ویرایش شانزدهم ۲۰۲۱

جان کوئیرا

بافت‌شناسی پایه

تألیف

آنتونی ل. مشر

ترجمه

دکتر سیدمهدی منتظری

دکتر محمدهادی بهادری

استاد بافت‌شناسی و جنین‌شناسی

دانشگاه علوم پزشکی گیلان

دکتر علی بیدختی

زیر نظر

دکتر مسلم بهادری

استاد آسیب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران

کتاب ارجمند

فهرست

فصل ۱: بافت‌شناسی و روشهای مطالعه در آن ۱۱

آماده‌سازی بافتها برای مطالعه ۱۲

مطالعه با میکروسکوپ نوری ۱۶

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی ۲۱

اتورادیوگرافی ۲۳

کشت سلول و بافت ۲۴

شیمی بافتی آنزیمی ۲۵

نمایان‌سازی مولکولهای خاص ۲۶

تفسیر ساختارهای موجود در برشهای بافتی ۳۱

فصل ۲: سیتوپلاسم ۳۷

تمایز سلولی ۳۷

غشای پلاسمایی ۳۸

اندامک‌های سیتوپلاسمی ۵۲

اسکلت سلولی (The Cytoskeleton) ۷۱

انکلوزیونها ۷۹

فصل ۳: هسته ۹۰

اجزای هسته ۹۰

چرخهٔ سلولی ۱۰۰

میتوز ۱۰۳

سلول‌های بنیادی و بازسازی بافت ۱۰۶

میوز ۱۰۷

آپوپتوز ۱۰۹

فصل ۴: بافت اپی‌تلیال ۱۱۵

ویژگی‌های خاص سلول‌های اپی‌تلیال ۱۱۶

ساختمان‌های اختصاصی سطح رأسی سلول ۱۲۴

انواع اپی‌تلیوم‌ها ۱۲۹

انتقال از خلال اپی‌تلیوم‌ها ۱۴۰

بازسازی سلول‌های اپی‌تلیال ۱۴۳

فصل ۵: بافت همبند ۱۴۹

سلول‌های بافت همبند ۱۵۰

رشته‌ها ۱۵۹

مادهٔ زمینه‌ای ۱۶۹

انواع بافت همبند ۱۷۴

فصل ۶: بافت چربی ۱۸۴

بافت چربی سفید ۱۸۵

بافت چربی قهوه‌ای ۱۹۰

فصل ۷: غضروف ۱۹۵

غضروف هیالن ۱۹۷

غضروف الاستیک (ارتجاعی) ۲۰۰

غضروف فیبری ۲۰۱

تولید، رشد و ترمیم غضروف ۲۰۲

فصل ۸: استخوان ۲۰۸

سلول‌های استخوانی ۲۱۱

ماتریکس استخوانی ۲۱۵

پریوستئوم (ضریع) و آندوستئوم ۲۱۷

انواع استخوان ۲۱۷

ساخت استخوان ۲۲۱

قالب‌گیری مجدد و ترمیم استخوان ۲۲۹

نقش متابولیک استخوان ۲۳۱

مفاصل ۲۳۲

فصل ۹: بافت عصبی و دستگاه عصبی ۲۴۱

تکامل بافت عصبی ۲۴۴

نورون‌ها ۲۴۴
سلول‌های گلیال و فعالیت نورونی ۲۵۴
دستگاه عصبی مرکزی ۲۶۰
دستگاه عصبی محیطی ۲۶۸
قالب‌پذیری و ترمیم بافت عصبی ۲۷۸

فصل ۱۰: بافت عضلانی ۲۸۴
عضله اسکلتی ۲۸۵
عضله قلبی ۳۰۲
عضله صاف ۳۰۶
ترمیم بافت عضلانی ۳۰۹

فصل ۱۱: دستگاه گردش خون ۳۱۴
قلب ۳۱۶
بافتهای دیوارهٔ رگ ۳۲۰
تشکیلات رگی (Vasculature) ۳۲۳
دستگاه رگهای لنفاوی ۳۳۸

فصل ۱۲: خون ۳۴۴
ترکیب پلاسما ۳۴۶
سلول‌های خونی ۳۴۷

فصل ۱۳: خون‌سازی ۳۶۷
سلول‌های بنیادی، فاکتورهای رشد و تمایز ۳۶۷
مغز استخوان ۳۷۱
بلوغ اریتروسیت‌ها ۳۷۳
بلوغ گرانولوسیت‌ها ۳۷۵
بلوغ آگرانولوسیت‌ها ۳۷۸
منشأ پلاکت‌ها ۳۷۹

فصل ۱۴: دستگاه ایمنی و اندام‌های لنفوئید ۳۸۴
ایمنی ذاتی و تطبیقی ۳۸۵
سیتوکین‌ها ۳۸۷
آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها ۳۸۸
ارائهٔ آنتی‌ژن ۳۹۰
سلول‌های ایمنی تطبیقی ۳۹۲
تیموس ۳۹۸
بافت لنفوئید متصل به مخاط (MALT) ۴۰۳
عقده‌های لنفی (Lymph Nodes) ۴۰۵
طحال ۴۱۲

فصل ۱۵: دستگاه گوارش ۴۲۳
ساختمان عمومی مجرای گوارش ۴۲۳
حفره دهانی ۴۲۶
مری ۴۳۷
معده (Stomach) ۴۳۷
رودهٔ کوچک ۴۴۸
رودهٔ بزرگ ۴۵۶

فصل ۱۶: اندامهای ضمیمهٔ دستگاه گوارش ۴۶۶
غدد بزاقی ۴۶۶
پانکراس ۴۷۱
کبد ۴۷۵
مجاری صفراوی و کیسهٔ صفرا ۴۸۷

فصل ۱۷: دستگاه تنفس ۴۹۳
حفرات بینی ۴۹۴
حلق ۴۹۸
حنجره (Larynx) ۴۹۸
نای (Trachea) ۵۰۰
درخت نایژه‌ای و ریه ۵۰۱
تشکیلات عروقی و اعصاب ریه ۵۱۶
پرده‌های جنب ۵۱۷
حرکات تنفسی ۵۱۸

فصل ۱۸: پوست ۵۲۲
اپی‌درم ۵۲۴
درم (Dermis) ۵۳۴
بافت زیرپوستی ۵۳۵
گیرنده‌های حسی ۵۳۵

مو ۵۳۷
ناخنها (Nails) ۵۴۱
غدد پوست ۵۴۱
ترمیم پوست ۵۴۶

فصل ۱۹: دستگاه ادراری ۵۵۲
کلیه‌ها ۵۵۲
گردش خون ۵۵۵
کارکرد کلیوی: پالایش، ترشح، و بازجذب ۵۵۷
حالب‌ها، مثانه، و پیشابراه ۵۷۱

فصل ۲۰: غدد درون‌ریز ۵۷۹
غدهٔ مخاطی (هیپوفیز) ۵۸۱
غدد آدرنال ۵۹۰
جزایر پانکراس ۵۹۶
دستگاه نوروآندوکرین منتشر ۵۹۹
غدهٔ تیروئید ۶۰۰
غدد پاراتیروئید ۶۰۵
غده پینه‌آل یا صنوبری ۶۰۶

فصل ۲۱: دستگاه تولیدمثل مرد ۶۱۳
بیضه‌ها ۶۱۳
مجاری داخل بیضه‌ای ۶۲۶
مجاری تناسلی ترشحی ۶۲۶
غدد ضمیمه ۶۲۹
آلت تناسلی (Penis) ۶۳۴

فصل ۲۲: دستگاه تولیدمثل زن ۶۴۱
تخمدان‌ها ۶۴۱
لوله‌های رحمی ۶۵۶
رویدادهای اصلی لقاح ۶۵۷
رحم (زهدان) ۶۵۸
لانه‌گزینی رویان، دسیدوا، و جفت ۶۶۴
گردن رحم ۶۶۸
واژن (Vagina) ۶۷۰
اندام‌های تناسلی خارجی ۶۷۱
غدد پستانی (Mammary Glands) ۶۷۲

فصل ۲۳: چشم و گوش: اندام‌های حسی ویژه ۶۸۱
چشم‌ها: دستگاه گیرندهٔ نوری ۶۸۱
گوش‌ها: دستگاه دهلیزی ـ شنوایی ۷۰۷

ضمیمه: رنگ‌آمیزی‌های ویژهٔ مطالعه با میکروسکوپ نوری ۷۲۸

نمایه ۷۳۰

به نام خداوند جان و خرد

«زندگی چیست، عشق ورزیدن زندگی را به عشق بخشیدن
زنده است آن که عشق می‌ورزد دل و جانش به عشق می‌ارزد»

دوست دیرینه و گرامی‌ام جناب آقای دکتر سید مهدی منتظری که من او را با کتاب بافت‌شناسی پایهٔ دکتر جان کوئیرا توأمان می‌دانم، به من اطلاع دادند که کتاب و اطلس ویراست شانزدهم (سال ۲۰۲۱) Carlos Junqueira را ترجمه کرده و مایل‌اند که من ضمن مقابله ترجمه و کتاب، پیشگفتاری بر آن بنویسم، و لذا کتاب و بخشی از ترجمه را توسط مؤسسهٔ انتشارات ارجمند برایم فرستادند. بدیهی است با دوستیِ قدیمی که من با هم ایشان و هم دکتر ارجمند داشته و دارم، این اقدام من مطابق سال‌های پیش برای ترجمه‌های آنها ادامه خواهد داشت. من با آغوش باز از این امر استقبال کردم، اگرچه برای سایر مترجمین نیز این گونه پیشگفتارها را نوشته‌ام.

من سال‌ها است با کار علمی آقای دکتر منتظری آشنایی دارم. در سال‌های اولیه ترجمه را سطر به سطر و روبروی هم می‌خواندیم. بعدها که تبحر ایشان به‌طور چشمگیر در ترجمه متون پزشکی افزایش یافت، من دیگر نیازی به مطابقت متن به صورت رو در رو ندیدم، و خودم شخصاً ترجمه‌ها را مرور می‌کنم و در صورت لزوم با اصل کتاب تطبیق می‌دهم. برای ویراست اخیر نیز همین روش را به کار بردم. البته خوانندگان عزیز مطلعند که حقیر در راستای این خدمت فرهنگی (که تاکنون بالغ بر سیصد کتابِ ترجمه‌شده در رشته‌های مختلف علوم پایه و آسیب‌شناسی را در برمی‌گیرد)، دیناری از مترجمین و ناشرین محترم دریافت نکرده و نمی‌کنم. مساعدت من در این زمینه به مضمون دو بیت شعر بالا رایگان می‌باشد.

ویراست جدید بافت‌شناسی پایه که توسط دکتر Mescher تدوین شده است، همانند ویراست‌های گذشته، با دقت و اطمینان کامل و با استفاده از آخرین پژوهش‌ها در زمینه بافت‌شناسی انجام گرفته است. پروفسور Anthony L. Mescher از استادان بنام علوم آناتومی و زیست‌شناسی سلولی دانشکده پزشکی دانشگاه ایندیانای آمریکای شمالی می‌باشند، و وسعت اطلاعات ایشان در Cell Biology معروفیت دارد. در اهمیت کتاب همین بس که با آن که اصل کتاب به زبان اسپانیولی است، تقریباً به تمام زبان‌های علمی برای دانشکده‌های پزشکی جهان ترجمه شده و خصوصاً متن انگلیسی آن بن‌مایهٔ اغلب ترجمه‌ها است. کتاب بافت‌شناسی پایه جان کوئیرا یک متن کلاسیک برای یادگیری بافت‌شناسی در رشته‌های علوم پزشکی است. نویسنده به راحتی دانشجو را از علوم پایه به طرف تفکر بالینی سوق می‌دهد (From Bench To Bed). مؤلف در هر یک از عناوین کتاب پرسش و پاسخ‌های مناسبی را مطرح کرده است که راه‌گشای درک عمیق‌تر از مفاهیم کتاب هستند. کتاب با دارا بودن عکس‌های فراوان و زیرنویس‌های گویا به صورت یک اطلس در اختیار دانشجویان قرار دارد.

من از صمیم قلب کوشش‌های آقای دکتر منتظری را ارج می‌نهم و برای او آرزوی موفقیت می‌نمایم. از زحمات مؤسسهٔ انتشارات ارجمند نیز صمیمانه قدردانی می‌کنم.

دکتر مسلم بهادری
تهران ـ مهرماه ۱۴۰۰

سخن مترجم

«به نام خدا»

کاروان دانش با شتابی روزافزون به پیش می‌رود. سرعت این پیشرفت آنچنان است که اذهان نکته‌سنج را به شگفتی و تحسین وامی‌دارد. دانشمندان خود در برابر تراکم فزایندهٔ کشفیات جدید، به تعبیری «غافلگیر» شده‌اند. امروزه تجهیزات پیشرفته تحقیقاتی که برپایهٔ اصول مهندسی و در راستای مفاهیم پایهٔ فیزیکی – شیمیایی طراحی شده‌اند، با کاهش آستانهٔ حسی و افزایش دقت درک انسان، علوم زیستی را وارد دورهٔ تحولیِ نوینی کرده‌اند که تا چند دهه پیش، به هیچ‌وجه انتظار آن نمی‌رفت. در این دورهٔ انتقالی نوین، ما بایستی آمادگی آن را داشته باشیم که از شنیدن خبر هر پیشرفت معجزه‌آسایی، شگفت‌زده نشویم. تسخیر هستهٔ سلول که دانشمندان علوم زیستی به عنوان آخرین ره‌آورد خویش به بشریت ارزانی داشته‌اند، قابل مقایسه با تسخیر اتم در نیمهٔ اول سده بیستم و تسخیر فضا در نیمه دوم آن می‌باشد. علوم پایهٔ ریاضیات، فیزیک و شیمی، که راهگشای این پیشرفت‌ها بوده‌اند، چون دایه‌ای مهربان این نوزاد (علوم زیستی) را به زیر بال و پر خویش گرفته‌اند.

درمان بیماری‌ها که یکی از اهداف عمدهٔ این دسته از علوم می‌باشد، امروزه در سطح مولکولی و سلولی مطرح می‌باشد. یکی از اساسی‌ترین دانش‌هایی که بیشترین خدمت را در این زمینه به دست‌اندرکاران رشتهٔ پزشکی ارائه نموده‌اند، «بافت‌شناسی» است که به حق آن را «تشریح میکروسکوپی» لقب داده‌اند. بافت‌شناسی نوین، هم‌اکنون چهره‌ای متفاوت با دهه‌های پیشین دارد و با بررسی ویژگی‌های زیرمیکروسکوپی بافت‌ها و مطالعهٔ ریزترین دقایق سلول، زمینه‌ای رو به گسترش در جهت ابداع روش‌های درمانی جدید بر پایهٔ ارتباطات متقابل سلولی و در سطح زیرسلولی فراهم آورده است.

براساس آنچه ذکر شد، دانش بافت‌شناسی (که اساس آسیب‌شناسی را تشکیل می‌دهد) از چنان پویایی‌ای برخوردار است که بدون اغراق می‌توان ادعا کرد روزانه دست‌آوردهای جدیدی به بازار دانش عرضه می‌دارد، و این امر نیاز به تجدیدنظر در کتب مرجع این رشته و انتقال یافته‌های جدید در این زمینه در دوره‌های زمانی روبه کاهش را، توجیه می‌نماید. کتاب «بافت‌شناسی پایه» تألیف Anthony L. Mescher و همکاران که اینجانب به ترجمهٔ آن اقدام نموده‌ام، در این زمینه یکی از «بهترین‌ها» و در نوع خود بی‌نظیر می‌باشد. این کتاب در بسیاری از دانشگاههای جهان، به عنوان «متن مرجع» مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ویراست شانزدهم این کتاب که در سال ۲۰۲۱ میلادی به طبع رسیده است، با ویراستهای قبل تفاوت‌هایی دارد. بازنگری برخی از فصول جهت ارائه اطلاعات تازه و سازمان‌بندی قابل درک این اطلاعات، بازنگری دیاگرامهای پیشین و ارائهٔ تصاویر و دیاگرامهای جدید به روشی هنرمندانه جهت افزایش کارآیی متن کتاب، مشخص نمودن نکات کلیدی در تصاویر و مفاهیم اساسی در برخی از بخش‌های برگزیدهٔ متن کتاب، مشخص‌نمودن ارتباطات بالینی در هر فصل که کاربرد مستقیم اطلاعات پایه بافت‌شناسی را در روندهای تشخیص، پیش‌آگهی، پاتوبیولوژی و جنبه‌های بالینی بیماری‌ها نشان می‌دهند، و افزوده شدن بخش خودآزمایی (پرسش‌های چندگزینه‌ای) به هر فصل جهت ارزیابی آموخته‌های خوانندگان، از ویژگیهای این کتاب می‌باشند که مجموعاً این متن را به عنوان یکی از

کارآمدترین و مفیدترین مراجع قابل دسترس، مطرح می‌نمایند.

ترجمهٔ کتاب فوق با نهایت دقت و وسواس صورت پذیرفته است، و در این زمینه من حداکثر توان خویش را به‌کار گرفته‌ام تا متن در دسترس سلیس، یکدست، بدون خطای علمی و دستوری، و در مجموع قابل اعتماد باشد.

در این فرصت جا دارد که از جناب آقای دکتر مسلم بهادری استاد دپارتمان آسیب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران که با وجود گرفتاری‌های فراوان، ساعاتی از وقت گرانبهای خویش را در اختیار اینجانب گذاشتند و با حوصلهٔ فراوان، تمامی فصول متن ترجمه شده را با اصل کتاب مقایسه و اشکالات احتمالی را برطرف نمودند، صمیمانه تشکر نمایم.

در خاتمه از تمامی دست‌اندرکارانی که سهمی در ارائه سرویس‌های فنی (حروفچینی، صفحه‌بندی، لیتوگرافی، چاپ، صحافی و ...) داشته‌اند، تشکر می‌شود.

امید است که ترجمه فوق برای دانشجویان و سایر دست‌اندرکاران رشتهٔ پزشکی و رشته‌های وابسته مفید و قابل استفاده باشد، و این بهترین پاداش قابل تصور است.

سید مهدی منتظری

پاییز ۱۴۰۰

پیش‌گفتار

انتشار ویرایش شانزدهم بافت‌شناسی پایه با پنجاهمین سالگرد خلق این کتاب توسط دکتر ل. ک. جانکوئیرا و همکاران وی هم‌زمان شده است. نسخهٔ اولیهٔ این کتاب که با جلد نرم چاپ شد فشرده، مختصر و مفید و بسیار خواندنی بود، و در عین حال کتابی جامع بود که به‌سرعت به الگویی بدل شد که سایر کتب بافت‌شناسی و بیولوژی سلولی بر مبنای آن قضاوت می‌شدند. پس از درگذشت دکتر جانکوئیرا، من دعوت انتشارات مک‌گراوهیل را پذیرفتم و تلاش کردم تمام جنبه‌های کتاب را برای استفادهٔ دانشجویان جدید بهبود ببخشم و در عین حال فشردگی و سهولت کتاب را نیز حفظ نمایم. این کتاب که همیشه جزو پرفروش‌ترین‌ها در میان دست‌نامه‌های بافت‌شناسی بوده است، منبعی مختصر و در عین حال جامع حاوی تمام اطلاعات لازم در زمینهٔ ساختار و کارکرد بافت‌های انسانی است. این منبع آموزشی به مدت پنج دهه نیازهای دانشجویان را پاسخ گفته است و با ارائهٔ منظم و خلاصه‌شدهٔ اطلاعات مربوط به بافت‌شناسی و بیولوژی سلولی و ترکیب این اطلاعات با ضروریات رشتهٔ بیوشیمی، ایمنی‌شناسی، غدد درون‌ریز و فیزیولوژی، توانسته بنیانی بی‌نظیر را برای پژوهش‌های بعدی در حوزهٔ پاتولوژی فراهم کند. متن کتاب به‌طور مشخص برای دانشجویان پزشکی و سایر تخصص‌های مراقبت از سلامت، و همچنین پژوهشگران پیشرفتهٔ در حوزهٔ بیولوژی بافت انسانی، تدوین شده است. کتاب بافت‌شناسی پایهٔ جانکوئیرا، به دلیل ارزش علمی آن و مورد استقبال قرار گرفتن از سوی دانشجویان و اساتید، به ده‌ها زبان مختلف ترجمه شده است و در دانشکده‌ای پزشکی در سرتاسر جهان تدریس می‌شود.

برخلاف سایر کتب و اطلس‌های بافت‌شناسی، این ویراست همچنان شامل مجموعه‌ای از پرسش‌های خودآزمایی چندگزینه‌ای در هر فصل است که به خوانندگان امکان می‌دهد درک و دانش خویش درباره موارد مهم آن فصل را مورد ارزیابی قرار دهند. در هر مجموعه شماری از پرسش‌ها مواردی بالینی را مطرح می‌کنند تا زمینه‌ای برای نشان دادن ارتباط طبی مفاهیم در علوم پایه فراهم کنند (براساس توصیه «مجمع ملی آزمون‌های پزشکی ایالات متحده»). همانند ویراست پیشین، هر فصل هم‌چنین محتوی چکیده‌ای از نکات مهم است که به دانشجویان امکان می‌دهد نکات مهم را از نکاتِ با اهمیت کمتر افتراق دهند. در هر فصل جداول خلاصه‌کننده‌ای نیز وجود دارند که به‌منظور تسهیل روند یادگیری توسط دانشجویان، اطلاعات مربوطه را سازماندهی می‌کنند.

من متن تمام فصول را مورد بازنگری قرار داده و یکایک فصول را کوتاهتر کرده و در عین حال اطلاعات جدیدی به آنها افزوده و در موارد لزوم برخی از فصول خاص را توسعه داده‌ام و به‌روز کرده‌ام. مطالعه متن نیز به کمک یک شیوه جدید و طراحی صفحات آسان شده است. در سرتاسر هر فصل پاراگرافهای کوتاه بیشتری گنجانده شده‌اند که نحوه کاربرد طبی اطلاعاتِ ارائه‌شده را نشان می‌دهند و ارتباط بنیادین کاربردهای فوق را با مطالب مربوطه مورد تأکید قرار می‌دهند.

ابداعات هنرمندانه و شکلهای دیگری نیز در هر فصل وجود دارند، که هدف آنها کمک به یادگیری و یکپارچه‌سازی مطالب مربوطه است. تصاویر پزشکی McGraw-Hill که اکنون در سراسر کتاب مورد استفاده قرار گرفته است مفیدترین، کامل‌ترین و جذاب‌ترین نمونه‌ها در میان کتب پزشکی مشابه هستند. میکروگرافهای نوری و الکترونی در سراسر کتاب در صورت لزوم تغییر یافته‌اند، و آنها خود یک اطلس کامل از ساختمان سلولها، بافتها و اندامها تشکیل می‌دهند که با مجموعه لامهای شیشه‌ای یا دیجیتال خود دانشجویان کاملاً برابری می‌کند.
مجموعه‌ای حاوی بیش از ۱۵۰ اسلاید میکروسکوپی از بافت‌ها و اندام انسانی نیز در پیوند زیر در دسترس همگان قرار داده شده است:

http://medsci.indiana.edu/junqueira/virtual/junqueira.htm

همانند ویراست پیشین، این کتاب از طریق سازمان‌بندی زیر روند یادگیری را آسان می‌کند:

- در فصل آغازین تکنیک‌های بافت‌شناسی جهت مطالعه ساختمانهای سلولها و بافتها ارائه شده‌اند.
- سپس دو فصل به بررسی اجمالی سازمان ساختمانی و کارکردی بیولوژی سلولی انسان می‌پردازند.
- هفت فصل بعد به بررسی چهار بافت پایه‌ای می‌پردازند که اندامها را تشکیل می‌دهند: اپی‌تلیومها، بافت همبند (و زیرگونه‌های اصلی آن)، بافت عصبی، و عضله.
- فصول باقیمانده سازمان و اهمیت کارکردی این بافتها در هر یک از دستگاههای بدن را شرح می‌دهند، و با بررسی به‌روزشده سلولها در چشم و گوش پایان می‌پذیرند.

با این ویژگی‌های نوین، من اطمینان دارم که کتاب فوق همچنان یکی از مفیدترین و پرکاربردترین منابع آموزشی در بافت‌شناسی خواهد بود.

Anthony L. Mescher

Indiana University School of Medicine- Bloomington

فصل ۱

بافت‌شناسی و روشهای مطالعه در آن

آماده‌سازی بافتها برای مطالعه
ثابت‌سازی (Fixation)
قالب‌گیری (Embedding) و برش‌دهی
رنگ‌آمیزی (Staining)
مطالعه با میکروسکوپ نوری
مطالعه با میکروسکوپ زمینه‌روشن
مطالعه با میکروسکوپ فلوئورسان
مطالعه با میکروسکوپِ با کنتراست فاز
مطالعه با میکروسکوپ هم‌کانون
مطالعه با میکروسکوپِ با نور پولاریزه
مطالعه با میکروسکوپ الکترونی
مطالعه با میکروسکوپ الکترونی انتقالی
مطالعه با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ
اتورادیوگرافی
کشت سلول و بافت
شیمی بافتی آنزیمی
نمایان‌سازی مولکولهای خاص
ایمونوهیستوشیمی
تکنیک‌های هیبریدیزاسیون (دورگه‌سازی)
تفسیر ساختارهای موجود در برشهای بافتی
چکیدهٔ نکات مهم
خودآزمایی

بافت‌شناسی (histology) عبارت از مطالعه بافتهای اجزای ساختمانی بدن و چگونگی آرایش این بافتها جهت تشکیل اندامها است. این مبحث کلیهٔ جنبه‌های بیولوژی بافتی را در بر می‌گیرد، اما بیشتر بر این نکته متمرکز است که چگونه ساختار و آرایش سلولها موجب می‌شوند هر اندام کارکرد ویژهٔ خویش را به بهترین نحو به انجام برساند.

بافتها از دو جزء که بر هم تأثیر متقابل دارند تشکیل شده‌اند: سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی[1] (ECM). ماتریکس خارج سلولی متشکل از انواع گوناگونی از ماکرومولکولها است که بیشتر آنها ساختارهای پیچیده‌ای (مانند فیبریل کلاژن) تشکیل می‌دهند. ECM از سلول‌ها محافظت می‌کند و محتوی مایعی است که مواد غذایی را به سلول‌ها انتقال می‌دهد و مواد زائد و فرآورده‌های ترشحی آنها را از میان برمی‌دارد. سلولها ECM را به صورت موضعی تولید می‌کنند و به نوبهٔ خود به شدت تحت تأثیر مولکولهای ماتریکس قرار دارند. بسیاری از اجزای ماتریکس به گیرنده‌های سطح سلولی خاصی اتصال می‌یابند که غشاهای سلولی را درمی‌نوردند و به اجزای ساختمانیِ درون سلول‌ها متصل می‌شوند و [بدین ترتیب] پیوستاری (continuum) را تشکیل می‌دهند که در آن سلولها و ECM با همدیگر به صورتی کاملاً هماهنگ عمل می‌کنند.

در خلال روند تکامل (نمو)، سلولها و ماتریکس مربوطه واجد کارکردهای تخصصی می‌شوند و انواع بنیادی بافتها با ویژگی‌های ساختمانی مشخصه را ایجاد می‌کنند. اندامها از ترکیب ویژه و مناسبی از این بافتها تشکیل شده‌اند، و آرایش دقیق این بافتها امکان کارکرد را برای هر اندام و کل ارگانیسم فراهم می‌کند.

اندازهٔ کوچک سلولها و اجزای ماتریکس دانش

1. extracellular matrix

بافت‌شناسی را به کاربرد میکروسکوپ و روش‌های مولکولی مطالعه وابسته می‌سازد. پیشرفت در فراگیری علوم بیوشیمی، بیولوژی مولکولی، فیزیولوژی، ایمنی‌شناسی و آسیب‌شناسی، در دستیابی به دانش بهتری دربارهٔ بیولوژی بافتی اهمیت حیاتی دارد. آشنایی با ابزارها و روشهای هر شاخه از علم، برای درک صحیح موضوع ضروری است. در این فصل روشهای شایع مورد استفاده برای مطالعهٔ سلولها و بافتها، با تمرکز و تأکید بر روش‌های میکروسکوپی، مرور می‌شوند.

آماده‌سازی بافتها برای مطالعه

شایعترین روش پژوهش‌های بافت‌شناختی آماده‌سازی "برشها" یا قطعات بافتی به نحوی است که با گذراندن نور از طریق دیدن قابل مطالعه باشند. از آنجا که بیشتر بافتها و اندامها ضخیم‌تر از آن هستند که بتوانند نور را از خویش عبور دهند، بنابراین مقاطع نازک و شفافی از آنها تهیه و روی لامهای شیشه‌ای قرار داده می‌شوند تا ساختارهای داخلی آنها مورد مطالعهٔ میکروسکوپی قرار گیرند.

یک آمادش میکروسکوپی ایده‌آل طوری حفظ شده است که بافت روی لام همان ویژگی‌های ساختمانی را که در بدن دارا بوده است، داشته باشد. اما این کار در عمل اغلب امکان‌پذیر نیست، زیرا فرآیند آماده‌سازی می‌تواند چربی سلول را از میان بردارد و تغییر شکل (آشفتگی[1]) خفیفی در ساختمان سلول ایجاد کند. مراحل اصلی در آماده‌سازی بافتها جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری در شکل ۱-۱ نشان داده شده‌اند.

ثابت‌سازی (Fixation)

برای حفظ ساختمان بافت و جلوگیری از تجزیهٔ آن به وسیله آنزیمهای حاصل از سلولها یا میکروارگانیسم‌ها، قطعاتی از اندامها هر چه سریعتر بعد از بیرون آوردن از بدن در محلولهای حاوی ترکیبات ثابت‌کننده یا اتصال‌ساز[2] به نام **ثابت‌ساز (fixative)** قرار داده می‌شوند. از آن‌جا که یک ثابت‌ساز باید کاملاً درون بافتها انتشار یابد تا [ساختار] همهٔ سلول‌ها را حفظ کند، بنابراین بافتها معمولاً پیش از روند ثابت‌سازی به قطعات کوچکی بریده می‌شوند تا نفوذ [مادهٔ ثابت‌ساز] تسهیل شود. برای محافظت بیشتر از سلولها در اندامهای بزرگ، ثابت‌سازها اغلب از طریق رگهای خونی [به محل مربوطه] فرستاده می‌شوند؛ در این حالت جریان خون درون رگها موجب می‌شود ثابت‌سازی به سرعت در سراسر بافتها به انجام برسد.

یکی از ثابت‌سازهای پُرکاربرد برای مطالعه با میکروسکوپ نوری عبارت است از فرمالین (یک محلول ایزوتونیک بافرشدهٔ فرمالدئید ۳۷٪). هم این ترکیب و هم گلوتارآلدئید (ثابت‌سازی که برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی مورد استفاده قرار می‌گیرد)، با گروههای آمینِ (NH_2) پروتئینها واکنش نشان می‌دهند و جلوی تجزیهٔ آنها توسط پروتئازهای متداول را می‌گیرند. گلوتارآلدئید هم‌چنین موجب اتصال متقاطع پروتئین‌های مجاور می‌شود و [بدین ترتیب] ساختارهای سلول و ECM را تقویت می‌کند.

میکروسکوپ الکترونی بزرگنمایی و قدرت تمایز (resolution) بسیار زیادتری برای بررسی ساختارهای سلولی بسیار کوچک فراهم کرده است، و دقت در ثابت‌سازی برای حفظ جزئیات بسیار ریز ساختمانی (فراساختاری: ultrastructural) لازم است. معمولاً در این گونه بررسی‌ها بافت [ابتدا] در گلوتارآلدئید پرداخت و سپس در تتراکسید اسمیومِ بافرشده فرو برده می‌شود؛ مادهٔ اخیر موجب حفظ (و رنگ‌آمیزی) چربیها و نیز پروتئینهای سلول می‌شود.

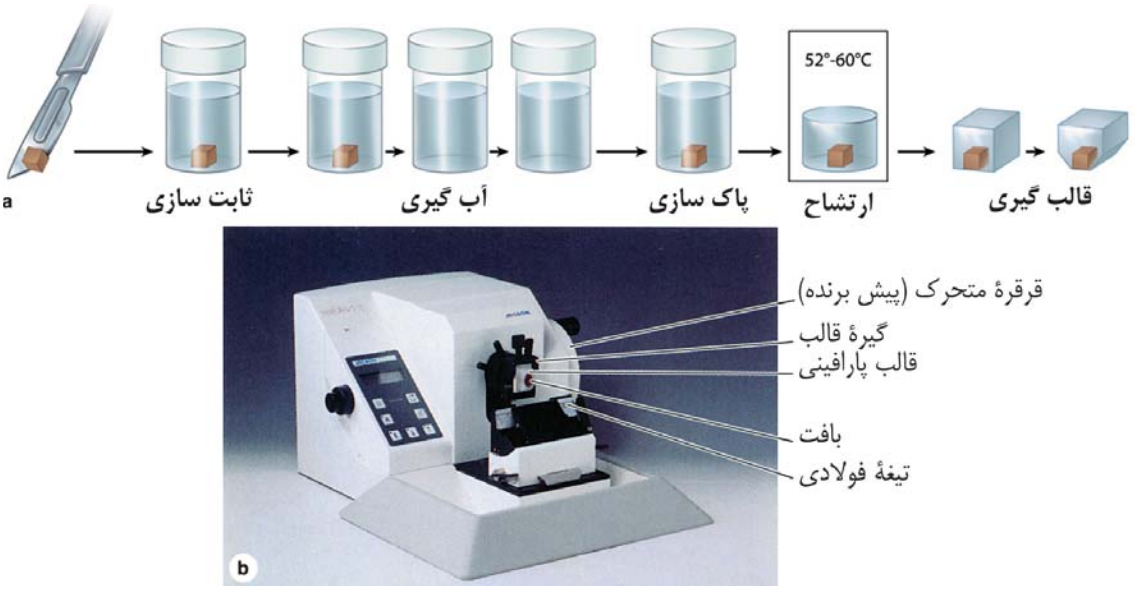
قالب‌گیری (Embedding) و برش‌دهی

برای تهیه برشهای نازک، بافتها پس از ثابت‌سازی باید تحت ارتشاح (infiltration) موادی قرار گیرند که به بافت قوام سخت می‌بخشند. مواد سفت‌کننده شامل پارافین و رزینهای پلاستیکی می‌باشند. پارافین به طور معمول برای مطالعه با میکروسکوپ نوری به کار می‌رود؛ رزین‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری و الکترونی هر دو به کار می‌روند.

پیش از ارتشاح با مواد مذکور، بافتِ ثابت شده باید تحت فرآیند **آب‌گیری (dehydration)** قرار داده شود؛ در این فرآیند، آب بافت از طریق انتقال [پی‌درپی] آن به یک سری از محلولهای اتانول با درجهٔ فزاینده (که به اتانول ۱۰۰٪ ختم می‌شوند) استخراج می‌شود. سپس یک حلالِ آلیِ قابل امتزاج با هم الکل و هم محیط سفت‌کننده، جایگزین اتانول می‌شود. این مرحله **پاک‌سازی (clearing)** نام دارد، زیرا

1. distortion: از شکل افتادگی
2. cross-linking agents

شکل ۱-۱. برش‌برداری از بافت ثابت و قالب‌گیری‌شده.



بیشتر بافتهایی که مورد بررسی بافت‌شناختی قرار می‌گیرند، با طیّ مراحل زیر به صورتی که در این شکل نشان داده شده است، آماده می‌شوند. **(a):**

- **ثابت‌سازی:** قطعات کوچکی از بافت در محلولهایی از مواد شیمیایی قرار داده می‌شوند، که با ایجاد پیوند عرضی میان پروتئین‌ها و غیرفعال کردن آنزیم‌های تجزیه‌کننده ساختمان سلول و بافت را حفظ می‌کنند.
- **آب‌گیری:** بافت به درون مجموعه‌ای از محلولهای الکلی با غلظت فزاینده انتقال داده می‌شود؛ غلظت آخرین محلول ۱۰۰٪است، که کلّ آب را [از بافت] می‌گیرد.
- **پاکسازی:** الکل توسط حلالهای آلی که الکل و پارافین هر دو در آنها قابل امتزاج هستند، برداشته می‌شود.
- **ارتشاح:** سپس بافت در پارافین مذاب قرار داده می‌شود تا آن که کاملاً توسط این ماده ارتشاح یابد.
- **قالب‌گیری:** بافتِ ارتشاح‌یافته توسط پارافین در یک قالب کوچک محتوی پارافین مذاب قرار داده می‌شود، که سپس آن را به حال خود رها می‌کنند تا سخت شود.
- **تراش‌دهی:** قالب پارافینی حاصله تراشیده می‌شود تا بافت را برای تهیهٔ برش (لایه‌برداری توسط میکروتوم) نمایان کند و در معرض قرار دهد.

در آماده‌سازی بافت برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی انتقالی نیز همین مراحل به کار می‌روند، به جز آن که نمونه‌های بافتی کوچکتری همراه با ثابت‌سازها و محلولهای آب‌گیری خاصی مورد استفاده قرار می‌گیرند و قالب‌گیری توسط رزین‌های اپوکسی صورت می‌گیرد که سختی بیشتری از پارافین پیدا می‌کنند و بدین ترتیب امکان تهیهٔ برش‌های بسیار نازک را فراهم می‌کنند.

(b): جهت مطالعه با میکروسکوپ نوری، یک **میکروتوم** برای برش‌برداری از بافتهایی که در پارافین قالب‌گیری شده‌اند مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از سوار کردن قالب پارافینیِ حاوی نمونهٔ بافتی تراشیده بر روی یک گیره، هر دور چرخاندن قرقرهٔ متحرک توسط بافت‌شناس گیرهٔ نمونه را تا مسافت مشخصی (عموماً بین ۱ و ۱۰ میکرومتر) جلو می‌برد، و به دنبال هر حرکت رو به جلو قالب بافت از روی لبهٔ تیغهٔ فولادی می‌گذرد؛ بدین ترتیب تیغهٔ مذکور برش‌هایی تهیه می‌کند که ضخامتشان به اندازهٔ مسافتی است که قالب جلو آمده است. سپس برش‌های پارافینی روی لامهای شیشه‌ای قرار داده می‌شوند تا به آنها بچسبند، پارافین‌شان گرفته می‌شود، و برای بررسی با میکروسکوپ نوری مورد رنگ‌آمیزی قرار می‌گیرند. برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی انتقالی، با استفاده از یک فرامیکروتوم (ultramicrotome) با تیغه‌ای از جنس شیشه یا الماس، برش‌هایی نازکتر از ۱ میکرومتر از سلولهایی که در رزین قالب‌گیری شده‌اند تهیه می‌شوند.

ارتشاح بافت با معرف‌های مورد استفاده در اینجا به آن یک ظاهر شفاف می‌بخشد.

بافتِ کاملاً پاکسازی شده سپس درون پارافینِ ذوب‌شده در اجاق (در دمای ۵۲–۶۰°C) قرار داده می‌شود، که باعث تبخیر حلالِ پاکسازی‌کننده و **ارتشاح** بافت با پارافین مایع می‌شود. بافت سپس در یک ظرف کوچک حاوی پارافین در دمای اتاق سفت و بدین ترتیب **قالب‌گیری** می‌شود. بافتهایی که با رزین پلاستیکی قالب‌گیری می‌شوند نیز در اتانول آب‌گیری شده و سپس با حلالهای پلاستیکی ارتشاح می‌یابند؛ این حلالها به وسیله افزودن پلیمریزه‌کننده‌های اتصال‌ساز (cross-linking polymerizers) سفت می‌شوند. قالب‌گیری در پلاستیک نیازی به دماهای بالا (مانند قالب‌گیری در پارافین) ندارد؛ این امر جلوی به هم ریختگی (distortion) بافت را می‌گیرد.

قالبِ سخت‌شدهٔ حاوی بافت و مادهٔ قالب‌گیر پیرامون آن تراشیده و برای برش‌دهی در وسیله‌ای به نام **میکروتوم** قرار داده می‌شود (شکل ۱–۱). نمونه‌های پارافینی برای مطالعه با میکروسکوپ نوری عموماً به ضخامت ۳–۱۰μm بریده می‌شوند، اما مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نیازمند برش‌هایی به ضخامت کمتر از ۱μm است. یک میکرومتر (μm) برابر ۰/۰۰۱ mm یا 10^{-6}m است. سایر واحدهای طول که کاربرد گسترده‌ای در مطالعهٔ میکروسکوپی دارند عبارتند از نانومتر (۰/۰۰۱μm یا 10^{-6}mm یا 10^{-9}m) و آنگستروم (Å) (۰/۱ nm یا $10^{-4}\mu$m). برش‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری بر روی لامهای شیشه‌ای قرار داده و رنگ‌آمیزی می‌شوند یا این که برای رنگ‌آمیزی و بررسی با میکروسکوپ الکترونی بر روی شبکه‌های فلزی قرار داده می‌شوند.

» کاربرد طبی

بیوپسی‌ها نمونه‌های بافتی هستند که هنگام جراحی یا اقدامات[1] معمول طبی برداشته می‌شوند. در اتاق عمل، بیوپسی‌ها در ویال[2] فرمالین ثابت می‌شوند تا در یک آزمایشگاه آسیب‌شناسی مورد پردازش و بررسی میکروسکوپی قرار گیرند. اگر نتایج این بررسی‌ها پیش از تکمیل اقدام طبی موردنیاز باشند، برای نمونه هنگامی که پیش از بستن محل جراحی در بیمار می‌خواهیم بدانیم آیا یک توده بدخیم است یا خیر، یک روش پردازش بسیار سریعتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. نمونه به سرعت در نیتروژن مایع منجمد می‌شود، و بدین ترتیب ساختمانهای سلولی حفظ می‌شوند و در عین حال بافت سخت و آمادهٔ برش می‌شود. یک میکروتوم به نام **کرایوستات**[3] در یک محفظه در دمای زیر انجماد جهت برش قالبِ حاوی بافت به کار می‌رود، و برش‌های منجمد[4] روی لام قرار داده می‌شوند تا به سرعت رنگ‌آمیزی شوند و توسط یک آسیب‌شناس مورد بررسی میکروسکوپی قرار گیرند.

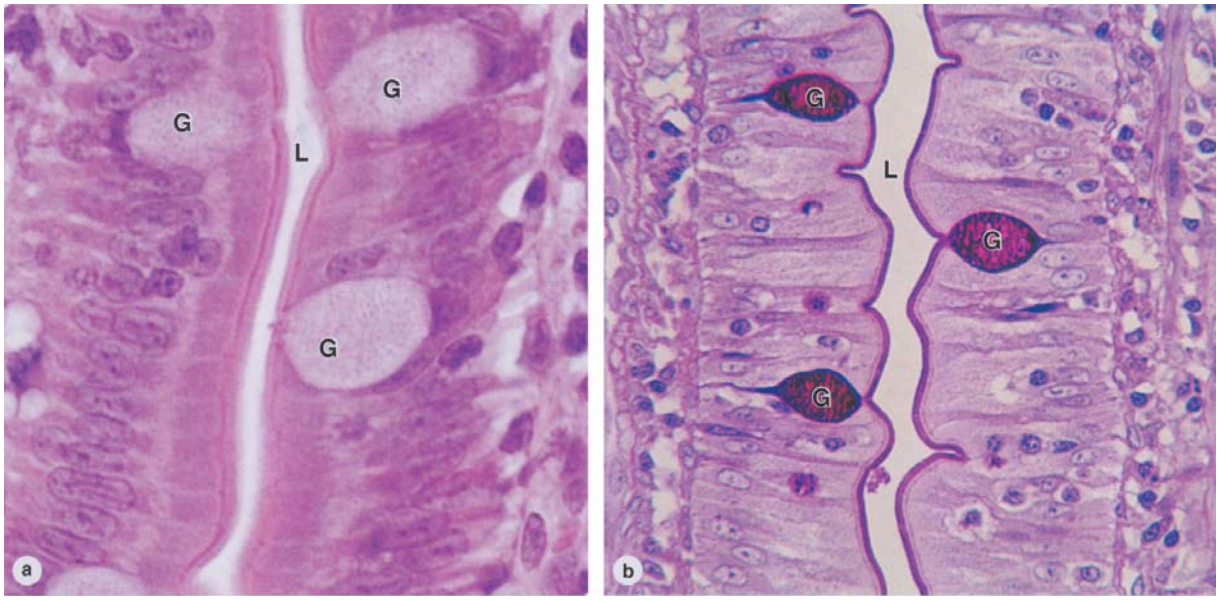
منجمدسازی بافتها همچنین در بررسی هیستوشیمیاییِ آنزیمهای بسیار حساس یا مولکولهای کوچک مفید است، زیرا انجماد (برخلاف ثابت‌سازی) بیشتر آنزیمها را غیرفعال نمی‌کند. سرانجام، از آن‌جا که حلالهای پاکسازی‌کننده غالباً چربیهای سلولیِ موجود در بافتهای ثابت‌شده را حل می‌کنند، بنابراین هنگامی که ساختمانهای حاوی چربی نیز مورد بررسی بافت‌شناختی قرار می‌گیرند برشهای منجمد به کار می‌آیند.

رنگ‌آمیزی (Staining)

بیشتر سلولها و مادهٔ خارج سلولی کاملاً بیرنگ هستند، و برشها جهت مطالعهٔ میکروسکوپی باید رنگ‌آمیزی شوند یعنی تحت تلقیح رنگیزه (dye) قرار گیرند. [بنابراین،] روشهای رنگ‌آمیزی بافتها ابداع شده‌اند که نه تنها اجزای مختلف بافتی را مشخص می‌کنند، بلکه افتراق این اجزا از هم را نیز میسر می‌کنند. رنگیزه‌ها مادهٔ مربوطه را به طور انتخابی بیشتر یا کمتر رنگ می‌کنند و اغلب رفتاری مانند ترکیبات اسیدی یا بازی دارند و پیوندهای الکتروستاتیک (نمکی) با رادیکالهای یونیزه‌شوندهٔ ماکرومولکولهای موجود در بافتها تشکیل می‌دهند. اجزای سلولی مانند اسیدهای هسته‌ای با بار منفی خالص (آنیونی) به رنگیزه‌های بازی تمایل دارند و **بازوفیل (basophilic)** نامیده می‌شوند؛ اجزای کاتیونی (مانند پروتئین‌های واجد تعداد زیادی

1. procedures
2. vial: شیشه (ظرف) کوچک
3. cryostat
4. frozen sections

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



میکروگرافهای اپی‌تلیوم استوانه‌ای پوشانندهٔ رودهٔ کوچک. **(a):** میکروگراف رنگ‌آمیزی‌شده با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E). **(b):** میکروگراف رنگ‌آمیزی‌شده با واکنش پریودیک اسید ـ شیف (PAS) برای گلیکوپروتئین‌ها. با H&E، هسته‌های بازوفیل سلولها به رنگ ارغوانی و سیتوپلاسم آنها به رنگ صورتی درمی‌آیند. مناطقی از سلول که حاوی اولیگوساکاریدهای بسیاری بر روی گلیکوپروتئین‌ها هستند، مانند انتهاهای سلولها در مجرا **(L)** یا سلولهای جامی پراکنده و کم‌تعداد مترشحهٔ موکوس **(G)**، به سختی رنگ می‌گیرند، اما با این حال با PAS شدت رنگ‌پذیری سلولها در مجرا، که در آنجا میکروویلی‌های بیرون‌زده لایهٔ برجسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها در مجرا **(L)** دارند، و در گرانولهای ترشحیِ غنی از موسینِ سلولهای جامی از همه جا بیشتر است. گلیکوپروتئین‌های سطح سلول و موسین، به‌دلیل محتوای بالای به ترتیب اولیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدهایشان، PAS ـ مثبت هستند. بافتِ رنگ‌آمیزی‌شده با PAS مورد رنگ‌آمیزی تقابلی با هماتوکسیلین قرار گرفته است تا هسته‌های سلولها آشکار شوند.

گروه‌های آمینی یونیزه) با رنگیزه‌های اسیدی آسان‌تر رنگ می‌گیرند و **اسیدوفیل (acidophilic)** نامیده می‌شوند.

آبی تولوئیدین (toluidine blue)، آبی آلشین (alcian blue)، و آبی متیلن (methylene blue)، مثالهایی از رنگیزه‌های بازی هستند. هماتوکسیلین به صورت یک رنگیزهٔ بازی رفتار می‌کند، یعنی اجزای بافتی بازوفیل را رنگ می‌کند. علت آنکه اجزای اصلی بافتی یونیزه می‌شوند و با رنگیزه‌های بازی واکنش می‌سازند، وجود اسیدها در ساختمان آنها است (DNA، RNA، و گلیکوزآمینوگلیکانها). رنگیزه‌های 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 همهٔ روشهای رنگ‌آمیزی، ترکیب سادهٔ **هماتوکسیلین و ائوزین (H&E)** بیشتر از همه به کار می‌رود. هماتوکسیلین یک رنگ آبی تیره یا ارغوانی ایجاد و DNA ی هسته سلول، بخشهای غنی از RNA ی سیتوپلاسم و ماتریکس غضروف را رنگ می‌کند. در مقابل، ائوزین سایر اجزای سیتوپلاسم و کلاژن را به رنگ صورتی می‌کند (شکل ۲a-۱). اینجا ائوزین یک **رنگیزهٔ تقابلی**[1] محسوب می‌شود، که معمولاً یک رنگیزهٔ منفرد است که به طور جداگانه به کار می‌رود تا ویژگی‌های بیشتری از یک بافت را

1. counterstain: رنگیزه‌ای که برای قابل تشخیص‌تر کردن اثرات یک رنگیزهٔ دیگر به کار می‌رود ـ مترجم.

مشخص کند. اقدامات [بافت‌شناختی] پیچیده‌تر، مانند رنگ‌آمیزی با تری‌کروم (مثلاً، ماسون تری‌کروم)، امکان تمایز بهتر اجزای بافتی خارج سلولی مختلف را فراهم می‌کنند.

واکنش **پریودیک اسید ـ شیف (PAS)** از حلقه‌های هگزوز پلی‌ساکاریدها و سایر ساختمانهای بافتیِ غنی از کربوهیدرات استفاده می‌کند و این ماکرومولکولها را به صورت مشخص و مجزا به رنگ ارغوانی (زرشکی) یا قرمز[1] درمی‌آورد. شکل ۱-۲b یک نمونه از سلول‌های واجد مناطق غنی از کربوهیدرات را نشان می‌دهد که با واکنش PAS به خوبی رنگ‌آمیزی شده‌اند. DNAی هستهٔ سلول می‌تواند با استفاده از اِعمال تغییری در روش PAS (به نام واکنش فولگن[2]) به طور اختصاصی رنگ‌آمیزی شود.

مادهٔ بازوفیل یا PAS ـ مثبت را می‌توان از طریق **هضم آنزیمی** (پرداخت اولیهٔ[3] یک برش بافتی با آنزیمی که به طور اختصاصی یک سوبسترا را هضم می‌کند)، بیشتر مشخص کرد. برای نمونه، پرداخت اولیه با ریبونوکلئاز بازوفیلی سیتوپلاسم را در حد زیادی کاهش می‌دهد اما تأثیر کلی اندکی بر هسته دارد، که نشانگر اهمیت RNA برای رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم است.

ساختمانهای غنی از چربیِ سلولها با اجتناب از مراحل پردازش که چربی‌ها را از میان برمی‌دارند (مانند پرداخت با حرارت و حلالهای آلی) و رنگ‌آمیزی با **رنگیزه‌های محلول در چربی** مانند **سیاه سودان**[4] نمایان می‌شوند؛ این رنگیزه‌ها می‌توانند در تشخیص بیماریهای متابولیک که در آنها تجمع کلسترول، فسفولیپیدها یا گلیکولیپیدها درون سلول وجود دارد، سودمند باشند. روش‌های کمتر متداول رنگ‌آمیزی شامل **تکنیک‌های تلقیح فلز** معمولاً با استفاده از محلولهای املاح نقره جهت آشکارسازی برخی از رشته‌های خاص ECM و اجزای سلولی خاص در بافت عصبی هستند. بخش ضمیمه [در پایان کتاب] روش‌های رنگ‌آمیزی مهم را که برای بیشتر میکروگرافهای نوری در این کتاب به کار رفته‌اند، فهرست کرده است.

آماده‌سازی لام، از ثابت‌سازی بافت تا مشاهده با میکروسکوپ نوری، می‌تواند از ۱۲ ساعت تا ۲/۵ روز طول بکشد (بسته به اندازهٔ بافت، محیط قالب‌گیری، و روش رنگ‌آمیزی). آخرین مرحله پیش از مشاهده با میکروسکوپ، قرار دادن یک پوشش شیشه‌ای محافظ بر روی لام با استفاده از مواد چسبانندهٔ شفاف است.

مطالعه با میکروسکوپ نوری

مطالعه با میکروسکوپ با نور روشن معمولی، و نیز اقدامات تخصص‌یافته‌تر مانند مطالعه با میکروسکوپ با کنتراست فاز، میکروسکوپ با نور پولاریزه، میکروسکوپ هم‌کانون (confocal m.)، و میکروسکوپ فلوئورسان، همه بر مبنای تداخل عمل نور و اجزای بافتی استوار هستند و برای نمایش و مطالعهٔ ویژگی‌های بافتها مورد استفاده قرار می‌گیرند.

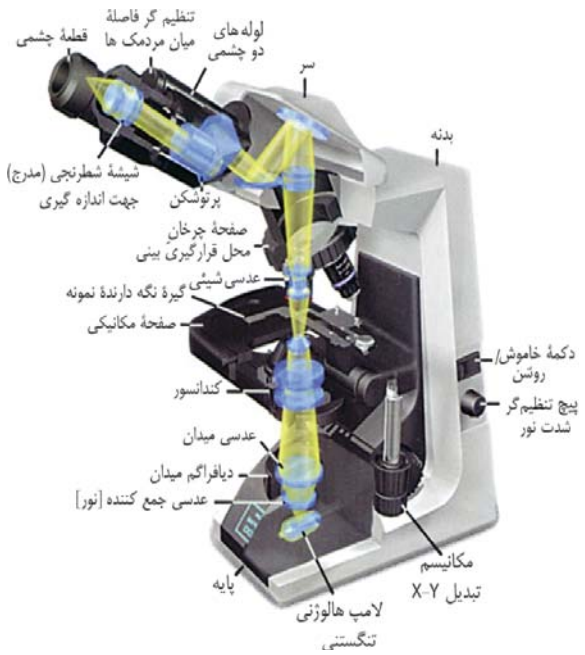
مطالعه با میکروسکوپ زمینه‌روشن

با میکروسکوپ زمینه‌روشن[5] بافتِ رنگ‌شده به‌وسیلهٔ نور معمولی که از درون آمادش می‌گذرد، مورد مطالعه قرار می‌گیرد. میکروسکوپ از یک سامانهٔ نوری و مکانیسم‌هایی برای به حرکت درآوردن و در کانون قرار دادنِ نمونه تشکیل شده است (مطابق شکل ۳-۱). اجزای نوری عبارتند از: **متراکم‌کننده (condenser)**، عدسی **شیئی (objective)**، و **قطعهٔ چشمی (eyepiece)**. **کندانسور** نور را بر روی شیء مورد مطالعه متمرکز می‌کند. عدسی **شیئی** تصویر شیء را بزرگ می‌کند و آن را در جهت قطعهٔ چشمی می‌اندازد. **قطعهٔ چشمی** (یا عدسی چشمی) باز هم این تصویر را بزرگتر می‌کند و آن را روی شبکیهٔ مشاهده‌گر یا یک ابزارِ جفت‌شده با بار (CCD)[6] می‌اندازد که به‌شدت به میزان پایین نور حساس و مجهز به یک صفحهٔ نمایشگر و دوربین است. بزرگنمایی کلی با ضرب‌کردن قدرت بزرگنمایی عدسی شیئی و عدسی چشمی در هم، به‌دست می‌آید.

عامل اساسی در بدست آوردن یک تصویر ظریف و دقیق با میکروسکوپ نوری **قدرت تمایز**[7] است، که عبارت است از کوچکترین فاصلهٔ بین ۲ شیء کوچک که در آن فاصله به‌صورت اشیای مجزا قابل مشاهده باشند. بالاترین قدرت تمایز میکروسکوپ نوری تقریباً ۰/۲ میکرومتر است؛ این قدرت تمایز تصویرهای شفاف و روشنی که ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ برابر بزرگ شده‌اند، فراهم می‌کند. اجزای کوچکتر یا

1. magenta
2. Feulgen reaction
3. pretreatment: پیش‌پرداخت
4. Sudan black
5. bright-field m.
6. charge-coupled device: ابزارِ الحاق‌یافته با بار [الکتریکی]
7. resolving power

شکل ۳-۱. اجزای یک میکروسکوپ زمینه‌روشن و مسیر نور در آن.



تصویر یک میکروسکوپ نوری زمینه‌روشن که اجزای مکانیکی آن و مسیر نور از لامپ زیرصفحه تا چشم مشاهده‌گر را نشان می‌دهد. سامانهٔ نوری (اپتیک) سه گروه عدسی دارد:

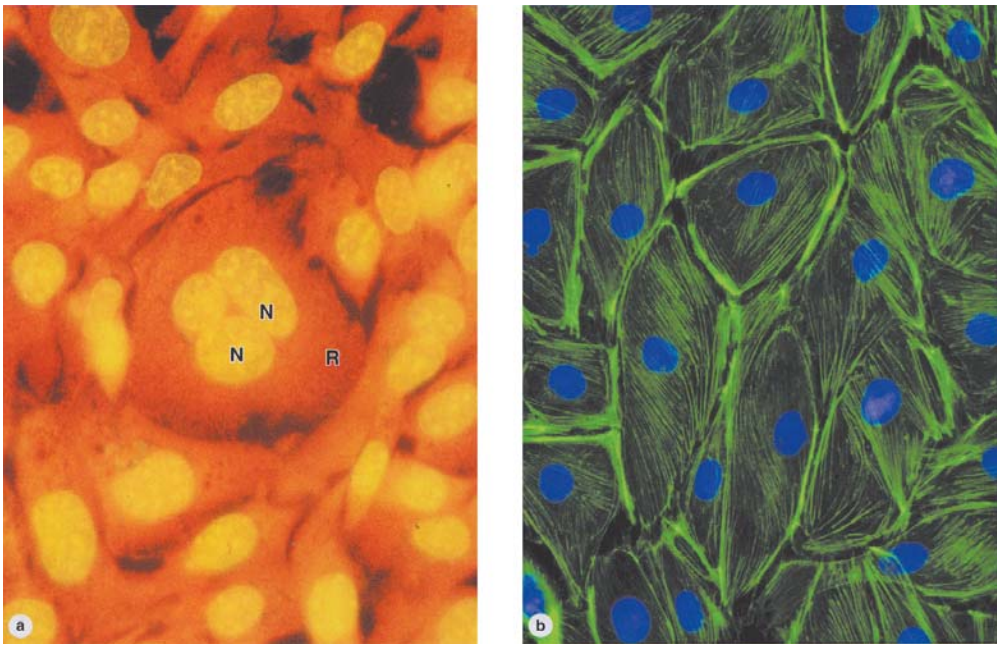
- **کندانسور** نور را جمع‌آوری و متمرکز و مخروطی از نور ایجاد می‌کند که لامِ حاوی بافت را بر روی صفحه روشن می‌کند.
- عدسی‌های **شیئی** تصویرِ نورگرفته و روشن‌شدهٔ شیء را بزرگ می‌کنند و آن را در جهت قطعهٔ چشمی پیش می‌برند. شیئی‌های قابل تعویض با بزرگنمایی متفاوت برای بررسی‌های بافت‌شناختی روزمره و معمول عبارتند از: ۴× برای بزرگنمایی پایین یک ناحیه (حوزهٔ بزرگ از بافت؛ ۱۰× برای بزرگنمایی متوسط یک حوزهٔ کوچکتر؛ و ۴۰× برای بزرگنمایی بالای نواحیِ با جزئیات بیشتر.
- دو **قطعهٔ چشمی** یا عدسی چشمی این تصویر را ۱۰ بار دیگر بزرگ می‌کنند و آن را بر روی [چشم] مشاهده‌گر می‌اندازند، و بدین ترتیب بزرگنمایی کلّی را به ۴۰×، ۱۰۰×، یا ۴۰۰× می‌رسانند.

نازکتر از ۰/۲ میکرومتر (مانند یک ریبوزوم یا میکروفیلامان سیتوپلاسمی منفرد) را نمی‌توان با این ابزار تشخیص داد. به طریق مشابه، دو شیء (مانند دو میتوکندری) اگر فاصله‌ای کمتر از ۰/۲ میکرومتر داشته باشد، به صورت یک شیء واحد دیده خواهند شد. کیفیت تصویر (وضوح و میزان نمایش جزئیات) توسط قدرت تمایز میکروسکوپ تعیین می‌شود و عمدتاً به کیفیت عدسی شیئی آن بستگی دارد. بزرگنمایی (magnification) فقط وقتی همراه قدرت تمایزهای بالا باشد، ارزشمند است. عدسی‌های شیئی با بزرگنمایی‌های بالاتر به گونه‌ای طراحی شده‌اند که قدرت تمایز بالاتری نیز داشته باشند. عدسی قطعهٔ چشمی فقط تصویرِ حاصل از عدسی شیئی را بزرگ می‌کند، اما قدرت تمایز را بهبود نمی‌بخشد.

مطالعه با میکروسکوپ مجازی[1]، که معمولاً برای بررسی آمادش‌های میکروسکوپی زمینه روشن مورد استفاده قرار می‌گیرد، شامل تبدیل یک آمادش بافتی رنگ‌آمیزی شده به تصاویر دیجیتالِ با وضوح بالا است و امکان بررسی بافتها با استفاده از کامپیوتر یا وسایل دیجیتال دیگر بدون یک لام رنگ‌آمیزی شدهٔ واقعی یا یک میکروسکوپ را فراهم می‌کند. در این تکنیک مناطقی از یک نمونه که روی لام شیشه‌ای قرار داده شده است، به کمک یک میکروسکوپ تخصصی که لام را اسکن می‌کند، با یک الگوی شبکه مانند در بزرگنمایی‌های مختلف به صورت دیجیتال اخذ و به صورت هزاران فایل تصویری پیاپی حفظ می‌شوند. سپس نرم‌افزار مربوطه با استفاده از یک فرمت (که امکان دست‌یابی به لام اصلی و نمایان‌سازی و ارتباطی‌دهی آن با انواع متداول جستجوگرهای شبکه[2] یا سایر وسایل را فراهم می‌کند)، مجموعه داده‌های مذکور را روی یک سِرور ذخیره می‌کند. با کاهش هزینه و آسان‌تر شدن استفاده از میکروسکوپ مجازی، این روش به سرعت در حال جایگزینی میکروسکوپهای نوری و مجموعه لامهای شیشه‌ای در آزمایشگاههای بافت‌شناسی برای دانشجویان است.

1. virtual microscopy
2. web browsers: شبکه‌گردها، موتورهای جستجوی شبکه [اینترنت]

شکل ۴-۱. نمای سلول‌ها در مطالعه با میکروسکوپ فلوئورسان.



اجزای سلول‌ها غالباً با ترکیباتی که در مطالعه با میکروسکوپ فلوئورسان قابل رؤیت‌اند، رنگ‌آمیزی می‌شوند.
(a): نارنجی آکریدین به اسیدهای هسته‌ای اتصال می‌یابد و موجب می‌شود DNA ی هسته سلول **(N)** نور زرد از خود ساطع کند و سیتوپلاسمِ غنی از RNA **(R)** در این سلول‌های لولهٔ کلیوی نارنجی به نظر برسد.
(b): رنگ‌آمیزی سلول‌های کشت‌یافته با DAPI (۴′، ۶ـ دی‌آمینو ـ ۲ ـ فنیل‌اندول) (که به DNA اتصال می‌یابد) و فلوئورسین ـ فالوئیدین (که به فیلامانهای آکتین اتصال می‌یابد)، موجب می‌شود هسته‌های این سلول‌ها یک فلوئورسانس آبی از خود نشان دهند و فیلامانهای آکتین به رنگ سبز ظاهر شوند. ویژگیهای مهم مانند تراکم بیشتر میکروفیلامانها در ناحیهٔ محیطی سلول به خوبی مشخص هستند.

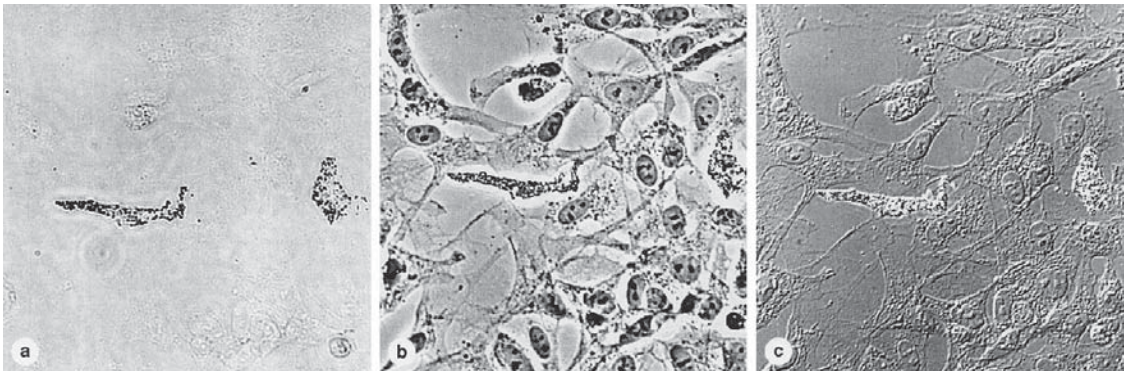
مطالعه با میکروسکوپ فلوئورسان

وقتی برخی مواد سلولی خاص تحت تابش نور با یک طول موج خاص قرار می‌گیرند، نوری با طول موج بلندتر ساطع می‌کنند. این پدیده **فلوئورسانس** نام دارد. در روش **مطالعه با میکروسکوپ فلوئورسان** برش‌های بافتی معمولاً تحت تابش نور فرابنفش (UV) قرار می‌گیرند، به نحوی که نورِ ساطع‌شده در بخش قابل رؤیت طیف نوری قرار می‌گیرد. مواد فلوئورسان به صورت روشن در یک زمینهٔ تاریک به نظر می‌رسند. در این روش، ابزار مربوطه مجهز به یک چشمهٔ پرتو UV یا سایر پرتوها و فیلترهایی است که پرتوهایی با طول موجهای متفاوت را که از مواد ساطع می‌شوند، به صورت انتخابی از خویش عبور می‌دهند.

ترکیبات فلوئورسان که تمایل به [اتصال به] ماکرومولکولهای سلول دارند، به عنوان رنگهای فلوئورسان مورد استفاده قرار می‌گیرند. نارنجی آکریدین[1] که می‌تواند با DNA و RNA ترکیب شود، یک نمونه از این ترکیبات است. هنگام مشاهده در میکروسکوپ فلوئورسان، این اسیدهای هسته‌ای فلوئورسانسی اندکی متفاوت از خود ساطع می‌کنند، که امکان تعیین محل جداگانه آنها را در سلولها فراهم می‌کند (شکل ۴-۱a). سایر ترکیبات مانند رنگ Hoechst و DAPI اختصاصاً به DNA اتصال می‌یابند و جهت رنگ‌آمیزی هستهٔ سلول مورد استفاده قرار می‌گیرند و

1. acridine orange

شکل ۵-۱. نمای سلولهای رنگ‌آمیزی‌نشده در سه نوع مطالعه با میکروسکوپ نوری.



سلولهای زندهٔ ستیغ عصبی که در کشت رشد می‌کنند، در تکنیکهای مختلف مطالعه با میکروسکوپ نوری ظاهر متفاوتی دارند. در اینجا حوزهٔ واحدی از سلولهای رنگ‌آمیزی‌نشده (شامل دو سلول رنگدانه‌ایِ در حال تمایز) با استفاده از سه روش متفاوت نشان داده شده است.

(a): مطالعه با میکروسکوپ زمینه‌روشن: بدون ثابت‌سازی و رنگ‌آمیزی، فقط دو سلول رنگدانه‌ای قابل رؤیت‌اند.

(b): مطالعه با میکروسکوپ با کنتراست فاز: حدود سلول، هسته‌ها، و ساختارهای سیتوپلاسمی با ضرایب انکساری مختلف تأثیر متفاوتی بر نورِ در فاز (in-phase light) دارند و تصویری از این اجزاء در کلیهٔ سلولها ایجاد می‌کنند.

(c): مطالعه با میکروسکوپ با تداخل افتراقی: با استفاده از دستگاه نوری نومارسکی جزئیات سلول به نحوی متفاوت نمایان و بارز شده‌اند. مطالعه با میکروسکوپ با کنتراست فاز، با یا بدون تداخل افتراقی، کاربرد گسترده‌ای در مشاهدهٔ سلولهای زنده‌ای دارد که در کشت بافت رشد کرده‌اند.

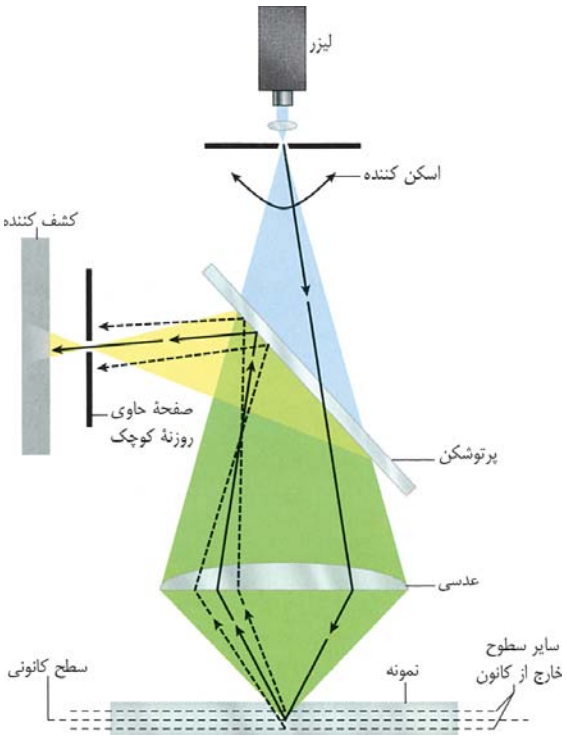
زیر پرتو UV فلوئورسانس آبی مشخصی ساطع می‌کنند. یک کاربرد مهم دیگر میکروسکوپ فلوئورسان از طریق جفت‌کردن (الحاق) ترکیباتی مانند فلوئورسین با مولکولهایی به دست می‌آید که به طور اختصاصی به برخی اجزای سلولی خاص اتصال خواهند یافت و بدین ترتیب امکان شناسایی این ساختارها را در زیر میکروسکوپ فراهم خواهند کرد (شکل ۴b-۱). آنتی‌بادیهای نشاندارشده با ترکیبات فلوئورسان در رنگ‌آمیزی به روش ایمونوهیستولوژیک بسیار اهمیت دارند (به بخش «نمایان‌سازی مولکولهای خاص» رجوع کنید).

مطالعه با میکروسکوپِ با کنتراست فاز

سلولها و برشهای بافتیِ رنگ‌آمیزی‌نشده، که معمولاً شفاف و بی‌رنگ هستند، می‌توانند با این میکروسکوپ نوریِ تغییریافته مورد مطالعه قرار گیرند. چون همه قسمتهای نمونه تقریباً دارای یک چگالی نوری (optical density) هستند، در حالت عادی مشاهده جزئیات سلولی آنها مشکل است. ولی در **مطالعه با میکروسکوپِ با کنتراست فاز**، از یک سیستم عدسی استفاده می‌شود که از اشیای شفاف تصاویر قابل رؤیت می‌سازد، و نکته مهم آن است که از این روش می‌توان در بررسی سلول‌های زندهٔ کشت داده شده استفاده کرد (شکل ۵-۱).

اساس کار مطالعه با میکروسکوپ با کنتراست فاز بر این اصل استوار است که سرعت نور هنگام عبور از ساختمانهای سلولی و خارج سلولیِ با ضرایب انکساری مختلف، تغییر می‌کند. این تغییرات توسط دستگاهِ با کنتراست فاز مورد استفاده قرار می‌گیرند تا موجب شوند ساختمانها نسبت به همدیگر روشن‌تر یا تیره‌تر به‌نظر برسند. از آنجا که بررسی سلول‌ها در مطالعه با میکروسکوپ با کنتراست فاز مستلزم ثابت‌سازی یا رنگ‌آمیزی نیست، این گونه میکروسکوپها ابزار مهمی در کلیهٔ آزمایشگاههای کشت سلولی هستند. یک روش مربوطهٔ تغییریافته عبارت از **مطالعه با میکروسکوپِ**

شکل ۶-۱. اصول مطالعه با میکروسکوپ هم‌کانون.



در حالی که نقطه (لکهٔ) بسیار کوچک نور که از یک سطح برش منشأ می‌گیرد از روزنهٔ کوچک می‌گذرد و به ابزار کشف‌کننده (detector) می‌رسد، پرتوهای برخاسته از سایر سطوح توسط یک صفحهٔ کدر متوقف می‌شوند. بدین ترتیب، هر بار فقط سطح بسیار نازکی از نمونه به کانون درمی‌آید. طرح فوق آرایش کاربردی (عملی) اجزای میکروسکوپ هم‌کانون را نشان می‌دهد. نورِ حاصل از یک منبع لیزری به نمونه برخورد می‌کند و منعکس می‌شود. یک پرتوشکن نورِ انعکاس‌یافته را به سمت یک روزنهٔ کوچک و یک ابزار کشف‌کننده هدایت می‌کند. نورِ حاصل از اجزایی از نمونه که در بالا یا پایین سطحِ به کانون درآمده قرار دارند، توسط یک صفحهٔ کدر متوقف می‌شود. لیزر نمونه را اسکن می‌کند، به نحوی که منطقهٔ بزرگتری از نمونه می‌تواند مورد مشاهده قرار گیرد.

با تداخل افتراقی با استفاده از ابزارهای نوری نومارسکی[1] است که از سلولهای زنده تصویری فراهم می‌کند که ویژگی‌های سه‌بعدی (3D) آن واضح‌تر هستند (شکل ۵c-۱).

مطالعه با میکروسکوپ هم‌کانون

در میکروسکوپ زمینه‌روشن معمولی پرتو نور نسبتاً بزرگ است و کلّ نمونه را در بر می‌گیرد. نور پراکنده و سرگردان (اضافی) کنتراست درون تصویر را کاهش می‌دهد و قدرت تمایز عدسی شیئی را محدود می‌کند. میکروسکوپ هم‌کانون (شکل ۶-۱) به کمک موارد زیر جلوی این مشکلات را می‌گیرد و قدرت تمایز بالا و فوکوس واضحی فراهم می‌کند: (۱) یک نقطهٔ کوچک از نور پرشدت که توسط یک لیزر تأمین می‌شود و (۲) یک صفحه با سوراخ (روزنه) سرسوزنی ریزی در جلوی آشکارساز تصویر. منبع نور نقطه‌ای، نقطهٔ کانونی عدسی، و روزنهٔ سرسوزنی همگی از نظر اپتیک همبسته[2] یا در سطح کانونی نسبت به هم در یک راستا قرار دارند (هم‌کانون)، و نورِ تمرکز نیافته (به کانون درنیامده) از سوراخ سرسوزنی عبور نمی‌کند. این امر قدرت تمایز برای شیء به کانون درآمده را بسیار افزایش می‌دهد و امکان آن را فراهم می‌کند که موقعیت اجزای نمونه با دقتی بسیار بیشتر از میکروسکوپ زمینه‌روشن تشخیص داده شود.

میکروسکوپهای هم‌کانون شامل یک سامانهٔ آینه‌ای با هدایت رایانه‌ای (پرتوشکن)[3] هستند که به صورت خودکار و به سرعت نقطهٔ نورپردازی را از این سو تا آن سوی نمونه حرکت می‌دهد. تصاویر دیجیتالی که در بسیاری از نقاط منفرد در یک صفحه (سطح) کانونی بسیار نازک تهیه شده‌اند، جهت ایجاد یک "برش نوری" از آن صفحه مورد استفاده قرار می‌گیرند. ایجاد این برش‌های نوری در مجموعه‌ای از صفحات کانونی در خلال نمونه امکان آن را فراهم می‌کند که تصاویر مربوطه بتوانند به صورت دیجیتال به شکل یک تصویر سه‌بُعدی بازسازی شوند.

مطالعه با میکروسکوپِ با نور پولاریزه

میکروسکوپِ با نور پولاریزه امکان تشخیص ساختمانهای رنگ‌آمیزی‌شده یا نشده‌ای را فراهم می‌کند که از زیرواحدهای کاملاً سازمان‌یافته تشکیل شده‌اند. وقتی نور معمولی از درون یک فیلتر **پولاریزه‌کننده** می‌گذرد، در هنگام خروج فقط در یک جهت ارتعاش می‌یابد. اگر فیلتر دومی در میکروسکوپ بالای فیلتر اول قرار داده شود، به طوری که

1. Nomarski differential interference microscope
2. conjugated
3. beam splitter