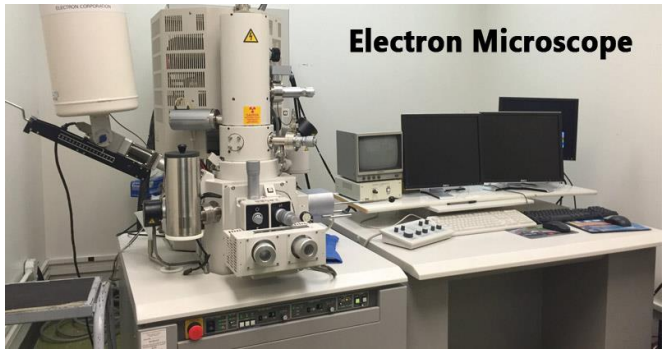
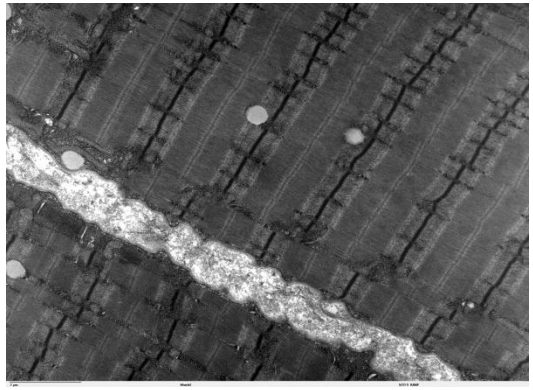
مروری بر روش های آماده سازی و رنگ آمیزی بافت ها برای مطالعات بافت شناسی

By: Shirin Kashfi
PhD in animal development
sh.kashfi@staf.ui.ac.ir

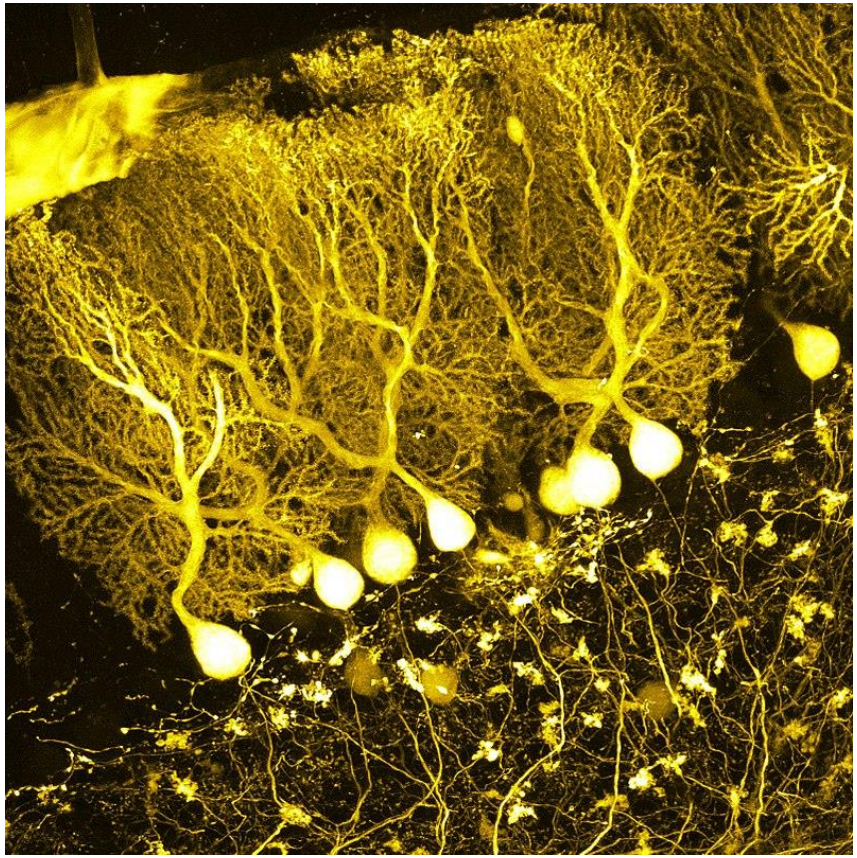
آنچه برای مطالعات بافت شناسی لازم است:

- روشی برای آماده سازی و رنگ آمیزی یک بافت یا ارگان به طوری که بتوان به وسیله میکروسکوپ مورد نظر آن را مشاهده کرد
- میکروسکوپ مناسب (نوری، الکترونی، فلوروسنت و ...)





- تصویر میکروسکوپ هم کانون (confocal) از سلول های پورکنژ که پروتئین فلوروسنت td Tomato را بیان می کنند



چگونه یک نمونه برای مطالعات بافت شناسی آماده می شود

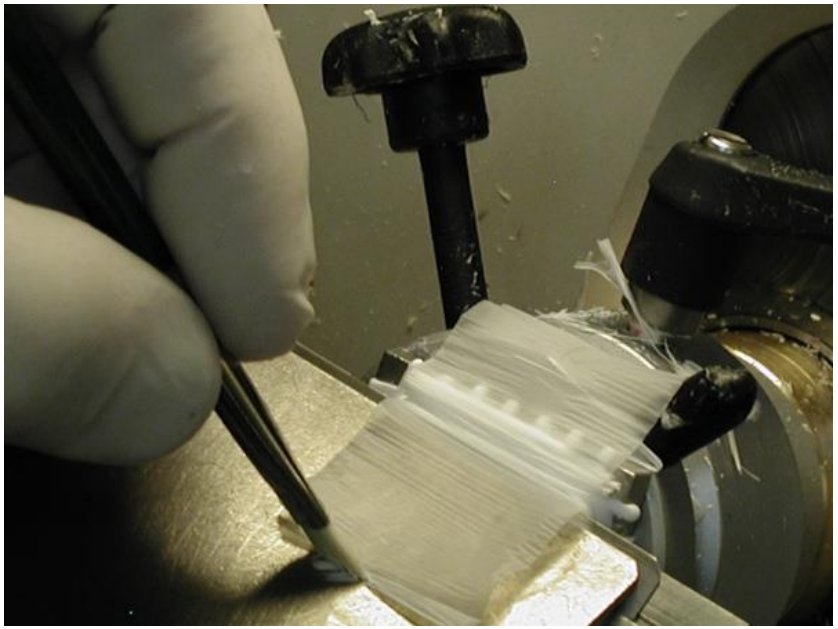
- اغلب بافت های تازه بسیار نرم هستند و به آسانی پاره شده یا صدمه می بینند و بنابراین تهیه برش نازک از آنها امکان پذیر نمی باشد مگر اینکه به صورت شیمیایی حفظ یا تثبیت شوند به صورتی که در هنگام برش زدن، حمایت شوند. به طور کلی دو روش برای فراهم آوردن چنین حمایتی در هنگام برش زدن وجود دارد:

۱- می توان بافت را به صورت یخ زده برش زد. به این نوع برش ها، **برش های یخ زده** (frozen section or cryosection) گویند

۲- در روش دیگر یک ماده شیمیایی را در حالت مایع به بافت وارد می کنند که بعداً به جامدی با خواص فیزیکی مناسب تبدیل می شود و اجازه گرفتن برش های نازک را می دهد. پارافین نمونه ای از این مواد است. به این نوع برش ها، **برش های پارافینی** (paraffin section) گویند

*

CRYOSECTION



- برش های یخ زده کیفیت کمتری نسبت به برش های پارافینی دارند و در مواردی که نیاز به بررسی سریع بافت باشد، تهیه می شوند
- برای تهیه برش های یخ زده، ابتدا با فروبردن بافت‌های غنی از آب در نیتروژن مایع، بافت را منجد می‌کنند. سپس توسط میکروتوم‌های یخچال دار و در حالت منجمد، نمونه‌ها را برش می‌زنند. پس از آن برش‌ها رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ مطالعه می‌شوند

میکروتوم های یخچال دار به نام cryostat microtome شناخته می شوند

آماده سازی بافت (TISSUE PROCESSING)برای تهیه برش های پارافینی

- به مراحلی که در طی آن بافت گرفته شده از انسان یا جانور تثبیت شده و به طور کامل در یک موم بافت شناسی مناسب غوطه ور می شود به صورتی که آماده برش زدن توسط دستگاه میکروتوم شود، **«آماده سازی بافت»** گویند

- آماده سازی بافت شامل چهار مرحله است: تثبیت، آبگیری، شفاف سازی و آغشته سازی به موم (پارافین)

.

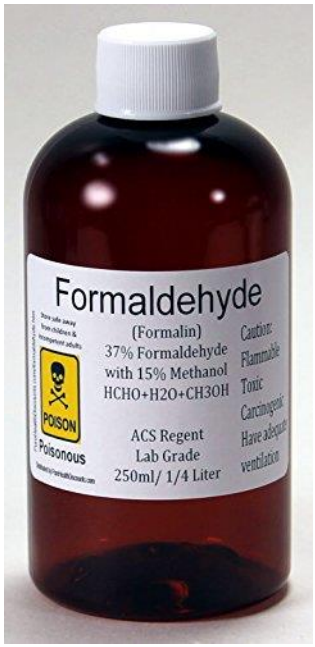
Source: Anthony L. Mescher: Junqueira's Basic Histology, 14th Edition.
www.accessmedicine.com
Copyright © McGraw-Hill Education. All rights reserved.

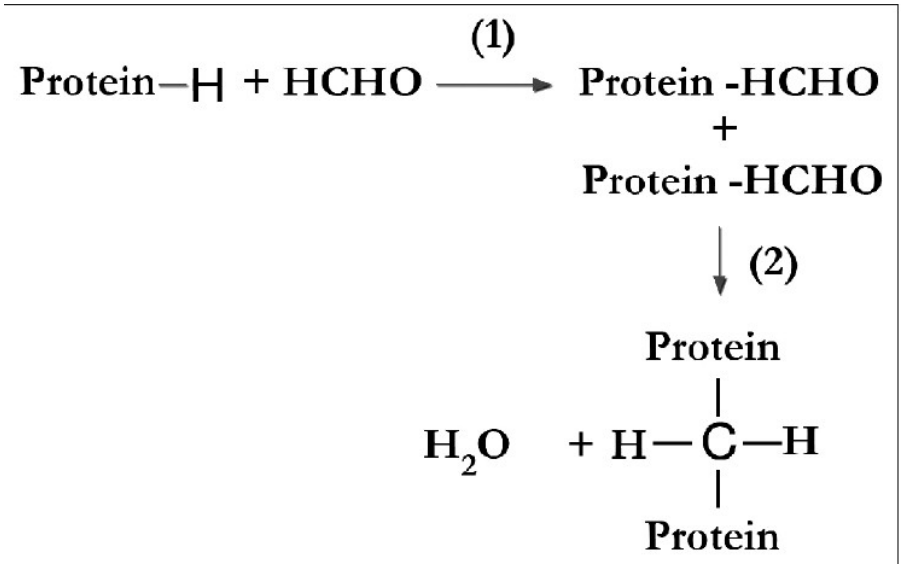
۱-تثبیت کردن (FIXATION)

- مهمترین بخش همه تکنیک های بافت شناسی و سلولی، حفظ بافتها به صورت طبیعی خود است. برای حصول به این هدف تکه های بافت در یک مایع تثبیت کننده (fixation fluid) غوطه ور می شوند. باید تلاش نمود این کار بلافاصله بعد از برداشت نمونه از انسان یا جانور آزمایشگاهی در همان محل برداشت انجام گیرد. در غیر این صورت نمونه باید فوراً به آزمایشگاه حمل و بلافاصله در تثبیت کننده قرار گیرد.
- اصولاً تثبیت کنندها با غیر فعال کردن آنزیم های لیزوزومی از اتولیز جلوگیری می کند و نیز ساختارهای درون و بیرون سلول را با مقاوم کردن ماکرومولکول ها نسبت به حل شدن توسط آب و سایر مایعات، پایدار می کند. تثبیت کننده ها همچنین از رشد باکتری ها و قارچ ها که موجب فساد می شوند، جلوگیری می کنند.
- معمولاً فرمالدهاید (Formaldehyde) با غلظت ۴٪ یا فرمالین با غلظت ۱۰٪ برای تثبیت کردن به کار می رود
- عمل تثبیت کردن در حرارت اتاق انجام می گیرد
- بسته به اندازه نمونه ۶ تا ۲۴ ساعت زمان برای تثبیت کردن لازم است
- نمونه ها در سبد های ویژه یا ظروف مناسب با ذکر مشخصات قرار می گیرند

اهمیت تثبیت کردن

- جزئیات مورفولوژی اصلی نمونه تنها زمانی قابل استفاده است که نمونه به خوبی تثبیت شده باشد
- در پی تثبیت کردن ضعیف نمونه ها:
  - انجام برش روی آنها به سختی و با مشکلات بیشتری انجام می گیرد
  - مورفولوژی نمونه ها حتی با وجود انجام دقیق بقیه مراحل آماده سازی و برش گیری درست، به خوبی نشان داده نمی شود





نحوه عمل فرمالدهاید

۲-آبگیری (DEHYDRATION)

- به دلیل اینکه پارافین هیدروفوبیک (غیر قابل حل در آب) است، قبل از آنکه نمونه در پارافین قرار گیرد باید آب آن حذف شود. این عمل با فرو بردن نمونه ها در محلول هایی از الکل اتانول که از رقیق به غلیظ مرتب شده اند و در نهایت به الکل خالص و کاملاً بدون آب می رسند، انجام می گیرد

- یک مثال:

- A typical dehydration sequence for specimens not more than 4mm thick would be:
  - 70% ethanol 15 min
  - 90% ethanol 15 min
  - 100% ethanol 15 min
  - 100% ethanol 15 min
  - 100% ethanol 30 min
  - 100% ethanol 45 min

۳-شفاف سازی (CLEARING)

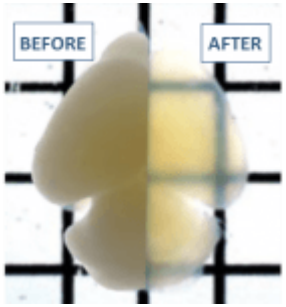
- با وجود اینکه تا این مرحله نمونه کاملاً فاقد آب است ولی هنوز نمی توان در آن پارافین نفوذ داد زیرا الکل و پارافین قابل حل در یکدیگر نیستند. بنابراین از یک حلال حدواسط استفاده می شود که هم با الکل و هم با پارافین قابل اختلاط است. این حلال جایگزین اتانول می شود و سپس در مرحله بعد خود توسط پارافین ذوب شده جایگزین می گردد. این مرحله شفاف سازی نامیده می شود. دلیل این نامگذاری این است که برخی از مواد مورد استفاده در این مرحله به دلیل ضریب شکست نسبتاً بالاتر، موجب شفافیت بافت ها نیز می شوند. نقش مهم دیگر مواد شفاف کننده حل و از بین بردن چربی بافت ها است که در صورت باقی ماندن از نفوذ پارافین جلوگیری می کنند

- معمول ترین ماده شفاف کننده گزیلل است و چندین مرحله عبور دادن از گزیلل لازم است تا کاملاً جایگزین اتانول شود

- یک مثال:

- A typical clearing sequence for specimens not more than 4mm thick would be:

  xylene 20 min
  xylene 20 min
  xylene 45 min



۴-آغشته سازی با موم (INFILTERATION WITH WAX)

- در این مرحله یک موم مناسب بافت شناسی در بافت نفوذ داده می شود. اگرچه برای سال ها مواد مختلف برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته اند، موم های بافت شناسی بر پایه پارافین متداول تر هستند. پارافین در ۶۰ درجه سانتی گراد مایع است و می تواند به داخل بافت نفوذ کند و سپس تا دمای ۲۰ درجه سانتی گراد سرد می شود که در این دما جامد شده و می توان از آن برش های منسجمی تهیه کرد. گاهی این موم ها مخلوطی از پارافین خالص و چند ماده افزودنی دیگر مانند انواع رزین ها هستند.این فرمولاسیون ویژه خواص فیزیکی مناسبی دارد که باعث می شود موم به داخل بافت نفوذ کند و بتوان بافت را تا ضخامت حداقل ۲ میکرومتر در دستگاه میکروتوم برش زد و نیز برای باز شدن روی آب در هنگام شناورسازی در حمام آب گرم انعطاف پذیری کافی دارند

- A typical infiltration sequence for specimens not more than 4mm thick would be:
  - wax 30 min
  - wax 30 min
  - wax 45 min

یک نمونه دستگاه فرآوری خودکار بافت

قالب گیری (EMBEDDING OR BLOCKING OUT)

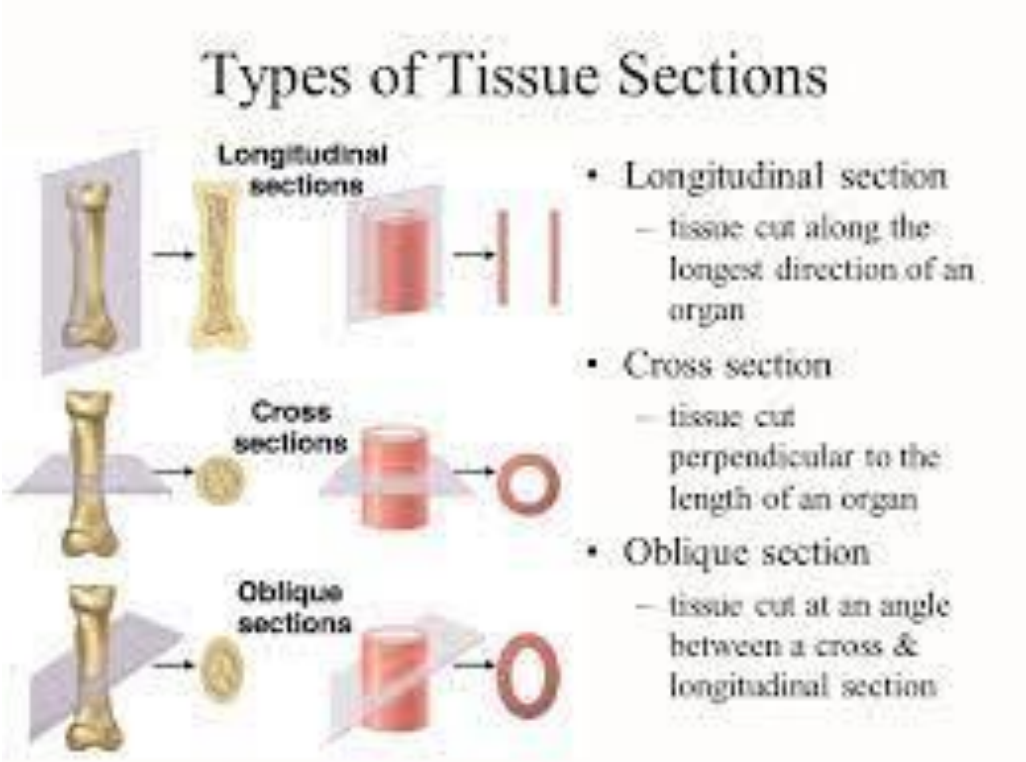
- هنگامی که نمونه کاملاً با موم آغشته شد باید قالب گیری شود تا بتوان آن را به دستگاه میکروتوم متصل نمود و برش گیری کرد. برای این مرحله قالب تا حدی از موم ذوب شده پر می شود و سپس نمونه با دقت و در جهت مورد نظر در موم قرار می گیرد. پس از آن بقیه فضای قالب با موم ذوب شده پر می شود. توجه به جهت قرار گیری نمونه در این مرحله بسیار اهمیت دارد، چون تعیین کننده نوع برش خواهد بود. باید اضافه نمود در صورتی که آماده سازی بافت به درستی انجام شود، بلوک های مومی حاوی نمونه های بافتی کاملاً پایدار بوده و می توان آنها را مدت ها ذخیره نمود

پوشش دادن لام های شیشه ای

- اغلب برش‌های بافتی روی لام‌های شیشه‌ای قرار می‌گیرند. مواد مختلفی جهت پوشش این لام‌ها به کار می‌رود. این کار کمک می‌کند تا در مراحل بعدی رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها از سطح لام شسته نشوند
- آلبومین تخم‌مرغ متداول‌ترین ماده‌ای است که برای پوشاندن سطح لام‌ها به کار می‌رود و باعث چسبیدن نمونه به سطح لام می‌شود

برش گیری

- برش های پایه در بافت شناسی در انواع زیر گرفته می شوند:
- برش های طولی (longitudinal or sagittal section) که در آن برش در امتداد محور بلند ساختار انجام می گیرد
- برش های عرضی (cross or transverse section) که در آن برش در امتداد محور کوتاه ساختار انجام می گیرد
- برش مورب (oblique section) که در آن صفحه برش نسبت به محور کوتاه یا بلند ساختار مایل قرار می گیرد

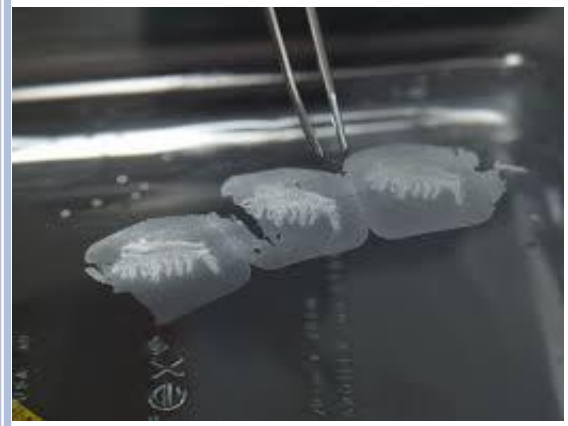


From: https://www.bcchr.ca/sites/default/files/group-bcchr-histology-core/histology-best-practices.pdf

دستگاه میکروتوم برای برش گیری نمونه های نگهداری شده در پارافین

برش گیری و انتقال برش ها روی لام پوشش داده شده

دستگاه میکروتوم و نواری از برش های سریالی از نمونه بافت موجود در پارافین



شناور سازی برش های خارج شده از دستگاه میکروتوم روی آب گرم

انتقال برش ها از روی سطح آب به لام پوشش داده شده که به این عمل MOUNTING گویند

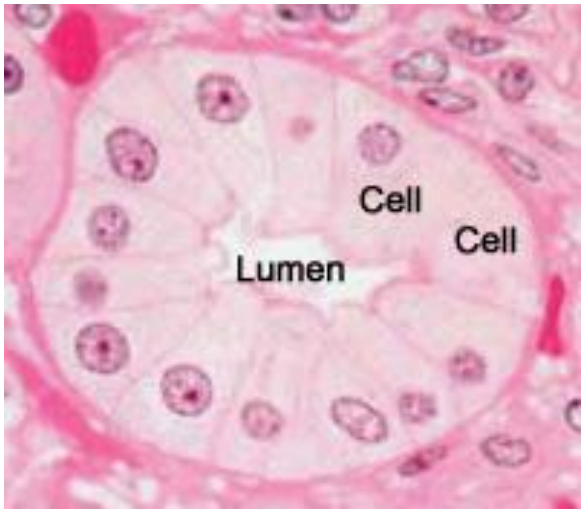
رنگ آمیزی (STAINING)

- بیشتر سلول ها بی رنگ یا شفاف هستند، بنابراین برای قابل مشاهده شدن باید رنگ آمیزی شوند. تکنیک های رنگ آمیزی بر دو دسته هستند:
  - رنگ آمیزی غیر اختصاصی: در این حالت، انواع سلول ها به یک روش رنگ آمیزی می شوند
  - رنگ آمیزی اختصاصی: در این حالت، گروه های شیمیایی یا مولکول های خاصی در سلول یا بافت رنگ آمیزی می شوند
- رنگ آمیزی معمولاً به وسیله رنگ هایی انجام می گیرد که برخی اجزاء سلول ها را به رنگ روشن تری در می آورد همراه با رنگ هایی که بقیه اجزاء سلول را تیره تر رنگ می کند

- رنگ های اسیدی و بازی:
  - رنگ های اسیدی با اجزاء بازی (یا کاتیونیک) سلول واکنش نشان می دهند. پروتئین ها یا سایر اجزاء سیتوپلاسم بازی هستند و بنابراین به رنگ های اسیدی متصل می شوند (اجزاء سلول که این رنگ ها را می گیرند اجزاء اسیدوفیل نامیده می شوند)
  - رنگ های بازی با اجزاء اسیدی (یا آنیونیک) سلول واکنش نشان می دهند. اسیدهای نوکلئیک اسیدی هستند و بنابراین به رنگ های بازی متصل می شوند (اجزاء سلول که این رنگ ها را می گیرند اجزاء بازوفیل نامیده میشوند)

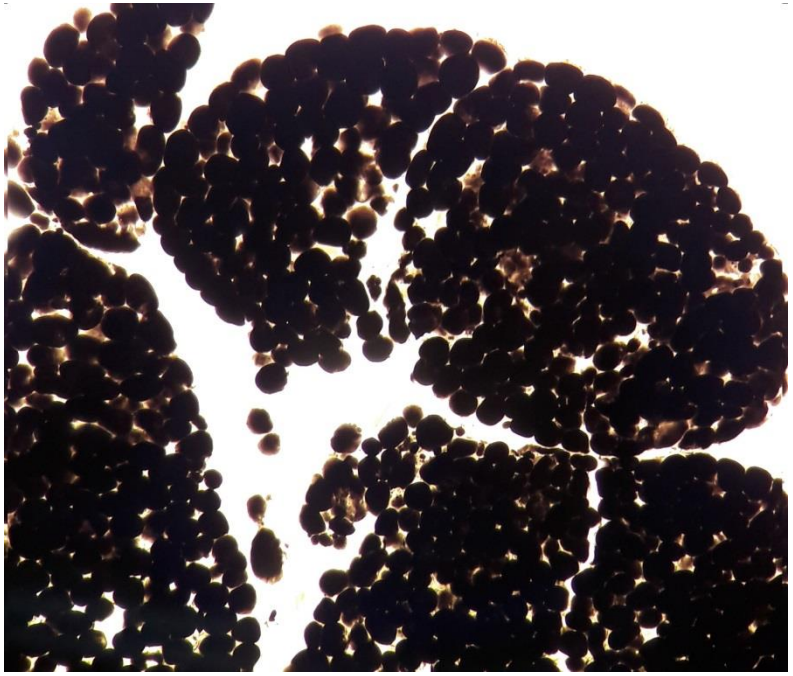
رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین (H&E)

- H&E نوعی رنگ آمیزی غیر اختصاصی بسیار متداول است که در آن از دو رنگ هماتوکسیلین و ائوزین استفاده می شود
- ائوزین رنگ اسیدی است و دارای بار منفی است. این رنگ ساختارهای بازی (یا اسیدوفیل) را به رنگ قرمز یا صورتی در می آورد. این ساختارها گاهی ائوزینوفیلیک هم نامیده می شوند
- هماتوکسیلین به عنوان یک رنگ بازی در نظر گرفته می شود. از این رنگ برای رنگ آمیزی ساختارهای اسیدی (یا بازوفیل) به رنگ بنفش استفاده می شود
- بنابراین در این روش رنگ آمیزی، DNA در هسته و RNA در ریبوزوم ها بنفش رنگ و بقیه اجزاء سیتوپلاسم صورتی می شوند

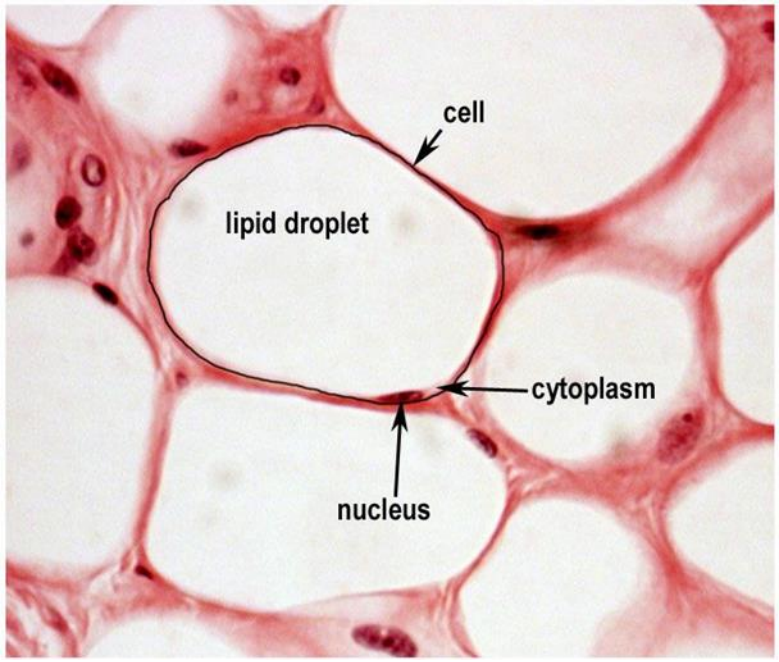


رنگ آمیزی بافت چربی

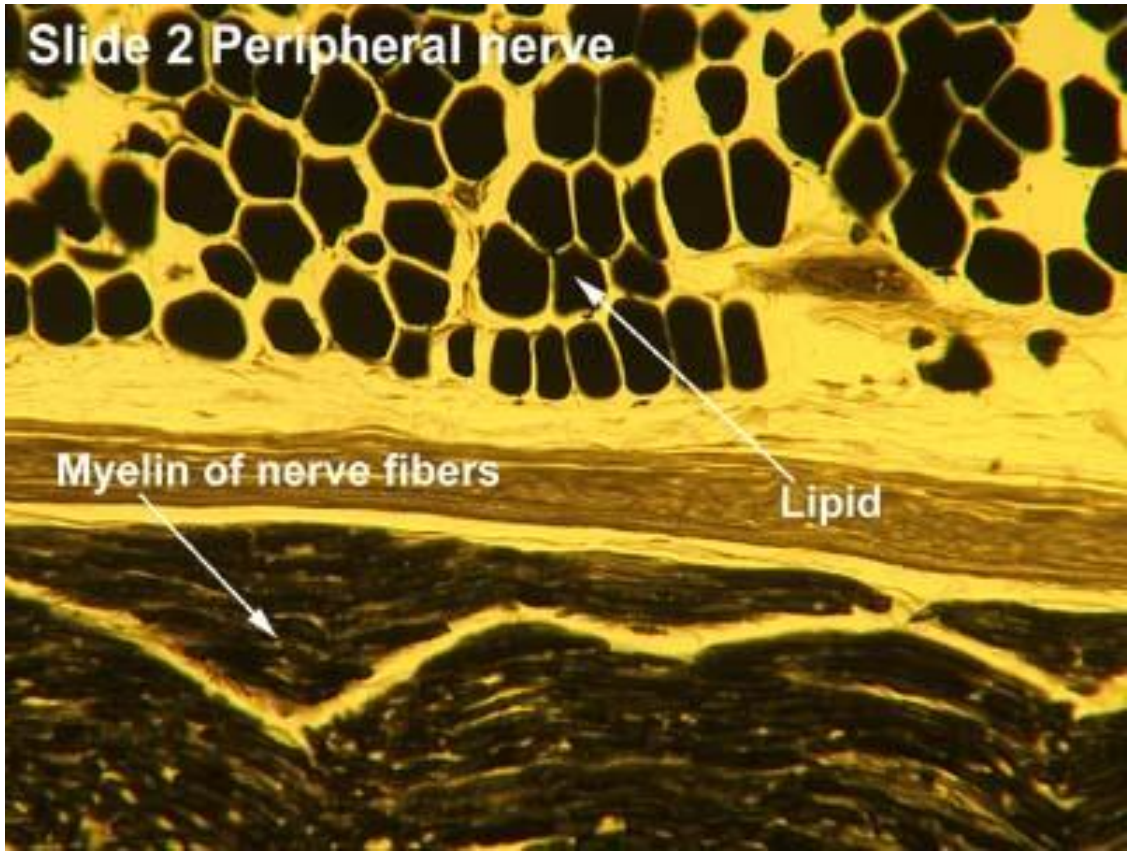
- استفاده از الکل و گزیلل در روش‌های متداول آماده سازی برش‌های پارافینی منجر به حذف چربی از بافت می‌شود. بنابراین، برای حفظ چربی معمولاً از مقاطع انجمادی و رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی توسط رنگ‌های لیپوفیل استفاده می‌شود
- سودان سیاه نمونه ای از این رنگ ها است که موجب رنگ گرفتن چربی های خنثی، فسفولیپیدها و استرول ها می شود
- با استفاده از این رنگ ها، ساختارهای غنی از چربی مانند میلین و قطرات چربی به رنگ سیاه در می آیند



بافت چربی، رنگ آمیزی سودان سیاه



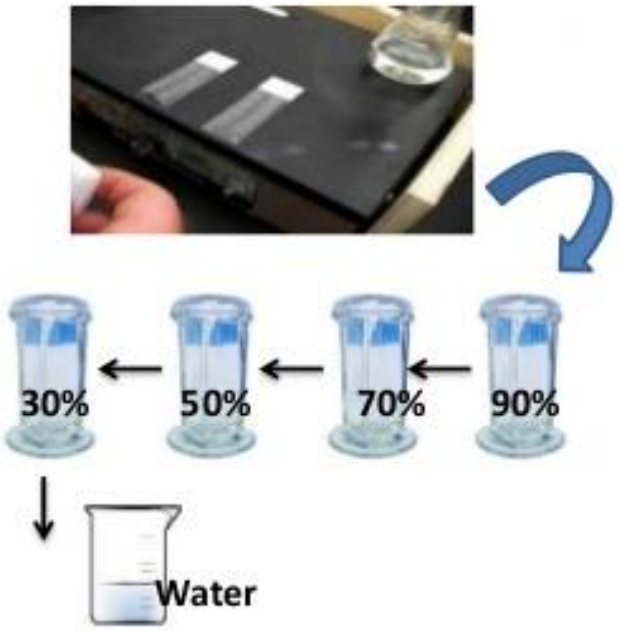
بافت چربی، رنگ آمیزی H&E

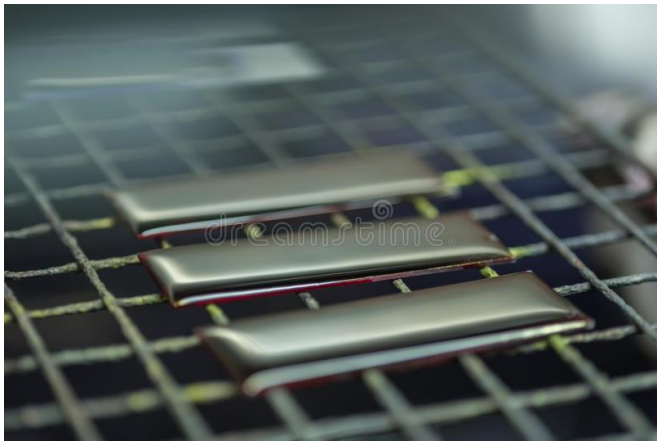


مقطع طولی عصب محیطی؛ آماده سازی بافت با تتراکسید اسمیوم که باعث حفظ چربی می شود

مراحل رنگ آمیزی

- قبل از شروع رنگ آمیزی لام همراه با نمونه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده می شود که تا حد ممکن پارافین ذوب و از نمونه خارج شود. سپس نمونه در گزیلل قرار می گیرد تا پارافین کاملاً خارج شود
- سپس با گذراندن نمونه سوار شده روی لام از الکل هایی که به ترتیب از غلظت زیاد به کم مرتب شده اند، نمونه آبدهی می شود
- پس از خاتمه رنگ آمیزی نیز دوباره از نمونه ها آبگیری می شود و در پایان باز هم در گزیلل قرار می گیرند

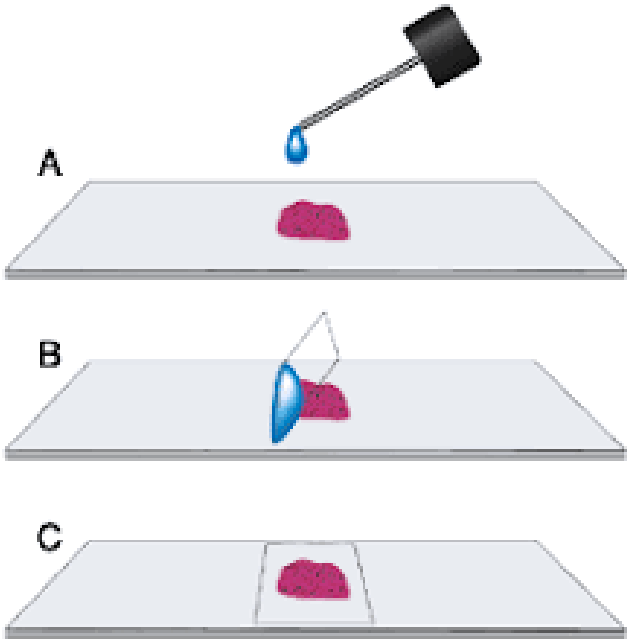




نمونه هایی از وسایل مورد استفاده جهت رنگ آمیزی بافت ها

لامل گذاری

- برای چسباندن لامل به سطح نمونه از چسب انتلان یا کانادابالزام استفاده می شود
- استفاده از یک قطره کوچک از هر یک از این مواد کافی است
- باید دقت نمود زیر لامل حباب هوا وارد نشود



لام های تهیه شده را می توان سال ها در جعبه های مخصوص نگهداری کرد