of spleen
<https://histologyguide.com/slideview/MHS-293-spleen/03-slide-1.html>