

جلسه اول

آشنایی با آزمایشگاه بافت شناسی و فراگیری اصول مقدماتی کار با میکروسکوپ

در این قسمت دانشجو باید اصول مقدماتی کار با میکروسکوپ را در آزمایشگاه بافت شناسی فرا گرفته و به خوبی بتواند یک لام را در زیر میکروسکوپ تنظیم کرده و با بزرگمایی های مختلف از ۱۰۰ - ۲/۲ عدسی های شیشه مشاهده نماید. همچنین برای تفهیم هر چه بهتر کار در آزمایشگاه عملی بافت شناسی توضیحات مختصری از مراحل تهیه یک لام از نمونه های جانوری یا انسانی بداند.

الف) مراحل تهیه لام بافت شناسی :

برای بررسی هستولوژیکی بافتهای بدن از طریق میکروسکوپ نوری نیاز مبرم به وجود یک نمونه بافتی مناسب است. این نمونه را از روشهای مختلف زیر می‌توان بدست آورد :

- مقاطع سایشی (Ground section) . برای استخوان و دندان .

- تهیه اسمیر (Smear Technique) —————> معمولاً برای خون و مغز استخوان .

- تهیه مقاطع ضخیم (Thick Section) —————> این عمل در موارد خاص صورت می گیرد .

- تهیه مقاطع نازک (Sectional Method) —————> برای تشخیص بهتر جزئیات سلول و بافت

- روش انجمادی (Frozen Section) —————> برای تسریع عمل در مواقع اضطراری

ازبین این روشها بهترین طریقه تهیه برشی است که کساکن به طور دائم حفظ شود. برای تهیه این برش ابتدا از قطعه کوچک بافت تثبیت شده یک لایه نازک را بریده و رنگ نموده و بر روی یک لام شیشه ای قرار می دهند ، سپس بر روی آن لام می چسباندند ، مجموعه ای که بدین طریق آماده مشاهدات نمونه میکروسکوپی نامیده می شود. نمونه یا (Specimen).

یک نمونه میکروسکوپی هنگامی اید آال تلقی می شود که بافت موجود بر روی اسلاید به کمک مواد شیمیایی و مولکولی خون را آنچنان که در بدن بوده ، حفظ کند . برای تهیه چنین نمونه ای باید قطعه ای از بافت از جسد انسان یا حیوان تهیه شده و از مراحل زیر عبور نماید و سپس رنگ آمیزی گردد .

A - Fixation (تثبیت کردن) :

باید قطعات بافت را پیش از برداشتن از بدن حیوان و یا بلافاصله پس از آن به سرعت و به مقدار کافی در معرض محلولهای تثبیت کننده قرار داد. این مرحله برای جلوگیری از هضم بافت توسط آنزیمها (اتولیز) یا باکتریها - حفظ ساختمان فیزیکی بافت - بجامد نمودن مواد کلیدیستیوپلاسم - حفظ درجه انکسار بافت و سخت نمودن بافت صورت می پذیرد . مهمترین محلولهای تثبیتی فرمالین - الکل -

بیکرومات پتاسیم - اسید استیک - اسید اسمیک و یا مخلوطی از این مواد است و لیکن بیشتر از همه از فرمالین ۱۰٪ استفاده می شود. (البته به مقدار چندین برابر حجم بافت)

B - Dehydration (آگیری) :

چون اغلب محلولهای ابتدایی آبی هستند و در پارافین قابل حل نمی باشند لذا به کمک یک ماده جاذب که غالباً اتانول با غلظت های صعودی از ۵۰ تا الکل مطلق است. آب اضافی بافت گرفته می شود، علت تدریجی بودن این عمل به خاطر جلوگیری از جذب یکباره آب بافت و در نتیجه چروکیدگی آن می باشد. این مرحله در دستگاه پاساژ بافت حدود ۱۶ - ۱۴ ساعت طول می کشد.

C - Clearing (شفاف نمودن) :

چون الکل قابلیت انحلال در پارافین را ندارد لذا توسط یک ماده جاذب که معمولاً (Xylo) می باشد الکل را گرفته و گزیرل را جایگزین آن می نمایند. بافتها توسط این حلال چربی اشباع شده و قابل عبور می گردند، این مرحله حدوداً ۱۲ - ۶ ساعت طول می کشد.

D - Impregnation (آغشتگی) :

موادی نظیر چربی در مرحله شفاف کردن از بین می روند و باید محل خالی شده آنها را پر نمود تا نسج حالت طبیعی خود را حفظ کند. برای این عمل شمع شفاف شده در پارافین مذاب فرو برده می شود. می توان از مواد دیگری مثل ژلاتین و سلولئیدین نیز استفاده نمود. مدت این مرحله ۹ - ۸ ساعت است.

E - Embedding (قالب گیری) :

به مفهوم قراردادن بافت آغشته شده در وضعیت کاملاً مناسب در قالب حاوی پارافین مذاب و سپس جامد نمودن آن به صورت یک بلوک بافت است. در این زمان پس از ریختن پارافین در کف قالب لوکارت نمونه را بسته به جهت مقطع گیری (به صورت طولی - عرضی - مورب) قرار می دهند.

F - Sectioning (مقطع گیری) :

در این مرحله بلوک آماده را بر روی میکروتوم نصب نموده و به کمک چاقوی میکروتوم برشهایی به قطر ۵ - ۱ میکرون تهیه می نمایند در طی عمل نوارهای پشت سر هم به طول ۲۵ - ۲۰ سانتی متر بریده می شود که آن ها را بر روی الکل ۲۰ درجه به منظور بازشدن چروکهای نسجی قرار داده و بعد از قطعه قطعه کردن توسط سوزن تشریح بر روی حمام آب گرم ۳۷ درجه قرار می دهند تا یکی باز شوند.

G - Mounting (چسباندن) :

لامهای تمیزی که فاقد چربی در سطح خود باشند را به محلول آلبومین آغشته کرده و سپس به آرامی به کمک آنها مقاطع را از روی آب جمع می کنند بعد سری لامهای آماده شده را در دستگاه اتوکلان قرار داده تا پارافین آب شده و دفع گردد.

H – Staining (رنگ آمیزی) :

منظور از رنگ آمیزی افزایش تضاد نوری طبیعی و در نتیجه وضوح بیشتر سلول‌های مختلف ، اجزاء بافت و مواد خارجی آن می باشد . برای این کار از رنگ‌های مختلف مثل هاتوکسیلین – اتوزین H&E ، تری کروم ماسون Trichrome Massons ، PAS – آنیلین بلو Aniline blue و ... استفاده می شود . ولی معمولاً از رنگ آمیزی H&E به طور روتین استفاده می شود که در آن هسته آبی تا سیاه و سیتوپلاسم صورتی تا قرمز می گردد و رشته های کلاژن و الاستیک صورتی تا قرمز و رشته های رتیکولر غیر قابل تفکیک از سایر رشته ها به صورت کمی صورتی دیده می شوند . پس از رنگ آمیزی نمونه ها توسط یک قطره چسب اتلان و لامل پوشیده می شوند .

● آرتیفکت (Artifact) :

به حالت‌های ناخواسته ای که در نتیجه خطاهای آزمایشگاهی ناشی از فقر تکنیکی و یا به صورت تصادفی رخ می دهد و می تواند به صور مختلف از جمله رسوب مواد – چین و چروک ، دولا شدن و چین خوردگی مقطع و شکاف بین قسمتهای مختلف نمونه باشد .

● جهت برش گیری :

بلیل اینکه از هر نمونه بافتی معمولاً مقاطع متعددی و نه فقط یک مقطع تهیه می شود . برشهای مختلف از یک بافت و حتی یک سلول ممکن است منظره های متفاوتی داشته باشد . به عنوان مثال اگر یک تخم مرغ را مشابه سلول فرض کنیم برش آن گاه بیضی و گاه دایره ای است و گاه برش از هسته گذشته و قابل رؤیت است و زمانی از آن نگذشته است و لذا دیده نمی شود . کلاً بهتر است قبل از مشاهده نمونه به نوع جهت گیری آن که سی تواند به صورت طولی (Longitudinal section) و یا عرضی (Cross section) و یا مورب (Oblique section) باشد توجه نمود .

ب (ساختن میکروسکوپ نوری :

یک میکروسکوپ نوری معمولاً دارای دو عدسی چشمی (Ocular) با بزرگنمایی ۱۰ و چهار عدسی شیئی (Objective) با بزرگنمایی های متغیر (۴ – ۱۰ – ۴۰ و ۱۰۰) است که مجموعاً این دو قسمت بخش اپتیک دستگاه نامیده می شود . همچنین قسمتی به نام Condenser

میکروسکوپ موجود است که کاربرد مهمی در کیفیت تصویر مورد مشاهده دارد و از چند عدسی همگرا و یک دیافراگم و یک فایتر تبدیل نور زرد به نور سفید تشکیل شده است که معمولاً باید همیشه برای لامهای رنگ آمیزی شده دیافراگم آن تا آخر باز باشد و بی در مورد لامهای مرطوب بدون رنگ معمولاً با بستن دیافراگم کندانسور باعث ایجاد کنتراست مصنوعی برای تشکیل بهتر تصویر می شوند . یک صفحه مکانیکی در زیر عدسیهای شیئی قرار داشته که محل قرارگیری نمونه مورد بررسی است لذا برای عبور نور از نمونه سوراخی در وسط این صفحه تعبیه شده و دو اهرم در سمت راست این

صفحه باعث جل و عقب کردن یا به رسات و چپ بردن لام مورد نظر می گردد. بر روی تته میکروسکوپ دو پیچ فوکوس کننده ماکرو و میکرو موجود است که به وسیله آن می توان پس از قراردادن لام بر روی صفحه مکانیکی فاصله سطح لام تا سطح عدسی شیئی را برای تشکیل بهتر تصویر تنظیم نمود (Functional space) که این فضای کار برای عدسی $\pm$ از همه بیشتر و برای عدسی ۱۰۰ از هم کمتر است لذا عدسی کاملاً به سطح لام می چسبد و معمولاً برای این عدسی از روغن سدر یا ایلر سیون استفاده می شون و به این عدسی ، عدسی روغنی نیز گفته می شود .

ابتدا میکروسکوپ را روشن نموده و عدسی شیئی را بر روی $\pm$ گذاشته و دو عدسی چشمی را آنقدر حرکت می دهیم تا با دو چشم یک دایره روشن مشاهده شود سپس لام را به صورتی که لامل آن به سمت بالا باشد بر روی صفحه مکانیکی قرار داده سپس با پیچ فوکوس فضای کار را تنظیم نموده تا تصویر واضحی دیده شود آنگاه بر حسب احتیاج عدسی ها را تغییر داده تا با بزرگمایی های بیشتر نمونه را مطالعه نماییم . قابل ذکر است در بزرگمایی بیشتر وضوح تصویر و عمق میدان دید کم می شود .