

فهرست مطالب

۱۱	فصل ۱ - بافت شناسی و روش های مطالعه آن
۳۵	فصل ۲ - سیتوپلاسم
۸۴	فصل ۳ - هسته
۱۰۸	فصل ۴ - بافت پوششی
۱۴۱	فصل ۵ - بافت همبند
۱۷۳	فصل ۶ - بافت چربی
۱۸۳	فصل ۷ - غضروف
۱۹۵	فصل ۸ - استخوان
۲۲۷	فصل ۹ - بافت عصبی و سیستم عصبی
۲۶۹	فصل ۱۰ - بافت عضلانی
۲۹۸	فصل ۱۱ - دستگاه گردش خون
۳۲۷	فصل ۱۲ - خون
۳۴۹	فصل ۱۳ - خونسازی
۳۶۶	فصل ۱۴ - دستگاه ایمنی و اندام های نفوذی
۴۰۳	فصل ۱۵ - لوله گوارش
۴۴۶	فصل ۱۶ - اندام های ضمیمه گوارش
۴۷۳	فصل ۱۷ - دستگاه تنفس
۵۰۲	فصل ۱۸ - پوست
۵۳۰	فصل ۱۹ - سیستم ادراری
۵۵۶	فصل ۲۰ - غدد درون ریز
۵۹۰	فصل ۲۱ - دستگاه تولید مثل مرد
۶۱۷	فصل ۲۲ - دستگاه تولید مثل زن
۶۵۶	فصل ۲۳ - چشم و گوش اندام های حسی ویژه
۷۰۱	ضمیمه - رنگ آمیزی های میکروسکوپ نوری
۷۰۳	واژه یاب

بافت‌شناسی و روش‌های مطالعه آن

۲۰..... میکروسکوپ الکترونی عبوری	۱۳..... آماده‌سازی بافت‌ها جهت مطالعه
۲۱..... میکروسکوپ الکترونی تقطیعی	۱۳..... ثابت‌سازی
۲۳..... اتورادیوگرافی	۱۳..... قالب‌گیری و برش زدن
۲۳..... کشت سلول و بافت	۱۴..... رنگ‌آمیزی
۲۵..... هیستوشیمی آنزیمی	۱۶..... میکروسکوپ نوری
۲۵..... مشاهده ملکول‌ها، اختصاصی	۱۶..... میکروسکوپ زمینه روشن
۲۶..... ایمونوهیستوشیمی	۱۷..... میکروسکوپ فلوروسنس
۲۸..... روش‌های هیبریدیزاسیون (دورگه‌سازی)	۱۸..... میکروسکوپ فاز - کنتراست
۳۰..... تفسیر ساختارها در برش‌های بافتی	۱۹..... میکروسکوپ هم‌کانون
۳۱..... خلاصه نکات کلیدی	۲۰..... میکروسکوپ پلاریزان
۳۳..... خودآزمایی	۲۰..... میکروسکوپ الکترونی

بافت‌شناسی^۱ مطالعه بافت‌های بدن و چگونگی آرایش این بافت‌ها برای تشکیل اندام‌ها است. این عنوان تمامی جنبه‌های بیولوژی بافتی را با تمرکز بر چگونگی ساختار سلولی و آرایش بهینه جهت عملکردهای خاص هر عضو در بر می‌گیرد.

بافت‌ها از دو جزء در حال تعامل با یکدیگر تشکیل شده‌اند: سلول و ماتریکس خارج سلولی^۲. ECM شامل انواع فراوانی از ماکرومولکول‌ها است که بیشتر آن‌ها ساختمان‌های پیچیده‌ای مثل فیبریل‌های کلاژن را تشکیل می‌دهند. ECM از سلول‌ها حمایت کرده و حاوی مایعی است که مواد غذایی را به سلول‌ها منتقل می‌کند و مواد دفعی و تولیدات ترشحاتی را از آن‌ها دور می‌نماید. با اینکه سلول‌ها ECM را به طور موضعی می‌سازند اما شدیداً توسط مولکول‌های ماتریکس تحت تأثیر قرار می‌گیرند. بسیاری از اجزاء ماتریکس به گیرنده‌های اختصاصی سطح سلول متصل می‌شوند که از عرض غشاهای سلولی عبور کرده‌اند و بدین ترتیب با عناصر ساختاری درون سلول ارتباط برقرار می‌کنند. این نوع ارتباط بین سلول‌ها و ECM مجموعه مداومی را

می‌سازد که سبب می‌شود تا آن‌ها به طور کاملاً هماهنگ با هم عمل نمایند.

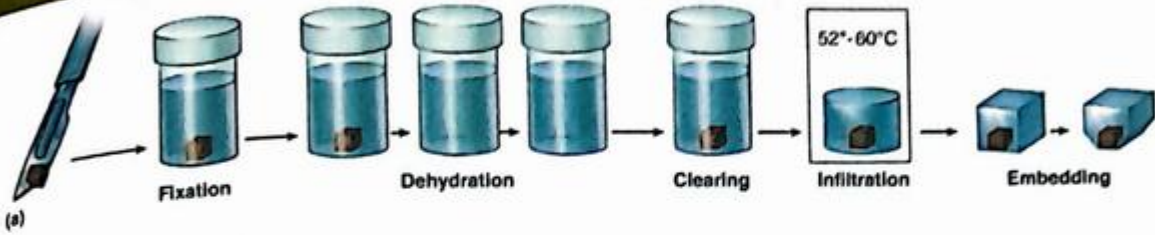
در طی تکامل جنینی، سلول‌ها و ماتریکس‌های همراه آن‌ها از نظر عملکرد تخصص یافته و به انواع بافت‌های اصلی با ویژگی‌های ساختاری خاص تمایز می‌یابند. اندام‌ها از ترکیب منظم این بافت‌ها تشکیل می‌شوند و سازماندهی دقیق آن‌ها منجر به عملکرد مناسب اندام‌ها و در نهایت ارگانیسم می‌شود.

اندازه کوچک سلول‌ها و اجزای ماتریکس، مطالعه بافت را به استفاده از میکروسکوپ و روش‌های مولکولی وابسته کرده است. پیشرفت‌های موجود در بیوشیمی، بیولوژی مولکولی، فیزیولوژی، ایمونولوژی و پاتولوژی جهت شناخت بهتر بیولوژی بافت ضروری می‌باشد. آشنایی با ابزار و روش‌های هر شاخه علمی برای درک بهتر موضوع ضرورت دارد. در این فصل به بسیاری از روش‌های معمول در مطالعه سلول‌ها و بافت‌ها با تمرکز بر رویکردهای میکروسکوپی

1- Histology

2- Extra cellular matrix (ECM)

شکل ۱-۱ برش‌گیری بافت‌های ثابت شده و قالب‌گیری شده.



اکثر بافت‌هایی که از نظر بافت‌شناسی مطالعه می‌شوند مطابق شکل نشان داده شده، در طی مراحل زیر تهیه می‌شوند (a)

■ **ثابت‌سازی:** قطعات کوچکی از بافت در محلول‌های شیمیایی قرار می‌گیرند. این محلول‌ها با ایجاد پیوند شیمیایی با پروتئین‌ها و غیرفعال نمودن آنزیم‌های هضم‌کننده باعث حفظ ساختار سلولی و بافتی می‌گردند.

■ **آب‌گیری:** بافت با عبور از یک مجموعه‌ای از محلول‌های الکلی با غلظت افزایشی تا ۱۰۰ درصد، تمام آب خود را از دست می‌دهد.

■ **شفاف‌سازی:** الکل توسط حلال‌های الی که قابلیت امتزاج با الکل و پارافین را دارد، برداشته می‌شود.

■ **ارتشاح بافتی:** بافت در پارافین مذاب قرار داده می‌شود تا زمانی که پارافین به طور کامل به داخل بافت نفوذ کند.

■ **قالب‌گیری:** بافتی که پارافین به درون آن نفوذ کرده، در یک قالب کوچک حاوی پارافین مذاب قرار داده شده و اجازه داده می‌شود تا سفت گردد.

■ **اصلاح‌سازی (trimming):** قالب پارافینی برای نمایان ساختن بافت جهت برش زدن (مقطع زدن) توسط میکروتوم، مرتب می‌شود.

مراحل مشابهی به منظور آماده‌سازی بافت جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) انجام می‌شود، با این تفاوت که ثابت‌کننده‌ها و محلول‌های آب‌گیری مخصوص بافت‌های کوچک‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند و مواد قالب‌گیری شامل رزین‌های اپوکسی است که سخت‌تر از پارافین هستند و امکان برش زدن بسیار نازک را فراهم می‌کنند.

(b) میکروتوم برای برش زدن بافت‌های قالب‌گیری شده در پارافین جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری استفاده می‌شود. نمونه بافتی در قسمت نگه‌دارنده قالب پارافینی قرار داده می‌شوند و با هر بار چرخش دسته، نگه‌دارنده قالب در فاصله‌ای کنترل شده که معمولاً بین ۱ تا ۱۰ میکرومتر است به سمت جلو حرکت می‌کند. بعد از هر حرکت به سمت جلو، قالب بافتی از بالای لبه تیغه فولادی عبور می‌کند و مقطع با ضخامتی برابر با مسافت طی شده قالب به جلو، بریده می‌شود. برش‌های پارافینی بر روی لام‌های شیشه‌ای قرار داده می‌شوند و پس از چسبیدن، پارافین زدایی شده و برای مطالعه با میکروسکوپ نوری رنگ‌آمیزی می‌شوند. در مطالعه با TEM، مقاطع با ضخامت کمتر از ۱ میکرومتر، از سلول‌هایی قالب‌گیری شده در رزین، با استفاده از یک اولترامیکروتوم دارای تیغه شیشه‌ای یا الماسی تهیه می‌شوند.

پرداخته شده است.

آماده‌سازی بافت‌ها جهت مطالعه

رایج‌ترین روشی که در تحقیقات بافت‌شناسی انجام می‌شود آماده‌سازی برش‌ها یا "مقاطع" بافتی است که بتوان آن‌ها را با میکروسکوپ نوری مطالعه کرد. از آن جایی که ضخامت بیشتر بافت‌ها و اندام‌ها برای عبور نور، زیاد است، برش‌های شفاف و نازک از آن‌ها تهیه شده و برای مطالعه میکروسکوپی ساختارهای درونی، بر روی لام‌های شیشه‌ای چسباندن می‌شوند.

آماده‌سازی میکروسکوپی ایده‌آل، باید به نحوی صورت بگیرد که بافت روی لام ویژگی‌های ساختاری مشابهی که در بدن دارد را نشان دهد. هر چند این حالت به ندرت امکان‌پذیر است چرا که روند آماده‌سازی باعث حذف لیپید سلولی و صدمات خفیف ساختار سلول می‌گردد. مراحل اصلی مورد استفاده در آماده‌سازی بافت جهت میکروسکوپ نوری در شکل ۱-۱ نشان داده شده است.

ثابت‌سازی^۱

جهت حفظ ساختار بافت و جلوگیری از تخریب آن، آنزیم‌های رها شده از سلول‌ها یا میکروارگانیسم‌ها، قطعاتی از اندام‌ها بلافاصله بعد از جدا شدن از بدن در محلول‌های پایدار کننده یا ترکیبات دارای ارتباط متقاطع که ثابت‌کننده^۲ نام دارند قرار داده می‌شوند. از آنجایی که ثابت‌کننده برای حفظ تمام سلول‌ها، باید کاملاً به درون کل بافت نفوذ کند، قبل از ثابت‌سازی، بافت‌ها معمولاً به قطعات کوچکی بریده می‌شوند تا نفوذپذیری تسهیل شود. جهت حفظ سلول در اعضا بزرگ، ثابت‌کننده‌ها غالباً از طریق عروق خونی وارد می‌شوند، توسط پرفیوژن عروقی، ثابت‌کننده به سرعت به بافت‌ها می‌رسد.

یکی از رایج‌ترین ثابت‌کننده‌های مورد استفاده در مطالعه با میکروسکوپ نوری، فرمالین، یک محلول بافر ایزوتونیک تهیه شده از فرمالدئید ۳۷ درصد است. این ترکیب و گلووتارالدئید، ثابت‌کننده‌ای که برای میکروسکوپ الکترونی به کار می‌رود، هر دو با گروه‌های آمینی (NH_2) پروتئین‌ها واکنش نشان می‌دهند و از تخریب آن‌ها توسط پروتئازهای

معمول جلوگیری می‌نماید. گلووتارالدئید، همچنین با اتصال متقاطع پروتئین‌های مجاور هم، سلول‌ها و ساختارهای ماتریکس خارج سلولی را تقویت می‌کند.

به دلیل بزرگ‌نمایی و تفکیک بالاتر ساختارهای سلولی بسیار کوچک در میکروسکوپ الکترونی، برای حفظ جزئیات فراساختاری، ثابت‌سازی باید با دقت بیشتری انجام شود. معمولاً در چنین مطالعاتی، بافت تیمار شده در گلووتارالدئید در بافر تتراکسید اسمیوم غوطه‌ور می‌شود، که علاوه بر پروتئین‌ها، لیپیدهای سلولی را نیز حفظ (و رنگ) می‌کند.

قالب‌گیری و برش، زدن^۳

به منظور تهیه برش‌های نازک، بافت‌های ثابت شده می‌بایست توسط ماده‌ای که برای قالب‌گیری استفاده می‌شود، اشباع شوند که باعث سختی بافت می‌شود. مواد قالب‌گیری، شامل پارافین است که به طور معمول برای میکروسکوپ نوری استفاده می‌شود، و رزین‌های پلاستیکی که برای مطالعه با هر دو نوع میکروسکوپ نوری و الکترونی استفاده می‌شود.

قبل از ارتشاح بافتی با چنین موادی، بافت فیکس شده از محلول‌های اتانول که به تدریج غلظت آن‌ها افزایش می‌یابد و در نهایت به محلول ۱۰۰ درصد می‌رسد عبور داده شده و آب‌گیری^۴ می‌شود. سپس یک حلال آلی که قابلیت مخلوط شدن با الکل و ماده قالب‌گیری را دارد، جایگزین اتانول می‌شود. این مرحله به عنوان مرحله شفاف‌سازی^۵ معروف است، چرا که مواد مورد استفاده در ارتشاح، سبب شفاف شدن بافت می‌شوند.

سپس بافت شفاف با پارافین ذوب شده در دمای ۶۰-۵۲ درجه سانتی‌گراد اشباع می‌شود که سبب تبخیر ماده شفاف‌کننده شده و اشباع بافت توسط پارافین را تسهیل می‌کند. سپس بافت اشباع از پارافین، در ظرف‌های کوچک پارافین، در درجه حرارت اتاق، قالب‌گیری می‌شود. بافت‌هایی که با رزین‌های پلاستیکی قالب‌گیری می‌شوند نیز به وسیله اتانول آب‌گیری شده و به دنبال آن با حلال پلاستیکی اشباع می‌شوند. این حلال‌ها با ایجاد اتصالات

1- Fixation

2- Fixative

3- Embedding & Sectioning

4- Dehydration

5- Clearing

مقاطع پلی‌مریزه سخت می‌شوند. قالب‌های پلاستیکی که به درجه حرارت پایین‌تری نسبت به قالب‌های پارافینی نیاز دارند، باعث جلوگیری از چروک شدن و تغییرات بافتی می‌شوند.

قالب‌های سخت‌شده حاوی بافت و محیط قالب‌گیری احاطه کننده آن، اصلاح شده و برای برش‌گیری بر روی دستگاهی به نام میکروتوم^۱ قرار می‌گیرند (شکل ۱-۱) برش‌های پارافین معمولاً با ضخامت ۳ تا ۱۰ میکرومتر برای میکروسکوپ نوری و برش‌هایی با ضخامت کمتر از ۱ میکرومتر، جهت میکروسکوپ الکترونی تهیه می‌شوند. یک میکرومتر مساوی ۰/۰۰۱ میلی‌متر یا 10^{-6} متر است. واحدهای دیگر که به طور معمول در بافت‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرند، شامل نانومتر $(1\text{nm}=0/001\mu\text{m}=10^{-6}\text{mm}=10^{-9}\text{m})$ و آنگستروم $(10^{-4}\mu\text{m}$ یا $1\text{Å}=0/1\text{nm})$ می‌باشند. در مطالعه با میکروسکوپ نوری برش‌های بسیار نازک روی لام‌های شیشه‌ای قرار گرفته و رنگ‌آمیزی می‌شوند. میکروسکوپ الکترونی بر روی گریدهای فلزی^۲ قرار داده شده و مورد بررسی قرار می‌گیرند.

کاربرد در پزشکی

بیوپسی‌ها^۳، نمونه‌های بافتی هستند که در طی جراحی با روش‌های پزشکی معمول، برداشته می‌شوند. اتفاق عمل بیوپسی‌ها در ویال حاوی فرمالین تثبیت می‌شوند تا برای انجام مراحل بعدی و آنالیز میکروسکوپی در آزمایشگاه آسیب‌شناسی مورد استفاده قرار بگیرند. اگر نتیجه چنین آنالیزهایی، تا قبل از پایان پروسه پزشکی مورد نیاز باشد، به عنوان مثال تشخیص رشد بدخیمی قبل از بخیه زدن بیمار، روش آماده‌سازی سریع‌تری مورد نیاز است. در این موارد نمونه به سرعت در نیتروژن مایع منجمد شده و ساختارهای سلولی حفظ می‌شود. در این زمان بافت سخت و آماده برش است. یک میکروتوم که گرایوستات نام دارد و درون محفظه‌ای با دمای زیر صفر قرار داده شده است، برای برش زدن قالب حاوی بافت مورد استفاده قرار می‌گیرد. برش‌های منجمد برای رنگ‌آمیزی و مشاهده میکروسکوپی سریع توسط پاتولوژیست بر روی لام قرار داده می‌شوند.

انجماد بافت‌ها در مطالعات هیستوشیمی بسیاری از آنزیم‌های

حساس یا مولکول‌های کوچک نیز کاربرد دارد زیرا انجماد برخلاف ثابت‌سازی، اکثر آنزیم‌ها را غیرفعال نمی‌کند. از آنجایی که اغلب حلال‌های شفاف‌کننده چربی سلول را در بافت‌های فیکس شده حل می‌کنند، برش‌های انجمادی می‌تواند در مواقعی که ساختمان‌های حاوی چربی مورد مطالعه قرار می‌گیرند، نیز مفید باشد.

رنگ‌آمیزی^۴

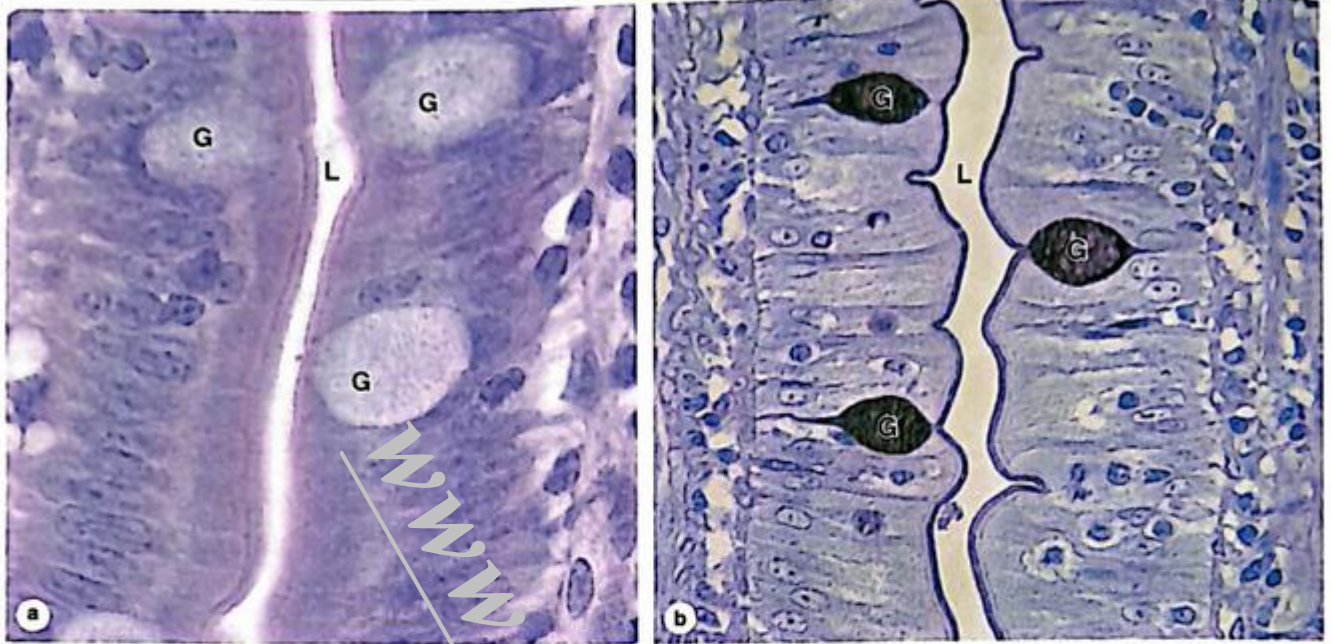
اکثر سلول‌ها و مواد خارج سلولی کاملاً بی‌رنگ هستند، لذا برش‌های بافتی برای مطالعه میکروسکوپی باید رنگ‌آمیزی شوند. روش‌های رنگ‌آمیزی طوری طراحی شده‌اند که علاوه بر مشخص کردن اجزاء مختلف بافت، امکان افتراق بین آن‌ها را نیز فراهم می‌کنند. رنگ‌ها ترکیبات بافتی را کم و بیش به طول انتخابی رنگ می‌کنند اکثر آن‌ها رفتاری مانند ترکیبات اسیدی یا بازی دارند و با ماکرومولکول‌ها و رادیکال‌های یونیزه درون بافتی، پیوندهای الکترواستاتیک (نمکی) ایجاد می‌کنند. ترکیبات سلولی مثل اسیدهای نوکلئیک با بار الکتریکی منفی (آنیونی) با رنگ‌های بازی رنگ می‌گیرند به همین دلیل بازوفیلیک^۵ (باز دوست) نامیده می‌شوند، ترکیبات کاتیونی مثل پروتئین‌های دارای تعداد زیادی گروه‌های آمینی یونیزه، به رنگ‌های اسیدی تمایل دارند و اسیدوفیلیک^۶ (اسید دوست) نامیده می‌شوند.

تولوئیدین آبی^۷، آلسین آبی^۸ و متیلن آبی^۹ مثال‌هایی از رنگ‌های بازی هستند. هماتوکسیلین^{۱۰} به عنوان یک رنگ بازی عمل کرده و ترکیبات اسیدی بافت‌ها را رنگ‌آمیزی می‌کند. اجزای اصلی بافتی، به دلیل وجود اسیدها در ترکیباتشان (DNA, RNA و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها) یونیزه می‌شوند و با رنگ‌های بازی واکنش می‌دهند. رنگ‌های اسیدی (مثل اتوزین، اورنج جی و اسید فوشین) ترکیبات اسیدوفیلیک بافتی مثل میتوکندری‌ها، گرانول‌های ترشحی و کلاژن را رنگ‌آمیزی می‌کنند.

از میان همه روش‌های رنگ‌آمیزی، ترکیب ساده

- | | |
|-------------------|-----------------|
| 1- Microtome | 2- Metal grids |
| 3- Biopsies | 4- Staining |
| 5- Basophilic | 6- Acidophilic |
| 7- Toluidine blue | 8- Alcian blue |
| 9- Methylene blue | 10- Hematoxylin |

شکل ۱-۲ رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) و پریودیگ اسید-شیف (PAS).



مناطق میسوپلی‌های سلولی که لایه‌ای از گلیکوپروتئین‌ها در سطح برای میانی (L) دارند و گرانول‌های ترش‌غنی از موسین در سلول‌های جامی به شدت رنگ گرفته‌اند. سطح سلولی بی‌بیل دارا بودن گلیکوپروتئین‌ها و موسین‌ها به ترتیب که حاوی میزان زیادی الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها هستند، PAS مثبت می‌باشد. برای نمایش بهتر هسته‌ها در رنگ آمیزی PAS، هماتوکسیلین به عنوان رنگ افتراقی به کار رفته است. (a: ۴۰۰x، b: ۳۰۰x)

میکروگراف‌هایی از اپی‌تلیوم پوشاننده روده باریک (a) با رنگ آمیزی H&E (b) گلیکوپروتئین‌های رنگ شده با واکنش PAS. در رنگ آمیزی H&E هسته‌های سلولی بازوفیلیک به رنگ بنفش درآمده‌اند در حالی که سیتوپلاسم صورتی رنگ می‌شود. نواحی از سلول که میزان زیادی الیگوساکارید بر روی گلیکوپروتئین‌ها دارند، مانند انتهای سلول‌های موجود در مجرای میانی (L) یا در سلول‌های جامی (G) ترشح کننده موکر که به طور پراکنده قرار گرفته‌اند، به میزان کمی رنگ می‌گیرند. اما در PAS، سلول‌های موجود در مناطق مجرای پررنگ‌ترند. در این

واکنش پریودیگ اسید شیف (PAS)^۲ با استفاده از ساختارهای حلقه‌ای هگزوز پلی‌ساکاریدها و ساختارهای بافتی دیگر غنی از کربوهیدرات‌ها، چنین ماکرومولکول‌هایی را به طور مشخص به رنگ بنفش یا ارغوانی درمی‌آورد. شکل ۱-۲b نمونه‌ای از سلول‌ها با مناطق غنی کربوهیدراتی را نشان می‌دهد که به خوبی با واکنش PAS رنگ شده‌اند. DNA هسته‌های سلولی، با کمک روش PAS تغییر یافته‌ای به نام واکنش فولگن^۴ به طور اختصاصی رنگ شده‌اند. مواد بازوفیلیک و PAS مثبت را با روش‌های هضم

هماتوکسیلین و ائوزین^۱ (H&E) بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. هماتوکسیلین رنگ آبی تیره یا بنفش ایجاد می‌کند و DNA را در هسته سلول و سایر ترکیبات اسیدی مانند بخش‌های غنی از RNA سیتوپلاسم و ماتریکس غضروف را رنگ می‌کند. در مقابل، ائوزین دیگر ترکیبات سیتوپلاسمی و کلاژن را صورتی رنگ می‌کند (شکل ۱-۲a). در اینجا ائوزین به عنوان رنگ افتراقی^۲ است. رنگ افتراقی، معمولاً یک رنگ منفرد است که جداگانه به کار برده می‌شود تا امکان تشخیص بهتر ساختارهای بافتی فراهم آید. رنگ‌های دیگری مثل تری‌کروم‌ها (مثل تری‌کروم ماسون) که در روش‌های بافت‌شناسی پیچیده‌تر استفاده می‌شوند امکان تفکیک بهتری از اجزاء بافتی خارج سلولی را فراهم می‌کنند.

1- Hematoxylin & Eosin (H&E)
 2- Counterstain
 3- Periodic acid-Schiff reaction
 4- Feulgen reaction