



مقدمات بافت شناسی Histology

در بافت شناسی به مطالعه میکروسکوپی بدن انسان می‌پردازیم. مطالعه ساختارهای ریز و جزئی بدن از وسیله‌ای به نام میکروسکوپ استفاده می‌کنیم.

Histo/Tissue: بافت Logy : مطالعه و بررسی

سلول: کوچکترین واحد ساختاری و عملکردی

بافت: مجموعه‌ای از سلول‌ها که از نظر ساختار و عملکرد (آناتومی و فیزیولوژی) با هم یکسان هستند.

بافت‌ها دارای دو جزء در حال تعامل با یکدیگرند: سلول‌ها (cells) - ماتریکس خارج سلولی (Extra Cellular Matrix - ECM)

انواع بافت

epithelium پوششی

connective tissue همبند (پیوندی)

muscular tissue عضلانی

nervous tissue عصبی

ارگان‌ها (اندام‌ها) مجموعه از بافت‌ها هستند.

ارگان‌ها (اندام‌ها) از ترکیب منظم بافت‌ها تشکیل شده‌اند.

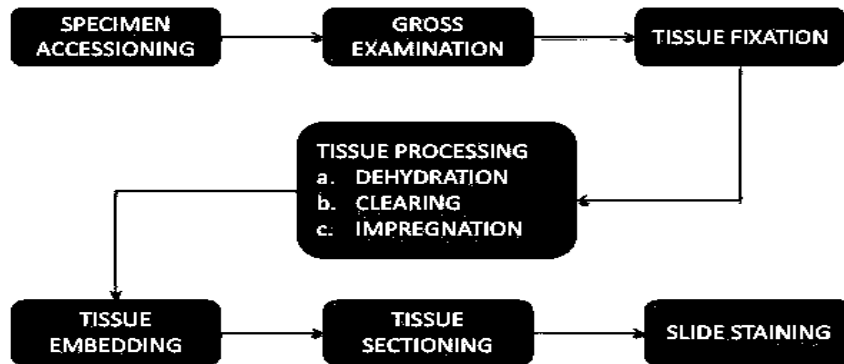


Medoxin
@med402

کاتال جزوات ورودی بهمن 1402
دانشگاه علوم پزشکی تهران

مراحل بافت شناسی

HISTOLOGY PROCEDURE



1- در مرحله اول نمونه گیری میکنیم.

-بافت مرده: معمولاً انسانی

-بافت زنده: حیوانی و انسانی

- در نمونه های حیوانی از پستانداران کوچک مثل موش و خرگوش استفاده می شود که از لحاظ ساختار میکروسکوپی شباهت بیشتری به انسان دارند.
- در بیوپسی که از افراد زنده استفاده می شود در بافت شناسی معمولاً استفاده نمی شود اما در پاتولوژی از افراد بیمار نمونه گرفته می شود و ساختارهای غیرنرمال مورد بررسی قرار می گیرد.
- نمونه های زنده تازه تهیه شده معمولاً عمر کمی دارند (مثل بافت معده، روده) و به همین دلیل آنها را فریز یا خشک میکنند و با اینکار بقای آنها را افزایش میدهند. پاتولوژی یا به اصطلاح بافت شناسی (pathology) که معمولاً برای اطمینان از برداشته شدن cancer نیز استفاده میشود بافت زنده انسانی را مورد بررسی قرار میدهد

نمونه ها در پروسه آماده سازی بافتی برده شده و مورد مطالعه قرار میگیرند



**Histology procedure****روش بافت شناسی**

Specimen accessioniry

بافت برداری

Gross Examination

1-دید اجمالی به بافت (tissue)

Tissue Fixation

2-فیکس کردن بافت

Tissue processing

3-آماده سازی بافت

Fixation

1-3 فیکساسیون

Dehydration

2-3 آبگیری

Clearing

3-3 شفاف سازی

impregnation

4-3 نفوذ

Tissue Embedding

4-دسته بندی (لیبل) بافت ها

Tissue Sectioning

5-برش زدن به بافت (سکشن زنی)

Slide staining

6-رنگ آمیزی

سه روش اصلی آماده سازی نمونه های میکروسکوپی:

- تکنیک پارافین-->رایج ترین روش (از موم یا رزین استفاده میشود)
- تکنیک celloidin-->بهترین روش
- تکنیک انجماد-->سریعترین روش (استفاده برای حین جراحی های سرطانی)

ثابت سازی (Tissue Fixation)

فیکساسیون چیست؟ مجموعه فعالیت های شیمیایی است که رویدادهای در پی آن در بافت های مختلف ارگان ها متفاوت است.

فیکساسیون، اولین مرحله بعد از نمونه گیری انجام می شود. برای جلوگیری از لیز شدن نمونه ها (انسانی و حیوانی) است.



نمونه ها در یکسری از محلول ها به نام ثابت کننده (fixator) قرار می‌دهیم. رایج ترین آنها فرمالین است. فرمالین با یک ماده شیمیایی است که با پروتئین های غشای سلول پیوند می‌دهد و آنها را در جای خود فیکس می‌کند و مانع جا به جایی آنها می‌شود بدین ترتیب آنزیم های لیزوزمی محیط مورد نیاز را برای فعالیت خود از دست می‌دهند. به این شکل غشای سلول قوام خودش را حفظ می‌کند و نهایتاً ساختار سلول حفظ شود و بدین ترتیب ساختار بافت، ارگان و کل مجموعه ثابت می‌شود.

نمونه را در فرمالین غوطه ور می‌کنیم (چون ثابت کننده برای حفظ تمام سلول ها باید کاملاً به بافت نفوذ کند، نمونه ها را قبل از ثابت سازی معمولاً به قطعات کوچک یک سانتی متری تقسیم می‌کنیم تا نفوذپذیری تسهیل شود) طبق قانون انتشار (imergration) (از غلظت بیشتر به کمتر) وارد بافت شده و آن را ثابت می‌کند. بعد از نفوذ بافت مقداری سفت شده و قوام اصلی خود را به دست می‌آورد و کار را برای مراحل بعدی راحت تر می‌کند. برای چندماه نمونه ها را به کمک فرمالین نگهداری کنیم. اگر نیاز به مدت زمان بیشتری برای نگهداری و ماندگاری نمونه ها داشته باشیم آنها را در الکل ۷۰ درجه قرار می‌دهیم. (الکل 70 به عنوان ثابت کننده اولیه نباید استفاده شود)

نکته: اندازه بافت ها $2 \times 1 \text{ cm}^2$ خواهد بود با ضخامت $5-10 \text{ }\mu\text{m}$ - اگر بافت یکنواخت نباشد سختتر میتوان نمونه برداشت.

نکته: فرمالین بیشتر فیکس خارجی بافت را انجام می‌دهد و فیکس داخلی در مرحله Tissue Processing انجام می‌شود.

نکته: ثابت کننده ها در صنعت استفاده های زیادی دارند به عنوان مثال فرمالین در موارد زیبایی ناخن و مو نیز کاربرد دارد.

اهداف Fixation

۱. جلوگیری از هضم بافت توسط آنزیم های موجود در سلول (آنزیم های لیزوزمی) (cellular autolysi) و حملات باکتریال به بافت

۲. فیکس شدن بافت و عدم تغییر شکل حین تشریح

- نمونه هایی که روی لام قرار می‌گیرند قطر و ضخامت کمی دارند و اندازه ای در حد میکرون دارند. برای برش نمونه ها در حد میکرون از وسیله های خاصی استفاده می‌شود. برش نمونه های تازه راحت نیست و به ساختار اصلی بافت آسیب می‌زند و ممکن است آنزیم هایی آزاد شوند که روی بافت اثر گذاشته و آن



را هضم می کنند. بنابراین با فیکس کردن نمونه ها را سفت تر میکنیم تا بتوانیم با دستگاه ها برش هایی در حد میکرون تهیه کنیم.

۳. آماده سازی برای ارائه تصویر مناسب پس از شفاف سازی (رنگ آمیزی بهتر)

۴- تا حد امکان بافت را سرزنده و با الیاف واقعی تر نگه داریم و میکرومولکول ها گم نشوند. (حفظ حداکثری موقعیت طبیعی سلول ها)

-هدف بررسی ساختار نرمال بافت است و فیکس کردن کمک میکند شکل ظاهری و ساختار میکروسکوپی نمونه حفظ شده تا نزدیک به ساختار بدن باشد.

برای مطالعه بیشتر:

فرمالین محلول بافری ۳۷٪ فرم آلدهید است که از طریق واکنش با NH_2 آمینواسیدها و تبدیل آنها به NH_3^+ این پروتئین ها را ؟ پروتئازهای سلول مقاوم میکند. همچنین از فرم آلدهید و گلوکز آلدهید نیز میتوان برای فیکساسیون و بررسی (Electron microscope) EM استفاده کرد .

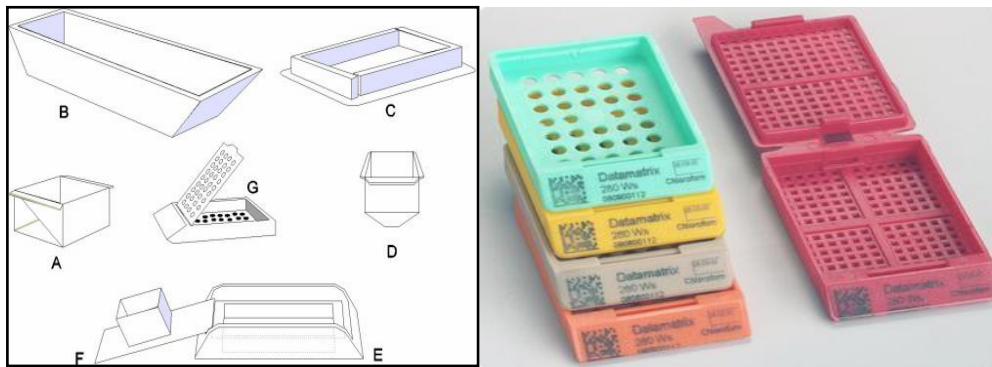
فیکساسیون با فرمالین طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت رخ میدهد



Tissue Processing (پاساژ بافتی – آماده سازی بافتی)

-در آزمایشگاه تعداد بالایی نمونه جمع آوری میشود برای همین لازم است نمونه ها را در basket هایی قرار دهیم و با نام گذاری آنها را شناسایی کنیم. (البته این کار برای کارهای تحقیقاتی بیشتر رایج است تا آزمایشگاه های پاتولوژیک) در آزمایشگاه های بافت شناسی بافت ها از لحاظ ظاهری با هم متفاوت هستند





-دستگاه Tissue Processor (آماده کننده بافت) دارای یه سری ظرف است که محلول ها را در آن قرار می دهیم. دستگاه به طور اتوماتیک تنظیم می شود و پروسه ای که انجام می دهد حدود ۱۶ الی ۱۸ ساعت طول می کشد بنابراین دستگاه از قبل آماده شده و نمونه ها درون آن قرار داده می شود و نمونه ها به وسیله چرخیدن در ظرف که بلند می شود و می چرخد ظرف به ظرف جا به جا میشوند. این مراحل میتواند به صورت دستی هم انجام شود.

Fixation-1

-اگر لازم باشد برای فیکس بهتر انجام میشود. در بعضی آزمایشگاه ها این مرحله انجام نمیشود. (این مرحله جدا از ثابت سازی اولیه است)

در آزمایشگاه بافت شناسی میخواهیم از نمونه هایی که داریم برش های یکسان و مساوی در حد ۵ تا ۱۰ میکرومتر بزنیم. اگر بافت را به حالت عادی برش بزنیم ممکن است نمونه ها ضخامتشان در همه جا یکسان نباشد و برای مطالعه مشکل ایجاد کند و به طور کلی در حد میکرون برش زدن خیلی سخت میشود. به همین دلیل نمونه ها را داخل بلوک هایی (قالب) قرار می دهیم که از جنس پارافین یا رزین هستند. اینها یک سری مواد نیمه سخت هستند که باعث میشوند به راحتی می توانیم برش تهیه کنیم. برای اینکه نمونه در قالب پارافین قرار بگیرد باید داخل خود نمونه نیز پارافین باشد تا برش به ظاهر ساختاری بدن انسان نزدیک باشد.

Dehydration-2

Hydrate- یعنی آب دار شدن و dehydrate یعنی آبگیری

بافت برای نفوذ پارافین باید آبگیری شود داخل سلول مقدار زیادی آب است و پارافین ماده ای روغنی است. برای اینکار از دستگاه هایی استفاده میکنیم و نمونه های حیوانی یا انسانی که فیکس شده بودند و به قطعات کوچکی تقسیم شده بودند را درون ظرفهای مختلفی که به اشکال مختلفی هست قرار می دهیم و لیبل میزنیم.



در این مرحله از اتانول استفاده میکنیم. الکل ابگیری خوبی دارد. (الکل زدن به دست باعث خشکی پوست میشود) زیرا الکل آب سلول را میگیرد. با قرار دادن نمونه به طور ناگهانی در الکل صد درجه شوک به بافت وارد شده و چروک شده و بافت ساختار طبیعی اش را از دست میدهد. برای جلوگیری از این اتفاق در ظروف مختلف (4 تا 7 ظرف) از الکل درجه کم بین ۳۰ تا ۵۰ درجه شروع میکنیم و به تدریج درجات الکل 10 تا 100 تا افزایش پیدا می کند و نهایتا آب سلول خارج میشود و الکل جایگزین می شود. این تدریجی بودن از چروکیدگی جلوگیری می کند و باعث می شود آب به تدریج کاملاً خارج شود.

نکته: در مرحله رنگ آمیزی برعکس این مرحله است است آب سلول و بافت را بعد از اینکه لام رنگ شد به داخل سلول برمیگردانیم

3-Clearity (شفاف سازی)

- طی این مرحله نمونه از لحاظ میکروسکوپی شفافتر شده.

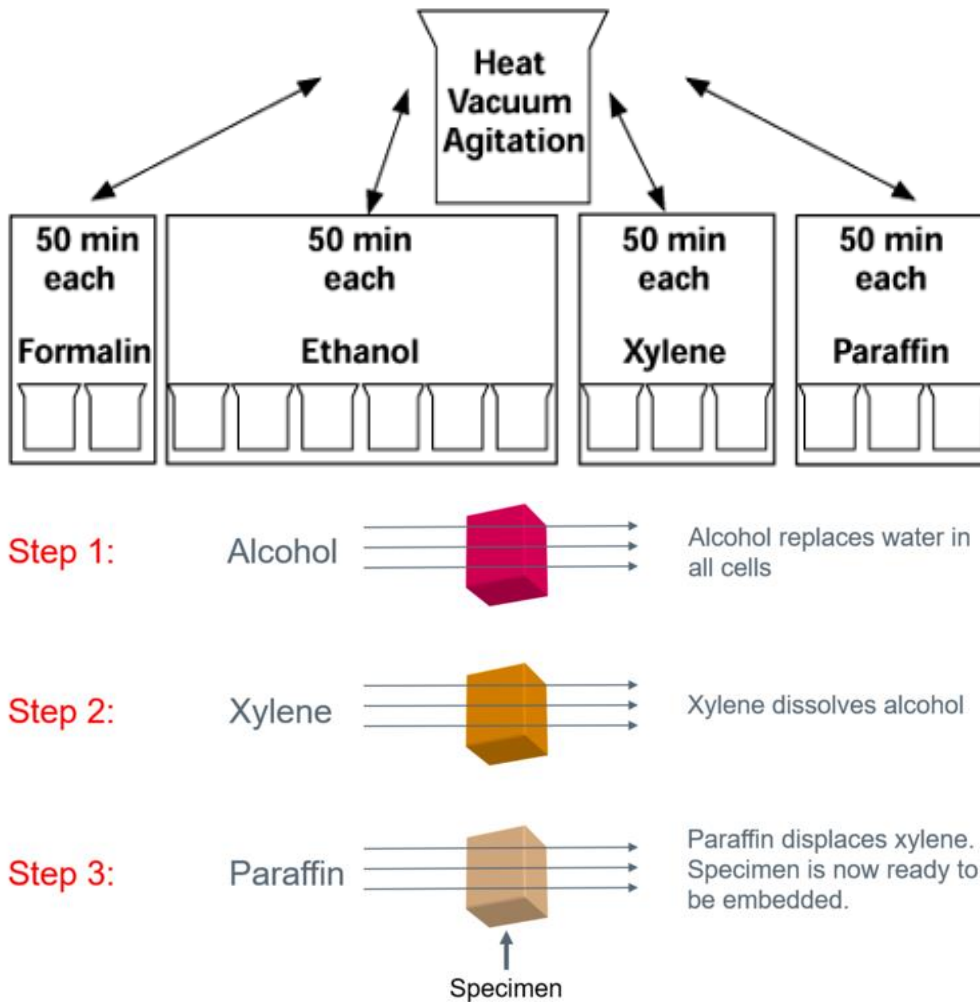
الکل نیز بنیان آبی دارد و آب در آن فراوان است و به راحتی نمیتوان پارافین را با آن جایگزین کرد. بنابراین از یک ماده به نام Xylene یا زایلن که بنیان آبی-روغنی دارد به عنوان واسط استفاده می شود. گزینول را در ۳ ظرف قرار می دهیم و به تدریج جایگزین اتانول می شود و داخل سلول حاوی ماده ای می شود که هم بنیان آبی دارد هم بنیان لیپیدی (روغنی) دارد بنابراین پارافین به راحتی می تواند نفوذ کند.

4-مرحله infiltration (نفوذ پذیری)

پارافین به علت ویسکوزیته بالا به سختی و به تدریج وارد سلول میشود. این مرحله حاوی ۳ ظرف است که شیشه ای نیستند و فلزی هستند و زیر آن هیتری است که پارافین را گرم می کند. پارافین در محیط معمولی جامد است و برای ذوب شدن به یک درجه حرارت حدود ۵۸ تا ۶۰ درجه نیاز دارد.

در انتهای پاساژ بافتی آب سلول خارج شده و پارافین قرار گرفته است. در این حالت نمونه ها را می توانیم به راحتی در قالب های بافتی قرار دهیم. قالب ها می تواند به حالت آماده یا از کاغذ به شکل مکعب مستطیل یا مربع یا حتی از قوطی چوب کبریت استفاده کنیم.



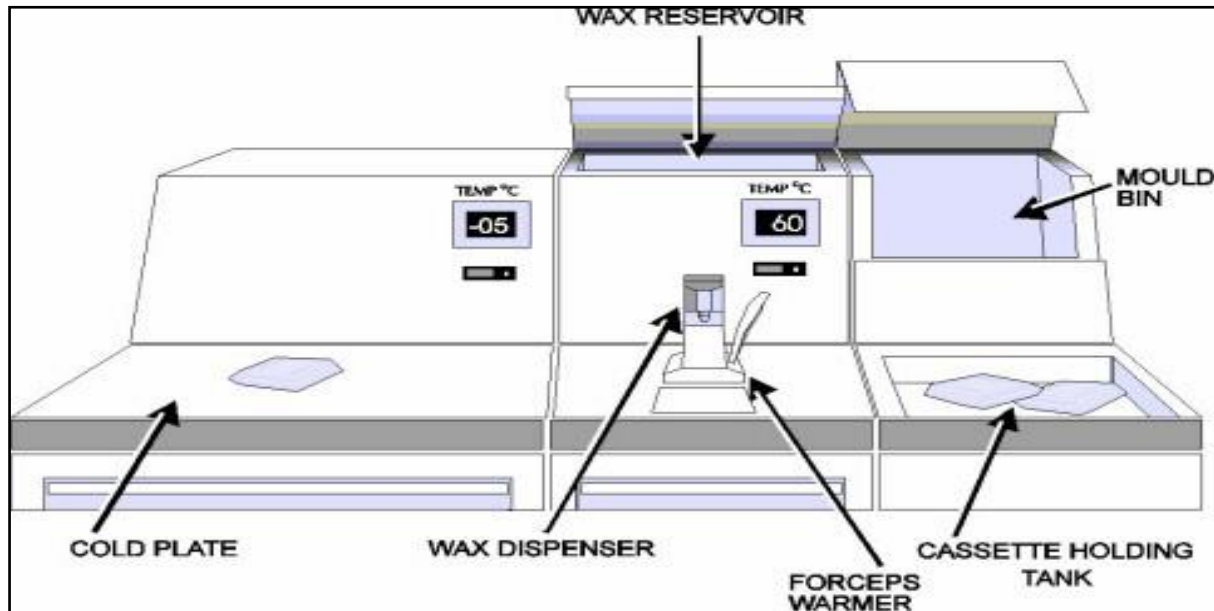


Embanding (قالب گیری)

نیاز به یک دستگاه پیشرفته دارد. نمونه را در قالب قرار می‌دهیم و بر روی آن پارافین میریزیم و لیبیل می‌زنیم. در این حالت نمونه‌ها را می‌توان تا مدت زمان زیادی بدون خراب شدن نمونه در آزمایشگاه نگهداری کنیم برای برش زدن چند ساعت در یخچال قرار می‌دهیم تا پارافین خودش را بگیرد تا بتوانیم برش بزنیم.

نکته: این مرحله جهت قرارگیری بافت در دستگاه مهم است.





Sectioning (برش گیری)

به کمک دستگاهی به نام microtome برش هایی یکسان میزنیم به طوری که ضخامت بافت در همه جا یکسان باشد. micro به معنی بریدن، برداشتن است. microtome یعنی دستگاهی که در اندازه میکرون برش تهیه می کند. اندازه این برش ها قابل تنظیم در محدوده ۳ تا ۵۰ میکرون است. (در آزمایشگاه بافت بین ۵ تا ۱۰ میکرون)

دو نوع microtome داریم:

۱- چرخشی

قالب های پارافینی در نگه دارنده قالب قرار میگیرند که جلوی آن تیغ است و با هر بار چرخاندن دسته یک بار تیغ روی نمونه حرکت می کند و یک برش به ما میدهد.

- در کارهای تحقیقاتی گاهی نیاز به برش های serial داریم به خصوص وقتی روی نواحی مختلف مغز کار میشود تا همه ی نمونه ها روی لام قرار بگیرد در غیر اینصورت برای مثال در بافت شناسی هریک از نمونه ها به طور مجزا روی یک لام قرار می گیرد.



2-انجمادی

در آزمایشگاه پاتولوژی به خصوص در بیمارستان از این دستگاه استفاده میشود. در جراحی هایی که برای برداشتن تومور انجام میشود یک الی دو سانت از دو سمت مارژینال (سالم) اطراف تومور هم برداشته می شود. برای مطمئن شدن از برداشته شدن از کل تومور یک نمونه از آن ناحیه در اتاق جراحی گرفته شده و به آزمایشگاه پاتولوژی فرستاده می شود. اگر بخواهیم نمونه را در پروسه بافتی که بیان شد ببریم زمان بر است و حیات بیمار را به خطر می اندازد.

در این دستگاه این پروسه بافتی (Tissue processing) را نداریم و نمونه تازه از اتاق عمل در دمای ۲۰- قرار میگیرد و از روش فیکس کردن به روش انجمادی (freezing) استفاده میکنیم. نمونه بلافاصله فریز شده و سفت میشود و به راحتی قابل برش زدن است. داخل محفظه قرار گرفته و با هربار چرخاندن دسته یک برش به ما می دهد. این فرایند حدود نیم ساعت طول می کشد. (به دلیل سرعت بالا و یخ زدگی تا حدی به بافت آسیب میرساند و ماندگاری آن کاهش میابد)

در آزمایشگاه تحقیقاتی زمانی که روی آنزیم ها کار شود به علت اینکه آنزیم در اثر حرارت از بین می رود از این دستگاه استفاده می شود.



Straining (رنگ آمیزی)

در این پروسه یکسری ظرف های شیشه ای به نام jar هستند که در آن مخلوط های مختلفی قرار میگیرد و رنگ آمیزی انجام میشود. ماکرومولکول هایی که داخل سلول هستند (سیتوپلاسم ارگانل های داخل سلولی

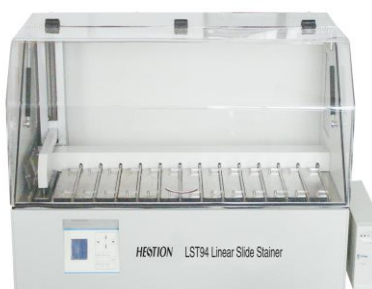


هسته سلول غشای سلول ترکیبی از این ماکرومولکول ها هستند)رنگ ها به آنها باند شده و بررسی بهتری زیر میکروسکوپ انجام دهیم.

-با برش تهیه شده مخصوصا در مغز با قرار دادن لام سفید که قسمت های مختلفش خیلی مشخص نیستند اما تا حدودی می تواند به ما کمک کند

برای آزمایشگاه های بافت شناسی و پاتولوژی و آزمایشگاه های دیگر رنگ آمیزی انجام می شود تا تمایز بهتری زیر میکروسکوپ داشته باشیم و آنها را بهتر شناسایی کنیم.

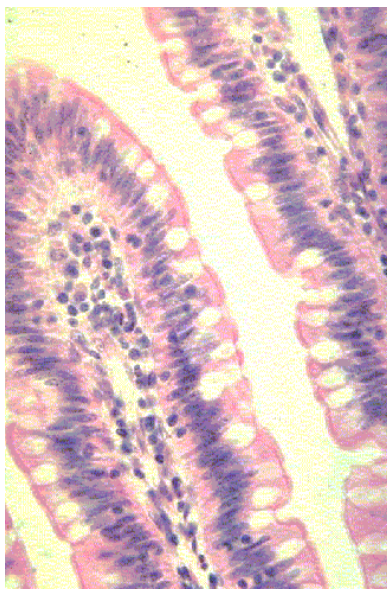
در این پروسه علاوه بر رنگ آمیزی آبی که از سلول گرفته بودیم و با پارافین جایگزین کرده بودیم به وسیله این محلول هایی که در jar ها است به خصوص محلول های آخری که الکل و گزیلول است مجددا آب سلول به آن برگردانده میشود و درنهایت یک لام رنگ آمیزی شده داریم که به ساختار طبیعی سلول نزدیک است.



در آزمایشگاه بافت شناسی لام هایی که می بینیم با Hematoxylin و Eosin رنگ شده اند که به آن رنگ آمیزی H&E گفته میشود.هماتوکسیلین رنگ طبیعی است که از صمغ درختی گرفته میشود طی یک پروسه آماده می شود و برای رنگ آمیزی استفاده می شود.هماتوکسیلین تمایل خوبی برای اتصال اسیدهای نوکلئیک در سلول دارد.(درواقع ترکیبات Basophile یا بازی دوست هستند که اسید ها را به سرعت جذب میکنند)اسید نوکلئیک را بیشتر در هسته سلول داریم و عمدتا هسته را رنگ میکند و اگر در سیتوپلاسم ساختارهایی داشته باشیم که اسیدنوکلیک داشته باشند مثل mRNA که در ریبوزوم.بنابراین در سلول هایی که ریبوزوم فعالیت بالایی دارد مانند نوروها می تواند رنگ بگیرد ولی خب عمدتا هسته ها رنگ می گیرد و زیر میکروسکوپ هسته را رنگی بین آبی تا بنفش دارند.

Eosin رنگ صورتی دارد و ترکیبی Acidophile بوده و به سمت ترکیبات بازی میرود که عمدتا در سیتوپلاسم قرار دارند و ان را به رنگ صورتی تا قرمز در می آورد.طیف آن بستگی به ماکرومولکول ها پروتئین هایی که در سلول است،دارد.





این عکس پرز روده را نشان می دهد.

پس در آزمایشگاه بافت شناسی لام هایی را بررسی می کنیم که هسته شان آبی تا بنفش است و سیتوپلاسمشان صورتی رنگ.

اگر نیاز به بررسی بیشتر ساختارهای سلولی باشد مثل رشته های کلاژن، الاستیک و میتوکندری باید از رنگ آمیزی های اختصاصی استفاده کنیم. مثل تتراکسید اوسمیوم یا هاترین استفاده میکنیم.

با رنگ آمیزی H&E و میکروسکوپ نوری تنها میتوانیم هسته و سیتوپلاسم را تشخیص دهیم (حتی غشا را نمیتوانیم به طور مشخص تعیین کنیم) برای مشاهدات بیشتر باید از میکروسکوپ الکترونی استفاده کنیم.



میکروسکوپ ها

1- میکروسکوپ نوری در آزمایشگاه بافت شناسی از آن استفاده می شود و با نور سفید کار می کند. میکروسکوپ نوری انواع مختلفی دارد. (با نور فلئوئورسنت و پلاریزه کار میکنند)

Ocular lens (eyepiece)
Remagnifies the image formed by the objective lens

Body tube
Transmits the image from the objective lens to the ocular lens

Arm

Objective lenses
Primary lenses that magnify the specimen

Stage
Holds the microscope slide in position

Condenser
Focuses light through specimen

Diaphragm Controls the amount of light entering the condenser

Coarse focusing knob

Illuminator Light source

Base

Fine focusing knob

(a) Principal parts and functions

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

این تصویر نیاز به مطالعه ندارد

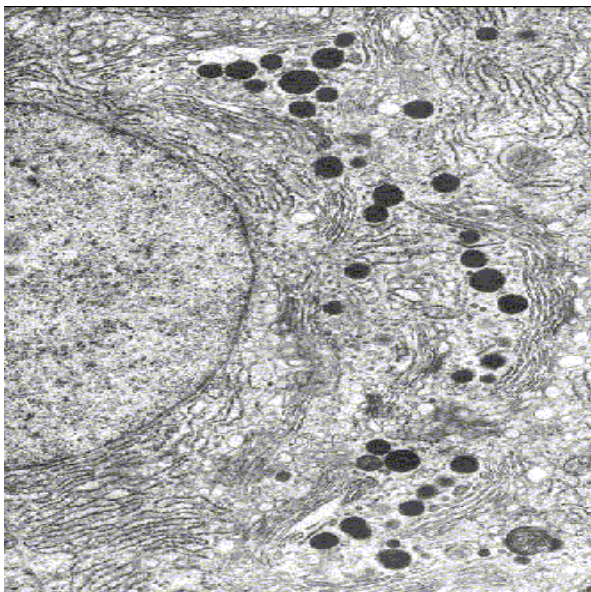
2- میکروسکوپ الکترونی: به جای منبع نور سفید از الکترون استفاده می شود و الکترون گان در این میکروسکوپ وجود دارد که الکترون ها (بار منفی هستند) با شتاب خیلی زیاد به سمت نمونه ها پرتاب می کند و ماکرومولکول ها آنها را جذب میکنند. به کمک این میکروسکوپ می توانیم جزئیات درون سلولی را هم بررسی کنیم. براساس تابش و میزان جذب الکترون در بخشهای مختلف سلول عکس های سیاه و سفید تهیه میکنند. هرچه جذب زیادتر تیره تر (چگالی الکترون در آن قسمت زیاد است)



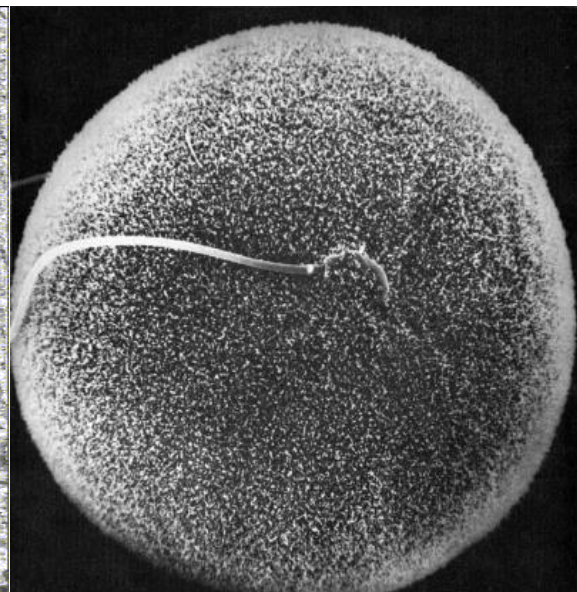
1-2-Transmission: شبکه اندوپلاسمی میتوکندری غشای هسته و غشای سلول را می‌توانیم با کمک آن بررسی کنیم. پروسه بافتی را اینجا هم داریم نمونه‌ها را فیکس می‌کنیم و پاساژ بافتی انجام می‌دهیم و برش‌هایی در حد نانومتر می‌زنیم و می‌توانیم جزئیات داخل سلولی را ببینیم.

2-2-Scanning میکروسکوپ برای مطالعه ساختار کل سطح سلول استفاده می‌شود هر سلولی هم می‌تواند باشد. یک سلول که به حالت سه بعدی است الکترون‌ها به آن برخورد می‌کند و نقطه به نقطه تصویر می‌دهد و نقاط جمع شده و یک تصویری جامع از ساختار سطحی سلول می‌دهند

-بیشتر از میکروسکوپ transmission استفاده می‌شود که برخلاف میکروسکوپ نوری بسیار بزرگ هستند و پروسه آماده‌سازی و رنگ آمیزی آن سخت و متفاوت است.

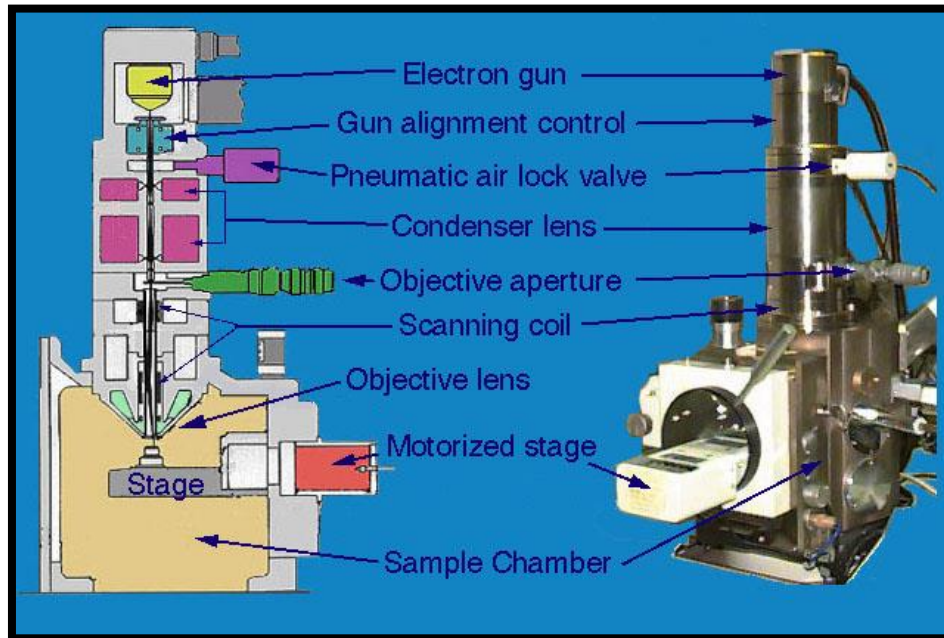


Scanning



Transmission





برای مطالعه بافت ها و سلول ها در بدن انسان روش های دیگری هم وجود دارد

Autoradiography

Cell & tissue culture

Immunohistochemistry

Enzyme Histochemistry

برای مطالعه بیشتر:

Autoradiography: یک نوع تصویربرداری با استفاده از مواد رادیواکتیو است

Cell & tissue culture: همان کشت بافت و سلول است.

Immunohistochemistry: جهت جایگاه یک پروتئین در سلول یا بافت است که از طریق rector و یا

پادتن و آنتی ژن است

Enzyme Histochemistry: مشابه مورد سوم و با استفاده از آنزیم و DNA



سلول

سلول واحد ساختاری و عملکردی دارای حیات بدن. سلول های بدن انسان به طور کلی شامل : ۱- غشا
۲- سیتوپلاسم (شامل مایع سیتوپلاسمی ، ارگانل و ذرات محلول) و ۳- هسته (عمدتا در مرکز سلول یا
نزدیک به مرکز سلول قرار دارد) هستند.

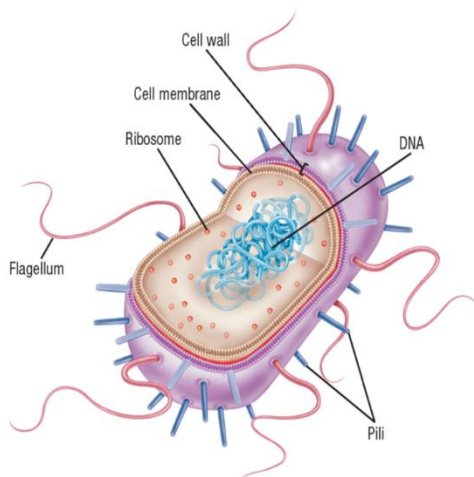
سلول ها

1. Eukaryot (یوکاریوت): Eu=good , karyo: هسته

واجد ارگانل های بدون غشا و غشادار و نیز هسته؛ مثلاً همه ی سلول های انسان

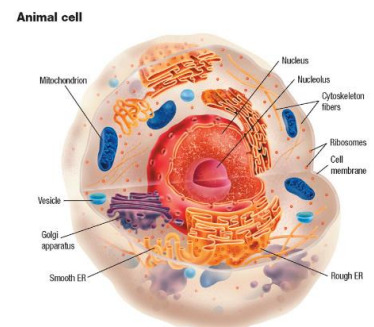
2. Prokaryot (پروکاریوت): Pro= before , karyo: nucleus

واجد ارگانل های کمتر و کوچکتر بدون غشا ، فاقد هسته



Two Cell Types

Prokaryote	Eukaryote
No nucleus	Nucleus
No membrane-bound organelles	Many organelles
Most 1-10 μm in size	Many 2-1,000 μm in size
Evolved 3.5 billion years ago	Evolved 1.5 billion years ago
Only bacteria	All other cells



لقاح اسپرم و تخمک = زیگوت (سلول تخم) = مورولا (۱۶ سلولی) = تمایز

ایجاد انواع سلول ها در بدن در اثر بیان یا عدم بیان ژن ها، ترشح یا عدم ترشح => (Differentiation)
برخی هورمون ها در دوران جنینی = ایجاد موجود پسرسلولی



* طی فرایند تمایز، با توجه به عملکرد سلول و بافت ، ویژگی های ساختاری و ظاهری به سلول القا می شود.

* سلول های بنیادی عموماً گرد یا مکعبی شکل اند.

* سلول درمانی (cell differentiation) مثلاً پیوند مغز استخوان => مثالی از استفاده از تمایز در کار های تحقیقاتی (با استفاده از القاگر هایی به صورت مصنوعی تمایز به سلول مورد نظر را القا می کنیم).

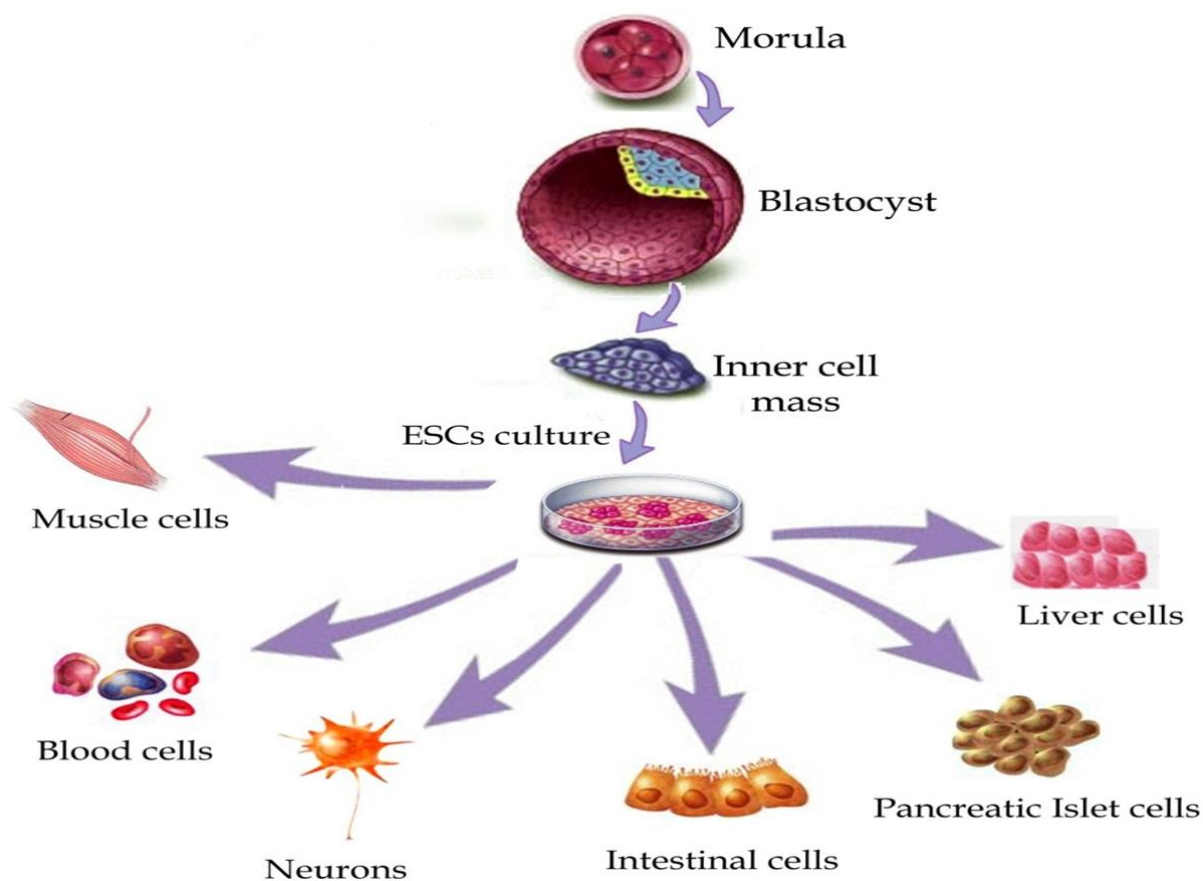


TABLE 2-1

Differentiated cells typically specialize in one activity.

General Cellular Activity	Specialized Cell(s)
Movement	Muscle and other contractile cells
Form adhesive and tight junctions between cells	Epithelial cells
Synthesize and secrete components of the extracellular matrix	Fibroblasts, cells of bone and cartilage
Convert physical and chemical stimuli into action potentials	Neurons and sensory cells
Synthesis and secretion of degradative enzymes	Cells of digestive glands
Synthesis and secretion of glycoproteins	Cells of mucous glands
Synthesis and secretion of steroids	Certain cells of the adrenal gland, testis, and ovary
Ion transport	Cells of the kidney and salivary gland ducts
Intracellular digestion	Macrophages and neutrophils
Lipid storage	Fat cells
Metabolite absorption	Cells lining the intestine

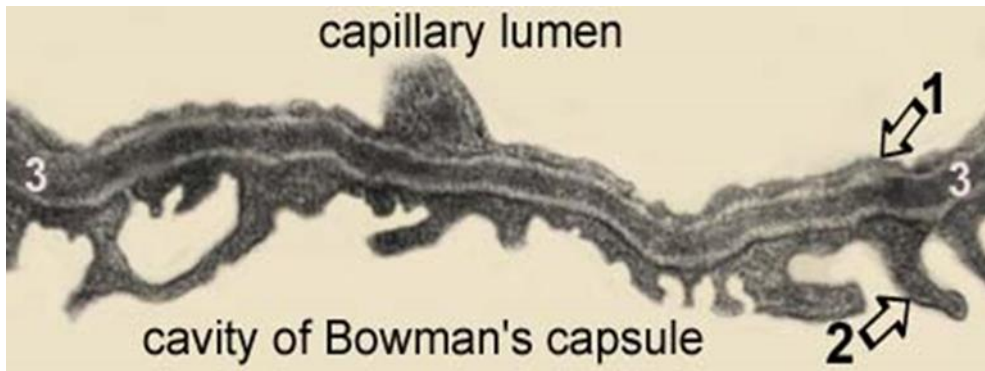
غشای سلول

فسفولیپید دو لایه با ضخامت 7 تا 10 nm، جداکننده ی سلول از ماتریکس خارج سلولی قابل مشاهده توسط میکروسکوپ الکترونی

رنگ آمیزی غشا با تترا اکسید اسمیم => به چربی های غشا می چسبد و آن ها را به رنگ سیاه در می آورد.
=> دو لایه ی تیره و یک لایه ی روشن که به آن واحد غشایی (unit membrane) می گویند، با میکروسکوپ الکترونی دیده می شود. (غشا در صورت رنگ آمیزی مناسب با میکروسکوپ نوری هم دیده می شود اما نه به این جزئیات)



*قسمت هایی با تراکم کمتر ماکرومولکول ها => اتصال کمتر الکترون => کمرنگ تر مشاهده می شود و بالعکس.



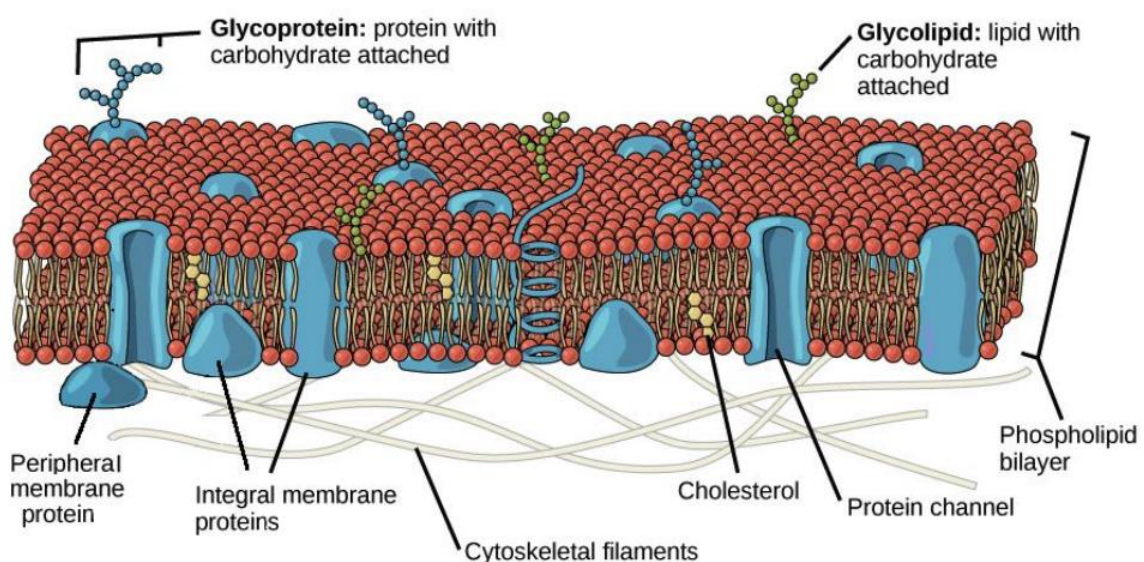
اجزای غشای سلولی

1. Phospholipids bilayer
2. Proteins
3. Cholesterol
4. Oligosaccharide chains

Phospholipids Bilayer

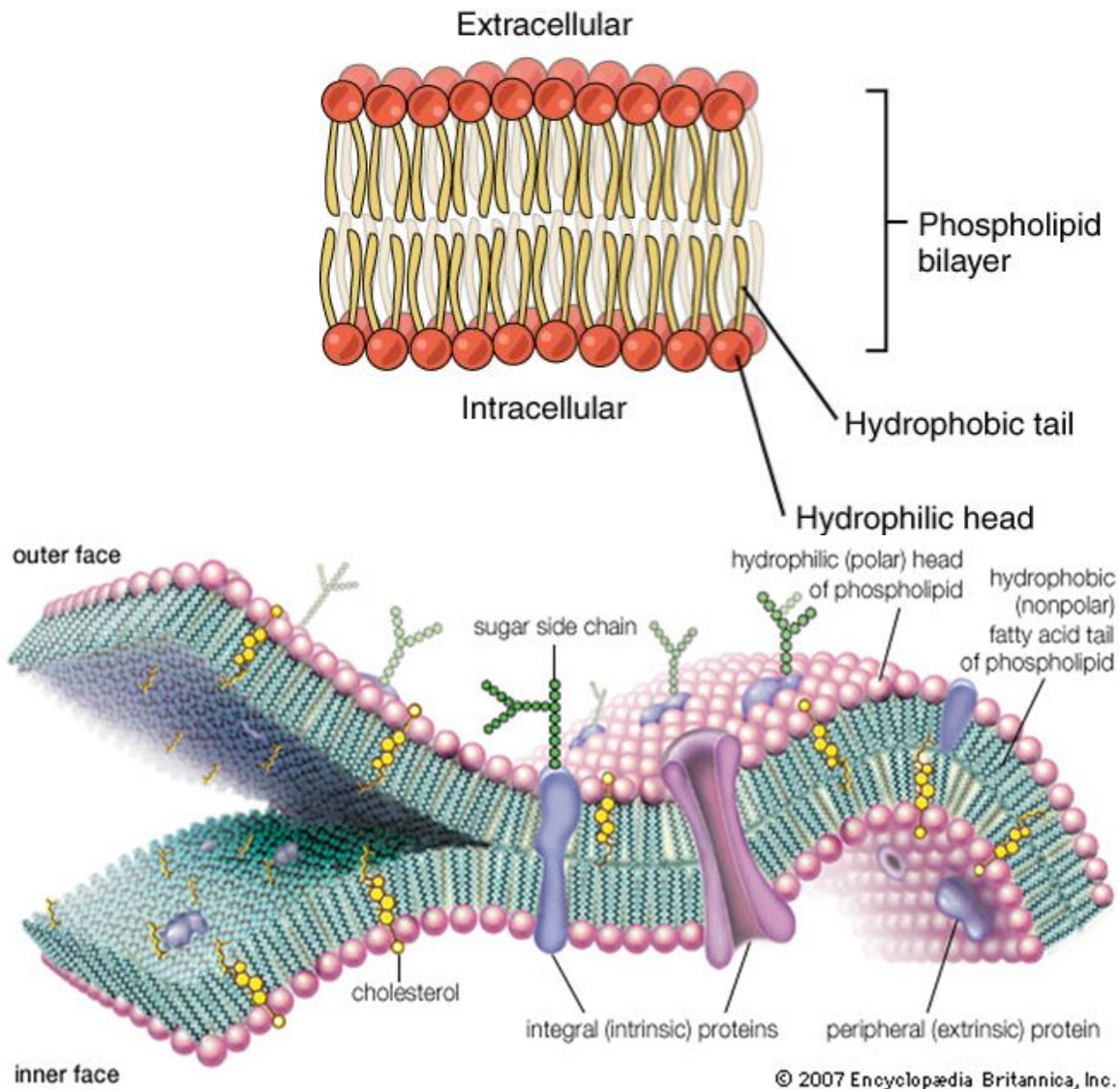
• تقریباً 50 درصد حجم غشا

• نوع فسفو لیپید ها ، پراکندگی و نحوه ی قرار گیری آن در سلول های مختلف فرق می کند.
• همچنین اینکه چه نوع فسفولیپیدی در لایه ی داخلی و خارجی غشا باشد ، با هم متفاوت است.



جابه جایی PLS لایه ی داخلی و خارجی => ایجاد بیماری (مثلا با جابه جایی اسفنگومیلین در سیستم عصبی => بیماری گلیوزیس)
* به عنوان مثال در گلبولهای قرمز :

phosphatidylcholine and sphingomyelin : Outer half
phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine : Inner half



پروتئین های غشایی

براساس نحوه قرار گیری در غشا:

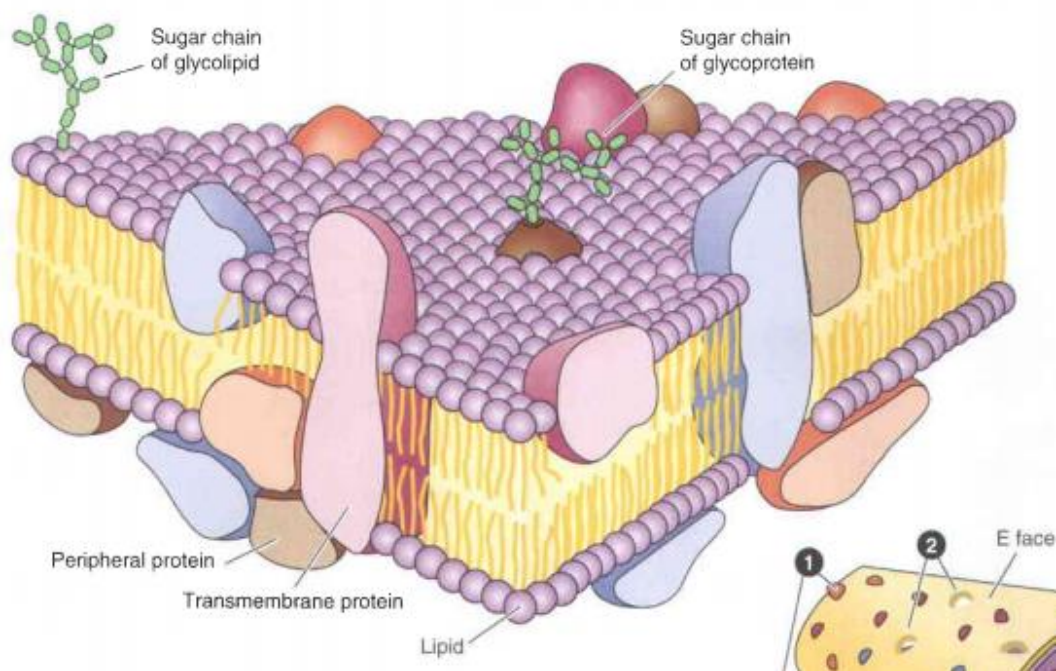
الف) سرتاسری یا Integral یا غشایی : نقش به عنوان carrier و...

ب) محیطی (peripheral): تنها در یک نیمه یا در لایه خارجی یا داخلی غشا ، تعداد بیشتر از سرتاسری

* پروتئینهای integral ممکن است چندگذری باشند، یعنی آنقدر بلند باشند که در چند نقطه از غشا بگذرند.

* تراکم پروتئین ها در قسمت داخلی سلول (یعنی سمت فسفولیپید های داخلی) بیشتر است.

* پروتئینهایی که به سمت داخل غشا هستند با اسکلت درون سلولی ارتباط برقرار میکنند.



پوسته ی قندی (glycocalyx) : اتصال الیگو ساکارید ها به PLS و Pr های سرتاسری و محیطی

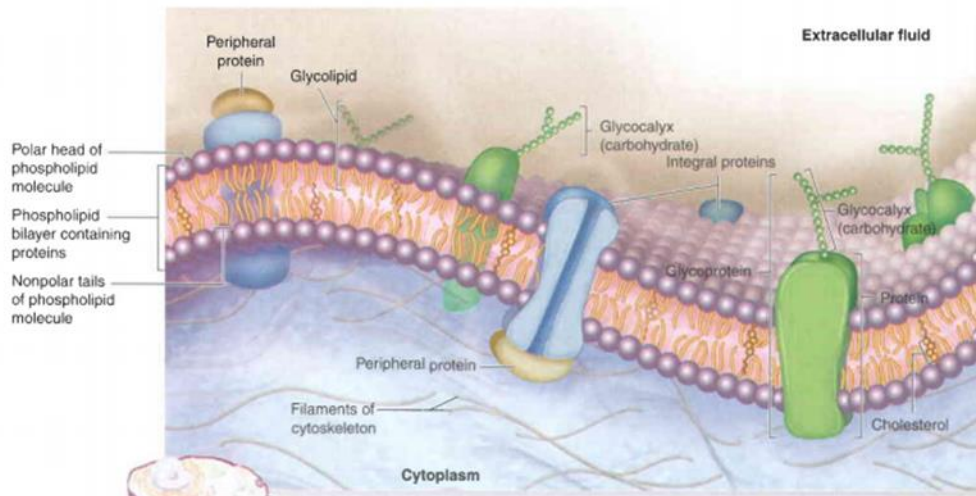
لایه ی خارجی غشا (باعث غیر قرینه (assymetric) شدن دو لایه ی غشا)

کاربرد : اتصالات ، مهاجرت ، شناسایی سلول ها در بدن و نیز آزمایشگاه (به عنوان علامت عمل می کنند). مثل گروه های خونی.



کلسترول

* لیپیدی که هم در لایه ی خارجی و هم در لایه ی داخلی غشا به صورت پراکنده مشاهده می شود.

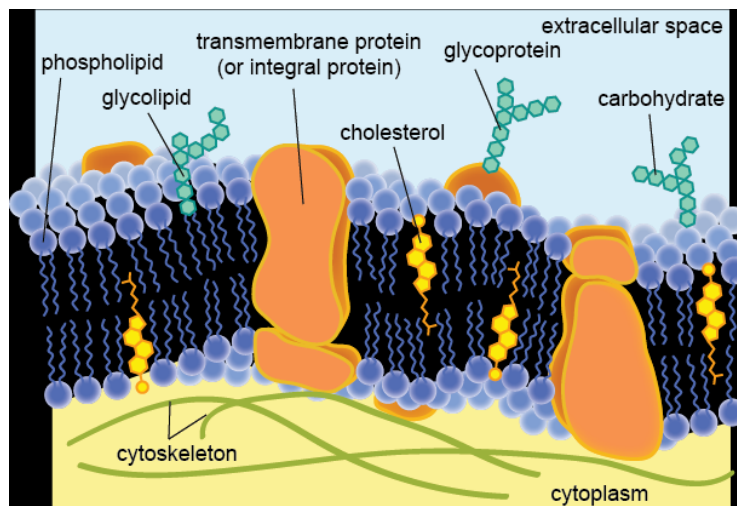


* مسبب پایداری غشا

* کمک به جا به جا به جایی و نیز عدم جا به جایی (محدود کردن حرکت) پروتئین ها و اسید های چرب

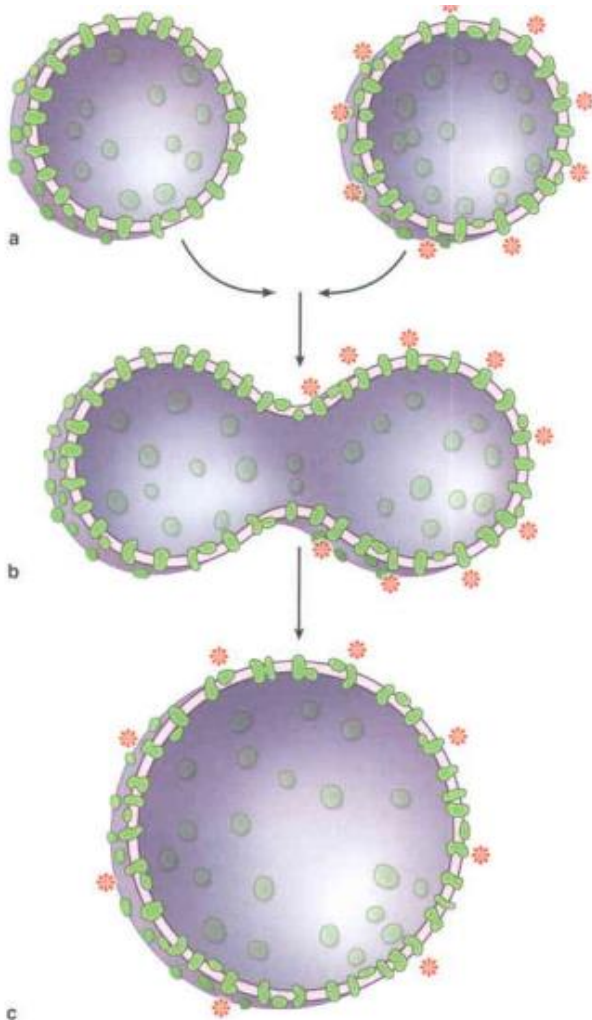
(در اثر جا به جا شدن خود کلسترول) => سیالیت غشا

* همانطور که مشخص است ، کلسترول می تواند نقش های متضاد داشته باشد؛ مثل نقش در سیالیت.



مدل سیالیت غشا (model mosaic Fluid)





*کلیسترول نقش مهمی در سیالیت غشا دارد.

1. در محیط کشت دو نوع سلول کشت دادند، یکی با رنگ های فلوئورسنت نشان دار شده و دیگری فاقد آن و عادی است.

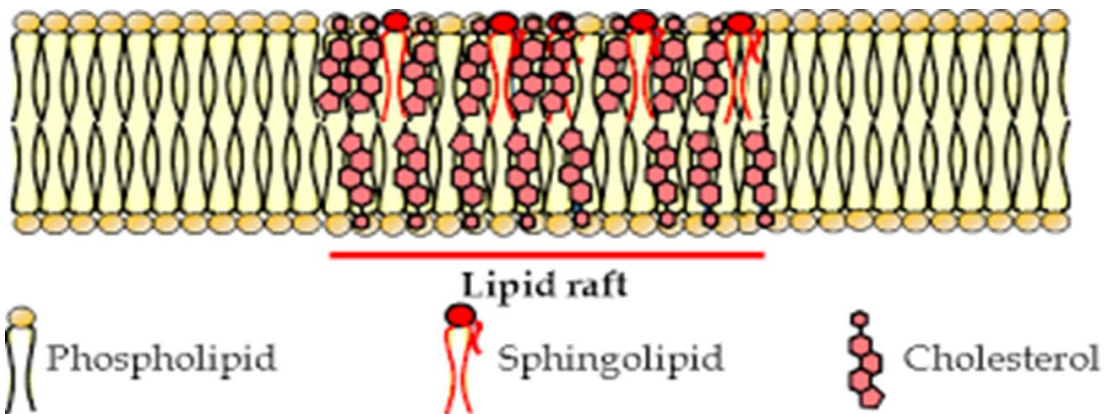
2. دو سلول به صورت آزمایشی برای ایجاد یک سلول هیبریدی ادغام شدند و به هم پیوند زده شدند.

3. پس از مدتی دیده میشود که رنگ فلوئورسنت در تمام سطح غشا پراکنده میشود که این امر به دلیل به وجود آمدن سیالیت غشا میباشد.

طاقچه ی لیپیدی (Lipid rafts)

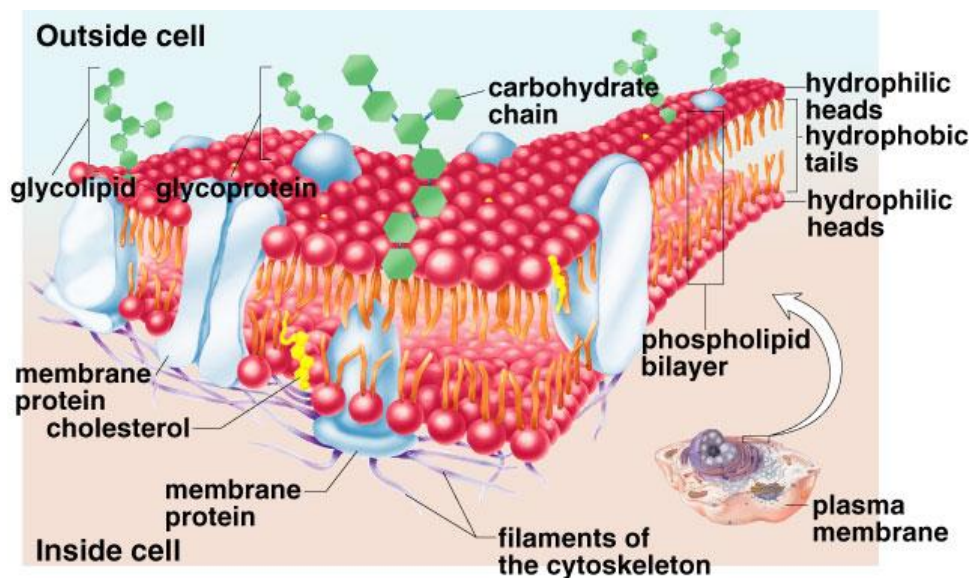
پروتئینهای غشایی که به عنوان اجزایی از کمپلکسهای بزرگ آنزیمی عمل می کنند به ویژه آنهایی که در Cell signaling نقش دارند، تحرک کمی دارند .چنین کمپلکس های پروتئینی در تکه های تخصص یافته ای از غشا به نام lipid rafts قرار گرفته اند. این نواحی دارای غلظت بالایی از کلیسترول و اسیدهای چرب غیر اشباع هستند .در این lipid raft ها، پروتئین ها فیکس میشوند و در جای خود ثابت می مانند.





عملکرد های غشای سلول

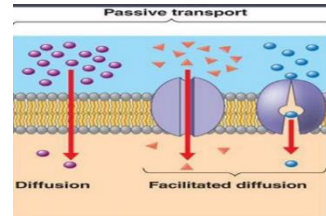
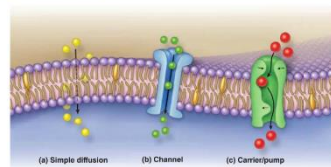
1. Communication: ارتباطات بین سلولی
2. Intercellular connection: اتصال بین سلولی و نیز اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی و در نهایت حفظ ساختار سلول
3. Physical barrier: سد فیزیکی
4. Selective permeability: نفوذپذیری انتخابی



روش های انتقال

۱. غیر فعال (passive process): در جریان شیب غلظت ، بدون مصرف ATP ، مثل کانال aquaporin ، حامل ها (carriers)

FIGURE 2-5 Major mechanisms by which molecules cross membranes.

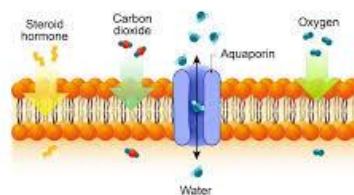


الف) انتشار تسهیل شده

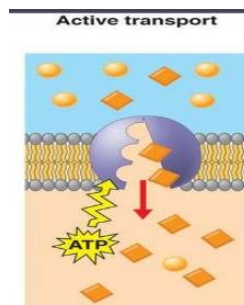
ب) انتشار ساده (diffusion)

*پروتئین aquaporins یکی از پروتئین های سرتاسری غشا است که تنها در نقل و انتقالات آب نقش دارد. در همه ی سلول ها وجود دارد و از پروتئین های بسیار مهم است.

AQUAPORIN



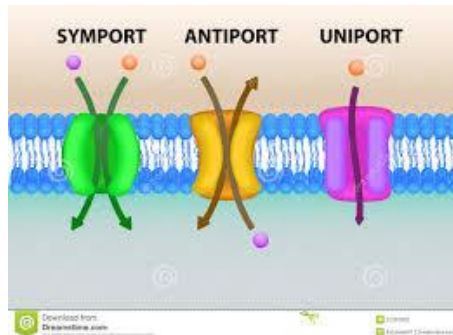
۲. فعال (passive process.): نیاز به ATP ، عمدتاً به واسطه ی پروتئین های اینتگرال پمپ



الف) uniport: انتقال یک ماده

ب) antiport: انتقال دو ماده در دو جهت مخالف

پ) symport: انتقال دو ماده در یک جهت



انتقال وزیکولی (vesicular process)

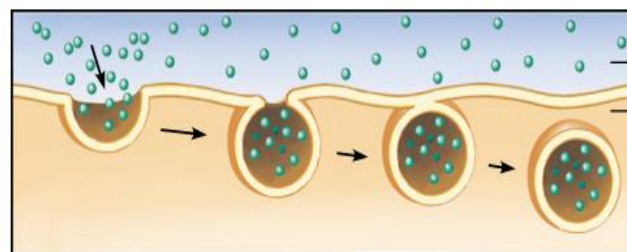
وزیکول ها مانند سایر اندامک های غشادار دارای غشایی مشابه با غشای سلول از نظر ساختاری است ، با این تفاوت که زنجیره پلی ساکاریدی ندارند.

1. اندوسیتوز (endocytosis)

ابتدا مواد در نزدیکی غشای سلول جمع می شوند و تعداد یا غلظت ماده افزایش مییابد.

سپس در غشای سلول فرورفتگی ایجاد میشود و به تدریج این فرورفتگی عمیق می شود.

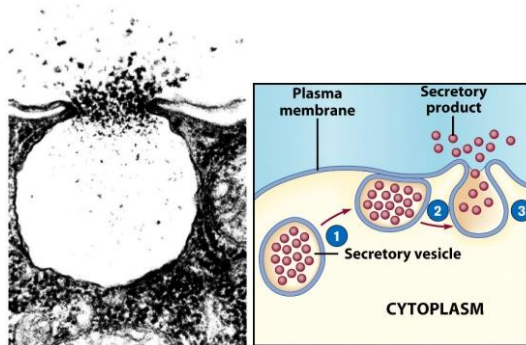
در نهایت دو لبه فرورفتگی به هم متصل میشوند و وزیکول تشکیل میشود. (به وزیکولهای تشکیل شده طی آندوسیتوز، آندوزوم (endosome) می گوییم.



(a) Endocytosis

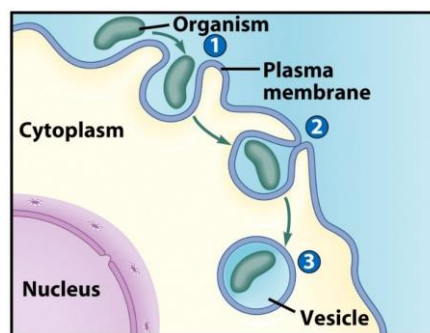


2. اگزوسیتوز (exocytosis)

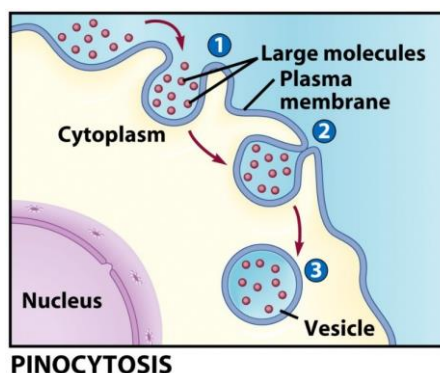


انواع اندوسیتوز براساس نوع موادی که وارد می شوند:

1-الف) فاگوسیتوز (phagocytosis): به معنای غذا خوردن است و ورود ذرات جامد، عمدتاً ذرات جامد خارجی و میکروارگانیسم ها (عمدتاً در ماکروفاژها)



1-ب) پینوسیتوز (pinocytosis): به معنای نوشیدن است و ورود مواد محلول (به داخل کشیدن مایع خارج سلولی و محتویات حل شده در آن). به ذرات وارد شده از این طریق، pinosomes و به وزیکول های حاصل از این فرایند، pinocytotic می گویند.

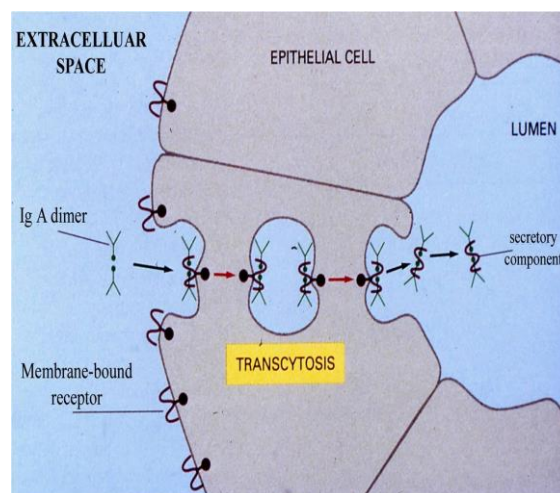


Transcytosis (انتقال درون سلولی):

برای موادی که مورد استفاده ی سلول قرار نمی گیرند اما راه دیگه ای برای عبور و ورود به سلول بعدی نیست ، وزیکول از یک سمت وارد و از سمت دیگر خبدون تغییر خارج می شود. در این روش ، برای جابه جایی ، از یک سلول به عنوان معبر استفاده می شود.

*وزیکول وارد شده بدون تغییر (ادغام با لیزوزوم و...) خارج می شود. در غیراینصورت ، این فرایند transcytosis نخواهد بود و اندوسیتوز و اگزوسیتوز است.

*فضای بین سلولی برای عبور مواد 15 تا 30 نانومتر میباشد.

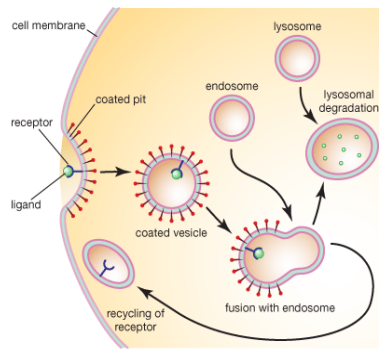


1-پ) اندوسیتوز به واسطه ی گیرنده (receptor mediated endocytosis) :

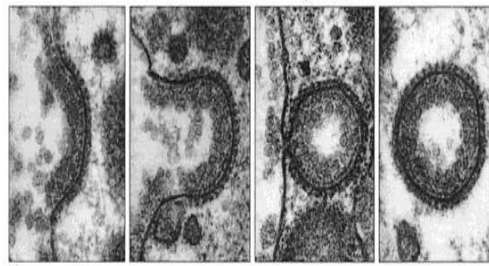
مثل هورمون ها و آلرژن ها؛ موادی که به گیرنده ها متصل میشوند ligand نامیده می شوند. در داخل سلول پروتئین هایی است که میتوانند تشکیل وزیکول ها را تسهیل کنند. یکی از این پروتئینها Clathrin است. وقتی که ligand به گیرنده متصل میشود Clathrin ها به سطح سیتوپلاسمی غشا متصل میشوند و باعث تسهیل فرو رفتگی غشا ابتدا فرو رفتگی هایی به نام حفره های پوشش دار (coated pits) و نهایتا وزیکولی شکل میگیرد که سطح خارجی آن را Clathrin پوشانده که به آن Vesicle Coated می گویند. در نهایت این پروتئین ها می توانند از وزیکول جدا شوند و دوباره در این فرآیند مورد استفاده قرار گیرند.



Receptor-mediated endocytosis

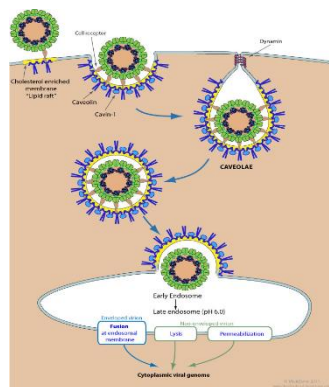


Formation of Clathrin-Coated Vesicles

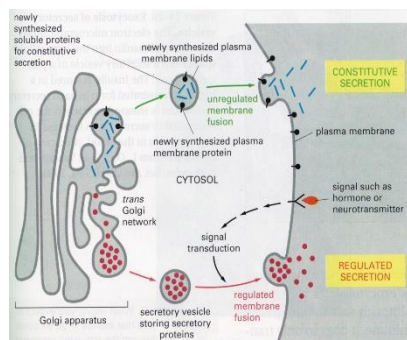


- 2500 every minute
- CCV uncoat within seconds

* پروتئین دیگری که می تواند در این فرایند نقش داشته باشد ، Caveolin است که البته Clathrin شناخته تر و معمول تر است. پروتئین Caveloin در سلولهای اندوتلیال مویرگ و عضله صاف شناخته شده است.



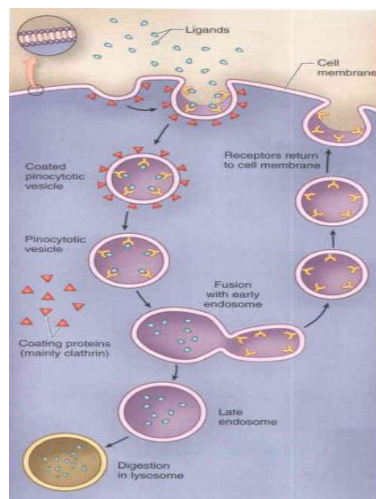
2-الف) regulatory exocytosis (تنظیم شده) : مانند ترشح هورمون و نوروترانسمیتر که یکسری فاکتور ها ترشح آن ها را تنظیم می کنند.



2-ب) constitutive (سرشتی ، ذاتی) : جهت رها سازی تولیداتی که باید به خارج از سلول آزاد شوند و نیاز به فاکتور ای کنترلی نیست؛ مثلا پروتئین کلاژن که اگر در سلول بماند ، سبب فیبروز شدن آن می شود.

Membrane trafficking (ترافیک غشایی) :

رفت و آمد غشایی. مقداری از غشا حین اندوسیتوز کم و حین اگزوسیتوز افزوده می شود. => در کل مقدار غشا تقریبا ثابت است.



نکات استخراجی جان کوئرا

بیوپسی = نمونه

در بخشی که کاریومیکروتوم نوشته شده:

انجماد در دستگاه با استفاده از نیتروژن مایع انجام می‌شود.

در بخش تکنیک انجماد:

استفاده از این تکنیک در هیستوشیمی بسیار مفید است زیرا سبب غیرفعال ماندن آنزیم و پروتئین‌ها می‌شود و همچنین روش مناسبی برای مطالعه لیپیدها نیز می‌باشد.

در بخش رنگ آمیزی با اتوزین:

کمک در شناسایی بیماری‌های مربوط به افزایش و تجمع کلسترول و فسفولیپید در سلول می‌شود.

در بخش اتورادیوگرافی:

این روش برای بررسی ماکرومولکول‌هایی مثل DNA و RNA و Pro استفاده می‌شود و تصاویر سه بعدی به ما تحویل می‌دهد؛ بیشتر اطلاعات سلولی در بافت‌شناسی از همین روش بدست می‌آید.

در بخش آنزیم هیستوشیمی:

در این مورد با آنزیم‌هایی مثل فسفاتازها، پراکسیدازها، دی‌هیدروژنازها و ... آزمایشات و بررسی‌ها انجام می‌شود.

مطلب مربوط به اسلایدی که عکس برداری از غشای سلولی صورت گرفته و سه بخش که به ترتیب از بالا به پایین (بیرون به داخل)، تیره روشن تیره است مربوط به سطح جذب اوسمیوم تترااکسید است که در دولایه فسفولیپیدی، اوسمیوم تترااکسید بیشتری به سر فسفاتی و قندها اتصال می‌یابد ولی به اسیدچرب‌ها که در بخش هیدروفوب قرار داشته و روشن تر دیده می‌شوند، در واقع اوسمیوم تترااکسید کمتری دریافت کرده‌اند.

در مطلب فاگوسیتوز، معنی آن را غذا/ذره خوردن و پینوسیتوز به معنای مایع نوشیدن در نظر بگیریم.

فاگوسیتوز طی نزدیک شدن پاهای کاذب به یکدیگر انجام می‌شود.

