ویراست سیزدهم ـ ۲۰۱۳

جان کوئیرا

# بافت‌شناسی پایه


تألیف

آنتونی ل. مشر

ترجمه

دکتر سیدمهدی منتظری

زیر نظر مستقیم

دکتر مسلم بهادری

استاد آسیب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران



کتاب ارجمند

کتاب ارجمند

آنتونی ل.مشر
بافت‌شناسی پایه جان کوئیرا
فروست: ۸۵۲
ترجمه: دکتر سیدمهدی منتظری
زیرنظر مستقیم: دکتر مسلم بهادری
ناشر: کتاب ارجمند
صفحه‌آرا: حسین اینانلو
طراح داخل متن: فاطمه نویدی
مدیر هنری: احسان ارجمند
سرپرست تولید: محبوبه بازعلی‌پور
ناظر چاپ: سعید خانکشلو
چاپ: غزال، صحافی: افشین
چاپ دوم، دی ۱۳۹۴، ۱۱۰۰ نسخه

www.arjmandpub.com

این اثر، مشمول قانون حمایت از مؤلفان و مصنفان و هنرمندان مصوب ۱۳۴۸ است، هر کس تمام یا قسمتی از این اثر را بدون اجازه مؤلف (ناشر) نشر یا پخش یا عرضه کند مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

سرشناسه: مشر، آنتونی ال. Mescher, Anthony L.
عنوان و نام پدیدآور: بافت‌شناسی پایه جان کوئیرا / تألیف آنتونی ل. مشر؛ ترجمه دکتر سیدمهدی منتظری؛ زیرنظر مستقیم دکتر مسلم بهادری.
مشخصات نشر: تهران: کتاب ارجمند، ۱۳۹۲.
مشخصات ظاهری: ۶۸۰ ص، قطع: وزیری
شابک: ۰-۳۲۷-۲۰۰-۶۰۱-۹۷۸
عنوان اصلی: Junqueira's basic histology: text and atlas, 13th. ed, c2013.
موضوع: بافت‌شناسی
موضوع: بافت‌شناسی -- اطلس‌ها
شناسه افزوده: منتظری، سیدمهدی، ۱۳۴۵- مترجم.
شناسه افزوده: بهادری، مسلم، ۱۳۰۵-، ناظر
شناسه افزوده: جان کوئیرا، لوئیز کارلوس اکوا، ۱۹۲۰-م. بافت‌شناسی پایه
رده‌بندی کنگره: الف ۱۳۹۲ ۲۸ب ۲ج/QLA۸۰۷
رده‌بندی دیویی: ۶۱۱/۰۱۸
شماره کتابشناسی ملی: ۳۲۵۳۳۱۳

مرکز پخش: انتشارات ارجمند
دفتر مرکزی: تهران بلوار کشاورز، بین خیابان کارگر و ۱۶ آذر، پلاک ۲۹۲، تلفن: ۸۸۹۸۲۰۴۰
شعبه مشهد: ابتدای احمدآباد، پاساژ امیر، طبقه پایین، انتشارات مجد دانش تلفن: ۰۵۱-۳۸۴۴۱۰۱۶
شعبه رشت: خیابان نامجو، روبروی ورزشگاه عضدی تلفن: ۰۱۳-۳۲۳۳۲۸۷۶
شعبه بابل: خیابان گنج‌افروز، پاساژ گنج‌افروز تلفن: ۰۱۱-۳۲۲۲۷۷۶۴
شعبه ساری: بیمارستان امام، روبروی ریاست تلفن: ۰۹۱۱-۸۰۲۰۰۹۰
شعبه کرمانشاه: خ مدرس، پشت پاساژ سعید، کتابفروشی دانشمند، تلفن: ۰۸۳-۳۷۲۸۴۸۳۸

بها: ۴۵۰۰۰ تومان

با ارسال پیامک به شمارهٔ ۵۹۹ ۵۹۹ ۰۰۰ ۰۰۰ ۱ در جریان تازه‌های نشر ما قرار بگیرید:
ارسال عدد ۱ : دریافت تازه‌های نشر پزشکی به صورت پیامک
ارسال عدد ۲: دریافت تازه‌های نشر روان‌شناسی به صورت پیامک
ارسال ایمیل: دریافت خبرنامهٔ الکترونیکی انتشارات ارجمند به صورت ایمیل

# فهرست


**فصل ۱. بافت‌شناسی و روشهای مطالعه در آن ..... ۱۱**
آماده‌سازی بافتها برای مطالعه ..... ۱۲
مطالعه با میکروسکوپ نوری ..... ۱۷
مطالعه با میکروسکوپ الکترونی ..... ۲۲
اتورادیوگرافی ..... ۲۴
کشت سلول و بافت ..... ۲۵
شیمی بافتی آنزیمی ..... ۲۶
نمایان‌سازی مولکولهای خاص ..... ۲۷
تفسیر ساختارهای موجود در برشهای بافتی ..... ۳۲
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۳۴

**فصل ۲. سیتوپلاسم ..... ۳۶**
تمایز سلولی ..... ۳۶
اندامک‌های سیتوپلاسمی ..... ۳۷
اسکلت سلولی (The Cytoskeleton) ..... ۶۸
انکلوزیونها ..... ۷۷
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۸۳

**فصل ۳. هسته ..... ۸۶**
اجزای هسته ..... ۸۶
چرخهٔ سلولی ..... ۹۵
میتوز ..... ۹۸
سلول‌های بنیادی و بازسازی بافت ..... ۱۰۱
میوز ..... ۱۰۲
آپوپتوز ..... ۱۰۴
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۱۰۷

**فصل ۴. بافت اپی تلیال ..... ۱۰۹**
ویژگی‌های خاص سلول‌های اپی تلیال ..... ۱۱۰
ساختمان‌های اختصاصی سطح رأسی سلول ..... ۱۱۷
انواع اپی تلیوم‌ها ..... ۱۲۰
انتقال از خلال اپی تلیوم‌ها ..... ۱۳۲
بازسازی سلول‌های اپی تلیال ..... ۱۳۴
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۱۳۸

**فصل ۵. بافت همبند ..... ۱۴۰**
سلول‌های بافت همبند ..... ۱۴۱
رشته‌ها ..... ۱۴۹
مادهٔ زمینه‌ای ..... ۱۵۸
انواع بافت همبند ..... ۱۶۶
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۱۷۱

**فصل ۶. بافت چربی ..... ۱۷۳**
بافت چربی سفید ..... ۱۷۴
بافت چربی قهوه‌ای ..... ۱۷۸
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۱۸۰

**فصل ۷. غضروف ..... ۱۸۱**
غضروف هیالن ..... ۱۸۳
غضروف الاستیک (ارتجاعی) ..... ۱۸۶
غضروف فیبری ..... ۱۸۷
تولید، رشد و ترمیم غضروف ..... ۱۸۸
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۱۹۰

**فصل ۸. استخوان ..... ۱۹۲**
سلول‌های استخوانی ..... ۱۹۴
ماتریکس استخوانی ..... ۱۹۸
پریوستئوم (ضریع) و آندوستئوم ..... ۲۰۰
انواع استخوان ..... ۲۰۰
ساخت استخوان ..... ۲۰۵

رشد، قالب‌گیری مجدد، و ترمیم استخوان ..... ۲۱۰
نقش متابولیک استخوان ..... ۲۱۳
مفاصل ..... ۲۱۴
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۲۱۸

**فصل ۹. بافت عصبی و دستگاه عصبی ..... ۲۲۲**
تکامل بافت عصبی ..... ۲۲۳
نورون‌ها ..... ۲۲۳
سلول‌های گلیال و فعالیت نورونی ..... ۲۳۲
دستگاه عصبی مرکزی ..... ۲۴۰
دستگاه عصبی محیطی ..... ۲۴۹
قالب‌پذیری و ترمیم بافت عصبی ..... ۲۵۸
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۲۶۰

**فصل ۱۰. بافت عضلانی ..... ۲۶۲**
عضله اسکلتی ..... ۲۶۳
عضله قلبی ..... ۲۷۹
عضله صاف ..... ۲۸۱
ترمیم بافت عضلانی ..... ۲۸۶
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۲۸۶

**فصل ۱۱. دستگاه گردش خون ..... ۲۸۹**
قلب ..... ۲۹۰
بافتهای دیوارهٔ رگ ..... ۲۹۴
تشکیلات رگی (Vasculature) ..... ۲۹۶
دستگاه رگهای لنفاوی ..... ۳۱۲
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۳۱۴

**فصل ۱۲. خون ..... ۳۱۶**
ترکیب پلاسما ..... ۳۱۷
سلول‌های خونی ..... ۳۱۸
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۳۳۵

**فصل ۱۳. خون‌سازی ..... ۳۳۷**
سلولهای بنیادی، فاکتورهای رشد و تمایز ..... ۳۳۷
مغز استخوان ..... ۳۴۰
بلوغ اریتروسیت‌ها ..... ۳۴۳
بلوغ گرانولوسیت‌ها ..... ۳۴۴
بلوغ آگرانولوسیت‌ها ..... ۳۴۷
منشأ پلاکت‌ها ..... ۳۴۹
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۳۵۱

**فصل ۱۴. دستگاه ایمنی و اندام‌های لنفوئید ..... ۳۵۲**
ایمنی ذاتی و تطبیقی ..... ۳۵۴
سیتوکین‌ها ..... ۳۵۵
آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌ها ..... ۳۵۵
ارائهٔ آنتی‌ژن ..... ۳۵۹
سلول‌های ایمنی تطبیقی ..... ۳۶۰
تیموس ..... ۳۶۶
بافت لنفوئید متصل به مخاط (MALT) ..... ۳۷۰
عقده‌های لنفی (Lymph Nodes) ..... ۳۷۴
طحال ..... ۳۷۹
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۳۸۵

**فصل ۱۵. دستگاه گوارش ..... ۳۸۸**
ساختمان عمومی مجرای گوارش ..... ۳۸۸
حفره دهانی ..... ۳۹۱
مری ..... ۴۰۲
معده (Stomach) ..... ۴۰۳
رودهٔ کوچک ..... ۴۱۲
رودهٔ بزرگ ..... ۴۱۹
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۴۲۷

**فصل ۱۶. اندامهای ضمیمهٔ دستگاه گوارش ..... ۴۳۰**
غدد بزاقی ..... ۴۳۰
پانکراس ..... ۴۳۵
کبد ..... ۴۳۸
مجاری صفراوی و کیسهٔ صفرا ..... ۴۵۰
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۴۵۳

**فصل ۱۷. دستگاه تنفس ..... ۴۵۵**
حفرات بینی ..... ۴۵۵
نازوفارنکس ..... ۴۶۰
حنجره (Larynx) ..... ۴۶۰
نای (Trachea) ..... ۴۶۲
درخت نایژه‌ای و ریه ..... ۴۶۳
تشکیلات عروقی و اعصاب ریه ..... ۴۷۸
پرده‌های جنب ..... ۴۷۸
حرکات تنفسی ..... ۴۷۹
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۴۸۰

**فصل ۱۸. پوست ..... ۴۸۲**
اپی‌درم ..... ۴۸۴
درم (Dermis) ..... ۴۹۳
بافت زیرپوستی ..... ۴۹۴
گیرنده‌های حسی ..... ۴۹۵
مو ..... ۴۹۶
ناخنها (Nails) ..... ۵۰۰
غدد پوست ..... ۵۰۰
ترمیم پوست ..... ۵۰۷
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۵۰۸

**فصل ۱۹. دستگاه ادراری ..... ۵۱۰**
کلیه‌ها ..... ۵۱۰
گردش خون ..... ۵۱۳
کارکرد کلیوی: پالایش، ترشح، و بازجذب ..... ۵۱۴
حالب‌ها، مثانه، و پیشابراه ..... ۵۲۸
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۵۳۲

**فصل ۲۰. غدد درون‌ریز ..... ۵۳۴**
غدهٔ مخاطی (هیپوفیز) ..... ۵۳۶
غدد آدرنال ..... ۵۴۵
جزایر پانکراس ..... ۵۵۱
دستگاه نوروآندوکرین منتشر ..... ۵۵۴
غدهٔ تیروئید ..... ۵۵۵
غدد پاراتیروئید ..... ۵۵۹
غده پینه‌آل یا صنوبری ..... ۵۶۰
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۵۶۳

**فصل ۲۱. دستگاه تولیدمثل مرد ..... ۵۶۵**
بیضه‌ها ..... ۵۶۵
مجاری داخل بیضه‌ای ..... ۵۷۷
مجاری تناسلی ترشحی ..... ۵۷۸
غدد ضمیمه ..... ۵۸۲
آلت تناسلی (Penis) ..... ۵۸۵
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۵۸۸

**فصل ۲۲. دستگاه تولیدمثل زن ..... ۵۹۰**
تخمدان‌ها ..... ۵۹۰
لوله‌های رحمی ..... ۶۰۳
رویدادهای اصلی لقاح ..... ۶۰۵
رحم (زهدان) ..... ۶۰۶
لانه گزینی رویان، دسیدوا، و جفت ..... ۶۱۲
گردن رحم ..... ۶۱۶
واژن (Vagina) ..... ۶۱۷
اندام‌های تناسلی خارجی ..... ۶۲۰
غدد پستانی (Mammary Glands) ..... ۶۲۰
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۶۲۵

**فصل ۲۳. چشم و گوش: اندام‌های حسی ویژه ..... ۶۲۸**
چشم‌ها: دستگاه گیرندهٔ نوری ..... ۶۲۸
گوش‌ها: دستگاه دهلیزی ـ شنوایی ..... ۶۵۲
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۶۶۸

**نمایه ..... ۶۷۳**

## به نام خداوند جان و خرد

اندیشهٔ تو گرچه بود دُرّ و خوش‌آب　　تابان نشود گر که نیاید به کتاب

**عبدالعظیم قریب**

شکر خدای را یگانه، که دگربار به من فرصت داد تا زحمات دوست گران‌قدرم آقای دکتر سیدمهدی منتظری را ارج نهم. سالهااست که دست‌اندرکاران علوم پزشکی، خصوصاً در علوم پایه پزشکی در ایران، با وی و ترجمه‌هایش، چه خود شخصاً انجام دهد و چه بر آنها نظارت داشته باشد، آشنائی دارند، و همگان بر آن واقف‌اند که وی در ترجمه متون پزشکی با دقت و وسواس قابل ستایش عمل می‌کنند. در اوایل کار که من با ایشان همکاری را شروع کردم، مترصد بودم که تمام بخش‌های ترجمه را با اصل کتاب انطباق دهم تا خطائی در فهم مطلب پیش نیاید؛ از آن زمان سالها می‌گذرد. اما امروزه مشاهده می‌کنم که من واقعاً در ترجمه‌هایی که وی به من ارائه می‌دهد نمی‌توانم کمکی بکنم، زیرا این کار با کمال صحت و امانت توسط آقای دکتر منتظری انجام گرفته است. لذا به پیش‌گفتاری دربارهٔ اهمیت کتابی که وی ترجمه آن را به من ارائه داده است، بسنده می‌کنم.

اثر حاضر ویرایش سال ۲۰۱۳ کتاب «بافت‌شناسی پایه» جان کوئیرا (Junqueira's Basic Histology: text and atlas) است، که تألیف آن مثل ویرایش قبلی توسط دکتر Anthony L. Mescher (استاد کالبدشناسی و زیست‌شناسی یاخته‌ای دانشگاه علوم پزشکی ایندیانا) انجام گرفته است. با آن که نویسنده اصلی کتاب (دکتر جان کوئیرا) اهل آمریکای جنوبی و کتاب اصلی نیز به زبانی غیر از انگلیسی نوشته شده بود، معذالک به‌علت روانی مطالب کتاب و قابل درک بودن آن به‌زودی به زبان انگلیسی و پس از آن به سایر زبان‌های زنده دنیا (بیش از دوازده زبان) ترجمه شده و این کتاب امروزه از مراجع اساسی آموزش بافت‌شناسی در اغلب دانشکده‌های پزشکی جهان (از جمله در ایالات متحده امریکا) است، و ما در ایران از همان ابتدا که دکتر جان کوئیرا زنده بود این کتاب را ترجمه کرده و در اختیار علاقه‌مندان قرار داده بودیم.

این کتاب به علت روانی نگارش، قابل فهم بودن مطالب، فراوانی و گویائی تصاویر، و بخصوص ایجاز آن مقبولیت یافته است. دکتر Mescher در مقدمه این ویرایش می‌نویسد "من متن کتاب را مورد تجدیدنظر قرار دادم و هر فصل را کوتاهتر کردم، در حالی‌که اطلاعات تازه‌ای را به آن افزوده‌ام و مطالبی را که توسعه آن لازم بود گسترش دادم"، و البته کسانی که با امر کتاب‌نویسی آشنایی دارند می‌دانند که این کار عظیمی است.

از ویژگی‌های مهم این کتاب آن است که در پایان هر فصل نکات مهم و کلیدی آن فصل جدا و خلاصه و جداول و اَشکال تازه‌ای افزوده و سئوالات لازم مطرح شده‌اند. مهمترین اقدام در این کتاب هماهنگی مطالب پایه با مسائل بالینی است، که خواندن کتاب را نه تنها برای دانشجویان علوم پزشکی، بلکه برای پزشکان نیز سودبخش کرده است. همانندگذشته کتاب به فصولی تقسیم شده است (مانند کلیات، مسائل مشترک، و مطالب مربوط به هر یک از اعضاء)، که خود هدایتگر روش دستیابی به مسائلی است که لزوماً با توالی مشخصی باید آموخته شوند.

ترجمهٔ کتاب به‌صورتی سلیس انجام شده است، جداول و زیرنویس تصاویر به‌خوبی تدوین شده‌اند، و خوانندهٔ فارسی‌زبان به آسانی مطالب مربوطه را درک خواهد کرد. با وجود افزودن برخی مطالب به کتاب، حجم آن تغییر زیادی نکرده است، و انتشارات ارجمند نیز به‌خوبی از عهدهٔ چاپ کتاب به‌صورتی زیبا برآمده است.

من شخصاً این اقدام بسیار باارزش فرهنگی را به دوست عزیزم آقای دکتر سیدمهدی منتظری و همکاران ایشان در انتشارات ارجمند تبریک می‌گویم، و مطالعهٔ این کتاب را برای دانشجویان علوم پزشکی ضروری می‌دانم.

خوشا آن درخت بلند گُشن  که در سایه‌اش خُفت هیزم‌شکن

«دکترعلی‌فروحی»

**دکتر مسلم بهادری**

تهران، شهریور ۹۲

# 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 بر پایهٔ 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 L. Carlos Junqueira 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 سیزدهم این کتاب که در سال ۲۰۱۳ میلادی به طبع رسیده است، با ویراستهای قبل تفاوتهای چشم‌گیری دارد. بازنگری کلیهٔ فصول به‌ویژه فصل دستگاه ایمنی 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 بخش‌های برگزیدهٔ متن کتاب، و مشخص نمودن ارتباطات بالینی در هر فصل که کاربرد مستقیم اطلاعات پایه بافت‌شناسی را در

روندهای تشخیص، پیش‌آگهی، پاتوبیولوژی و جنبه‌های بالینی بیماری‌ها نشان می‌دهند، 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 جادارد 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**

شهریور ۱۳۹۲

# پیش‌گفتار

هم اکنون در ویراست سیزدهم، "بافت‌شناسی پایهٔ جان کوئیرا" همچنان منبع ممتاز **فشرده اما جامعی** از اطلاعات دربارهٔ ساختمان و کارکرد بافتهای انسان است. برای بیش از ۴۰ سال، این منبع آموزشی نیازهای پژوهندگان را به‌عنوان متنی سازمان‌یافته و فشرده دربارهٔ **زیست‌شناسی و بافت‌شناسی سلول** برآورده کرده است و موضوعات مربوطه را با از آنِ **بیوشیمی و فیزیولوژی** در هم آمیخته و یکپارچه کرده و بنیانی مطلوب برای بررسی‌های بعدی در زمینهٔ **آسیب‌شناسی** فراهم کرده است. این متن اختصاصاً برای دانشجویان پزشکی و سایر رشته‌های مربوطه و نیز برای دوره‌های دانشجویی در زیست‌شناسی بافتی طراحی شده است. به دلیل ارزش و جاذبهٔ آن برای دانشجویان و نیز اساتید، "بافت‌شناسی پایهٔ جان کوئیرا" در تمام جهان و به زبانهای گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در این ویراست من متن 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. مطالعهٔ متن نیز به کمک یک **شیوهٔ جدید و طراحی صفحات** آسان شده است. در سر تاسر هر فصل پاراگرافهای کوتاه بیشتری گنجانده شده‌اند که نحوهٔ کاربرد طبی اطلاعاتِ ارائه‌شده را نشان می‌دهند و ارتباط بنیادین کاربردهای فوق را با مطالب مربوطه مورد تأکید قرار می‌دهند. هم‌چنین، براساس درخواست دانشجویان، من در انتهای هر فصل فهرستی از **نکات مهم** را ارائه کرده‌ام که چکیدهٔ آن فصل هستند. در هر فصل شکلها و **جداول خلاصه‌کننده‌ای** نیز افزوده شده‌اند که به‌منظور تسهیل روند یادگیری توسط دانشجویان، اطلاعات مربوطه را سازماندهی می‌کنند.

**ابداعات هنرمندانه** و شکلهای دیگری نیز در هر فصل وجود دارند، که هدف آنها کمک به یادگیری و یکپارچه‌سازی مطالب مربوطه است. اطلس پزشکی McGraw-Hill که اکنون در سراسر کتاب مورد استفاده قرار گرفته است، و نیز انیمیشن‌های متعددی که در نسخهٔ الکترونیکی کتاب وجود دارند، 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 مجموعهٔ لامهای شیشه‌ای یا دیجیتال خود دانشجویان کاملاً برابری می‌کند. یک **میکروسکوپ مجازی** با بیش از ۱۵۰ لام از کلیهٔ بافتها و اندامهای انسان در دسترس قرار گرفته است.

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

- در فصل آغازین نحوهٔ مطالعهٔ ساختمانهای سلولها و بافتها ارائه شده است.
- سپس دو فصل به بررسی اجمالی سازمان ساختمانی و کارکردی سیتوپلاسم و هستهٔ سلول 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 به‌روزشدهٔ 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**
mescher@indiana.edu

فصل ۱

# بافت‌شناسی و روشهای مطالعه در آن


آماده‌سازی بافتها برای مطالعه ..... ۱۲
ثابت‌سازی (Fixation)..... ۱۲
قالب‌گیری (Embedding) و برش‌دهی ..... ۱۳
رنگ‌آمیزی (Staining) ..... ۱۵
مطالعه با میکروسکوپ نوری ..... ۱۷
مطالعه با میکروسکوپ زمینه‌روشن ..... ۱۷
مطالعه با میکروسکوپ فلوئورسان ..... ۱۸
مطالعه با میکروسکوپ با کنتراست فاز ..... ۱۹
مطالعه با میکروسکوپ هم‌کانون..... ۲۰
مطالعه با میکروسکوپ با نور پولاریزه ..... ۲۱
مطالعه با میکروسکوپ الکترونی ..... ۲۲
مطالعه با میکروسکوپ الکترونی انتقالی..... ۲۲
مطالعه با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ ..... ۲۳
اتورادیوگرافی ..... ۲۴
کشت سلول و بافت ..... ۲۵
شیمی بافتی آنزیمی ..... ۲۶
نمایان‌سازی مولکولهای خاص ..... ۲۷
ایمونوهیستوشیمی ..... ۲۸
تکنیک‌های هیبریدیزاسیون (دورگه‌سازی)..... ۳۰
تفسیر ساختارهای موجود در برشهای بافتی ... ۳۲
چکیدهٔ نکات مهم ..... ۳۴


بافت‌شناسی (histology) عبارت از مطالعه بافتهای اجزای ساختمانی بدن و چگونگی آرایش این بافتها جهت تشکیل اندامها است. ریشهٔ یونانی histo را می‌توان به "بافت" یا "شبکه" ترجمه کرد، و هر دو ترجمه صحیح و مناسب‌اند زیرا بیشتر بافتها شبکه‌ای از فیلامان‌ها و رشته‌های درهم‌تنیده (هم سلولی و هم غیرسلولی) همراه با پوشش‌های غشایی هستند. بافت‌شناسی 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 ـ مانند فیبریل کلاژن و غشای پایه ـ تشکیل می‌دهند. ECM از سلول‌ها و مایعی که مواد غذایی را به سلول‌ها انتقال می‌دهد محافظت می‌کند، و کاتابولیت‌ها و فرآورده‌های ثانویهٔ آنها را از میان برمی‌دارد. سلولها ماتریکس خارج سلولی را تولید می‌کنند و نیز تحت تأثیر و گاه کنترل مولکولهای ماتریکس قرار دارند. [بدین ترتیب،] یک کنش متقابل شدید میان سلولها و ماتریکس وجود دارد، و بسیاری از اجزای ماتریکس توسط گیرنده‌های موجود بر سطح سلول مورد شناسایی قرار گرفته و به آنها متصل می‌شوند. بسیاری از این گیرنده‌های پروتئینی عرض غشاهای سلول را طی کرده، به اجزای ساختمانیِ درون سلول متصل می‌شوند. بدین ترتیب، سلولها و ماتریکس خارج سلولی پیوستاری (continuum) تشکیل می‌دهند که اجزای آن با همدیگر عمل کرده و نسبت به عوامل محرک و مهارگر واکنش نشان می‌دهند.

1. extracellular matrix

هریک از بافتهای بنیادی بدن توسط انواع مختلفی از ارتباطات مختص سلول میان سلولها و ماتریکس خارج سلولی تشکیل می‌شود. این ارتباطات مشخصه، شناسایی انواع بافتها را برای دانشجویان تسهیل می‌کنند. اندامها از ترکیب ویژه و مناسبی از بافتهای مختلف تشکیل شده‌اند، و ترکیب دقیق این بافتها امکان کارکرد را برای هر اندام و کل ارگانیسم فراهم می‌کند.

اندازهٔ کوچک سلولها و اجزای ماتریکس دانش 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 برخی از روشهای شایعتر 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 قابل مطالعه با میکروسکوپ نوری باشند. زیر میکروسکوپ نوری، بافتها به وسیله پرتوی از نور که از درون بافت عبور داده می‌شود، مورد بررسی قرار می‌گیرند. از آنجاکه بیشتر بافتها و اندامها ضخیم‌تر از آن هستند که بتوانند نور را از خویش عبور دهند، باید ابتدا جهت تهیهٔ مقاطع نازک و شفاف برش داده شوند و سپس روی لامهای شیشه‌ای قرار گیرند تا بتوانند مورد بررسی قرار گیرند.

یک آمادش میکروسکوپی ایده‌آل طوری حفظ شده است که روی لام همان ساختمان و ترکیب مولکولی را که در بدن دارا بوده است، داشته باشد. اما این کار در عمل به ندرت امکان‌پذیر است، و آرتیفکت‌ها (artifacts)، تغییرشکلها (آشفتگی‌ها)[1] و از دست رفتن اجزای بافت بر اثر فرآیند آماده‌سازی اغلب وجود دارند. مراحل اصلی در آماده‌سازی بافتها جهت مطالعهٔ میکروسکوپی در شکل ۱-۱ نشان داده شده‌اند.

### ثابت‌سازی (Fixation)

برای جلوگیری از تخریب بافت به وسیله آنزیمهای موجود درون سلولها (autolysis) یا باکتریها و برای حفظ ساختار سلول و بافت، قطعاتی از اندامها هر چه سریعتر بعد از بیرون آوردن از بدن تحت اقدامات حفاظتی قرار می‌گیرند. طیّ این اقدام حفاظتی آغازین ــ**ثابت‌سازی**ــ بافتها معمولاً در محلولهای حاوی مواد ثابت‌کننده یا اتصال‌ساز[2] به نام **ثابت‌ساز (fixative)** فرو برده می‌شوند. از آن‌جا که یک ثابت‌ساز باید کاملاً درون بافتها انتشار یابد تا [ساختار] همهٔ سلول‌ها را حفظ کند، بنا بر این بافتها معمولاً پیش از روند ثابت‌سازی به قطعات کوچکی بریده می‌شوند تا نفوذ مادهٔ ثابت‌ساز تسهیل و حفظ بافت بیشتر تضمین شود. در مورد برخی از اندامها یا جانوران آزمایشگاهی، می‌توان از تزریق (فرستادن) مواد ثابت‌ساز به درون عروق استفاده کرد. از آن‌جاکه در این حالت مادهٔ ثابت‌ساز به سرعت از طریق رگهای خونی به بافتها می‌رسد، بنا بر این روند ثابت‌سازی بهبود می‌یابد.

یکی از ثابت‌سازهای پُرکاربرد برای مطالعه با میکروسکوپ نوری عبارت است از فرمالین (یک محلول ایزوتونیک بافرشدهٔ فرمالدئید ۳۷٪). اساس شیمیایی فرآیند ثابت‌سازی در بسیاری از اجزای بافتی پیچیده است و همیشه به خوبی مشخص نیست. هم فرمالدئید و هم گلوتارآلدئید (ثابت‌سازی که اغلب برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی مورد استفاده قرار می‌گیرد)، با گروههای آمینیِ ($NH_2$) پروتئینهای بافتی واکنش نشان می‌دهند و جلویِ تجزیهٔ آنها را می‌گیرند. گلوتارآلدئید، با توجه به این که یک دی‌آلدئید است که می‌تواند اتصال متقاطع در پروتئین‌ها نیز ایجاد نماید، عمل ثابت‌سازی را تقویت می‌کند.

با توجه به بزرگنمایی و قدرت تمایز (resolution) زیادتری که میکروسکوپ الکترونی برای بررسی ساختارهای بسیار کوچک فراهم کرده است، دقت در ثابت‌سازی برای حفظ جزئیات بسیار ریز ساختمانی (فراساختاری: ultrastructural) لازم است. به این منظور، روش ثابت‌سازی مضاعف شامل استفاده از محلول گلوتارآلدئیدِ بافرشده و در پی آن فرو بردن نمونه در تتراکسید اسمیومِ بافرشده، یک روش استاندارد در

1. distortions: از شکل‌افتادگی‌ها
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 ساختمانهای سلول 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 تولوئن یا مواد دیگری 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 به‌دنبال 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.

آماده‌سازی بافتها در این گونه مطالعات است. نقش تتراکسید اسمیوم حفظ (و رنگ‌آمیزی) چربیها و نیز پروتئینهای غشاء است.

## قالب‌گیری (Embedding) و برش‌دهی

بافتها در یک محیط جامد فروبرده (قالب‌گیری) می‌شوند تا تهیهٔ برش از آنها آسان گردد. برای تهیه برشهای بسیار نازک، بافتها پس از ثابت‌سازی باید تحت ارتشاح (infiltration) مواد سفت‌کننده که به بافت قوام سخت می‌بخشند، قرار گیرند. مواد سفت‌کننده شامل پارافین و رزینهای پلاستیکی می‌باشند. پارافین به طور معمول برای میکروسکوپ نوری به کار می‌رود؛ رزین‌ها برای مطالعه با میکروسکوپ نوری و الکترونی هر دو به کار می‌روند.

قبل از قالب‌گیری در پارافین، یا تلقیح بافتی، دو مرحله اصلی دیگر وجود دارد: **آب‌گیری (dehydration)** و **پاک‌سازی (clearing)**. در فرآیند آب‌گیری، آبِ بافتهای ثابت شده از طریق انتقال پی‌درپی نمونه به یک سری مدرج از مخلوطهای اتانول با آب (معمولاً از اتانول ۷۰٪ تا ۱۰۰٪) استخراج می‌شود. سپس یک حلالِ آلیِ قابل امتزاج با هم الکل و هم محیط سفت‌کننده، جایگزین اتانول می‌شود. وقتی این حلال در بافتها ارتشاح می‌یابد، آنها شفاف‌تر می‌شوند (دستخوش فرآیند پاک‌سازی می‌شوند). بافتِ کاملاً پاکسازی شده سپس درون پارافینِ ذوب‌شده در اجاق (در دمای ۶۰°C-۵۲) قرار داده می‌شود. در این دماها حلالِ پاکسازی‌کننده تبخیر و بافت توسط پارافین مایع پر می‌شود. بافتِ تلقیح‌یافته سپس در یک ظرف کوچک حاوی پارافین در دمای اتاق سفت می‌شود. بافتهایی که با رزین پلاستیکی سفت می‌شوند نیز در اتانول آب‌گیری شده و ـ بسته به نوع رزین مورد استفاده ـ سپس با حلالهای پلاستیکی ارتشاح می‌یابند. اتانول یا حلالها بعداً به وسیله محلولهای پلاستیکی جایگزین می‌گردند، که این محلولها 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 چروک‌خوردگی و به هم ریختگی (distortion) شدید بافت را می‌گیرد.

قالب‌های سخت‌شدهٔ حاوی بافتها و پارافین سپس در وسیله‌ای به نام **میکروتوم** قرار داده شده (شکل ۱-۱) و به وسیله تیغهٔ فولادی آن به ضخامتهای بسیار نازک بریده می‌شوند. نمونه‌های پارافینی عموماً به ضخامت ۱۰-۱ $\mu m$ بریده می‌شوند؛ در حالی که تیغه‌های شیشه‌ای یا الماسی ریزمیکروتوم[1] برش‌هایی به ضخامت کمتر از ۱ $\mu m$ برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی تهیه می‌کنند. یک میکرومتر ($\mu m$) برابر ۰/۰۰۱ mm یا $10^{-6}$ m است. سایر واحدهای طول که کاربرد گسترده‌ای در بافت‌شناسی دارند عبارتند از نانومتر (۰/۰۰۱ $\mu m$ یا $10^{-6}$ mm یا $10^{-9}$ m) و آنگستروم (Å) (۰/۱ nm یا $10^{-4}$ $\mu m$). برش‌های بسیار نازک، 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 مخصوص قرار داده می‌شوند.

### » کاربرد طبی

بیوپسی‌ها نمونه‌های بافتی هستند که هنگام جراحی یا اقدامات[2] معمول طبی برداشته می‌شوند. در اتاق عمل یا مرکز طبی، بیوپسی‌ها در ویال[3] فرمالین ثابت می‌شوند تا بعداً 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**[4] در یک محفظه در دمای زیر انجماد جهت برش قالبِ حاوی بافت به کار می‌رود، و برش‌های منجمد[5] روی لام قرار داده می‌شوند تا به سرعت رنگ‌آمیزی شوند و توسط یک آسیب‌شناس مورد بررسی میکروسکوپی قرار گیرند.

---

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

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 مانند تولوئن چربیهای سلولیِ موجود در بافتهای ثابت‌شده را حل می‌کنند، بنا بر این 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 نوعاً 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 را از هم نیز میسر می‌کنند. مخلوطهای حاوی رنگ (رنگیزه‌ها) اجزای بافتی را به طور انتخابی بیشتر یا کمتر رنگ می‌کنند. اغلب رنگهای مصرفی مانند ترکیبات اسیدی یا بازی رفتار می‌کنند و پیوندهای الکتروستاتیک (نمکی) با رادیکالهای یونیزه‌شوندهٔ مولکولهای موجود در بافتها تشکیل می‌دهند. اجزای سلولی مانند اسیدهای هسته‌ای با بار منفی خالص (آنیونی) با رنگهای بازی راحت‌تر رنگ می‌گیرند و **بازوفیل (basophilic)** نامیده می‌شوند؛ اجزای کاتیونی (مانند پروتئین‌های واجد تعداد زیادی گروه‌های آمینی یونیزه) تمایل به رنگهای اسیدی دارند و **اسیدوفیل (acidophilic)** نامیده می‌شوند.

آبی تولوئیدین (toluidine blue)، آبی آلشین (alcian blue)، و آبی متیلن (methylene blue)، مثالهایی از رنگهای بازی هستند. هماتوکسیلین به صورت یک رنگ بازی رفتار می‌کند، یعنی اجزای بافتی بازوفیل را رنگ می‌کند. علت آنکه اجزای اصلی بافتی یونیزه می‌شوند و با رنگهای بازی واکنش می‌سازند، وجود اسیدها در ساختمان آنها است (DNA، RNA، و گلیکوزآمینوگلیکانها). 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 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 DNAی هسته سلول و سایر ساختمانهای اسیدی (مثل بخشهای غنی از RNAی سیتوپلاسم و ماتریکس غضروف) را رنگ می‌کند. در مقابل، ائوزین سایر اجزای سیتوپلاسم و کلاژن را به رنگ صورتی می‌کند (شکل ۲a-۱). رنگهای دیگر، مانند تری‌کروم‌ها (برای نمونه رنگ مالوری[1]، رنگ ماسون[2])، در اقدامات بافت‌شناسی پیچیده‌تر به کار می‌روند. تری‌کروم‌ها، علاوه بر آن که هسته و سیتوپلاسم را به خوبی نشان می‌دهند، اجزای بافتی برون‌سلولی را بهتر از H&E متمایز می‌کنند.

اساس شیمیایی سایر روشهای رنگ‌آمیزی پیچیده‌تر از برهم‌کنش‌های الکتروستاتیکی است که بازوفیلی و اسیدوفیلی را پدید می‌آورند. با استفاده از واکنش فولگن[3] می‌توان DNA را به طور اختصاصی در هسته تشخیص داد و میزان آن را اندازه‌گیری کرد؛ در این واکنش قندهای دزوکسی‌ریبوز توسط اسید هیدروکلریک ضعیف هیدرولیز می‌شوند و سپس پرداخت با **معرّف پریودیک اسید ـ شیف (PAS)** انجام می‌گیرد. اساس این واکنش PAS تغییر شکل گروه‌های ۱،۲-گلیکول موجود در قندها به پس‌ماندهای[4] آلدئید است، که سپس با معرّف شیف واکنش نشان می‌دهند و یک رنگ ارغوانی یا قرمز (magenta) ایجاد می‌کنند.

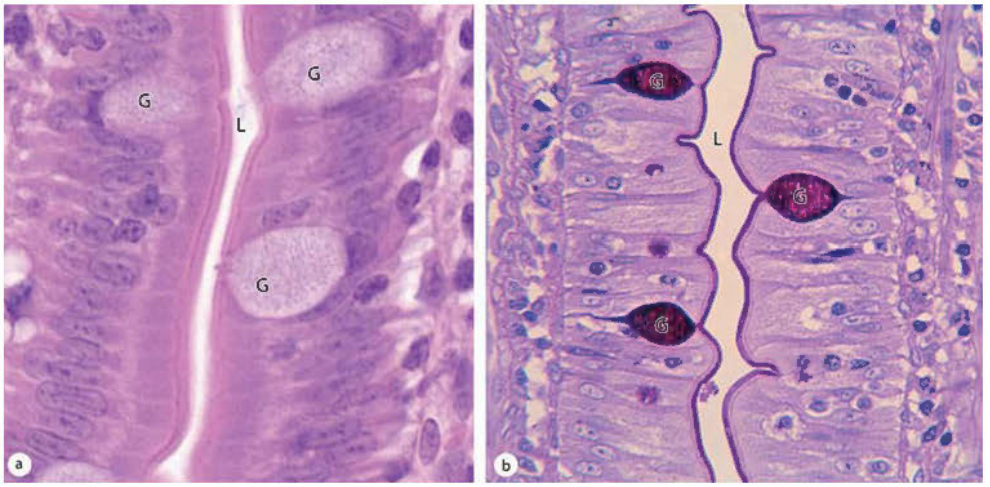
پلی‌ساکاریدها گروهی غیریکدست و متنوع را در بافتها تشکیل می‌دهند و به صورت آزاد یا در ترکیب با پروتئین‌ها و چربی‌ها یافت می‌شوند. بسیاری از پلی‌ساکاریدها، به دلیل محتوای قند هگزوزشان، می‌توانند با واکنش PAS نیز نمایان شوند. یک پلی‌ساکارید آزادِ متداول و همه جا موجود در سلول‌های جانوری **گلیکوژن** است، که می‌تواند با PAS درکبد، عضلهٔ مخطط و سایر بافتهایی که در آنها تجمع می‌یابد نمایان شود.

زنجیره‌های کوتاه شاخه‌دار قندها (اولیگوساکاریدها) به آمینواسیدهای خاصی از **گلیکوپروتئین‌ها** اتصال می‌یابند، که موجب می‌شود بیشتر گلیکوپروتئین‌ها PAS ـ مثبت شوند. شکل ۲b-۱ یک نمونه از سلول‌ها را نشان می‌دهد که با واکنش PAS رنگ‌آمیزی شده‌اند. **گلیکوزآمینوگلیکان‌ها** (GAGها) پلی‌ساکاریدهای آنیونیِ بدون شاخهٔ زنجیره بلندی هستند که قندهای آمینه دارند.

---

1. Mallory
2. Masson
3. Feulgen reaction
4. residues: شاخه‌های جانبی

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




میکروگرافهای اپی‌تلیوم استوانه‌ای پوشاننده 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 پیرونزده لایهٔ برجسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها در مجرا (L) دارند، و دو 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. بافت رنگ‌آمیزی‌شده با PAS مورد رنگ‌آمیزی تقابلی با هماتوکسیلین قرار گرفته است تا هسته‌های سلولها آشکار شوند.

بسیاری از GAGها در حالی که به یک پروتئین محوری متصل‌اند ساخته می‌شوند و جزء رده‌ای از ماکرومولکولها به نام **پروتئوگلیکان‌ها** هستند؛ سواد اخیر پس از ترشح بخش‌های مهم ساتریکس خارج سلولی (ECM) را به وجود می‌آورند (به فصل‌های ۵ و ۷ رجوع شود). GAGها و بسیاری از گلیکوپروتئین‌های اسیدی وارد واکنش PAS نمی‌شوند، اما به دلیل محتوای بالای گروه‌های آنیونی کربوکسیل و سولفات یک برهم‌کنش الکتروستاتیک قوی با آبی آلشین و سایر رنگهای بازی از خود نشان می‌دهند.

مادهٔ بازوفیل یا PAS ـ مثبت را می‌توان از طریق **هضم آنزیمی** مقدماتیِ یک برش بافتی با آنزیمی که به طور اختصاصی یک سوبسترا را هضم می‌کند، بیشتر مشخص کرد. برای نمونه، پرداخت اولیه[1] 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. به طریق مشابه، پلی‌ساکاریدهای آزاد به وسیلهٔ آمیلاز هضم می‌شوند، و بنا بر این آنزیم فوق می‌تواند جهت تشخیص گلیکوژن از گلیکوپروتئین‌ها در مادهٔ PAS ـ مثبت به کار رود.

در بسیاری از روشهای رنگ‌آمیزی برخی ساختمانهای خاص مانند هسته‌ها قابل رؤیت می‌شوند، اما سایر اجزای سلول بی‌رنگ باقی می‌مانند. در این موارد یک **رنگیزهٔ تقابلی (counterstain)**[2] جهت دست‌یابی به اطلاعات

1. pretreatment: پیش‌پرداخت

۲. رنگیزه‌ای که برای قابل تشخیص‌تر کردن اثرات یک رنگیزهٔ دیگر به کار می‌رود ـ م.

بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. رنگیزهٔ تقابلی معمولاً یک رنگ (مادهٔ رنگی) واحد است که به‌صورت جداگانه به کار گرفته می‌شود تا امکان تشخیص هسته و ساختمانهای دیگر فراهم شود. در رنگ‌آمیزی H&E، ائوزین رنگیزهٔ تقابلی برای هماتوکسیلین است.

بهترین روش آشکارسازی ساختمانهای غنی از چربیِ سلولها به کارگیری **رنگیزه‌های محلول در چربی** است، که نیاز به مراحل آماده‌سازی لام که چربی‌ها را از میان برمی‌دارند (مانند پرداخت با حرارت، حلال‌های آلی، یا پارافین) را برطرف می‌کند. عموماً برش‌های منجمد در محلول‌های الکل که با یک رنگیزهٔ چربی‌دوست مانند **سیاه سودان**[1] اشباع شده‌اند، رنگ‌آمیزی می‌شوند؛ این رنگیزه در ساختمانهای غنی از چربیِ سلولها حل می‌شود. روشهای تخصصی برای تشخیص و تعیین محل کلسترول، فسفولیپیدها و گلیکولیپیدها، در تشخیص بیماریهای متابولیک که در آنها تجمع این انواع گوناگون چربی‌ها درون سلول وجود دارد، سودمندند. علاوه بر رنگ‌آمیزی بافتها با رنگیزه‌ها، **تکنیک‌های تلقیح فلز** معمولاً با استفاده از محلولهای املاح نقره روش مرسومی جهت آشکارسازی برخی از رشته‌های خاص ECM و اجزای سلولی خاص در بافت عصبی هستند.

کل فرآیند، از ثابت‌سازی تا مشاهدهٔ یک بافت زیر میکروسکوپ نوری، می‌تواند از ۱۲ ساعت تا ۲/۵ روز طول بکشد (بسته به اندازهٔ بافت، نوع مادهٔ ثابت‌ساز، 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 چسباننده شفاف است.

## مطالعه با میکروسکوپ نوری

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

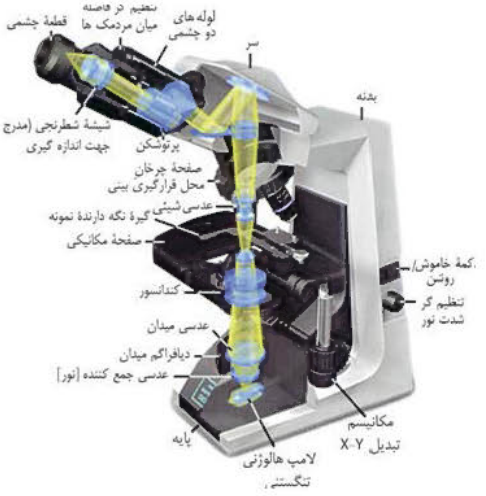
### مطالعه با میکروسکوپ زمینه‌روشن

با میکروسکوپ زمینه‌روشن[2] (که دانشجویان بافت‌شناسی به‌طور گسترده از آن استفاده می‌کنند)، آمادشهای رنگ‌شده به‌وسیلهٔ نور معمولی که از درون نمونه می‌گذرد، مورد مطالعه قرار می‌گیرند. میکروسکوپ از یک سامانهٔ نوری و مکانیسم‌هایی برای به حرکت درآوردن و درکانون قرار دادنِ نمونه تشکیل شده است (شکل ۳-۱). اجزای نوری از ۳ عدسی تشکیل شده‌اند: متراکم‌کننده (condenser)، عدسی شیئی (objective)، و قطعهٔ چشمی (eyepiece). **کندانسور** مخروطی از نور را مجتمع و متمرکز می‌کند که شیء مورد مشاهده را روشن می‌سازد. 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)[3] 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**[4] است، که عبارت است از کوچکترین فاصلهٔ بین ۲ شیء کوچک که در آن فاصله به صورت اشیای مجزا قابل مشاهده باشند. بالاترین قدرت تمایز میکروسکوپ نوری تقریباً ۰/۲ میکرومتر است؛ این قدرت تمایز تصویرهای خوبی که ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ برابر بزرگ شده‌اند، فراهم می‌کند. اجزای کوچکتر یا نازکتر از ۰/۲ میکرومتر (مانند ریبوزوم، یک غشا، یا یک فیلامان آکتین) 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 ــ وضوح و میزان نمایش جزئیات ــ به قدرت تمایز میکروسکوپ بستگی دارد. بزرگنمایی (magnification) فقط وقتی همراه قدرت تمایزهای بالا باشد، ارزشمند است. قدرت تمایز یک میکروسکوپ اساساً به کیفیت عدسی شیئی آن وابسته است. عدسی قطعهٔ چشمی فقط تصویرِ حاصل از عدسی شیئی را بزرگ می‌کند، اما قدرت تمایز را بهبود نمی‌بخشد. به این دلیل، در مقام مقایسهٔ عدسی‌های شیئی با بزرگنمایی‌های متفاوت، آنهایی که بزرگنمایی بیشتری

1. Sudan black
2. bright-field m.
3. charge-coupled device: ابزارِ الحاق‌یافته با بار [الکتریکی]
4. resolving power

**شکل ۴-۱ اجزای یک میکروسکوپ زمینه‌روشن و مسیر نور در آن.**




تصویر یک میکروسکوپ نوری زمینه‌روشن که اجزای مکانیکی آن و مسیر نور از لامپ زیر صفحه 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 چشمی تصویرِ نورگرفته و روشن‌شدهٔ شیء را بزرگ می‌کنند و آن را در جهت قطعهٔ چشمی پیش می‌برند. چشمی‌های 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.

دارند از قدرت تمایز بیشتری نیز برخوردارند.

دوربین‌های دیجیتالِ بسیار حساس به نور قدرت میکروسکوپ زمینه‌روشن و سایر میکروسکوپ‌های نوری را افزایش می‌دهند (از طریق امکان به دست آوردن تصاویری که برای آنالیز کمّی و چاپ فوری مناسب‌اند). استفاده از دوربین‌های دیجیتال حدّ کاربرد میکروسکوپ نوری را تغییر داده است، و با استفاده از برنامه‌های تقویت تصویر (مثلاً، جهت افزایش کنتراست)، اشیایی را که مستقیماً از طریق قطعهٔ چشمی قابل رؤیت نیستند می‌توان بر روی صفحه تصویر ویدئو مورد آنالیز قرار داد. این سیستم‌ها همچنین در مطالعهٔ سلولهای زنده برای دوره‌های زمانی طولانی سودمندند، زیرا از نورِ با شدت کم استفاده و بدین طریق از صدمه سلولیِ ناشی از گرمای حاصل از تابش نور شدیدتر جلوگیری می‌کنند. نرم‌افزاری که به‌منظور آنالیز تصویر ابداع شده است، امکان اندازه‌گیری سریع و مطالعهٔ کمّی ساختمانهای میکروسکوپی را فراهم می‌کند.

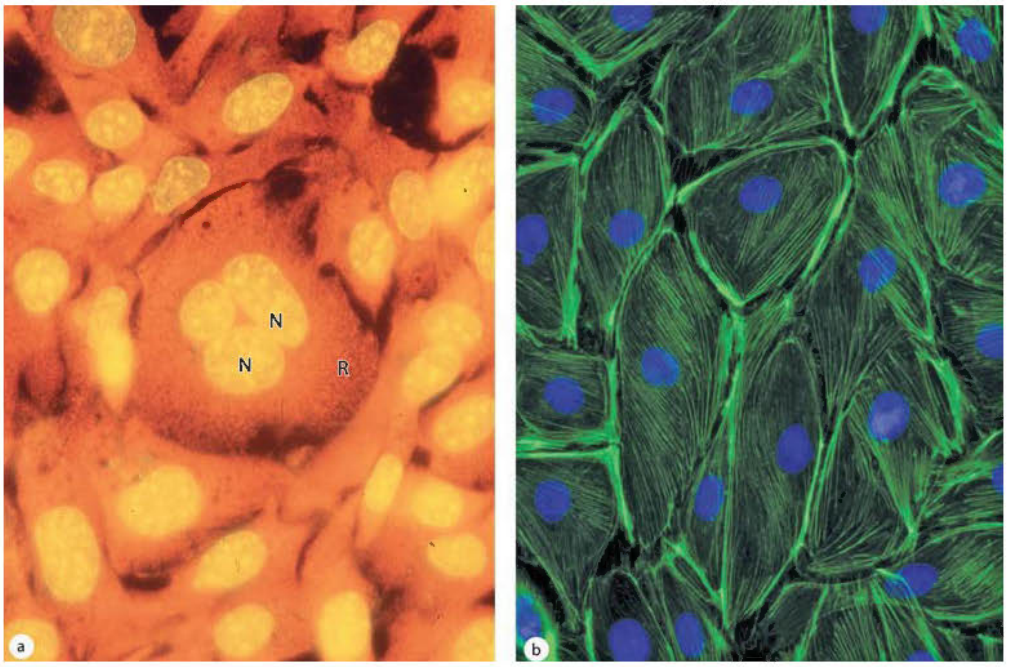
## مطالعه با میکروسکوپ فلوئورسان

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 درخشش در یک زمینهٔ تاریک به نظر می‌رسند. در این روش، میکروسکوپ مجهز به یک چشمهٔ قوی پرتو UV و فیلترهای مخصوصی است که به پرتوهای با طول موجهای متفاوت که از مواد ساطع می‌شوند امکان 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 ۴a-۱). سایر

1. acridine orange

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



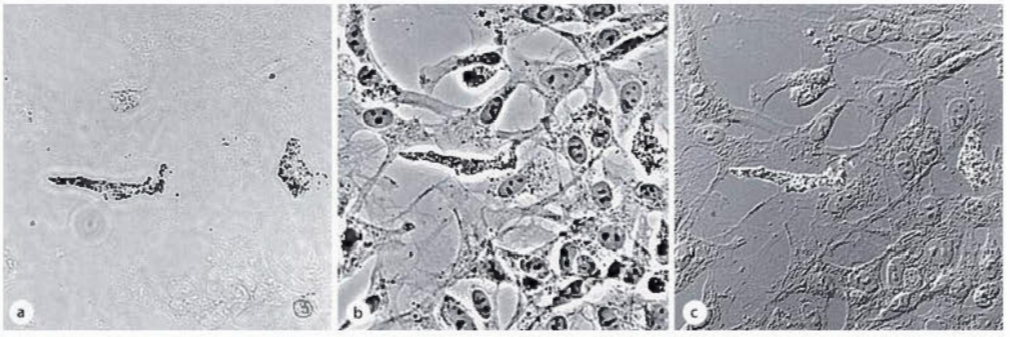

اجزای سلولها غالباً با ترکیباتی که در مطالعه با میکروسکوپ فلوئورسان قابل رؤیتاند، رنگ‌آمیزی می‌شوند.
(a): نارنجی آکریدین به اسیدهای هسته‌ای اتصال می‌یابد و موجب می‌شود DNAی هسته سلول (N) نور زرد از خود ساطع کند و سیتوپلاسم غنی از RNA (R) در این سلول‌های لوله کلیوی نارنجی به نظر برسد.
(b): رنگ‌آمیزی سلولهای کشت‌یافته با DAPI (۴′، ۶ـدی‌آمیدو ـ ۲ـفنیل‌ایندول) (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.

ترکیبات مانند رنگ Hoechst و DAPI اختصاصاً به DNA اتصال می‌یابند و جهت رنگ‌آمیزی هستهٔ سلول مورد استفاده قرار می‌گیرند و 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 میکروسکوپ 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

**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 رنگدانه‌ای 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 افترافی:** 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 افترافی، کاربرد گسترده‌ای در مشاهدهٔ سلولهای زنده‌ای دارد که در کشت بافت رشد کرده‌اند.

است. ولی در **مطالعه با میکروسکوپ 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).

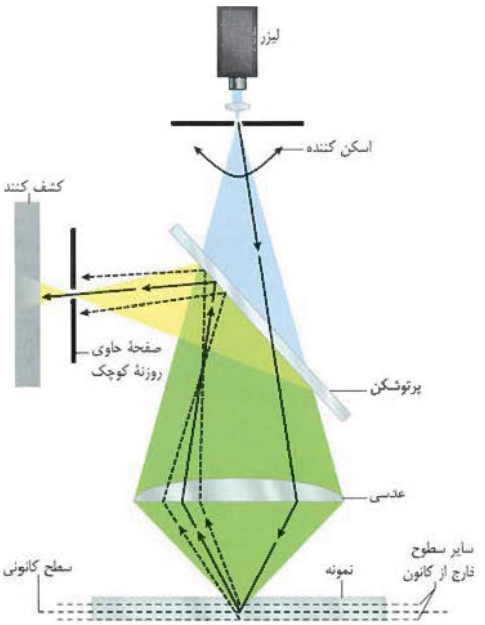
اساس کار مطالعه با میکروسکوپ با کنتراست فاز بر این اصل استوار است که سرعت نور هنگام عبور از ساختمانهای سلولی و خارج سلولیِ با ضرایب انکساری مختلف، تغییر می‌کند. این تغییرات توسط دستگاهِ با کنتراست فاز مورد استفاده قرار می‌گیرند تا موجب شوند ساختمانها نسبت به همدیگر روشن‌تر یا تیره‌تر به‌نظر برسند. از آنجا که بررسی سلول‌ها در مطالعه با میکروسکوپ با کنتراست فاز مستلزم ثابت‌سازی یا رنگ‌آمیزی نیست، این گرنه میکروسکوپها ابزار مهمی در کلیهٔ آزمایشگاههای کشت سلولی هستند. یک روش مربوطهٔ تغییریافته عبارت از **مطالعه با میکروسکوپِ با تداخل افترافی** با استفاده از ابزارهای نوری نومارسکی[1] است که از سلولهای زنده تصویری فراهم می‌کند که ویژگی‌های سه‌بعدی (3D) آن واضح‌تر هستند (شکل ۵-۱c).

## مطالعه با میکروسکوپ هم‌کانون

در میکروسکوپ زمینه‌روشن معمولی پرتو نور نسبتاً بزرگ است و کلِ 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 پوشدت که توسط یک لیزر تأمین می‌شود و (۲) یک صفحه با سوراخ (روزنه) سرسوزنی ریزی در جلوی آشکارساز تصویر.

1. Nomarski differential interference microscope

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.

منبع نور نقطه‌ای، نقطهٔ کانونی عدسی، و روزنهٔ سرسوزنی همگی از نظر اپتیک همبسته[1] یا در سطح کانونی نسبت به هم در یک راستا قرار دارند (هم‌کانون)، و نورِ تمرکز نیافته (به کانون درنیامده) از سوراخ سوسوزنی 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 زمینه روشن تشخیص داده شود.

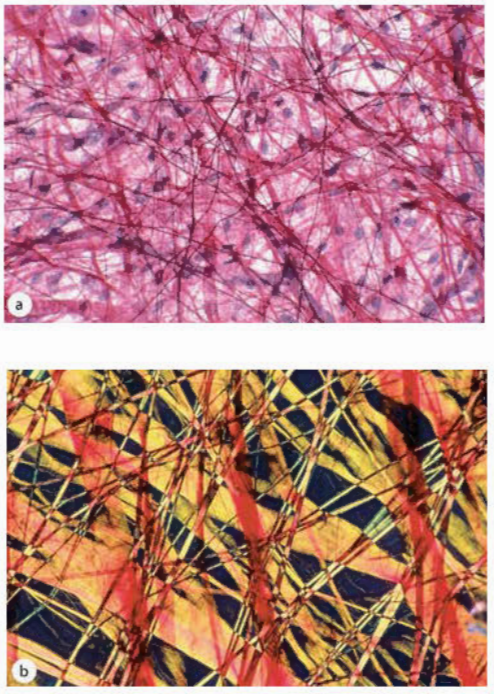
میکروسکوپهای هم‌کانون شامل یک سامانهٔ آینه‌ای با هدایت رایانه‌ای (پرتوشکن)[2] هستند که به صورت خودکار و به سرعت نقطهٔ نورپردازی را از این سو تا آن سوی نمونه حرکت می‌دهد. تصاویر دیجیتالی که در بسیاری از نقاط منفرد در یک صفحه (سطح) کانونی بسیار نازک تهیه شده‌اند، جهت ایجاد یک "برش نوری" از آن صفحه مورد 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 میکروسکوپ 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 محور اصلی آن عمود بر محور فیلتر اول باشد، نوری از دستگاه عبور نمی‌کند. ولی اگر ساختمانهای بافتی حاوی ساکرومولکولهای جهت‌دار بین دو فیلتر پولاریزه‌کننده قرار داده شوند، ساختمان تکرارشوندهٔ آنها سبب چرخش محور نورِ خارج‌شده از فیلتر پولاریزه‌کننده می‌شود. در نتیجه، آنها به صورت 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) است.

1. conjugated
2. beam splitter

**شکل ۷-۱ نمای بافت در مطالعه با میکروسکوپ زمینه‌روشن و میکروسکوپ با نور پولاریزه.**



میکروسکوپ با نور پولاریزه فقط از موادی تصویر تهیه می‌کند که دارای ساختار ماکرومولکولی تکراری دوره‌ای هستند؛ اجزای فاقد این ساختار دیده نمی‌شوند. تکه‌هایی از مزانتر برش‌نخوردهٔ نازک با پیکروسیریوس قرمز، اورسئین و هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی و [سپس] روی لام قرار داده شده و توسط میکروسکوپ زمینه‌روشن (a) و پولاریزه (b) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند.

(a): در مطالعه با میکروسکوپ زمینه‌روشن رشته‌های کلاژن به رنگ قرمز، و رشته‌های الاستیک نازک و هسته‌های سلول‌ها تیره‌تر ظاهر می‌شوند.

(b): در مطالعه با میکروسکوپ با نور پولاریزه فقط رشته‌های کلاژن قابل رؤیت‌اند، که خاصیت انکسار مضاعف زرد یا نارنجی شدیدی از خود نشان می‌دهند.

## مطالعه با میکروسکوپ الکترونی

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی انتقالی و اسکنینگ بر پایهٔ تداخل عمل پرتو الکترونها و اجزای بافتی استوار است. طول موج پرتو الکترونی بسیار کوتاه‌تر از نور است، و این امر قدرت تمایز آن را تا هزار برابر افزایش می‌دهد.

### مطالعه با میکروسکوپ الکترونی انتقالی

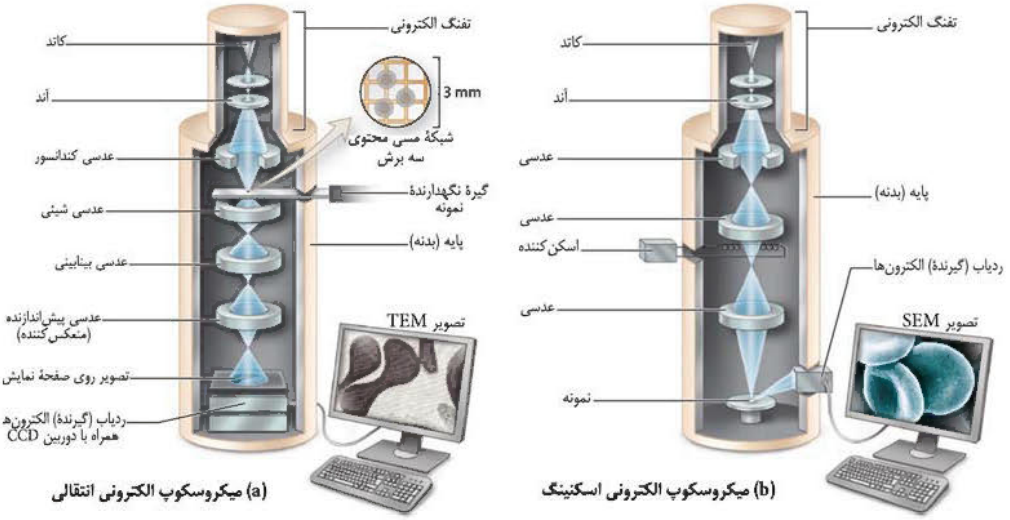
**میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM)**[1] یک سامانهٔ تصویرساز است که قدرت تمایزی حدود ۳nm ایجاد می‌کند. این قدرت تمایز بالا امکان آن را فراهم می‌کند که جزئیات تصویر با بزرگنمایی تا ۴۰۰,۰۰۰ برابر دیده شوند. متأسفانه، این میزان بزرگنمایی فقط برای مولکولها یا ذرّات منفرد قابل به کارگیری است. جزئیات برشهای بافتی بسیار نازک را می‌توان با بزرگنمایی تا حدود ۱۲۰,۰۰۰ برابر مشاهده کرد.

همان گونه که در شکل ۸a-۱ نشان داده شده است، در TEM یک رشتهٔ فلزی کاتُد الکترونها را ساطع می‌کند که به سمت آند پیش می‌روند (آند یک صفحهٔ فلزی با سوراخی در مرکز است که پرتوی از الکترونها تشکیل می‌دهد که از میان آن می‌گذرند). تفاوت ولتاژ میان کاتد و آند می‌تواند تقریباً از ۶۰ تا ۱۲۰ کیلوولت متغیر باشد، و این امر پرتوهای الکترونی با طول موج‌های متفاوت ایجاد می‌کند. این پرتو با گذر از درون آهن‌رباهای الکتریکی، که قدرت آنها نیز متفاوت است، به کانون درمی‌آید (متمرکز می‌شود).

نخستین عدسی یک کندانسور است که پرتو الکترونها را روی برشی از نمونه متمرکز می‌کند. برخی الکترونها با اتمهای برش وارد کنش متقابل می‌شوند و مسیرشان تغییر می‌یابد، در حالی که بقیه صرفاً از نمونه عبور می‌کنند بدون این که با آن وارد کنش متقابل شوند. الکترونهایی که از درون نمونه می‌گذرند به عدسی شیئی می‌رسند، که یک تصویرِ به کانون درآمدهٔ بزرگ‌شده ایجاد می‌کند که سپس از طریق سایر عدسی‌ها باز هم بزرگتر می‌شود و روی یک صفحهٔ نمایش قرار می‌گیرد. در تصویر نمونهٔ تحت بررسی مناطق سیاه و سفید و سایه‌های خاکستری رنگی دیده می‌شوند که مربوط به مناطقی هستند که از خلال آنها الکترونها به آسانی عبور کرده‌اند (که به صورت روشن‌تر یا مناطقِ با شفافیت الکترونی پدیدار می‌شوند) و مناطقی که در آنجا الکترونها جذب یا منحرف شده‌اند (که به صورت تیره‌تر یا مناطقِ با

1. transmission electron microscope

**شکل ۸-۱ میکروسکوپهای الکترونی.**




میکروسکوپهای الکترونی رسایل بزرگی هستند که عموماً در جایگاهی مختص EM نصب می‌شوند.

(a): نمای ترسیمی از اجزای اصلی میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM)، که طرح ساختمانی آن تقریباً مانند یک میکروسکوپ نوری وارونه است. بدنهٔ میکروسکوپ در خلأ قرار دارد و یک رشتهٔ فلزی (معمولاً تنگستن) (کاتد) در بالای بدنهٔ دستگاه الکترونها را ساطع می‌کند، که با ولتاژ شتاب‌دهندهٔ ۱۲۰–۶۰ کیلوولت به سمت آند حرکت می‌کنند. الکترونهایی که از میان سوراخ آند می‌گذرند، پرتوی تشکیل می‌دهند که توسط آهن‌رباهای الکتریکی یا گذر از درون سیم‌پیچ‌های الکتریکی حلقوی به روشی مشابه تأثیر عدسی‌های نوری بر نور به کانون درمی‌آید (متمرکز می‌شود).

نخستین عدسی یک کندانسور است که پرتو [الکترونها] را روی برش متمرکز می‌کند. برخی از الکترونها با اتم‌های برش برهم‌کنش نشان می‌دهند و به درجات مختلف جذب یا پراکنده می‌شوند، در حالی که بقیه بدون برهم‌کنش با نمونه صرفاً از آن عبور می‌کنند. الکترونهایی که به عدسی شیئی می‌رسند، تصویری ایجاد می‌کنند که سپس بزرگ شده و سرانجام بر روی یک صفحهٔ فلوئورسان یا یک صفحهٔ نمایشگر و دوربین CCD انداخته می‌شود.

در تصویر TEM مناطقی از نمونه که الکترونها از آنها عبور کرده‌اند روشن (واجد شفافیت الکترونی) به نظر می‌رسند، در حالی که مناطق متراکم‌تر یا ضخیم‌تر که در حین روند آماده‌سازی نمونه به یونهای فلزات سنگین اتصال می‌یابند الکترونها را جذب یا منحرف می‌کنند و تیره‌تر (واجد کدورت الکترونی) به نظر می‌رسند. بنا بر این، تصاویر مربوطه همواره سیاه و سفید یا سایه‌های خاکستری هستند.

(b): میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM) شباهت‌های بسیاری به TEM دارد. اما، در اینجا پرتو الکترونی تمرکزیافته از درون نمونه عبور نمی‌کند، بلکه متوالیاً نقطه به نقطه در عرض سطح نمونه حرکت (اسکن) داده می‌شود (شبیه روشی که از طریق آن یک پرتو الکترونی در عرض لامپ تصویر یا صفحهٔ تلویزیون اسکن داده می‌شود). برای SEM نمونه توسط اتمهای فلزی پوشانده می‌شود، و پرتو الکترونی با این اتمها برهم‌کنش نشان می‌دهد و الکترونهای بازتاب‌یافته و الکترونهای تازه‌ساطع‌شدهٔ ثانویه را پدید می‌آورد. کلیهٔ این الکترونها توسط یک ردیاب (detector: کشف‌کننده) گرفته و به تقویت‌کننده‌هایی منتقل می‌شوند و مورد پردازش قرار می‌گیرند تا تصویری سیاه و سفید روی صفحهٔ نمایشگر ایجاد کنند. SEM فقط نماهایی سطحی از نمونهٔ پوشانده‌شده اما با کیفیت سایه‌دار سه‌بُعدی قابل توجهی ارائه می‌کند. درون اندامها یا سلولها را می‌توان با برش‌دادن (شکافتن) آنها جهت آشکارسازی سطوح داخلی‌شان مورد آنالیز قرار داد.

کدورت الکترونی بیشتر پدیدار می‌شوند). برای افزایش کنتراست و قدرت تمایز در TEM، ترکیبات حاوی **یون‌های فلزی سنگین** غالباً به مادهٔ ثابت‌ساز یا محلول‌های آب‌گیری، که برای آماده‌سازی بافت به کار می‌روند، افزوده می‌شوند. این ترکیبات شامل تتراکسید اُسمیوم، سیترات سرب، و ترکیبات اورانیل هستند، که به ماکرومولکول‌های سلول اتصال می‌یابند و کدورت الکترونی و رؤیت‌پذیری آنها را افزایش می‌دهند.

TEM به طور طبیعی نیازمند برشهای بسیار نازک (۹۰-۴۰ nm) است؛ بنا بر این، قالب‌گیری بافت در یک اپوکسی سخت صورت می‌گیرد و برش‌دهی توسط یک چاقو با تیغهٔ شیشه‌ای یا الماس انجام می‌شود. برشها بر روی شبکه‌های فلزی کوچکی جمع‌آوری می‌شوند که جهت آنالیز در پایه (بدنهٔ) میکروسکوپ قرار داده می‌شوند.

**شکست انجمادی**[1] و **پرداخت انجمادی**[2] تکنیک‌هایی هستند که امکان مطالعهٔ سلولها را با TEM بدون ثابت‌سازی یا قالب‌گیری فراهم می‌کنند. شکست انجمادی در بررسی ساختمان غشاء بسیار سودمند بوده است. در این روشها، نمونه‌های بافتی بسیار کوچک به سرعت در نیتروژن مایع منجمد و با یک چاقو شکانده یا بریده می‌شوند. با به کارگیری لایه‌های نازکی از بخار پلاتین یا سایر اتم‌های فلزی، رونوشتی (المثنی) از سطح برهنه و ناپوشیدهٔ منجمد در یک خلاء تهیه می‌شود. پس از برداشت مادهٔ آلی، رونوشت سطح بریده شده می‌تواند توسط EM مورد بررسی قرار گیرد. در غشاها سطوح شکست اتفاقی اغلب دولایهٔ لیپیدی را می‌شکافند و اجزای پروتئینی را در معرض قرار می‌دهند؛ بررسی اندازه، شکل و توزیع این اجزاء توسط سایر روشها دشوار است.

## مطالعه با میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ

**میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ (SEM)**[3] نمایی با قدرت تمایز (وضوح) بالا از سطوح سلولها، بافتها و اندامها فراهم می‌کند. این میکروسکوپ نیز همانند TEM یک پرتو الکترونی خیلی باریک تولید می‌کند و به کانون درمی‌آورد، اما در این وسیله پرتو از درون نمونه عبور نمی‌کند (شکل ۸b-۱). در عوض، سطح نمونه نخست خشک می‌گردد و لایهٔ بسیار نازکی از یک فلز سنگین (اغلب طلا) (که الکترونها به آسانی از آن نمی‌گذرند)، از طریق اسپری روی آن کشیده می‌شود. هنگامی که پرتو نقطه به نقطه از این سو تا آن سوی نمونه حرکت داده می‌شود، با اتم‌های فلز وارد کنش متقابل می‌شود و الکترونهای بازتابیده یا الکترونهای ثانویه را که از فلز ساطع شده‌اند، پدید می‌آورد. این الکترونها توسط یک آشکارساز گرفته می‌شوند، و سیگنال حاصله مورد پردازش قرار می‌گیرد تا تصویری سیاه و سفید روی یک صفحهٔ نمایش ایجاد شود. تصاویر SEM معمولاً به راحتی قابل تفسیر هستند، زیرا نمایی 3D را ارائه می‌دهند که به نظر می‌آید از بالا نورپردازی شده است (به همان صورت که اشیای بزرگ با سایه‌روشنهای ناشی از نورپردازی از بالا دیده می‌شوند).

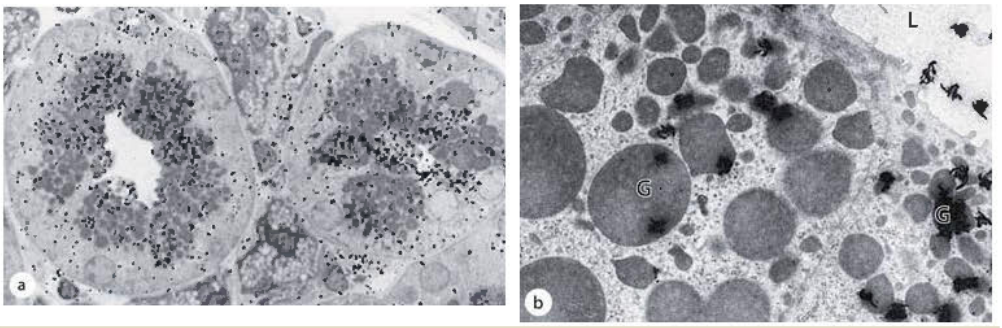
## اتورادیوگرافی

**اتورادیوگرافی** میکروسکوپی روشی برای مکان‌یابی ماکرومولکول‌های تازه‌ساز (DNA، RNA، پروتئین، گلیکوپروتئین‌ها، و پلی‌ساکاریدها) در سلولها یا برش‌های بافتی است. متابولیت‌های نشاندارشده با مادهٔ رادیواکتیو (نوکلئوتیدها، آمینواسیدها) که به درون ماکرومولکول‌ها راه یافته‌اند، پرتو ضعیفی ساطع می‌کنند که محدود به مناطقی از سلول است که مولکولها در آنجا قرار دارند. سلولهای نشاندارشده با مادهٔ رادیواکتیو یا برش‌های بافتیِ آماده‌شده در یک تاریک‌خانه با امولسیون عکاسی محتوی بلورهای برومید نقره پوشانده می‌شوند؛ این بلورها به صورت ریزآشکارسازهایی برای پرتو مذکور عمل می‌کنند (به همان صورتی که در فیلم عکاسی معمولی به نور واکنش نشان می‌دهند). پس از طیّ یک زمان مکفی جهت قرارگیری در معرض مادهٔ موردنظر در جعبه‌های ضدّ نور، لامها به طریق عکاسی ظاهر می‌شوند. بلورهای برومید نقره که توسط پرتو احیا شده‌اند، دانه‌های سیاه کوچکی از نقرهٔ فلزی ایجاد می‌کنند که، زیر میکروسکوپ نوری یا TEM، محل ماکرومولکول‌های نشاندار را در بافت نشان می‌دهند (شکل ۹-۱).

با اتورادیوگرافی سلولها یا بافتها اطلاعات زیادی در دسترس قرار می‌گیرد. اگر یک پیش‌ساز رادیواکتیو DNA (مانند تیمیدین رادیواکتیو) مورد استفاده قرار گیرد، امکان آن فراهم می‌شود که بدانیم کدام سلولها در یک بافت (و چه تعداد از آنها) در حال تکثیر DNA و در شرف تقسیم شدن

1. cryofracture: شکست سرمایی
2. freeze etching
3. scanning electron microscope

شکل ۹-۱ اتورادیوگرافی میکروسکوپی.




اتورادیوگرافها آمادش‌های بافتی هستند که در آنها ذراتی به نام دانه‌های نقره سلولها یا مناطقی در سلولها را مشخص می‌کنند که در آنها ماکرومولکولهای خاصی درست پیش از روند ثابت‌سازی ساخته شده‌اند. در اینجا اتورادیوگرافهایی از غدهٔ بزاقی یک موش که ۸ ساعت پیش از ثابت‌سازی بافت تحت تلقیح $H^3$-فوکوز قرار گرفته است، نشان داده شده‌اند. فوکوز وارد ساختمان اولیگوساکاریدها شده است، و $H^3$-فوکوز آزاد در خلال روند ثابت‌سازی و برش غده برداشته شده است. پردازش اتورادیوگرافیک و مطالعهٔ میکروسکوپی مربوطه محل گلیکوپروتئین‌های تازه‌سازِ حاوی این قند را نشان می‌دهند.

(a): دانه‌های نقرهٔ سیاهِ حاصل از مادهٔ حساس به نور که نمونه را پوشانده است، بر روی مناطق سلولیِ حاوی گرانولهای ترشحی و مجرا[ی غده] قابل رؤیت‌اند و نشانگر محل گلیکوپروتئین هستند.

(b): همان بافت که برای اتورادیوگرافی TEM آماده‌سازی شده است. نشانگر دانه‌های نقره با ظاهری پیچ‌خورده یا بی‌شکل است که باز عمدتاً بر روی گرانولها (G) و در مجرای غده (L) متمرکز شده‌اند.

هستند. رویدادهای دینامیک نیز می‌توانند مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند. برای نمونه، جهت تعیین آن که پروتئینی که ترشح می‌شود در کجای سلول تولید می‌شود و پیش از ترشح چه مسیری را در سلول طی می‌کند، جانوران مختلف تحت تزریق یک آمینواسید رادیواکتیو قرار می‌گیرند و از بافت‌هایشان در زمانهای مختلف پس از تزریق نمونه‌برداری می‌شود. اتورادیوگرافی بافت‌ها در زمانهای متوالی (به صورت پشت سر هم)، روند مهاجرت پروتئین‌های رادیواکتیو را نشان می‌دهد.

## کشت سلول و بافت

سلولها و بافتهای زنده می‌توانند خارج از بدن در کشت (در لولهٔ آزمایش[1]) نگهداری شوند و مورد بررسی قرار گیرند. در یک ارگانیسم (در بدن موجود زنده[2])، سلولها در مایع حاصل از پلاسمای خون (که حاوی بسیاری از مولکولهای مختلف است که برای بقا و رشد مورد نیازند)، غوطه‌ور هستند. کشت سلول در بررسی کارکردهای این مولکول‌ها بسیار ارزشمند بوده است. این روش همچنین امکان مشاهدهٔ مستقیم رفتار سلولها زیر میکروسکوپِ با کنتراست فاز را فراهم می‌کند. بسیاری از آزمایشاتی راکه از نظر فنی (تکنیکی) نمی‌توان در حیوان زنده به انجام رساند، می‌توان در لولهٔ آزمایش انجام داد.

سلولها و بافتها در محلولهای پیچیده‌ای از ترکیبات شناخته شده (نمکها، آمینواسیدها، ویتامین‌ها) که اجزای سرم یا فاکتورهای رشد خاصی به آنها اضافه می‌شوند، رشد داده می‌شوند. برای کشت یک بافت یا اندام، سلولها را باید به طریق مکانیکی یا آنزیمی از هم جدا ساخت. پس از جداسازی، می‌توان سلولها را در یک بشقاب تمیز، که سلولها معمولاً در یک لایهٔ منفرد به آن متصل می‌شوند، کشت داد (شکل ۵-۱). کشتهای سلولی که بدین روش تهیه (جداسازی) می‌شوند، **کشت سلولی اولیه** نام دارند.

1. in vitro
2. in vivo

بسیاری از انواع سلولی را پس از جداسازی از بافت طبیعی یا پاتولوژیک می‌توان برای مدت‌های طولانی در لولهٔ آزمایش نگهداری کرد، زیرا آنها فناناپذیر می‌شوند و [اکنون] یک **رده سلولی**[1] دائمی را تشکیل می‌دهند. اغلب سلولهای به دست آمده از بافتهای طبیعی طول عمری محدود و از نظر ژنتیکی برنامه‌ریزی‌شده دارند. ولی بعضی از تغییرات (که بیشتر به انکوژنها[2] مربوط می‌شوند؛ به فصل ۳ رجوع شود)، می‌توانند سبب فناناپذیری (immortality) سلولی شوند؛ این فرآیند **استحاله (transformation)** نامیده می‌شود و ممکن است شبیه تغییرات اولیه در سرطانی‌شدن یک سلول طبیعی باشد. به دلیل پیشرفت در تکنولوژی کشت، هم‌اکنون می‌توان بیشتر انواع سلولها را در آزمایشگاه نگهداری کرد. جهت اجتناب از آلودگی با میکروارگانیسم‌ها، کلیهٔ اقدامات بر روی سلولها و بافتهای زنده باید در یک محیط استریل (با استفاده از محلولها و تجهیزات استریل) به انجام برسند.

همان‌گونه که در فصل ۲ آمده است، تلقیح بسیاری از ترکیبات فلوئورسان جدید که در بخش‌های خاصی از سلول تجمع یافته و متابولیزه می‌شوند به سلولهای زنده در لولهٔ آزمایش، امکان جدیدی برای شناخت ساختمان و فیزیولوژی این بخش‌ها فراهم می‌کند. سایر تکنیک‌های بافت‌شناختی که بر روی سلولهای کشت‌یافته به کار گرفته می‌شوند، برای درک مکان و کارکردهای میکروتوبول‌ها، میکروفیلامان‌ها، و سایر اجزای اسکلت سلولی بسیار اهمیت داشته‌اند.

### » کاربرد طبی

کشت سلول برای مطالعهٔ تغییرات مولکولی در سرطان، برای بررسی عفونت‌های ناشی از ویروس‌ها، میکوپلاسما و برخی از تک‌یاخته‌ها، و نیز برای بسیاری از بررسی‌های معمول ژنتیکی یا کروموزومی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته است. سلولهای سرطانی گردن رحم یک بیمار به نام Henrietta Lacks، که در سال ۱۹۵۱ بر اثر این بیماری درگذشت، برای تهیهٔ یکی از نخستین رده‌های سلولی، به نام **سلولهای هِلا**[3]، مورد استفاده قرار گرفتند؛ این سلولها هنوز در پژوهش‌های مربوط به ساختمان و کارکرد سلول در سراسر جهان به کار می‌روند.

## ➤ شیمی بافتی آنزیمی

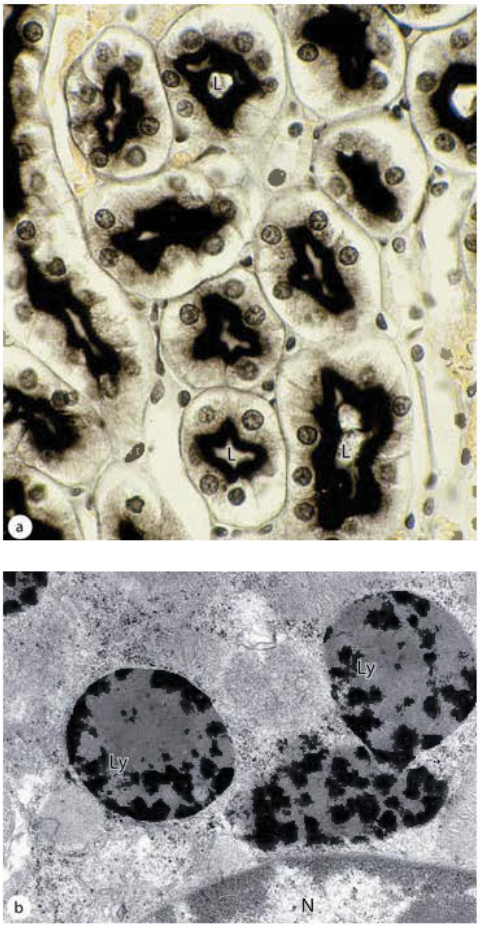
**شیمی بافتی آنزیمی (enzyme histochemistry)** (شیمی سلولی) روشی برای تعیین موقعیت ساختمانهای سلولی با استفاده از فعالیت یک آنزیم خاص موجود در آن ساختمانها است. برای حفظ این آنزیم‌ها روش‌های شیمی بافتی معمولاً بر روی بافت ثابت نشده یا اندکی ثابت شده به انجام می‌رسند، و این بافت اغلب بر روی یک کرایوستات برش داده می‌شود تا جلوی اثرات ناخواستهٔ گرما و حلال‌های آلی بر فعالیت آنزیمی گرفته شود. شیمی بافتی آنزیمی معمولاً به طریق زیر عمل می‌کند: (۱) برشهای بافتی در محلولی که حاوی سوبسترای آنزیم موردنظر است، فرو برده می‌شوند؛ (۲) به آنزیم امکان داده می‌شود که روی سوبسترایش عمل کند؛ (۳) در این مرحله یا بعداً، برش در تماس با یک ترکیب نشانگر (marker) قرار داده می‌شود که با یکی از فرآورده‌های عمل آنزیم روی سوبسترا واکنش نشان می‌دهد؛ (۴) فرآوردهٔ نهایی ترکیب نشانگر، که باید نامحلول باشد و توسط میکروسکوپ نوری یا الکترونی (به دلیل آن که رنگی یا دارای کدورت الکترونی است) قابل رؤیت است، روی منطقهٔ حاوی آنزیم‌ها رسوب و امکان آن را فراهم می‌کند که منطقهٔ موردنظر در بررسی میکروسکوپی مشخص گردد.

در میان آنزیمهایی که می‌توانند به روش شیمی بافتی مورد تشخیص قرار گیرند، نمونه‌های زیر قرار دارند:

- **فسفاتازها**، که پیوند میان یک گروه فسفات و مولکول‌های فسفریله را می‌شکنند. هم فسفاتازهای قلیایی، که حداکثر فعالیت آنها در pH قلیایی است، و هم فسفاتازهای اسیدی می‌توانند به این روش مورد شناسایی قرار گیرند (شکل ۱۰-۱).
- **دِهیدروژنازها**، که یونهای هیدروژن را از یک سوبسترا برداشته و آنها را به یک سوبسترای دیگر منتقل می‌کنند، با تلقیح (وارد کردن) برش‌های بافتیِ ثابت‌نشده در یک محلول سوبسترا حاوی یک مولکول که هیدروژن را دریافت و به صورت یک ترکیب رنگی نامحلول رسوب می‌کند، تشخیص داده می‌شوند. میتوکندریها را می‌توان با این روش به طور اختصاصی شناسایی کرد، زیرا دهیدروژنازها در میان آنزیم‌های چرخهٔ اسید سیتریک (کربس) این اندامک قرار دارند.

1. cell line
2. oncogenes
3. HeLa cells

شکل ۱۰-۱ شیمی بافتی آنزیمی.




(a): میکروگراف برش عرضی لوله‌های کلیه که برای فسفاتاز قلیایی مورد پرداخت هیستوشیمیایی قرار گرفته است. نشانگر فعالیت شدید این آنزیم در سطوح رأسی سلولها در مجرای (L) لوله‌ها است.
(b): عکس TEM یک سلول کلیه که در آن محل فسفاتاز اسیدی به طریق هیستوشیمیایی در سه لیزوزیم (Ly) در نزدیکی هسته (N) مشخص شده است. مادهٔ تیرهٔ درون این ساختمانها فسفات سرب است که در محلهای واجد فعالیت فسفاتاز اسیدی رسوب کرده است.

- **پراکسیداز**، که با انتقال یونهای هیدروژن به پراکسید هیدروژن و تشکیل مولکولهای آب روند اکسیداسیون سوبستراها را به پیش می‌برد، غالباً از طریق شیمی بافتی تشخیص داده می‌شود. برش‌های سلولی یا بافتی در یک محلول حاوی پراکسید هیدروژن و ۳،۳′-دی‌آمینوآزوبنزیدین (DAB) تلقیح می‌شوند. ترکیب اخیر در حضور پراکسیداز اکسیده می‌شود، که نتیجهٔ آن تولید یک رسوب نامحلول قهوه‌ای با کدورت الکترونی[1] است.

### » کاربرد طبی

روشهای شیمی بافتی آنزیمی فراوانی در آزمایشگاههای طبی مورد استفاده قرار می‌گیرند، و موارد زیر در میان آنها قرار دارند: واکنش آبی پروس[2] پرلز برای آهن (جهت تشخیص بیماریهای ذخیرهٔ آهن مانند هموکروماتوز و هموسیدروز)، واکنش‌های PAS–آمیلاز و آبی آلشین[3] برای گلیکوژن و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها (جهت تشخیص گلیکوژنوز و موکوپلی‌ساکاریدوز)، و واکنش‌های ویژهٔ لیپیدها و اسفنگولیپیدها (جهت تشخیص اسفنگولیپیدوز).

## نمایان‌سازی مولکولهای خاص

یک ماکرومولکول خاص موجود در یک برش بافتی گاهی می‌تواند با استفاده از ترکیباتِ برچسب زده یا ماکرومولکولهایی که به طور اختصاصی با مادهٔ موردنظر کنش متقابل نشان می‌دهند، مورد شناسایی قرار گیرد. ترکیباتی که با این مولکول کنش متقابل نشان خواهند داد، غالباً باید با یک برچسب که بتواند زیر میکروسکوپ نوری یا الکترونی مورد ردیابی قرار گیرد، نشاندار شوند. برچسب‌هایی که بیشترین کاربرد را دارند عبارتند از ترکیبات فلوئورسان، اتم‌های رادیواکتیو (که از طریق اتورادیوگرافی قابل ردیابی هستند)، مولکولهای پراکسیداز یا سایر آنزیم‌ها (که از طریق شیمی بافتی قابل ردیابی هستند)، و ذرات فلزی (معمولاً طلا) که توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی قابل مشاهده‌اند. از این روش‌ها می‌توان برای شناسایی و تعیین محل برخی قندها،

1. electron dense
2. Prussian blue: نیل فرنگی
3. alcian blue

پروتئین‌ها و اسیدهای هسته‌ای خاص استفاده کرد.

نمونه‌هایی از ترکیباتی که به طور اختصاصی با سایر مولکولها کنش متقابل نشان می‌دهند، عبارتند از:

- **فالوئیدین** ترکیبی است که از یک قارچ *(Amanita phalloides)* به دست می‌آید و به شدت با آکتین کنش متقابل نشان می‌دهد و غالباً جهت آشکارسازی فیلامانهای آکتین در سلولها با رنگیزه‌های فلوئورسان نشاندار می‌شود (شکل ۴b-۱).
- **پروتئین A** از باکتری **استافیلوکوک طلایی** به دست می‌آید و به ناحیهٔ Fc مولکول‌های ایمونوگلوبولین (آنتی‌بادی) اتصال می‌یابد. بنا بر این، از پروتئین A نشاندار می‌توان برای تعیین محل آنتی‌بادیهای متصل به سطوح سلول که به طور طبیعی در محل وجود دارند یا به آن اضافه شده‌اند، استفاده کرد.
- **لکتین‌ها** پروتئین‌ها یا گلیکوپروتئین‌هایی هستند که عمدتاً از بذرهای گیاهی به دست می‌آیند و با تمایل بالا و به طور اختصاصی به کربوهیدراتها متصل می‌شوند. لکتین‌های گوناگون به قندها یا سکانس‌های خاصی از پس‌ماندهای قندی اتصال می‌یابند. لکتین‌های نشاندارشده با مواد فلوئورسان جهت رنگ‌آمیزی گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکانها و گلیکولیپیدهای خاص و نیز مشخص کردن ترکیبات غشایی حاوی سکانس‌های خاصی از پس‌ماندهای قندی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

## ایمونوهیستوشیمی

یک کنش متقابل بسیار اختصاصی میان مولکولها کنش میان یک آنتی‌ژن و آنتی‌بادی آن است. به این دلیل، روش‌هایی که از آنتی‌بادیهای نشاندار استفاده می‌کنند در شناسایی (تشخیص) و تعیین موقعیت بسیاری از پروتئین‌های خاص (و نه فقط پروتئین‌های دارای فعالیت آنزیمی که از طریق شیمی بافتی قابل شناسایی هستند)، فوق‌العاده اهمیت یافته‌اند.

سلولهای ایمنی بدن با سایر ماکرومولکولها، به نام **آنتی‌ژنها**، کنش متقابل دارند و بر علیه آنها **آنتی‌بادیها** را تولید می‌کنند؛ آنتی‌ژنها توسط بدن به عنوان "بیگانه" (و نه بخشی طبیعی از ارگانیسم) و بالقوه خطرناک تشخیص داده می‌شوند. آنتی‌بادی‌ها به خانوادهٔ **ایمونوگلوبولین** از گلیکوپروتئین‌ها (که توسط لنفوسیت‌ها تولید می‌شوند) تعلق دارند. این مولکولها به طور طبیعی اختصاصاً به آنتی‌ژنهای برانگیزانندهٔ آنها اتصال می‌یابند و به از میان برداشتن آنها کمک می‌کنند.

برای اهداف تشخیصی و پژوهشی هر دو، **ایمونوهیستوشیمی** جهت تشخیص پروتئین‌های خاص (یا سایر مولکول‌های) موردنظر در سلولها و بافتها کاربرد بسیار گسترده‌ای دارد. این تکنیک نیازمند یک آنتی‌بادی بر علیه پروتئینِ مورد ارزیابی است؛ این بدان معنا است که پروتئین مورد نظر باید قبلاً با استفاده از رویکردهای بیوشیمیایی یا مولکولی خالص شده باشد، به نحوی که آنتی‌بادیهای ضدّ آن بتوانند تولید شوند. برای تولید آنتی‌بادیهایی برعلیه پروتئین x مربوط به یک گونهٔ جانوری خاص (برای نمونه، موش صحرایی یا انسان)، پروتئینِ جداشده [از بدن آن جانور] درون بدن جانوری از یک گونهٔ دیگر (برای نمونه، خرگوش یا بز) تلقیح می‌گردد. اگر سکانس آمینواسیدی پروتئین موردنظر به اندازهٔ کافی با بدن این جانور متفاوت باشد که به عنوان بیگانه ــ یعنی به عنوان یک آنتی‌ژن ــ مورد شناسایی قرار بگیرد، جانور آنتی‌بادیهایی برعلیه پروتئین تولید خواهد کرد.

در ایمونوهیستوشیمی (immunohistochemistry)، یک برش بافتی (یا سلولهای موجود در کشت) که می‌دانیم محتوی پروتئین موردنظر است، در یک محلول حاوی یک آنتی‌بادی برای این پروتئین تلقیح می‌شود. آنتی‌بادی به طور اختصاصی به پروتئین اتصال می‌یابد، و سپس موقعیت پروتئین در بافت یا سلول می‌تواند توسط میکروسکوپ نوری یا الکترونی (بسته به نحوهٔ نشاندار کردن آنتی‌بادی) مورد تشخیص قرار گیرد. آنتی‌بادیها غالباً با ترکیبات فلوئورسان، پراکسیداز یا فسفاتاز قلیایی برای تشخیص هیستوشیمیایی، یا ذرات طلای دارای کدورت الکترونی برای TEM نشاندار می‌شوند.

گروههای (دودمانهای) مختلفی از لنفوسیت‌های جانوری که تحت تزریق قرار گرفته بود می‌توانند بخش‌های مختلفی از پروتئین x را شناسایی کنند، و هر دودمان آنتی‌بادی خاصی برعلیه بخش مربوطه تولید می‌کند. این آنتی‌بادیها از پلاسمای جانور جمع‌آوری شده و مخلوطی از **آنتی‌بادیهای چنددودمانی**[1] را تشکیل می‌دهند، که هر یک از آنها می‌تواند به منطقهٔ جداگانه‌ای از پروتئین x اتصال یابد.

1.polyclonal antibodies