بافت‌شناسی پایه

جان کوئیرا

ویرایش پانزدهم (۲۰۱۸)

تألیف

آنتونی ال. مشر

مترجمان

دکتر غلامرضا حسن‌زاده
استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر سیمین فاضلی‌پور
استاد دانشگاه آزاد اسلامی

دکتر رستم قربانی
دانشیار دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

دکتر سید محمدحسین نوری موگهی
استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر مظفر خزاعی
استاد دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

دکتر عباس پیریایی
دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دکتر جعفر گلعلی‌پور
استاد دانشگاه علوم پزشکی گلستان

دکتر محمود اوراضی‌زاده
استاد دانشگاه علوم پزشکی اهواز

دکتر طاهره طلایی
استاد دانشگاه علوم پزشکی شیراز

دکتر ملیحه‌الزمان منصفی
استاد دانشگاه شیراز

دکتر محمد بیات
استادیار دانشگاه علوم پزشکی اراک

دکتر طیبه رستگار
استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر فرشته مهرآیین
دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران

دکتر فاطمه ملک
استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر نسرین تک‌زارع
استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

دکتر تهمینه مختاری
استادیار دانشگاه علوم پزشکی سمنان

مرتضی غلامی‌نژاد
دانشجوی دکترای علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تهران

مهداد عبدی
دانشجوی دکترای علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تهران

انتشارات ابن‌سینا

سرشناسه: مشر، آنتونی ال. (Mescher, Anthony L.)
عنوان و نام پدیدآور: بافت‌شناسی پایه جان کوئیرا / [آنتونی ال. مشر]؛ ترجمه غلامرضا حسن‌زاده... [و دیگران].
مشخصات نشر: تهران: انتشارات ابن‌سینا، ۱۳۹۷.
مشخصات ظاهری: ۶۶۸ ص.: مصور (رنگی)، جدول (رنگی)، نمودار (رنگی).
شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۸۸۷۴-۶۱-۴
عنوان اصلی: Junqueira's basic histology: text and atlas, 15th ed, 2018.
یادداشت: مترجمان غلامرضا حسن‌زاده، سیمین فاضلی‌پور، رستم قربانی، مظفر خزاعی، سیدمحمدحسین نوری موگهی، عباس پیریایی... .
یادداشت: در ویراست‌های قبلی لوئیز کارلوس اکوا جان کوئیرا مؤلف بوده است.
یادداشت: واژه‌نامه.
عنوان دیگر: بافت‌شناسی پایه.
موضوع: بافت‌شناسی (Histology).
شناسه افزوده: حسن‌زاده، غلامرضا، ۱۳۴۴- ، مترجم
شناسه افزوده: جان کوئیرا، لوئیز کارلوس اکوا، ۱۹۲۰- م.
رده‌بندی کنگره: QL۸۰۷/ج۲ب۲۸ ۱۳۹۷
رده‌بندی دیویی: ۶۱۱/۰۱۸
شماره کتابشناسی ملی: ۵۳۷۲۷۵۲

انتشارات ابن‌سینا

نام کتاب:	بافت‌شناسی پایه جان کوئیرا ۲۰۱۸
تألیف:	آنتونی ال. مشر
مترجمان:	دکتر غلامرضا حسن‌زاده و همکاران
ناشر:	انتشارات ابن‌سینا
نوبت چاپ:	اول، مهر ماه ۱۳۹۷
شمارگان:	۲۰۰۰ جلد
شابک:	۹۷۸-۶۰۰-۸۸۷۴-۶۱-۴
بها:	۸۰۰۰۰ تومان

تمامی حقوق مادی و معنوی این اثر برای انتشارات ابن سینا محفوظ است. لذا هرگونه تکثیر و بازنویسی مطالب به هر نحو ممکن در هر گونه رسانه، کتاب، مجله، جزوه و لوح فشرده بدون اجازه کتبی ناشر **شرعاً حرام** است و موجب **پیگرد قانونی** می‌شود.

به انتشارات ابن‌سینا بپیوندید
https://telegram.me/EntesharatEbneSina

مرکز پخش

دفتر مرکزی و فروشگاه شماره ۱: تهران: خیابان انقلاب، خیابان منیری جاوید (اردیبهشت)، خیابان وحیدنظری غربی، پلاک ۱۵۰، واحد ۵
تلفن: ۶۶۴۱۸۳۱۹، فکس: ۶۶۴۱۸۳۰۹ Email: press.ebnesina@gmail.com سایت: www.ebnesinapress.com
فروشگاه شماره ۲: اهواز: بلوار گلستان، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، کتابفروشی دانشگاه، انتشارات ابن‌سینا تلفن: ۰۶۱۳۳۷۳۳۸۲۶۷

نمایندگی‌های فروش

مشهد: انتشارات مجد دانش تلفن: ۰۵۱-۳۸۴۴۱۰۱۶
کرمانشاه: جهان کتاب تلفن: ۰۸۳-۳۷۲۸۴۸۳۷-۸
تبریز: کتابفروشی بابک تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۴۰۹۸۳
کرمانشاه: اندیشه تلفن: ۰۸۳-۳۷۲۷۱۱۱۳
ساری: کتب پزشکی ارجمند تلفن: ۰۹۱۱-۸۰۲۰۰۹۰
بابل: کتابفروشی ارجمند تلفن: ۰۹۱۱-۸۰۲۰۰۹۰
تبریز: کتابفروشی بسیج دانشجویی تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۴۶۶۱۰
ارومیه: شهر کتابفروشی پزشکی تلفن: ۰۴۴-۳۲۲۵۲۸۷۹
اصفهان: کتابفروشی کیا تلفن: ۰۳۱-۳۶۶۹۹۱۱۲
قزوین: کتابفروشی ابن‌سینا تلفن: ۰۹۱۰۹۵۸۲۶۶۱
شیراز: بازار کتاب شیراز تلفن: ۰۷۱-۳۲۳۳۳۶۴۶
مشهد: فرا انگیزش تلفن: ۰۵۱-۳۲۲۴۰۷۶۸

مقدمه

به نام آفریدگار جان و خرد

سپاس مخصوص پروردگاری که در کمال زیبایی و هنر انسان را خلق کرد و به ما بندگان هنر آشنایی با جان و کالبد انسان را آموخت. شناخت کالبد انسان و درک چگونگی عملکرد دستگاه‌های مختلف بدن و بررسی فراساختاری اجزای آن علاوه بر افزایش دانش پزشکی باعث می‌شود تا انسان پی به عظمت خالق یکتا برده و از خودشناسی به خداشناسی برسد. در سایه لطف خداوند ترجمه آخرین ویرایش کتاب بافت‌شناسی پایه جان کوئیرا که از رفرنس‌های اصلی در علوم پزشکی بوده و منبع تدریس و آزمون‌های دانشگاه‌های و علوم پایه می‌باشد، انجام گرفت. بر رهروان علوم مختلف پزشکی لازم است که علاوه بر آموختن ساختار بدن از دیدگاه ماکروسکوپی، ساختار قابل تأمل و شگفت‌انگیز میکروسکوپی بافت‌های مختلف بدن را نیز بیاموزند تا درک بهتری از عملکرد و ویژگی‌های بافتی دستگاه‌های مختلف بدن پیدا کنند. مطالعه کتاب بافت‌شناسی جان کوئیرا تا حد زیاد و قابل قبولی نیاز بافت‌شناختی دانشجویان عزیز را برطرف می‌نماید. در پایان لازم است از همکاران محترم انتشارات ابن‌سینا که در چاپ این کتاب ما را یاری نمودند و دقت کافی را مبذول داشتند صمیمانه تشکر کنم. از همکاران گرامی خواهشمندم نظرات و پیشنهادات خود را از ما دریغ نفرمایند.

دکتر غلامرضا حسن‌زاده

استاد آناتومی دانشگاه علوم پزشکی تهران

فهرست مطالب

فصل ۱. بافت‌شناسی و روش‌های مطالعه آن ۹
فصل ۲. سیتوپلاسم ۳۱
فصل ۳. هسته ۷۷
فصل ۴. بافت پوششی ۹۹
فصل ۵. بافت همبند ۱۳۱
فصل ۶. بافت چربی ۱۶۳
فصل ۷. غضروف ۱۷۳
فصل ۸. استخوان ۱۸۵
فصل ۹. بافت عصبی و دستگاه عصبی ۲۱۵
فصل ۱۰. بافت عضلانی ۲۵۳
فصل ۱۱. دستگاه گردش خون ۲۸۱
فصل ۱۲. خون ۳۰۹
فصل ۱۳. خون‌سازی ۳۲۹
فصل ۱۴. سیستم ایمنی و ارگان‌های لنفاوی ۳۴۵
فصل ۱۵. لوله گوارش ۳۸۱
فصل ۱۶. اعضاء ضمیمه لوله گوارش ۴۲۱
فصل ۱۷. دستگاه تنفس ۴۴۵
فصل ۱۸. پوست ۴۷۱
فصل ۱۹. دستگاه ادراری ۴۹۷
فصل ۲۰. غدد درون‌ریز ۵۲۱
فصل ۲۱. دستگاه تولیدمثل مرد ۵۵۳
فصل ۲۲. دستگاه تولیدمثل زن ۵۷۹
فصل ۲۳. چشم و گوش: اندام‌های حسی اختصاصی ۶۱۵
ضمیمه: رنگ‌آمیزی میکروسکوپ نوری ۶۵۷
نمایه ۶۵۹

فصل ۱

بافت‌شناسی و روش‌های مطالعه آن

Histology & Its Methods of Study

آماده‌سازی بافت‌ها برای مطالعه
ثابت‌سازی
قالب‌گیری و مقطع‌گیری
رنگ‌آمیزی
میکروسکوپ نوری
میکروسکوپ زمینه روشن
میکروسکوپ فلورسنت
میکروسکوپ فاز کنتراست
میکروسکوپ هم‌کانون
میکروسکوپ پلاریزه
میکروسکوپ الکترونی
میکروسکوپ الکترونی عبور
میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ
اتورادیوگرافی
کشت سلول و بافت
هیستوشیمی آنزیم
روش‌های شناسایی با استفاده از تأثیر متقابل بین مولکول‌ها
ایمونوهیستوشیمی
تکنیک‌های هیبریدیزاسیون
مشکلات در مطالعه مقاطع بافتی
خلاصه‌ای از نکات کلیدی
ارزیابی دانش خود

بافت‌شناسی علم مطالعه بافت‌های بدن و نحوه آرایش و قرارگیری آنها در کنار هم برای تشکیل اعضاء می‌باشد. بافت‌شناسی همه جنبه‌های بیولوژی بافتی را شامل می‌شود با تمرکز بر این که چگونه ساختار و آرایش سلول‌ها عملکردهای مخصوصی را برای هر عضو ایجاد می‌کند.

بافت‌ها دو جزء تعاملی دارند: سلول‌ها و ماتریکس خارج‌سلولی (ECM). ماتریکس خارج‌سلولی (ECM) شامل انواع زیادی از ماکرومولکول‌ها است که بسیاری از آنها ساختارهای پیچیده‌ای نظیر فیبریل‌های کلاژن را تشکیل می‌دهند. ماتریکس خارج‌سلولی از سلول‌ها پشتیبانی می‌کند و حاوی مایعی است که مواد مغذی را به سلول‌ها انتقال می‌دهند، و مواد دفعی و ترشحی آنها را برمی‌دارد. سلول‌ها اجزای ماتریکس خارج‌سلولی را تولید می‌کنند، و همچنین تحت‌تأثیر آنها نیز قرار می‌گیرند. بسیاری از اجزای ماتریکس به گیرنده‌های اختصاصی سطح سلول اتصال می‌یابند که این گیرنده‌ها در کل ضخامت غشاء قرار دارند و به اجزای [illegible] سلول‌ها متصل می‌شوند.

بنابراین سلول‌ها و ماتریکس خارج‌سلولی مجموعه‌ای تشکیل می‌دهند که به‌صورت هماهنگ با یکدیگر کار می‌کنند.

در جریان تکامل، سلول‌ها و ماتریکس اطراف آنها از لحاظ عملکرد تخصص یافته می‌شوند و بافت‌های اصلی با ویژگی‌های ساختاری مختص آنها را ایجاد می‌کنند. ارگان‌ها از ترکیب منسجم چندین بافت تشکیل شده‌اند، ترکیب دقیق این بافت‌ها عملکرد هر عضو و یک موجودزنده را به‌طور کلی تأمین می‌کنند.

اندازه کوچک سلول‌ها و اجزاء ماتریکس موجب شده است که علم بافت‌شناسی وابسته به استفاده از میکروسکوپ و مطالعه با روش‌های مولکولی باشد. پیشرفت در بیوشیمی، بیولوژی مولکولی، فیزیولوژی، ایمنی‌شناسی و آسیب‌شناسی برای درک بهتر بیولوژی بافتی ضروری است. آشنایی با این ابزارها و روش‌های مطالعه هر شاخه از علم، برای درک صحیح آن علم ضروری است. این فصل برخی از روش‌های متداول برای مطالعه سلول‌ها و

بـافت‌ها را مـرور مـی‌کند و تـمرکز آن بـر روی کـاربرد میکروسکوپ می‌باشد.

آماده‌سازی بافت‌ها برای مطالعه

متداول‌ترین روش مطالعه بافت‌ها، آماده‌سازی مقاطع بافتی به نحوی است که قـابل مـطالعه بـا مـیکروسکوپ نـوری باشند. در زیـر مـیکروسکوپ نـوری، بـافت‌ها بـه وسـیله پرتویی که از درون بافت عبور داده می‌شود، مورد بررسی قرار می‌گیرند. از آنجا که معمولاً اندام‌هـا و بـافت‌ها آنـقدر ضخیم هستند که نور نمی‌تواند از آن عبور کند، باید برای به دست آوردن مقاطع نازک و شفاف برش داده شوند.

یک آمـاده‌سازی مـیکروسکوپی ایـده‌آل بـاید طـوری نگـه‌داری شـود، کـه روی لام هـمان سـاختمان و تـرکیب مولکولی را که در بدن دارا بوده است، نشان دهد. این کار به ندرت امکان‌پذیر است، زیرا فرآیند آماده‌سازی باعث ازبین رفتن لیپید سلولی و به‌هم‌ریختگی ساختار سلول می‌شود. مراحل اولیه آماده‌سازی بافت برای میکروسکوپ نوری در شکل ۱-۱ نشان داده شده است.

ثابت‌سازی Fixation

برای حفظ ساختار بافت و جلوگیری از تخریب بافت توسط آنزیم‌های رها شده از سلول‌ها و موجودات میکروسکوپی، قطعات مناسب از اعضاء باید بلافاصله بعد از بیرون آوردن از بدن، در محلول‌های ثبوت یا در ترکیباتی که ایجاد اتصال متقاطع مـی‌کنند و فـیکساتیو نـامیده مـی‌شوند، غـوطه‌ور گردند. از آنجا که فیکساتیو باید کاملاً به درون بافت‌ها نفوذ کند، بافت‌ها معمولاً قبل از روند ثـابت‌سازی بـه قـطعات کوچکی بریده می‌شوند تا فیکساتیو به راحتی نفوذ کند و حفظ بافت تضمین شود. برای حفظ سلول‌ها در ارگان‌های بزرگ معمولاً تزریق داخل عروقی فیکساتیو نیز می‌توانـد، مورد استفاده قرار گیرد. در این حـالت مـاده فـیکساتیو بـه سرعت از طریق عروق خونی به بافت‌ها می‌رسد.

یکـــی از بـهترین فـیکساتیوها بـرای مـطالعه بـا مـیکروسکوپ نـوری فـرمالین است کـه یک مـحلول ایزوتونیک بافرشده فرمالدئید ۳۷٪ است. هر دو فیکساتیو فرمالدئید و گلوتارآلدئید (فیکساتیو دیگری که غـالباً بـرای مطالعه میکروسکوپ الکترونی کاربرد دارد)، با گـروه‌های آمینی (NH_2) پروتئین‌های بافتی واکنش نشان می‌دهند و از تجزیه آنها توسط پروتئازها جلوگیری می‌کنند. با توجه بـه اینکه گلوتارآلدئید می‌تواند در پـروتئین‌ها اتـصال مـتقاطع ایجاد نـماید، سـاختار سـلول‌ها و ECM بـه‌خوبی حـفظ می‌شود.

بـا تـوجه بـه قـدرت تـفکیک (resolution) زیـاد میکروسکوپ الکترونی، برای حـفظ جـزئیات بسـیار ریـز فـــراســـاختاری (ulrastructure) دقت بـــیشتری در فیکساسیون لازم است. به این منظور، بافت فیکس شده با گلوتارآلدئید در تتراکسید اسمیوم بافر شده، غوطه‌ور شده و تتراکسید اسمیوم سبب حفظ (و رنگ‌آمـیزی) چـربی‌ها و پروتئین‌های سلولی می‌شود.

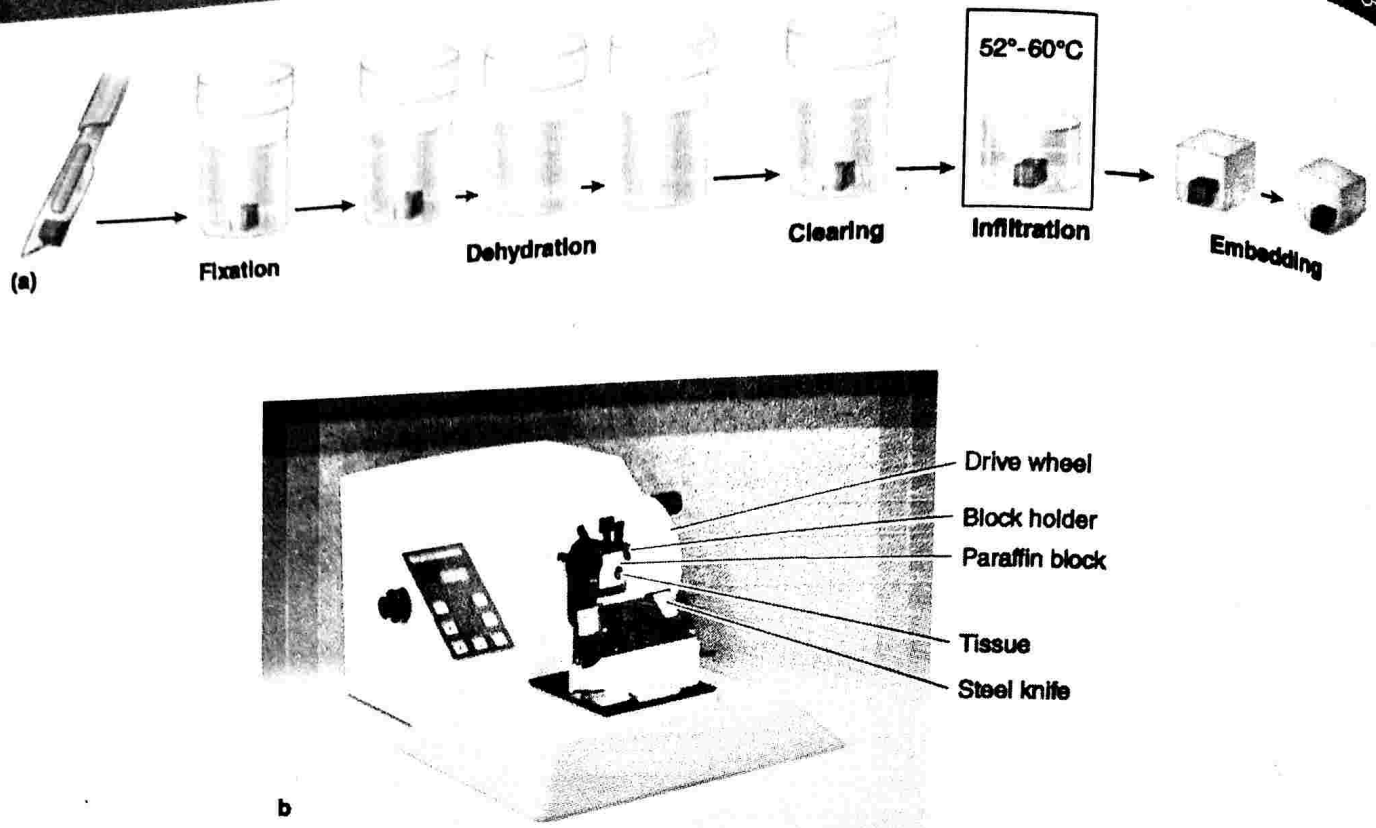
قالب‌گیری و مقطع‌گیری Embedding & Sectioning

جهت تهیه مقاطع نازک، بافت‌ها بایستی پس از ثابت‌سازی، تحت نفوذ (infiltration) با مواد قالب‌گیری قرار گـیرند تـا قوام سخت پیدا کنند. مواد قالب‌گیری، پارافین و رزین‌های پـلاستیکی هسـتند. پـارافـین بـه طـور مـعمول بـرای میکروسکوپ نوری به کار می‌رود و رزین‌ها در مطالعات با میکروسکوپ نوری و الکترونی کاربرد دارند.

قبل از نفوذ مواد قالب‌گیری، بافت فـیکس شـده بـاید تحت آب‌گیری (dehydration) قرار گیرد. در آب‌گیری، آب از قـطعات فـیکس‌شده بـا شسـتشوی پـی‌درپی آنـها در محلول‌های افزایشی اتـانول (تـا ۱۰۰٪) خـارج مـی‌گردد. سپس یک حلال با قابلیت مخلوط شدن بـا الکـل و مـاده قـالب‌گیری، جـایگزین اتـانول مـی‌شود. بـه ایـن فـرآیـند شفاف‌سازی می‌گویند. زیرا نفوذ با معرف‌های مورد استفاده در اینجا ظاهری شفاف به بافت می‌بخشد.

بافت کاملاً شفاف شده سپس در درون پارافین مایع در داخل اُون با دمای ۶۰°C-۵۲ قـرار مـی‌گیرد. گـرما سـبب تبخیر حلال می‌شود و فضای داخل بافت‌ها توسط پارافین مایع پر می‌شود. بافت همراه با پارافین موجود در آن پس از خروج از اُون در دمای اتاق سفت می‌شود. بافت‌هایی که با رزین پلاستیکی قالب‌گیری می‌شوند نیز در اتانول آب‌گیری شـده و بـا حـلال‌های پـلاستیکی کـه بـا اضـافه شـدن پلی‌مرازهای با پیوندهای متقاطع سخت مـی‌شوند، تـحت نفوذ (infiltration) قرار می‌گیرند. قالب‌گیری با پلاستیک از چروکیدگی و به‌هم‌ریختگی بافت، که درنتیجه حرارت زیاد لازم برای قالب‌گیری با پارافین استفاده می‌شود، جـلوگیری می‌کند.

شکل ۱-۱ مقطع‌گیری بافت‌های تثبیت شده و قالب‌گیری شده.



بیشتر بافت‌های مورد مطالعه برای بافت‌شناسی همان‌طور که در شکل نشان داده شده است به ترتیب این مراحل آماده‌سازی می‌شوند (a):

- **فیکس کردن (Fixation):** قطعات کوچک بافت را در محلول مواد شیمیایی قرار می‌دهیم که موجب اتصال متقاطع پروتئین‌ها، غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها و حفظ ساختار سلول و بافت می‌شود.
- **آبگیری (Dehydration):** بافت از محلول‌هایی عبور داده می‌شود که غلظت الکل آنها افزایش یافته تا به الکل ۱۰۰٪ می‌رسد و بدین‌ترتیب کل آب موجود در بافت خارج می‌شود.
- **شفاف‌سازی (Clearing):** الکل در حلال‌های آلی که در آنها الکل و پارافین حل می‌شوند، حذف می‌شود.
- **نفوذ (Infiltration):** بافت در درون پارافین مذاب قرار داده می‌شود؛ تا به‌طور کامل با پارافین آغشته شود.
- **قالب‌گیری (Embedding):** بافت آغشته به پارافین در قالب‌های کوچک که حاوی پارافین مذاب می‌باشد قرار می‌گیرد تا قوام بافت بهتر شود.
- **پیرایش (Trimming):** سپس بلوک‌های پارافین را تریم می‌کنیم تا آماده برش‌گیری با میکروتوم شوند.

قالب‌های سخت حاوی بافت و پارافین اطراف آن برای مقطع‌گیری در دستگاهی قرار می‌گیرد که میکروتوم نامیده می‌شود (شکل ۱-۱). به طور معمول برای مطالعه با میکروسکوپ نوری بافت به قطعاتی با ضخامت ۳ تا ۱۰ میکرومتر بریده می‌شود. درحالی که برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی مقاطعی با ضخامت کمتر از ۱μm ایجاد می‌شود. یک میکرومتر برابر با ۰/۰۰۱ میلی‌متر و ۱۰-۶ متر است. یک نانومتر برابر با ۰/۰۰۱ میکرومتر،

مراحل مشابه نیز برای TEM استفاده می‌شود با این تفاوت که مواد فیکساتیو و آب‌گیری مورد استفاده اختصاصی‌تر و نمونه بافتی کوچکتر بوده و برای قالب‌گیری از اپوکسی رزین استفاده می‌شود که قوام بسیار محکم‌تری نسبت به پارافین به بافت می‌دهد و برای برش‌های بسیار نازک مناسب است.

(b) **میکروتوم** برای مقطع‌گیری بافت‌های پارافینه در میکروسکوپ نوری استفاده می‌شود. پس از آنکه بلوک پارافینه Trim شده را روی میکروتوم گذاشتیم، با استفاده از یک وسیله چرخ‌مانند (Drive wheel) بلوک را بالا و پایین می‌بریم. هر بار که این وسیله چرخ‌مانند می‌چرخد، بلوک را بین ۱ تا ۱۰ میکرومتر جلوتر آورده، بافت با لبه تیغ میکروتوم برخورد می‌کند. بدین ترتیب برش‌های بافتی با ضخامتی متناسب با فاصله‌ای که بلوک جلو آمده، تهیه می‌شوند. برش‌های پارافینه سپس روی اسلایدهای شیشه‌ای (لام) چسبانده می‌شود، پارافین آن برداشته شده و برای مطالعه با میکروسکوپ نوری رنگ‌آمیزی می‌شود. مقاطع برای میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) با ضخامت کمتر از ۱ میکرومتر، و با قالب‌گیری با رزین توسط اولترامیکروتوم و با استفاده از یک چاقوی شیشه‌ای یا چاقو الماس گرفته می‌شود.

۶-۱۰ میلی‌متر و ۹-۱۰ متر می‌باشد هر انگستروم ۰/۱ نانومتر (۴-۱۰ میکرون) است. مقاطعی بسیار نازک که تهیه شده‌اند برای رنگ‌آمیزی بر روی لام‌های شیشه‌ای جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری منتقل می‌شوند و یا روی گریدهای فلزی مخصوص برای میکروسکوپ الکترونی جهت رنگ‌آمیزی و مطالعه منتقل می‌گردند.

» کاربرد پزشکی

بیوپسی‌ها نمونه‌های بافتی هستند که هنگام جراحی یا اقدامات پزشکی روتین برداشته می‌شوند. در اتاق عمل، بیوپسی‌ها جهت پردازش‌های بیشتر و آنالیز میکروسکوپی در آزمایشگاه پاتولوژی در محلول فرمالین فیکس می‌شود. چنانچه نتایج این آنالیزها قبل از تکمیل روند جراحی مورد نیاز باشد، برای مثال جهت آگاهی از اینکه قبل از دوختن ناحیه، رشد بدخیمی وجود دارد باید روش پردازش بافتی سریع‌تری مورد استفاده قرار گیرد. نمونهٔ بیوپسی به سرعت در نیتروژن مایع فریز می‌شود، ساختار بافت حفظ شده و همزمان بافت سخت می‌شود و برای مقطع‌گیری آماده می‌گردد. در این روش میکروتومی که **کرایوستات** نامیده می‌شود و در محفظه‌ای که در دمایی زیر فریزکردن قرار دارد، جهت مقطع‌گیری بلوک‌های بافتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. سپس برش‌هایی فریزشده روی لام‌هایی برای رنگ‌آمیزی سریع و مطالعه میکروسکوپی توسط پاتولوژیست مورد استفاده قرار می‌گیرد.

فریز کردن بافت‌ها همچنین در مطالعات هیستوشیمیایی آنزیم‌های بسیار حساس یا مولکول‌های کوچک بسیار مؤثر است. زیرا فریز کردن، برخلاف فیکس، بسیاری از آنزیم‌ها را غیرفعال نمی‌کند. در نهایت به علت اینکه محلول‌های شفاف‌ساز در بافت فیکس شده چربی سلولی را حل می‌کند، برش با فریز برای مطالعه ساختارهایی که دارای چربی هستند، مفید می‌باشد.

رنگ‌آمیزی Staining

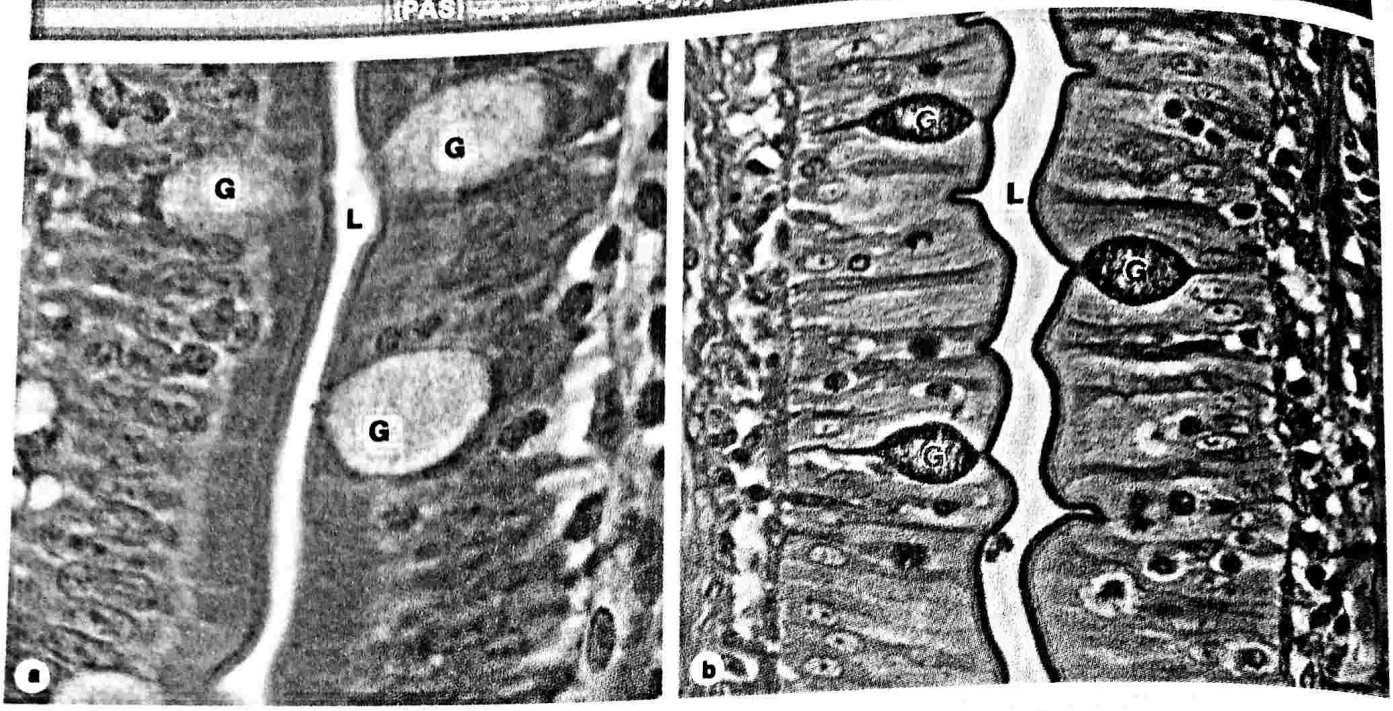
بسیاری از سلول‌ها و مواد خارج سلولی به‌طور کامل فاقد رنگ هستند و بیشتر مقاطع جهت مطالعه میکروسکوپی باید رنگ‌آمیزی شوند. بنابراین، روش‌های رنگ‌آمیزی بافت‌ها ابداع شده‌اند که نه تنها اجزای مختلف بافتی را مرئی می‌کنند، بلکه افتراق این اجزا را نیز میسر می‌نمایند. رنگ‌ها اجزای بافتی را کم‌وبیش به‌طور انتخابی رنگ می‌کنند. اغلب رنگ‌های‌مصرفی مانند ترکیبات اسیدی یا بازی رفتار می‌کنند و تمایل دارند که پیوندهای الکتروستاتیک (نمکی) با رادیکال‌های یونیزه‌شونده ماکرومولکول‌ها در بافت‌ها تشکیل دهند. اجزای سلولی مثل اسیدهای نوکلئیک که دارای بارمنفی (آنیونی) هستند با رنگ‌های قلیایی راحت‌تر رنگ می‌گیرند و بازوفیل (basophilic) نام دارند در حالی که اجزاء کاتیونی مانند پروتئین‌ها که دارای تعداد زیادی گروه‌های آمینی یونیزه می‌باشند تمایل به رنگ‌های اسیدی دارند و اسیدوفیل (acidophilic) نامیده می‌شوند.

تولوئیدین بلو (toluidin blue)، آلسین بلو و متیلن بلو (methylene blue)، مثال‌هایی از رنگ‌های قلیایی هستند. هماتوکسیلین به صورت یک رنگ قلیایی رفتار می‌کند، یعنی اجزای بافتی بازوفیل را رنگ می‌کند. اجزای اصلی بافتی که یونیزه می‌شوند و با رنگ‌های قلیایی واکنش می‌دهند، به دلیل وجود اسیدها در ساختمان آنها چنین واکنشی دارند (RNA، DNA، گلیکوزآمینو گلیکان‌ها). رنگ‌های اسیدی مثل نارنجی جی (orange G)، ائوزین (eosin) و فوشین اسیدی (acid fuchsin)،اجزای اسیدوفیل بافت‌ها مانند میتوکندری، گرانول‌های ترشحی و کلاژن را رنگ می‌کنند.

از میان همه رنگ‌ها، ترکیب هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) کاربرد بیشتری دارد. هماتوکسیلین، رنگ آبی تیره یا بنفش ایجاد می‌کند و DNA در هسته سلول، بخش‌های غنی از RNAی سیتوپلاسم و ماتریکس غضروف را آبی تیره یا بنفش می‌کند. در مقابل، ائوزین سایر ساختارهای سیتوپلاسمی و کلاژن را به رنگ صورتی در می‌آورد (شکل ۲a-۱). در این‌جا ائوزین به‌عنوان پادرنگ (counterstain) در نظر گرفته می‌شود. پادرنگ به رنگی گفته می‌شود که به صورت جداگانه و برای افتراق قسمت‌های دیگر بافت استفاده می‌شود. رنگ‌آمیزی‌های پیچیده‌تر ازجمله رنگ‌های تری‌کروم (برای مثال، تری‌کروم ماسون) اجازه افتراق بیشتری را در بین اجزای خارج‌سلولی بافت می‌دهند.

واکنش پریودیک اسید ـ شیف (PAS) از حلقه‌های هگزوز پلی‌ساکاریدها و دیگر ساختارهای غنی از

شکل ۲-۱. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) و پریودیک اسید-شیف (PAS)



میکروگراف‌های اپی‌تلیوم استوانه‌ای پوشاننده رودهٔ باریک. **(a)** میکروگراف رنگ‌شده با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E). **(b)** میکروگراف‌های رنگ‌شده با پریودیک اسید ـ شیف (PAS) برای گلیکوپروتئین‌ها. در H&E، هسته بازوفیل سلول‌ها به رنگ بنفش و سیتوپلاسم به رنگ صورتی در می‌آید. مناطقی از سلول که دارای اُلیگوساکارید فراوان روی گلیکوپروتئین‌ها هستند مانند انتهای رأسی سلول‌ها در لومن **(L)** یا سلول‌های گابلت ترشح‌کننده موکوس **(G)**، کم‌رنگ دیده می‌شوند. با رنگ‌آمیزی PAS سطح سلول‌ها در لومن روده باریک که حاوی میکروویلی و یک لایه مشخص از گلیکوپروتئین در لومن **(L)** هستند و نیز گرانول‌های سلول‌های گابلت غنی از موسین می‌باشند، با شدت بیشتری رنگ می‌گیرند. گلیکوپروتئین‌های سطح سلول و موسین به دلیل محتوای بالای الیگوساکارید و پلی‌ساکارید (به ترتیب) PAS مثبت هستند، بافت‌هایی که توسط PAS رنگ شده‌اند، توسط هماتوکسیلین نیز رنگ می‌شوند تا هسته سلول‌ها مشخص شود (a. ۴۰۰ ×؛ b. ۳۰۰ ×).

کربوهیدرات بافت استفاده کرده و این ماکرومولکول‌ها را به رنگ بنفش یا قرمز رنگ‌آمیزی می‌کند. شکل ۲b-۱ نمونه‌ای از سلول‌هایی را نشان می‌دهد که دارای مناطق غنی از کربوهیدرات بوده و با PAS رنگ‌آمیزی شده‌اند. DNA هسته سلول‌ها می‌تواند به‌طور اختصاصی توسط روش اصلاح‌شده‌ای از رنگ PAS به نام واکنش فولگن (Feulgen) رنگ‌آمیزی شود.

مواد بازوفیلی یا PAS مثبت را می‌توان با هضم آنزیمی یک مقطع بافتی توسط یک آنزیم خاص که یک سوبسترای خاص را هضم می‌کند، تشخیص داد. برای مثال استفاده از ریبونوکلئاز موجب می‌شود که مقدار بازوفیلی سیتوپلاسم تا حدود زیادی کاهش یابد و یک اثر جزئی نیز روی هسته دارد که نشان‌دهندهٔ اهمیت RNA در رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم می‌باشد.

ساختارهای غنی از چربیِ سلول‌ها، با انجام ندادن مراحل ازبین‌برنده چربی‌ها قابل شناسایی می‌باشند مانند استفاده از گرما، حلال‌های آلی و رنگ‌آمیزی با رنگ‌های محلول در چربی مانند سودان سیاه که می‌تواند در تشخیص بیماری‌های متابولیکی که مرتبط با تجمع کلسترول، فسفولیپید و گلیکولیپید باشند، مفید واقع شود. علاوه بر رنگ‌آمیزی بافت‌ها توسط رنگ، تکنیک‌های تلقیح فلز نیز استفاده می‌شود. به‌طور معمول از نمک‌های نقره برای شناسایی الیاف ماتریکس خارج سلولی و عناصر سلولی ویژه در بافت عصبی استفاده می‌شود. در قسمت ضمیمه، فهرستی از روش‌های رنگ‌آمیزی مهمی آورده شده است که برای بیشتر مطالعات میکروسکوپ نوری در این کتاب مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

کل فرآیند از فیکساسیون تا مشاهدهٔ یک بافت زیر میکروسکوپ نوری، بسته به اندازه بافت، محیط قالب‌گیری، و روش رنگ‌آمیزی می‌تواند ۱۲ ساعت تا ۲/۵

روز طول بکشد. مرحله آخر قبل از مشاهده کردن لام، چسباندن لامل با یک چسب شفاف روی لام می‌باشد.

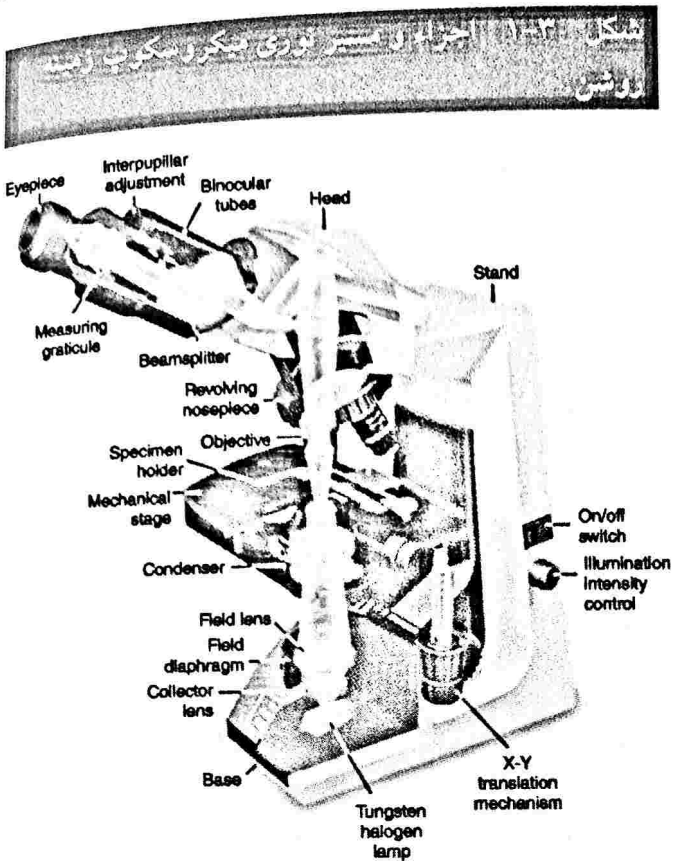
میکروسکوپ نوری
Light microscopy

میکروسکوپ‌های زمینه روشن معمولی و نیز میکروسکوپ‌های تخصصی مانند فلورسنت، فاز کنتراست، پلاریزان و هم‌کانون همگی براساس تعامل بین نور و اجزای بافت کار می‌کنند و می‌توان برای مطالعه بافت از آنها استفاده نمود.

میکروسکوپ زمینه روشن

در میکروسکوپ زمینه روشن نمونه‌های رنگ شده معمولاً براساس میزان نوری که از درون بافت عبور می‌کند، بررسی می‌شوند. همان‌طور که در شکل ۳-۱ نشان داده شده است، میکروسکوپ شامل یک سیستم نوری و مکانیسم‌هایی برای حرکت و متمرکز کردن نمونه می‌باشد. اجزای نوری متشکل از سه سیستم عدسی هستند. متراکم‌کننده، (Condenser) نور را جمع و روی نمونه مورد مطالعه متمرکز می‌کند؛ عدسی شیئی که شیء را بزرگ می‌کند و آن را در امتداد قطعه چشمی قرار می‌دهد؛ قطعه چشمی یا عدسی چشمی تصویر را بزرگ‌تر کرده و آن را بر روی شبکیه فرد مشاهده‌کننده یا بر روی وسیله‌ای که با صفحه‌ای شارژی جفت شده است (CCD) و به شدت به مقادیر بسیار کم نور حساس است و با یک مانیتور و دوربین همراه است، منعکس می‌کند. بزرگنمایی کلی میکروسکوپ نوری با ضرب کردن قدرت بزرگنمایی عدسی‌های شیئی و چشمی در هم، به دست می‌آید.

عامل اساسی در به دست آوردن یک تصویر واضح و دقیق با میکروسکوپ، قدرت تفکیک است که عبارت از کمترین فاصلهٔ بین ۲ شیء کوچک است که در آن فاصله، به صورت اشیای مجزا قابل مشاهده باشند. بالاترین قدرت تفکیک میکروسکوپ نوری تقریباً ۰/۲ میکرومتر است؛ این قدرت تفکیک تصاویر خوبی ایجاد می‌کند که ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ برابر بزرگ شده‌اند. اجزای کوچک‌تر از ۰/۲ میکرومتر (مانند یک ریبوزوم، یا میکروفیلامان سیتوپلاسمی) را نمی‌توان با این ابزار تشخیص داد. به طریق مشابه، دو شیء مانند میتوکندری اگر فاصله‌ای کمتر از ۰/۲ میکرومتر داشته باشند، به صورت یک شیء واحد



تصویر یک میکروسکوپ نوری که اجزاء مکانیکی و مسیر نور از لامپ زیرین به چشم مشاهده‌کننده را نشان می‌دهد. سیستم اپتیکال دارای ۳ جزء عدسی می‌باشد.

- **متراکم‌کننده (Condenser)**، نور را متراکم کرده و مخروطی از نور را متمرکز می‌کند تا بافت روی صفحه را روشن و نورانی می‌گرداند.
- **عدسی شیئی (Objective)** بافت نورانی شده را بزرگ کرده و تصویر آن را به عدسی چشمی منتقل می‌کند. در مطالعات بافت‌شناسی معمول از عدسی شیئی قابل تغییر استفاده می‌شود: ۴ × برای بزرگنمایی کم که منطقه بزرگتری از بافت را نشان می‌دهد. ۱۰ × برای بزرگنمایی متوسط و منطقه محدودتر از بافت و ۴۰ × برای بزرگنمایی بیشتر نواحی با جزئیات بیشتر.
- دو عدد **عدسی چشمی (eyepieces)** یا oculars تصویر را ۱۰ برابر بزرگتر کرده و آن را روی چشم بیننده منعکس می‌کند، بنابراین بزرگنمایی نهایی ۴۰ ×، ۱۰۰ × یا ۴۰۰ × می‌باشد.

دیده می‌شوند. کیفیت تصویر، وضوح و میزان نمایش جزئیات، به قدرت تفکیک میکروسکوپ و قدرت تفکیک به‌طور عمده به کیفیت عدسی شیئی بستگی دارد. بزرگ‌نمایی فقط زمانی با ارزش است که همراه با قدرت تفکیک بالا باشد. عدسی‌های شیئی با بزرگ‌نمایی بالاتر دارای قدرت تفکیک بیشتری نیز هستند. عدسی چشمی

فقط تصویر حاصل از عدسی شیئی را بزرگ می‌کند و قادر به بهبود و قدرت تفکیک نیست.

میکروسکوپ مجازی که به‌طور معمول برای مطالعه؛ بافت‌ها با زمینه روشن استفاده می‌شود، شامل تبدیل مقطع بافتی آماده به تصاویر دیجیتالی با کیفیت بالاست و این اجازه را می‌دهد که بدون وجود نمونه رنگ‌آمیزی شده یا میکروسکوپ و با استفاده از کامپیوتر یا لوازم دیجیتالی دیگر، بافت‌ها را مطالعه نمود. در این تکنیک، به وسیله میکروسکوپ مخصوصی از نواحی مختلف نمونه قرار گرفته روی لام تصویربرداری می‌شود. این کار با بزرگنمایی‌های مختلف تکرار شده و در نهایت هزاران فایل تصویری پشت سر هم ذخیره می‌شوند. سپس نرم‌افزار این اطلاعات را روی سروری ذخیره می‌کند که قابلیت دسترسی، مشاهده و دستیابی به اسلاید اصلی را از طریق مرورگرهای رایج وب و سایر دستگاه‌ها فراهم می‌کند. میکروسکوپ‌های مجازی با هزینه کمتر و استفاده راحت‌تر، به سرعت جایگزین میکروسکوپ‌های نوری و مجموعه‌های اسلاید در آزمایشگاه‌های بافت‌شناسی می‌شوند.

میکروسکوپ فلورسنت
Fluorescence microscopy

برخی از اجزای سلول وقتی تحت تابش نور با یک طول موج مشخص قرار می‌گیرند، نوری با طول موج بلندتر ساطع می‌کنند. این پدیده فلورسانس (fluorescence) نام دارد. در روش مطالعه با میکروسکوپ فلورسنت، مقاطع بافتی تحت تابش نور ماورابنفش (UV) قرار می‌گیرند، و نور ساطع شده از آنها در بخش قابل رؤیت طیف نوری قرار می‌گیرد. مواد فلورسنت به صورت درخشان در یک زمینه‌ی تاریک دیده می‌شوند. در این روش، میکروسکوپ دارای یک منبع نوری UV قوی و فیلترهای خاص می‌باشد که اشعه‌های ساطع شده از اجسام با طول موج‌های مختلف را برای تشکیل تصویر انتخاب می‌کند.

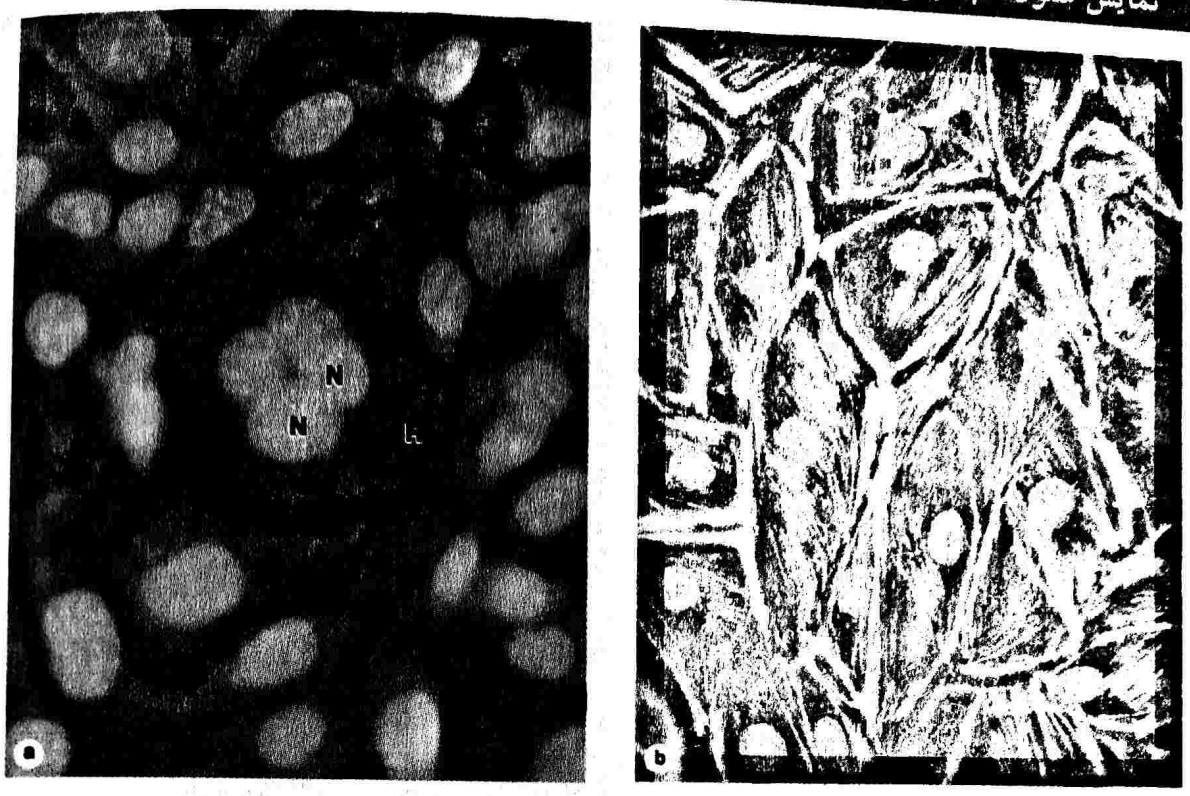
ترکیبات فلورسنت که تمایل به اتصال با ماکرومولکول‌های خاصی از سلول دارند، می‌توانند به عنوان رنگ‌های فلورسنت مورد استفاده قرار گیرند. به عنوان مثال، آکریدین نارنجی (acridine orange) که می‌تواند با DNA و RNA ترکیب شود، در ترکیب با این اسیدهای نوکلئیک، اشعه‌های مختلفی را ساطع می‌کند. بدین ترتیب شناسایی و تعیین موقعیت اسیدهای نوکلئیک در سلول‌ها امکان‌پذیر است (شکل ۴a-۱). سایر ترکیبات مانند هوخست (Hoechst) و DAPI به طور اختصاصی به DNA متصل می‌شوند و برای رنگ‌آمیزی هسته کاربرد دارند که در زیر نور UV به رنگ آبی دیده می‌شوند. یک کاربرد مهم دیگر میکروسکوپ فلورسنت، الحاق موادی نظیر فلورسئین به مولکول‌هایی است که به‌طور اختصاصی به اجزای بافت‌ها اتصال خواهند یافت و بدین ترتیب امکان شناسایی این اجزاء را در زیر میکروسکوپ فراهم خواهند کرد (شکل ۴b-۱). آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با ترکیبات فلورسنت در رنگ‌آمیزی‌های ایمونوهیستولوژیک کاربرد زیادی دارند (به مبحث روش‌های شناسایی با استفاده از کنش‌های متقابل با میل ترکیبی شدید میان مولکول‌ها رجوع کنید).

میکروسکوپ فاز کنتراست
Phase-Contrast microscopy

سلول‌ها و مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی نشده که معمولاً شفاف و بی‌رنگ می‌باشند، قابل مطالعه با این میکروسکوپ نوری تغییر یافته هستند. جزئیات سلولی در بافت‌های رنگ نشده به سختی قابل رؤیت هستند زیرا دارای چگالی نوری (Optical density) یکسان می‌باشند. در مطالعه با میکروسکوپ فاز کنتراست، از عدسی‌هایی استفاده می‌شود که از اشیای شفاف، تصاویر قابل رؤیت می‌سازند و برای مشاهده سلول‌های زنده کشت داده شده مناسب هستند (شکل ۵-۱).

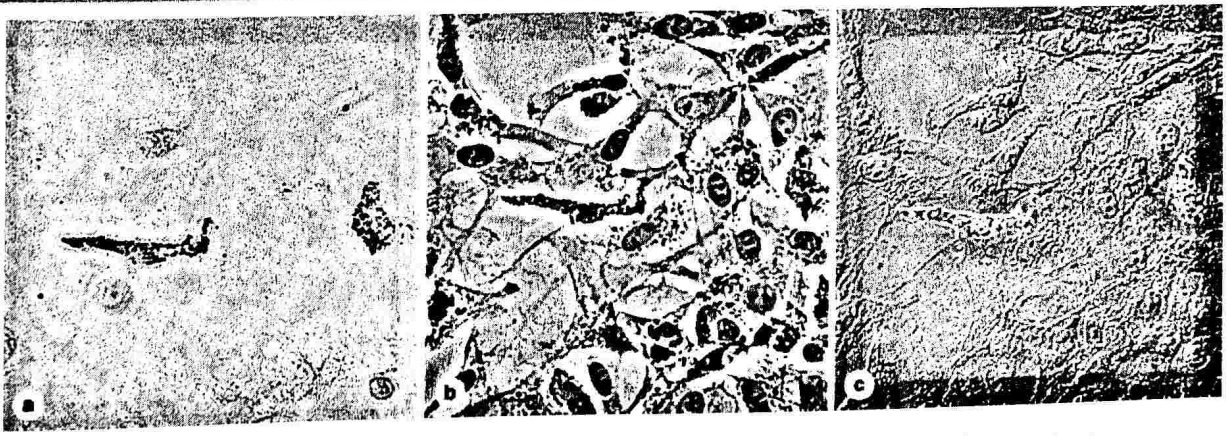
مطالعه با میکروسکوپ فاز کنتراست بر این اصل استوار است که سرعت نور هنگام عبور از ساختمان‌های سلولی و خارج سلولی با ضرایب انکسار مختلف، تغییر می‌کند. این تغییرات توسط دستگاه فاز کنتراست استفاده می‌شود تا ساختمان‌ها نسبت به یکدیگر روشن‌تر یا تیره‌تر به نظر برسند. از آنجایی که در این روش نیازی به فیکساسیون و رنگ‌آمیزی نیست این نوع میکروسکوپ ابزاری قدرتمند جهت استفاده در آزمایشگاه‌های کشت سلول می‌باشد. روش دیگر برای مشاهدهٔ سلول‌ها یا مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی نشده مطالعه با میکروسکوپ با تداخل افتراقی نومارسکی است که یک تصویر سه‌بعدی از سلول‌های زنده ایجاد می‌کند (شکل ۵c-۱).

شکل ۴-۱ نمایش سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت.



اجزای سلول اغلب توسط ترکیبات قابل مشاهده با میکروسکوپ فلوروسنت رنگ‌آمیزی می‌شوند.
(a) سلول‌های توبولی کلیه توسط آکریدین اورنج رنگ شده که به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شوند. در زیر میکروسکوپ فلورسنت DNA (هسته) **(N)** به‌صورت زردرنگ و سیتوپلاسم که غنی از RNA **(R)** می‌باشد به رنگ‌قرمز یا نارنجی دیده می‌شود.
(b) سلول‌هایی کشت داده شده که توسط DAPI (۴و۶-دی‌آمینو -۲- فنیل‌ایندول) و فالوئیدین (pholloidin) رنگ می‌شوند، DAPI به DNA و فالوئیدین به فیلامان‌های اکتین متصل شده، هسته این سلول‌ها را آبی فلورسنت و فیلامان‌های اکتین را به رنگ سبز نشان می‌دهند. اطلاعات مهم مانند تراکم بیشتر میکروفیلامان‌ها در محیط سلول هم نشان داده شده است (هر دو شکل ۵۰۰ ×).

شکل ۵-۱ ظاهر سلول‌های رنگ نشده در سه نوع میکروسکوپ نوری.



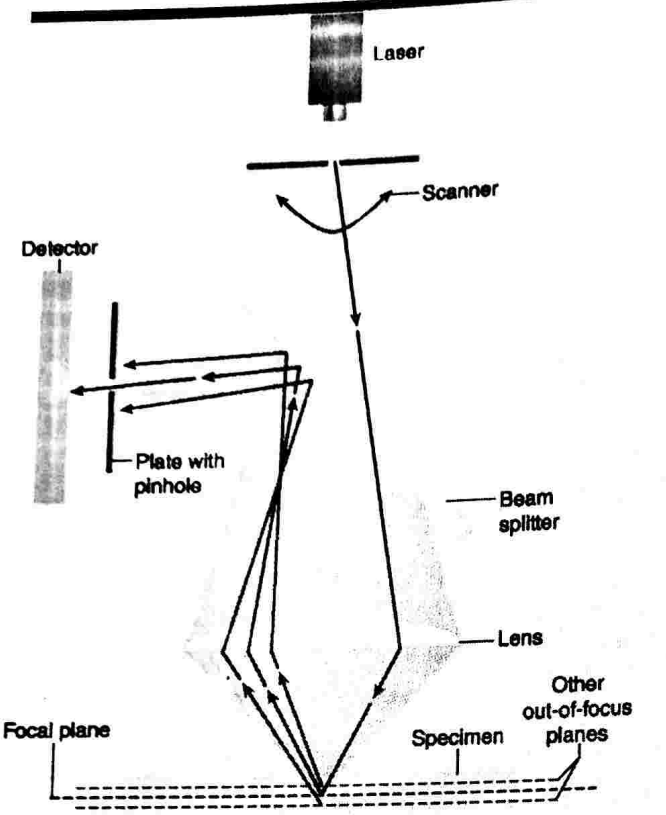
سلول‌های ستیغ عصبی زنده در محیط کشت، توسط تکنیک‌های مختلف میکروسکوپ‌های نوری به صورت متفاوت دیده می‌شوند. این سلول‌ها رنگ نشده‌اند، زمینه سلول‌ها یکسان بوده و دو نوع سلول رنگدانه‌دار در حال تمایز در هر تصویر دیده می‌شود.
(a) میکروسکوپ زمینه روشن: بدون فیکس و رنگ، فقط دو سلول پیگمانته دیده می‌شود.
(b) میکروسکوپ فاز ـ کنتراست: مرزهای سلولی، هسته‌ها و ساختارهای سیتوپلاسمی با ایندکس‌های انعکاسی متفاوت به صورت متفاوت روی فاز نوری اثر می‌گذارند و در نتیجه یک تصویر از این ساختارها به ما می‌دهد.
(c) میکروسکوپ تداخل افتراقی: جزئیات سلولی با روش متفاوت و توسط عدسی‌های نومارسکی مشخص می‌شوند. میکروسکوپ فازکنتراست، با یا بدون تداخل افتراقی، اغلب برای مشاهده سلول‌های زنده در حال رشد در محیط کشت استفاده می‌شوند.

میکروسکوپ هم‌کانون

میکروسکوپ نوری زمینه روشن، دارای پرتوی نور نسبتاً بلند بوده و نمونه را پر می‌کند. انحراف نور موجب کاهش کنتراست تصویر و قدرت تفکیک عدسی شیئی می‌شود. میکروسکوپ هم کانون با (شکل ۶-۱) استفاده از دو اصل مانع از این مشکل شده و موجب می‌شود که وضوح تصویر بهتر شود. این دو اصل عبارتند از (۱) استفاده از یک نقطه کوچک نوری با شدت بالا که توسط یک لیزر ایجاد می‌شود. (۲) استفاده از یک صفحه با یک منفذ بسیار کوچک که در جلوی آشکارساز تصویر قرار گرفته است. منبع نور نقطه‌ای، کانون عدسی و منفذ آشکارساز تصویر با هم در یک راستا قرار دارند، بنابراین نور متمرکز نشده عبور نمی‌کند. این عامل موجب می‌شود تا وضوح شیء در فوکوس بهبود پیدا کرده در نتیجه اجزای نمونه با دقت بیشتری نسبت به میکروسکوپ نوری قابل مشاهده شود.

میکروسکوپ‌های هم‌کانون دارای یک سیستم آینه‌ای کامپیوتری (پخش‌کنندهٔ پرتو) می‌باشند که از طریق آن نقطه تابش در طول نمونه به‌صورت اتوماتیک و با سرعت منتقل می‌شود. تصاویر دیجیتال از نقاط بسیاری گرفته شده و در یک «مقطع نوری» در آن صفحه بسیار نازک قابل رؤیت هستند. پس‌لایه‌های کانونی مختلف یک نمونه به هم پیوسته و به‌صورت یک تصویر سه‌بعدی بازسازی می‌شوند.

شکل ۶-۱ اصول میکروسکوپ هم‌کانون.



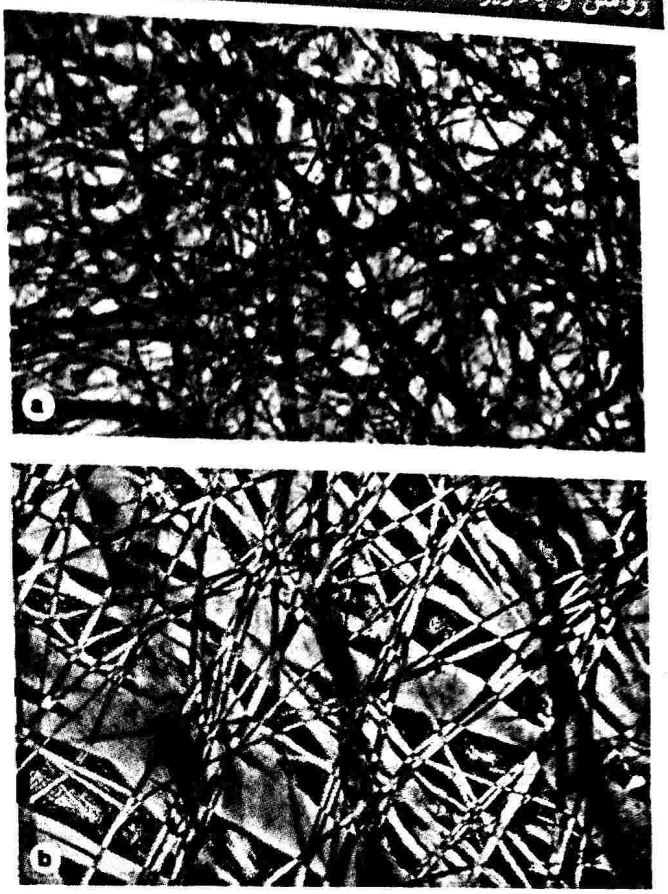
در ابتدا نقاط بسیار کوچکی از نور در مقطع بافتی از طریق یک سوراخ کوچک به آشکارساز (detector) می‌رسد، سایر اشعه‌هایی که از دیگر بخش‌های صفحه بافتی پخش می‌گردند، مهار می‌شوند. بنابراین در هر زمان یک قسمت بسیار کوچک از بافت فوکوس می‌شود. این دیاگرام نشان‌دهنده ترتیب و آرایش جزئیات میکروسکوپ هم کانون می‌باشد. نور تولید شده توسط یک منبع لیزر به نمونه برخورد کرده و منعکس می‌شود. پخش‌کننده پرتو، نور منعکس شده را می‌شکند و آن را به سمت سوراخ منتقل می‌کند. نوری که از اجزاء بالاتر یا پایین‌تر از محل فوکوس نور، منعکس می‌شوند توسط Blind بلوک می‌شوند. لیزر، بافت را اسکن کرده تا منطقهٔ وسیع‌تری از بافت قابل مشاهده باشد.

میکروسکوپ پلاریزان
Polarizing microscopy

میکروسکوپ پلاریزان امکان تشخیص ساختمان‌های رنگ شده یا رنگ نشده را فراهم می‌کند که از مولکول‌های کاملاً سازمان‌یافته تشکیل شده‌اند. وقتی نور معمولی از درون فیلتر پلاریزه کننده می‌گذرد، در هنگام خروج فقط در یک جهت ارتعاش می‌یابد. اگر فیلتر دومی بالای فیلتر اول قرار داده شود که محور اصلی آن عمود بر محور فیلتر اول باشد، نوری از دستگاه عبور نمی‌کند. ولی اگر ساختمان‌های بافتی حاوی ماکرومولکول‌های جهت‌دار بین دو فیلتر پولاریزه‌کننده قرار داده شوند، "ساختمان مولکولی جهت‌دار تکرارشونده‌ی" آنها، محور نور خارج شده از فیلتر پولاریزه‌کننده را می‌چرخانند. در نتیجه، به‌صورت ساختمان‌های روشنی در یک زمینه تیره دیده می‌شوند (شکل ۷-۱). توانایی چرخاندن جهت ارتعاش نور پولاریزه، **خاصیت انکسار مضاعف** (birefringence) نامیده می‌شود و یکی از ویژگی‌های مواد بلوری یا مواد حاوی مولکول‌های به شدت جهت‌دار مثل سلولز، کلاژن، میکروتوبول‌ها و فیلامان‌های اکتین می‌باشد.

کاربرد تمامی انواع میکروسکوپ نوری در پی استفاده از دوربین‌های دیجیتال به شدت توسعه‌یافته استز نرم‌افزار مناسب می‌تواند تصاویر دیجیتال را به صورت کمّی تجزیه و تحلیل کند. به علاوه، چنین تصاویی اجازه می‌دهند بخش‌هایی که مستقیماً با عدسی چشمی قابل رؤیت نیستند، بر روی یک مانیتور دیده شوند.

شکل ۱-۷ خصوصیات بافتی با میکروسکوپ زمینه روشن و پلاریزه.



میکروسکوپ نوری پلاریزه تصویر از موادی را می‌دهد که دارای ساختارهای تکراری و ماکرومولکول‌های متناوب هستند و ساختارهایی که دارای چنین ویژگی نمی‌باشند، دیده نمی‌شوند. در اینجا یک قطعه نازک از مزانتر که توسط پیکروسیریوس قرمز، اورسئین و هماتوکسیلین رنگ شده، دیده می‌شود که بعد به‌طور مستقیم روی یک لام گذاشته شده و توسط میکروسکوپ‌های زمینه روشن **(a)** و پلاریزه **(b)** بررسی می‌گردد.

(a) در زیر میکروسکوپ زمینه روشن الیاف کلاژن به رنگ قرمز همراه با الیاف نازک الاستیک و هسته‌های سلول که تیره‌تر هستند قابل مشاهده می‌باشند.

(b) در زیر میکروسکوپ پلاریزه تنها الیاف کلاژن قابل دیدن است و به رنگ زرد پررنگ یا نارنجی دیده می‌شوند.

(a: ۴۰ ×؛ b: ۱۰۰ ×).

میکروسکوپ الکترونی
Electron microscopy

میکروسکوپ‌های الکترونی عبوری و نگاره بر اساس تأثیر متقابل پرتوهای الکترون‌ها و اجزاء بافت کار می‌کنند. طول موج پرتو الکترون بسیار کمتر از نور می‌باشد و موجب می‌شود ۱۰۰۰ مرتبه وضوح بهتری از تصویر ارائه دهد.

میکروسکوپ الکترونی عبوری
Transmission electron microscopy

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) یک سیستم تصویرساز است که قدرت تفکیکی در حدود ۳nm را مهیا می‌کند. این قدرت تفکیک بالا امکان آن را فراهم می‌کند که جزئیات تصویر با بزرگنمایی تا ۴۰۰,۰۰۰ برابر دیده شوند. جزئیات مقاطع بافتی بسیار نازک (۴۰-۹۰nm) را می‌توان تا بزرگنمایی ۱۲۰,۰۰۰ برابر با TEM مشاهده کرد.

شکل ۱-۸a اجزای یک TEM و اصول پایه عملکرد آن را نشان می‌دهد: پرتویی از الکترون توسط عدسی‌های الکترومغناطیسی متمرکز شده و از مقطع بافتی عبور می‌کنند تا تصویری با نواحی سیاه، سفید و خاکستری (بینابینی) را تشکیل دهند. تصویر میکروسکوپ الکترونی در برخی نواحی که الکترون‌ها به آسانی عبور می‌کنند، روشن‌تر (الکترون لوسنت) و در نواحی که الکترون‌ها جذب یا منحرف شده‌اند، تیره‌تر (الکترون دنس) است.

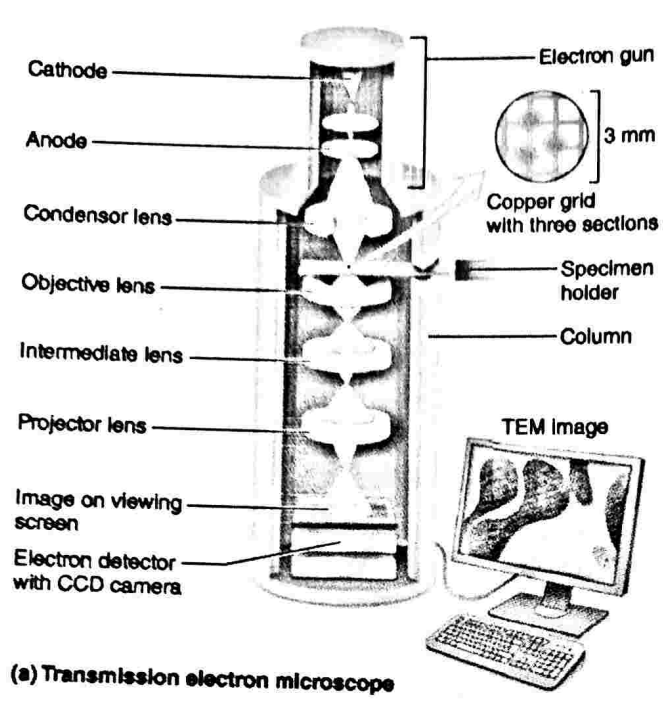
جهت بهبود قدرت تفکیک و وضوح در TEM، ترکیباتی از یون‌های فلزات سنگین در فرآیند آماده‌سازی بافت به فیکساتیو یا محلول‌های آبگیری اضافه می‌شود. این ترکیبات شامل تتراکسید اسمیوم، سیترات سرب و اورانیل است که به ماکرومولکول‌های سلولی متصل شده و تراکم الکترونی و قابلیت مشاهده آنها را بالا می‌برند.

شکست انجمادی و فریزکردن تکنیک‌هایی هستند که مطالعهٔ سلول‌ها توسط TEM را بدون نیاز به فیکس و قالب‌گیری مهیا می‌سازند. در این روش‌ها نمونه‌های بافتی بسیار کوچک به سرعت در نیتروژن مایع منجمد شده و توسط یک چاقو بریده یا شکسته می‌شوند. سطح بافت توسط یک پوشش نازک، پلاتینیوم یا دیگر اتم‌های فلزی پوشیده می‌شود. سپس پوشش ساخته شده، بعد از حذف مواد آلی توسط TEM مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. مقاطع به صورت تصادفی گرفته می‌شوند و ممکن است دو لایه لیپیدی را از هم جدا کنند و اجزاء پروتئینی غشاء که مطالعه آنها از لحاظ شکل، اندازه و توزیع با روش‌های دیگر مشکل است، نمایان می‌شوند.

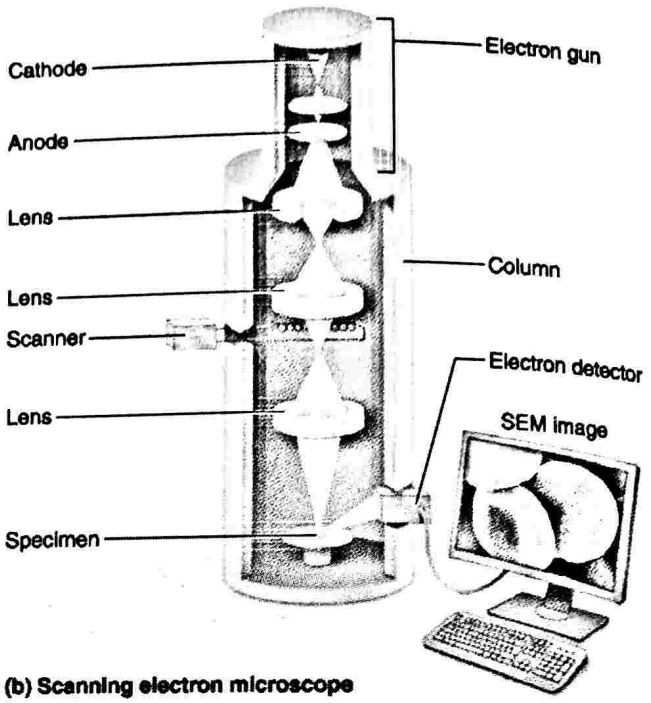
میکروسکوپ الکترونی نگاره
Scanning electron microscopy

میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، نمایی با رزولوشن بالا از سطوح سلول‌ها، بافت‌ها و ارگان‌ها ایجاد می‌کند. این

شکل ۸-۱ میکروسکوپ الکترونی



(a) Transmission electron microscope



(b) Scanning electron microscope

میکروسکوپ‌های الکترونی دستگاه‌های بزرگی می‌باشند که اغلب در یک جایگاه ویژه و ثابتی قرار می‌گیرند.

(a) نمای شماتیک از اجزای اصلی یک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) که مشابه میکروسکوپ نوری وارونه است. در کل ستون میکروسکوپ خلأ وجود دارد، الکترون‌ها در کاتد که یک فیلامان فلزی (اغلب تنگستن) می‌باشد، آزاد می‌شوند. الکترون‌های آزاد شده سپس با یک اختلاف ولتاژ ۶۰ تا ۱۲۰ کیلوولت به سمت آند شتاب می‌گیرند. سپس الکترون‌ها از سوراخی که در آند وجود دارد عبور کرده و پرتویی را ایجاد می‌کنند که توسط کویل‌های الکتریکی حلقوی به‌طور الکترومغناطیسی فوکوس می‌شود که این شیوه دقیقاً مشابه اثر لنزهای نوری بر نور می‌باشد.

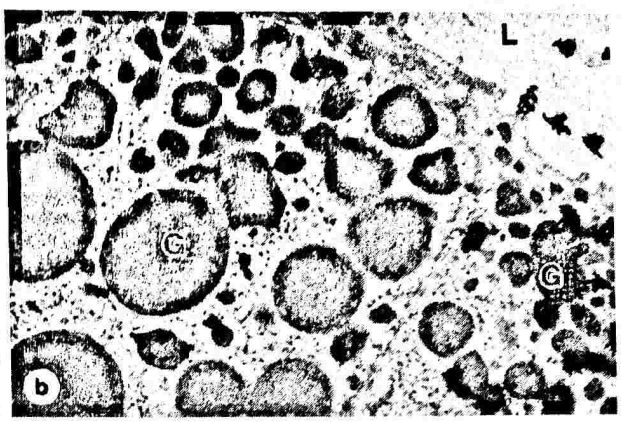
لنز اول اشعه‌های الکترونی را بر روی مقطع فوکوس می‌کند. برخی از الکترون‌ها با اتم‌های مقطع برهم‌کنش داده و خواه جذب یا به مقادیر مختلف پراکنده می‌شوند، در حالی‌که دیگر الکترون‌ها از عرض مقطع بافتی بدون هیچ برهم‌کنشی عبور می‌کنند. بیشتر الکترون‌ها به عدسی شیئی می‌رسند و یک تصویر بزرگ شده را ایجاد می‌کنند که این تصویر در نهایت بر روی یک صفحه فلورسنت و یا یک دوربین و مانیتور (CCD) منتقل می‌گردد.

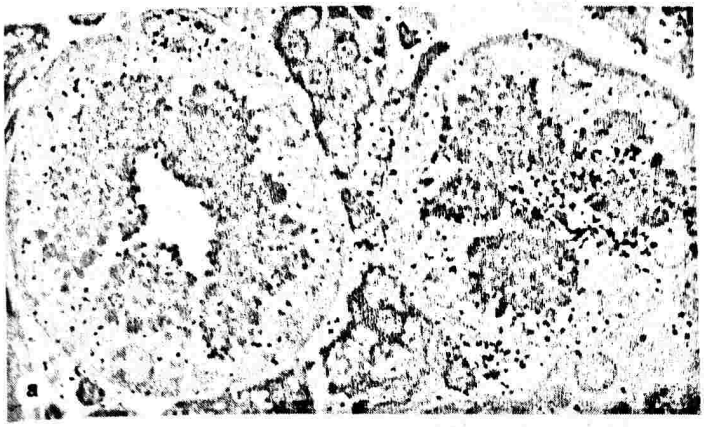
در یک تصویر TEM منطقه‌ای از بافت که الکترون از آن عبور می‌کند به‌صورت روشن (الکترون لوسنت) بوده درحالی که منطقه‌ای که به‌طور طبیعی متراکم بوده و یا هنگام آماده‌سازی با یون‌های فلزات سنگین پوشیده شده‌اند الکترون‌ها را جذب یا منحرف کرده و به صورت تیره (الکترون دنس) دیده می‌شود. این تصاویر همیشه به‌صورت سیاه و سفید و سایه‌هایی از خاکستری دیده می‌شوند.

(b) میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) دارای شباهت‌های زیادی به TEM می‌باشد. اگرچه در اینجا پرتوهای الکترونی متمرکز شده از نمونه عبور نمی‌کنند، بلکه به صورت نقطه به نقطه مشابه مسیری که یک پرتو الکترونی در یک لوله تلویزیونی طی می‌کند، می‌باشد. مقاطع قبلاً توسط یک لایه بسیار نازک از اتم‌های فلزی پوشیده می‌شوند و پرتوها با این اتم‌ها بر هم کنش داده، ایجاد الکترون‌های انعکاسی و الکترون‌های ثانویه جدید می‌کنند. همه این الکترون‌ها توسط یک آشکارساز گرفته شده و به تقویت‌کننده‌ها انتقال داده می‌شوند که نتیجه آن ایجاد یک تصویر سیاه و سفید بر روی مانیتور می‌باشد. SEM تنها سطح نمونه را نشان می‌دهد و یک نمای سه‌بعدی به ما می‌دهد. سطح درونی ارگان‌ها یا سلول‌ها را می‌توان با مقطع‌گیری از سطح داخلی آنها نشان داد.

میکروسکوپ الکترونی مانند TEM یک پرتو خیلی باریک از الکترون‌ها را تولید و متمرکز می‌کند. الکترون‌ها در میکروسکوپ الکترونی نگاره از درون نمونه عبور نمی‌کنند (شکل ۸b-۱). در عوض سطح نمونه بافتی، خشک شده و با یک لایه خیلی نازک از فلز سنگین (غالباً طلا) پوشانده می‌شود تا الکترون‌ها از نمونه منعکس شوند. الکترون‌های بازتاب شده به وسیله یک آشکارساز (detector) گرفته می‌شوند و سیگنال‌های تولید شده مورد پردازش قرار گرفته

شکل ۹-۱ اتورادیوگرافی میکروسکوپی





اتورادیوگرافی روش آماده‌سازی است که در آن ذراتی به نام **دانه‌های نقره** بخش‌های مختلف سلول را نشان می‌دهند و در آن ماکرومولکول‌های اختصاصی سنتز شده درست قبل از فیکساسیون نمایش داده می‌شوند. در اینجا اتورادیوگرافی از غده بزاقی موش نشان داده شده که ۸ ساعت قبل از فیکس به آن 3H-Fucose تزریق کرده‌اند. Fucose در شکل‌گیری الیگوساکاریدها نقش دارد و 3H-Fucose آزاد در طی فیکساسیون و مقطع‌گیری غده برداشته شده است. مطالعه و پردازش اتورادیوگرافیکی مکان‌های گلیکوپروتئین‌های تازه سنتز شده حاوی قند نشان‌دار را آشکار می‌کند.

(a) در مناطقی که گرانول‌های ترشحی و مجاری حاوی گلیکوپروتئین هستند، رنگ سیاه (دانه‌های نقره) دیده می‌شود (۱۵۰۰ ×).

(b) همان مقطع اتورادیوگرافی TEM دانه‌های نقره را نشان می‌دهد که ظاهری پیچ‌خورده یا بی‌شکل دارند و عمدتاً در گرانول‌ها **(G)** و در مجرای غدد **(L)** وجود دارند (۷۵۰۰ ×).

یک تصویر سیاه و سفید به وجود می‌آید. تصاویر SEM به راحتی قابل تفسیر هستند زیرا نمایی سه‌بعدی را ارائه می‌کنند که درست مانند اشیاء بزرگ با سایه روشن‌های ناشی از نور، دیده می‌شوند.

اتورادیوگرافی Autoradiography

اتورادیوگرافی میکروسکوپی یک روش برای مکان‌یابی ماکرومولکول‌های تازه تولید شده در مقاطع بافتی و یا سلول‌ها می‌باشد. متابولیت‌های نشان‌دار شده با ماده رادیواکتیو مانند نوکلئوتیدها و اسید آمینه‌ها و قندها که در ساختار ماکرومولکول‌های ویژه سلول‌های زنده (DNA، RNA و پروتئین و گلیکوپروتئین و پلی‌ساکارید) شرکت دارند، در مکان‌های خاصی که این ماکرومولکول‌ها وجود دارند ایجاد تشعشع می‌کنند. سلول‌ها و یا مقاطع بافتی نشان‌دار شده با مواد رادیواکتیو در یک محیط تاریک با امولسیون‌های فوتوگراف که حاوی کریستال‌های برومید نقره هستند، آغشته می‌شوند. بلورهای برومید نقره موجود در امولسیون به صورت آشکارسازهای کوچک (microdetectors) عمل می‌کنند یعنی با همان روشی که در فیلم عکاسی معمولی نسبت به نور واکنش نشان می‌دهند. پس از طی زمان کافی برای قرارگیری درمعرض ماده موردنظر در جعبه ضد نور اسلایدها مشابه روش عکاسی ظاهر و بررسی می‌شوند. هنگامی‌که بلورهای برومید نقره موجود در امولسیون عکاسی تحت برخورد پرتوها قرار گیرند، به گرانول‌های سیاه کوچکی از فلز نقره تبدیل می‌شوند و بدین‌ترتیب وجود فعالیت رادیواکتیو را در بافت مشخص می‌کنند. از این روش می‌توان در مطالعه با میکروسکوپ الکترونی و نوری هر دو استفاده کرد (شکل ۹-۱).

اطلاعات فراوانی با استفاده از اتورادیوگرافی، در دسترس قرار می‌گیرند. اگر یک پیش‌ساز رادیواکتیو DNA (مانند تیمیدین نشان‌دارشده با تریتیوم) مورد استفاده قرار گیرد، می‌توان متوجه شد کدام سلول‌ها در یک بافت (و چه تعداد از آنها)، در حال همانندسازی DNA و آماده شدن برای تقسیم هستند. وقایع دینامیک نیز می‌توانند مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند. برای مثال، جهت تعیین آن که پروتئین ترشحی در کجای سلول تولید می‌شود و پیش از ترشح چه مسیری را در سلول طی می‌کند، یک آمینواسید رادیواکتیو به چند جانور تزریق می‌شود و مقاطع بافتی در زمان‌های مختلف پس از تزریق جمع‌آوری می‌شوند.

اتورادیوگراف‌های مقاطع، که در فاصله زمان‌های مختلف تهیه شده‌اند، روند مهاجرت پروتئین‌های رادیواکتیو را نشان می‌دهند.

کشت سلول و بافت
Cell and tissue culture

سلول‌ها و بافت‌های زنده می‌توانند در محیط کشت خارج از بدن (in vitro) نگه‌داری و مطالعه شوند. درون ارگانیسم (in vivo)، سلول‌ها در یک مایع مشتق از پلاسمای خون که حاوی مولکول‌های مختلف موردنیاز برای بقا و رشد می‌باشد، غوطه‌ور هستند. کشت سلول مشاهده مستقیم رفتار سلول‌های زنده را زیر میکروسکوپ فاز کنتراست ممکن می‌سازد و بسیاری از آزمایشاتی را که نمی‌توان در حیوان زنده انجام داد، در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) قابل انجام است.

سلول‌ها و بافت‌ها در محلول‌های پیچیده‌ای از ترکیبات شناخته شده (نمک‌ها، اسید آمینه‌ها و ویتامین‌ها) که اجزای سرم و فاکتورهای رشد اختصاصی به آنها اضافه شده، رشد داده می‌شوند. برای کشت یک سلول، ابتدا باید آنها را به طریق مکانیکی با قرار دادن بافت در معرض آنزیم‌ها، از بافت یا عضو جدا کرد. پس از جداسازی، می‌توان سلول‌ها را روی یک ظرف پتری (دیش) که معمولاً در یک لایه منفرد به آن متصل می‌شوند، قرار داد (شکل ۵-۱ را ببینید). کشت‌های سلولی که با این روش جداسازی می‌شوند، **کشت‌های سلولی اولیه** نام دارند. بعضی از سلول‌ها می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی یا دوره‌های طولانی نگهداری شوند زیرا آنها فناناپذیر شده‌اند و یک رده سلولی دائمی را تشکیل داده‌اند. اغلب سلول‌های به دست آمده از بافت‌های طبیعی طول عمری محدود دارند و از نظر ژنتیکی برنامه‌ریزی شده‌اند. ولی بعضی از تغییرات که بیشتر به انکوژن‌ها مربوط می‌شوند (فصل ۳ را ببینید) می‌توانند سبب فناناپذیری (immortality) سلولی شوند، فرایندی که تغییرشکل (transformation) نامیده می‌شود مشابه اولین مرحله در سرطانی‌شدن یک سلول طبیعی است. به دلیل پیشرفت‌های تکنولوژی کشت و استفاده از فاکتورهای رشد اختصاصی، هم‌اکنون می‌توان انواع سلول‌ها را برای مدت نامحدود در آزمایشگاه نگه‌داری کرد.

همانطور که در فصل ۲ نیز به آن اشاره خواهد شد، قرار دادن سلول‌های زنده در محیط آزمایشگاهی با ترکیبات متنوع فلورسنت جدید که در بخش‌های خاصی از سلول ساخته می‌شوند یک یافته جدید برای شناسایی این بخش‌ها از نظر ساختاری و فیزیولوژیکی می‌باشد. سایر تکنیک‌های بافت‌شناسی که برای کشت سلول استفاده می‌شوند برای یافتن محل و عملکرد میکروتوبول‌ها، میکروفیلامنت‌ها و دیگر اجزای اسکلت سلولی مهم هستند.

» کاربرد پزشکی

کشت سلولی به‌طور گسترده جهت مطالعه تغییرات مولکولی در سرطان استفاده می‌شود. همچنین جهت آنالیز عفونت‌های ویروسی، میکوپلاسما، برخی پروتوزواها و برای بسیاری از دیگر آنالیزهای معمول کروموزمی و ژنتیک کاربرد دارد. سلول‌های سرطانی گردن رحم از بیماری که بعداً به‌عنوان Henrietta lacks معرفی شد و در سال ۱۹۵۱ فوت کرد اولین رده سلولی به دست آمده و **Hela cells** نامیده شد و هنوز در تحقیقات بر روی ساختار سلولی و عملکرد آن در تمام دنیا با این نام استفاده می‌شود.

هیستوشیمی آنزیمی
Enzyme Histochemistry

هیستوشیمی آنزیمی (سیتوشیمی) روشی برای تعیین موقعیت ساختارهای سلول با استفاده از فعالیت‌های آنزیمی خاصی که در آن ساختارها وجود دارد، می‌باشد. برای اینکه خاصیت آنزیم‌های مورد استفاده در این روش‌ها حفظ شود اغلب از مقاطع فیکس نشده و یا مقاطع با فیکس خفیف استفاده می‌شود، مقاطع را اغلب در محفظه‌های سرما (cryostat) برش می‌زنند چرا که گرما و حلال‌های آلی اثرات مخربی بر فعالیت آنزیم دارد. در هیستوشیمی آنزیم‌ها اغلب به طرق زیر عمل می‌شود. (۱) مقاطع بافتی در یک محلول حاوی سوبسترای آنزیمی غوطه‌ور شده و محل آنزیم شناسایی می‌شود؛ (۲) به آنزیم اجازه داده می‌شود که بر روی سوبسترا عمل کند؛ (۳) سپس مقاطع در تماس با ترکیبات نشاندار قرار داده می‌شوند که این ترکیبات با مولکول‌های ایجادشده توسط فعالیت آنزیمی واکنش می‌دهند؛ و (۴) محصولات نهایی واکنش باید غیرمحلول بوده و توسط میکروسکوپ نوری یا الکترونی قابل‌مشاهده

باشد. بنابراین محصولات رنگی در محل‌هایی که حاوی آنزیم است، رسوب کرده و جایگاه آنها را مشخص می‌کند.

نمونه‌هایی از آنزیم‌ها که می‌توانند به روش هیستوشیمی تشخیص داده شوند، عبارتند از:

- فسفاتازها که گروه‌های فسفات را از ماکرومولکول‌ها برمی‌دارند (شکل ۱۰-۱).
- دهیدروژنازها یون هیدروژن را از یک سوبسترا برمی‌دارند و آن را به یک سوبسترای دیگر منتقل می‌کنند مثل بسیاری از آنزیم‌های چرخه سیتریک اسید (کربس) که می‌توان چنین آنزیم‌هایی را در میتوکندری شناسایی کرد.
- پراکسیداز، آنزیمی است که با انتقال یون‌های هیدروژن به پراکسید هیدروژن، سبب اکسیداسیون برخی سوبستراهای خاص می‌شود.

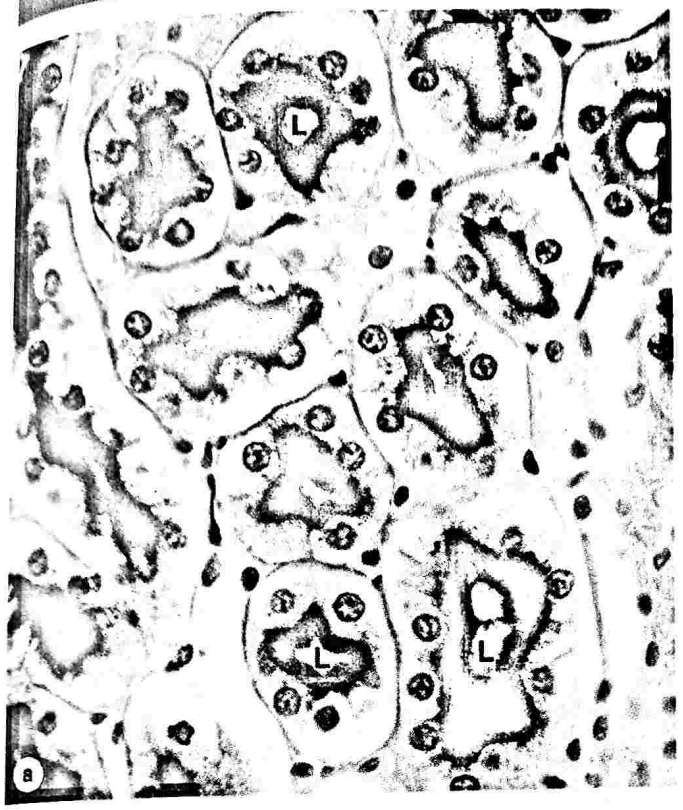
» کاربرد پزشکی

روش‌های هیستوشیمی آنزیمی بسیاری در آزمایشگاه‌های تشخیصی انجام می‌شود که عبارتند از واکنش پرلز پروسین بلو (Perls' prussian blue) برای آهن (جهت تشخیص بیماری‌های ذخیره آهن، برای مثال هموکروماتوز، هموسیدروز)، واکنش PAS- آمیلاز و رنگ‌آمیزی آبی آلسین برای پلی‌ساکاریدها (برای تشخیص گلیکوژنوز و موکوپلی‌ساکاریدوز)، و واکنش‌های مربوط به لیپیدها و اسفنگولیپیدها (برای تشخیص اسفنگولیپیدوز).

شناسایی مولکول‌های اختصاصی

ماکرومولکول‌های اختصاصی که در یک برش بافتی حضور دارند ممکن است گاهی به‌وسیله ترکیبات برچسب شده یا ماکرومولکول‌هایی که به‌طور اختصاصی با مولکول موردنظر پیوند شده‌اند مورد شناسایی و بررسی قرار گیرند. ترکیباتی که با مولکول تعامل دارند و باید در زیر میکروسکوپ نوری یا الکترونی قابل مشاهده باشند اغلب با یک برچسب قابل تشخیص برچسب‌گذاری شده‌اند. برچسب‌هایی که رایج‌ترین کاربرد را دارند عبارتند از: ترکیبات فلورسنت، اتم‌های رادیواکتیو که از طریق اتورادیوگرافی قابل تشخیص هستند، مولکول‌های پراکسیداز یا سایر آنزیم‌ها که با روش‌های هیستوشیمی قابل

شکل ۱۰-۱ هیستوشیمی آنزیمی



(a) میکروگراف مقطع عرضی از توبول‌های کلیوی که توسط روش هیستوشیمی برای آلکالین فسفاتازها با حداکثر فعالیت در pH قلیایی آماده‌سازی شده است. فعالیت قوی این آنزیم در سطح رأسی سلول‌ها در لومن **(L)** توبول‌ها مشخص است. (۲۰۰ ×).

(b) تصویر TEM از یک سلول کلیوی که در آن اسید فسفاتاز به طریق هیستوشیمی در سه لیزوزوم **(Ly)** در نزدیک هسته **(N)** مکان‌یابی شده‌اند. ماده تیره در داخل این ساختارها، فسفات سرب است که در محل‌های دارای فعالیت اسید فسفاتاز رسوب کرده است. (۲۵۰۰۰ ×).

تشخیص هستند، و ذرات فلزی (معمولاً طلا) که با میکروسکوپ نوری و الکترونی قابل مشاهده‌اند. این روش‌ها می‌توانند برای شناسایی جایگاه‌های قندها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک استفاده شوند.

نمونه‌هایی از مولکول‌ها که به‌طور اختصاصی با سایر مولکول‌ها واکنش متقابل نشان می‌دهند عبارتند از:

- فالوئیدین، ترکیبی است که از قارچ آمانیتا فالوئیدس *(Amanita phalloides)* استخراج می‌شود و به شدت با پروتئین آکتین میکروفلامان‌ها واکنش می‌دهد.
- پروتئین A، پروتئینی است که از باکتری استافیلوکوک طلایی به دست می‌آید و به ناحیه Fc مولکول‌های ایمونوگلوبولین (آنتی‌بادی) اتصال می‌یابد. پروتئین A می‌تواند برای تعیین محل آنتی‌بادی‌های طبیعی یا متصل به ساختارهای سلولی به کار رود.
- لکتین‌ها، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که عمدتاً از دانه‌های گیاهی به دست می‌آیند و با تمایل زیاد و به طور اختصاصی به کربوهیدرات‌ها متصل می‌شوند. لکتین‌های گوناگون به قندها یا توالی‌های خاص مولکول‌های قند اتصال می‌یابند. لکتین‌های نشان‌دار شده با فلورسنت جهت رنگ‌آمیزی گلیکوپروتئین‌های اختصاصی یا دیگر ماکرومولکول‌ها با توالی ویژه‌ای از زنجیره‌های قندی کاربرد دارند.

ایمونوهیستوشیمی
Immunohistochemistry

یک اثر متقابل بسیار اختصاصی میان یک آنتی‌ژن و آنتی‌بادی آن است. به همین دلیل آنتی‌بادی‌های نشان‌دار شده به‌طور معمول در ایمونوهیستوشیمی برای شناسایی و تعیین محل بسیاری از پروتئین‌های خاص، نه تنها پروتئین‌های با فعالیت آنزیمی که می‌توانند با روش هیستوشیمی نشان داده شوند، استفاده می‌شوند.

سلول‌های ایمنی بدن با ماکرومولکول‌های موسوم به آنتی‌ژن واکنش می‌دهند و آنتی‌بادی‌ها را می‌سازند. این سلول‌ها آنتی‌ژن‌های «بیگانه» را شناسایی می‌کنند که یک بخش طبیعی از ارگانیسم نیستند و بالقوه خطرناک هستند. آنتی‌بادی‌ها به خانواده‌ای از گلیکوپروتئین‌ها به نام ایمونوگلوبین‌ها تعلق دارند که به وسیله لنفوسیت‌ها ترشح می‌شوند. این مولکول‌ها به صورت اختصاصی به آنتی‌ژن محرک خود متصل می‌شوند و به حذف آنها کمک می‌کنند.

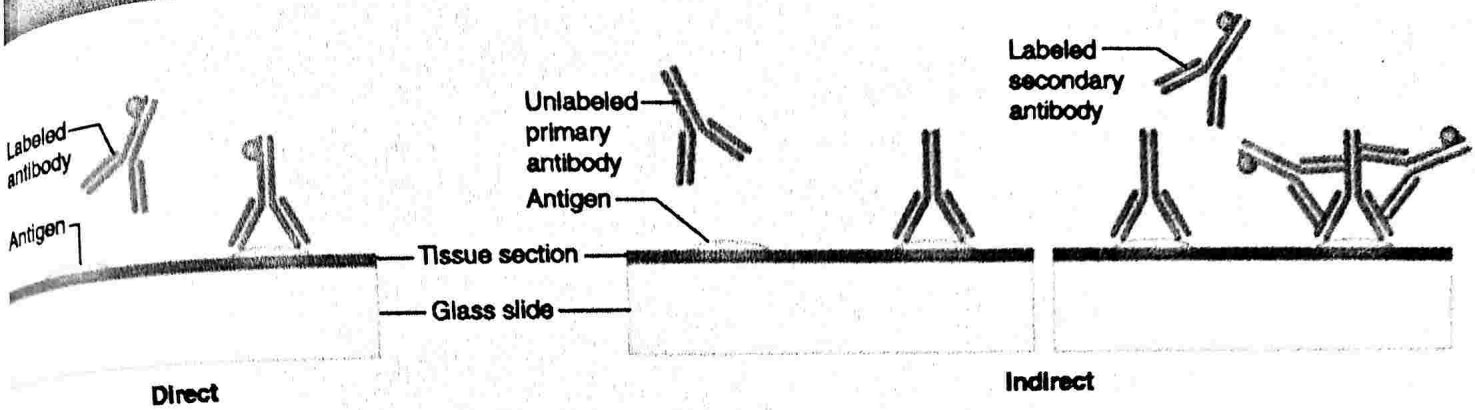
جهت هر دو هدف تشخیصی و تحقیقاتی، ایمونوهیستوشیمی به‌طور گسترده کاربرد دارد. هر تکنیک ایمونوهیستوشیمی نیازمند یک آنتی‌بادی علیه هر پروتئینی که باید شناسایی شود، می‌باشد. این بدان معنا است که پروتئین مورد نظر باید قبلاً به روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی خالص و جداسازی شده باشد به نحوی که آنتی‌بادی‌ها علیه آن بتوانند تولید شوند. برای تولید آنتی‌بادی علیه پروتئین x مربوط به یک گونه جانوری (مانند انسان یا موش صحرایی)، ابتدا پروتئین x جداسازی شده و به بدن جانوری از گونه دیگر (مانند خرگوش یا بز) تزریق می‌شود. اگر توالی اسید آمینهٔ پروتئین مورد نظر به اندازه کافی با پروتئین‌های بدن این جانور متفاوت باشد، جانور آن را به عنوان بیگانه (یا همان آنتی‌ژن) شناخته و آنتی‌بادی‌هایی علیه پروتئین تولید خواهد کرد.

گروه‌های (دودمان‌های)[1] مختلف از لنفوسیت‌های جانوری که پروتئین x به آن تزریق شده است، می‌توانند بخش‌های مختلفی از پروتئین x را شناسایی کنند و علیه آن بخش آنتی‌بادی تولید کنند. این آنتی‌بادی‌ها از پلاسمای جانور جمع‌آوری می‌شود و مخلوطی از آنتی‌بادی‌های چند دودمانی (Polyclonal antibodies) را تشکیل می‌دهند که قادرند به نواحی مختلف از پروتئین x متصل شوند.

این امکان وجود دارد که پروتئین x به موش تزریق شود و چند روز بعد لنفوسیت‌های فعال شده را جدا کرد و در محیط کشت قرار داد. رشد و فعالیت این سلول‌ها را می‌توان با الحاق آنها به سلول‌های تومور لنفوسیتی برای ایجاد سلول‌های «هیبریدوما» به صورت نامحدود طولانی کرد. کلونی‌های هیبریدوماهای مختلف، آنتی‌بادی‌های متنوعی علیه بخش‌های مختلف پروتئین x ایجاد می‌کنند. هر دودمان می‌تواند به‌طور مجزا جداسازی و کشت داده شود، به نحوی که آنتی‌بادی‌های مختلف ضدپروتئین x بتوانند به‌طور جداگانه جمع‌آوری گردند. هر یک از این آنتی‌بادی‌ها یک آنتی‌بادی تک‌دودمانی (monoclonal antibody) است. مزیت استفاده از آنتی‌بادی‌های تک‌دودمانی در مقایسه با آنتی‌بادی‌های چند دودمانی، این است که یک آنتی‌بادی تک دودمانی می‌تواند طوری انتخاب شود که بسیار اختصاصی باشد و محکم به پروتئین مورد نظر اتصال یابد تا آن پروتئین شناسایی گردد. بنابراین،

1- clones

شکل ۱۱-۱ ایمونوسیتوشیمی



ایمونوسیتوشیمی (ایمونوهیستوشیمی) را می‌توان به صورت مستقیم و غیر مستقیم انجام داد. در **ایمونوسیتوشیمی مستقیم (چپ)** یک آنتی‌بادی استفاده می‌شود که علیه بخشی از بافت موردنظر طراحی شده و به‌طور مستقیم با یک نشانه مانند ترکیبات فلورسنت یا پراکسیداز نشانه‌گذاری می‌گردد. زمانی که یک مقطع بافتی روی لام گذاشته می‌شود این آنتی‌بادی‌های نشان‌دار اختصاصاً به پروتئینی (آنتی‌ژن) که علیه آن ساخته شده متصل می‌شود که آنها می‌توانند با استفاده از روش‌های خاصی مشاهده شوند. در **ایمونوسیتوشیمی غیر مستقیم (راست)** اغلب دو آنتی‌بادی متفاوت استفاده می‌شود. در ابتدا یک **آنتی‌بادی اولیه** که علیه پروتئین (آنتی‌ژن) موردنظر طراحی شده، به آنتی‌ژن اختصاصی موجود در مقطع بافتی متصل می‌شود. سپس (۱) **آنتی‌بادی ثانویه** نشان‌دار شده که در بدن گونه‌های دیگر علیه پروتئین‌های ایمونوگلوبین (آنتی‌بادی) همان گونه‌هایی که آنتی‌بادی‌های اولیه از آنها به دست آمده است ساخته می‌شود (۲) با یک ترکیب فلورسنت یا پراکسیداز نشانه‌گذاری می‌شود. زمانی که این آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار برای مقطع بافتی استفاده می‌شود به‌صورت اختصاصی به آنتی‌بادی‌های اولیه متصل شده و به‌طور غیرمستقیم پروتئین موردنظر را در لام نشان‌دار می‌کند. از آنجایی‌که بیش از یک آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار می‌تواند به مولکول آنتی‌بادی اولیه متصل شود، نشانه‌گذاری پروتئین موردنظر در روش غیرمستقیم چند برابر می‌باشد.

میزان اتصال غیراختصاصی به سایر پروتئین‌ها که مشابه پروتئین مورد بررسی هستند، کاهش خواهد یافت.

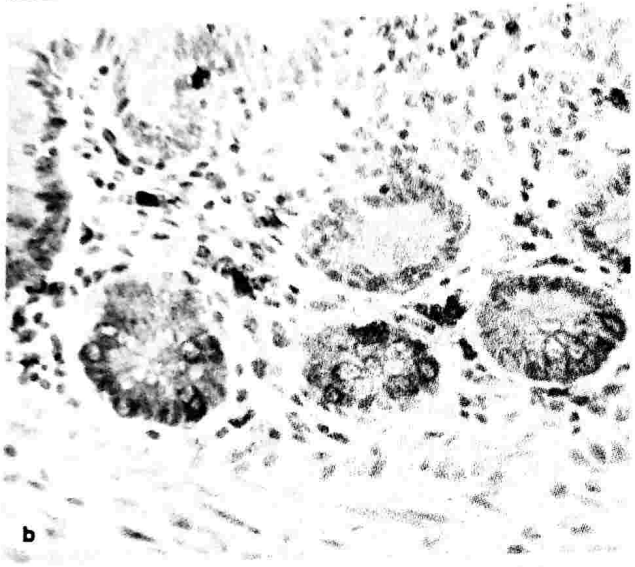
در ایمونوهیستوشیمی، یک مقطع بافتی که می‌تواند حاوی یک پروتئین خاص باشد، در یک محلول محتوی آنتی‌بادی (چه مونوکلونال و چه پلی‌کلونال) علیه این پروتئین انکوبه می‌شود. آنتی‌بادی به‌طور اختصاصی به پروتئین اتصال می‌یابد، و پس از شست‌وشو، موقعیت پروتئین با مشاهده آنتی‌بادی می‌تواند توسط میکروسکوپ نوری یا الکترونی، تشخیص داده شود. آنتی‌بادی‌ها معمولاً با ترکیبات فلورسنت، پراکسیداز یا فسفاتاز قلیایی برای شناسایی هیستوشیمیایی، یا با ذرات طلا که الکترون دنس هستند، جهت مشاهده در میکروسکوپ الکترونی TEM، نشان‌دار می‌شوند.

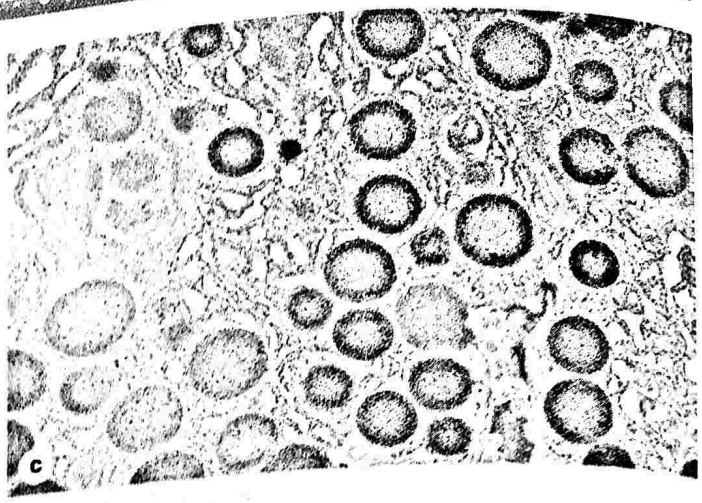
همان‌طور که در شکل ۱۱-۱ نشان داده شده است، دو روش ایمونویستوشیمی مستقیم و غیرمستقیم وجود دارد*. در روش ایمونوسیتوشیمی مستقیم، آنتی‌بادی نشان‌دار مستقیماً به پروتئین موردنظر متصل می‌شود.

روش ایمونوسیتوشیمی غیرمستقیم شامل کاربرد متوالی دو آنتی‌بادی و مراحل شستشوی اضافی می‌باشد. آنتی‌بادی (اولیه) که به صورت اختصاصی به پروتئین موردنظر متصل می‌شود نشاندار نمی‌گردد و برچسب قابل آشکارسازی به آنتی‌بادی ثانویه که در گونه جانوری متفاوت (بیگانه) با گونه‌ای که در آن آنتی‌بادی اولیه تولید شده است، متصل می‌گردد. به عنوان مثال آنتی‌بادی اولیه‌ای که توسط لنفوسیت‌های موش به‌وجود می‌آید (مانند بیشتر آنتی‌بادی‌های مونوکلونال) به‌صورت اختصاصی مورد شناسایی قرار می‌گیرد و به آنتی‌بادی که در بدن بز یا خرگوش که در اثر تزریق ایمونوگلوبولین آنتی‌بادی موش ایجاد شده است، متصل می‌گردد.

روش غیرمستقیم به‌طور گسترده در تحقیقات و آزمایشات پاتولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا این روش بسیار حساس است، و با مراحل اضافی اتصال آنتی‌بادی به تقویت سیگنال قابل‌مشاهده کمک می‌کند. به

* مترجم: استفاده از کمپلکس آنتی‌ژن - آنتی‌بادی برای شناسایی پروتئین‌های خاص در مقاطع بافتی اصطلاحاً ایمونوهیستوشیمی و در کشت سلولی اصطلاحاً ایمونوسیتوشیمی نامیده می‌شود.





روش‌های ایمونوهیستوشیمی برای مکان‌یابی پروتئین‌های خاص در سلول‌ها می‌توانند توسط میکروسکوپ نوری یا TEM با نشانه‌های مختلف انجام شوند.

(a) یک سلول منفرد رحمی کشت داده شده و با مواد فلورسنت رنگ‌آمیزی شده، شبکه‌ای از فیلامان‌های حد واسط (سبز) که در تمام سیتوپلاسم آن مشخص می‌باشد. آنتی‌بادی‌های اولیه علیه پروتئین فیلامان دسمین ساخته شده و آنتی‌بادی ثانویه که با فلورسین ایزوتیوسیانات (FITC) نشانه‌گذاری شده در تکنیک رنگ‌آمیزی غیرمستقیم مورد استفاده قرار گرفته‌اند. هسته با DAPI به رنگ آبی روشن دیده می‌شود (۶۵۰ ×).

(b) مقطعی از رودهٔ باریک که توسط آنتی‌بادی علیه آنزیم لیزوزیم رنگ‌آمیزی شده است. آنتی‌بادی ثانویه که توسط پراکسیداز نشان‌دار شده بعداً مورد استفاده قرار می‌گیرد که محل‌های مورد شناسایی با سوبسترای پراکسیداز DAB ۳ و ۳′ دی‌آمینوبنزیدین به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند. در این روش ساختارهای حاوی لیزوزیم در ماکروفاژهای پراکنده و مجموعهٔ وسیعی از سلول‌ها دیده می‌شود. هسته‌ها با هماتوکسیلین رنگ شده‌اند (۱۰۰ ×).

(c) یک مقطع از سلول‌های پانکراس در TEM که با آنتی‌بادی علیه آنزیم آمیلاز انکوبه شده و سپس با پروتئین A که با ذرات طلا جفت شده آمیخته می‌شود. پروتئین A تمایل بالایی به مولکول‌های آنتی‌بادی دارد و نتیجه آن مشخص‌شدن آنزیم‌های آمیلاز است که با ذرات طلا نشان‌دار شده و تصویر حاصل به صورت نقاط سیاه بسیارکوچک برروی گرانول‌های ترشحی و گرانول‌های درحال تکامل (چپ) دیده می‌شود با ویژگی مولکول‌های ایمونوگلوبولین پروتئین A نشان دار شده برای مکان‌یابی هر نوع آنتی‌بادی اولیه استفاده می‌شود (۵۰۰۰ ×).

علاوه، همین آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار می‌توانند در مطالعات مربوط به آنتی‌بادی‌های اولیه مختلف (اختصاصی برای آنتی‌ژن‌های متفاوت) به کار روند، به شرطی که تمامی اینها در یک گونهٔ جانوری ساخته شوند. روش‌های غیر مستقیم دیگری وجود دارند که در آنها از مولکول‌های حد واسط دیگری نظیر تکنیک بیوتین ـ آویدین استفاده می‌شود که به تقویت آشکارسازی سیگنال‌ها هم کمک می‌کند.

مثال‌هایی از ایمونوسیتوشیمی غیرمستقیم در شکل ۱۲-۱ آمده است. این شکل استفاده از این روش را با سلول‌های محیط کشت یا پس از مقطع‌گیری بافت برای بررسی با میکروسکوپ نوری یا TEM نشان می‌دهد.

» کاربرد پزشکی

به علت این‌که سلول‌ها در برخی از بیماری‌ها مانند سلول‌های سرطانی، پروتئین‌های اختصاصی آن بیماری را تولید می‌کنند، ایمونوسیتوشیمی توسط پاتولوژیست‌ها جهت تشخیص بسیاری از این

جدول ۱-۱ نمونه‌هایی از آنتی‌ژن‌های اختصاصی با اهمیت تشخیصی آنها.

آنتی‌ژن	تشخیص
سیتوکراتین‌های خاص	تومورهایی با منشأ اپی تلیال
هورمون‌های پروتئینی و پلی پپتیدی	تومورهای اندوکرینی
آنتی‌ژن کارسینوامبریونیک (CEA)	تومورهای غددی، عمدتاً در دستگاه گوارش و پستان
گیرنده‌های هورمون استروئیدی	تومورهای سلول‌های مجاری پستان
آنتی‌ژن‌های تولید شده توسط ویروس‌ها	عفونت‌های ویروسی خاص

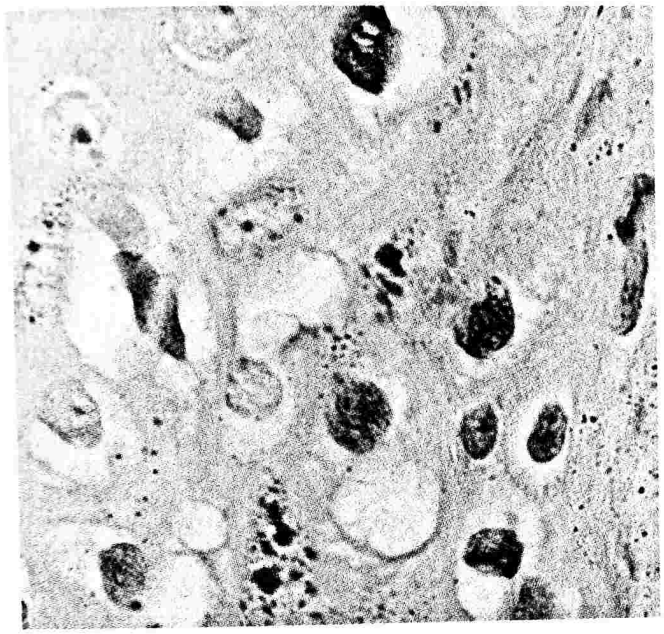
بیماری‌ها استفاده می‌شود که شامل انواع مشخص تومورها و برخی سلول‌های آلوده به ویروس می‌باشد. جدول ۱-۱ برخی از کاربردهای معمول روش‌های ایمونوسیتوشیمی را در طب بالینی نشان می‌دهد.

تکنیک‌های هیبریدیزاسیون (دورگه‌سازی)

دورگه‌سازی عبارت است از ایجاد پیوند اختصاصی میان دو رشته منفرد اسیدهای نوکلئیک در صورتی که این رشته‌ها مکمل یکدیگر باشند. هرچه شباهت میان توالی رشته‌های مکمل بیشتر باشد، مولکول‌های هیبرید دورشته‌ای راحت‌تر تشکیل می‌شوند. بدین ترتیب، روند دورگه‌سازی امکان شناسایی اختصاصی توالی‌ها در ژن‌ها یا RNA را مهیا می‌کند. هیبریداسیون می‌تواند با RNA یا DNA سلولی انجام شود زمانی که محلول حاوی توالی اسید نوکلئیک به‌طور مستقیم به درون سلول و مقاطع بافتی وارد می‌شود. به این روش هیبریدیزاسیون درجا (ISH) (In situ hybridizatian) می‌گویند.

این تکنیک ایده‌آل است برای: (۱) تعیین اینکه آیا یک سلول دارای توالی ویژه از DNA مانند ژن یا بخشی از ژن می‌باشد (شکل ۱۳-۱)، (۲) شناسایی سلول‌هایی که حاوی RNAهای پیامبر (mRNA) خاصی می‌باشند (که ژن موردنظر از آن ترجمه گردد)، (۳) شناسایی محل یک ژن در یک کروموزوم خاص. DNA و RNA سلول‌ها ابتدا باید توسط گرما و یا مواد دیگر دناتوره شده و بصورت تک رشته‌ای در آیند و توالی‌های نوکلئوتید موردنظر توسط پروب‌ها (probs) که شامل تک‌زنجیره مکمل (cDNA) DNA هستند، آشکار شوند. پروب از طریق PCR و یا روش‌های شیمیایی (برای رشته‌های کوتاه) سنتز می‌شود. این پروب را می‌توان از طریق نوکلئوتیدهای رادیواکتیو (که

شکل ۱۳-۱ هیبریدیزاسیون درجا (ISH).



هیبریدیزاسیون درجای این مقطع بافتی با پروب‌های مربوط به پاپیلوماویروس انسانی (HPV)، وجود تعداد زیادی سلول آلوده به ویروس را نشان می‌دهد. این مقطع در یک محلول حاوی پروب cDNA نشان‌دار شده با digoxygenin برای DNA مربوط به HPV انکوبه می‌شود. سپس پروب توسط ایمونوهیستوشیمی مستقیم با استفاده از آنتی‌بادی‌های نشان‌دار توسط پراکسیداز علیه digoxygenin قابل مشاهده می‌باشد. در این روش سلول‌هایی که حاوی HPV هستند به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند (۴۰۰ × ؛ H&E).

از طریق اتورادیوگرافی قابل شناسایی است) و یا با ترکیباتی مانند digoxygenin (که با روش‌های ایمونوسیتوشیمی شناسایی می‌شود) نشان‌دار کرد. محلول حاوی پروب بر روی نمونه برای مدت زمان لازم (جهت دورگه‌سازی) قرار داده می‌شود. سپس آن را شستشو می‌دهند و پروب‌هایی که باند نشده‌اند، شسته شده و محل پروب‌های هیبرید از طریق برچسب‌شان مشخص می‌گردد.

» کاربرد پزشکی

زگیل‌ها در پوست نواحی تناسلی و جاهای دیگر به دلیل عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) به وجود می‌آیند که رشد تکثیری خوش‌خیم شاخص را ایجاد می‌کند. همان‌طور که در شکل ۱۲-۱ آمده، چنین سلول‌های آلوده به ویروس را با ISH می‌توان بررسی کرد. به علاوه، برخی سلول‌های سرطانی که ژن‌های اختصاصی منحصربه‌فرد یا با بروز بیشتر دارند و همچنین در تومورها قرار دارند، به روش ISH قابل بررسی هستند.

تفسیر ساختارها در مقاطع بافتی

یک نکته کلیدی که هنگام مطالعه و تفسیر مقاطع بافتی رنگ‌آمیزی شده در آماده‌سازی میکروسکوپی باید به خاطر سپرده شود، آن است که فرآورده مشاهده شده نتیجه نهایی تعدادی فرآیند است که با جمع‌آوری بافت آغاز شده و با قرار دادن و چسباندن لامل روی لام خاتمه می‌یابند. مراحل مختلف این روند می‌تواند موجب ایجاد آشفتگی و تغییر شکل در بافت شود که به آنها آرتیفکت می‌گویند و تصویری فراهم می‌کنند که در بافت‌های زنده وجود ندارند.

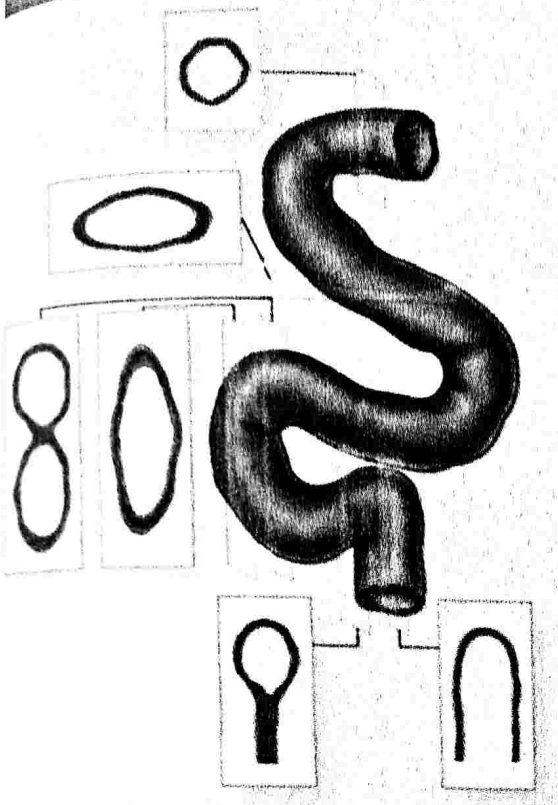
یکی از دلایل ایجاد آرتیفکت، چروکیدگی جزیی سلول‌ها یا بافت بر اثر استفاده از فیکساتیو، اتانول، و حرارت موردنیاز برای قالب‌گیری در پارافین است. یکی از نتایج چروکیدگی ایجاد فضاهای مصنوعی در بین سلول‌ها و سایر اجزای بافتی است. یکی دیگر از علل پیدایش فضاهای مصنوعی ازدست‌رفتن مولکول‌هایی مانند لیپیدها یا مواد با وزن مولکولی پایین است که توسط ماده فیکساتیو به‌خوبی در بافت حفظ نشده‌اند یا طی روندهای آب‌گیری و شفاف‌سازی برداشته شده‌اند. شکستگی در بافت هم ممکن است به‌صورت فضاهای بزرگ دیده شود.

سایر آرتیفکت‌ها عبارتند از: موج برداشتن مقطع (که ممکن است با ساختارهای خطی در بافت اشتباه شود) و رسوبات رنگ (که می‌توانند با ساختارهای سلولی مثل گرانول‌های سیتوپلاسمی اشتباه شود). دانشجویان باید از وجود آرتیفکت‌ها آگاه باشند و سعی کنند آنها را تشخیص دهند، به گونه‌ای که این آشفتگی‌ها آنها را گمراه نکند.

یک مشکل دیگر در مطالعه مقاطع بافت‌شناسی عدم امکان رنگ‌آمیزی افتراقی کلیه اجزای بافتی برروی یک لام است. یک رنگ‌آمیزی واحد به ندرت می‌تواند همهٔ هسته‌ها، میتوکندری‌ها، لیزوزوم‌ها، غشاهای پایه، الیاف الاستیک و غیره را به خوبی نمایش دهد. هنگام مشاهده سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری، قبل از ایجاد یک ایده در مورد تمام ترکیبات و ساختار یک سلول یا بافت لازم است بافت آماده‌سازی شده به وسیله روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی شود. از سوی دیگر، میکروسکوپ الکترونی عبوری مشاهده یک سلول با تمام ارگانل‌ها و انکلوزیون‌های آن را که با اجزای ماتریکس خارج‌سلولی احاطه شده‌اند، امکان‌پذیر می‌کند. اما سلول‌های کمی در یک بافت در این نمونه‌های کوچک قابل‌مطالعه خواهند بود.

در نهایت هنگامی که از یک حجم سه‌بعدی مقاطع بسیار نازک تهیه شود، به نظر می‌رسد که مقاطع فقط دو بعد دارند: طول و عرض. هنگامی که یک مقطع زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شود، همواره باید این تصویر را در ذهن داشته باشیم که ممکن است در جلو یا عقب آن چیزی ازدست رفته باشد، چون بسیاری از ساختارهای بافت ضخیم‌تر از مقطع ایجاد شده هستند. ساختارهای گرد در میکروسکوپ ممکن است به صورت قسمت‌هایی از کره یا لوله دیده شوند. از آنجا که ساختارهای موجود در بافت دارای راستاهای متفاوتی هستند، ساختار دوبعدی آنها بستگی به محل برش دارد. یک لوله مارپیچ در یک مقطع به صورت تعداد زیادی ساختارهای مدور یا بیضی‌شکل مشاهده می‌شود (شکل ۱۴-۱).

شکل ۱۲-۱ تفسیر ساختارهای سه‌بعدی در مقاطع بافتی دوبعدی



ساختارهای سه‌بعدی در مقاطع نازک تنها دو بعد دارند. این تصاویر باید به‌طور صحیح تفسیر شوند تا ساختار واقعی بافت و اجزای یک ارگان قابل درک شود. برای نمونه عروق خونی و دیگر ساختارهای لوله‌ای در برش‌ها گرد یا بیضوی شکل دیده می‌شوند که سایز و شکل آنها به زاویه‌ی عرضی یا مایل برش بستگی دارد. لوله‌های به‌شدت پیچ‌خورده به‌صورت ساختارهای متعدد مدور یا بیضی دیده خواهند شد. در TEM، ساختارهای مدور ممکن است مربوط به اندامک‌های کروی یا برش‌های عرضی اندامک‌هایی نظیر میتوکندری باشند. این نکته مهم است که مهارت‌های تفسیری بالا رود تا بافت و مورفولوژی سلولی در نمونه‌های میکروسکوپی قابل فهم و درک گردد.

بافت‌شناسی و روش‌های مطالعه آن خلاصه‌ای از نکات کلیدی

آماده‌سازی بافت جهت مطالعه

- فیکساتیوهای شیمیایی مانند فرمالین جهت **حفظ و نگهداری ساختار بافتی** از طریق ایجاد اتصال متقاطع و دناتوره‌کردن پروتئین‌ها، غیرفعال‌کردن آنزیم‌ها و جلوگیری از اتولیز سلولی و خودهضمی استفاده می‌شوند.
- **دهیدراته‌کردن** بافت فیکس شده در الکل و پاکسازی آن در حلال‌های آلی آن را برای **قالب‌گیری و برش‌گیری** آماده می‌کند.
- قالب‌گیری در پارافین یا اپوکسی رزین اجازه می‌دهد تا از بافت برش‌های بسیار نازکی با **میکروتوم** تهیه گردد.
- مقاطع بر روی لام شیشه‌ای جهت **رنگ‌آمیزی** چسبانده می‌شود، تا برای رنگ‌آمیزی آماده گردد. جهت آشکار ساختن اجزای سلولی و بافتی در زیر میکروسکوپ این عمل موردنیاز است.
- رایج‌ترین روش رنگ‌آمیزی ترکیب رنگ **هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)** است، که به‌ترتیب به‌عنوان رنگ‌های بازی و اسیدی عمل می‌کند.
- مواد سلولی با بار منفی خالص (آنیونیک) مانند DNA و RNA، به‌شدت با رنگ‌های بازی و هماتوکسیلین رنگ می‌پذیرند، به چنین موادی «**بازوفیل**» گفته می‌شود.
- مواد کاتیونی، مثل کلاژن و بسیاری از پروتئین‌های سیتوپلاسمی با ائوزین و بسیاری از رنگ‌های اسیدی واکنش می‌دهند که به آنها «**اسیدوفیل**» گفته می‌شود.

میکروسکوب نوری

- **میکروسکوپ زمینه روشن:** رایج‌ترین میکروسکوپی که هم توسط دانشجویان و هم توسط پاتولوژیستها استفاده می‌شود. در این میکروسکوپ از نور معمولی استفاده می‌شود و رنگ‌ها به‌داخل بافت ازطریق رنگ‌آمیزی بافتی وارد می‌شوند.
- **میکروسکوپ فلوروسنت:** از نور فرابنفش استفاده می‌کند و مولکول‌های فلوروسنت در آن قابل مشاهده هستند. این میکروسکوپ امکان مکان‌یابی پروب‌های فلوروسنت را می‌دهد و بسیار اختصاصی‌تر از روش‌های معمولی رنگ‌آمیزی است.
- **میکروسکوپ فازکنتراست:** از ضرایب شکست متفاوتی در اجزای بافتی و سلولی استفاده می‌کند تا تصویری بدون رنگ‌آمیزی ایجاد کند و امکان مشاهده سلول‌های زنده را فراهم می‌نماید.
- **میکروسکوپ هم‌کانون:** شامل اسکن کردن نمونه در سطوح کانونی متوالی با نور مرئی کانونی شده، که غالباً لیزر است، می‌باشد. عمل این میکروسکوپ تولید تصویر سه‌بعدی 3D بازسازی شده از تصاویر است.

اتورادیوگرافی

- این روش محل ساخت اجزاء مختلف سلول را با استفاده از **پیش‌سازهای رادیواکتیو** نشان می‌دهد. با آشکارسازی ذرات نقره تولیدشده توسط تابش ضعیف رادیواکتیو در یک

امولسیون فتوگرافیک پوشاننده مقطع بافت یا سلول‌ها ردیابی می‌شود.

- با میکروسکوپ نوری یا TEM، اتورادیوگرافی امکان مطالعه روند رشد بافتی را فراهم می‌سازد (که با استفاده از پیش‌ساز رادیواکتیو DNA است) یا این‌که مسیرهای سلولی سنتز ماکرومولکول‌ها را آشکار می‌سازد.

کشت سلولی و بافتی

- سلول‌ها توانایی رشد در شرایط in vitro را از بافت‌های تازه **کشت شده** (کشت اولیه) یا از ردیف‌های سلولی از قبل تولید شده را دارند و این قابلیت وجود دارد که در حالت زنده به‌وسیله میکروسکوپ فازکنتراست بررسی شوند.

هیستوشیمی آنزیمی

- **تکنیک‌های هیستوشیمیایی (یا سیتوشیمیایی)** از فعالیت‌های آنزیمی اختصاصی در برش‌های بافتی فیکس نشده یا خیلی ضعیف فیکس شده استفاده می‌کند تا محصولات قابل مشاهده‌ای در جایگاه اختصاصی آنزیم تولید کند.
- فیکس‌کردن و قالب‌گیری پارافین بسیاری از آنزیم‌ها را دناتوره می‌کند بنابراین برای مطالعات هیستوشیمی معمولاً برش‌های انجمادی تهیه شده با **کرایوستات** استفاده می‌شود.
- آنزیم‌ها جهت مطالعات هیستوشیمی طبقه‌بندی می‌شوند و شامل فسفاتازها، دهیدروژنازها و پراکسیدازها هستند. پراکسیدازها اغلب به آنتی‌بادی متصل می‌شوند و جهت ایمونوهیستوشیمی استفاده می‌شوند.

مشاهده مولکول‌های اختصاصی

- برخی مواد به‌طور اختصاصی به هدف‌های مشخصی در سلول متصل می‌شوند.
- **ایمونوهیستوشیمی** براساس واکنش‌های ویژه‌ای بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی است که با مارکرهای قابل مشاهده‌ای برچسب شده‌اند. اغلب از ترکیبات فلورسنت یا پراکسیداز برای میکروسکوپ نوری و از ذرات طلا برای میکروسکوپ الکترونی استفاده می‌شود.
- اگر آنتی‌ژن سلول یا بافت موردنظر از طریق اتصال مستقیم به **آنتی‌بادی اولیه** نشان‌دار اختصاصی آن آنتی‌ژن در مورد شناسایی قرار گیرد، این روش را **ایمونوهیستوشیمی مستقیم** می‌نامند.
- **ایمونوهیستوشیمی غیرمستقیم** از آنتی‌بادی اولیه نشان‌دار نشده استفاده می‌کند که به همراه **آنتی‌بادی ثانویه** نشان‌دار شده با آنتی‌ژن خود متصل می‌شود.
- روش ایمونوهیستوشیمی غیرمستقیم کاربرد بیشتری دارد زیرا آنتی‌بادی اضافه شده سیگنال آشکار شده را تقویت می‌کند و انعطاف‌پذیری تکنیکی بیش‌تری دارد.
- توالی ژنی اختصاصی یا mRNA سلولی می‌توانند با استفاده از لیبل کردن توالی DNA مکمل (cDNA) به‌صورت پروب در میکروسکوپ مشاهده گردد که به این روش تکنیک هیبریدیزاسیون درجا یا (ISH) گفته می‌شود.

تفسیر ساختارها در برش‌های بافتی

- بسیاری از مراحل آماده‌سازی بافتی، مثل آماده کردن لام و رنگ‌آمیزی ممکن است **آرتیفکت‌های** خفیفی مثل فضاهای کاذب یا رسوب اضافی ایجاد کنند که در شرایط نرمال آنها در بافت موجود زنده وجود ندارد و باید تشخیص داده شوند.
- برش‌های سلولی یا بافتی به جای این‌که سه‌بعدی باشند اغلب دوبعدی هستند و فهم این حقیقت جهت تفسیر صحیح و مطالعه آنها ضروری می‌باشد.

بافت‌شناسی و روش‌های مطالعه آن ارزیابی دانش خود

۱. در آماده‌سازی بافت‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری، کدام مرحله بلافاصله قبل از شفاف کردن نمونه با یک حلال آلی است؟
الف) آب‌گیری
ب) فیکساسیون
ج) رنگ‌آمیزی
د) شفاف‌سازی
ه) قالب‌گیری

۲. کدام یک از روش‌های رنگ‌آمیزی به ویژگی‌های کاتیونی و آنیونی مواد رنگ‌آمیزی‌شونده بستگی دارد؟
الف) هیستوشیمی آنزیمی
ب) واکنش PAS
ج) رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین
د) ایمونوهیستوشیمی
ه) تکنیک‌های تلقیح فلز

۳. در میکروسکوپ نوری مورد استفاده برای بافت‌شناسی، قدرت تفکیک و بزرگ‌نمایی سلول‌ها عمدتاً به کدام بخش وابسته است؟
الف) متراکم‌کننده
ب) عدسی شیئی
ج) عدسی چشمی یا قطعه چشمی
د) لام نمونه
ه) کنترل شدت نور

۴. ذخایر سلولی گلیکوژن که یک پلی‌ساکارید آزاد است، توسط

کدام روش به بهترین نحو قابل شناسایی است؟
الف) اتورادیوگرافی
ب) میکروسکوپ الکترونی
ج) هیستوشیمی آنزیمی
د) رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین
ه) واکنش PAS

۵. اضافه کردن فلزات سنگین به محلول فیکساتیو و مقطع‌گیری‌های بسیار نازک بافت قالب‌گیری شده با چاقوی شیشه‌ای در کدام روش بافت‌شناسی استفاده می‌شوند؟
الف) میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)
ب) میکروسکوپ فلوروسنت
ج) هیستوشیمی آنزیمی
د) میکروسکوپ هم‌کانون
ه) میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)

۶. به کدام دلیل قدرت تفکیک میکروسکوپ الکترونی از میکروسکوپ نوری بسیار بیشتر است؟
الف) طول موج پرتوهای الکترونی از پرتو نوری کمتر است.
ب) عدسی‌های میکروسکوپ الکترونی کیفیت بالاتری دارند.
ج) برای میکروسکوپ الکترونی مقطع بافتی نیاز به رنگ‌آمیزی ندارد.
د) بزرگ‌نمایی میکروسکوپ الکترونی از میکروسکوپ نوری بیشتر است.
ه) میکروسکوپ الکترونی نسبت به میکروسکوپ نوری به صورت ظریف‌تری قابل کنترل است.

۷. روش اتورادیوگرافی که از خاصیت رادیواکتیویته استفاده می‌کند، برای مطالعه چه ویژگی‌هایی از مقطع بافتی قابل استفاده است؟
الف) انواع آنزیم‌های یافت شده در قسمت‌های مختلف سلول
ب) مکان‌های سلولی که ماکرومولکول‌های متعدد در آن ساخته می‌شوند.
ج) توالی mRNA تولیدشده در سلول
د) ابعاد ساختارهای داخل‌سلولی
ه) مکان ژن‌هایی که mRNA خاصی از روی آنها رونویسی می‌شود

۸. برای تشخیص و مکان‌یابی پروتئین خاص در داخل سلول یا ماتریکس خارج سلولی بهتر است از کدام روش استفاده شود؟
الف) اتورادیوگرافی
ب) هیستوشیمی آنزیمی
ج) ایمونوهیستوشیمی
د) میکروسکوپ الکترونی عبوری
ه) میکروسکوپ پلاریزه

۹. هیبریدیزاسیون درجا در بافت‌شناسی برای نشان دادن کدام ماکرومولکول استفاده می‌شود؟
الف) پروتئین‌ها
ب) کربوهیدرات‌ها
ج) آنزیم‌های خاص
د) اسیدهای نوکلئیک
ه) لیپیدها

۱۰. آزمایشگاه‌های بیمارستان‌ها مرتباً از نمونه‌های فیکس نشده، منجمد شده و مقطع‌خورده در محفظه سرما (cryostat) برای رنگ‌آمیزی سریع، بررسی میکروسکوپی و تشخیص شرایط پاتولوژیک استفاده می‌کنند. علاوه بر این که مقاطع منجمد، زمان زیادی را که برای فیکس کردن و قالب‌گیری در پارافین تلف می‌شود، ذخیره می‌کند، امکان مطالعه کدام ماکرومولکول‌ها را فراهم می‌آورد که به‌طور معمول با پارافین از بین می‌روند؟
الف) کربوهیدرات‌ها
ب) mRNA کوچک
ج) پروتئین‌های بازی
د) پروتئین‌های اسیدی
ه) لیپیدها