فصل اول

« بافت‌شناسی و روش‌های مطالعه‌ی آن »

بافت‌شناسی علمی است که به مطالعه سلول‌ها، بافت‌ها و اعضای بدن می‌پردازد. از اجتماع توده‌های سلولی که کار یکسانی دارند و متحدالشکل نیز می‌باشند بافت (Tissue) و از اجتماع چند بافت یک عضو (Organ) به وجود می‌آید. یک دستگاه (System) اجتماع چند عضو در بدن می‌باشد که در علم بافت‌شناسی به مطالعه میکروسکوپی آن‌ها می‌پردازند.

بافت‌ها از **سلول و ماتریکس خارج سلولی** تشکیل شده‌اند. پشتیبانی مکانیکی سلول و انتقال مواد غذایی به عهده‌ی ماتریکس خارج سلولی می‌باشد. سلول‌ها، اجزای ماتریکس خارج سلولی را می‌سازند و تقابل شدیدی بین سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی بافت‌ها مشاهده می‌شود.

مطالعه میکروسکوپی بافت‌ها

متداول‌ترین روش مطالعه‌ی بافت‌ها، تهیه برش‌های بافتی و مطالعه با میکروسکوپ نوری می‌باشد. به دلیل آنکه اندام‌ها و بافت‌ها ضخیم می‌باشند، به منظور مطالعه‌ی میکروسکوپی آن‌ها باید برش‌های نازکی از آن‌ها تهیه شود. این برش‌ها به وسیله دستگاه میکروتوم به دقت تهیه می‌شود.

طی مراحل آماده‌سازی بافتی گاهی تغییر شکل‌ها و از دست رفتن اجزای بافتی که به **آرتیفکت** (Artifact = Artefact) موسوم است، مشاهده می‌شود. (تغییر شکل شامل چین‌ها، شکاف‌ها، دو رنگ شدن مقاطع، رسوب ذرات خارجی یا لکه‌های زرد و ... می‌باشد)

آماده‌سازی بافت‌ها شامل مراحل زیر می‌باشد:

۱ـ ثابت‌کردن بافت (Fixation): به منظور به حداقل رساندن تغییرات سلول پس از مرگ، ثابت کردن بافت به وسیله محلول‌های تثبیت‌کننده صورت می‌گیرد. محلول‌های تثبیت‌کننده شامل **الکل، فرمالین، اسیداستیک و اُسید اسمیک** و بیکرمات پتاسیم می‌باشد. یکی از بهترین محلول‌های تثبیت‌کننده، محلول **ایزوتونیک فرمالدئید ۴٪** می‌باشد یا (فرمالین ۵ تا ۱۰ درصد).

۲ـ آب‌گیری(Dehydrating): پس از تثبیت، باید بافت را جداگانه در الکل‌های ۷۰ درصد، ۹۰درصد و دو تا الکل مطلق عبور داد تا آب بافت گرفته شود. سپس بافت را از محلول گزیلل عبور داده تا الکل آن نیز جدا شود. (شسته شدن الکل توسط xylen)

۳ـ قالب‌گیری (Embedding): جهت تهیه‌ی مقاطع نازک بافتی، بافت‌ها را در یک محیط جامد فرو برده و قالب‌گیری می‌شوند. مواد سخت‌کننده‌ی بافت شامل پارافین و رزین می‌باشد. چنانچه از ماده Acrylic or epoxy resins برای قالب‌گیری استفاده کنند مقاطع نازک‌تر تهیه و از میکروتوم ویژه برای بررسی استفاده خواهد شد.

در مطالعه با میکروسکوپ نوری از پارافین و رزین و در مطالعه با میکروسکوپ الکترونی فقط از رزین استفاده می‌شود.

۴ـ مقطع‌گیری (Sectioning): قالب بافت تهیه شده را به وسیله دستگاه میکروتوم به ضخامت ۱ـ۲ میکرون برش می‌دهند. سپس آن را بر روی لام شیشه‌ای چسبانده و پارافین‌زدایی می‌کنند.

یک روش متفاوت، استفاده از **میکروتوم انجمادی ـ کرایوستات** (Cryostat) جهت برش بافت‌های منجمد ابداع شده است.

۵ـ رنگ‌آمیزی (Staining): مشاهده بافت‌ها بدون رنگ‌آمیزی در میکروسکوپ نوری، میسر نمی‌باشد. متداول‌ترین روش رنگ‌آمیزی، هماتوکسیلین ـ ائوزین (HE) می‌باشد. اجزای بافتی که تمایل به رنگ‌های اسیدی دارند، **اسیدوفیل** و آن‌هایی که تمایل به رنگ‌های بازی دارند، **بازوفیل** می‌نامند.

هسته با خاصیت اسیدی، رنگ بازی هماتوکسیلین را می‌پذیرد و آبی رنگ می‌شود و **سیتوپلاسم با خاصیت بازی،** رنگ اسیدی ائوزین را پذیرفته و به رنگ قرمز در می‌آید. آبی تولوئیدین و آبی متیلن جزء رنگ‌های بازی و نارنجی G و فوشین اسیدی جزء رنگ‌های اسیدی هستند.

رنگ‌های تری‌کروم علاوه بر هسته و سیتوپلاسم در تمایز کلاژن از عضله صاف نیز مفید است. کل مراحل ثابت کردن بافت تا مشاهده در زیر میکروسکوپ حدود ۱۲ ساعت تا ۲/۵ روز طول می‌کشد.

مثال۱: کدام مورد صحیح می‌باشد؟

۱) هسته خاصیت اسیدی داشته و رنگ هماتوکسیلین را می‌پذیرد. ۲) به دلیل خاصیت بازی، سیتوپلاسم به رنگ آبی در می‌آید.
۳) سیتوپلاسم خاصیت بازی داشته و رنگ هماتوکسیلین را می‌پذیرد. ۴) به دلیل خاصیت اسیدی، هسته به رنگ قرمز در می‌آید.

☑ **پاسخ:** گزینه «۱» هسته با خاصیت اسیدی، رنگ بازی هماتوکسیلین را می‌پذیرد و آبی رنگ می‌شود. در حالی که سیتوپلاسم خاصیت بازی داشته و رنگ اسیدی ائوزین را می‌پذیرد و قرمز رنگ می‌شود.

مثال۲: هدف از Fixation بافت چیست؟

۱) تهیه مقاطع نازک بافتی ۲) کاهش آرتیفکت
۳) به حداقل رساندن تغییرات سلول پس از مرگ ۴) مشاهده بافت زیر میکروسکوپ

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» به منظور به حداقل رساندن تغییرات سلول پس از مرگ، بافت‌ها را به وسیله محلول‌های تثبیت‌کننده، ثابت یا Fix می‌کنیم.

انواع میکروسکوپ‌ها

۱. میکروسکوپ نوری

در این نوع میکروسکوپ، نمونه‌های رنگ شده براساس میزان نوری که از درون بافت عبور می‌کند، بررسی می‌شوند. اجزای نوری این میکروسکوپ شامل **متراکم‌کننده نور** (Condenser)، **عدسی شیئی** (Objective) و **عدسی چشمی** (Eyepiece) می‌باشد. کندانسور نور را متراکم می‌کند. عدسی شیئی، تصویر شیئی را بزرگ کرده و آن را به سمت عدسی چشمی می‌فرستد. عدسی چشمی باز هم تصویر را بزرگ‌تر کرده و آن را بر روی شبکیه چشم، قابل رؤیت می‌کند. **بزرگ‌نمایی** کلی میکروسکوپ نوری با ضرب کردن قدرت بزرگ‌نمایی عدسی‌های شیئی و چشمی در هم به دست می‌آید. قدرت تمایز میکروسکوپ نوری عبارت است از کوچکترین فاصله بین دو شیء کوچک که در آن فاصله، اشیاء به طور مجزا قابل رؤیت می‌باشند.
بالاترین قدرت تمایز (تفکیک) میکروسکوپ نوری تقریباً **۰/۲ میکرومتر** است که اساساً به کیفیت عدسی شیئی وابسته است.

۲. میکروسکوپ فاز کنتراست و میکروسکوپ تداخل افتراقی

در میکروسکوپ فاز کنتراست، از عدسی‌هایی استفاده می‌شود که از اشیای شفاف، تصاویر قابل رؤیت می‌سازند. سرعت نور در هنگام عبور از ساختمان‌های سلولی با ضرایب انکساری مختلف، تغییر می‌کند. میکروسکوپ تداخل افتراقی از این تغییرات استفاده کرده تا ساختمان‌ها نسبت به یکدیگر روشن‌تر و تیره‌تر به نظر برسند.

نکته۱: مطالعه‌ی میکروسکوپ تداخل افتراقی جهت مشاهده **سلول‌های زنده** بسیار مناسب است.

نکته۲: برای مطالعه‌ی نمونه‌های **بیولوژیک رنگ نشده** از میکروسکوپ فاز کنتراست و تداخل افتراقی استفاده می‌کنند.

۳ـ میکروسکوپ پلاریزان

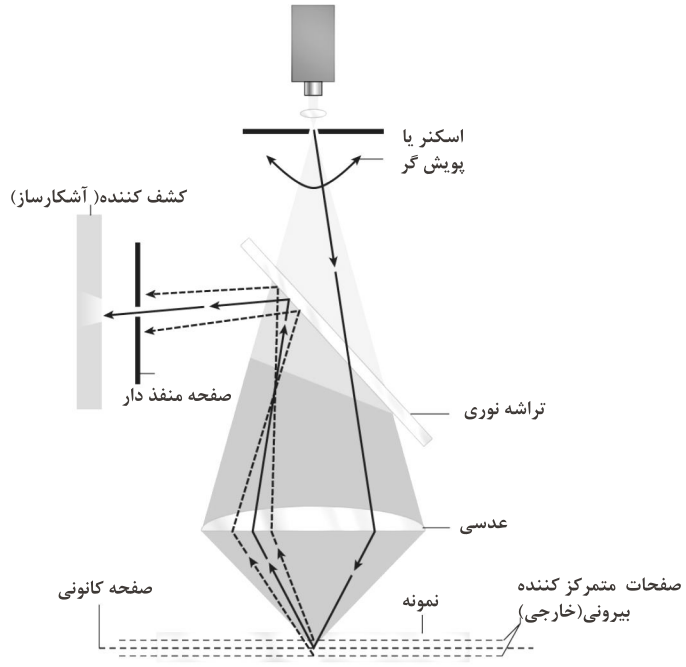
برای تشخیص ساختمان‌های کاملاً سازمان یافته از میکروسکوپ پلاریزان استفاده می‌شود. یکی از ویژگی‌های مواد بلوری یا حاوی مولکول‌های جهت‌دار، خاصیت انکسار مضاعف یا توانایی چرخاندن جهت ارتعاش نور می‌باشد. در این نوع میکروسکوپ از این خاصیت مواد سازمان یافته استفاده شده است. در این نوع میکروسکوپ نمونه‌ها را بین دو فیلتر پلاریزه کننده قرار می‌دهند و به دلیل چرخش محور نور خارج شده از فیلتر پلاریز کننده، ساختمان‌های روشنی در یک زمینه تیره مشاهده می‌شود.

۴ـ میکروسکوپ هم‌کانون

با میکروسکوپ هم کانون این امکان فراهم می‌شود که محدوده‌ی نسبتاً وسیعی از نمونه، هم زمان در کانون دیده شود که منجر به روی هم افتادن تصویر یک شیء سه بعدی می‌شود. ویژگی این نوع میکروسکوپ این است که در هر زمان فقط سطح بسیار نازکی از نمونه دیده می‌شود.

ـ دو اصل میکروسکوپ هم کانون:

۱) برعکس میکروسکوپ نوری نمونه توسط پرتو نازکی از نور روشن می‌شود.
۲) تصویر جمع شده از نمونه از یک منفذ کوچک عبور کرده و نهایتاً تصویر حاصل از صفحه کانونی به آشکارساز می‌رسد و تصاویر حاصل از مناطق جلو و عقب این سطح متوقف می‌شود. نورپردازی در میکروسکوپ هم کانون توسط یک **منبع لیزری** می‌باشد، بخشی از نمونه‌ی مورد بررسی باید توسط یک مولکول **فلوئورسانت** نشان‌دار شود.



اصول میکروسکوپ هم کانون

مثال۳: در کدام یک از میکروسکوپ‌های زیر، ساختمان‌ها نسبت به یکدیگر روشن‌تر و تیره‌تر به نظر می‌رسند؟

۱) پلاریزان ۲) تداخل افتراقی ۳) نوری ۴) هم کانون

☑ **پاسخ:** گزینه «۲» میکروسکوپ تداخل افتراقی از تغییرات ضرایب انکساری مختلف نور استفاده کرده تا ساختمان ها نسبت به یکدیگر روشن‌تر و تیره‌تر به نظر برسند.

۵ـ میکروسکوپ فلوئورسانت

در این نوع میکروسکوپ، مقاطع بافتی تحت تابش نور ماوراء بنفش (UV) قرار می‌گیرد. به نحوی که نور ساطع شده در بخش قابل رؤیت طیف نوری قرار می‌گیرد. پدیده فلورسانس: زمانی که مواد خاصی تحت تابش نور با یک طول موج معین قرار می‌گیرند، نوری با طول موج بلندتر ساطع می‌کنند. **ترکیبات فلوئورسانت تمایل به اتصال با ماکرومولکول‌های سلول، مانند DNA و RNA دارند** (مثال: آکریدین نارنجی).

نکته۳: میکروسکوپ‌های نوری معمولی، فاز کنتراست، تداخل افتراقی و هم کانون و فلوئورسانت براساس تعامل بین نور و اجزای بافت کار می‌کنند.

۶ـ میکروسکوپ الکترونی

میکروسکوپ الکترونی به دو نوع **گذاره یا عبوری و نگاره** تقسیم می‌شود که بر اساس تأثیر متقابل الکترون‌ها و اجزاء بافت کار می‌کنند.

الف) میکروسکوپ الکترونی گذاره یا عبوری: بر اساس انحراف پرتوهای الکترونی در میدان الکترومغناطیسی کار می‌کنند. تصویر در میکروسکوپ الکترونی عبوری از طریق تعامل بین الکترون‌هایی که به صفحه فلوئورسنت برخورد می‌کنند و الکترون‌هایی که در لوله‌ی میکروسکوپ باقی می‌مانند، به وجود می‌آید. بنابراین تصویر همواره سیاه و سفید است. به مناطق تیره، مناطق با **کدورت الکترونی** و به مناطق روشن مناطق با **شفافیت الکترونی** اطلاق می‌شود.

مطالعه با میکروسکوپ الکترونی به مقاطع بسیار نازک $(۴۰-۹۰\,mm)$ قالب‌گیری شده با رزین نیاز دارد.

مثال۴: در کدام یک از انواع میکروسکوپ‌های زیر تصویر همواره سیاه و سفید می‌باشد و مناطق با کدورت و شفافیت الکترونی در آن مشاهده می‌شود؟

۱) الکترونی گذاره ۲) نوری ۳) هم‌کانون ۴) پلاریزان

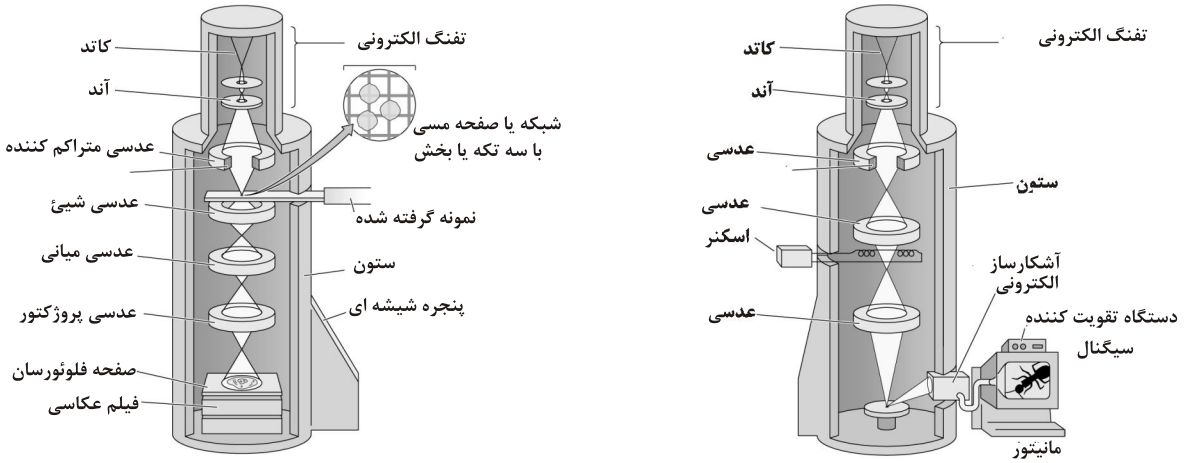
☑ **پاسخ:** گزینه «۱» میکروسکوپ الکترونی گذاره بر اساس انحراف پرتوهای الکترونی در میدان الکترومغناطیسی کار می‌کند. تصویر در این نوع میکروسکوپ همواره سیاه و سفید است. به مناطق تیره، مناطق با کدورت الکترونی و به مناطق روشن، مناطق با شفافیت الکترونی اطلاق می‌شود.

طرح ساختمانی میکروسکوپ الکترونی گذاره یا عبوری مشابه با میکروسکوپ نوری است در حالی که لوازم نوری میکروسکوپ الکترونی از بالا به پایین قرار گرفته است.

تکنیک‌های انجمادی، مطالعه بافت‌ها با میکروسکوپ الکترونی بدون نیاز به تثبیت و قالب‌گیری را امکان‌پذیر می‌سازد. در این روش، آرتیفکت کمتری نسبت به روش عادی مشاهده می‌شود. بافت‌های منجمد را می‌توان برش داد و در معرض روش‌های ایمونوسیتوشیمی قرار دارد.

ب) میکروسکوپ الکترونی نگاره: این نوع میکروسکوپ، نماهای **سه بعدی کاذبی** از سطح سلول، بافت و اندام ایجاد می‌کند. تصویر در این نوع میکروسکوپ از الکترون‌های بازتابشی سطح نمونه‌ی پوشیده شده با فلز به وجود می‌آید. این الکترون‌ها به وسیله یک ابزار کشف‌کننده (Detector) گرفته می‌شوند.

برخلاف میکروسکوپ الکترونی گذاره، الکترون‌ها در میکروسکوپ الکترونی نگاره از درون نمونه عبور نمی‌کنند در حالی که مانند میکروسکوپ الکترونی گذاره، تصویر سیاه و سفید می‌باشد.



میکروسکوپ الکترونی

اتورادیوگرافی برش‌های بافتی

اتورادیوگرافی عبارت است از مطالعه‌ی وقایع زیستی در برش‌های بافتی با استفاده از مواد رادیواکتیو. در این روش مواد رادیواکتیو را به درون سلول وارد می‌کنند. با توجه به هدف مطالعه، **آمینواسیدهای رادیواکتیو، نوکلئوتیدها** و **قندهای رادیواکتیو** مورد استفاده قرار می‌گیرند. آمینواسیدها، قند و نوکلئوتیدها پیش‌سازهای (Precursor) ماکرومولکول‌های سلول نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک یا پلی‌ساکاریدها و گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند. بلورهای برومید نقره که کشف‌کننده‌های فعالیت رادیواکتیو می‌باشند، تحت برخورد پرتوها به گرانول‌های سیاه کوچکی از فلز نقره احیا می‌شوند و فعالیت رادیواکتیو را در بافت معین می‌کنند. از روش اتورادیوگرافی می‌توان در مطالعه با میکرسکوپ الکترونی و نوری استفاده کرد.

با تعیین محل فعالیت رادیواکتیو در اجزای بافتی، اطلاعات فراوانی می‌توان به دست آورد. برای مثال، می‌توان میزان پروتئین یک سلول را با سلول دیگری در یک بافت مقایسه کرد و یا اینکه می‌توان فهمید که کدام سلول در یک بافت در حال تقسیم شدن است که این موضوع را با نشان‌دار کردن DNA می‌توان دنبال کرد. همچنین می‌توان وقایع دینامیک را مورد بررسی قرار داد. برای مثال: تعیین محل تولید یک پروتئین و مسیر ترشحی آن.

مثال۵: در روش اتورادیوگرافی برش‌های بافتی از کدام مورد استفاده می‌شود؟

۱) آمینواسیدهای رادیواکتیو ۲) قندهای رادیواکتیو ۳) نوکلئوتیدهای رادیواکتیو ۴) تمامی موارد

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» در روش اتورادیوگرافی از تمامی موارد گفته شده استفاده می‌شود. آمینواسیدها، قندها و نوکلئوتیدها پیش‌سازهای ماکرومولکول‌های سلول نظیر پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و اسیدهای نوکلئیک و گلیکوپروتئین‌ها می‌باشند.

کشت سلول و بافت: در این روش سلول‌ها و بافت‌ها در محیط‌هایی رشد داده می‌شوند که دارای نمک‌ها، اسید آمینه‌ها و ویتامین‌ها به همراه اجزای سرم می‌باشند. در ابتدا سلول‌های بافت را به روش مکانیکی و یا به کمک آنزیم‌ها از یکدیگر جدا می‌کنند. سپس آن‌ها را در یک سوسپانسیون کشت می‌دهند و یا می‌توان سلول‌ها را بر روی یک لام شیشه‌ای گستراند. کشت‌های سلولی که بدین روش تهیه و جداسازی می‌شوند، **کشت سلولی اولیه** می‌نامند. کشت سلول و بافت امکان مشاهده‌ی مستقیم رفتار سلول‌های زنده را زیر میکروسکوپ میسر می‌سازد. با فرآیندی به نام تغییر شکل **(Transformation)** می‌توان انواع سلول‌ها را برای مدت نامحدود نگهداری کرد و رده‌های سلولی **(Cell line)** دائمی تشکیل داد. **تغییر شکل، اولین مرحله در سرطانی شدن سلول طبیعی است.**

کاربرد طبی: کشت سلول به منظور مطالعه‌ی متابولیسم سلول‌های طبیعی و سرطانی، تولید داروهای جدید، مطالعه‌ی انگل‌های درون سلولی، پژوهش سیتوژنتیکی و تعیین کاریوتیپ انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. (انگل درون سلولی شامل پروتوزوئا، میکروپلاسما، ویروس‌ها می‌باشند.)

شیمی بافت و شیمی سلول: برای تعیین موقعیت مواد در برش‌های بافتی از روش‌های هیستوشیمی و سیتوشیمی استفاده می‌شود. این روش‌ها براساس واکنش‌های شیمیایی خاص یا تعامل شدید میان ماکرومولکول‌ها می‌باشد.

یون‌ها: یون‌هایی مانند **کلسیم، آهن، فسفات** در واکنش‌هایی که یک فرآورده نامحلول تیره تولید می‌کند، در بافت‌ها قابل شناسایی هستند.

اسیدهای نوکلئیک: تشخیص DNA در هسته سلول و میزان آن را می‌توان از واکنش **Feulgen** (رنگ قرمز تیره ایجاد می‌کند) امکان‌پذیر ساخت. DNA و RNA از طریق رنگ‌آمیزی سلول و برش‌های بافتی قابل بررسی می‌باشند.

پروتئین‌ها: اگرچه روش‌های هیستوشیمیایی قادر به تعیین موقعیت پروتئین‌های خاص در سلول و بافت‌ها نمی‌باشند، اما چندین روش هیستوشیمیایی اختصاصی، به منظور آشکارسازی آنزیم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنزیم‌هایی که با این روش‌ها قابل شناسایی هستند عبارتند از:

۱ـ فسفاتازها: پیوند میان یک گروه فسفات و یک باقی‌مانده (Residue) الکلی در مولکول فسفریله را می‌شکنند. **فسفاتازهای قلیایی** با حداکثر فعالیت در pH قلیایی با این روش قابل تشخیص می‌باشند. **فسفاتازهای اسیدی** برای نشان‌دار کردن لیزوزوم‌ها که حاوی فسفاتازهای اسیدی هستند، استفاده می‌شوند.

۲ـ پراکسیدازها: این آنزیم با انتقال یون هیدروژن به پراکسید هیدروژن سبب اکسیداسیون سوبسترای‌های خاصی می‌شود و مولکول آب نیز تشکیل می‌شود. از پراکسیدازها به دلیل فعال بودن و تولید میزان قابل توجهی رسوب نامحلول، در نشاندار کردن سایر ترکیبات نیز استفاده می‌شود.

مثال۶: به منظور آشکارسازی آنزیم‌ها از کدام روش استفاده می‌شود؟

۱) واکنش Feulgen ۲) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳) آنتی‌بادی‌های نشان‌دار ۴) هر سه روش

☑ **پاسخ:** گزینه «۳» جهت آشکارسازی آنزیم‌ها از چندین روش هیستوشیمیایی استفاده می‌شود که در آنها آنتی بادی‌های نشان‌دار مورد استفاده قرار می‌گیرند.

◆ ◆ ◆ ◆

۳ـ دهیدروژنازها: این آنزیم‌ها یون هیدروژن را از یک سوبسترا به سوبسترای دیگر منتقل می‌کنند.

دهیدروژنازها به وسیله‌ی روش‌های هیستوشیمیایی تشخیص داده می‌شوند. با این روش می‌توان محل **آنزیم مهم چرخه اسیدسیتریک** میتوکندری را که سوکسینات دهیدروژناز می‌باشد، مشخص کرد.

پلی‌ساکاریدها و اولیگوساکاریدها

پلی‌ساکاریدها را که به صورت آزاد و یا ترکیب با پروتئین‌ها می‌باشند، می‌توان با واکنش **پریودیک اسید ـ شیف (PAS)** تشخیص داد. این واکنش براساس تبدیل گروه‌های ۱، ۲ـ گلیکول موجود در قند به آلدئید عمل می‌کند. در این روش در محل‌های تجمع پلی‌ساکارید رنگ ارغوانی یا قرمز معرف شیف آشکار می‌شود.

گلیکوژن، پلی‌ساکاریدی است که در همه جای بدن به صورت آزاد می‌باشد و در کبد، **عضله مخطط** و سایر بافت‌ها توسط واکنش PAS قابل تشخیص است. گلیکوپروتئین‌ها مولکول‌های پروتئینی هستند که به زنجیره‌های قندها (اولیگوساکاریدها) اتصال دارند. گلیکوژن و گلیکوپروتئین خنثی هر دو **PAS مثبت** می‌باشند. ساختمان‌هایی که با واکنش PAS رنگ می‌گیرند ولی در معرض آمیلاز رنگ نمی‌گیرند، حاوی **گلیکوژن** هستند.

گلیکوزآمینوگلیکان‌ها، پلی‌ساکاریدهای خطی بدون انشعاب هستند با خاصیت آنیونی قوی می‌باشند. از اتصال زنجیره‌های **گلیکوزآمینوگلیکان‌ها** به یک محور پروتئینی، پروتئوگلیکان تشکیل می‌یابد.

نکته۴: پروتئوگلیکان‌ها، جزء اجزای مهم ماتریکس بافت همبند می‌باشند.

نکته۵: در پروتئوگلیکان‌ها، برخلاف گلیکوپروتئین‌ها، جزء اصلی مولکول زنجیره‌های کربوهیدراتی می‌باشد.

گلیکوزآمینوگلیکان‌ها و گلیکوپروتئین‌های اسیدی به دلیل گروه‌های کربوکسیل و سولفات بالای خود، **خاصیت آنیونی** قوی دارند و به شدت با رنگ **آبی آلسین** واکنش می‌دهند.

لیپیدها: متداول‌ترین ماده رنگی مورد استفاده جهت نشان‌دار کردن لیپیدها، **سودان IV** و **سودان سیاه** می‌باشد. این مواد رنگی در قطرات لیپید حل شده و رنگ قرمز یا سیاه دیده می‌شود.

مثال۷: کدام یک از مولکول‌های زیر را می‌توان با واکنش PAS تشخیص داد؟

۱) گلیکوپروتئین‌ها ۲) پلی ساکاریدها ۳) گلیکوژن ۴) تمامی موارد

☑ **پاسخ:** گزینه «۴» پلی ساکاریدها را که به صورت آزاد و یا در ترکیب با پروتئین‌ها می‌باشند، می‌توان با واکنش پریودیک اسید ـ شیفت (PAS) تشخیص داد.

◆ ◆ ◆ ◆

روش‌های ردیابی مولکول‌ها: به منظور شناسایی یک مولکول خاص و یک برش بافتی، می‌توان از ترکیباتی استفاده کرد که به طور اختصاصی با مولکول مورد نظر ما واکنش می‌دهند. این ترکیبات باید به وسیله یک ماده قابل ردیابی توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی نشاندار شوند. این مواد شامل ترکیبات فلورسنت، اتم‌های رادیواکتیو، مولکول‌های پراکسیداز، آنزیم‌ها و ذرات فلزی (طلا) می‌باشند. از این روش می‌توان برای ردیابی قندها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک استفاده کرد.

فالوئیدین: جهت ردیابی فیلامان‌های اکتین با رنگ‌های فلورسنت نشان‌دار می‌شوند. این ماده میل ترکیبی بالایی با اکتین دارد.
لکتین: پروتئین‌ها یا گلیکوپروتئین‌هایی هستند که با تمایل بالا و به طور اختصاصی به کربوهیدرات‌ها متصل می‌شوند.
از این ماده می‌توان جهت ردیابی مولکول‌های غشایی حاوی توالی‌های قندی به طور گسترده استفاده کرد.
پروتئین A: این پروتئین به ناحیه **FC** مولکول‌های ایمونوگلوبولین متصل می‌شود و جهت شناسایی ایمونوگلوبولین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

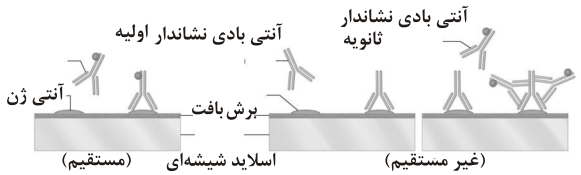
ایمونوسیتوشیمی Immunocytochemistry

یک واکنش بسیار اختصاصی بین مولکول‌ها، واکنش میان آنتی‌ژن و آنتی بادی آن‌ها است. زمانی که بدن مورد هجوم مولکول بیگانه (آنتی‌ژن) قرار می‌گیرد، قادر است با تولید پروتئین‌های اختصاصی علیه آن آنتی‌ژن (که به آنتی‌بادی معروف است)، پاسخ دهد. آنتی بادی‌ها پروتئین‌هایی از خانواده ایمونوگلوبولین‌ها می‌باشند.
در روش ایمونوسیتوشیمی، یک برش بافتی حاوی یک پروتئین خاص در یک محلول حاوی یک آنتی بادی اختصاصی برای این پروتئین، تلقیح می‌شود. سپس آنتی‌بادی به طور اختصاصی به پروتئین متصل می‌شود. به دلیل نشان‌دار بودن آنتی‌بادی، می‌توان موقعیت پروتئین را توسط میکروسکوپ نوری و یا الکترونی تشخیص داد. یکی از مهم‌ترین ملزومات روش ایمونوسیتوشیمی در دسترس بودن آنتی بادی بر علیه پروتئین مورد ردیابی می‌باشد.
دودمان‌های مختلف از لنفوسیت‌ها قادرند قسمت‌های مختلفی از آنتی‌ژن را شناسایی کرده و آنتی‌بادی خاص هر قسمت را تولید کنند. این آنتی‌بادی‌ها مخلوطی از آنتی‌بادی‌های چند دودمانی (Polyclonal antibody) تشکیل می‌دهند. البته می‌توان هر دودمان را به طور مجزا جداسازی و کشت داد. در این صورت آنتی‌بادی‌های مختلف بر علیه یک پروتئین خاص می‌توانند به طور جداگانه جمع‌آوری شوند. هر یک از این آنتی‌بادی‌ها یک **آنتی‌بادی تک‌دودمانی** (Monoclonal antibody) می‌باشند. (به طور خلاصه وقتی لنفوسیت یک نوع آنتی‌بادی ترشح (تراوش) نماید آن را آنتی‌بادی مونوکلونال هنگامی که چند نوع آنتی‌بادی تراوش کنند پُلی‌کلونال نامیده می‌شود).
مزایای استفاده از آنتی‌بادی‌های تک‌دودمانی: یک آنتی بادی تک دودمانی را می‌توان طوری انتخاب کرد که بسیار اختصاصی و محکم به پروتئین مورد نظر متصل شود. **بنابراین میزان اتصال به پروتئین‌های غیر اختصاصی کاهش می‌یابد.**

مثال۸: کدامیک جهت شناسایی ایمونوگلوبولین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد؟
۱) فالوئیدین ۲) پروتئین A ۳) لکتین ۴) سودان سیاه

☑ **پاسخ:** گزینه «۲» پروتئین A به قسمت FC ایمونوگلوبولین‌ها متصل می‌شود و جهت شناسایی آنها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

روش ایمونوسیتوشیمی مستقیم: آنتی‌بادی (تک‌دودمانی و چنددودمانی) با یک ترکیب مناسب نشاندار می‌شود. یک برش بافتی را در معرض آنتی‌بادی قرار داده می‌شود به نحوی که آنتی‌بادی با آنتی‌ژن واکنش داده و به آن متصل شود. سپس برش بافتی تحت شستشو قرار می‌گیرد تا آنتی‌بادی برداشته شود. با توجه به ترکیب مورد استفاده جهت نشان‌دار کردن آنتی‌بادی (آنزیم، فلوئورسانت، ذرات طلا) می‌توان برش بافتی را با میکروسکوپ نوری یا الکترونی مورد بررسی قرار داد.
روش ایمونوسیتوشیمی غیرمستقیم: ابتدا برش بافتی را که حاوی آنتی‌ژن (پروتئین خاصی) می‌باشد، تحت تلقیح آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن قرار می‌دهند. پس از شستشو، برش بافتی تحت تأثیر آنتی‌بادی ضدآنتی‌بادی اولیه قرار می‌گیرد. آنتی‌بادی ثانویه، آنتی‌بادی اولیه ضدآنتی ژن خاص را شناسایی می‌کند. سپس آنتی‌ژن خاص را می‌توان با استفاده از نشان‌دار بودن آنتی‌بادی ثانویه، توسط میکروسکوپ شناسایی کرد. آنتی‌بادی اولیه با آنتی‌بادی ثانویه از نظر منشأ متفاوت می‌باشد.



ایمونوسیتوشیمی

تکنیک‌های هیبریداسیون (دورگه‌سازی): دورگه‌سازی عبارت است از ایجاد اتصال بین دو رشته‌ی منفرد اسیدهای نوکلئیک (DNA با DNA، DNA با RNA، RNA با RNA). در صورتی که دو رشته مکمل یکدیگر باشند، همدیگر را شناسایی می‌کنند. تکنیک دورگه‌سازی امکان شناسایی اختصاصی توالی‌های DNA یا RNA را مهیا می‌کند.

زمانی‌که تکنیک دورگه‌سازی مستقیماً در سلول، برش بافتی یا کروموزوم‌های سلول‌های میتوزی انجام گیرد، **دورگه‌سازی درجا** نامیده می‌شود. این تکنیک برای تشخیص سلول‌هایی که دارای یک توالی خاصی از DNA (یک ژن) در حال نسخه‌برداری یا تعیین محل یک ژن در یک کروموزوم خاص استفاده می‌شود.

در این روش ابتدا دو رشته DNA داخل سلول توسط حرارت از یکدیگر جدا می‌شوند و سپس آماده تشکیل هیبرید با قطعه‌ای از DNA یا RNA تک‌رشته‌ای که مکمل توالی مورد نظر است و **پروب** (Probe) نامیده می‌شود، می‌باشد.

دورگه‌سازی را می‌توان با DNA خالص شده یا RNA در محیط‌های پشتیبان جامد انجام داد. اسیدهای نوکلئیک از طریق الکتروفورز در یک ژل آگارز یا پلی آکریل آمید جدا می‌شوند. این تکنیک شناسایی DNA، Southern blotting نامیده می‌شود. زمانی که الکتروفورز RNA انجام گیرد، تکنیک Northern blotting نام دارد.

مشکلات موجود در تفسیر برش‌های بافتی: مراحل مختلف تهیه برش‌های بافتی می‌تواند موجب ایجاد آشفتگی و تغییر شکل در بافت شود. دلایل این آشفتگی‌ها می‌تواند **چروکیدگی ناشی از ماده تثبیت‌کننده، اتانول** و **حرارت جهت قالب‌گیری در پارافین** باشد. میزان چروکیدگی در نمونه‌ی قالب‌گیری شده در رزین، کاهش یافته است.

ایجاد فضاهای مصنوعی در برش‌های بافتی یا به دلیل چروکیدگی در بافت و یا از دست رفتن مولکول‌هایی است که توسط ماده تثبیت‌کننده به خوبی در بافت حفظ نشده‌اند و یا از دست رفتن مولکول‌هایی که طی مراحل آب‌گیری و شفاف‌سازی در اثر مایعات فوق برداشته شده‌اند، می‌باشد. تمامی این فضاهای مصنوعی و سایر آشفتگی‌های ناشی از روند آماده‌سازی برش، آرتیفکت (Artifact) نامیده می‌شود.

سایر آرتیفکت‌ها، چروک‌خوردگی برش بافتی و رسوبات رنگ‌آمیزی می‌باشد. چروک‌خوردگی برش با یک رگ خونی و رسوبات رنگ‌آمیزی با گرانول‌های سیتوپلاسمی اشتباه شناسایی می‌شود.

تمامیت بافت: یکی از مشکلات مطالعه‌ی برش‌های بافتی، عدم امکان رنگ‌آمیزی افتراقی اجزای بافتی بر روی یک لام می‌باشد. بنابراین در زمان مشاهده سلول زیر میکروسکوپ، غیر ممکن است که هسته، میتوکندری، لیزوزوم و پراکسی زوم (که توسط رشته‌های کلاژن، الاستیک و رتیکولر و یک غشای پایه احاطه شده‌اند)، دیده شوند.

مثال۹: در کدامیک از روش‌های زیر از پروب نشان‌دار استفاده می‌شود؟

۱) هیبریداسیون ۲) ایمونوسیتوشیمی ۳) ایمونوهیستوشیمی ۴) وسترن بلات

☑ **پاسخ:** گزینه «۱» در تکنیک هیبریداسیون یا دورگه‌سازی از قطعه‌ای از DNA یا RNA تک رشته‌ای نشان‌دار که مکمل توالی موردنظر است، استفاده می‌کنند.

تست‌های طبقه‌بندی شده فصل اول

۱ـ با بکارگیری کدام تکنیک می‌توان محل دقیق یک پروتئین غشائی را در بافت تشخیص داد؟ (سراسری ۸۱)

۱) ایمونوهیستوشیمی ۲) اتورادیوگرافی ۳) هیبریدیزاسیون درجا ۴) رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین

۲ـ پشتیبانی مکانیکی سلول‌ها وظیفه کدام بخش بافت می‌باشد؟

۱) سلول‌های بافت ۲) ماتریکس خارج سلولی ۳) فیبریل کلاژن ۴) سلول‌ها به همراه ماتریکس

۳ـ در کدام روش مطالعه‌ی بافت‌ها آرتیفکت کمتری مشاهده می‌شود؟

۱) مطالعه با میکروسکوپ نوری
۲) مطالعه با میکروسکوپ الکترونی با مقاطع نازک قالب‌گیری شده در رزین
۳) مطالعه با میکروسکوپ الکترونی با مقاطع نازک با تکنیک انجمادی
۴) مطالعه با میکروسکوپ فلوئورسانت

۴ـ به منظور مطالعه‌ی برجستگی‌های سطح بافت‌ها از کدام نوع میکروسکوپ استفاده می‌شود؟

۱) میکروسکوپ فازکنتراست ۲) میکروسکوپ الکترونی گذاره ۳) میکروسکوپ تداخلی ۴) میکروسکوپ الکترونی نگاره

۵ـ میزان تولید یک پروتئین در یک بافت خاص را با کدام روش می‌توان شناسایی کرد؟

۱) کشت سلول و بافت ۲) ایمونوهیستوشیمی ۳) هیبریداسیون درجا ۴) اتورادیوگرافی بافت

۶ـ به منظور آشکارسازی آنزیم‌ها در برش‌های بافتی از چه روشی استفاده می‌شود؟

۱) هیستوشیمی اختصاصی
۲) استفاده از مواد رنگی از جمله سودان IV
۳) واکنش Feulgen
۴) هیچ‌کدام

۷ـ چه ساختمان‌هایی حاوی گلیکوژن می‌باشند؟

۱) موادی که با رنگ آبی آلسین به شدت واکنش دهند.
۲) موادی که به واکنش PAS پاسخ نمی‌دهند ولی در معرض آمیلاز نسبت به واکنش PAS واکنش نشان می‌دهند.
۳) موادی که به واکنش PAS به شدت رنگ می‌گیرند ولی زمانی که در معرض آمیلاز قرار داده شوند رنگ نمی‌گیرند.
۴) موادی که با رنگ سودان سیاه به بهترین نحو آشکار شوند.

۸ـ کدام مولکول‌ها می‌توانند جهت مشخص کردن مولکول‌های غشایی حاوی توالی‌های مشخص از قندها مورد استفاده قرار گیرند؟

۱) پروتئین A ۲) فالوئیدین ۳) لکتین‌ها ۴) گلیکوپروتئین‌ها

۹ـ یکی از مزایای استفاده از آنتی بادی تک‌دودمانی ...

۱) اتصال به تمامی بخش‌های یک پروتئین اختصاصی
۲) کاهش میزان اتصال غیر اختصاصی به سایر پروتئین‌های مشابه با پروتئین مورد بررسی
۳) استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی مستقیم و غیرمستقیم
۴) تنها اتصال به یک ناحیه‌ی خاصی از پروتئین و یا پروتئین‌های مشابه

۱۰ـ پروب (Probe) چیست؟

۱) قطعه‌ای از DNA تک‌رشته‌ای که مکمل توالی مورد نظر در رشته DNA می‌باشد.
۲) قطعه‌ای از RNA تک‌رشته‌ای که مکمل توالی مورد نظر در رشته DNA می‌باشد.
۳) قطعه‌ای از DNA یا RNA تک‌رشته‌ای که مکمل توالی مورد نظر در رشته DNA می‌باشد.
۴) قطعه‌ای از DNA یا RNA دو رشته‌ای که مکمل توالی مورد نظر در رشته DNA می‌باشد.

پاسخنامه تست‌های طبقه‌بندی شده فصل اول

۱ـ گزینه «۱» روش ایمنوهیستوشیمی بهترین روش جهت تشخیص محل دقیق یک پروتئین اختصاصی و سایر ماکرومولکول‌های ویژه می‌باشد. روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (HE) به منظور مطالعه میکروسکوپی بافت‌ها می‌باشد. تکنیک‌های کشت سلول و بافت اجازه آنالیز مستقیم سلول را می‌دهد. با روش‌های رنگ‌آمیزی HE امکان مطالعه ساختار بافت‌ها برای مدت طولانی و تحت شرایط فیزیولوژیکی و آزمایشگاهی وجود دارد. واژه‌های هیستوشیمی و سیتوشیمی برای بیان روش‌هایی به کار می‌رود که از آن‌ها برای تعیین موقعیت مواد در مقاطع بافتی استفاده می‌شود. برای آشکارسازی پروتئین‌هایی مثل آنزیم‌ها از روش‌های هیستوشیمیایی اختصاصی استفاده می‌کنند که در این روش‌ها از توانایی آنزیم‌ها در واکنش با پیوندی شیمیایی خاصی استفاده می‌کنند. تکنیک دو رگه‌سازی عبارت است از ایجاد پیوند میان دو رشته منفرد اسیدنوکلئیک‌ها.

اگر این رشته‌های اسیدنوکلئیکی مکمل یکدیگر باشند، به هم متصل می‌شوند و هر چه درصد این تشابه بیشتر باشد، مولکول هیبرید دو رشته‌ای راحت‌تر تشکیل می‌شود. چنانچه این تکنیک دو رگه‌سازی در سلول‌ها و مقاطع بافتی یا کروموزوم‌های میتوزی باشد دو رگه‌سازی درجا نامیده می‌شود. این روش برای تشخیص سلول‌هایی که در آن‌ها یک ژن خاص در حال نسخه‌برداری است و یا تعیین محل یک ژن روی کروموزوم مناسب است. اتورادیوگرافی محل مواد رادیواکتیو را در بافت‌ها با استفاده از اثر پرتوهای ساطع شده روی امولسیون‌های عکسبرداری، تعیین می‌کند. با این روش می‌توان مشخص کرد کدام سلول دارای پروتئین با اسیدآمینه رادیواکتیو بیشتری است و کدام سلول میزان کمتری از آن پروتئین را دارد.

◆ ◆ ◆ ◆

۲ـ گزینه «۲» از اجتماع توده‌های سلولی که کار یکسانی دارند و متحدالشکل هستند، بافت به وجود می‌آید. بافت‌ها از سلول و ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده است. پشتیبانی مکانیکی سلول و انتقال موادغذایی به عهده ماتریکس خارج سلولی می‌باشد.

◆ ◆ ◆ ◆

۳ـ گزینه «۳» میکروسکوپ الکترونی بر اساس تأثیر متقابل الکترون‌ها و اجزاء بافت کار می‌کند.

تکنیک‌های انجمادی، مطالعه بافت‌ها با میکروسکوپ الکترونی بدون نیاز به ثابت‌سازی و قالب‌گیری را امکان‌پذیر می‌سازد. در این روش، آرتیفکت کمتری نسبت به روش عادی مشاهده می‌شود. بافت‌های منجمد را می‌توان برش داده و در معرض روش‌های ایمونوسیتوشیمی قرار دارد.

◆ ◆ ◆ ◆

۴ـ گزینه «۴» میکروسکوپ الکترونی نگاره نماهای سه بعدی کاذبی را از سطح سلول، بافت و اندام ایجاد می‌کند. تصویر در این نوع میکروسکوپ از الکترون‌های بازتابشی سطح نمونهٔ پوشیده شده با فلز به وجود می‌آید. بنابراین جهت بررسی سطح بافت‌ها مناسب است.

◆ ◆ ◆ ◆

۵ـ گزینه «۴» اتورادیوگرافی در مطالعه وقایع زیستی در برش‌های بافتی با استفاده از مواد رادیواکتیو گویند. با تعیین محل فعالیت مواد رادیوالکتیو در اجزای بافتی اطلاعاتی از جمله: میزان پروتئین یک سلول، سلول در حال تقسیم در یک بافت، تعیین محل تولید یک پروتئین و مسیر ترشحی آن، را می‌توان به دست آورد.

◆ ◆ ◆ ◆

۶ـ گزینه «۱» مواد رنگی از جمله سودان سیاه و سودان IV جهت نشان‌وار کردن لیپیدها استفاده می‌شوند. تشخیص DNA در هسته سلول و میزان آن را می‌توان از واکنش Feulgen امکان‌پذیر ساخت. اما چندین روش هیستوشیمیایی اختصاصی به منظور آشکارسازی آنزیم‌ها استفاده می‌شود. با این روش می‌توان آنزیم‌هایی مانند فسفاتازها، پراکسیدازها و دهیدروژنازها را تشخیص داد.

◆ ◆ ◆ ◆

۷ـ گزینه «۳» پلی‌ساکاریدها را که یا به صورت آزاد و یا ترکیب با پروتئین‌ها می‌باشند، می‌توان با واکنش پریودیک اسید ـ شیفت (pAs) تشخیص داد. ساختمان‌هایی که با واکنش PAS رنگ می‌گیرند ولی در معرض آمیلاز رنگ می‌گیرند حاوی گلیکوژن هستند.

◆ ◆ ◆ ◆

۸ـ گزینه «۳» لکتین‌ها، پروتئین‌ها یا گلیکوپروتئین‌هایی هستند که با تمایل بالا به طور اختصاصی به کربوهیدرات‌ها متصل می‌شوند. این ماده می‌تواند جهت ردیابی مولکول‌های غشایی حاوی توالی‌های قندی به طور وسیع استفاده شود.

◆ ◆ ◆ ◆

۹ـ گزینه «۲» آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آنتی‌ژن‌ها به دو صورت چند دودمانی و تک دودمانی می‌باشند. یک آنتی‌بادی تک دودمانی می‌تواند به طور بسیار اختصاصی و محکم به پروتئین مورد بررسی متصل شود. بنابراین میزان اتصال به پروتئین‌های غیر اختصاصی کاهش می‌یابد.

◆ ◆ ◆ ◆

۱۰ـ گزینه «۳» پروب (probe) قطعه‌ای از DNA یا RNA تک‌رشته‌ای است که مکمل توالی موردنظر ما می‌باشد.

◆ ◆ ◆ ◆

آزمون فصل اول

۱ـ مراحل آماده‌سازی بافت‌ها تا مشاهده زیر میکروسکوپ نوری کدام است؟

۱) تثبیت بافت، آب‌گیری، قالب‌گیری، مقطع‌گیری، رنگ‌آمیزی
۲) تثبیت بافت، قالب‌گیری، رنگ‌آمیزی، مقطع‌گیری
۳) تثبیت بافت، آب‌گیری، قالب‌گیری ، رنگ‌آمیزی، مقطع‌گیری
۴) تثبیت بافت، مقطع‌گیری ، قالب‌گیری، رنگ‌آمیزی

۲ـ قدرت تفکیک یک میکروسکوپ نوری وابسته به چه عاملی می‌باشد؟

۱) عدسی چشمی ۲) متراکم‌کننده نور ۳) عدسی شیئی ۴) بزرگ‌نمایی میکروسکوپ

۳ـ به منظور مطالعه‌ی نمونه‌های بیولوژیک رنگ نشده از کدام میکروسکوپ استفاده می‌شود؟

۱) فاز کنتراست و الکترونی ۲) نوری معمولی و فاز کنتراست ۳) تداخل افتراقی و الکترونی ۴) فاز کنتراست و تداخل افتراقی

۴ـ پیوند فلورسانس یعنی:

۱) ساطع کردن نوری با طول موج بلندتر از طول موج نور ورودی
۲) ساطع کردن نوری با طول موج کوتاه‌تر از طول موج نور ورودی
۳) ساطع کردن نوری با طول موج برابر با طول موج نور ورودی
۴) جذب نور و عدم پراکنش آن

۵ـ در کدام یک از میکروسکوپ‌های زیر از تعامل بین نور و اجزای بافت استفاده نمی‌شود؟

۱) فاز کنتراست ۲) الکترونی ۳) تداخل افتراقی ۴) هم‌کانون

۶ـ از تکنیک اتورادیوگرافی مقاطع بافتی چه اطلاعاتی را از برش بافتی می‌توان کسب کرد؟

۱) محل تولید پروتئین ترشحی در سلول و مسیر مهاجرت آن تا ترشح را می‌توان مشخص کرد.
۲) سلول در حال تقسیم در یک بافت را می‌توان شناسایی کرد.
۳) سلول و بافت‌های زنده را می‌توان بررسی کرد.
۴) گزینه‌های ۱ و۲

۷ـ برای تعیین کاریوتیپ انسان از چه روشی استفاده می‌شود؟

۱) جداسازی کروموزوم‌ها و الکتروفورز بر روی ژل
۲) کشت سلول‌های لنفوسیتی خون یا فیبروبلاست‌های خون و بررسی سلول‌ها در خلال تقسیم میتوز در کشت بافت
۳) تکنیک دو رگه‌سازی درجا
۴) تکنیک اتورادیوگرافی با استفاده از نوکلئوتیدهای رادیواکتیو

۸ـ جهت شناسایی و تعیین موقعیت پروتئین‌ها و گلیکوپروتئین‌ها از چه روشی استفاده می‌شود؟

۱) ایمونوسیتوشیمی ۲) ایمونوهیستوشیمی ۳) هیبریداسیون ۴) هیچ‌کدام

۹ـ کدام روش امکان شناسایی اختصاصی توالی‌های DNA یا RNA را در سلول‌ها، برش‌های بافتی و یا کروموزوم‌های سلول میتوزی میسر می‌سازد؟

۱) تکنیک دورگه‌سازی ۲) تکنیک دورگه‌سازی درجا ۳) اتورادیوگرافی ۴) الکتروفورز

۱۰ـ در کدام‌یک از حالات زیر میزان چروکیدگی بافت کمتر خواهد بود؟

۱) حذف مراحل آب‌گیری و شفاف‌سازی
۲) استفاده از ماده تثبیت‌کننده مناسب
۳) قالب‌گیری با پارافین
۴) قالب‌گیری با رزین