فهرست مطالب

فصل ۱	بافت‌شناسی و روشهای بررسی در آن	۱
فصل ۲	سیتوپلاسم	۹
فصل ۳	هسته	۲۸
فصل ۴	بافت اپی‌تلیال	۳۸
فصل ۵	بافت همبند	۵۴
فصل ۶	بافت چربی	۶۹
فصل ۷	غضروف	۷۴
فصل ۸	استخوان	۸۰
فصل ۹	بافت عصبی	۹۱
فصل ۱۰	بافت عضلانی	۱۰۶
فصل ۱۱	دستگاه گردش خون	۱۱۸
فصل ۱۲	خـون	۱۳۰
فصل ۱۳	خون‌سازی	۱۳۹
فصل ۱۴	دستگاه ایمنی و اندامهای لنفوئید	۱۴۶
فصل ۱۵	دستگاه گوارش	۱۶۵
فصل ۱۶	اندام‌های ضمیمه دستگاه گوارش	۱۸۳
فصل ۱۷	دستگاه تنفس	۱۹۶
فصل ۱۸	پوست	۲۰۸
فصل ۱۹	دستگاه ادراری	۲۲۱
فصل ۲۰	غدد درون‌ریز	۲۳۴
فصل ۲۱	دستگاه تولید مثل مرد	۲۴۷
فصل ۲۲	دستگاه تولید مثل زن	۲۵۸
فصل ۲۳	اندام‌های حسی ویژه (چشم و گوش)	۲۷۵

فصل ۱

بافت‌شناسی و روشهای بررسی در آن

بافت‌شناسی (هیستولوژی)[1] شامل بررسی بافتهای اجزای ساختاری بدن و نحوه آرایش این بافتها به منظور تشکیل اندامها می‌باشد.

بافتها دارای دو بخش عمده هستند که بر روی یکدیگر دارای تأثیر متقابل می‌باشند. این دو بخش شامل **سلولها و ماتریکس خارج سلولی** هستند. امروزه مشخص شده که با وجود آنکه سلولها ماتریکس خارج سلولی را می‌سازند ولی تحت تأثیر ملکولهایی نیز می‌باشند و گاهی بوسیله آنها کنترل می‌گردند. در نتیجه یک بخش متقابل میان سلولها و ماتریکس وجود دارد و بسیاری از اجزای ماتریکس بوسیله گیرنده‌های موجود بر سطح سلولها تشخیص داده می‌شوند. اکثر این گیرنده‌ها ملکولهایی می‌باشند که از غشاهای سلولی گذشته و به اجزای ساختاری سیتوپلاسم داخل سلول متصل می‌گردند.

☑ ***اکثر اندامها از ترکیب بافتهای گوناگون تشکیل شده‌اند به جز بافت عصبی که به شکل انحصاری از سلولهای عصبی ایجاد شده است.***

آماده سازی بافتها جهت بررسی

شایعترین روش بررسی بافتها آماده‌سازی برشهای بافتی یا قطعات بافتی به شکلی است که قابل ارزیابی با میکروسکوپ نوری باشند. بدلیل اینکه اغلب بافتها و اندامها بیش از آن ضخیم می‌باشند که بتوانند نور را از خود عبور دهند می‌بایست ابتدا به منظور تهیه مقاطع نازک و شفاف برش داده شوند و سپس روی لامهای شیشه‌ای قرار گیرند تا بتوانند مورد ارزیابی واقع گردند.

ثابت سازی (فیکساسیون)[2]

در صورتیکه نیاز به یک برش بافتی باشد می‌بایست بافتها ثابت گردند. جهت جلوگیری از تخریب بافت توسط آنزیمهای موجود در داخل سلولها (اتولیز) یا باکتریها و به منظور حفظ ترکیب ساختمانی و ملکولی می‌بایست فوراً و به مقدار کافی قطعاتی از احشاء قبل یا هر چه سریعتر پس از

1- Histology 2- Fixation

بیرون آوردن از بدن موجود زنده تحت اقدامات حفاظتی قرار گیرند. این اقدام حفاظتی که **ثابت سازی** اطلاق می‌گردد ممکن است بوسیله روشهای شیمیایی و در موارد کمتری با روشهای فیزیکی صورت گیرد. در ثابت‌سازی شیمیایی بافتها اغلب در محلولهای واجد مواد ثابت‌کننده تحت عنوان **تثبیت‌کننده**[1] فرو برده می‌شوند.

بافت‌ها قبل از فرایند ثابت‌سازی به قطعات کوچکی بریده می‌شوند تا منجر به تسهیل نفوذ ماده ثابت‌ساز و تضمین حفظ بافت گردد. می‌توان از تزریق مواد تثبیت‌کننده به داخل عروق استفاده نمود.

یکی از بهترین ثابت‌سازها جهت بررسی روزمره با میکروسکوپ نوری **فرمالین** (یک محلول ایزوتونیک بافر شده فرمالدهید ۳۷ درصد) می‌باشد. **فرمالدهید و گلوتارآلدهید** با گروههای آمینی (NH_2) پروتئینهای بافتی واکنش می‌دهند.

☑ ***از آنجا که گلوتارآلدهید یک دی‌آلدهید می‌باشد می‌تواند سبب ایجاد اتصال متقاطع در پروتئینها گردد.***

از آنجا که با افزایش قدرت تمایز در میکروسکوپهای الکترونی گاهی نیاز به حفظ جزئیات بسیار ریز ساختمانی می‌باشد بدین منظور از ثابت‌سازی مضاعف استفاده می‌شود که شامل استفاده از محلول گلوتارآلدهید بافر شده و سپس ثابت‌سازی ثانویه با **تتراکسید اسمیوم بافر شده** می‌باشد.

☑ ***نقش تتراکسید اسمیوم حفظ و رنگ‌آمیزی چربیها و پروتئینها می‌باشد.***

قالب‌گیری و برش‌دهی

جهت تسهیل برش بافتی اغلب بافتها در یک محیط جامد فرو برده می‌شوند **(قالب‌گیری)**. به منظور تهیه برشهای نازک با میکروتوم، بافتها پس از ثابت‌سازی می‌بایست تحت ارتشاح مواد سفت‌کننده (که سبب ایجاد قوام سفت در بافت می‌شوند) قرار گیرند. این مواد شامل **پارافین و رزینهای پلاستیکی** هستند.

☑ ***پارافینها معمولاً جهت میکروسکوپ نوری استفاده می‌شوند و رزین‌ها به منظور بررسی با میکروسکوپ نوری و الکترونی هر دو بکار می‌روند.***

پیش از روند قالب‌گیری یا تلقیح بافتی، اغلب دو مرحله اصلی وجود دارد: **آب‌گیری (دهیدراسیون)**[2] **و پاکسازی**[3]. ابتدا آب قطعات بافتی که می‌بایست قالب‌گیری شوند از طریق شستشوی متوالی در یک سری مدرج از مخلوطهای اتانول با آب (اغلب اتانول ۱۰۰–۷۰ درصد) خارج می‌شود (آب‌گیری). سپس یک حلال قابل حل با هم الکل و هم محیط سفت‌کننده جایگزین اتانول می‌گردد. زمانی که حلال در بافتها ارتشاح پیدا می‌کند اغلب بافتها شفاف می‌گردند (پاکسازی). هنگامی که بافت توسط حلال اشباع گردید داخل پارافین ذوب شده در اجاق (اغلب دمای ۶۰–۵۲°C) قرار داده می‌شود. گرما منجر به تبخیر حلال می‌گردد و پارافین فضای داخل بافتها را پر می‌نماید. بافتهایی که با رزین پلاستیکی سفت می‌گردند نیز در اتانول آب‌گیری شده سپس با حلالهای پلاستیکی ارتشاح می‌یابند.

اتانول یا حلالها سپس توسط محلولهای پلاستیکی جایگزین می‌شوند. از آنجا که در دماهای بالای مورد نیاز جهت قالب‌گیری در پارافین چین‌خوردگی بافت رخ می‌دهد قالب‌گیری در پلاستیک مانع از بروز این امر می‌شود.

قالب‌های سخت حاوی بافتها سپس در وسیله‌ای به نام **میکروتوم** قرار می‌گیرند و توسط تیغه شیشه‌ای یا فولادی آن بریده می‌شوند.

یک روش دیگر به منظور تهیه برشهای بافتی قرار دادن بافت در معرض **انجماد سریع** می‌باشد. در این روش بافتها بواسطه انجماد (فیزیکی، نه شیمیایی) تثبیت شده و همچنین سخت و آماده برش می‌گردند. سپس یک میکروتوم انجمادی **(کرایوستات)**[4] جهت برش بافتهای بدن بکار می‌رود. این روش اغلب در بیمارستانها به منظور ارزیابی نمونه در طول اقدامات جراحی استفاده می‌شود. منجمد نمودن بافتها همچنین در ارزیابی بافتی ـ شیمیایی

1- Fixatives
2- Dehydration
3- Clearing
4- Cryostat

آنزیمهای بسیار حساس یا ملکولهای کوچک مفید می‌باشد چرا که انجماد (برعکس ثابت سازی) اکثر آنزیمها را غیر فعال نمی‌سازد.

☑ ***بدلیل آنکه فرو بردن بافتها در حلالهایی نظیر گزیلن سبب حل شدن چربیهای سلولی موجود در بافتهای ثابت شده می‌گردد در نتیجه موقع ارزیابی ساختارهای حاوی چربی نیز از برش منجمد استفاده می‌شود.***

رنگ‌آمیزی

به منظور بررسی میکروسکوپی بافتها می‌بایست رنگ‌آمیزی گردند یا تحت تلقیح رنگیزه[1] قرار گیرند چرا که اکثر بافتها بی‌رنگ می‌باشند. اغلب رنگهای مصرفی مشابه ترکیبات اسیدی یا بازی رفتار می‌نمایند و تمایل دارند که با رادیکالهای یونیزه شده بافتها پیوندهای الکتروستاتیک برقرار نمایند. اجزای بافتی با **بار منفی** خالص **(آنیونی)** با رنگهای بازی ساده‌تر رنگ می‌گیرند و **بازوفیل** اطلاق می‌گردند. اجزای کاتیونی (نظیر پروتئین‌های واجد تعداد زیادی گروههای آمینی یونیزه) تمایل به رنگهای اسیدی داشته و **اسیدوفیل** اطلاق می‌گردند.

☑ ***نمونه رنگهای بازی عبارتند از: آبی تولوئیدین[2]، آبی آلشین[3]، آبی متیلن[4] و هماتوکسیلین[5].***

☑ ***نمونه رنگدانه‌های اسیدی عبارتند از: نارجی جی[6]، ائوزین[7]، فوشین اسیدی[8].***

☑ ***با رنگدانه‌های اسیدی اجزاء اسیدوفیل سلول مثل میتوکندری، گرانولهای ترشحی و کلاژن رنگ می‌گیرند.***

☑ ***علت رنگ گرفتن اجزای اصلی بافتها با رنگهای بازی وجود ساختارهای اسیدی مانند نوکلئوپروتئین‌ها و گلیکوز آمینوگلیکانها می‌باشد.***

در بین همه رنگها ترکیب ساده **هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)** بیشتر از همه استفاده می‌شود. هماتوکسیلین DNA **هسته سلول و ساختارهای اسیدی دیگر** (مانند قسمتهای مملو از RNA سیتوپلاسم و ماتریکس غضروف) را آبی‌رنگ می‌سازد. در عوض ائوزین اجزای دیگر سیتوپلاسم و کلاژن را صورتی‌رنگ می‌نماید.

تری‌کرومها (مثلاً **رنگ مالوری**[9]، **رنگ ماسون**[10]) به جز اینکه هسته و سیتوپلاسم را به شکل مطلوبی نشان می‌دهند اجزای بافتی خارج سلولی را بهتر از H&E مشخص می‌سازند. یک روش مطلوب جهت تشخیص کلاژن استفاده از **پیکروسیریوس**[11] می‌باشد بخصوص زمانی که با نور پلاریزه باشد.

توسط **واکنش فولگن** می‌توان شکل اختصاصی DNA را در هسته تشخیص داد و مقدار آن را اندازه‌گیری نمود. در این واکنش قندهای دزوکسی ریبوز بوسیله اسید هیدروکلریک ضعیف هیدرولیز می‌گردند و سپس پرداخت با معرف **پریودیک اسیدوشیف (PAS)** صورت می‌گیرد که سبب ایجاد رنگ ارغوانی یا قرمز در قندها می‌شود.

بسیاری از پلی‌ساکاریدها به علت محتوای قند هگزوز خود می‌توانند با واکنش PAS مشخص شوند.

یک پلی‌ساکارید آزاد رایج در سلولهای جانوری **گلیکوژن** می‌باشد که می‌توان آنرا با PAS در **کبد، عضله مخطط** و سایر بافتهایی که در آن تجمع پیدا می‌کند مشخص نمود.

اکثر **گلیکوپروتئین‌ها** PAS مثبت می‌باشند. **گلیکوز آمینوگلیکانها (GAGها)** و گلیکوپروتئین‌های اسیدی وارد واکنش PAS نمی‌گردند ولی به علت محتوای بالای گروههای آنیونی **کربوکسیل و سولفات** یک برهم کنش الکتروستاتیک قوی با **آبی آلشین** و رنگهای بازی دیگر از خود نشان می‌دهند.

ماده بازوفیل یا PAS مثبت را می‌توان بواسطه هضم آنزیمی مقدماتی یک برش بافتی با آنزیمی که به شکل

1- Dye
2- Toluidine blue
3- Alcian blue
4- Methylene blue
5- Hematoxilin
6- Orange G
7- Eosin
8- Acid fushin
9- Mallory
10- Masson
11- Picrosirius

اختصاصی یک سوبسترا را هضم می‌نماید ولی بر برش‌های مجاور فاقد تأثیر است بیشتر مشخص نمود. مثلاً **ریبونوکلئاز بازوفیلی** سیتوپلاسم را به مقدار زیادی کاهش می‌دهد ولی بر کروموزومها اثر کمی دارد.

همچنین پلی‌ساکاریدهای آزاد توسط **آمیلاز** هضم می‌گردند و در نتیجه از این آنزیم می‌توان به منظور تشخیص گلیکوژن از گلیکوپروتئین‌ها در ماده PAS مثبت استفاده نمود.

بهترین روش مشخص‌سازی ساختارهای غنی از چربی استفاده از **رنگیزه‌های محلول در چربی** می‌باشد که سبب رفع نیاز به مراحل آماده‌سازی از بین برندهٔ چربی (نظیر **پرداخت با حرارت، گزیلن یا پارافین**) می‌شود. نمونه رنگیزه‌های چربی‌دوست **سیاه سودان** می‌باشد که جهت رنگ‌آمیزی برشهای منجمد استفاده می‌شود.

☑ ***کل روند آماده‌سازی بافت از ثابت سازی تا مشاهده زیر میکروسکوپ نوری ممکن است از ۱۲ ساعت تا ۲/۵ روز به طول انجامد.***

آخرین مرحله قبل از مشاهده گستره بافتی قرار دادن یک پوشش شیشه‌ای محافظ روی لام توسط مواد چسباننده می‌باشد.

بررسی با میکروسکوپ نوری

میکروسکوپ زمینه روشن

میکروسکوپ با زمینه روشن[1] شامل اجزای مکانیکی و نوری می‌باشد. اجزای نوری شامل ۳ سیستم از عدسیها می‌باشند: **عدسی متراکم‌کننده**[2]، **عدسی شیئی**[3] **و عدسی چشمی**[4] **(قطعه چشمی).**

کندانسور نور را مجتمع و متمرکز نموده و سبب ایجاد مخروطی از نور می‌شود تا شیء مورد مشاهده را روشن نماید. **عدسی شیئی** تصویر نورپردازی‌شده جسم را بزرگ می‌نماید و آنرا در جهت قطعه چشمی می‌اندازد. **قطعه چشمی یا عدسی چشمی** تصویر را بازهم بزرگتر می‌کند و آن را روی شبکیه فرد مشاهده‌کننده، دوربین یا فیلم عکاسی متمرکز می‌نماید.

عامل عمده در ایجاد یک تصویر ظریف و دقیق با میکروسکوپ نوری **قدرت تمایز**[5] می‌باشد که شامل کوچکترین فاصله میان ۲ شیئی کوچک که در آن فاصله به شکل اشیای مجزا قابل مشاهده هستند، می‌باشد. بالاترین قدرت تمایز میکروسکوپ نوری حدود ۰/۲ میکرومتر می‌باشد (بزرگ کردن تصویر تا حدود ۱۵۰۰۰–۱۰۰۰ برابر).

☑ ***اجزای کوچکتر یا نازکتر از ۰/۲ میکرومتر (نظیر ریبوزوم، یک غشاء یا یک فیلامان اکتین) با این میکروسکوپ مشاهده نمی‌شوند.***

بزرگنمایی تنها زمانی که همراه با قدرت تمایز بالا باشد مفید است. قدرت تمایز یک میکروسکوپ بستگی به **کیفیت عدسی شیئی** دارد.

☑ ***عدسی چشمی تنها تصویر حاصل از عدسی شیئی را بزرگ می‌نماید و بر قدرت تمایز اثر ندارد (در نتیجه در مقایسه عدسی‌های شیئی با بزرگنمایی‌های متفاوت، مواردی که بزرگنمایی بیشتری دارند قدرت تمایز بالاتری دارند).***

میکروسکوپ فلوئورسان

در روش بررسی با **میکروسکوپ فلوئورسان** برش بافتی اغلب تحت تابش نور فرابنفش (UV) قرار می‌گیرد به شکلی که نور ساطع شده در قسمت قابل مشاهده طیف نوری واقع می‌شود. مواد فلوئورسان به شکل درخشش در یک زمینه تاریک دیده می‌شوند.

از ترکیبات فلوئورسان با تمایل به ماکروملکولهای سلول به عنوان رنگهای فلوئورسان استفاده می‌شود. **نارنجی آکریدین** که می‌تواند با DNA و RNA ترکیب گردد یک نمونه از این ترکیبات می‌باشد. ترکیبات دیگر نظیر رنگ

1- Bright-field microscope
2- Condenser
3- Objective
4- Eye peice
5- Resolution

Hoechst و **DAPI** که بطور اختصاصی به DNA متصل می‌گردند، به منظور رنگ‌آمیزی هسته استفاده می‌شوند و در زیر پرتو UV فلوئورسانس آبی مشخصی ساطع می‌کنند.

آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با ترکیبات فلوئورسان در رنگ‌آمیزی به روش ایمونوهیستولوژیک بسیار مهم می‌باشد.

میکروسکوپ فازکنتراست و میکروسکوپ با تداخل افتراقی

نمونه‌های بافتی رنگ نشده اغلب شفاف می‌باشند و از آنجا که تمامی بخشهای نمونه تقریباً واجد یک چگالی نوری هستند رؤیت جزئیات آنها دشوار می‌باشد. اما در ارزیابی با **میکروسکوپ فاز کنتراست** سیستم عدسی بکار می‌رود که از اشیای شفاف تصاویر قابل مشاهده می‌سازد. در نتیجه نیاز به ثابت‌سازی و رنگ‌آمیزی نمی‌باشد.

اساس کار بررسی با میکروسکوپ فاز کنتراست بر این اصل استوار می‌باشد که سرعت نور موقع عبور از ساختارهای سلولی و خارج سلولی با ضرایب انکساری گوناگون متفاوت است. یک روش دیگر مشاهده سلولها یا برشهای بافتی رنگ‌آمیزی نشده شامل **مطالعه با میکروسکوپ با تداخل افتراقی نومارسکی**[1] می‌باشد که تصاویری فراهم می‌سازد که خصوصیات سه‌بعدی آن بارزتر از روش رایج و معمول بررسی با میکرسکوپ فاز کنتراست می‌باشد.

میکروسکوپ هم‌کانون

در میکروسکوپ زمینه روشن رایج معمولی اغلب پرتو نور نسبتاً بزرگ بوده و کل نمونه را فرا می‌گیرد. نور پراکنده سبب کاهش وضوح داخل تصویر شده و قدرت تمایز عدسی شیئی را محدود می‌سازد. میکروسکوپ هم‌کانون به روشهای زیر مانع از پراکندگی نور شده و قدرت تمایز بیشتری را فراهم می‌نماید:

(۱) یک نقطه کوچک از نور با شدت بالا که بوسیله یک لیزر تأمین می‌گردد.

(۲) یک صفحه با سوراخ سر سوزنی ریزی در جلوی آشکارساز تصویر

میکروسکوپ با نور پولاریزه

میکروسکوپ با نور پولاریزه امکان تشخیص ساختارهای تشکیل شده از ملکولهای کاملاً سازمان‌یافته را فراهم می‌سازد. توانایی چرخاندن جهت ارتعاش نور پولاریزه، **انکسار مضاعف** اطلاق می‌گردد و یکی از خصوصیات مواد بلوری یا مواد واجد ملکولهای شدیداً جهت‌دار (مثلاً **سلولز، کلاژن، میکروتوبولها و میکروفیلامانها**) می‌باشد.

بررسی با میکروسکوپ الکترونی

میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM)

TEM یک سامانه تصویرساز می‌باشد که قدرت تمایز آن حدود **۳ نانومتر** است. این قدرت تمایز امکان مشاهده جزئیات تصویر با بزرگنمایی **۴۰۰ هزار برابر** را فراهم می‌نماید. جزئیات برشهای بافتی بسیار نازک را می‌توان با بزرگنمایی حدود **۱۲۰ هزار** مشاهده نمود.

TEM نیازمند برشهای بسیار نازک می‌باشد در نتیجه قالب‌گیری در یک اپوکسی سخت انجام می‌شود و برش‌دهی بوسیله یک چاقو با تیغه شیشه‌ای یا الماس صورت می‌گیرد.

اساس عملکرد TEM بر این اصل استوار است که پرتوی از الکترونها (مشابه انحراف در نور در عدسیهای شیشه‌ای) می‌توانند توسط میدانهای الکترومغناطیسی منحرف گردد.

میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM)

SEM نماهای سه‌بعدی کاذبی در سطوح سلولها، بافتها و اندامها فراهم می‌سازد. این میکروسکوپ نیز مشابه

1- Nomarski