فهرست مطالب

فصل ۱ ـ بافت‌شناسی و روش‌های مطالعه آن ۱۱
فصل ۲ ـ سیتوپلاسم ۳۵
فصل ۳ ـ هسته ۸۴
فصل ۴ ـ بافت پوششی ۱۰۸
فصل ۵ ـ بافت همبند ۱۴۱
فصل ۶ ـ بافت چربی ۱۷۳
فصل ۷ ـ غضروف ۱۸۳
فصل ۸ ـ استخوان ۱۹۵
فصل ۹ ـ بافت عصبی و سیستم عصبی ۲۲۷
فصل ۱۰ ـ بافت عضلانی ۲۶۹
فصل ۱۱ ـ دستگاه گردش خون ۲۹۸
فصل ۱۲ ـ خون ۳۲۷
فصل ۱۳ ـ خونسازی ۳۴۹
فصل ۱۴ – دستگاه ایمنی و اندام‌های لنفوئیدی ۳۶۶
فصل ۱۵ ـ لوله گوارش ۴۰۳
فصل ۱۶ – اندام‌های ضمیمه لوله گوارش ۴۴۶
فصل ۱۷ ـ دستگاه تنفس ۴۷۳
فصل ۱۸ ـ پوست ۵۰۲
فصل ۱۹ ـ سیستم ادراری ۵۳۰
فصل ۲۰ ـ غدد درون‌ریز ۵۵۶
فصل ۲۱ – دستگاه تولید مثل مرد ۵۹۰
فصل ۲۲ ـ دستگاه تولیدمثل زن ۶۱۷
فصل ۲۳ ـ چشم و گوش اندام‌های حسی ویژه ۶۵۶
ضمیمه – رنگ‌آمیزی‌های میکروسکوپ نوری ۷۰۱
واژه‌یاب ۷۰۳

فصل ۱ بافت‌شناسی و روش‌های مطالعه آن

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

بافت‌شناسی[1] مطالعه بافت‌های بدن و چگونگی آرایش این بافت‌ها برای تشکیل اندام‌ها است. این عنوان تمامی جنبه‌های بیولوژی بافتی را با تمرکز بر چگونگی ساختار سلولی و آرایش بهینه جهت عملکردهای خاص هر عضو، در بر می‌گیرد.

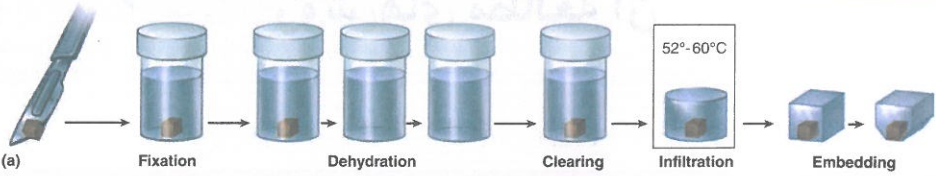
بافت‌ها از دو جزء در حال تعامل با یکدیگر تشکیل شده‌اند: سلول و ماتریکس خارج سلولی[2]. ECM شامل انواع فراوانی از ماکرومولکول‌ها است که بیشتر آن‌ها ساختمان‌های پیچیده‌ای مثل فیبریل‌های کلاژن را تشکیل می‌دهند. ECM از سلول‌ها حمایت کرده و حاوی مایعی است که مواد غذایی را به سلول‌ها منتقل می‌کند و مواد دفعی و تولیدات ترشحی را از آن‌ها دور می‌نماید. با اینکه سلول‌ها ECM را به طورموضعی می‌سازند اما شدیداً توسط مولکول‌های ماتریکس تحت تأثیر قرار می‌گیرند. بسیاری از اجزاء ماتریکس به گیرنده‌های اختصاصی سطح سلول متصل می‌شوند که از عرض غشاهای سلولی عبور کرده‌اند و بدین ترتیب با عناصر ساختاری درون سلول ارتباط برقرار می‌کنند. این نوع ارتباط بین سلول‌ها و ECM مجموعه مداومی را می‌سازد که سبب می‌شود تا آن‌ها به طور کاملاً هماهنگ با هم عمل نمایند.

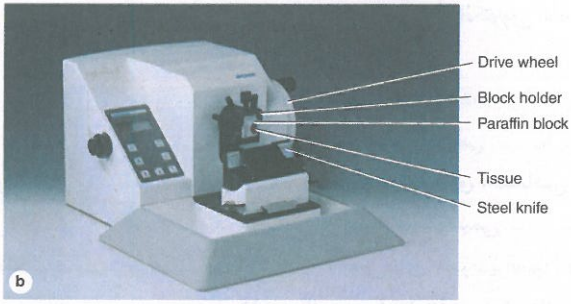
در طی تکامل جنینی، سلول‌ها و ماتریکس‌های همراه آن‌ها از نظر عملکرد تخصص یافته و به انواع بافت‌های اصلی با ویژگی‌های ساختاری خاص تمایز می‌یابند. اندام‌ها از ترکیب منظم این بافت‌ها تشکیل می‌شوند و سازماندهی دقیق آن‌ها منجر به عملکرد مناسب اندام‌ها و در نهایت ارگانیسم می‌شود.

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

1- Histology
2- Extra cellular matrix (ECM)

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





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

- **ثابت‌سازی:** قطعات کوچکی از بافت در محلول‌های شیمیایی قرار می‌گیرند. این محلول‌ها با ایجاد پیوند متقاطع با پروتئین‌ها و غیرفعال نمودن آنزیم‌های هضم‌کننده باعث حفظ ساختار سلولی و بافتی می‌گردند.
- **آب‌گیری:** بافت با عبور از یک مجموعه‌ای از محلول‌های الکلی با غلظت افزایشی تا ۱۰۰ درصد، تمام آب خود را از دست می‌دهد.
- **شفاف‌سازی:** الکل توسط حلال‌های آلی که قابلیت امتزاج با الکل و پارافین را دارد، برداشته می‌شود.
- **ارتشاح بافتی:** بافت در پارافین مذاب قرار داده می‌شود تا زمانی که پارافین به طور کامل به داخل بافت نفوذ کند.
- **قالب‌گیری:** بافتی که پارافین به درون آن نفوذ کرده، در یک قالب کوچک حاوی پارافین مذاب قرار داده شده و اجازه داده می‌شود تا سفت گردد.
- **اصلاح‌سازی (trimming):** قالب پارافینی برای نمایان ساختن بافت جهت برش زدن (مقطع زدن) توسط میکروتوم، مرتب می‌شود.

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

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

پرداخته شده است.

آماده‌سازی بافت‌ها جهت مطالعه

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

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

ثابت‌سازی[1]

جهت حفظ ساختار بافت و جلوگیری از تخریب توسط آنزیم‌های رها شده از سلول‌ها یا میکروارگانیسم‌ها، قطعاتی از اندام‌ها بلافاصله بعد از جدا شدن از بدن در محلول‌های پایدار کننده یا ترکیبات دارای ارتباط متقاطع که **ثابت کننده**[2] نام دارند قرار داده می‌شوند. از آنجایی که ثابت کننده برای حفظ تمام سلول‌ها، باید کاملاً به درون کل بافت نفوذ کند، قبل از ثابت‌سازی، بافت‌ها معمولاً به قطعات کوچکی بریده می‌شوند تا نفوذپذیری تسهیل شود. جهت حفظ سلول در اعضاء بزرگ، ثابت کننده‌ها غالباً از طریق عروق خونی وارد می‌شوند، توسط پرفیوژن عروقی، ثابت کننده به سرعت به بافت‌ها می‌رسد.

یکی از رایج‌ترین ثابت‌کننده‌های مورد استفاده در مطالعه با میکروسکوپ نوری، فرمالین، یک محلول بافر ایزوتونیک تهیه شده از فرمالدئید ۳۷ درصد است. این ترکیب و گلوتارآلدئید، ثابت کننده‌ای که برای میکروسکوپ الکترونی به کار می‌رود، هر دو با گروه‌های آمینی (NH_2) پروتئین‌ها واکنش نشان می‌دهند و از تخریب آن‌ها توسط پروتئازهای معمول جلوگیری می‌نماید. گلوتارآلدئید، همچنین با اتصال متقاطع پروتئین‌های مجاور هم، سلول‌ها و ساختارهای ماتریکس خارج سلولی را تقویت می‌کند.

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

قالب‌گیری و برش‌زدن[3]

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

قبل از ارتشاح بافتی با چنین موادی، بافت فیکس شده از محلول‌های اتانول که به تدریج غلظت آن‌ها افزایش می‌یابد و در نهایت به محلول ۱۰۰ درصد می‌رسد عبور داده شده و **آب‌گیری**[4] می‌شود. سپس یک حلال آلی که قابلیت مخلوط‌شدن با الکل و ماده قالب‌گیری را دارد، جایگزین اتانول می‌شود. این مرحله به عنوان مرحله **شفاف‌سازی**[5] معروف است، چرا که مواد مورد استفاده در ارتشاح، سبب شفاف‌شدن بافت می‌شوند.

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

1- Fixation
2- Fixative
3- Embedding & Sectioning
4- Dehydration
5- Clearing