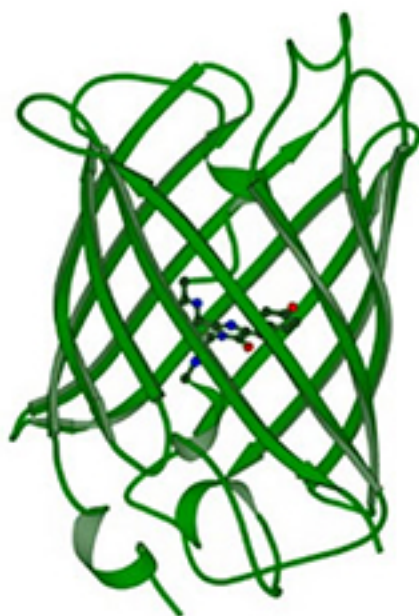




SZÖVETTANI ÉS SEJTBIOLOGIAI VIZSGÁLÓMÓDSZEREK

dr. CSIKÓS GYÖRGY
dr. LÁSZLÓ LAJOS
dr. KOVÁCS ATTILA LAJOS
dr. MOLNÁR KINGA
PÁLFIA ZSOLT
dr. ZBORAY GÉZA

Szövetteni és sejtbiológiai vizsgálómódszerek

Szerkesztette: dr. László Lajos

dr. Csikós György (3. fejezet)
dr. László Lajos (1. és 4. fejezet)
dr. Kovács Attila Lajos (5. fejezet)
dr. Molnár Kinga (2. fejezet)
Pálfia Zsolt (6. fejezet)
dr. Zboray Géza (2. fejezet)

Szövetteni és sejtbíológiai vizsgálómódszerek: Szerkesztette: dr. László Lajos

írta dr. Csikós György (3. fejezet), dr. László Lajos (1. és 4. fejezet), dr. Kovács Attila Lajos (5. fejezet), dr. Molnár Kinga (2. fejezet), Pálfi Zsolt (6. fejezet), és dr. Zboray Géza (2. fejezet)

lektorálták:

dr. H.-Minkó Krisztina

dr. Telbisz Ágnes

Kiss István

Szerzői jog © 2012 Eötvös Loránd Tudományegyetem

E könyv kutatási és oktatási célokra szabadon használható. Bármilyen formában való sokszorosítása a jogtulajdonos írásos engedélyéhez kötött.

Készült a TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0073 számú, „E-learning természettudományos tartalomfejlesztés az ELTE TTK-n” című projekt keretében. Konzorciumvezető: Eötvös Loránd Tudományegyetem, konzorciumi tagok: ELTE TTK Hallgatói Alapítvány, ITStudy Hungary Számítástechnikai Oktató- és Kutatóközpont Kft.

Nemzeti Fejlesztési Ügynökség
www.ujszechenyiterv.gov.hu
06 40 638 638



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.



Tartalom

Előszó: célok és lehetőségek	vii
1. A mikrotechnika fogalma	1
2. Fénymikroszkópia	2
Különálló, illetve izolált sejtek vizsgálata	2
Élő sejtek vizsgálata természetes állapotukban, festések nélkül	2
Élő sejtek festése vitális festékekkel	2
Sejt- és szövetminta-vételi eljárások	3
Vérkenet készítése és festése	4
Csontvelőkenet vizsgálata	5
Exfoliatív citológiai vizsgálat	6
Aspirációs biopszia	6
Egésztest-készítmények vizsgálata	7
Embriók festése	7
Átderített porc-csont festett készítmények előállítása	8
Porcfestés alciánkék-oldattal	8
Az alizarinvörös és a kombinált alciánkék-alizarinvörös festés	9
Autoradiográfia	10
Korróziós készítmények	11
Vékonycsiszolatok, illetve felületi csiszolatok készítése	12
Szöveti preparátumok, metszetek készítése	13
A biológiai anyag előkészítésének általános menete	13
A mintavétel és a rögzítés néhány szabálya	13
A rögzítéssel kapcsolatos tudnivalók	14
Metszetkészítés beágyazás nélkül	17
Metszetkészítés beágyazással	19
A szövettani metszetek festése	27
Hisztokémiai eljárások	33
A félvékony metszetek	36
A lefedés	36
Metszeteken látható néhány gyakori műtermék	37
A fénymikroszkóp története	42
Optikai alapfogalmak	49
Az Abbe-képlet	49
A fénytörés	50
Lencsehibák	50
A fényforrás	52
Az objektívek típusai és azok feliratai	53
Az objektíven lévő feliratok és számok jelentése	54
Erős nagyítású immerziós lencsék használata	56
A kondenzor és működésének lényege	56
Az okulárok felépítése és típusai	58
A mikroszkópi képalkotás és a mikroszkóp beállítása	60
A fénymikroszkóp képalkotása és nagyítása	60
A feloldóképesség kihasználása: a Köhler-féle beállítás lépései	62
Speciális mikroszkóptípusok és mikroszkópi eljárások	63
Mikroszkópi rajzolóeszköz (camera lucida)	63
A fáziskontraszt mikroszkóp	64
A polarizációs mikroszkóp	66
A differenciál interferencia kontraszt (DIC) mikroszkóp	69
Az ultramikroszkóp	70
A sötét látóterű mikroszkóp	71
A fluoreszcens mikroszkóp	72
3. Fluoreszcens módszerek	74
Bevezetés	74
A fluoreszcencia sajátosságai	75

Fluoreszkáló molekulák	77
A fotoelhalványodás jelensége (photobleaching)	78
Kioltódás (quenching)	79
Kvantum-kitermelés (quantum-yield, Φ)	79
Az extinkciós és az emissziós maximumok viszonya	79
Kötődés, méret, toxicitás és ár	80
A fluorofór molekulacsaldók	80
Az autofluoreszcencia	81
Quantum dots	81
A fluorokrómokkal való munka általános szabályai	82
A gerjesztéshez használható fényforrások	82
Higanygőzlámpa	83
A lézer fényforrások	84
LED fényforrások	85
A fényforrás helye a fluoreszcens mikroszkópokban	85
A fluoreszcens mikroszkópokban alkalmazott szűrők	86
A szűrőkocka	88
Sejtorganellumok szelektív jelölése fluorokrómokkal	89
Sejtmagfestés	89
Mitokondriumok kimutatása	92
Lizoszómák kimutatása	93
Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis (FACS)	94
Egyedi molekulák vizsgálata	96
Immunhisztokémia	97
Fluoreszkáló fehérjék	100
Fluoreszkáló fehérjék használata	102
Fluoreszcencia-visszatérés fotoelhalványodás után (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)	102
Inverz fluoreszcencia-visszatérés fotoelhalványodás után (inverse fluorescence recovery after photobleaching, iFRAP)	103
Fluorescence loss in photobleaching (FLIP)	104
Fluoreszcencia lokalizáció fotoelhalványítás után (fluorescence localization after photobleaching, FLAP)	104
Fotoaktiváció (photo-activation)	105
Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (fluorescence resonance energy transfer, FRET)	105
Fluoreszcens in situ hibridizáció (fluorescence in situ hybridization, FISH)	106
4. Elektronmikroszkópia	109
Mi teszi szükségessé az elektronmikroszkóp használatát?	109
Elektronjelenségek	109
Az elektronmikroszkóp rövid története	111
A transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)	112
A TEM és a fénymikroszkóp összehasonlítása	112
A TEM képkötő elemei	114
Az elektronmikroszkóp beállítása, lencsehibák	120
A mikroszkópos munka menete	122
Minta-előkészítés rutin TEM vizsgálatokra	123
Anyagpreparálás, rögzítés	123
Vízelenítés	126
Beágyazás	127
A blokk kifaragása, az ultramikrotom működése és a kések	130
Kontrasztosítás	138
A kész metszetek vizsgálata	139
Átágyazás: átjárás a fény- és az elektronmikroszkópos dimenziók között	140
Műtermékek, hibák	141
Minta-előkészítés speciális TEM vizsgálatokra	142
Negatív kontrasztosítás	142
Citokémia	143
Immunitokémia	144

Az alapok	144
Ellenanyagok	145
Elektron-optikai jelzőanyag	146
Az immunjelölés két módja	148
Minta-előkészítés és a beágyazás előtti immunjelölés	148
A beágyazás utáni immunjelölés	149
Fehérjepreparátum immunarany jelölése	157
Immunjelölés átágyazott metszeten	159
Az immuncitokémiai jelölés kontrolljai	160
Gyakori hibák és azok kiküszöbölése	160
A pásztázó elektronmikroszkóp (SEM)	161
5. Soksejtűekből izolált túlélő rendszerek vizsgálata: <i>in vitro</i> (<i>ex vivo</i>) módszerek	165
Az <i>in vitro</i> kísérleti rendszerekkel kapcsolatos néhány alapvető elvi kérdés	165
Az <i>in vitro</i> rendszerek fő típusainak vázlatos áttekintése	167
Az összetettség szintje szerinti csoportosítás: szupra-, szubcelluláris és újraépített rendszerek	167
Az oxigénnel való ellátás módja szerinti csoportosítás	168
Teljes embriók <i>in vitro</i> rendszerekben	174
Kombinált módszerek	176
Szubcelluláris <i>in vitro</i> rendszerek	178
Az <i>in vitro</i> rendszerek működésének általános feltételei	179
Tisztaság és sterilitás	179
A hőmérséklet	184
Az <i>in vitro</i> rendszerek vizes közegeinek alapvető tulajdonságai	187
A perfúziós rendszerek alapvető sajátosságai, néhány gyakran használt perfundált szerv	194
A perfundált máj	197
Egyéb szervek, testtájak, testrészek perfúziós rendszerben	197
Diffúzióval oxigenált organotipikus rendszerek	197
Szervtenyészetek	198
Teljes embrió tenyészetek	200
Szövetszeletek	201
Izolált sejtcsoportok, sejtek	202
Sejtizolálás szövettenyésztési célokra	202
Frissen izolált sejtek, sejtcsoportok	204
Szövet- és sejtenyészetek	214
A tenyésztés körülményei	214
A tenyészetek növekedése és fenntartása	222
Klónozás és sejtklónok	224
6. A mikroszkópos morfológia alapjai	228
Bevezetés	228
Morfológia	228
Tradicionális vagy klasszikus morfológia	228
Geometriai morfológia	228
Sztereológia	229
Egy kis statisztika	232
A statisztikai kiértékelésről	234
Mintavétel	234
Az elektronmikroszkópos minta előállításával kapcsolatos feladatok	235
A mintavétel módszere	235
A szükséges mérések számának meghatározása	236
Térfogatarányok (volumenfrakció: V_V) meghatározása	237
Adott térfogatban lévő (S_V) felület meghatározása	238
Adott térfogatban lévő struktúra hosszának (L) meghatározása	239
A sztereológiában használatos jelölések	239
7. Függelék	241
Vérkenet festése	241
May–Grünvald–Giemsa-festés	241
Egésztest-festések	241

Embriók festése	241
Porcos vázelemek feltüntetése: alciankék-festés	242
Csontos vázelemek feltüntetése: alizarinvörös festés	243
Csont-porc (alciankék-alizarinvörös) kombinált festés	243
Általános áttekintésre szolgáló szövettani festések	244
Sejtmagok festése hematoxin festéssel	244
A citoplazma festése	246
Kombinált mag- és citoplazmafestés	247
Kötőszövet kimutatása	247
Azan-festés	247
Nyálka kimutatása	248
PAS festés	248
Lipidek kimutatása	249
Szudánfekete festés	249
Oilred festés	249
Ideganyag festése	250
Idegrostok festése ozmium-tetroxiddal	250
Luxol fast blue-krezilbolya festés	250
Félvékony metszetek festése	251
Toluidinkék festés	251
Metilénkék-azúr II festés	251
Metilénkék-bázikus fukszin festés	251
Hematoxin-eozin és Azan-festés	252
Ezüstimpregnáció	252
Hisztokémiai reakciók	252
Gömöri-féle lúgos foszfatáz kimutatás	252
Gömöri-féle savas foszfatáz kimutatás	253
Pufferek, pufferrendszerek	254
Sörensen-féle foszfát puffer	254
Kakodilátpuffer	254
Veronal-acetát puffer	255
Rögzítők, keverékek, kimosók	255
Neutrális formalin-szukróz	255
Kalcium tartalmú formalin lipidek rögzítéséhez	255
Bouin-rögzítőkeverék	256
Carnoy-keverék	256
Karnovsky-keverék	256
Elektronmikroszkópos munkához ajánlott rögzítőkeverékek	257
Vízelenítés, parafasztos (paraffinos) beágyazás előtt	257
Deparaffinálás és rehidráció	257
A lefedés előtti dehidráció és derítés	258
Beágyazás fénymikroszkópos vizsgálathoz	258
Beágyazás parafasztba	258
Beágyazás elektronmikroszkópos vizsgálathoz	259
Beágyazószer eltávolítása műgyantába ágyazott félvékony metszetekből	259
Immunitokémiai jelölés beágyazás után (postembedding)	259
Kétféle immunjelölés	259
Háromlépcsős immunjelölés	260
Kontrasztosítás	260
Ultravékony metszetek rutinvizsgálatokhoz	260
A nem saját ábrák forrása	261
Filmek	265

Előszó: célok és lehetőségek

A szövettani és sejttani vizsgálómódszerek című tárgy a kifejelett **szervezetben lezajló**, spontán vagy kísérletesen előidézett, látható és láthatóvá tehető morfológiai változások elemzésére szolgáló eljárásokról nyújt alapvető tájékoztatást. Mivel valóban az alapokról szól, biológia alapszakos (BSc) hallgatóknak szánjuk. Az itt leírt információk megértése és értelmezése feltételezi az előzetes anatómiai, sejtbiológiai, szövettani, alapfokú biokémiai, immunológiai és kémiai ismereteket, így a könyvben előforduló ilyen vonatkozású állítások háttérére nem térünk ki részletesen.

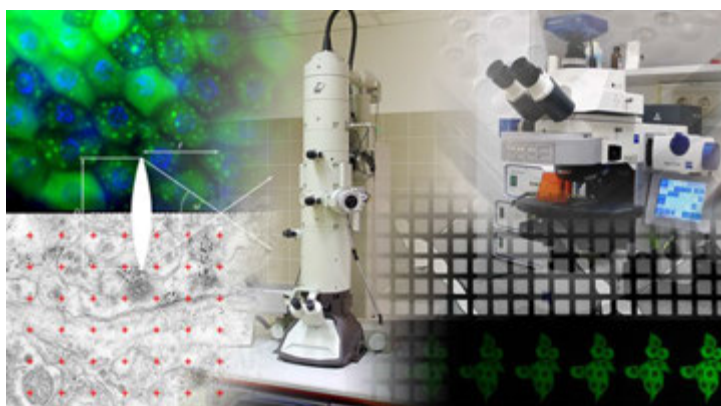
A könyvben nem tárgyalt képkalkító technikákon kívül (MRI, CT stb.), amelyek működésük közben „belelátunk” az élő szervezetbe, a „betekintésre” csak **mintavétel** után van lehetőségünk. Végezhetünk megfigyeléseket **élő sejteken, szöveteken**, persze csak olyan eszközökkel, amelyeket arra terveztek, hogy bepillantást adjanak a szöveti és sejttani dimenziókba. Az élettől összeegyeztethető vizsgálatok tárháza azonban viszonylag szerény, nincsen olyan technológia a kezünkben, amellyel az élő sejtek apró részleteit, a bennük zajló folyamatok teljességét megközelíthetnénk, megfigyelhetnénk.

Jóval több lehetőségünk adódik akkor, amikor az élő rendszerek tanulmányozása céljából tervezett beavatkozásokat a sejtek pusztulása után végezzük. Örök kérdés azonban, hogy egy ilyen minta mennyire tükrözi az élő állapotot. A mintavételi eljárások során tehát arra kell törekednünk, hogy maga a mintavétel a lehető legkisebb mértékű beavatkozást jelentse a vizsgálandó rendszer szempontjából, s hogy az abból kivett sejtek és szövetek a legkisebb mértékű változást szenvedjék el. Egy olyan vizsgálati (kísérleti) rendszer felállításához tehát, amely az élő szervezetben jelen lévő állapotokat és viszonyokat tükrözi, nagyon gondosan és körültekintően megtervezett **kísérleti munkára van szükség**.

A szöveti szintű változások leírására, azonosítására és dokumentálására a fénymikroszkópos technikák nyújtanak lehetőséget. A látható fényt használó mikroszkópok felbontása azonban korlátozott, s bár bepillantást engednek a sejt belsejébe, de az ott zajló folyamatok jobb megértéséhez, a részletek leírásához, más szavakkal az ultrastrukturális jellemzők bemutatásához már a nagyságrendekkel nagyobb felbontású elektronmikroszkóp szükséges. Az utóbbi ahhoz is nagyszerű eszköz, hogy a molekuláris sejtbiológiai, genetikai és fénymikroszkópos szintű sejttani kísérletek egyre szaporodó adatait összevethessük az ultrastrukturális megfigyelésekkel, és megítélhessük a fenti kísérletek eredményeinek megbízhatóságát és hitelességét.

Könyvünkben bemutatunk alapvető mintavételi technikákat, a minták rutin és fluoreszcens eljárásokkal kiegészített fény-, valamint elektronmikroszkópos szintű feldolgozásához szükséges eljárásokat. Foglalkozunk a szervezetből kivett sejtek és szövetek, szervek mesterséges (*in vitro*) körülmények közötti életben tartásával, ennek módszereivel és perspektíváival is. Végül, de nem utolsó sorban kitérünk olyan metodikák és eszközök bemutatására, amelyek lehetővé teszik a kapott eredmények számszerű (objektív) kiértékelését is.

A könyvet egy olyan függelék zárja, amely a bemutatott témakörökhöz kapcsolódó konkrét eljárásokat, recepteket tartalmaz.



Budapest, 2012. október 10.

A szerzők

1. fejezet - A mikrotechnika fogalma

László Lajos

Az élő sejtek és szövetek az élettel összeegyeztethető, vitális mikroszkópi vizsgálatára csak igen korlátozott lehetőségeink vannak. Az esetek többségében ezek nem szolgáltatnak elegendő információt, ezért a mikromorfológiai vizsgálatokat több lépésből álló előkészítő munka előzi meg. A **mikrotechnika** ezen **előkészítő eljárások elméleti és gyakorlati tudománya**. A minták előkészítésének megtervezésekor elsődlegesen azt kell eldöntenünk, hogy megfigyeléseinket fény-, vagy elektronmikroszkóppal végezzük, tehát az eredményeket szövet-, vagy sejtszinten értékeljük-e. Ahogy a későbbiekben látni fogjuk, a kétféle megközelítési szint komoly különbséget jelent a vizsgálandó minták preparációjában.

A mikrotechnika alkalmazásakor kettős célt kell szem előtt tartanunk:

1. egyrészt **kellő vékonyságú**, a kiértékeléskor alkalmazott (fény- vagy elektron-) mikroszkóp sugárnyalábja számára jól átvilágítható készítményt kell előállítanunk,
2. másrészt általában **meg kell növelnünk** a biológiai mintákban jellemző csekély **fénytorés- vagy elektronszórásbeli különbségeket** ahhoz, hogy az egyes szöveti vagy sejtkomponenseket el tudjuk különíteni egymástól. Ezt a fénymikroszkópiában **mikrotechnikai festékek**, az elektronmikroszkópiában pedig **nehézfémek** alkalmazásával, azaz kontrasztosítással érjük el.

A **mikrotechnikai feldolgozás legfőbb célja** az, hogy a preparátumok előállítása közben az élő anyag strukturális (és a feltételezett funkcióra utaló) sajátosságait úgy őrizzük meg, hogy az a lehető legkevésbé térjen el az élő állapottól. Ezért az előkészítés okozta torzulásokat a lehető legalacsonyabb szinten kell tartanunk, más szavakkal a **műtermék** (*artefactum*) képződésének lehetőségét a minimálisra kell leszorítanunk. Minél jobb optikai felbontóképességű vizsgálómódszer számára készítjük elő a biológiai anyagot, annál nagyobb figyelmet kell fordítanunk erre a követelményre!

2. fejezet - Fénymikroszkópia

Zboray Géza
Molnár Kinga

Bizonyos, a szervezetet élő állapotban ért hatások, tervezett beavatkozások szabad szemmel történő megfigyelésekkel is értékelhetők, de számos olyan reakció is végbemehet az állati szervezetben, amelyek csak mikroszkópos módszerekkel mutathatók ki. Ezek közül az alábbiakban a **fénymikroszkópos eljárások módszertanáról lesz szó**.

Leírásunkban az egyszerűbb rendszerektől haladunk a bonyolultabbak felé. Ez azt jelenti, hogy a fejezet olyan vizsgálatokkal kezdődik, amelyekben viszonylag egyszerű előkészületekkel és gyorsan juthatunk eredményhez (élő sejtek megfigyelése, kenetek készítése, egésztest-preparátumok). Ezeket bonyolultabb, időigényesebb eljárások követik (korróziós készítmények előállítása, csiszolatok készítése), majd a módszertani részt a szövettani készítmények (metszetek) előállításának igen összetett, hosszadalmas munkafolyamata zárja.

A hangsúlyt a módszerek elveinek bemutatására helyezzük. Az eljárásokat konkrétan leíró receptek és adatok közzétételének csak az a célja, hogy az elvi alapokat érzékeltessé tegye, illetve az elméleti megfontolásokat a gyakorlatba ültesse. Ezeket természetesen nem kell memorizálni, hiszen a mindennapi, rutinszerű alkalmazásuk során ez óhatatlanul és automatikusan bekövetkezik.

Metodikai leírásunkat egy, a fénymikroszkópokat és a hozzájuk kapcsolódó optikai ismereteket bemutató fejezettel egészítettük ki. Az ott leírtak hasznos ismereteket adnak a mai modern készülékek működési elvének megértéséhez és használatához is. A **mikroszkóp** a kísérleti eredmények kiértékelésére használt műszer. Kellő mélységű ismerete tehát **megalapozza** egyrészt a **kísérletek tervezését**, vagyis azt, hogy egy adott kérdés megválaszolásához milyen módszer alkalmazása és melyik mikroszkóp a megfelelő; másrészt **az eredmények kiértékelését**, azaz azt, hogy milyen szintű következtetéseket vonhatunk le a látottakból. Általánosan elmondható, hogy **több metodika egymás melletti használata**, illetve egymást kiegészítő eredményei vezetnek csak az adott szinten elfogadható, megalapozott következtetésekhez.

Különálló, illetve izolált sejtek vizsgálata

A vizsgálat tárgyát képező sejtek számos esetben önálló egységként, más sejtekhez nem kapcsolódva vannak jelen a szervezetben. Ilyenek pl. az érett vérsejtek, nyiroksejtek, ivarsejtek. Ezen sejteket vizsgálhatjuk élő állapotban vagy rögzítést követően, festetlenül vagy festett formában is.

Élő sejtek vizsgálata természetes állapotukban, festések nélkül

Élő állapotban és festések nélkül csak speciális optikai eszközökkel, így fáziskontraszt és differenciális interferencia-kontraszt (DIC) valamint sötét látóterű mikroszkóppal történhet a megfigyelés. A fáziskontraszt-mikroszkóp abban az esetben használható, ha a készítmény vastagsága nem haladja meg a 10–12 μm -t. Ezzel az eljárással jól láthatóvá válik pl. a sejtmag, látszanak a mitokondriumok, a különböző vezikulák és a sejtfelszín módosulatai (ezekről fotókat a mikroszkópokkal foglalkozó fejezetekben mutatunk be).

Élő sejtek festése vitális festékekkel

Élő sejtek különböző struktúráit **vitális festésekkel** tehetjük láthatóvá vagy feltűnőbbé. A vitális szó azt jelzi, hogy a festék (festési eljárás) nem pusztítja el a sejtet. Amennyiben ezek a festékek egyben **sav-bázis indikátorok** is, az eljárás funkcionális következtetések levonására is alkalmas. A festett készítmények vizsgálatára, az alkalmazott festékektől függően, használhatunk áteső fénnel működő fénymikroszkópot vagy fluoreszcens mikroszkópot.

A neutrálvörös festés

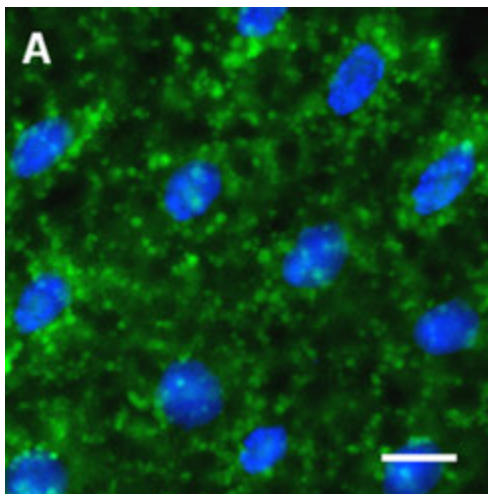
A **neutrálvörös**, nevének megfelelően, egy olyan **indikátorfesték**, amelynek átcsapási pontja pH 7 körül (pH 6,8 és 8 között) van. Ennek megfelelően a festés eredményéből leginkább arra következtethetünk, hogy a festett struktúra savas vagy lúgos jellegű-e. Így elsősorban lizoszómák kimutatására alkalmas.

A neutrálvörös festés szép példája az egysejtűekben az emésztőüröcskék útjának és az emésztés folyamatának nyomon követése. A sejtek a táplálékkal együtt a festéket is felveszik, amely így ugyanabba a térbe kerül, mint maga a táplálék. Fénymikroszkóp alatt figyelve az egysejtűt, a festék színének változásából (narancs/sárga) következtethetünk az emésztővakuólum lúgos (narancsszín) vagy savas (sárga szín) voltára. Neutrálvörössel feltüntethetjük a kapillárisokat kísérő hízósejteket és más sejt típusokat is. Alkalmazhatjuk a neutrálvörös festést paraffinba ágyazott, már elhalt, fixált szövetek vizsgálatára is (pl. idegsejtek feltüntetése céljából).

Az akridinnarancs festés

A sejtalkotórészek és a sejtek vitális festésére használhatunk **UV fényben fluoreszkáló festékeket** (fluorokrómot) is: ilyen az akridinnarancs (akridinoranzs, acridinorange). A festéket nukleinsavak (l. Fluoreszcens módszerek, sejtmagfestés) és lizoszómák kimutatására is alkalmazzuk.

Az **élő sejtek felveszik**, így sejtenyészeten tartott, vagy izolált szervek sejtjeit is kezelhetjük vele. A gyors és egyszerű eljárással előzetes szűrést végezhetünk pl. arra vonatkozóan, hogy az alkalmazott kezelés befolyásolja-e a sejtek lizoszómális aktivitását (2.1 ábra). Erről és a fluorokrómok segítségével élő sejteken, szerveken végezhető más vizsgálati lehetőségekről a Fluoreszcens módszerek c. fejezetben írunk részletesen.



2.1. ábra. Akridinnarancs festés eredménye: a lizoszómák zöld pöttyökként tűnnek elő, a sejtmagokat magfestékkel (DAPI) jelöltük (ecetmuslica, lárvális zsírtest preparátum, fluoreszcens mikroszkóp; méretvonal: 5 μ m)

Amikor **szöveti környezetben** előforduló sejtek vizsgálatára használjuk, az adott szervből fagyasztó mikrotommal vagy kriosztáttal készített metszetet (vizes kimosást követően) helyezünk a festékkoldatba. Megfelelő idő elteltével a felesleges festékanyagot kimossuk, majd készítményünket tárgylemezre helyezzük, glicerinnel lefedjük, és fluoreszcens mikroszkópban vizsgáljuk. A sötét háttérben a festődött részek zöldes színben és/vagy sárgánarancssárgán tűnnek elő környezetükből¹.

Sejt- és szövetminta-vételi eljárások

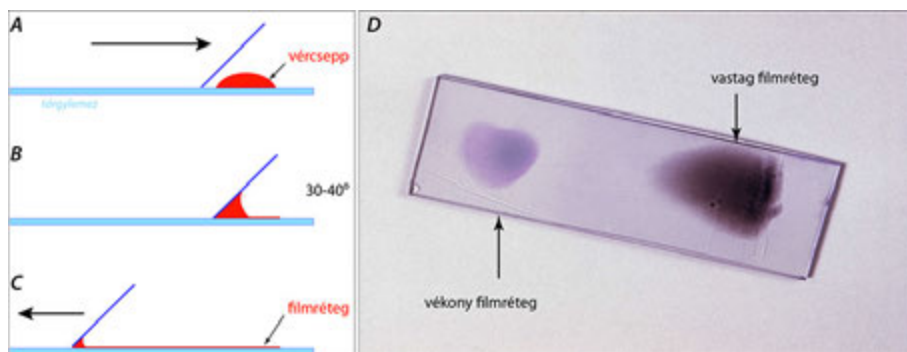
Amennyiben a sejtek önállóan és szabadon lebegnek vagy áramlanak egy közegben (pl. a vérben), akkor a sejteket tartalmazó testfolyadékból kenetet készítünk. Más esetekben a sejteket vagy a felszínekről választjuk le (exfoliatív készítmények), vagy egy szerv belsejéből nyerjük ki (biopszia).

¹<http://www.ecmaj.ca/content/175/5/475.2.short>

Vérkenet készítése és festése

Az ujjbegyből vett vércsepphez tiszta, zsírtalanított tárgylemezt érintünk, minek következtében a vércsepp rátapad a tárgylemezre. A vércseppet egy másik tárgylemez hozzáérintésével szétfolyatjuk a két üveglemez érintkezési vonalában, majd ez utóbbi tárgylemezt határozott mozdulattal elhúzzuk a vércseppet tartalmazó tárgylemez felületén (2.2. ábra). A kialakult folyadékfilmet nevezzük **vérkenetnek**, amelyet vizsgálhatunk festetlenül, pl. fáziskontraszt-mikroszkóppal, vagy mikrotechnikai festés után is (2.2.D ábra).

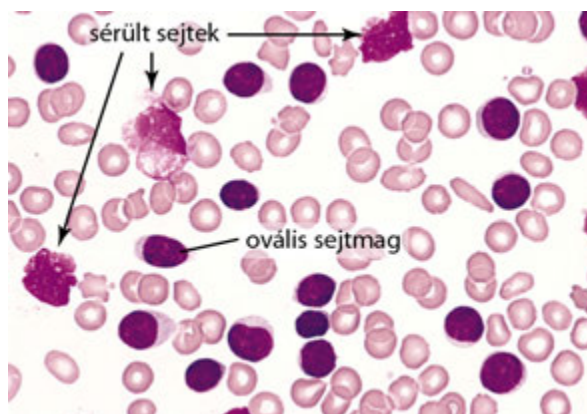
Száradást és rögzítést követően alkalmazhatunk May–Grünwald- és/vagy Giemsa-festést (2.2.D ábra), amely után a vörösvérsejtek (*erythrocyták*) minden további beavatkozás nélkül jól láthatók a mikroszkópban. Ha a fehérvérsejtek (*leucocyták*) granulumainak és magszerkezetének vizsgálata szükséges (típusmeghatározás, számolás), akkor további festési eljárást kell alkalmaznunk. Egyszerű, demonstrációs célokra hematoxinil-eozin festéssel is dolgozhatunk.



2.2. ábra. Vérkenet készítése (A–C) és eredménye (D). A kenet készítésének lépései (A): a tárgylemezen lévő vércsepp felé egy másik lemezt közelítünk (A), amelynek szélén a csepp szétfut (B). A lemezt 30-40 fokos szögben tartva azt előretoljuk, így a cseppet vékony réteggé húzzuk szét (C). A vérkenetek festés után (D)

A **Giemsa-festés** a DNS foszfátcsoportjaira specifikus eljárás, amely elsősorban az adenin/timin párosban gazdag szakaszokat jelöli. A festékeverékben metilénkék, eozin és azúr-B festékek vannak. Az eljárás – vérkenetek és csontvelői kenetek festésén kívül – jól használható a bakteriológiában és a kórszövettanban is.

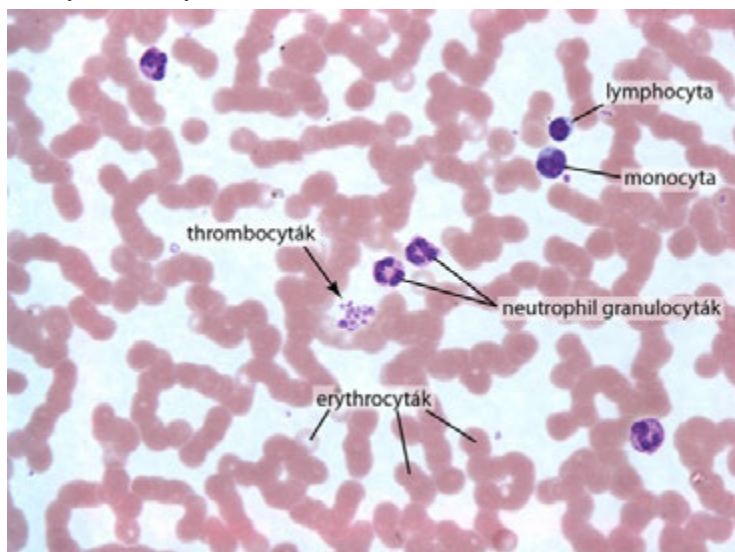
Vérkenet festésekor a vörösvérsejtek (*erythrocyták*) és a vérlemezkék (*thrombocyták*) rózsaszínűre festődnek, a fehérvérsejtek (*leucocyták*) plazmája a kék különböző árnyalataiban tűnik elő, magjuk pedig lilásra színeződik (2.3. ábra).



2.3. ábra. Vérkenet Giemsa-festéssel: az *erythrocyták* rózsaszínűek, a *leucocyták* citoplazmája kissé kékes, magjuk lila színű (B-sejtes krónikus lymphoid leukaemia)

A **May–Grünwald-festéssel** ugyancsak kitűnő eredményt kapunk. A festékek itt eozin és metilénkék. Az eljárással a vörösvértestek rózsaszínűre, a fehérvérsejtek magvai ibolyás kékre festődnek. Az eozinofil *granulocyták* szemcséi pirosra, a *neutrophil* sejtek granulumai világos ibolyakékre, míg a *basophil granulocyták* szemcséi kékre festődnek. A *lymphocyták* plazmája kék lesz (2.4. ábra).

Nagyon jó és szép eredményt ad a **May–Grünwald–Giemsa kombinált festés** is.



2.4. ábra. Vérkenet May–Grünwald-festés után: a vörösvértestek rózsaszínűek, a *neutrophil granulocyták* szemcséi ibolyaszínűek, a *lymphocyták* citoplazmája halványkék. A sejtmagok és a vérlemezkék ibolyakék

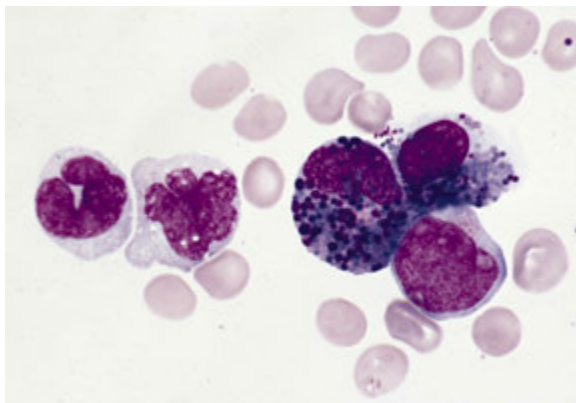
Csontvelőkenet vizsgálata

A csontvelői vérképzés vizsgálatához **csontvelőkenet**et kell készítenünk. Ehhez csontvelőt a szegycsont vagy a csípőcsont *punctió*jával nyerhetünk. Egy erős tűvel át kell szúrni a bőrt és a *sternum* kompakt állományát, majd a szivacsos csontállományba vagy a velőüregbe hatolva szívással (*aspiráció*, *aspiratio*) kell mintát venni (2.5. ábra).

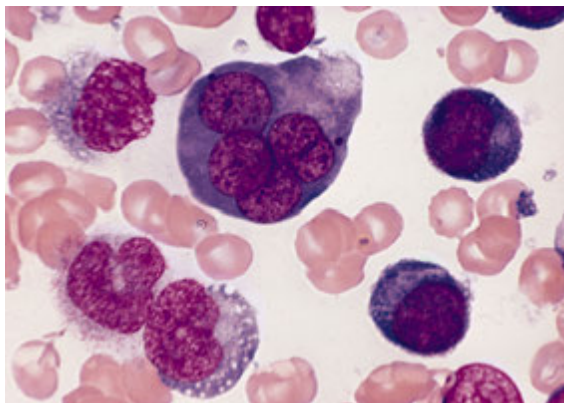


2.5. ábra. Csontvelő-mintavétel fecskendővel (*aspirációs biopszia*)

A fecskendő tartalmának egy hányadát tárgylemezre visszük, majd belőle kenetet készítünk. A kenetet a vérsejtek (vérkenet) festésére használatos festékeverékekkel (**May–Grünwald, Giemsa**, illetve ezek módosításai) festjük meg, és mikroszkópban vizsgáljuk (2.6. és 2.7. ábra).



2.6. ábra. Csontvelőből készített kenet (Giemsa-festés, acut leukaemia)



2.7. ábra. Csontvelőkenet: a kép közepén egy sokmagvú, lila citoplazmájú *erythroblast* látható (Giemsa-festés, *erythroleukemia*)

Exfoliatív citológiai vizsgálat

Gyakori citológiai mintavételi eljárás a nőgyógyászatban a **méhnyak** hüvelyi részletének területéről és a **méhszájról** vett úgynevezett exfoliatív² citológiai minták elemzése. Az eljárás neve azt jelzi, hogy itt a **felszín borító nyálkahártya leváló hámsejtjeinek** és a **fehérvérsejteknek a vizsgálatára** van lehetőségünk. Ennek megfelelően a mintavevővel (kis kefeszerű eszköz) óvatosan végigsimítjuk a mintavételi területet. Ezután a kefécskére tapadt sejteket tárgylemezre cseppentett vizsgálóoldatba juttatva, majd a mintában lévő sejteket megfestve értékeljük az eredményt.

Hasonló technikával végezzük a **hüvelykenet** citológiai vizsgálatát. Az eljárással jól követhető az ivari (*oestrus*) ciklus és annak fázisai. Az *oestrus* ciklus hormonális változásai a petefészekben, a méhben és a hüvelyben időben együtt mozgó változásokat hoznak létre. Ennek alapján a hüvelykenet változásaiból következtethetünk a ciklus által indukált folyamatokra. Egéren és patkányon végzett endokrinológiai, neuroendokrinológiai kutatásokban gyakran használt eljárás.

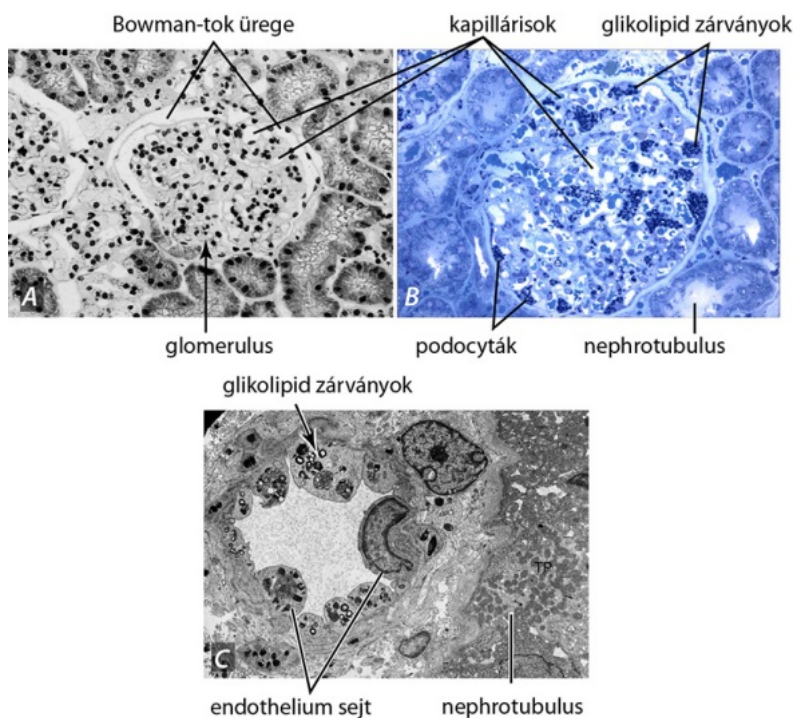
Aspirációs biopszia

Ugyancsak elterjedt módszer, de inkább szövetdarabok, szövetrészletek vizsgálatára alkalmas a tű-biopszia vagy más néven **aspirációs³ biopszia⁴**. A kórosnak vélt területbe szűrt, megfelelő méretű mintavevő tűvel, illetve a tűre szerelt fecskendővel (l. mintavétel csontvelőből) egy kis szövetdarabot távolítunk el a kérdéses szervből, és azt szövettani-molekuláris biológiai analízisnek vetjük alá (2.8. ábra).

² *exfoliatio*: hámlás

³ *aspiratio*: belégzés, beszívás

⁴ *biopsia*: élő szervezetből történő mintavétel



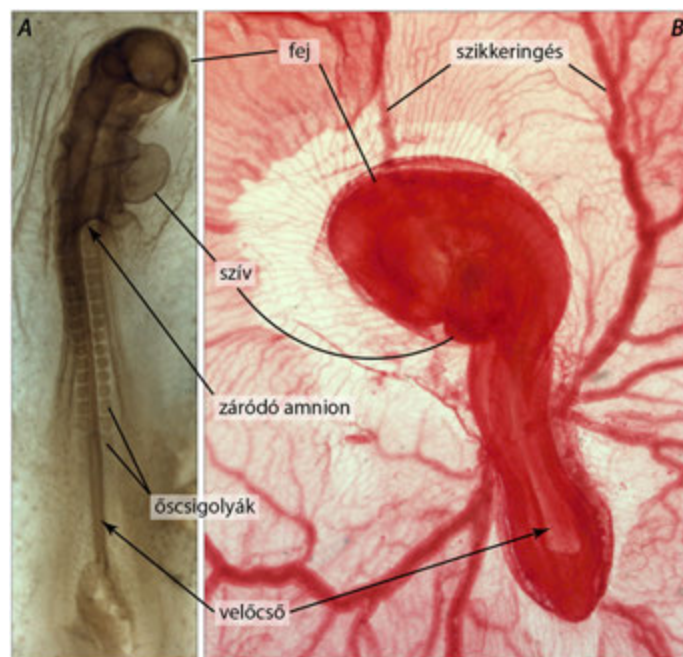
2.8. ábra. Biopsziás minta veséből: a kiemelt vesekéregminta egy részletét fénymikroszkópos vizsgálatra (A,B), egy másik részletét pedig elektronmikroszkópos analízisre (C) készítették, így a betegség fennállását ultrastrukturális szinten is igazolták (A: hematoxinilín-eozin festés, fekete-fehér felvétel, B: toluidinkékkel festett félvékony metszet, C: kis nagyítású ultravékony metszet)

Egésztest-készítmények vizsgálata

Egésztest-készítmények esetében az állatokból vagy embrióikból nem választunk le sejteket, nem is készítünk belőlük metszetet, hanem az alkalmazott eljárást a teljes testen végezzük. A festések, jelölések után a testet rendszerint átderítjük, azaz átlátszóvá tesszük.

Embriók festése

Az áttetsző, még pigmentációval sem rendelkező embrionális szövetek könnyen átíthatók különféle festékekkel (pl. ozmium-tetroxiddal, Kernechtrot-festékkel), s az így kapott készítmények hűen tükrözik az embrionális fejlődés adott stádiumát (2.9. ábra).



2.9. ábra. Ozmiummal festett fiatalabb (A) és Kernechtrot-festett idősebb (B) csirkeembrió

Átderített porc-csont festett készítmények előállítása

A módszerrel az **átderített testekben** kitűnően láthatóvá válnak a **vázrendszer elemei**, még hozzá **eredeti helyzetükben és kapcsolataikkal**. Egy ilyen preparátumon olyan részletek is megfigyelhetők, amelyek még a legnagyobb műgonddal és aprólékos munkával készített vázrendszeri készítményeken sem láthatók. Az eljárásnak igen sokféle változata ismert; vannak embriókra és nagyobb méretű (különböző gerincescsoportokba tartozó) állatokra kidolgozott módszerek is.

Ennek megfelelően az itt és a Függelékben részletesen közölt eljárások nem feltétlen egyeznek meg minden lépésben. Adott feladat megoldásához az adott állatcsoportra kidolgozott eljárás követését ajánljuk!

Első lépésként – ha ez indokolt és lehetséges – **a tetemet megnyúzzuk**. A bőr eltávolítása nagymértékben megkönnyíti a vegyszerek és a festékek bejutását a szövetekbe.

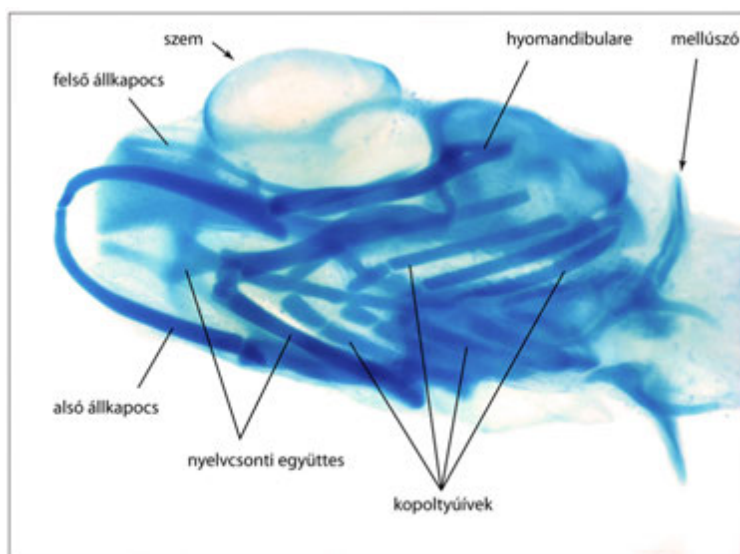
Embriók esetében erre nincsen szükség, hiszen ezt a lépést a gerinces bőr felhámjának elszarusodása, illetve kifejezett szaruképleteinek jelenléte indokolja. Az embrionális és magzati szövetek ugyanis az oldatok számára jobban átjárhatók, mint a differenciált szövetek (l. pl. a mesenchyma jellemzői!).

Porcfestés alciánkék-oldattal

Ezután (amennyiben ezt az állat méretei lehetővé teszik) **a testüregi szerveket eltávolítjuk** (kizsigerelés, *evisceratio*), majd a testet formalinban vagy alkoholban fixáljuk. A fixált tetemet híg (kb. 1%-os) KOH oldatba helyezzük. A lúgos oldatban a szövetek fellazulnak, ami megkönnyíti a festékoldat behatolását. Közben az izomzat és a kötőszöveti elemek részben átderülnek, kissé áttetszővé válnak. A teljes eljárás sikere nagymértékben függ attól, hogy ez a kálium-hidroxidos kezelés (előzetes átderítés) mennyire történt az előírások szerint. A KOH oldatban a tetem igen szakadékonnyá válik (fellazult izmok, inak), óvatosan kell tehát mozgatnunk, esetleg megemelnünk a testet.

Következő lépésként a tetemet kálium-hidroxidos **alciánkék** oldatba helyezzük. Festés után folytatjuk az átderítést és a nem kötődött, felesleges festék eltávolítását. Az alciánkék oldattal tulajdonképpen „túlfestjük” a preparátumot, ami azt jelenti, hogy a festék nem csak a vázelemekbe rakódik be (a teljes állatot kéknek látjuk). A nem specifikusan kötődő felesleget ki kell tehát oldanunk. Erre alkalmas az úgynevezett Mall-oldat, amely víz, glicerín és KOH keveréke. Ebből egy glicerintartalmára nézve növekvő koncentrációjú sort készítünk. Az oldatsor első tagját mindaddig cseréljük az alciánkékkel festett tetemen, amíg az a kioldódó festék miatt kék színűvé válik. A

preparátumot végső tárolásra hígítatlan glicerint tartalmazó, lezárható üvegedénybe helyezünk (2.10. ábra). Ez a szép festődés sajnos az évek során kifakulhat. (A Függelékben zebrahalra vonatkozó eljárást közlünk.)



2.10. ábra. Alciánkéssel festett csukalárva fejképe: a koponya egyelőre még csak porcos részei szépen kivehetők az átlátszó koponyában

Az alciánkék (Alcianblue G) jól festi a proteoglikánokat és a glükózaminoglikánokat⁵, ezért az ezen anyagokban gazdag **porcszöveteket**. Az eljárás, amennyiben szövettani metszeteken alkalmazzuk, kombinálható például hematoxilin-eozin és PAS festéssel is.

Az alizarinvörös és a kombinált alciánkék-alizarinvörös festés

Alizarinvörössel kitűnően és tartósan festhetők a **kalciumsókban gazdag** vázrendszeri elemek (csontszövet, elmeszesedett porc és mésztartalmú kötőszövet).

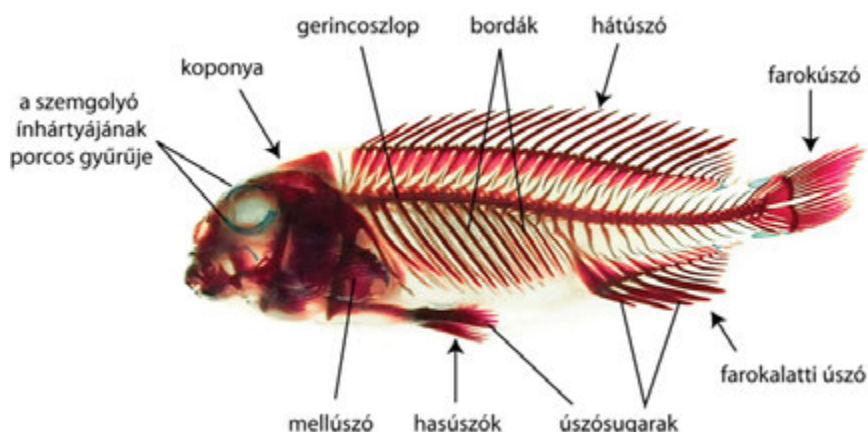
Az alizarinvörös (Alizarin red) a festőbuzér (Rubia tinctorum) nevű növényből kivont, régóta ismert festék. Oldatban élénk sötétvörös színű (színe a bordói vörösborhoz hasonló).

A festeni kívánt tetemet formalinban vagy 95%-os alkoholban fixáljuk, majd anyagunkat 1%-os KOH oldatba helyezünk, egészen addig, amíg a test átlátszóvá nem válik. Az eljárásnak ez a része kulcsfontosságú a festés eredményessége szempontjából.

Ezután következik a festés KOH-ban oldott alizarinvörössel. A kellő festődést követően folytatjuk az átderítést, pl. Mall oldatban. A kész preparátumot tiszta glicerinben tároljuk. Az alizarinvörös festés stabil, nem halványul. Az eljárás eredményeképpen az állatok vázrendszere szépen kirajzolódik. (A Függelékben zebrahalra vonatkozó leírást közlünk.)

Alciánkék-alizarinvörös kombinált festéssel a porcok kékesre, világoskékre, a csontok közép- vagy sötétvörösre színeződnek. A készítmények szépsége akkor tűnik elő igazán, ha a glicerinben tárolt anyagot alulról középerős szórt fénnel világítjuk meg (2.11. ábra).

⁵ I. szövettani tanulmányok!



2.11. ábra. Porc- és csontfestés kombinációja: alizarinvörös-alciánkék festés (piranja)

A porc-csont festett készítményeket kitűnően használhatjuk az **anatómiai oktatásban**, demonstrációban, a vázrendszer fejlődésével foglalkozó tudományos munkákban, a spontán előforduló vagy szándékosan előidézett hibás fejlődések vizsgálatára, a fejlődési hibák leírására, illetve gyógyszeripari **hatóanyagok szűrésére**. Amennyiben, egy bizonyos kezelés eredményeképpen a kísérleti testállatokban bármilyen vázrendszeri rendellenesség (szájpadhi hasadék, az ujjak számának redukciója /*oligodactylia*/ vagy éppen számfeletti ujjak megjelenése /*polydactylia*/) tapasztalható, ez alciánkék-alizarinvörös festéssel már embrionális (magzati) korban kimutatható.

Az ilyenfajta vizsgálatok ma már kötelezőek, de amíg ezt nem vezették be, sajnos előfordult, hogy egy-egy évekig forgalomban lévő gyógyszerről utólag bizonyosodott be, hogy vázrendszert érintő fejlődési rendellenességeket okoz (l. thalidomide, USA, 2.12. ábra).



2.12. ábra. Az édesanya által szedett gyógyszerben lévő hatóanyag hatására kialakult végtagfejlődési rendellenesség

Olyan kísérletes munkákban, amelyek bizonyos **géneknek a vázrendszer fejlődésében betöltött szerepével** foglalkoznak, szintén gyakran találkozunk ilyen eljárással kapott eredményekkel⁶.

Autoradiográfia

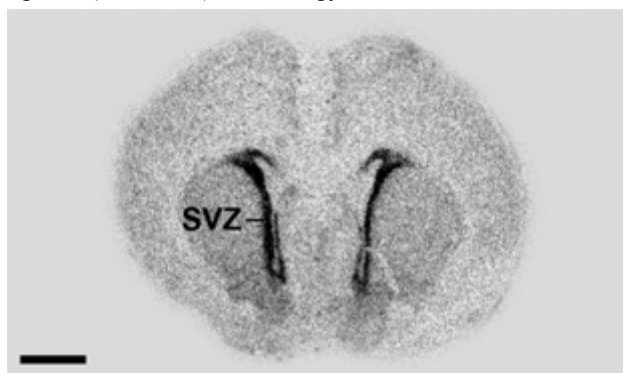
A módszer arra szolgál, hogy **radioaktív izotópokkal jelölt molekulákat** és ennek kapcsán a jelölődött szerveket vagy azok részleteit azonosítani tudjuk szövettani metszetekben vagy egésztest készítményekben, metszetanatómiai preparátumokban.

Egyik lehetőségként a radioaktív anyagot **intravénásan** juttatjuk a szervezetbe, ami így az élő állatban halmozódik fel valamely szervben. Az esetek más részében már a szervből megfelelő módszerrel készített szeletet vagy metszetet **inkubáljuk** a radioaktív anyagot tartalmazó oldatban. Mindkét módszer alkalmazásakor elegendő időt kell biztosítani ahhoz, hogy a célszervben a kimutathatósági küszöböt meghaladó mennyiségű sugárzó anyag halmozódjon fel. Ezután a metszetet (szeletet) sötétszobába visszük, ahol speciális filmre helyezük úgy, hogy a két réteg, azaz a metszet és a film ne mozdulhasson el egymáshoz képest. Ezután ezt a „szendvicset” fénymentesen becsomagoljuk,

⁶ <http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0027324?imageURI=info:doi/10.1371/journal.pone.0027324.g001>

és néhány napra jégszekrénybe helyezzük (expozíció). A hűtéssel megakadályozzuk, hogy a metszet bomlani kezdjen vagy sérüljön, a megfelelő expozíciós idővel pedig azt biztosítjuk, hogy az izotópot tartalmazó szervrészlet felett a film a radioaktív sugárzástól megfeketedjen. Mint ismeretes, a radioaktív sugárzás a fényhez hasonlóan a fotóemulzióban lévő ezüst-nitrátot ezüstté redukálja. Az expozíció lejártával a filmet előhívjuk: azokon a helyeken, ahol fém-ezüst keletkezett, fekete területek jelennek meg. A filmet, más néven **autoradiogramot** a megfestett metszetünkkel összevetjük, s a fekete területeket azonosítjuk.

Autoradiográfiát egész állatokból, elsősorban egerekből vagy patkányokból, illetve hasonló méretű állatokból is készíthetünk, pl. annak eldöntésére, hogy egy adott, jelzett vegyület a szervezet mely részében dúsul fel (pl. receptorok lokalizációjának meghatározása, 2.13. ábra), illetve raktározódik (metabolizmus vizsgálata). Radioaktív elemként ^3H -ot, foszforizotópokat (^{32}P és ^{33}P), ^{35}S -t, vagy ^{125}I -ot használhatunk.



2.13. ábra. Ingerületátvivő anyagot (neurotranszmittert) megkötő receptor kimutatása patkányembrióban: ahol a receptorok előfordulnak, ott a radioaktív ligandumok feldúsulnak (előagy, frontális metszet, SVZ: az oldalkamramenti /szubventrikuláris/ neurogén zóna)

Korróziós készítmények

E készítmények előállításánál a szervek vagy akár az egész test **érrendszerét**, **vezetékrendszerét** és egyéb **üregeit** mutatjuk ki úgy, hogy ezeket az üregeket testmeleg és alvadást gátló anyagot is tartalmazó fiziológiás sóoldattal **átmossuk**, majd – ha a mosófolyadék már vérmentes – az üregrendszert **feltöltjük** valamilyen színes (színezett), gyorsan polimerizálódó anyaggal. A megkötött töltőanyag megszilárdulását követően a lágyrészeket (lúgkezeléssel) eltávolítjuk. A **maratás** után visszamaradt töltőanyag megmutatja a feltöltött struktúra (pl. érrendszer) elágazásrendszerét. Az eljárás eredményeként kapott **korróziós preparátumot** lemosás, majd szárítás után, illetve folyadékban tartva vizsgálhatjuk (2.14. ábra).



2.14. ábra. Szívkoszorúér-rendszer korróziós készítményen: a jobb és bal oldali érrendszert más színű anyaggal töltötték fel

Az eljárás **mikrodimenziókban** is igen értékes információt ad, pl. a vese érrendszeréről, a glomeruluskapillárisok elrendeződéséről, vagy egy agyterület érrendszerének térbeli szerkezetéről. Ilyen esetekben a vizsgálat pásztázó elektronmikroszkóppal történik.

A módszert **teljes testi érrendszer** kimutatására és feltöltésére is alkalmazhatjuk. Ez esetben először az aortába vagy valamelyik nagyobb érbe, pl. a combartériába kanült kötünk, egyidejűleg megnyitunk egy vénát az elfolyás biztosítása érdekében. A kanülon keresztül alvadésgátló anyagot tartalmazó, testhőmérsékletű fiziológiás sóoldattal átmossuk a teljes érrendszert, egészen addig, amíg a mosófolyadékból az utolsó vérnyomok is eltűnnek. Ezután az érrendszerbe viszonylag gyorsan polimerizálódó színes, kék vagy piros műanyagot juttatunk attól függően, hogy a vénás vagy az artériás rendszert töltjük-e fel. Ezt követően az injektált és megkeményedett anyagról lúggal lemaratjuk a lágyrészeket, a visszamaradó „öntvényt” lemoszuk, megszáritjuk, és megvizsgáljuk vagy kiállítjuk. Az ilyen készítmények demonstrációs jellegűek, és az oktatást szolgálják.

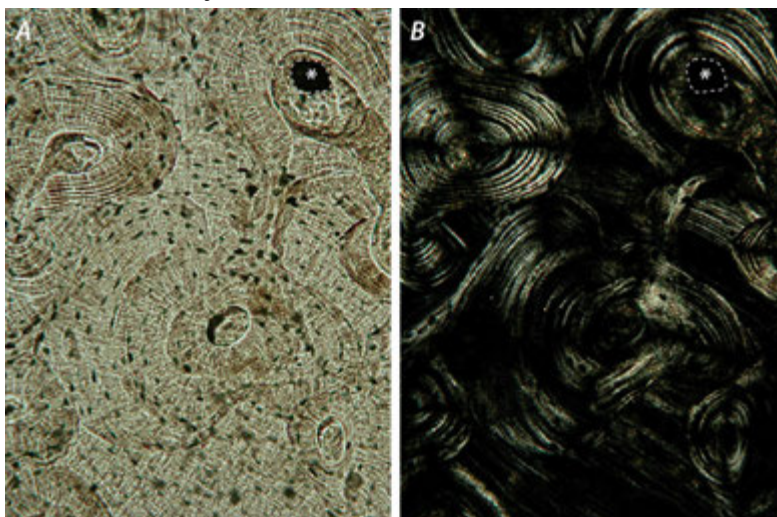
Vékonycsiszolatok, illetve felületi csiszolatok készítése

Az elmeszesedett szervek, illetve szervrészek és egyéb meszes, kemény struktúrák (pl. csontok, fogak, kristályok, fülkövek (*otholithok*), vese- vagy epekövek, megkövült élőlények) csak a szervesetlen anyagok eltávolítását követően (dekalcinálás) metszhetők és vizsgálhatók. A **dekalcinálással** (salétomsav, kelátok, pl. EDTA) a struktúra kialakításában fontos szervesetlen anyagokat eltávolítjuk, amelyek hiánya, illetve a kezelés megváltoztathatja az eredeti viszonyokat, s ez **műtermék** képződéséhez vezethet. Mindezen problémákat elkerülendő, ilyenkor csiszolatokat kell készítenünk. Tudatában kell lennünk azonban annak, hogy ezeken csak a szervesetlen komponensek tanulmányozhatók!

A csiszolandó anyagokat a csiszolás okozta erőteljes mechanikai hatásoktól **műgyantába ágyazással** védjük. A beágyazott anyagból közetvágó készülékkel **kb. 1 mm** vastagságú **korongokat vágunk**, amelyeket tárgylemezre ragasztunk.

A csiszoláshoz viszonylag durva, közepes, majd kis szemcse nagyságú krómdioxid port szórunk egy-egy üveglemezre, majd a krómdioxidot vízzel összekeverjük, tárgylemezre ragasztott anyagunkat pedig a krómdioxid felé fordítva egy elképzelt kör mentén körkörös mozgással vékonyítjuk. A legfinomabb szemcseméretű **csiszolóanyaggal** fejezzük be a vékonyítást. Ekkor az anyagnak már kb. 20 µm vastagságúnak és **átlátszónak** kell lennie. Legvégül a csiszolatunkat alumínium-oxiddal **polírozzuk**, majd fedőlemezrel lefedjük.

A készítményt fénymikroszkóppal és/vagy polarizációs mikroszkóppal vizsgáljuk (2.15. ábra). Az anyag felületét is tanulmányozhatjuk (elemi összetétel, mikroanalízis pásztázó, scanning (szkenning) elektronmikroszkóppal); ilyen esetekben természetesen nem fedjük le.



2.15. ábra. Csontcsiszolat ugyanazon területe fénymikroszkópban polarizációs szűrők nélkül (A) és keresztbe állított szűrőkkel (B). A képek jobb felső sarkában egy központi csatornát (fehér csillag) rajzoltunk körül (szagittált vonal)

Ismét hangsúlyozzuk, hogy a biológiai mintákból készített csiszolatok kiértékelésénél figyelembe kell venni azt, hogy azok **a szerves komponenseket már nem tartalmazzák**: a csontcsiszolatokban tehát magukat a csontsejteket nem láthatjuk, csak azokat a kamrácskákat (*lacunákat*), amelyek körülzárták őket! A vizsgálat céljának megfelelően tehát előzetesen kell eldöntenünk, hogy az adott anyag szerves vagy szervetlen komponenseit szeretnénk-e megőrizni.

Szövetteni preparátumok, metszetek készítése

A biológiai anyag előkészítésének általános menete

A megfelelő vékonyságú, mikroszkóppal átvilágítható minta előállítása érdekében a **célunk** egy jól „szeletelhető”, metszhető minta, ún. **blokk előállítása**. Az előkészítő eljárás főbb lépései és ezek céljai a következők:

1. Anyagpreparálás és rögzítés (fixálás): az élő anyag strukturális és kémiai stabilizálása. A szövetteni készítmények előállításához a szervet vagy szövetdarabot a szervezetből ki kell emelni, szerkezetét rögzítőszerrel vagy megfelelően kivitelezett fagyasztással meg kell őrizni, bomlását meg kell akadályozni.
2. Kimosás: a rögzítőszer eltávolítása vízzel vagy egyéb oldószerrel. Fagyasztott minta esetében természetesen ezt a lépést kihagyjuk.
3. Víztelenítés (dehidráció): a rögzítőszerrel fixált szövet víztartalmának vízelvonó szerekkel történő eltávolítása. Erre azért van szükség, mert a jó metszhetőséget biztosító beágyazószer általában nem vízdékonyak.
4. Beágyazás: a vizsgálandó anyag folyékony beágyazószerrel történő átitatása és a beágyazásra használt közeg kikeményítése, azaz blokk előállítása. Ennek mechanikai tulajdonságai már lehetővé teszik azt, hogy belőle megfelelő vékonyságú, átvilágítható preparátumot, metszetet készítsünk. **Fagyasztott minta** esetében a beágyazószer a sejtek, szövetek természetes közege, azaz maga a **víz**, amely megfelelő körülmények között lehűtve nem képez membránokat károsító jégkristályokat.
5. Metszetkészítés: a blokk felszeletelése a kiértékeléskor alkalmazott mikroszkóp fajtájának megfelelő vastagságban. A fagyasztott mintát is tudjuk metszeni.
6. Festés: a szövetelemek fény-, illetve elektronszórásbeli különbségeinek növelése. A fénymikroszkópos metszeteket ezután lefedjük, ami a hosszú eltarthatóságukat is biztosítja. Ritkán az elkészült metszeteket festés nélkül is vizsgálhatjuk.

A mikrotechnikai eljárás **kompromisszumok sorozata**, mivel a vizsgálandó anyag mindvégig olyan reagensekkel kerül közvetlen kontaktusba, amelyek valamilyen módon hatnak rá. Tökéletes, minden kíváncsúnak megfelelő rögzítő-, beágyazó- és víztelenítőszer nincsenek, ezért a végső cél érdekében az adott reagens néhány hátrányos tulajdonságával mindig meg kell alkudnunk. Az egész eljárást a vizsgálat céljának leginkább megfelelően kell alakítanunk, s az egyes lépések megtervezésénél nélkülözhetetlen a tapasztalati (irodalomban rögzített) adatok figyelembevétele.

A következő leírásunkban **a fénymikroszkópos szintű vizsgálatokhoz szükséges** alapvető ismereteket mutatjuk be. Felhívjuk a figyelmet arra, hogy az itt említésre kerülő vegyszerek és eljárások nem feltétlen alkalmasak olyan preparátumok készítésére, amelyeket a fénymikroszkópi felbontást meghaladó, ultrastrukturális szinten (elektronmikroszkóppal) kell kiértékelni (l. műtermékkel kapcsolatos fenti megjegyzés). Az ez irányú ismereteket az Elektronmikroszkópia című fejezetben foglaljuk össze.

A mintavétel és a rögzítés néhány szabálya

Szövetteni mintavétel történhet élő emberből és állatból, műtéti eljárásban (biopszia), vagy a halál beállta után, a tetem boncolásakor (autopszia). Az előkészítő munkálatok és a műtét során figyelniük kell arra, hogy az állatnak **feleslegesen ne okozzunk fájdalmat** vagy kellemetlenséget. A minden kutatótól elvárható empátián kívül ez azért is fontos, mert a rosszul tartott és nem kellő gondossággal megfogott, kezelt és táplált állatokban stresszreakció léphet fel, ami számos esetben torzíthatja a minta értékelhetőségét.

Figyelnünk kell arra is, hogy a kivételre kerülő szervet **minél gyorsabban** fixáljuk. A halál beálltával, vagy az adott szerv működésének megszűnte után pl. megváltozhat a mellékvesekéreg C-vitamin-tartalma, vagy egy izomszövetben az egyes rostok ATP-és ATP-áz-tartalma, illetve aktivitása, a szénhidrátok mennyisége stb.

A szerv eltávolításánál **ne fogjuk meg csipesszel** magát a vizsgálandó szervet (vagy ha ez elkerülhetetlen, igen óvatosan tegyük), mert ezzel annak roncsolódását okozhatjuk. Az a legjobb, ha a szerv körüli kötőszövetnél vagy az ereknél (l. felfüggesztések⁷) fogva mozgathatjuk anyagunkat.

Ne fixáljunk a kelleténél nagyobb tömegű szövetet! Ha szükséges, az adott szervből igen éles eszközzel vágjunk ki egy megfelelő nagyságú darabot, és ezt helyezzük a fixálóba. Ezzel megnyitjuk a szerv kötőszövetes tokját, amivel megkönnyítjük a rögzítőszer behatolását.

Végül ügyeljünk arra, hogy a **rögzítő mennyisége** sokszorosan haladja meg a fixált szerv térfogatát! Gondoljunk arra, hogy ellenkező esetben a szövetmintából kiáramló anyagok (pl. vér) jelentősen megváltoztatják a fixáló oldat összetételét és ezzel rontják a rögzítés minőségét (a rögzítőszer és a minta kölcsönösen hatnak egymásra).

A rögzítésnek a minta bomlását megakadályozó szerepén túl még az is fontos sajátossága, hogy megkeményíti a szervet vagy a szervrészletet, és így megkönnyíti a metszet készítését.

A rögzítéssel kapcsolatos tudnivalók

Rögzítő- vagy fixálószer

Már régóta alkalmazott és ma is az egyik legjobb fixálószer a **formaldehid** (formol, HCOH), amely a hangyasav (*acidum formicum*) aldehidje. A mintába gyorsan behatoló és csak kevésbé zsugorító formalint általában 4-5%-os vizes oldatként alkalmazzuk. Az izotóniás és puffertelt formalinban (**neutrális formalin**) a formalinoldathoz kálium-dihidrogenfoszfát és nátrium-hidrogenfoszfát keverékét tartalmazó puffert (l. Sörensen-puffer) adunk.

A rögzítőhöz adott **pufferoldatok** úgynevezett **hordozó oldatok**, amelyekkel az *in vivo* körülményeket (pH, ionösszetétel, ozmotikus viszonyok) igyekszünk utánozni, pótolni (zsugorodás, kioldódás, anyagvesztés megakadályozása). Alkalmazásuknak akkor van nagy jelentősége, amikor a vizsgált komponensek (pl. fehérjék) alakjának és aktivitásának megőrzése elsődleges szempont (l. immunhisztokémia és enzimhisztokémia), vagy kiértékelésünket ultrastrukturális szinten végezzük (l. elektronmikroszkópia).

Nagy **előnye** a formalinos rögzítésnek, hogy az optimális rögzítési időt túllépve sem történik baj, sőt évekig, évtizedekig formalinban tárolt anyagokból is jó minőségű fénymikroszkópos metszet készíthető.

Az **elektronmikroszkópos minták előkészítésére csak korlátozottan alkalmas**, mivel az általa létrehozott keresztkötések reverzibilisek, azaz a rögzítő kimosásakor jelentős részük felbomlik (ultrastrukturális szinten ez anyagok elmozdulását, kioldódását teszi lehetővé). A formaldehid további tulajdonságaira az elektronmikroszkópos technikák kapcsán térünk ki (l. később).

A formalin mérsékelten rákkeltő és egészségkárosító is, szaga szúrós és kellemetlen. Ezt a vele való munka során érdemes észben tartani.

Az **alkohol** ugyancsak jó rögzítőszer. Igen gyorsan penetrál, rövid időn belül átjárja a szervet, viszont erőteljes **vízfelvonó szer**, ezért zsugorítja a mintát. Leggyakrabban e célra **etanolt** (CH₃CH₂OH, EtOH) alkalmazzuk, de az **izopropil-alkohol** is megfelelő.

Megjegyezzük, hogy a szövettani technikában az alkohol volt az egyik első rögzítőszer; használatát Johann Christian Reil vezette be.

Rögzítőkeverékek

Tökéletes rögzítőszer nincsen, ezért manapság elsősorban rögzítőkeverékeket alkalmazzuk. Ebben az egyes komponensek előnyös sajátosságai összeadódnak, hátrányos tulajdonságaik pedig mérséklődnek.

⁷ A testüregekben a szerveket savós hártya által képzett felfüggesztések rögzítik a helyükön, illetve az ér- és idegrendszer is ezeken keresztül éri el a célszerveit.

A **Bouin⁸-keverék**, amely igen elterjedt és szép eredményt adó rögzítőszer, formalint, jégecet (tömény ecetsav) és pikrinsav-oldatot tartalmazó, az utóbbi komponens miatt sárga színű keverék. (Összetétele: 71% telített pikrinsav-oldat, 24% tömény formalinoldat és 5% jégecet, készítését l. a Függelékben). **Hátránya** többek között az, hogy a pikrinsavat ki kell mosni a mintából, ami idő- és oldószerigényes. A metszetekben visszamaradt pikrinsav festődési problémákat, egyenetlenségeket okoz. A rögzítőszer kimosása 80%-os alkohollal történik, amit mindaddig cserélünk a mintán, amíg az alkohol már nem sárgul el (ez rövid időközönkénti, sokszoros oldatcserét jelent). **Alternatív megoldásként** választhatjuk azt a lehetőséget, hogy a blokkban bennmaradt pikrinsav maradékot a beágyazás után, a festés előtt távolítjuk el a metszetekből. Ez anyag- és időtakarékos megoldás.

A **Carnoy⁹-keverék** (60% etanol, 30% kloroform és 10%-nyi jégecet; készítését l. a Függelékben) valamennyi komponense gyorsan penetrál, így a fixálási idő rövid, ami előnyös lehet. Ugyanakkor zsugorító hatású. Ennek ellenére egyes sejtalkotók, így pl. a sejtmagvak struktúrája Carnoy-rögzítés után nagyon szép. A rögzítőszert 80%-os alkohollal mossuk ki.

A rögzítés módjai

Egy adott szerv rögzítésekor nemcsak a fixálóoldat összetételét, hanem a rögzítés módját is meg kell határoznunk. Alapvetően két módszer közül választhatunk.

Az **immerziós fixálás** során a helyéről óvatosan **kiemelt szervet** a rögzítő **többszörös térfogatú oldatába** merítjük. Gondoskodnunk kell arról, hogy minden oldalról rögzítőszer vegye körül, azaz lehetőleg lebegjen a folyadéktérben, de ne ússzon annak felszínén. Egyes szervek esetében ez utóbbi elkerülése a szerv levegő tartalmának eltávolítását igényli. Ha ez nem lehetséges (pl. egy tüdő esetében), akkor egy nehéz, a rögzítőt tartalmazó edény aljára süllyedő tárgyhoz (pl. egy üveg dugóhoz) horgonyozhatjuk a szervet. A mintát lazán gézlapba csomagoljuk, a gézlap csúcsait összekötjük, majd ehhez rögzítjük megfelelő hosszúságú cérnával az üveg dugót.

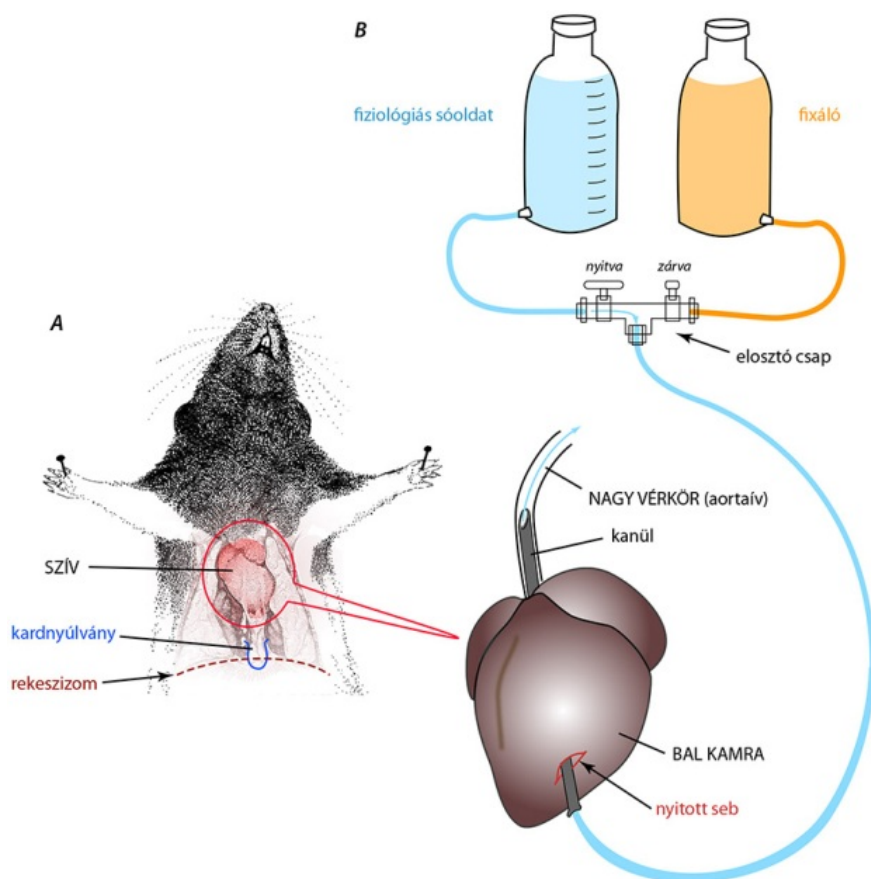
Az immerziós fixálás **előnye**, hogy nem igényel különösebb felszerelést. **Hátránya**, hogy a rögzítőoldat a rögzítés előrehaladtával egyre lassabban hatol be a mintába, hiszen a felszínt egyre jobban fixálja, annak átjárhatóságát ezzel önmaga számára is csökkenti. Számolnunk kell tehát azzal, hogy a felszíni rétegek jobb megtartásúak lesznek, mint a minta belseje. Nagyon fontos tehát a rögzítendő szervdarabka méretének megfelelő megválasztása!

A másik eljárás a **perfúziós fixálás**. Ennek során a rögzítőt a túlaltatott állat érrendszerébe juttatjuk, s annak közvetítésével „**belülről**” **fixáljuk a szervet**. Mivel szinte minden szerv tartalmaz ereket, az eljárást általánosan használhatjuk.

Az adott állat érrendszerének ismeretében és a szerv helyzetétől függően kiválasztunk egy megfelelő átmérőjű artériát, amelybe kanült vezetünk. Ha a fixálandó szerv a nagy vérkörhöz tartozik, akkor – egér vagy patkány esetében – a kanült legcélszerűbb a bal szívkamrába vezetni úgy, hogy annak hegye az aorta kezdetébe felérjen (2.16. ábra). A vénás rendszer megnyitása után fiziológiás sóoldattal átmoszuk az ereket, majd a kimosó oldatot lecseréljük a fixálóra. (Így a rögzített vér nem zárja el az ereket.) A folyadékok megfelelő sebességű áramoltatásáról vagy a folyadéktartályok adott magasságban való elhelyezésével (gravitációs mozgás), vagy egy perisztaltikus pumpa segítségével gondoskodhatunk. A megnyitott vénás rendszerből kicsöpögő folyadékok számára elvezetést biztosítunk.

⁸ ejtsd: buen

⁹ ejtsd: karnoá



2.16. ábra. Perfúziós fixálás vázlatrajza: az elaltatott állat mellkasát feltárjuk (A), a szívburkot felnyitjuk, a bal kamrán metszést ejtünk, amelyen keresztül a kanült bevezetjük az aortába (B)

Az eljárás akkor vezet szép eredményhez, ha a munkát a túlaltatást követően azonnal megkezdjük, lehetőleg akkor, amikor az állat szíve még működik, s a keringése még nem állt le. A perfúziót követően a **szervet óvatosan kiemeljük** a helyéről. Bár kevésbé sérülékeny, mint a fixálás előtt, de a fentebb említett szabályok betartására ekkor is szükség van!

A perfúziós eljárás **előnye**, hogy a szervet annak helyén rögzítjük, és azelőtt, mielőtt még hozzányúltunk volna. Ezzel nagymértékben csökkenthetjük a mechanikai roncsolásból adódó műtermékek képződését. Mivel a rögzítőszer az érrendszer felől érkezik a sejtekhez, s az érrendszer behálózta a szervet, a fixálás a szerv teljes területén azonnal megkezdődik, s nem kell számolnunk a gyengébb penetrációból adódó hátrányokkal (egyenetlen rögzítés).

A két eljárást kombinálhatjuk is: a **perfúziós rögzítést** követően alkalmazhatunk **immerziós utófixálást**. Ezt kifejezetten ajánljuk akkor, ha ultrastrukturális szinten vizsgálódunk (l. elektronmikroszkópia).

A rögzítés hőmérséklete

Rutincélokra és gyors eredmény szükségessége esetén kielégítő a **szobahőmérsékleten** végzett rögzítés.

Ha kíméletesebb eljárásra van szükség (pl. elektronmikroszkópos eljárásban vagy immunológiai módszer alkalmazása előtt), az immerziós rögzítést végezhetjük 4°C-on is. Ez ugyan meghosszabbítja a rögzítés idejét, de mivel lassítja a fixáló penetrációját, az abból adódó káros hatásokat (pl. zsugorodás) csökkenti. Megfelelő összetételű fixálókeveréket alkalmazva a minta hűtőszekrényben hosszabb ideig is eltartható a „túlfixálódás” veszélye nélkül.

A megfelelő ideig rögzített anyagból ezután **kimossuk a fixálószert**. Amennyiben a rögzítőkeverékben vizes oldatok szerepeltek, a kimosás történhet csapvízzel vagy 80%-os etanollal (fénymikroszkópos minta készítésekor), illetve a fixáló **hordozóoldataként** alkalmazott pufferoldattal (fény- és elektronmikroszkópos minták esetében egyaránt).

Metszetkészítés beágyazás nélkül

Fagyasztó mikrotommal készített metszetek

Ezzel az eszközzel általában puffert formalinban fixált szervekből szoktunk metszeteket készíteni. A vizsgálat célja a gyors diagnózis felállítása pl. műtétek közben kivett (biopsziás) anyagokból. Alkalmazhatjuk olyan komponensek kimutatása során is, amelyek a hagyományos, **beágyazással járó eljárások során kioldódnak vagy sérülnek**: ilyenek pl. a lipidek (membránok, membránkött molekulák vizsgálata) és enzimek (l. hisztokémiai eljárások).

A módszer előnye a paraffinos beágyazott anyagokból készített metszetekkel (lásd alább!) szemben az, hogy igen rövid időn belül hozzájuthatunk az eredményhez, a lipidek a metszetből nem oldódnak ki (l. víztelenítés), és az enzimek aktivitása is kevésbé sérül, mint a paraffinos beágyazási eljárás során (itt a víztelenítés és a magas hőmérséklet okoz problémát).

Az eljárás hátránya, hogy ezzel a módszerrel nem lehet olyan vékony metszeteket készíteni, mint egy beágyazott blokkból, és a festhetőség is korlátozottabb.

A metszés előtt a metszendő anyagból lassan áramló vezetéki vízzel **kimossuk a formalint**, majd a szervet a fagyasztó mikrotom tárgytartójára helyezzük, ami rendszerint egy **Peltier¹⁰-elem**. Ez az eszköz hőszállításra képes félvezetővel működő szerkezet, amely pl. fagyasztó mikrotom tárgyasztalkájáról a készüléken átáramló vízhez vezeti el a hőt, és ezzel a tárgyasztalt lehűti, és az azon lévő szervet pedig megfagyasztja. A metszésre szánt anyaghoz kevés vizet adunk, így a fagyasztást követően a mintánk jégbe fagy, mintegy beágyazódik. A víz a gyors lehűtésnek köszönhetően **folyadék állapotban fagy meg**, nem képez kristályokat, így nem roncsolja a sejteket.

Ezután megkezdhetjük a metszést. A késtartóba helyezett speciális, e célra készített késsel a metszetvastagságot kb. **10–15 µm**-re állítjuk, a kést közepes gyorsasággal mozgatjuk. A metszés közben a kés mozgatásával nem szabad megállni.

A metszet általában felcsúszik a kés felületére, ahonnan azt megnedvesített ecsettel szedjük le, majd pufferbe vagy desztillált vízbe helyezzük (l. 2.29. ábra). Kellő számú metszet összegyűjtése után a metszeteket ecsettel rakjuk tovább a soron következő vegyszerbe vagy festékoldatba. Az eljárás végeztével a metszeteket tárgylemezre helyezzük, majd pl. glicerinnel lecseppentve és fedőlemezrel lefedve vizsgáljuk (l. lefedés).

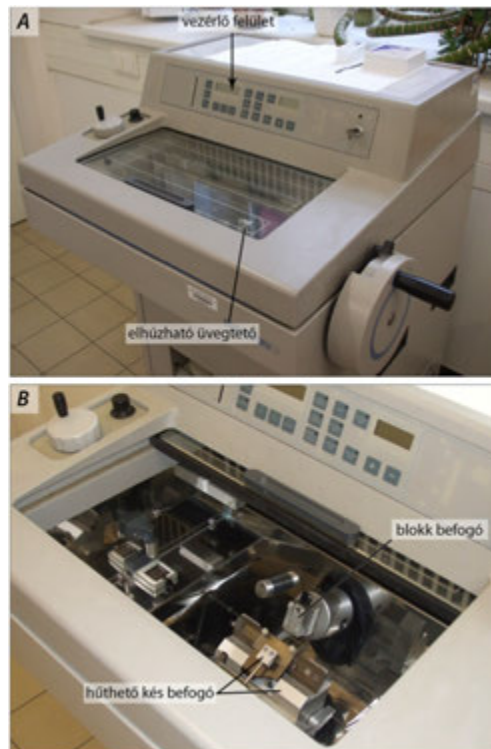
Ha **tartós készítmény** előállításra a cél, akkor felszálló alkoholsorozattal és xilollal víztelenítenünk kell. A víztelenített metszeteket tárgylemezre helyezzük, és kanadabalzsammal vagy valamilyen szintetikus lefedőszerezrel és fedőlemezrel fedjük (l. lefedés).

A fagyasztó mikrotom használatakor egy mélyfagyasztott (kb. -25 °C) szervet metszünk egy **szobahőmérsékletű késsel**. A fennálló **hőmérsékleti különbségből** adódóan kellő felbontást biztosító vékony metszet csak nehezen és bizonytalan eredménnyel készíthető. A problémát kriosztát használatával küszöbölhetjük ki.

A kriosztát vagy kriotom

A kriosztát egy **mélyhűtött térbe** (azaz mélyhűtőpultba) **helyezett mikrotom**, amelyet az eszköz oldalán elhelyezett forgatható kerék és a kezelőpanel gombjainak segítségével tudunk működtetni (2.17. ábra). A kriosztátban a **metszendő anyag és a kés egyforma hőmérsékletű**, így jó rögzítést követően rutinszerűen készíthetünk 5 µm vastagságú metszeteket is. A metszetek kezelése és a metszetkészítés céljai megegyeznek a fagyasztó mikrotomnál leírtakkal.

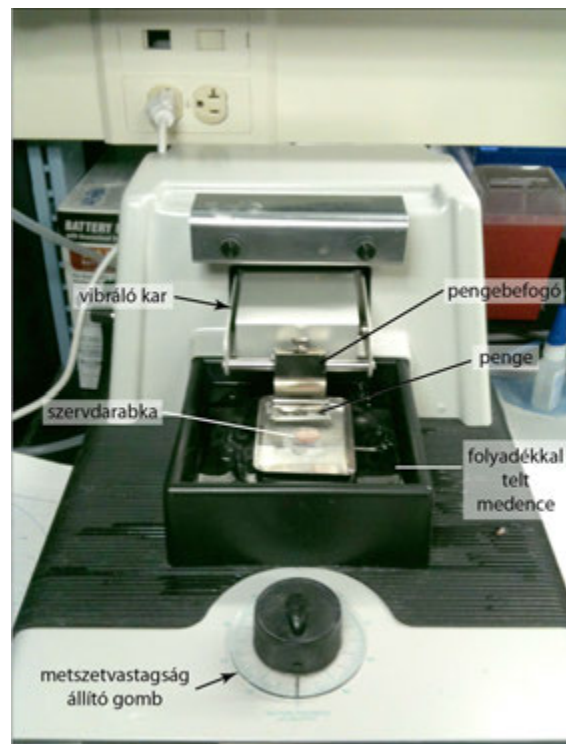
¹⁰ ejtsd: peltyié



2.17. ábra. Kriosztát: a berendezés külső oldalai (A) és beépített mikrotomja (B)

A vibratom vagy rezgőkéses mikrotom

Az eszköz **natív állapotú vagy fixált anyagok metszésére** szolgál. A metszendő anyagot pl. agaróz gélbe ágyazzuk, és így ragasztjuk fel a tárgytartóra, amely egy pufferral vagy desztillált vízzel megtöltött medencében foglal helyet, a folyadékszint alatt (2.18. ábra). A rezgő kés által leválasztott metszetek a folyadék tetején kisimulnak, festésig itt gyűjtjük össze őket.



2.18. ábra. Vibratom: a készülék kése egy Gillette-penge, amelynek befogóját egy rezgő karra erősítették. A metszendő szervdarabka és a penge a folyadékszint alatt vannak, a metszetek a folyadék felszínére úsznak fel

Az **eljárás előnyei** részben egyezők a fagyasztó mikrotomos technikáknál leírtakkal, azaz nem kell a szövetmintát vízteleníteni, a beágyazás során különböző vegyszerekkel átítatni és meleg (56 °C-os) paraffinba ágyazni. Ezért az eljárás jól használható hisztokémiai reakcióknál, immunfestéseknél, azaz ott, ahol a molekulák eredeti konformációjának megőrzése nélkülözhetetlen.

A **hátrányok** is hasonlóak a fagyasztó mikrotomos technikánál említettekkel, azaz a szabadon úszó metszetek kezelése kissé nehezebb, mintha azokat tárgylemezre „ragasztottuk” volna, illetve nem lehet olyan vékony metszeteket készíteni, mint egy beágyazott blokk esetében.

Megjegyzendő azonban, hogy a neuroanatómusok előszeretettel használják, mivel az így készített vastagabb metszetek alkalmasak arra, hogy egy idegsejt kapcsolatrendszerét áttekintsük, azaz kisebb **neuronális hálózatokat** egyben vizsgáljunk. A vastagabb metszetben a mikroszkóp mikrocsovarjának használatával (az élesség síkjának állításával) egy határig követhetjük az idegsejtek nyúlványainak lefutását, és meghatározhatjuk esetleges kapcsolataikat.

Metszetkészítés beágyazással

Ez a leggyakrabban alkalmazott szövettani technika, amellyel vékony, **3–10 µm vastagságú** metszetek készíthetők egyenként és sorozatban is. A metszetek festésére, az egyes komponensek kimutatására rendkívül sokféle módszer áll rendelkezésünkre. A metszetek korlátlan ideig tárolhatók, könnyen kezelhetők.

A beágyazás menete

A rögzítőszer kimosását követően anyagunkat **felszálló alkoholsorozatban** (50%, 70%, 80%, 90%, 96%-os és abszolút etanol) dehidráljuk. Elsősorban a beágyazandó anyag méreteitől függ, hogy mennyi ideig tartjuk szövetmintánkat ezekben az oldatokban. Ugyanakkor, ha a mintánk túl sokáig van alkoholban, akkor túlzottan megkeményedik, és metszése nehezebb lesz. Fontos, hogy az oldószerek térfogata a beágyazandó szerv térfogatának többszöröse legyen, másképpen az alkoholok kihígulnak.

Sürgős munka esetén, a rutinvizsgálatokra szánt mintáknál a víztelenítést elegendő 70%-os etanollal kezdeni. Ha az ütemezés úgy kívánja (pl. munkaszüneti napok miatt), a víztelenítési eljárásba hosszabb „pihenőt” is beiktathatunk, de a mintát csak a 70-80%-os alkoholban hagyhatjuk több napig állni.

Az utolsó, vízmentes etanolból anyagunkat többször váltott **benzolba**, **toluolba** vagy **metilbenzoát-celloidin** keverékbe helyezzük át. Minden egyes áttételnél az előző oldószert maradványait röviden leitatjuk. A fent említett szerek úgynevezett **intermedierek**, ami azt jelenti, hogy az abszolút alkohollal és a beágyazószerrel is problémamentesen elegyednek. Amennyiben a víztelenítés nem sikerült és az anyagban víz maradt, akkor az intermedier kissé megzavarosodik. A kezelések idejét elsősorban a szervdarabka mérete határozza meg. A leírásokban ajánlott időket érdemes pontosan betartani, hiszen ezen lépésekkel az a célunk, hogy az intermedier a mintát tökéletesen átítassa. Ugyanakkor az idő túlfutása az anyagot nagyon megkeményítheti (2.19. ábra).



2.19. ábra. Intermediérral átítatott minták (bal oldalon gyomor, jobb oldalon feldarabolt földigilisztá; a bal oldali szervet Bouin-fixálóval rögzítettük, s a víztelenítés előtt nem távolítottuk el teljes mértékben a pikrinsavat, aminek egy része beoldódott az intermediéerbe)

A **beágyazószer** alkalmasak arra, hogy a mintát **folyékony állapotukban átítassák**, s **megszilárdulva** annak metszéséhez megfelelő támasztékot adjanak. Ezek olyan anyagok tehát, amelyek magasabb hőmérsékleten megolvadnak, azaz folyadékok, lehűtve pedig megdermednek. A jó beágyazószerrel szemben követelmény, hogy megdermedéskor ne változzon a térfoga, azaz ne okozzon torzulást, s ne lépjen reakcióba a szövettel.

Régebben az általánosan használt beágyazószer a **méhviasszal kevert paraffin** volt: a méhviasz lágyította az önmagában rideg, törékeny paraffint. A laza szerkezetű szövetek azonban gyakran zsugorodnak a paraffin olvadáspontja (54–56 °C) körüli hőmérsékleten, s ennek kiküszöbölésére később azt celloidinbe keverték (l. az intermedierek között a metilbenzoát-celloidin keveréket). (Ha csak celloidinbe ágyoznánk a vizsgálandó anyagot, akkor nem tudnánk olyan vékony metszeteket készíteni, mint a paraffinos keverék esetén¹¹.)

Ma már a paraffin helyett **szintetikus utánzatokat** használnak, mint amilyen a Paraplast¹². Mivel lényegileg paraffin, a köznap szóhasználatban gyakran nevezik paraffinnak (a két elnevezés csereszabatos).

A rutin eljárás során a beágyazást tehát 56°C-os **termosztátban** végezzük. Az intermediérből kivett szervet – a megfelelő idők betartásával – az **intermediér–beágyazószer 2:1, majd 1:1, és végül 1:2 arányú keverékébe** tesszük, s a termosztátban tartjuk.

Ezután a mintát meleg, termosztátban tartott csipesszel a tiszta beágyazószeret tartalmazó edénybe helyezzük. Ez az ún. 1. számú, más néven **előparaffin/előparaplast**. A mintában még jelenlévő intermediér kiáramlik a beágyazószerbe, azaz eltávozik a szervből. A második, ún. **kiöntőparaffinba/paraplastba** így már olyan anyag kerül, amely nyomokban sem tartalmaz intermediért (2.20. ábra).



2.20. ábra. A beágyazáshoz termosztátban előkészített oldatok és eszközök

Amennyiben visszagondolunk a leírtakra, akkor láthatjuk, hogy az eljárás során a mintában lévő vizet vagy vizes oldatokat fokozatosan alkoholra, majd az alkoholt intermediérré, végül az intermediért beágyazószerre cseréltük ki. A végeredmény egy olyan szerv, illetve szervrészlet, amelynek minden kis tere kitöltődött a beágyazószerrel.

A még olvadt kiöntőparaffinban lévő szervet meleg csipesszel eligazítjuk, a későbbi metszésre gondolva kellő helyzetbe állítjuk (**orientáljuk**) azért, hogy a metszés síkját egyértelműen meg tudjuk határozni. Ezután az edényt kiemelve a termosztátból, és jégkockás vízfürdőben, vagy mélyhűtőpultban **gyorsan lehűtjük**, megdermesztjük. A megolvadt kiöntőparaffint célszerű olyan műanyag sablonokban, vagy porceláncsészében tartani, amelyekből majd a fagyott, dermedt paraffinblokkot könnyedén el lehet távolítani. A hűtés hatására a paraplastblokk felszíne elválik a kiöntőformától, így abból könnyen **kiütögethető**. A kiesett formából a felesleget le kell faragni, hiszen a beágyazott anyag valahol annak belsejében van. Gyakori, hogy egy kiöntőformába egyidejűleg több mintát is beágyazunk, így ezeket most önálló blokkokká kell alakítanunk. A beágyazószer feleslegét késsel vagy szikével távolíthatjuk el úgy, hogy közben a szervdarabkát magába foglaló anyagból hasábot formálunk. Ez a beágyazott mintát tartalmazó **blokk**.

¹¹ Ez is egy példa arra, hogy a mintaelőkészítés során kompromisszumokra van szükség.

¹² ejtsd: paraplast

Végezetül a paraffinblokkot olvadt paraffincseppel felragasztjuk egy fakockára (2.21. ábra), amit ezután befoghatunk a mikrotom tárgybefogójába. Ezzel anyagunk metszésre készen áll.



2.21. ábra. Fakockára ragasztott parafaszabványblokkok: a bal oldali blokk felszínén látszik, hogy ebből már metszet is készült (a szervek Bouin-fixálóból visszamaradt pikrinsav miatt sárgák)

Automatizált beágyazás

Ahol nagy mennyiségű mintát kell feldolgozni, és fontos a gyorsaság is (l. diagnosztika), ott a víztelenítést és a beágyazást automata vagy félautomata gépekkel végzik.

A **víztelenítőberendezésekben** olyan tartályok helyezhetők el, amelyekben nagy mennyiségű minta kezelhető egyszerre (2.22. ábra). Annak érdekében, hogy ezeket meg lehessen különböztetni, a szervdarabokat (biopsziás mintákat) kis kazettákba helyezik, amelyekre az azonosító adataikat is ráírják (2.23. ábra). A kazettákat kosarakba teszik, majd ezt az első tartályba helyezik. A gépek programozhatók, a mintatartó kosarakat automatikusan töltik fel a víztelenítés során használt oldatokkal, s megadott idő elteltével önállóan helyezik át azokat egyik tartályból a másikba. A sor végén a tiszta beágyazószerrel feltöltött tartály áll, amelyből az azzal átitatott szerveket tartalmazó kazettákat kiveszik és termosztátba helyezik.



2.22. ábra. Víztelenítőautomaták: régebbi (A) és újabb (B) típus

A beágyazás itt is kézi munka. A beágyazógépekben van egy folyékony beágyazószerrel tartalmazó tartály, amelyből egy kis csap lóg a munkaterület fölé. A csapot gombnyomással kinyitjuk, s egy megfelelő méretű, fém beágyazótálkát félig megtöltünk beágyazószerrel. A mintatartó kazettát felnyitjuk, a tetejét eldobjuk, majd a szervdarabkát csipesszel óvatosan átemeljük a folyékony beágyazószerbe. Ekkor van lehetőség a minta orientálására, amit csipesszel végzünk. Ezután a mintatartó kazetta azonosító adatokat hordozó alját ráfordítjuk a fém beágyazótálkára, azaz a mintára, s teljesen feltöltjük a kis tálkát a beágyazószerrel.



2.23. ábra. Beágyazógép munkapadja: a beágyazás kezdetén a fém beágyazótálka félig víztiszta beágyazószerrel töltött, s éppen a minta kazettából való kiemelését látjuk

A kész blokkot a gép munkapadján kialakított hűtött felületre helyezzük, ahol az hirtelen lehűl, így a blokk a fémtálkából könnyen kifordíthatóvá válik. A kész, beágyazott blokk azonosítható, hiszen az egyik oldalán ottmarad az azonosító jeleket hordozó félkazetta (2.24. ábra). Mivel ez nagyobb, mint a fémtálka, alkalmas arra is, hogy a fakocka szerepét betöltsse, azaz rögzíthető egy mikrotom blokkbefogójába (2.25. és 2.26. ábra). A fémtálka leemelése után a kazettát a talpára állítva látható, hogy ebben az esetben nincs szükség a blokk befaragására, mivel a beágyazott minta a tálka alakjának megfelelő csonka piramis belsejében van.



2.24. ábra. Automata géppel beágyazott minták: a blokkok alján a mintatartó kazetta alja látható (az azonosítószámok a hátsó oldalon), a tetejükön a mintákat magukba foglaló, a fémtálka alakjának megfelelő kiemelkedések (a fekete jelölések utólag megjelölt minták)

A mikrotomok és a metszés

A mikrotomok fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatokra alkalmas metszetek készítésére kifejlesztett eszközök.

Az első mikrotomot Purkinje¹³, kiváló cseh tudós alkalmazta még a XIX. században. Ez idő előtt a kutatók általában alkoholban keményített anyagot metszettek az akkori idők legelősebb eszközeivel, borotvával. Ezek a metszetek változó vastagságúak és minőségűek voltak. A mikrotomok bevezetésével a metszetkészítésnek ez a mozzanata óriási javult, ezzel együtt és ezért is megindult a festési eljárásokat forradalmasító kutatás is. Az első sorozatban gyártott mikrotomokat a Reichert cég készítette Ausztriában.

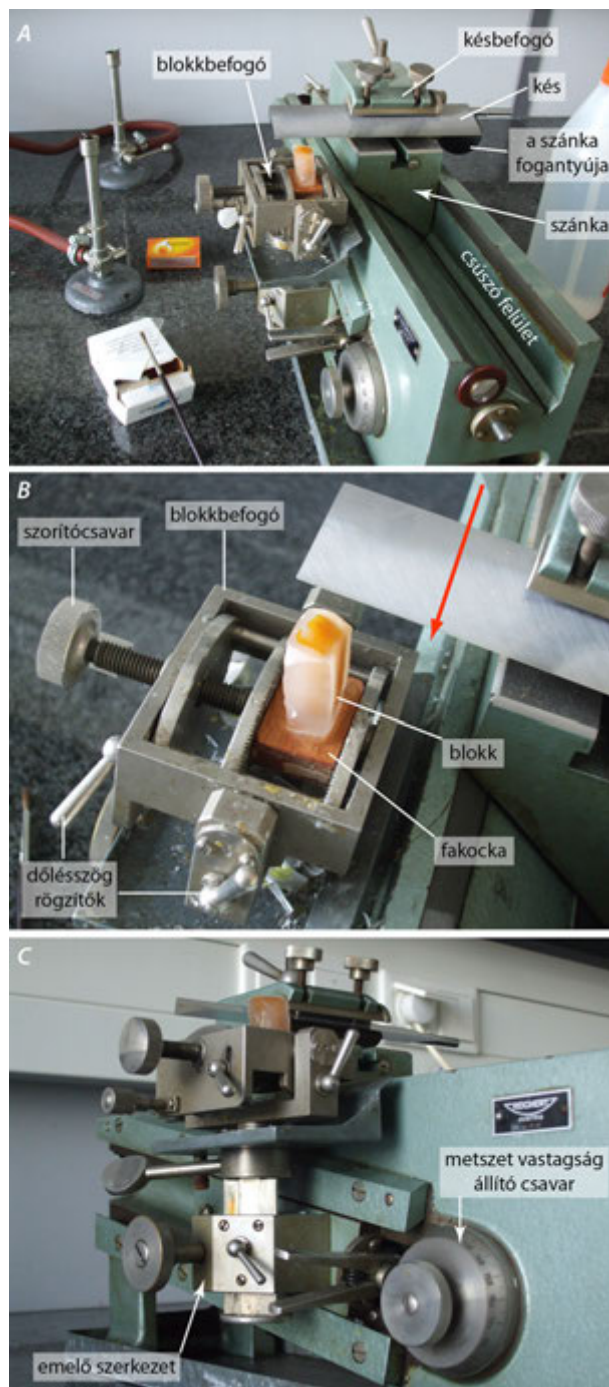
A mikrotom két alapváltozata a szánka- és a kerek (Minot-féle) mikrotom. Míg a **fénymikroszkópos vizsgálatokra** beágyazott, **3–10 µm vastagságú metszetek** készítésére mindkét típust használják, addig az elektronmikroszkópos technikában, az ún. ultravékony metszetek készítésére csak az utóbbi típus terjedt el (l.

¹³ L. Purkinje-sejt a kisagyban.

ultramikrotom). A paraplasztos metszetek kézzel is készíthetők, az ultravékony metszetek készítése azonban már automatizálást igényel.

A szánkamikrotom

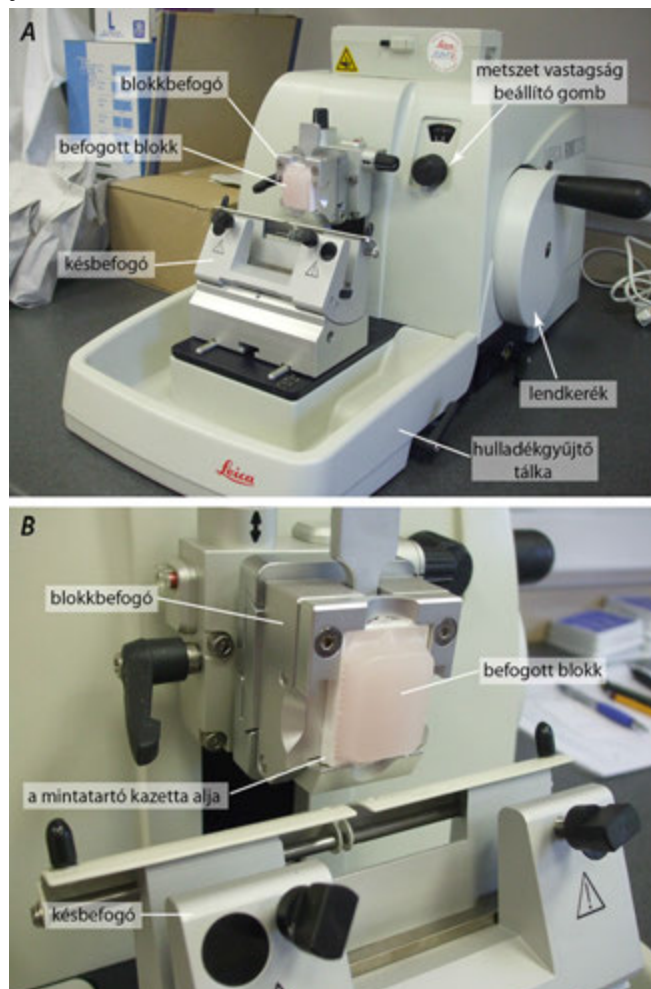
Ennek a mikrotomnak az alsó részében egy igen simára megmunkált és olajozott, hosszukás **csúszófelület** van. Az ebbe illeszkedő **szánka** ezen a felületen csúszik el. A szánka a rászert **késtartóval** együtt fogantyúján keresztül **mozgatható** (2.25.A ábra). Az alsó részre van felszerelve a fakockára felragasztott paraffinblokk befogására alkalmas **tárgytartó**, amelyhez mikronnyi léptékkel működő **emelőszerkezet** tartozik (2.25.A–C ábra). Amikor a szánkát alaphelyzetbe, azaz magunktól ütközésig eltoljuk, az emelőszerkezet a tárgytartót a beállított mértékben és értékkel megemeli (2.25.C ábra). A szánka magunk felé húzásával a kés a paraffinblokkba hatolva elkészíti a metszetet.



2.25. ábra. Szánkamikrotom: a kés mozgásának irányát a metszet lehúzása közben a B ábrán piros nyíl jelzi

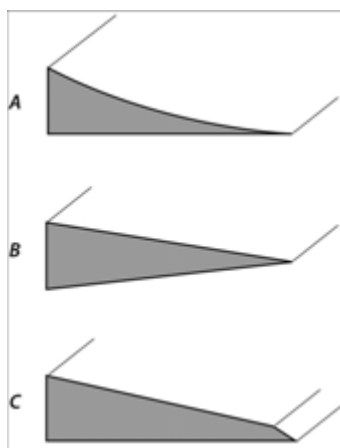
A kerekas vagy rotációs mikrotom

A szánkamikrotommal ellentétben ezekben a berendezésekben **a kés áll**, és a **tárgytartó mozog** a hozzá rögzített blokkal együtt. A metszés során egy kerék hajtásával idézzük elő a tárgytartó le és felfelé történő mozgását, és így készítjük a metszeteket (2.26. ábra). Ez a mikrotomtípus különösen alkalmas sorozatmetszetek készítésére, de csak akkor, ha a beágyazásunk jól sikerült.



2.26. ábra. Modern kerekas mikrotom: a késbefogó még üres, de a blokkot már rögzítették a metszéshez: utóbbin látszik, hogy automatával végzett beágyazás során készült, hiszen a blokkbefogóba a mintatartó kazetta alja rögzül (az A ábrán látható, hogy a késbefogó felénk néző oldalán beosztás van, tehát az dönthető)

A mikrotomokhoz használt kések (**mikrotomkések**) élei különböző kialakításúak – annak megfelelően választunk közülük, hogy milyen tulajdonságú blokkot (beágyazott anyagot) kell metszenünk (2.27. ábra).

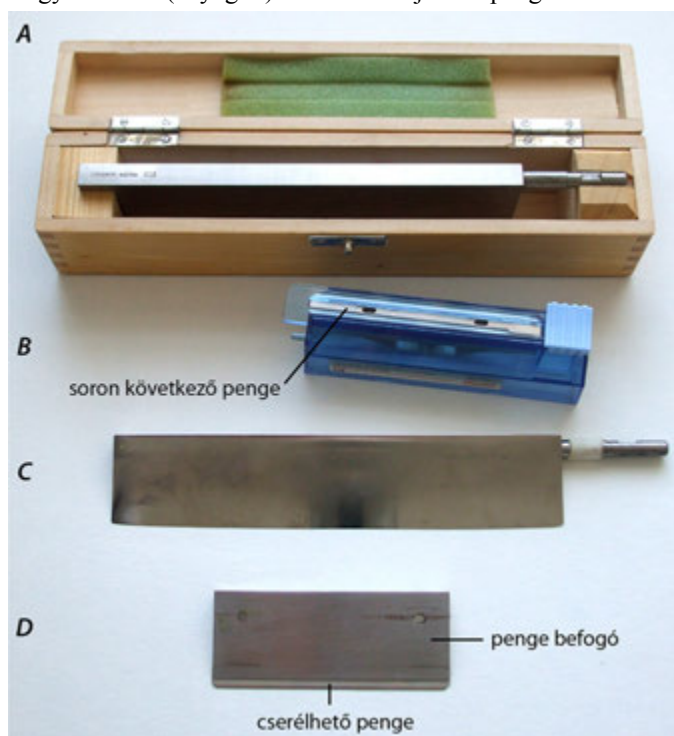


2.27. ábra. Mikrotomkések különböző késprofiljai

A mikrotomkéseket a számukra gyártott dobozban tartjuk (2.28.A ábra), s csak a metszés idejére vesszük elő. Rendkívül élesek, nagyon komoly sérülést okozhatnak! A velük való mindenfajta tevékenység nagy figyelmet igényel!

A metszés során a kések éle kopik, illetve sérül, ami a metszetek roncsolódásához vezet. Ha azt tapasztaljuk, hogy a kés csíkot húz a metszeten, akkor azt újra kell éleztetni (2.51. ábra). Ezt a feladatot csak erre képzett szakemberre bízunk!

Manapság általában **cserélhető pengékkel** dolgozunk, amelyeket egy mikrotomkést utánzó befogóba rögzítünk, így az gond nélkül beilleszthető a mikrotom késbefogójába (2.26. ábra). Amikor ez a penge tönkrement, lecseréljük. A blokkok mechanikai tulajdonságainak megfelelően különböző pengék kaphatók, így választhatunk a kemény, a közepesen kemény és a lágy blokkok (anyagok) metszésére ajánlott pengék közül.



2.28. ábra. Mikrotomkések (A, C) és cserélhető pengék (B, D): mikrotomkés dobozban (A) és szabadon (C), cserélhető pengék adagolódobozban (B), és egy cserélhető penge a hozzá tartozó, kést utánzó befogóban (D)

A metszés kivitelezése hasonló ahhoz, amit a fagyasztó mikrotomos metszésnél már leírtunk. **A blokkot a kés síkjához igazítjuk** a beállítócsavarok és szorítók segítségével, s ellenőrizzük, hogy a metszendő anyag felszíne a

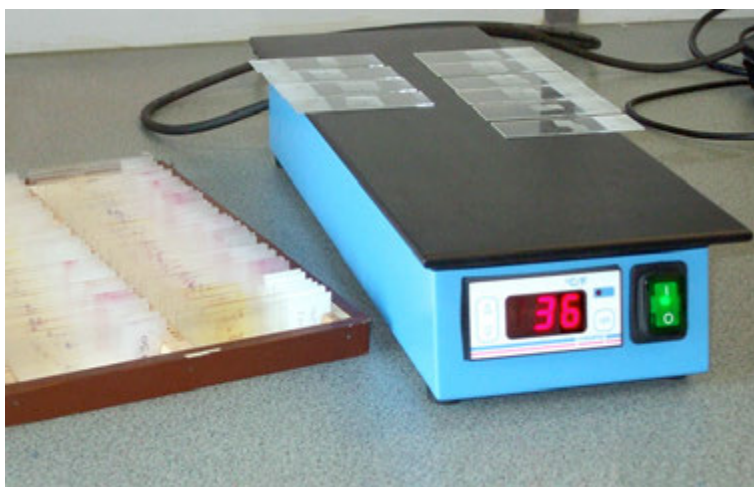
kés pengéjével párhuzamosan áll-e. A késsel óvatosan közelítjük meg a blokkot, majd egy nem gyors, de határozott mozdulattal, megállás nélkül lemetsszük az anyagot. Ha az első metszet nem tartalmazza az egész blokkot, akkor igazítunk a blokk pozícióján. Az anyag mechanikai tulajdonságainak megfelelően állíthatunk a kés dőlésszögén is (2.26.A ábra).

A metszet rendszerint felcsúszik a kés felszínére. Ezt célszerű a metszet lehúzása közben finom, megnevedesített ecsettel segítenünk (2.29. ábra).



2.29. ábra. Metszés közben a metszet felcsúszik a kés felszínére, ahonnan ecsettel lehet óvatosan leemelni

A kés felszínéről **leemelt metszetet** ezután annak tapadását növelő anyaggal, pl. tojásfehérje glicerinnel bekenet, vagy **polilizinnel**¹⁴ bevont tárgylemezre cseppentett desztillált vízre helyezzük. Ezen a metszet kiterül, de kisebb-nagyobb gyűrődések még maradhatnak benne. Ezért a tárgylemezt egy kb. 30 °C-os melegítőlapra helyezzük, ahol a metszet gyűrődései kisimulnak, egyben a víz elpárolog, a metszet pedig rögzül a tárgylemez felületére (2.30. ábra).



2.30. ábra. Az elkészült metszetek melegítőasztalon száradnak

Amikor **sorozatmetszeteket** kell készíteni, azaz egy tárgylemezre több egymást követő metszetet is fel kell vinni, akkor az egymás után lemetezett metszeteket nem választjuk szét. Ezek szomszédos élükkel összetapadnak, így egy egységben le is emelhetők a késről (2.31. ábra).

¹⁴ A polilizin fehérje polimer, amely nagyon sok pozitív töltést hordoz, bevonata segíti a metszetek megtapadását.



2.31. ábra. Összetapadt sorozatmetszetek a kés felszínén

Kisimításukhoz vízfürdőt használunk: a meleg víz tetejére helyezett metszetek adott időn belül szépen kinyújtóznak. Tárgylemezre úgy telepíthetők, hogy a lemezzel alájuk nyúlunk, az egyik sorvégi metszetet ecsettel a tárgylemezhez szorítjuk, majd a sorozatot óvatosan kiemeljük a vízből (2.32. ábra).



2.32. ábra. A sorozatmetszetek vízfürdő segítségével húzhatók fel egy tárgylemezre

Az **azonosíthatóság** miatt fontos, hogy kóddal vagy írással minden egyes tárgylemezt megjelöljünk. Az adatoknak tartalmazniuk kell azt, hogy a tárgylemezen milyen szervek miféle metszetei (metszési sík) találhatóak, esetleg dátummal együtt. A manapság forgalomban lévő tárgylemezeken – a lemez egyik végén – maratással erre megfelelő helyet alakítanak ki. Arra azonban figyeljünk, hogy **olyan írószert használjunk** (pl. gyémánt hegyű ceruza), aminek nyomát a későbbi (alkoholos) kezelések nem mossák le, illetve hogy a tárgylemeznek a metszettel azonos oldalára írjunk (ezzel megelőzhetjük a metszet letörlését akkor, amikor az szabad szemmel nem látható)!

Metszeteinket a szárítást követően lehetőleg számozott helyekkel rendelkező **metszettartó dobozokba** helyezzük, és festésig itt tartjuk őket, nehogy beporosodjanak.

A szövettani metszetek festése

A szövettani festékek olyan anyagok, amelyek **különböző mértékben kötődnek a sejtek, illetve szövetek egyes komponenseihez**. Vannak közöttük olyanok, amelyek a szövetek szinte minden eleméhez kötődnek, igaz, nem azonos intenzitással jelölik azokat. Az ilyen festékeket **általános tájékozódásra** használhatjuk. A festékek másik csoportja **specifikusan** csak egy-egy összetevőhöz **kötődik**, így annak kimutatására használhatjuk.

Általában nem egy, hanem több festékkal festünk egy metszetet. A festékeket használhatjuk keverékben (anilinkék+orange-G az Azan-festésben) vagy egymás után (pl. hematoxin-eozin festés).

A festék mutathatja a saját színét: a jelenség neve **ortokromázia**. Előfordulhat azonban, hogy más színben látjuk viszont a metszeten: ez a **metakromázia** (pl. az anilinkék kék szín helyett zöldre festi a rugalmas rostokat).

A **festés típusa** lehet **progresszív**, amikor a festődést a festés idejével szabályozzuk. A **regresszív festés** esetében a festékekkel túlfestjük a metszetet, azaz azt telítjük vele, majd utána a nem kötődő felesleget egy megfelelő oldószerral kimossuk, eltávolítjuk.

A szövettani metszetek festése e célra szolgáló sima vagy (a tárgylemezek összetapadásának megakadályozása miatt) bordázott belső felületű üvegedényekben, úgynevezett **küvetákban** történik (2.33. ábra). A festendő metszetek számának és a rendelkezésre álló oldatok mennyiségének megfelelően választunk közülük. Bármelyiket használjuk is, mindig figyeljünk arra, hogy az egymás mellé állított tárgylemezeknek az azonos oldalán legyenek a metszetek (azonos orientáció), illetve hogy az így sorakozó, szomszédos lemezek ne tapadjanak össze!



2.33. ábra. Álló és fekvő üveg, valamint tárgylemeztartó betéttel rendelkező műanyag küvetta

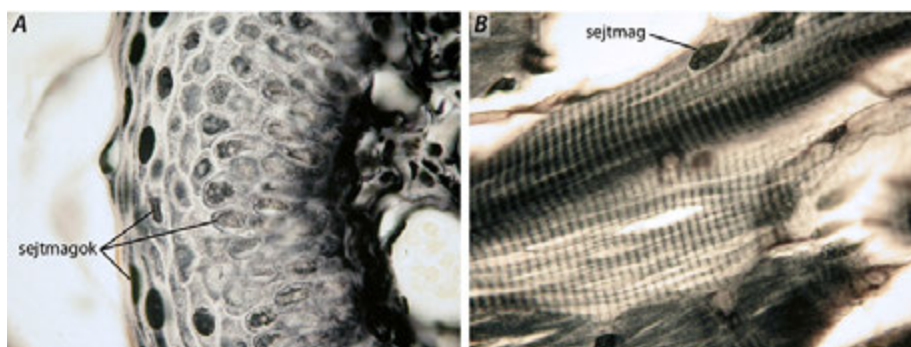
A hematoxin-eozin festés

Ez a legrégebbi szövettani festési eljárások egyike, egyben a legjobb és a legszélesebb körben használt módszer, mivel **teljes áttekintést ad** a metszetről. Több változata ismert (l. Függelék). Az eljárással kitűnően festődnek a sejtmagvak és a citoplazma, és számos granuláció is feltűnik. Valamennyi általánosan használt rögzítőszer után alkalmazható.

A paraffinos metszeteket első lépésként kétszer váltott xilolban **deparaffináljuk**, majd **leszálló alkoholsorozatban** (abszolút etanol, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%-os etanol) egészen desztillált vízig visszük el. A desztillált vizes küvetából alkoholos, kissé savanyított hematoxin (*haematoxylin*) oldatba tesszük át metszetünket, amivel magfestést végzünk.

*A hematoxilint a borsövényfa vagy kékfa (*Haematoxylum campechianum*) nevű növényből állítják elő. A mikrotechnikában az oldatnak több változata is ismert (pl. hemalaun, vas-hematoxin), amelyek alapvetően a festékanyaghoz kevert fém sókban (aluminium vagy vas) térnek el egymástól¹⁵ (l. Függelék). A metszeten adott színükben és esetleg a festés jellegében is eltérőek (l. pl. vas-hematoxin, 2.34. és 2.35. ábra).*

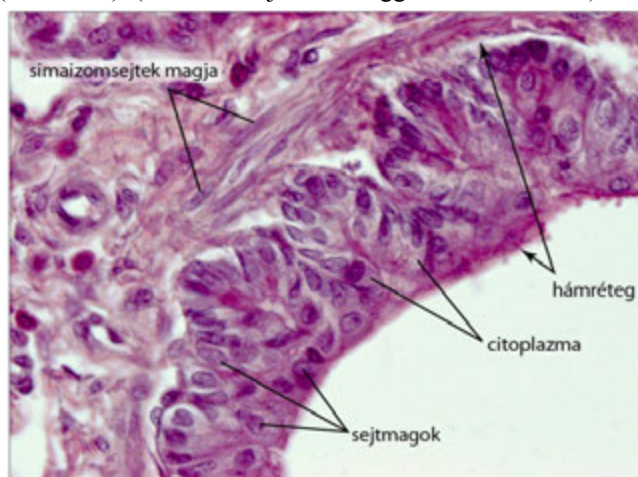
¹⁵ A hematoxilint oxidálni kell, ezért keverik fém sókkal.



2.34. ábra. Vas-hematoxilinnel festett metszet: hámréteg (A) és harántcsíkolt vázizomszövet (B)

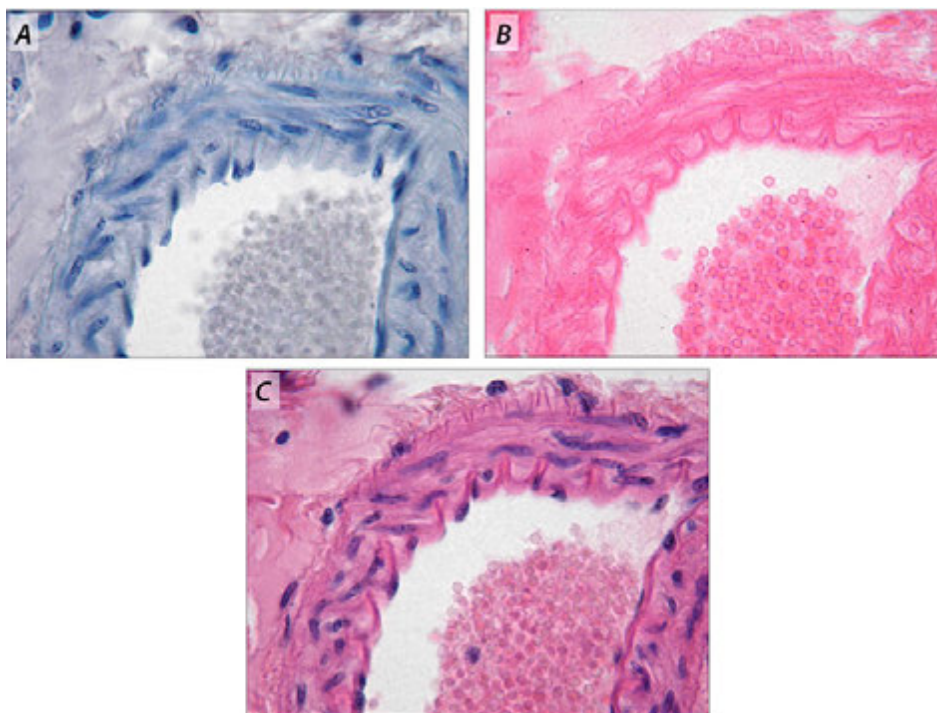
A festés után a metszetünkben **desztillált vízzel kimossuk** a felesleges festéket, majd küvétával együtt rövid időre **csapvízbe** helyezzük. A csapvízben lévő szervetlen anyagok hatására **a sejtmagvak szép kékeslilára színeződnek**.

Ezután újabb desztillált vizes öblítés, majd **eoziinfestés** következik. Az eozint vízben és alkoholban is oldhatjuk. A keramikusok által is gyakran használt eozin (*eosin*, magyarul: hajnalpír) a citoplazmát pirosas színben tünteti fel, de kötődik az extracelluláris térben lévő kollagénnel is. A felesleges festéket az alkalmazott eljárástól függően vagy desztillált vízzel, vagy alkohollal kimossuk (a használt oldat típusa attól függ, hogy az eozint vizes vagy alkoholos oldatként használtuk-e), végül felszálló alkoholsorozatban víztelenítünk. Ezután kétszer váltott xilol következik, majd a metszetet a küvétából kivéve kanadabalzsammal, vagy valamilyen szintetikus lefedőszerral és fedőlemezzel lefedjük (2.35. ábra). (Részletes eljárást a Függelékben közlünk.)



2.35. ábra. A hematoxin-eozin festés végeredménye: a sejtmagok liláskékek, a citoplazma és a sejtközi állomány komponensei rózsaszínek-pirosak (emlős tüdő, *bronchiolus*)

Megjegyezzük, hogy mindkét festék általános festék, azaz a sejtmagokhoz és a citoplazmához is kötődnek. Ha megnézzük a metszetet a hematoxilinfestés után, vagy csak eozinnal festjük meg, akkor ez nyilvánvaló. A két festék kombinációja azonban mégis egymást kiegészítő képet ad: a hematoxin a nukleinsavakban (sejtmagok, DER), az eozin pedig a fehérjékben gazdag területeket jelöli jobban (2.36. ábra).



2.36. ábra. Párhuzamos metszetek festődése hematoxilinnal (A), eozinnal (B) és a két festék együttes alkalmazásával (C) (emlős, izmos falú kisartéria)

Az **eozinofil** kifejezés azt jelenti, hogy az adott struktúra erősen köti az eozint: ez arra utal, hogy fehérjében gazdag. Minél nagyobb tehát egy sejt citoplazmájának fehérjetartalma, annál intenzívebben festődik eozinnal. Fordítva, ha egy sejt citoplazmatere alig tartalmaz fehérjét, akkor az a sejt alig festődik, a mikroszkópban ezért világosnak látjuk. A jelenség jól látható, ha pl. fehérje- és nyálkatermelő mirigysejtek állományát hasonlítjuk össze (2.37. ábra).



2.37. ábra. Összetett nyálmirigy részlete: a sötétebben festődő sejtek fehérjetartalmú, a világos citoplazmájúak pedig nyálkatartalmú váladékot halmoznak fel a citoplazmájukban (a metszeten mütermékképződés is látható, pl. szakadások formájában)

Az Azan-festés

Az **Azan** egy rövidítés, és a festék két fő komponensére: az **azokárminra** és az **anilinkékre** utal.

A módszer **élénk kék** színben tünteti fel a **kötőszöveti alapállományt** és a **kollagénrostokat**, valamint egyes nyálkaanyagokat (ezekhez az anilinkék kötődik), továbbá rózsaszínre festi a sejtek citoplazmáját és vörösre a sejtmagvakat (ez utóbbiakat az azokármín festi, 2.38. ábra).

A festés során még egy harmadik festéket is alkalmaz(hat)unk: ekkor a festést **trikróm** (három színnel való¹⁶) **festésnek** nevezzük. Az Azan-festés esetében a leggyakrabban ez az **orange-G** festékkoldat, amelyet az anilinkékkel keverünk össze (a keverék neve Mallory-oldat). Az **orange-G narancssárgára festi** az emlősök vörövértsejtjeit.

A dehidráció lépéseit nem ismételjük meg, a többi vegyszerezés kezelés áttekintése és a lépések magyarázata meghaladja ezen anyag kereteit (l. Függelék). Az azonban megjegyzendő, hogy ez a festés **kötőszöveti állományok általános kimutatására használatos**.



2.38. ábra. Azan-festés eredménye: a kötőszövet és a porcszövet kék, a sejtmagok vörösek, a sejtek citoplazmája piros (törpeharsa kopoltyúja, kopoltyúlemez a kopoltyúsugárral)

A toluidinkék festés

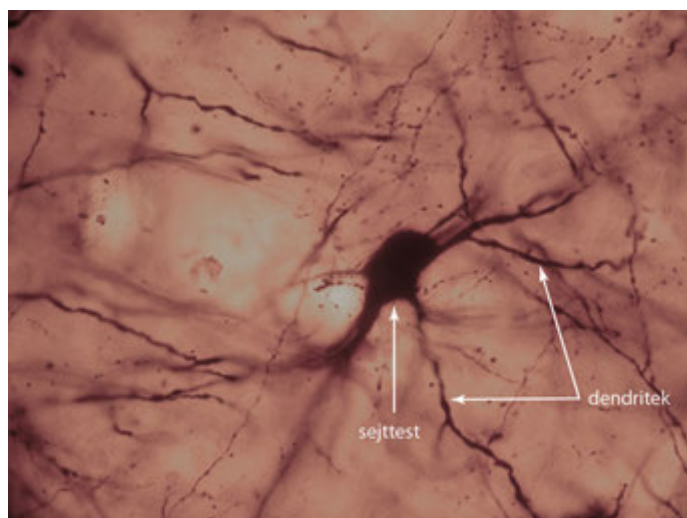
*Ez egy egyszerű, de hasznos festési módszer, amelyet formalinban végzett fixálást követően alkalmazunk. A festékkoldat **toluidinkéket tartalmazó alkoholos oldat**. A metszet festődése sokszor **metakromáziát** mutat, ami egy porcszövet esetében azt jelenti, hogy az interterritoriális állomány zöldeskék, a porcudvarok mélykékek, a porcsejtek liláskékek lesznek, azaz a festődött részek színe eltér a festék színétől. Az eljárás jól használható fejlődéstani metszetek festésére, porcok feltüntetésére, a porcszerkezet tanulmányozására és félvékony metszetek festésére (l. elektronmikroszkópia).*

A Golgi-festés, Golgi-impregnáció

Louis **Ranvier** vezette be az **ezüstsók** alkalmazását a szövettanba, és Camillo **Golgi** volt az, aki az első olyan módszert dolgozta ki, amellyel az idegsejteket nyúlványrendszereikkel együtt lehetett feltüntetni. A róla elnevezett Golgi-impregnációnak óriási jelentősége volt, **Golgi Nobel-díjat kapott** Santiago Ramón y **Cajallal együtt**, 1906-ban. A Golgi-módszernek számos módosítása ismeretes, pl. a Cajal-féle. Golgi saját módszerét fekete reakciónak (olaszul: reazione nera) nevezte.

A szövetdarabot formalinos fixálást követően vizes kálium-dikromát-oldatban tartjuk, majd ebből az oldatból kivéve a mintát leitatjuk és **vizes ezüst-nitrát**-oldatba helyezzük. Ezt követően az anyagból kb. 20 µm vastagságú és nem nagy felületű metszeteket készítünk. A metszeteket etanollal **dehidráljuk**, felderítjük, azaz **átlátszóvá tesszük**, majd lefedjük és vizsgáljuk. Az eljárásban az idegsejtek felszínére **ezüst-kromát csapadék**, illetve kristályok válnak ki, amelyektől a **neuronok teljes nyúlványrendszere feketésbarna színnel rajzolódik ki**. A háttér is barna lesz (2.39. ábra).

¹⁶ A festődés nem feltétlenül háromszínű, az esetleges metakromázia miatt további színek is megjelenhetnek.



2.39. ábra. Golgi-impregnációval festett idegszövet (oldalsó térdes test, corpus geniculatum laterale, CGL)

Egyszerű idegrostfestési eljárás

Az alábbiakban a legegyszerűbb rostkötegfestési eljárást írjuk le. Formalinos fixálást követően az idegszövetből **fagyasztó mikrotommal** 20–25 µm vastagságú metszeteket készítünk, majd ezeket desztillált vizes kimosást követően **ozmium-tetroxid** (OsO_4) oldatba helyezzük, egészen addig, amíg a metszetek közép-dohánybarnára színeződnek. A barnás színeződést az ozmium redukciója okozza. Ezután a felesleges ozmium-tetroxidot kimossuk, a metszeteket dehidráljuk, xilolban kezeljük, végül tárgylemezre húzzuk őket, lefedő anyagot cseppentünk rájuk, és eligazításukat követően fedőlemezrel fedjük.

Egy hagyományos méretű tárgylemeznél nagyobb agyrészből is készíthetünk metszeteket, de ilyenkor nagyobb felületű tárgylemezt és fedőlemezlet kell alkalmaznunk. A festést követően a metszetek teljes felülete barna lesz, de a **rostkötegek és pályák** (pl. a *corpus callosum*, a *fornix*, a *commissura anterior*, a *tractus olivocerebellaris*¹⁷) feketésbarna színnel tűnnek elő. Különböző sejtszoptok (pl. az *oliva inferior*, vagy a középagy *substantia nigra* nevű magja) is jól előtűnnek (2.40. ábra). A kisebb sejttesttel rendelkező neuronok nem jelölődnek kellőképpen. A módszer természetesen nem alkalmas egy-egy konkrét pálya szelektív festésére; ehhez kísérletes módszerekre van szükségünk, de jól alkalmazható az agytörzs struktúráinak tanulmányozására és bemutatására.



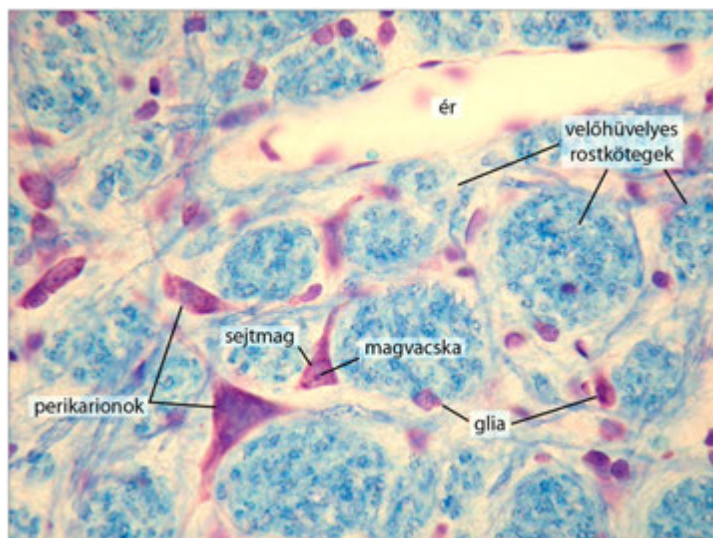
2.40. ábra. Idegrostfestési eljárás végeredménye emberi nyúltvelő metszeten: a rostok feketés-barnák, közöttük az idegsejtszoptok (magok, l. *oliva inferior*) világosabb területek

¹⁷ l. anatómiai tanulmányok

A Luxol Fast blue-krezilibolya festés

Formalinban történt fixálást követően az idegrendszeri mintát paraffinba ágyazzuk, majd 5–7 µm vastagságú metszeteket készítünk. Deparaffinálást és hidratálást követően – ez utóbbival csak a 96%-os etanolig megyünk el – anyagunkat meleg (56 °C-os) termosztátban **Luxol Fast blue** oldatban festjük, majd a felesleges festéket 96%-os etanollal kimossuk (regresszív festés). Egy lítium-szulfátos és alkoholos kezelés következik, majd ezután mikroszkóp alatt megvizsgáljuk készítményünket. Ha a velőállomány (fehérállomány) erősen kéklik, a kéreg viszont halványkék, és ha a két rész között a határ éles, akkor jól dolgoztunk.

Ezután következik a **krezilibolya** festés, majd metszetünket dehidrálnuk és lefedjük (részletesen l. Függelék). A rostok kék, illetve zöldes színűek, a sejtek liláskékek. A módszer igen szép és szabatos áttekintést nyújt az idegszövet struktúrájáról (2.41. ábra).



2.41. ábra. Luxol Fast blue-krezilibolya festés eredménye: az idegsejtek perikarionjainak sejtmagja, magvacskája, a citoplazma szemcsészettsége (Nissl-rögök), a vastagabb nyúlványok és a glia sejtek rózsaszín-lilás színük miatt jól elkülöníthetők a kék velőhüvelyes rostoktól (agytörzs)

Hisztokémiai eljárások

Amikor a sejtek, szövetek valamilyen makromolekuláris összetevőjét szeretnénk kimutatni, akkor azt azok jellege alapján választott hisztokémiai eljárásokkal tehetjük meg. A hiszto- vagy szövetkémia célja a sejtek, szövetek **kémiai felépítésének és az alkotóelemek lokalizációjának** feltárása. (Amennyiben ez kizárólag a sejt szintjére vonatkoztatott, a cito- vagy sejtkémiai elnevezést használjuk.)

A hisztokémiai reakciók alapja mindig egy olyan **kémiai vagy biokémiai reakció**, amely alkalmas a makromolekulák vagy funkcióik azonosítására. Az átalakítások akár többlépéses reakciósorok is lehetnek, amelyek mechanizmusa részben vagy egészben feltárt. Az eredmények általában kvalitatív (minőségi), ritkábban kvantitatív (mennyiségi) jellegűek.

A szűkebb értelemben vett, vagy más néven **leíró hisztokémián** a sejtek, szövetek makromolekuláit (fehérjék, poliszacharidok, nukleinsavak, lipidek), illetve anorganikus alkotóelemeit közvetlenül kimutató, direkt eljárásokat értjük.

Ezzel szemben a **funkcionális hisztokémia** a sejtek és szövetek működéséről, a bennük végbemenő folyamatokról ad felvilágosítást, indirekt eljárások útján. Enzimeket ismert reakciómechanizmusuk alapján mutathatunk ki (l. enzimhisztokémia), egyedi fehérjéket pedig immunológiai módszerrel.

A makromolekulákat kimutató, direkt eljárások közül az alábbiakban az úgynevezett PAS festést és egy lipidfestést mutatunk be röviden, az enzimhisztokémia köréből pedig a lúgos és savas foszfatázok kimutatásával foglalkozunk. Az immunológiai módszereket jelentőségük miatt külön fejezetekben tárgyaljuk (l. immunhisztokémia, immuncitokémia).

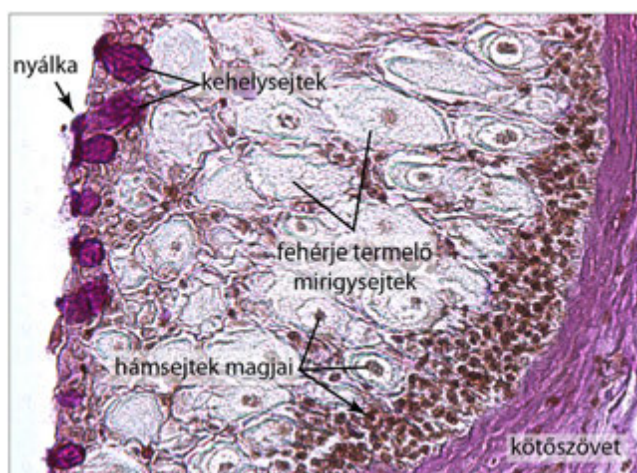
A PAS-festés

A **PAS szintén egy betűszó** (perjódsv: periodic acid és Schiff-reagens). Nem általános festés, hanem meghatározott szöveti komponensek kimutatására szolgál. A festésre szánt mintát pikrinsavas rögzítőkeverékkel (pl. Bouin-rögzítő) vagy neutrális formalinoldattal rögzítjük.

A módszer **glikogén, proteoglikánok és nyálkaanyagok, mukopoliszacharidok kimutatására való**, és így pl. kitűnően festi a bélbolyhokban lévő nyálkatermelő kehelysejtek váladékát, az alaphártyát, a porcok alapállományát, a rugalmas rostokat és a nyálmirigyekben a nyálkatermelő (*mucinosus*) végkamrákat. A festődő struktúrákat **PAS-pozitívnak** nevezzük.

Az eljárás során az említett makromolekuláris anyagokban lévő alkoholcsoportokat **perjódssavval aldehiddé oxidáljuk**, majd az aldehideket a **fukszint** tartalmazó úgynevezett **Schiff-reagens**szel mutatjuk ki. A metszeten való tájékozódást megkönnyítendő, a sejtmagvak láthatóvá tételére úgynevezett ellenfestést alkalmazunk, így a szövettani képen a világoslila PAS-pozitív részletek között a sejtmagvak is megjelennek (2.42. ábra).

Az eljárást kombinálhatjuk egy harmadik festékkel is, pl. a kötőszöveti állomány láthatóvá tétele érdekében (trikróm festés).



2.42. ábra. PAS-festés eredménye: a kehelysejtek váladéka és egyes kötőszöveti elemek PAS-pozitívak, élénk lilák, míg a fehérjetermelő sejtek PAS-negatívak, áttetszőek (a magfestést alciankéssel végeztük, hal kopolytúja)

Lipidek kimutatása

Lipidek kimutatásához formalinban fixált, fagyasztott vagy fixálatlan és fagyasztó mikrotommal vagy kriosztáttal készített metszeteket használunk. A **fagyasztással** itt a beágyazás procedúráját kerülni kell, mivel az azzal járó víztelenítés során (az alkoholsor nagyobb koncentrációjú tagjai miatt) a lipidek egy része távozik a szövetből.

Metszeteinket desztillált vízben gyűjtjük össze, majd kalciumtartalmú formalinban utófixálunk, ha formalinos anyaggal dolgozunk. (A kalcium-ionok jelenléte stabilizálja a membránok szerkezetét.) Ezt követően a metszeteket propilén-glikolban merítjük, majd azokat **Szudán-fekete** oldattal megfestjük. Festés után ugyancsak propilén-glikolban kiöblítjük a felesleges festéket (regresszív festés). Ezután a magvakat Kernechttróttal festjük pirosra, végül készítményünket glicerinben fedjük le (részletesen l. a Függelékben).

A reakcióval a **telítetlen észterek és a trigliceridek** kékesfeketére színeződnek, a **foszfolipidek** szürkés színben jelennek meg, míg a **velőhüvelyekben lévő lipidek** a polarizációs mikroszkópban bronz árnyalattal tűnnek elő.

Általánosan használt lipidfesték az **Oil red** is. A fixálást itt is neutrális formalinnal vagy kalciumtartalmú formalinnal, a metszést (a beágyazás elkerülése végett) pedig fagyasztó mikrotommal érdemes végezni. A festéket izopropil-alkoholban oldjuk, a magokat hematoxilinnal festjük (l. Függelék). Ezzel az eljárással a lipidcseppek narancsszínűek, a magok kékek lesznek. A 2.43. ábrán ilyen módon festett, sejtenyészetben tartott sejteket mutatunk be.



2.43. ábra. Oil red festés sejtenyészeti sejteken: a lipidcseppek narancssárga pöttyökként tűnnek elő a citoplazmában (hematoxilin magfestés, kínai törpehörcsög petefészek (CHO) sejtek)

Enzimhisztokémiai reakciók

Ezek az eljárások azon alapszanak, hogy a minta- vagy metszetkészítés során alkalmazott procedúra ellenére a preparátumban maradnak ép, **működőképes enzimek**, ezek megfelelő körülmények között aktiválhatók, és szubsztrátjuk hozzáadásával **oldhatatlan, színes csapadékot** képeznek. Ennek helye az enzim jelenlétét bizonyítja, illetve lokalizációját jelzi.

Az eredmények csak **megfelelő kontroll mellett** fogadhatók el, mivel az eljárás számos műtermék-képződési lehetőséget rejt (az elégtelen fixálás miatt az enzimet nem az *in vivo* előfordulási helyén mutatjuk ki, a rossz fixáló, az enzimaktivitást biztosító körülmények nem megfelelő volta, vagy a keletkező csapadék kioldódása, elmozdulása miatt téves negatív eredményt kaphatunk). Kontrollok lehetnek olyan metszetek, amelyeken mindent ugyanúgy végzünk, mint a többi metszeten, de 1) nem adunk hozzá szubsztrátot, vagy 2) hozzáadjuk az enzim specifikus gátlószerét, vagy 3) a szubsztrát hozzáadása előtt hővel kezeljük a metszetet (denaturáljuk az enzimet). Ezen kezelések eredményeképpen nem kapunk aktivitást.

Lúgos foszfatáz kimutatása Gömöri szerint

A **Gömöri György** által kidolgozott **nehézfémsós módszerek** a szubsztrátumról lehasított foszfát- vagy szulfát-ionok láthatóvá tételén alapulnak.

A foszfatáz nevű enzimek szerves foszfátésztereket hasítanak, a lúgos foszfatázok pH-optimuma pH 9-nél van.

A kimutatásra szánt anyagot (szervet vagy szövetmintát) kalciumot tartalmazó formalinoldatban fixáljuk¹⁸, majd fagyasztott vagy paraffinos metszeteket készítünk belőle. (Az utóbbi esetben ügyeljünk arra, hogy a beágyazás során csak a minimálisan szükséges hőnek tegyük ki a szövetet, nehogy az enzimet inaktiváljuk.) Amennyiben paraffinos metszettel dolgozunk, a deparaffinálást követően hidratáljuk a metszetet (fagyasztott metszetek esetében ez szükségtelen), majd nátrium-glicerofoszfátot tartalmazó nátrium-veronálcetát pufferben inkubáljuk őket. **A reakció során** az enzim a nátrium-glicerofoszfátból hasítja le a foszfátcsoportot, amely az inkubálóoldatban és a szövetben lévő kalcium-ionnal (ez az úgynevezett lecsapó reagens) kalcium-hidrogénfoszfát (CaHPO_4) csapadékká alakul.

Mivel azonban a **CaHPO_4 színtelen**, ezért kobalt (II)-sókkal és ammónium-szulfiddal ($(\text{NH}_4)_2\text{S}$) reagáltatva **kobalt-szulfidra (CoS) cseréljük le**.

Első lépésben a színtelen csapadékban a kalciumiont kobaltionra cseréljük: $\text{CaHPO}_4 + \text{Co}^{2+} \rightarrow \text{CoHPO}_4 + \text{Ca}^{2+}$, majd második lépésként a foszfátcsoportot szulfiddal helyettesítjük: $\text{CoHPO}_4 + \text{S} \rightarrow \text{CoS} + \text{HPO}_4$.

A kobalt-szulfid markáns **kékesfekete színű és rosszul oldódó csapadék**, amely jelzi az enzim jelenlétét. A metszeten való tájékozódást megkönnyítendő magfestést végzünk, pl. hemalaunnal (a magok kékek lesznek).

¹⁸ A kalcium ionok stabilizálják a membránokat.

Végül vizes kimosást követően glicerinben átderítjük a metszeteket, és ugyancsak glicerinben le is fedjük őket (2.44.A ábra). (Az eljárást részletesen l. a Függelékben.)

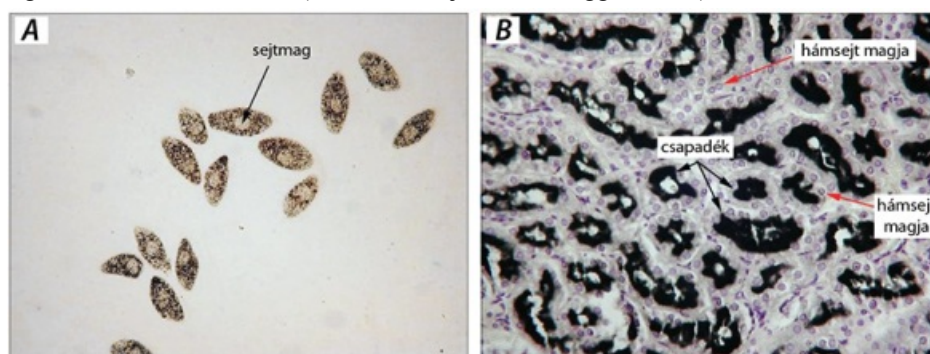
Savas foszfatáz kimutatása Gömöri szerint

A savas foszfatázok pH-optimuma 5 körüli érték. A savas foszfatázok kimutatása abban különbözik a fentiektől, hogy a lehasított foszforsav-maradékot **ólom (Pb) ionokkal** kötjük meg.

Anyagunkat formalinban vagy formalingőzben fixáljuk, majd fagyasztó mikrotommal vagy kriosztáttal metszeteket készítünk belőle. Ezután ólom-nitrátot és nátrium-glicerofoszfátot tartalmazó és a megfelelő pH-t biztosító nátrium-veronáacetát pufferben inkubáljuk a metszeteket. Az enzim a nátrium-glicerofoszfátról, azaz a szubsztrátumról lehasítja a foszfátcsoportot, amely ez esetben is láthatatlan. Ólomionokkal **ólom-hidrogénfoszfátot** (PbHPO_4) képez. A következő ammónium-szulfidos inkubáció arra való, hogy a foszfátcsoportot szulfidcsoportra cseréljük le. A reakció eredményeképpen kialakuló **barnásfekete ólom-szulfid csapadék** (PbS) jelzi a keletkező foszfácionok és ezzel az enzim helyét (2.44.B ábra).

A savas foszfatáz az egyik legjellemzőbb lizoszomális enzim.

A Gömöri-módszert elektronmikroszkópos szinten is lehet alkalmazni, hiszen mind a kobalt-szulfid, mind pedig az ólom-hidrogénfoszfát elektronszóró. (A részletes eljárást l. a Függelékben.)



2.44. ábra. Lúgos (A) és savas (B) foszfatáz kimutatása: a reakció következtében primer lizoszómák és táplálékvakuolumok jelölődtek *Tetrachymena* sejtekben (A), valamint csapadék jelenik meg a vesetubulusok hámlásának kefésegyénén (a magfestés hematoxilinnal történt, B)

A félvékony metszetek

A parapsztba ágyazott metszetek több sejtsornyi vastagok. Az úgynevezett félvékony metszetek ennél vékonyabbak, **körülbelül egy sejtréteget tartalmaznak**. Az **elnevezés** magyarázata, hogy az ilyen metszetek vastagságukat tekintve (ami 1–1,5 μm) a fény- és az elektronmikroszkópos (úgynevezett ultravékony) metszetek között foglalnak helyet. Éppen olyan vastagok, hogy fénymikroszkóppal még vizsgálhatók, azaz annyi festék még meg tud kötődni bennük, hogy a preparátum látható legyen.

Előállításukat, mivel az a fénymikroszkópia területén használt módszerektől némileg eltérő elektronmikroszkópos minta-előkészítési eljárást igényel, az elektronmikroszkópiával foglalkozó fejezetben mutatjuk be.

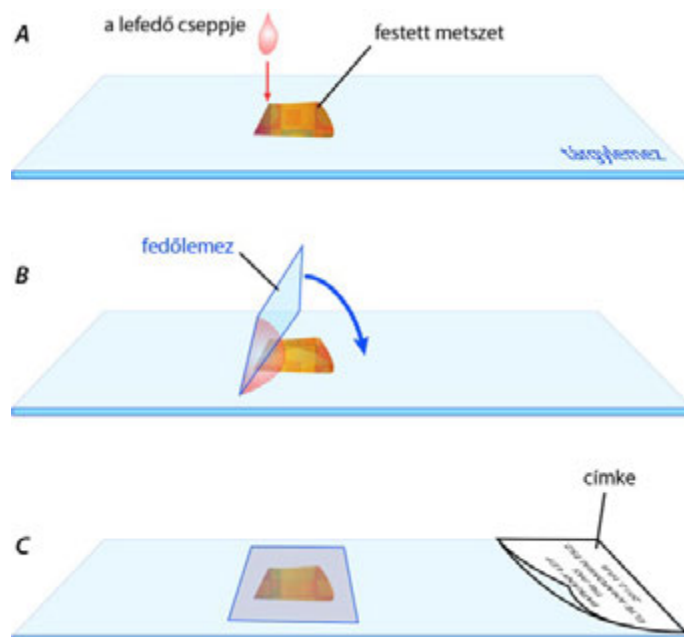
A lefedés

A festést a preparátum tartósítása érdekében **lefedés** követi. Eerre azért is szükség van, mert a fénymikroszkópok optikai rendszere úgy kerül kialakításra, hogy kellően részletgazdag és jó minőségű kép csak a tárgy és fedőlemez együttes használatával kapható.

A **lefedőszerek** egy része vízzoldékony, más része xilolban oldódik. Az utóbbiak esetében a festés során metszetbe került vizet el kell távolítanunk. A metszetet ilyenkor egy **felszálló alkoholsor** oldataival kezeljük, amit váltott xilolos öblítés követ.

A **lefedés menete** a következő: az oldószerből kivett tárgylemezt megtörölgetjük, a ráakódott festéknymoktól megtisztítjuk. Gyorsan kell dolgoznunk, hiszen a xilol gyorsan párolog, s ha nem igyekszünk, akkor a metszet kiszárad. A megtisztított lemezre a metszet mellé egy csepp lefedőszert cseppentünk. A fedőlemezt a csepp széléhez érintve letámasztjuk a tárgylemezre: ilyenkor a csepp szétfut a két lemez érintkezési vonala mellett. Ezután a fedőlemezt egy vékony tűvel (gombostű, bonctű, esetleg csipesz) megtámasztjuk, majd lassan leengedjük a tárgylemez felszínére (2.45. ábra). Biztosítsunk elegendő időt arra, hogy a lefedőszert a fedő- és a tárgylemez között szétterjedhessen, s csak a terjedés ütemében engedjük le a fedőlemezt. A kész metszetet száradni hagyjuk (a lefedőszert megszilárdul), majd feliratozzuk és metszettartó dobozba helyezzük.

A jól lefedett metszet buborékmentes, a lefedőszert mennyisége éppen elegendő arra, hogy kitöltse a teljes fedőlemez alatti területet, azaz nem folyik ki a fedőlemez szélén. Az így elkészített metszetek hosszú ideig színváltozás nélkül eltarthatók.

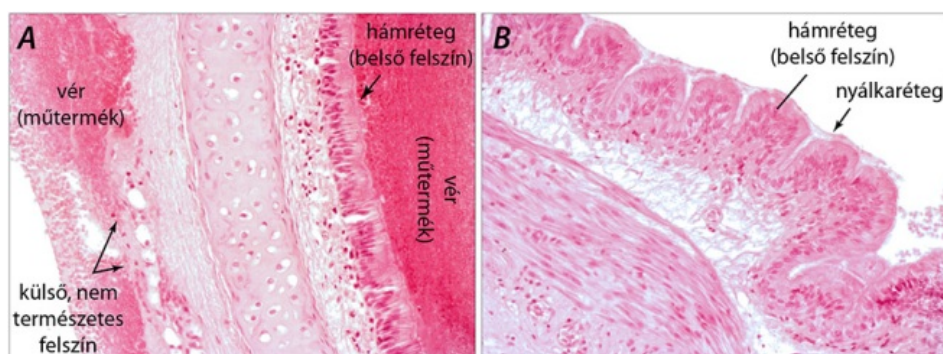


2.45. ábra. A festett metszet lefedése: a lefedő anyag egy cseppjét a metszet mellé cseppentjük (A), egy fedőlemezt a csepp mellé a tárgylemezre támasztunk (B), majd tűvel megtartva óvatosan leeresztjük (B ábra, kék nyíl). A kész metszetet hagyjuk megszáradni, majd feliratozzuk (C)

Metszeteken látható néhány gyakori műtermék

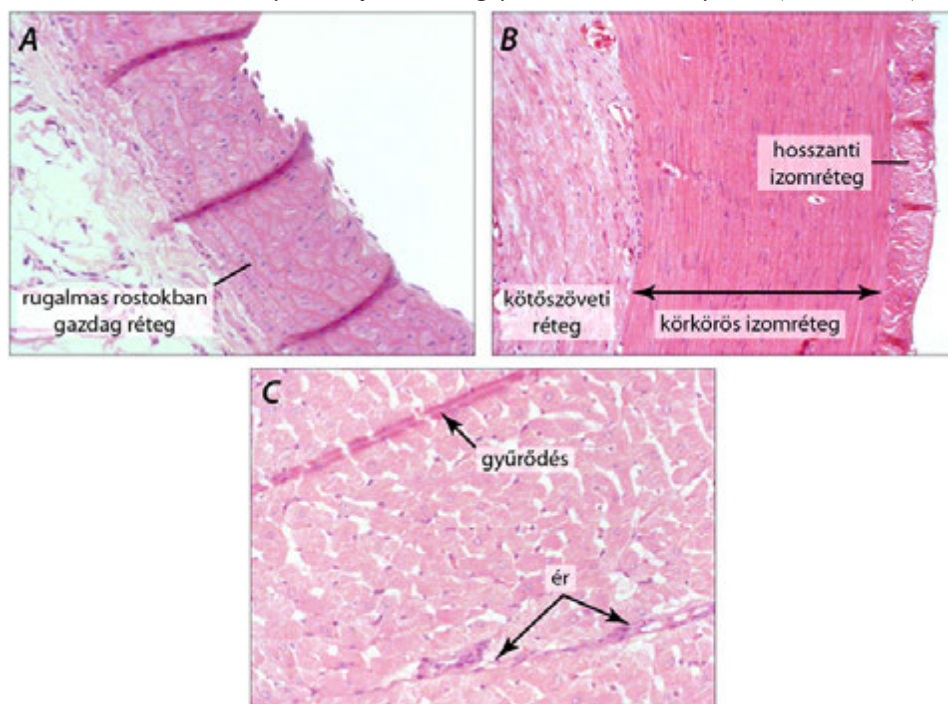
Ebben a fejezetben a szövettani metszeteken látható leggyakrabban előforduló műtermékeket foglaljuk össze. Az itt bemutatott hibák komolyan nem zavarják a metszeten való tájékozódást, sőt, ha ismerjük keletkezésük okát, akkor a megjelenésük még a metszet értelmezéséhez is hozzásegíthet bennünket. Az ilyesfajta műtermékek előnyei ellenére azonban törekednünk kell arra, hogy ezek képződését megelőzzük, hiszen célzott vizsgálatoknál már akadályai lehetnek a kísérlet kiértékelésének. E téren a mikrotechnikával foglalkozó könyvek és leírások igen sok hasznos tanácsot adnak.

Egy szerv kiemelése során gyakran előforduló hiba, hogy azt rögzítőbe helyezése előtt nem öblítjük le megfelelő oldatban (fiziológiás sóoldat vagy pufferoldat). Ez akkor szükséges, ha a szerv kiemelésével ereket is átvágunk, s azokból **a vér a szerv külső vagy (ha az üreges) belső felszínére folyik**. Ezt azután a rögzítő odafixálja ahhoz a felszínhez, ahol vér élő állapotban soha nem volt (2.44. ábra). Az ilyenfajta műtermék felismerése szövettani ismereteket igényel, hiszen tudnunk kell, hogy az a tér, amelyben a vért látjuk, nem a keringési rendszer része (pl. nem ér).



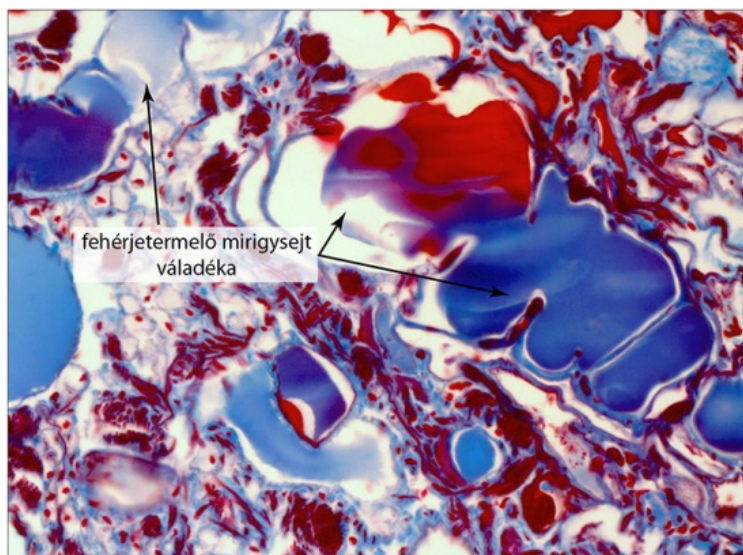
2.46. ábra. Példa a szövettani eljárás során keletkező mütermékre: a légső belső és külső felszínén megjelenő vér (A), valamint mütermék nélküli, nyálkaréteggel bevont belső felszín (B)

Gyűrődések ott és akkor keletkeznek, ahol a különböző összetételű szövetek az előkészítés során eltérő mértékben és/vagy irányban zsugorodnak, s a metszéssíkban „hosszfölösleggel” rendelkező réteg felgyűrődik (2.47.A, B ábra). Gyűrődések a nagyméretű metszeteken homogén szöveti állományon belül is megjelenhetnek. Ennek oka az, hogy a szövet a metszés során helyenként jobban megnyúlhat, mint a környezete (2.47.C ábra).



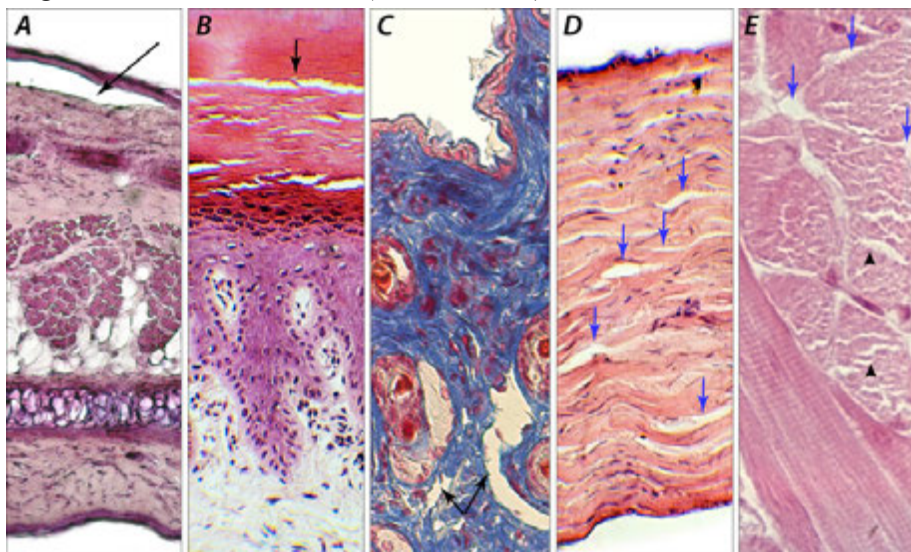
2.47. ábra. Gyűrődések keletkezése: a különböző szöveti összetételű rétegek a metszés során eltérő módon nyúlnak meg, a megnyúlt részek ráncokat képezve felgyűrődnek (aortafal, A; gyomor, B); gyűrődés szívizomszövetben (C). (Mindhárom metszet hematoxilin-eozin festésű)

A nagy fehérjetartalmú folyadékok (l. vér; vérplazma) vagy váladékok a mikrotechnikai eljárás során nagyon tömör tartalommal állhatnak össze. Metszéskor ez azt eredményezi, hogy az érintett területen egymással párhuzamos, vastagságbeli (ebből következően festődésszerű) egyenetlenségek, esetleg hasadások jelennek meg benne (2.48. ábra). Ilyen jelenséget vázizomszövetben is megfigyelhetünk a citoplazma magas akto-miozin-tartalma miatt (2.48.E ábra).



2.48. ábra. Éticsiga köpenyszegélyének részlete mirigysejtekkel: a sávos festődés és a töredező beltartalom a fehérjetermelő mirigysejteket jelzi (Azan festés)

A metszeten megjelenhetnek egymással párhuzamosan rendeződő, szabálytalan alakú, de ismétlődő **szakadások**. Hámmal borított felszínekről a hámréteget metszés közben a kés letolhatja ott, ahol az nem rögzül elég stabilan az alatta lévő felszínhez. Szakadásokat megfigyelhetünk intenzíven elszarusodó laphám rendezett rétegei között, de tipikusak orientált kollagénrostokat tartalmazó szövetben is. Itt az egymás mellé rendeződő rostokat nem kapcsolják össze kovalens kötések (ennek okát l. a szövettani tankönyvekben), s a kötőszöveti állomány két oldalán lévő szövetek zsugorodása a rostokat széthúzza (2.49. C–D ábra).



2.49. ábra. Tipikus műtermékként megjelenő szakadások: hám leválása (A), rések az elszarusodó laphám rétegében (B), szakadások orientált kollagénrostokat tartalmazó kötőszövetben (C, D) és izomrostok burkaiban (E). (A szakadásokat fekete és kék nyilak jelzik; az E részleten látható fekete nyílhegyek az izomrostok citoplazmájában keletkező hasadásokra mutatnak. A C ábrán Azan-, a többin hematoxilin-eozin festés látható)

A metszetből hiányozhatnak szabályos alakú struktúrák: mire a megfestett, kész metszetet megnézzük, azt tapasztaljuk, hogy egyes részei „**kiestek**” a környezetükből. Ez akkor fordulhat elő, amikor az adott metszés síkjában a hiányzó részlet éppen önálló, nem kapcsolódik a környezetével, s egyébként nem tapad elég szorosan a tárgylemez felszínéhez. Amikor a festés előkészítéseként a beágyazószereltávolítjuk, az utolsó köteléket is kivonjuk a metszetből, ami egy ilyen részletet a helyén tartana. Egy hosszú ideig tartó festés (pl. Azan-festés) során ezek a területek leválnak, „leáznak” a tárgylemezről (2.50. ábra).



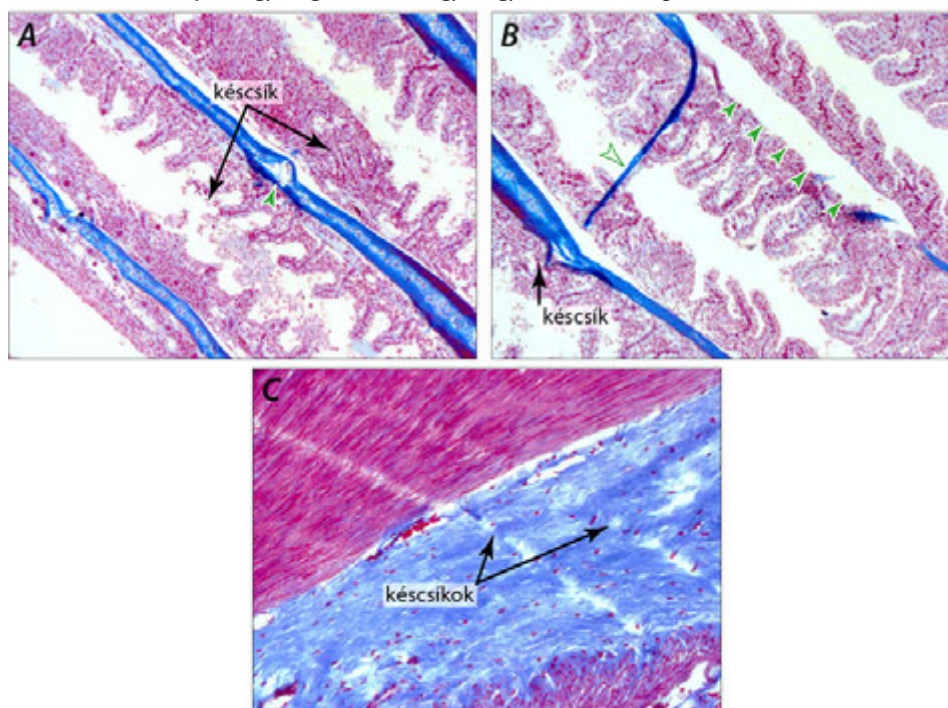
2.50. ábra. A szórtüszőből kiesett szórtüsző helye, amely a faggyúmirigy szórtüszőbe torkollása magasságában már nem tapad szorosan a gyökérhüvelyhez (hematoxilin-eozin festés)

A mikrotomkés éle a használat során sérül. Keletkező **késhibára** elsősorban akkor lehet számítani, amikor olyan szöveti állományt metszünk, amely vagy eredendően, vagy a fixálásból és víztelenítésből következően kristályos szerkezetű, nagy rendezettségű részletet tartalmaz. Ilyen pl. a csontszövet, az elmeszesedő porc, a kollagénrostokban gazdag tömött rostos kötőszövet.

A kés élének sérülése miatt az egymás után lehúzott metszeteken mindig ugyanazon a helyen jelenik meg az apró szakadások sora (**késcsík**), vagy esetleg **nagyobb terület kitörése**, kiszakadása (2.51. ábra).

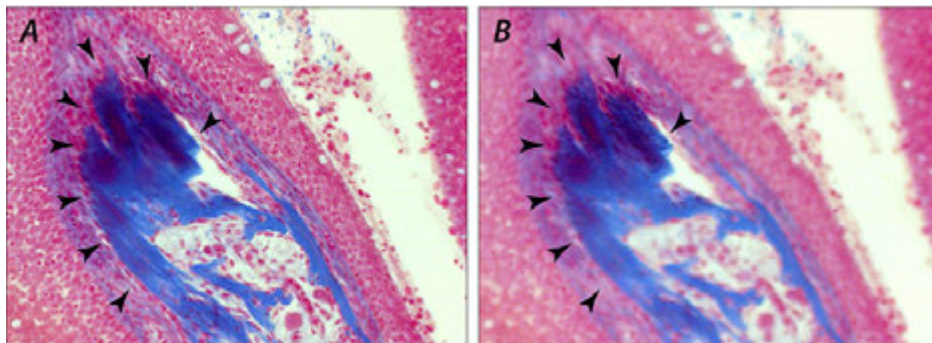
Ez már a metszéskor, a még festetlen metszeten is jól látható. Ha cserélhető pengével dolgozunk, a befogóba tegyünk be új pengét, illetve a különböző blokkok metszésére ajánlott pengék közül válasszuk a kemény anyagokhoz ajánlottat. Hagyományos mikrotomkés esetében az egyetlen megoldás az éleztetés.

Átmenetileg, ha nagyon szükséges, akkor a munkát a sérült késsel is folytathatjuk, ha a blokk elforgatásával a sérülés olyan területre esik, ahol már nincsen metszendő anyag. Ezzel azonban újabb hibákat idézünk elő a kés élében, csak ezúttal másik helyen, így végül is csak egy vagy két további ép metszet készítésére van lehetőségünk.



2.51. ábra. A halkopoltyú metszetén a kés az él hibája miatt nem metszi, hanem kitöri a kopoltyúsugarakban lévő keményebb porcszövetet (zöld nyílhegy, A, B), a lágyabb szövetekbe pedig csíkot húz (A, B, C). (A B ábrán a kitört és részben áthelyeződött, elhajlott részt zöld körvonalú nyílhegy mutatja. Mindhárom felvétel törpeharcsa kopoltyújának részletét mutatja Azan-festéssel)

A késhiba miatt részben kiszakadt szövetrész már nem tapad le a tárgylemezre úgy, mint a környezete. Amikor a festett metszetet vizsgáljuk, azt tapasztaljuk, hogy annak bizonyos részlete(i) a metszet síkja fölött „lebeg(nek)”. Amikor ez a terület éles, a környezet életlen, és fordítva (2.52. ábra). Az elemelkedett részek ugyanúgy vizsgálhatók, mint a környezet, de lehetetlenné teszik a nagyobb nagyításon való fényképezést.

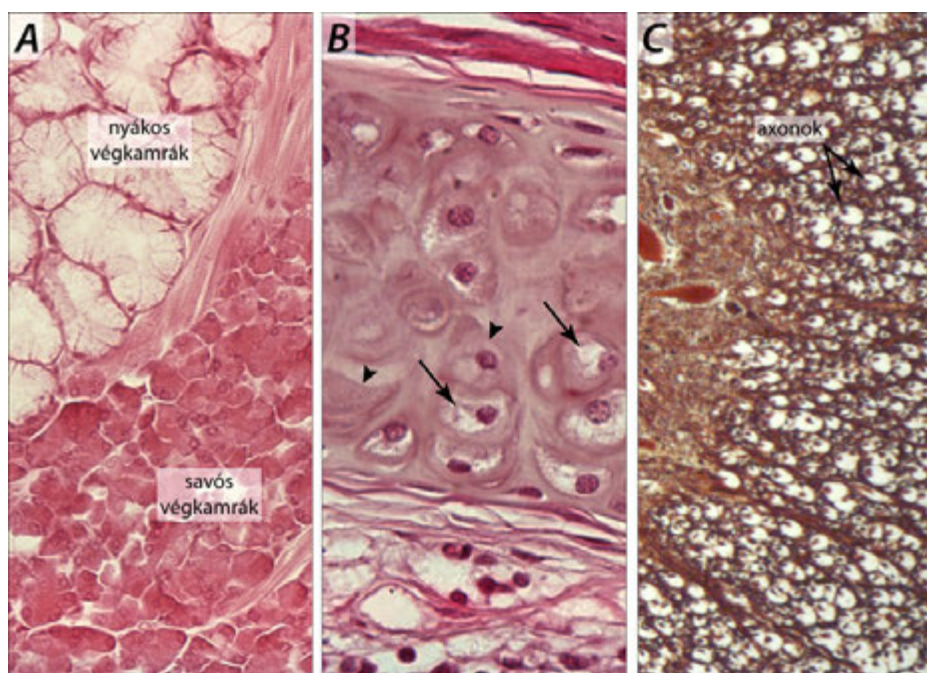


2.52. ábra. A túl kemény anyagot (itt csontszövetet) a kés kiszakította a környezetéből, ezért az a metszet többi részétől elemelkedett: az A képen a környezet éles, a B képen a kiszakadt rész (Azan-festés, hal kopoltyúja)

*Amikor azt tapasztaljuk, hogy a festett metszet egyes részei alig vagy egyáltalán nem láthatók, akkor két lehetőséget kell végiggondolnunk. Az egyik az, hogy az adott részlet megfestésére **nem a megfelelő festéket használtuk** – más szavakkal: az alkalmazott festék nem vagy alig festi a kérdéses részletet. Ilyen gyanú esetén érdemes más festékeket kipróbálni. A másik lehetőség, hogy a festéknek nem volt mit megfesteni, azaz ez a részlet hiányzott (hiányzik) a metszetből. Ennek oka lehet nem megfelelő fixálást követő **kioldódás** és késhiba is.*

*A **nyálkaanyagok** különböző összetételűek, s ez meghatározza azt, hogy milyen körülmények (pH) között melyik mikrotechnikai festékekkel mutathatók ki (pl. anilinkék /Azan-festés/, PAS- vagy alciankék festés). Közös jellemzőjük, hogy viszonylag kis fehérjetartalmuk miatt eozinnal gyengén festődnek. Ennek hátterében azonban részben az is állhat, hogy egy részük a metszet készítése során kioldódik (2.53.A ábra).*

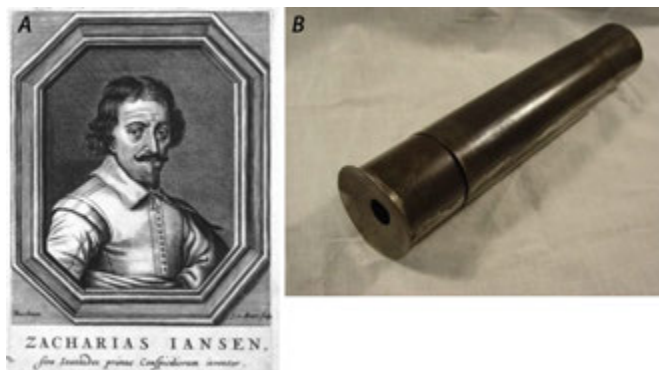
*A rutin eljárás során a **lipidek** ugyancsak kioldódnak. Így a zsírszöveti sejtek lipidcseppjei helyén üres (fehér) területet látunk, míg a cseppek körüli citoplazma és a sejtmag kirajzolódik (2.53.B ábra). A **velőshüvely** speciális lipideket tartalmazó, helyenként igen vastag axonborítás. A mielin anyagának kioldódása miatt a velőshüvelyű rostok keresztmetszetén a neuriteket ugyan látjuk (ezek apró pöttyök), de ezeket nem velőshüvely, hanem csak egy „üres” (fehér) gyűrű veszi körül (2.53.C ábra).*



2.53. ábra. Elterő összetételű váladékot termelő mirigyvégkamrák festődése eozinnal (A), porcsejtekből kioldott lipidcseppek helye (nyílak, B) és a mielin kioldódása miatt megjelenő fehér udvarok tömege idegpályák axonjai körül (C)

A fénymikroszkóp története

Az első egyszerű és összetett mikroszkóp megalkotása **Zacharias Jansen** (1585–1632) nevéhez kötődik, aki szemüvegek készítésével foglalkozott, valószínűleg ebből tartotta fenn magát. Egylencsés egyszerű és kétlencsés, összetett mikroszkópot is készített a XVI. század utolsó és a XVII. század első éveiben (2.54. ábra). Mikroszkópi vizsgálatairól, eredményeiről elérhető adatokat nem találtunk.



2.54. ábra. Zacharias Jansen (A) és az általa 1590 körül készített első összetett mikroszkóp rekonstrukciója (B)

Jansen halálának évében született **Anthony van Leeuwenhoek**¹⁹ (2.55. ábra), aki nemcsak a mikroszkópok készítésében, de a velük való munkában is kiemelkedő eredményeket ért el. Egyszerű családban született, kereskedősegéd, majd kereskedő lett. Feltehetően **Robert Hook** *Micrographia* című könyvének hatására kezdett el lencsét és mikroszkópokat készíteni. Kb. 200 mikroszkópjáról tud az utókor, bár ez a szám a forrásmunkákban nagymértékben szór. Egyesek 500 mikroszkópot említenek. A lencsét egy rézlemez furatába helyezte, a tárgytartót, amelyre a vizsgált objektumot fel lehetett tűzni vagy rögzíteni, két irányban lehetett mozgatni úgy, hogy az a lencséhez képest optimális helyzetbe kerüljön. A vizsgálandó anyag rögzítése után a készüléket a Nap vagy a világos égbolt felé tartották, ami adott esetben erős fénnel történt megvilágítást eredményezett. Leeuwenhoek mikroszkópjai

¹⁹ ejtsd: Léüvenjúk.

viszonylag kisméretű, tenyérszerű eszközök voltak. Egyes mikroszkópjainak csúcsnagyítása a 270-szeres értéket is elérte. Ilyen nagysággal, még az akkori kezdetleges preparatív technikák mellett is számtalan mikrostruktúra vált láthatóvá.



2.55. ábra. Anthony van Leeuwenhoek (Jan Verkolje festménye)

Robert Hookkal egy időben ő látott először sejteket. Felfedezéseiről holland nyelvű leveleket írt az akkoriban alakult angol királyi tudományos társaságnak, a Royal Societynek. Ez a levelezés közel 50 évig tartott. Egy idő után az akadémia Robert Hookot bízta meg Leeuwenhoek eredményeinek hitelesítésével. Miután kiderült, hogy a Leeuwenhoek által leírtak igazak, élete vége felé a Royal Society a tagjai közé választotta.

Lencsekészítési titkait nem árulta el, mint mondta, ezeket ő magának készítette. Egészen az 1950-es évekig tartott, amíg valaki rátalált arra a technológiára, amelyet annak idején Leeuwenhoek is használt. A teljesség igénye nélkül ő írta le az egysejtűeket, a baktériumokat, a vörösvérsejteket, spermatozoon névvel a spermiumokat, az izomszövetben a harántcsíkolatot, a szemlencse szerkezetét, a retinában a pálcikákat és még sok mindent.

Leeuwenhoekkal közel egy időben élt **Robert Hook** (2.56. ábra), angol akadémikus, természettudós, a mikroszkopizálás másik nagy egyénisége és úttörője.



2.56. ábra. Bal oldalon Robert Hook portréja, amely közeli ismerősei és barátai leírása alapján készült. A jobb oldalon egy emléket megőrzítő festmény látható, amelyen a művész Hook mikroszkópját és a *Micrographia* című könyvét is bemutatja. A háttérben az éjszakai égbolt és a meteorit Hook csillagászat iránti érdeklődését jelzi. Hook felemelt keze alatt teleszkópjainak egyike látható (a mű címe: „A nyitott Világegyetem”)

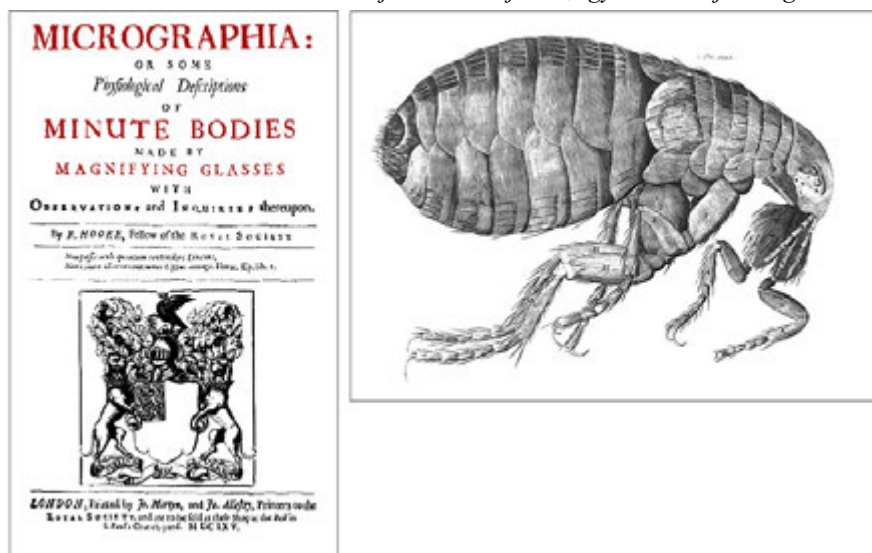
Hook összetett mikroszkópokkal dolgozott. A szemlencsét és a tárgylencsét magukba foglaló részeket egy henger alakú cső (tubus) két végére erősítette, az egész együttest fénymentesen zárta és egy olyan állványra szerelte, amelyen a mikroszkóp magasságát és ezzel a kép élességét állítani lehetett. A mikroszkóp tubusát szépen mintázott és festett bőrrel vonták be. Hook mikroszkóplámpát is használt. Egy olajmécses vagy gyertya fényét egy vízzel

töltött üveggömb segítségével fókuszálta és irányította a vizsgálandó tárgyra. Ez egy felülvilágító rendszer volt (2.57. ábra).



2.57. ábra. Hook mikroszkópja: alul a mikroszkóp rajza az olajmécsszel és az üveggömbbel, felül a mikroszkóp hosszmetezete (vesd össze a 2.54. ábra festményével)

Hook *Micrographia* című munkájában számos érdekes és szépen kidolgozott rajzot közöl többek között növényi metszetekről és a sejtekről, a legyek szárnyszerkezetéről, a rovarok szemének felépítéséről és a hatszöges kitinlencséről, a rovarok szájszerveiről, a bolhák és a lapostetvek testszerveződéséről (2.58. ábra). A munka 1665-ben jelent meg. Leeuwenhoekkal ellentétben Hook jól tudott rajzolni, így ábráit saját maga készítette el.



2.58. ábra. A Micrographia című könyv 1665-ös, londoni kiadásának címlapja és egy rajza

A továbbiakban gyorsan elterjedtek a mikroszkópok, sokat fejlődött a mechanikus részek kidolgozottsága, és a lencsék is mind nagyobb felületűek és nagyobb teljesítményűek lettek. A XVIII. században tükrök használatával megoldották a tárgyasztalon lévő anyagok átvilágítását, de voltak olyan mikroszkópok is, amelyekkel át- és felülvilágításos üzemmódban egyaránt lehetett dolgozni. A különböző nagyítású és részcsőbe foglalt, menettel ellátott lencsét már cserélni lehetett, a mikroszkópok esztétikailag is szép, lakkozott sárgarézből készültek és igényesen előállított fadobozokban kínálták őket eladásra.

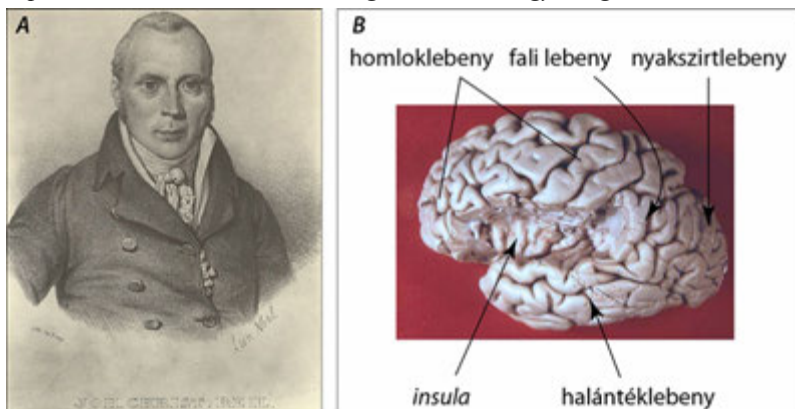
Híresek voltak akkoriban az angol mikroszkópok, George Adams mikroszkópjai, pl. éppen az is, amelyet 1761-ben gazdag díszítésekkel és ezüstből III. György királynak készített.

Megjelentek a kis dobozzal ellátott és faalapra épített preparálómikroszkópok is, amelyeket ki lehetett vinni a terepre pl. a begyűjtött rovarok ivar- vagy szájszerveit vizsgálandó (2.59. ábra).



2.59. ábra. Antik mikroszkópok a XIX. századból: francia mikroszkóp 1854-ből (A) és hordozható angol mikroszkóp preparátumtartó fadobozzal (B)

A készülékekkel együtt rohamléptekben fejlődött a preparátumkészítés is. Ehhez kulcsfontosságú volt Johann Christian **Reil** (1759–1813, 2.60. ábra) ötlete, aki első ízben használt alkoholt a metszendő anyagok rögzítésére és keményítésére. Az ilyen anyagokból már sokkal jobb készítményeket lehetett előállítani, mint a hőkezelt (főzött) vagy természetes állapotú szervekből. Reil találta meg és írta le az agykéreg *insula*²⁰ nevű területét.



2.60. ábra. Johann Christian Reil portréja (A) és az általa leírt, feltárt insula területe (emberi nagyagy bal oldala, B)

Az angol, a francia és az amerikai mikroszkópok mellett Németországban is készítettek ilyen eszközöket, de a mikroszkópi kép keletkezésének elméleti alapjai még nem voltak kidolgozva.

Nagy ugrással teremjünk a XIX. század közepén Jénában, ahol 1846-ban Carl Zeiss (2.61. ábra) mikroszkópgyártó műhelyt alapított: ez volt a máig is működő **Zeiss Optikai Művek** elődintézménye.

²⁰ Insula: sziget; az emlős nagyagy azon rejtett felszíne, amelyre az egyedfejlődés során ráhajlik a szomszédos homlok-, fali- és halántéklebények együttese.

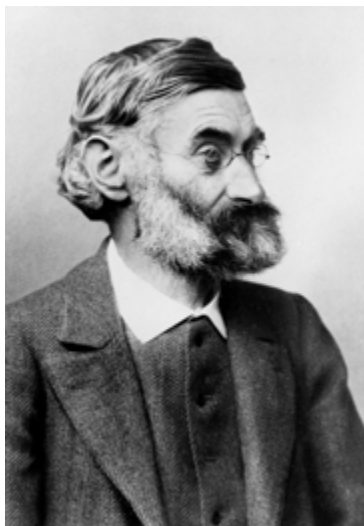


2.61. ábra. Carl Zeiss

Zeiss kísérleti fizikát, ásványtant és optikát hallgatott a jénai egyetemen. Az első Zeiss-mikroszkóp 1847-ben került ki az üzemből. Lencséit akkortájt még külföldről szerezték be.

A Zeiss céghez a későbbiek során igen nagy tehetségű tudósok csatlakoztak, akik szinte a mikroszkópkészítés minden területén forradalmasították az előállítást és a mikroszkópok használatát. Lássuk őket!

*Ernst **Abbe** (1840–1905, 2.62. ábra) matematikát és fizikát tanult. Legfontosabb felfedezéseit a Zeiss műveknél publikálta, illetve hasznosította. Megalkotta a máig is alkalmazásban lévő, erős és homogén fényt (megvilágítást) biztosító kondenzort (Abbe-kondenzor).*



2.62. ábra. Ernst Abbe arcképe

Az inspiráció nem kis mértékben Robert Kochtól, a híres bakteriológustól jött (2.63. ábra), aki sürgette a Zeiss műveket egy valóban jó minőségű kondenzor megalkotására. Abbe dolgozta ki a róla elnevezett Abbe-formulát, amely alapján meghatározhatjuk egy lencse feloldóképességét.



2.63. ábra. Robert Koch laboratóriumában munka közben

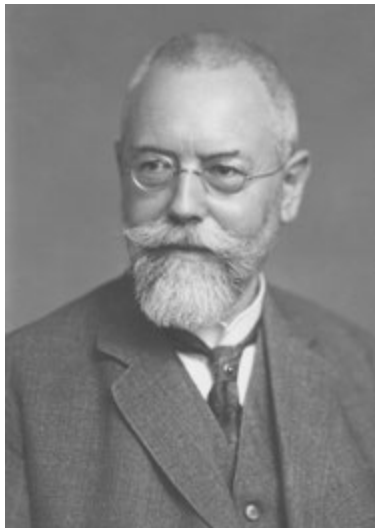
1877-ben Abbe J. W. Stephensonnal együtt dolgozta ki a homogén immerziós (HI) objektívek működési elvét, majd alkotta meg magát a lencsét. „Végül”, és csak a legnagyobb jelentőségű eredmények közül válogatva, Abbe dolgozta ki az apochromat lencsék optikai rendszerét. Az apochromat lencsék jelentik a csúcsmínőséget. Az ilyen lencsék a három alapszínt egy fókuszpontban képesek egyesíteni és ezzel kiküszöbölik az úgynevezett színi hibát (kromatikus aberráció).

Az üvegyáros családban született Otto **Schott** (1851–1935, 2.64. ábra) vegyészként végezte el az egyetemet, majd üvegekémiával kezdett el foglalkozni. 1887-ben Otto Schott, Ernst Abbe, Carl Zeiss, és Roderich Zeiss hozta létre azt az üveglaboratóriumot, amelyben eredményes kutatások folytak a lencsék készítésével kapcsolatosan. Később Schott saját céget is alapított. Több tekintetben Abbé-val együtt ő dolgozta ki a mikroszkóplencsék készítésére alkalmas üvegfajták (boroszilikát üvegek, lítium alapú üvegek stb.) előállításának módját.



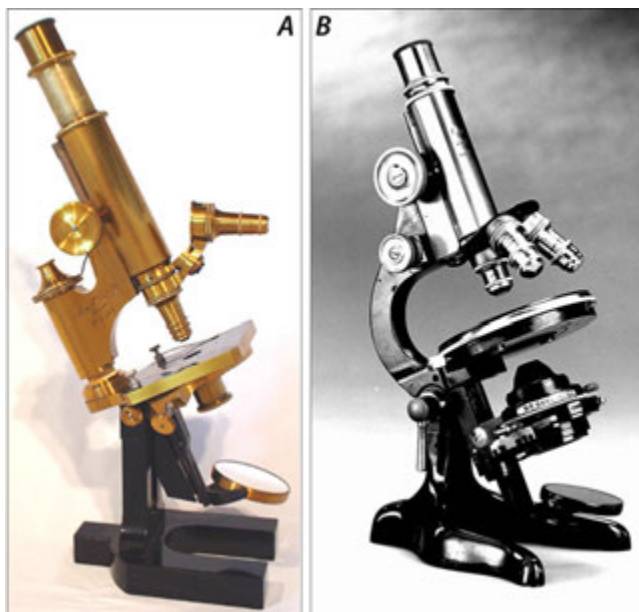
2.64. ábra. Otto Schott

A csúcsteljesítményt nyújtó és a Zeiss művekkel dolgozó szakemberek között negyedikként August **Köhler** (1866–1948, 2.65. ábra) említjük. Az ő munkája nyomán született meg a mikroszkópok optimális beállításának algoritmus (1893), amelyet máig használunk, és amelyet a napjainkban gyártott kutatómikroszkópokon egy automatika állít be. Moritz von Rohrral közösen Köhler fejlesztette ki 1902-ben az UV mikroszkópot. Ez később kiszorult a gyakorlatból, nem úgy, mint a Köhler és Siedentopf közös munkájaként megtervezett fluoreszcens mikroszkóp, amelynek manapság, különböző kombinációkban és változatokban óriási jelentősége van. Végül ugyancsak ő vezette be azt a gyártási eljárást, melynek eredményeképpen az objektíveket úgy tervezték meg, hogy revolver foglalatba helyezve egyszerű elfordítással lehessen változtatni a nagyítást (l. 2.79. ábra).

**2.65. ábra.** August Köhler

A kornak a mikroszkópok fejlesztésében közreműködő jelentős egyéniségei voltak még Carl **Reichert** (1851–1922, 2.66. ábra), továbbá idősebb Ernst Leitz (1843–1920) és fia, ifjabb Ernst Leitz (1871–1956), valamint még sokan mások, pl. George (született Jerzy) **Nomarski**, aki a Nomarski- vagy differencia-interferencia kontraszt mikroszkóp (DIC) kifejlesztője.

**2.66. ábra.** Az optikus Carl Reichert



2.67. ábra. Zeiss- (A) és Leitz-mikroszkóp, utóbbi revolver foglalatával (B)

A mikroszkópok máig tartó fejlesztésében még sok jeles kutató vett részt, de e téma kifuttatása napjainkig már egy másik történet.

Optikai alapfogalmak

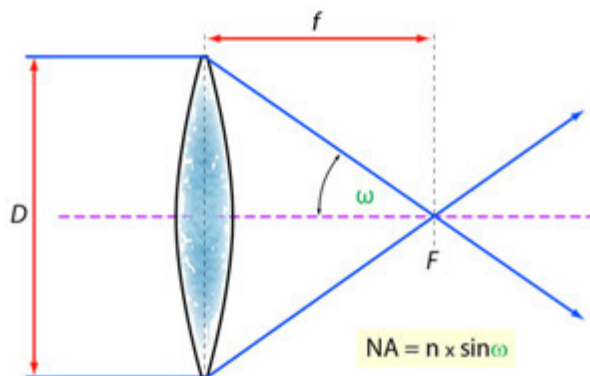
Az Abbe-képlet

Ernst Abbe munkái nyomán tudjuk, hogy miképpen keletkezik a mikroszkópi kép, hogy mi ebben az objektív, a kondenzor és az okulár szerepe. A mikroszkóplencsék és ezzel együtt a mikroszkóp feloldóképességének tényezőit is ő határozta meg és öntötte matematikai formulába.

A képlet szerint a **feloldási határ**: $d_{\min} = 0,61 \times \lambda_v / n \times \sin \omega$, ahol

- $d_{\min}$ az a legkisebb távolság, amelyet a mikroszkóp két különálló képpontként képez le (feloldható minimális távolság);
- λ_v a vákuumban terjedő és a megvilágításra használt fény hullámhossza;
- n a lencse és a tárgy közötti közeg, a levegő, a víz vagy az immerziós olaj törésmutatója;
- ω a lencse fél-nyílásszöge (2.68. ábra);
- $n \times \sin \omega$ pedig az úgynevezett **numerikus apertúra (NA)**.

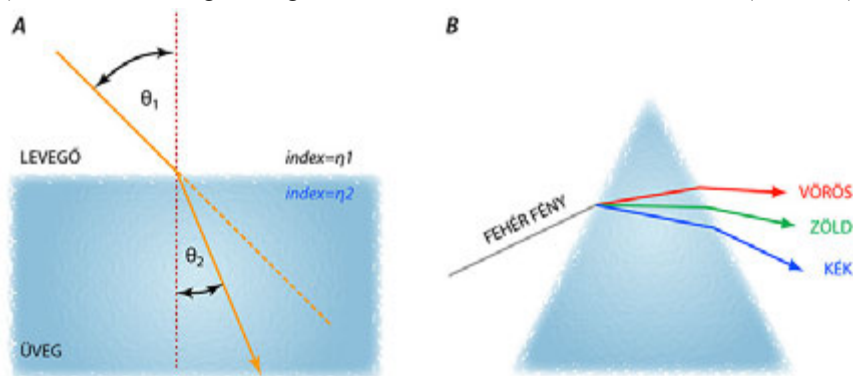
Közvetlenül ennek értéke jelzi a lencse feloldóképességét. **Minél kisebb ez a szám, annál jobb minőségű, azaz jobb felbontási képességű a lencse.**



2.68. ábra. A lencse fél-nyláásszöge (ω), amely alapvetően meghatározza a numerikus apertúra (NA) értékét (F: a lencse fókuszpontja, f: a lencse fókusz távolsága, D: a lencse átmérője, lila szaggatott vonal: optikai tengely)

A fénytörés

Fénytörés (refrakció), azaz a **fény útjának irányváltozása** akkor jön létre, ha a fény egy ritkább közegből egy sűrűbbe lép át, vagy fordítva. Ha ritkább közegből lépnek át a fénysugarak egy sűrűbbe, pl. a levegőből az üvegbe, illetve a lencsékbe, a fény útja a beesési merőleges irányába mozdul el. A fénytörés mértéke hullámhosszfüggőséget mutat (2.69. ábra). Az eltérő sűrűségű közeg határfelületéről visszaverődés is történik (történhet).

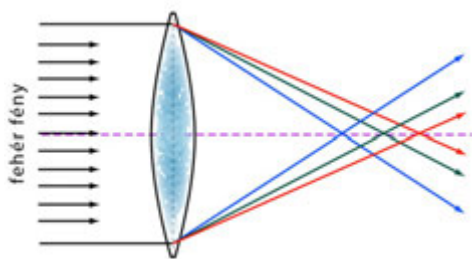


2.69. ábra. A fénytörés jelensége: a különböző törésmutatójú, azaz eltérő sűrűségű anyagok határán a fény megtörik: a ritkábból a sűrűbb közegbe átlépő fény a beesési merőlegeshez közeledik (A); a fénytörés hullámhosszfüggő (B)

Lencsehibák

A leggyakoribb lencsehibák a színi hibák (kromatikus aberrációk) és a gömbi hibák (szférikus aberráció).

A **tengely menti színi hiba** (kromatikus aberráció) esetében a kevert (fehér) fény összetevői **hullámhosszuk függvényében a lencsétől különböző távolságra fókuszálódnak** (2.70. ábra). Ez a lencsék alkotta kép esetében úgy mutatkozik meg, hogy különösen a képen látható tárgyak élei mentén a struktúrák határvonalai egymáshoz közel és eltérő színekben, többszörözve jelennek meg (2.71. ábra).

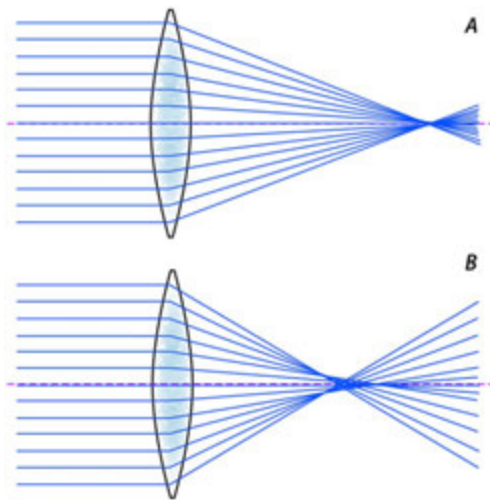


2.70. ábra. Optikai lencse színi hibája: az eltérő hullámhosszú (energiájú) fénysugarak külön fókuszpontokat alakítanak ki

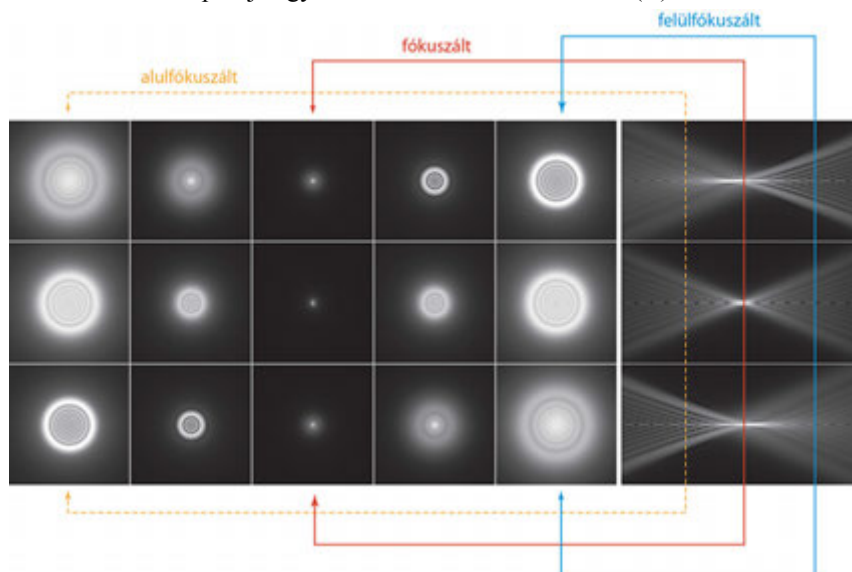


2.71. ábra. Kromatikus hiba következtében a fényfoltok szegélye „szellemképes”

A **gömbi hiba** esetében az optikai tengelyben és az azzal párhuzamosan a lencse különböző zónáin áthaladó fénysugarakat a lencse eltérő mértékben töri. Ennek eredményeképpen vagy a kép középső részei, vagy széli részei lesznek élesek; a kettő együtt nem (2.72. és 2.73. ábra).



2.72. ábra. Gömbi hiba: míg a tökéletes lencse a rajta bármely ponton áthaladó sugarakat egy fókuszpontba gyűjti (A), addig a gömbi hibával rendelkező lencse ugyanezen sugarakat más és más pontba fókuszálja: a kép valamennyi pontja egyik fókusz síkban sem lesz éles (B)



2.73. ábra. Sugármenetek gömbi hiba esetében: a bal oldali kép (koncentrikus körök) azoknak a sugármeneteknek a keresztmetszeteit mutatja, amelyeket a jobb oldali kép hosszmetsetben ábrázol. A képek egy kísérletet mutatnak, amelyben egy pont leképezését látjuk. Ezt a hibátlan lencse egy pontba képezi le (középső sor: keresztmetszetek közül a 3. kép, valamint a hozzá tartozó hosszmetset). Az alsó és felső sorban gömbi hibával rendelkező lencse sugármeneteit látjuk.

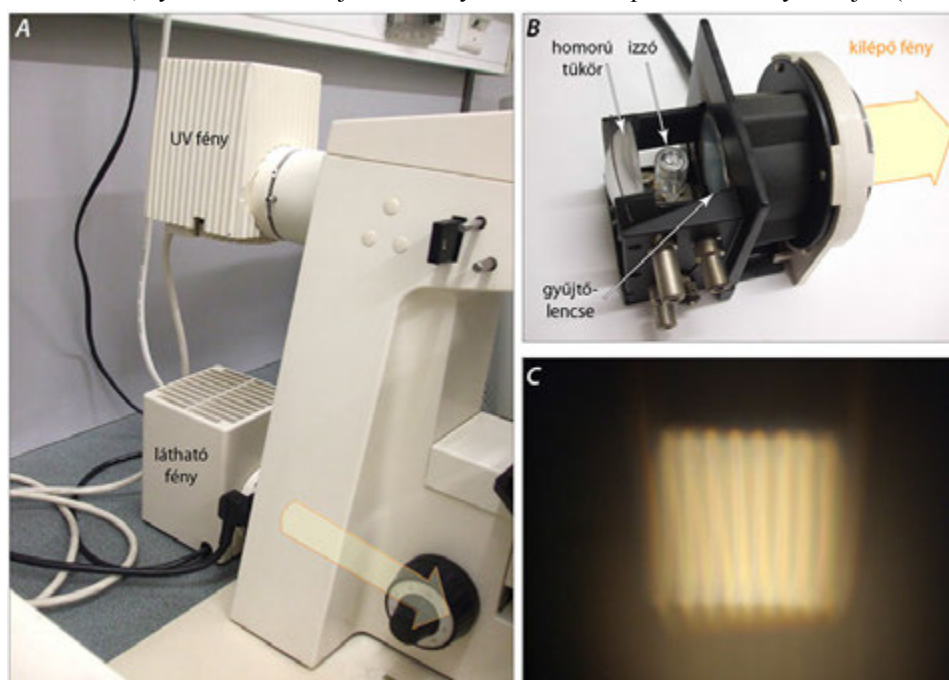
A lencsék hibáit **lencserendszerekkel lehet javítani**. Ilyenkor az egyik lencse hibáját egy másikkal küszöböljük ki. A lencsét olyan anyagokkal ragasztják össze, amelyek törésmutatója egyezik, vagy igen közel áll az üvegéhez. A visszaverődés és a következményes képromlást kiküszöbölendő, az igényesebb lencsék vagy lencserendszerek felületét tükröződést gátló bevonatokkal látják el.

A fényforrás

A fénymikroszkópok **lámpaházban** elhelyezett fényforrása látható, kevert (fehér) fényt bocsát ki. Az **izzó** fényereje szabályozható. Mögötte homorú **tükrör** van, amely a rá eső fénysugarakat visszaveri, ezzel a fénysűrűséget növeli. Az izzó előtt egy **gyűjtő- vagy kollektorlencse** található (2.74.B ábra).

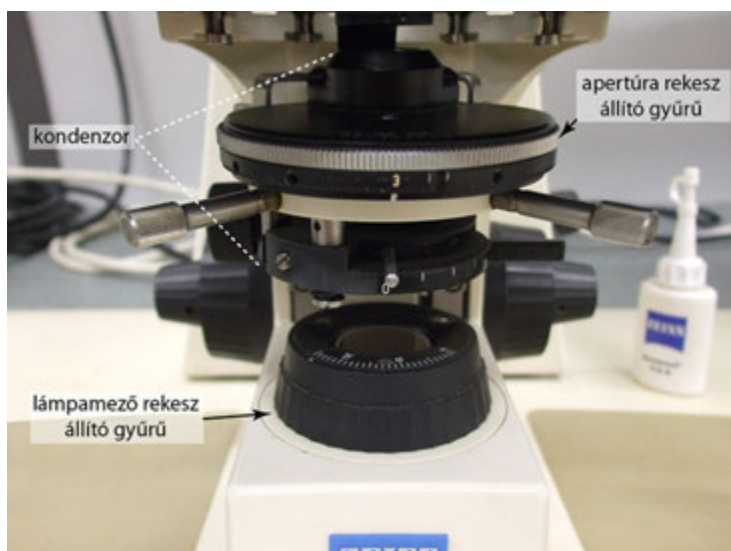
A színi lencsehiba miatt az az előnyös, ha a fényforrás homogén fényt bocsát ki, ezért manapság egyre inkább terjednek a LED²¹-es izzóval ellátott mikroszkópok, ahol a kibocsátott fény hullámhossza (színe) a fényforrásként használt dióda (félvezető) anyagától függ.

A lámpaházból kilépő fénysugarat egyrészt a kondenzor lencserendszerére kell juttatni, másrészt a képalkotás számára leginkább megfelelő alakúra kell formálni, össze kell hangolni a kondenzor apertúrájával (2.83. ábra). A fény tereléséhez tükröket, a fénykúp alakjának kialakításához pedig egy úgynevezett **lámpamező rekeszt** használnak. Utóbbi egy írisz blende, nyílásának átmérőjét a komolyabb mikroszkópokban szabályozhatjuk (2.75. ábra).



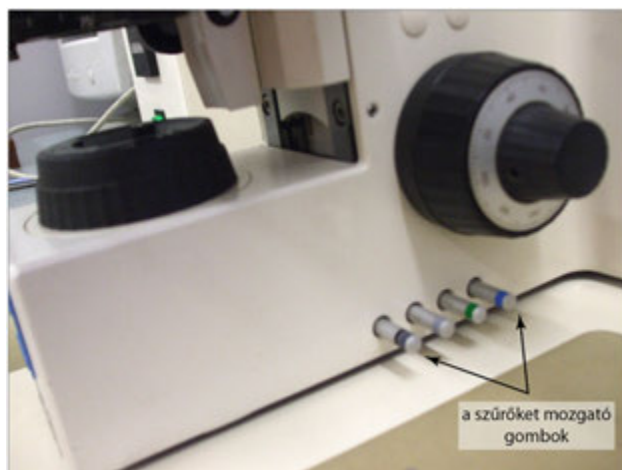
2.74. ábra. Látható és UV fényt kibocsátó mikroszkóplámpák házai (A), az izzó és környezete (B), valamint az izzószál kivetített képe (C) (a lámpaházból kilépő fénnyalábot az A és B ábrán narancssárga körvonalú, sárgával kitöltött nyíl jelzi)

²¹ LED: „light emitting dioda”, azaz fényt kibocsátó dióda



2.75. ábra. A lámpamező rekesz állítási lehetősége, a kondenzor és a kondenzor apertúra rekesze

A kutatómikroszkópok talpzatába a fényútba helyezhető **szűrőket** is elhelyeznek, amelyekkel a megvilágító sugárnyaláb színösszetételét (színhőmérsékletét) szabályozhatjuk (2.76. ábra). Amikor nézelődünk a mikroszkópban, akkor úgy állítsuk be a fényerősséget, hogy az ne legyen nagyon erős! Használat után pedig ne felejtjük el levenni a fényerőt és elzárni a lámpát!



2.76. ábra. Színszűrők a talpzatban

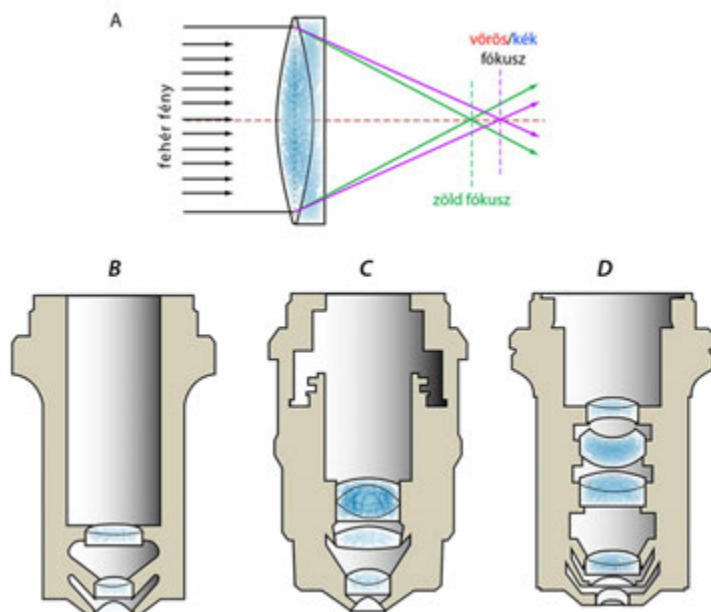
Az objektívek típusai és azok feliratai

Egy mikroszkóp „lelke” az objektív, alapvetően ugyanis ez határozza meg a műszer felbontóképességét.

A ma használatos mikroszkópok objektívjei lehetnek két színre (vörösre és kékre) korrigált **akromát lencsék** (2.77.A ábra) és a három alapszínre korrigált apokromát lencsék. A korrigáltság arra utal, hogy a lencse a nevezett fénysugarakat egy pontban fókuszálja.

Rutincélokra, így pl. szövettani gyakorlatokra az akromát lencsék teljes mértékben megfelelőek. Amennyiben fényképezni is szeretnénk vele, a zöld színszűrő alkalmazása miatt csak fekete-fehér felvételt készíthetünk. Ennek feltétele, hogy a mikroszkóp objektív és okulár lencserendszere egyaránt síkba vetítő legyen (**plán-akromát** objektív és fotookulár).

Az **apokromát lencsék** a három alapszín egyetlen pontban fókuszálják, így színi hibával nem kell számolnunk. Ezek csúcsminőségű lencsék. **Fényképezéshez** síkba vetítő, ún. **plán-apokromát** lencsákat alkalmazunk, természetesen síkba vetítő fotóokulárral.



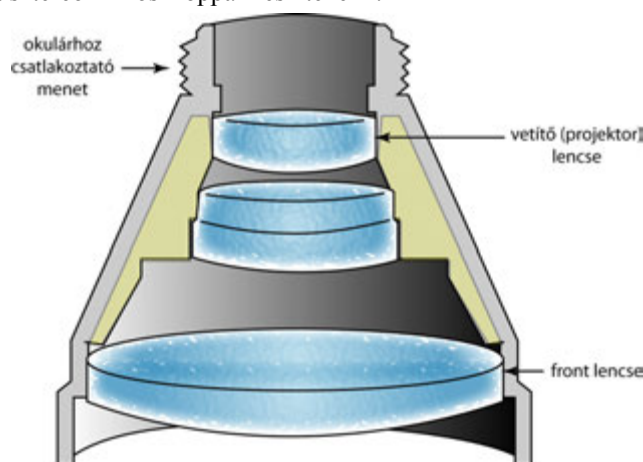
2.77. ábra. Az akromát lencsék leképezése (A), valamint akromát, apokromát és plán-akromát objektívek metszetei (B–D)

Az objektíven lévő feliratok és számok jelentése

Az objektívek legfontosabb tulajdonságairól az oldalukon elhelyezett **jelzések** tájékoztatnak. Nézzük ezeket sorban!

Az objektíven természetesen feltüntetik a gyártó cég nevét és a lencse soktagú sorozat-, illetve gyártási számát.

A **nagyítás értékét** számokkal jelzik, pl. 1, 10, 20, 40, 63, 90 vagy 100. A felsorolás elején álló 1-szeres nagyítású lencsákat nagy felületű metszetek fényképezésére használják (2.78. ábra). Alkalmazásuk révén sokkal jobb képet kapunk, mintha a felvételt sztereomikroszkóppal készítenénk.



2.78. ábra. 1x-es nagyítású objektív hosszmetsete (vázlatrajz)

A 60-szoros nagyításon felül a lencsékhez **immerziós olaj**at használunk. A gyárak általában a nagyítást és az objektív típusát jelző színkóddal is ellátják az objektíveket (2.79.C ábra).

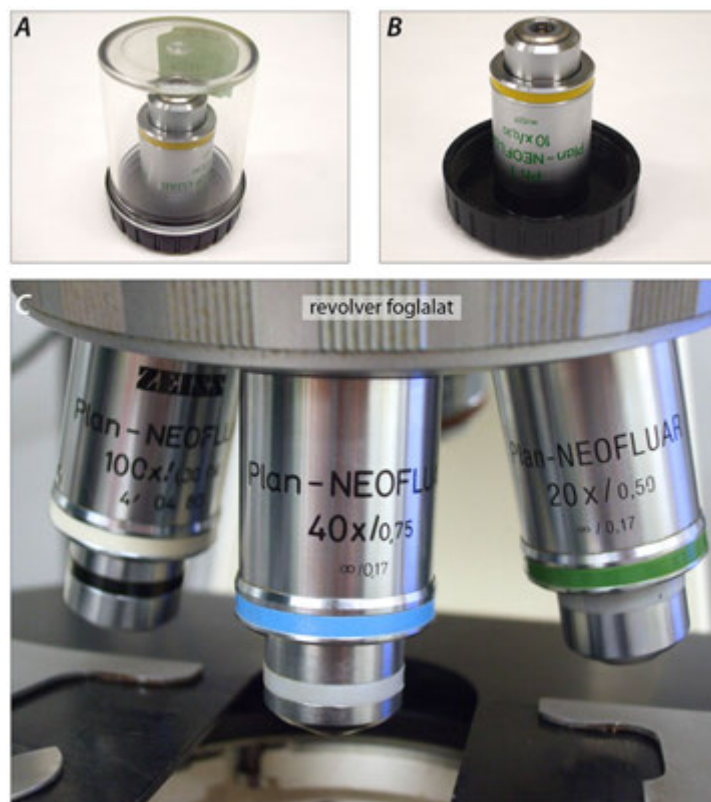
A **numerikus apertúra** (NA) az objektív fontos minősítő adata. A lencse fényereje és felbontóképessége elsősorban ettől függ. Képletben: $NA = n \times \sin \omega$, ahol az ω a lencse fél nyílásszöge, az n pedig a törésmutató. Értelemszerűen a numerikus apertúra függ a lencse átmérőjétől és a fókusz távolságtól, illetve ezek arányától (2.68. ábra). Minél nagyobb a numerikus apertúra értéke, annál jobb teljesítményű lencsével állunk szemben.

A **tubushossz** értéke milliméterben kifejezve az objektív és az okulár közötti távolság. Az objektíven erre vonatkozólag két adatot látunk. Vagy **160-as szám** szerepel, amely mutatja, hogy a mikroszkóphoz tartozó lencsék képtávolsága 160 mm, azaz ilyen tubushossz mellett adnak optimális képet. A tubus hosszát persze meg lehet változtatni, meg lehet növelni (régén voltak is ilyen kihúzható tubusú mikroszkópok). A tubushossz megnövelésével nőtt a nagyítás, de a kép élesre állításához meg kellett változtatni az objektívnek a tárgytól/metszettől való távolságát, ami azt jelenti, hogy az objektívet el kellett mozdítanunk eredeti helyzetéből. Minthogy egy objektívnek egy fókusz távolsága és egy tárgytávolsága van, az eljárás a mikroszkópi kép minőségromlását eredményezte.

A másik egy **végteles jel**, amely arra utal, hogy az objektív végtelesre korrigált, azaz a végtelesbe vetíti a képet (2.79.C ábra). Az ilyen lencsék bevezetésére azért volt szükség, mert ha a tubusba beépítettek egy kiegészítő eszközt (pl. egy polarizációs berendezést vagy egy plusz köztes lencsét), akkor a 160 mm-es tubushossz megváltozott, ami az objektívek által előállított kép minőségromlását okozta. A végtelesre korrigált lencsék esetében a képtávolság a végtelesben van, így semmi akadálya sincsen annak, hogy a tubusba az objektív és az okulár közé bármiféle járulékos optikai eszközt helyezünk.

A **fedőlemez vastagságát** is felírják az objektívre, ez **0,17 mm** (2.79.C ábra). Ha élesre állítjuk metszetünket, és a metszet tetejére egy másik fedőlemezt is rácsúsztatunk, a kép azonnal életlen lesz. Ez jól mutatja a fedőlemez vastagságának jelentőségét.

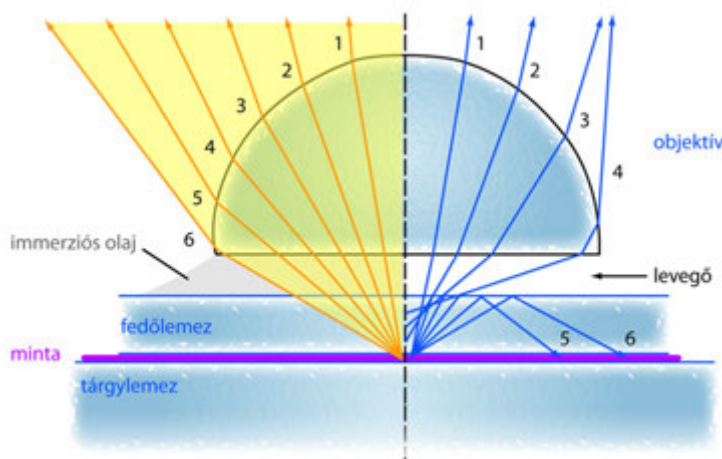
Az **immerziós objektíveket** felirattal (HI) és/vagy egy fekete (és fehér) csíkkal jelölik (2.79.C ábra). A HI jelentése: homogén immerzió. A homogenitás arra utal, hogy az olaj és a lencsék anyaga optikailag homogén, fénytörésük egyforma. Vízimmerziós lencsék esetében a lencséket úgy szerkesztik meg, hogy vízbe, pl. tápfolyadékba merítve is jó képet adjanak.



2.79. ábra. Objektívek: objektív a tárolására szolgáló tokban (A), ahová a revolver foglathoz csatlakozó menetével rögzül (B), illetve a mikroszkópba szerelve (C): itt jól láthatók a feliratai (a színes gyűrűk jelentése: fekete – immerziós, kék – 40-szeres nagyítású, zöld – fluoreszcens objektív)

Erős nagyítású immerziós lencsék használata

Amennyiben erős nagyítású – általában 60-szoros nagyításon felüli – lencsét használunk, a fedőlemez és az objektív frontlencséje között csak egy nagyon vékony levegőréteg maradna. Emiatt a kondenzor által a metszetre bocsátott fény – egyrészt visszaverődések, másrészt a közeghatár miatti fénytörés következtében (az üveg és a levegő sűrűsége különbözik) – nem jut be az objektívbe, szóródik, illetve interferál (2.80. ábra). Ennek következtében a kép fényszegény, homályos és életlen lenne. A problémát úgy küszöbölhetjük ki, hogy a fedőlemez és az objektív frontlencséje közé az üveg sűrűségével közel egyező sűrűségű folyadékot, például **immerziós olajat**, helyezünk. Hatására a kép fényerős és éles lesz. Igényes vizsgálatok esetében a kondenzor frontlencséje és a tárgylemez közé is olajat kell helyoznunk.

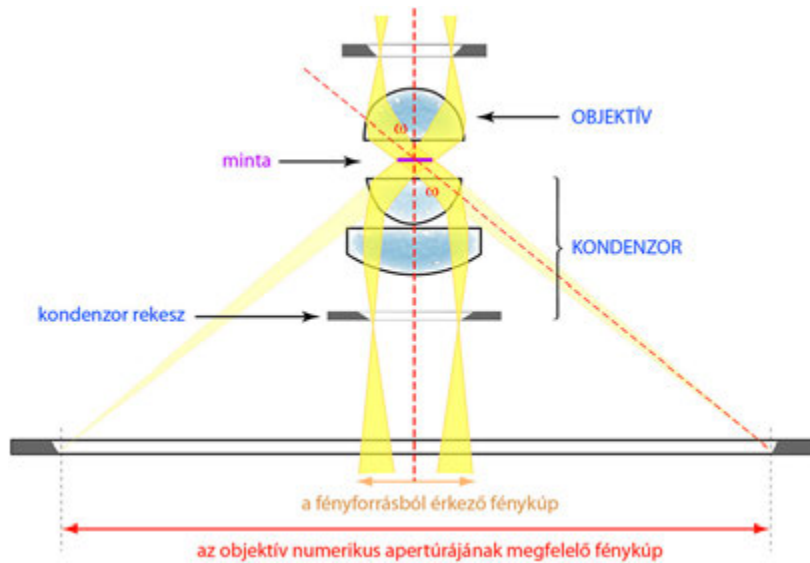


2.80. ábra. Az immerziós olaj hatása: az ábra bal oldalán látható, hogy immerziós olaj használatával a bejelölt, tárgyról érkező sugarak mindegyike bejut az objektívbe, míg a jobb oldali részen ugyanezen sugarak közül a széli sugarak (5-ös és 6-os számúak) ki sem lépnek a levegő közegbe (így nem jutnak az objektívbe sem), s a közbelső sugarak is jobban, de nem egyenletesen terülnek szét

A kondenzor és működésének lényege

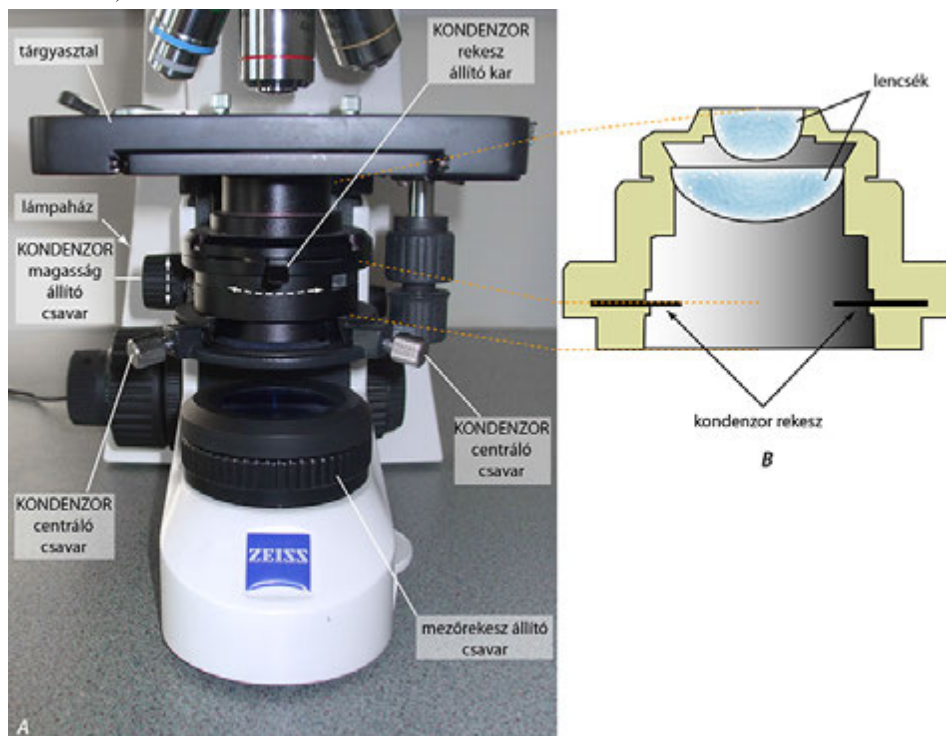
A kondenzor egy olyan összetett és blendével összeépített lencserendszer (2.81. és 2.82. ábra), amelynek **feladata az**, hogy a metszetet kellő erősségű és homogén fénnel, optikailag optimálisan világítsa meg.

Alaptípusa az Abbe által kifejlesztett, úgynevezett **Abbe-kondenzor**. A kondenzornak is van numerikus apertúrája, azaz egy jellemző alakú és szögű fénykúpja. Amennyiben a **kondenzor numerikus apertúrája** bizonyos határon belül egyezik a használt objektív numerikus apertúrájával, a **megvilágítás optimális**, azaz a kondenzor által kibocsátott fény teljes mértékben részt vesz a képalkotásban (2.81. ábra).

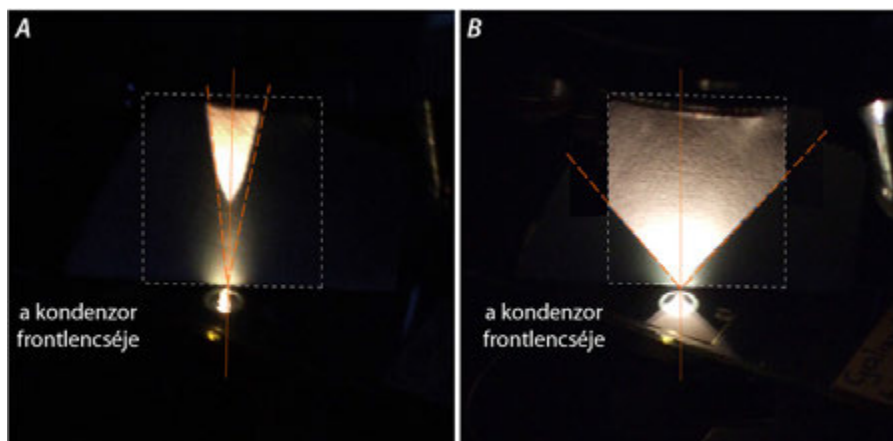


2.81. ábra. A kondenzor és az objektív numerikus apertúrájának összehangolása: a megvilágítás akkor a legmegfelelőbb, amikor a kondenzort elhagyó összes fénysugár bejut az objektívbe

A kondenzor numerikus apertúráját, azaz az átbocsátott fénykúp alakját a **kondenzor rekessel** (diafragma) állítjuk be (2.82. és 2.83. ábra).

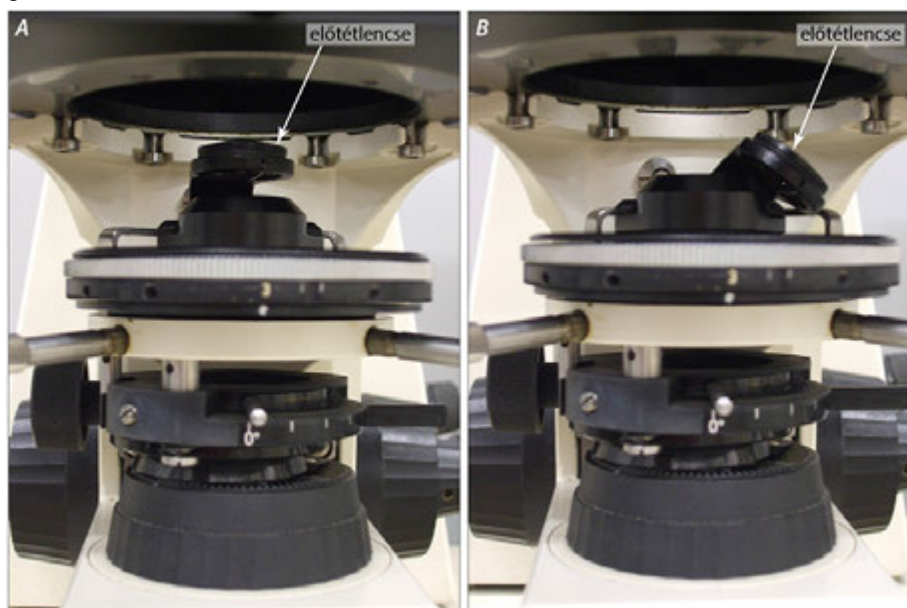


2.82. ábra. Kondenzor fotója (A) és felépítése vázlatosan (B): a kondenzorhoz magasságállító csavar, két centráló csavar és egy rekesszállító kar tartozik (A) (a kondenzoron látható fehér szaggatott vonalak mozgató, forgató lehetőségeket jeleznek)



2.83. ábra. A tárgyat megvilágító fénykúp alakja a kondenzor rekesznyílásának megfelelően alakul: szűk diafragmánál keskeny (A), tág rekesznél széles (a kondenzor frontlencséjén keresztül érkező fénynyaláb áthalad a tárgylemezen és egy, az objektívnek támasztott papírlapot súrol, alakja azon rajzolódik ki)

Figyelembe kell vennünk azt is, hogy a kondenzor frontlencsége milyen távolságban van a tárgylemeztől. Ezt a távolságot egy fogasléces rendszerrel lehet szabályozni. Számos kondenzorban az előtét- vagy **frontlencse** ki- és visszabillenthető, annak megfelelően, hogy gyenge vagy erős nagyítású lencsét használunk-e (2.84. ábra). A frontlencse ki- és bebillentésével a kondenzor numerikus apertúráját változtatjuk meg; e frontlencse beiktatásával a numerikus apertúra értéke nő.

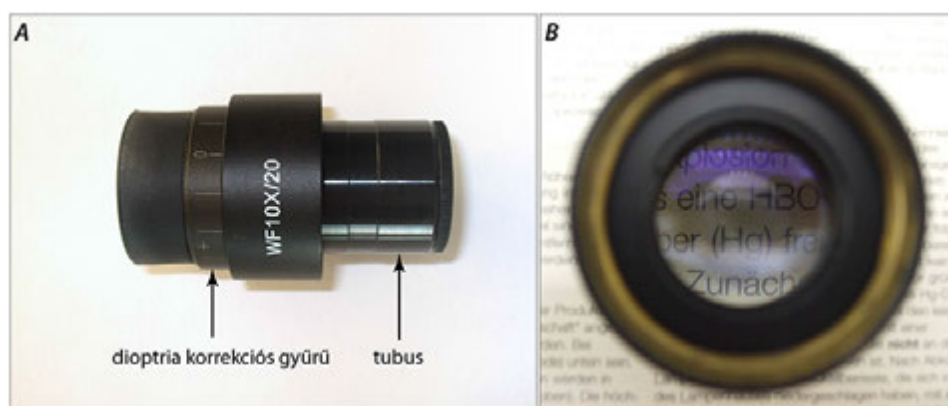


2.84. ábra. A kondenzor frontlencsége a fényútban (A) és abból kibillentett helyzetben (B)

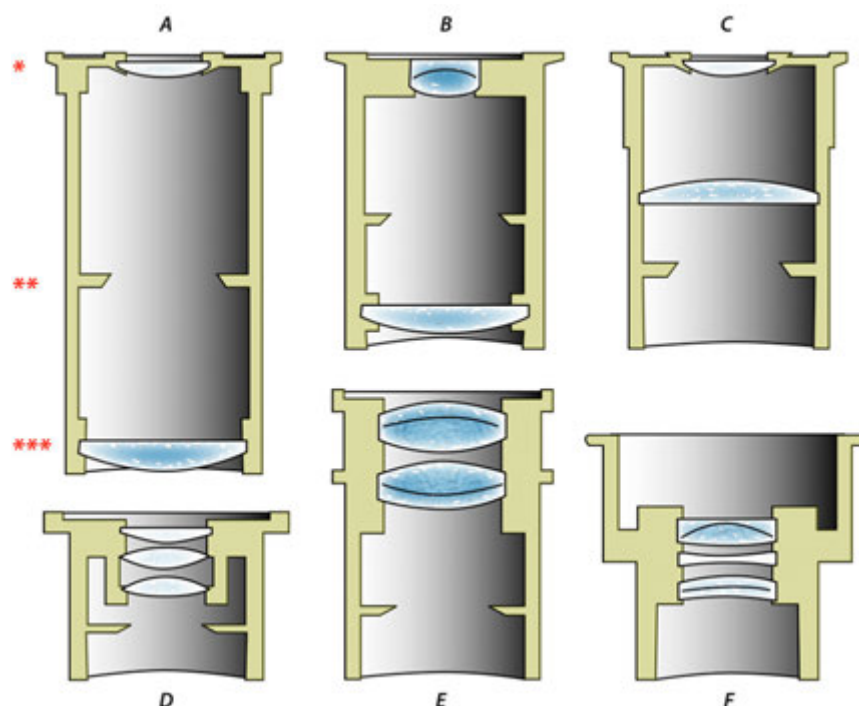
Immerziós vizsgálatnál a kondenzor lencsége és a tárgylemez közé is cseppentenünk kell immerziós olajat, mert a kondenzor frontlencsége és a tárgylemez között ugyanolyan jelenségek (reflexiók, ill. fénytörések) mennek végbe, mint amilyenekről az objektívek esetében beszámoltunk. Erről sokan elfeledkeznek.

Az okulárok felépítése és típusai

A mikroszkópokulárok egy csőbe, úgynevezett **tubusba szerelt összetett** lencsék, amelyek nagyítanak (2.85. ábra). Az objektív felé eső lencsét **mezőlencsének** nevezzük, az ellenkező oldalt **szemlencsének**. Az okulárban állandó átmérőjű rekesz, ún. **mezőrekesz** is van, mégpedig a két lencse között (2.86. ábra).



2.85. ábra. Mikroszkópból kiemelt okulár (A) és nagyítása (B): a felirat szerint ez 10-szeres nagyítású okulár (A)

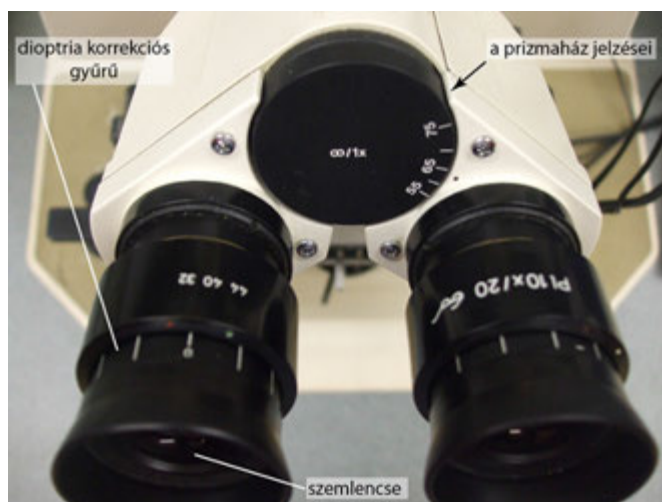


2.86. ábra. Okulárok hosszszeteinek vázlatrajzai: az egy piros csillag a szemlencse, a két csillag a mezőrekesz, a három csillag pedig a mezőlencse helyzetét jelzi

Egyéb jelzések mellett az **okulárokon szerepel** a gyártó cég neve és a nagyítás mértéke. Amennyiben a „photo”, vagy „PL” (plan) jelzések nem láthatók a szemlencse foglalatán, az azt jelenti, hogy az okulár domború felszínre, azaz a szaruhártya felszínére vetít és így ad éles képet. Ha ilyen lencsével fényképeznénk, akkor vagy a látótér széle, vagy a közepe lenne éles, de a kettő együtt sohasem. Fényképezéshez fotóobjektíveket, illetve plánkompenzációs okulárokat alkalmazunk (2.87. ábra).

Vannak **mono- és binokuláris** mikroszkópok. Utóbbiakban az objektív felől érkező sugárnyalábot ketté kell osztani annak megfelelően, hogy két szemmel nézünk a mikroszkópba. Erre a megosztásra összetett prizákat használnak, amelyek abban a **prizmaházban** foglalnak helyet, amely az okulárok foglalatait is hordozza. Ezen feltüntetik a prizma nagyítását és azt, hogy a rendszer a végtelenbe vetít (fekvő nyolcas jelzés).

Beállíthatjuk az okulárok egymástól való távolságát (**szemtávolság**), és egy **dioptriakompenzációs gyűrűvel** azokat a szemünkhöz igazíthatjuk (2.87. ábra).



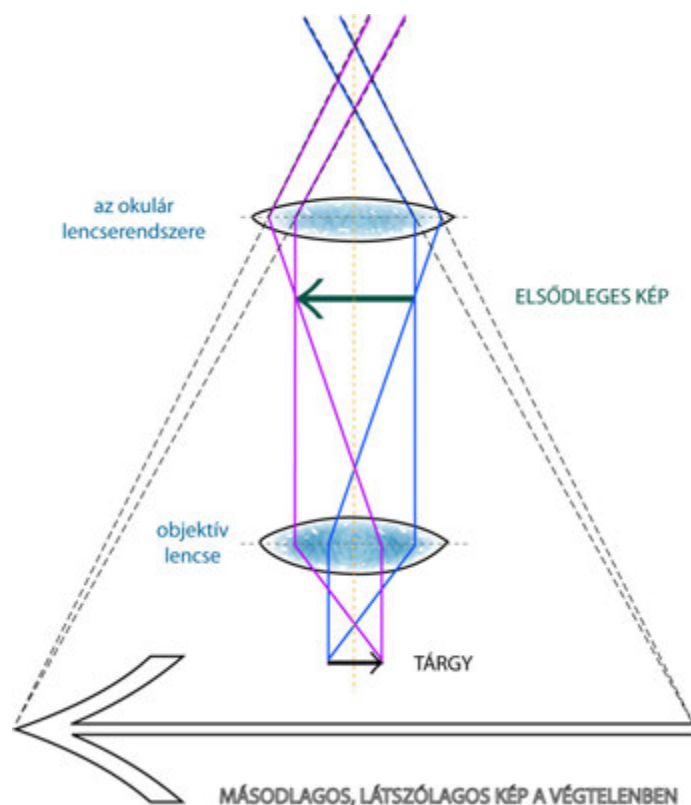
2.87. ábra. Síkba vetítő, „PL” jelzésű okulárok a foglalatukban: jól láthatók az okulárok és a prizmaház jelzései

A mikroszkópi képalkotás és a mikroszkóp beállítása

A fénymikroszkóp képalkotása és nagyítása

A mikroszkóp objektívje a tárgyról (metszetről, kenetről) egy **valódi képet vetít** a tubusba, az okulár mezőrekeszének síkjába. Ezt a képet az **okulár továbbnagyítja**; így alakul ki a mikroszkópban látott kép (2.88. ábra). Másképpen fogalmazva: a helyzet ahhoz hasonló, mint amikor egy vetített képet egy nagyítóval továbbnagyítunk. **A mikroszkópi kép minőségét elsősorban az objektív sajátosságai határozzák meg.** Ezt könnyű belátni, hiszen az okulár az objektív által létrehozott képben új képpontot nem képes létrehozni, a képpontokat csupán nagyítja.

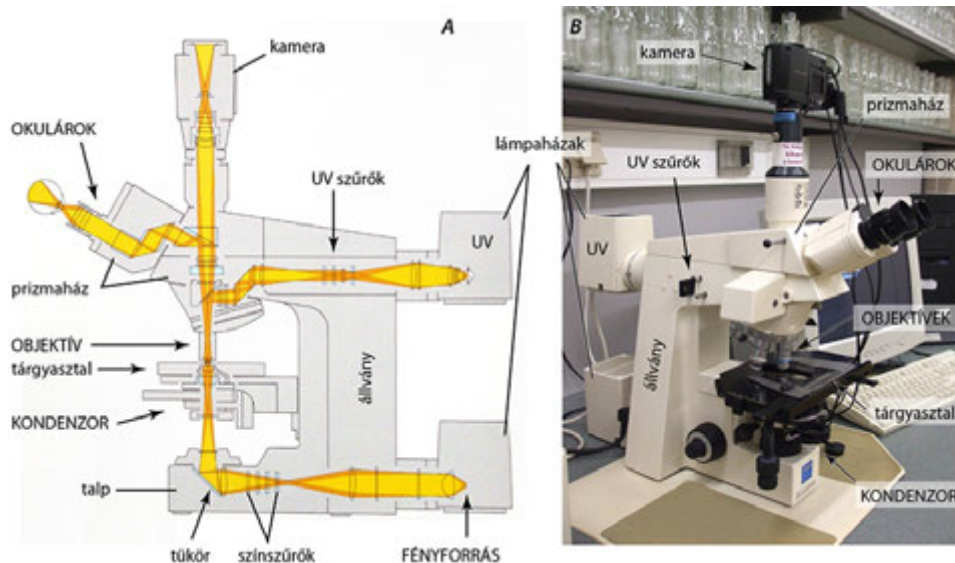
A mikroszkóp összetett lencserendszer, amelynek nagyítása az objektív, az okulár és a kettő között, a prizmaházban (l. 2.89. ábra) elhelyezett lencsék nagyításának szorzata: **mikroszkóp nagyítása = objektív nagyítása x köztes lencsék nagyítása x okulár nagyítása**. Amikor tehát 40-szeres nagyítású objektívet, 10-szeres nagyítású okulárt használunk egy olyan mikroszkópban, amelynek a prizmaházában elhelyezett köztes lencsék nagyítása egyszeres (l. 2.87. ábra), akkor a mikroszkóp nagyítása $40 \times 10 \times 1$, azaz 400-szoros.



2.88. ábra. Az összetett fénymikroszkóp képképzése: az objektív által létrehozott valódi, fordított állású képet az okulár lencserendszere továbbnagyítja

Egy általános **fénymikroszkóp felépítése** a következő. Az optikai elemeket és foglalatokat az állvány tartja, amely **talpon** áll. A **fényforrást** és a fénysugarakat a kondenzorra vetítő tükröt ez utóbbiban helyezik el az esetleges színszűrőkkel együtt. Ha van, az UV megvilágítást biztosító lámpa házázt az állványra rögzítik, amellyel a mintát felülről, az objektíven keresztül gerjesztik (epifluoreszcenciás megvilágítás). Az **állvány** (statív) tartja a mintát hordozó, mozgatható (esetleg forgatható) **tárgyasztalt** (l. 2.89. ábra) és az objektívet magába foglaló **revolver foglalatot**, valamint a **prizmaházat**. Az ebben elhelyezett prizmarendszer a fénnyt megosztását biztosítja az **okulárok** és a **fényképezőgép** között (2.89. ábra).

Amennyiben a műszerrel UV megvilágítással is dolgozhatunk, illetve fényképezőgépet vagy kamerát is csatlakoztatunk hozzá, akkor azt érdemes egy jól besötétíthető helyiségben elhelyezni.



2.89. ábra. Kutatómikroszkóp belső felépítése (A) és oldalnézete (B): a sugármeneteket a fényforrásoktól követve megtaláljuk a tükröt, a képkalkító lencsét, a prizmákat és a képrögzítő kamerát (az UV fény itt epifluoreszcenciás megvilágítást tesz lehetővé)

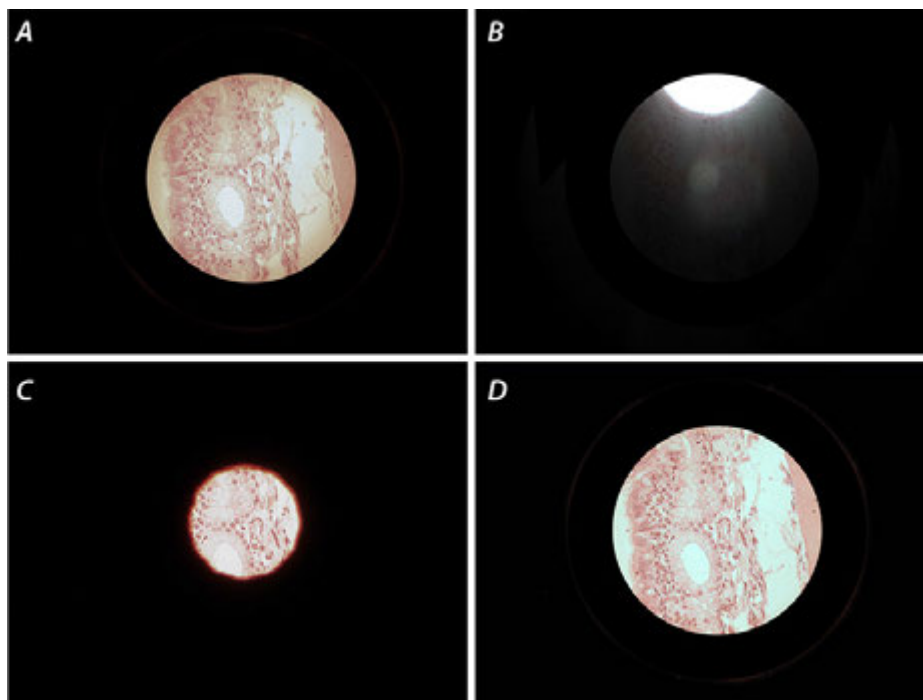
A feloldóképesség kihasználása: a Köhler-féle beállítás lépései

A kevert fénnel működő mikroszkóp felbontóképessége elsődlegesen az objektívtől, annak **numerikus apertúrájától** és a **kondenzor** minőségétől függ.

Ahogy azt már korábban írtuk, a felbontóképességet azzal a minimális távolsággal ($d_{\min}$) határozzuk meg, amelynél két pontot még különállónak látunk (d =feloldási határ).

A **felbontóképesség függ** a lencsék minőségétől, numerikus apertúrájától (l. Abbe-képlet), a tükröződést gátló rétegek minőségétől. Az optimális képkalkotáshoz igen fontos a **mikroszkóp Köhler szerinti beállítása**, amelynek lépései a következők (2.90. ábra).

1. A mikroszkóp fényforrásában, lámpaházában az izzó spirálját a fénykilépő nyílás központjába állítjuk. Ezzel a lépéssel a mikroszkópba belépő fénysugarat a mikroszkóp kondenzorig vezető optikai rendszerének középpontjába állítjuk.
2. A kondenzorba vetítő tükröt, ha az mozgatható, úgy állítjuk be, hogy a róla visszaverődő fénysugár a kondenzor felé tekintő fénykilépő ablak közepén haladjon át.
3. Az okulárba nézve élesre állítjuk a preparátum (metszet) képét (2.90.A ábra).
4. Leszűkítjük a lámpamező rekeszt (l. 2.75. ábra), majd a kondenzort addig emeljük vagy süllyesztjük, amíg a rekesz nyílásának széle éles lesz (2.90.B ábra). Következő lépésként a kondenzor központosító (centráló) csavarjainak segítségével a rekesz képét a látótér közepére hozzuk (2.90.C ábra). Ezután a lámpamezőrekeszt addig nyitjuk, amíg az éppen elhagyja a látótér.
5. Teljes mértékben kinyitjuk az apertúrarekeszt a kondenzoron, majd addig szűkítjük azt, ameddig a látótérben a fényerő csökkenni kezd. Az objektív feloldóképessége teljesen nyitott apertúrarekesznél a legjobb, de ilyenkor kontrasztja minimális, ami a tájékozódást megnehezíti. Az apertúrarekessel igazából egy olyan köztes helyzetet hozunk létre, amelyben a feloldóképesség (felbontóképesség) még megfelelő, ugyanakkor a kontraszt is kielégítő (2.90.D ábra).



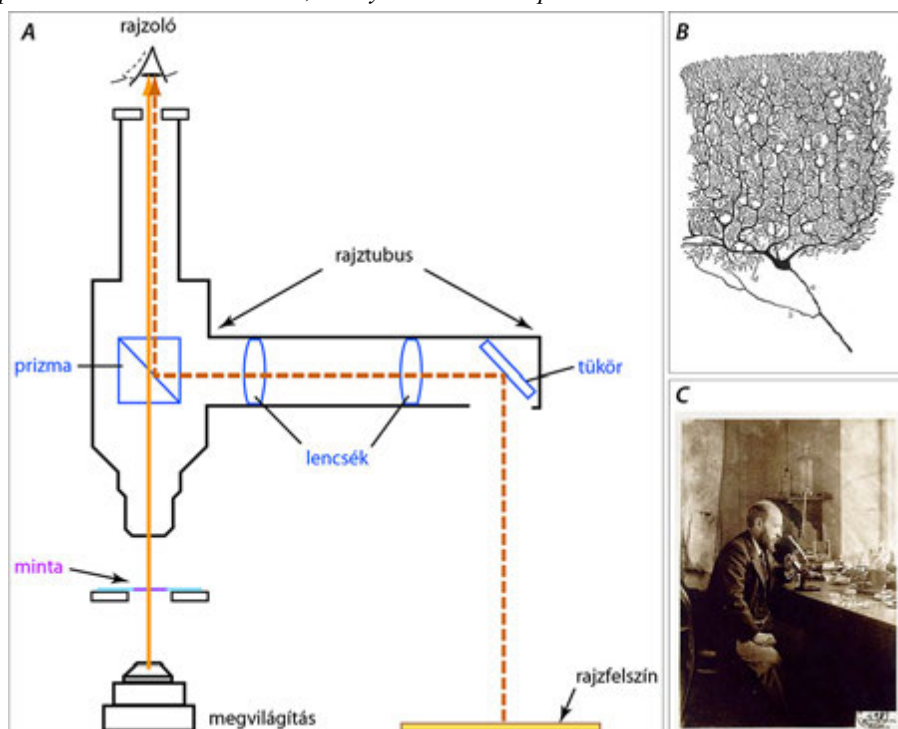
2.90. ábra. A mikroszkóp Köhler szerinti beállításának fő lépései: a kiindulási állapot egyenetlen megvilágítással és élességgel (A); a mezőrekesz leszűkítése és szegélyének élesre állítása: egyértelmű, hogy az objektívbe érkező fénykúp tengelye nem esik egybe az objektív tengelyével (B); a kondenzor központozása a beállítócsavarok segítségével, a megvilágító fénykúpot a látótér középre állítjuk (C); a mezőrekesz kinyitása és a kondenzorblende beállítása után a látótér egyenletesen megvilágítottá válik, a kép részletgazdag és mindenütt éles (D)

Speciális mikroszkóptípusok és mikroszkópi eljárások

Mikroszkópi rajzolóeszköz (camera lucida²²)

Ez egy olyan, a fénymikroszkópokhoz csatlakoztatható eszköz, amellyel a mikroszkópi preparátumról pontos rajzot készíthetünk. A tubushoz csatlakoztatható eszközben lévő tükör, néhány lencse és egy félig áteresztő prizmapár segítségével a mikroszkóp melletti asztalfelület, illetve az erre helyezett papír és a papírra helyezett ceruza bevetíthető a mikroszkóp látóterébe (2.91. ábra). Amennyiben le akarjuk rajzolni egy elágazó nyúlványrendszerrel rendelkező neuron képét, a camera lucida segítségével ezt maximális pontossággal megtehetjük.

Az eszköz használatának akkor volt nagy jelentősége, amikor a fotóanyag ritka és drága volt, valamint olyan fényképezőgépek nem álltak rendelkezésre, amelyeket mikroszkópra szerelve lehetett volna használni.



2.91. ábra. A camera lucida elve (A), Cajal egyik ilyen készülékkel rajzolt rajza (Purkinje-sejt) és az alkotó maga saját laboratóriumában (C)

A készüléket, másfajta kialakítással alakok, személyek rajzolásához is felhasználták (2.92. ábra).

²² camera: kamra, lucida: világos



2.92. ábra. Portré rajzolás *camera lucida* segítségével

A fáziskontraszt mikroszkóp

Frits **Zernike** (1888–1966) alkotta meg a fáziskontraszt mikroszkóp működését meghatározó fizikai alapokat. Ennek alapján magát a készüléket 1936-ban vitte piacra a Zeiss, természetesen Zernikével karöltve. Zernike 1963-ban **Nobel díjat** kapott (2.93. ábra).

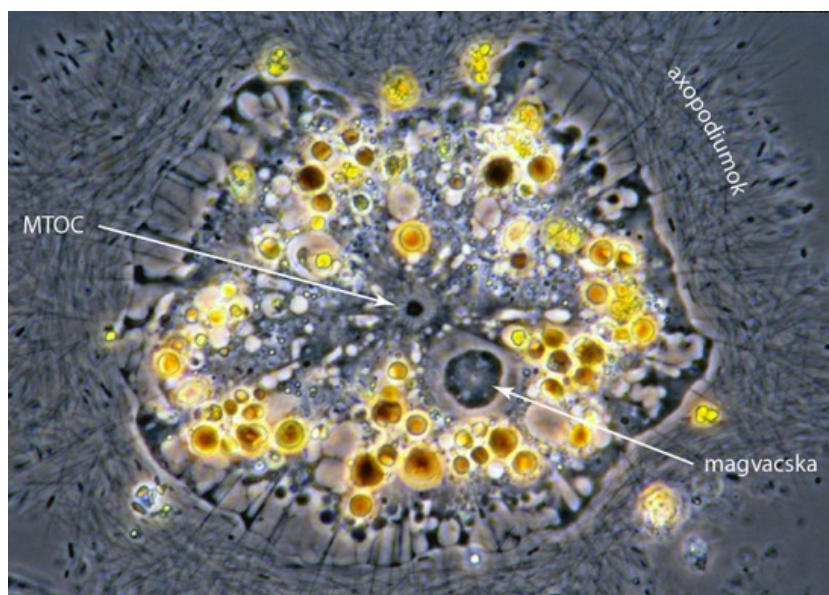


2.93. ábra. Frits Zernike Nobel-díj Bizottságnak leadott fényképe az aláírásával

A fáziskontraszt mikroszkóp működését a maga fizikai, műszaki részleteiben nem írjuk le; csak a **leglényegesebb vonatkozásokra** térünk ki, amit egy biológusnak is ajánlatos tudnia.

A mikroszkóppal **átlátszó élő sejteket és szöveteket** festés és minden egyéb kezelés nélkül is vizsgálhatunk, méghozzá a felbontóképesség csökkenése nélkül.

Vannak olyan tárgyak, sejt- és szövetrészek, amelyekben a készítményen, illetve annak részletein áthaladó fény a mintában lévő részek sűrűségkülönbsége miatt fáziseltolódást szenved. A fáziseltolódásokra az emberi szem nem érzékeny, ezért a fáziseltéréseket okozó struktúrákat egy egyszerű fénymikroszkópban nem látjuk. A fáziskontraszt mikroszkóp **a fáziseltéréseket intenzitásbeli, azaz kontrasztkülönbségekké alakítja**, amit már látunk, érzékelünk (2.94. ábra). Erre utal a neve is: fáziskontraszt.



2.94. ábra. Fáziskontraszt felvétel: festetlen, élő sejtben jól láthatók egyes sejtszervecskék, fagocitált táplálékszemcsék (sárgásbarna beltartalmú vakuólumok), a sejthártya és a vékony axopódiumok (napállatka, *Heterophrys myriapoda*)

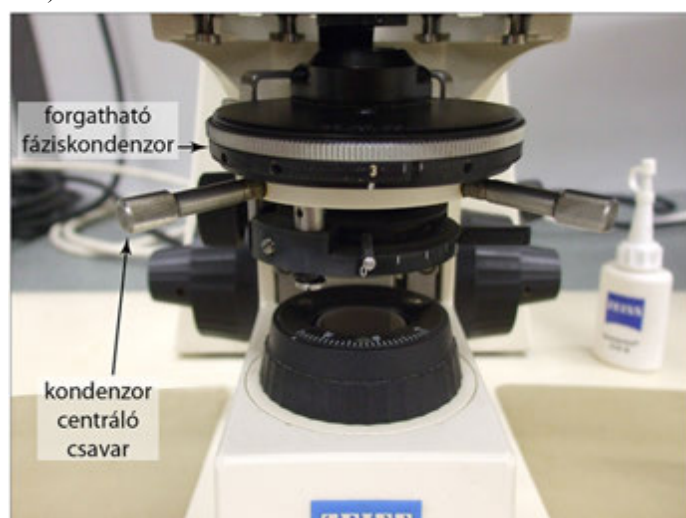
A fáziskontraszt berendezést általában külön készletként lehet megvásárolni, de olyan mikroszkópok is léteznek, amelyekbe ez az együttes gyárilag be van építve, vagy amelyet közvetlenül fáziskontraszt mikroszkópként gyártanak.

Mi van egy ilyen felszerelésben?

Van benne egy **zöld szűrő**, ugyanis a zöld szín alkalmazása mellett a legintenzívebb a fázishatás.

Van benne egy speciális, **forgatható fáziskondenzor**. Ebben különböző gyűrű alakú, fényt áteresztő részek (úgynevezett **gyűrűdiafragmák**) vannak (2.95.C ábra). A gyűrűkön kívüli területek feketék, a fényt nem eresztik át.

Felszerelés előtt tartsuk a fény felé a kondenzort, úgy, hogy a 0 jelű, „üres” szektort állítsuk be. Egyenletesen megvilágított területet látunk, olyat, mint akármelyik mikroszkópban. Az 1. jelű szektor beforgatásával egy viszonylag nagy átmérőjű fényt áteresztő gyűrűt látunk. Ez való a 10-szeres nagyítású objektívhez. A 2. jelű szektor beforgatásával a kép ugyanolyan, mint az előző esetben, de a fényáteresztő gyűrű átmérője kisebb. Ezt alkalmazzuk a 20-szoros és 40-szeres nagyítású objektívekhez. A 100-szoros nagyítású objektívek használatakor forgatjuk be a 3. jelű szektort (2.95. ábra).



2.95. ábra. Fáziskondenzor: jól láthatóan a hármasszempozíciójú gyűrű van a fényútban

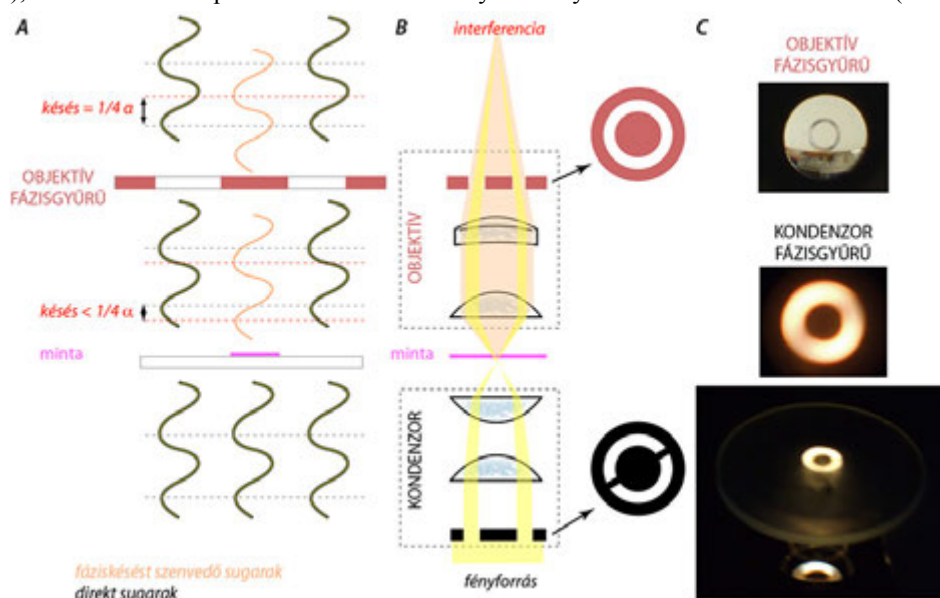
A gyűrű alakú fényáteresztő részek miatt a kondenzor a tubusba egy hengerpalást vagy kúppalást alakú fényt vetít (2.96. ábra).

Most nézzük meg a **fázisobjektíveket**! Ezeket a fény felé tartva némiképp átlátszó gyűrűket látunk az objektív látóterében (2.96.C ábra). Ezek a rajtuk áthaladó fényben fáziskésést eredményeznek. (Jelentőségét lásd alább!)

Ha most a helyére tesszük a fáziskondenzort, és becsavarjuk a revolver foglalatba a fázisobjektíveket, mikroszkópunk vizsgálatra kész.

Először a kondenzor üres állása mellett megkeressük a preparátumot, a készüléket élesre állítjuk, és beállítjuk a megvilágítást **Köhler szerint**. A továbbiakban figyeljünk arra, hogy az egyes objektívekhez a nekik megfelelő kondenzorállásokat alkalmazzuk (lásd fentebb).

A fázishatás elvi alapjai: a megvilágító fény a gyűrűdiafragmán áthaladva, a tárgy síkjába fókuszálódva megvilágítja a preparátumot, illetve annak közvetlen környezetét (2.96.A ábra). Ezután a fény két úton halad tovább. Egyrészt a metszet környezetében, természetes állapotában, diffrakció nélkül, így egy henger- vagy kúppalástnak megfelelő alakzatban éri el az objektívet, és annak fázisgyűrűjét (2.96.B ábra). Másrészt a preparátumba belépve, annak átlátszó, de különböző sűrűségű részein áthaladva lelassul és így fáziseltolódást szenved a hengerpalástszerűen terjedő „referencia”, direktsugarakkal szemben (2.96.A ábra). A keletkező fáziseltérést a szem nem tudja érzékelni. Amennyiben ezt a **fázisdifferenciát** az objektívbe helyezett fényáteresztő fázisgyűrű segítségével $\frac{1}{4}$ hullámhosszal **megnöveljük**, a referenciafény és a metszeten áthaladó fény között interferencia (erősítés vagy kioltás) lép fel (2.96.B ábra), és a keletkező kép a fáziskésést okozó helyen környezeténél kontrasztosabb lesz (2.94. ábra).



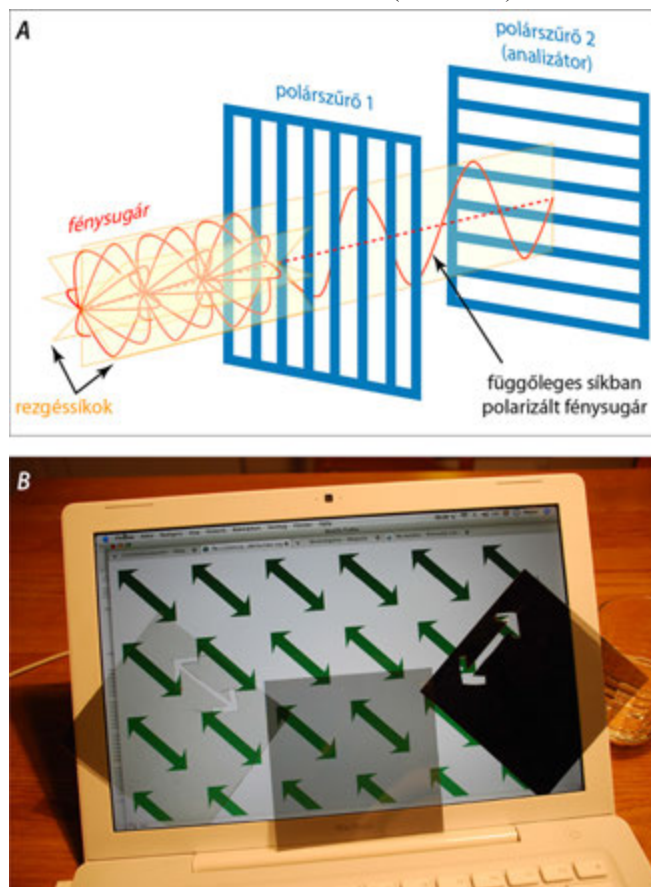
2.96. ábra. A fáziskontraszt mikroszkóp működési elve: egyes, a fényforrásból a kondenzoron át érkező sugarak a mintán fáziskésést szenvednek, amit az objektív gyűrűdiafragmája megnövel (A); a késést nem szenvedő és az adott hullámhosszal késő sugarakat az objektív fókuszálja (B): itt a fellépő interferencia következtében a találkozó hullámok vagy kioltják, vagy erősítik egymást (kontraszt alakul ki); gyűrűdiafragmák felülnézeti képe rajzon és a valóságban (C)

A polarizációs mikroszkóp

A készüléket többnyire már eleve ilyenként gyártják, de vannak olyan polarizációs készletek, amelyeket fénymikroszkópokra szerelve eszközünket polarizációs mikroszkópként is használhatjuk.

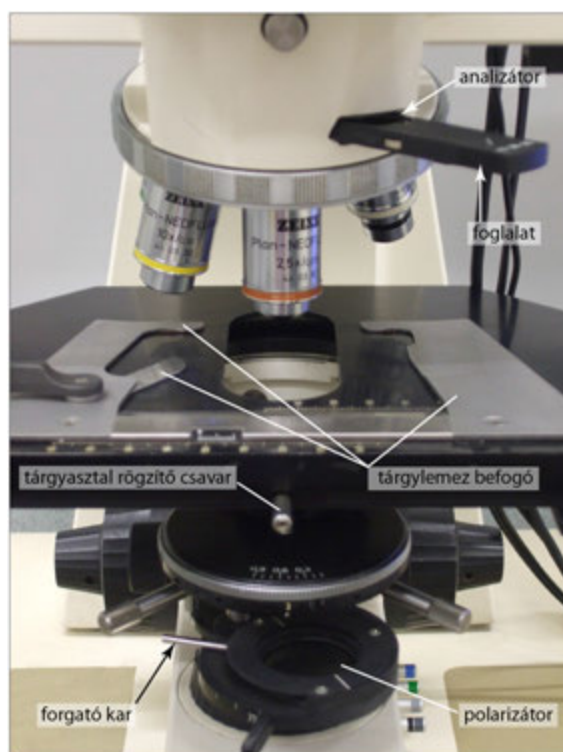
Először röviden **néhány alapgölem** a fénypolarizációról. A fény a terjedés síkjára merőlegesen, s egyben a tér minden irányában rezeg. Ha a fény útjába **polarizációs szűrőt** helyezünk, a szűrő – amelyet egy rácshoz is hasonlíthatunk – a minden irányban rezgő fényből csak egy rezgéssíknak megfelelően, a rácscok között engedi át a fényt. Az ilyen fényt polarizált (**síkban polarizált**), azaz csak egyetlen síkban rezgő fénynek nevezzük. A sima felszínekről (üvegfelületek, nem hullámzó vízfelszín stb.) visszaverődő csillogó fény ugyancsak polarizált.

Ha a polarizált fény útjába egy **másik polarizációs szűrőt** helyezünk, a szűrő (rács) állásától függően a fény vagy tovaterjed, vagy képtelen átjutni a szűrőn. Az előbbi esetben a két rács párhuzamos állású, azaz pl. mindkettő kelet–nyugati helyzetben van, az utóbbiban keresztezett helyzetű. Ez azt jelenti, hogy ha az egyik szűrő kelet–nyugati helyzetben van, a másik észak–déli orientációval rendelkezik (2.97. ábra).



2.97. ábra. A polarizáció jelensége és a polarizációs szűrők: a minden irányban rezgő fotonok közül polarizációs szűrővel (polárszűrő 1) kiválaszthatjuk a szűrő orientációjának megfelelő síkban rezgőket. Egy második szűrővel ezek útját lezárhatjuk, így a kereszthe állított szűrők rendszerén egyetlen fénysugár sem hatolhat át (A). A felületi csillogás kialakulásának megakadályozására egyes monitorok polarizált fényt bocsátanak ki, amelyet megfelelően elforgatott polarizációs szűrővel kiszűrhetünk. A B ábrán a szürke, monitor elé tartott lapok a szűrők. „Rácsozatuk” orientációját a szűrőből kivágott kétféjű nyílak jelzik. Látható, hogy a legtöbb fény akkor éri a szemünket, amikor ez a nyíl a monitor által mutatott zöld nyilakkal párhuzamosan áll, de amikor azokra merőleges a pozíciója, egyetlen fénysugár sem jut el hozzánk

A polarizációs mikroszkópban két polarizációs szűrő van. Az egyik a tárgy alatt (**polarizátor**), a másik pedig az objektív felett (**analizátor**) helyezkedik el (2.98. ábra). Amennyiben a két szűrő („rács”) párhuzamos állású (pl. mindkettő úgymond kelet–nyugati irányú), akkor a látóterünk világos lesz. Ha a két szűrő („rács”) keresztezett helyzetben van, azaz a polarizátor kelet–nyugati, az analizátor észak–déli állású, látóterünk sötét.

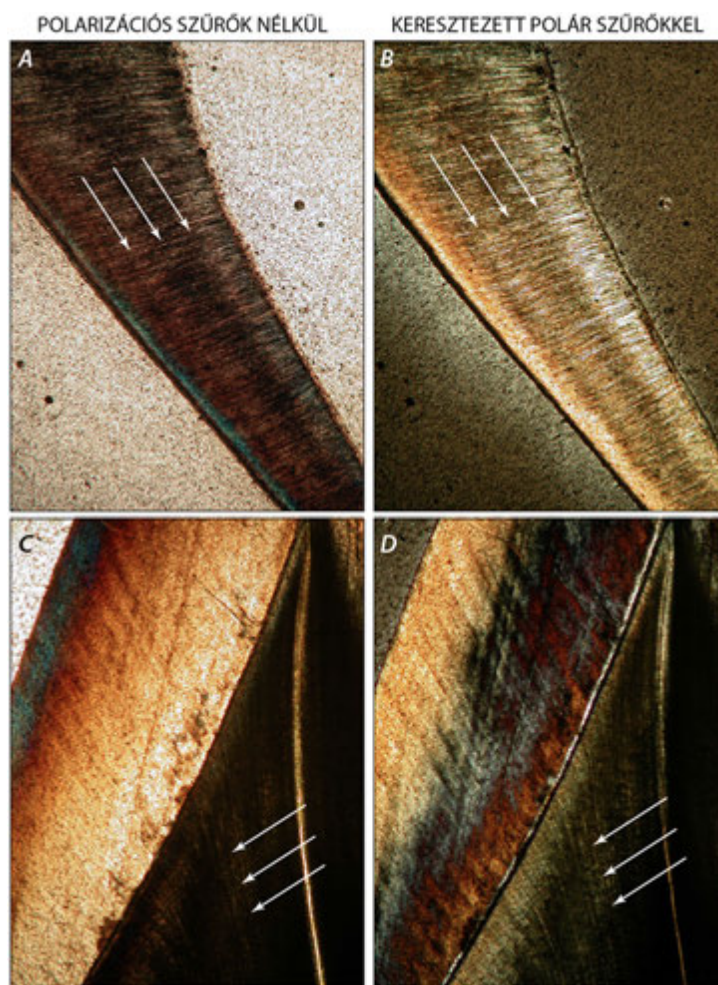


2.98. ábra. Mikroszkóp polarizációs felszerelése: polarizátor (amely egy összetett kondenzor része, kihajtottuk, rajta egy kis kar van, amellyel elmozdítható), analizátor (foglalatát nem töltük be teljesen a helyére, hogy a szűrő látható legyen,) és forgatható tárgyasztal

Ha a tárgyasztalon vagy a metszetben **kettősen törő tárgy** vagy tárgyrészlet (pl. valamilyen kristályos anyag, vagy nagymértékben rendezett struktúra: harántcsikolt izomszövet, idegrostok együttese, csont- vagy porcszövet) van, a kettőstöréssel rendelkező részletek a sötét látótérben felfénylenek (2.99. ábra).

Ennek magyarázata az, hogy a kettősen törő tárgyak megváltoztatják a rájuk eső, rajtuk áthaladó polarizált fény síkját, amely ennek következtében képes áthaladni az analizátoron, és így láthatóvá válik.

Hogy ez a felfénylés látható-e, az attól is függ, hogy a mikroszkóp **tárgyasztala milyen állásban van**. Ha a tárgyasztalt körbeforgatjuk (ennek lehetőségét l. 2.98. ábra), a kettőstörő minta egyszer kivilágosodik, majd elsötétül. Ebből következik, hogy a kettőstörés észlelése attól is függ, hogy a tárgy az analizátorhoz képest milyen helyzetben van.



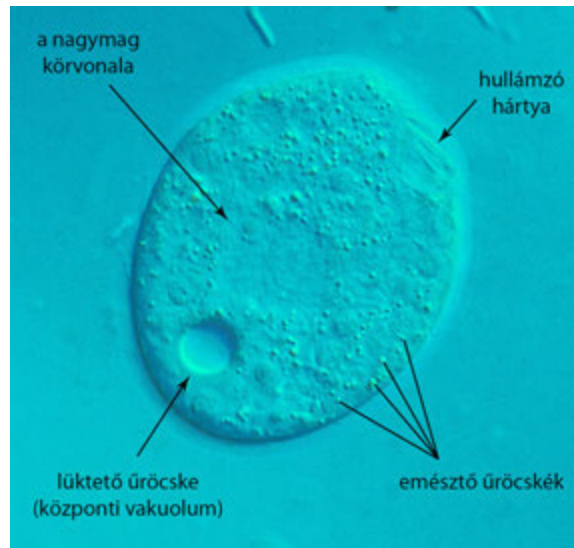
2.99. ábra. Fogcsiszolat polarizációs mikroszkópban: ugyanazon részleteknek a képe párhuzamos (A, C) és keresztezett (B, D) szűrőállásnál: a fehér nyilak olyan részletekre (dentincsatornákra) mutatnak, amelyek a keresztezett állásnál fénylenek, míg a háttér itt sötét

A differenciál interferencia kontraszt (DIC) mikroszkóp

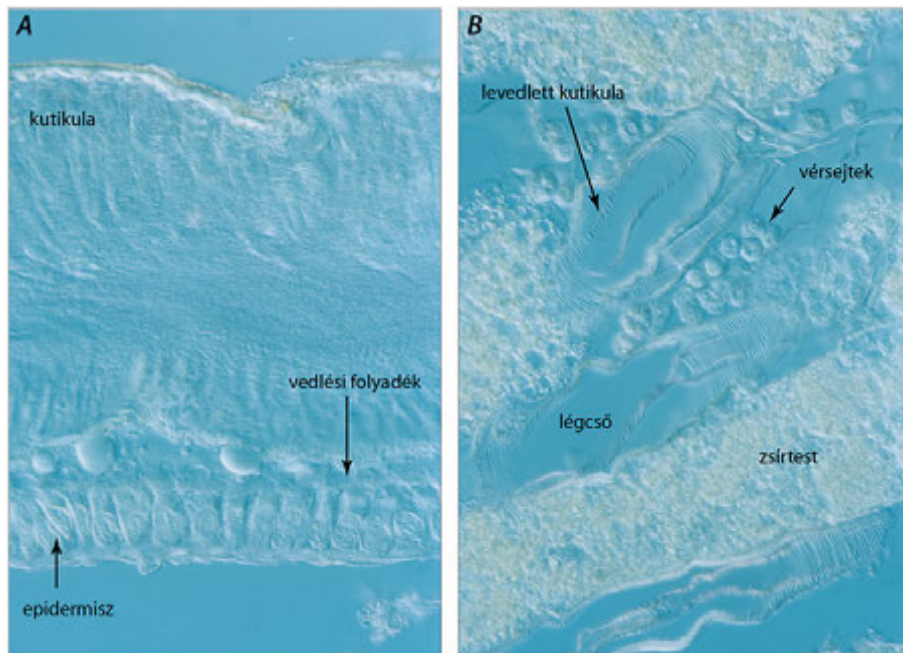
Festetlen, áttetsző, átvilágítható minták (egysejtűek, kenetek, kisebb állatok, metszetek) vizsgálatára alkalmas berendezés, amely hasonló képet alkot, mint egy fáziskontraszt mikroszkóp, de ez a kép csillogó fényudvarok (2.100. ábra) nélküli.

A mikroszkóp polarizált fényt állít elő, amelyet egy speciális prizma két, egymásra merőleges síkra terel. Ezzel világítjuk meg a tárgyat. Ennek bizonyos pontjai az egyik sugármenetben fáziseltolódást okoznak a másik, úgynevezett referenciasugárhoz képest. Ha ezután a merőleges síkú sugarakat egymásra vetítjük, azaz egy újabb prizmával egyesítjük, akkor mivel már azonos síkban folytatják útjukat, interferencia léphet fel közöttük. Ez a két sugármenet egymásra vetített képét hordozó, egyesített sugár még egy polarizációs szűrőn áthaladva (itt nem részletezett módon) végül is térhatású képet alakít ki (2.100. és 2.101. ábra).

Az eljárás, illetve a mikroszkóp másik neve Nomarski interferencia kontraszt (NIC) mikroszkóp.



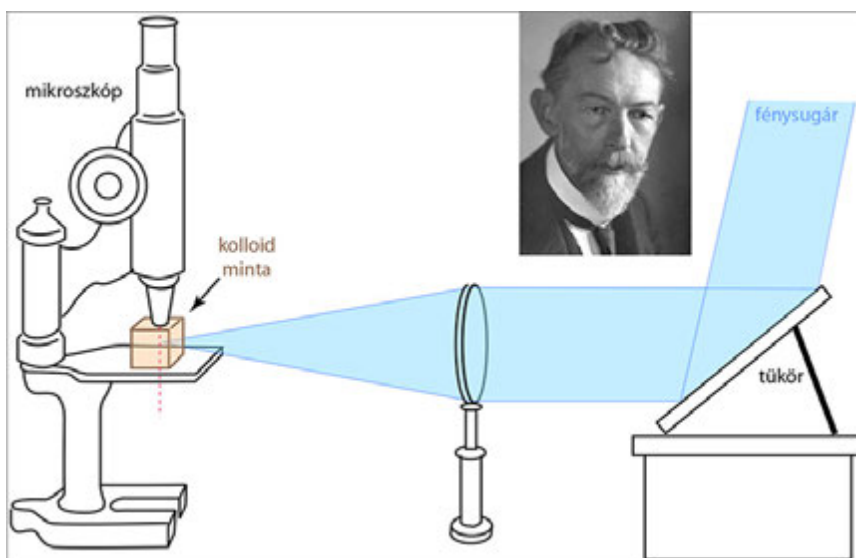
2.100. ábra. Egysejtű DIC felvétele: a kép részletgazdag, a sejtalkotók kitűnően látszanak rajta (*Tetrachymena* faj)



2.101. ábra. Festetlen metszetről készült DIC felvétel (dohányszender lárva, vedlő stádium)

Az ultramikroszkóp

Az ultramikroszkópot Henry **Siedentopf** (1872–1940) és **Zsigmondy Richárd** (1865–1929), Nobel-díjas (1925) **kolloidkémikus** (2.102. ábra) fejlesztette ki a Zeiss művekkel karöltve.



2.102. ábra. Zsigmondy Richárd portréja és az ultramikroszkóp vázlata

Alapelve a következő. Amennyiben egy oldatban a részecskék mérete nem haladja meg a megvilágító fény hullámhosszát (kb. 500 nm-es méretről van szó), az adott részecske nem látható. Ha viszont a rendszert oldalról erős fényrel világítjuk meg, és ezzel fényszóródást és visszaverődést okozunk, a fenti méretnél sokkal kisebb részecskék is megfigyelhetővé válnak. Ezen, a hétköznapi életből is ismert, úgynevezett **Tyndall**²³-**jelenségen** (2.103. ábra) alapul az ultramikroszkóp működése. A készülékkel folyadékokban a Brown-féle mozgás is érzékelhetővé válik, és aeroszolok, valamint kolloid oldatok is vizsgálhatók.



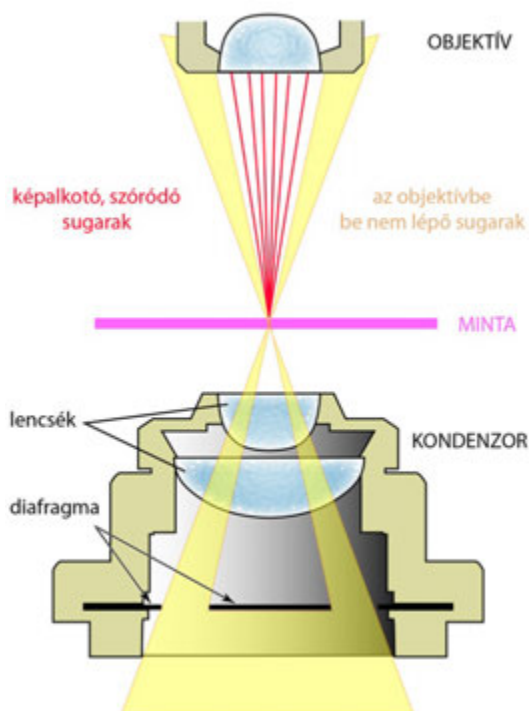
2.103. ábra. Tyndall-jelenség: fényszóródás a levegő szabad szemmel nem látható részecskéin

A sötét látóterű mikroszkóp

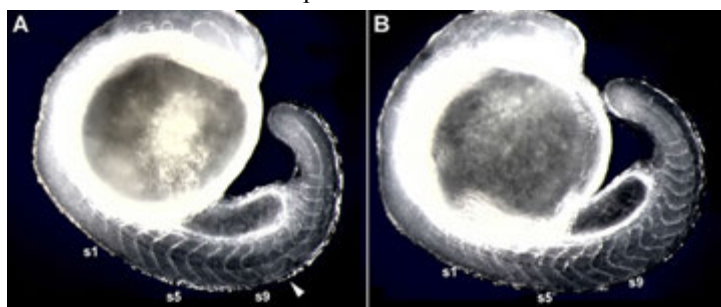
Ebben a vizsgálati módban a kondenzorból kilépő erős fényrel oldalról és kis szögben világítjuk meg a tárgyat. A **sötét látóterű kondenzor** speciális kiképzése miatt a megvilágító fény nem jut be az objektívbe. Ha viszont ez a fény a tárgyasztalon lévő kis részecskéken, csillókon szóródik, a fényszóródást okozó struktúrák a sötét látótérben felragyognak (2.104. ábra). A sötét látóterű mikroszkóppal kitűnően vizsgálhatók egysejtűek, csillós egysejtűek,

²³ John Tyndall (1820–1893) író fizikus volt

élő csillós struktúrák, áttetsző embriók és kisebb lárvák (2.105. ábra). Hátránya a módszernek, hogy a csillogás miatt a felszín alatti struktúrák nem figyelhetők meg.



2.104. ábra. A sötét látóterű mikroszkóp működésének alapja: a kondenzor speciális rekesze (diafragmája) azokat a sugarakat szűri ki, amelyek az objektívbe jutnának, így csak a tárgy pontjain szóródó fénysugarak vesznek részt a kép kialakításában



2.105. ábra. Szelvényszámot érintő fejlődési rendellenesség kimutatása sötét látótér alkalmazásával: az A képen fehér nyílhegy mutat oda, ahol a B ábrán szereplő kontroll állatban egy kötőszöveti sövény húzódik: a bal oldali állatban tehát ennek a sövénynek a hiányát látjuk, ami az itteni őscsigolya állomány, azaz egy szelvény hiányára utal (zebrahal embriók)

A fluoreszcens mikroszkóp

A fluoreszcencia jelenségéről, a fluoreszcens mikroszkóp felépítéséről, a minták készítésének módjáról – a módszer széles körű alkalmazási lehetőségei és jelentősége miatt – külön, a 3. fejezetben szólunk részletesen.

Kérdések és feladatok

1. Mire kell ügyelnünk a szövettani mintavétel kapcsán?
2. Milyen módszerekkel lehetséges élő sejtek vagy szövetegységek vizsgálata?
3. Mit nevezünk vitális festésnek, és milyen festékanyagok alkalmazhatók erre a célra?
4. Mit tud a vérkenetek vizsgálatáról, milyen módon kell elkészíteni egy kenetet?
5. Milyen vérkenet-festési módszereket ismer?
6. Mondjon példát exfoliatív citológiai vizsgálatra, aspirációs biopsziára és elemezze a felhozott példákat!

7. Mondjon példát egésztest-készítmények előállítására és festésére, alkalmazhatóságára!
8. Mikor alkalmazhatunk és alkalmazunk autoradiográfiás módszereket, és milyen esetben lehet szükségünk korroziós készítmények előállítására?
9. Mit jelent a mikrotechnika fogalma? Mi az eljárás fő célja? Mit nevezünk műterméknek?
10. A szövettani metszetek készítésének kezdeti lépései: a mintavétel, a fixálás és a kimosás. Mondjon példát fixálószerkre és fixáló keverékekre, indokolja meg, hogy a legtöbb esetben miért előnyösebb a fixáló keverékek használata! Mit nevezünk hordozó oldatnak, s miért adjuk a rögzítőhöz? Mi az immerziós és a perfúziós fixálás lényege? Mit takar a kimosás fogalma, s miért van rá szükség?
11. Mutassa be a víztelenítés és a beágyazás lépéseit, a paraffin blokk előállításával bezárólag! Melyek azok a főbb hibák, amelyek elkerülésére gondot kell fordítanunk? Mik a beágyazószerszettel szemben támasztott fő követelmények? Nevezzen meg beágyazószereket! Foglalja össze röviden a beágyazó automaták működését!
12. Mutassa be röviden a mikrotomok típusait és alkalmazhatóságukat! Mi a vibratom? Mi határozza meg azt, hogy melyik eszközzel dolgozunk?
13. Milyen vastagok a fénymikroszkópos metszetek? Mik az úgynevezett félvékony metszetek és milyen esetben készítünk ilyeneket? Hogyan rögzítjük a parapsztos metszeteket a tárgylemezre?
14. Hogyan készítené szövettani vékonycsiszolatot? Egy ilyen készítmény milyen vizsgálatokra alkalmas?
15. A szövettani metszetek festése és lefedése: melyek a leggyakoribb festési eljárások, mit tud ezek alkalmazhatóságáról? Mi a mikrotechnikai festékek alkalmazhatóságának alapja? Mutasson be általános tájékozódásra alkalmas festés(ek)e)t, nevezze meg a festékeket és írja le a festés eredményét!
16. Nevezzen meg speciális kimutatásokra alkalmas festési eljárásokat a festékek megnevezésével és a festés eredményének bemutatásával!
17. Milyen követelményeket támasztunk a lefedő anyagokkal szemben?
18. Mit jelent a hisztokémia kifejezés és milyen esetekben alkalmazunk hisztokémiai módszereket? Mutasson be három ilyen módszert!
19. Milyen műtermékek keletkezhetnek a szövettani feldolgozás során, milyen okokra vezethetők vissza ezek a jelenségek és miképpen lehet ezeket kiküszöbölni?
20. Tekintse át a fénymikroszkópok kialakulásának történetét és a mikroszkópépítés és tervezés néhány úttörőjének munkásságát!
21. Mit tud az optikai lencséről, a fénytörésről és a képalkotás törvényszerűségeiről?
22. Mik a főbb lencsehibák és mik ezek tünetei és okai?
23. Hogyan épül fel egy modern fénymikroszkóp, mik az egyes alkotórészek funkciói? Mik a mikroszkóp beállításának főbb lépései? Ismertesse a Köhler-féle módszer lényegét!
24. Mit tud az adott tubushosszal rendelkező, illetve a végtelenre korrigált lencsékkel dolgozó mikroszkópokról?
25. Milyen felépítésű egy fénymikroszkóp fényforrása? Mi a színszűrők jelentősége és milyen a kondenzor felépítése és ez utóbbi szerepe a mikroszkóp működésében? Mi a lámpamezőrekesz és az apertúra-rekesz jelentősége? Mit tud a mikroszkópok tárgyasztaláról és a metszetek mozgásáról?
26. Mit tud a mikroszkópok objektívjeiről? Milyen feliratok szerepelnek az objektíveken és mi ezek jelentése?
27. Ismertesse az okulárok elemeit, az okulár jelentőségét és típusait!
28. Az immerziós lencsék és ezek alkalmazásának alapja: miért van szükségünk az immerziós olajra? Milyen igényeket támaszt a mikrofelvelelek készítése, mire kell ügyelnünk?
29. Elemezze a mikroszkópi kép keletkezésének folyamatát! Mit tud a sötét látóterű mikroszkópról és ennek jelentőségéről, alkalmazhatóságáról?
30. A mikroszkópi rajzolás eszköze és jelentősége: milyen eszköz a *camera lucida*?
31. Mutassa be a fáziskontraszt mikroszkópot: mi a működési elve, milyen a kondenzora és az objektívjei, mi a felhasználásai köre?
32. Ismertesse a kettőtörés jelenségét, a polarizációs mikroszkóp felépítését, ennek felhasználási körét és működési elvét!
33. Röviden mutassa be az ultramikroszkópot! Min alapszik a működése? Mit takar a DIC betűszó? Milyen objektumok vizsgálatára alkalmas az ilyen mikroszkóp?

3. fejezet - Fluoreszcens módszerek

Csikós György

Bevezetés

A sejtekben és részben a belőlük felépülő szövetekben zajló sejtbiológiai folyamatokban részt vevő géntermékek jelenlétének, lokalizációjának és funkciójának vizsgálatára két nagy, számos ponton érintkező és együttműködő metodikai lehetőség kínálkozik: az immunbiológiai, illetve a genetikai alapon nyugvó vizsgálati módszerek. Ezek alkalmazása esetén egy adott gén (DNS-szekvencia), vagy annak különböző szintű termékének (mRNS, egyszerű, illetve összetett fehérje) jelenlétére, sejten, vagy szöveten belüli elhelyezkedésére (lokalizációjára), illetve transzportjának dinamikájára, más molekulákkal való kölcsönhatásaira (interakcióira), valamint egy vizsgálati időszakon belül történő keletkezési és/vagy lebomlási sebességére (turnoverére) következtethetünk.

Ahhoz, hogy egy bizonyos szövet- vagy sejtkomponenst detektálni vagy vizsgálni tudjunk, azt egyértelműen, megbízhatóan és lehetőleg tartósan meg kell jelölnünk. Ha az alkalmazott jelölőanyag közvetlenül kötődik a szövetek vagy sejtek bizonyos alkotóelemeihez vagy (enzimek esetében) azok aktivitásához, és **látható fényben** teszi lehetővé a tárgy mikroszkópos vizsgálatát, akkor **klasszikus hisztológiai** vagy **enzimhisztológiai eljárásról** beszélünk. Ha viszont a jelölésre kiválasztott molekula ultraviola (UV) vagy látható fényrel gerjesztve **látható fényt bocsát ki** (emittál¹), és ez utóbbi teszi lehetővé számunkra a megjelölt sejt-, ritkábban szöveti komponens vizsgálatát, akkor **fluoreszcens metodikával** állunk szemben. Mivel a fluoreszkáló molekulák családja igen nagy, és nem csak természetes, hanem számos tervszerűen előállított szintetikus vegyületet is magába foglal, ezért a velük lefedhető alkalmazási terület jóval szélesebb, mint a klasszikus hisztológiai technikáké.

A számunkra látható fény (elektromágneses sugárzás) hullámhossztartománya kb. 380–760 nm között van. Ha ebben a spektrumban mindenhol egyenletes intenzitású a sugárzás, akkor a fényt (vagy a fényt visszaverő tárgyat) fehér színűnek látjuk. Ha viszont a megvilágított tárgy bizonyos hullámhosszúságú tartományokban jobban abszorbeálja (azaz véglegesen elnyeli) a fénysugarakat, mint a többiben, akkor azt a tárgyat színesnek fogjuk látni. Példának okáért, ha egy anyag erős elnyelést mutat a kék (420–480 nm) és a zöld (510–570 nm) tartományban, akkor az az anyag számunkra piros színben jelenik meg.

Általánosságban azokat a molekulákat, vagy molekularészleteket, amelyek képesek a látható spektrumból meghatározott hullámhosszúságú fényt abszorbeálni, **kromofóroknak** nevezzük.

Ezzel szemben **fluorokrómnak** nevezzük azokat a vegyületeket, amelyek megvilágítva, az őket fotonok formájában elérő energiát nem nyelik el véglegesen, hanem ezt felvéve gerjesztett állapotba kerülnek, majd igen rövid idő múlva a felvett energiát más hullámhosszú fény formájában kisugározva visszatérnek az alapállapotukba. A folyamat második felének (a gerjesztett állapotból az alapállapotba való visszatérés) történéseit **fluoreszcencia** elnevezés alatt foglalkozunk össze.

A fluoreszcencia jelenségét már nagyon régóta ismerik: a ránk maradt első írásos, spanyol nyelvű említése az 1560-as évekből származik, amikor is előbb Bernardino de **Sahagún** (3.1. ábra), majd pár évvel később Nicolai **Monardis** (3.2. ábra) vetette papírra érdekes megfigyelését, miszerint a *Pterocarpus indicus*, valamint az *Eysenhardtia polystacha*² nevű fákból készített, vesegyógyító főzet (a neve: *Lignum nephriticum*) erős napsütésben kékes fényt mutat³. Az évszázadokkal későbbi kutatások feltárták, hogy a jelenséget egy fluorokróm, a matlanin nevű flavonoid oxidált formája okozza.

¹ emisszió: a gerjesztés megszűnte után kibocsátott sugárzás

² http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Eysenhardtia_polystacha&action=edit&redlink=1

³ *Valeur és Berberan-Santos, 2011.*



3.1. ábra. Bernardino de Sahagún (1499–1590)



3.2. ábra. Nicolai Monardis (1493–1588)

A fluoreszcencia sajátosságai

A XIX. században sorra fedezték fel a fluoreszkáló anyagokat, így a fluoritokat, a klorofillt és a kinint. A fluoreszcencia esetében tapasztalható hullámhossz-eltolódás tudományos értelmezése és alaptörvényének megfogalmazása George **Stokes** (3.3. ábra) alapos kutatásainak köszönhető. 1852-ben publikált „Refrangibility” című cikkében ő használta először a fluoreszcencia kifejezést, és később ugyancsak az ő vizsgálatainak eredményeképpen vált világossá az, hogy a gerjesztő fény frekvenciája általánosságban mindig nagyobb, hullámhossza pedig kisebb, mint az emittált fényé (**Stokes-szabály**, Stokes, 1852).



3.3. ábra. George Gabriel Stokes (1819–1903)

A fluoreszcencia jelenségének korszerű, az alábbiakban vázlatosan ismertetett, elektron-szintű magyarázata Aleksander Jablonski (3.4. ábra) lengyel molekuláris fotofizikus munkája során kristályosodott ki⁴. 1933-ban publikált nevezetes diagramja (3.5. ábra) számos formában található meg a különböző tankönyvekben.

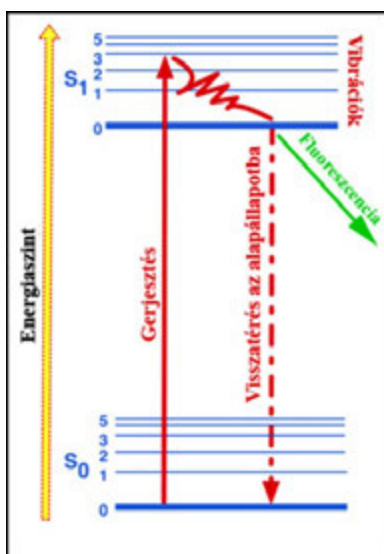


3.4. ábra. Aleksander Jablonski (1898–1980)

A fotokémiai jelenségek körébe tartozó fluoreszcencia az erre alkalmas molekulákban egy **kétlépéses folyamat eredményeképpen** jön létre. Először a látható fénynél rövidebb hullámhosszú, nagyobb frekvenciájú és energiájú UV fényvel megvilágított molekula (ritkábban atom, vagy nanorészecske) valamely külső pályán tartózkodó elektronja felveszi (abszorbeálja) az őt elérő fotonok energiáját ($h\nu$), és emiatt képes lesz az eredeti S_0 (alap-singlet) állapotához képest egy magasabb energiaszintű pályára (S_1) ugrani (3.5. ábra). Ezt a rendkívül rövid idő (10^{-15} szekundum) alatt bekövetkező folyamatot **gerjesztésnek** vagy **excitációnak** nevezzük.

Az S_1 pozícióba került elektron helyzete azonban két ok miatt is instabil: egyrészt, mivel az eredeti pályáján egy betöltetlen hely marad utána, másrészt pedig, mert az új pályán sem a legalacsonyabb energiaszintre, hanem általában annál magasabbra kerül. Innen egy igen rövid (10^{-12} szekundum) ideig tartó, és energiavesztéssel járó **belső konverzió** (egyfajta „vibrációs” mozgás) után eléri az S_1 pálya legalsó energiaszintjét. Ennek során a leadott energia egy részét átveszik a környezetében lévő (pl. oldószerek) molekulák, másik hányada hő formájában távozik a rendszerből.

Ezután, a folyamat második lépéseként, az elektron a legalsó S_1 szintről zuhan vissza az eredeti S_0 pozíciójába. Mivel ez a fluoreszkálás leglassúbb lépése (10^{-8} szekundum), ezért egyúttal ez lesz az $S_0 \Rightarrow S_1 \Rightarrow S_0$ folyamat sebességmeghatározó reakciója is.



⁴ Valeur és Berberan-Santos, 2011

3.5. ábra. Gerjesztéskor az S_0 energiaszinttel jelzett pályák valamelyikén (0–5) elhelyezkedő elektron egy vagy több foton energiáját abszorbeálva a magasabb energiaszintű S_1 pályák (0–5) egyikére ugrik fel. Innen először a vibrációs veszteség miatt a legalacsonyabb szintű S_1 pályára kerül, majd ezt követően tér vissza az S_0 pályára, miközben a gerjesztéskor felvett energia maradékától fotonok leadásával szabadul meg (fluoreszcencia).

A belső konverziónál tapasztalttal szemben az S_1 és az S_0 állapotok közötti energiakülönbségtől a gerjesztett molekula **fotonok** és hő leadásával szabadul meg. Erősen leegyszerűsítve, a folyamat a következőképpen írható le:

Gerjesztés: $S_0 + h\nu_{\text{ex}} \Rightarrow S_1$,

ahol h a Planck-állandó, ν_{ex} pedig a gerjesztő fény frekvenciája.

Emisszió: $S_1 \Rightarrow S_0 + h\nu_{\text{em}} + \text{hő}$,

ahol ν_{em} az emittált fény frekvenciája.

Természetesen a vibráció és a hő formájában történő energiavesztés miatt az emisszió során **kibocsátott fotonok energiája kisebb lesz**, mint a gerjesztési folyamatban részt vevő fotonoké ($h\nu_{\text{ex}} > h\nu_{\text{em}}$). Ebből következően **az emittált fény frekvenciája kisebb**, a $c=\lambda\nu$ összefüggés miatt pedig a **hullámhossza nagyobb lesz**, mint amilyen a gerjesztő fényé volt, vagyis megváltozik a látható tartományban észlelhető színe.

Fluoreszkáló molekulák

A fluoreszcencia jelensége az elnevezését a **kalcium-fluorid** (CaF_2) kristályról kapta, amely UV fényben élénk kék színben ragyog⁵ (3.6 ábra). Felhívjuk azonban a figyelmet arra, hogy ez a jelenség csak a megvilágítás (gerjesztés) időtartama alatt tapasztalható, azután gyorsan halványul, tehát tulajdonképpen a kalcium-fluorid kristály foszforeszkál!

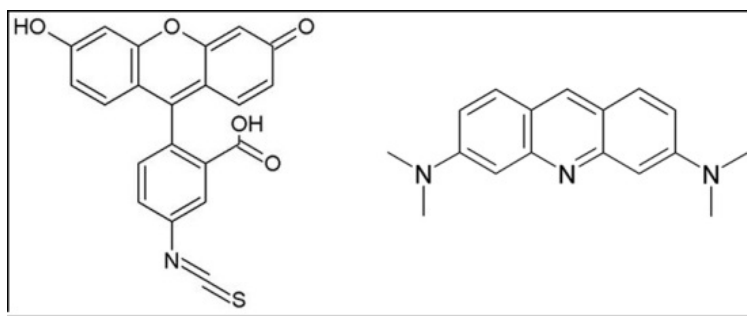
A **foszforeszcencia és a fluoreszcencia** jelensége egyaránt a fotolumineszcencia körébe tartozik. Közöttük az alapvető különbség a gerjesztett állapot élettartamában van: a foszforeszkáló molekulák a gerjesztés alatt világítanak, de ezt követően gyorsan elhalványulnak. A fluoreszkáló kristályok és molekulák a gerjesztett állapotukat tovább megőrzik, így a gerjesztés után még hosszabb ideig képesek fényt kibocsátani (emittálni). A fluoreszcencia elnevezés annak ellenére megmaradt, hogy a kalcium-fluorid „csak” foszforeszkálni képes.



3.6. ábra. A kalcium-fluorid UV fényben

A **biológiai vizsgálatok** szempontjából fontos fluoreszkáló molekulák elsősorban a szerves vegyületek és a makromolekulák köréből kerülnek ki. Ezek szinte kivétel nélkül tartalmaznak aromás, homo- vagy heterociklikus gyűrűt vagy gyűrűket, mivel ez utóbbiakban lévő delokalizált elektronok könnyen gerjeszthetők. A mikroszkópos vizsgálatokhoz használt első fluorokrómok között volt a fluorescein-izotiocianát (FITC) és az akridinoranáz (3.7. ábra).

⁵ A fluoreszcencia név alapja a fluor (F) atom neve.



3.7. ábra. A fluorescein-izotiocianát (balra) és az akridinoranzs képlete (jobbra)

Az August Köhler, Henry Siedentopf és Carl Reichert által az 1910-es évek elején a jeni Zeiss üzemből kifejlesztett, UV fényrel történő megvilágítást alkalmazó „lumineszcens mikroszkóp” első, biológiai célú felhasználói között találjuk Stanislaus von Provazek parazitológust és Siegfried Strugger botanikust. Ők – a látható fényrel működő hagyományos mikroszkópokénál nagyobb felbontást adó lumineszcens mikroszkópban – a fenti fluorokrómokkal megfestve vizsgálták a különböző baktériumsejteket, illetve növényi szöveteket.

Bár az idők folyamán egyre több fluorokróm molekulát találtak, illetve szintetizáltak, ezek nem mindegyike volt alkalmas jelölőanyag a biológiai vizsgálatokhoz, más szavakkal nem minden szempontból voltak megfelelő **fluorofórok**, vagyis a fluoreszcens jelet a vizsgálandó molekulán hordozó⁶ fluorokrómok. A gondosan megtervezett fluorofór molekulacsaládok (l. később) létrehozása a XX. század utolsó harmadának eredménye.

A következőkben tekintsük át, hogy milyen **elvárásoknak** kell megfelelnie egy korszerű, a biológiai kutatásban jól használható fluorofórnak!

A kisméretű, nem fehérje-jellegű fluoreszkáló molekulák akkor lehetnek jól felhasználhatók mint fluorofórok, ha:

- huzamosabb ideig tartó gerjesztés után is excitálhatóak maradnak (azaz nem mutatják a fotoelhalványodás jelenségét),
- gerjesztés után nem transzferálják a felvett energiát a környezetükben lévő (oldószer) molekulákra (azaz nem mutatják a kioltódás jelenségét),
- megfelelő kvantum-kitermelési (quantum-yield) hányadossal rendelkeznek,
- az excitációs és az emissziós maximumuk jól elkülönül,
- viszonylag egyszerűen, de stabilan köthetők a vizsgálandó molekulákhoz, illetve reprodukálhatóan halmozódnak fel a sejtek bizonyos organelumában vagy kompartmentumában,
- nem túlságosan nagy méretűek, így nem zavarják a vizsgálandó molekula működését vagy mozgását,
- nem (nagyon) toxikusak és
- viszonylag olcsón előállíthatók.

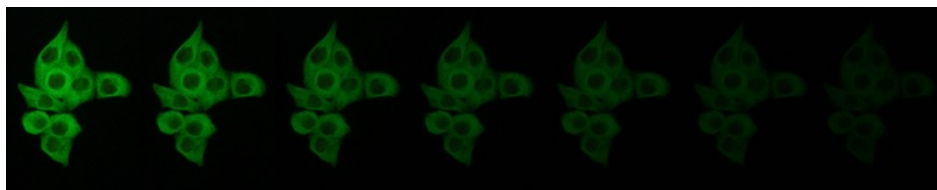
Természetesen számos olyan vizsgálati eljárás van, amelyben nem szükséges, hogy a felhasznált fluorofór egyidejűleg rendelkezzen valamennyi, az előbbieken felsorolt tulajdonsággal, sőt bizonyos metodikák esetében egyenesen kívánatos, hogy a fluorofór – megfelelő körülmények között – kioltható legyen, illetve hogy képes legyen a gerjesztéskor felvett energiát – fény emisszálása nélkül! – egy másik fluorofórnak átadni.

A fotoelhalványodás jelensége (photobleaching⁷)

Ez a jelenség hosszabb megvilágítás esetén jelentkezik, és egyedül **a molekula felépítésétől, szerkezetétől függ**. Vannak olyan fluorofórok, mint például a FITC, amelyek viszonylag kevés excitációs-emissziós ciklusban tudnak részt venni. Precíz fotokémiai mérések szerint az említett molekula mintegy 30 ezer ciklus után egyre nehezebben gerjeszthető, míg végül teljesen inaktívvá válik. Ez a jelenség szabad szemmel, a mikroszkópban is megfigyelhető: a kezdetben zöldes fényben fluoreszkáló jel 20–30 másodperc (!) múlva egyre halványabb lesz, majd teljesen kioltódik, a fekete háttérrel egyszínűvé válik. Mivel a kioltódás folyamata **visszafordíthatatlan**, a kioltódott fluorofórt tartalmazó terület többé nem vizsgálható. A megoldást a minta gyors lefényképezése, vagy a kioltódásnak jobban ellenálló fluorofór használata jelenti (3.8. ábra).

⁶ phorus (gör.): hordozni

⁷ bleaching: kiféhéredés, kifakulás



3.8. ábra. A folyamatosan megvilágított preparátumról különböző időpontokban készített fényképek sorozatán látszik, hogy a fotohalványodásra hajlamos fluorofór folyamatosan veszít az emissziós képességéből

Kioltódás (quenching⁸)

Az előbbi jelenséggel ellentétben az elhalványodást nem az adott fluorofór sajátosságai, hanem annak **környezete** fogja befolyásolni, azaz például a vizsgált minta hőmérséklete, pH-ja, vagy éppen nyomása. Bizonyos molekulák előfordulása határozottan fokozza a quenching előtérbe kerülését, így például a molekuláris oxigén, a jodidion, vagy éppen az elektroforetikus vizsgálatokhoz használt akrilamid jelenléte, ugyanis ezek **képesek átvenni a fluorofórtól annak gerjesztési energiáját**, amit valamilyen formában (pl. hőként) kisugároznak (disszipálnak). Ez a jelenség természetesen a fluoreszcens jel lassú elhalványulásához vezet. Bár a folyamat nem teljesen irreverzibilis, mégis érdemes a lehetőségekhez képest visszaszorítani, amit elsősorban elhalványodást gátló, ún. anti-quenching komponenst is tartalmazó lefedőszerekkel érhetünk el.

Kvantum-kitermelés (quantum-yield, Φ)

Amint az a nevéből is sejthető, ez a **viszonyszám** azt mutatja meg, hogy az adott fluorofór mennyire hatékonyan képes a gerjesztéskor felvett energiát az emisszió alkalmával leadni. Ezt számos dolog befolyásolja: a molekula szerkezete, kötődése a célmolekulához, és a gerjesztéskori pozíciója éppúgy, mint a környezet paraméterei (pl. pH változás).

Alapértelmezésben a Φ = az emittált fotonok száma/az abszorbeált fotonok száma összefüggést jelenti.

Az abszorbeált fotonok mennyiségét az adott molekula moláris extinkciós koefficiense (ϵ) határozza meg, ezért a kvantum-kitermelés és a moláris extinkciós koefficiens szorzata az adott molekula fluoreszkáláskor mutatott fényességet (brightness) adja meg:

$$\text{Brightness} = \Phi \times \epsilon;$$

aminek ismerete fontos adat lehet egy fluoreszcens vizsgálat megtervezésekor.

Az extinkciós és az emissziós maximumok viszonya

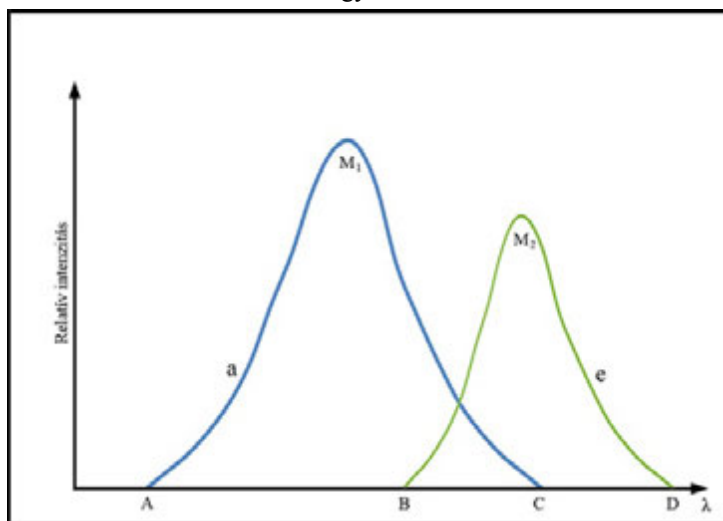
Gerjesztéskor az adott fluorokróm nem csak egy adott hullámhosszú fény abszorbeálására képes, hanem egy meghatározott hullámhossztartományba eső fényt el is nyel. Ezen jelenség mögött számos, az abszorpciót befolyásoló tényező áll. Többek között az is, hogy egy adott fluorokróm molekula hogyan helyezkedik el az őt elérő fényhullám rezgési síkjához képest, illetve hogy hány darab és milyen energiájú foton felvételére képes. Természetesen ennek az elnyelési tartománynak van egy optimális hullámhosszértéke, amelynél az abszorpció intenzitása maximális. Ez a pont lesz a kérdéses fluorokróm **gerjesztési vagy excitációs maximuma**, ahol a legjobban gerjeszthető. Rendszerint azonban ettől a hullámhossztól nem túl jelentősen eltérő hullámhosszú fénnel is kényelmesen lehet gerjeszteni az adott fluorokrómot. Ilyenkor azonban az abszorpció intenzitása nem lesz maximális – és várhatóan az emisszióé sem (3.9. ábra).

Fluoreszkáláskor sem egyetlen hullámhosszúságú fényt fog az alapállapotba visszatérő molekula kibocsátani, hanem ismét egy spektrumban fog sugározni. Ennek is van egy maximumpontja, ahol az emittált fény intenzitása a legmagasabb lesz. Ahogy arra már korábban utaltunk, és ahogy a **Stokes-szabály** is leírja, az emittált fény intenzitási maximumához tartozó hullámhossz nagyobb lesz, mint amilyen a gerjesztési fény maximumához tartozó hullámhossz volt (3.9. ábra). Ez egyben azt is jelenti, hogy az emittált fény frekvenciája és energiája is

⁸ quenching: az emisszió csillapodása

kisebbség lesz. Ennek értelmében, ha az emberi szem számára nem detektálható UV fénnel történik a fluorokróm gerjesztése, akkor az emittált fény hullámhossza jó eséllyel már a látható tartományba fog esni.

Ha a két spektrumot egymásra vetítjük, akkor egyrészt jól látszik a **hullámhossz-eltolódás** (az ún. Stokes-shift), másfelől viszont azt is észre lehet venni, hogy **a két spektrum** egy jelentős területen **átfed** (3.9. ábra). Erre az utóbbi tényre a gerjesztési és a detektálási feltételek megválasztásánál oda kell figyelni, és megfelelő szűrők kiválasztásával (l. később) az átfedési tartományba tartozó hullámhosszakat – lehetőség szerint – mindkét folyamatból ki kell küszöbölni. Természetesen minél közelebb van egymáshoz egy fluorokróm abszorpciós és emissziós maximuma, annál nagyobb az esélye annak, hogy a két spektrum jelentős mértékben átfedjen. Ez komolyan megnehezítheti, de legalábbis megdrágíthatja az ilyen fluorokrómokkal való munkát, tehát célszerű olyan molekulát választani, ahol a két maximum határozottan elválik egymástól.



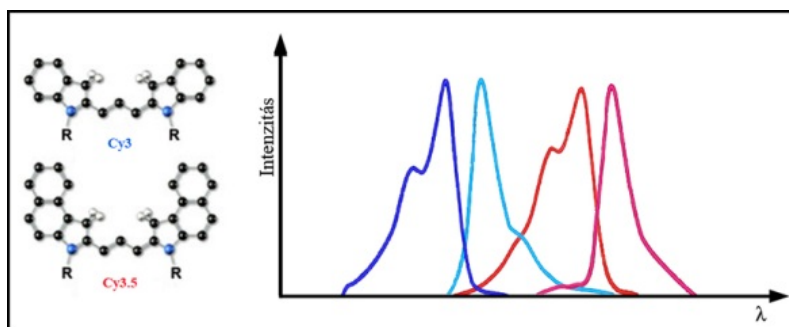
3.9. ábra. Az abszorpciós és emissziós spektrumok, valamint azok egymáshoz való viszonya. A kék görbe egy bizonyos fluorokrómra jellemző abszorpciós, a zöld görbe pedig az emissziós spektrumot ábrázolja, a hullámhossz és a relatív intenzitás függvényében. Az A-C hullámhossztartományon belül ez az adott fluorokróm gerjeszthető, a legerősebben természetesen az M1 maximumnak megfelelő hullámhosszúságú fénnel. A B-D tartomány az emissziós hullámhosszakat foglalja magában, amelyen belül a legintenzívebb fénykibocsátást az M2 hullámhossznál várhatjuk. A B-C hullámhosszak között a kétféle spektrum átfed, így ebben a tartományban nem tudjuk megbízhatóan vizsgálni az adott fluorokrómmal megjelölt molekulát vagy sejt-komponenst

Kötődés, méret, toxicitás és ár

Bár ezen paraméterek mindegyike fontos a kutatók számára, sajnálatosan ezek ügyében a döntés a fluorokróмок és fluorofórok előállító cégek kezében van. Mivel a cégek közötti verseny ezen a területen jelenleg erős, ezért igyekeznek termékeikkel minél inkább kiszolgálni a kutatók és a kutatás igényeit.

A fluorofór molekulacsaládok

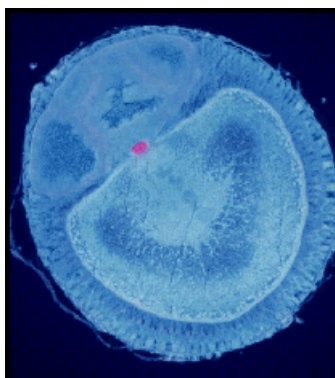
Egy-egy ígéretes – a kioltásnak és az elhalványodásnak egyaránt jól ellenálló, a vizsgálandó célmolekulákhoz gond nélkül hozzákötethető, nem toxikus és megfelelő intenzitású – fluorokróm molekuláris alapvázból kiindulva, tervszerű módosításokkal **a teljes látható spektrumot lefedő molekulacsaládok** hozhatók létre. A 3.10. ábrán a cianin fluorokrómok (C_n) esetén vizsgálhatjuk meg, hogy a gyűrűk számának megváltoztatása hogyan módosítja az adott molekula abszorpciós és emissziós spektrumát.



3.10. ábra. Az ábra bal oldalán látható, hogy hogyan egészítették ki a Cy3 alapvázat két újabb aromás gyűrűvel (Cy3.5). A kép jobb oldalán lévő színes grafikon segítségével könnyen átláthatjuk, hogy ennek következtében hogyan változott meg a molekula abszorpciós és emissziós spektruma. A sötétkék görbe mutatja a Cy3 abszorpciós, a világoskék pedig az emissziós spektrumát. A Cy3.5 fluorokrómhoz tartozó excitációs spektrumot a vörös, az emissziósat pedig a lila görbe mutatja

Az autofluoreszcencia

Az eddig elmondottak értelmében számos molekula képes az excitációra és az azt követő fényemisszióra. A fluoreszcens vizsgálatok során – jobb híján önkényesen – meg kell különböztetnünk a számunkra fontos, informatív jelet adó fluoreszcenciát a szövet vagy sejt saját molekuláiból származó háttérfluoreszkálástól. Ez az utóbbi, **autofluoreszcencia**nak nevezett jelenség leggyakrabban a vizsgált szövet magas aromás aminosav tartalmú fehérjéiből származik, és rendszerint homogén, a gerjesztőfény hullámhosszától függő háttérfestődésként jelenik meg. Célszerűen megválasztott, ezzel a háttérszínnel megfelelő kontrasztot adó fluorokróm alkalmazása esetén kifejezetten segíti a számunkra érdekes molekula lokalizációjának meghatározását, mivel szinte kirajzolja a szöveti háttérrel (3.11. ábra).

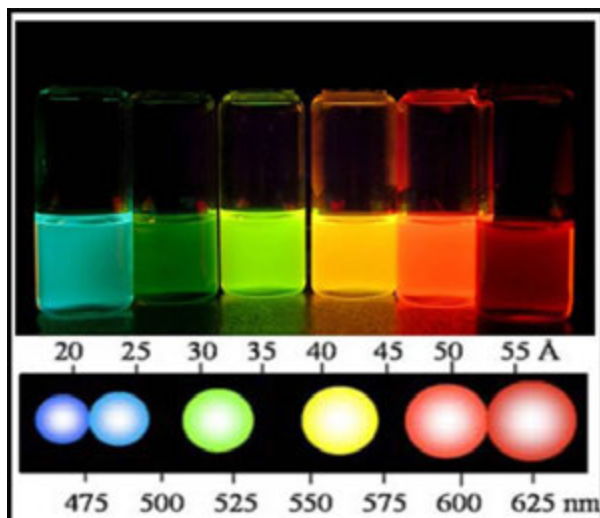


3.11. ábra. Egy folliculus keresztmetszete selyemhernyó petefészekből. A folliculust kívülről a folliculáris sejtek veszik körül, balra fent három tápláló (nurse) sejt, a kép közepétől jobbra lefelé pedig a fejlődő petesejt látható. Az utóbbit a nurse sejtekkel egy gyűrűsatorna köti össze, az ezt alkotó egyik fehérje hordozza a fluoreszcens jelet (piros). A folliculust alkotó sejteket megjelenítő kékes szín az autofluoreszcenciától származik

Quantum dots

Ezek az **apró, félvezető nanokristályok** alapvetően különböznek a klasszikus fluorofóroktól. Hogy itt említésre kerülnek, annak az az oka, hogy intenzív fényemissziójuk és stabilitásuk miatt egyre több biológiai kísérletben helyettesítik – több-kevesebb sikerrel – a klasszikus fluoreszkáló molekulákat. Általánosságban elmondható, hogy hozzávetőlegesen húszszor fényesebbek, és mintegy százszor nehezebben oltódnak ki, mint a jelenleg használt fluorokrómok. **Szerkezetük** viszonylag egyszerű: a kadmium-szelenid (CdSe) magot egy cink-szulfidból (ZnS) álló réteg burkolja, amelyet egy további lipidköpennyel borítanak, hogy a nanokristályok összetapadását meggátolják. Természetesen biológiai vagy orvosi célra ez utóbbit fehérje- vagy más molekulákból álló réteggel helyettesítik. A **gerjesztési maximuma** mindegyik quantum dot (QD) szemcsének **425 nm körül** van, ámde az **emissziós hullámhosszat** az adott **CdSe mag mérete** határozza meg: nagyobb átmérőjű maghoz nagyobb emissziós

hullámhossz tartozik. Így tehát, amíg egy 20 nm (200 angström) átmérőjű QD részecske kékes fényt (475 nm) fog emittálni, addig egy 50 nm átmérőjű már 600 nm vöröset, annak ellenére, hogy a gerjesztőfény hullámhossza mindkét esetben 425 nm volt (3.12. ábra).



3.12. ábra. Különböző méretű quantum dot részecskéket tartalmazó oldatok emissziója, UV fénnel történő megvilágítás után. A felső számsor a szemcsék átmérőjét mutatja angströmben ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m} = 10 \text{ nm}$), az alsó pedig a hozzájuk tartozó emissziós hullámhosszakat

Bár a QD-ok mérete jelentősen meghaladja a klasszikus fluorokrómok méretét – ez a legjelentősebb hátrányuk –, korábban említett előnyös tulajdonságaik miatt mégis egyre gyakrabban találunk **QD-tal jelölt (másodlagos) antitesteket** (l. Immunhisztokémia) a vegyszerforgalmazó cégek kínálatában. Ezen túlmenően egyre jelentősebb szerepet játszanak az **endocitózisvizsgálatokban**, amelyekhez a sejtek által felvehető fehérjével borítják be a QD-ot, valamint **egyes rákterápiákban**. Ez utóbbi esetben a tumoros sejtekkel nagyméretű QD szemcséket vetetnek fel, amelyek majd a gerjesztőfény hatására infravörös tartományban emittálnak. Ez az emisszió jelentős hőhatással jár, ami megöli a tumoros sejteket.

A fluorokrómokkal való munka általános szabályai

Mint minden reaktív vegyület, így egy adott fluorokróm is hordoz potenciális veszélyeket a velük dolgozó kutató vagy laboráns számára. Alapvető balesetvédelmi szabály, hogy ezek nem kerülhetnek közvetlen kapcsolatba a velük dolgozó szövetével, különösképpen nem kerülhetnek be a belső szervek üregeibe. Megkülönböztetett figyelemmel kell kezelni a **sejtmagfestékeket**, mivel ezek DNS-kötő tulajdonságaik révén potenciális, vagy éppen reális rákkeltő vegyületek. Használatukkor a védőkesztyű viselése ajánlott. Mivel ezek a laborból kikerülve komoly veszélyt jelenthetnek a környezetre, ezért a használt fluorokróмокat érdemes összegyűjteni, és megsemmisítésüket erre specializálódott cégre bízni.

A másik lehetséges veszélyforrás a következő fejezetben tárgyalt, intenzív UV fényt is kibocsátani képes **fényforrások** jelenthetik. Ezekbe természetesen semmilyen körülmények között sem szabad közvetlenül – és főként nem a lencserendszeren keresztül – beletekinteni, csupán a velük gerjesztett fluorokrómok által emittált fényt szabad megfigyelni és vizsgálni.

A gerjesztéshez használható fényforrások

Mind elméletileg, mind pedig a gyakorlati megvalósíthatóság szempontjából a fluorokróмокokat (a biológiai mintákban) gerjeszteni képes fényforrásokat **két nagy csoportba** oszthatjuk. Az elsőbe azok a klasszikus lámpák tartoznak, amelyek képesek – ha nem is egyenletes intenzitással – az ultraibolyától a látható spektrumon át egészen az infravörös tartomány kezdetéig terjedő hullámhosszsort kibocsátani. A második csoport képviselői viszont az előbbi spektrumnak csupán egy vagy néhány pontján képesek gerjesztőfényt adni.

Higanygőzlámpa

Az első csoportba tartozó, legelterjedtebben használt fényforrás jelenleg is a – már az 1930-as években felfedezett – higanygőzlámpa, klasszikus nevén HBO lámpa (H = Hg, B = a fénysűrűsége vonatkozó jelzés, O = arra utaló jelzés, hogy a lámpa nem igényel külön hűtést). **Eltételezve számos hátrányától** (relatív rövid – általában 400 órá – élettartam, önálló tápegység igénye, odafigyelést igénylő használat, nem változtatható intenzitás, és az, hogy az általa kibocsátott fény nem egyenletesen fedi le a spektrumot), alacsony ára, kis mérete és az, hogy különböző hullámhosszakon tud gerjeszteni, jelenleg is biztosítja népszerűségét és széles körű használhatóságát.

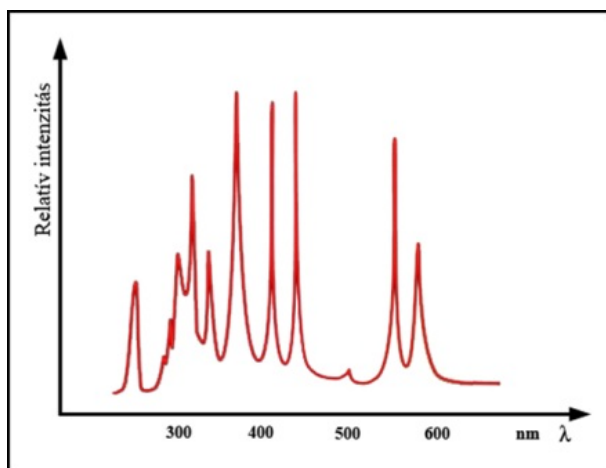
A rendszerint dupla falú (a belső kvarcüvegből és a külső boroszilikát üvegből készült) gömbszerű bura ionos formában tartalmazza a higanyt, amiből a két elektróda között előállított ívfény elpárologtat, azaz higanygőzt állít elő (3.13. ábra).



3.13. ábra. A higanygőzlámpa: a kép közepén jól látszik a kettős burokból álló két elektróda, amelyek között létrejön az ívfény

Bekapcsolásakor a tápegység nagyfeszültséget ad az elektródokra, aminek következtében a megjelenő ívfény energiája megkezd a higanygőz előállítását, azaz a higany gerjesztését. A lámpa belsejében a hőmérséklet fokozatosan növekszik, és néhány perc múlva jóval meghaladhatja az 1000 °C-ot. Ilyen magas hőmérsékleten a **higanyionok gerjesztése önfenntartóvá válik**, azaz az egyik ion által emittált fény képes egy másikat gerjeszteni. Ekkor az elektródákra kapcsolt feszültség mérsékelhető; ez manapság már automatizált lépés. Természetesen a feszültség csak annyira csökkenhet, hogy a folyamat még fennmaradjon, azaz ez az energia fogja pótolni a lámpát elhagyó fotonok által magukkal vitt energiát. A bekapcsolást követően néhány perc szükséges ahhoz, hogy a fenti folyamatok végbemenjenek, és fényforrás csak ezt követően használható. A higanygőzlámpa fénye erős, kékesfehéres színű, és mivel **jelentős mennyiségű UV-t tartalmaz**, ezért belenézni nem szabad. Emissziós spektruma széles (a szokványos 100 W-os lámpa esetében 230–650 nm), és bár nem egyenletes, a rutinszerűen használt fluorokrómok gerjesztéséhez megfelel (3.14. ábra).

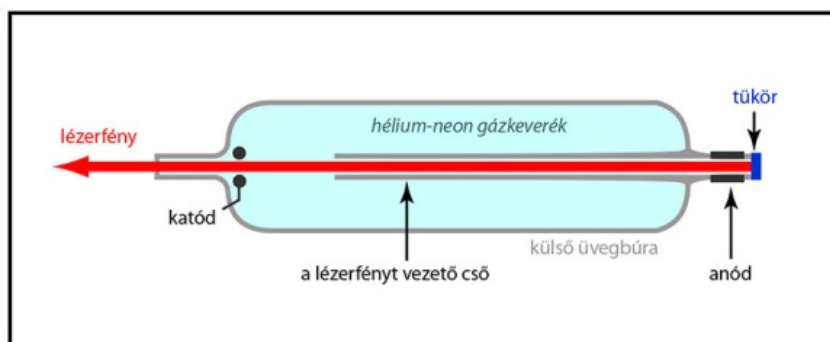
Fontos megjegyezni, hogy kikapcsolás után 30–40 perc szükséges ahhoz, hogy a lámpa lehűljön, és a higanygőz lecsapódjon. Eppen ezért **kikapcsolás után azonnal újra visszakapcsolni a higanygőzlámpát nem szabad**, mivel ilyenkor a még gőz állapotban lévő higanyionok a nagy feszültség hatására túlgerjedhetnek, a folyamat kontrollálhatatlanná válik, ami a lámpa felrobbanásához vezethet.



3.14. ábra. A 100 W-os higanygőzlámpa emissziós spektruma

A lézer fényforrások

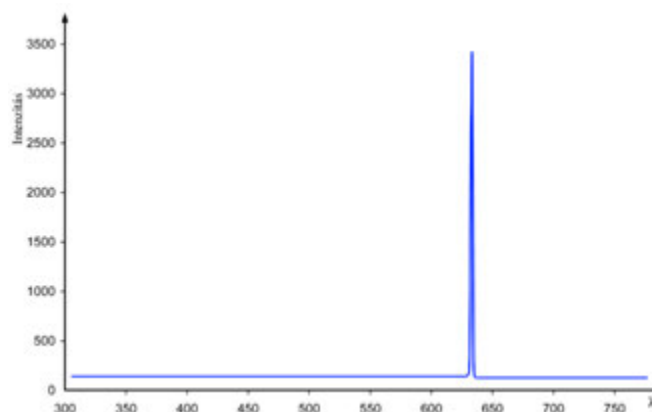
A higanygőzlámpák teljesítménye általában elegendő egy fluoreszkáló festékkel megjelölt minta áttekintéséhez és konvencionális vizsgálatához. Ha azonban a mintából csupán egy nagyon keskeny sávot (**optikai szeletet**) szeretnénk megtekinteni, akkor ehhez egy jóval nagyobb teljesítményre képes fényforrásra van szükségünk, amivel az adott területen hatékonyabb gerjesztést és erősebb emissziót tudunk előidézni. Erre alkalmasak az elsősorban **konfokális mikroszkópokban használt lézerek**. Bár ezek felépítésének részletes ismertetése messze meghaladja ennek a kurzusnak a kereteit, annyit mindenképpen érdemes megjegyezni, hogy a gerjesztés itt is az elektródák közötti feszültség hatására történik, azonban az emittált fotonok az ún. **rezonátorcső** két végén elhelyezkedő tükrök között ide-oda haladva ismételt gerjesztik az ott lévő atomokat. Bizonyos paraméterek fenntartása esetén az így gerjesztett részecskék az abszorbeálttal megegyező energiájú fotonokat emittálnak, ami tovább erősíti a gerjesztési folyamatot. A fotonok a lézer egyik tükrén keresztül hagyhatják el a rezonátorcső terét, ui. ez egy részben áteresztő tükrök (3.15. ábra).



3.15. ábra. A lézer elvi felépítése

Ez természetesen azt fogja jelenteni, hogy a lézercsőben keletkező (és természetesen az abból kilépő) fény csupán egyféle hullámhosszúságú, emiatt **monokróm** (egyszínű) lesz (3.16. ábra). A lézer által kibocsátott fény színe az alkalmazott gáztöltetől függ.

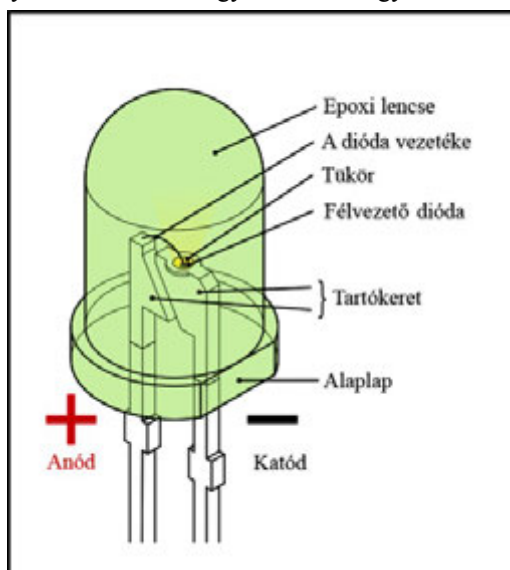
A **lézer fényforrások előnye**, hogy stabilak, intenzitásuk igen magas és jól szabályozható, a belőlük kilépő fény homogén, koncentrált, jól irányítható sugár. Mivel a fényük monokróm, ezért egyféle lézer csak azon fluorokromok gerjesztésére alkalmas, amelyeknek gerjesztési maximuma a lézer által kibocsátott fény adott hullámhosszúságának a közelében van. Ennek megfelelően, egy konfokális mikroszkópot 3-4-féle, egyenként különböző hullámhosszúságú fényt kibocsátó lézer tud kiszolgálni.



3.16. ábra. A legtöbb lézer csak egyféle hullámhosszúságú (monokróm) fényt képes emittálni

LED fényforrások

Jelenleg úgy tűnik, hogy ezek lesznek a **jövő ideális fényforrásai** a fluoreszcens mikroszkópokban, mivel olcsók, energiaigényük alacsony, kis távolságon belül elég intenzív monokróm fényt adnak. Szerkezetük egyszerű: a műgyantából készült lencse alatt egy **félvezető dióda** foglal helyet, amely alatt egy kicsi **homorú tükör** található. Ha az átfolyó áram polaritása megfelelő, abban az esetben a dióda fényt bocsát ki, amit a segédberendezések felerősítenek és fókuszálnak (3.17. ábra). Mivel nem építhetők be közvetlenül a korábbi mikroszkópok higanygőzlámpáinak helyébe, ezért főként az újabb fejlesztésű mikroszkópokban találkozhatunk velük, ahol általában a vizsgálandó tárgy közelében helyezik el őket olyan módon, hogy az éppen alkalmazott fluorokrómnak megfelelő hullámhosszúságú fényt kibocsátó LED egyszerűen a tárgy fölé illeszthető legyen.



3.17. ábra. A LED-ek általános felépítése

A fényforrás helye a fluoreszcens mikroszkópokban

Hosszú ideig, egészen a múlt évszázad hetvenes éveinek végéig a fluoreszcens mikroszkópokban a fény útja megegyezett a látható fényt használó mikroszkópokéval, azaz **alulról**, a talp felől indulva, a kondenzoron keresztül érte el a tárgyat, majd a nem abszorbeált gerjesztőfény a tárgyon áthaladva az objektíven, prizmán és az okuláron keresztül egyenesen a vizsgáló szemébe jutott. Azt leszámítva, hogy emiatt a háttér mélyvörös színűnek látszott, a fényforrás által kibocsátott – főként az UV tartományba tartozó – intenzív fény súlyosan károsíthatta a megfigyelést végző kutató szemét.

Ezt elkerülendő, a gyártók kifejlesztették az **epifluoreszcens megvilágítású** mikroszkópot, amelyben a gerjesztőfény **felülről** (erre utal az „epi” előtag a mikroszkóp nevében), az objektíven át vetül a tárgyra, és a nem abszorbeált excitációs fény a tárgyon áthaladva a kondenzorra, vagy a talpra vetül, ahol végleg elnyelődik (3.18. ábra). A megfigyelést végző személy szemébe az objektív–prizma–okulár útvonalon már csak a mintában lévő fluorokrómok által emittált fény juthat. Így a háttér feketének tűnik, amelyen a színes jelek még kontrasztosabban tűnnek elő, illetve nincs esély arra, hogy UV fény juthasson a kutatást végző személy látószervébe.



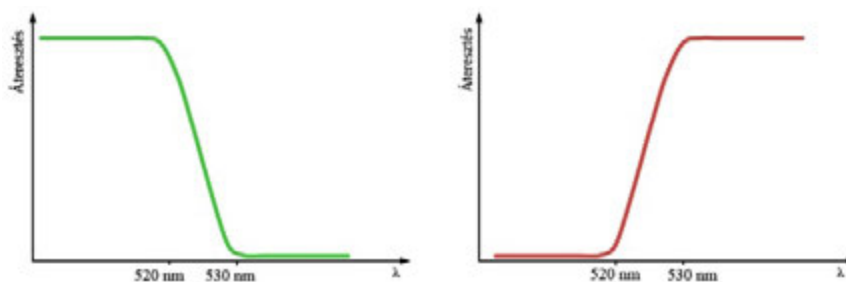
3.18. ábra. Korszerű epifluoreszcens mikroszkóp: a mikroszkóp mögött látható sötétszürke doboz a gerjesztő fényforrást rejtő lámpaház

A fluoreszcens mikroszkópokban alkalmazott szűrők

Amint az előbbiekben láthattuk, a fényforrások egy része (a higanygőzlámpa és bizonyos –az előbbiekben nem ismertetett – lézerek, mint amilyen a kripton és az argon) egyidejűleg többféle hullámhosszúságú fény kibocsátására is alkalmas. Mivel azonban a mintában jelölőanyagként használt fluorokróm számára gerjesztőfényként csak az olyan hullámhosszúságú fény jöhet számításba, amelyik a saját excitációs maximuma környékére esik, a többi, egyéb hullámhosszú fény csak lényegtelen vagy zavaró tényezőként lesz jelen a rendszerben. Éppen ezért praktikus a gerjesztőfény spektrumából csak azt a hullámhossztartományt a tárgy irányába továbbengedni, amelyik az alkalmazott fluorokrómot ténylegesen gerjeszteni képes. Ezt a problémát a gyakorlatban az ún. **excitációs szűrők**nek a fényforrás és a tárgy közé történő beiktatásával oldhatjuk meg.

Alapvetően **háromféle szűrőtípus** létezik: a short pass, a long pass és a band pass filter. Ezek általában összetett, többféle üvegből összeállított szűrők.

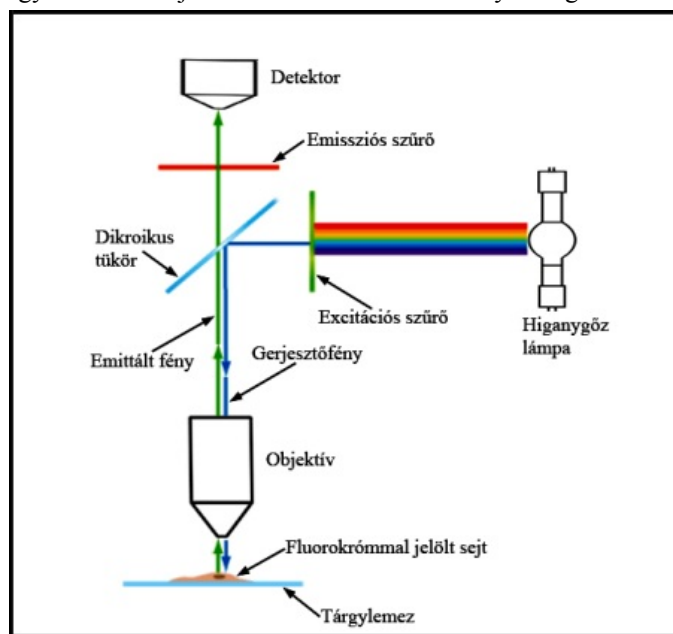
- A short pass filterek – mint ahogy a nevük alapján is sejthető – alacsonyabb hullámhossztartományban minden fotont átengednek, de egy felső határ (pl. 550 nm) felettieket már nem (3.19.A ábra).
- A long pass szűrők éppen ellenkezőleg viselkednek: csak bizonyos hullámhosszúság fölötti fényt engednek át (575 nm-től mindent), az ez alattiakat viszont egyáltalán nem (3.19.B ábra).
- A band pass filterek csak a spektrum egy keskeny, alulról és fölülről is behatárolt sávjában engednek át (pl. 540 és 580 nm között).



3.19. ábra. A short pass és a long pass szűrők áteresztési tartományai: a bal oldali ábrán jellemzett short pass filter 520 nm-ig valamennyi hullámhosszúságú fényt átengedi, az 530 nm fölöttieket viszont már nem; a jobb oldalon bemutatott long pass filter 520 nm alatt semmit sem enged át, míg 530 nm fölött már mindent

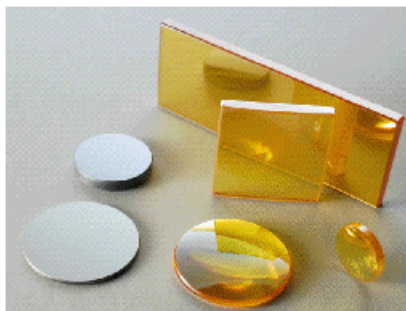
Természetesen nemcsak a gerjesztési, hanem **az emittált fény is lehet inhomogén**, akár csak amiatt is, mert a vizsgálati anyag visszatükrözheti a gerjesztőfényt, amely a detektorba kerülve a kép minőségét rontó háttérzajként jelentkezik. Ezt elkerülendő, egy **emissziós** (vagy más néven: barrier) **filtert** kell elhelyeznünk a tárgy felől érkező és a detektor irányába tartó fény útjába.

Ahogy azt „A fényforrás helye a fluoreszcens mikroszkópokban” c. részben említettük, a manapság kizárólagosan használt epifluoreszcens mikroszkópok esetében mind a gerjesztési, mind az emittált fény az objektíven halad át. Ez azt jelenti, hogy valahol, a fényforrás, az objektív és az okulár között kell lennie egy olyan berendezésnek, amely képes irányítani a különböző hullámhosszúságú fénysugarakat: a gerjesztőfényt letereli az objektíven át a tárgy felé, míg az onnan ugyancsak az objektíven át érkező emittált fényt átengedi az okulár irányába (3.20. ábra).



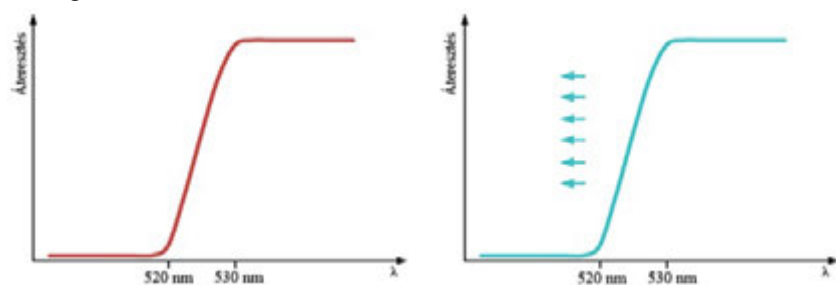
3.20. ábra. A fény útja az epifluoreszcens mikroszkópban

Ez a különleges alkatrész egy **dikroikus (sokszor: dikromatikus) tükör** (3.21. ábra), egy vékony, rágózoltított fémréteget hordozó üveglap, amely képes arra, hogy az őt elérő, alacsonyabb hullámhossztartományba eső fénnel szemben tükörként viselkedjen, és azt egy másik irányba reflektálja, míg az ennél nagyobb hullámhosszúságú fényt – a sima üveglemezhez hasonlóan – átengedje (3.22. ábra). Jellemző és fontos tulajdonsága az üveglapra gőzölt vékony fémrétegnak köszönhető, és annak anyagától függ, hogy milyen hullámhosszakra hogyan reagál a dikroikus tükör.



3.21. ábra. Dikroikus tükör

A 3.20. ábrán a dikroikus tükröt egy halványkék színű vonal jelzi. Itt jól látható, hogy a kék színnel jelzett gerjesztőfényt az objektív irányába reflektálja, míg az onnan jövő emittált zöld színű fénysugarakat – gyakorlatilag veszteség nélkül – átengedi az okulár felé.



3.22. ábra. A long pass filter (balra) és a dikroikus tükör (jobbra) tulajdonságainak összehasonlítása: figyeljük meg, hogy amíg a filter vagy átenged, vagy nem, addig a dikroikus tükör vagy reflektál, vagy átenged

Sajnos még a szakirodalomban is gyakori jelenség, hogy a dikroikus tükör elnevezést a dikroikus nyalábosztó nevével (beam splitter) keverik össze, noha a két optikai aktivitás merőben különbözik: a dikroikus tükör bizonyos hullámhossz alatti fényt tükröz, az afölöttit pedig átengedi. A dikroikus nyalábosztó a hullámhossztól függetlenül, 50-50%-ban tükrözi, illetve átengedi a ráeső fényt.

A szűrőkocka

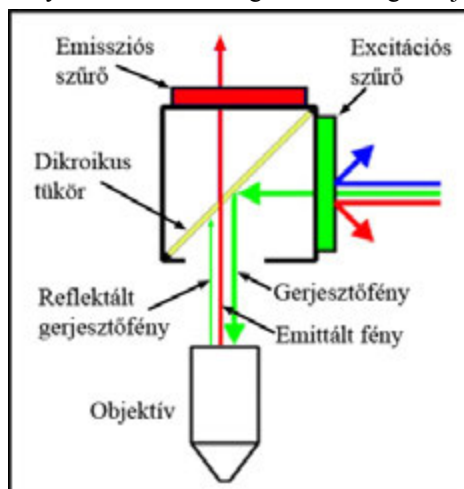
Az epifluoreszcens mikroszkópban a szokásos optikai elemeken kívül tehát helyet kell kapnia egy excitációs szűrőnek, egy dikroikus tükörnek és egy emissziós filternek. Az 1960-as évek elején Sebastiaan **Ploem**nek (3.23. ábra) sikerült ezeket egy egységbe, az azóta praktikusán valamennyi mikroszkópban használatos szűrőkockába (3.24. ábra) beépítenie.



Johan Sebastiaan Ploem
(1927-Present)

3.23. ábra. Johann Sebastiaan Ploem, szumátrai származású orvos-biológus arcképe (1927–)

A szűrőkocka előnye a következő. Amennyiben olyan mintát vizsgálunk, amely többféle, eltérő abszorpció és emissziós hullámhosszal rendelkező fluorokrómmal lett megfestve, ezek észleléséhez nyilván más és más excitációs és emissziós filter szükséges. Ezek cseréjét ezzel a rendszerrel gyorsan és minden nagyobb szerelés nélkül, egy másik, megfelelő szűrőkockának a fénypálya történő beforgatásával megtehetjük.



3.24. ábra. A szűrőkocka felépítése és a különböző fénysugarak útja a szűrőkocka belsejében

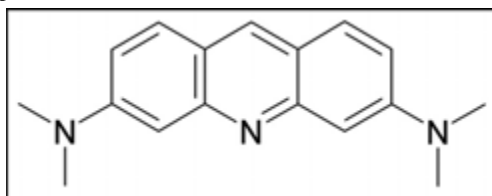
Sejtorganellek szelektív jelölése fluorokrómokkal

A legegyszerűbb fluoreszcens metodika a sejtorganellek szelektív megjelölése és jelenlétének, illetve lokalizációjának kimutatása arra alkalmas fluorokrómokkal. Több cég is árul olyan fluoreszkáló molekulákat, amelyek gyakorlatilag bármilyen eukarióta szervezet bármelyik sejtjének adott szervecskéjéhez képesek hozzákapcsolódni vagy abban felhalmozódni. A jelölés – kevés kivételtől eltekintve – élő sejtekben történik, amelyeket azután fixálással és átderítéssel teszünk mikroszkópi vizsgálatra alkalmassá. Az alábbiakban néhány példán keresztül szeretnénk csupán felvillantani az ebben az eljárásban rejlő lehetőségeket.

Sejtmagfestés

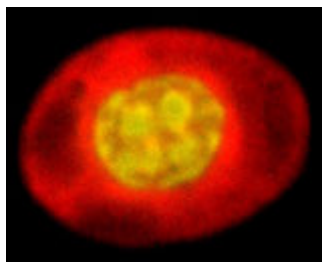
Akridinoranzs (akridinnarancs)

Az egyik legrégebben használt, DNS-hez kötődni képes fluorokróm az akridinnarancs (acridinorange). Ez egy három aromás gyűrűt tartalmazó vegyület (3.25. ábra), amely attól függően, hogy **egyszálú (RNS) vagy kettős szálú (DNS) nukleinsavakhoz kötődik**, más és más excitációs és emissziós hullámhosszmaximummal rendelkezik. Az előbbi esetben a gerjesztési maximum 450 nm, míg az emissziós 650 nm lesz. Ezzel szemben, amikor helikális szerkezetű DNS molekulához kapcsolódik, akkor ez a két érték 502 és 525 nm-re változik.



3.25. ábra. Az akridinoranzs szerkezeti képlete

Ennek értelmében, amikor akridinoranzssal festünk egy sejtet, akkor a citoplazma piros árnyalatú lesz (az ott található RNS-félesége miatt), a sejtmag viszont zöldes színben fog feltűnni (3.26. ábra).

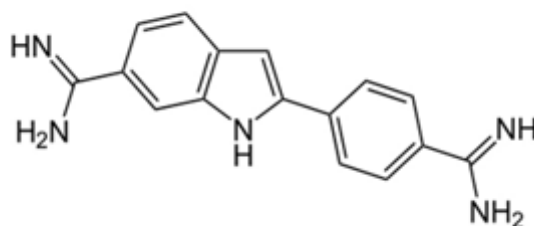


3.26. ábra. Kacsá vörösvérsejt akridinoranzsal megfestve. Annak ellenére, hogy egyféle fluorokrómot alkalmaztunk, kétféle emissziós hullámhosszt tapasztalunk

Az akridinoranzs egyes és kettős szálú nukleinsavakhoz történő kötődése esetén mutatott eltérő fluoreszcenciáját felhasználhatjuk az apoptotizáló sejtek kimutatására is. Meg kell említsük, hogy ez a fluorokróm nemcsak a nukleinsavakhoz képes kapcsolódni, hanem hajlamos az erősen savas beltartalmú sejtorganellekben is akkumulálódni (l. 2.1. ábra). Nevét is erről a tulajdonságáról kapta, mivel erős narancssárga színnel jelölte meg a spermiumok fejében lévő módosult lizoszómát, azaz az akroszómát.

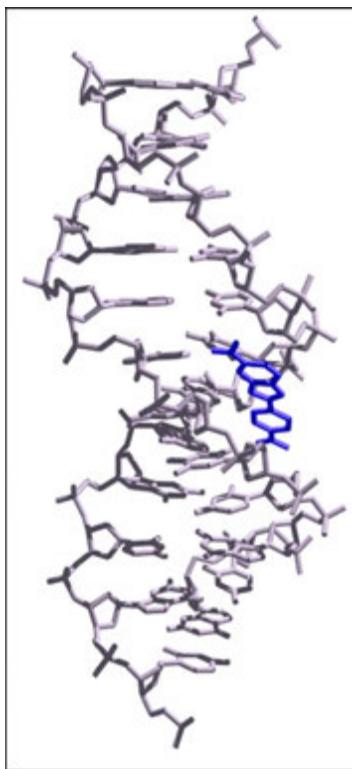
DAPI

A DNS kettős hélixéhez számos, fluoreszkálni is képes molekula tud kötődni. Ezek közül jelenleg az egyik legelterjedtebben használt vegyület a 2,4 diamidino-2-fenilindol, azaz a DAPI (3.27. ábra).



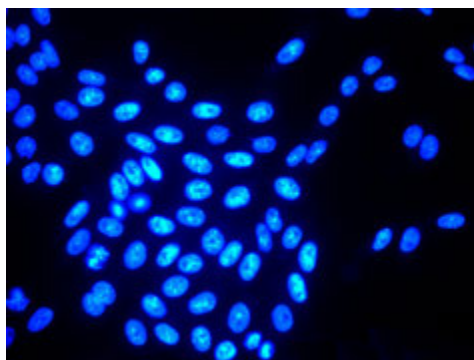
3.27. ábra. A DAPI szerkezeti képlete

Ezt a fluorokrómot eredetileg egysejtű belső élősködők (pl. *Trypanosoma* sp.) elleni potenciális gyógyszerként állították elő a múlt század hetvenes éveiben, de csakhamar kiderült, hogy sokkal inkább használható a sejtbiológiai kutatásokban mint a DNS-hez, illetve a sejtmaghoz kötődő, és azt szelektíven megjelölni képes molekula. Hosszú idejű gerjesztés esetén sem mutat kioltódást. Szerkezetében – hasonlóan az akridinoranzshoz – három aromás gyűrű található (3.27. ábra). A felhasználásával sikerült 1975-ben igazolni, hogy a mitokondriumok saját DNS-sel rendelkeznek. Gondos vizsgálatokkal kimutatták, hogy a molekula a **DNS-hélix nagyobb árkába illeszkedve** képes ahhoz **stabilan** kapcsolódni (3.28. ábra).



3.28. ábra. A DAPI a DNS nagyobb árkába illeszkedve képes azt megjelölni

Gerjesztési maximuma 358 nm, emissziós maximuma 461 nm, így tehát a sejtmagokat kékes árnyalatban tünteti fel (3.29. ábra). DNS-hez történő kapcsolódásakor kissé megváltozik a molekula térbeli szerkezete, emiatt fluoreszcenciája erősebb lesz, mint a nem kötött formáé. Kismértékben képes az RNS-hez (valószínűleg a tRNS-ek kettős szálú szakaszaihoz) is hozzákötődni, ez azonban nem okoz számottevő jelet a sejtek citoplazmájában.

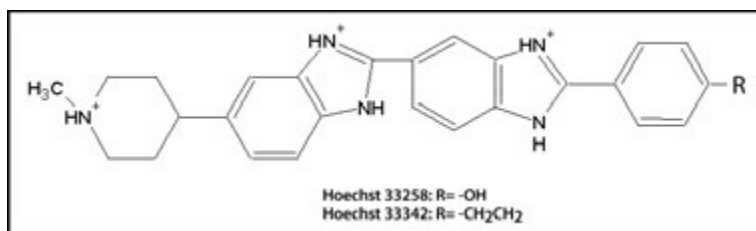


3.29. ábra. DAPI-val láthatóvá tett sejtmagok: a magokon belül látható világosabb foltok a nukleoluszok

Mind a fixált, mind pedig az élő sejtekben képes a sejtmagot festeni, de az utóbbi esetben a festődés lényegesen erőteljesebb és kontrasztosabb. Nem toxikus, és egyelőre nincs direkt bizonyíték a mutagenizáló hatására.

Hoechst

A másik, ugyancsak elterjedt, hasonló paraméterekkel rendelkező DNS/sejtmagfesték a Hoechst-33258 és a Hoechst-33342 (3.30. ábra). Gerjesztési és emissziós paramétereik szinte teljesen megegyeznek a DAPI-éval (350 nm / 461 nm), emiatt a velük megfestett sejtmagok színe igen hasonló. Használatukban sincs számottevő különbség. A Hoechst-33342 kitűnik közülük azzal, hogy a másik kettőnél lényegesen könnyebben jut át a sejthártyán.

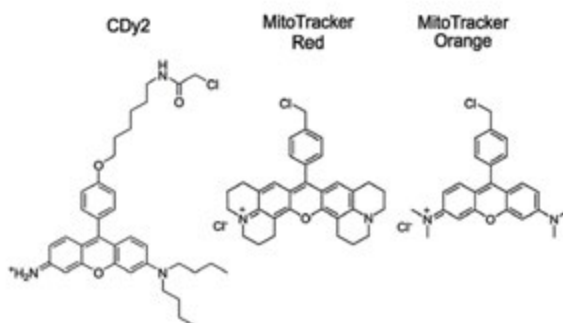


3.30. ábra. A Hoechst festék szerkezeti képlete

Fontos megjegyezni, hogy bár a példaként eddig említett magfestékek valamennyien kék színben tüntették fel a sejtmagot, **számos más magfesték létezik**, amelyek segítségével zöld (pl. cytoxgreen), sárga (pl. cytoxyellow) vagy piros (pl. etidium-bromid, propidium-jodid) színben lehet megjeleníteni a sejtmagokat.

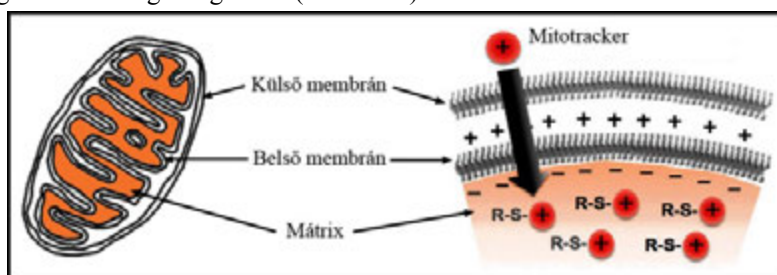
Mitokondriumok kimutatása

A sejten belül előforduló mitokondriumok megjelölésére a mitokondriális mátrixban található speciális fehérjék adnak lehetőséget. Az ezekhez kapcsolódni képes vegyületek közül néhányat a 3.31. ábrán láthatunk.

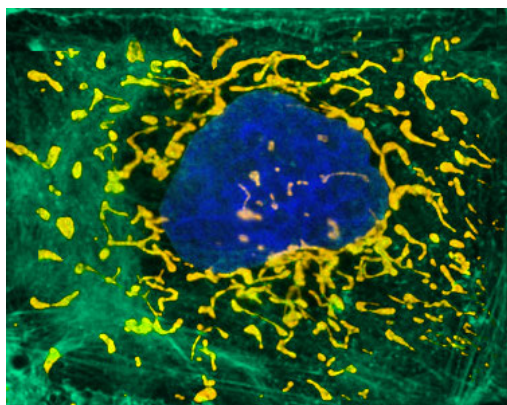


3.31. ábra. A mitokondriumok szelektív jelölésére alkalmas flouorkrómok szerkezeti képlete

A kapcsolódás alapja az, hogy a pozitívan töltött fluorokrómok átjutnak a mitokondrium külső- majd belső membránján is, és a mátrixban lévő fehérjék SH-csoportjaikon a H-t helyettesítve, azokhoz stabilan hozzákapcsolódnak (3.32. ábra). A kötődés **irreverzibilis és stabil**, így a megfestett mitokondriumok mérete, alakja és mennyisége hosszú ideig vizsgálható (3.33. ábra).



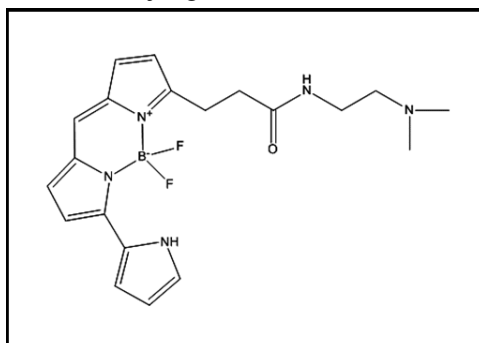
3.32. ábra. A CDy2 mitokondrium jelölésére alkalmas fluorokróm kapcsolódása a mitokondriális mátrixfehérjékhez



3.33. ábra. Mitotrackerrel sárga színűre megfestett mitokondriumok egy májsejtben. A háttérben lévő mikrotubulusokat zöld fluoreszcens festékkel jelölték, míg a sejtmag kék színű. Az utóbbi területén látható mitokondriumok természetesen nem a sejtmagban vannak, hanem fölötté helyezkednek el

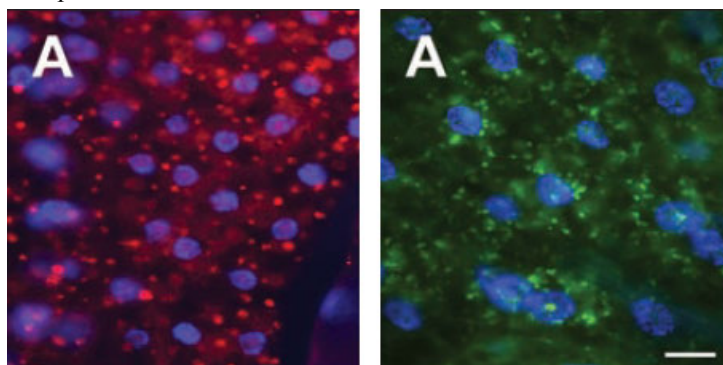
Lizoszómák kimutatása

Azt a jelenséget, mely szerint a savas beltartalmú sejtorganellek (elsősorban lizoszómák) képesek a gyenge bázikus vegyületeket a lumenükben akkumulálni, lizoszomotropizmus néven régóta ismeri a szakirodalom. Azonban csak alig egy évtizede jelentek meg azok a vegyületek, amelyek megbízhatóan alkalmasak a sejtben belüli lizoszómák szelektív kimutatására. A **Lysotracker festékcsalád** alapváza egy gyengén bázikus vegyület (3.34. ábra), amely neutrális pH-jú közegben csak részlegesen protonálódik, és így képes áthaladni (penetrálni) mind a plazmamembránra, mind pedig a különböző sejtorganellek határoló membránokon.



3.34. ábra. A Lysotracker család egyik tagja, a Lysotracker Red szerkezeti képlete

Amennyiben az **organellek beltartalma savas**, úgy a belépő Lysotracker festék teljes mértékben protonálódik, és emiatt elveszti a penetrációs képességét, vagyis bent marad az adott organellek (primer vagy szekunder lizoszóma, autofagoszóma, bizonyos esetekben a késői endoszóma) lumenében (3.35. ábra). Mivel ez a folyamat – mindaddig, amíg az organellek beltartalmának savas volta fennáll – egyirányú, a citoplazmában, illetve a többi sejtsejtszervecskén keresztül szabadon mozogni képes Lysotracker molekulák – optimális festékkoncentráció esetén – előbb-utóbb csaknem valamennyien csapdába esnek a lizoszómák terében.



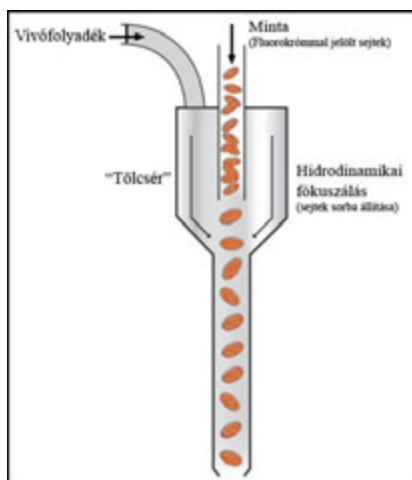
3.35. ábra. Mindkét képen metamorfózis előtt álló *Drosophila* lárvák zsírtestsejtjei láthatók, amelyekben ekkor már az autofágia igen jelentős. A szekunder liszoszómák és az autofág vakuólumok a bal oldali képen Lysotracker Red festékkel, a jobb oldali képen pedig acridinoranzs festéssel lettek feltüntetve

Ahogy a fejezet bevezetőjében említettük, gyakorlatilag valamennyi sejtalkotó megfestéséhez lehet találni megfelelő fluorokrómot. Bár ezek kötődése az egyes sejtkomponensekhez más és más fizikai vagy kémiai folyamat eredménye, az ezekkel végzett munka metodikai lépései nagyon hasonlóak. Ezért egy gyakorlati orientáltságú kurzuson nem látjuk értelmét az összes ilyen festék részletes ismertetésének.

Fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis (FACS)

A FACS⁹ (fluorescence activated cell sorting) az **áramlási citometria** (flow cytometry) egyik változata. E módszerek közös jellemzője, hogy bármilyen folyadékban (vérplazma vagy sejttenyésztő médium) szabadon úszó sejteket – egy megfelelő berendezés segítségével – képes bizonyos tulajdonságaik (pl. méret) szerint felismerni, megszámolni, és ha szükséges, kigyűjteni az oldatból további vizsgálatok céljára. A **műszer négy fő részből áll**: a sejteket egyesével sorba rendező és áramoltató kamrából, a megvilágítóegységből, a sejtek felszínén szóródó fényt felismerő detektor(ok)ból és az ez(ek) által vezérelt osztályozóberendezésből. Mivel a sejtek felől érkező jel nagyon gyenge, ezért annak detektálását egy jelerősítő (photomultiplier) segíti. Természetesen a különféle lehetőségek szerint megválasztható mérési és osztályozási folyamatot egy számítógép vezérli.

A **lamináris áramlást** biztosító, tölcsér alakú kamrában valójában kétféle folyadék áramlik párhuzamosan: az egyik a tölcsér belső fala mellett, amely egy folyamatosan áramló, ugyancsak cső alakú folyadékköpenyt hoz létre a kamrán belül. Ez lesz a **vivőfolyadék**, amely a tölcsér szűkületénél szépen sorba kényszeríti a sejteket. Így a tölcsér alsó, csőszerű részén ennek a vivőfolyadék-palátnak a közepén fog áramlani a másik, **sejteket szállító folyadék**-oszlopocska, amelynek éppen akkora az átmérője, hogy egyszerre csak **egy sejt** férjen el benne (3.36. ábra). A vivőfolyadék lamináris áramlása fenntartja az egyes sejtek közötti távolságot, ilyen módon akadályozva meg azok összetapadását.



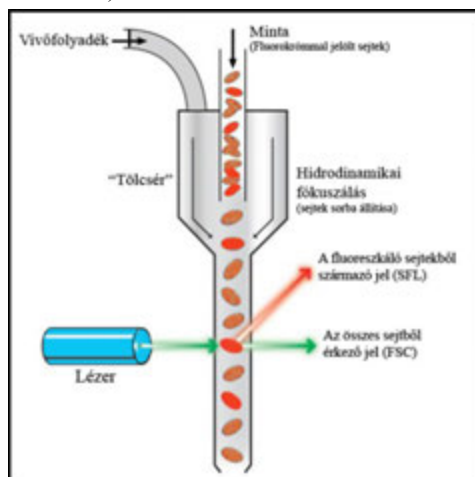
3.36. ábra. A FACS készülék lamináris áramlást biztosító kamrája, a kétféle folyadék-betápláló rendszerrel: az első a vivőfolyadékot szállítja, a másikon keresztül a felfuszpendált, vizsgálandó sejtek (minta) érkezik

Az immár sorban, egyesével áramló sejtek elhaladnak a **fényforrás** előtt, amelyik lehet higanygőzlámpa vagy lézer, és a rájuk irányuló fénysugár egy részét reflektálják (szórják), másik részét a beléjük juttatott fluorokróm abszorbeálja, vagyis gerjesztődik, majd egy más módon hullámhosszú fényt emittál.

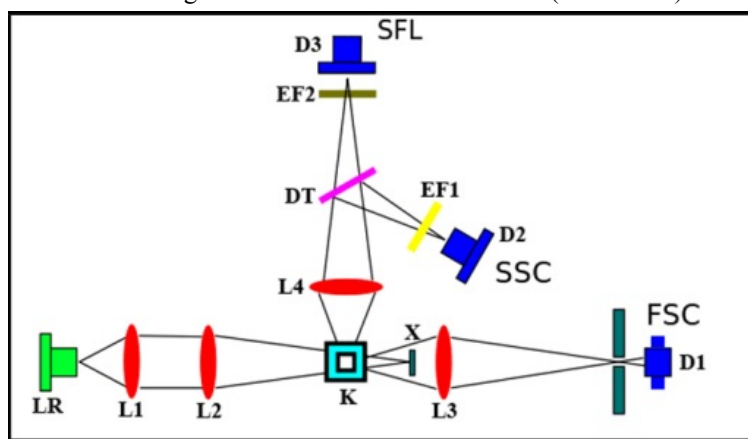
A **detektorok** helyzete és érzékenységeinek beállítása szabja meg, hogy milyen adatokat tud szolgáltatni a FACS készülék, amelyben lévő sugármeneteket a 3.37. és 3.38. ábra mutatja. A fényforrással pont szemben elhelyezett detektorban az éppen kettejük között áthaladó sejt árnyképe, kontúrja jelenik meg, ezt FSC-nek (forward scatter) nevezik (3.38. ábra), ezt érzékeli az **FSC detektor**. Az így kapott kép alapján a sejt átmérőjére, és ezen keresztül

⁹ ejtsd: faksz

a térfogatára lehet következtetni. Egy másik, a sejtekre vetülő fénysugárra merőlegesen álló detektorba csak azok a fénysugarak jutnak, amelyek a sejtről visszaverődtek, illetve, amelyeket a sejtben lévő fluorokróm emittált. Mivel a sejtek általában áttetszőek, ezért az általuk reflektált fény nem csak a külső felszínükről, hanem a belső membránjaikról is visszaverődhet. Így ezek az SSC-nek (side scatter) nevezett fénysugarak tájékoztatást adnak a sejtmag vagy az endoplazmatikus retikulum méretéről, kiterjedéséről. Ne feledjük: mind az FSC, mind az SSC fény hullámhossza megegyezik a gerjesztőfény hullámhosszával, hiszen annak visszatükröződéséről, szórásáról van szó. Az utóbb tárgyalt SSC fénysugarak egy **dikroikus tükrön** reflektálódva jutnak az **SSC detektorba**. Ezzel szemben a sejtben lévő gerjesztett fluorokrómok már nagyobb hullámhosszúságú fényt fognak emittálni. Ez az SFL-nek (side fluorescence light) nevezett fény áthaladva az előbb említett dikroikus tükrön a harmadik, **SFL detektorra** érkezik meg (3.37. és 3.38. ábra).



3.37. ábra. A lézert fény előtt sorban, egyesével elhaladó sejtekről kétféle fény származhat. Ha a sejt nem jelölődött, akkor csupán saját fénytörése („árnyéka”) detektálható (FSC). Mivel ez minden sejt esetében megjelenik, ez teszi lehetővé a sejtek megszámlálását. Amennyiben a sejt megjelölődött az adott fluorokrómmal, úgy emittálni fog egy bizonyos hullámhosszúságú fényt, amely csak a jelölt sejtekből származik (SFL), így azok külön is megszámlálhatók, és szükség szerint elkülöníthetők a többitől (szortírozás)

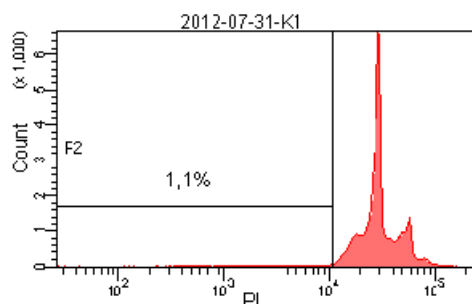


3.38. ábra. Sugármenetek a FACS készülékben. Az LR fényforrásból az L1 és L2 lencséken keresztül a fény a mérőkamrában (K) éppen áthaladó sejtre vetül. (A fókuszpontja az X ernyőre esik.) A sejt pereméről szóródó fény a fényforrással szemben lévő D1-es (FSC) detektorba kerül, az L3-as lencsén keresztül. A sejt felszínéről, illetve belsejéből reflektálódó fény az L4-es lencsén át a dikroikus tükrön (DT) jut. Innen vetül az EF1-es szűrőn keresztül a D2-es (SSC) detektorba. A sejtbe bejuttatott fluorokróm által emittált fény hullámhossza nagyobb lesz, mint a gerjesztőfényé, ezért az előbbi gond nélkül áthalad a dikroikus tükrön (DT), majd az EF2-es emissziós szűrőn át a D3-as (SFL) detektorba jut

Milyen eredmények nyerhetők egy FACS vizsgálatból? Az FSC detektor adataiból nemcsak az adott sejtek számára, továbbá méretére és térfogatára, hanem alakjára is következtethetünk, aminek fontos diagnosztikai jelentősége van. Az SSC detektor a sejtkomponensekre vonatkozó adatokat szolgáltatja, azaz a mag mérete, alakja, kondenzáltsága, az egyes sejtalkotók aránya a sejtben belül. Ezekből az adatokból a sejtek állapotára, a sejtciklusban

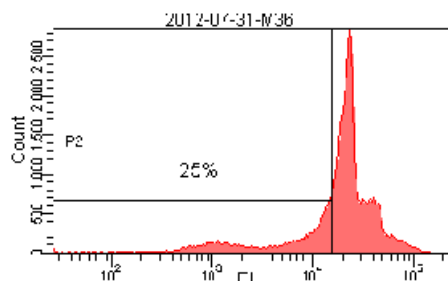
elfoglalt helyükre következtethetünk. A fluoreszcens (SFL) detektor az általunk fluorokrómmal megjelölt sejtorganellum, vagy molekula jelenlétét és relatív mennyiségét képes mérni.

Az alábbi példában a kontroll és kezelt sejtenyészeti sejtek programozott sejthalállal (apoptózissal) történő pusztulását vizsgáltuk. Az apoptózis során a sejt a saját DNS-ét kisebb-nagyobb darabokra vágja, és megfelelő inkubációs körülmények között a rövidebb DNS fragmentek kikerülnek a sejtéből. Emiatt a sejt DNS-tartalma csökken. Tehát míg egy egészséges sejtpopulációban a sejtek túlnyomó többségében a DNS mennyisége $2n$ (diploid) vagy $4n$ (osztódó), addig egy főleg pusztuló sejteket tartalmazó mintában bőven találunk $2n$ -nél kevesebb DNS-t tartalmazó (apoptotizáló) sejteket. A kísérlet megkezdése után 36 órával mind a kontroll, mind a kezelt sejteket lefixáltuk, majd propidium-jodiddal, egy fluoreszkáló DNS (sejtmag) fluorokrómmal festettük meg. Az ezt követő inkubációs idő alatt a már korábban pusztulásnak indult sejtekből kikerültek a rövid DNS-fragmentek, így bennük a DNS-hez kötött propidium-jodid mennyisége is csökkent. A FACS-készülékkel 50 ezer kontroll és ugyanennyi kezelt sejtet vizsgáltunk meg. A kontrollsejtek DNS-tartalmát a 3.39. ábra mutatja. Az azon látható hatalmas csúcs a $2n$ DNS-tartalmú sejtek számát mutatja. Jól látható az is, hogy mindössze 1,1%-nyi apoptotizáló sejt volt a kontrolltenyészetben.



3.39. ábra. A kontrollsejtek DNS-tartalom szerinti megoszlásának meghatározása FACS készülékkel

Ezzel szemben a kezelt mintában ez az arány jóval magasabb, 25%-os volt (3.40. ábra).



3.40. ábra. Kezelt sejtek DNS-tartalom szerinti megoszlásának meghatározása FACS készülékkel

Összefoglalva tehát a FACS eljárás kitűnően alkalmazható nagy elemszámú minta gyors, megbízható számszerű kiértékelésére, ami éppúgy a kísérletes, mint az alkalmazott (gyógyszergyári) kutatásban, valamint a diagnosztikában felbecsülhetetlen jelentőségű.

Egyedi molekulák vizsgálata

Természetesen igen sokszor előfordul, hogy pusztán a sejtorganellumok láthatóvá tétele és vizsgálata nem nyújt elegendő információt a kérdéses normális vagy kóros sejtbiológiai folyamatról, hanem ehhez szükséges az egyes (fehérje)molekulák **sejten belüli jelenlétének és elhelyezkedésének** (lokalizációjának) pontos ismerete is. A sejtekben és részben a belőlük felépülő szövetekben zajló sejtbiológiai folyamatokban részt vevő géntermékek jelenlétének, lokalizációjának és feladatának fénymikroszkópos szintű vizsgálatára **három** nagy, számos ponton érintkező és együttműködő **metodikai lehetőség** kínálkozik: a klasszikus (enzim) hisztokémiai, az immunbiológiai, illetve a genetikai alapokon nyugvó vizsgálati módszerek. A kifejezetten morfológiai sajátságok leírására alkalmas klasszikus hisztológiai módszerek alkalmazása esetén csupán kivételesen tudjuk egy-egy vegyületcsoport jelenlétét kimutatni (pl. PAS-festés), vagy néhány enzim (pl. savas vagy alkalikus foszfatázok) aktivitását detektálni, de

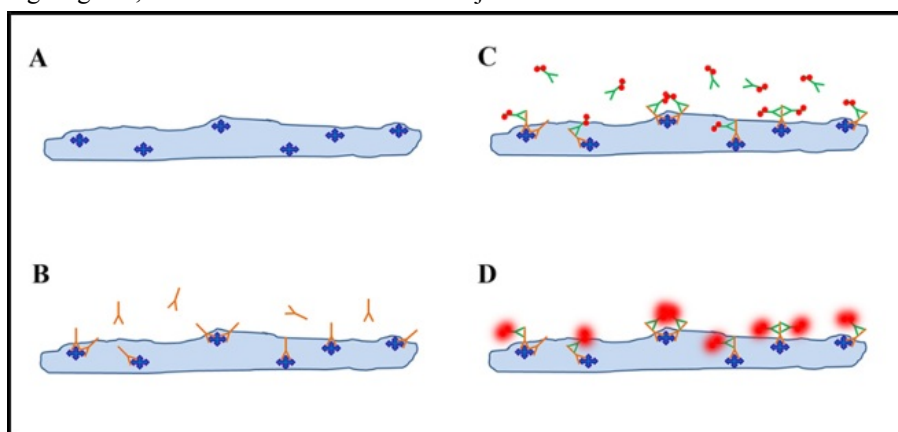
tetszőlegesen kiválasztott fehérje- vagy nukleinsav-szekvencia azonosítása és lokalizálása ezekkel a módszerekkel nem lehetséges. Ezzel szemben az **immunbiológiai, illetve a genetikai alapokon nyugvó vizsgálati eljárásokkal** egy adott gén (DNS-szekvencia), vagy annak különböző szintű termékeinek (mRNS, egyszerű, illetve összetett fehérje) jelenléte, sejten vagy szöveten belüli lokalizációjára, más molekulákkal való kölcsönhatásaira (interakcióira), valamint egy vizsgálati időszakon belül történő keletkezési és lebomlási sebességére (turnoverére) is következtethetünk.

Immunhisztokémia

Az immunhisztokémia (és elektronmikroszkópos változata, az immuncitokémia) az immunbiológiai módszerek népes családjába tartozik. Ennek az eljárásnak az a **célja**, hogy specifikusan kimutathatóvá és vizsgálhatóvá tegyen egy bizonyos fehérje-, ritkábban lipid- vagy szénhidrát-molekulát a szöveteken vagy sejteken belül. Az eljárás alkalmazása előtt a szövetet vagy sejteket – megfelelő rögzítőszerrel segítségével – szinte mindig **fixálni kell**, tehát ez a metodika csak kivételes esetekben használható élő sejteken. A **kérdéses molekula lokalizálása** történhet enzimreakció következtében **kiváló csapadék keletkezése révén**, vagy pedig **fluorofórok** segítségével. Mindkét esetben a detektálás eszköze mikroszkóp lesz, csak az első esetben szokványos fénymikroszkópot használunk, míg a másodikban UV-fénnyel működő (epi)fluoreszcens mikroszkópot.

Az immunhisztokémiai festések szinte mindig lehetővé teszik azt, hogy az előzőekben ismertetett, a sejtorganelumok láthatóvá tételére használt **fluoreszcens kimutatásokkal együtt** használjuk őket. Ez nyilván jelentősen megkönnyíti a sejten belüli tájékozódást, és jól használható viszonyítási alapot ad az immunfestéssel láthatóvá tett egyedi fehérjék helyének pontos meghatározásához. Leggyakrabban sejtmagfestést alkalmazunk az immunhisztokémiai módszerrel vizsgálhatóvá tett mintákon.

Lévé, hogy ezzel a metodikával leggyakrabban fehérjék sejten belüli elhelyezkedését tudjuk láthatóvá tenni, ezért ennek példáján mutatjuk be a **módszer elvi alapjait**. A kérdéses (praktikusan tetszőleges) fehérje – vagy csupán annak egy kisebb, ámde erősen immunogén darabja, azaz az **epitóp** – egy másik, adaptív immunrendszerrel rendelkező fajba beoltva **antigénként** viselkedik, azaz kiváltja az őt specifikusan felismerni és megkötni képes **antitestek** szintézisét, majd azok vérplazmába történő szekrécióját. Az ebből a plazmából kinyert vészérumot, vagyis a **primer ellenanyagot** (tehát az adott fehérjét specifikusan felismerni képes antitesteket tartalmazó antiszérumot) már alkalmazhatjuk az antigénként használt fehérje szövet- vagy sejtmintán való azonosítására, ha egy **második (az elsőt specifikusan felismerni képes) ellenanyaghoz kapcsolt fluorofórral** láthatóvá tesszük (3.41. ábra). Ritkábban ehhez a második antitesthez egy **enzim** van kapcsolva, és az ennek aktivitása következtében, a hozzáadott úgynevezett kromogén szubsztatrátból keletkező **oldhatatlan** (és színes) **csapadék** árulkodik a vizsgálandó fehérje helyéről. Ez esetben tehát a keresett fehérjét egy, a közelében immunreakcióval rögzített enzim aktivitásának segítségével, hisztokémiai módszerrel mutatjuk ki.



3.41. ábra. Az immunhisztokémia főbb lépései. A) A fixált minta a kimutatandó antigénnel. B) Az antigént a primer antiszérum antitestjei felismerik a mintában és specifikusan hozzákötődnek. C) A nem kötődött elsődleges antitestek eltávolítása után a fluorofórt hordozó, és a primer antitestekhez specifikusan kapcsolódni képes másodlagos antitesteket adjuk hozzá a rendszerhez. D) A nem kötődött szekunder antitestek eltávolítása után a mintában lévő fehérje (antigén) – primer antitest – jelölt szekunder antitest komplex a gerjesztőfény hatására ott emittál látható fényt a mintán belül, ahol a számunkra érdekes fehérje található

Megfelelő minőségű primer és szekunder antitesteket használva **a módszer rendkívül specifikus és precíz** lokalizációt ad. A **primer antitestek minősége** elsősorban az antigénként használt szekvencia megfelelő kiválasztásától és az immunizálásra szánt fehérje tisztaságától függ. A primer antiszérum minőségét és affinitását immuno-, vagy más néven Western-blottal lehet a legegyszerűbben ellenőrizni. Szerencsétlen esetben nem egy, hanem többféle fehérjét felismerni képes antiszérumot kapunk, amit további tisztítás nélkül immunhisztokémiai vizsgálatokhoz használni nem lehet, hiszen a kép alapján nem tudjuk eldönteni, hogy a fluoreszcens jel melyik fehérje lokalizációját mutatja.

A fehérjeláncokból felépülő, Y alakú **antitesteknek két eltérő viselkedésű végük van**: az Y két karjának végén vannak azok a **variábilis régiók**, amelyek képesek egyféle fehérje meghatározott szakaszát specifikusan felismerni és hozzákötődni. Természetesen fontos, hogy a kimutatandó fehérje ténylegesen „**idegen**” legyen az antiszérumot termelő állat számára. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy **más fajból** kell hogy származzon a lokalizálandó fehérje. Például ha β -tubulin lokalizációt szeretnénk vizsgálni egér L929 fibroblaszt sejteken, akkor az egérből izolált β -tubulin fehérjemolekulákat nyúlba fogjuk injektálni, mivel az egérfehérjék a nyulak számára idegen, immunogén fehérjék lesznek. (Természetesen a nyulakban is jelen van a mikrotubulusok felépítéséhez szükséges β -tubulin, azonban az egér β -tubulin szekvenciája ettől egy kicsit eltér, és ez elegendő ahhoz, hogy a nyulak immunrendszere azt már idegen fehérjeként, azaz antigénként ismerje fel.) Az adott idegen fehérjével többször stimulált immunrendszerű nyulak 4-5 hét múlva nagy mennyiségű anti-(egér) β -tubulin antitestet halmoznak fel a vérplazmájukban. Ezekből az állatokból levett pár milliliter vérérum (primer antiszérum) több száz immunhisztokémiai festésre elegendő antitestet tartalmaz.

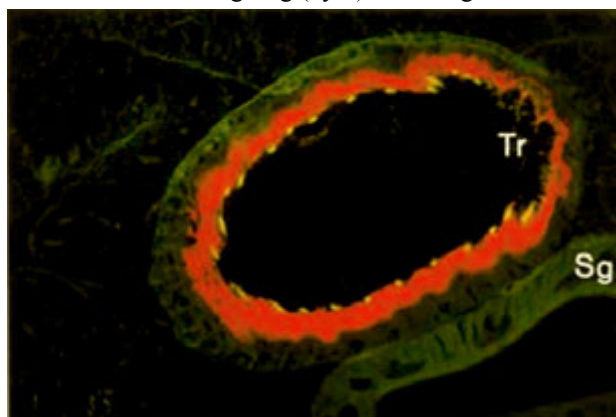
Azonban ezeken a **primer antitesteken nincs semmilyen (fluoreszcens) jel**, amivel jelenlétüket azonosítani lehetne a mikroszkópban. Nincs gyakorlati akadálya, hogy ezekre kémiai fluorofórt kössünk, azonban ez két hátránnyal is járna. Egyrészt van esély arra, hogy a fluorofór az antitestnek pont az antigénhez való kötéseért felelős részére kapcsolódna, és ezáltal **fizikailag megakadályozná** az antitest–antigén összekapcsolódást. Másrészt, valamennyi előállított antitesttartamú antiszérumot egyenként meg kellene jelölni. Mivel ez nehézkes és sokszor bizonytalan kimenetelű munka, ezért sokkal egyszerűbb, ha a vegyszergyártók által forgalmazott, **fluorofórral már megjelölt szekunder antitestet** használunk. Mik ezek a szekunder antitestek?

Az előbbi példánál maradva, a nyúlban termelődő antitestfehérjék (azaz az immunglobulinok, Ig), éppúgy idegen fehérjék lesznek egy kecske számára, mint ahogy az egér β -tubulin volt a nyúl részére. Ahogy a bekezdés elején említettük, az antitestek Y alakú fehérjemolekulák. Mivel **az Y szárán konzervatív szekvenciák vannak**, ezért a nyulból származó immunglobulin fehérje – mint antigén – ellen egy harmadik faj (példánkban a kecske) is antitestet tartalmazó antiszérumot fog termelni, amely specifikusan csak a nyúl antitesteket (immunglobulinokat) ismeri fel és kötődik azokhoz. Ezt a forgalmazók által fluorofórral megjelölt antiszérumot mint **szekunder antiszérumot** fogjuk használni. Nagyon lényeges, hogy ezek a kecskében termeltetett, és nyúl immunglobulinokat felismerő antitestek (a szokásos jelölés szerint: anti-nyúl Ig (kecske)) valamennyi nyúl-immunglobulinnal – azaz antisszel – képesek reagálni, attól függetlenül, hogy maga az adott antitest milyen fehérjét képes specifikusan felismerni (példánkban egér β -tubulint). Ilyen módon elegendő 2-3, más és más színű fluorofórral megjelölt anti-nyúl Ig (kecske) antiszérumot megvásárolni, és ezeket több száz, különféle fehérje ellen termeltetett nyúl primer antiszérumhoz használhatjuk (3.42. ábra).



3.42. ábra. Az immunhisztokémiai festésekhez leggyakrabban használatos komplex felépítése. A rendszerben antigénként szereplő, fixált, lokalizálandó fehérjét a kék színű, fordított V alak jelzi. A hozzájuk specifikusan kötődni képes primer antitestet a zöld színű Y szimbolizálja. Az ehhez kapcsolódó, fluorofórt (piros kör) hordozó másodlagos antitestnek a sárga színű Y felel meg. Ilyen módon a fluoreszcens jel a kimutatni kívánt fehérje tényleges helyétől 10–15 nm távolságra van, amely a fénymikroszkóp feloldóképességét figyelembe véve elhanyagolható különbséget jelent

A 3.43. ábrán egy ilyen **immunfestésre látunk példát**. Egy rovar kutikulájából tisztán izolált 12,3 kDa molekulatömegű fehérjét egerekbe beoltva, azokból anti-12,3 kDa (egér) antiszérumot nyertünk, amely az összes rovarfehérje közül csak ehhez a 12,3 kDa kutikuláris fehérjéhez volt képes kapcsolódni. Ezt az antiszérumot – megfelelő pufferben – a rovarból készült metszetekre helyezve, rövid idő múlva az antiszérumban lévő antitestek a metszeten is felismerték az antigént, azaz a 12,3 kDa fehérjét, és hozzákötődtek. A nem kötődött primer antitesteket mosással lehet eltávolítani a mintáról. Ezután kerül a metszetre a fluoreszkáló vegyületet hordozó, nyúlban termeltetett másodlagos antitest, amely képes az egérben előállított primer antitestekhez hozzákötődni. Így kialakulhat a **három tagból álló komplex**: a szövetben fixáltan jelen lévő 12,3 kDa fehérje, a hozzákapsolódott anti 12,3kDa (egér) primer antitest és az ahhoz kötődött anti-egér Ig (nyúl) másodlagos antitest.

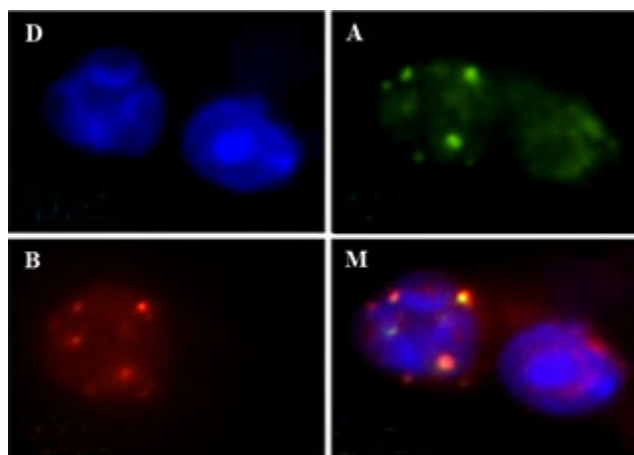


3.43. ábra. A 12,3 kDa kutikuláris fehérje lokalizációja. Mint tudjuk, a kutikula nemcsak a rovar testének felszínét borítja, hanem betérjed a trachearendszerbe is. A képen egy trachea keresztmetszete látszik, ahol a piros színű fluoreszcens jel mutatja a fehérje helyét a tracheális kutikulában. Az ezt körülvevő tracheális epidermisz (már) nem tartalmazza ezt a fehérjét, csupán az autofluoreszcencia miatt zöldes színű. Ugyanez igaz az Sg-vel jelzett nyálmirigyre (salivary gland) is

A fentiekben tárgyalt ún. **kétlépcsős** (elsődleges és másodlagos antitesteket használó) immunhisztokémiai festési technika a legelterjedtebb. Természetesen ennek a rendkívül sokoldalú metodikának számos válfaja létezik, amelyekről bővebben az Immunocitokémia gyakorlat keretén belül kaphatnak áttekintést az érdeklődők.

Alapesetben egy fehérje lokalizációját szokás egy metszeten elvégezni, de különböző hullámhosszú fénnyel gerjeszthető fluorofórokkal ellátott másodlagos antitestek használatával lehetőség van arra, hogy **egy metszeten egyidejűleg két, vagy akár három különböző fehérje helyzetét** is meghatározzuk. Az ilyen eljárásokra akkor van szükség, amikor két fehérjéről (A és B) azt feltételezzük, hogy a sejten belül azonos kompartmentumban helyezkednek el, és ezt a **ko-lokalizációt** szeretnénk immunhisztokémiai eljárással igazolni. Az ilyen vizsgálatok kivitelezéséhez elengedhetetlen feltétel, hogy az A és a B fehérje elleni primer antiszérum **két különböző állatfajban** (pl. egérben és tengerimalacban) legyen termeltetve, ugyanez vonatkozik a másodlagos antiszérumra is (anti-egér (nyúl) és anti-tengerimalac (kecske)), és természetesen a második antitesteken is kétféle, eltérő excitációs maximummal rendelkező, egymást gerjesztetni nem képes, egymástól jól megkülönböztethető fluorofór kell hogy legyen. A mikroszkópos vizsgálat során külön-külön gerjesztve az egyes fluorofórokat, annyi képet készítünk, ahányféle fluorofórt használtunk, majd végül ezeket egymásra vetítjük („mergeljük”¹⁰). Ha az A és a B fehérjéhez kapcsolódó jel az egymásra vetített képeken átfednek, akkor a két fehérje **nagy valószínűséggel** ugyanabban a kompartmentumban van, azaz ko-lokalizál (3.44. ábra). (Megjegyezzük, hogy a ko-lokalizáció ténye akkor fogadható el, ha azt elektronmikroszkópos, ultrastrukturális szinten is sikerül bebizonyítani.)

¹⁰ A szó az angol „merge”, egyesít(és) jelentésű szóból ered.

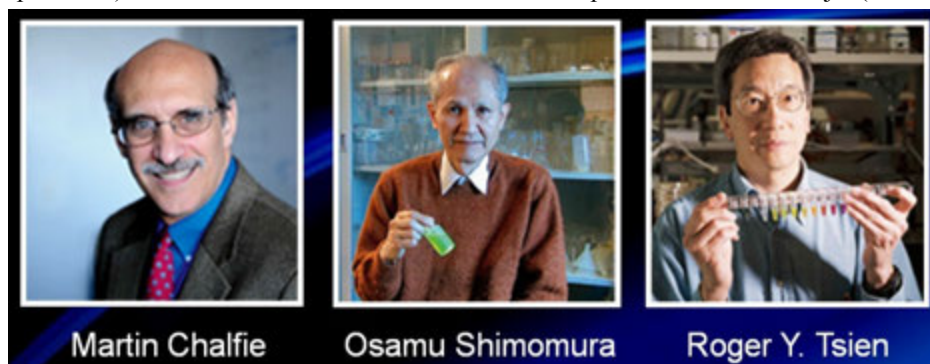


3.44. ábra. Itt három, különböző gerjesztési és emissziós hullámhossz mellett készített képet (kék, zöld és piros) látunk, valamint az ezek egymásra vetítésével kapott kombinált (M=Merge) képet. Az első (D) képen a DAPI-val megfestett sejtmagokat látjuk. A következő két képen (A és B) két különböző fehérje lokalizációját láthatjuk. A zöld fluorofórral jelzett A és a piros fluorofórral megjelölt B fehérje ko-lokalizációt mutat, mivel a kombinált képen mindkét fehérje azonos, egymással átfedő pozíciókat foglal el a DAPI-val megfestett sejtmag mellett

Fluoreszkáló fehérjék

Az eddig ismertetett módszerek használatakor a fluoreszcens jel – közvetlen vagy közvetett – kötődését a vizsgálni kívánt objektumhoz (sejtorganellumhoz vagy molekulához) úgy értük el, hogy a fluorofórt (vagy az azt hordozó antitestet) a vizsgálandó mintához hozzáadtuk. Ezzel szemben az adott célmolekulához – és ezen keresztül sokszor egy bizonyos sejtkomponenshez – kapcsolt **fluoreszkáló fehérjéket** viszont **maga a vizsgált sejt állítja elő**. Ám ennek az eljárásnak széles körű elterjedéséig és rutinszerű használatáig hosszú út vezetett.

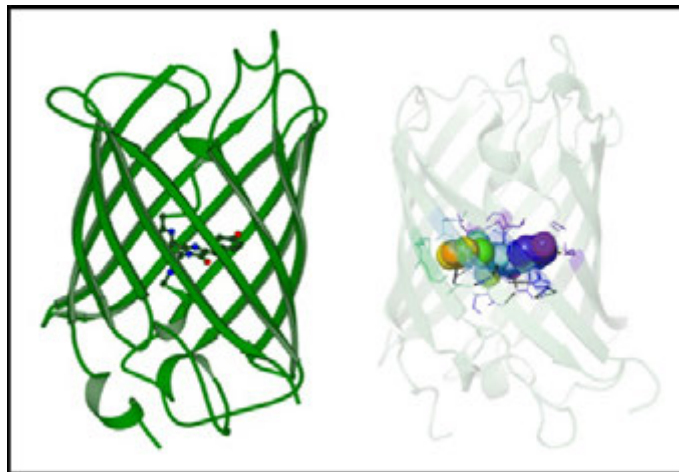
Osamu **Shimomura** az 1960-as és 70-es években publikálta először a **zöld fluoreszkáló fehérjén** (green fluorescent protein, **GFP**) végzett vizsgálatainak eredményeit. A fehérjét az *Aequorea victoria* nevű medúzából izolálta, és kimutatta, hogy a GFP fényemissziójához egy másik heterodimer szerkezetű fehérje, az aequorin aktivitása szükséges. Ez utóbbi kalciumionok megkötése után egy kékes fényfelvillanást produkál, amelyik képes gerjeszteni a GFP-t, és az ezután egy zöld színű fényt fog emittálni. Mintegy negyed évszázaddal később Martin **Chalfie** gondolt először arra, hogy ennek a fehérjének a génjét más élőlények (így az *Escherichia coli* és a *Caenorhabditis elegans*) genomjába beillesztve, kifejeződésük alapján következtetni lehet a GFP-t kódoló DNS szekvenciát befogadó gén expressziójára. Ebben a rendszerben nem az aequorinból származó, hanem a minta közvetlen megvilágítására szolgáló **UV fény** gerjesztette a GFP-t. Ugyanebben az évben (1994) közzölte eredményeit Roger Y. **Tsien**, akinek sikerült a GFP-ből – néhány aminosav cseréjével – más színű fényt emittáló fehérjéket (YFP – sárga, RFP – piros stb.) előállítani. 2008-ban ez a három kutató kapta az orvosi Nobel díjat (3.45. ábra).



3.45. ábra. A 2008-as Nobel-díjat megosztva három kutató a GFP-vel kapcsolatos eredményeikért kapta

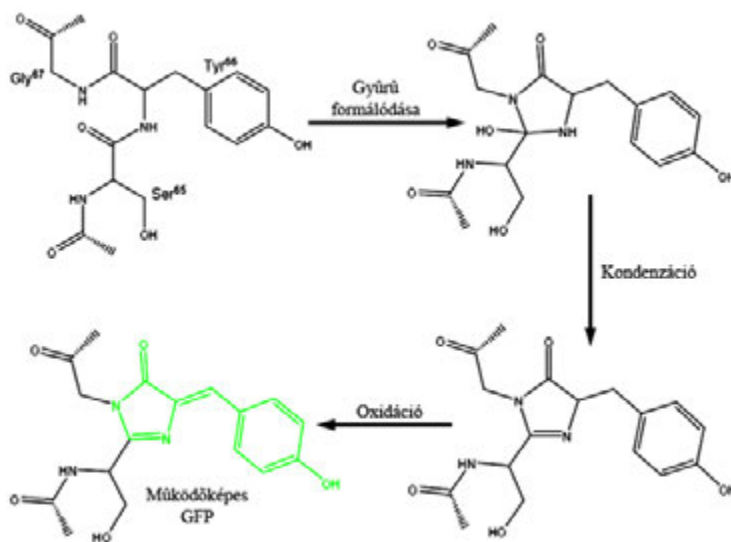
Nemcsak az *Aequorea victoria*, hanem számos más – elsősorban tengeri – élőlényből sikerült előállítani fluoreszkáló fehérjét, és a mesterséges változatok száma is jelentős. **Alapvető szerkezetük** hasonló: a fehérjelánc nagy részét

kitevő, 11 darab β -redő egy közel hordó alakú molekulát hoz létre, amelynek belsejében a centrális α -hélix helyezkedik el. A hordó közepén, az α -hélixben három egymást követő aminosav (X-Tyr-Gly) oldalláncából jön létre a hidrogénhidakkal planárisan (síkban) rögzített tényleges fluorokrómként viselkedő részlet, ami egy 4-(p-hydroxybenzylidene)imidazolidin-5-one (HBI) struktúra. Ez a szerkezet – a hordó + a fluorokrómként funkcionáló részlet – alkot egy monomert, a GFP (és számos mesterségesen előállított fluoreszkáló fehérje) mindössze ennyiből áll (3.46. ábra). De a fluoreszkáló fehérjék között találunk dimer (pl. dTomato), vagy tetramer (pl. dsRed) szerkezetűeket is.



3.46. ábra. A GFP szerkezete: a bal oldalon a fehérjelánc, a jobb oldalon a fluorokrómként viselkedő HBI-részlet lett kiemelve

A GFP-ben a HBI-t alkotó három aminosav a következő: Ser-Tyr-Gly. A **HBI** több lépésben, mint **poszttranszlációs módosulás** jön létre. A folyamat kezdetekor a szerin karboxil- és a glicin amino-csoportja lép reakcióba egymással, és egy gyűrűt hoznak létre (ciklizáció). Az ezt követő vízvesztéssel a gyűrű stabilizálódik, majd végül egy oxidációs lépéssel egy újabb kettőskötés alakul ki a tyrozinon lévő és a frissen keletkezett gyűrűk között (3.47. ábra).



3.47. ábra. A fluoreszcenciára alkalmas rendszer formálódása a GFP belsejében

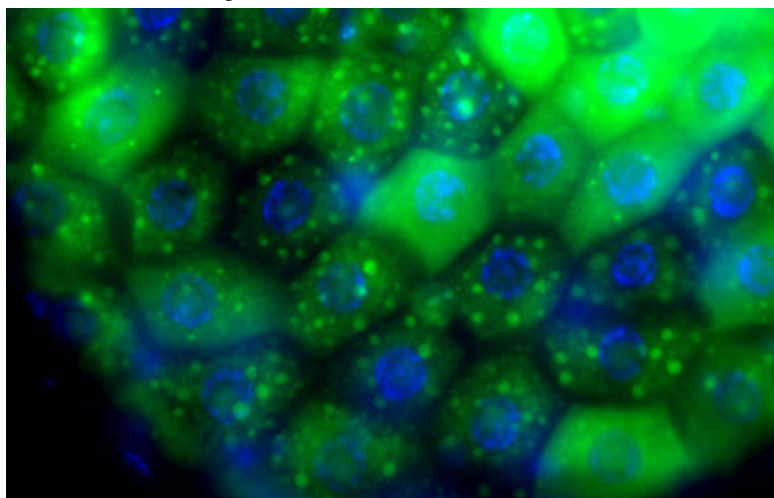
Az így kialakult struktúra **alacsony hullámhosszú** (kék színű, illetve UV) **fénnyel már jól gerjeszthető**, és excitáció után **zöldes fényt fog emittálni**. A fluorokróm felépítésében részt vevő aminosavak tervezett, mesterséges cseréjével érhető el az, hogy a molekula ne zöld, hanem más színű fényt bocsásson ki.

Fluoreszkáló fehérjék használata

Mivel ezeket a fehérjéket a legtöbbször egy másik, **vizsgálni kívánt fehérjéhez kötve** – mint annak fluoreszkáló jelét – használjuk, ezért nem a kész fehérjét, hanem csupán egy olyan vektort (kisméretű, cirkuláris DNS-molekulát) juttatunk be a sejtekbe, vagy az élő szervezetbe, amelyik a fluoreszkáló fehérje intronoktól megszabadított cDNS-ét („génjét”) egy leolvasási keretben tartalmazza a számunkra érdekes fehérje cDNS-ével. A vektor tartalmaz olyan kapcsolódási pontokat, amik lehetővé teszik, hogy stabilan beépülhessen a befogadó genomba. Mivel a kétféle fehérjét kódoló szekvenciák közötti stop kodont eltávolítják, így egy olyan **fúziós fehérje** fog keletkezni az élő sejtekben, amelyik valójában kétféle fehérjeszekvenciát tartalmaz: a vizsgálni kívánt fehérjét és a fluoreszkálóét. Mivel az utóbbiak **molekulatömege** 30 kDa körüli, ezért ez nem szokta jelentősen megzavarni a számunkra fontos fehérje viselkedését (szintézisét, transzportját, lokalizációját, aktivitását), ezért abból helytálló következtetéseket lehet levonni a natív fehérje sorsát illetően.

Amennyiben a vektort sejtenyészeti sejtekbe juttatják be, úgy **transzfekecióról** vagy transzfekektálásról, ha pedig egy megtermékenyített petesejtbe, akkor **transzgenezisről** beszélünk. Az utóbbi esetben a kifejlődött élőlény valamennyi sejtje tartalmazni és – a kísérletes rendszertől függően – expresszálni fogja ezt a fúziós fehérjét, így a kapott organizmus egy **transzgenikus növény vagy állat** lesz.

Mennyiben jelent ez más eszközt a korábban ismertetettekhez képest? Mivel a fúziós fehérje szekvenciáját hordozó vektor beépül a genomba, ezért öröklődni fog, vagyis a transzfekektált sejteket, illetve a transzgen állatokat elég egyszer előállítani, utána – megfelelő feltételek esetén – az utódok hosszú ideig expresszálnak az adott konstrukciót, tehát nincs szükség minden egyes minta megfestésére. Lévéen, hogy a **fúziós fehérje állandóan jelen van**, ezért annak viselkedése akár az élő sejtekben is nyomon követhető. Továbbá, mivel a fluoreszcens jel egy adott fehérjén állandóan jelen van, ezért ko-lokalizációs vizsgálatok esetén elég a másik fehérjére vonatkozó kimutatást (pl. immunhisztokémia) elvégezni. A 3.48. ábrán egy, az autofagoszómák membránjához lokalizáló fehérje, az Atg8 GFP-vel fuzionáltatott változatának viselkedését lehet tanulmányozni, *Drosophila* zsírtestsejtekben. A fluoreszkáló fehérje az Atg8 C-terminálisához volt kapcsolva.



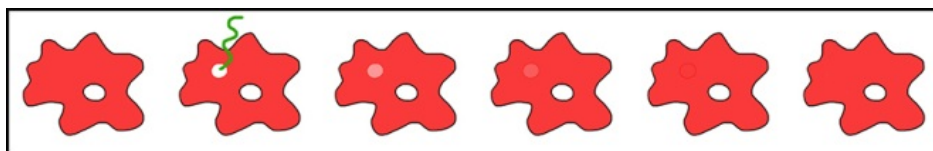
3.48. ábra. Az Atg8::GFP lokalizációja *Drosophila* vándorló lárva zsírtestében. A fénykép jobb felső sarkában olyan sejtek láthatók, amelyekben az Atg8::GFP nagy mennyiségben fejeződik ki és halmozódik fel szabadon a citoplazmában, minden különösebb lokalizáció nélkül. Ezekben a sejtekben még nem indult el az autofágia. A kép bal oldalán és alsó felében viszont olyan sejteket figyelhetünk meg, amelyekben az Atg8::GFP kis, határozott kontúrú foltokban van jelen. Ezek az autofagoszómák, membránjukban az Atg8::GFP-vel. Ezek a sejtek már intenzív autofágiát folytatnak, és ennek megfelelően citoplazmájukban már alig látható szabad Atg8::GFP. A nagy, polyten kromoszómákat tartalmazó sejtmagok DAPI-val lettek megfestve

Fluoreszcencia-visszatérés fotoelhalványodás után (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)

Ahogy azt korábban említettük, a fluorokrómok – hosszabb ideig tartó, erős megvilágítás hatására – hajlamosak elhalványulni, azaz elveszítik az emissziós képességüket. Bár ez – az adott jel hosszú időn át való megfigyelése

szempontjából – alapvetően hátrányos tulajdonságnak tűnik, vannak **technikák**, amelyek pont **erre építve** lehetővé teszik a molekulák mozgásának, dinamikájának vizsgálatát. Négy ilyen fontos metodika van: a FRAP, az iFRAP, a FLIP és a FLAP.

A **FRAP** (fluorescence recovery after photobleaching) – ahogy arra az elnevezése is utal – az élő sejt citoplazmájában lévő, meghatározott, a fluoreszcencia szempontjából inaktív, elhalványított területen vizsgálja a **fluoreszcens jel újbóli megjelenését**. Természetesen nem arról van szó, hogy az erős megvilágítással elhalványított fluorokrómok nyernék vissza az aktivitásukat, a photobleaching folyamat visszafordíthatatlan. Viszont az élő sejt citoplazmájában lévő molekulák képesek –passzívan vagy aktívan – megváltoztatni a helyüket. Ennek a mozgásnak van iránya és van sebessége is. Ha nagyon keveset jelölünk meg a vizsgálandó molekulából, akkor elvileg követhetnénk az egyes molekulák élő sejten belüli mozgását, de a jel/háttér számunkra kedvezőtlen aránya ezt általában nem teszi lehetővé. (Vannak olyan fluoreszcens mikroszkópok, illetve eljárások, amelyekkel egyetlen fluorofór is nyomon követhető.) Amennyiben viszont intenzíven jelzett molekulánk van, úgy nem tudjuk őket egymástól megkülönböztetni, az egyes helyeken való felhalmozódásukat, lokalizációjukat meg tudjuk állapítani, azonban a sejten belüli mozgásuk dinamikájáról nem kapunk képet. Ha viszont – amint azt a 3.49. ábrán nyomon követhetjük – a sejten nagy számban jelen lévő, számunkra érdekes molekulán lévő fluoreszcens jelet a sejt egy jól meghatározott, kicsiny területén elhalványítjuk, akkor megfigyelhetjük, hogy erre a területre mennyi idő alatt, azaz milyen gyorsan jut vissza a fluoreszcens jel. Mivel a fluorofór hozzá van kötve a vizsgálandó molekulához, ezért a fluoreszcencia újbóli megjelenése az elhalványított területen csak az adott molekula **sejten belüli diffúziójának vagy transzportjának** a sebességétől függ.



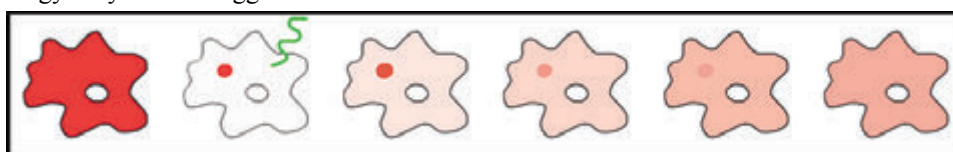
3.49. ábra. A FRAP eljárás lépései. A sejten a fluorofórral jelölt molekula először egyenletes eloszlást mutat, ami természetesen egy dinamikus, folyamatosan változó állapot összegzett képe. Ha egy erős lézersugárral a citoplazma egy részén elhalványítjuk a fluoreszcens jelet, akkor – ha a kérdéses molekula képes (diffúzióval vagy transzporttal) mozogni – egy idő után ez a terület ismét fluoreszkálni fog, az oda vándorló, jelölt molekulák miatt.

Az elhalványított terület méretéből és a fluoreszcens jel újbóli – környezetével megegyező intenzitású – megjelenéséhez szükséges időből ki lehet számolni a molekula mozgásának sebességét, amiből következtetni lehet a mozgás típusára is

Vagyis a FRAP-pel elsősorban a **molekuláris mobilitásra**, annak típusára, illetve a diffúziós állandóra következtethetünk. Ha az elhalványított területre nem jut vissza a fluoreszcens jel, az azt jelenti, hogy a jelölt molekula immobilis, azaz kötve van valamelyik sejtkomponenshez.

Inverz fluoreszcencia-visszatérés fotoelhalványodás után (inverse fluorescence recovery after photobleaching, iFRAP)

Ez az eljárás technikailag pont az előbbieken ismertetett **FRAP fordított változata**: az elhalványítás nem az élő, jelölt sejt egy területén történik, hanem szinte annak teljes egészén, egy kis területet leszámítva (3.50. ábra). Ennek az utóbbi területnek a kiválasztása azonban nem véletlenszerű, ez éppen az a terület lesz, ahonnan azt várjuk, hogy a jelölt molekulák szétterjednek a sejten. Ez tipikusan a sejtmag, vagy a Golgi-apparátus lehet, ahol a vizsgálandó molekula számításaink szerint keletkezik, vagy ideiglenesen tárolódik, majd egy adott jelle lép ki erről a területről. Ha ezt kivéve az egész sejten elhalványítottuk a fluoreszcens jelet, akkor tényleg megtudhatjuk, hogy ez a kompartment lesz-e az **adott molekula forrása**, illetve hogy milyen stimulusra képes a molekula elhagyni ezt a területet, és hogy milyen sebességgel.



3.50. ábra. Az iFRAP módszer használatakor a feltételezett raktározási hely kivételével minden más citoplazma-területen elhalványítjuk a fluoreszcens jelet, majd megnézzük, hogy ebből a lehetséges forrásból milyen feltételek mellett jut ki/vissza a a fluorofórral jelölt molekula a sejt többi részébe

Flourescence loss in photobleaching (FLIP)

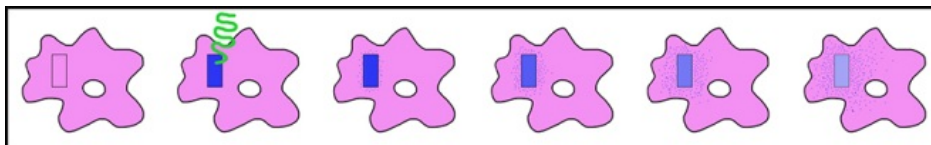
A FRAP eljárással megvizsgálhattuk, hogy a sejt egy adott, kisméretű területére hogyan, mennyi idő alatt jut vissza az onnan eltüntetett fluoreszcens jel. Nem fogjuk tudni viszont, hogy oda csak az elhalványított terület közvetlen közeléből, vagy esetleg a sejt távolabbi részeiből is kerültek molekulák. Azaz, nem lehetünk biztosak abban, hogy az adott molekula a sejt teljes területén ugyanúgy, ugyanolyan paraméterekkel képes-e mozogni. Másfelől viszont abban sem lehetünk biztosak, hogy az elhalványításhoz használt erős lézertény nem okozott-e olyan károsodást az elhalványított terület szerkezetében, ami befolyásolhatná a vizsgálni kívánt molekula oda történő visszavándorlását. Ezeknek a problémáknak a megoldásához nyújt segítséget a FLIP. Ehhez nem egy, hanem **két, egymástól független területet** kell kiválasztanunk az élő, fluorofórral megjelölt molekulákat tartalmazó sejtben (3.51. ábra). Az egyik területet folyamatosan elhalványítjuk egy lézersugárral. Ez a sejt részlet tehát egyfajta „**fekete lyukként**” fog viselkedni: folyamatosan elhalványítja az ide visszaáramló, fluoreszcens jelet. A másik, ettől távolabb lévő, intakt terület lesz a **vizsgálati ablak**: itt figyeljük meg, hogy mennyi idő szükséges ahhoz, hogy innen is eltűnjön a fluoreszcens jel. Mivel azt a területet semmilyen behatás sem éri, ezért itt biztos, hogy a valós viszonyoknak megfelelő értékeket tudunk mérni.



3.51. ábra. A FLIP módszer használatakor a sejt egyik területén folyamatosan elhalványítjuk a fluoreszcens jelet, míg egy másik, érintetlen területen figyeljük meg a fluoreszcens jel eltűnését, azaz a fluorofórt hordozó molekula elvándorlását

Fluoreszcencia lokalizáció fotoelhalványítás után (fluorescence localization after photobleaching, FLAP)

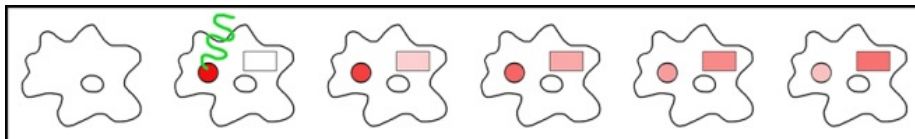
Bár ennek a módszernek az elnevezése azt sejteti, hogy megint csak egy lokalizációs eljárással állunk szemben, valójában ez a módszer elsősorban egy molekula egy adott struktúrán belüli dinamikus áthelyeződésének kimutatására ideális. A vizsgálandó molekulára kétféle fluorokróm kerül. Mindkettő gerjeszthető, akár közel azonos hullámhosszú gerjesztőfényvel, de az emissziós hullámhosszuk (színük) eltérő kell hogy legyen. A másik fontos különbség a két fluorokróm között az, hogy az egyikük jóval érzékenyebb az excitációra, azaz könnyebben elhalványítható. Ha az élő sejt egy bizonyos területén az érzékenyebb fluorokrómot erősen gerjesztjük, akkor ott ez a fluoreszcens jel eltűnik, és csak a másik, sokkal stabilabb jel marad látható. Így az erről a területről elvándorló molekulák továbbra is nyomon követhetők maradnak (3.52. ábra). A FLAP ugyanannyival precízebb az iFRAP-nél, mint amennyivel a FLIP a FRAP-nél: a jelzett molekulák mozgását a sejt olyan részein tudjuk megfigyelni, amelyet nem ért erős behatás. A módszer ideális sejt-váz-polimerek és a hozzájuk kapcsolódó molekulák mozgásának, átrendeződésének vizsgálatára.



3.52. ábra. A FLAP-vizsgálathoz egy kettősen jelölt molekulára van szükségünk. Miután detektáltuk a jelzett molekulák elhelyezkedését a sejtben, azután az egyik fluorokrómot egy erős lézertényvel a sejt egy meghatározott területén elhalványítjuk. Mivel a molekulán lévő másik fluorofór működőképes, segítségével nyomon követhetjük a molekula mozgását a sejtben belül

Fotoaktiváció (photo-activation)

Az előbbieken ismertetett eljárások a fluorokrómok elhalványíthatóságán alapultak, és elsősorban a velük megjelölt molekulák mozgását lehetett ezekkel a metodikákkal tanulmányozni. Mivel a működőképes fluorokrómok már a kísérlet kezdete előtt rajta voltak a vizsgálandó molekulán, nincs „nulla” időpont, amikor bekapcsoljuk a fluorokrómot, és onnan kezdve követjük a jel útját. Vagyis ezekkel az eljárásokkal csak közvetetten tudjuk egy adott folyamathoz (pl. egy molekula endocitózissal történő bekebelezéséhez) szükséges időt megbecsülni. Vannak azonban **aktiválható fluorokrómok** is, amelyek csak egy erős megvilágítást követően gerjeszthetők úgy, hogy azután fényt emittálnak. Az ezekkel felszerelt molekulák mindaddig láthatatlanok maradnak, amíg be nem kapcsoljuk, azaz emisszióra nem kényszerítjük a rajtuk lévő fluorofórt. Ez lesz a kísérlet kezdőpontja, és ettől kezdve lehet mérni és számítani a folyamat végbemeneteléhez szükséges időt (3.53. ábra).



3.53. ábra. Az inaktív fluorofórral megjelölt molekula az élő sejt bármelyik részén előfordulhat. Egy tetszőlegesen (vagy nagyon is tudatosan) kiválasztott kompartmentumban aktiváljuk a fluorofórt, majd egy másik vizsgálati ablakban figyeljük, hogy mikor jut el oda a jel. Ezzel egy időben természetesen az aktiválás helyén is detektálhatjuk a fluoreszcens jel csökkenésének mértékét

Fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (fluorescence resonance energy transfer, FRET)

A módszer elnevezésében az F betű eredetileg Theodor **Förster** (3.54. ábra) nevére utalt, azonban a jelenség felfedezése óta eltelt több mint fél évszázad alatt lassan kicserélődött a két, egyaránt F betűvel kezdődő szó.

Förster eredeti megfigyelése szerint két olyan fluorokróm között, amelyek közül az egyik (A) emissziós maximuma közel egybeesik a másik (B) excitációs maximumával, nemcsak az figyelhető meg, hogy az A-t gerjesztve, az általa emittált fény gerjeszti B-t, amelyik ezután szintén emisszióval szabadul meg a felvett energiától, hanem – a fluorokrómok megfelelő párosítása és közelsége esetén – A-ról a gerjesztéssel felvett energia közvetlenül (azaz az A-ra jellemző emisszió nélkül!) is átkerülhet a B-re, amelyik ezután a neki megfelelő emissziós fényt fogja kibocsátani. Vagyis, míg az első, megszokott esetben kétféle emissziót (színt) látunk (A-ét és B-ét), addig a FRET esetében csak a B-ét. A **donor fluorokrómról** (példánkban az A) az energia egy nem-sugárzásszerű, dipólus-dipólus kapcsolódáson keresztül kerül át az **akceptor (B) fluorokrómra**, amelyik ettől gerjesztett állapotba kerül. Az **energiatranszfer** igen erősen függ a két fluorokróm egymástól való távolságától (annak hatodik hatványával fordítottan arányos).

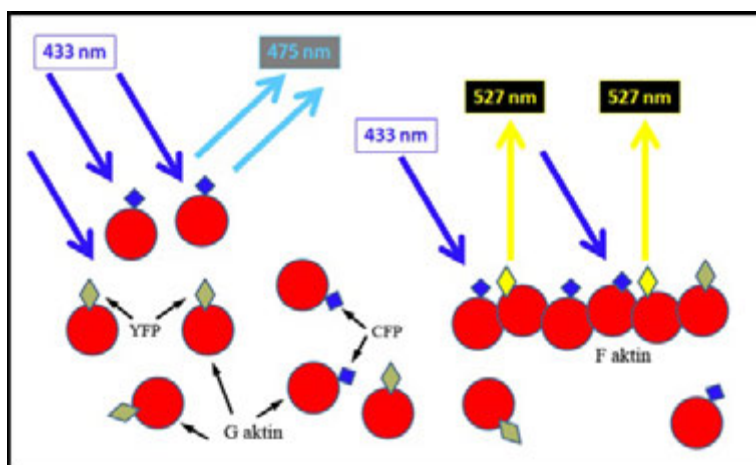


3.54. ábra. Theodor Förster (1910–1974)

Ebből következik, hogy ennek megvalósulásához az kell, hogy a két molekula ne legyen távolabb egymástól, mint 4-8 nm. Ebből ered a módszer biológiai használhatósága. Amennyiben ugyanis van két különböző molekulánk, és azt szeretnénk igazolni, hogy azok egy bizonyos folyamatban tényleg annyira közel helyezkednek el egymáshoz,

hogy **fizikai vagy kémia interakcióba léphetnek egymással**, akkor ezt FRET-tel bizonyíthatjuk. Ehhez az egyikféle molekulát az A (donor) fluorofórral, a másikat pedig a B (akceptor) fluorofórral kell megjelölnünk az élő sejtben. Tegyük fel, hogy az A fluorofór egyedül gerjesztve kék, a B pedig sárga fényt emittál. Ha a sejtben a két molekula egymástól általában messzebb van, mint 8 nm, tehát egymással nincs kapcsolatban, akkor az A-t gerjesztve kék színű emissziót fogunk látni (illetve, ha az emittált fény képes gerjeszteni a B-t, akkor egy kevés zöldet is.). Ha viszont a két molekula összekapcsoltnak jelen a sejtben, azaz a közöttük lévő távolság kisebb, mint 8 nm, akkor az A-t gerjesztve csak a B-re jellemző sárga emissziót fogjuk látni (3.55. ábra).

Természetesen a pozitív FRET eredmény önmagában nem tekinthető egy kölcsönhatás abszolút bizonyítékának, de igen erősen valószínűsíti a két vizsgált molekula interakcióját, amit megfelelő biokémiai vagy ko-immunoprecipitációs vizsgálatokkal is érdemes alátámasztani. Megjegyzendő azonban, hogy a FRET-hez nem válogathatjuk össze teljesen tetszőlegesen a donor és akceptor fluorokrómkat, hiszen korántsem biztos, hogy azok között létrejön a dipólus-dipólus kapcsolat. Az ilyen típusú vizsgálatokhoz a gyártók ellenőrzött **fluorokróm párokat** kínálnak.

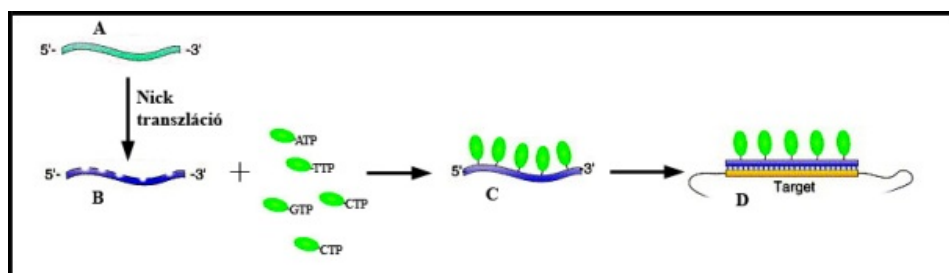


3.55. ábra. A FRET eljárás bemutatása az aktin polimerizációjának példáján. A G-aktin monomereket a FRET-re alkalmas kétféle fluorofórral (CFP és YFP) jelöltük meg. A CFP kék (433 nm) fénnel gerjesztve világoskék fényt emittál, míg a YFP zölddel gerjesztve sárgát. Amíg az aktin nem kezd el polimerizálódni, addig a monomerek szabadon mozognak a citoplazmában, az átlagos távolságuk bőven meghaladja a 8 nm-t. Ekkor 433 nm-es hullámhosszúságú fénnel gerjesztve őket csak világoskék emissziót fogunk látni, mivel ez a hullámhossz nem alkalmas a YFP gerjesztésére. Ha azonban a jelzett aktinok beépülnek a polimerbe, akkor szép számmal kerülnek szorosan egymás mellé olyan monomerek, amelyek közül az egyik CFP-t, a másik YFP-t hordoz. Ekkor a 433 nm gerjesztésre már jelentős mennyiségű sárga emissziót is kapunk, ami azt jelzi, hogy a kétféle módon jelölt aktin összekapcsolódott, és a rajtuk lévő kétféle fluorofór között létrejött az energiatranszfer

Fluoreszcens in situ hibridizáció (fluorescence in situ hybridization, FISH)

Ez a módszer kifejezetten **nukleinsavak jelölésére és kimutatására szolgál**. Segítségével nemcsak bizonyos DNS-szekvenciák, éppen expresszálandó mRNS-ek, hanem mikroRNS-ek jelenléte is detektálható. A keresett nukleinsav-szekvencia jelenlétének kimutatásához úgynevezett **próbákat** használunk, amelyek 30–50 bázispárnnyi szakaszt tartalmaznak a kimutatandó szekvenciából. A próba általában DNS, mivel ennek kettős helixe igen stabil. A két DNS-szál közül azon vannak a fluoreszcens jelek, amelyik **párba tud állni** (azaz komplementerként tud viselkedni) a keresett nukleinsav-szekvenciával. A másik szál „néma”, csupán stabilizáló szerepe van. A próbákat erre szakosodott cégek állítják elő, a detektálni kívánt szekvencia ismeretében. A mintaként szolgáló fixált sejteket feltárják (a DNS-re nézve permeabilissá teszik), illetve a fixált szövetből általában fagyasztó mikrotommal készítenek metszeteket. A mintában lévő **nukleinsavakat denaturálják**, ekkor a DNS két lánc, illetve a tRNS-ek összefekvő szakaszai elválnak egymástól, tehát valamennyi nukleinsav egyszálú lesz. A próba-DNS-t szintén denaturálják, majd felviszik a pufferben lévő mintára. Mintegy 12 óra elegendő arra, hogy a mintában lévő, detektálandó nukleinsav-szekvenciát a próba jelzett DNS-szála megtalálja, és azzal párba álljon. Ilyen módon hibrid nukleinsavak jönnek létre, hiszen a kettős szálú molekula egyik szála a mintából, a másik – jelzett – szála pedig a próbából

származik. A felesleges jelzett nukleinsav eltávolítása után a minta fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálható (3.56. ábra).



3.56. ábra. A FISH lépései. Először a kiválasztjuk és izoláljuk azt a DNS szakaszt (A), aminek a jelenlétét a mintában igazolni szeretnénk. Ezután úgynevezett nick translációval ennek egyik szálából random módon nukleotidokat vágunk ki (B). Következő lépésként – az ép szál alapján – jelzett nukleotidokkal egészítjük ki a hiányos DNS szálát (C). Ennek a próba-DNS-nek a két szálát egymástól elkülönítjük (denaturáljuk), és ugyanezt tesszük a mintában lévő DNS-sel is. Ha a minta DNS-ében megtalálható a jelzett próba-DNS komplementere, akkor a próbát a mintához adva a kétféle DNS-szál összekapcsolódik, azaz hibridizál. A próba DNS-en lévő fluoreszcens jel kötődése alapján a kérdéses DNS szakasz jelenléte a mintában igazolható

Kérdések és feladatok

1. Hogyan jön létre a fluoreszcencia?
2. Mi a különbség a fluoreszcencia és a foszforeszkálás között?
3. Milyen szerkezetű molekulák képesek fluoreszcenciára?
4. Mi a különbség a kromofór és a fluorofór között?
5. Mit mond ki a Stokes-szabály?
6. Hogyan magyarázzuk a fluoreszcencia létrejöttét?
7. Mire vezethető vissza a kioltódás (photobleaching) jelensége?
8. Mi okozza az elhalványodás (quenching) jelenségét?
9. Mi az abszorpciós spektrum?
10. Mi az emissziós spektrum?
11. Mi határozza meg egy fluoreszkáló molekula fényességét?
12. Hogyan lehet fluorofór molekulacsaládokat létrehozni?
13. Mit értünk autofluoreszcencia alatt?
14. Miért jöhet létre autofluoreszcencia?
15. Milyen egy quantum dot szerkezete?
16. Mitől függ egy quantum dot abszorpciós maximuma?
17. Melyek a fluorokrómmal való munka általános szabályai?
18. Mire kell figyelni egy higanygőzlámpa használatakor?
19. Milyen az intenzitás-karakterisztikája egy short pass és egy long pass filternek?
20. Mi a különbség egy long pass filter és egy dikroikus tükör között?
21. Hogyan működik egy dikroikus tükör?
22. Milyen egységek vannak egy szűrőkockában?
23. Minek a festésére alkalmas az akridinoranazs?
24. Hogyan és mit jelöl a DAPI?
25. Hogyan jelöli meg szelektíven a mitokondriumokat a Mitotracker?
26. Mi az alapja a LysoTracker lizoszómákban történő felhalmozódásának?
27. Mire használható egy FACS berendezés?
28. Hányféle detektor van egy FACS készülékben?
29. Mi az epitop?
30. Mi a különbség a primer és a szekunder antitest között?
31. Hogyan lehet kettős immunhisztokémiai jelölést csinálni?
32. Hogyan használjuk a fluoreszkáló fehérjéket?
33. Mit tudunk kimutatni a FRAP módszerrel?
34. Mire ideális az iFRAP?
35. Miért adhat pontosabb adatokat a FLIP mint a FRAP?
36. Mi a jelölésbeli különbség a FRAP és a FLAP között?

37. Mi tudunk kimutatni a FRET módszer segítségével?
38. Mi a FISH eljárás lényege?

4. fejezet - Elektronmikroszkópia

László Lajos

Mi teszi szükségessé az elektronmikroszkóp használatát?

A szabad szemmel nem látható szerkezetek megfigyelésére mikroszkópokat használunk. A szövettani szintű vizsgálatokhoz a fénymikroszkópok alkalmasak. Fényforrásuk látható fényt bocsát ki, aminek a hullámhossztartománya 400–700 nm. Ahogy azt az Optikai alapfogalmak című fejezetben már írtuk, egy **mikroszkóp felbontóképességét** a feloldási határ ($d_{\min}$) értékével jellemezhetjük, ahol a feloldási határ az a legkisebb távolság, amelyet a mikroszkóp két különálló képpontként képez le (feloldható minimális távolság). Egy mikroszkóp **felbontóképessége** (feloldóképessége) alapvetően a minta megvilágítására használt elektromágneses sugár hullámhosszának a függvénye (l. Abbe-képlet). A hagyományos fénymikroszkóp esetében a felbontóképesség javításának éppen az szab határt, hogy a legrövidebb hullámhosszú, de még a látható tartományba eső, képalkotásra felhasználható fény – kékesibolya, $\lambda=440$ nm – alkalmazásakor a $d_{\min}$ értéke körülbelül a hullámhossz fele, azaz 200–220 nm. Ez azt jelenti, hogy egy metszeten a 200 nm-nél közelebb lévő tárgypontok a fénymikroszkópban a legnagyobb nagyítással sem különíthetők el egymástól, a mikroszkóp ugyanis azokat egy pontba képezi le¹.

A **sejtteni dimenziókban** való vizsgálódáshoz azonban ennél sokkal jobb feloldóképességre van szükség, hiszen a sejtek és sejtalkotók mérettartománya ezt kívánja meg. Jobb felbontást elérhetünk úgy, hogy – a levegőhöz képest – növeljük a tárgy és az objektív közötti közeg törésmutatóját (l. immerziós olaj használata).

Amennyiben az így elérhető felbontás sem elég, a látható féynél rövidebb hullámhosszú sugárzást kell használnunk. Ilyen például az **elektronsugár**, amelynek hullámhossza az elektronok sebességével (a rájuk ható gyorsító feszültséggel) fordítottan arányos (l. alább). Minél nagyobb tehát az elektronok sebessége, annál rövidebb a hullámhosszuk (λ); ezzel viszont egyenesen arányosan csökken a feloldási határ ($d_{\min}$) értéke. Egy korszerű elektronmikroszkóp esetében ez az érték több nagyságrenddel kisebb a fénymikroszkópénál ($d_{\min} = 0,1\text{--}0,2$ nm, azaz $1\text{--}2$ Å), ami értelemszerűen nagyságrendekkel jobb felbontást tesz lehetővé.

De Broglie mutatta ki, hogy minden m tömegű és v sebességű anyagi részecskéhez λ hullámhosszúságú mozgás tartozik. Az itt nem részletezett összefüggés szerint a mozgó részecskéhez tartozó hullámhossz a részecske sebességével csökken. Ha az elektronok sebessége $10^7\text{--}10^{10}$ cm/s akkor a megfelelő hullámhosszértékek $7,26 \times 10^{-7}\text{--}6,85 \times 10^{-10}$ cm. Ezzel szemben a látható fény közepes hullámhossza 5×10^{-5} cm, az ultraibolya fényé pedig $2,5 \times 10^{-5}$ cm. Az elektronsugárzás hullámhossza tehát a látható fény hullámhosszának 50–100 ezred része, speciális fizikai célokra használt elektronmikroszkópok esetében pedig egymilliomod része is lehet. A modern műszerek felbontása gyakorlati okokból még nem javult ilyen arányban, de körülbelül ezerszer jobb lehet, mint a fénymikroszkópoké. Ilyen felbontás mellett már bizonyos nagyobb méretű molekulák is elkülöníthetők egymástól. A biológiai anyagok vizsgálatához általában nincsen szükség ennél jobb felbontásra.

A megfelelően előkészített **biológiai minták** vizsgálata során az elektronsugárral: i) a metszeteket át lehet világítani (átvilágító vagy transzmissziós elektronmikroszkóp, TEM), ii) a felületeket le lehet tapogatni (pásztázó vagy scanning /szkenning/ elektronmikroszkóp, SEM), iii) bizonyos elemekre vonatkozóan az anyagösszetételt meg lehet határozni (analitikai mikroszkópia). A mikroszkópgyártók a különböző célokra más-más adottságú mikroszkópokat fejlesztettek ki, de ma már olyan készülékek is forgalomban vannak, amelyek az átvilágító és a pásztázó technikát egyaránt alkalmazzák (STEM).

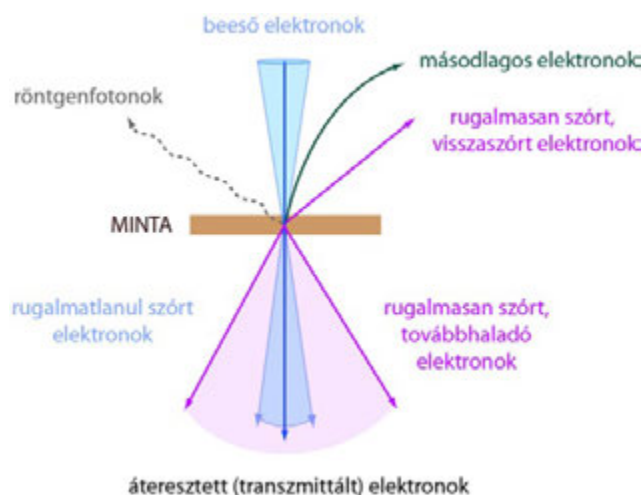
Elektronjelenségek

A becsapódó elektronok egy hányada **nem lép kölcsönhatásba** a minta atomjaival, így változatlan módon folytatja útját. Az elektronok másik része atommagokba ütközik, és azokkal kölcsönhatásba lépve úgynevezett elektronjelenségeket indukál. Bizonyos százalékuk – az anyagi összetétel függvényében – az ütközés következtében

¹ Itt tettünk különbséget a pont- és vonalas felbontás között, bár ismert, hogy a kettő nem ugyanaz.

rugalmasan szóródik: eredeti irányától nagymértékben eltérül, és vagy **folytatja útját**, vagy **visszaverődik**. Mennyiségük a minta **atomjainak tömegszámától** függ. A legnehezebb elemek a beléjük csapódó elektronokat akár 50%-os valószínűséggel rugalmasan szórják, míg a legkönnyebb elemek atomjain csak igen kismértékű az ilyen típusú szóródás. A rugalmasan szóródó elektronok energiája nagy, az ütközés során nem csökken, így a minta mélyebb rétegeiből is kijutnak a preparátumból (4.1. ábra).

A mintával kölcsönhatásba lépő elektronok egy része a **mintán áthatol**: úgy ütközik a minta atomjaival, hogy energiát ugyan veszít, de irányát csak kismértékben változtatja meg. Ezt a jelenséget nevezzük **rugalmatlan szóródásnak** (4.1. ábra).



4.1. ábra. Elektronjelenségek: az elektronok és a minta kölcsönhatásának eredményeként szóró és másodlagos elektronok, valamint röntgenfotonok hagyják el a mintát

Minél vékonyabb a minta, illetve minél kisebb atomszámu elemeket tartalmaz, annál több elektron juthat át rajta: a kellően vékony **biológiai minták alapvetően transzparenszek**. A transzmittált („áteresztett”) elektronokat legelterjedtebben a **transzmissziós elektronmikroszkópiában (TEM)** használják metszetek képi megjelenítésére. Ennek megértéséhez képzeljünk el egy olyan mintát, amelynek az egyik része amorf szénből, egy másik területe amorf nehézfémről áll, a harmadik rész pedig kristályos rendezettségű nehézfémrészecskéket (atomok vagy nehézfém-sók ionjai) tartalmaz. A minta különböző anyagi összetételű részein áteső, változatlan irányban haladó és szóródó elektronok száma (aránya) változni fog: a 10 nm-es amorf szénrétegen 100 elektronból 90 irányváltoztatás nélkül átmegy, a többi különböző szögben szóródik. Ha a réteg vastagsága ennek kétszerese (20 nm), akkor az „egyenes vonalban” átmegyő elektronok száma 80, a szóródóké 20. Az amorf nehézfémre az elektronoknak már csak 5%-a jut át (közel) változatlan irányban, 95%-uk változó szögben rugalmasan szóródik. A minta negyedik, kristályos nehézfémről álló részén rugalmasan szóródó elektronok mindig egy adott szögben térnek el az elektronsugár tengelyétől; ahol az eltérés szöge a minta orientációjától függ. Az útjukat egyenesen folytató és a szóródó elektronok száma itt a minta orientációjától és a minta vastagságától függően változó lesz. Amennyiben ebben a gondolat kísérletben az egy adott szögnél nagyobb eltéréssel szóródó elektronokat lekecskezzük, azaz kizárjuk a képkészítéskor, akkor a minta leképezéseként kialakuló képnek eltérő árnyalatú részei lesznek, ahol a különböző árnyalatokat a rekesz nyílásán átmegyő elektronok száma fogja meghatározni (4.2. ábra).

A 4.2. ábrán látható, hogy a kis atomszámu szén esetében a vastagság növelése alig csökkenti le az áthaladó elektronok számát, míg a nagy rendszámu fém jelentősen szórja az elektronokat. A szénalapú biológiai minták alapvetően transzparenszek, s itt a minta vastagságából adódó árnyalatnyi eltérés csak gyenge kontrasztot ad. Éles határvonal a nehézfémről álló területeket rajzolja körül.

A becsapódó (elsődleges) elektronok által vizsgált felszín atomjaiból elektronok léphetnek ki, melyek a tárgyat elhagyják. Ez utóbbiak az ún. **másodlagos (szekunder)** elektronok (4.1. ábra). Mennyiségük nem áll egyszerű összefüggésben a vizsgált felületet alkotó atomok tömegszámával. Kilépési irányuk és mennyiségük nagymértékben függ a vizsgált felület topográfiájától. Energiájuk kicsi, ezért a mintának csak kis mélységéből tudnak a felszínre jutni. A detektorral összegyűjtött másodlagos elektronokat a **páztázó elektronmikroszkópban (SEM)** használják képalkotásra: ennek során a „megvilágító” sugárnyaláb egy megfelelően előkészített felületet pásztáz végig, tapogat le pontról pontra.

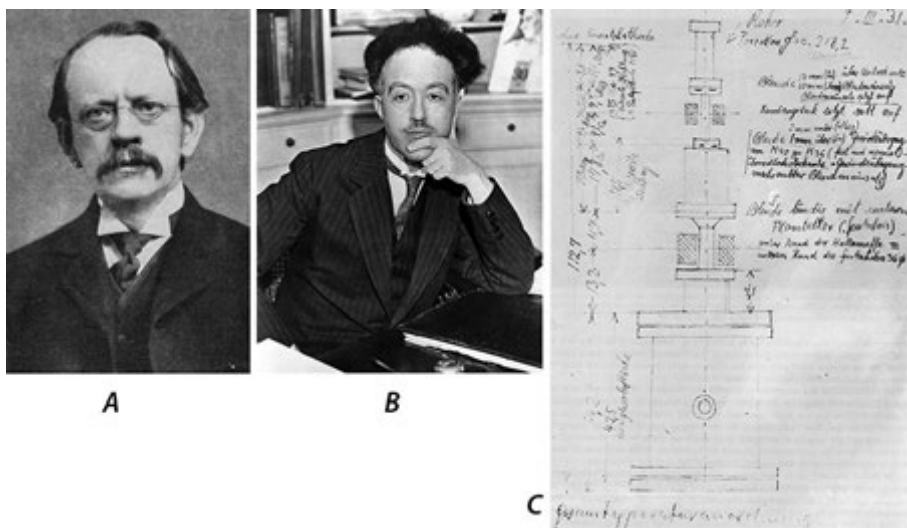
A minta atomjaiba becsapódó elektronok „kiűthetnek” elektront az adott atom valamelyik (K, L, M) elektronhéjáról. A kilépő elektron helyébe az egyik külső héjról egy elektron ugrik, miközben energia szabadul fel, kvantumokba, fotonokba „csomagolt” módon. Ez **röntgensugárzás** formájában detektálható (4.1. ábra). Az elektronhéjaik közötti energiakülönbségek jellemzőek az egyes atomokra, ezek alapján az atomok azonosíthatók. Az elektronok belsőbb héjra való ugrása közben kibocsátott röntgensugárzás elemzésével tehát az anyagi összetétel határozható meg. Az **analitikai** célokra használt **mikroszkóp** tulajdonképpen egy röntgensugár-detektorral felszerelt pásztázó elektronmikroszkóp, amely a gyorsítófeszültség nagyságától függően élettelen és biológiai minták vizsgálatára is használható.

Az elektronsugárzást képalkotásra használó mikroszkóp addig elképzelhetetlen dimenziókat nyitott a kutatások előtt, mind az élő-, mind pedig az élettelen tudományok területén, hiszen használatával lehetővé vált az anyag atomi szintű vizsgálata. **1986 a fizikai Nobel-díjak** történetében az elektronmikroszkópé volt: ebben az évben a díjat megosztva három német fizikus, Ernst **Ruska**, Gerd **Binnig** és Heinrich **Rohrer** kapták. Ernst Ruska az elektromágneses lencsék és az elektronmikroszkóp kifejlesztésében végzett úttörő munkássága alapján, Binnig és Rohrer pedig a felület atomonkénti letapogatására alkalmas technológia kidolgozásáért kapta az elismerést (pászttázó alagút mikroszkóp, „scanning tunneling microscope”).

XML to PDF by RenderX XEP XSL-FO F ormatter, visit us at <http://www.renderx.com/>

elektromágneses lencsét Hans **Busch** készítette, aki ezzel bizonyította, hogy az elektronsugár inhomogén mágneses térben fókuszálható (1927). Busch ezzel tulajdonképpen megteremtette az elektronmikroszkóp létrehozásához szükséges alapvető feltételt – ahogy az a Nobel-díj-átadási ünnepségen 1986-ban elhangzott: az elektronmikroszkóp megszületése és léte azon alapszik, hogy egy megfelelően kialakított elektromos tekercssel az elektronsugarat ugyanúgy lehet „terelni”, mint ahogy azt az optikai lencsék teszik a fénnel (l. 4.4 ábra).

Az első elektronmikroszkóp megalkotása közös munka eredménye volt, amelyben Ruska mellett egy elektromérnök, Max **Knoll** is részt vett (Berlin, 1931, 4.3.C ábra). Ezt megelőzően Ruska az elektromágneses tekercsek elektronokra gyakorolt hatásait tanulmányozta, s rájött, hogy az elektromos lencsék fókusz távolsága lecsökkenthető, ha a tekercset vasköppennyel vonja be (4.10.B ábra). 1933-ban önállóan saját mikroszkópot épített, amelynek a nagyítása 12 ezerszeres volt. Az első, kereskedelmi forgalomba került mikroszkóp megalkotásán (1939) már a Siemens cég alkalmazottjaként dolgozott. Ebben a munkában kollégája Bodo **von Borries** volt. A mérnökök kezdettől fogva törekedtek arra, hogy a találmány a biológiai minták vizsgálatára is alkalmas legyen. Annak érdekében, hogy ez az eszköz az élettelen és élő tudományok minél szélesebb körében elterjedjen, 1940-ben egy olyan laboratóriumot hoztak létre, ahol külföldi kutatók is kipróbálhatták és kísérleteikben használhatták az új mikroszkópot. Ennek köszönhetően 1944-ig körülbelül 200 olyan publikáció született, amely elektronmikroszkópos munka eredménye volt. A második világháború ugyan lelassította a fejlődést, de 1954-ben megszületett az „Elmiskope 1”, amelyet világszerte több mint 1200 intézetben használtak.



4.3. ábra. Joseph John Thomson (A), Louise de Broglie (B) és az elektronmikroszkóp vázlatrajza Ruska jegyzőkönyvéből (C)

Az első pásztázó elektronmikroszkóp összeállítása Manfred **von Ardenne** nevéhez fűződik (1938). Ennek a típusnak a továbbfejlesztett, kereskedelmi változatára 1964-ig kellett várni.

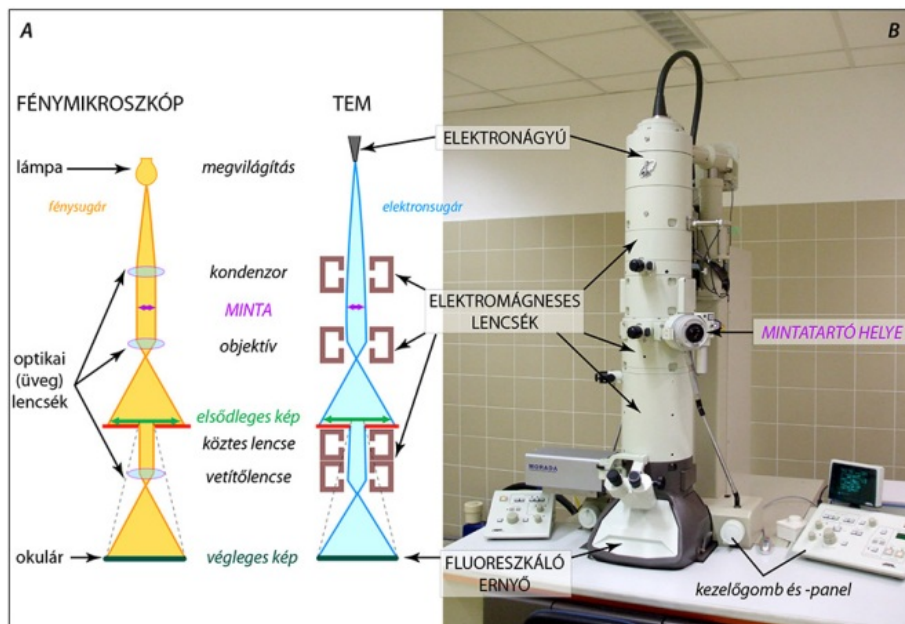
A transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)

A TEM és a fénymikroszkóp összehasonlítása

Az optikai mikroszkóp és a **TEM képkalkotása** alapvetően hasonló: mindkettő egy preparátumon (metszeten) áthaladó elektromágneses sugarakból álló nyalábot használ a tárgy leképezésére. A sugárforrás az egyikben (látható) fényforrás, lámpa, a másikban elektronágyúnak nevezett elektronforrás. Az ezek által kibocsátott sugarakat a fénymikroszkópban optikai lencsékkel, az elektronmikroszkópban elektromágnesekkel terelhetjük, fókuszálhatjuk és teríthetjük. A preparátumhoz érő sugarak egy része változatlanul halad át a metszeten, a másik része kölcsönhatásba lép vele (pl. megváltoztatja hullámhosszát, irányát, rezgéssíkját, l. 4.1. és 4.2. ábra). Mindkét mikroszkóptípusban a preparátumon áteső, változatlanul áthaladó és rugalmatlanul szóródó sugarakat használhatjuk képkalkotásra, a rugalmasan szóródókat abból kizárjuk.

Egy **átvilágító elektronmikroszkóp felépítése** tehát egy optikai mikroszkópéhoz igen hasonló. A két berendezés működési elve **lényegileg a következő**: a sugárforrás által kibocsátott elektromágneses (foton vagy elektron)

nyalábot a kondenzorlencse fókuszálja a minta síkjába. Az innen továbbhaladó sugarak kereszteződve képet alkotnak az objektív hátsó fókusz síkjában. Ezt a nagyított, látszólagos, elsődleges képet, illetve ennek részletét a kívánt nagyításúra alakíthatjuk, ha a kép síkjába helyezett blendével a sugaraknak csak egy részét engedjük tovább, ám ezeket egy vetítő (projektor) lencserendszerre vezetjük, amely szétteríti őket, azaz tovább nagyítja a képet. A végleges, látható kép tehát az eredeti tárgypontokból csak azokat tartalmazza, amelyeket a blendével átengedtünk, de ennek a részletnek a mérete a tárgy megfelelő részletéhez viszonyítva már jóval nagyobb lesz (4.4. ábra és I. táblázat).



4.4. ábra. A fénymikroszkóp és a TEM képképzésének összehasonlítása (elvi felépítések, A), valamint a képképző elemek helyzete az elektronmikroszkópban (B). Az A ábrán az objektív alatti piros vonalak az objektív blendét jelzik, amelynek síkjában kialakul az elsődleges kép. Figyeljük meg, hogy a többszörösére nagyított, végleges kép az elsődleges képnek csak a középső, egyenes vonalból álló részét tartalmazza, a két kép közötti nagyítás mértékét pedig vékony szaggatott vonal jelzi!

I. táblázat. A fénymikroszkóp és a TEM összehasonlítása

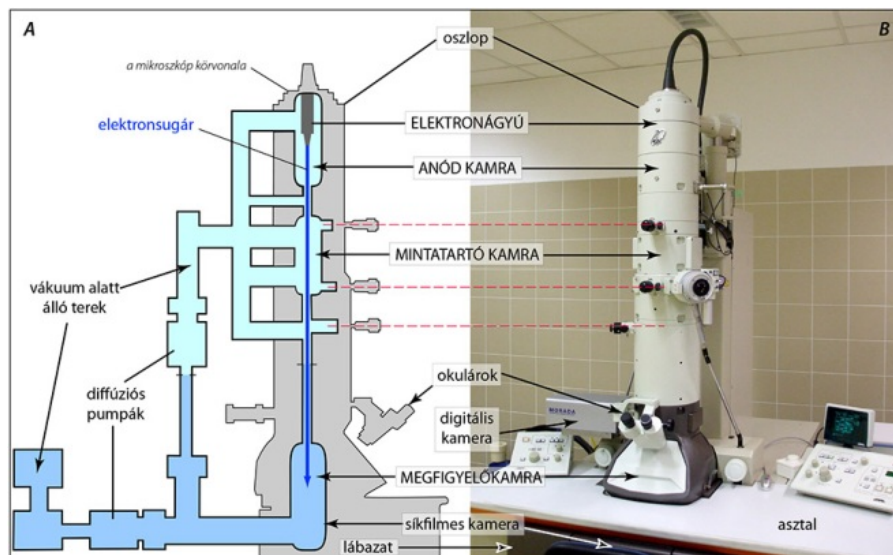
Megvilágítás (fényforrás)	lámpa	elektronágyú
Kondenzor	optikai (üveg)lencse	elektromágneses lencse
Minta elhelyezése	tárgyasztal	mintatartó
Objektív	optikai (üveg)lencse	elektromágneses lencse
Képvetítő, nagyító és képfelfogó rendszer	tükör, optikai (üveg)lencse, okulár	elektromágneses lencsék, fluoreszcens ernyő
Képrögzítés (kamera típusa)	analóg vagy digitális	analóg vagy digitális

A két mikroszkóptípus között fontos különbség, hogy az elektronmikroszkópban a sugárforrás védelmére és az elektronnaláb zavartalan haladásának érdekében **vákuumot** kell létrehozni (10^{-6} – 10^{-2} Pa). Az elektronsugár létrehozásához, tereléséhez és megfelelő minőségű kép létrehozásához nagy feszültségű, stabil áramkörökre van szükség. A mikroszkóp működése közben folyamatosan hő termelődik, így a **hűtéséről** gondoskodni kell (vízhűtés, vízpumpa). Mindezek figyelembevételével a **TEM főbb részei** a következők:

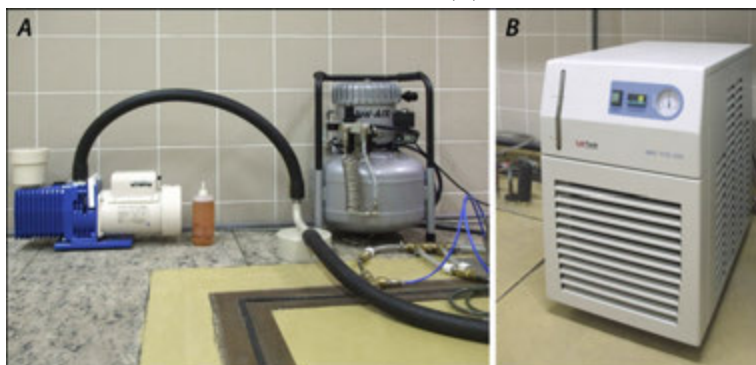
1. **Elektronforrás** (elektronágyú): kibocsátja az elektronnalábot, amellyel „megvilágítjuk” a tárgyat;
2. **Kondenzorlencse**: az elektronsugár-nyalábot a tárgysíkba vetíti;
3. **Mintatartó**: a tárgyat (mintát) hordozza;
4. **Objektívlencse**: hátsó fókusz síkjában létrehozza az elsődleges, már nagyított, köztes képet;
5. **Közbenő (köztes) és vetítő (projektor) lencse**: továbbnagyítják az elsődleges képet;
6. **Képfelfogó ernyő és képrögzítő rendszer**: megjeleníti a végleges képet;

7. **Segédberendezések:** vákuum-, hűtő- és feszültségstabilizáló rendszerek: biztosítják a mikroszkóp megbízható, stabil működését.

Az elektronforrás, az elektromágneses lencsék, a mintatartó és a képfelfogó ernyő a sugárnyaláb útja mentén, a mikroszkóp **oszlop**ában kialakított terekben találhatók (4.5. ábra). A kezelőgombok és kapcsolók magán az oszlopon, az **asztal**on lévő paneleken, illetve az asztal alatti **lábazat** szekrényeiben vannak elhelyezve. A segédberendezések szintén a lábazatban, vagy a mikroszkóp mellett kapnak helyet (4.6. ábra).



4.5. ábra. A TEM fő részei és vákuum alatt lévő belső terei (ezek világos- és sötétkékek, A), valamint a mikroszkóp külső felszíne (B)



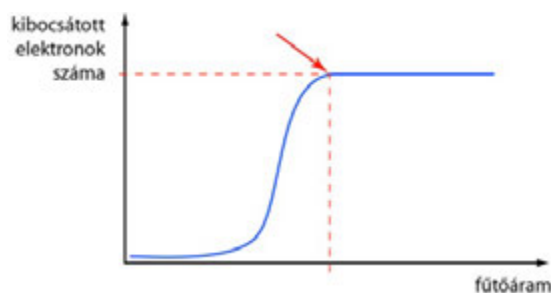
4.6. ábra. A TEM egyes segédberendezései: vákuumot előállító pumpák (A) és vízhűtő (B)

A TEM képképző elemei

Az elektronágyú

Az elektronmikroszkóp „fényforrása” az **elektronágyú** (4.4. és 4.5. ábra), amelynek részei a katód, a Wehnelt-henger és az anód (4.9. ábra). A lelke egy elektromos árammal felfűtött, meghatározott anyagú (wolfram vagy lantan-hexaborid, LaB_6) **fémzárlat**, amely V alakban hajlított. A fémzárlat negatív töltésű: ez a **katód**. Belőle az elektronok a fűtőáram hatására a V betű csúcsán lépnek ki (izzózárlat katód típus, 4.9.A ábra).

A **fűtőáram** növelésével a katód elektronkibocsátását egy telítési görbének megfelelően tudjuk fokozni. Az áramerősség emelésének hatására egy pontig nő a kibocsátott elektronok száma (a leképezett kép egyre fényesebb lesz), a **telítési pont** fölött azonban már hiába emeljük tovább az áramerősséget, az emittált (kibocsátott) részecskék mennyisége gyakorlatilag nem növelhető tovább (túlfűtés esetén viszont a katód élettartama jelentősen csökken!). A telítési görbe felső, konvex flexiós pontjának megfelelő fűtőáramot érdemes tehát használni (4.8. ábra).



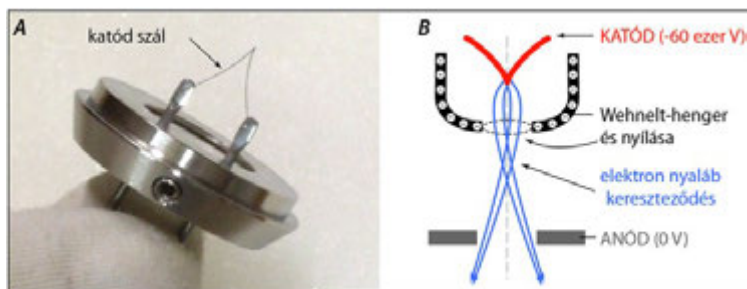
4.8. ábra. A fűtőáram (vízszintes tengely) és a kibocsátott elektronok száma (függőleges tengely) közötti összefüggés: a fűtőáram erősségének emelésével a kibocsátott elektronok száma a konvex flexiós ponton túl tovább már nem növelhető (egyszerűsített vázlatrajz)

Az elektronforrásként használt katódszálat az ún. **Wehnelt-henger** veszi körül. Ennek feszültsége néhány száz voltal negatívabb, mint a katódé, s rajta egy nyílás van: ezen haladnak át az elektronok (4.9.B. ábra). A Wehnelt-henger szabályozza az elektronok katódszálból történő kilépését: a kilépés helyét a szál csúcsára szűkíti, és meghatározza a kilépő elektronok számát (azaz a „fényerőt”), de egyben tereli is az elektronokat. Az elektronágyúból kilépő sugárzás forgásszimmetrikus nyalábot alkot, amely egy kereszteződési pont után szét tart.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a sugárnyaláb „fényerejének” (elektronsűrűségének) kialakításában a katódnak és a Wehnelt-hengernek is szerepe van. Ezért a megfelelő tulajdonságú „megvilágítás” kialakításához a katód és a Wehnelt-henger paramétereit össze kell hangolni. A régebbi mikroszkópokban a két érték külön-külön állítható volt, az újabb generációjú berendezéseknél azonban már csak kapcsolatosan változtathatók, illetve az utóbbi automatikusan igazodik a katódhoz.

Az elektronsugár hullámhossza az elektronok sebességével fordítottan arányos: annál kisebb a hullámhossz, minél nagyobb a sebesség. A nagy felbontás eléréséhez tehát az elektronokat kellő sebességre fel kell gyorsítani: erre szolgál az ún. **gyorsítófeszültség**. Feszültségkülönbséget kell tehát létrehozni a katód és egy, az elektronok útjába eső sík között. Ezt a földelt **anód** (feszültsége 0 V) biztosítja, amely tulajdonképpen egy gyűrű: a nyílása felé „repülő” elektronok a feszültségkülönbség miatt felgyorsulnak, miközben az anód nyílásán át ki is lépnek az ágyúból (4.9. ábra).

A biológiai minták vizsgálatára használt transzmissziós elektronmikroszkópokban a gyorsítófeszültség értéke általában **50–60 ezer V**. Az érték helyes megválasztása nagyon fontos az eredményesség szempontjából: ha túl nagy a gyorsítófeszültség, az elektronoknak nagyon nagy lesz az energiájuk, így jelentős részük úgy halad át a mintán, hogy azzal nem lép kölcsönhatásba (4.1. ábra). Ez lényegében azt eredményezi, hogy a kapott kép kontrasztszegény lesz (l. 4.2. ábra). Alacsony gyorsítófeszültségnél az elektronoknak nem lesz megfelelő sebességük, ezért a mikroszkóp felbontása romlik. A megbízható működés szempontjából a gyorsítófeszültség stabilan tartása tehát fontos követelmény.



4.9. ábra. Az elektronágyú részei: izzókatód (A) és az ágyú hosszsz metszeti vázlata (B). (Az A ábrán látszik, hogy egy esetleges katódcsere esetén a katódot csak kesztyűvel szabad megfogni)

Az elektromágneses lencsék és a blendék

Az elektronsugár mágneses lencsékkel terelhető, azaz fókuszálható és szétteríthető. A TEM oszlopában **négyféle elektromágneses lencse** van, amelyek sorrendje fentről lefelé a következő: **kondenzorlencse**, **objektívlencse**,

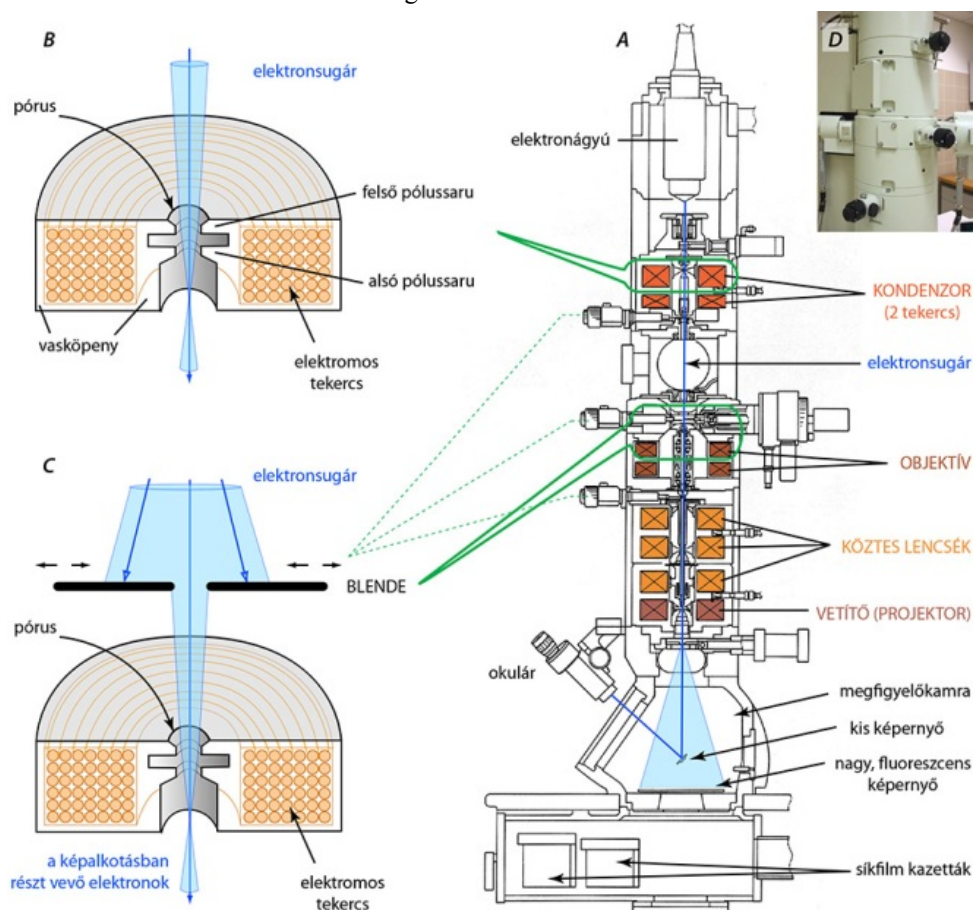
köztes lencse és projektor- (vetítő)lencse. A modern mikroszkópokban ezek kettős lencsék, azaz két-két tekercs alkotja őket.

Funkciójuk röviden a következő. Az elektronforrásból kilépő sugárnyalábot a kondenzorlencsék gyűjtik össze és terítik szét egy adott méretű folton belül közel homogén megvilágítássá. A megvilágító nyaláb lehet közel párhuzamos, azaz síkhullám (képalkotásnál), vagy fókuszált, azaz konvergens (analitikai alkalmazásnál). Ez a nyaláb világítja meg a mintát. Az elsődleges leképezést végző objektívlencse által alkotott képet (4.4. ábra) a köztes és a vetítőlencsék közvetítik a képrögzítőre (film, digitális kamera érzékelője). A köztes lencsék száma változó (2–3), s a kívánt nagyítás mértékétől függően kapcsolhatók be és ki. Kis nagyításnál elegendő csak az egyiket használni, közepes és nagyobb nagyításoknál a többit is be kell kapcsolni (4.10.A ábra). Amikor egy intermedier lencsét bekapcsolunk, a kép 180 fokban elfordul (ennek okára nem térünk ki).

A kapott kép nagyítása független a megvilágított terület nagyságától, egyedül attól függ, hogy az objektívlencse képsíkjában megjelenő rögzített nagyítású, elsődleges (köztes, intermedier) képet a vetítőrendszer hányszorosára nagyítva vetíti tovább a képrögzítőre (4.4. ábra).

A **mágneses lencsék** térerősségét a tekercsben folyó áram határozza meg. A tekercs közepén nyílás (pórus) van, amit kúposan megmunkált pólusperemek, ún. **pólussaruk** képeznek (14.10.B ábra). A lencsék tekercsében folyó áram hatására mágneses erővonalak keletkeznek, amelyek az elektronokat terelik. A tekercs vasköppennyel borított.

A lencsék között elhaladó elektronnyalábban az elektronok spirális pályán mozognak. A régebbi mikroszkópokban ez világosan érzékelhető volt a nagyítás változtatásakor, ilyenkor ugyanis a kép adott szögben elfordult. Ez az elmozdulás a modern berendezéseknél már korrigált.



4.10. ábra. Az elektronsugár terelése: az elektromágneses lencsék helyzete a mikroszkópban (A), egy lencse metszete a pólussarukkal (B), az objektívblende működése (C) és a blendék kezelőgombjai a mikroszkóp oldalán (D)

A **lencse fókusz távolságát** az elektromágnes áramerősségével lehet szabályozni. A **mélységélesség** a lencse azon tulajdonsága, hogy nem csak egy síkról, hanem a tér (tárgy) adott mélységű szeletéről ad éles képet. Értéke függ

a hullámhossztól és a numerikus apertúrától. Az elektronsugár esetében ez az ultravékony metszet vastagságánál nagyobb érték, így a **TEM a metszet teljes vastagságát egy síkba képezi le**.

Csakúgy, mint az optikai (üveg)lencséknek, az elektromágneses lencséknek is vannak **lencsehibáik**. Ezek egy részét korrigálhatjuk az apertúra szűkítésével, mivel a hibák a lencse széle felé jelentkeznek leginkább. Az apertúra szűkítése a felbontás csökkenésével jár, így a felbontóképességnek a lencsehibák kiküszöbölése szab határt (vagyis a felbontóképesség elmarad az elméletileg lehetséges értéktől).

A megfelelő képminőség kialakításában fontos, hogy a tárgyat (metszetet) megvilágító és az azt elhagyó sugárnyaláb egyenletes sűrűségű és homogén legyen. Ez a feltétel a nyaláb tengelyének közelében teljesül. Az ezen kívül eső, a képkalkotás szempontjából nem kívánatos elektronokat a **kondenzorlencse alatti és az objektívlencse feletti blendékkal** (apertúrákkal) zárhatjuk ki a sugárnyalábból. Ahogy azt már korábban írtuk, a mintával találkozó elektronok kétféleképpen ütközhetnek a minta atomjaival. Ha az elektron – megtartva energiáját – csak irányát változtatja meg (azaz „el pattan” a mintáról), akkor **rugalmas szóródásról**, ha az ütközés következtében lelassul (energiát veszít), de irányát csak kissé változtatja meg, akkor **rugalmatlan szóródásról** beszélünk (4.1. ábra).

A blendék – apertúrayílásuktól függően – a sugárnyaláb periferiáját zárják ki (az ott haladó szóródó elektronokkal együtt) a továbbhaladó elektronnyalábból (4.10.C ábra). Minden egyes blende nyílásának méretét a gyorsítófeszültséggel (azaz a rugalmasan és rugalmatlanul szóródó, valamint a mintán változatlanul áthaladó elektronok arányával) kell összehangolni annak érdekében, hogy a **kapott kép kontrasztja és felbontása is elfogadható** legyen (l. 4.2. ábra).

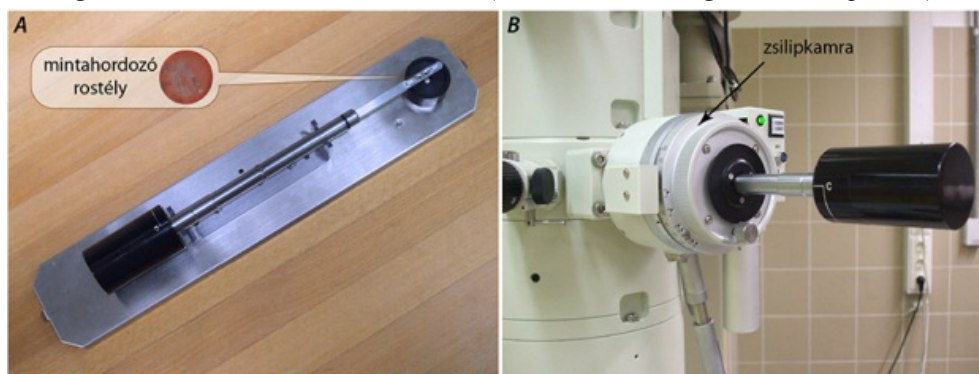
Adott gyorsítófeszültségnél a blende szűkítésével a kontraszt növelhető. Adott blendenyílásnál viszont a gyorsítófeszültség emelésével egyre nagyobb sebességgel érkeznek az elektronok, nő a mintán változatlanul áthaladó és a rugalmasan ütköző elektronok száma. Utóbbiak egyre kevésbé térülnek ki a sugárnyaláb tengelyéből, tehát a blende nem rekeszeli le őket. Mivel így a ketténél több elektron vesz részt a képkalkotásban, a tárgy egyes pontjai közötti anyagi különbségek egyre kevésbé képeződnek le a kialakuló képbe, tehát annak kontrasztja egyre csökken (l. 4.2. ábra). Miután a felbontás az elektronok sebességével nő, a kontraszt viszont csökken, az optimális eredményt, azaz a legjobb képminőséget e két szempontot együttesen mérlegelő kompromisszumok árán érhetjük el.

A kondenzorlencse blendéje a lencse alatt, a többi lencséé az elektromágnes fölött van. A lencsékhez tartozó blendék kezelőgombjai az oszlop oldalán találhatóak, s velük a blendék sugárútba való behelyezését és kiemelését, illetve az apertúra beállítását végezhetjük (4.10.D ábra).

A mintatartó

Egy biológiai minta elektronmikroszkópos vizsgálatra való előkészítése többlépéses folyamat (l. később). A megfelelő preparátum egy nagyon vékony, ún. ultravékony metszet, amelynek vastagsága 50–100 nm. A metszést követően a metszetek egy hordozófelületre, ún. **mikrorostélyra** kerülnek. Ezeket finom csipesszel helyezzük a **mintatartóba**, majd azt a mikroszkóp oldalán található nyíláson keresztül betoljuk a zsilipkamrába (4.11. ábra). Itt ugyanolyan vákuumot kell kialakítani, mint az oszlopban, s csak ezt követően juttatjuk be a mintánkat a mikroszkóp belső terébe, ahol az elektronnyaláb halad.

A röntgendiffrakciós vizsgálatokra is alkalmas mikroszkópok mintatartói olyan kialakításúak, hogy segítségével a minta dőlésszöge adott határokon belül változtatható (a mintatartóba ún. goniométert építettek).



4.11. ábra. TEM mintatartója (A) és a zsilipkamrába helyezett mintatartó (B)

A minta a vizsgálat során kisebb-nagyobb mértékben károsodik. A melegedés általában nem jelentős (a keletkező hőt a mintatartó elvezeti), de a vákuumtérbe bekerült szennyeződések adszorbeálódhatnak a mintán (kontamináció), illetve az ionizálódott vízgőz kiégetheti a metszetet (eloxidálja annak széntartalmát, l. 4.30.B ábra). A minta előkészítése és kezelése során ezért nagyon fontos a tisztaság (kesztyű használata) és a körültekintő, gondos munka.

A minta, a képalkotó rendszer és a képrögzítés

A TEM működési elvének megfelelően a képalkotásban azok az elektronok vesznek részt, amelyek a mintán áthaladnak. A transzparencia feltétele, hogy a metszet kellően vékony legyen, és viszonylag kevés nagy tömegszámú elemet tartalmazzon. A képalkotásban a rugalmasan és a rugalmatlanul szóródó elektronoknak is van szerepük. A biológiai mintákban eredendően kevés olyan atom van, amelyik rugalmas szóródásra kényszeríti az elektronokat, ezért a metszeteket (nagy tömegszámú) **nehézfémekkel** kezeljük. Mivel ezek különböző jellegű (adszorpció, ionos kötés képzése vagy redukció) és mértékű kölcsönhatásba lépnek a sejt komponenseit alkotó biológiai makromolekulákkal, a mintában való megkötődésük – a létrejövő képen megjelenő kontrasztok révén – lehetővé teszi az egyes struktúrák környezetüktől való elkülönítését (l. 4.2. ábra). A nehézfémekkel történő kezelés a **kontrasztosítás**.

A fématomokba ütköző elektronok szóródnak, s közülük a rugalmasan szóródókat egy megfelelően beállított blendével ki lehet zárni a sugármenetből (l. 4.10.C ábra). A továbbhaladó elektronok felvillanásokat okoznak a megfigyelőkamra alján elhelyezett szcintillációs vagy **fluoreszcens képernyőn**. A sugárnyalázból kizárt elektronok nem érkezik ide, azon tárgypontok képpontjai tehát, amelyekkel kölcsönhatásba léptek, hiányozni fognak a képből: ezek lesznek a **kép sötét (elektronszóró) pontjai**. Egy TEM kép tehát világos és sötét pontokból álló mintázat (l. 4.2. és 4.14 ábra).

Az „elektronszóró” kifejezést gyakran helyettesítik az „elektrodenz” kifejezéssel, holott az utóbbi éppen az előbbi ellenkezőjét jelenti. A minta erősen elektronszóró helyeiről a szóródó elektronok nem jutnak el a képernyőre, nem vesznek részt a kép kialakításában, tehát helyükön a pozitív képen fekete képpontok lesznek. Ezzel szemben az elektrodenz kifejezés elektronokban gazdag, sűrű (denz) helyet jelent – viszont ahová sok elektron érkezik, ott a pozitív kép világos, fehér részei alakulnak ki. Az elektrodenz jelzőt tehát helytelen a kép sötét részeinek jellemzésére használni!

Egy TEM kép értelmezésénél figyelembe kell venni, hogy a képet a teljes mintán áteső elektronok hozzák létre, azaz a képernyőn az ultravékony **metszet teljes vastagságban leképeződik**.

A keletkező képet a megfigyelőkamra üveglapja előtt elhelyezett okuláron keresztül nézhetjük (4.12. ábra). A vizsgálódást érdemes kis nagyításon kezdeni, ahol a teljes metszetet áttekinthetjük, s ellenőrizhetjük az eddigi munka eredményességét. Ezután hozzáláthatunk a kiválasztott területek nagyobb nagyításon való megfigyeléséhez.



4.12. ábra. A megfigyelőkamra és a képrögzítő kamerák (A), a fluoreszcens ernyő az okulárokkal (B)

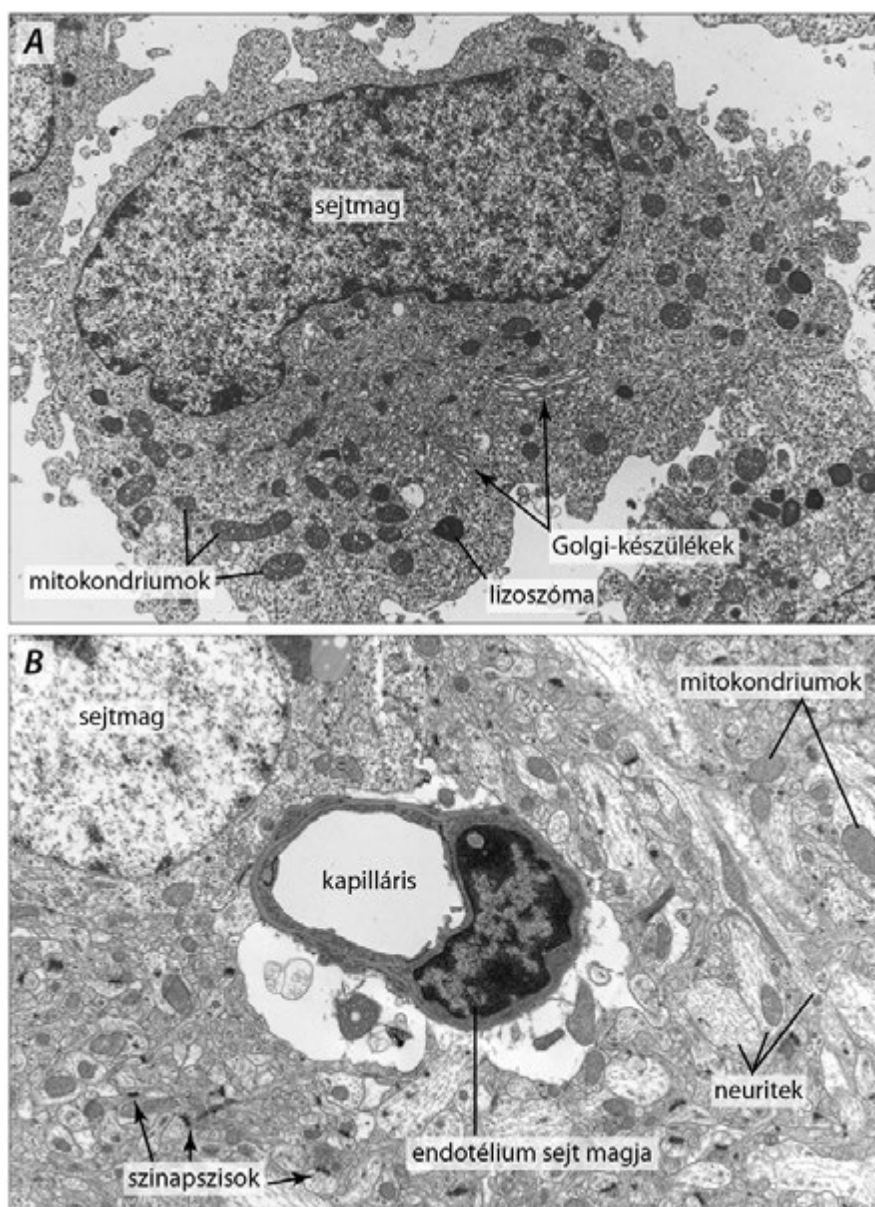
Megfigyeléseink dokumentálása céljából, és mivel a metszetek nagyon sérülékenyek és a mikroszkópban károsodnak is, érdemes róluk felvételeket készíteni. **Síkfílm (analóg) kamerát** a mikroszkóp lábazatában, a megfigyelőkamra alatt találunk (4.5. és 4.10.A ábra). Használatkor a nagy képernyő felemelkedik, így az elektronsugár beléphet a filmkamrába. Mivel ez a tér is vákuum alatt van, a negatívok ide – zsilipelés után – csak a fotózás idejére kerülnek be.

A negatívok a hagyományos fotótechnikában használatos bevonattal rendelkező síkfilmek, amelyeken az elektronok becsapódása ugyanolyan változásokat idéz elő, mint a fotonok becsapódása. A film felszínén lévő cellulózalapú emulzióban az elektronbecsapódás által ezüst-kloridból vagy ezüst-bromidból kivált fémezüstöt kémiai reakcióval (hívóoldattal) tesszük láthatóvá. A fényérzékeny negatívokat sötét fotókamrában kell az adagolódobozba (kazettába) betölteni, majd azt az üres, exponált negatívokat befogadó kazettával együtt a mikroszkópasztal alatt kialakított kamrába kell helyezni. A filmkockák exponáláskor az adagolókazettából kerülnek be a vákuum alatti térbe, majd innen az exponálás után a fogadókazettába továbbítódnak. Az utóbbiban összegyűlt, exponált negatívokat a hagyományos fotóeljárás szerint kell előhívni és róluk nagyításokat készíteni. A felvételek számozottak, így a fotózás során vezetett jegyzőkönyv alapján az előhívás után azonosíthatók.



4.13. ábra. A síkfilmes negatívok számára kialakított kazetták helye a mikroszkóp lábazatában

A modern mikroszkópokkal szemben alapvető kíváncsi, hogy az általuk alkotott kép **számítógép**-monitoron is látható és digitális módon is rögzíthető legyen. Az **LCD kamerákat** az oszlop oldalára szerelik (4.12.A ábra), kameraként és képrögzítőként is használhatók. A kamerákhoz szoftvereket is mellékelnek, amelyek nemcsak a kamera kezelésére, hanem a készített kép adatainak rögzítésére (pl. nagyítás mértéke) és utólagos képfeldolgozásra is használhatók (4.14. ábra). Mivel az LCD kamerák is kapcsolatban állnak a vákuum alá helyezett térrel, a jó képminőség megtartása érdekében szennyeződésektől való megóvásuk nagyon fontos.



4.14. ábra. Transzmissziós elektronmikroszkópban készített digitális felvétel: az egyes sejtalkotók jól elkülöníthetők egymástól, mert a mintába bevitt nehézfémek megfelelő kontrasztot biztosítanak

A **fókuszmélység** (mélységélesség) azt a távolságot adja meg, amelyen belül a vetített kép pontjai élesek. Ennek az értéknek a megfigyelőernyő és az alatta lévő síkfilm, vagy a digitális kamera érzékelője közötti távolság kialakításakor van jelentősége. A TEM fókuszmélysége nagy, így a képfelfogó felszínének egymáshoz képesti elhelyezésére tág határok állnak rendelkezésre – a távolság változtatásával csak a kép nagyítása és a fényereje változik.

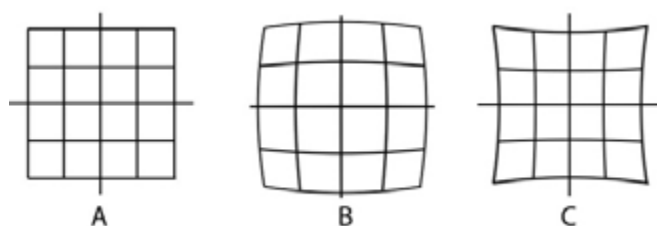
Az elektronmikroszkóp beállítása, lencsehibák

A megfelelő minőségű, részletgazdag eredmény (l. 4.14. ábra) eléréséhez az elektronmikroszkópot ugyanúgy be kell állítani (fókuszálni, centrálni kell), mint a fénymikroszkópot. Ezt egyrészt az elektronjelenségek, másrészt a lencsehibák teszik szükségessé. Utóbbiak határt szabnak a felbontásnak, ezért egy jól beállított mikroszkópban látott kép sokkal kontrasztosabb és részletgazdagabb, mint egy olyan mikroszkóp által létrehozott kép, amelynek beállítására nem fordítanak gondot.

Az **elektronjelenségekről**, a képképzés szempontjából legfontosabb szóródásról, ennek típusairól korábban már szóltunk. Összefoglalóan azt mondhatjuk, hogy a rugalmasan szóródó, mintán áthaladó elektronok zavarják a képképzést (pl. rontják a kontrasztot), így azokat a sugárnyalábból ki kell zárni. Erre alkalmasak a blendék.

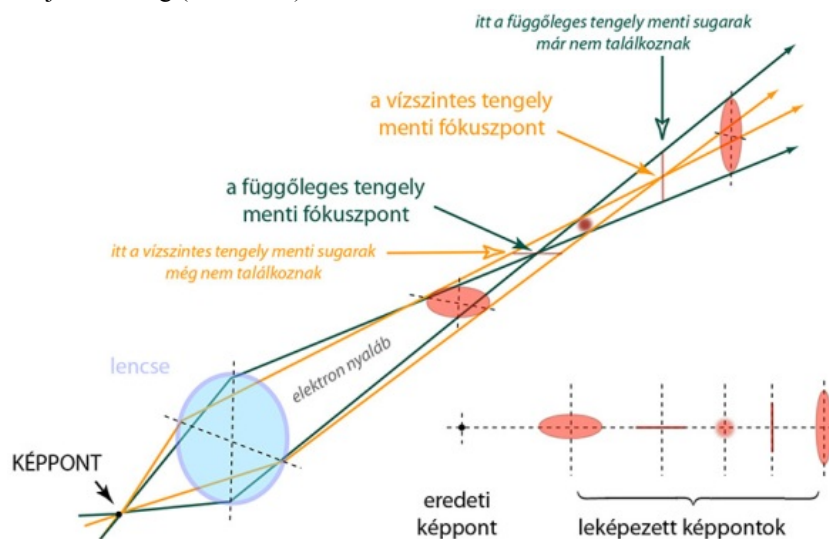
Az **elektromágneses lencsehibák** alapvetően az optikai (üveg)lencsék hibáihoz hasonlítanak, a mikroszkóp használata során ezeket korrigálni kell. A lencsehibák egyrészt az elektron-sugárnyaláb inhomogenitásának következményei, másrészt a lencsék tökéletlen voltából következnek. Az előbbieket az ún. **kromatikus hibák** (aberrációk), az utóbbiak pedig az **akromatikus hibák** kialakulását okozzák.

Akromatikus hiba a **szférikus aberráció**. Abból adódik, hogy az elektromágneses lencsék eltérően hatnak a sugárnyaláb tengelyében és az attól távolabb haladó elektronokra (az általuk létrehozott elektromágneses tér nem homogén). Az eredmény az, hogy a tárgy pontjairól több síkban keletkeznek képpontok. A vetített képen ez hordó- vagy párnatorzításként jelentkezik (4.15. ábra). Ezen a hibán a sugárnyaláb szélén haladó elektronok sugárnyalábból való kizárásával, azaz az **objektívblende szűkítésével** javíthatunk.



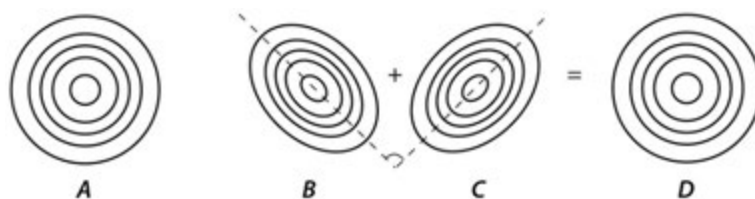
4.15. ábra. A szférikus aberráció eredménye: négyzetháló tökéletes leképezése (A), hordó (B) és párna torzítás (C)

Szintén akromatikus hiba az **asztigmatizmus**, ami a lencse nem tökéletes szimmetriájából, anyagának inhomogenitásából adódik. A fellépő jelenség lényege, hogy egy tárgypontról két, egymásra merőleges, vonalszerűen elmosódott képet kapunk. Ezek egyike a lencséhez közelebb, a másik pedig attól távolabb jelenik meg. **A lencse fókusz távolsága tehát eltér az egymásra merőleges tengelyek mentén:** a tárgy pont a két fókuszpont között kissé elmosódott pontként jelenik meg (4.16. ábra).



4.16. ábra. Az asztigmatizmus jelensége: a lencse függőleges és vízszintes fókuszpontjai nem esnek egybe, a két fókuszpont között pedig elmosódott a leképezett pont kontúrja

Mivel tökéletes lencsét jelenleg nem lehet előállítani, a korrekciót egy **kompenzáló elektromágneses térrel** kell biztosítani. Ezt a lencse alá helyezett, elektromágnesekből álló gyűrűvel lehet előállítani, amelyben a mágneses tér (ezzel együtt az elektron-sugárnyaláb) ellenkező értelmű torzulást szenved, mint amit a lencse okozott (4.17. ábra). A berendezés neve: **stigmátor**. A kondenzor, az objektív és a köztes lencsék hibáit javítják vele.



4.17. ábra. Az asztigmatizmus kompenzálása a stigmátor elektromágneses terével: egy tökéletes lencse fókuszsíkja az ábra (papír, képernyő) síkjában van, a leképezett koncentrikus gyűrűk így körszimmetrikusak (A); az asztigmatizmus következtében megdőlt függőleges tengelyt (B) a stigmátor mágneses tere kompenzálja (C), így a torzulás megszűnik (D)

Az optikai tengely menti **kromatikus aberráció** abból adódik, hogy a sugárnyaláiban haladó elektronok eltérő energiájúak, azaz hullámhosszúak. A jelenség eredménye az, hogy a minta azonos pontjait az eltérő hullámhosszúsággal rendelkező elektronok más-más síkba képezik le. Két fókuszpont alakul ki: a lencséhez közelebbit a kis energiájú, a távolabbit a nagyobb energiájú sugarak kereszteződése hozza létre. A hiba kijavításának egyik lehetősége, hogy az elektronok energiájának eltérését (azaz a szórást) csökkentjük, más szavakkal a mintát elérő sugárzást energetikai szempontból homogénné tesszük. A másik megoldás az inhomogenitást okozó sugarak „fényútból” való kizárása, azaz a sugárnyaláb monokromatikusá tétele úgynevezett **monokromátor** alkalmazásával. A legújabb fejlesztésű, nanotechnológiában használt ultra-nagy felbontású mikroszkópokba (ultra-high resolution TEM, HR-TEM) már komplex akromatikus hibát javító rendszert építenek be.

A **fókuszálás** (centrálás) a megvilágító (elektronágyú, kondenzorrendszer) és a leképezőrendszer (objektív) tagjainak a **közös optikai tengelybe** történő lehető legpontosabb beállítása. Ennek lépéseire itt nem térünk ki részletesen, azt a mikroszkópokhoz mellékelt leírások tartalmazzák. Menete – ha nem is feltétlen ugyanabban a sorrendben, de – ugyanazokat a logikai lépéseket tartalmazza minden TEM mikroszkóp esetében. A régebbi mikroszkópokban ezt ajánlatos volt rendszeresen, a rendszer minden tagjára kiterjedően elvégezni – a modern mikroszkópok működése jóval stabilabb, így a beállításukra ritkábban van szükség.

A jól beállított mikroszkóp egyenletes megvilágítású, kerek „fényfoltot” ad, a nagyítások közti váltásnál a folt alakja és a megvilágítottság egyenletessége nem változik, csak a fényerő csökken. A felbontás a nagy nagyításokon is kielégítő, a kép éles.

A helyes fókusz megtalálása kis nagyítás mellett nehezebb, mint nagy nagyításon. A munkát a modern mikroszkópokba beépített úgynevezett wobbler-rendszer könnyíti meg (ennek ismertetésére ezen a szinten nem térünk ki). A wobbler bekapcsolásakor a kép vibrálni kezd. Ha az objektívlencse fókusza helyesen beállított, akkor a kép közepén a remegés megszűnik.

A mikroszkópos munka menete

Miután a biológiai mintát megfelelően előkészítettük (l. később), betehetjük a mikroszkópba, hogy megvizsgáljuk. A mikroszkóp bekapcsolása előtt győződjünk meg arról, hogy az ki van kapcsolva. A bekapcsolás menete a következő:

1. A mikroszkóp vízkeringető és hűtőrendszerének bekapcsolása;
2. A mikroszkóp bekapcsolása és ellenőrzése (tapasztalható-e szokatlan zaj vagy rezgés). Bekapcsoláskor a vákuumrendszer automatikusan aktiválódik;
3. A megfelelő értékű vákuum kialakulására 20–30 percet várni kell. Ha a mikroszkóp kész a használatra, azt egy LED jelzi;
4. A minta mintatartóba, majd a mintatartó mikroszkópba helyezése;
5. A gyorsítófeszültség beállítása (általában 60 ezer V);
6. A minta vizsgálata (mindig kis nagyításon kezdjük);
7. A metszetek átnézése és dokumentálása után a mintatartó kivétele a mikroszkópból;
8. A minták visszahelyezése a rostélytartóba;
9. A gyorsítófeszültség levétele, a mikroszkóp kikapcsolása (a vákuum-előállító rendszer is leáll);
10. A vízkeringető rendszer kikapcsolása.

A mikroszkóp használata során szem előtt kell tartani azt, hogy annak belső tereiben vákuum van. Ennek megfelelő értékre történő beállításához idő kell, így a vákuumrendszer bekapcsolása után és a mintatartó zsilipelőkamrán keresztül való mozgatása közben megfelelő ideig várni kell. A munka befejeztével a mikroszkóp kikapcsolása után a vízűtő rendszert még adott ideig működtetni kell, s csak utána szabad leállítani.

Minta-előkészítés rutin TEM vizsgálatokra

Az elektronsugárással átvilágítható, elektronmikroszkópban vizsgálható preparátumok, metszetek előállítását célzó eljárások a **mikrotechnika** tárgykörébe tartoznak. Ahogy azt a fénymikroszkópos eljárásoknál írtuk, a mikrotechnikai feldolgozás legfőbb **célja** itt is az, hogy a preparátumok előállítása közben az élő anyag strukturális (funkcionális) sajátosságait úgy őrizzük meg, hogy az a lehető legkevésbé térjen el az élő állapottól. A munka során használt anyagokkal szemben tehát alapvető kíváncságot, hogy ne lépjenek olyan kölcsönhatásba a mintával, amely **műtermék** képződését eredményezi. Minél jobb optikai felbontóképességű vizsgálómódszer számára készítjük elő a biológiai anyagot, annál nagyobb figyelmet kell fordítanunk erre a követelményre.

Az elektronmikroszkópos minta előkészítésével kapcsolatban is igaz az, hogy univerzális eljárás nincsen: az alkalmazott anyagok és eljárások kiválasztása a kísérlet céljától és a vizsgálandó szövet- és sejttípustól függ. Az itt következő leírásunkban tehát csak az általános elvek és a rutinvizsgálatoknál leggyakrabban használt eljárások, anyagok és vegyszerek ismertetésére szorítkozunk. Általános megjegyzésünk, hogy a publikációkban elvárt szintű eredmények eléréséhez olyan vegyszerek és eszközök használata szükséges, amelyet a gyártók **kifejezetten az elektronmikroszkópos munkára** ajánlanak.

Anyagpreparálás, rögzítés

Az **élő szervezetből kiemelt** minta nagyon gyorsan változik, lebomlik. Ennek megakadályozása érdekében kellő körültekintéssel, de gyorsan, célzott mozdulatokkal kell dolgoznunk. A vizsgálandó szövet (vagy szervrészletet) rögzíteni, fixálni kell, azaz az azt felépítő struktúrát **az élő állapothoz legközelebbi helyen és állapotban kell megőrizni**. A rögzítés fokozza a minta további eljárások – esetleges károsító – hatásaival szembeni ellenálló képességét is.

Gyakorlati tapasztalat, hogy olyan fixáló nincsen, amely minden szempontból megfelelő lenne, ezért olyan rögzítőoldatot és eljárást kell alkalmaznunk, amelyik a legkevesebb műtermék megjelenésével jár. Általános tanács, hogy előkísérletként több lehetőséget is érdemes kipróbálni, s a hasonló eredményt adók közül a legjobbat kell kiválasztani.

A munkához olyan kémiai fixálók az ideálisak, amelyek beépülnek a sejt molekuláris rendszerébe, s így fejtik ki hatásukat.

A fixálók másik csoportja kicsapja a fehérjéket, így megváltoztatja azok alakját, tönkreteszi a szerkezetet, általában térfogatváltozást, zsugorodást okoz (ilyen pl. az etil-alkohol).

A minta eredeti állapotban való megőrzésének igénye miatt nagyon fontos a fixálóoldat megfelelő pH-jának, ionösszetételének, ozmolaritásának és hőmérsékletének megválasztása. A **rögzítőszer és a szövet kölcsönösen hatnak egymásra**: amíg a fixáló bejut a szövetbe, annak anyagai is kijuthatnak a rögzítőoldatba, megváltoztatva annak összetételét. Nyilvánvaló, hogy az élő szerkezetet „utánzó” környezet megteremtése csak **többkomponensű rögzítőoldattal lehetséges**. A legmegfelelőbb környezetet a fixálók és az ún. hordozóoldatok összetételének optimális megválasztásával tudjuk biztosítani (l. még alább).

Vegyük tehát sorra a rögzítőoldatok egyes összetevőit a fixálóoldatokkal szemben támasztott követelmények szerint!

A **leggyakrabban használt kémiai fixálók**: a glutáraldehid, a formaldehid és az ozmium-tetroxid (4.18. ábra). Mivel az aldehidgyökök (–COH) igen sokféle funkciós csoporttal képesek kapcsolatba lépni, az aldehid típusú fixálók keresztkötéseket alakítanak ki a fehérjék között és a fehérjemolekulákon belül is. A keresztkötéseknek fontos szerepük van abban, hogy a makromolekulák eredeti helyükön maradjanak, azaz ne oldódjanak ki a beágyazási eljárás során.

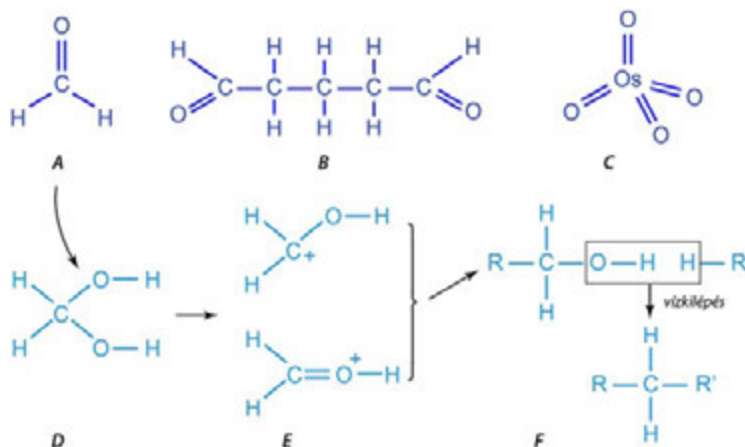
A **formaldehid** (HCOH) előnyös tulajdonsága, hogy gyorsan és mélyen behatol (penetrál) a mintába. Vizes oldatban metilén-glikol ($\text{H}_2\text{C}-(\text{OH})_2$) formájában van jelen, amelyből pozitív töltésű, nagyon reaktív gyökök keletkeznek. E formákból végül is olyan metilén-csoportok lesznek, amelyek két fehérjemolekula között kereszthídként azonosíthatók ($\text{R}-\text{CH}_2-\text{R}'$, 4.18.D–F ábra). Mivel ezek a kapcsolatok **reverzibilisek** – a fixálás utáni lépésben (a fixáló kimosása során) részlegesen hidratálódhatnak, azaz felbomolhatnak –, ezért ez a fixáló a rutin elektronmikroszkópos célokra önmagában nem elég hatékony. Akkor azonban, amikor a fixált fehérjék biológiai aktivitásának (térszerkezetének) megtartása fontos követelmény (enzim- és immuncitokémiai vizsgálatok), kifejezetten ajánlott.

A formaldehid ma már ampullázott, nagyon tiszta, stabil, 16%-os oldat formájában kapható. A stabilitás azt jelenti, hogy az oldatban gyakorlatilag nem képződik dimerizált forma, azaz paraformaldehid (PFA). (Utóbbi mennyiségének növekedése nyilvánvalóan csökkenti a fixálás hatékonyságát.)

A **glutáraldehid** ($\text{HOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COH}$, 4.18.B ábra) az anyagba lassabban hatol be (nagyobb méretű, mint a formaldehid), de hatékonyabban (**irreverzibilis módon**) hoz létre keresztkötéseket, mint a kisebb formaldehid. A fehérjéket jól rögzíti, a lipidekkel viszont nem lép reakcióba. Az elektronmikroszkópos rögzítéshez desztillálással kapott ampullázott oldatát ajánljuk, mivel ebben a szennyeződések (glutársav, etanol, metanol, dimer és oligomer formák) mennyisége elhanyagolható. Eltarthatóságát a polimerizációja korlátozza: az eredetileg víztiszta oldat sárgulni kezd, ha a glutáraldehid molekulák kovalensen egymáshoz kapcsolódnak.

A rutin eljárások során ma már a **formaldehid és a glutáraldehid különböző arányú elegyét** használják (l. Karnovsky-fixáló), a **rögzítőkeverékben** ugyanis mindkét komponens előnyös hatása érvényesül: a gyorsan penetráló formaldehid megfelelő, de nem tartós rögzítőhatását a lassabban behatoló glutáraldehid véglegessé, irreverzibilissé teszi.

Az **ozmium-tetroxid** (4.18.C ábra) a rögzítőhatását annak köszönheti, hogy reakcióba lép a lipidek kettős kötéseivel (keresztkötéseket alakít ki közöttük), illetve egyes poláros csoportjaival (ezeket adott fehérjékhez köti). **Önmagában** alkalmazva nem elég hatékony, mert egyes anyagokat nem képes azok eredeti helyén megőrizni, még glutáraldehid után használva is tapasztalható, hogy a lipidek kb. 10%-a kioldódik a mintából, s a fehérjék egy része is távozik a sejtől. Ezek a káros hatások alacsony hőmérsékleten kisebbek, ezért ajánlott 4°C -on használni. A lipideket érintő veszteség tovább csökkenthető, ha a fixálóoldatban **kalcium** (-klorid) is jelen van. A fixálás idejét az befolyásolja, hogy az ozmium-tetroxid által rögzített szövetrészt gátat képez a fixáló további penetrációjával szemben, azaz a rögzítőszer szövetbe történő behatolása egyre inkább lassul.



4.18. ábra. Az elektronmikroszkópiában leggyakrabban használt rögzítők: formaldehid (A), glutáraldehid (B) és ozmium-tetroxid (C). Metilén-glikol (D), köztes, reaktív termékek (E) és keresztkötések kialakítása (F) (R és R': szerves molekulák)

Az ozmium-tetroxidot a rutin eljárás során – aldehides fixálás után – **utófixálóként** és kontrasztosítóként használjuk (0,5–1%-os koncentrációban); ilyenkor nem szükséges alacsony hőmérsékleten alkalmazni. Aldehides fixálók utáni használatát a **membránokat megőrző** tulajdonsága indokolja, amivel jelentősen mérsékli a beágyazást megelőző víztelenítési lépések során az etil-alkohol lipidvesztést okozó hatását.

Az ozmium-tetroxid illékony és toxikus vegyület, a bőrre, a szembe, orrba, torokba jutva ártalmas! Ampullázva, kristályos formában kapható. Nagy körültekintéssel készített, bomlékony és illékony odatát sötétben, hűtőszekrényben kell tartani. A vele való munkát kizárólag elszívófülkében, laboratóriumi gumikesztyűt viselve végezzük!

A **hordozóoldatok** lehetővé teszik a fixáló pH-jának és ozmolaritásának stabilizálását. Ezek olyan **pufferrendszerek**, amelyek komponenseitől elvárjuk, hogy vízben jól oldódjanak, ne befolyásolják a kémiai fixálószer hatását (azzal ne lépjenek reakcióba), a disszociáció mértéke gyakorlatilag ne függjön a koncentrációjuktól és a hőmérséklettől, s a rendszer pufferelési tartománya pH 6 és 8 közé essen. Gyakorlati tapasztalat, hogy ugyanazon fixáló más és más pufferrendszerben kissé eltérő ultrastruktúrát ad (a kísérletben alkalmazott puffer ismerete tehát fontos az eredmények kiértékelésekor).

Az elektronmikroszkópos mikrotechnikában a legáltalánosabban elterjedt puffer a **kakodilát puffer**, amelyet 6,4–7,4 közötti pH-tartományban használnak. Hosszan eltartható oldatát nátrium-kakodiláttól [$\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$] és koncentrált sósavból állítják elő. Mivel hamarabb hat a sejtekre, mint a fixáló, ezért membránkárosodást is okozhat, amit azonban – a membránokat stabilizáló hatású – kalcium hozzáadásával megelőzhetünk. Előnyös tulajdonsága, hogy segítségével számos enzim aktivitását részlegesen megőrizhetjük.

Arzéntartalma miatt mérgező, bőrgyulladást okozhat, belélegezni sem ajánlott: elszívófülke alatt, gumikesztyűt viselve dolgozzunk vele!

A **foszfátpuffer**ek (l. Sörensen puffer) ugyan a legtermészetesebb hordozóoldatok lennének (fiziológiásak), de **csapadékok képeznek** a kontrasztosítás során használt ólom- és uránsókkal, valamint a kalciummal (kalcium-foszfát). Ezért ha a fixálás során foszfátpuffert használunk, akkor azt a rögzítés után, a víztelenítés megkezdése előtt gondosan el kell távolítani (alaposan „ki kell mosni”) a mintából.

*A foszfátpuffer*ek kalcium-foszfátképző tulajdonságát adott esetben ki is használhatjuk: ha a minta valamely komponense nagy mennyiségű kalciumot köt (pl. miozin), annak kontrasztját növelni fogja. Az eljárás további menetét azonban ennek a csapadéknak a megőrzéséhez kell igazítani (a víztelenítést 50%-os etanollal kell kezdeni), s a kapott kép kiértékelésénél az esetleges műtermékek megjelenésének lehetőségét figyelembe kell venni.

A rutinvizsgálatoknál az elektronmikroszkópos mikrotechnikában a szerves pufferek (pl. HEPES, PIPES) használata nem vált általánossá.

A hordozóoldatok következő lényeges összetevője az **ozmolaritást meghatározó komponens**. A sejtek alakja és mérete egyértelműen függ az intra- és az extracelluláris térben uralkodó ozmotikus koncentrációk különbségétől. A fixálóoldat először az extracelluláris térben jelenik meg. Amennyiben ozmotikus koncentrációja eltér a sejt közötti folyadékététől, akkor az az anyagoknak a sejtől történő kioldódását vagy az extracelluláris folyadék káros mértékű beáramlását eredményezheti. Ez a lassan ható fixálók esetében jelentős műtermékképződéshez vezethet. A tényleges ozmotikus nyomást azok a komponensek alakítják ki, amelyek nem jutnak át szabadon a membránokon. Ebből a szempontból a hordozóoldatok (pufferrendszerek) komponensei lényegesebbek, mint maga a fixáló. Az ozmolaritás beállítására használt adalékanyag lehet töltéshordozó elektrolit és töltéseket nem hordozó, nem-elektrolit jellegű molekula.

Az **elektrolitok**, pl. a **kalcium-klorid**, csökkentik a sejtalkotók duzzadását, stabilizálják a membránokat, csökkentik az anyagvesztést. Mivel kicsapják a fehérjéket, használatuk csak nagyon alacsony koncentrációban ajánlott. **Nem-elektrolit adalékok** például a **glukóz**, a szukróz és a dextrán, amelyek az anyagmegőrzésben szintén eredményesen alkalmazhatók.

A megfelelő fixáló kiválasztásán kívül a **fixálás módjának** is döntő szerepe van. Az ultramikrotechnikában az immerziós fixálás helyett **kombinált fixálást** alkalmaznak: első lépésben **perfúziós fixálást**, majd ezt követően immerziós módszert.

Ahogy ezt a korábbiakban írtuk, ez röviden azt jelenti, hogy a vizsgálatra kiválasztott szervet „belülről”, az érrendszere felől rögzítjük. Az elaltatott állat szívébe vagy a nagy artériák közül valamelyikbe (általában az aorta valamelyik szakaszába) kanült vezetünk, majd a vénás rendszert megnyitjuk (valamelyik nagyvénát átvágjuk), és az érrendszert először fiziológias sóoldattal vagy izotóniás pufferrel átmossuk. Amikor a vért már kimostuk, a sóoldatot fokozatosan lecseréljük a rögzítőszert tartalmazó oldatra. A fixáló így a szervezetben eredeti helyén lévő szervet rögzíti, amelyet azután nagyobb biztonsággal távolíthatunk el, mint „friss” állapotában. (Egy ilyen előfixált szervet a mechanikai hatások [csipesz!] kevésbé károsítanak.)

A szervezetből kiemelt szervet ezután **immerziós módszerrel utófixáljuk** az ismert módon. Ehhez a kiemelt szervből olyan kisméretű darabokat kell kivágni, amelyek vastagsága 0,5–0,75 mm közötti. Ezeket előre feliratozott, megfelelő térfogatú, hűtött fixálót tartalmazó, jól zárható (pl. gumidugós) üvegcsékbe helyezzük, s a rögzítés időtartamára hűtőszekrényben tartjuk.

A megfelelő fixálás idejét tapasztalati úton határozhatjuk meg. A **rögzítés végén** a fixálóoldatot a hordozóként használt pufferoldatra cseréljük le annak érdekében, hogy a **fixáló feleslegét kimossuk** a mintából. A továbbra is hűtőben tartott blokkokon a pufferoldatot többször is le kell cserélni.

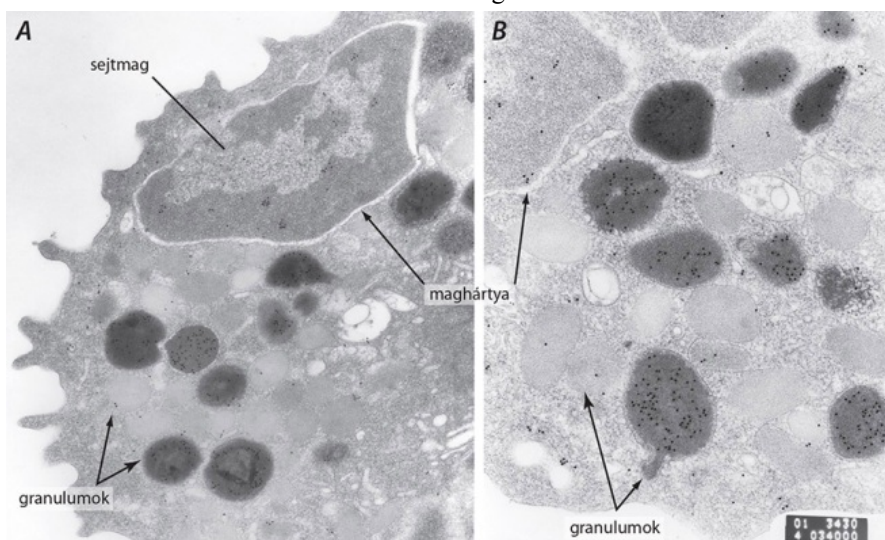
*Tökéletes fixáló nincsen: a hagyományos fixálók alkalmazása gyakran vezet(het) műtermék képződéséhez (ilyen a fehérje-összecsapzódás, a membrándeformáció, a zsugorodás és a duzzadás). Modern, nagyon szép eredményeket adó alternatív eljárás a minta gyors lefagyasztása, amely során a jégkristályok képződését megakadályozzuk. Köztudott, hogy a jéggé fagyott víz térfogata nagyobb, mint a folyékony halmazállapoté, s a kialakuló kristályok roncsolják a membránokat. A kristályosodás megakadályozható igen nagy (kb. 2000 bar) nyomás és alacsony hőmérséklet (-70–90 °C) alkalmazásával. A módszer neve **magas nyomású fagyasztás** (high-pressure freezing). Ha e lehűtés megfelelően gyors, a vízben nem alakulnak ki kristályosodási magok, a molekulák nem rendeződnek kristályos szerkezetbe – a túlhűtött víz folyadék marad. A módszer alkalmazásának a minta (blokk) nagysága szab határt (azon idő alatt, ami az áthűtéséhez szükséges, a belsejében van-e idő jégkristályok képződésére). A rutinvizsgálatokon kívül kifejezetten ajánlott immunológiai jelölések előtti alkalmazása (l. immuncitokémia). Az eljárásról az irodalomban több összefoglaló is megjelent².*

Víztelenítés

A rögzítőszer kimosását általában azonnal követi a víztelenítés és a beágyazás. A víztelenítésre azért van szükség, mert a rutinszerűen használt beágyazószerek műgyanták, amelyek vízben nem oldódnak (hidrofóbok), így a víztartalmú szövetet nem itatják át, tehát a sejteket molekuláris dimenzióban nem járják át. A citokémiai és immuncitokémiai eljárásokban használnak már olyan beágyazószereket is, amelyek vízzel mérsékeltén elegyednek, így ott csak részleges víztelenítésre van szükség.

Mivel a sejtek természetes közege a víz, annak eltávolítása szükségszerűen műtermékek képződéséhez vezet. A dehidrálásra olyan anyagot érdemes használni, amelyik az adott szervrészlet esetében a legkisebb károsodásokat okozza.

Ahogy az előzőekben említettük, a víztelenítés elé egy **ozmiumos utófixálási** lépést szoktak beiktatni. Az ozmium-tetroxid-ot, amely nehézfém-tartalma miatt egyben **kontrasztosító** is, ennél a lépésnél a **teljes blokk** kezelésére használjuk. A lipidekhez kötődve a membránok hidrophil rétegét elektronszóróvá (sötétté) teszi. Ha ezt a kezelést elhagyjuk, a membránok alig különülnek el a környezettől (4.19. ábra). Az ozmium hatását vízben vagy alkoholban oldott, fehérjéhez kötődő **uranil-acetátos** kontrasztosítás egészíti ki.



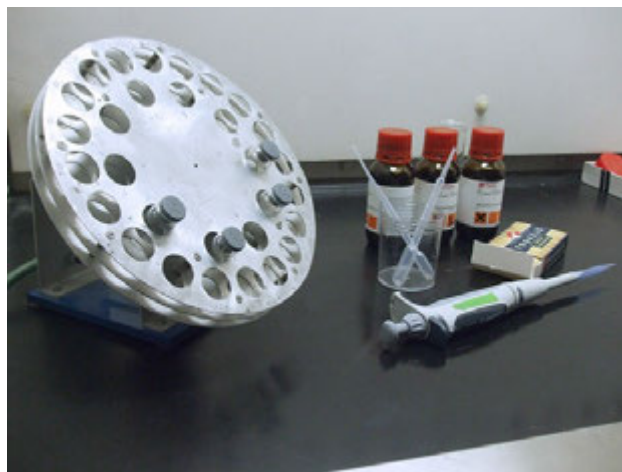
² Pl.: Microscopy and Microanalysis / Volume 13 / Supplement S02 / augusztus 2007, pp 440-441, DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/S1431927607078567>, vagy <http://bio3d.colorado.edu/docs/mmanual.pdf>

4.19. ábra. TEM metszet blokk-kontrasztosítás nélkül: a minta csak a metszést követően kapott uranil-acetátos és ólom-citrátos kezelést. A kép minőségét érdemes összehasonlítani a 4.14. ábra részletgazdagságával! (Az A és B képen látható apró fekete pöttyök immunjelölés eredményeként a felszínhez kötődött aranyszemcsék, l. immuncitokémia)

Dehidrálásra fokozatosan növekvő koncentrációjú, ún. **felszálló** aceton vagy **etil-alkohol sor** is alkalmas. Általában az utóbbit használjuk, bár az alkoholsor kisebb koncentrációjú oldatai a mintából fehérjéket vonnak ki, a töményebb oldatok pedig lipideket távolítanak el, ráadásul a folyamat során zsugorodás is felléphet. A káros hatások minimalizálása érdekében a víztelenítés idejét a szükséges minimumra kell csökkenteni (gyors eljárás): a 30%, 50%, 70%, 90%-os, valamint az abszolút etanolt tartalmazó sor tagjait 10-15 percenként cseréljük a beágyazandó blokkokon.

A mintákat a víztelenítés során végig ugyanazokban az üvegcsékben tartjuk, amelyekben az immerziós rögzítést végeztük. Az egyes oldatok cseréjénél tehát a mintákról az oldatokat pipettával szívjuk le, ügyelve arra, hogy – belevegőzés és kiszáradás elleni védelemként – minimális mennyiségű folyadék mindig maradjon rajtuk.

A megfelelő eredmény eléréséhez biztosítanunk kell, hogy a blokkokat az alkalmazott oldatok és később a beágyazószer is egyenletesen átitathassák: a **folyadékok keveréséről** tehát folyamatosan gondoskodnunk kell (4.20. ábra).



4.20. ábra. A beágyazószer komponensei és a beágyazáshoz szükséges néhány eszköz az elszívófülkében, bal oldalon a dehidrálás és beágyazás során használt keverőgép néhány üvegcsével

Az alkoholsor után egy ún. **intermediér** 100%-os koncentrációjú oldatával történő kezelés következik. Ez lehet toluol, xilol vagy **propilén-oxid**. Az intermedierek átmenetet biztosítanak a poláros alkohol és az apoláros beágyazószer között. Bennük a beágyazószer tökéletesen oldódik. Reaktív vegyületek, kioldhatnak lipideket, és a blokkokban maradó nyomnyi mennyiségük is gátolhatja a beágyazószer polimerizációját.

A kíméletesebb kezelés és a tökéletesebb átitatódás érdekében olykor a propilén-oxidot lépcsőzetesen adagoljuk az abszolút alkoholhoz: először 1:3, majd 1:1, végül 3:1 arányú keverékeket használjuk, ahol az alkohol csökkenő, az intermediér növekvő mennyiségben van jelen. A 3:1 arányú keveréket cseréljük le azután a tiszta intermediérré.

A propilén-oxid tűzveszélyes, illékony, és gőzei az egészségre károsak, ezért **csak elszívófülkében** szabad vele dolgozni.

Beágyazás

A beágyazószerrel szembeni elvárásaink ugyanazok, mint a fénymikroszkópos minták esetében. Az elektronmikroszkópos vizsgálat miatt további követelmény még, hogy az alkalmazott anyag az elektronsugárral szemben ellenálló legyen, s ne szórja az elektronokat.

A beágyazásnak **három fő lépése** van:

1. átitatás (infiltráció),

2. kiöntő formába öntés és
3. polimerizáltatás.

Az **átítatás** során műgyanták monomer komponenseinek és adalékanyagainak keverékét folyékony formában, fokozatosan adjuk a mintához. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy az intermediert általában több lépésben cseréljük le műgyantára: először az intermediert és a műgyanta **2:1, majd 1:1 és végül 1:2 arányú keverékét** használjuk, majd a mintáinkat **tiszta műgyantába** helyezzük. A cél a minta tökéletes átítatása, ezért a folyamatot továbbra is állandó keverés mellett, **szobahőmérsékleten**, viszonylag hosszú inkubációs idővel végezzük. Az utolsó lépéseknél a beágyazóüvegséket már nem zárjuk le, hogy az intermediert teljesen elpárologhasson belőlük.

A rutincélokra alkalmazott műgyanták **többkomponensű keverékek**, amelyeket frissen, a beágyazás előtt, megadott arányban és sorrendben kell összekeverni. A beágyazás lényege, hogy a gyanta monomerjei átítassák a mintát, majd polimerizálódva megfelelő szilárdságú térhálót képezzenek térfogatváltozás, azaz torzulás előidézése nélkül.

Vízzel nem elegyedő, epoxi műgyanták az Araldite, a Durcupan, az epon (ez az araldit USA-ban kifejlesztett változata) és a Spurr. A névadó **epoxi-csoportok** a monomerek, illetve a polimerizáció kezdeti lépéseként kialakuló kis tagszámú előpolimerek (oligomerek) láncvégein elhelyezkedő csoportok (4.21.A ábra). Ezeket a **gyorsító (akcelerátor)** komponens molekulái nyitják fel (4.21.B ábra), amelyek ezután hídaként beépülnek az epoxi-csoportokat hordozó végek közé. Hosszabbítják a láncot, és a térháló kialakításában is részt vesznek (4.21.C ábra)

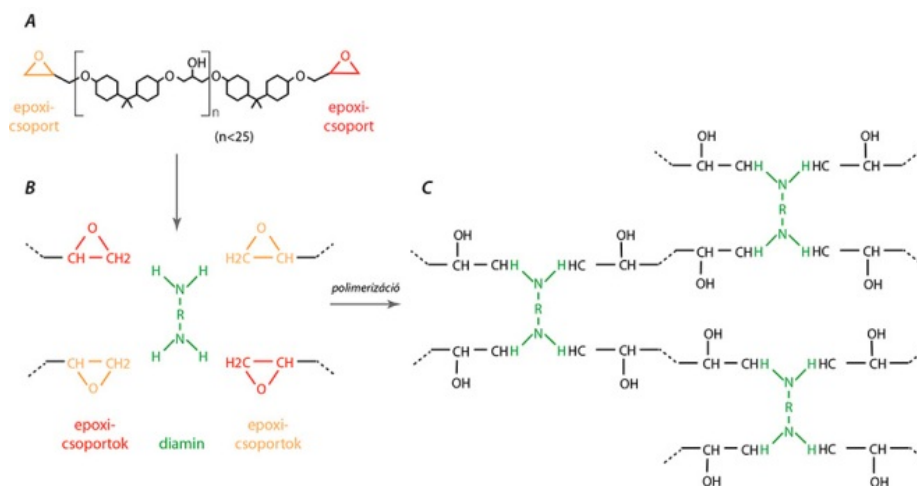
Az akcelerátor általában szúrós szagú, erős szerves bázis, gyakran tercier amin, mint pl. a 2,4,6-trisz-(dimetilaminometil)-fenol (DMP-30,) vagy az N-benzil, N,N-dimetilamin (BDMA).

A monomerek másik reaktív csoportja a **hidroxil-csoport**. Ezek a monomerek fajtái szerint változó számban találhatóak a láncmolekula hossza mentén. Könnyen észteresíthetők pl. dikarbonsav-anhidridekkel, melyek diészter kötésben keresztkötéseket alkotva kapcsolják egymáshoz a láncmolekulákat. Az ilyen adalékanyagokat **térhálósító vagy keményítő (hardener)** anyagoknak nevezik.

Ilyen keményítő anyag például a dodecenil-szukcinil-anhidrid (DDSA,) vagy az 1-metil-5-norborén-2,3-dikarbonsav anhidrid (MNA, vagy más néven metil-endometilén-tetrahidroftálsav-anhidrid), de lehet a keményítő diol, ditiol is.

A **lágylító** adalék (flexibilizer, plasticizer) a polimer (blokk) rugalmasságát növeli, a kedvezőbb metszési tulajdonságok kialakítása érdekében adagoljuk a keverékhez. Lefedi a keresztkötéseket kialakító funkció csoportokat, így csökkenti a kialakuló keresztkötések számát.

Lágylítóként leggyakrabban dibutilftalátot (DBP) használunk.



4.21. ábra. Epoxi műgyanta polimerizációja: kis tagszámú ($n < 25$) előpolimer (A), az epoxi-csoportok és velük reakcióba lépő akcelerátor (itt diamin) helyzete (B), valamint a kialakuló hálózat (C)

Az összes komponensre igaz, hogy belégzésük káros, bőr- és szemirritációt okozhatnak. Ezért csak elszívófülké alatt dolgozzunk velük! A munka után feleslegben megmaradó beágyazószer szerencsére könnyen ártalmatlanítható 50-60 °C-os termosztátban polimerizáltatva.

Forgalomban vannak akrilalapú, **hidrofil gyanták** is (pl. LR White, Lowicryl), amelyek UV fény, katalizátor vagy adott hőmérséklet hatására polimerizálódnak. Használatuk előnye, hogy a teljes víztelenítés szükségtelenné válik, ezzel csökkenthető a minták fehérje- és lipidtartalmának kioldódása. A fehérjéket denaturáló szerves oldószerek és az epoxigyanták polimerizációjához szükséges magas hőmérsékletre sincsen szükség, ami az enzimitokémiai és immunjelöléses vizsgálatoknál előnyös. A hidrofób gyantákkal szemben azonban hátrányuk, hogy használatuk esetén a minta morfológiai megtartása rosszabb, és a metszetek sérülékenyebbek. Általános használatuknak elsősorban az első tulajdonságuk szab határt, ám ha kifejezetten olyan struktúrákat (pl. membránokat) vizsgálunk, amelyek a hagyományos beágyazás során károsodnak, az alkalmazásuk megoldást jelenthet.

Az immunitokémiai vizsgálatokhoz nélkülözhetetlen az antigenitás megőrzése, amire az epoxigyantákat alkalmazó beágyazásnál alkalmasabb az **alacsony hőmérsékletű beágyazás**. Erről az immunitokémia fejezetben írunk részletesebben.

Miután a minta átitatódott a folyékony beágyazószerrel, azt kellő mennyiségű friss műgyantakeverékkel együtt **kiöntőformába helyezzük**. Ez lehet kiöntőformában megformázott, lapos, csonka kúp végű hasáb, vagy hengeres, csúcsos végű kapszula is (4.22. ábra).



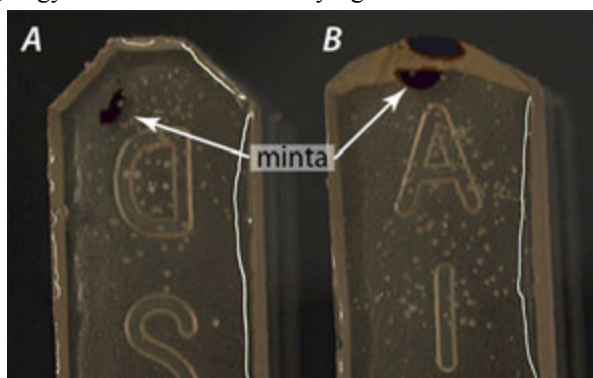
4.22. ábra. Kiöntőformák: balra piros szilikon-gumi kiöntőforma, az előtérben áttetsző, kupakos polietilén kapszulák, a háttérben jobbra sárga színű araditblokkok felnyitott kapszulában és már kapszula nélkül

A mintát gyakran orientálni kell (adott szögben el kell forgatni) a megfelelő metszéssík biztosítása érdekében. Az **orientáció** legkönnyebb a lapos szilikonformák esetében.

A **polimerizáltatást** hővel (vagy egyes akrilgyanták esetében UV sugárzással) végezhetjük. Az egyenletes hőelosztás, azaz az egyenletes polimerizálódás biztosítására a megadott hőmérsékletre beállított **termosztát** a legmegfelelőbb.

Ezután a polimerizált blokkot az öntőformából el kell távolítani. A zselatinkapszulát meleg vízben le lehet oldani, de a polietilén kapszulákat fel kell vágni ahhoz, hogy leváljanak a műgyantáról. A szilikon öntőforma rugalmas, hajlítható, így a blokkok könnyen kipattinthatók belőle. A kiöntőforma zsebeinek alján bemélyedő számok vannak, amik a kiöntött blokk oldalán azonosítják a mintákat (4.23. ábra).

A beágyazás sikerét az jelzi, hogy a blokkból kellő vékonyságú metszetek készíthetők.

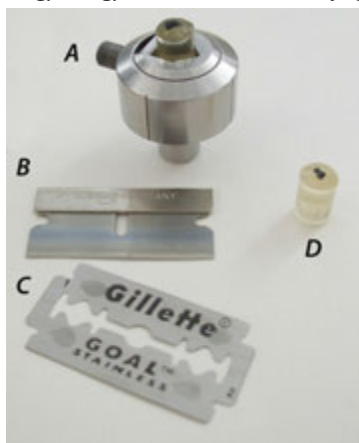


4.23. ábra. Szilikon öntőformából kipattintott blokk (A) és a már metszésre előkészített, a „kifaragott” szövetmintát tartalmazó blokk (B): az ozmiummal kontrasztosított minták feketék, s mindkét blokk hátulján látszanak az azonosító betűk

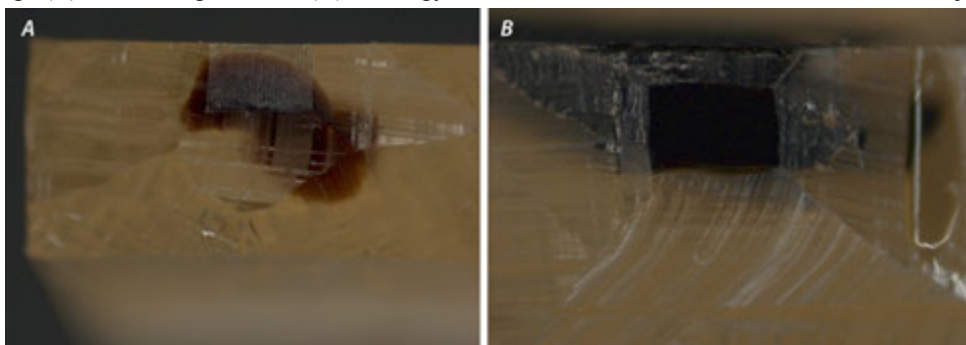
A blokk kifaragása, az ultramikrotom működése és a kések

Az öntőformából kivett blokkok felszínét a metszéshez elő kell készíteni. Ultravékony metszeteket csak kb. 1 mm^2 nagyságú felületről lehet eredményesen és szépen készíteni. Ezért a blokkok csúcsi részét megfelelően ki kell alakítani: olyan csonka piramis formát kell a minta felett képezni, amelynek oldalai közrefogják a mintát, felszíne **trapéz** vagy (nagyobb metszetek szükségessége esetén) **téglalap** alakú, és közvetlenül a beágyazott anyag fölött van.

*A munkához a blokkot egy **blokkbefogóba** helyezzük, majd sztereomikroszkóp alatt a felesleges műgyantát pengével lefaragjuk róla. A **blokk kifaragását** a piramis oldalainak kialakításával kezdjük, majd a tetejét vágjuk le megfelelő magasságban egyélű pengével (4.24. ábra). Ezután Gillette pengével lesimítjuk a piramis tetejét (4.25.A ábra), majd a blokkot áthelyezzük a mikrotóm tárgy- vagy más néven blokkbefogójába (4.26. és 4.27. ábra).*

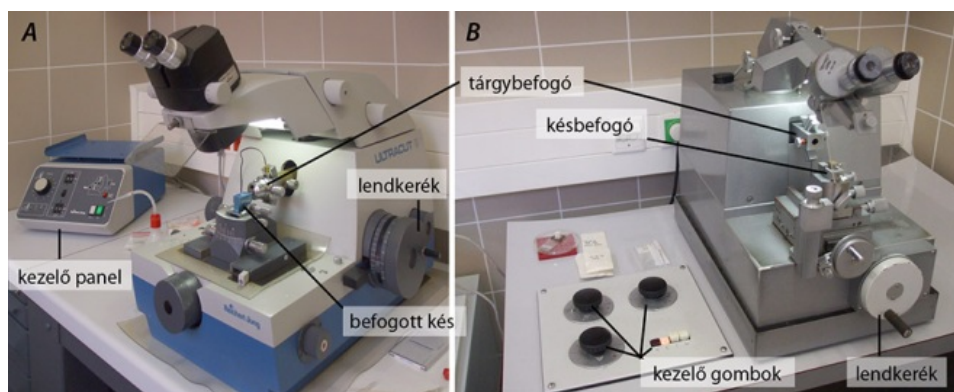


4.24. ábra. A blokk kifaragásához szükséges eszközök: blokkbefogó a befogott blokkal (A), egyélű penge (B), Gillette penge (C) és a kifaragott blokk (D). A beágyazott minták az ozmiumkezelés miatt sötétek és jól látszanak



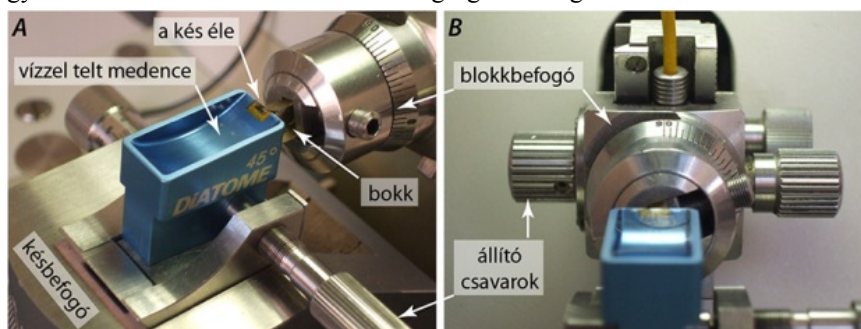
4.25. ábra. Téglalap alakúra kifaragott (A) és már metszett (B) blokk felszíne (a beágyazott minták az ozmiumkezelés miatt sötétek)

Az ultravékony metszetek készítésére kifejlesztett eszköz az **ultramikrotom**. Felépítése a fénymikroszkópos metszetek készítésére használt kerek mikrotomhoz hasonló: a kés helyzete rögzített, a metszés során a blokk mozog fentről lefelé. Működése **automatizált**, de a metszetek lehúzása (lendkerék segítségével) manuálisan is végezhető. A munkát a tárgy- és késbefogó fölé szerelt mikroszkóppal folyamatosan ellenőrizhetjük (4.26. ábra).



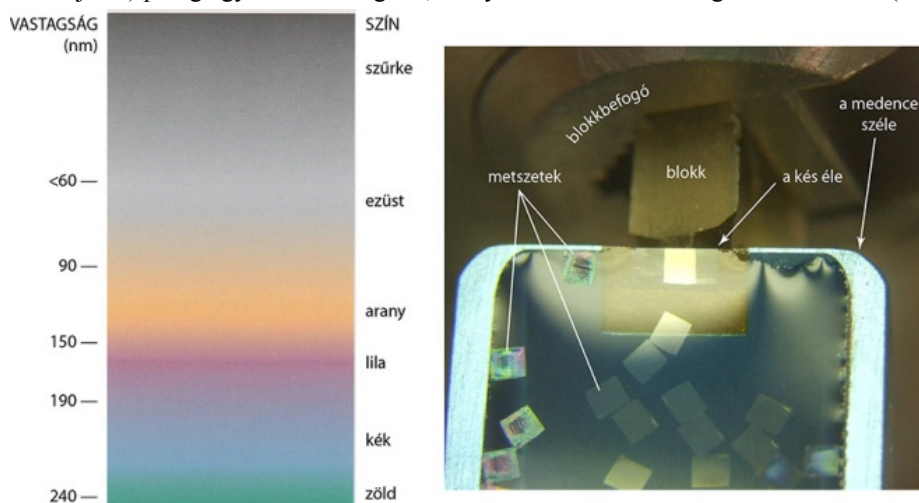
4.26. ábra. Újabb (A) és régebbi típusú (B) ultramikrotomok

A blokk fentről lefelé halad, miközben a rögzített kés pengéje egy metszetet szel le a felszínéről. A kés előtt elhaladt blokk a kés mögé süllyed (ez a metszési fázis vége, 4.27. és 4.28. ábra jobb oldali kép), majd felemelkedve visszatér kiindulási helyzetébe (visszatérési fázis), miközben egy nagyon precíz szerkezet gondoskodik az előretolásáról: a blokk felszíne egy cikluson belül a metszet kívánt vastagságának megfelelő mértékben mozdul előre.



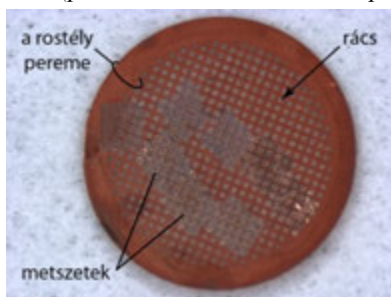
4.27. ábra. A mikrotomba befogott gyémántkés és a blokk metszés közben (oldalról [A] és szemből [B] nézve): a blokk éppen a metszési fázis végére, a kés mögé ért

A lehúzott és a kés víztartó medencéjébe úszó **metszetek vastagságát** a mikrotom saját megvilágítása mellett, azok színe alapján lehet ellenőrizni. A rutinjellegű TEM vizsgálatokra az ezüstsűrke, immunjelölésre (l. Immuncitokémia fejezet) pedig egy kicsit vastagabb, aranszínű metszetek a legalkalmasabbak (4.28. ábra).

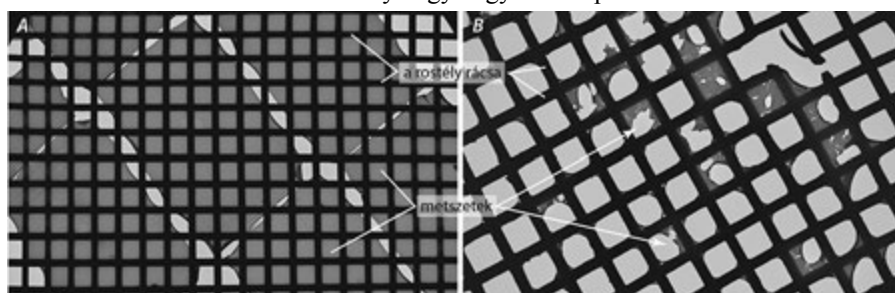


4.28. ábra. Bal oldalon a metszetek vastagságának és színének összefüggése; a jobb oldalon: metszetek a gyémántkés medencéjének vízfelszínén (a bal oldali, szivárványos metszetek kisímitatlanok, a medence közepén lévők aranszínű, kisímitott, immunjelölés céljára készített, nagyméretű, egymástól elváló metszetek)

A vízfelszínen úszó **metszetek kisimítása** kloroform- vagy xilolgőzben, vagy hőceruzával történik. A metszetek fölött a szerves oldószerbe mártott fogpiszkálót vagy abba áztatott szűrőpapírcsíkot, illetve hőceruzát húzunk el vagy tartunk (ezek a kezelések a felületi feszültséget növelve segítik a metszetek kisimulását, l. 4.28. ábra jobb oldali kép). A következő lépés a metszetek mikrorostélyra (4.29. és 4.30. ábra), majd a rostély számmal és betűjelekkel ellátott metszettartó dobozba (gridtartóba) való helyezése. A metszeteket könnyebb a rostélyra telepíteni, ha a metszés során sorozatot, szalagot alkotnak (párhuzamos éllel összetapadnak), s nem úsznak el egymástól.



4.29. ábra. Mikrorostély nagy nagyítású képe a metszetekkel

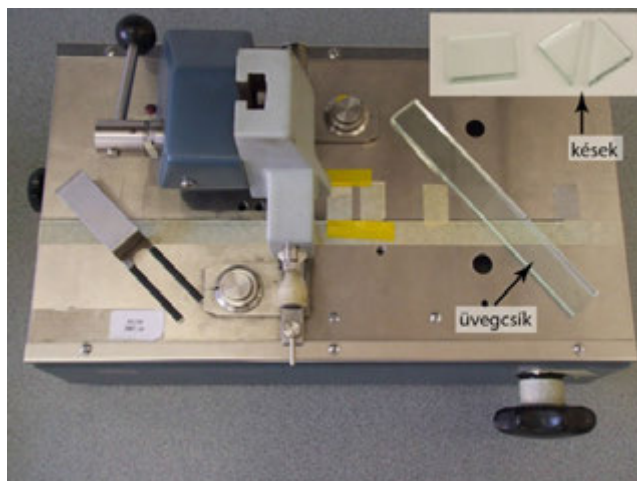


4.30. ábra. Metszetek a rostélyon (kis nagyítású elektronmikroszkópos felvétel): A: a metszés során sorozatban lejevő, ép metszetek, B: szakadozott, tönkrement metszetek (a minta-előkészítés nem volt megfelelő)

Az elektronmikroszkópban készített képek, azaz metszetek összehasonlíthatóságának feltétele, hogy azok szinte egyforma vastagok legyenek, a blokkot előretoló szerkezetnek így megbízhatóan kell működnie. Ez kifejezetten fontos, ha sorozatmetszeteket készítünk, s a minta egyetlen „szeletét” sem veszíthetjük el. Az ultravékony metszetek nagyon érzékenyek, könnyen szakadnak (4.30.B ábra), a rostélyok annyira könnyűek, hogy egy-egy fuvallat, tüsszentés is elröpíti őket. A metszés során nagyon fontos a munkaterület tisztán tartása, a szennyeződési lehetőségek minimalizálása és a nyugodt, huzatmentes környezet.

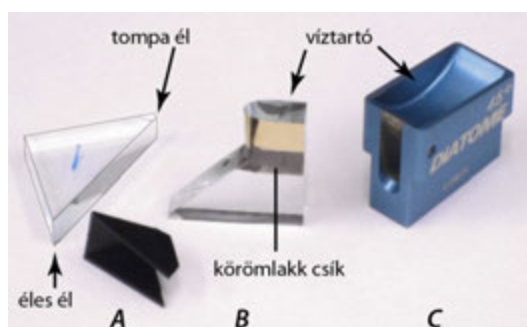
Az ultramikrotechnikában használt **kések üveg- vagy gyémántkések**. Az üvegekéseket – megfelelő szabályok szerint – üvegcsíkból, **késtörő berendezéssel**, saját magunk készítjük (4.31. ábra).

Az üvegcsíkból négyzet alakú darabokat vágunk, majd ezekből egyenként két-két háromszög alakú kést készítünk (4.31. ábra). Ha megfelelően járunk el, akkor a késeknek egy tompa és egy hegyes, éles éle lesz (4.32.A ábra): az utóbbi törésvonala ívelt – ez a megfelelő vágóél (4.33.A ábra). A berendezésben egy gyémánthegy van, amellyel a kívánt helyen bekarcoljuk a rögzített üvegdarab felszínét, majd azt a karcolás mentén eltörjük.



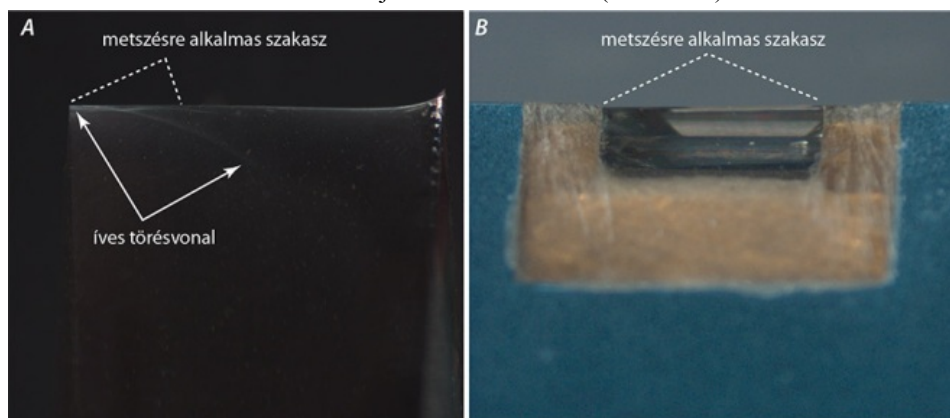
4.31. ábra. Régebbi típusú késtörő berendezés üvegcsíkkal és a kész kések (jobb felső sarok)

Az üvegcésre desztillált **víz**et **tartó medencét** (kádat) ragasztunk fényes ragasztószalagból, amelynek alsó szegélyét folyékony paraffinnal vagy körömlakkal lezárjuk (4.32.B ábra). Az elkészített késeket meghatározott ideig, pormentesítés céljából lezárt dobozban **tárolhatjuk** is, de idővel az élük „elfolyik” (az üveg amorf kristályos szerkezete átrendeződik), s használhatatlannak válnak.

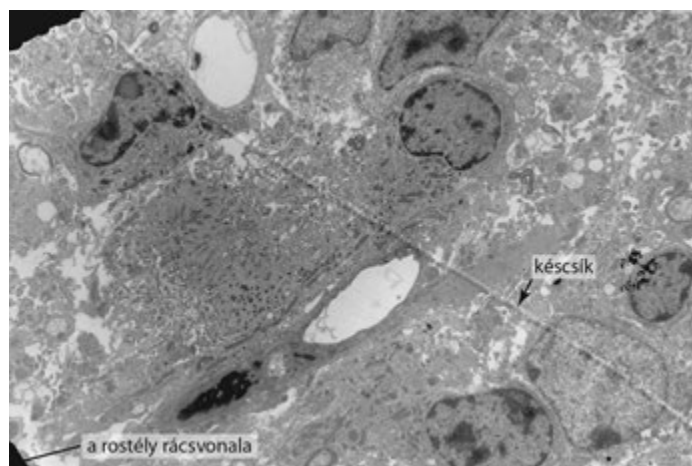


4.32. ábra. Kések: üvegcés (a jobb láthatóság kedvéért vékony fekete vonallal körülrajzoltuk), előtte előre gyártott, felragasztható víztároló medence (A), üvegcés szalagból ragasztott víztárolóval (B) és gyémántkés (C)

Az üvegcések éle sérülékenyebb, mint a készen kapható gyémántkéseké, s ultravékony metszésre csak egy adott szakaszuk alkalmas (4.33. ábra). Sajnos a gyémántkések éle sem örök életű, a használat során ez is sérülhet. A késhibák a metszeten húzott ún. **késcsík** formájában azonosíthatók (4.34. ábra).

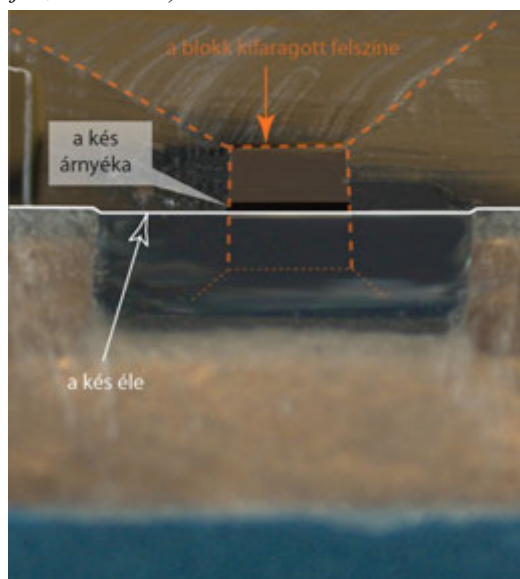


4.33. ábra. Üveg- (A) és gyémántkés (B) éle nagyításon: az A ábrán jól látszik az íves törésvonal, ami az éles, metszésre alkalmas élt jelzi



4.34. ábra. Sérült késél által húzott csík a metszeten

A **metszés menete** a következő. A kifaragott blokkot rögzítjük a tárgybefogóba. Kiválasztjuk a megfelelő kést, s azt rögzítjük a késbefogóba. A kés dőlésszöge állítható, s a blokk (a polimerizált beágyazószer) tulajdonságaihoz igazítható (4.27. ábra). A blokkot a blokkbefogó állítócsavarjai segítségével úgy igazítjuk, hogy a trapéz vagy téglalap rövidebb párhuzamos élét a kés felé fordítjuk, majd a kés élével párhuzamosra állítjuk. Ellenőrizzük, hogy a blokk teteje a kés éle előtt mozog-e, s hogy a mozgása közben nem távolodik-e attól (azaz a metszetvastagság azonos lesz a trapéz tetején és alján, 4.35. ábra).



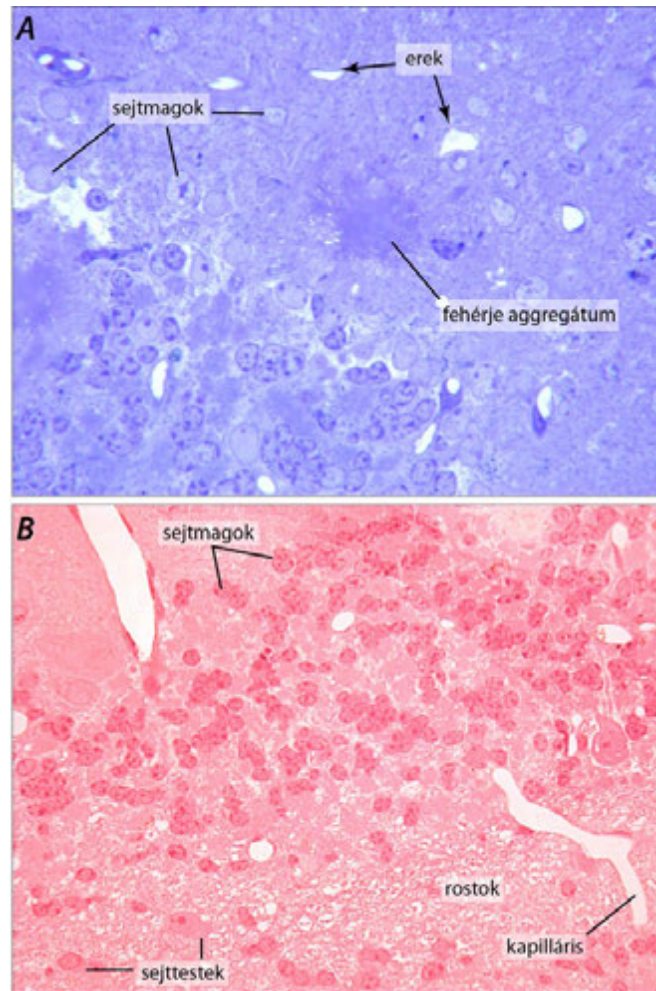
4.35. ábra. A kés és a mögötte lévő kifaragott blokk helyzete a helyes beállítás után: a kés éle párhuzamos a téglalap párhuzamos oldalaival és a blokk felszínére vetett árnyékának vonalával. (A blokk csúcsára faragott piramis éleit a jobb láthatóság kedvéért narancssárga szaggatott vonal jelzi, a kés mögé eső, a felvételen takarásban lévő éleket vékonyabb vonallal jeleztük.)

Ha az anyagot előzetesen ozmiummal kontrasztosítottuk, akkor helyzete jól látszik a blokkban. A mikrotommal néhány metszetet lehúzunk belőle, így a kifaragott minta egész (kívánt) felszíne bekerül a metszéssíkba.

Félvékony metszetek

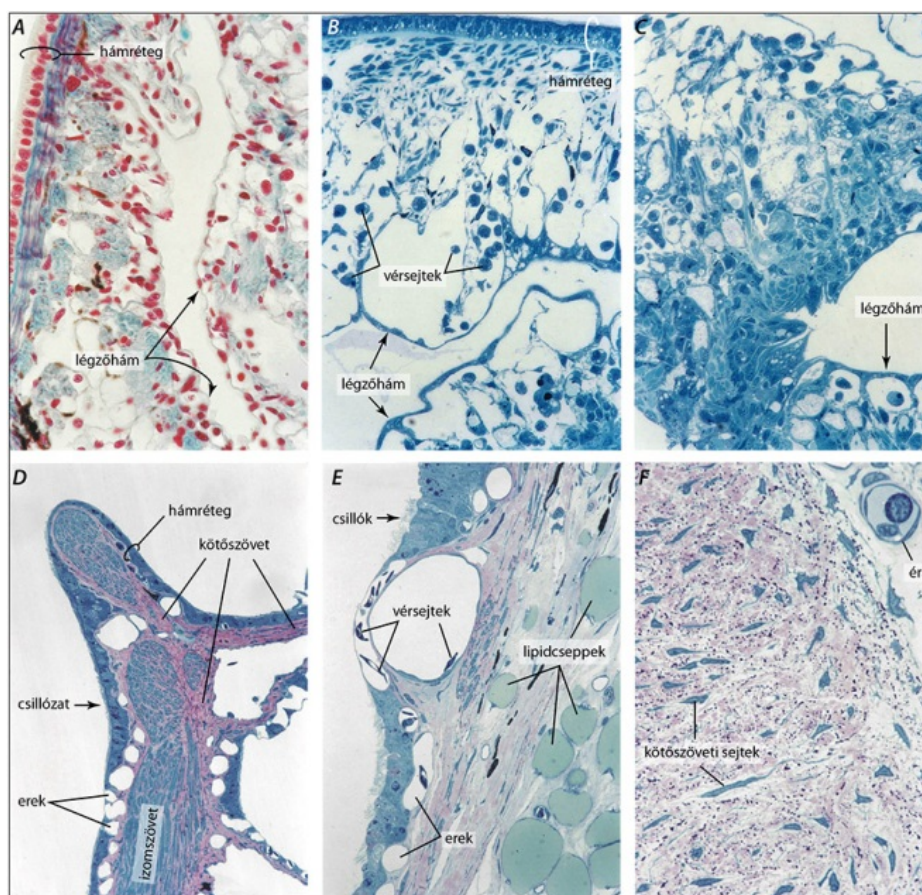
Az ultravékony metszetek készítése előtt érdemes a minta minőségét és orientációját ellenőrizni. Ezt **0,5–1 μm vastag, ún. félvékony metszet** segítségével tehetjük meg. A mikrotom ugyan automatizált, de ezeket a metszeteket még kézi vezérléssel is lemetszhetjük. A vízre úszó metszeteket tárgylemezen lévő vízcsepp felszínére helyezzük, ráleheléssel kisimítjuk, és melegítőasztalra téve rászárítjuk a tárgylemezre, majd a kívánt módon megfestjük. A félvékony metszetek festésére általában 1%-os, lúgos kémhatású **toluidinkék** oldatot használunk, mert ezzel a

festés gyors és egyszerű. A lúgos pH-tartomány és a hő (melegítőasztal vagy láng) biztosítja a festék műgyantába való behatolását (l. később). Hasonló eljárás a **bázikus fukszinnal** való festés. A festett metszetek fénymikroszkópban vizsgálhatók. Kontrasztos, a teljes minta áttekintésére alkalmas képet kapunk, amelyet lefedés után azonnal megnézhetünk, s dokumentálás céljából metszettartó dobozban meg is őrizhetünk (4.36. ábra).



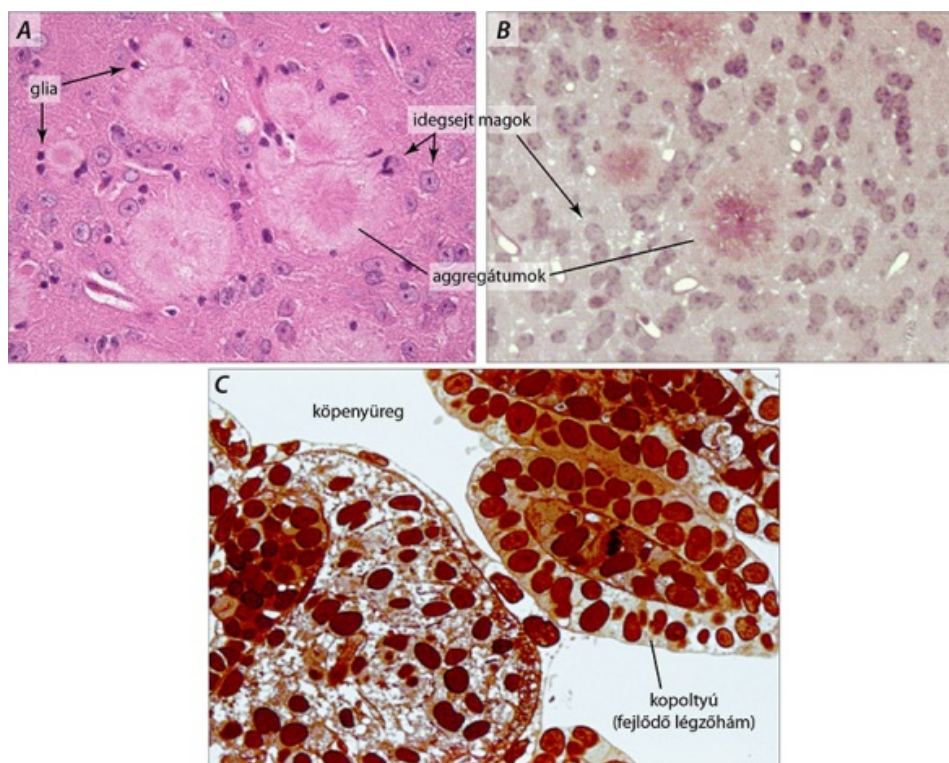
4.36. ábra. Toluidinkékkel (A) és bázikus fukszinnal (B) festett félvékony metszet (patológias agyszövet)

A félvékony metszetek is lehetnek sokszínűek, ha egymás után több festéket használunk (szukcedán festés). A **metilénkék**et gyakran kombinálják **bázikus fukszinnal**: a metszet színvilága így az Azan-festéshez hasonló lesz (4.37. ábra). Lényeges különbség azonban, hogy ami a fénymikroszkópos metszeten piros (sejtmagok, citoplazma), az a félvékony metszeten kék, illetve ami az Azan-festés után kék (pl. kollagénrostok), az a bázikus fukszinnal történő festés után rózsaszínű lesz. A festékek itt is mutatnak metakromáziát, azaz a saját színük helyett más színre festhetnek: a lipidcseppeket a toluidin-kék és a metilénkék is zöldre festi (4.37.E ábra).



4.37. ábra. Fénymikroszkópos és félvékony metszetek összehasonlítása: vastagabb, fénymikroszkópos, paraplasztba ágyazott metszet Azan-festés után (A), félvékony metszetek metilénkék (B, C) és metilénkék-bázikus fukszin (D–F) festés után. (Az E ábrán a lipidcseppek metakromázát – zöld színt – mutatnak. Az F felvételen a rózsaszín területek kollagénrostok, a bordó pöttyök és vonalak rugalmas rostok. A–C: éticsiga tüdő, D, E: béka laryngo-trachealis zsák, F: béka hangredő)

A félvékony metszetek vastagságban átmenetet jelentenek a fénymikroszkópos és az elektronmikroszkópos metszetek között. Ez a részletgazdagságra is igaz, hiszen a fénymikroszkópos metszetekkel ellentétben a félvékony készítmények csak egy sejtsor vastagságúak. Annak érdekében, hogy festés után a fénymikroszkópos mintákkal jobban összehasonlíthatók legyenek, kidolgozták a hagyományos fénymikroszkópos festési eljárások műgyantába ágyazott metszeteken alkalmazható változatát is. Így a félvékony metszeteket megfesthetjük hematoxin-eozinnal, Azannal vagy akár ezüstimpregnációval is (4.38. ábra).



4.38. ábra. Fénymikroszkópos (A) és félvékony (B) metszet hematoxin-eozin festés után (patológiás kisagy, fehérjeaggregátumokkal), valamint félvékony metszet ezüstimpregnációval (C, tintahal)

Ha a metszet festődése nem megfelelő, ezen úgy javíthatunk, hogy **a beágyazószeret részlegesen eltávolítjuk**, azaz a metszetet olyan oldatba helyezzük, ami kémiai úton „oldja” a beágyazószeret. Ez utóbbi eljárás alapja az, hogy az epoxigyantákban kialakuló savanhidridek epoxi-csoportokkal alkotott észterkötései **lúgérzékenyek**. Ez lehetővé teszi a műgyantának a metszetről való részleges kioldását nátrium-hidroxiddal (pontosabban annak alkoholos oldatával, Na-etioláttal vagy Na-metoxiddal). Ilyen „maratást” végezhetünk immuncitokémiai jelölés előtt is, hogy a metszet felszínéhez közeli epitopokat (antigén determinánsokat) az ellenanyag számára hozzáférhetővé tegyük (epitop-feltárás, l. később).

Ultravékony metszetek és a mikrorostélyok

Amennyiben a félvékony metszeteken végzett vizsgálatok alapján a minta-előkészítés megfelelőnek bizonyult, a munkát az ultravékony metszetek készítésével folytathatjuk. Ilyenkor a mikrotomot érdemes automata üzemmódba állítani, ugyanis ez biztosítja a leginkább azt, hogy a metszés során a blokk mozgása megfelelő sebességű és az előretolás egyenletes legyen. Az elkészült metszetek úgy úsznak a vízfelszínre, hogy a trapézok párhuzamos, szomszédos élei összetapadnak, a metszetekből tehát összefüggő láncolat keletkezik.

Az ultravékony metszeteket **tárgytartó** rácsra, ún. **mikrorostélyra** (röviden rostély) helyezzük. A rostély (angol neve: **grid**) 2,3–3 mm átmérőjű kis korong, amely a metszeteket tartja, az elektronsugárzás által keltett hőt és töltést mérsékli, elvezeti (4.29. ábra). A hordozófelszín kialakítása változó: vannak **egylyukú és hálós rostélyok** (4.39. ábra). Utóbbiak a metszetek egy részét kitakarják, így ha fontos, hogy a minta egészét kitakarás nélkül lássuk, akkor a metszeteket olyan egylyukú gridre vesszük fel, amelyre előzetesen egy vékony, elektronáteresztő ún. hordozóhátyát vittünk fel (**hátyás rostély**). Ezek a hátyák 5-10 nm vastagságúak, s amellet, hogy tartják a metszeteket, a sugárzás által keltett hőhatásokkal szemben kissé ellenállóbbak, mint a rácsálózat (a felmelegedés a vékony metszetek elszakadásához vezethet). A hátyák készülhetnek szerves (pl. szén) és szervetlen (pl. formvar) anyagból is.

A rostély hálóméretét mesh-ben adják meg (mesh=háló, hálószem). Minél nagyobb ez a szám, annál sűrűbb a háló, azaz annál kisebb a nem takart, vizsgálatra alkalmas felszín. Értelemszerűen a ritkább háló kevésbé tartja a metszeteket, de nagyobb vizsgálható területet biztosít. Forgalmaznak 40, 100, 150, 200, 300 és 400 mesh értékű rostélyokat is.

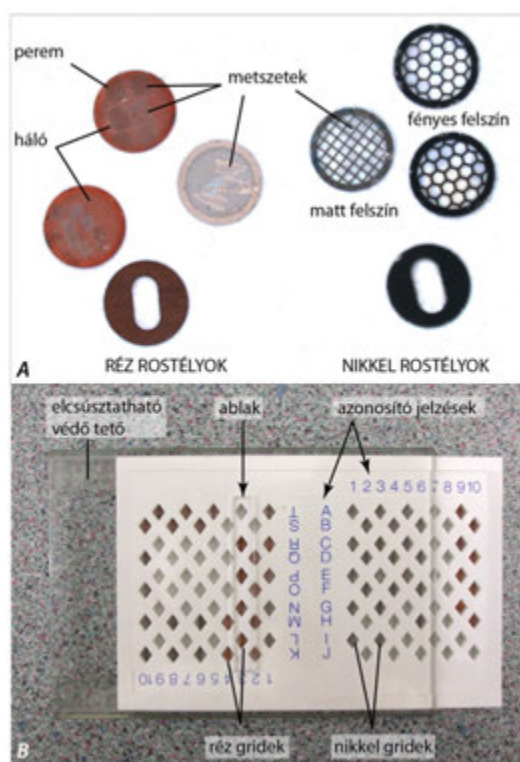
A rostélyok anyaga leggyakrabban **réz vagy nikkell**. A rutincélokra készített metszeteket rézgridre, míg az immunjelölésre szántakat nikkellrostélyra tesszük³.

A metszés végén a kés víztartó medencéjében úszó metszeteket kisímitjuk (4.28. ábra), közülük a nem megfelelő vastagságúakat eltávolítjuk, majd a többit a rostélyra helyezzük.

A rostélyt a metszetek mellett a víz szintje alá buktatjuk, majd azok alá toljuk, és vele a metszeteket a vízből kiemeljük. A metszetek kiemelése könnyebb, ha azok összefüggő sort alkotnak, s nem egyesével lebegnek a vízen (4.29. ábra).

A grideket szűrőpapíron hagyjuk megszáradni, majd azonosítójelekkel ellátott tartóba helyezzük.

A gridtartó doboz elcsúsztatható tetővel és azonosítójelekkel ellátott tároló, amelybe a rostélyokat mindig megadott orientációban kell elhelyezni. A tetőn ablaknyílás van, amit a kiválasztott rostélyt tartalmazó lyuk fölé tolva lehet a gridet kiemelni a helyéről (4.39. ábra). A minták azonosítójelzéseit a dobozhoz tartozó dokumentációban rögzíteni kell.



4.39. ábra. Ultravékony metszeteket tartó (mikro)rostélyok (A) és a gridtartó doboz (B)

Kontrasztosítás

Az elektronmikroszkóp képernyőjén (és a síkfilmen vagy a digitális kamera érzékelőjén) azok az elektronok alkotnak képet, amelyek a minta atomjaival rugalmatlanul ütköztek. A képernyő azon pontjai, ahova becsapódnak, világosak lesznek, míg azok, ahová nem érkezik elektron, sötétek maradnak. Ahogy említettük, a biológiai mintákban kevés a rugalmas szóródást okozó **nehézfématomok száma**, azaz a metszetek ilyen jellegű kezelés nélkül kontrasztban szegények lesznek. A részletgazdagságot tehát **nehézfém sók bevitelével** növelhetjük: ez a kontrasztosítás (l. 4.2. ábra). Általában erre az ozmiumot (ozmium-tetroxid), az uránt (uranil-acetát) és az ólmot (ólom-citrát) használják. A minta kontrasztosítása történhet blokkban (a víztelenítés előtt) és metszetben is.

Az utófixálásra és blokk-kontrasztosításra használt **ozmium-tetroxid** a membránokba épül be, kirajzolja tehát a membránok által határolt tereket. Az uránt vízben vagy alkoholban oldott **uranil-acetát** formájában, blokkban és metszeten történő kontrasztosításra egyaránt használjuk. Kötődik a nukleinsavakhoz, a kollagénnel, de gyengén

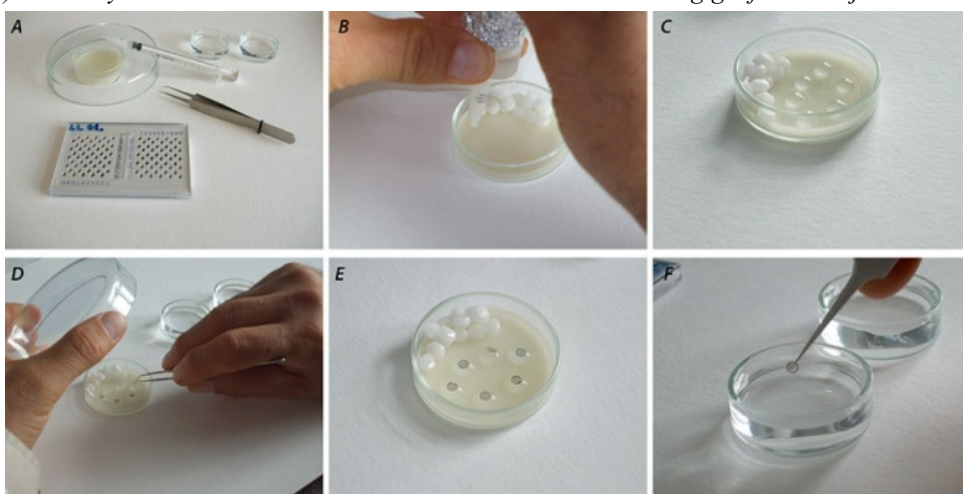
³ Ennek magyarázata, hogy a réz griden az aranykolloid kicsapódik.

jelöli a membránfehérjéket is. Mindkét oldatot fénytől védve, sötétben kell tárolni. Az **ólom-citrát** lúgos oldatát csak **metszetek kontrasztosítására** használjuk.

Az ólomsók a levegő szén-dioxid-tartalmával ólom-karbonátot képeznek, ami csapadék formájában kicsapódik a metszeten, ezért a kezelést zárt térben (Petri-csészében), a vizet megkötő (higroszkópos) nátrium-hidroxid kristályok mellett kell végezni (4.40.B–E ábra).

Az ultravékony metszetek „festésére” szolgáló oldatokat szűrni kell. Erre a célra kis térfogatú fecskendő és a végére helyezett, baktériumok kiszűrésére alkalmas **fecskendőszűrőt** használhatunk (4.40.A ábra).

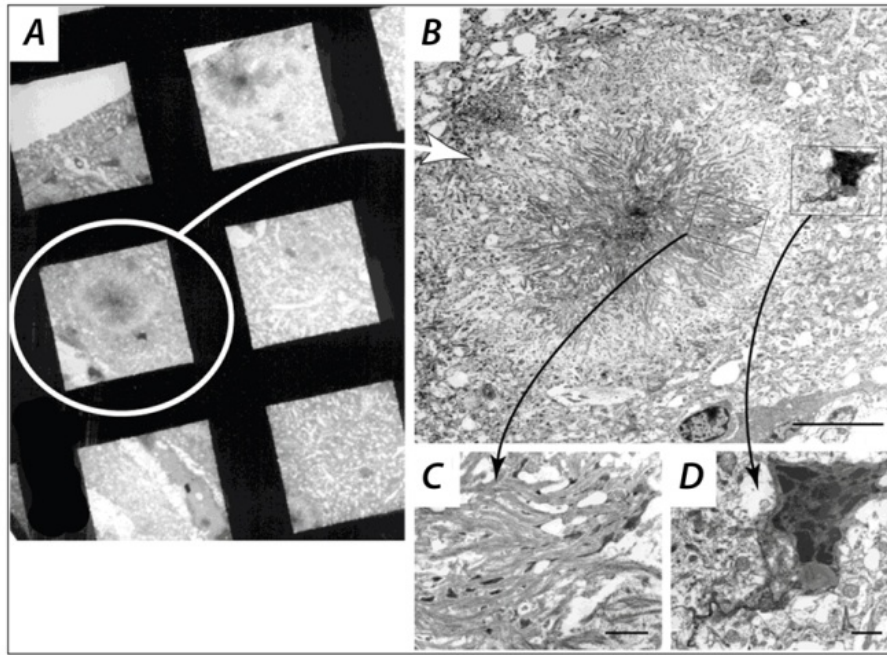
*A **kontrasztosítás menete** a következő: a kontrasztosítóoldatból Petri-csésze viasszal kiöntött aljára fecskendőszűrővel a rostélyokkal azonos számú cseppet cseppentünk (4.40.B, C ábra). Mikrocsipesszel óvatosan a cseppek tetejére helyezzük a rostélyokat, mégpedig a metszethordó felszínükkel lefelé, hogy a metszetek érintkezzenek az oldattal (4.40.D, E ábra). Megfelelő idő elteltével a kontrasztosítóoldatot leöblítjük: ezt a kontrasztosítóoldat oldószerével kezdjük, majd desztillált vízzel zárjuk. A mosás során a grideket csipesszel tartva belemártogatjuk a mosófolyadékot tartalmazó Petri-csészébe (4.40.F ábra), majd a rostélyokat – a metszetekkel felfelé! – szálmentes szűrőpapírra helyezzük, hogy megszáradjanak. Végül a kész metszeteket hordozó rostélyokat visszahelyezzük a gridtartó dobozba (4.39. ábra). A szennyeződések elkerülése érdekében a Petri-csészét mindvégig lefedve tartjuk.*



4.40. ábra. Ultravékony metszetek ólom-citráttal történő kontrasztosítása: a szükséges felszerelés (Petri-csészék, szűrővel ellátott fecskendő, mikrocsipesz, kontrasztosításra váró rostélyok a gridtartó dobozban) (A), a kontrasztosítóoldat cseppjeinek kicseppentése a viaszfelszínre (B), a cseppek a fehér nátrium-hidroxid kristályok mellett (C), a rostélyok cseppfelszínre helyezése (D), metszeteket hordozó felszínükkel lefelé fordított rostélyok a cseppek felszínén (E), a kontrasztosítóanyag lemosása mosófolyadékba mártogatással (F)

A kész metszetek vizsgálata

A kontrasztosítás után a metszetek vizsgálhatók az elektronmikroszkóppal. Ez az első lehetőség arra, hogy ultrastrukturális szinten megnézzük, vajon megfelelő volt-e a minta előkészítése. A rostélyokat kis nagyításon áttekintjük. Ha a metszetek megfelelőnek tűnnek (4.30.A ábra), akkor közepes nagyítással kiválaszthatjuk közülük azokat, amelyeket részletesebben megvizsgálunk (4.41. ábra).



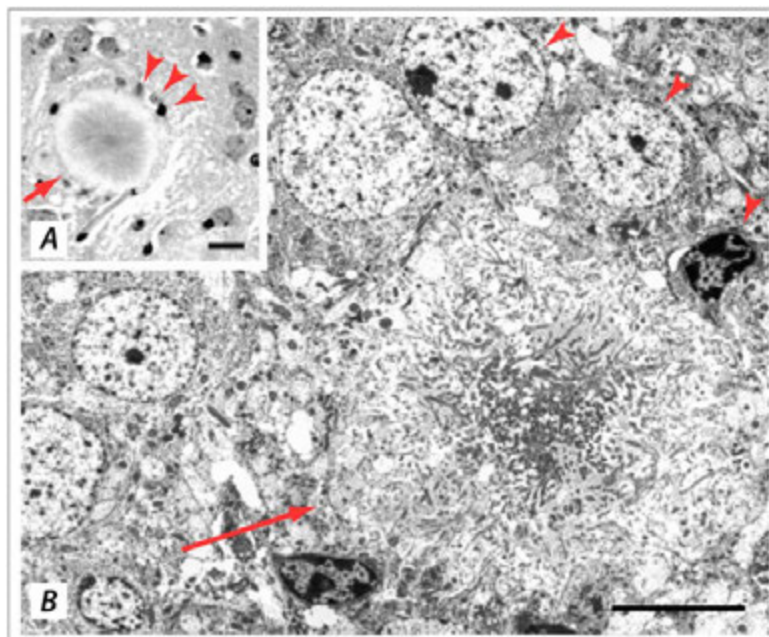
4.41. ábra. A vizsgálatra kiválasztott terület kis (A), közepes (B) és nagy nagyítású (C, D) részletei (emberi kisagy, a méretvonalak: 10 μm /B/ és 2 μm /C, D/)

Átágyazás: átjárás a fény- és az elektronmikroszkópos dimenziók között

Lehetőség van arra, hogy a fénymikroszkópos vizsgálatok során különösen érdekesnek tartott terület ultrastruktúrájáról is képet alkossunk. Ez azért figyelemre méltó, mert – ahogy azt a mikrotechnikai bevezetőben írtuk – az egész minta-előkészítési eljárást azon szempontnak rendeljük alá, hogy milyen dimenzióban, azaz milyen felbontású mikroszkóppal szeretnénk a kiértékelést végezni. Más rögzítőszer, rögzítési módot és beágyazást alkalmazunk a fény-, és mást az elektronmikroszkópos minták készítésekor.

Abban az esetben, ha a minta-előkészítést azzal az igénnyel kezdtük, hogy a fénymikroszkópos vizsgálatok során a legérdekesebbnek tartott területek ultrastrukturális szinten is megnézhetők legyenek, a metszetnek erre a célra kijelölt területeit át kell ágyazni. Az átágyazás azt jelenti, hogy a fénymikroszkópi technikában használt beágyazószer (pl. paraplastot), ami a rögzített szerv- vagy szövetmintát a metszeten magába zárja, le kell cserélni az elektronmikroszkópiában használt beágyazószerre (pl. epoxigyanta).

Az eljárást itt nem részletezzük, az eredmények önmagukért beszélnek. Az alábbi, 4.42. ábrán megnézhetjük az idegszövetben kialakult kóros fehérjeaggregátumot és a környezetében lévő gliasejteket fény- és elektronmikroszkópos képen is. Nagyobb nagyítással megvizsgálhatjuk, hogy a sejtek ultrastrukturális szinten mutatnak-e valamilyen patológiás elváltozást, vagy sem (4.42. ábra).



4.42. ábra. Ultrastrukturális vizsgálatra kiválasztott terület a parafinba ágyazott, H-E festett metszeten (A), valamint ugyanennek a területnek az elektronmikroszkópos képe (B) (a nyílhegyek mindkét képen ugyanazon sejtekre, a nyíl pedig a közöttük lévő extracelluláris aggregátumra mutat)

A morfológiai vizsgálaton felül megpróbálkozhatunk kevésbé érzékeny antigének immunjelöléssel történő kimutatásával, lokalizációjával is (l. Immuncitokémia fejezet).

Műtermékek, hibák

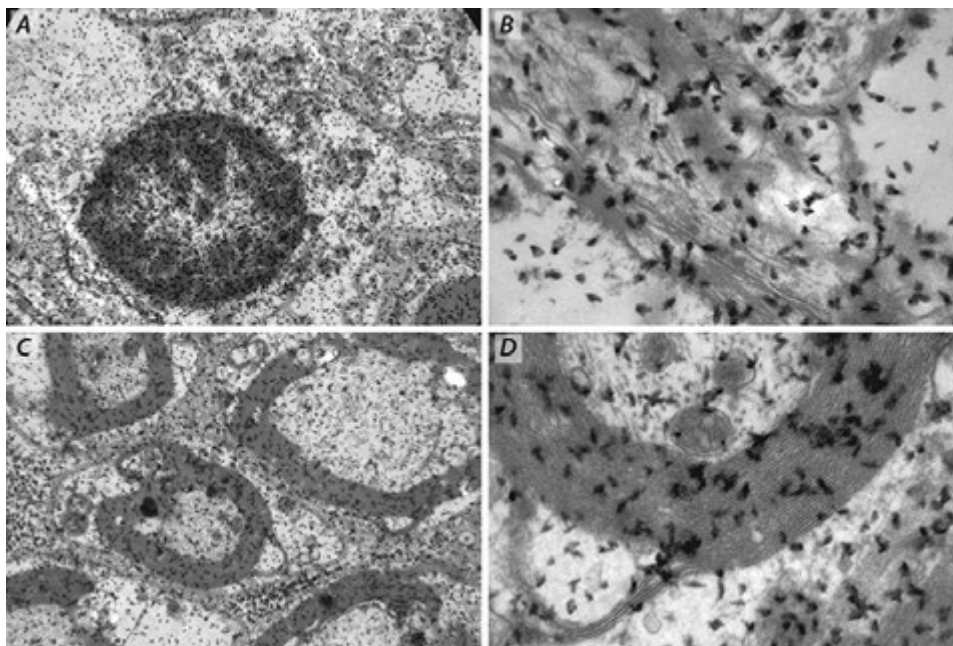
A minta-előkészítés során elkövethető, műterméket okozó hibákból csak néhányat említünk. Annak elemzésétől eltekintünk, amikor a metszet nem jó megtartású, részletgazdagsága nem kielégítő. Ezt okozhatja helytelen fixálás és beágyazás is.

A nagyítás fokozása a „fényintenzitás” csökkenésével jár, ezért a „megvilágítást” fokozni kell, ami viszont az elektronok energiájának emelésével jár. Ilyenkor a **metszet** zsugorodhat, torzulhat, szélsőséges esetben a szemünk láttára el is **szakadhat** (4.30.B ábra). Ennek oka az, hogy a beágyazószer nem képes elviselni azt a – hőtöbblet által kiváltott – károsodást, amit az elektronsugarakkal való kölcsönhatás okoz. A problémát (bizonyos határok között) általában a metszetvastagság növelésével szüntethetjük meg.

Műtermékeknek számít a kés sérüléséből adódóan a metszetre kerülő **késcsík** is (4.34. ábra), amely súlyosabb esetben apró szakadások, lyukak sorozatának formájában jelentkezik.

A metszeten a késcsíkra merőleges, egymással párhuzamosan futó csíkot jelenthet meg, ami megfelel a metszet változó vékonyabb-vastagabb sávjainak. Ennek forrása lehet a metszés közben fellépő valamilyen külső rezgés, vagy a blokk és/vagy a kés helytelen rögzítése.

Amikor a minta előkészítése során a **metszet szennyeződik**, vagy olyan oldatmaradványok maradnak benne, amelyek csapadékképződéshez vezetnek, a metszet felszínén kiváló, egyenletes sűrűségben előforduló sötét vagy fekete kristályok eltakarják a minta finom rajzolatát (4.43. ábra). Ez esetben meg kell keresni a hiba okát, ellenőrizni kell a munkamenet tisztaságát és a használt oldatokat. Végig kell nézni a munka során készült jegyzőkönyvet, amely az oldatok pontos összetételét, a kezelések sorrendjét és idejét tartalmazza.



4.43. ábra. Csapadékképződés a metszet felszínén: a kiváló nehézfém-só kristályok eltakarják a metszet rajzolatát, lehetetlenné teszik a pontos megfigyeléseket (a B ábra az A felvételen látható metszet, a D ábra pedig a C fotón látható metszet nagyított részlete; a metszetek kontrasztosítása egyszerre történt; egéragy részlete)

Minta-előkészítés speciális TEM vizsgálatokra

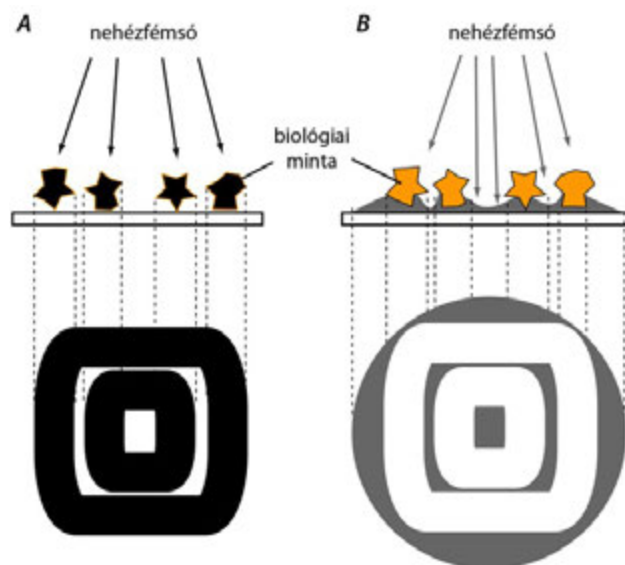
Ebben a témakörben három módszert említünk: a negatív kontrasztosítást, az egyes makromolekulák és enzimek lokalizációját célzó citokémiát, valamint (elsősorban) a fehérjék kimutatására és lokalizációjára kifejlesztett immuncitokémiát. Utóbbit, jelentősége és terjedelme miatt, külön fejezetben tárgyaljuk.

Negatív kontrasztosítás

Az eljárás elnevezése azt jelzi, hogy a rutinszerűen alkalmazott kontrasztosítással (világos háttér, sötét objektumok) szemben az így kapott képen a **háttér sötét** (elektronszóró) lesz, a **vizsgált objektum pedig világos** (elektronok számára átjárható). Emlékeztetőül: a biológiai minták alapvetően transzparenszek, rajtuk az elektronok nem szóródnak, tehát ha nehézfémek nem kapcsolódnak hozzájuk, akkor az elektronsugarak kölcsönhatás nélkül áthatolnak rajtuk (4.1. és 4.2. ábra).

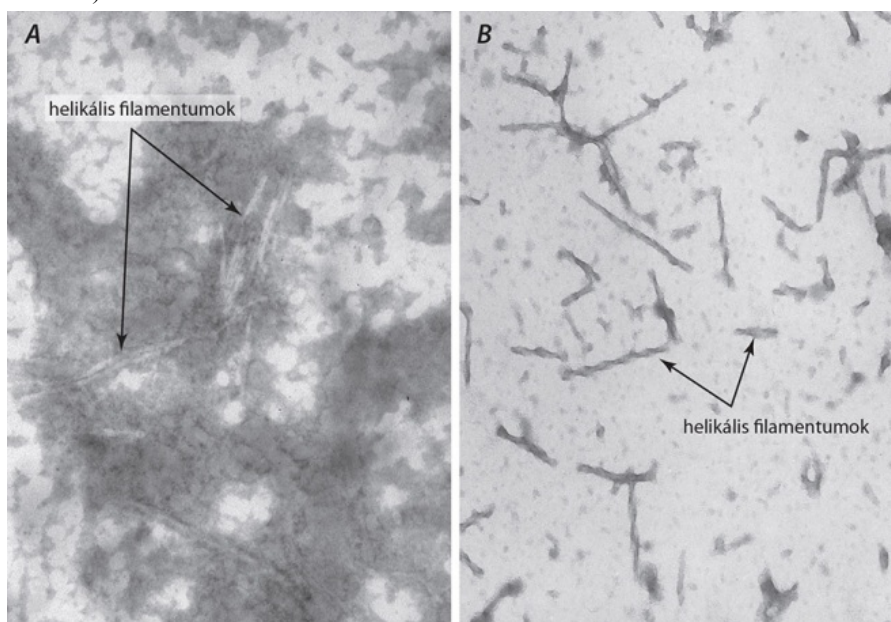
Az eljárás népszerű, mert gyors, egyszerű módszer izolált sejtalkotók (ultracentrifugálással nyert frakciók), baktériumok, vírusok és makromolekulák (sejtváz elemek, fehérje aggregátumok) vizsgálatára. A munka során a vizsgálandó objektumokat tartalmazó oldatot hártás rostélyra kell kicseppenteni és arra rászárítani.

A módszer lényege, hogy a vizsgálandó objektumra nehézfém-só oldatot cseppentünk, ami kitölti a preparátum mélyedéseit és az objektumok közötti teret, ám a minta magasabb részeit nem lepi el, így azok kontrasztanyagmentesek lesznek. A gyorsan beszáradó fémsóoldat elektronszóróvá teszi a környezetet, míg a „kiálló” részek transzparenszek maradnak, tehát a képen fehér színűek lesznek (4.44., 4.45.A ábra).



4.44. ábra. A pozitív (A) és a negatív (B) kontrasztosítási eljárás lényege: a pozitív eljárásnál a nehézfémek a biológiai minta egyes komponenseihez kötődnek, a negatív „festésnél” az azok közötti teret töltik ki; felül oldalnézeti kép, alul a mikroszkópban megjelenő kép

Ha a kontraszt anyagot megfelelően adagoljuk, vagy óvatosan kissé lemoszuk, akkor az szinte csak a minta finom mélyedéseiben, a kiemelkedő részek peremén ül meg, illetve marad meg, így annak térbeli, domborzati viszonyait kirajzolja (4.45.B ábra).



4.45. ábra. Csavarodott fonalakat (helikális filamentumokat) formáló fehérjeaggregátumok negatív kontrasztosítás után: a B minta készítése során a kontrasztanyagot annak beszáradása előtt óvatosan leöblítettük, így itt a háttér világos (tau-filamentumok Alzheimer-kórban elhunyt beteg agymintájából)

Citokémia

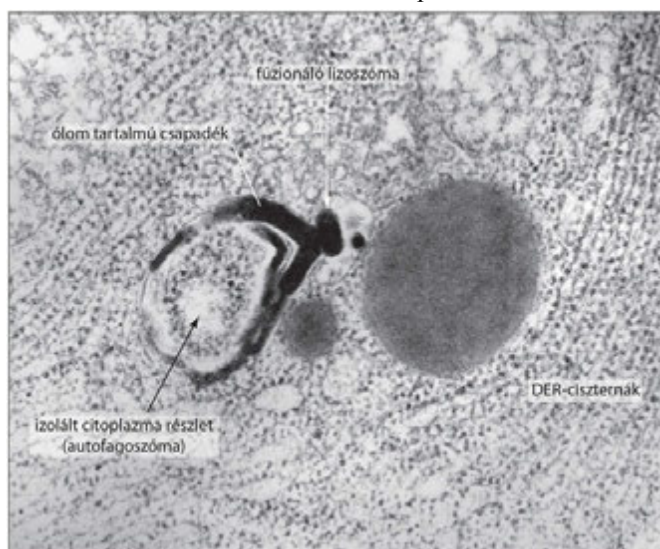
Alapjai megegyeznek a korábbiakban már bemutatott hisztokémiai eljárások alapjaival. A fénymikroszkópos metszetekhez hasonlóan az ultravékony, elektronmikroszkópos metszeteken is láthatóvá tehetjük **specifikus komponensek jelenlétét**, azaz a lipidek, szénhidrátok, nukleinsavak és fehérjék kimutatására kidolgozott hisztokémiai (szöveti) eljárások közül – némi módosítással – egyeseket az elektronmikroszkópiában is használhatunk.

Ilyenre példa a Feulgen- és a PAS-rakció. Nehézfémionok nem csak lipidrétegeket (l. kontrasztosítás), hanem szénhidrátokat is jelöl(het)nek (l. sejtköpeny).

Ha a feladat **fehérjék kimutatása**, választhatunk **immunológiai módszert**: a fehérjét (antigén) specifikusan felismerő ellenanyaggal jelöljük, majd ezt az immunkomplexet mutatjuk ki. A módszer a keresett fehérje lokalizációjára alkalmas, és többféle változata ismert (l. Immuncitokémia).

Amennyiben a fehérje **enzim**, akkor a helyzetén kívül a **működésére** vonatkozóan is nyerhetünk információt, hiszen az enzimeket katalizált reakcióik alapján azonosíthatjuk. Ezzel foglalkozik az **enzimcitokémia**. Alkalmazásának feltétele, hogy az enzim megőrizze, illetve visszanyerje aktivitását az eljárás során – ezt a szempontot a minta-előkészítő eljárás egésze folyamán szem előtt kell tartani.

Az **enzimcitokémia alapja** az, hogy az adott enzimreakció termékei (vagy azok egyike) olyan reakcióba vihetők, amelyben belőlük a keletkezésük, vagyis az enzim aktivitásának helyén azonnal **oldhatatlan csapadék** keletkezik. Amennyiben a végtermék **nehézfémionokat** tartalmaz, az enzimaktivitás elektronmikroszkópos metszeten is detektálható. A korábban már bemutatott **Gömöri-féle savas foszfatáz kimutatás** ilyen eljárás: a reagentsek között ólom-nitrát is szerepel, amely a savas környezetben aktív foszfatáz által lehasított foszforsavmaradékkal elektronszóró ólom-hidrogén-foszfat csapadékot képez. A reakció a lizoszomális enzimek kimutatására alkalmas, eredményeként a képen sötét folt jelenik meg ott, ahol az enzim működött (4.46. ábra). A lúgos foszfatáz kimutatás során keletkező kobalt-szulfid csapadék szintén azonosítható elektronmikroszkópban.



4.46. ábra. Lizoszomális enzimaktivitás savas foszfatáz kimutatáson alapuló azonosítása: a fekete csapadék autofagoszóma lizoszómával való fúzióját bizonyítja

A műtermékek képződési lehetősége (pl. az elégtelen fixálás miatt az enzim nem eredeti helyen való előfordulása, az aktivitás elvesztése, a szubsztrát nem megfelelő volta és bomlékonysága, a csapadék részleges kioldódása) miatt a kapott eredmény csak megfelelő kontrollkísérletek elvégzésével fogadható el.

Immuncitokémia

Az alapok

Ahogy azt már korábban írtuk, az elektronmikroszkópia megjelenése új távlatokat nyitott a morfológiai vizsgálatok előtt. Az egyre újabb és újabb generációs mikroszkópok az élőlények szerkezeti felépítésének (struktúrájának) egyre részletgazdagabb tanulmányozását és leírását teszik lehetővé, amely ma már a makromolekulák szintjénél tart. (A jelen technikák az atomi szintű felbontást is biztosítják /l. nagy felbontású transzmissziós és pásztázó elektronmikroszkóp, HR-T(S)EM/, de ennek gyakorlati jelentősége csak az élettelen minták, kristályok szerkezetének kutatásában van.)

Ahhoz, hogy a szerkezet és a működés kapcsolatáról és ennek változásáról molekuláris szintű ismereteket szerezzünk, arra van szükség, hogy a makromolekulák eloszlási mintázatát a szöveti szint mellett (l. fénymikroszkópos immunhisztokémia, angolul immunohistochemistry, IHC) a sejtek szintjén is vizsgálni tudjuk. A sejten belüli, ún. **ultrastrukturális lokalizáció** vizsgálatára az elektronmikroszkópos **immuncitokémia** (angol nevén: immunocytochemistry, **ICC**) módszertana teremt lehetőséget, amely az elektronmikroszkópiát a nagy felbontású, de mégis csak leíró, szerkezetvizsgáló módszerből a molekuláris sejtbológia ma is dinamikusan fejlődő ágává tette.

Az **immuncitokémia alapjai** az immunhisztokémia alapjaival: a módszer a nagyon **specifikus antigén-antitest reakcióra** épül, ahol a lokalizálandó antigén alapvetően fehérje. A kivitelezés során alkalmazandó módszertani különbségek elsősorban abból az igényből származnak, hogy szeretnénk kihasználni az elektronmikroszkópnak a fénymikroszkópét nagyságrendekkel meghaladó felbontóképességét. Így e módszernél a cél az, hogy az antitest által felismert **antigént annak természetes előfordulási helyén** (*in situ*) tegyük az **elektronmikroszkópban** – minden más struktúrától megkülönböztethető módon – **láthatóvá**.

Mindezen szempontokat figyelembe véve egy molekuláris szinten értelmezhető és képi mondanivalóban gazdag elektronmikroszkópos immunjelölés sikeres kivitelezésének **három alapvető feltétele** van:

1. jó minőségű, rendkívül **specifikus ellenanyag**;
2. elektron-optikailag kiválóan detektálható **jelzőanyag** (vizualizációs marker);
3. megfelelő – sokszor a mintára szabott, egyedi – **minta-előkészítés**, amelynek kettős követelményt kell kielégítenie: maximálisan kell biztosítani
 - a. a lokalizálandó fehérje antigenicitásának természetes formában való megőrzését, valamint
 - b. a biológiai minta finomszerkezetének (ultrastrukturájának) a lehető legjobb megtartását.

A minta-előkészítés fenti két (3.a és 3.b) követelményének **egyidejű teljesítése igen nagy nehézségekbe ütközik**, és soha nem lehet tökéletes. A rutin TEM eljárások során használt, jó megtartást biztosító fixálók változatlan módon való alkalmazása ugyanis – kovalens keresztkötések kialakításával – gyakran tönkreteszi az epitopokat⁴, így ellehetetleníti a jelölést. Az antigén determinánsok épségének, reakcióképességének a megvédését szolgáló eljárások pedig általában nem biztosítják kellő mértékben az ultrastrukturális szerkezetek megőrzését. A kidolgozott eljárásokban tehát **kompromisszumok sorozatát találjuk**, hiszen azok „egyensúlyoznak” a két feltételt külön-külön maximálisan biztosító megoldások között.

Ellenanyagok

Az ellenanyagok szerkezetével, előállításával, tisztításával és minőségük ellenőrzésének módjaival e könyv keretein belül nem foglalkozunk. Az Immunhisztokémia fejezetben leírt alapokon túl, alább röviden összefoglaljuk a **poliklonális antiszérumok** és a **monoklonális ellenanyagok** közötti alapvető különbségeket.

Amikor egy állat immunrendszere találkozik egy számára „idegen” fehérjével (az immunizálás során beoltott antigénnel), akkor benne több B-limfocita klón jön létre, amelyek mindegyike az antigénnel szemben specifikus immunglobulint termel. Az egyes klónok abban különböznek, hogy ellenanyaguk az antigén mely részletét (epitopját) ismeri fel, s azt milyen affinitással és specificitással köti. A vérszérumban tehát több klón terméke azonosítható, ezért ezt a szérumot **poliklonális antiszérumnak** nevezzük.

Amikor egy olyan ellenanyagot szeretnénk, amely „tisztá” abban az értelemben, hogy az antigénnek csak egy szigorúan meghatározott epitopját (részletét) ismeri fel, akkor válogatni kell a keletkező klónok immunglobulinjai között. Ezt megtehetjük a poliklonális antiszérumból kiindulva: a módszer neve affinitástisztítás, s hozzá nagy mennyiségű antiszérum és antigén szükséges. Egyszerűbb megoldás, ha még a B-sejt klónok közül választjuk ki a legmegfelelőbb immunglobulint termelőt, majd ezt a klónt egy B-sejthiányos állat hasüregfolyadékában felszaporítjuk. Az így kapott reagens tehát nem a vérből származik (nem vérszérum), s csak egy klón ellenanyagát tartalmazza, tehát **monoklonális**⁵.

Számtalan tapasztalaton alapuló általános szabály, hogy csak **olyan ellenanyaggal vágjunk bele elektronmikroszkópos jelölésbe**, amelyet fénymikroszkópos szinten már teszteltünk, és a jelölés intenzitása és

⁴ Az epitopok, vagy más néven antigén-determinánsok az antigén olyan – többnyire néhány aminosavból álló – meghatározott szerkezetű részletei, amelyek kizárólagosan jellemzik az adott antigént.

⁵ További részleteket és háttérrel l. az immunológiai tankönyvekben.

specifitása egyaránt megfelelő volt. A precíz kivitelezés ellenére azonban a siker ekkor sem garantált, főleg, ha a lokalizálandó antigén (fehérje) fokozottan érzékeny az immunreakciót megelőző minta-előkészítő eljárás valamelyik lépésére.

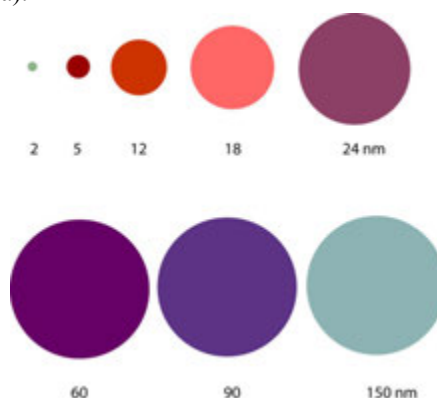
Elvileg mind a poli-, mind pedig a monoklonális ellenanyagok alkalmasak elektronmikroszkópos immunjelölésre. A tapasztalat azonban azt bizonyítja, hogy a **monoklonális ellenanyagok alkalmazási köre jóval korlátozottabb**. Ennek magyarázata abban rejlik, hogy az immunglobulin az antigénnek csak egyetlen antigén determinánsát ismeri fel (1. feljebb). Amennyiben ennek hozzáférhetősége a minta-előkészítés következtében gyengül vagy megszűnik (a jelenség neve **antigénmaszkírozás**), illetve az eljárás során rejtve marad, akkor megtévesztő negatív eredményt kapunk. Ez a magyarázata annak, hogy a monoklonális ellenanyagokat általában csak az úgynevezett beágyazás előtti (angolul: pre-embedding) immunjelöléshez használjuk, ahol a minta-előkészítés során sokkal kisebb mértékben áll fenn az antigénmaszkírozás veszélye.

Elektron-optikai jelzőanyag

Annak érdekében, hogy az antigén (determináns)-antitest reakció pontos morfológiai helyét ultrastrukturális szinten demonstrálni tudjuk, a jelölési eljárás során elektronmikroszkóppal jól és egyértelműen azonosítható jelet (markert) kell az immunreakció helyére beépítenünk. Egy **jó vizualizációs jelzőanyaggal** szembeni követelmények a következők:

1. szerkezete legyen stabil, ami jól bírja a nagy energiájú elektronsugárzást;
2. intenzíven szórja (ne eressze át) az elektronokat, hogy a képe éles kontúrú, fekete folt formájában látszódjon a felvételeken, jól megkülönböztethetően az intracelluláris struktúráktól;
3. egyedi mérete lehetőleg szűk mérettartományba essen és összevethető legyen a legkisebb sejten belüli struktúrákkal (pl. membránok, sejtvázfílamentumok átmérője).

A legideálisabb immun-elektronmikroszkópos marker a **kolloidális arany**, amely a kezdeti próbálkozások után mára már minden más háttérbe szorított. Az aranykolloid redukcióval viszonylag egyszerűen előállítható aranykloridból. A kolloidrészecskék mérete az alkalmazott redukálószer típusától és a komponensek koncentrációjától függ. Előállíthatók olyan aranykolloidoldatok, amelyekben az aranyrészecskék átlagos átmérője 2, 5, 12, 15, 18, 20, 24 vagy akár 150 nm (4.47. ábra).

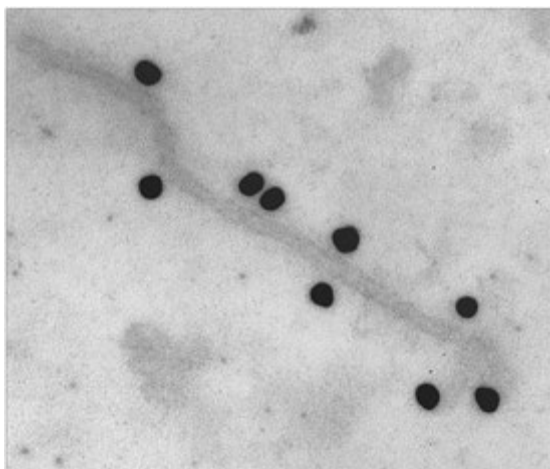


4.47. ábra. Aranykolloidoldatok: a kolloidszemcsék mérete és az oldat színe összefügg (a felső sorban a szemcseméret arányosan változik, az alsó sorban a különböző méretű részecskéket – megfelelő hely hiányában – azonos méretben kellett ábrázolnunk)

Az immuncitokémiában általában az 5–20 nm tartományba eső aranyszemcséket használják. Az 1 nm-es, vagy annál kisebb, úgynevezett „**nanogold**” részecskék alkalmazása esetén a lokalizáció helyén megkötődő aranyszemcséket az immunreakciót követő **ezüstözéssel** kell az elektronmikroszkópban látható méretűre növelni („ezüsterősítés”, intenzifikáció: silver enhancement).

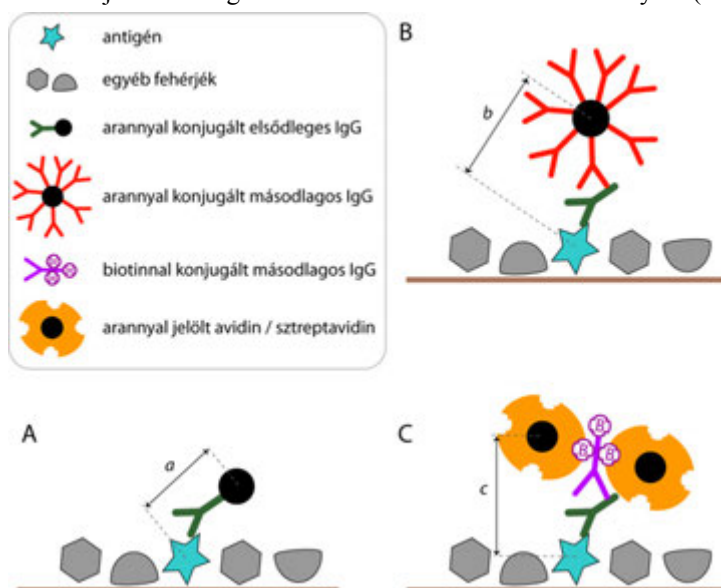
Az aranykolloidoldatban lévő aranyszemcsék tulajdonképpen olyan, aranyatomokból álló **mikrokristályok**, amelyeknek felülete negatív töltéstöbbletet hordoz, és hidrofób tulajdonsággal is rendelkezik. Ezek a részecskék – meghatározott körülmények között – a fehérjék számos típusával viszonylag **stabil, de nem kovalens** kölcsönhatást

képesek kialakítani. Erre alkalmas fehérjék az **immunglobinok**, amelyek lehetnek IgM, IgA vagy IgG típusúak⁶. A reakció során kapott, aranszemcsét hordozó ellenanyagot **arannyal konjugált (kapcsolt) ellenanyagnak** nevezzük (4.48. ábra).



4.48. ábra. 10 nm-es aranykolloiddal konjugált ellenanyag aranszemcséi nagy nagyításon: a mikrokristályok alakja változó, s a méretük sem tökéletesen egyforma (tau fehérje immuncitokémiai kimutatása filamentumpreparátumban, negatív kontrasztosítás)

Az elektronmikroszkópos immunjelölés hőskorszakában az aranszemcséket közvetlenül az antigént felismerő elsődleges (primer) ellenanyaghoz (általában IgG molekulához) kötötték (konjugálták), s így egy lépésben, **direkt** módon juttatták a vizualizációs jelet az antigén-antitest reakció kialakulásának helyére (4.49.A ábra).



4.49. ábra. A direkt és indirekt jelölések összehasonlítása: egy- (A), két- (B) és háromlépcsős (C) rendszer felépítése vázlatosan: az antigén helye és az aranykolloid közötti távolság a köztük lévő „emeletek” számától és jellegétől függően eltérő (jelmagyarázat a bal felső sarokban)

Ez a módszer – számos, itt nem részletezett hátránya miatt⁷ – mára már szinte teljesen kiszorult a gyakorlatból. A direkt módszert felváltotta az **indirekt jelölés**. Ennek lényege, hogy a vizualizációt lehetővé tevő jel egy olyan komplex része, amelynek egyik tagja specifikusan felismeri az antigén determinánshoz kötődő elsődleges (**primer**) ellenanyagot, így az antigén helyét közvetett módon jelzi.

⁶ A közöttük – akár méretben – mutatkozó különbségeket l. az immunológiai könyvekben.

⁷ Az aranszemcsé a primer ellenanyaghoz való kötődésével megváltoztathatja az immunglobulin konformációját, így annak antigénnel szembeni affinitását. További hátrány a módszer magas ára, ugyanis így annyiféle ellenanyagot kellene arannyal konjugálni, ahányféle antigént szeretnénk jelölni.

Az indirekt jelölés legegyszerűbb esete az, amikor az antigént felismerő primer ellenanyaghoz specifikusan kötődő, **második** (szekunder) **ellenanyag** hordozza az aranyszemcsét. (5 nm-es átmérő felett egy aranyszemcse több IgG molekulát is képes megkötni, megnövelve ezzel a komplex kialakulásának, így a jelölés sikerének a valószínűségét, 4.49.B ábra). Ez az úgynevezett **kétlépcsős rendszer**.

Az elsődleges ellenanyagot felismerő másodlagos ellenanyagra **biotin** is kapcsolható. A biotinhoz viszont nagy specificitással és intenzitással kötődik az **avidin** (sztreptavidin), így ebben az esetben egy harmadik szint is kiépíthető. A **háromlépcsős rendszerben** a mikroszkópban látható aranyjelölést az avidin hordozza (4.49.C ábra).

Mára már egész iparág szerveződött arra, hogy az indirekt jelölésben használt konjugátumokat (arannyal konjugált másodlagos ellenanyagok: protein A-gold, sztreptavidin-gold, biotinált másodlagos ellenanyagok stb.) előállítsák és forgalmazzák.

Az immunjelölés két módja

A szövet- és sejtminták immun-elektronmikroszkópos vizsgálatokra történő előkészítése során elsősorban azt kell mérlegelnünk, hogy a lokalizálni kívánt antigének hol, a sejt melyik kompartmentumában helyezkednek el.

Bizonyos esetektől eltekintve, általánosítható az a megközelítés, hogy a **sejtfelszínen** található molekulák azonosítására a sejtszuspenzióban lévő vagy letapadt sejteken végzett **beágyazás előtti** (angol nevén: pre-embedding), míg a szövetmintában vagy a sejten belül, intracellulárisan előforduló antigének kimutatására az ultravékony metszeteken végzett, **beágyazás utáni** (angolul post-embedding) eljárás a legalkalmasabb.

A kétféle metódus a minta-előkészítés több lépésében jelentősen eltér, de az immunjelölt minták tanulmányozása mindkét esetben ultravékony metszeteken transzmissziós elektronmikroszkóppal történik.

Minta-előkészítés és a beágyazás előtti immunjelölés

A módszer nagy előnye, hogy miután az antigének **immunlokalizációja megelőzi a teljes elektronmikroszkópos minta-előkészítési eljárást**, elvileg nem kell számolnunk a kémiai fixálásból, az ozmifikálásból, a dehidrációból, a műgyantával történő átitatásból (beágyazásból) és a magas hőmérsékleten zajló műgyanta-polimerizációból adódó antigénroncsoló és epitopmaszkírozó hatásokkal. További előny, hogy az immunjelölés után a mintákat erőteljesen fixálva (például 2,5%-os glutáraldehiddel) a morfológiát a legjobban megőrző beágyazási eljárásnak vethetjük alá.

Sejtfelszíni molekulák (pl. receptorok) lokalizációjáról lévén szó, előfordulhat azonban, hogy az elsődleges ellenanyag keresztkötéseket hoz létre az antigének között, ami azok összezsugorodását, sőt, endocitózissal történő felvételét (**internalizációját**) válthatja ki. Ez hamis irányba terelné a molekula natív eloszlásáról alkotott elképzelésünket (**műtermék**). Ezt elkerülendő nagyon enyhe előfixálást alkalmazunk (2% formaldehid, 0,1% glutáraldehid, fixálási idő 10 perc) és az immunreakciót 4 °C-on végezzük.

Intracelluláris antigének pre-embedding lokalizációjára csak akkor van lehetőség, ha a sejt membránját az eljárás során használt reagensek számára átjárhatóvá tesszük. Ez történhet kis koncentrációjú **detergens**ek (Triton X-100, Tween-20, szaponin) alkalmazásával, vagy **jéghideg metanollal való fixálás** révén. Egyik esetben azonban az antigének migrációja, a másik esetben pedig éppen a fixálás eredményezhet a valóságtól eltérő, megtévesztő lokalizációs mintázatot.

A pre-embedding eljárást sejten belüli antigén kimutatásakor is lehet használni, ha a fentiekhez hasonlóan biztosítjuk az ellenanyag megfelelő penetrációját. A módszert akkor használjuk, amikor azt tapasztaljuk, hogy a beágyazás tönkreteszi az antigént, azaz beágyazás után az nem jelölhető. Az eljárás menete röviden a következő: perfúziós fixálás után az adott szervből vibratommal metszeteket készítenek, majd ezen pre-embedding immunjelölést végznek. Az immunkomplexet olyan reakcióval tesszük láthatóvá, amelynek csapadékát elektronmikroszkópban is detektálhatjuk. A másodlagos ellenanyaghoz kötött torna-peroxidáz enzim hatására a diamino-benzidinből (DAB) ilyen csapadék keletkezik. A barnásfekete, oldhatatlan és elektronszóró reakciótermék fénymikroszkópban is látható, az eredmény kiértékelése után pedig a metszet adott részletét beágyazhatjuk, majd a csapadék lokalizációját ultravékony metszeteken is megvizsgálhatjuk.

A beágyazás utáni immunjelölés

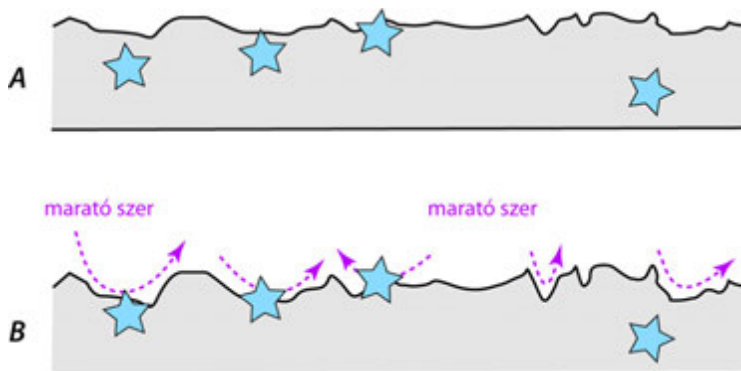
Az előző módszertől való alapvető eltérés tehát az, hogy az antigén lokalizációját célzó immuncitokémiai reakciót, azaz az antigén determinánsok helyének specifikus megjelölését olyan mintákból készült ultravékony metszeten kell elvégeznünk, amelyek már átestek az elektronmikroszkópos minta-előkészítés valamennyi fázisán. Ahogy azt korábban említettük, a jelölés sikere alapvetően a minta-előkészítés mikéntjén múlik. Éppen ebből adódik az az **elsődleges követelmény**, hogy már a biológiai minta elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára történő preparálásának megkezdésekor döntenünk kell arról, hogy a későbbiekben végzünk-e rajta immunjelölést, vagy nem.

Ennek megfelelően a fixálástól a víztelenítésen át a beágyazószer polimerizációjáig olyan eljárásokat kell kidolgoznunk és alkalmaznunk, amelyek révén – a sikeres immunjelölés érdekében – a lehető legjobb feltételeket biztosítjuk az antigenitás maximális megőrzéséhez úgy, hogy közben ne szenvedjen jelentős változást a mintánk finomszerkezete sem (l. a mikrotechnikai eljárások célja).

A legmegfelelőbb preparatív technika megválasztásához **előzetesen tájékozódunk kell** arról, hogy **milyen jellegű (szerkezetű) mintában** és várhatóan **milyen érzékenységű antigént** kívánunk kimutatni. Más előkészítő eljárást igényel ugyanis pl. egy proteázrezisztens és nagymértékben oldhatatlan fehérjeaggregátum komponenseinek kimutatása patológiás agyszövetből, mint egy szolubilis fehérje lokalizációja a citoplazmában.

A megfelelő módszer kiválasztásához elengedhetetlenek a saját megfigyeléseink és tapasztalataink, de munkánkat nagymértékben segíti az immunhisztokémiai és immuncitokémiai vegyszerek gyártására és forgalmazására szakosodott cégek rendkívül széles és kiváló minőségű kínálata. Korlátot csak az anyagi lehetőségeink jelenthetnek, de minden esetben érdemes mérlegelni, hogy hosszú hónapok kísérletes munkája veszhet kárba nem megfelelő tisztaságú és minőségű reagensek használata miatt.

A beágyazás utáni jelölések akkor lehetnek sikeresek, ha biztosítjuk, hogy az elsődleges ellenanyag „megtalálja” az antigénje epitopjait a metszeten. Egyszerű a helyzet akkor, ha az antigén megfelelő része éppen a metszet felszínén van. Ez azonban a legjobb esetben is csak részben teljesül; az epitopok többsége rejtve marad a felszín alatt. Hozzáférhetőségüket **antigénfeltárással** próbáljuk fokozni, azaz a metszet felszínét olyan oldattal kezeljük, ami a beágyazószer legalább részlegesen kioldja. Ez az eljárás az úgynevezett **maratás** (angolul: etching, 4.50. ábra). Leggyakrabban hidrogén-peroxidot vagy nátrium-etoxidot (nátrium-hidroxiddal telített etanol) használunk erre a célra.



4.50. ábra. Az antigének a metszet teljes vastagságában előfordulnak, nem csak a felszínén. Hozzáférhetőségüket maratással biztosítjuk: a metszet felszínén a metszéskor kialakuló egyenetlenségeket (A) a beágyazószer kioldásával mélyítjük, hogy a felszín alatti antigének is hozzáférhetővé váljanak (B) (az antigéneket kék csillagok jelzik)

Az eljárás fő lépései

A beágyazás utáni, kétlépcsős elektronmikroszkópos immunjelölés lényegét az alábbiakban foglaljuk össze (az eljárás lépésenkénti technikai leírását a függelék tartalmazza):

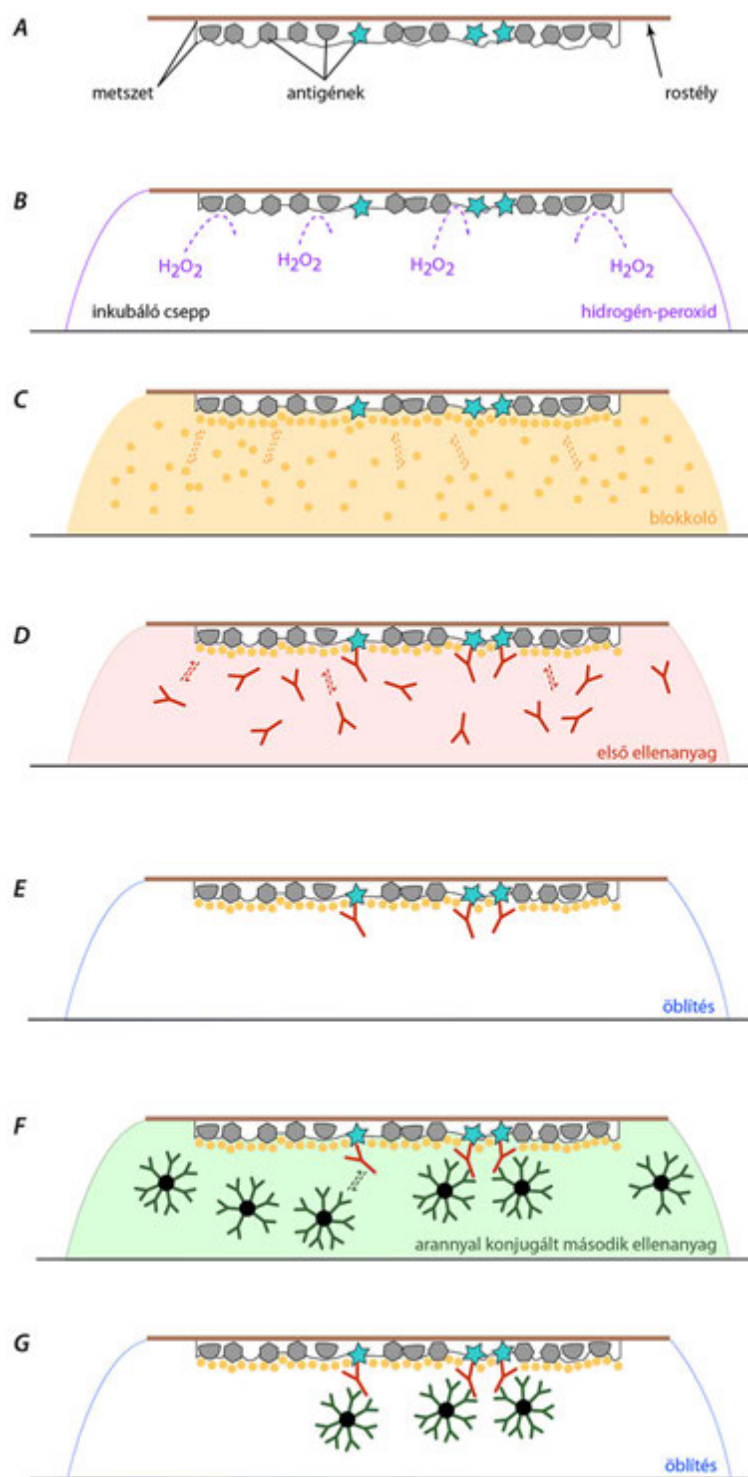
1. A megfelelő módon előkészített blokkból 80–100 nm vastagságú ultravékony metszeteket készítünk, s ezeket **nikkelrostélyra** visszük fel (4.51.A ábra).
2. A griden lévő metszeteket **maratásnak** vetjük alá annak érdekében, hogy a felszíni epitopokat feltárjuk (4.51.B ábra).

3. A felszínt blokkoljuk („befedjük” a blokkoló részecskéivel, 4.51.C ábra), majd
4. a metszeteket az **elsődleges (primer) ellenanyaggal** inkubáljuk. Az immunglobulinok a blokkolómolekulákat leszorítják onnan, ahová nagyobb affinitással kötődnek, mint azok (4.51.D ábra).

Itt érhető tetten a blokkolás jelentősége: a blokkolásra használt részecskék csökkentik az ellenanyag nem specifikus (ún. aspecifikus) kötődésének mértékét, mert kompetíciót (versenyhelyzetet) teremtenek a kötőhelyekért.

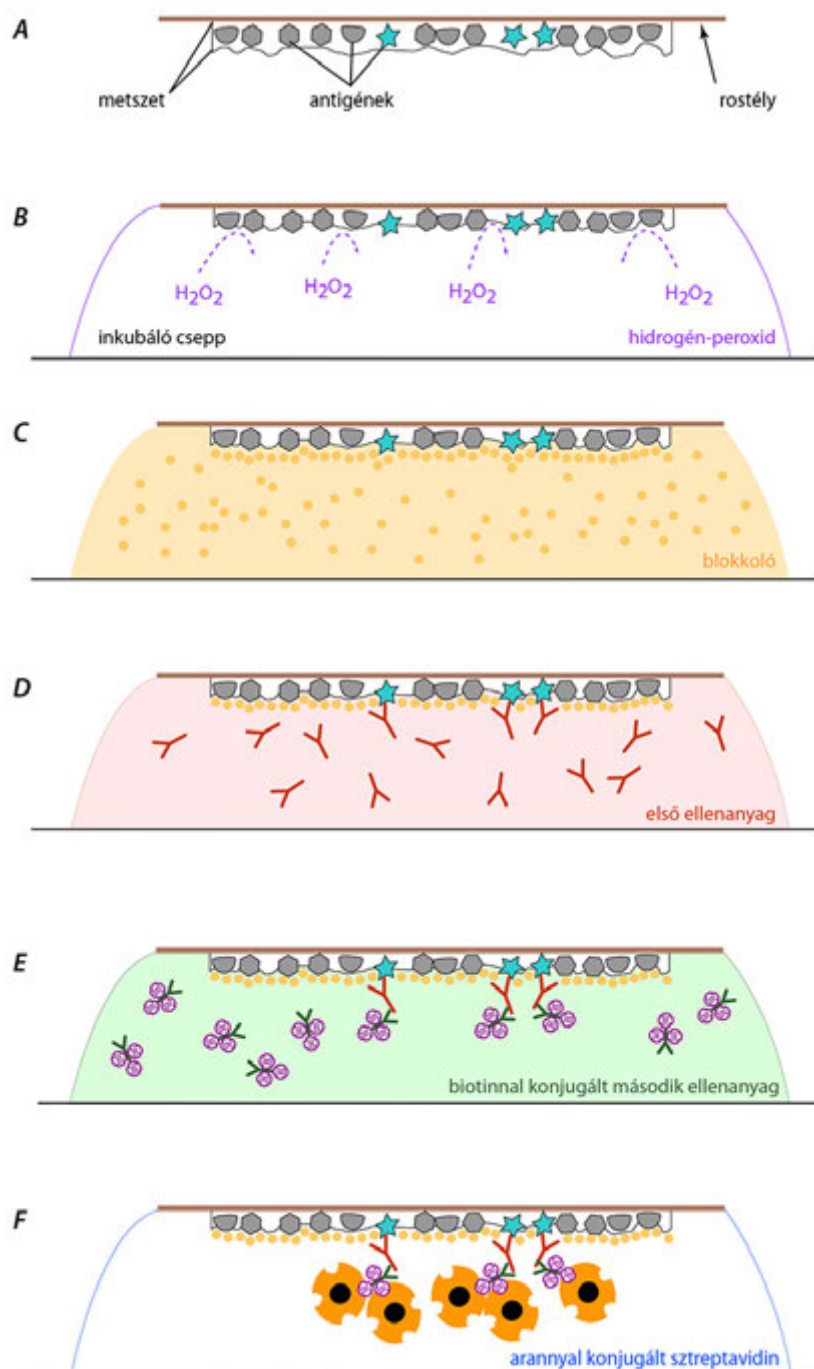
5. Megfelelő idő múlva a primer ellenanyagot tartalmazó oldatot lecseréljük, a metszetekhez specifikusan nem kötődött ellenanyag-molekulákat pedig többször váltott mosófolyadékkal eltávolítjuk (öblítés, 4.51.E ábra).
6. A továbbiakban a metszeteket **aranykolloiddal konjugált másodlagos ellenanyaggal** inkubáljuk, ami specifikus immunkomplexet képez az elsődleges immunglobulinnal (4.51.F ábra).
7. Végül a metszeteket ismét mossuk, majd a rostélyt megszáritjuk (4.51.G ábra).

Megjegyezzük, hogy a specifikus kötődés érdekében a 4. pontban említett **versenyhelyzetet az eljárás során mindvégig fenntartjuk** úgy, hogy az elsődleges és a másodlagos ellenanyagot is a blokkolásra (is) használt oldatban hígítjuk.



4.51. ábra. A beágyazás utáni kétlépcsős immuncitokémiai jelölés legfontosabb lépései (a rostélyok a cseppek tetején a metszethordó felszínükkel lefelé nyugszanak!) (a részletes leírást l. a szövegben)

A **három lépcsős eljárás** lényege ugyanez, azzal a különbséggel, hogy ott a második ellenanyag és a láthatóságot biztosító arany szemcse között egy **biotin-avidin kötés** hozunk létre. A biotint a második ellenanyag hordozza, az arannyal jelölt avidint (vagy a hozzá nagyon hasonló térszerkezetű sztreptavidint) harmadik „emeletként” adjuk a rendszerhez (4.52. ábra). Az avidin/sztreptavidin helyett ma már arannyal-konjugált **anti-biotin ellenanyagot** is használhatunk.

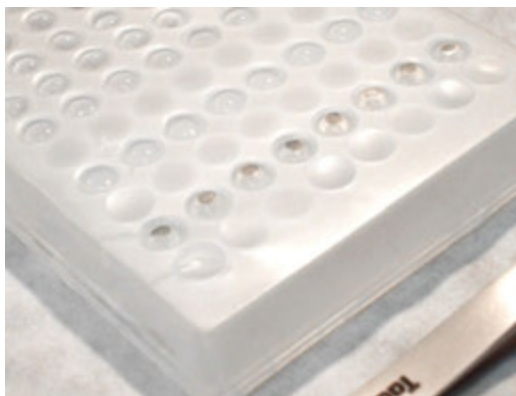


4.52. ábra. A beágyazás utáni háromlépcsős immunjelölés legfontosabb lépései (a mosási lépéseket nem ábrázoltuk!) (a részleteket l. a szövegben)

Ahogy a fenti ábrákon látható, a metszeteket az inkubálóoldatokkal és mosófolyadékokkal úgy kezeljük, hogy a metszeteket hordozó rostélyt mikroszipesszel egy-egy csepp felszínére helyezzük: **a metszetet hordozó felszínükkel lefelé**. Arra, hogy a különböző összetételű cseppeket egymás mellé helyezzük, egy parafilm⁸ bevont Elisa-lemez (plate) a legalkalmasabb. A lemez lyukainak megfelelően a parafilmbe kis mélyedéseket készítünk, amelyekbe 50-50 μ l-nyi oldatot cseppentünk (4.53. ábra).

A munkafolyamat egésze során ügyelni kell arra, hogy a szomszédos cseppek ne érintkezzenek, mivel ez hamis eredményre vezethet!

⁸ A parafilm egy nyújtható, rugalmas, áttetsző fólia.



4.53. ábra. Mikrorostélyok az Elisa-lemezen elhelyezett cseppek felszínén

Az alábbiakban a post-embedding immunjelölési célra történő minta-előkészítés általános szabályait írjuk le.

Rögzítés és beágyazás

Alapvető szempont az antigén determinánsok hozzáférhetőségének és természetes (natív) térbeli szerkezetének a megőrzése. Ezért **kémiai fixálás** alkalmazása esetén törekednünk kell arra, hogy a **lehető legenyhébb** (lehetőleg reverzibilis) kovalens módosítással érjük el a kívánt hatást. A korábban leírt fixálószeretek közül ennek a követelménynek a **formaldehid** felel meg leginkább. Szép ultrastrukturális megtartás mellett a legtöbb fehérje-antigén immunlokalizációja esetében megfelelő jelölési intenzitást lehet elérni a Karnovsky-fixáló **csökkentett koncentrációjú glutáraldehidet** tartalmazó változataival, amelybe igen gyakran pikrinsavat is tesznek. (A saját gyakorlatunkban nagyon jól bevált rögzítőkeverék összetételét l. a Függelékben).

Az **ozmium-tetroxid** epitop-maszkírozó hatása rendkívül erős. Koncentrációját csökkenthetjük 0,2 %-ig, ekkor azonban már számolnunk kell a membránok gyengébb „megtartásával” és kontrasztjával. Érzékeny antigének esetén teljes elhagyása javasolt.

A **rögzítés**, a **víztelenítés** és a beágyazásra felhasznált **műgyanta** tulajdonságai nagyon **meghatározó és szorosan összefüggő tényezőként** befolyásolják mind az immunreakció sikerét, mind pedig a biológiai minta finomszerkezetének megőrzését. Egy-egy paraméter megváltoztatása az előkészítő eljárás több pontján is változtatást igényel(het). Az antigenicitás megóvása szempontjából előnyös eljárások – például az enyhe kémiai fixálás és az ozmifikálás elhagyása – sokkal érzékenyebbé teszik a szövetet a dehidrálás és beágyazás során fellépő extrakciós (kioldódási) és denaturációs (kicsapódási) hatásokra.

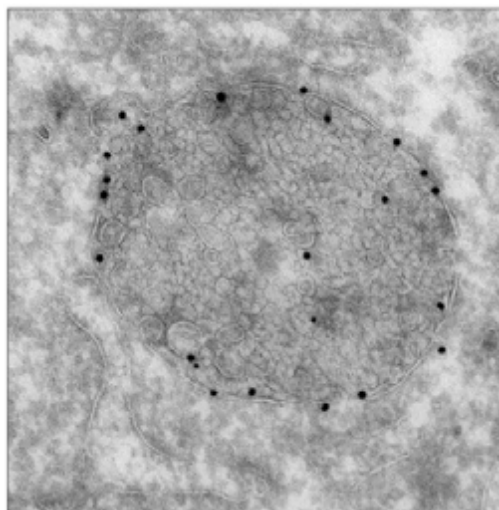
Ezen problémák elkerülésének egyik lehetséges (és igen hatékony) módja, ha – a fixálástól a víztelenítésen át a műgyantába történő beágyazásig – az egész minta-előkészítési protokoll **alacsony hőmérsékleten** zajlik. A transzmissziós elektronmikroszkópiában általánosan elterjedt epoxigyanták azonban nagyon korlátozottan alkalmazhatók ilyen körülmények között. Olyan műgyanták kifejlesztésére volt szükség tehát, amelyek alacsony hőmérsékleten (akár -20 °C) is jól átítatják a beágyazandó mintát, és polimerizációjukhoz (megszilárdulásukhoz) nincs szükség magas hőmérsékletre, az kiváltható UV megvilágítással is. A korszerű **akriltípusú műgyanták** megfelelnek ezeknek a követelményeknek. Közülük leginkább elterjedté az LR White használata vált.

Az ultravékony metszetek felszínén zajló post-embedding immuncitokémiai jelölés eredményessége szempontjából különösen előnyös ezen műgyanták (enyhe) **hidrofil tulajdonsága**. Amellett ugyanis, hogy a beágyazás során elkerülhető a minták 100%-os víztelenítése, és ezzel csökkenthető az antigének károsodása, illetve az extrakció, a metszetek részleges rehidráálásával jelentősen fokozni lehet az antigén–antitest reakció intenzitását is.

Mindezek után érthető, hogy mind az ultrastruktúra, mind pedig az antigenicitás megőrzését szem előtt tartó, nagyon kíméletes minta-előkészítési eljárás az **alacsony hőmérsékleten végzett fixálás és beágyazás** (angolul: cryo-fixation, freeze substitution), amelynek lényege a következő.

Az alacsony hőmérsékleten végzett fixálási eljárások közé tartozik a **magas nyomású fagyasztás** (high-pressure freezing), amelyről korábbiakban már említést tettünk (l. Minta-előkészítés rutin TEM vizsgálatokra, Anyagpreparálás, rögzítés c. fejezet). Ez speciális és igen drága berendezést igényel. **Ennek hiányában** a rögzítéshez

a fent említett rögzítőkeveréket használhatjuk (pontos összetételét l. Függelék). A mintát alacsony hőmérsékletre helyezése előtt cukoroldattal átitatjuk (krioprotekció⁹), majd folyékony nitrogénben lefagyaszttjuk (-190 °C). Hidrofil beágyazószer (LR White) esetében a szövetet csak részlegesen kell dehidrálni, ezért azt tömény alkoholba helyezzük, s -70 °C-ra tesszük. Ezt követi a szervdarabka folyékony beágyazószerrel való átitatása és beágyazása, mégpedig alacsony hőmérsékleten (-20 °C). Ilyen körülmények között a beágyazószer polimerizációját UV megvilágítással biztosíthatjuk. Ezen eljárás során nincsen szükség ozmiumos utófixálásra és blokk-kontrasztózásra, nehézfém sókkal csak a blokkból készített ultravékony metszeteket kezeljük. Egy ilyen eljárással készített mintát láthatunk a 4.54. ábrán.



4.54. ábra. Immunarany jelölés multivezikuláris test membránján (alacsony hőmérsékletű fixálás és beágyazás, LR White beágyazás, mannóz-6 foszfát kimutatás)

Metszés

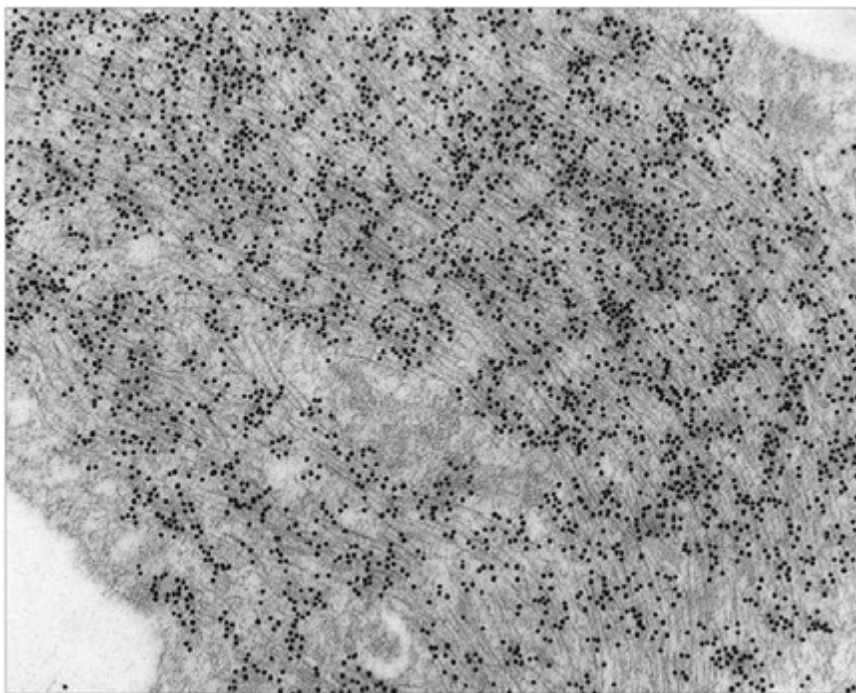
A beágyazás utáni immunjelölés egész folyamata a metszetet hordozó rostélyra (grid) felvett ultravékony metszetek felszínén zajlik, ezért **a metszetek minősége kritikus szempont**. A kívánt minőségű metszet elkészítésének nélkülözhetetlen eszköze a hibátlan és tiszta kés, ami készülhet üvegből is, de a megfelelően gondozott **gyémántkés** nagyságrendekkel tartósabb, és nagyobb felület egyenletes vastagságú metszésére alkalmas. A viszonylag hosszadalmas és több inkubációs lépésből álló post-embedding jelöléshez (l. 4.51. és 4.52. ábra) a hagyományos elektronmikroszkópos vizsgálatra készült, 50–60 nm-nél vastagabb, **80–100 nm-es metszetekre** van szükség (4.28. ábra).

Az igazán **jó metszet felszíne** úgy néz ki, mint egy finoman faragott dombormű, aminek a legmagasabb és legalacsonyabb pontja között 10–15 nm szintkülönbség van (4.50. ábra). Miután sem a primer, sem az arannyal konjugált másodlagos ellenanyagok nem tudnak a polimerizált műgyantával átitatott metszet belsejébe hatolni (penetrálni), ezért **az antigén–antitest reakció csak erre a rétegre koncentrálódik**. Ebből adódik, hogy az antigéneknek csak azokat a determinánsait tudjuk megjelölni, amelyek ebbe a domborművi felszínbe belekerültek. A többiek rejtve maradnak az antitestek számára. (A korábban leírtak mellett ez az alapvető magyarázata annak, hogy post-embedding jelölés során a monospecifikus – az antigénnek csak egyetlenféle epitopját felismerő – monoklonális antiszérumok alkalmazása általában miért jár szerény eredménnyel.)

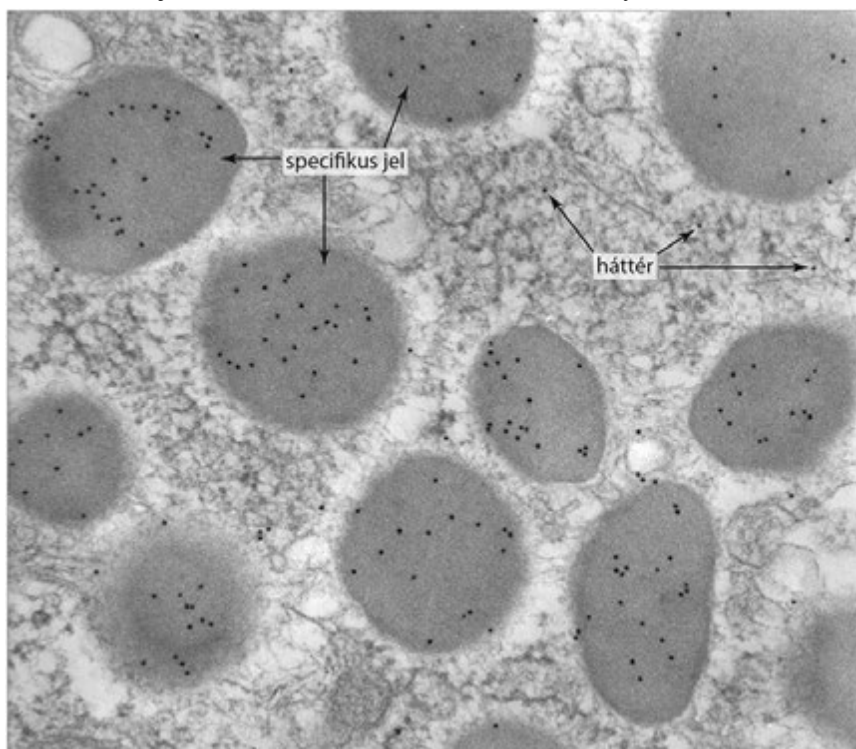
Különböző maratási technikákkal (etching) a domdorművi felszín mélyíthető (4.50. ábra), sőt a műgyanta teljesen ki is oldható a metszetből, de ezek az eljárások többnyire a minta jelentős morfológiai károsodásával, és esetenként az antigének migrációjával is járnak.

A jól kivitelezett eljárás végén a mikroszkópban látható képen a jelölés egyértelmű, a háttér (aspecifikus jel) szintje alacsony, az aranszemcsék jelenléte a jelölt struktúrához köthető, miközben a sejt ultrastruktúrája jó megtartású és a kontraszt is megfelelő ahhoz, hogy a sejtalkotókat azonosíthassuk (4.55., 4.56. ábra).

⁹ A cukor akadályozza a jégkristályok kialakulását.



4.55. ábra. Gliális filamentumokat képző savas fehérje (GFAP) kimutatása glia (asztrocita) sejtben. Az arany szemcsék egyértelműen a kötegeket képező, vékony vonalakként megjelenő intermedier filamentumokat jelölik, a szabad citoszolikus területről hiányoznak.

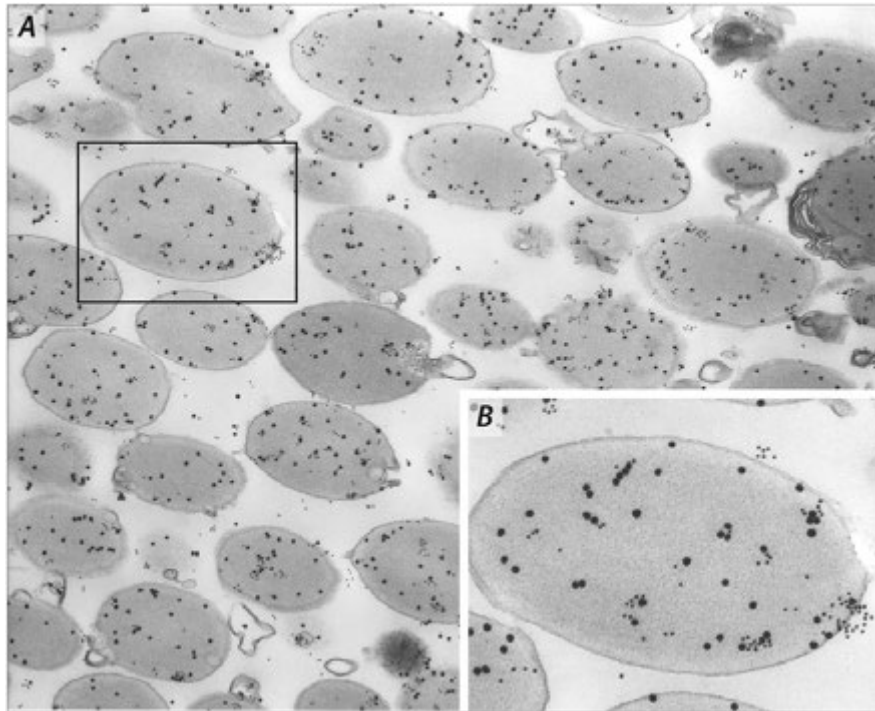


4.56. ábra. Zimogén granulumok egyik specifikus fehérjéjének (tripszinogén) kimutatása immunjelöléssel (hasnyálmirigysejt). Az arany szemcsék zöme a sötétszürke árnyalatú granulumokban csoportosul, de néhány szemcse a citoplazmában is felbukkan (háttér)

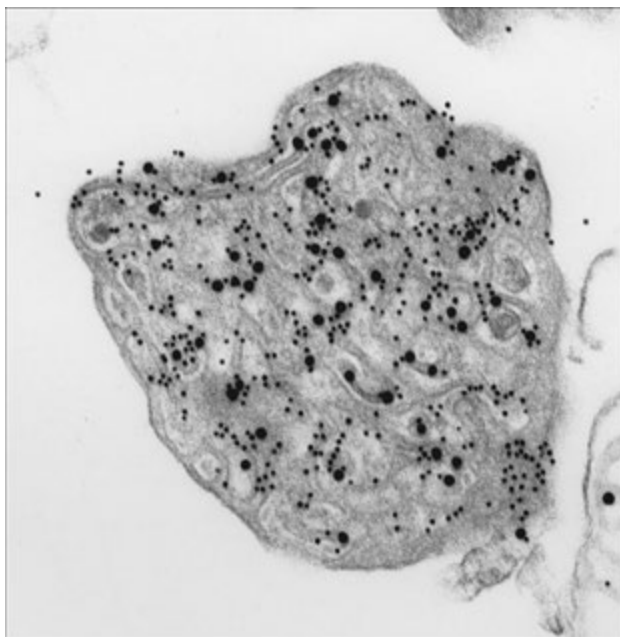
Kettős immunjelölés elektronmikroszkópos szinten

Ahogy korábban említettük, a fénymikroszkópos immunhisztokémiai fejezetben leírt kettős jelölés alkalmazását ultrastrukturális szinten a kolloidális aranyak mint elektronoptikai jelzőanyagok a bevezetése és elterjedése tette lehetővé. A **különböző méretű kolloidális arany szemcsékkel konjugált ellenanyagok** rendkívül változatos palettájának köszönhetően ma már a siker reményével vágatunk bele két különböző fehérje (antigén) párhuzamos immuncitokémiai lokalizációjába, egymáshoz viszonyított szubcelluláris eloszlási mintázatuk felderítésébe.

Mivel a kettős jelölést ma már szinte kizárólag indirekt módszerrel végezzük, ezért az immunreakció megkezdése előtt el kell döntenünk, hogy **milyen méretű arany szemcse** jelzi majd az egyik és milyen a másik antigént. Nagyon fontos, hogy ezek az elektronmikroszkópban egyértelműen megkülönböztethetők legyenek egymástól. Tapasztalataink szerint a legjobb párosítás a 10 és 20 nm-es arany szemcsék alkalmazása (4.57. és 4.58. ábra).



4.57. ábra. Kettős jelölés immun-arany módszerrel hasnyálmirigysejtek zimogén frakcióján: az egyik antigént (a tripszinogént) 20 nm-es, a másikat (az ubikvitint) 10 nm-es arany jelöli. A kolloidszemcsék közötti méretkülönbség jól látszik a B ábrán, ami az A ábra kinagyított, bekeretezett részlete



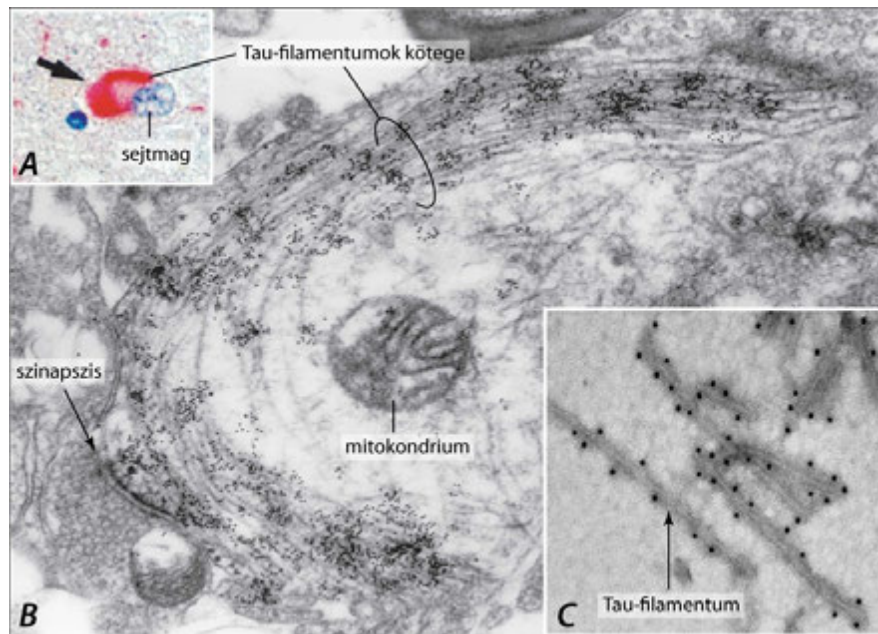
4.58. ábra. Kettős jelölés immun-arany módszerrel egéragyból készített frakción: a 10 nm-es arany a prion fehérje, a 20 nm-es arany szemcsék pedig a mannóz-6-foszfát receptorok jelenlétét jelzik (a kísérlet eredménye szerint a prion fehérje bekerül a késői endoszómákba)

A megkülönböztethetőség alapvető feltétele továbbá az is, hogy a két különböző antigén specifikus felismerésére **két különböző állatfajból nyert primer ellenanyagot** használjunk (például egér és nyúl), és a **két különböző méretű arany szemcsével konjugált másodlagos ellenanyag** közül az egyik kizárólag az egyik fajra, a másik pedig a másikra legyen specifikus (tehát pl. az anti-egér 10 nm arannyal, az anti-nyúl 20 nm-es arannyal kapcsolt másodlagos antitest legyen).

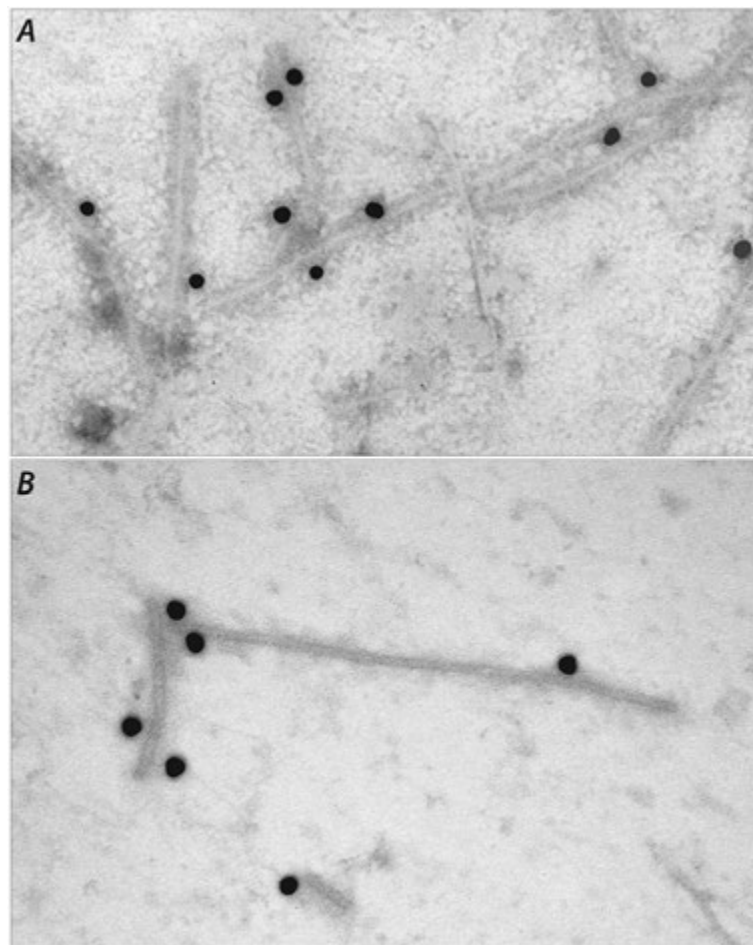
Fehérjepreparátum immunarany jelölése

Az elektronmikroszkóp felbontása lehetővé teszi azt, hogy ne csak szövetekből és sejtekből készült mintákon végezhessünk immunjelölést, hanem **makromolekuláris szinten**, fehérje-preparátumokon is. Természetesen ennek csak akkor van értelme, ha a vizsgálandó molekula (fehérje) negatív festés (negatív kontrasztosítás) után elektronmikroszkópban felismerhető. Diagnosztikai szempontból is érdekes lehet például a konformációs neurodegeneratív betegségekre jellemző, fibrillumképződésre és aggregációra hajlamos fehérjék immuncitokémiai beazonosítása agyszövet homogenátumból készült fehérje-preparátumokban (4.59. ábra). A jelölést hártályos rostélyra cseppentett és beszárított preparátumon végezzük.

A reakció a beágyazás utáni immunjelöléshez hasonlóan (csak annál sokkal rövidebb ideig), 50 µl-es cseppek felszínén zajlik, amelyek tartalmazzák a primer, illetve az arannyal konjugált másodlagos ellenanyagot. Az immunjelölés után uranil-acetáttal végezzük a negatív kontrasztosítást (4.60. ábra).



4.59. ábra. Tau-fehérje kimutatása fény- (A) és elektronmikroszkópos szinten (B, C). Az immunhisztokémiai módszerrel jelölődő, jellegzetes alakú folt (fekete nyíl, A) elektronmikroszkópos képén látható, hogy az – immunarany módszerrel is jelölődő – olyan filamentumok kötege (B), amelyek csavart, helikális szerkezetet mutatnak (C, izolált filamentumok, negatív kontrasztosítás)

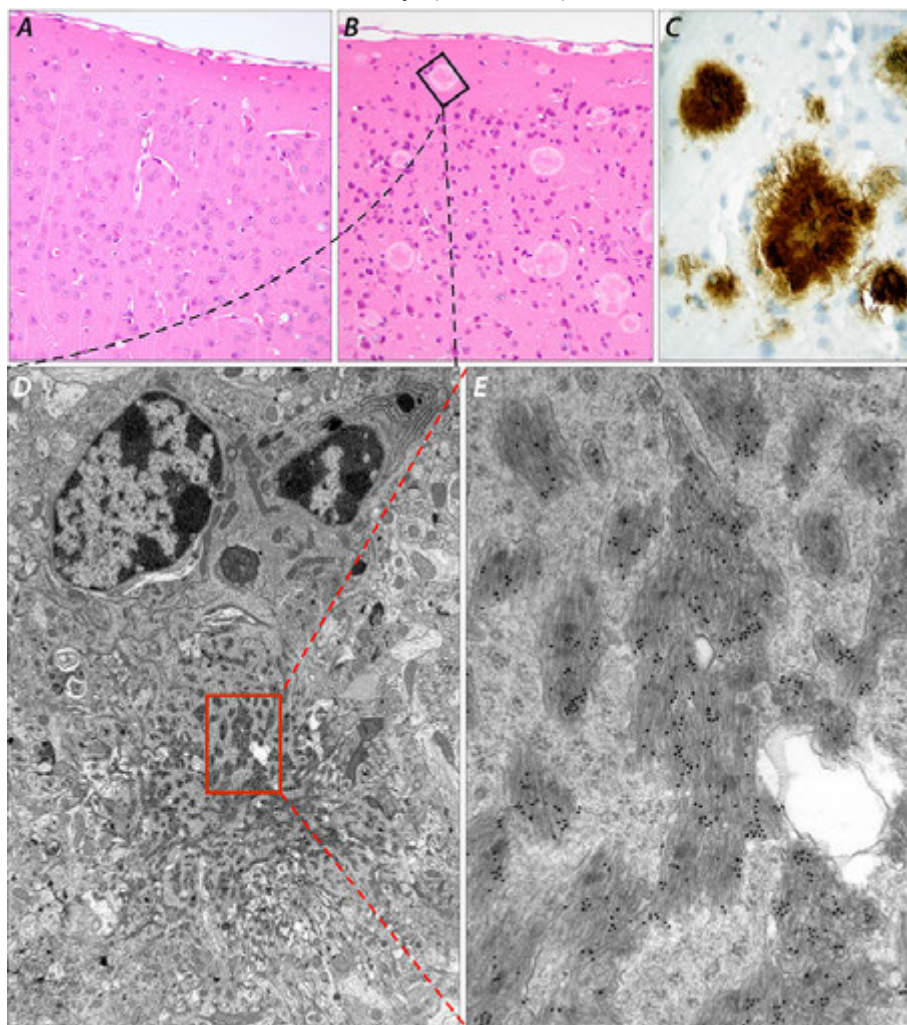


4.60. ábra. Idegszövetből izolált Tau filamentumok azonosítása anti-Tau monoklonális ellenanyaggal (A) és a filamentumok ubikvitinnel való jelöltségének kimutatása anti-ubikvitin szérummal (B) (Alzheimer-kór, negatív kontrasztosítás)

Immunjelölés átágyazott metszeten

Megfelelő, **ultrastrukturális szinten is jó megtartást** biztosító rögzítés után lehetőségünk van arra is, hogy egy **fénymikroszkópos beágyazáson** átesett metszeten a számunkra érdekes területet elektronmikroszkóppal is megvizsgáljuk. Ehhez – a két minta-előkészítő eljárás közötti alapvető különbségek ismeretében – az kell, hogy a metszetet átágyazzuk, azaz a fénymikroszkópos beágyazószert lecseréljük műgyantára. Amennyiben az egész eljárás kíméletes volt, elektronmikroszkópos immunjelöléssel is próbálkozhatunk.

Az itt nem részletezett munka során áttekinthetjük a kiválasztott szervrészlet morfológiáját pl. hematoxilin-eozin festéssel (4.61.A–B ábra), egy párhuzamos metszeten adott fehérje kimutatására immunhisztokémiai jelölést végezhetünk (4.61.C ábra), majd a legérdekesebb területeket kijelölve (4.61.B ábra) azokat átágyazhatjuk és ultrastrukturális szinten is megvizsgálhatjuk (4.61.D ábra). Kíméletes mintakezelés és kevésbé érzékeny antigén mellett az immuncitokémiai jelölést is elvégezhetjük (4.61.E ábra), amely szépen kiegészíti és ultrastrukturális szinten megerősíti az immunhisztokémiai eredményt (4.61.C ábra).



4.61. ábra. Komplex vizsgálat fény- és elektronmikroszkópos metszeten: prionprotein-felhalmozódás kimutatása a neokortexben. Kontroll (A) és transzgén modell (B) állat agykérgének fénymikroszkópos, hematoxilin-eozinnal festett metszetei; a fénymikroszkópos immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye szerint immunpozitív fehérjeaggregátumok (prionplakkok, C); a hematoxilin-eozinnal festett metszeten kiválasztott aggregátum elektronmikroszkópos képe két gliasejttel (D) és a plakkot alkotó fibrillumok prion fehérje tartalmának igazolása ultrastrukturális szinten immunarany jelöléssel (E)

Az immuncitokémiai jelölés kontrolljai

Mivel a jelölések többlépcsős, összetett munkafolyamatok, az eljárás során viszonylag könnyen előfordulhatnak hibák (l. következő fejezet). Ezenkívül az ellenanyagok specificitása és a jelölés megbízhatósága is felvethetnek kétségeket. Az eredmények megbízható kiértékeléséhez és közléséhez tehát megfelelő kontrollkísérleteket kell terveznünk.

A legegyszerűbb kontroll az, ha az egyik párhuzamos mintához nem adunk elsődleges antiszérumot vagy ellenanyagot. Ezt **belső kontroll**nak tekinthetjük, s azt vizsgáljuk vele, hogy a másodlagos ellenanyag direkt módon, nem specifikusan kötődik-e a metszet vagy preparátum valamelyik komponenséhez. Ha igen, akkor ez az elsődleges ellenanyaggal történt jelölés mintázatában téves többletpozitivitásként jelentkezik. Ez a jelölés **háttere**.

A háromlépcsős jelölés esetében kihagyható a biotinnal konjugált másodlagos ellenanyag (második lépcső) is. Ebben az esetben az avidin/sztreptavidin nem kötődhet a metszethez, így aranyjelölést sem láthatunk. Ezzel teszteljük továbbá azt is, hogy endogén biotin van-e a vizsgált mintában.

További (szigorúbb) kontrollt jelent az, ha a negatív kontrollnak kiválasztott mintát ún. **nem immun szérummal** kezeljük. Ez a szérum a párhuzamos metszeten alkalmazott elsődleges antiszérumtól csak abban különbözik, hogy hiányoznak belőle az immunizálás során megjelenő és felszaporodó immunglobulinok, azaz az antigént specifikusan felismerő antitestek. Ilyen kontrollt csak akkor tervezhetünk, ha rendelkezünk a megfelelő állatból származó immunizálás előtti (non-immune) szérummal, illetve csak akkor végezzük, ha magát a jelölést poliklonális antiszérummal (és nem monoklonális antitesttel) végezzük. Ez az eljárás azt mutathatja meg, hogy az elsődleges antiszérumban van-e olyan immunglobulin, amely a metszeten nem a kívánt antigénhez kapcsolódik specifikusan.

Végül megjegyezzük, hogy az átgondolt kontrollok mellett is kaphatunk egy adott szintű háttér jelölést (l. 4.56. és 4.57. ábra). Azt, hogy ez milyen szintig fogadható el, a tapasztalat segít eldönteni. Ha kétségeink vannak, akkor az eredményt morfológiai módszerekkel (l. 6. fejezet) kell kiértékelni, azaz meg kell bizonyosodni arról, hogy a specifikus jelnek tekintett aranszemcsék eloszlási mintázata és száma szignifikánsan eltér a háttérrel adó, aspecifikusnak tekintett jeltől.

Gyakori hibák és azok kiküszöbölése

Ebben a fejezetben röviden összefoglaljuk az immunarany jelölés során előforduló leggyakoribb hibákat és lehetséges okaikat, valamint megoldásukat.

*Az első kategóriába azok a hibák tartoznak, amelyek a **kísérletet végző személyéhez köthetők**.*

1. A **minták** (gridek) kezelése során előfordul, hogy azok **felcserélődnek**. Ezt viszonylag könnyű észrevenni akkor, amikor az egyik, negatív kontroll mintán (elsődleges ellenanyag nélkül) **nem várt eredményt**, azaz jelölést kapunk, a vele párhuzamos egyik mintán pedig nem kapunk jelölést. Ilyenkor valószínűleg két gridet, vagy a megfelelő két oldatot felcseréltük.
2. Nem várt negatív eredményt adhat az is, ha a megfelelő másodlagos ellenanyag helyett **egy másik fajból származót** használtunk. Amikor az elsődleges ellenanyag nyúlban termeltetett antiszérum, akkor a másodlagos ellenanyag anti-nyúl IgG kell legyen. Ha véletlenül anti-egér ellenanyagot használtunk, akkor nem várhatunk jelölést.
3. Hibaforrás lehet az is, ha **nem a megfelelő mintát** vittük végig az eljáráson, pl. az eleve nem is tartalmazhatja a kimutatni kívánt fehérjét.
4. *Végül, de nem utolsósorban figyelniünk kell arra, hogy a metszeteket a **megfelelő nagyításon** vizsgáljuk. Az 5 nm-es aranszemcsék nyilvánvalóan csak nagyobb nagyításon vehetők észre, mint a 20 nm-es kristályok. A felismerhetőséget az is befolyásolhatja, hogy az aranszemcse milyen árnyalatú részleten van (egy sötét háttér megnehezítheti az azonosítást).*

*A második kategória azon problémákat foglalja össze, amikor **nincsen jel**, azaz a metszeten nincsenek aranszemcsék.*

1. Egyik lehetőségként a jelenség hátterében az **antigén hiánya** állhat. Erről könnyen meggyőződhetünk, ha az elektronmikroszkópos szintű jelölés előtt fénymikroszkópos szintű immunhisztokémiai jelölést is tudunk végezni. A fénymikroszkópos minta előkészítése során ugyanis (többnyire) más fixálást és beágyazást használunk, s ha

ezek mellett az antigén kimutatható (azaz az antigenicitása megmarad), akkor ez az antigén az elektronmikroszkópos metszetekben, azok felszínén is ott kell legyen. A negatív eredmény forrása a helytelen minta-előkészítés lehet, amely során az antigenicitás jelentősen gyengül vagy elvész, az **antigén** maszkírozódik. Ahogy említettük, ebből a szempontból a két legkritikusabb lépés a minta rögzítése és beágyazása.

2. **Antigénmaszkírozó** hatás felléphet a **metszés** során is. Amikor a metszetek készítéséhez régi, erősen igénybe vett gyémántkést használunk, annak éle metszés közben elken(het)i a beágyazószert, amely így letakarja a biológiai minta felszínét. Ezen a felszín feltárásával, maratásával segíthetünk. Ezt a kezelést azonban csak óvatosan alkalmazzuk, mert – ahogy azt korábban már említettük – az az epitopok tönkretételével, illetve az antigén metszeten belüli elmozdulásával járhat! (Az irodalomban olyan közlésekkel is találkozunk, amelyek szerint olykor a metszéssíkon kell állítani ahhoz, hogy az epitopok megfelelő mértékben hozzáférhetővé váljanak.)

A harmadik kategória az **antiszérumokkal és azok használatával kapcsolatos problémákat** foglalja magába.

1. Negatív eredmény esetén felvetődik a gyanú, hogy a grideknek nem a megfelelő oldala érintkezett az inkubálóoldatokkal, azaz **a rostélyokat fordítva helyeztük a cseppekre** (l. pl. 4.52. ábra). Ez a hiba elkerülhető, ha a grideket alaposan szemügyre vesszük, amikor a gridtartó dobozból kivesszük őket. Előfordulhat ugyanis, hogy a metszés után fordítva, nem a szokásos orientációban kerülnek a megfelelő lyukba. Ilyenkor a megfelelő mintát vesszük ugyan elő, de a megszokott mozdulattal nem a metszethordó felszínét fordítjuk az első cseppre. Fontos az is, hogy a helyes orientáció meghatározása után a rostélyt ne fordítsuk meg az egyes oldatcserék alkalmával.
2. Helyes rostélyorientáció mellett is előfordulhat, hogy az inkubálóoldatok cseppjeiben **buborék** marad, s mivel ez a csepp legmagasabb pontjára úszik fel, megakadályozza a metszet és az inkubálóoldat érintkezését.
3. Figyeljünk arra, hogy az elsődleges ellenanyagot tartalmazó cseppről a rostélyt **ne helyezzük közvetlenül** a másodlagos ellenanyagot tartalmazó cseppre, mert ilyenkor az előbbi oldatából átvitt (feleslegben lévő) antitestmolekulák megkötik, elvonják („kitirálják”) a másodlagos immunglobulin molekulákat a metszet felszínén specifikusan kötődő elsődleges antitestmolekuláktól (utóbbiak jóval kevesebben vannak).
4. Jelölés hiánya esetén győződjünk meg arról, hogy az alkalmazott elsődleges antiszérum és a másodlagos ellenanyag egyáltalán **reagálnak-e egymással**¹⁰. Ha igen, akkor lehetséges, hogy az **ellenanyagok hígítása** nem volt megfelelő. Ilyenkor előzetes kísérletekben meg kell határozni azokat a koncentrációértékeket, amelyeknél a jelölés a legkisebb háttérrel a legintenzívebb.
5. Végül előfordulhat, hogy **az arannyal konjugált ellenanyag túl régi**: ilyenkor az aranykolloid kristályok leválhatnak az immunglobulinokról. A metszeteken tehát végbemegy az immunreakció, a másodlagos ellenanyag felismeri az elsődleges antitesteket, ám jelet mégsem látunk, hiszen a levált arany szemcséket a következő öblítés során lemostuk. Tanács: a meghígított, arannyal konjugált ellenanyagot használat előtt mikrocentrifugán le kell centrifugálni. Amennyiben az Eppendorf-cső alján nagyobb mennyiségű, az aranykolloid méretének megfelelő színű csapadék látszik, akkor ne használjuk az ellenanyagot, vegyünk újat!

Az utolsó kategóriába a **pufferrendszer által okozott hibák** tartoznak.

1. Az immunreakciók megfordítható, egyensúlyra vezető reakciók. Hiába jön azonban létre immunkomplex, ha az valamelyik következő lépésben túl **alacsony pH-jú környezetbe** kerül, s a másodlagos ellenanyag ledisszociál a primer antitestről. Jelölés hiányában ellenőrizzük az oldatok és a desztillált víz pH-ját!
2. A rossz pufferrendszer okozhat **magas háttérjelölést** is. Ezt kompenzálhatjuk megfelelő blokkolással, illetve azzal, hogy az ellenanyagok mellé az inkubálóoldatba olyan komponenst is teszünk, amely az aspecifikus kötődést gátolja. Ilyenek a detergenssek (pl. Triton-X 100, Tween20).

Az elkövethető hibák sokfélesége arra figyelmeztet, hogy a rendszeres, pontos, kísérletről kísérletre azonos gondolatmenetet követő jegyzőkönyvi bejegyzések vezetése a munka teljes menete során nagyon fontos! Ez az esetleges hibák megtalálását is nagyban megkönnyíti.

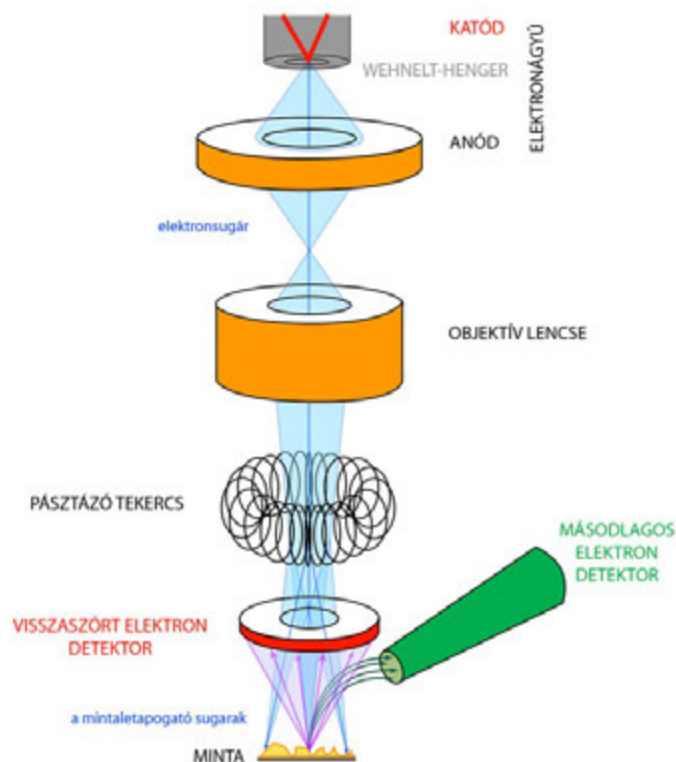
A pásztázó elektronmikroszkóp (SEM)

A TEM mellett kevésbé elterjedt, felületek letapogatására, vékony preparátumok átvilágítására, anyagösszetétel analizésére egyaránt alkalmas. A sugárnyalábot ún. pásztázótekerccsel kényszerítik elhajlásra, s ezzel a nyalábbal a vizsgálati területet soronként, pontról pontra tapogatják le.

¹⁰ Ennek vizsgálatára alkalmas az immundiffúzió módszere, amely azt használja ki, hogy az immunkomplex kialakulása megfelelő körülmények között csapadékképződéssel jár (immunprecipitáció).

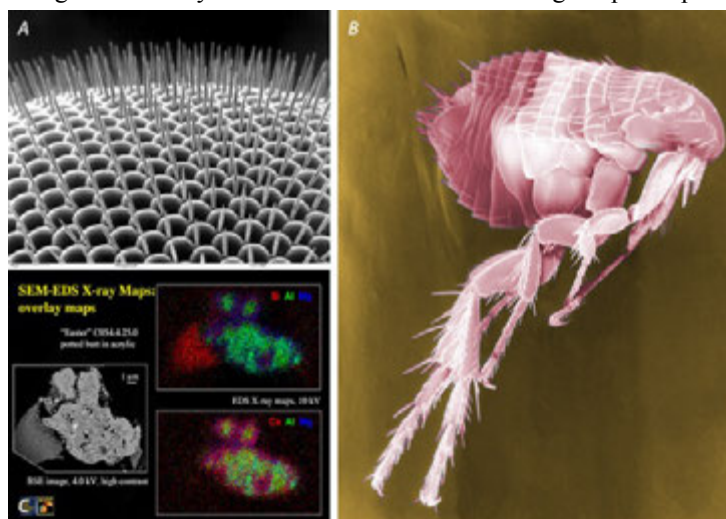
A mikroszkóp fontosabb egységei az elektronágyú, az objektívlencse, a pásztázótekercesek, a detektor(ok) és a mintatartó (4.61. ábra).

A mikroszkóp az elektronnyaláb és a minta kölcsönhatásainak következtében a mintát elhagyó másodlagos elektronokat, visszaszórt elektronokat és röntgenfotonokat használhatja képalkotásra (4.62. ábra). Az elektronágyúból kilépő sugárnyalábot itt tehát képalkotásra nem, csak a minta végigtapogatására használjuk.



4.62. ábra. A pásztázó elektronmikroszkóp felépítése: az elektronágyú, az objektív, a pásztázólencse, a minta és a detektorok elhelyezkedése

A legegyszerűbb pásztázó elektronmikroszkópokban csak szekunder elektron detektor van. Mivel ezek az elektronok kis energiával rendelkeznek, csak a felszín alatti kis mélységekből képesek kilépni a mintából, így a kép elsősorban a felület közeli vékony rétegről hordoz információt, és jobbra a felületi morfológia vizsgálatára használatos. A mélységélesség fordítottan arányos a nagyítással, ezért a szekunder elektron kép sajátossága, hogy kis nagyítás esetén nagy mélységélesség érhető el. Ilyenkor **háromdimenziós**-minőségű képek kaphatók (4.63. ábra).



4.63. ábra. SEM képek: ecetmuslica összetett szemének felszíne (A), bolha, számítógép segítségével utólag színezett kép (B) és anyagminta röntgensugár-analízisének eredménye (C). Az utóbbi felvételen látszik a letapogatott felszín (szürke árnyalatok) és az anyagi összetétel (színezett képek)

A vizsgálathoz **elektromosan vezető mintára** van szükség, máskülönben a rávitt elektronok miatt töltés halmozódik fel a mintában (abszorbeált áram). Ez a töltés torzíja a képet, különösen a szekunder elektronokkal létrehozott kép esetében. Ha a minta eleve vezető, akkor vezető ragasztóval rögzítjük a földelt mintatartó asztalhoz. A rögzítés céljára kaphatók szén- vagy ezüstpaszták, amelyek elektromosan vezetnek, rögzítik a mintát, ugyanakkor viszonylag egyszerűen megoldható az eltávolításuk is. Rögzítés céljára kapható kétoldalas ragasztós vezető szalag is.

A **biológiai minták** rossz vezetők, felületüket ezért vékony vezetőréteggel szokás bevonni. Ez a réteg általában **arany vagy szén**, amelyet **párologtatással** (gőzöléssel) lehet a felületre felvinni. Fontos, hogy a vezetőréteg egyenletes vastagságú és a lehető legvékonyabb legyen. A felvitt réteg megnöveli a felületről távozó másodlagos elektronok számát, ezzel növeli a kép fényességét, sőt a felbontást is. Szükség szerint a gőzölés előtt a felület tisztítása szükséges.

Kérdések és feladatok

1. Ismertesse, hogy milyen igények tették szükségessé az elektronmikroszkóp kifejlesztését!
2. Miért alkalmas az elektronsugár egy mikroszkóp felbontási határának (d) csökkentésére?
3. Az elektronok milyen kölcsönhatásba léphetnek a mintával? Mutassa be az elektron-jelenségeket!
4. A mintával kölcsönható elektronok közül melyeket használunk képalkotásra? Mi a különbség a rugalmasan és a rugalmatlanul szóródó elektronok között? Mik a másodlagos elektronok és a röntgen fotonok?
5. Milyen elektronmikroszkóp típusokat ismer, s mi az elnevezésük alapja?
6. Hasonlítsa össze röviden a TEM és a fénymikroszkóp felépítését! Miben hasonlítanak és miben különböznek egymástól?
7. Sorolja fel a TEM képalkotó elemeit, s helyezze el azokat a mikroszkóp oszlopában!
8. Mi az elektronmikroszkóp sugárforrása? Milyen ennek a felépítése?
9. Mutassa be röviden az elektronágyú felépítését és működését!
10. Mi biztosítja azt, hogy az elektronok megfelelő sebességet érjenek el? Miért fontos ennek növelése, illetve stabilan tartása?
11. Jellemezze az elektromágneses lencsákat! Milyen felépítésűek, miért és hogyan alkalmasak az elektronsugarak terelésére?
12. Mira alkalmasak a blendék, miért van rájuk szükség?
13. Hogyan helyezzük a transzmissziós elektronmikroszkópba a mintát?
14. Hogyan keletkezik a transzmissziós elektronmikroszkópban rögzíthető kép? Mi ennek az alapja? Hogyan segíthetjük elő azt, hogy részletgazdag kép alakuljon ki?
15. Mit jelent a kontrasztosítás fogalma? Miért van rá szükség és mit takar az elnevezés? Milyen típusait ismeri? A fénymikroszkópi mikrotechnikában melyik eljárásnak felel meg?
16. Milyen alapon és hol jelenik meg a TEM által alkotott kép? Hogyan és milyen eszközökkel rögzíthetjük ezt?
17. Mit tud az elektronmikroszkóp lencséinek hibáiról, mi okozza ezeket és milyen torzulást okoznak? Hogyan és miért kell korrigálni ezeket?
18. Ismertesse az elektronmikroszkópos minták rutin előkészítési menetének fő lépéseit!
19. Mutassa be röviden az elektronmikroszkópos technikákban használt rögzítőket! Foglalja össze, hogy milyen elvárásaink vannak ezekkel szemben, és hasonlítsa össze ezeket a fénymikroszkópos mikrotechnikában használtakkal!
20. Milyen elektronmikroszkópos célokra használt beágyazó szereket ismer? Ezeket milyen szempont(ok) alapján lehet csoportosítani? Ismeretei alapján melyiket mikor ajánlott használni és miért?
21. Mutassa be röviden az ultramikrotómot és a metszetkészítés lényegét! Mit nevezünk félvékony- és ultravékony metszetnek? Melyik mire alkalmas?
22. Hasonlítsa össze az ultravékony metszetek készítésére használt kések tulajdonságait (anyagát, felépítését, használhatóságát és élettartamát)!
23. Mit nevezünk mikrorostélynak vagy gridnek? Milyen típusait ismeri, és melyiket mikor használjuk?
24. Mit jelent a műtermék fogalma? Soroljon fel az elektronmikroszkópos minta előkészítés során keletkező műtermékeket és nevezze meg keletkezésük okait!
25. Mit jelent a negatív kontrasztosítás fogalma? Röviden ismertesse az eljárás lényegét és azt, hogy mikor alkalmazzuk!

26. Mit jelent a citokémia és a hisztokémia fogalma? Mi a két eljárás célja és lényege? Mikor alkalmas(ak) elektronmikroszkópos szintű vizsgálatokra?
27. Mit jelent az immuncitokémia fogalma? Foglalja össze röviden az eljárás alapjait!
28. Sorolja fel, hogy mik az alapvető feltételei egy sikeres elektronmikroszkópos immuncitokémiai jelölésnek!
29. Milyen típusú ellenanyagokat ismer? Mi alapján dönthető el, hogy melyik alkalmasabb elektronmikroszkópos szintű vizsgálatokhoz?
30. Mit jelent az elektron-optikai jelzőanyag fogalma? Milyen tulajdonságokkal kell rendelkezzen, és manapság melyik a legáltalánosabb formája?
31. Mutassa be azokat a minta előkészítés során alkalmazandó eltéréseket, amelyekben a rutin és az immuncitokémiai elektronmikroszkópos preparatív eljárások különböznek!
32. Összehasonlító ábrával (is) jellemezze a pre- és a post-embedding immuncitokémiai eljárásokat!
33. Mikor alkalmazna pre- és mikor post-embedding jelölési eljárást?
34. Mit jelent a „blokkolás”, és miért van rá szükség?
35. Rajzokkal illusztrálva, mutassa be az indirekt, post-embedding immuncitokémiai jelölés lépéseit!
36. Egy (indirekt) többlépcsős immun-arany jelölés során melyik ellenanyag kell hordozza az aranykolloid szemcsét?
37. Milyen esetben alkalmazná a metszeten történő kettős immunarany jelölés módszerét, és mik a megkülönböztethetőség alapvető feltételei?
38. A pre- és postembedding jelölés kombinációjával elérhető-e kettős jelölés? Mire kell ügyelnünk, ha ezzel a módszerrel próbálkozunk?
39. Mit takar a SEM betűszó? Mi indokolja ennek a mikroszkópnak az elnevezését? Milyen detektorok építhetők a berendezésbe és ezek milyen információkat adnak?

5. fejezet - Soksejtűekből izolált túlélő rendszerek vizsgálata: *in vitro* (ex vivo) módszerek

Kovács Attila Lajos

Az *in vitro* kísérleti rendszerekkel kapcsolatos néhány alapvető elvi kérdés

A teljes élő szervezetben zajló folyamatokat latin eredetű kifejezéssel *in vivo* folyamatoknak nevezzük. Azokat a módszereket, amelyeket az intakt élő szervezet vizsgálatakor alkalmazunk, ***in vivo* módszereknek** hívjuk. Az *in vivo* vizsgálatok sok szempontból erősen korlátozottak, fáradságosak. A soksejtűek nagyon komplex rendszerek, gondoljunk például egy tyúktojásra. A tyúktojás már önmagában sem túl egyszerű, de a benne lezajló fejlődés eredményeképpen még sokkal bonyolultabbá válik, mire kiscsirke lesz belőle.

Az ember testében egyszerű szövettani és elektronmikroszkópos módszerekkel több mint kétszázféle sejtípus különböztethető meg. Ennél is sokkal többfélék a sejtek, ha más módszerekkel finomabb különbségeket mutatunk ki közöttük. A **soksejtű élőlény** sokféle sejtje között túlnyomórészt **rejtett és bonyolult kölcsönhatások** vannak. A sejtek kölcsönösen függenek egymástól.

A **kölcsönös függőséget** jól szemlélteti a részleges májkiirtás, az úgynevezett parciális hepatektomia példája. Sebészi beavatkozással eltávolíthatjuk a laboratóriumi patkány májának a kétharmadát. Meglepő módon az állat ebbe nem pusztul bele, sőt azt mondhatjuk, hogy a műtétet jól tolerálja. Az operáció után, nagyjából két hét alatt, az állat mája pontosan az eredeti méretűvé növekszik. Ha pl. egy nagyobb termetű kutyaéból kisebbbe transzplantálnak májat, akkor a beültetett máj veszt a tömegéből, és a befogadó (recipiens) kisebb testméretének megfelelő nagyságúra zsugorodik. Ugyanez fordítva is igaz. A sejtek együttműködése révén tehát a szervezet pontosan meghatározza az **egyes szervek méretét**.

Hasonlóan állandó egy szerven belül a különböző szövetek, sejtek, valamint az extracelluláris és az intercelluláris állomány mennyisége. A sejtek az egymással való kölcsönhatásaik révén alakítják ki a fejlődés során a testen belüli mennyiségi arányait, a háromdimenziós elhelyezkedésüket és a működésük intenzitását. Egy soksejtűben tehát a sejtek egymástól függő módon fejlődnek és működnek. A különböző típusú és fejlettségű szövetek sejtjei között a kölcsönös függőség kisebb vagy nagyobb mértékű lehet. Erre jó példa lehet a regeneráció. A szivacsok, hidrák, örvényférgék egyes fajtái, de sokféle növény is képes arra, hogy akár teste kicsiny töredékéből is teljes élőlényt hozzon létre. Az elkülönített rész a hiányzó részeket újra létre tudja hozni, tehát azoktól nem függ. Az összetettség magasabb szintjén ez a képesség fokozatosan elveszni látszik. Szöveti regenerációs folyamatok természetesen itt is működnek pl. sérülések, műtétek után.

A teljes, intakt szervezetben (*in vivo*) nagyon nehéz, gyakran lehetetlen a sejtek, a szövetek és a szervek közötti együttműködés felderítése. Ezért szükség van a szervezet részekre szedésére, és a **kiemelt részek elkülönített vizsgálatára**. Ezzel meg lehet állapítani azt, hogy önmagukban, **az élő szervezetten kívül** (*ex vivo*), hogyan működnek az elkülönített túlélő részek. Ezeket a módszereket a XIX. század második felében, az 1850-es évektől kezdték alkalmazni. A kutatók természetesen szerették volna látni, hogy mi történik a kivett szervekkel, szövetekkel, ezért a túlélő részeket a leggyakrabban üvegedényekbe tették. Innen származik az ***in vitro* elnevezés**, ami eredetileg azt jelenti, hogy „üvegen”.

Annak, hogy a szervezet egyes részeit a szervezetből kiemeljük, izoláljuk őket, **fontos következményei** vannak. Az izolálás révén megszüntetjük a túlélő sejtek kapcsolatait a szervezet többi részével. Ezzel jelentősen **leegyszerűsödik a kísérleti rendszerünk**, és lehetővé válik az, hogy **direkt módon** és a bonyolult kapcsolatrendszerek nélkül vizsgáljuk az izolált szervek, szövetek vagy sejtek működését.

Az izolálás után a túlélés feltételeit a vizsgálatot végző kutatónak kell biztosítania. Legalábbis részben pótolnia kell a kiemelt rész számára a szervezet hiányzó részeit. Ennek során egyre pontosabban ismerheti meg, sőt bizonyos értelemben kényszerül megismerni, hogy mire van szükség az izolált részek túléléséhez és a bennük zajló folyamatok fenntartásához. Az *in vitro* megközelítés jó lehetőséget ad arra, hogy könnyebben és egyértelműbben befolyásoljuk a működést a közeg és a kísérleti feltételek módosításával. További előny, hogy *in vitro* sokkal szabadabban változtathatjuk a kísérleti paramétereket, mint *in vivo*. A kísérletezés emellett rendszerint hatékonyabb és olcsóbb is *in vitro*.

In vitro végzett megfigyelésekkel **fel tudjuk deríteni** például azt, hogy

1. egy külső hatásra adott válasz egy sejttípus közvetlen reakciója-e, vagy a szervezet más részeinek közvetítésével jön létre,
2. adott szervek, sejtek milyen anyagokat vesznek fel és hasznosítanak,
 - a. milyen termékeket juttatnak a környezetükbe,
 - b. milyen anyagok hatására hogyan reagálnak önmagukban,
 - c. felderíthetjük a különbségeket a számunkra érdekes sejttípusok között pl. egy-egy potenciális gyógyszerhatóanyag adagolására adott válaszban.

Az így nyert adatok azért fontosak, mert ami a túlélő rendszerben, tehát *in vitro* történik, az nagy valószínűséggel *in vivo* is lehetséges. Fontos azonban tudatosítanunk, hogy az *in vitro* nyert eredmények nem vonatkoztathatóak közvetlenül a teljes élő szervezetben lejátszódó folyamatokra, mivel **a sejtek *in vitro* működése jelentősen el is térhet az *in vivo* működéstől**. Külön feladat annak a gondos mérlegelése és eldöntése, hogy az *in vitro* kísérletekben megnyilvánuló képességükkel vajon valóban élnek-e a sejtek *in vivo* is, és ha igen akkor mikor és milyen feltételek között.

Visszatérve az *in vitro* kísérletezésre, a részekre szedés tehát komoly beavatkozást jelent a sejtek közötti kapcsolatokba; az izolálás eredményeképpen megszűnnek a testből kiemelt testalkotókra *in vivo* gyakorolt hatások. A szervezetből kivett vizsgált részek sejteinek szükségszerűen alkalmazkodniuk kell az új körülményekhez, a test többi részének a hiányához. Kézenfekvő és magától értetődő, hogy a kiemelt részek elkülönítésével megtörténik egy sor *in vivo* meglévő **funkció kiesése**. Ilyenek lehetnek pl. a stimulatív idegrendszeri és endokrin hatások révén fenntartott funkciók. A működéskiesésre vonatkozó példák mellett fontos tudatosítanunk azt is, hogy az izolálás révén az *in vivo* érvényesülő **gátló hatások kiesése** is megtörténhet. Ez pedig a korábban *in vivo* gátlott működések *in vitro* beindulásához, azaz **funkciónyeréshez** vezet. Ami a frissen izolált részekben megmarad, azok az autonóm funkciók. A rövid távú alkalmazkodás hatásain túl, a hosszabb ideig *in vitro* tartott sejtekben reális lehetősége van annak, hogy megváltozik a gének kifejeződése, tehát a **génexpressziós mintázat** is. Meg kell jegyezni, hogy erre adott esetben már néhány óra vagy annál rövidebb idő is elegendően hosszú lehet. Emellett az osztódó sejteket tartalmazó *in vitro* rendszerekben hetek, hónapok, évek során **mutációk** alakulhatnak ki és szaporodhatnak fel. Mindezeknek a körülmekintő figyelembevétele nagyon fontos az *in vitro* eredmények értelmezésében.

A biológiai és biomedicinális kutatások végső célja természetesen az *in vivo* működés felderítése. Ezért **nélkülözhetetlen az *in vitro* adatok *in vivo* érvényességének, relevanciájának meghatározása**. Ehhez csaknem minden esetben újabb, most már *in vivo* kísérletek és megfigyelések kellenek. Az *in vitro* eredmények egyik fontos haszna éppen az, hogy ezeket az új *in vivo* vizsgálatokat az *in vitro* szerzett ismeretek birtokában pontosan célzott és hatékony módon tervezhetjük meg és végezhetjük el, ráadásul pontosabban is értelmezhetjük őket.

Újabban széles körben bontakoznak ki társadalmi mozgalmak az in vivo állatkísérletek visszaszorítására, és in vitro vizsgálatokkal történő teljes helyettesítésükre. Sokan azt hangoztatják, hogy a céljuk a kísérleti állatok „megóvása, megmentése”, a szélsőségesek egészen odáig mennek, hogy az állatkísérletek teljes betiltását követelik.

Számomra elfogadható az az álláspont, amely szerint az állatokra érdemes úgy tekintenünk, mint evolúciós testvéreinkre. Úgy gondolom, hogy helyes, ha az állatokat általában tiszteljük és becsüljük, beleértve a kísérleti állatokat is. Bánjunk velük gondosan és kerüljünk mindenféle kegyetlenkedést! Az a meggyőződésem, hogy az állatkísérleteket végző biológusok lényegében kivétel nélkül így gondolkodnak. Már csak azért is, mert a sikeres állatkísérletekhez nélkülözhetetlen, hogy a kísérleti állatokat a lehető legjobb körülmények között tartsuk, tenyészük, és ne tegyük ki őket fölösleges stressznek.

Kutatói működésem túlnyomó részében in vitro módszereket alkalmaztam, és ki is fejlesztettem új in vitro kísérleti rendszereket. Egyetértek azzal, hogy sok ok miatt nagymértékben lehetséges és kívánatos is az in vivo kísérleteket in vitro vizsgálatokkal kiváltani, ahogy fentebb erről már volt szó. Szögezzük le azonban világosan, hogy a teljes

helyettesítés, a már szintén vázolt okok miatt, nem lehetséges. Mindebből következik, hogy **az élő állatokon végzett kísérletek** végső soron **nélkülözhetetlenek**. Világosan látnunk kell, hogy az *in vivo* állatkísérletek esetleges teljes beszüntetése után csupán két lehetőségünk maradna. Az egyik az, hogy lemondunk az orvosbiológiai fejlesztésről, a másik, hogy az *in vivo* állatkísérleteket az embereken való kísérletezéssel helyettesítjük.

Az *in vitro* technikákról használatuk több mint egy évszázados története során könyvtárnyi anyag jelent meg, változatosságuk kimeríthetetlen. Emiatt ismertetésük távolról sem lehet teljes. **Az alábbi összefoglaló célja** ezért nem lehet az összes technika részletes és pontos ismertetése. Inkább egy átfogó, vázlatos képet szeretnék adni ezekről a nélkülözhetetlen módszerekről, amelyet kiegészíték néhány módszer szubjektív válogatáson alapuló, változó mélységű, részletesebb bemutatásával. Ahol lehet, igyekszem kiemelni olyan összefüggéseket, amelyek felvillantják alkalmazásuk indokait, lehetőségeit. Egy ilyen összefoglaló írása soha nem fejezhető be, csak abbahagyni lehet. Ennek oka nem csupán a tengernyi publikált anyag és tapasztalat, hanem a korábbi eredmények állandó újraértékelése és a ma is folytatódó fejlesztés.

Az *in vitro* rendszerek fő típusainak vázlatos áttekintése

A soksejtű szervezet és egyedfejlődése vizsgálatához az objektum bonyolultságának megfelelő változatosságban fejlesztettek ki módszereket. Ezeket igen sokféle módon csoportosíthatjuk. Ennek megfelelően az alábbi összefoglalóban is többféle csoportosítás jelenik meg, amelyek különböző mértékben átfednek egymással.

Az összetettség szintje szerinti csoportosítás: szupra-, szubcelluláris és újraépített rendszerek

Az *in vitro* kísérleti rendszereket első közelítésben célszerű az összetettségük szintjei szerint két fő csoportba, **szupracelluláris** (beleértve az intakt sejtet is) és **szubcelluláris rendszerekre** osztani (II. táblázat). A kétféle rendszer összetétel szempontjából alapvetően különbözik egymástól. A szupracelluláris rendszereké az extracelluláris, míg a szubcellulárisaké az intracelluláris közegének felel meg (III. táblázat).

Túlélő rendszerben tarthatunk szervrendszereket, akár egész testtájakat, szerveket, szöveteket, sejteket. Módszereink vannak **teljes emlős embriók *in vitro* vizsgálatára** mind a fejlődés korai (a méhfalba való beágyazódás előtti, preimplantációs), mind későbbi (beágyazódás utáni, posztimplantációs) fázisában. Különös kombinációja az *in vitro* és *in vivo* rendszereknek az **implantációs, vagy reimplantációs technika**, amikor korábban kivett majd *in vitro* tartott részeket az élő állatba, nem feltétlenül az eredeti helyére, visszaültetnek.

A **szubcelluláris rendszereket úgy hozzuk létre**, hogy a szövetek, sejtek szubcelluláris alkotókra való szétszedése (homogenizálása) után elkülönítve vizsgáljuk alkotórészeiket. Ilyenek lehetnek pl. a homogenizált sejtekből nyert organelumrendszerek, komplex molekuláris rendszerek.

Újabban egyre több kísérlet történik arra, hogy egyszerűbb ***in vitro* rendszerek kombinálásával** *in vitro* körülmények között újraépítsünk bonyolultabb rendszereket. Ilyenekkel jelenleg főként a szupracelluláris szinten találkozunk, pl. sejtek reaggregációs tenyészetek, extracelluláris elemek sejtekkel való kombinációi stb (ld. Kombinált módszerek). A publikációk között találunk olyan cikkeket is, amelyekben izolált sejtalkotókat kombinálnak összetett intracelluláris folyamatok rekonstruálására, ilyen funkciók tanulmányozására. Újabban kísérletek folynak a lehető legkevesebb összetevőből álló **minimális sejt** biokémiai komponensekből való *in vitro* előállítására is, bár itt egyelőre prokarióta sejtekről van szó.

II. táblázat. *In vitro* kísérleti rendszerek az összetettségük szintje szerint

Szupracelluláris rendszerek
Szervrendszerek/testtájak
Szervek
Szövetek
Sejtek
Reimplantáció
Teljes embriók
Korai fázisban (implantáció előtt)
Későbbi fázisban (implantáció után)
Szubcelluláris rendszerek
Sejtfrakciók, organellumok
Komplex molekuláris rendszerek
Újraépített rendszerek
pl. sejtek és az extracelluláris matrix kombinációi
reaggregációs és háromdimenziós kultúrák

III. táblázat. Az extracelluláris és az intracelluláris térben található néhány fontos ion koncentrációja (mmol/l)

Ionok	Extracelluláris folyadék		Intracelluláris folyadék (citoszol)
	Intravaszkuláris tér	Intercelluláris tér	
Kationok			
Na ⁺	141	143	10
K ⁺	4	4	150
Ca ⁺⁺	2,5	1,3	< 0,001
Mg ⁺⁺	1	0,7	15
Anionok			
Cl ⁻	103	115	8
HCO ₃ ⁻	30		10
PO ₄ ⁻	1	1	65

Az oxigénnel való ellátás módja szerinti csoportosítás

Perfúziós rendszerek

A túlélő rendszerben való működés egyik alapvetően fontos feltétele az **oxigénnel való ellátás**. Ennek módja összefüggésben van a túlélő rendszerben tartható testrészek méretével. A felnőtt gerinces kísérleti állatok esetében a szervrendszerek és a szervek általában olyan méretűek, hogy életben tartásuk csak az érhalózatuk felhasználásával, mesterségesen fenntartott keringés révén lehetséges. Ezek az úgynevezett **perfúziós rendszerek** (IV. táblázat). Perfúziós rendszerben elvileg életben tartható a testnek minden olyan része, amely keringési szempontból izolálható a test többi részétől. Ha a perfundált szervet meghagyjuk természetes anatómiai helyén az állatban, úgynevezett **in situ perfúziót** végzünk (5. 37-38. ábra); gyakrabban alkalmazzák az állatból kioperált, **izolált szerv perfúzióját**.

A perfúziós rendszerekben a **létfenntartó közeg**, a médium (amelyiknek a neve itt perfúziós oldat, perfúziós folyadék vagy perfuzátum) általában valamilyen vérpótlék. A legtöbb esetben ez a vér kisebb vagy nagyobb mértékben átalakított származéka. A leggyakrabban olyan kismértékben hígított vér, amelynek valamilyen módszerrel

meggátoltuk az alvadását (pl. defibrinálás, vagy leggyakrabban véralvadásgátló heparin hozzáadása). Igen ritka esetektől eltekintve tökéletesen megfelel az igényeknek más fajokból származó (heterológ) vér, vagy lejárt emberi vérkonzerv segítségével készült perfúziós médium is.

A perfúziós rendszer működésének fő jellemzői egyes paraméterek esetében megközelíthetik az *in vivo* értékeket, legtöbbször azonban nem érik el azokat. A **túlélés időtartama** nem túlságosan hosszú, rendszerint néhány óra, esetleg néhány nap. A perfúziós rendszerben **leggyakrabban vizsgált szervek** a máj, a vese és a szív, de vizsgálhatók szervrendszerek, testtájak is. Ugyan ritkán alkalmazzák erre a célra, de késői, fejlett embriók is életben tarthatók perfúziós rendszerben.

IV. táblázat. Érrendszeren keresztül átáramoltatott (perfúziós) rendszerek

Átáramoltatott vagy perfúziós rendszerek	
Oxigénellátás	mesterségesen fenntartott lokális keringéssel, vérpótlék (főleg módosított vér) segítségével
Objektum	elsősorban emlős szervrendszerek, testtájak, szervek, nagyméretű fejlett embrió
Élettartam	néhány óra, esetleg ritkán 1-2 nap
A rendszer típusai	
In situ perfúzió	Izolált perfundált rendszer
Csak keringésileg izolált, eredeti anatómiai helyén hagyva	eredeti anatómiai helyéről kiemelt

Diffúzióval oxigenált rendszerek

A **perfúzió nélkül** a testből kivett túlélő részek méretét a diffúzióval való oxigénellátás lehetőségei szabják meg. Mivel keringés nélkül, a közegben oldott oxigén egyszerű diffúziójával csak jóval kisebb mennyiségű oxigén jut el a sejtekhez, az ilyen módon eltartható **izolált testrészek mérete** is jelentősen csökken. Ez a méret bizonyos határok között változó lehet, de mindenképpen a 2-3 mm körüli vastagság illetve átmérő tartományába esik (V. táblázat).

V. táblázat. Perfúzió nélküli, diffúzióval oxigenált organotipikus rendszerek

Diffúzióval oxigenált organotipikus rendszerek	
Organotipikus felépítés (és növekedés)	megmarad a szerv kötőszövetes tokja, az <i>in vivo</i> sejtösszetétel és háromdimenziós szerkezet
Oxigénellátás	a vizes közegbe oldódott oxigén diffúziójával
Objektum	kisméretű szervek, főleg embriókból vékony falú csöves, lemezes szerkezetek, szövetszeletek teljes embrió tenyészetek pre- és posztimplantációs fázisban
Méret	maximális vastagság ill. átmérő kb. 2-3 mm
Élettartam	lehet több nap, esetleg néhány hét is

Szervtenyészetek

A méretek miatt perfúzió nélküli szervtenyészeteket embriókból, vagy kisméretű fiatal és felnőtt állatokból kivett szervekből alakíthatunk ki, melyek **mérete** a néhány mm-es átmérő, illetve vastagság tartományába esik. Ezeket **úgy hozzuk létre**, hogy a kivágáskor a legnagyobb mértékig épen megtartjuk a szervek kötőszövetes tokját. Ha így járunk el, akkor az izolált szerv hosszabb ideig megtartja az *in vivo* állapotra jellemző sejtösszetételét és háromdimenziós szerkezetét. A kivett embrionális szerv az ilyen tenyészetben *in vitro* növekedhet és tovább is fejlődhet, differenciálódhat. Azt a növekedést, amikor a szerv megtartja az *in vivo* állapotra jellemző háromdimenziós szerkezetét, **organotipikus növekedésnek** nevezzük. Ilyen kísérleti rendszerekben az izolált szervek napokig,

esetleg néhány hétig is eltarthatók és vizsgálhatók lehetnek. Kisméretű felnőtt állatok (pl. egér) szervezetében is találunk a néhány mm-es méret tartományába eső teljes szerveket. Ez a méret nagyobb állatok esetén is elérhető, ha csöves, illetve lemezes szerkezetű szerveket vizsgálunk, amelyek vastagsága ebbe a mérettartományba esik. A hosszúság vagy a síkbeli kiterjedés természetesen jóval nagyobb lehet, mint néhány mm. A **szervtenyészetek közege**, médiuma lehet pl. kocsonyás plazmaalvadék, de lehet folyékony tápoldat is. Újabban, amióta megoldották a megfelelő tisztítását, agart is használnak szubsztrátumként, amit valamilyen szövettényesztő médiummal általában 1 %-os koncentrációjúra állítanak be.

Szövetszeletek

A diffúzióval történő oxigénellátás korlátaiból következik, hogy a **terjedelmesebb szervekből részletek** csak úgy tarthatók el, ha a szervből szeleteket készítünk. Ilyenkor nyilvánvalóan szétvágjuk a kötőszövetes tokot is. Kevésbé kényes, nem túl puha szövetek esetében szikével, esetleg ollóval is készíthetünk szeleteket. Ha a szerv kifejezetten lágy szöveti szerkezetű (pl. agy, gerincvelő), akkor különleges berendezést kell alkalmazni, hogy a mechanikai károsodást elkerüljük. Az ilyen célra kifejlesztett berendezések, az úgynevezett vibratomok, rezgő kést tartalmaznak.

Az oxigénellátás szempontjából megfelelő méretű szövetszeletekben lévő sejtek **viszonylag rövid távon** (ami néhány óra, esetleg egy két nap) sokféle funkció szempontjából **jól reprodukálhatóan működnek**, megmarad az **organotipikus felépítés** is, tehát az eredeti sejtösszetétel és háromdimenziós szerkezet. Ennél hosszabb távon azonban a működés és a szerkezet egyaránt megváltozik, és ilyenkor az eredmények már nem megbízhatóak.

Az oxigenálást keveréssel, vagy a médiumnak a szeletek körül való áramoltatásával (perifúzió, vagy szuperfúzió) is segíthetjük.

Diffúzióval oxigenált szervtenyészetekben és szövetszeletekben nemcsak alapvető sejt- és fejlődésbiológiai **folyamatokat vizsgálunk**, hanem többek között felhasználják őket fiziológiai és fejlődésbiológiai vizsgálatokra is. Különösen fontos objektumok gyógyszerhatóanyagok metabolizmusának vizsgálatára és toxikológiai tesztelésére.

VI. táblázat. Diffúzióval oxigenált hisztiotipikus rendszerek

Diffúzióval oxigenált hisztiotipikus rendszerek	
Hisztiotipikus felépítés (és növekedés)	eltávolítjuk a szerv kötőszövetes tokját, elveszik az eredeti háromdimenziós szerkezet, több sejtípus marad, de módosul az <i>in vivo</i> sejtösszetétel
Oxigénellátás	a vizes közegbe oldódott oxigén diffúziójával
A rendszer típusai	
Monolayer (egyrétegű) szövettényesztet	izolált sejtekből vagy szövetdarabkákból az aljzatra került, egy rétegben letapadt és szétterült sejtek
Élettartam	hetek, hónapok, évek
Szuszenziós tenyésztet	olyan sejtekből, amelyek <i>in vivo</i> sem tapadnak egymáshoz vagy az extracelluláris matrixhoz
Élettartam	hetek, hónapok, évek
Frissen izolált sejtek, sejtcsoportok	szervekből, szövetekből mechanikus és/vagy enzimatisz kezeléssel kapott sejtek, sejtcsoportok azonnali kísérleti felhasználása
Élettartam	néhány óra
Sejttényesztet	spontán vagy irányított szelekció révén csak egyféle sejtípus marad
Élettartam	hetek, hónapok, évek

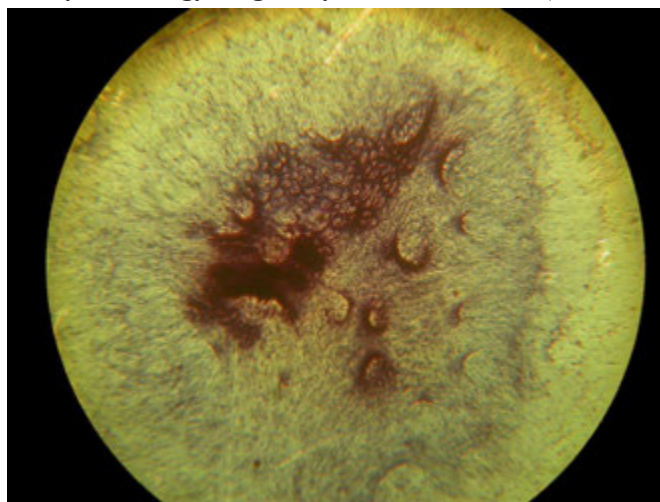
Egyrétegű (monolayer) szövettényesztetek és néhány alapfogalom

A kísérleti biológiai és orvostudományi gyakorlat szempontjából **kiemelkedő jelentőségűek** a szövettényesztetek. Az alapfogalmak bevezetésére jó lehetőséget ad, ha röviden ismertetem **a szövettényesztetek létrehozásának klasszikus módját**.

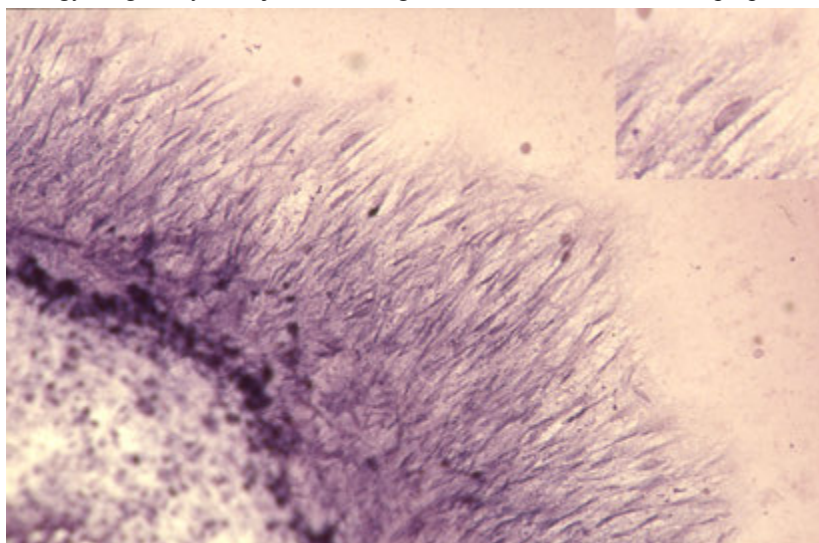
Ez a ma is használt módszer apró, néhány mm³-es szövetdarabkákból indul ki. Ezeknek a szövetszeleteknek nagy relatív területű frissen vágott felszínük van, amit nem fed természetes kötőszövetes burok. A feldarabolás miatt ugyancsak elvesznek a természetes határként viselkedő szomszéd sejtek. A **kiültetendő szövetdarabkákat** (úgy is nevezzük őket, hogy explantátum darabkák) tenyészfolyadékban megfelelő üveg, vagy műanyag tenészfelületre tesszük, egyenletes eloszlásban. Ekkor a darabkák **letapadnak** az aljzatra. A vágás révén frissen megnyílt szabad felszínen a mozgékony sejtek a mobilitási képességük szerinti sebességgel **kivándorolnak** a szövetszeletből, azaz migrálnak. Ezután az aljzat szabad felületére tapadva, lassú mozgással sugárirányban szétkúsznak (5.1. ábra), és közben rendszerint osztódnak is. A letapadás normális esetben az osztódás feltétele (anchorage dependence vagy attachment dependence).

A migrálás miatt leépül a szerv-, ill. szövetdarabka eredeti háromdimenziós szerkezete. A kivándorolt sejtek ellapulnak, szétterülnek (spreading). Megváltozik tehát az alakjuk, de mégis felismerhetően megmaradnak a szöveteket alkotó sejtípusok. A tenyészet tehát növekszik, de nem az *in vivo* állapotra jellemző háromdimenziós szerkezetben. Ezt a növekedést **hisztiotipikus növekedésnek** hívjuk.

Az eredményül kapott, egyetlen rétegbe, tehát két dimenzióba rendeződött sejtek tenyészetét széles körben elterjedt angol szakkifejezéssel **monolayer**, azaz **egyrétegű tenyészetnek** nevezzük (5.2. és 5.3. ábra).

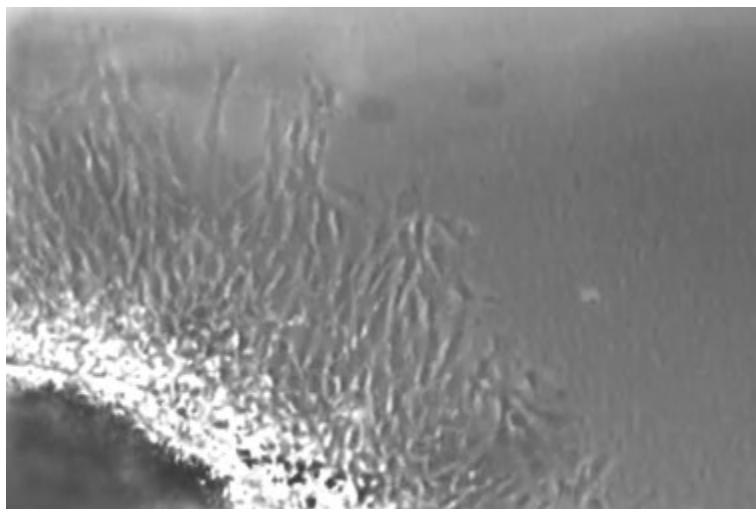


5.1. ábra. Csirkeembrió tüdejéből származó szöveti explantátum darabkákból kialakuló egyrétegű (monolayer) tenyészet kis nagyítású képe. A központban lévő kb. 1,5 mm átmérőjű szövetdarabka az *in vivo* állapothoz még némileg hasonló háromdimenziós szerkezetű. A periferia felé sugárirányban vándorló sejtek legkülső zónájában már egyrétegű tenyészet jött létre. Rögzített, hematoxilinnel festett preparátum



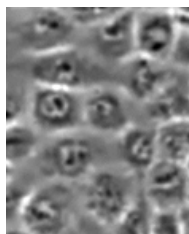
5.2. ábra. Csirkeembrió bőrexplantátumából migrációval kialakuló fibroblaszt tenyészet. Az explantátum (bal alsó sarok) még őrzi háromdimenziós szerkezetét, de a viszonylag mozgékony fibroblasztok a szélén már erőteljesen

kifelé migrálnak. A kétnapos tenyészet periferiájának szélén és a kinagyított részleten már az aljzatra egy rétegben letapadt és szétterült fibroblasztok láthatók. Rögzített, hematoxilinnel festett preparátum, ahol a szétterült sejtek hosszúkas sejtmagjai erősebben festődnek

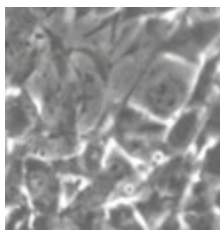


5.3. ábra. Az explantátumból kivándorló fibroblasztok fáziskontraszt mikroszkópban vizsgálva. A periferiára kivándorolt sejtek már monolayert alkotnak

A sejtek szaporodásuk révén kezdeti mennyiségük és osztódási sebességük függvényében néhány nap vagy hét alatt **benővik** a rendelkezésre álló szabad területet, és amikor már mindenütt egymáshoz érnek, akkor a tenyészet úgynevezett **konfluens állapotba** kerül (5.4. és 5.5. ábra). Ilyenkor a normális sejtek osztódása megáll, bennük úgynevezett **kontaktus általi gátlás** érvényesül (contact inhibition of growth). A további szaporítás érdekében a sejtek számára szabad területet kell biztosítani. Ezt az aljzatról való leválasztással és az eredményként kapott szuszpenzió felhígítása után több tenyészetbe való szétosztással érjük el. Ezt az eljárást **passzálásnak** (passage, subculturing) nevezzük.



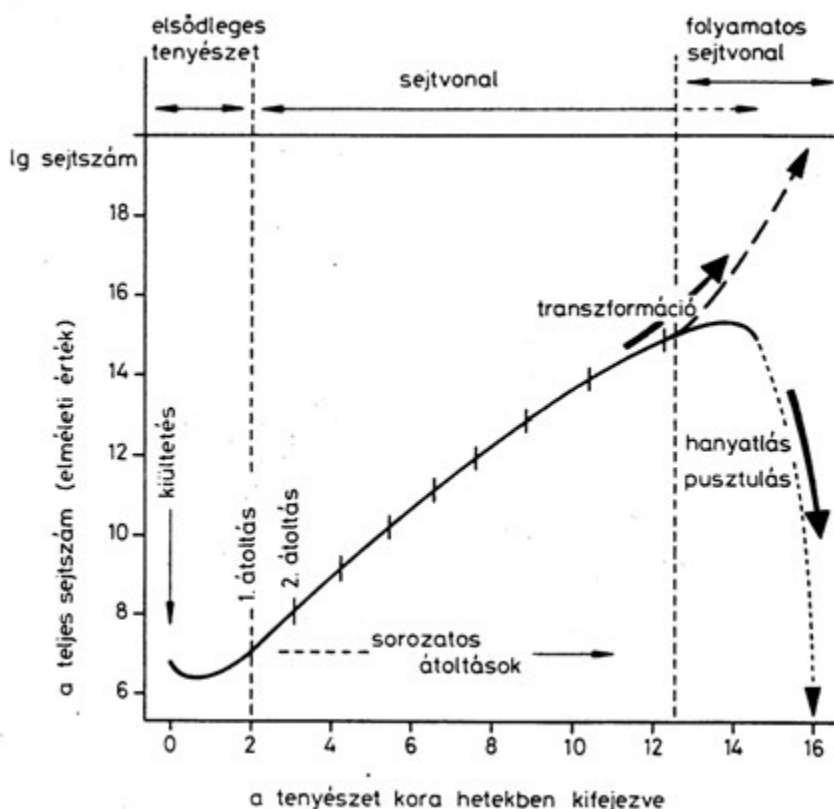
5.4. ábra. Hámjellegű (epiteliális) HeLa sejtek (l. 199. old) konfluens tenyészetének részlete (fáziskontraszt mikroszkópos felvétel)



5.5. ábra. Fibroblaszt jellegű (3T3) sejtek konfluens tenyészetének részlete (fáziskontraszt mikroszkópos felvétel)

Az állatból kivett sejtekkel, szövetdarabkákkal frissen indított tenyészetet **primer tenyészetnek** hívjuk (primary culture). Az első passzálás után létrejön a **szekunder**, majd a terciér stb. tenyészet. A szekunder tenyészetből a sorozatos passzálások révén létrejövő tenyészet sorozat az úgynevezett **sejtvonal** (cell line). A normális sejtekből kialakult sejtvonal véges élettartamú (finite cell line): pl. az emberi fibroblasztok esetében kb. 50 generációnyi osztódás után a tenyészet **stacioner állapotba** (megáll benne az osztódás) kerül, majd kihal. Nem mindig történik **azonban kihalás**, mert akár *in vivo*, akár *in vitro* spontán módon szert tehetnek a sejtek **korlátlan osztódóképességre**.

Ezáltal úgynevezett **folyamatos sejtvonal** jön létre (continuous cell line) (5.6. ábra). Folyamatos sejtvonalat mesterségesen is létre lehet hozni (immortalizálás) pl. valamilyen mutagén hatású kezelés révén.



5.6. ábra. A sejtvonalak általánosított életgörbéje és életszakaszai reális, de fiktív adatokkal illusztrálva

Ha a szövettenyészetünkben valamilyen mesterséges vagy természetes szelekció révén csak egyetlen sejtípus marad, akkor **sejttenyészet**ről beszélünk. Az egyetlen sejtől indított tenyészet a **sejtklón**. Az itt leírt nomenklatura és szakaszolás nem csak a monolayer, hanem a következő fejezetben tárgyalt szuszpenziós tenyészetekre is vonatkozik.

Szuszpenziós tenyészetek

Az olyan sejtípusok, amelyek *in vivo* sem tapadnak tartósan egymáshoz vagy az extracelluláris mátrix elemeihez, szuszpenziós formában, tehát a közegben pl. keveréssel lebegtetve, letapadás nélkül is tenyészthetők. Ilyen úgynevezett szuszpenziós tenyészeteket képeznek pl. bizonyos fehérvérsejt, illetve limfocitaképző sejtípusok, hematopoietikus sejtek. Szuszpenziós tenyészetben tarthatók olyan sejtek is, amelyeknek ősei eredetileg letapadásfüggőek voltak, de ezt a tulajdonságukat elvesztették (transzformálódtak), ilyen lehet pl. sokféle daganatsejt.

A szuszpenziós sejtvonalak életgörbéje és életszakaszai a monolayer tenyészetekéhez hasonlóak. Noha itt **nem érvényesül kontakt gátlás**, a tenyészet sűrűsége elér egy olyan szintet (**telítési sűrűség**, saturation density), ami meggátolja a sejtek további osztódását (density dependence of growth). A tenyészet növekedése itt is a **passzálás** után, a sűrűség lecsökkentése révén indul újra.

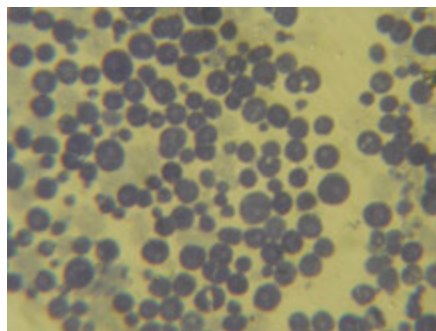
A monolayer és a szuszpenziós tenyészetek élettartama is hosszú lehet, ami jelenthet heteket, hónapokat, a folyamatos sejtvonalak esetében éveket, sőt akár évtizedeket is. A szövettenyészetek tápközege túlnyomórészt folyékony médium. A szövettenyésztő médiumokból több százféle létezik. Alább részletesebben foglalkozunk velük.

Sejtizolálás, izolált sejtek, sejtcsoportok

A szöveteknek sejteké, sejtcsoportokká való szétoszlata **több szempontból is hasznos**. Gyorsabban alakíthatók ki hosszú távú kultúrák, ha a szöveteket valamilyen módon, pl. mechanikus vagy enzimátikus módszerrel sejtekre

bontjuk, és az így kapott sejtszuspenziót használjuk fel tenyészet létrehozására. Ilyenkor nem kell a migrációra várni, és azokból a sejtekből is lehet tenyészetet kialakítani, amelyek nem migrálnak (pl. izomsejtek, idegsejtek).

Az izolálási technika fejlődésével létrejöttek olyan módszerek, amelyekkel nagy tömegben, igen jó életképességű, differenciált sejtek vagy sejtcsoportok szuszpenzióját lehet előállítani. Ez lehetővé teszi a frissen izolált sejtek, sejtcsoportok **azonnali kísérleti felhasználását**. Ilyen esetben az izolált részeket leginkább keveréssel, vagy finom rázatással **szuszpenzióban tartjuk**, de legalábbis nem engedjük őket erősen az aljzatra tapadni. Ezekben a rendszerekben többnyire néhány órás kísérleteket lehet jól reprodukálhatóan végezni. Ilyenkor **sejtszaporodás nem történik**. Szuszpenziós vizsgálatokra széles körben használják az izolált májsejteket (5.7. ábra), de számos más szervből is izolálnak sejteket, sejtcsoportokat (pl. hasnyálmirigy külső és belső elválasztású részéből, veséből, vagy akár szívizomszövetből is).



5.7. ábra. Patkány izolált májsejtjei (toluidinkék festés)

A frissen izolált sejtek és sejtcsoportok kísérleti felhasználásának különleges jelentősége abban áll, hogy az izolálás után azonnal felhasználjuk őket. Emiatt sokkal közelebb állnak az *in vivo* állapothoz mint a szövettenyészetek.

Teljes embriók *in vitro* rendszerekben

Preimplantációs stádium

Az elmúlt évtizedekben jelentős haladás történt az emlősök szaporodásbiológiájának és embriológiájának megismerése terén. Ebben fontos szerepet játszottak az *in vitro* módszerek. Lehetővé vált sok emlősfajban, beleértve az embert is, az ***in vitro* megtermékenyítés rutinszerű elvégzése**. A korai emlősembrió fejlődésének megtermékenyítést követő első szakasza a méhfalba való beágyazódásig (implantáció) tart. A preimplantációs embriók *in vitro* fenntartása és kísérleti felhasználása sok emlősfaj esetében szintén megoldottnak tekinthető.

Közvetlenül az implantáció előtt, a **blasztocisza¹ stádiumban**, az emlősembrió alapvetően kétféle sejtből áll; atrofoblasztot (trofoektoderma) alkotó **külső sejtrétegből** és a belül elhelyezkedő úgynevezett **belső sejttömeg vagy embrioblaszt** (inner cell mass, ICM) sejtjeiből (5.8. ábra). A trofoektodermából jön létre a placenta, míg az ICM sejtekből a későbbi újszülött. Az *in vitro* fertilizáció után Petri-csészében jól megfigyelhetők a fejlődő korai embrió morfológiai jellegzetességei, belőle – ha szükséges – néhány sejt a károsodás csekély kockázatával kivehető (pl. genetikai analízis céljából, preimplantation genetic diagnosis, PGD). Az ICM sejtek szeparálhatók és tenyészetben fenntarthatók, mint **pluripotens embrionális őssejtek** (embryonic stem cells, ESC, vagy ES sejtek).

Érdekes itt néhány mondatban kitérni a **toti- és pluripotens kifejezés használatára**. A potencia ez esetben azt a képességet jelöli, hogy hányféle sejté differenciálódhat egy adott sejt. Ha a potenciát a teljes embrióra vonatkoztatjuk, amelybe belértjük a placéntát és a későbbi újszülöttet, akkor csak az a sejt totipotens, amiből mindkétfele utódsejt létrejön. Ilyen sejtek az embrióban a trofoektoderma kialakulása előtt vannak, tehát a korai morula stádiumban. Ilyen értelmezésben az ICM sejtek már csak pluripotensek. Ha azonban csak a későbbi újszülöttre vonatkoztatjuk a potenciát, akkor az ICM sejtek is nevezhetők totipotensnek. Mindkét értelmezésre és szóhasználatra van példa az irodalomban.

¹ Az emlősök hólyagsírájának (*blastula*) neve.



5.8. ábra. A blasztociszta szerkezete

A tenyészetben tartott embrionális őssejtek **genetikailag módosíthatók** akár gének kiütésével vagy beépítésével. A genetikailag manipulált sejtek az ICM sejtek közé visszaültethetők, és további technikák igénybevételével végső soron lehetséges **genetikailag átalakított állatok létrehozása**. A folyamatos tenyészetben tartott pluripotens őssejtek kutatása ma egy kurrens terület, a differenciálódás irányításával kapcsolatban. Fontos szerepe van ennek a kutatási objektumnak a szövetregenerációs folyamatok megértésében és a majdani őssejtterápiás eljárások kifejlesztésében.

A humán embrionális őssejtek izolálását, sejtvonalak létrehozását, kutathatóságát szigorú nemzetközi és nemzeti szabályok alapján végzik a kutatók. A szabályozásban figyelembevett etikai megfontolások arra irányulnak, hogy az emberi személy méltóságát biztosítsák, amely egy nagyon korai ponttól kezdve az emberi embriót is megilleti.

Posztimplantációs stádium

A fejlődési események tanulmányozása a posztimplantációs periódusban **lényegesen nehezebbé** válik, mivel ilyenkor az embriónak már a placentára is szüksége van. Még ma is csekély a tudásunk az anya és a magzat placentán keresztüli kapcsolatáról az embrionális fejlődés során. Ez is oka annak, hogy mind ez ideig nem sikerült a placenta funkcióit *in vitro* ellátó eszközt, módszert kifejleszteni, vagyis **mesterséges placentát** létrehozni.

*Ez régi tárgya pedig az emberi képzeletnek. Aldous Huxley híres utópisztikus regényében, az 1932-ben megjelent Szép új világban (Brave New World) leír egy ipari méretű, embereket előállító üzemet, ahol mesterséges körülmények között, hatalmas üvegedényekben, *in vitro* fejlődnek az embriók egy folyamatos gyártósoron. Ettől szerencsére nagyon messze vagyunk, és szerintem soha nem is leszünk képesek ilyen módon szaporodni.*

A teljes embrionális fejlődést nem tudjuk reprodukálni *in vitro* még az egerek és a patkányok esetében sem, annak ellenére, hogy ezek az embriók kis méretük és kifordult helyzetük² miatt *in vitro* munkára viszonylag kedvezőbb lehetőséget nyújtanak. A **patkány és az egér** a fejlődésük beágyazódást követő középső periódusában olyan szakaszon mennek át, amikor a **dús erezetű szikzacskójuknak nagyobb szerepe van az embrió táplálásában**, mint a placentának. Emiatt ebben a szakaszban a szikzacskóval együtt izolált fejlődő embriók *in vitro* akár több napig is fenntarthatók, és bennük tanulmányozhatók pl. a szervfejlődés lényeges lépései. Technikailag ezt úgy érhetjük el, hogy a méhből kiemelt embrió körül megfelelő médiumot áramoltatunk akár a tartóedény forgatásával, akár pumpa segítségével (perfúzió, vagy szuperfúzió).

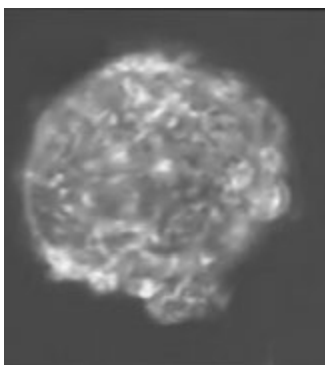
Ha az embrió elég nagy méretű ahhoz, hogy a **köldökerei kanülözhetőek**, akkor ezeken keresztül perfúzió révén életben tartható lényegében bármilyen állat esetében. Természetesen ebben az esetben a perfúziós rendszerekre érvényes korlátozó tényezők válnak meghatározóvá.

² A szóhasználat magyarázatát l. az embriológia tankönyvekben.

Kombinált módszerek

Mivel az *in vitro* kísérletek végső célja az *in vivo* folyamatok teljes bonyolultságukban való megismerése és megértése, nem meglepő, hogy az utóbbi időben növekvő számban végeznek kísérleteket a komplex rendszerek *in vitro* újraépítésére. Sorra születnek olyan módszerek, amelyekkel az egyszerűbb komponensekből bonyolultabb *in vitro* rendszereket hoznak létre, melyek közelebb állnak az *in vivo* állapothoz, a szervezetben lévő háromdimenziós szerkezethez.

Helyre lehet például állítani szövettenyészetekben a sejtek korábban *in vivo* megvolt polaritását³. Az *in vitro* szuszpenzióban tartott, de *in vivo* szoros szöveti kötelékekben egymáshoz tapadva élő sejtek szuszpenziós tenyészetben bizonyos idő múlva újra egymáshoz tapadnak. Ezek az úgynevezett **reaggregációs szuszpenziós kultúrák**, a bennük létrejött sejtaggregátumok pedig az úgynevezett **organoidok vagy szferoidok** (5.9. ábra). A pluripotens embrionális őssejtekből keletkező szferoidokat az angol nyelvű irodalomban az „embryoid body” névvel illetik. Többek között **jól vizsgálható bennük**, hogy hogyan alakulnak ki a sejtkapcsoló szerkezetek, a sejtek közötti kölcsönhatások, a sejtek együttműködése. Napirenden van a **szövetek rekonstrukciója**, intercelluláris mátrix anyagokkal való kombinációjuk létrehozása. Ilyen módon háromdimenziós tenyészeteket alakíthatunk ki. **Kísérletek folynak** a sejtek *in vitro* differenciáltatására, szövetek, szervek *in vitro* kifejlesztésére.



5.9. ábra. Emlő hámsejtek tenyészetéből összeállt szferoid

A legújabb trend az *in vitro* technikák alkalmazásában, hogy egyre nagyobb mértékben jelennek meg a modern molekuláris biológia, immunológia, genetika és fejlődésbiológia új módszereivel való kombinációik. A **folyamatosan növekvő módszertani repertoár** a szövettenyészeti sejtek működésének átmeneti, vagy tartós genetikai befolyásolásától a genetikailag módosított állatok létrehozásán át az ilyen állatokból származó szervek, szövetek, sejtek *in vitro* vizsgálatáig terjed.

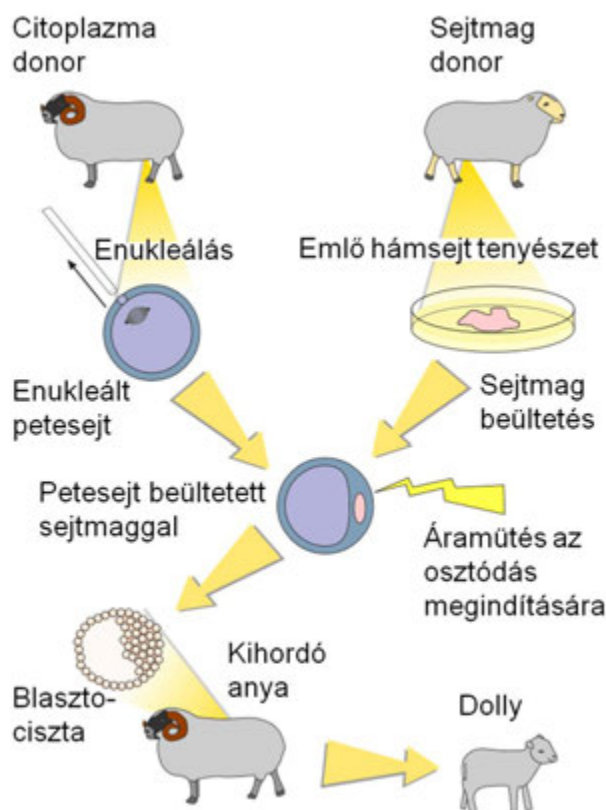
Az egyre szélesedő lehetőségek sok forrásból táplálkoznak. Elméleti alapjukat többek között az 1960-as évek elején békákon végzett kísérletek teremtették meg. Hosszú ideig az embrionális fejlődés nagy kérdése volt, hogy a totipotens zigótától a specializált felnőtt sejtekig zajló differenciálódás vajon visszafordítható-e? John Gurdon brit kutatónak sikerült kimutatnia azt, hogy ha a petesejt saját sejtmagját specializált sejtekből (pl. hámsejtek, neuronok) kivett sejtmaggal helyettesítjük (nukleáris transzplantáció) akkor számos esetben teljes értékű szaporodóképes béka fejlődhet ki belőle. Ezzel bizonyítottá vált egyrészt az, hogy a differenciálódás során nem veszik el genetikai anyag (bár ez alól vannak ritka kivételek), másrészt az is, hogy dedifferenciálódás révén lehetséges a totipotencia visszanyerése. Ezeket az eredményeket csak az 1990-es évek közepén tudták emlősejtekben reprodukálni.

A **nukleáris transzplantáció segítségével való klónozás** révén vált lehetővé vált a híres **Dolly nevű birka** születése (1996–2003). Ian Wilmut skót kutató és az általa felügyelt kutatócsoport egy felnőtt birka emlő hámsejtjeiből készült sejtenyészet sejtjeiből sejtmagokat nyert. Ezeket sejtmagjuktól megfosztott (enukleált) érett petesejtbe ültették. Több száz ilyen transzplantációt végeztek. Az *in vitro* kifejlődött korai (preimplantációs) embriókat hormonálisan előkészített⁴ befogadó anyabirkák méhében ültették. A megindult terhességek nagy része abortuszhoz, vagy súlyos rendellenességgel világra jött újszülötthöz vezetett, de egy közülük teljesen normálisnak mutatkozott.

³ A polaritás kifejezés itt azt jelenti, hogy a sejt egyes régiói és területei (doménjei) eltérő feladatok ellátására differenciálódnak. Tipikus polarizált sejtek a hámsejtek (csúcs-, oldalsó-alapi doménekkel), valamint az idegsejtek (csúcsi doménjük a neurit, alapi doménjük a sejttész és a dendritek). További részleteket l. a sejtbiológia tanulmányokban.

⁴ A részleteket l. az anatómiai és élettani tankönyvekben.

Ez volt Dolly, amelynek megszületése bizonyította, hogy nincs elvi akadálya az emlősök klónozásának egyetlen egyedből származó testi sejtek sejtmagjának enukleált petesejtbe való beültetése révén (5.10. ábra).



5.10. ábra. Az emlősök klónozásának módszere Dolly, a birka példáján.

In vitro technikák kombinációja által létrehozhatók úgynevezett **mozaikos állatok vagy kimérák**. Ezek különböző genetikai készlettel bíró sejtekből, akár két különböző faj sejtjeiből létrejött egyedek (interspecifikus kimérák). Az egyik faj blasztocisztájának ICM sejtjei közé egy másiktól kivett ICM sejtek, vagy tenyésztetben tartott embrionális őssejtek (ES sejtek) injektálhatók. Ha a két faj kellően közeli rokonságban van, akkor az ilyen állat kifejlődve egészséges egyedként élheti életét. Ez a helyzet pl. a kecske-birka kiméra (goat-sheep: geep) esetében.

Amint azt korábban már említettem, a tenyésztetben tartott ES sejtekbe molekuláris módszerekkel gének építhetők be, vagy egyes gének kiüthetők. A **genetikailag módosított ES sejteket** a kimérákéhoz hasonló technikával beültethetjük a blasztociszta ICM sejtjei közé. A beépült sejtekkel fejlődő embriók egy részében a módosított sejtek utódsejtjei bekerülhetnek az **ősivar-sejtek** közé. Ilyen esetben genetikailag módosított ivarsejtek jöhetnek létre, amelyek révén **genetikailag tartósan módosított (transzgénikus) állattörzs** hozható létre.

Az emberi őssejtek embriológiai felhasználásával kapcsolatban rengeteg etikai kérdés vetődik fel. Erről ma is sokrétű és élénk vita folyik, amelynek óriási irodalma van. Ennek eredményei időről időre tudományos és társadalmi-politikai dokumentumokban, sőt törvényekben is megjelennek. A jogi szabályozás bizonyos részleteket illetően akár országról-országra is eltérő lehet. Általános egyetértés van számos kérdésben, pl. állat-ember kimérák létrehozásának, vagy az emberi embriókkal való in vitro kísérletezésnek a tilalmáról.

Az elmúlt évtized közepén Shinya Yamanaka japán kutató és kollégái újabb jelentős eredményt értek el a sejtek *in vitro* differenciálódásának tanulmányozásában. Bőrből származó, tenyésztetben tartott fibroblasztokba ES sejtekben aktív transzkripció faktorokat juttattak. A kezelés hatására a fibroblasztok hasonlóvá váltak az ES sejtekhez, visszanyerték pluripotenciájukat és újra képesek lettek specializált sejtekké differenciálódni. Ezeknek az ún. indukált pluripotens sejteknek (induced Pluripotent Stem cells, iPS sejtek) a létrehozásáért Yamanaka kapta a 2012. évi orvosi Nobel-díjat, John Gurdonnal megosztva, akinek a békákon végzett dedifferenciációs kísérletei az elméleti alapokat fektették le. Az iPS sejtek a kutatás és az alkalmazás területén egyaránt új korszakot nyitnak.

Különösen előnyös sajátosságuk az, hogy alkalmazásukkal kapcsolatban az ES sejtekkel szemben minimálisra csökkennek az etikai problémák.

Az új eredmények alapján egyre lendületesebben fejlődik **egy sokrétű új kutatási és alkalmazási irányzat**, amelyet „Tissue Engineering and Regenerative Medicine” névvel illetnek az angol nyelvű irodalomban. Ez még a fentieknél is többféle diszciplína együttműködésével dolgozik, és elsősorban a gyógyászati iparban való felhasználásra koncentrál. **Ide tartoznak pl.:**

- *in vitro* módszereken alapuló biomedicinális alkalmazások és fejlesztések ipari méretekben;
- biokompatibilis anyagok és bioaktív vegyületek fejlesztése, gyártása;
- genetikailag módosított sejtek szaporítása és felhasználása biológiai hatóanyagok ipari méretű előállítására;
- immundiagnosztikai és terápiás módszerek és eszközök fejlesztése és gyártása;
- őssejtek terápiás felhasználásának fejlesztése szövet- és szervregeneráció céljaira;
- a biomedicinális fejlesztés és ipari tevékenység informatikai hátterének kialakítása.

Szubcelluláris *in vitro* rendszerek

Az eddigiekben ismertetett kísérleti rendszerekben a működési alapegység a sejt volt. Különböző módszerekkel a sejteket, szöveteket szubcelluláris alkotórészeikre is szétbonthatjuk, és a szeparált részeket tovább működtethetjük. Az így létrejött szubcelluláris *in vitro* rendszerekhez képest **az *in vivo* állapotot az intakt sejtek képviselik**. Az általános szóhasználat szerint tehát ha egy szövettenyészet sejtjeiből mitokondrium frakciót hozunk létre, akkor az utóbbihoz képest az előbbi *in vivo* állapotúnak tekintjük. A sejtalkotókat tartalmazó szubcelluláris *in vitro* rendszereket első közelítésben két szintre érdemes osztani, **organelláris és komplex makromolekuláris rendszerekre**. Az utóbbiak már inkább a biokémia tárgykörébe tartoznak.

Maguk a szubcelluláris *in vitro* rendszerek és a létrehozásukra alkalmazott módszerek igen sokfélék, részletesebb ismertetésük messze túlhaladja ennek az összefoglalónak a lehetőségeit. Emiatt csak itt a bevezető részben, rövid összefoglalás formájában foglalkozunk velük.

A **szubcelluláris alkotórészek kinyeréséhez**, a sejtek szétdarabolására használt eljárások lehetnek pl.: a turmixoláshoz hasonló homogenizálásnak nevezett eljárás, ozmotikus sokk (ozmotikus kipukkasztás), ultrahanggal, vagy detergenssel történő dezintegrálás, fagyasztás és felolvasztás. Az összetevőket szintén sokféle módszerrel választhatjuk el egymástól. **Organellumok** esetében leginkább elterjedt a differenciális üleptetés (leggyakrabban centrifugálás). Ennek segítségével pl. elkülöníthetők és így önállóan vizsgálhatók mitokondriumok, Golgi- és endoszómális elemek, lizoszómák, az endoplazmás retikulumból származó membránpreparátum, sejtmagok stb.

Makromolekuláris rendszerek esetében felhasználják a biokémiában alkalmazott szeparációs technikák teljes tárházát, többek között elektroforetikus, kromatográfiás és immunszeparációs módszereket⁵. A szeparált összetevőket megfelelő összetételben, **komplex molekuláris folyamatok** megismerésére vagy akár rutinszerű lebonyolítására használják. Széles körben alkalmazzák pl. a retikulocitából (vörösvértestekből), vagy búzacsírasejtekből izolált *in vitro* transzlációs rendszert, DNS-t és RNS-t sokszorozó, processzáló, proteaszómákat tartalmazó lebontó, apoptotikus folyamatokat⁶ reprodukáló *in vitro* rendszereket.

A szupracelluláris és szubcelluláris *in vitro* rendszerek közege **gyökeresen különbözik egymástól**. Az extracelluláris (intercelluláris) és az intracelluláris térben lévő folyadék összetétele között már az alapvető ionok mennyiségében is hatalmas az eltérés. A legnagyobb különbség a Na⁺ és a K⁺ koncentrációjában van. Az előbbi kicsi intracellulárisan és nagy extracellulárisan, míg az utóbbi esetében fordított a helyzet (VI. táblázat).

A **szubcelluláris rendszerek nem tekinthetők valódi élő rendszereknek**, mivel az életjelenségeknek csak rendkívül szűk körét mutatják. Működési idejük meglehetősen rövid, általában percek vagy órák. Ennek egyik fő oka az, hogy az élő sejtben az organelláris és makromolekuláris komponensek szinte kivétel nélkül a folyamatos keletkezés és pusztulás, megújulás (turnover) állapotában vannak. A turnover fenntartása *in vitro* nem történik meg, mert ehhez a teljes intakt sejtre szükség van. Emellett a szubcelluláris javítórendszerek is csak *in vivo* működnek. Ilyen módon a károsodások okozta hibák gyorsan felszaporodnak és a rendszer működésének leromlásához vezetnek.

⁵ Ezeket részletesen I. a biokémiai és immunológiai tanulmányokban.

⁶ lásd. sejtteni és molekuláris sejtbiológiai tankönyvek.

Az *in vitro* rendszerek működésének általános feltételei

Tisztaság és sterilitás

A szervezetből kiszakított állati testalkotók **nem rendelkeznek a fertőzésekkel szemben megfelelő védekezőmechanizmusokkal**. Emiatt a vírusokkal, baktériumokkal és gombákkal való fertőzés enyhébb esetben befolyásolhatja a kísérleteink eredményeit, súlyosabb esetben pedig teljesen tönkretelheti a munkánkat, és a tenyésztéseink pusztulásához vezethet.

Ha a kísérleti rendszerünket közvetlenül az élő állatból alakítjuk ki, fontos szem előtt tartanunk, hogy a fertőzés legerősebb forrása általában maga a kísérleti állat. Különös figyelmet kell szentelnünk tehát a tisztaságra.

Alapvető kiindulópontként kezelhetjük azt a megfigyelést, hogy amennyiben egy *in vitro* kísérleti rendszerben elindul a bakteriális szaporodás, az már néhány óra múlva káros mennyiséget ér el. A gyakorlati tapasztalatok szerint **két óránál hosszabb ideig működő *in vitro* rendszerrel célszerű steril körülmények között dolgozni**. Emlősök esetében elsődleges fertőzési forrás a szőr. Műtéti jellegű beavatkozások esetén, pl. a mell- vagy a hasüreg felnyitása előtt ennek előzetes leborotválása és a bőr alkohollal való fertőtlenítése ajánlatos. Szerveknek vagy szöveteknek a testből való kivágásakor különösen vigyázni kell a gyomor és a vastagbél sérülésének az elkerülésére. A szerveket és szöveteket célszerű antibiotikum és antimikotikum⁷ keverékét tartalmazó steril fiziológiás oldatba (l. alább) kivenni.

A fejlődés abba az irányba halad, hogy egyre több egyszer használatos steril eszközt gyártanak, mindig maradnak azonban olyanok, amelyeket magunknak kell sterilizálnunk. A tisztaság könnyebb megtartása érdekében érdemes elkülönítetten tartani a rendszeresen egyazon célra használt eszközöket. A sterilizálás előtt deterginstartalmú és mikrobaölő oldatban áztatást, mosogatást, ezután csapvízzel háromszor nagyon alapos öblítést, majd egyszeresen és kétszeresen desztillált vízben való öblítést alkalmazzunk. Szárítószekrényben történő szárítás után célszerű az eszközöket pl. erősebb rostozatú papírba, vagy alumíniumfóliába csomagolni, és ilyen módon helyezni a sterilizátorba.

Az eszközök sterilizálására kísérleti biológiai laboratóriumban általában kétféle módszer áll rendelkezésre: **autoklávozás és hőlég-sterilizálás**. Mindkettőt erre a célra gyártott berendezésben, autoklávban illetve hőlég-sterilizátorban végezzük. A közöttük a sterilizálandó **eszközök hőtűrése alapján** választunk. Ha erről nincs előzetesen biztos tudásunk, akkor célszerű egy minta segítségével próbasterilizálást végezni. Főleg a műanyagokkal kell vigyázni, mivel előfordulhat, hogy akár a hőlég-sterilizátorból, akár az autoklávból deformálódott, összeolvadt, használhatatlan eszközök kerülnek ki. Jó hőtűrő képességűek pl. az üveg- és fémeszközök. Ezeket általában 160–180 °C-on fél, egy órán át tartjuk hőlég-sterilizátorban. Más eszközöket, pl. gumicsöveket, dugókat, műanyag kupakokat, ilyen anyagú kiegészítőkkel ellátott üvegszerkezeteket, pipettacsúcsokat, mágneses keverőbotokat, steril szűrőket, valamint a hőérzékeny komponenseket nem tartalmazó oldatokat autoklávozzunk. Ez nedves környezetben 121 °C-ra, nyomás alatt (100 kPa) történő 20–30 perces felhevítést jelent.

Hőérzékeny összetevőket, hő hatására elbomló vegyületeket tartalmazó oldatokat általában **szűrőssel sterilizálunk**. A rutinszerű eljárás a **0,22 µm pórusátmérőjű** cellulózacetát szűrőlemezen való nyomás, vagy szívás révén való átpréselés. A 0,22 µm lyukméretű szűrő a baktériumok és gombák eltávolítására alkalmas, de nem szűri ki a vírusokat. Ezt a 10 nm-es nagyságrendbe eső részecskéket visszatartó úgynevezett **ultraszűrőkkel** lehet elérni. **Vírusmentesítésre** különösen gyógyászati felhasználású fehérjetermékeknek sejtenyészetek révén történő előállításakor van elengedhetetlenül szükség. Enyhe, de nehezen észlelhető és makacs problémát jelent a sejtenyészetekben a **Mycoplasma fertőzés**, amelynek detektálására és kiirtására különféle cégek kínálnak termékeket.

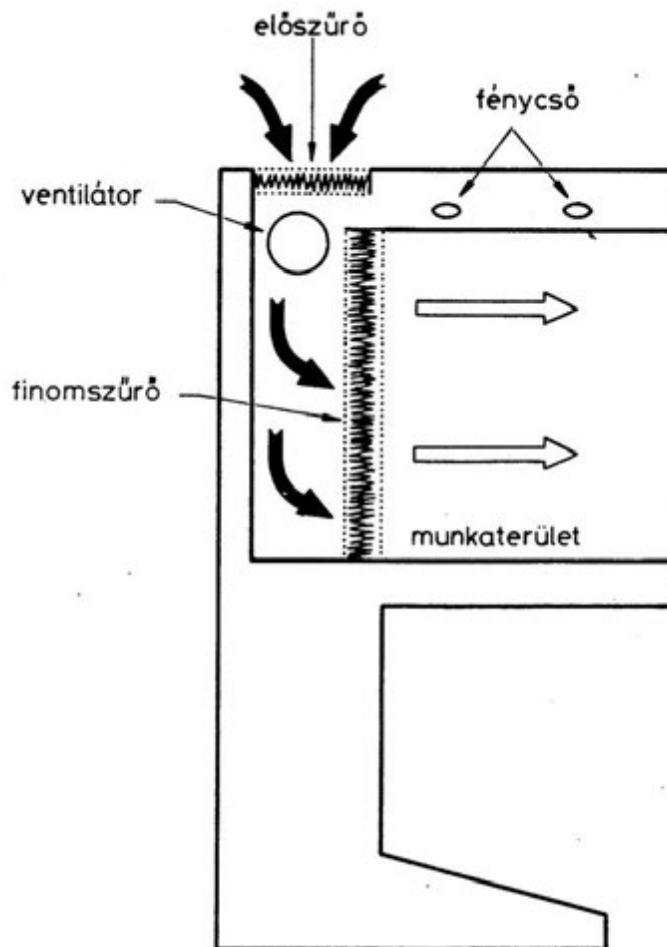
A **sterilizálás különleges módja** a γ-sugárzással való kezelés, amit főként hőre lágyuló műanyag eszközök esetében használnak.

⁷ Baktériumok és gombák szaporodását gátló szerek.

A sterilitás biztosításának módszerei döntő befolyást gyakoroltak az *in vitro* módszerek elterjedésére. Ennek megfelelően az első nagy fellendülés az antibiotikumok tápközegekben való alkalmazásának volt köszönhető az 1940-es években. Még ennél is jobban segítették az *in vitro* módszerek elterjedését az eredetileg mikroelektronikai célokra kifejlesztett levegőszűrő rendszerek. Ezek segítségével feleslegessé vált a korábban fáradságosan fenntartott és nehézkesen működtethető steril szobák alkalmazása.

A levegőszűrő berendezések a biológiai laboratóriumokban leggyakrabban **lamináris boksznak** nevezett **fülkék** formájában jelennek meg. Az úgynevezett **HEPA** (High Efficiency Particulate Air) filteren átszűrt levegő általában nem tartalmaz 0,3 μm -nél nagyobb részecskét. A légáramlás szempontjából alapvetően két fő típusukkal találkozhatunk. A **horizontális bokszt**ban a szűrt levegő hátulról előre, a munkát végzővel szemben áramlik (5.11. és 5.12. ábra). Ez az elrendezés hatékonyan védi a tenyészeteket a fertőzéstől, mindenfajta szennyezés kívülről való bejutásától. Nem védi viszont a dolgozót a tenyészetből származható káros hatásoktól. Az ilyen fülkében végzett munka egyik alapszabálya, hogy nem steril dolgok nem kerülhetnek a nyitott tenyészetek mögé. Az ilyen fülkéket leginkább előkészítő munkára, pl. tápoldatok készítésére érdemes használni.

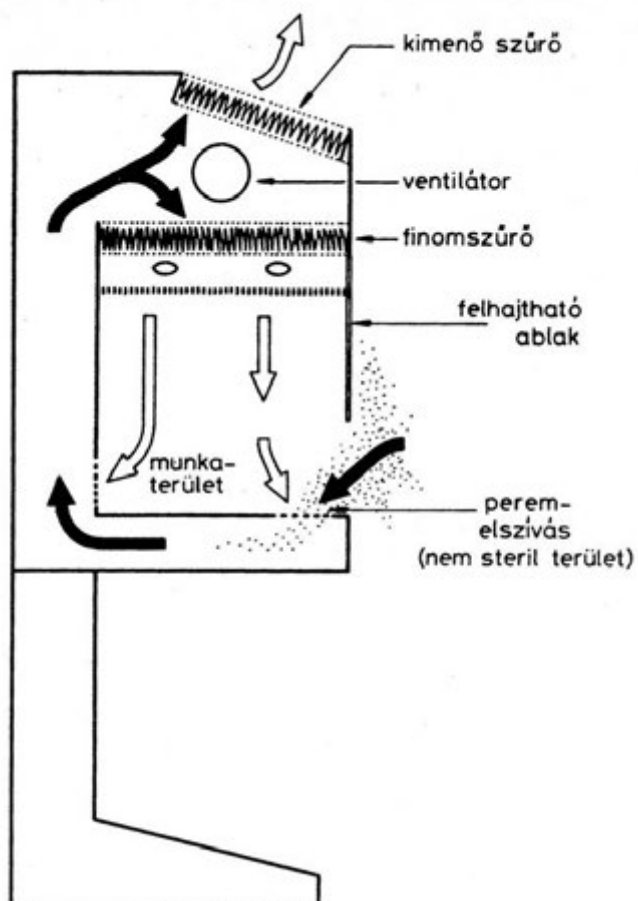
A ténylegesen szövet- és sejtenyészetekkel való munkára, különösen emlős és leginkább főemlős és emberi sejtek esetében ajánlott az úgynevezett **vertikális áramlású fülké** használata. Ezeknek a védetség növekvő mértékét biztosító változatai állnak rendelkezésre azon esetekre, ha tenyészetekben pl. toxikus anyagokat tesztelünk, esetleg bennük kórokozók (pl. vírusok) fordulhatnak elő. Használatukat a veszély mértéke szerint hatóságilag megfogalmazott szabályok írják elő. A legegyszerűbb vertikális fülkében egy félig lehúzott előablak alatt csak a dolgozó keze jut be a steril térbe, és a levegő ki- és beáramlásának megakadályozására a munkaasztal külső pereme mentén nagyobb intenzitású kiegészítő elszívást alkalmaznak (5.13. ábra). Az ilyen bokszt védi a dolgozót attól, hogy pl. a pipettázás, vagy átöntés révén óhatatlanul bekövetkező porlasztással keletkezett apró médiumcseppek a laboratórium levegőjébe vagy belélegzéssel a szervezetébe jussanak. Fokozottabb veszély esetén úgynevezett **bioprotektív bokszt** használata ajánlott. Ennek megemelt pereme és a labor légtere felé nagyobb biztonságot nyújtó szűrője van (5.14. ábra). Ezt a kimenetet a laborból ki is vezethetik. Súlyos veszélyt jelentő ágensekkel vagy szerekkel csak teljesen zárt, speciális elszívással kiegészített fülkében szabad dolgozni (5.15. ábra).



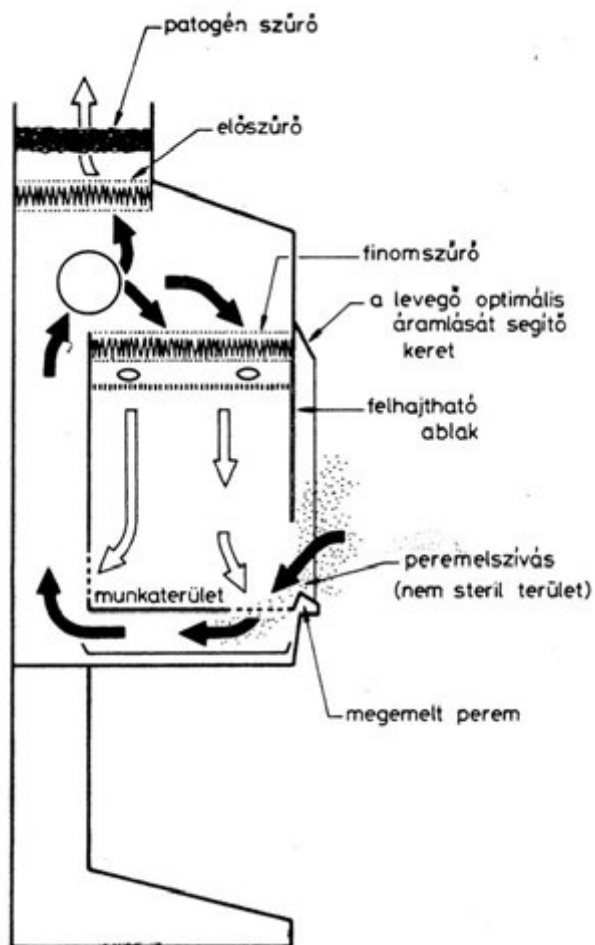
5.11. ábra. Horizontális légáramlású lamináris boks. A sötét nyilak a nem steril, a világosak a szűrt steril levegő áramlását jelzik



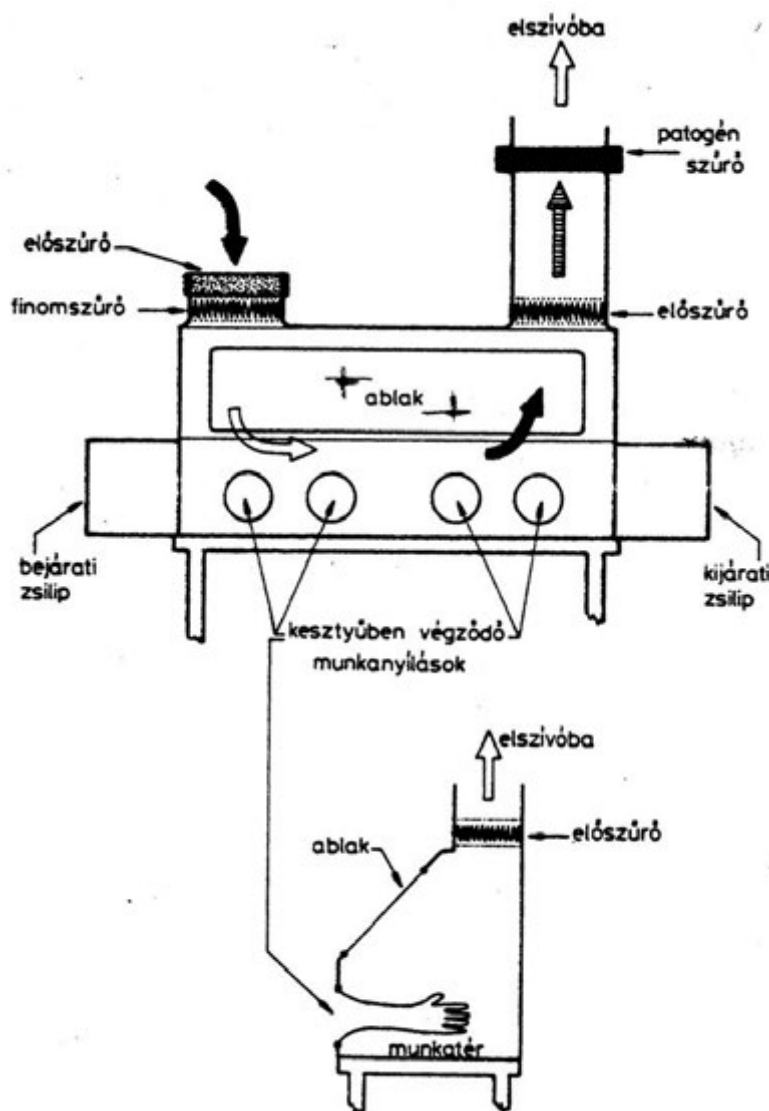
5.12. ábra. Horizontális lamináris boks, benne bal oldalon gázégő égetéses sterilizáláshoz, jobb oldalon kívül nitrogénes palack, nyomással történő szűréshez



5.13. ábra. Vertikális légáramlású lamináris boks. A peremelszívás a káros anyagok fülkéből való kiáramlását akadályozza meg. Sötét nyilak: nem steril levegő, világos nyilak: steril levegő



5.14. ábra. Vertikális légáramlású úgynevezett bioprotektív lamináris boks megemelt peremmel és a kórokozók kijutása elleni patogén szűrővel. Sötét nyilak: nem steril levegő, világos nyilak: steril levegő



5.15. ábra. Teljesen zárt biztonsági fülke előlről (fent) és oldalról (lent)

A hőmérséklet

Az *in vitro* körülmények kiváló lehetőséget biztosítanak a különböző szervekben és szövetekben zajló sejtbiológiai és fiziológiai folyamatok hőmérsékletfüggésének vizsgálatára.

Az *in vitro* kísérleti rendszerünket leggyakrabban olyan hőmérsékleten működtetjük, amely **megegyezik az *in vivo* működésük hőmérsékletével**. A **homoioterm, vagy endoterm állatok** (pl. emlősök, madarak) energiatermelése elég hatékony a viszonylag magas konstans testhőmérséklet fenntartásához. Ez az **emlőssejtek esetében** a legtöbbször 37 °C. Bizonyos szövetek tenyészetei, pl. a bőrből vagy a testisből származó minták számára az alacsonyabb hőmérséklet (30–32 °C) a fiziológiás.

Madaraktól származó sejteket kívánatos lehet 38,5 °C-on tartani. A **többi gerincesből** (hüllők, kételtűek) vagy rovarokból származó szövetek jobban szeretik az alacsonyabb hőfokot, és a legtöbb halból származó sejt számára nem kedvező már a 20 °C fölötti hőmérséklet sem. A hőmérséklet növekedése, akár csak néhány fokkal is, veszélyes és káros lehet. A 40–42 °C már hősokkot jelent, amit a sejtek általában túlélnek, ha nem tart tovább mint 12–24 óra; 45 °C azonban már néhány óra alatt elpusztítja őket.

Általában sokkal jobban tolerálják a sejtek a **hűtést**. A 37 °C-os optimumú tenyészetekben a működés, beleértve a tenyészet növekedését is, 20–22 °C-ig a molekuláris kinetikai paraméterekkel megegyező módon csökken a

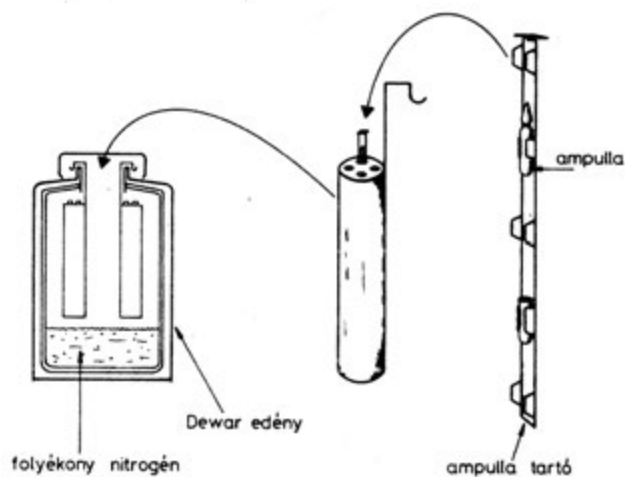
hőmérséklet csökkenésével. Ebben a tartományban hirtelen változás történik a membránfluiditásban, a **membránok mintegy befagynak**. Ez a normális fluiditáshoz kötött membránfunkciók, mint pl. az endocitózis gátlásához vezet. További hűtés után a megmaradó működések ismét molekuláris kinetikai szabályok szerint csökkennek egészen a **vizes közeg fagyásáig**. A hűtés a fagyáspontig általában nem befolyásolja a sejtek életképességét és reverzibilis hatású.

Az **alacsonyabbrendű gerincesek és a gerinctelenek** testhőmérséklete alapvetően a környezetüknek megfelelően változik (poikilotermek vagy ektotermek). A velük való kísérletezéskor tehát a természetes környezet hőmérsékletét kell figyelembe venni. A **heteroterm állatok** olyan endotermek, amelyek a periodikusan változtatott testhőmérsékletüket tartják állandó szinten (pl. a téli álmot alvó állatok télen, a denevérek nappal, a kolibrik éjjel tartják alacsonyabban testük hőmérsékletét). Mindez azzal jár, hogy a membránjaik fluiditását a foszfolipidek zsírsavösszetételének változtatásával módosítják. Érdekes meggondolnunk, hogy pl. a sarkkörhöz közeli vizekben élő halakból származó sejtek tenyésztését a jégszekrény hőmérsékletén kell tartanunk. Éppen azért van a hideg vízben élő halakban sok többszörösen telítetlen zsírsav, mert azok segítségével tartják fenn membránjaik fluiditását.

Az egyszerű fagyás azonnal elpusztítja a sejteket, mivel a nagyméretűre növekvő **jégkristályok irreverzibilisen károsítják a membránokat**. Emiatt találjuk pl. sokkal puhábbnak a felolvasztott fagyasztott húst a friss húsnál. Az úgynevezett **krioprotektív anyagokkal** (pl. glicerin, dimetil-szulfid) elérhetjük, hogy a jég mikrokristályos formában fagyjon meg. Így a membránok épek maradnak, és ha a megfelelően kidolgozott eljárást követjük a fagyasztásra és felolvasztásra, akkor a sejtek újraéleszthetők lesznek. Ez kisebb soksejtűekkel (pl. a fonálféreg, *Caenorhabditis elegans*) is megvalósítható. A fagyásnak természetes élőhelyükön rendszeresen kitett élőlények önmaguk számára termelnek a jégkristályok káros méretűre növekedését kivédő krioprotektív anyagokat. Elvileg **nagyobb állatok esetében** is lehetségesnek látszik a vér teljes testben való lecserélése perfúzió révén krioprotektív anyagot tartalmazó folyadékra. Itt a legnagyobb gondot az jelenti, hogy a vér eltávolítása közben hipoxiás állapot jön létre, ami irreverzibilisen károsítja főként az agyat és a szívet. Hűtéssel elvileg csökkenthető az oxigénigény, amit pl. a szív és a transzplantációhoz használt más donorszerveknél rutinszerűen alkalmaznak. A teljes test és különösen a központi idegrendszer 26 °C alá hűtése azonban komoly veszélyeket rejt magában. Mind ez ideig nem talákoztam olyan tudományos közleménnyel, amely akár egy egér esetében bizonyította volna az állat lefagyasztása utáni sikeres felélesztését.

Rutinszerű viszont a fagyasztás szövet- és sejtenyészetek vagy ivarsejtek és korai, preimplantációs embriók tárolásában. A eljárás, vagyis a **fagyasztással való megőrzés** (cryopreservation) részletei az objektumtól függően változóak, de **néhány általánosan érvényes jellegzetességet** érdemes összefoglalni. A krioprotektív anyagot (5–10%, pontos mennyisége a lefagyasztandó mintától függ) friss médiumban oldjuk. Megfelelő hígításban ebbe juttatjuk a fagyasztandó sejteket. A sejtszuspenziót korábban üvegampullába pipettáztuk, ma már inkább erre a célra készült, csavaros kupakkal ellátott műanyag tárolócsövekbe (cryovials), rendszerint 1 ml körüli térfogatban. A fagyasztást kezdetben (–70 °C-ig) lassan (nagyjából 1–3 °C/perc sebességgel) kell végezni. Az optimum pontos értéke sejttípustól függ, nagyobb objektumokat lassabban kell hűteni. A **pontos hűtési sebesség** biztosításához drága programozható készülékek kaphatók.

Fáradtságosabb és több kockázattal járó, de olcsóbb módszer, ha hőszigetelő anyagba csomagoljuk a mintákat, és így helyezzük –70 °C-os hűtőbe. Erre a célra legjobban bevált az, ha néhány cm vastagságú polisztirol dobozt használunk, és tapasztalati alapon kiválasztjuk a legjobb falvastagságút. Néhány óra múlva a –70 °C-ról egy adapterbe applikálva **folyékony nitrogént tartalmazó tárolóedényekbe** helyezzük a csöveket. Itt hosszú távú, akár évekig tartó tárolásra is mód van (5.16. ábra). A folyékony nitrogén fölötti gáztérben a magasságtól függően –140 – –180 °C-on, míg a nitrogénbe merülve –196 °C-on tárolhatjuk mintáinkat (5.16–5.19. ábra). A felhasználás előtti **felmelegítésnek** a hűtéssel ellentétben gyorsnak kell lennie. A tárolócsövet 37 °C-os vízbe dobjuk, vigyázva, hogy egy esetleges robbanás ne okozzon sérülést. Ez akkor fordulhat elő, ha az edénybe a cső bezárásának hibája miatt folyékony nitrogén jut. Hasznáink védőszemüveget és fedőt a 37 °C-os vízfürdőhöz. A felolvasztott mintát tízszeresre hígítjuk friss tenyésztőoldattal. Mivel a sejtek érzékenyek a krioprotektív anyagra, minél gyorsabban ki kell hígítanunk a fagyasztó médiumot normális médiummal. Centrifugálás után még ezt is cserélni kell, mielőtt megfelelő hígításban a tenyésztést elkezdjük. A folyamatos sejtkultúra használata során figyelni kell hogy mindig megfelelő állapotú (nem túl hosszan tenyésztett, jól tartott, fertőzésmentes) sejteket fagyassunk le megfelelő mennyiségben. A tárolt sejtek megfelelő adminisztrációja is fontos kérdés a sokszor évekkel későbbi felhasználás miatt.



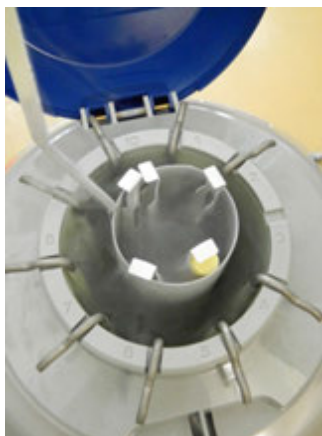
5.16. ábra. A folyékony nitrogénes tároló Dewar-edény és ampullatartó vázlatos rajza



5.17. ábra. A lefedett Dewar-edény, oldalt két füllel a szállításhoz



5.18. ábra. A fedő alatt nagyméretű, lazán illeszkedő dugó található



5.19. ábra. A kiemelt nagyobb átmérőjű tárolóhengerben helyezkednek el a sejteket tartalmazó csövek

Az *in vitro* rendszerek vizes közegeinek alapvető tulajdonságai

A víz

Az *in vitro* rendszerek médiumának legfontosabb komponense a víz. Ha a közegnek akár csak egy részét magunk készítjük, a felhasznált vízzel szemben támasztott alapvető követelmény, hogy **megfelelő tisztaságú** és ezen belül mindenekelőtt **toxikus anyagoktól mentes** legyen. A tapasztalatok szerint a toxikus anyagokat nem tartalmazó üvegből készült desztillálóban háromszorosan desztillált ivóvíz minőségű csapvíz megfelel ennek a követelménynek. Adott körülmények között a rendelkezésre álló víz minőségéből kiindulva a helyi sajátosságoknak megfelelő tisztítási eljárást kell alkalmazni. Ahol nagy tisztaságú vízre nagyobb, pl. üzemi mennyiségben van szükség, esetleg speciális technológiai előírásokat kell követni, ott többféle tisztítási lépésből rendszerré szervezett **víz tisztító rendszereket** használnak. Ebben szerepelhet többek között többféle szűrés, elektromos ionmentesítés, ioncsere, aktív szén kezelés, reverz ozmózis. A kereskedelemben kaphatók komplex víz tisztító berendezések, amelyek laboratóriumi felhasználásra alkalmas különböző minőségű víz kisebb mennyiségben való előállítására alkalmasak.

Fontos megjegyezni, hogy a tiszta víz ugyan elvileg semleges pH-jú, de a laboratóriumban tárolt desztillált vízbe a levegőből CO_2 oldódik be, amitől az **enyhén savassá** válik.

A médiumok két általánosan érvényes alapparamétere: az ozmotikus koncentráció és a pH

A médiumok általánosan fontos paramétere az **ozmotikus koncentrációjuk**. Ennek **értéke** az összes ozmotikusan aktív – tehát hidrárburokkal rendelkező oldott – alkotó koncentrációjától függ. A soksejtűek extracelluláris kompartmentumaira átlagosan jellemző a 295 mOsmol/kg körüli érték. A sejtek meglehetősen jól bírják az ozmotikus koncentráció változását, akár $\pm 20\%$ -os eltérést is képesek károsodás nélkül tolerálni, ha az nem hirtelen történik.

A közeg optimális pH-ja a semlegeshez közel áll, de a legtöbb szövet- és sejt típus esetében általában az igen **enyhén lúgos**, pH 7,2-es értéknél van. A sejtek szaporodásában, metabolikus aktivitásában, morfológiájában és viselkedésében már **néhány tized pH-érték-változás is észlelhető** lehet. Az életképesség változásában általában még nem jelentkező, **tolerálható tartomány** 6,8–7,6 között van. Ezen túli értékek esetében a sejtek pusztulása várható.

A pH stabilan tartását **pufferrendszerek** végzik. Mennyiségileg az egyik legfontosabb a hidrogénkarbonát ($\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$) rendszer, amelynek működése szoros kapcsolatban van a gázfázisban lévő CO_2 mennyiségével. Emellett fontos a hidrogénfoszfát ($\text{PO}_4^{3-}/\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}_3\text{PO}_4$) rendszer is, és szerepet játszik minden olyan molekuláris alkotó, amely protondonorként vagy akceptorként képes viselkedni. Mindkét pufferrendszer *in vivo* is alapvető jelentőségű. *In vitro* sokszor kívánatos lehet a pufferkapacitás olyan mértékű

növelése, ami a természetes pufferekkel már nem valósítható meg. Ebből a célból leginkább a metabolikus szempontból inert, de a semleges pH közeli értéktartományban (7,2–7,8) igen nagy pufferkapacitású **HEPES** (N-[2-hidroxietyl]piperazine-N'[2-etánszulfonsav]) nevű vegyületet használják különböző *in vitro* médiumokban.

A médiumok fő típusai

A legkorábban alkalmazott közegek, kézenfekvő módon, az izolált testrészeknek az élő szervezetben található környezetéből származnak. A természetes testfolyadékoknak valószínűleg az összes fajtáját alkalmazták már médiumként. Vannak közöttük **különleges**, speciális sejttípusok igényeit szolgáló, ritkán használt közegek (pl. szemcsarnokvíz, cerebrospinalis folyadék, a szuszpenziós hasüregi tumor közege /ascites folyadék/). Mások gyakrabban, illetve **általánosan használtak**, úgymint a vér és módosított származékai, a belőle nyert szérum, a nyirok, a vérnyirok (hemolimfa).

A **természetes médiumok előnye**, hogy helyes kiválasztás esetén jól megfelelnek az *in vitro* vizsgált izolált testrészlet igényeinek. Nagy **hátrányuk** viszont, hogy összetételük – rendkívüli bonyolultságuk miatt – pontosan nem ismert. Emellett kinyerésük gyakran fáradságos, tárolásuk nem egyszerű, és felhasználhatóságuk időben korlátozott.

A természetes médiumok hátrányait elvileg kiküszöbölhetjük akkor, ha egyszerű alkotórészekből magunk állítjuk össze az *in vitro* rendszerünk közegét. Az *in vitro* technikákkal dolgozó kutatók régóta törekednek az ilyen **definiált**, vagy más néven „**szintetikus**” médiumok előállítására és használatára. Újabban, a sejtenyészetekkel történő fehérje-előállítás igényei különösen nagy ösztönzést jelentenek a definiált, fehérjementes médiumok fejlesztésére.

Köztes állapotot jelentenek az úgynevezett **részben szintetikus médiumok**, amelyeknek bizonyos részét pontosan meghatározott, kémiaiailag tiszta komponensekből, adott recept alapján állítjuk elő, de kiegészítésképpen valamilyen komplex természetes folyadékot (leggyakrabban szérumot) adunk hozzájuk. A kutatási gyakorlatban az ilyen kevert médiumokat alkalmazzák a leggyakrabban.

A médiumok fejlesztése nagyon munka- és időigényes feladat. Nemcsak a megfelelő komponenseket, hanem azok optimális koncentrációját is meg kell határozni. Az ideális médium összetételének elvileg meg kellene egyeznie a soksejtűek testének egy adott helyén, adott időben lévő mikrokörnyezet összetételével. A mikrokörnyezet összetételét a szervezet állandó kontroll alatt tartja, amely kontroll azonban – a szervezet egészének hiányában – in vitro nem valósulhat meg. Emiatt az in vivo állapot tökéletes rekonstruálása in vitro elvileg nem lehetséges. A közelítésre azonban szintén elvileg korlátlan lehetőség van.

A médiumok komponensei

A bővülő élettani és sejtbiológiai ismeretek, valamint a médiumok összetevőit *in vitro* változtatva szerzett tapasztalatok révén folyamatosan fejlődik a tudásunk az *in vitro* közegek összetételéről és a komponenseik jelentőségéről. Ennek alapján ma már igen sokféle bonyolultságú médium választéka áll rendelkezésre a kutatásokhoz, a gyógyászati és ipari alkalmazásokhoz.

Kiegyensúlyozott sóoldatok, egyszerű médiumok rövid távra

Az *in vitro* munkák során gyakorlati szempontból mindig fontos volt, hogy közegként egy adott célra a **még éppen megfelelő, legegyszerűbb összetételű** oldatot használjuk. Ez a törekvés segítette elő az úgynevezett **kiegyensúlyozott sóoldatok** (angol szakkifejezéssel Balanced Salt Solutions: **BSS**) kialakítását és széles körű alkalmazását. Érdekes, máig tartó hagyomány, hogy a BSS oldatok túlnyomórészt a kifejlesztésükben jeleskedő kutatók nevét viselik.

Az emlősök esetében alkalmazott legegyszerűbb oldat, amely néhány paraméterében hasonlít a természetes közegekhez, a **fiziológiás sóoldat**, amit a XIX. század második felében kezdtek alkalmazni⁸. A fiziológiás sóoldatban csupán az extracelluláris térben legnagyobb mennyiségben jelen lévő két fő szervetlen ion, a Na⁺ és a Cl⁻ található, az viszont megfelelő mennyiségben (154 mM) ahhoz, hogy – a két mennyiségileg legfontosabb ion mellett – biztosítsa a fiziológiás tartományba eső ozmotikus koncentrációt is (VII. táblázat). Nincs viszont az oldat pufferelevé, és emiatt a **pH-értéke könnyen változhat**. A fiziológiás sóoldat **átmeneti médiumként jól alkalmazható** szerveknek, szöveteknek az állatokból való kivételekor a vér kimosására, különösen ha ezt a lépést hűtés mellett,

⁸Ebben az esetben egyetlen személyhez köthető irodalmi hivatkozást sem találtam.

1–2 °C körüli hőmérsékleten hajtjuk végre. Jól használható oldott hatóanyagok különböző médiumokhoz kis térfogatban (a befogadó médium 10%-ánál kisebb mennyiségben) való hozzáadására.

Az 1880-as években Sydney **Ringer** *in vitro* kísérletek során egyszerű oldatokban mutatta ki többek között a K^+ és Ca^{++} ionok jelentőségét az izmok összehúzódásában. Emiatt a kevés komponensű, szervesen ionokat fiziológiás mennyiségben tartalmazó BSS-eket sokszor **Ringer-oldatnak** nevezik. Bennük az ionok koncentrációja pl. emlősök, békák vagy más állatsoportok igényeinek megfelelően változó lehet. Nincs tehát egyetlen eredeti recept, amit az autentikus Ringer-oldatnak tarthatnánk. A Ringer szót időnként már mint köznevet használják és széles körben fordul elő további BSS-ek elnevezésében, gyakran más kutatók nevével együtt (pl. Locke–Ringer, Krebs–Ringer, l. alább).

Frank Spiller **Locke** a XIX–XX. század fordulóján szintén több cikkben publikált adatokat egymástól némileg eltérő összetételű egyszerű fiziológiás oldatokról. A táblázatban példaként szereplő BSS-ben már standard komponens a $NaHCO_3$, ami puffer hatású, ennek az oldatnak a pH-ja tehát már stabil, bár pufferkapacitása nem túl nagy (VII. táblázat).

Maurice Vejux **Tyrode** 1910-ben közölte egy emlősszövetekhez ma is viszonylag gyakran használt BSS leírását (VII. táblázat). Ebben a korábbiakhoz képest több érdekes változtatás történt. A pufferkapacitás növelése érdekében jelentősen megnövelte a HCO_3^- (bikarbonátion) koncentrációját, emellett $H_2PO_4^-$ ionokat is tett az oldatba. Mindkét aniont Na-só formájában vitte be, és emiatt a hiperozmotikus hatás kivédésére lecsökkentette a NaCl mennyiségét. Ez a megoldás később általános módszerré vált; ezt alkalmazzák, ha új komponenseket nagyobb koncentrációban kell az oldathoz adni.

Két további BSS-t érdemes még kiemelni a sok közül, amelyek széles körben elterjedtek és újdonságot hoztak összetételükben és felhasználásukban. Az egyik a Nobel-díjas, Hans **Krebs** által kidolgozott és eredetileg 1932-ben közölt úgynevezett **Krebs–Henseleit-oldat**. Ebben a legnagyobb újdonság az, hogy a pufferkapacitás maximálisra növelése érdekében a fiziológiás érték maximumára emeli a HCO_3^- koncentrációját (VII. táblázat). Ez önmagában véve meglúgosítaná az oldatot. Ezért a Krebs–Henseleit-puffert (az eredeti cikkben társszerzőként szereplő Henseleit nevét gyakran elhagyják, esetleg helyette a bikarbonát, vagy Ringer szerepel a hivatkozásokban) a gázfázisban lévő 5%-nyi CO_2 jelenlétében kell használni ahhoz, hogy a pH semleges legyen. Igen gyakran a Krebs-oldat az alapja a perfúziós és szövettenyésztő médiumoknak. Ilyenkor biztosítani kell, hogy a gázfázisban jelen legyen az 5%-nyi CO_2 . Emiatt használják a szövettenyésztésben széles körben elterjedt úgynevezett **CO_2 termosztátot**. Ebben megfelelő technikai megoldással biztosítják, hogy a hőmérséklet és a páratartalom állandósága mellett a CO_2 szint is állandó legyen a gáztérben.

A másik fontos BSS éppen a nagy CO_2 -tartalmú atmoszféra biztosításával járó technikai nehézségeket igyekszik kiküszöbölni azzal, hogy hidrogénfoszfát pufferrendszert használ. Ezt az oldatot az 1950-es évek első felében a szintén Nobel-díjas Renato **Dulbecco** dolgozta ki virológiai célokra használt tenyészetekhez. Ezzel létrehozta a BSS-ek új családját, amelyek a PBS (phosphate buffered saline) nevet kapták (VII. táblázat). Ezek népszerű alcsaládja a Ca^{++} - és Mg^{++} -mentes PBS. (Dulbecco módosította az Eagle által kidolgozott BME-t /ld. később/, és ezzel elindította a Dulbecco által módosított Eagle-médiumok (DMEM) kifejlesztését.) A foszfáttal puffertelt BSS-ek hátránya, hogy kisebb a pufferkapacitásuk a Krebs–Henseleit-oldaténál, és az előzővel szemben nem készíthetők el és tárolhatók koncentrált formájában, mivel nagyobb koncentráció esetén kalcium- és magnézium-foszfát csapódik ki, amit egyszerű hígítással nem lehet feloldani. Újabban a porokat tablettává összesajtolva formában is árulják a könnyebb tárolás végett.

A Tyrode-, a Krebs- és a Dulbecco-oldatok már tartalmazzák azokat az úgynevezett **fő esszenciális szervesen ionokat** (bulk essential inorganic ions), amelyek nélkülözhetetlenek valamennyi sejt rövid távú normális működéséhez. Ezek a Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , HCO_3^- , HPO_4^{2-} . A SO_4^{2-} csak szulfatálási reakciót igénylő biokémiai folyamatok szempontjából esszenciális (pl. heparán-szulfát szintézise).

VII. táblázat. Néhány BSS oldat összetétele

BSS oldatok						
Komponensek mmol/l	Fiziológiás só	Ringer 1886	Locke 1901	Tyrode 1910	Krebs–Henseleit 1932	Dulbecco 1954
NaCl	154	154	154	137	118	137

KCl		5,6	5,6	2,7	4,7	2,7
CaCl ₂		2,5	2,2	1,8	2,5	0,9
NaHCO ₃			3,6	11,9	25	
MgCl ₂				0,9		0,5
MgSO ₄					1,2	
NaH ₂ PO ₄				0,4		
KH ₂ PO ₄					1,2	1,47
Na ₂ HPO ₄						9,7
Glukóz			5,6	5,6		

A BSS oldatokhoz az **energiatermelés támogatása** érdekében gyakran adnak glukózt. Ennek ellenére aminosavak és több más összetevő hiányában még a glukózzal kiegészített BSS is **éhezési médium**nak számít, amiben a sejtek katabolikus állapotban vannak, saját belső tartalékaikat élik fel, és csak viszonylag rövid ideig (néhány óra) képesek megfelelően működni.

Érdemes még megjegyezni, hogy a kereskedelemben ezeken a történelmi neveken kapható médiumok és porok receptje változó lehet, emiatt minden esetben érdemes ellenőrizni az aktuális termék pontos összetételét. Az elkészült médiumokat, vagy a médiumhoz adott oldott kiegészítéseket természetesen sterilizálni kell. Ez rendszerint szűréssel, vagy gamma sugárzással történik.

Perfúziós közegek

A perfúziós rendszerekben túlnyomórészt **vörös vérszövetek segítségével juttatjuk az oxigént a sejtekhez**. A vér közvetlenül nem használható fel perfúziós médiumként, mivel speciális beavatkozás nélkül megalvad. A **véralvadást** leggyakrabban valamilyen **alvadást gátló szer**, pl. heparin hozzáadásával akadályozzák meg. Ha mellékhatásai (pl. a lipoprotein-lipáz rendszer aktiválása) miatt a heparin alkalmazása nem kívánatos, akkor **defibrinált vért** használhatunk. A vérszövetek az alvadás gátlása ellenére is hajlamosak a perfúziós rendszerekben a kicsapódásra. Ennek ellensúlyozására javasolják a vér 1:1, sőt 1:2, 1:3 arányú **hígítását**. A hígítást BSS-szel, többnyire Krebs–Henseleit-pufferrel, az **oxigenálást** pedig 95% O₂ / 5% CO₂ keverékével (úgynevezett karbogénnel) végzik.

A vérrel való perfúzió során megőrizzük a belső környezet természetességéhez közelebb álló komplexitását. A bonyolult természetes összetétel azonban hátrány is lehet, mivel fontos komponensek mennyiségének változásait lehetetlen kontroll alatt tartani, ami befolyásolhatja az eredmények reprodukálhatóságát. A perfúziós médium fő funkciója az oxigén szállítása. Ezt úgy is el lehet érni, ha **elkülönítjük a vörös vérszöveteket**, és BSS-ben felfuszpendáljuk őket. Mind a vér, mind a vérszövetek származhatnak más fajból, mint a perfundált szerv (**heterológ vér**), ami jelentős könnyebbség. Ilyen módon pl. perfundált patkányszervekhez használhatunk marhavért, vagy a belőle készült vösvérszövet-preparátumot, esetleg lejárt emberi vérkonzervből készült perfúziós folyadékot.

Ödémás duzzadás (oncotic swelling) **elhárítása** érdekében szükségessé válhat pl. albuminnak (1–4%) , és/vagy dextránnak (4–5 %) a médiumhoz adása. Az albumin többek között befolyásolja a zsírsavak hasznosítását és szintézisét. Mivel a felületén sokféle kisebb molekulát képes megkötni, ahonnan azok fokozatosan szabadulnak fel, növeli pl. a toxicitás határértékét.

Hosszú távú tenyészetek komplex médiumai

A hosszú távon működő médiumoknak tartalmazniuk kell a tenyészetben tartott izolált részek számára mindazokat a komponenseket, amelyek **egyenként biztosítják** az energiatermelést, valamint az anabolikus és katabolikus folyamatok megfelelő szintjét. A stacioner állapothoz a lebontó és felépítő folyamatoknak azonos mértékűeknek kell lenniük, míg a növekedéshez az előbbieket túlsúlyba kell tenni.

A tenyészetek felhasználásának kezdetén ezeket a feltételeket csak természetes anyagokkal sikerült teljesíteni. A leggyakrabban használt **természetes médiumok forrása** nem meglepő módon a vér. A diffúzióval oxigenált statikus rendszerekben a **vérszövetek fölöslegesek**, sőt jelenlétük nem kívánatos, mivel zavarják a megfigyelést, és emellett glukózt fogyasztanak.

A vérből két alapvető módon távolíthatók el a vérsejtek. Az egyik az alvadás, aminek révén véralvadék (vérsejtek+fibrin) és szérum keletkezik. A másik, ha az alvadás megelőzve elkülönítjük a vérsejteket (pl. megfelelő vérvétel, gyors hűtés és hűtve centrifugálás segítségével). Így olyan vérplazma jön létre, amely megtartja alvadási képességét. A hagyományos szervtenyészetek úgynevezett félig szilárd (semisolid) táptalaját ilyen plazmából hozzuk létre, homogenizált embrió extraktumának hozzáadásával való megalvasztás után.

A természetes testfolyadékok közül a szövettényésztés számára a **nyirok** lenne a leginkább megfelelő, ennek kinyerése azonban fáradságos. A **teljes tiszta szérum** viszont a tapasztalatok szerint káros hatással van a sejtekre, ezért csak hígítva alkalmazzák. Ennek okát leginkább a toxicitás szintjét elérő **immunreakciókban** látják. A gyakorlati próbálkozások tapasztalatai alapján a **leginkább az olyan médiumok terjedtek el**, amelyek a sejtek számára fontos ismert anyagokból mesterségesen összeállított úgynevezett **szintetikus részből** és a hozzáadott, általában 10%-nyi **szérumból** állnak.

A szövettényésztetek elterjedésének első nagy fellendülését, amelyet technikailag az antibiotikumok 1940-es években való felhasználása alapozott meg, elsősorban a vírusok tenyésztésének igénye ösztönözte. Ennek kiszolgálására számos médiumot fejlesztettek ki, amelyekbe a kor ismereteinek megfelelően és empirikus megfigyelések alapján kerültek a komponensek. Közülük ma is több használatos, és nagyrészt az eredeti recept szerint készülnek, noha 50-60 komponensük egy része a mai tudásunk szerint nem esszenciális.

Az 1950-es években már komoly tapasztalatok gyűltek össze a szövettényésztetekkel való munkában, és felmerült annak az igénye, hogy rendszeres vizsgálatokkal kiderítsék a médiumok összetevőiről, hogy közülük melyek esszenciálisak szövettényésztetben tartott és szaporított sejtek számára. Ezt a munkát elsőként Harry **Eagle** végezte el, és eredményeit 1955-ben, majd 1959-ben a *Science* folyóiratban közölte, ami jól jelzi a munka fontosságát.

Eagle egér fibroblaszt és **HeLa sejteken**⁹ végzett kísérleteivel elsősorban arra koncentrált, hogy kiderítse, hogy mely aminosavak esszenciálisak ezen sejtípusok tenyésztéséhez. Eredményei azt mutatták, hogy **az ember számára esszenciális aminosavak** mindegyikére szükségük volt a sejteknek (ezek az Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val). Ezen kívül a tenyésztett sejtek számára esszenciálisnak bizonyult a Cys, Gln és a Tyr is. Közülük a **Gln különleges** jelentőségű. Az emlősök vérplazmájában az összes aminosav 20%-át teszi ki. *In vivo* sokféle sejtípusban szintetizálódik, ezért táplálkozási szempontból nem esszenciális az emlősök számára. A tenyésztetben tartott sejtek többségének azonban nélkülözhetetlen. Rendszerint közvetlenül felhasználása előtt külön adják hozzá a médiumhoz, mivel tárolás közben elbomolhat.

Az új ismeretek birtokában zajló fejlesztés egyik tartós eredményeként Eagle létrehozott két nagymértékben leegyszerűsített médiumot. Ezek az Eagle féle bazális médium (**Basal Medium of Eagle, BME 1955**), és a minimális esszenciális médium (**Minimum Essential Medium, MEM 1959**). Különösen az utóbbi hatalmas karriert futott be, és még ma is a leggyakrabban használt szövettényésztő médium. Érdemes tehát vele kissé jobban megismerkednünk (VIII. táblázat).

Mint a legtöbb szövettényésztő médiumnak, a MEM-nek is a Krebs–Henseleit BSS az alapja, így benne 25 mM HCO_3^- van, tehát felhasználásakor a semleges pH eléréséhez a gázfázisában biztosítanunk kell 5% CO_2 jelenlétét. Ahogy már említettük, ezért fejlesztették ki a szövettényésztéshez az úgynevezett **szén-dioxid termosztátokat**, amelyek folyamatosan biztosítják a tenyésztett sejtek számára a megfelelő CO_2 -tartalmú gázfázist, ami egyes sejtípusok esetében kisebb és nagyobb is lehet, mint 5%. Bármely szövettényésztő médiumról a receptjében szereplő HCO_3^- koncentráció ismeretében megállapíthatjuk tehát, hogy használatakor kell-e hozzá CO_2 termosztát és azt, hogy a gázfázisban milyen legyen a CO_2 -koncentráció. Az optimális pH 7,2 érték eléréséhez atmoszférikus CO_2 mellett 4 mM, 2% CO_2 mellett 8 mM, 5% CO_2 mellett pedig 25 mM bikarbonát jelenléte szükséges.

VIII. táblázat. A minimális esszenciális médium (MEM) összetétele (Eagle 1959)

Komponensek				
Fő szervetlen ionok	Energia- és szénforrás	Esszenciális aminosavak	Vízoldékony vitaminok	Egyéb
Na^+	glukóz	Arg, Cys, Gln	Tiamin (B1)	kolin
K^+		His, Ile, Leu	Riboflavin (B2)	inozitol

⁹egy méhnyakrákban szenvedő amerikai hölgy, Henrietta Lacks 1951-ben kioperált szervdarabkájából indított és azóta a világ minden táján elterjedt, hámjellegű, folyamatos sejtvonal

Mg ⁺⁺		Lys, Met, Phe	Nikotinamid (B3)	
Cl ⁻		Thr, Trp, Tyr	Pantoténsav (B5)	
HCO ₃ ⁻		Val	Piridoxin (B6)	
H ₂ PO ₄ ⁻			Folsav (B9)	fenolvörös

A BSS fő esszenciális ionjain és az esszenciális aminosavakon kívül a MEM **szintetikus részében a következő anyagok** találhatóak: glukóz, ami szén- és energiaforrás, vízdékony vitaminok, kolin és inozitol. Ezen kívül mint a legtöbb szövettenyésztő oldatba, a MEM-be is tesznek metabolikusan inert **fenolvörös indikátort**, amely semleges pH-n paracitropiros. Az indikátor sárga színe a savasodást jelzi, ami arra utal, hogy a médium kimerülőben van, vagy esetleg bakteriális fertőzés történt. Lúgosodás ritkán fordul elő, ilyenkor a fenolvörös lilás színre vált. Hasznos megemlíteni, hogy mi az, ami a sokkomponensű médiumokhoz képest **hiányzik** a MEM-ből. Először is nincsenek benne nem esszenciális aminosavak. Ezeket a sejtek emiatt kénytelenek esszenciális aminosavakból előállítani, amelyek ezért a lehetséges maximális koncentrációban vannak jelen. Hiányoznak továbbá zsírdékony vitaminok, a szerves nyomelemek és a telítetlen zsírsavak. Ezenkívül természetesen még számtalan ismert és ismeretlen anyag, amelyeket a MEM-hez hozzáadott, rendszerint 10% szérummal viszünk be.

A tenyészetekben használt szérum

A szérum hozzáadásával egyrészt nem ismert anyagok tömegét juttatjuk a médiumba, másrészt az ismertek koncentrációját is ismeretlen mértékben megváltoztatjuk. A **szérum összetételének komplexitásánál** a sejtek működésében játszott szerepének komplexitása jóval nagyobb, mivel a komponensek bonyolult kölcsönhatásban vannak egymással.

A **szérum összetételéről** egyre növekvő mennyiségben állnak rendelkezésre analitikai adatok. A kérdés azonban nem egyszerűen az, hogy mi van a szérumban, hanem sokkal inkább az, hogy ami benne van, annak **mi a szerepe** a tenyészetekben. Ezt újabban úgy igyekeznek megválaszolni, hogy azonosítják a szérum valamilyen komponensét, izolálják és definiált médiumhoz való hozzáadása után elemzik a hatását (l. alább).

Egy 1979-ben megjelent összefoglaló cikk **a szérum szövettenyészetekben kifejtett hatását** 24 pontban sorolja fel. Ezek közül a fontosabbak röviden **összefoglalva a következők**. Tartalmazza a sejtek működéséhez és a tenyészetek növekedéséhez szükséges fő ionokat, nyomelemeket, vitaminokat, kis molekulatömegű tápanyagokat, hormonokat, a sejtek osztódását serkentő növekedési és az aljzatra való tapadást serkentő faktorokat, olyan fehérjéket, amelyek védik a sejteket sokféle eredetű toxikus hatástól; végül proteinázgátló (pl. alfa-antitripszin) aktivitása védi a sejtek integritását.

Ugyanúgy, ahogyan a vér médiumként való felhasználásakor, általában a szérum esetében sem kritikus a fajspecifitás biztosítása. Sokkal nagyobb szerepe van annak, hogy **milyen korú állatból** nyerjük. Gyakorlati okok miatt a szérum esetében is legegyszerűbben hozzáférhető és legolcsóbb a marhaszérum (bovine serum), amely felnőtt állat véréből készül. Emellett elterjedt a humán és a lószérum használata is. A **kor szerinti fokozatok** sorába tartozik a borjúból (calf serum), újszülött borjúból (newborn calf serum) és magzati borjúból (fetal calf serum) nyert szérum.

Ezenkívül a szérumnak számos további, mesterséges módosítások révén született változata ismert, amelyek **speciális célokra** használhatók. Ilyenek pl. a hővel inaktivált szérum, amelyet 56 °C-on történő kezelésnek vetnek alá. Anélkül, hogy elveszne a szérum növekedést serkentő hatása, az enyhe hőkezelés elegendő lehet pl. olyan immunoglobulinok hatástalanítására, amelyek tenyésztett sejtekre toxikus hatást gyakorolnak.

Dializálás révén eltávolíthatók a szérumból a kisebb molekulák. Ez lehetővé teszi azt, hogy a médium szintetikus részében változatlan, tehát pontosan definiált maradjon a kisebb alkotók, ionok, tápláló vegyületek koncentrációja. Megmaradnak viszont a dializált szérumban a fontos szerepet játszó makromolekulák és az általuk támogatott, pl. letapadási és növekedési funkciók.

A szérum a tenyészetek igen nagy része számára mind a mai napig nélkülözhetetlen, és igen sokáig az is marad. Az összetételéről sokmindent tudhatunk, de sohasem mindent. Ez abban is megnyilvánul, hogy a különböző forrásokból származó és hasonló kategóriájú szérumok, sőt ugyanattól a gyártótól származó **ugyanaz a szérumfajta két különböző időpontban beszerzett változata is jelentősen különbözhet egymástól** a tenyészetre gyakorolt hatás szempontjából. Ez szükségessé tesz bizonyos vizsgálatokat. **Az újonnan beszerzett szérumunkat** érdemes az éles felhasználás előtt ismert növekedési dinamikájú sejt vonalon **letesztelni**. Az egy gyártásból beszerzett szérum

(sarzs, batch) adagolását, ha kell, a teszt szerint módosíthatjuk, és ugyanarra a sarzra rutinszerűen alkalmazhatjuk. Az egy sarzból való nagyobb szérumszámú mennyiségét érdemes a rutinfelhasználás mennyiségének megfelelően szétmérni, és lefagyasztva -20 °C-on tárolni. Minden megismételt felolvasztás és lefagyasztás ugyanis csökkenti a hatékonyságát. Újabban kifejlesztettek olyan eljárást is, amely kevert eredetű, reprodukálhatóbb minőségű szérumszámú eredményez.

Szérumszámú- és fehérjementes médiumsok kifejlesztése

A szövettanésztők régi álma, hogy olyan médiumsval dolgozhassanak, amelynek legalább az induláskor pontosan tudják az összetételét mind minőségi, mind mennyiségi szempontból. Ennek révén válhat lehetségessé a különböző komponensek pontos szerepének tisztázása. A szérumsról fentebb mondottak értelmében ezt a célt csak szérums nélküli médiumsok kifejlesztésével érhetjük el. **Egyéb szempontok is indokolják** a szérumsmentes közegek használatát. A szérums egyik sokszor kellemetlen tulajdonsága az, hogy különösen stimulálja a kötőszöveti sejtek (fibroblasztok) szaporodását. Ez megnehezíti a nem kötőszöveti sejtek tenyésztésének kialakítását, mivel a többi sejtneél gyorsabban szaporodó fibroblasztok bizonyos idő múlva kiszorítják őket a tenyésztetből. A jelenség olyan gyakori, hogy **fibroblasztos túlnövés** (fibroblastic overgrowth) kifejezéssel önálló elnevezést kapott. Szérumsmentes médiumsval ez a jelenség megelőzhető. A biotechnológiai iparnak az az ágazata, amely sejttenyészteteket használ fehérjetermészetű anyagok szintézisére, különösen érdekelt abban, hogy szérums-, sőt teljes egészében proteínsmentes médiumsokat használhasson. Ilyen módon ugyanis nagymértékben leegyszerűsíthető a termék tisztítása.

A **médiumsok fejlesztése** ma is nagy erővel folyik, és talán soha nem ér véget. Ennek alapvető oka nyilvánvalóan a soksejtűek belső mikrokörnyezetének óriási időbeli és térbeli változatossága. A **definiált médiumsok kifejlesztésekor két fő kérdés** merül fel. Milyen komponensekre van szükség, és milyen koncentrációban? Már az első kérdésre is elég nehéz válaszolni. A nehézséget még tovább fokozza, hogy az optimális koncentráció minden egyes komponensre nézve függ az összes többi komponens koncentrációjától. Ez pedig kivitelezhetetlen számú (10 komponens esetében 50049) variáció kipróbálásának az igényéhez vezet. Ehhez képest a reális számú próbálkozás nagyon kevés, az elért eredmény pedig közelíti ugyan a célt, de szuboptimális marad, így is lehet persze kielégítő.

*Már az ötvenes évek második felében sikerült egy sejtvonala, az úgynevezett L-sejtek (egér fibroblasztok folyamatos sejtvonala) tenyésztését az NTCT-107 nevű médiumsban megoldani. Talán itt érdemes megemlíteni, hogy a **komplex médiumsok** nevét többnyire rövidítések adják, amelyek jelentése sokszor kideríthetetlen, és ha fáradságos munkával megtaláljuk a forrást, akkor sem sokra megyünk velük, mert többnyire semmitmondóak (pl. M: médiums, F: fibroblaszt, MCDB: Molecular Cellular and Developmental Biology, vagy RPMI: Roswell Park Memorial Institute, CMRL: egy egértörzs neve, stb.).*

A médiumsok fejlesztésében különös jelentősége van a **klónoozhatóságnak**. Az állati sejtek klónoozása különösen nehéz feladat. Általános szabály, hogy minél kevesebb sejtet ültetünk ki, annál nehezebben indul meg a sejtek szaporodása. Ebben valószínűleg annak van a legfontosabb szerepe, hogy maguk a sejtek is termelnek fontos anyagokat, amelyek bejutnak a médiumsba. Ez a folyamat jól ismert a szövettanésztéssel foglalkozók között, és **médiumsokkondicionálásnak** nevezzük. Az a médiums minősíthető tehát egy sejtvonala szempontjából igazán jónak, amelyben sikeresen megvalósítható a klónozás.

A klónoozhatóság fontos szerepet játszott az 1960-as évektől a szérumsmentes médiumsok kifejlesztésében. Richard Ham és munkatársai CHO (kínai hörcsög ovárium, chinese hamster ovary) sejteken dolgozva szisztematikusan csökkentették a tenyésztetekben a szérums mennyiségét, és a médiums egyéb komponensekkel való kiegészítésével, valamint az összetevők arányának módosításával fenntartották a klónoozhatóságot. Munkájuk eredménye az F és az MCDB jelű médiumsorozat, amelyeket ma is széles körben használnak.

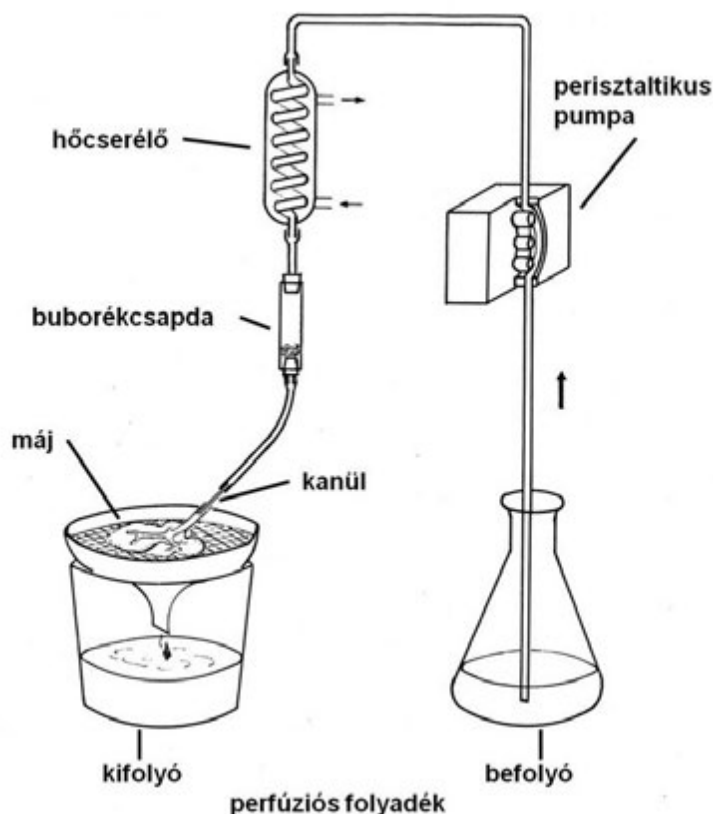
Az MCDB médiumsok kifejlesztése során megszületett **néhány általános tapasztalat**, amelyek ma is érvényesek a szérumsmentes médiumsok kialakításában. Ezek közül a **legfontosabbak a következők**. A szérums helyettesítésében fontos szerepet játszanak egyes hormonok, mindenekelőtt az inzulin, növekedési faktorok (pl. IGF: insulin like growth factor, EGF: epidermal growth factor, NGF: nerve growth factor, stb.), letapadási faktorok (pl. fibronectin, laminin) és transzportfehérjék (pl. transferrin, de bizonyos szempontból ide tartozik az albumin is). Kiderült, hogy a különböző sejtípusok igénye a médiums minőségi és mennyiségi összetételére nézve jelentősen eltérhet egymástól valamint, hogy a primer tenyésztet és a belőlük létrehozott sejtvonala igénye hasonló. Végül ne feledkezzünk meg arról a már említett fontos előnyről, hogy a szérumsmentes médiumsval elkerülhető a fibroblasztos túlnövés.

Érdemes megjegyezni, hogy a médiumsok fejlesztése érdekében végzett munkának különösen fontos eredményei voltak pl. az esszenciális nyomelemek felderítésében, valamint a telítetlenzsírsav- és a vitamínszükséglet részleteinek

tisztázásában. Nagyrészt ezek az eredmények tükröződnek manapság a mindenhol kapható különböző multivitamin-készítmények összetételében.

A perfúziós rendszerek alapvető sajátosságai, néhány gyakrabban használt perfundált szerv

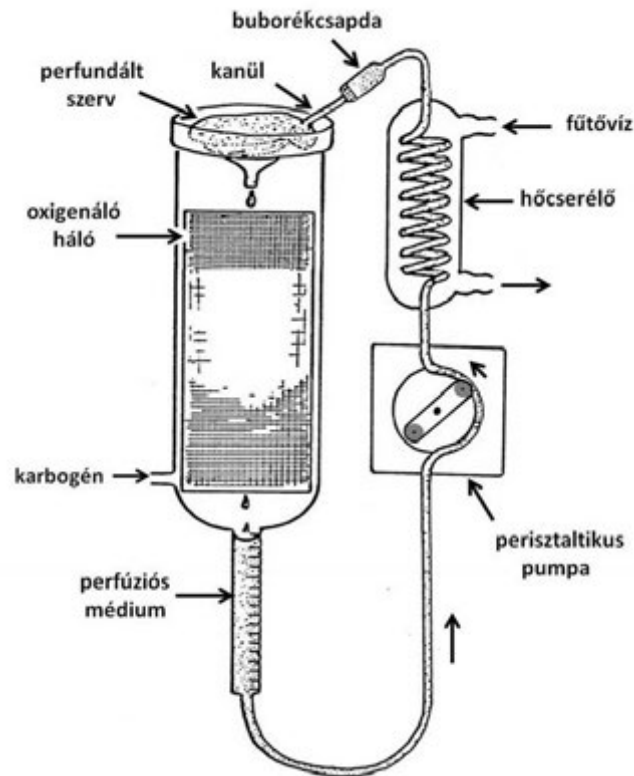
A perfúziós rendszereknek a **médium áramoltatása szempontjából két alapvető típusa** van. Az egyik az úgynevezett **átfolyó rendszer**, amelynek két nyitott vége van, tehát a perfúziós médium csak egyszer halad át rajta (5.20. ábra).



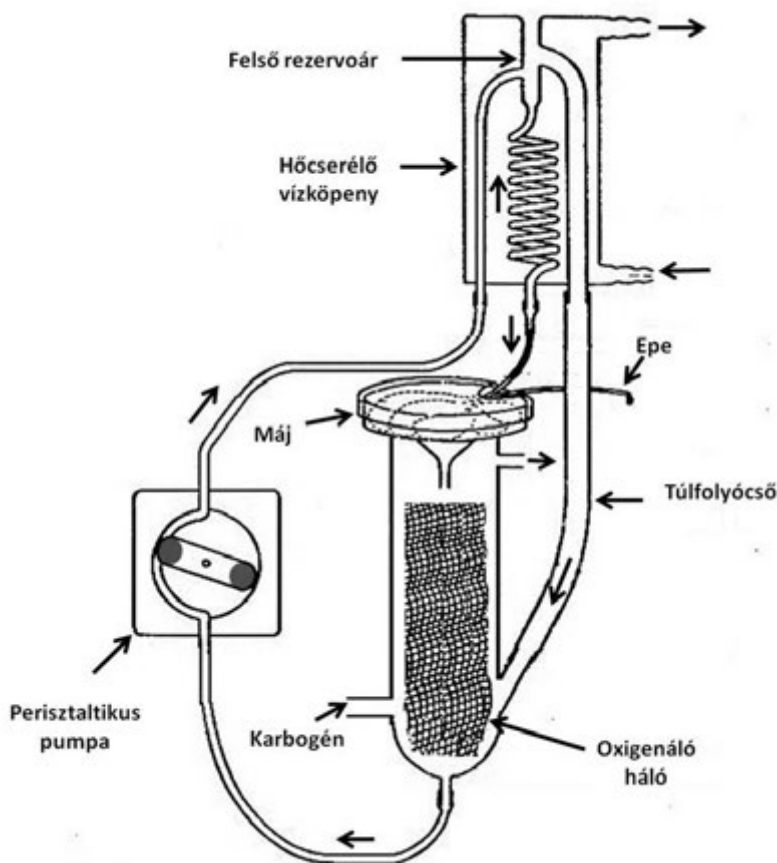
5. 20. ábra. Egyszerű átfolyó perfúziós rendszer. Ha a befolyó perfúziós folyadék előzetesen oxigénnel telített, akkor nincs szükség gázcserét végző egységre

A másikban a perfúziós folyadékot visszaáramoltatjuk a szervbe, ez az úgynevezett **recirkulációs rendszer** (5.21. és 5.22. ábra). Az utóbbi hasonlít az *in vivo* működő keringéshez. Ennek ellenére az átfolyó rendszerben stabil, míg a recirkulációs rendszerben (ha különleges kiegészítő beavatkozást nem végzünk) állandóan változik a médium összetétele. Minden olyan anyag koncentrációja csökken illetve nő, amit a szerv fogyaszt, illetve termel.

A perfúziós rendszerek technikai részleteiket tekintve még ugyanazon szerv esetében is sokfélék lehetnek, **fő elemeik** azonban **hasonlók**. Ezek ellátják a kísérletezéshez szükséges alapvető funkciókat, tehát a perfúziós médium áramoltatását, a termosztálást, az oxigenálást és a buborékmentesítést (5.21. ábra). Az itt bemutatott rendszerek viszonylag egyszerűek, a perfundált szervektől és a kísérletezés céljától függően sokféle módon kiegészített és módosított változatok találhatók az irodalomban.



5.21. ábra. Recirkulációs perfúziós rendszer, melyben a perisztaltikus pumpa, meghatározott áramlási sebességgel, közvetlenül a szervbe juttatja a perfúziós médiumot. A szervbe jutó médium megfelelő hőmérsékletét üvegből készült spirálhűtő biztosítja. A szervből kifolyó médium műanyag hálóra csepeg, amelyen szétterülve nagy felületet biztosít a gázcserére. A gázcsere térbe juttatott karbogént előzetesen átbuborékoltatás révén vízgőzzel telítjük (ez a szerkezet nem látható az ábrán). A szervet tartó rácsos tölcsér tetejéről hiányzik a fedő, amely szintén véd a kiszáradástól



5.22. ábra. Állandó nyomáson működő recirkulációs perfúziós rendszer

A perfúziós médium áramoltatását csaknem kivétel nélkül változtatható sebességű úgynevezett **perfúziós pumpa** segítségével oldják meg. **Két alapvető elrendezés lehetséges.** Az egyik esetben a perfúziós pumpa közvetlenül a szervbe továbbítja a perfúziós folyadékot. Ilyenkor az átáramlás sebessége (ml/perc) állandó. Minden változás, ami a perfundált szerv érrendszerének átteresztőképességében történik (vazokonstrikció, vazodilatáció, esetleg az erek eltömődése), a perfúziós nyomás változásában mutatkozik meg (5.21. ábra). A másik megoldás szerint a pumpa a folyadékot egy, a szerv fölött meghatározott magasságban elhelyezett edénybe (felső rezervoár) juttatja. Onnan a rezervoár folyadékszintje és a szervbe való belépés magasságának különbsége által meghatározott standard hidrosztatikai nyomás révén jut a perfúziós médium az izolált szervbe. Ebben az esetben a perfúziós nyomás állandó, és a fent említett belső változások az áramlási sebesség ingadozásában nyilvánulnak meg (5.22. ábra).

Az oxigenálást túlnyomórészt 95% O₂+5% CO₂ tartalmú **karbogénnek** (carbogen) nevezett gázzal végzik. Ennek fő indoka, hogy a nagyobb O₂-koncentráció korrigálja az esetleges érelzáródások ischémias hatását. Ugyanúgy mint a szövettenyésztő médiumok esetén a CO₂ a perfúziós médium pufferrendszerének is fontos alkotórésze.

*A perfúziós rendszerek alapvető szerepet játszottak és játszanak **szervfiziológiai ismereteink** megszerzésében és bővítésében. Nélkülözhetetlenek a gyógyszerhatóanyagok fejlesztésében, műtéti eljárások, transzplantációs technikák kidolgozásában.*

*A **transzplantációs technika fejlesztésében** fontos szerepet játszik a beültetendő szervek kezelésének optimalizálása a donorból való kivételtől a recipiensbe való beültetésig. A kivett szervet a lehető leghamarabb olyan médiummal kell átperfundálni és olyan körülmények között kell szállítani, hogy maximálisan megtartsa működési képességét. A felhasználhatóság időhatárait szintén pontosan meg kell állapítani.*

A perfundált máj

A máj az egyike a történetileg elsőként vizsgált és a ma is leggyakrabban alkalmazott perfundált szerveknek. Még 1855-ben **Claude Bernard** végzett egy fontos, bár igen kezdetleges májperfúziós kísérletet.

Egyszerűen vizet vezetett egy kísérleti állat (valószínűleg kutya) májába a portális vénán keresztül. Az egész kísérlet csak néhány percig tarthatott, mivel a víz, mint teljes mértékben afiziológias közeg, hamar elpusztította a sejteket. A májvénán keresztül elfolyó vízben mégis glukózt lehetett kimutatni, kiderült tehát, hogy a máj képes glukóz előállítására.

A későbbiekben rendszeresen használták az izolált perfundált májat a szerv működésének vizsgálatára. A módszer széles körben való elterjedésére mégis az 1950-es évekig kellett várni. Ekkor dolgozta ki Leon **Miller** a **patkánymáj perfúziójának módszerét**. Amellett, hogy fontos felfedezéseket tett a plazmaproteinek keletkezéséről, Miller megnyitotta az utat az éppen exponenciális fejlődés előtt álló gyógyszeripar számára, a **drogmetabolizmus hatékony tesztelésére** az izolált-perfundált májban. Az izolált-perfundált máj epevezetékébe is helyezhetünk kanült, aminek segítségével mérhető az epetermelés mértéke, így analizálható az epe összetétele (5.22. ábra).

Egyéb szervek, testtájak, testrészek perfúziós rendszerben

A szív

Izolált perfundált emlősszívét először a német fiziológus Karl (Friedrich, Wilhelm) Ludwig laboratóriumában készítették az 1800-as évek közepén. Sajátos félig in vitro megoldással éltek. Az egyik állat (ahogy említettük, a kor effajta kísérleteihez többnyire kutyát használtak) fejverőeréből vezették a vért egy másik állatból izolált szív koszorúartériáiba. Később ugyancsak Ludwig vezetésével dolgozták ki az izolált-perfundált békaszív-preparátumot. Májig használt megoldást dolgozott ki az 1890-es években Oskar Langendorff.

Az úgynevezett **Langendorff-perfúzió** során az aortába vezetett kanülon át a normális véráramlás irányával szemben, tehát **retrográd módon** pumpáljuk a szívbe a perfúziós médiumot. Mivel a zsebes billentyűk elzárják a folyadék elől a kamrát, így az kizárólag a koszorús erekbe jut. Az ilyen szív pulzál, de mivel a bal kamrába egyáltalán nem, és a jobb kamrába is csak alig jut vér, a szív valódi munkát nem végez. A rendszer átalakítása és kiegészítése révén a bal pitvaron át történő perfundálással kialakítható olyan in vitro szívpreparátum, amelyben tesztelhetők a bal kamra kontrakciójának változásai.

A vese

A vese olyan szerv, amely könnyen perfundálható, mivel egyetlen nagy és jól hozzáférhető artéria vezet hozzá. Az üréterbe kötött kanül segítségével vizelet gyűjthető, mennyisége és összetétele meghatározható. A perfúziós médium a vese esetében gyakran szerves komponensekkel (pl. albumin, dextrán, glukóz, inulin stb.) kiegészített, pontosan meghatározott ionösszetételű, puffertelt izo-oszmotikus BSS.

További szervek

Amint azt a bevezetőben említettem, perfúziós rendszerben tanulmányozható minden olyan szerv vagy testrészlet, amely keringési szempontból izolálható a test többi részétől. Készültek perfúziós preparátumok pl. tüdő, mellékvese, pajzsmirigy, hasnyálmirigy, emlőmirigy, ovárium, placenta, szem, bélszakaszok, végtagok, a test eviszcerált (a zsigerektől megfosztott) hátulsó negyede vagy fele, vagy a szív és a tüdő együttes in vitro (ex vivo) vizsgálatára.

Diffúzióval oxigenált organotipikus rendszerek

Az **organotipikus felépítés megtartása** révén az *in vivo* állapothoz közelebb álló fejlődés és/vagy működés vizsgálatára van lehetőségünk ilyen kísérleti rendszerekben. Embriónális, lárvális szervek, vagy teljes embriók bár korlátozottan, de növekedhetnek és differenciálódhatnak is *in vitro*. Csöves és lemezes szervek esetében, főként, ha azok nagyobb méretű állatból származnak, a kivágáskor a széleken többnyire megbontjuk a természetes

kötőszövetes határt. A tenyészet természetes szerkezetének szétesése itt indul meg, és néhány napon belül már jól észlelhetővé válik. Ha ezeket a felületeket megfelelően az anyagforgalmat biztosító hártyával (pl. cellofán) lefedjük, késleltethetjük a szétesést. Néhány órán át a szövetszeletek is megtartják a szövetekre jellemző felépítésüket. Különösen olyan szövetek (pl. központi idegrendszer) esetén használatos ez a technika, ahol a működés hangsúlyozottan egy adott háromdimenziós szerkezethez kötött.

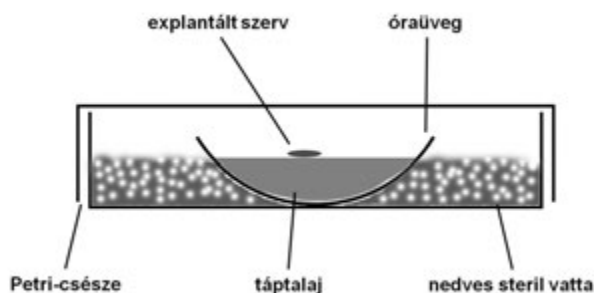
A **maximális méretet**, amely mellett a kivett szerv jól vizsgálható, több tényező határozza meg. Ha a méret túl nagy, akkor a kivett minta közepébe nem jut elég oxigén, és ez a középső rész elhalásához vezet, úgynevezett **centrális nekrozis** lép fel. Ezt mindenképpen érdemes elkerülni, mivel jelentősen befolyásolhatja az eredményeket. Egy kivétel van ez alól, ha éppen a centrális nekrozis folyamatát akarjuk tanulmányozni. Ennek a folyamatnak *in vivo* is nagy jelentősége van **olyan tumorok esetében**, amelyekbe nem nő bele az érrendszer. Ezek is diffúzióval veszik fel az oxigént, és bizonyos nagyság felett középponti részük elhal.

Irányadó lehet, hogy felnőtt egerből kivett szervek esetében az ajánlott nagyság 1–2 mm. Növelhetjük a méretet, ha karbogén gázfázist használunk (95% O₂ / 5% CO₂). Ezt a megoldást **emlőseimbriók és szerveik** esetében nem tanácsos alkalmazni, mivel azok az embrionális keringés miatt csökkent oxigéntartalmú környezetben vannak. Egyes szövetekre nézve (pl. retina) a nagy oxigénkoncentráció akár toxikus is lehet. Emiatt az embrionális tenyészeteket általában csak levegővel oxigenáljuk.

Amellett, hogy az oxigénigény szervenként is változó lehet, érdemes figyelembe vennünk, hogy a nagyobb testű állatok fajlagos oxigénfogyasztása kisebb, belőlük tehát nagyobb méretű részek tarthatók el centrális nekrozis nélkül. Javítható az oxigénellátás olyan tenyésztési technikákkal, ahol a médiumot az objektum körül áramoltatjuk, pl. a tenyészet mozgatásával billegő platformon (rocking platform), görgőcsőben (roller tube, 55-56. ábra), vagy keringetjük perisztaltikus pumpával (perifusion, superfusion).

Szervtenyészetek

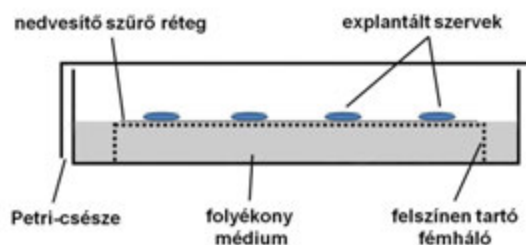
A szervtenyészetek ma is jól használható hagyományos formája az úgynevezett **óraüveg technika** (watchglass technique). A kimetszett szerv (explantátum) egy óraüvegben lévő, félig szilárd táptalajra kerül (plazmaalvadék, vagy tápoldatos agar). Az óraüveget Petri-csészébe helyezük, és steril desztillált vízzel átitatott vattával vesszük körül (5.23. ábra). A páratelt tér megakadályozza a tenyészet kiszáradását. A felületet vékony folyadékfilm fedi, ebbe oldódik bele az oxigén. A félig szilárd táptalaj tápanyagait, valamint a szerv által szintetizált vagy kiválasztott anyagokat ugyanúgy, mint az oxigént, a diffúzió mozgatja a kémiai koncentrációgradienseknek megfelelően a szerv, illetve a táptalaj és a gázfázis irányába.



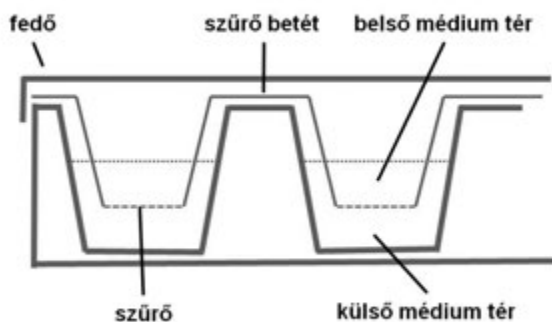
5.23. ábra. Hagományos szervkultúra nedvesített térben, félig szilárd (pl. plazmaalvadék) táptalajon

Az ilyen tenyészetekben a **passzálást** a szerv új, friss táptalajt tartalmazó óraüvegre való áthelyezése jelenti. A folyékony médium esetében kényelmesebb a médiumcsere, mivel a közeg pipettával leszívható. Használatakor biztosítani kell, hogy a szerv a folyadék felszínén maradjon, mivel ez biztosítja az **oxigénhez jutás megfelelő sebességét**. A leggyakrabban alkalmazott megoldás ennek elérésére olyan megfelelő minőségű, toxikus szennyezésektől mentes rozsdamentes acél vagy műanyag rács behelyezése a tenyészedénybe, amelynek magassága éppen megegyezik a médium kívánt szintjével (5.24. ábra). A szerv rendszerint a rácsra helyezett **szűrőre** (pl. polikarbonát) kerül, ami a médiumot felszívja, és biztosítja, hogy az anyagcseréhez szükséges folyadékfilm befedje

a szervet. Az újabban kifejlesztett szűrővel ellátott betétet (filter well insert) tartalmazó tenyészedények szervtenyészetekhez is jól alkalmazhatók (5.25. ábra).



5.24. ábra. Szervtenyészet folyékony médiummal

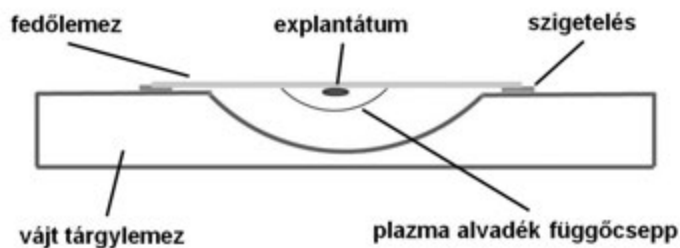


5.25. ábra. Szűrőbetétes soklyukú tenyészedény. A szűrő minőségétől függően a felületére sejtek (monolayer tenyészet) és szervek egyaránt telepíthetők. Epiteliális sejtek telepítése esetén a monolayer tenyészetben újra kialakul a sejtek bazális–apikális polarizációja, mivel a sejtek a letapadási oldalon is kapnak táploldatot

Kiváló megfigyelési lehetőséget biztosít a **függőcsepp technika**, amely könnyen elkészíthető egy vájt tárgylemez és egy fedőlemez segítségével (5.26. ábra).

A szervtenyészetekkel foglalkozó összefoglaló munkákban szereplő többoldalas táblázatok szerint lényegében minden olyan embrionális és felnőtt szervet vizsgáltak ezzel a technikával, ami megfelel a mérettel szemben támasztott követelménynek. Köztük szokatlan objektumok is előfordulnak, mint pl. fogcsírák, szőrtüszők vagy fejlődő szájpad.

Mint minden *in vitro* technika, az új genetikai módszerek térhódítása eredményeként, főként a transzgénikus állatok vizsgálatával, a szervtenyészetek használata is új fellendülést éli.



5.26. ábra. Klasszikus tenyésztetű, függőcepp vájt tárgylemezben, plazmaalvadékkal

Teljes embrió tenyészetek

A modern biológia **robbanásszerű fejlődésének** egyik magyarázata az, hogy a tudomány különböző területein egy időszakban és nagy számban születtek egymást kiegészítő és támogató eredmények. Ennek jó példája a genetika, a szaporodásbiológia és az *in vitro* módszerek új ismereteinek és módszereinek komplex hasznosítása.

In vitro fertilizáció (IVF) és a preimplantációs stádium

A korai kísérletek a megtermékenyítés *in vitro* megvalósítására emlősökben sokáig sikertelenek voltak. Ehhez mind a női, mind a hímivar-sejteket éppen megfelelő érési állapotban és megfelelő összetételű közegben kell egymás mellé juttatni a szervezeten kívül. Ennek feltételeit nem volt könnyű megtalálni. 1951-ben nyúlön és patkányon végzett kísérletek alapján írták le, hogy a spermiumok a kopuláció után a női ivarkészülékben egy **kapacitációnak** nevezett érési folyamaton mennek át, többek között membránjuk változásai és megnövekedett mozgási aktivitásuk révén nyerik el megtermékenyítőképességüket. 1959-ben nyúlban megvalósították az *in vitro* megtermékenyítést (fertilizációt) egy frissen ovulált petesejt és a kopuláció után a méhből kinyert spermiumok segítségével. A létrejött barázdálódó korai embriót megfelelő állapotban lévő méhbe ültetve a terhesség eredményesen végződött. Ezzel bizonyítást nyert, hogy a megtermékenyítés emlősök esetében *in vitro* is megtörténhet.

A preimplantációs embriók tenyésztésére tett kísérletek során kiderült, hogy glukózzal és BSA-val kiegészített Krebs–Henseleit BSS-ben a nyolcsejtes egérembrió blasztocisztává fejlődik, de ugyanebben a médiumban nem történik meg a zigóta első osztódása. Ezt a jelenséget **kétsejtes blokk**nak (two cell block) nevezték el. Úgy látszott, hogy ennek a gátlásnak az áttöréséhez a petevezetőben (*oviductus*ban) lévő mikrokörnyezetre van szükség. További érdekes megfigyelés volt, hogy a zigótával ellentétben a kétsejtes egérembrió képes volt blasztocisztává fejlődni, ha tejsavat adtak a Krebs–Henseleit BSS-hez, ugyanez azonban nem vált be a nyúlban. Az egér esetében kiderült, hogy a piroszölősav, foszogenolpiroszölősav és a citromsav is hatásosan segíti a nyolcsejtes embrió blasztocisztává fejlődését. Újabb megfigyelések azt mutatták, hogy a kétsejtes blokk nem minden egértörzsben érvényesül, és kivédhető EDTA-nak a médiumhoz adásával. További részletek bemutatása nélkül az eddigiekből is érzékelhetők a médiumok fejlesztésével kapcsolatos problémák és lehetőségek.

Az *in vitro* megtermékenyítést **ember esetében** először 1969-ben sikerült elérni. Ebben kulcsfontosságú volt az a megfigyelés, hogy a megtermékenyítéshez a médium pH-ját 7,6 körül kell tartani. Az e célra kialakított médiumokban mind a Graaf-tüszőkből¹⁰ nyert petesejtek, mind a hímivar-sejtek *in vitro* éretté váltak, és megtörtént a megtermékenyítés; az embriók azonban nem fejlődtek tovább a kétsejtes stádiumnál. További többéves munka és számos módosítás után a normális kezdeti osztódást mutató és a méhbe visszaültetett korai embriók révén 1978-ban megszületett az első *in vitro* fertilizáció révén fogant „lombikbébi”, Louise Joy Brown. A munkában végig úttörő szerepet játszó Robert G. **Edwards** brit kutató **2010-ben Nobel-díjat** kapott eredményeiért. Az eljárás tökéletesítése ma is folyik. Az *in vitro* alkalmazott feltételek finomítása mellett fejlesztették pl. az érett petesejthez való hozzájutásnak, az ivarsejtek és korai embriók tárolásának és a méhbe való beültetésnek a módszereit is. Az IVF-en alapuló módszerrel – a becslések szerint – 2012-re több millió gyermek születése vált lehetővé.

Az IVF módszert az emberi fertilitási problémák megoldásán kívül **kiterjedten használják** alap kutatásban, állattenyésztésben és veszélyeztetett emlősfajok megmentésében; természetesen minden esetben az adott faj igényeinek megfelelően módosítva. Az *in vitro* technika fejlesztése a folyamat szakaszaihoz (pl. gaméták kezelése, megtermékenyítés, korai osztódás, blasztociszta stádium) speciálisan alkalmazkodó, egymástól némileg eltérő összetételű médiumsorozat alkalmazása irányába halad. Kiragadott példaként érdemes bemutatni egyet az emberi IVF kivitelezésére kidolgozott oldatsorozatról (IX. táblázat).

IX. táblázat. Médium *in vitro* megtermékenyítéshez (IVF médium)

Komponensek			
Szervetlen sók	Energiaszubsztrátok	Aminosavak	Egyebek
NaCl	Na-piruvát	L-alanin	Taurin
KCl	Ca-laktát	L aszparagin	Ca-pantotenát

¹⁰ Lásd anatómiai tanulmányok.

MgCl ₂	D-glukóz	L aszparaginsav	EDTA
MgSO ₄		Glicin	Gentamycin
NaHCO ₃		L-glutamin (stabilizált)	Humán szérumalbumin
K ₃ PO ₄		L-glutaminsav	
		L-prolin	
		L-szerin	

A blasztociszta stádiumú embriók *in vitro* tanulmányozása és vizsgálatuk technikájának széles körben való elterjedése nyitott utat egy sor újabb *in vitro* technika kifejlesztésére az embriók kísérleti felhasználásában. Ezeknek a bevezetésben már jelzett két fő iránya a pluripotens embrionális őssejt tenyészetek létrehozása és a nukleáris transzplantáció révén történő klónozás.

Teljes embrió tenyészetek a blasztula stádium után

Teljes embriók tenyészetben való vizsgálata nem korlátozódik kizárólag emlősökre. Érdekes módon már az 1890-es évek végén történtek kísérletek a madarak embrionális fejlődésének felderítésére ilyen rendszerekben. Az 1950-es években kiültetett blasztoderma stádiumú csirkeembriókat in vitro körülmények között sikerült eljuttatni a működő keringési rendszer kifejlődéséig. Az in vitro vizsgált madárembriók esetében is kialakult a törekvés a természetes szubsztrátumok illetve médiumok, definiált médiumok felhasználására.

A beágyazódás utáni emlősembriók tanulmányozása – az alapkutatáson túl – nagy gyakorlati jelentőséggel bír a **toxikológiai és teratológiai vizsgálatokban**. Sok olyan gyógyszerhatóanyag, amely nem mutat káros hatást felnőtt szervezetben, súlyos problémát okozhat a fejlődő embrióban.

Ennek egyik példája a thalidomide, ami 1957–1961 ig Contergan néven nyugtatószerként volt kereskedelmi forgalomban. Már a piacra kerülés után egy év múlva ugrásszerűen megnőtt a végtag nélkül vagy csökevényes végtaggal született csecsemők száma. Mire kiderült, hogy a problémát ez a szer okozza, több mint 10 ezer ilyen gyermek született.

A **hatóanyagok preklinikai tesztelése** ma már kötelezően kiterjed az embriológiai rendellenességek kiszűrésére, és ebben fontos szerepet játszanak az egér és a patkány posztimplantációs fejlődési fázisából származó teljes embriótenyészetek.

Az egér (19–21 nap) és a patkány (21–23 nap) vemhességi ideje nagyjából egyforma. Teljes embriók *in vitro* tenyésztése egér esetében kb. 6–13, patkány esetében pedig 8–15 napos vemhességnek megfelelő szakaszra terjed ki. Ezen időszakban kivett embriók *in vitro* kb. **3 napig fejlődnek** az *in vivo*-hoz közelálló módon és sebességgel, tehát a 10. napon kivett embrió *in vitro* 3 nap alatt eljut a 13. napnak megfelelő *in vivo* állapotig, ezt követően azonban egyre fokozódó módon lelassul a fejlődés. Megfelelő mintavétellel ilyen körülmények között is jól vizsgálhatók a szervfejlődés legfontosabb lépései.

A teljesembrió-tenyésztés leggyakrabban forgatott csövekben történik. A médium többnyire szérum, de félig definiált közegek kifejlesztése itt is folyik, és a végső cél a szintetikus médiumok kidolgozása.

Szövetszeletek

Szövetszeleteket igazán komoly eredménnyel Otto Heinrich **Warburg** híres sejtlégzést vizsgáló kísérleteiben használtak először, az 1920-as években. A szeletek hosszú évtizedekig szabad kézzel készültek. A szeletelés technikai eszközeinek fejlesztése ma már lehetővé teszi **néhány száz mikrométernyi vastagságú, pontosan reprodukálható szeletek** készítését. A legújabb eszköz, a rezgő késsel dolgozó úgynevezett vibratom révén agyból olyan szeletek is készíthetők, amelyeken jól reprodukálható elektrofiziológiai adatokat nyerhetünk. Lényegében minden szeletelhető szervből és szövetből nyert mintát vizsgálhatunk.

Az áramoltatott, különösen a keveréssel oxigenált rendszerek élettartama rövid, mert a vágott felszínek az áramlás révén mechanikailag károsodnak. **Hosszabb távú**, akár néhány napos **eltartást** tesz lehetővé, ha a szervtenyészetekben is alkalmazott, már ismertetett módon csupán vékony folyadékfilmmel fedett felszínt biztosítunk az oxigénellátáshoz.

A szövetszeletek vizsgálatára használt **tápadatok sora** a diffúzióval oxigenált rendszerekben használt BSS-ektől a szövettenyészetekben és szervtenyészetekben használt médiumokig tart. Ritkán hozzáférhető kísérleti anyag esetében szükség lehet a szövetszeletek mélyhűtéssel való tartósítására, ami a szövettenyészetek esetében használatos módszerrel lényegében azonos.

Izolált sejtcsoportok, sejtek

A szervek és szövetek sejtekké, kisebb sejtcsoportokká való szétesztelésének (diszpergálásának) célja **olyan szuszpenzió előállítása**, amely kellően homogén ahhoz, hogy belőle reprodukálható módon azonos összetételű kisebb mennyiségeket (alíkvotokat) mérhessünk ki. A létrehozott szuszpenziókat alapvetően kétféle módon használjuk fel. Létrehozhatunk belőlük szövettenyészeteket, és végezhetünk azonnal kísérleteket a frissen izolált sejtekkel.

A szervek és szövetek részekre szedésének módja függ az objektum tulajdonságaitól és az izolálás céljától. A **szövettenyészési célra történő izolálás** esetén kisebb a jelentősége a szuszpenzióban kapott sejtek életképességének. Ilyenkor az izolálás és a vizsgálat között viszonylag sok idő telik el. A tenyésztet kialakulása során az irreverzibilisen károsodott sejtek elpusztulnak. Tőlük a médiumcsere és a passzálás során megszabadulunk. A reverzibilisen károsodott sejtek ugyanakkor visszanyerik teljes életképességüket.

Frissen izolált sejtek szuszpenziójából csak a súlyosan károsodott, erősen duzzadt, vagy részben szétesett sejteket lehet megfelelő hatékonysággal eltávolítani. A gyengébben károsodottak ott maradnak, egy részük a kísérlet során pusztul el, és változó arányuk befolyásolja az eredményeket.

A sejtz izolálás során a sejteket egymáshoz, illetve az intercelluláris állományhoz kapcsoló specializált sejtkapcsoló struktúrákat és nem specializált molekuláris kötéseket kell meglazítanunk, illetve megszüntetnünk. A **sejtz izolálás két fő alaptípusa** a mechanikus és az enzimikus izolálás. Az utóbbiban minden esetben megjelenik a mechanikus hatás valamilyen formája. A sejtkapcsoló szerkezetekben és molekuláris kötésekben fehérjék játszzák a fő szerepet, ezek nagy részének működéséhez Ca^{++} kell. Az izolálás során emiatt nagy jelentősége lehet a Ca^{++} eltávolításának. A sejteket összetartó fehérjéket **proteináz aktivitású enzimekkel** emészthetjük. Közülük a leggyakrabban a tripszint és a kollagenázt alkalmazzák.

Sejtz izolálás szövettenyészési célokra

A sejtek izolálásának legegyszerűbb módja, ha **mechanikai erő** segítségével szeparáljuk őket egymástól. Ilyen módon csak egymáshoz lazán kapcsolódó, vagy már eleve szabadon lévő sejteket tartalmazó szövetekből nyerhetünk megfelelő életképességű szuszpenziót. Ilyenek pl. a lép, nyirokcsomók, embrionális szervek, lágy tumorok és a központi idegrendszer. Az idegszövet esetében az izolálás közben leszakadnak a sejtek nyúlványai, de a plazma membrán túlnyomórészt spontán módon bezárul, ezért a sejtesteket nyerjük ki, amelyek a tenyésztetben megfelelő körülmények között újra nyúlványokat növesztenek.

Az eljárás éles eszközzel (pl. olló, penge) való **feldarabolással** indul, amelynek eredményeképpen néhány mm3-es darabkák keletkeznek. Ezeket csökkenő átmérőjű **fémcszitasorozaton** (pl. 500, 200, 100, 50 μm) préseljük át. A sejtek szétválását segíthetjük, ha Ca^{++} -mentes BSS-t alkalmazunk, amelyben kb. 1 mM EDTA (Ca^{++} -ot és Mg^{++} -ot is köt), illetve EGTA (főleg Ca^{++} -ot köt) van feloldva.

A szövettenyészetek indításának a bevezetőben vázolt explantátum technika mellett leggyakrabban használt módja az úgynevezett **tripszinezés**. Általában 0,25%-os tripszinoldatot használunk, amit Ca^{++} -mentes BSS-ben készítünk el. Ez nemcsak azért fontos, mert a Ca^{++} -megvonás gyengíti a sejtkapcsolatokat, hanem mert jelenléte erősen gátolja a tripszin aktivitását.

A tripszinnel való kezelésnek két fő módja van. Az egyik az úgynevezett **meleg tripszinezés**. Ilyenkor a szövetdarabkákat az erre kialakított üvegedényben (5.27. ábra) enyhe keverés mellett 37°C-on inkubáljuk. Nagyjából 20 percenként megállítva az emésztést, a szövetdarabkákat hagyjuk leülepedni, és a már izolálódott sejteket leöntjük az edény nyakánál lévő kis csövön keresztül (5.27. ábra). A megmaradt szövetdarabkák emésztését friss tripszinoldattal tovább folytatjuk. Ezt a műveletsort 3-4 alkalommal ismételjük. A sejtuszuszpenzióról centrifugális ülepítés után lecseréljük a tripszinoldatot. Az egymás után nyert sejtuszuszpenziókat jeges vízfürdőben tarthatjuk, hogy kizárjuk a hipoxiás károsodást, majd a folyamat végén egyesítjük őket, **életképesség vizsgálatot** végzünk,

és **beállítjuk a szuszpenzió sűrűségét**. Tápfolyadékban való felfuszpendálás után a kívánt sűrűségben tenyészedényekbe pipettázva indíthatjuk el a tenyészetet. Izolált sejtekből indulva nem kell a tenyészet kialakításához a sejtek migrációjára várni, és a nem migráló sejtekből is indítható tenyészet.



5.27. ábra. Tripszinező üvegedény. Leggyakrabban 50–100 ml-es átalakított Erlenmeyer-lombik, amelynek oldala 4–6 helyen be van nyomva, hogy a benne áramló folyadék örvénylését biztosítsa. Az oldatot kis fordulatszámú mágneses keverő mozgatja

A fent leírt tripszinezés közben azért nyerjük ki több menetben a sejteket, mert a tripszin a sejtek felszínén lévő összes fehérjét emészt, nem csak a sejtkapcsoló szerkezetekben szereplőket. Emiatt kívánatos, hogy minél rövidebb ideig legyenek a sejtek aktív tripszin hatásának kitéve. Az úgynevezett **hideg tripszinezést** ennek a problémának a csökkentésére dolgozták ki. Az eljárás során a tripszinező oldatban lévő szövetdarabkákat jégsezkrénybe helyezzük pl. egy éjszakára. Ezalatt a tripszin emésztő hatása minimális, viszont be tud diffundálni a sejtek közé. Másnap 37°C-os vízfürdőbe helyezve a szövetdarabkák belsejében is kifejti emésztő hatását a tripszin, és így akár egyetlen menetben is kinyerhetők lehetnek az izolált sejtek.

Fontos tudnunk, hogy **a tripszin alkalmazásának erős korlátai** vannak. Saját tapasztalataim szerint pl. tripszinnel jó életképességű sejteket nyerhetünk embrionális májból, de a felnőtt máj sejtjei ugyanilyen eljárás hatására kivétel nélkül mind elpusztulnak.

Sejtizolálás céljaira **többféle egyéb enzim** is alkalmaznak. Ezek közül igen hatékony a pronáz, amely bakteriális forrásból nyert aspecifikus proteínáz. Igen agresszív enzim, amely könnyen károsítja a sejteket. További enzimeket többnyire kiegészítésképpen használnak, így pl. kollagenázt, hialuronidázt, diszpázt, DN-ázt. Ezzel kapcsolatban fontos szem előtt tartani, hogy olyan enzimeket nem szabad ugyanazon oldatban együttesen alkalmazni, amelyeknek különböző az ionokkal kapcsolatos igényük. Tehát pl. nem használható együtt tripszin és kollagenáz, mivel az utóbbi csak Ca^{++} jelenléte mellett aktív. A DN-áz használata látszólag irracionális. A szerepe nem is abban van, hogy segíti a sejtek szétválasztását, hanem abban, hogy megakadályozza, hogy a sérült sejtekből kiszabaduló DNS-re kicsapódjanak a már izolált sejtek.

Noha kezdetben valóban kisegítő szerepet játszott a **kollagenáz**, sok szövet és szerv esetében fokozatosan kiszorította az egyéb enzimeket, mivel hatása az általános proteínázokénál specifikusabb, és kevésbé károsítja a sejtek felszínén lévő fehérjét.

Frissen izolált sejtek, sejtcsoportok

Az frissen készült izolátumok felhasználásának előnye, hogy működésük közelebb áll az *in vivo* állapothoz, mint a szövettenyészeteké. Az azonnali felhasználás különösen fontosá teszi, hogy az izolált részek **jó életképességűek** legyenek. Igen jó eredményre vezet, ha az izolálóoldatokat részben vagy egészében perfúzió útján juttatjuk a szervbe.

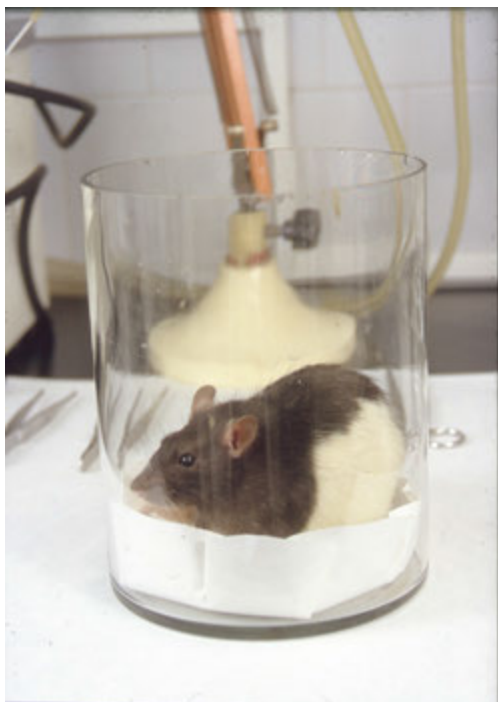
Ebből a szempontból a leginkább elterjedt a **felnőtt patkány májából kollagenáz enzimmel való perfúziós izolálás**, amelyet itt kiemelt példaként részletesebben ismertetek. A módszer sikeres alkalmazásáról 1969-ben közölt cikket Michael Berry, majd a 70-es évek elején azt továbbfejlesztette Per O. Seglen. Az eredmény egy maximálisan leegyszerűsített, könnyen alkalmazható technika, amely azonban kitűnő eredményt ad.

Az **eljárás eszközeit** az 5.28. ábra, lépéseit pedig az ezt követő ábrák mutatják.



5.28.ábra. A májsejtizoláláshoz használt eszközök

1: Ca-mentes puffer (500 ml), 2: perisztaltikus pumpa, 3: hőcserélő, 4: buborécsapda, 5: kanül, 6: hajlítható és forgatható állvány, 7: gömbcsukló (6 és 7 segítségével a kanül bármilyen pozícióba beállítható), 8: keringető termosztát, 9: Ca-tartalmú puffer az izolált sejtekhez, 10: kollagenáz puffer (50 ml), 11: műanyag pohár 250 µm-es szűrőhálójával, 12: Petri-csészék, 13: bonceszközök, 14: sebvarró cérnák és szűrőpapír csíkok, 15: bonctál, 16: éter és az altatáshoz szükséges 10 ml kiméréséhez mérőhenger, 17: patkánypohár és négyrét hajtott szűrőpapírv szintén altatáshoz, 18: lapos tölcsér, benne rozsdamentes fémrács műanyag pohár tetején, 19: altatómaszk, a nyíl mellett csonkolt 1 ml-es pipettacsúcs, 20: fecskendő, benne 300 µl heparin



5.29. ábra. A patkánypohárba helyezett állat nyugodt

A patkányt az éteres altatáshoz tiszta szűrőpapírral bélelt **patkánypohárba** tesszük. Fontos, hogy az edény az állat behelyezése előtt nyomokban se tartalmazzon étert; így az állat nyugodt marad (5.29. ábra).

A patkánypohár tetejére négyrét hajtott szűrőpapírt teszünk, majd arra 10 ml altatáshoz készült tiszta (alt.) étert öntünk. A poharat lapos tárggyal lefedjük. Ezúttal egy későbbi lépéshez előkészített 23 cm átmérőjű Petri-csészét használunk. Mivel az állat érzi, hogy az éter fentről jön, lent marad az edény alján, és nyugodt állapotban alszik el (5.30. ábra). A narkózis akkor kellően mély, ha az edény megdöntésére az állat nem reagál kitámasztó reflexszel, hanem az oldalára gördül.



5.30. ábra. Az altatás

A patkányt a **bonctálba** hanyatt fekvé helyezzük el. A szájüregébe a nyelvét kihúzva a két végén levágott 1 ml-es pipetta csúcsot helyezünk el, hogy a tónusát veszített hátraeső nyelvgyök a légzési utat el ne zárja. A narkózis akkor kellően mély, ha a fark az ábrán látható módon behajlítva marad (5.31. ábra). Az állat ébredésének első jele a fark kiegyenesedése. Ha ez történik, akkor az állatot vissza kell tenni az altatóedénybe.



5.31. ábra. Az állat elhelyezése a bonctálban

Az állat fejére **altatómaszk** kerül, amelyen alul egy nagyobb nyílás van a fejnek, és felül egy kisebb a levegőnek, benne pedig vatta az éter felszívásához (5.32. ábra). Néha bekövetkezhet a légzés megállása, de a maszk levétele után a mellkas két ujjal való ritmikus nyomkodásával az könnyen újraindítható.

A penisvénába 300 µl **heparint** injektálunk (5.33. ábra). Ha a penis az ujjak közül kicsúszik, a szűrőpapírsík két ujjhegynyi darabja közé kell fogni.



5.32. ábra. Az altatómaszk használata



5.33. ábra. A heparininjekció beadása

Ezt követően a **hasfalon keresztirányú, széles metszést** érdemes vágni. Ha sterilen kell dolgoznunk, akkor a metszés leendő helyén a hasfalat le kell borotválnunk alkohollal is fertőtlenítenünk kell. A bal oldalon lévő terjedelmes vastagbélszakaszt és a hozzá kapcsolódó többi bélkacsot a jobb oldalra hajtjuk, hogy előtűnjön a májkapu¹¹.



5.34. ábra. A hasfal megnyitása

A **perfúziós kanül bekötését** a következőképpen végezzük. A májkapu föltárása után hajlított csipesszel a májkapuér (*vena portae hepatis*) alá nyúlunk, csipeszbe fogjuk a sebvarró fonalat, és óvatosan áthúzzuk azt a kapuér alatt (5.35. ábra).

¹¹ Az állat anatómiai felépítésével kapcsolatban l. az anatómiai tanulmányokat.

Az áthúzott fonálra laza hurkot kötünk a kanül későbbi bekötésének előkészítésére (5.36. ábra, jobb felső kinagyítás). A mozgatható állvány segítségével megfelelő pozícióba helyezzük a kanült, és megindítjuk a perfúziós pumpát. Ezután hajlított szeméscollóval félig bemetsszük a hátulsó üres fővénát, a *vena cava posteriort* (5.36. ábra, bal alsó kinagyítás, nyíl), majd rögtön ezután a portális vénát (jobb felső kinagyítás, nyíl). Ebbe a nyílásba juttatjuk a kanült, és az előkészített hurokkal bekötjük azt a *v. portae hepatis*ba.



5.35. ábra. A sebvarró fonál kapuér alatti áthúzása: a jobb felső, kinagyított részleten látható a kapuér alatt átbújtatott csipesz összezárt szárainak hegye



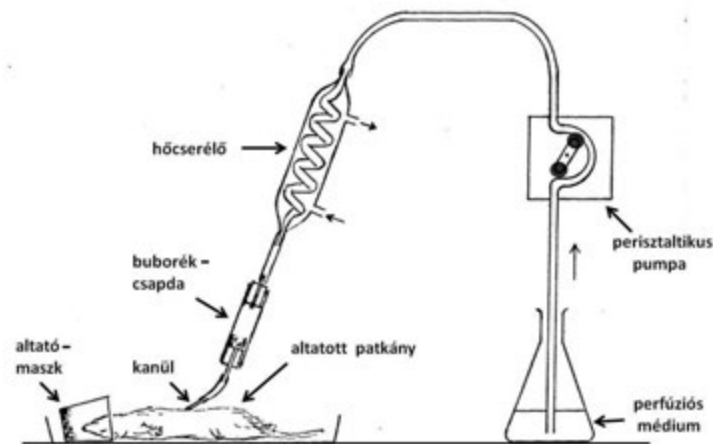
5.36. ábra. Laza hurok a kapuér körül a kanül bekötéséhez (jobb felső, kinagyított részlet, az érre nyíl mutat), valamint a *v. cava posterioron* ejtett bemetszés (bal alsó részlet, nyíl)

A **bekötött perfúzió** már néhány másodperc alatt kimossa a vért a májból, ezért az a továbbiakban a saját sárgásbarna színében tűnik fel (5.37. ábra). Folytatódó perfúzió mellett vágással kiszabadítjuk a májat a hashártya lemezei közül. Az átfolyó rendszerű *in situ* perfúziót és az izolált perfúziót HEPES-sel **pufferelt, Ca⁺⁺-mentes BSS** segítségével végezzük a sejtkapcsoló szerkezetek meglazítása érdekében.



5.37. ábra. A perfúzió már néhány másodperc alatt kimossa a vért a májból, ezért az a továbbiakban a saját sárgásbarna színében tűnik fel

Az *in situ* perfúziós rendszerben – a felhasználás jellegétől függően – a perfúziós médium lehet oxigenált vér vagy vérpótlék éppúgy, mint pl. BSS (sejtizolálás esetén BSS-t használunk). Ilyenkor nincs szükség gázcsereegységre, mivel az átfolyt vért nem vezetjük vissza a perfundált szervbe (5.38. ábra).



5.38. ábra. Az egyszerű átfolyó rendszerű *in situ* perfúziós rendszer vázlatos rajza

Az állatból kivett májat a hajlítható állvány segítségével mozgatva ráhelyezzük a lapos tölcsérben lévő rozsdamentes acélhálóra (5.39. és 5.40. ábra). A tölcsérre helyezett acélhálóval **átfolyó rendszerű izolált-perfundált rendszert** hoztunk létre. A szerv áttemelése közben a Ca-ionok kimosását szolgáló perfúzió folyamatosan működik (összesen tíz percen át tart, miközben a májon 500 ml puffert áramoltatunk át).

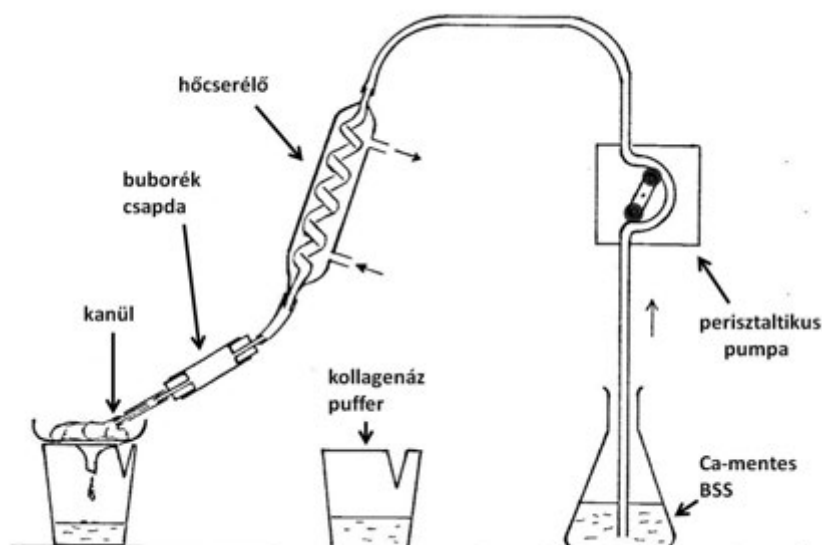


5.39. ábra. Az állatból kivágott máj a kanülön függ a lapos tölcsérben lévő rozsdamentes acélháló fölött

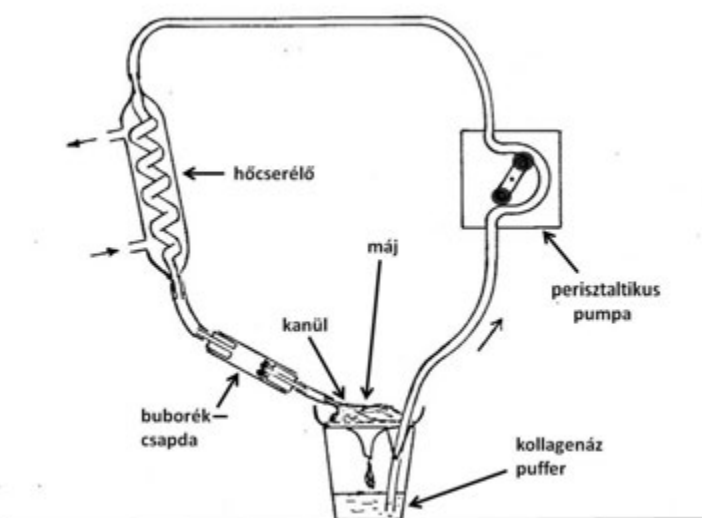


5.40. ábra. Az átfolyó rendszerű izolált-perfundált rendszer, folyamatosan fenntartott perfúzióval

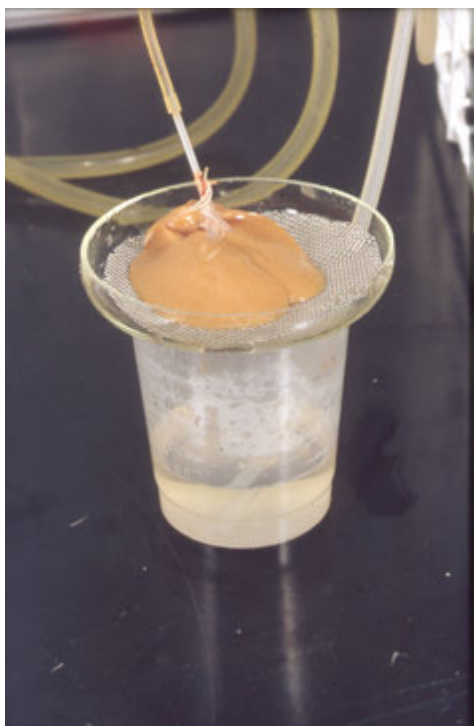
A tíz perces Ca^{++} -mentesítő perfúzió leteltével néhány másodpercre leállítjuk a perisztaltikus pumpát, és az átfolyó rendszert **recirkulációssá alakítjuk át**. A Ca^{++} -mentes BSS edényéből a beszívócsövet és a májat egyaránt egy-egy mozdulattal áthelyezzük a **kollagenáz** puffert tartalmazó műanyag pohárba, illetve pohárba (5.41.–5.43. ábra).



5.41. ábra. Az átfolyó rendszer recirkulációssá való átalakításához a Ca^{++} -mentes BSS edényéből a beszívócsövet és a májat egyaránt egy-egy mozdulattal áthelyezzük a kollagenáz puffert tartalmazó műanyag pohárba, illetve pohárba



5.42. ábra. A kollagenázos emésztéshez használt recirkulációs perfúziós rendszer vázlata



5.43. ábra. A perfundált máj a recirkulációs kollagenázos emésztés fázisában

A **recirkulációs rendszerben** újraindítjuk a perfúziót, és ismét 10 percen át 0,05%-nyi kollagenázt tartalmazó puffert áramoltatunk át a szervén. A kollagenáztartalmú BSS Ca^{++} -ot tartalmaz, ami szükséges a kollagenáz aktivitásához. Ennek ellenére a Ca^{++} -függő sejtkapcsolatok nem állnak helyre, mert irreverzibilisen meglazultak. Ennek révén a kollagenáz a sejtek közé jut, és az emésztés hatására a sejtek egymáshoz tapadása nagyon meggyengül.

A teljes folyamat során a perfúziós áramlási sebesség egy felnőtt, 350–400 g-os patkányból származó máj esetén 50 ml/perc. Ez nagyjából háromszorosa az *in vivo* véráramlási sebességnek.

A máj a kollagenázkezelés hatására megduzzad. A **kanülről való levétel után** Petri-csészében lévő Ca^{++} tartalmú BSS-be kerül. Ott ritka fogú kutyafésűvel feltépjük a kapszulát, és „kifésüljük” a sejteket az érhálózathoz (5.44. ábra).



5.44. ábra. A sejtek Ca^{++} -tartalmú BSS-be történő „kifésülése”

Jól sikerült izolálás esetén az egész máj sejtekre, illetve néhány sejtes sejtcsoportokra esik szét, és a csipeszben csak a nagy erek hálózata marad (5.45. ábra).



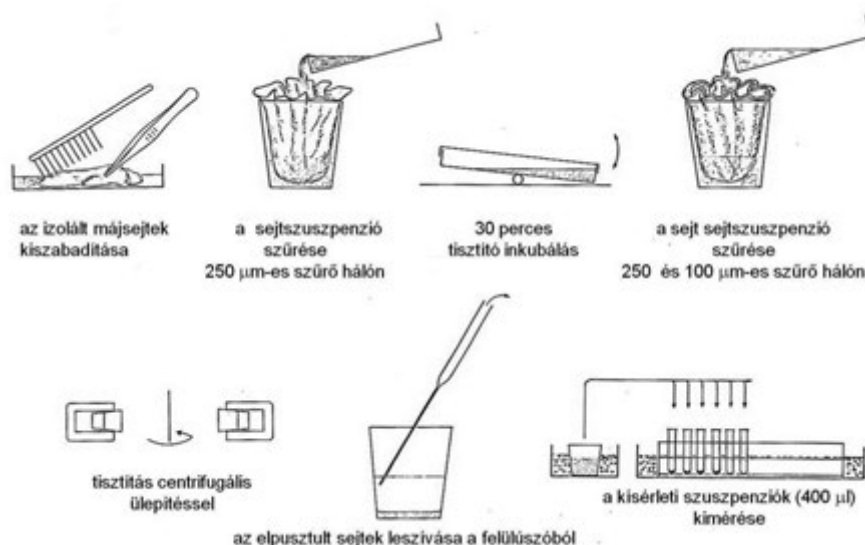
5.45. ábra. Jól sikerült izolálás esetén a csipeszben csak a nagy erek hálózata marad

A keletkezett sejtuszpenziót 250 µm lyukméretű szűrőn **átszűrjük**, majd 30 percig enyhe mozgatás mellett **37°C-on** nagy Petri-csészében **inkubáljuk** (5.46. ábra). Ebben a fázisban az irreverzibilisen károsodott sejtek elpusztulnak, az enyhén károsodottak reparálódnak. **Újabb szűrés** következik, ezúttal 100 µm lyukméretű szűrőn, az esetleg összetapadva maradt nagyobb sejtcsoportok kiküszöbölésére, ami biztosítja a **uszpenzió homogenitását**. A duzzadt, elpusztult sejtek sűrűsége kisebb, ezért elég jó hatékonysággal elkülöníthetjük őket centrifugális ülepítéssel.

Ezt követően **életképesség-vizsgálatot** végzünk. Erre a célra leginkább elterjedt a BSS-ben oldott 0,2 %-os **tripánkék** oldattal való festés. Az életképes sejtek nem festődnek, a károsodottaknak először a sejtmagja, majd a citoplazmája is kék színben tűnik fel.

A **fent leírt módszerrel** 90% feletti életképességű sejt uszpenziók is nyerhetők. A gyakorlati tapasztalatok szerint 80% feletti életképességű uszpenziókkal még reprodukálható eredmények érhetők el.

A standard módszer szerint a kísérletekhez ezután 400 µl-nyi térfogatban mérünk ki sejteket standard rövidkémcsőbe (5.46. ábra).



5.46. ábra. Az izolált májsejtek szuszpenziójának tisztítása és a kísérleti minták kimérése

Az ilyen **szuszpenziók sűrűségét** a legkönnyebben **nedves tömegméréssel** állíthatjuk be. Ezt úgy végezzük, hogy előre lemerített kémcsövekbe pipettázunk 100 µl-nyi szuszpenziót, majd centrifugálás és a felülúszó leszívása után az üledékkel együtt újra lemerjük a kémcsöveket. A sejtsűrűséget a kémcsöves kísérletekben 50–100 mg/ml-re állítjuk. A csövekbe 400 µl szuszpenziót mérünk, és 37 °C-on, pl. vízfürdőben rotációs mozgattal rázatjuk őket a megfelelő oxigenálás biztosítására. Ilyenkor a sejtek együtt áramlanak a médiummal, és így kevésbé károsodnak; velük 2–2,5 óra hosszúságú kísérleteket lehet végezni. Ilyen módon egyetlen májból sok száz párhuzamos mintát is készíthetünk, de egy személy számára már 100 cső kezelése is bőven elég munkát ad.

A **kis térfogat** miatt a rendszer igen gazdaságosan használható. A médium a vizsgálat igényeihez igazodhat, legegyszerűbb esetben lehet pl. HEPES-sel puffertelt BSS. A csövek feltöltésével és dugóval való lezárásával bármilyen összetételű gázfázist is egyszerűen biztosíthatunk.

Ilyen rendszerben **kitűnően vizsgálhatók** pl. metabolikus folyamatok, toxikus hatások, fehérjeszintézis, fehérjelebontás stb.

A fenti módszer érdekes módosítása révén műtétek során eltávolított emberi májdarabokból is nyerhetünk izolált sejteket. A máj vágott felszínén talált nagyobb érbe vezethetjük a kanült, amin keresztül a csatlakozó érelágazással behálózott májrész átfundálható.

A perfúziós izolálási technika kisebb-nagyobb módosításokkal **minden perfúziós rendszerben működtethető szerv esetében alkalmazható**.

Szövet- és sejtenyészetek

A tenyésztés körülményei

A bevezetésben kiemelten foglalkoztam olyan tényezőkkel, amelyek általánosan vonatkoznak az összes *in vitro* rendszerre. Ezúttal olyan feltételekről lesz szó, amelyek a szövet- és sejtenyészetek speciális igényeivel függnek össze.

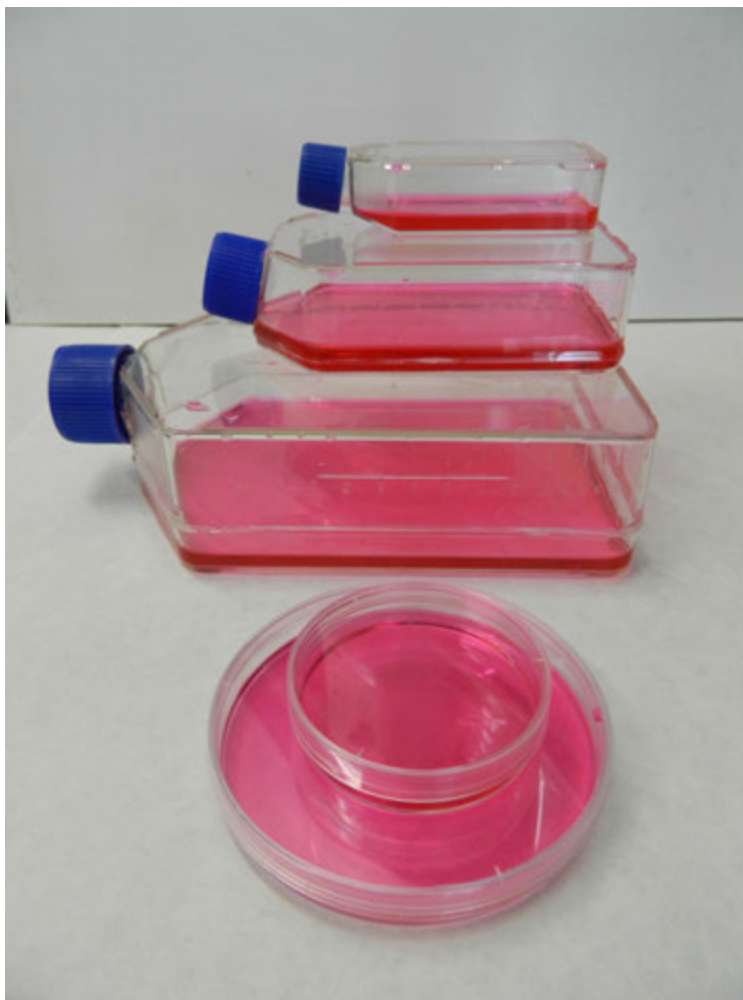
A szövet és sejtenyészetek két alapvető típusa, a monolayer és a szuszpenziós tenyészet alapvetően eltér egymástól a **tenyészedények** tekintetében. Mindkettőre általánosan érvényes megállapítás talán az lehet, hogy amíg korábban boroszilikát üvegedényeket használtak (ezek az úgynevezett nátriumüveghez képest sokkal kevesebb toxikus anyagot tartalmaznak), manapság már túlnyomórészt polisztirolból készült, **eldobható edényeket** alkalmaznak.

A **monolayer tenyészetek** alapvető igénye, hogy **letapadásra alkalmas** hidrofil felület álljon a sejtek rendelkezésére. Az üvegfelület már önmagában ilyen, ha kellően tiszta, akkor arra a sejtek képesek kitapadni. A polisztirol azonban közvetlenül a gyártás után hidrofób, és további kezelés hiányában csak mikrobiológiai tenyészetekhez alkalmazható. Monolayer tenyészetek céljait szolgáló edényeket a katalógusokban a „TC quality” (tissue culture quality) jelzéssel illetik. Ez azt jelenti, hogy a **tenyészfelszín** rendszerint glim-kisüléssel **hidrofilizált**ák. Ha az elektromos kezelés oxigénatmoszférában történt, akkor a felszínre **negatív töltésű**, illetve poláros oxigénatomot tartalmazó részek kerültek. Ugyanez a kezelés nitrogénatmoszférában **pozitív**, nitrogéntartalmú atomcsoportokhoz vezet. A sejtek letapadásához mindkettő jól megfelel. Olcsóbb és kényelmesebb oxigénatmoszférában hidrofilizálni, ezért ez az általánosan elterjedt. Bizonyos sejtípusok számára mégis kedvezőbb a pozitív töltésű felület. Ezt elérhetjük úgy, hogy **polilizinoldatot** töltünk az edénybe, amit néhány óra múlva többször leöblítünk. A felszín töltését tartósan megváltoztató molekulák olyan erősen kötve maradnak, hogy a mosás nem távolítja el őket.

A makromolekulákra, köztük olyanokra, amelyek a szérumban vannak, vagy maguk a sejtek termelik, a felszínre való eltávolíthatatlan adszorpció jellemző. Emiatt sem népszerűek ma már az üvegfelszínek. Noha elvileg többször felhasználhatók, minőségük bizonytalan és változó.

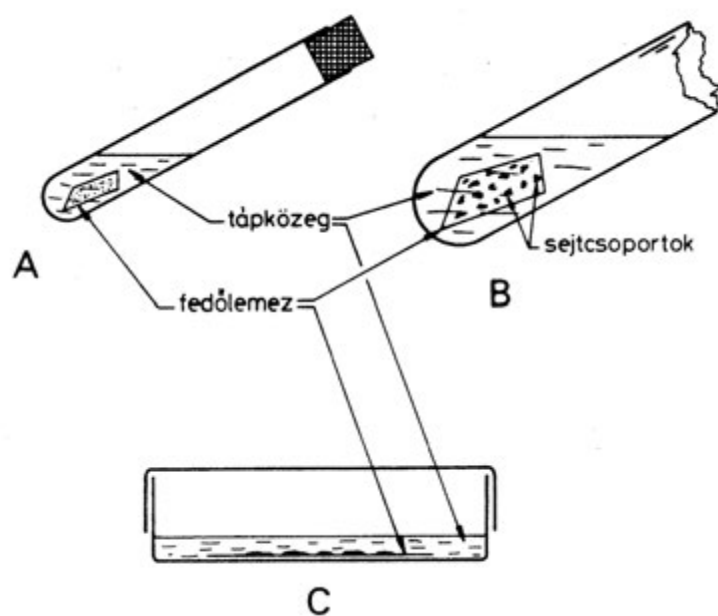
A letapadási felszín gyakran módosítják specifikus **letapadást szolgáló vagy azt gyengítő anyagok** segítségével. Ilyen lehet pl. a felszín szérummal való előkezelése, ami után általában szintén öblítést alkalmaznak, és így csak molekuláris fedőréteg marad. Tisztított formában alkalmazott ilyen anyagok pl. a kollagén, fibronectin, kondronektin, laminin, fetuin. Időnként cél lehet a letapadás gátlása. A sejtek letapadástól való függőségének elvesztése átalakulásuk fontos jellegzetessége. Ennek megállítására pl. lágy agargélben, vagy metilcellulózoldatban szuszpendálják a sejteket, miáltal nem süllyednek az aljzatra. Ha így is képesek osztódni, akkor úgynevezett **transzformált sejteknek** nyilvánítják őket, ami vírusok hatására vagy rákos átalakulásra utal.

Monolayer tenyészetek esetében a **tenyészedényeknek két alapvető típusuk** van. Az egyik a **Petri-csésze**, amely lehet egyedi (5.47. ábra) és lehet úgynevezett **soklyukú tálca** (multiwell plate), amely 4-től akár 96 kis csészét (well) is magába foglalhat (l. 5.54. ábra). A másik típus az úgynevezett **flaska**, amely **csavaros kupakkal** van ellátva, ezáltal jól zárható (5.47. ábra). A Petri-csésze típus fedőjének belsején három kis bütyöknek kell lennie, ami elemeli a fedőt, és ezáltal biztosítja a gázcserét. Lezárt flaskában nincs lehetőség a gázfázis egyensúlyozására. Ha a flaska szén-dioxid-termosztátba kerül, akkor általában meglazítják a kupakot. Előnye, hogy ha nagy a gáztere, akkor megtölthető bármilyen gázzal, ezáltal szén-dioxid-termosztáton kívül is tartható, viszont ilyenkor folyamatosan nő benne a szén-dioxid-koncentráció a sejtlégzés eredményeként.



5.47. ábra. Tenyészedények (flaskák fenn, Petri-csészék lenn), bennük fenolvörössel festett médium

Szövettenyészetekben viszonylag gyakran használnak **betéteket**. Ezek hagyományos formája az úgynevezett **fedőlemez tenyészet**, amelyben a sejteket a tenyészedénybe helyezett üveg vagy műanyag lemezre szélesztik. Ezt azután könnyen fel lehet használni rögzített és festett preparátumok készítésére olyan módon, hogy a sejteket tartalmazó vékony üveg- vagy műanyag lemezen tenyésztett sejteket megfestjük, és a tenyésztőlemezt fedőlemezként tárgylemezre helyezjük (5.48.–5.51. ábra).



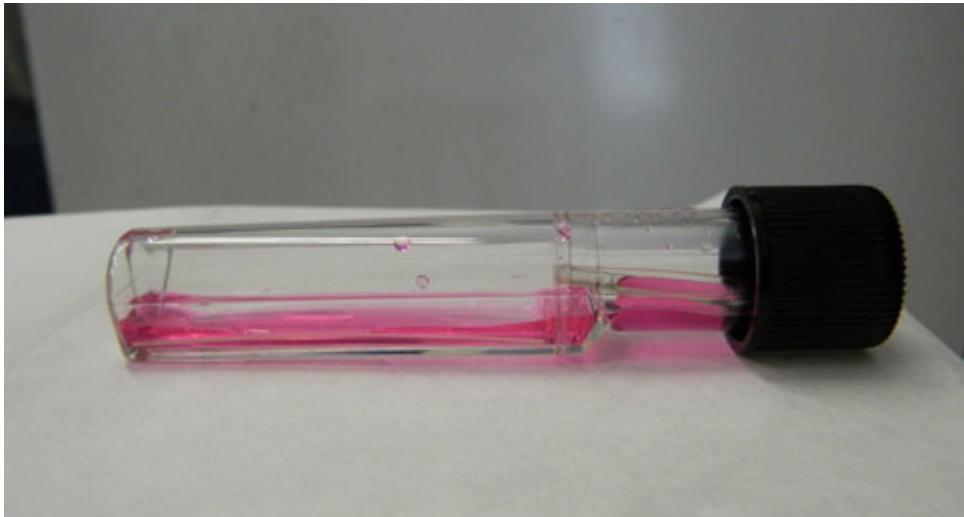
5.48. ábra. Fedőlemeztenyészetek csőben (A, B) és Petri-csészében (C)



5.49. ábra. Polisztirol tenyésztőlemez és kupakkal lezárható edénye



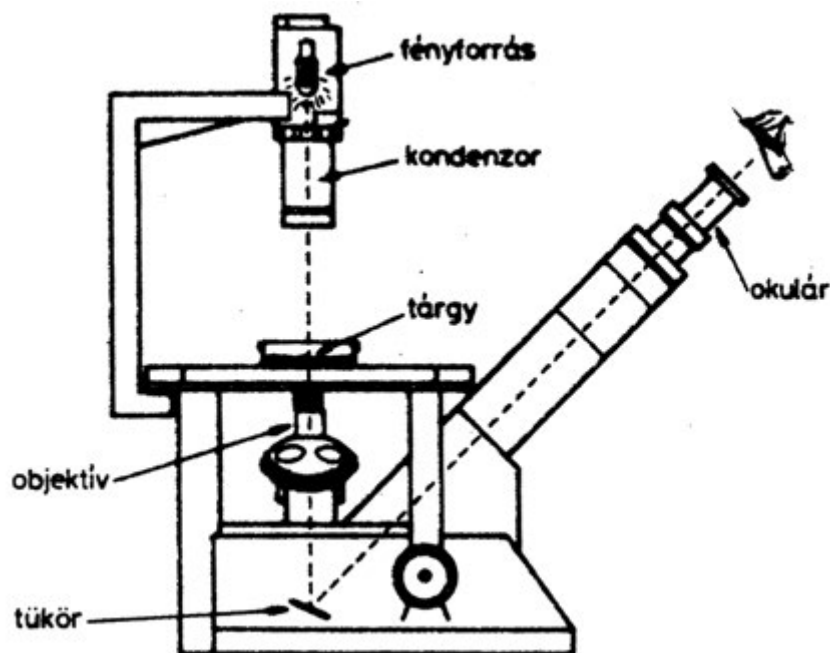
5.50. ábra. A tenyésztőlemez behelyezése a médiummal töltött edénybe



5.51. ábra. Fedőlemez tenyészet vékony polisztirol tenyésztőlemezen

A **tenyészfelszín specifikus** módosításaként fogható fel az a módszer, amikor **konfluens monolayer tenyészetet** hoznak létre pl. kötőszöveti sejtekből (fibroblasztokból). Ezek osztódási képességét valamilyen módszerrel irreverzibilisen megszüntetik (pl. mitomycin C kezelés, vagy gamma-sugárzás), és az így továbbélő sejtrétegre telepítenek egy másik típusú sejtet. Ilyen módon tenyésztik pl. az embrionális őssejteket.

A tenyészedény aljára tapadt sejtek vizsgálatára módosították a hagyományos mikroszkópot olyan módon, hogy az objektív a tárgy alá került. Ez az úgynevezett **invertoszkóp** (fordított állású, vagy inverz mikroszkóp, inverted microscope, (5.52.–5.54. ábra), amit fáziskontraszt vizsgálatra is képessé tesznek, mert ennek hiányában a vékony sejtréteg lényegében láthatatlan marad.



5.52. ábra. A szövettenyésztés céljaira konstruált fordított állású mikroszkóp (invertoszkóp) felépítésének vázlata

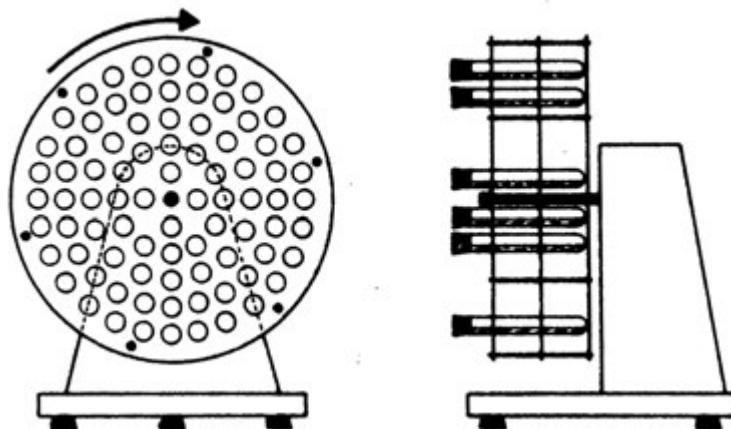


5.53. ábra. Fordított állású mikroszkóp oldalnézete. A tárgyasztalon tenyészfalaska látható, amelynek mozgatása a tárgyasztalon általában szabad kézzel történik



5.54. ábra. Fordított állású mikroszkóp előlnézete. A tárgyasztalon 96 lyukú tálca látható, amely egy erre a célra készült adapterben két irányban mozgatható

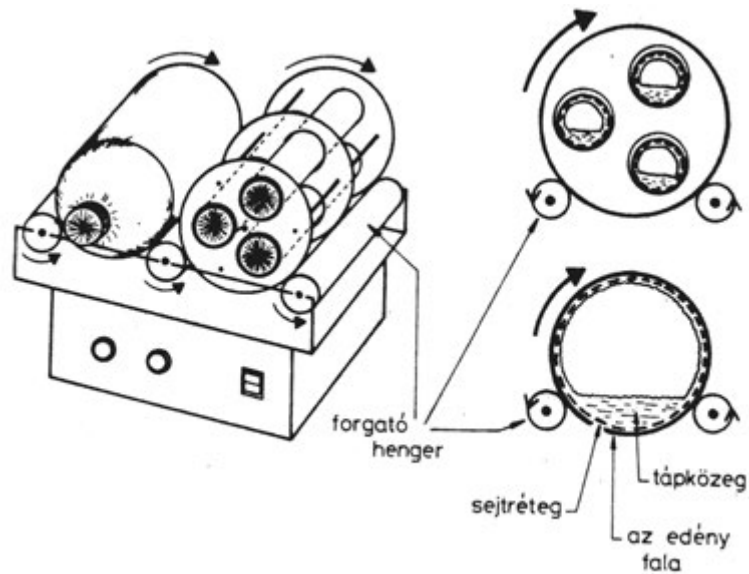
Szuszenziós tenyészetek fenntartásának fontos feltétele a megfelelő oxigénellátás biztosítása, és ami ezzel összefügg, a sejtek kiülepedésének meggátolása. Ezt többféle módon oldják meg. Ez egyik a tenyészedény forgatása, amit a forgócsöves (roller tube) vagy forgópalackos (roller bottle) rendszerben alkalmaznak (5.55.–5.58. ábra). Ilyenkor forgó gumihengerek közé helyezik az ugyancsak hengeres edényeket.



5.55. ábra. Forgócsöves tenyészetek forgató dobban (elől- és oldalnézet)



5.56. ábra. Forgócsöves szuszpenziós tenyészetek

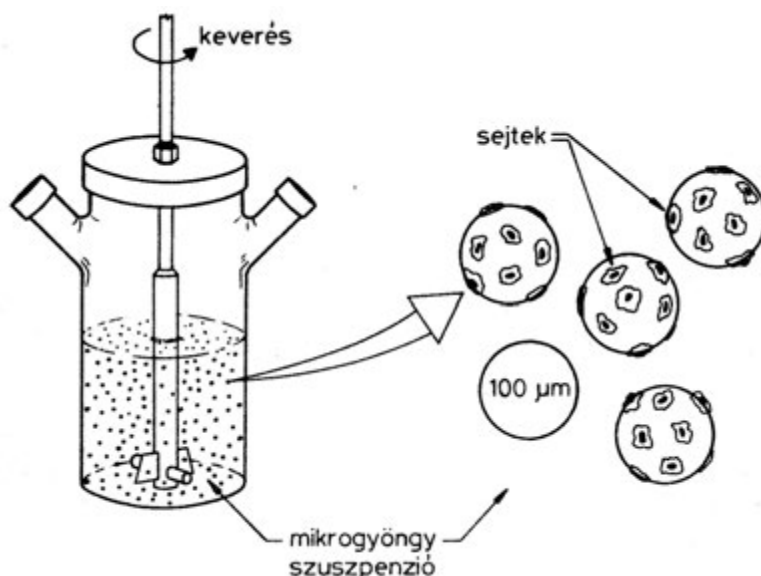


5.57. ábra. Monolayer tenyészetek forgópalackos rendszerben



5.58. ábra. Nagyméretű forgópalackos tenyészedény és forgatóberendezés

Szuszenziós tenyészetekre a leggyakrabban speciális keverőedényt alkalmaznak, akár mágneses, akár mechanikus forgatással (ilyen edényt mutat az 5.59. ábra). Megoldható az **oxigenálás** gázzal való átbuborékolatással. Ilyenkor habzási problémák jelentkezhetnek, ami pl. felületi feszültséget csökkentő anyagok hozzáadásával kiküszöbölhető. Szuszenziós tenyészetbe vihetők letapadást igénylő sejtek is, ha a számukra apró gömbökön tapadási felületet biztosítunk: ez az úgynevezett **mikrogyöngytenyészet** (microcarrier bead culture, 5.59. ábra).



5.59. ábra. A szuszpenziós tenyészet fenntartására szolgáló keverőedény egyik típusában kívülre nyúló tengely mozgatásával előzzük meg a szuszpendált sejtek kiüledését (bal oldal). Ilyen rendszerben letapadást igénylő sejtek is tarthatók, ha megfelelő minőségű, hidrofil felszínű mikrogyöngyökre engedjük őket kitapadni (jobb oldal)

A tenyészetek növekedése és fenntartása

A szövet- és sejtenyészetek **mindennapi gyakorlatban való fenntartása** bizonyos jól kialakult rutint követ. Szuszpenziós tenyészetek esetében ez nem jelent mást, mint egy kis térfogatú alikvot kivételét a régi tenyészetből, és friss médiumot tartalmazó tenyészetbe való átjuttatását. Mindez egyszerű pipetázással elvégezhető.

Monolayer tenyészetek esetében a sejteket az aljzatról le kell választani. Ennek módja a tapadás erősségétől függ. Egyes sejtípusok akár lerázhatók, vagy pipettából kispriccelt médiumsugárral (pipette jetting) lemoshatók lehetnek. Erősebb tapadást EDTA (EGTA) segítségével szüntethetünk meg. Végül, ha ez sem elég, akkor tripszint alkalmazhatunk. A sejtizoláláshoz képest a **passzáláshoz alkalmazott tripszin** koncentrációját érdemes a sejtípusra nézve specifikusan meghatározni, és a szükséges minimumon tartani az alkalmazásának idejével együtt. A tripszin ugyanis még akkor is jelentősen befolyásolhatja a tenyészet növekedését, tehát a sejtek osztódásának sebességét, ha csak nyomokban marad a tenyészetben. Emiatt, ha a passzáláshoz tripszint használunk, akkor egyrészt a leválasztott sejtek szuszpenziójáról centrifugális ülepítés után leszívjuk a tripszines médiumot, és friss médiumban szuszpendáljuk fel a sejteket. Ebben a médiumban **tripszint gátló anyagra** van szükség. Ez lehet a szérum, ha viszont a médium szérummentes, akkor pl. szójából származó tripszininhibitor célszerű a médiumhoz adni.

A későbbi növekedés közben tartása érdekében meghatározandó az **átvitt sejtsuszpenzió sűrűsége és életképessége**. Fontos annak ismerete, hogy az adott sejtípus az adott tenyésztési körülmények között milyen hatékonysággal indul osztódásnak. Ezt a kvalitást **telepképzési hatékonyságnak** (plating efficiency) nevezzük. A kifejezés onnan származik, hogy a kiültetett sejtek mindegyike az osztódás révén maga körül lényegében egy telepet, azaz **klónt** hoz létre. Ez szuszpenzióban is láthatóvá válik, ha pl. lágy agarban együtt tartjuk az utódsejteket. A telepképzési hatékonyságot a sejtek számának %-ában fejezzük ki; ha tehát a telepképzési hatékonyság 1%, akkor minden századik, ha 50%, akkor minden második, ha 100%, akkor az összes sejt osztódásnak indul. A **kiültetési, vagy szélesztési sűrűség** (seeding density) és a telepképzési hatékonyság ajánlott arányait mutatja a X. táblázat.

X. táblázat. Sejtenyészetek indításának néhány paramétere

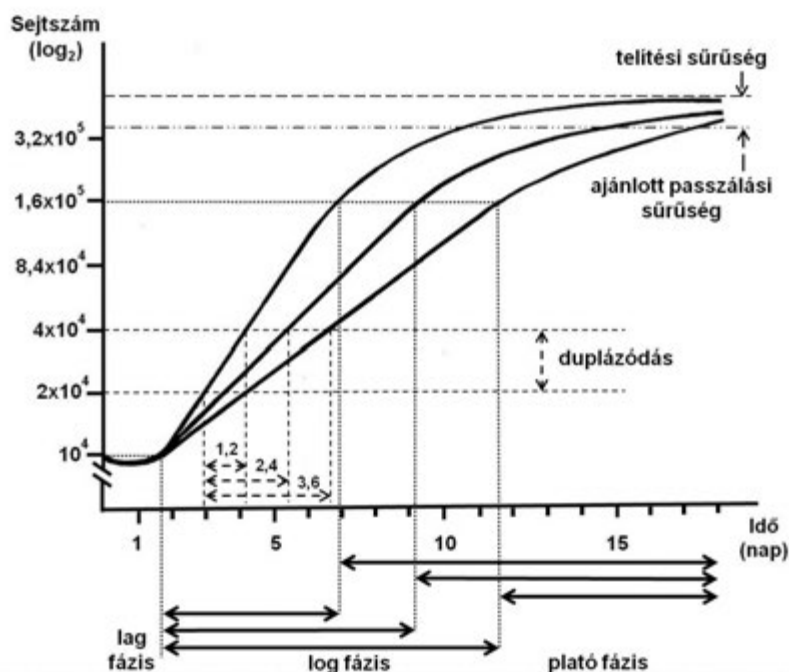
A szélesztési sűrűség és a telepképzési hatékonyság viszonya		
	A kiültetett sejtek optimális száma	
Várható telepképzési hatékonyság	szuszpenzióban sejt/mm ³	monolayerben sejt/cm ²
0,1%	10 ⁴	2×10 ³
1%	10 ³	2×10 ²

10%	10^2	2×10^0
50%	20	4
100%	10	2

További szempont a tenyésztés során az **osztódás és a médium tápanyagai felhasználásának sebessége**. A kettő egymással is összefüggésben van. A médium elhasználtságát legkönnyebben annak **savasodása** mutatja, amit a fenolvörös indikátornak a sárga irányába való színeltolódása jelez. Az osztódás sebességét monolayer esetében a sejtek által elfoglalt terület nagyságának a növekedése mutatja, szuszpenzióban pedig nő az oldat zavarossága. Két passzálás között a fenti paraméterektől és a közeg tápanyagtartalmától függően több médiumcserére is szükség lehet.

A **növekedés** elvileg a mikroorganizmusokéhoz hasonló **exponenciális függvényt** mutat, amely tízes alapú logaritmikus ábrázolás esetében inflexiós ponton át telítésbe fut. Kezdetben nem látszik a sejtek szaporodása, sőt, egy részük nyilván el is pusztul, ez a **lag fázis** (5.60. ábra). Ezt az **exponenciális növekedés szakasza** követi (**log fázis**). Biológiai és gyakorlati szempontból is nevezetes a logaritmikus növekedés középső szakasza, az **úgynevezett midlog fázis**, ami tízes alapú logaritmikus ábrázolás esetén az inflexiós pont körül található. A tapasztalatok szerint sok szempontból az ilyen tenyészettel végzett kísérletek eredményei a leginkább reprodukálhatóak. A log fázist az osztódás lassulása, majd stagnálása követi (**plató szakasz**). A növekedés jellegzetes paramétereit az 5.60. ábra mutatja.

A tenyészetek jellemzésére használt paraméterek közül kiemelkedően fontos a **duplázódási idő** (doubling time) és a **telítési sűrűség**. Ez utóbbi a növekedés sűrűség általi gátlása révén kialakuló platófázisban mérhető sejtkoncentráció. Normális sejtekből kialakult monolayer tenyészetek esetében a telítési sűrűség elérésekor a tenyészfelületet teljesen befedik a sejtek, úgynevezett **konfluens tenyészet** alakul ki. A **konfluencia** kifejezést a fedettség mértékének jellemzésére is használjuk annak alapján, hogy a rendelkezésre álló szabad tenyészfelület mennyire fedett sejtekkel. Két passzálás között a félig fedett (szemikonfluens) és a teljesen fedett (konfluens) állapot a két leggyakrabban használt tájékozódási szakasz. A kontakt gátlást mutató normális sejtípusok csak akkor osztódnak tovább, ha konfluens tenyészeiket újra passzáljuk.



5.60. ábra. Reális adatokat mutató általánosított növekedési görbe két passzálás között

A **kontakt gátlás elvesztése** esetén a konfluens állapot után is tovább osztódnak a sejtek. Több réteget is alkothatnak, ami zavarja a tenyészetek vizsgálhatóságát, és gyakoribb médiumcserét tesz szükségessé.

A tenyésztés alapadatait, az alkalmazható médiumot, a növekedés és passzálás dinamikáját ismert sejtvonalak esetében már irodalmi adatként is megkaphatjuk.

A sorozatos passzálások során a primer tenyészet eredeti **sejtösszetétele megváltozik**. Ez az explantátum technika esetében látványosabb, mivel a nem migráló sejtek itt már az első passzáláskor kiszelektálódnak. A szelekciós hatások azonban továbbra is működnek, és olyan tenyészetekben is jelen vannak, amelyeket izolált sejtekből hozunk létre. A tenyésztés káros, szelektív, sejtpusztító tényezői (pl. a passzálás „gyötrelmei”) gyorsan kivégzik a rájuk érzékeny sejttypusokat. Marad azonban egy állandóan és mindenütt jelen lévő, igen erős szelekciós hatás, amely az életképes sejteken működik, ez pedig az **osztódási sebesség alapján történő szelekció**. Azok a sejttypusok, amelyek gyorsabban osztódnak a többiekénél, néhány generáció után háttérbe szorítják, illetve teljesen túlnővik a lassabban szaporodókat. Ez különösen a **sejtvonalak** életének első három-öt generációjára jellemző. Ezt követően már nagyjából stabilnak tekinthető egy szövettenyészet, abból a szempontból, hogy benne átlagosan ugyanolyan sebességgel osztódó sejttypusok vannak. Megjegyzendő, hogy ez nem jelenti feltétlenül azt, hogy a tenyészet morfológiailag, vagy más markerek tekintetében teljesen homogén.

Érdemes még megjegyezni, hogy a kutatók gyakran szándékos szelekciót is alkalmaznak bizonyos sajátosságú sejtek preferenciális felszaporítására a tenyészetekben. Ilyenkor az történik, hogy egy tudatosan alkalmazott szelekciós hatás (amely lehet pl. a tenyésztés valamilyen paraméterének megváltoztatása, valamilyen anyagnak a médiumhoz való hozzáadása) a heterogén sejtpopuláció egyes sejtjeinek szaporodására kedvezőtlenebb hatással van, mint másokéra. Emiatt az utóbbiak az előbbieket fokozatosan túlnővik. Ilyen módon alakítottak ki pl. bizonyos a normális sejtekre káros hatású drogokra rezisztenciát mutató sejtvonalakat. Az effajta változások mögött gyakran az ellenálló sejtekben spontán módon létrejött mutáció áll.

Klónozás és sejtklónok

A szövet- és sejttenyészetekben végzett vizsgálatok nagyobb reprodukálhatósága és jobb értelmezése miatt sokszor fontos, hogy a tenyészet heterogenitását a legkisebbre korlátozzuk. Ennek elérésében fontos eszköz lehet, ha sejtklont, tehát olyan tenyészetet hozunk létre, amely **egyetlen sejt utódaiból** áll. Ezt az állati sejteknél sokszor nem könnyű megvalósítani.

Az egyszerű esetekben olyan mértékben hígítjuk ki a szuszpenziókat, hogy egy adott kimért térfogatba csak egyetlen sejt jusson. A médium kondicionálás szerepe miatt a sejt/médium térfogataránynak sokszor igen kicsinek kell lennie, ami nagy relatív felülethez vezet, és a párolgás révén való betöményedés veszélyét hozza magával. Ilyen esetben, mint mindenkor, amikor apró médiumcseppben kell hosszabb ideig egyetlen sejtet, vagy apró többsejtes struktúrát megőrizni, finomított paraffin- vagy szilikonolajjal fedhetjük le a vizes fázis cseppjeit.

A könnyebben klónoozható, letapadásfüggő sejtek esetében alkalmazható rutin eljárás a **klónozógyűrű** használata. Erősen kihígított szuszpenziót szélesztünk pl. Petri-csészében. Az egyenként egymástól több cm távolságra letapadt sejtek utódai egymás közelében maradvá telepnek alkotnak. Hat-nyolc generáció megszületése után a kíváncsnak látszó csoportokat inverz mikroszkópban kiválasztjuk, és a tenyésztedény külső oldalán permanens markerrel megjelöljük. Leszívjuk a médiumot, majd e célra készült, rendszerint rozsdamentes acélból gyártott úgynevezett klónozógyűrűt szilikonzsírba nyomunk, és a kijelölt területre tapasztjuk. A szilikonzsírral szigetelt hengerbe tripszinezőoldatot öntünk, és a leválasztott sejteket mint klont tenyésztjük tovább.

Az egyik legkorábban sikeresen alkalmazott klónozási módszer az úgynevezett **kapillárisklónozás**. Ilyenkor úgy járunk el, hogy egy üvegapillárisba egymástól jól megkülönböztethető, cm-es nagyságrendű távolságba egyedi sejteket szívunk fel, majd a kapillárist egy Petri-csészében lévő médiumba helyezzük. A kapilláris fala diffúziós akadályt képez a sejtek által termelt anyagok, köztük az ismert és a feltételezett autokrin növekedési faktorok előtt. Így hatékonyabbá válik a médium kondicionálása, ami segíti a sejtosztódást. Az egymástól távol lévő osztódó sejtek telepei mellett eltörjük a kapillárist, és külön tenyészcsészébe helyezzük, ahol tovább folytatódhat a klón növekedése.

A klónokkal kapcsolatban érdemes még megemlíteni azt a tapasztalatot, hogy a látszólag jogos várakozással ellentétben **sejtjeik nem teljesen egyformák**. Ezt úgy derítették ki, hogy a klónokat tovább klónozták, szubklónokat hoztak létre. A **szubklónok** tenyészeteit ezután több paraméter tekintetében összehasonlították, és köztük jelentős különbségeket találtak. A sejtek tehát állandóan változnak, ha tenyésztjük őket. Másképpen fogalmazva, **csak akkor nem változnak, ha nem tenyésztjük őket**. Ez meglehetősen lehangoló lehet az eredmények hosszú távú reprodukálhatósága szempontjából. A helyzet mégsem olyan rossz, mint amilyennek elsőre látszik. Az egyik

megoldás az, ha egy adott kísérletsorozathoz kellő mennyiségben fagyasztunk le belőlük ahhoz, hogy minden esetben azonos korú tenyésztettel dolgozhassunk. A másik támaszt a **sejttörzsek** (cell strains) használata jelenti. Ma már számos sejtbankból vásárolhatunk jól karbantartott és jellemzett sejtvonalakat. A sejttörzsek közülük abban tűnnek ki, hogy nemcsak eredetük, morfológiájuk és alapvető jellegük garantált, hanem megfelelő mértékben rendelkeznek bizonyos ugyancsak garantált markertulajdonságokkal, pl. egy adott hormonra való megfelelő érzékenység, valamilyen antigén jelenléte a sejtmembránon, bizonyos enzimaktivitás adott szintű megléte stb.

Kérdések és feladatok

1. Mit jelent eredetileg az *in vitro* kifejezés és hogyan használjuk ma? Hogyan viszonyul az *ex vivo* kifejezéshez?
2. Mit jelent az *in vivo* kifejezés, és mi jellemzi az *in vivo* kísérletezést?
3. Mi a parciális hepatektómia és milyen fontos tanulság vonható le a tanulmányozásából?
4. Melyek az *in vitro* végzett vizsgálatok kivitelezésének legfontosabb gyakorlati követelményei?
5. Milyen előnyei vannak az *in vitro* vizsgálatoknak az *in vivo* kísérletezéssel szemben?
6. Soroljon olyan példákat, amelyekben kézenfekvő az *in vitro* vizsgálatok hasznossága!
7. Milyen elvi jellegű változások lehetőségeivel kell számolnunk az *in vitro* rendszerekben végzett kísérletekben az *in vivo* állapothoz képest?
8. Milyen csoportokra oszthatók az *in vitro* kísérleti rendszerek összetettségük legáltalánosabb szintjei szempontjából? Mi különbségtétel egyik gyakorlati szempontból is alapvető jelentőségű sajátossága?
9. Melyek az organotipikus *in vitro* rendszerek; mi az organotipikus növekedés?
10. Melyek a hisztiotipikus *in vitro* rendszerek; mi a hisztiotipikus növekedés?
11. Hogyan csoportosíthatók az *in vitro* rendszerek az oxigénellátás szempontjából?
12. Mi jellemző a perfúziós rendszerekre?
13. Mi jellemző a perfúzió nélküli organotipikus rendszerekre?
14. Miért használunk *in vitro* kísérletezéshez szövetszeleteket; milyen sajátosságai vannak az ilyen kísérleti rendszereknek?
15. Melyek a monolayer tenyészet legfontosabb jellegzetességei?
16. Ismertesse a monolayer tenyészet létrehozásának klasszikus módszerét, a tenyészet kialakulásának fő lépéseit!
17. Mi a sejtvonal és melyek életének legfontosabb szakaszai?
18. Melyek a sejtvonalak fő típusai és milyen alapvető sajátosságaik vannak?
19. Mi a sejt klón és hogyan hozhatjuk létre?
20. Hogyan definiáljuk a szuszpenziós tenyészeteket; milyen sejttípusokra jellemző a szuszpenzióban való tenyésztés lehetősége?
21. Mi a kontakt gátlás?
22. Miért érdemes sejteket izolálni a szövetekből, szervekből?
23. Milyen technikát alkalmazhatunk a szövettenyészetek létrehozására a klasszikus módszeren kívül, és miért érdemes, illetve mikor kell ilyen technikákat alkalmaznunk?
24. Melyek a teljes embrió tenyészetek *in vitro* vizsgálatának fő típusai; milyen fontos folyamatokat vizsgálhatunk bennük?

25. Milyen kapcsolat van az ICM és az ESC tenyészetek között?
26. Milyen kísérleti lehetőségek nyílnak meg az ESC sejtek tenyésztése révén?
27. Milyen sajátosságokkal bírnak és lehetőségeket nyújtanak a rágcásók teljes embrió tenyésztői?
28. Írjon példát a komplexitás újraépítésének *in vitro* megközelítésére; milyen lehetőségek rejlenek az ilyen típusú kísérleti rendszerekben?
29. Ismertesse a nukleáris transzplantáció segítségével való soksejtű klónozás emlősökben elért első sikeres példáját!
30. Milyen módon lehet *in vitro* módszerekkel létrehozni emlős kimérát?
31. Milyen új komplex kutatási és gyakorlati szempontból is jelentős irányzat van kialakulóban az *in vitro* technikák révén; milyen problémák megoldását igyekeznek ezáltal megközelíteni?
32. Milyen fontosabb szubcelluláris *in vitro* rendszerek vannak és melyek ezek fő sajátosságai?
33. Melyek az *in vitro* rendszerek működésének általánosan érvényes fő feltételei?
34. Milyen technikai eszközökkel biztosíthatjuk az *in vitro* rendszerek működésének általánosan érvényes fő feltételeit?
34. Hogyan viselkednek az *in vitro* rendszerekben lévő sejtek a hőmérséklet mérsékelt és extrém megváltozásának hatására?
35. A hőmérséklet változtatásának milyen gyakorlati hasznosítása lehetséges az *in vitro* technikákkal kapcsolatban; mik ennek az eszközei?
36. Milyen követelmények érvényesek az *in vitro* rendszerekben használt vízre, és mik az ehhez szükséges eszközök?
37. Mi a jelentősége az ozmotikus koncentrációnak és a pH-nak az *in vitro* rendszerekben és hogyan biztosítjuk, hogyan ellenőrizzük annak megfelelő értékét?
38. Milyen természetes anyagok használhatók médiumként?
39. Mik a természetes médiumok előnyei és hátrányai?
40. Mennyiben lehetséges definiált, vagy „szintetikus” médium létrehozása és miért törekszünk erre?
41. Melyek a médiumok fő típusai és mire használhatjuk őket?
42. Melyik a legfontosabb és leginkább elterjed puffer rendszer a szövettenyésztő médiumokban, és hogyan működik?
43. Mit jelent a BSS rövidítés? Ismertesse az ilyen oldatok fő típusait és összetételüket!
44. Milyen típusaik és sajátosságaik vannak a perfúziós médiumoknak?
45. Mi a szérum jelentősége a szövettenyésztetekben, melyek az előnyei és a hátrányai?
46. Milyen újdonságot hoztak a médiumok fejlesztésében Eagle kísérletei?
47. Miért és milyen médiumok esetében van szükség széndioxid termosztátra?
48. Mik az MEM fő komponensei?
49. Melyek a szövettenyésztetekben használt szérumok fő típusai és mik az előnyeik, illetve hátrányaik?
50. Miért foglalkoznak szérummentes médiumok kifejlesztésével?
51. Mi a fibroblasztos túlnövéssé; mikor jó és mikor rossz? Az utóbbi esetben mit lehet tenni?

52. Milyen jelentősége volt a médiumok fejlesztésében a klónozatóságnak?
53. Melyek a perfúziós rendszerek fő típusai? (A téma ismertetéséhez készítsen vázlatrajzokat is!)
54. Melyek a perfúziós rendszerek fő technikai alkatrészei? Mi a funkciójuk? (A téma ismertetéséhez készítsen vázlatrajzokat is!)
55. Milyen szerveket használnak a leggyakrabban perfúziós kísérletekben és milyen céllal?
56. Milyen azonosságok és különbségek vannak a fontosabb szervek perfúziós rendszereinek kialakításában?
57. A diffúzióval oxigenált organotipikus rendszerek kialakításakor milyen fő szempontokra kell figyelemmel lennünk?
58. Milyen fő típusai vannak a diffúziós oxigenálással fenntartott szervtenyészeteknek?
59. Ismertesse az IVF megvalósításával kapcsolatos fő problémákat és a megoldás módjait!
60. Ismertesse a preimplantációs *in vitro* rendszerekkel kapcsolatos fő kérdéseket és eredményeket!
61. Ismertesse a posztimplantációs *in vitro* rendszerekkel kapcsolatos fő kérdéseket és eredményeket!
62. Mire és hogyan használhatjuk a szövetszeleteket és az izolált sejteket?
63. Milyen fő módszerei vannak a sejtizolálásnak?
64. Ismertesse a májsejt izolálás módszerét!
65. Melyek a szövettenyészetek fenntartásának és vizsgálatának technikai feltételei?
66. Milyen szövettenyésztő edényeket ismer, és melyek azok legfontosabb tulajdonságai?
67. Milyen speciális technikai feltételek kellene a szuszpenziós tenyészetekkel való munkához, és miért?
68. Jellemezze a szövettenyészetek legfontosabb növekedési sajátosságait!
69. Milyen szelekciós hatások érvényesülnek a tenyészetek élete során?
70. Milyen sejtklónozási módszereket ismer? Röviden ismertesse őket!
71. Mi a sejtörzs?
72. Mi a médium kondicionálás?

6. fejezet - A mikroszkópos morfometria alapjai

Pálfia Zsolt

Bevezetés

A sejtbiológiai kutatási területeken a molekuláris biológiai, biokémiai és genetikai vizsgálatok és módszerek valósággal ontják az eredményeket. Ezzel párhuzamosan természetes igényként merül fel, hogy az eredmények értelmezésénél a mérések során szerzett adatokat a vizsgált objektum felépítésével, működésének morfológiai alapjaival és azok változásával is összhangba lehessen hozni. Ennek is köszönhető, hogy a morfológiai kutatások egyre inkább funkcionális célokat szolgálnak, és megnőtt a vizsgálatok tárgyát képező struktúrák mennyiségi jellemzésének, kiértékelésének jelentősége. E feladatok megvalósítására alkalmas a morfometria.

Morfometria

A **morfometria** szilárd testek morfológiai jellemzőinek és azok térbeli és/vagy időbeni változásának mennyiségi adatokkal való (kvantitatív) jellemzése. A biológiai alkalmazásán túl más tudományterületen – pl. matematika/statisztika, geológia – is hasznosítják.

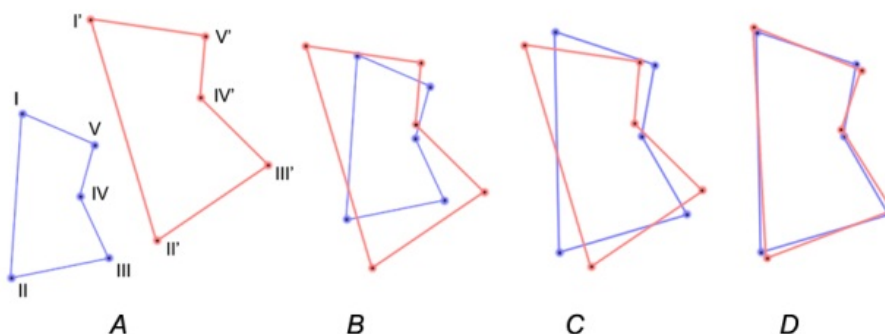
Tradicionális vagy klasszikus morfometria

Legegyszerűbb formája, a **tradicionális morfometria** a vizsgált test vagy egyes részei méreteivel, alapvető alaki tulajdonságainak elemzésével foglalkozik (az ember esetében például a kar hossza, a váll szélessége, a szemek távolsága, a test magassága és tömege, a testfelület területe, az agy térfogata stb.). A mérettel kapcsolatos paraméterek között számos esetben mutatható ki korreláció, ezért előfordulhat, hogy kevés a független változó, ami a kiértékelésnél korlátozza a lehetőségeket (pl.: a sipcsont és a combcsont hossza erős korrelációt mutat, adataik egymástól nem függetlenek). A test méretével kapcsolatos adatok korlátozott információt szolgáltatnak a szervezet egészének vagy egyes részeinek alakváltozásairól. Ennek ellenére az abszolút és relatív méretadatokat számos esetben használják a vizsgált objektum jellemzésére pl. a funkcionális morfológia területén (pl. testtömeg és testmagasság vagy a végtag keresztmetszeti területe és hossza).

Geometriai morfometria

A huszadik században teret hódító és a század utolsó negyedében kikristályosodó **geometriai morfológia** jellemzően kétdimenziós struktúrák alakjának statisztikai analízisével foglalkozik. A vizsgált objektumot egy koordináta rendszerben elhelyezve, és abban a tárgy jellemző felületi szerkezeti elemeinek (**landmarks**) helyzetét rögzítve nyílik lehetőség alaktani elemzésre, összehasonlításra. (Pl. pillangók szárnyán a szárny kontúrjának és mintázatának, vagy a hártájszárnyú rovarok szárnyán az "erezet" jellemző pontjai használhatók fel e célra.)

Elegendő számú mérést követően, a különböző mérésekből származó adatok transzformálásával (6.1. ábra) a homológ landmark pontok alapján kiszámolhatóak a vizsgált struktúrára jellemző átlagos értékek. Ez az eljárás alkalmas populációk morfológiai jellemzőinek vizsgálatára, összehasonlítására. A korszerű képrögzítési és számítógépes technikák alkalmazása lehetővé teszi a módszer háromdimenziós struktúrák (pl. zápfogak rágófelszíne) vizsgálatára történő kiterjesztését is.



6.1. ábra. Két hasonló struktúráról készült, egyaránt öt landmark pontot tartalmazó (homológ) profil illesztése (a római számok az egyedi landmark pontokat azonosítják). A nyers landmark profilok (A) centrálása (B), skálázása (C) és elforgatása (D) teszi lehetővé a profilok összevethetőségét

A nagy felbontású orvosi képalkotó eszközökből (CT, MRI) származó és nagyszámú adatot tartalmazó képi adatbázisok feldolgozására a geometriai morfológiából továbbfejlesztett és szoftverekkel, számítógépes képfeldolgozórendszerekkel támogatott speciális eljárások (voxel-based morphometry, pattern-based morphometry stb.) alkalmasak. Tipikus felhasználási területük az idegélettan, funkcionális neuroanatómia, orvosi diagnosztika.

Sztereológia

A háromdimenziós szerkezetek térbeli viszonyainak kétdimenziós minták (képek) alapján történő értelmezésével a **sztereológia** foglalkozik. A sztereológia a morfológia egyik részterülete, felhasználásával morfológiai analízisre mind fény-, mind elektronmikroszkópos metszetek esetében lehetőség van. Módszertana hozzájárul a mérések és a kiértékelés hibájának csökkentéséhez, biztosítja a csekély morfológiai változással járó változások megfigyelhetőségét és megbízható, összehasonlításra alkalmas eredmények elérését teszi lehetővé. Gyakran alkalmazzák térfogat (pl. sejtmag), felület (pl. endoplazmatikus retikulum membránfelszíne), hosszúság (pl. nephron tubulus hossza), partikulum szám vagy méret becsléséhez. A mérések eredményeként kapott adatokat relatív értéként, az esetek többségében a vizsgált objektum (pl. sejt) térfogategységére vonatkoztatva adják meg.

(A sztereológia nem jelenti a háromdimenziós struktúra metszetek alapján történő rekonstrukcióját, annak vizuális megjelenítését, és nem alkalmas a sejt molekuláris komponenseinek térfogat vagy molekulaszám szerinti mérésére, a fluoreszcens jel erősségének meghatározására.)

A sztereológia módszertanát matematikai, geometriai és statisztikai megfontolások alapozták meg. A teljesség igénye nélkül két alapelvet emelünk ki.

Cavalieri (6.2. ábra), a XVII. század első felében élt olasz matematikus megállapította, hogy egy szabályos test (pl. hasáb, henger, kúp) esetében annak alaplapjával párhuzamosan, egyenlő távolságokra képzett síkmetszetek felületének (területének) összege arányos a test térfogatával. Ha ismerjük az összes síkmetszet területét és azok távolságát, ezek szorzatából kiszámolható a test térfogata. A huszadik század második felében bizonyították, hogy ez az elv a nem szabályos testek közelítő térfogat meghatározására is alkalmazható. Ez alapozta meg sztereológiai alkalmazását.



6.2. ábra. Bonaventura Cavalieri (1598–1647) itáliai matematikus

Delesse (ejtsd: dölesz; 6.3. ábra) francia geológus 1847-ben tette közzé azt a megfigyelését, amely szerint egy kőzet random elhelyezkedésű komponenseinek térfogataránya megfelel a komponensek egy véletlenszerű síkban készített csiszolaton mérhető területarányainak. A róla elnevezett **Delesse-elv** szerint egy **adott szilárd test és strukturálisan elkülöníthető, random eloszlású komponenseinek térfogataránya megegyezik a testből készült síkmetszet felületén látható megfelelő területek arányával.**



6.3. ábra. Achille E. O. J. Delesse (1817–1881) francia geológus és bányamérnök

A Delesse-elv olyan esetekben alkalmazható, amikor a vizsgált testben annak egyes komponensei véletlenszerűen (random) oszlanak el, vagyis a vizsgált objektum belső szerkezete izotróp.

A Delesse-elv sejtekre vonatkozó megfogalmazását a következő kifejezés adja meg:

$$(1) \quad \frac{V_c}{V_T} = E\left(\frac{A_c}{A_T}\right)$$

vagy ha A_T változó

$$(2) \quad \frac{V_c}{V_T} = \frac{E(A_c)}{E(A_T)}$$

ahol:

V_c : a vizsgálandó komponens térfogata;

V_T : a térfogat, amelyben a vizsgálandó térfogat elhelyezkedik;

A_c : a vizsgálandó komponens által elfoglalt terület a metszeten;

A_T : a vizsgálandó komponenst tartalmazó térfogatnak a metszeten elfoglalt területe;

E: elméleti átlag;

A fenti összefüggést a gyakorlatban a következő képletekkel közelítjük meg:

$$(3) \quad \frac{V_c}{V_T} \sim \left(\frac{\bar{A}_c}{\bar{A}_T} \right)$$

vagy ha A_T változó

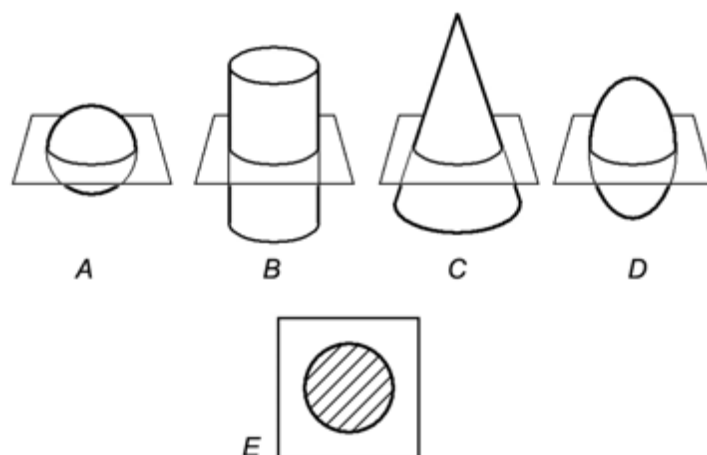
$$(4) \quad \frac{V_c}{V_T} \sim \frac{\bar{A}_c}{\bar{A}_T}$$

A fenti kifejezések egy adott komponensnek egy egységnyi térfogatban elfoglalt térfogatarányát (V_V) adják meg (relatív adat!). A későbbiekben látni fogjuk, hogy viszonylag egyszerű módon lehetőség van a térfogatarányok mérésén túl annak kiszámítására is, hogy egységnyi térfogatban mekkora egy komponens (kompartimentum) határolófelületének nagysága (S_V), vagy egy fonalas szerkezetnek a hossza (L_V). A komponensek (partikulumok) egységnyi térfogatban mért számának meghatározása meglepő módon igen bonyolult, még azonos mérettartományba eső, ideális, gömb alakú struktúrák esetében is.

A sejtbiológiai kísérletekben szükség van a molekuláris biológiai vizsgálati módszerekkel nyert adatok szövetszintű, sejtszintű értelmezésére is. A szervezet és a sejtek különböző fiziológiás és kísérleti állapotaiban (pl. szervfejlődés, sejt differenciálódás, sejt pusztulás, kóros és kísérletesen előidézett változások) eltérő lehet az egyes sejtalkotók részesedése a sejt térfogatából. A változás megvalósulhat az organellek térfogatának, alakjának, számának változásával, amit az egységnyi sejtterfogatba foglalt specifikus organellel membrán-mennyiség (membránfelület) változása is kísérhet.

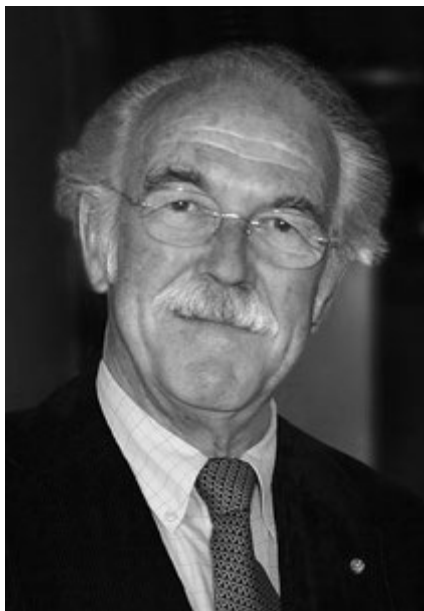
A sejt belső morfológiai részleteinek feltárására, változásainak nyomon követésére a nem invazív képalkotó (pl. mikro-CT) eljárások elsősorban térbeli felbontóképességük miatt nem alkalmasak. Ezért a vizsgálandó biológiai minta sejtjeinek morfológiai jellemzéséhez, a térfogatarányok változásának nyomon követéséhez szükség van a fény- és elektronmikroszkópos szövettani eljárásokkal előállítható metszetekre, azok mikroszkópokkal történő vizsgálatára.

A vizsgálat tárgya (szervek, szövetek, sejtek) az esetek többségében háromdimenziós szerkezetű. A metszetekről készített fényképek viszont csak kétdimenziós rendszert alkotnak, és bár csak a sejtek és organellek profilját (metszetük körvonalait; 6.4. ábra) látjuk, de segítségükkel bepillantunk a sejtek háromdimenziós szerkezetébe. Megfelelő számú metszet tanulmányozásával, a metszeteken mérhető adatokból kell a vizsgálati objektum térbeli arányaira vonatkozó következtetéseket levonni.



6.4. ábra. Szabályos testek azonos körprofilú metszetei (A – gömb, B – henger, C – kúp, D – ovoid). A síkmetszeten megfigyelhető profilok (E) nem adnak egyértelmű információt a profilhoz tartozó struktúrák térbeli kiterjedéséről, alakjáról

A mikroszkópos – elsősorban transzmissziós elektronmikroszkóppal végzett – morfológia vizsgálatok általánosan elfogadott módszere az 1960-as évek végére alakult ki. Ennek első széles körben használt összefoglalását E.R. Weibel (6.5. ábra) svájci kutató tette közzé 1969-ben. Részben Weibel munkásságának köszönhető, hogy a nemzetközi irodalomban egységesen használt definíció és jelölésrendszer terjedt el. (A morfológiában használatos paraméterek felsorolása, definíciójuk, jelölésük és dimenziójuk a fejezet végén található.)



6.5. ábra. Ewald Weibel (1929–) svájci anatómus és ultrastruktúra kutató

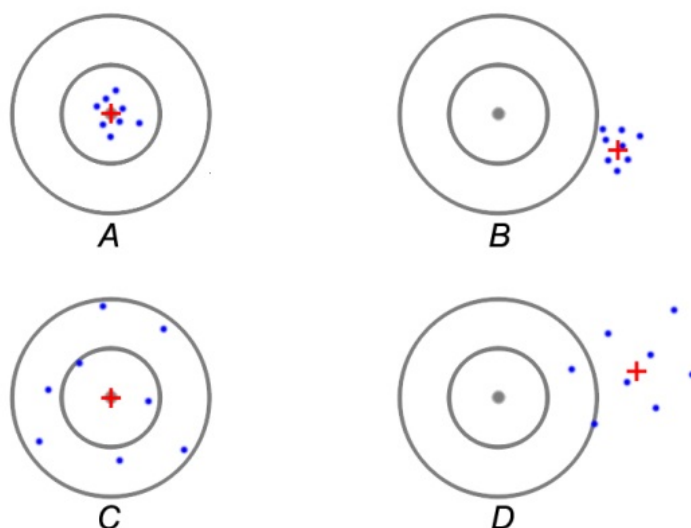
A Delesse-elvnek megfelelő, izotróp szerkezetű objektumok kiértékelésére kidolgozott konvencionális sztereológiai módszereken túl, a nem izotróp felépítésű testek vizsgálatához számos speciális mintavételi, mérési eljárás alapuló – általában az eljárás jellemző eleme szerint elnevezett – módszer született. A megfelelő eljárás kiválasztásához, a kísérlet megtervezéséhez sok segítséget nyújt, ha rendelkezésre áll a kísérleti objektum.

Egy kis statisztika

A kísérletek többségében minden egyes vizsgálati alanyra kiterjedő, teljes körű vizsgálat nem kivitelezhető, mert túl sok időt venne igénybe, értelmetlenül sok emberi és anyagi erőforrást igényelne. Állatkísérletekben ésszerűtlen a szükségesnél több állat bevonása, és kivitelezhetetlen, hogy a kísérlet mérési szakaszába a vizsgálandó szerv vagy szövettípus minden egyes sejtjét számításba vegyünk. Ilyen körülmények között, vagyis amikor nem a teljes sokaságot vizsgáljuk, a mintákon elvégzett mérések eredményei közelítő, becsült értékek lesznek. Létezik várható értékük (átlaguk; 5. képlet) és van szórásuk (6. képlet), eloszlásuk.

A mérés hibáját, torzítását (bias) adja meg, hogy a becslés várható értéke (vagyis a mérési adatok átlaga) mennyire tér el a vizsgált paraméter valószínű értékétől. A becslés minőségét jelzi, hogy a mérési adatok mennyire térnek el a becslés várható értékétől, azaz mennyire szóródnak az átlag körül (6.6. ábra).

Ha a vizsgált paraméter és a minta várható értéke megegyezik, akkor a becslés torzításmentes (unbiased estimation), a mérés hibája nulla. A torzításmentességet veszélyezteti a helytelenül megválasztott és/vagy hibásan kivitelezett mintavétel, a minta előállítása során elkövetett technikai hiba, továbbá a mérés, illetve számolás során elkövetett hiba. A becslés pontosságát az adatok variabilitása, az átlag körüli elhelyezkedése mutatja, jellemzésére a szórás és az abból származtatott mérőszámok szolgálnak. Ez utóbbiak képlete a vizsgálati objektum és a mintavétel sajátosságaihoz igazodóan lehet egyszerűbb vagy összetettebb is. Elméletben a mintaszám tetszőleges növelésével a pontosság is javítható, a gyakorlatban meg kell találni/állapítani a statisztikailag elegendő, de ésszerű mintaszámot.



6.6. ábra. A becslő adatok torzításának (hibájának) és szórásának ábrázolása lőtábla segítségével.

A – torzításmentes és pontos (kis varianciájú) becslés, *B* – torzított, jelentős hibát mutató, de kis szórású (varianciájú), azaz precíz becslés, *C* – nagy szórású, pontatlan, de torzításmentes becslés, *D* – nagy szórású, pontatlan és jelentős hibát mutató becslés lőtáblái

Olyan mintaértékek, melyek a mintaértékek döntő többségétől messze helyezkednek el (kiugró adatok; outliers) drámaian növelik a szórást, csökkentik a becslés pontosságát.

Egy megtervezett morfológiai kiértékelés hatékonysága lemérhető azon, hogy az adott kísérleti körülmények között többször megismételt mérések eredménye, a becslés várható értéke (átlaga) milyen közel helyezkedik el egymáshoz, szórásuk mennyire hasonló. Törekedni kell a torzításmentes becslést lehetővé tevő mintavételi eljárás és mérési módszer alkalmazására.

A mintára vonatkozó legegyszerűbb statisztikai mérőszámok képletei az alábbiak:

Átlag:

$$(5) \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Szórás (standard eltérés; standard deviation, SD)

$$(6) \quad s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Szórásnégyzet (variancia; variation)

$$(7) \quad s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}$$

Standard hiba (standard error of mean, SEM)

$$(8) \quad SE = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Standard hiba együtthatója (coefficient of error, CE) megadja a standard hibát az átlag százalékában kifejezve, így lehetővé teszi pl. egy kísérleti állatból vett mintasorozatok variabilitásának összehasonlítását.

$$(9) \quad CE = \frac{s}{\sqrt{n}} \cdot \frac{1}{\bar{x}}$$

Variációs együttható (coefficient of variation, CV) megadja a szórást az átlag százalékában kifejezve, így lehetővé teszi különböző, pl. több állatból vett mintasorozatok variabilitásának összehasonlítását.

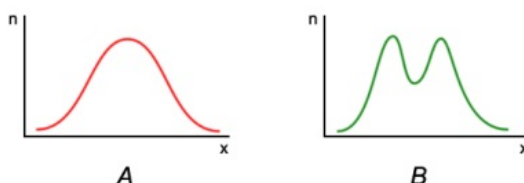
$$(10) \quad CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

A statisztikai kiértékelésről

Az eredmények statisztikai kiértékelésére számos módszer kínálkozik. Alkalmazhatóságuk függ a kísérleti objektumtól, az alkalmazott protokolltól, az adatok eloszlásától, az összehasonlítandó kísérleti pontok, csoportok számától stb. A megfelelő módszer (pl. t-próba, u-próba, főkomponens analízis stb.) kiválasztása kényes feladat, érdemes egy a statisztikában jártas kolléga segítségét igénybe venni.

A kiértékelés módszerének megválasztását döntően befolyásolja, hogy az adatok milyen eloszlást követnek. Igen sok citológiai paraméter normál (Gauss), vagy közel normál eloszlást mutat. Más paraméterek (különösen ritkán előforduló struktúrák) inkább a Poisson (ejtsd: poasszon) eloszlást követik.

A kiértékelés előtt célszerű megállapítani, ellenőrizni az eloszlás jellegét és érdemes ábrázolni is az adatok gyakorisági eloszlását (frekvenciafüggvény, hisztogram; 6.7. ábra), különösen akkor, ha az eredeti, nem származtatott adatokat ábrázoljuk.



6.7. ábra. A gyakoriság függvény ábrázolása gyors tájékoztató jellegű információkat ad a mérésről, pl. az adathalmaz eloszlásáról, az átlag körül elhelyezkedő adatok szórásáról. A bal oldali grafikon közel normál eloszlású, nem túl nagy szórású adathalmaz gyakorisági függvénye, a jobb oldali két maximumot mutató függvény kísérlettervezési vagy mérési hibára, esetleg a vizsgált jelenség mögött álló kettős hatásra utalhat

A struktúra morfológiai jellemzőinek meghatározásakor legcélszerűbb, ha egyedi adatnak (x) az egy metszetről/fényképről származó értéket tekintjük.

Mintavétel

A mintavétel a minták előállítására használt, a vizsgálati objektum jellemzői és statisztikai szempontok figyelembe vételével megtervezett eljárás. A mintavétel célja tehát annak biztosítása, hogy a kísérleti objektum sajátosságainak és a statisztikai követelményeknek is megfelelő eljárással kiválasztott, elegendő számú egyedi minta vizsgálatával a kísérlet tárgyát képező struktúrára vonatkozóan helytálló megállapításokat lehessen tenni.

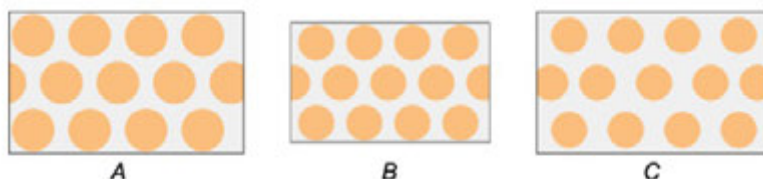
Fontos a vizsgálandó kísérleti objektum minél alaposabb ismerete (izotropitás, szerkezet, működés), a kísérletben alkalmazott kezelés várható hatására, az előidézett változás mértékére és irányára vonatkozó adatok tanulmányozása. Az alkalmazott eljárásnak biztosítania kell a mintavétel véletlenszerűségét, vagyis azt, hogy a vizsgált objektum bármely része bekerülhessen a mintába. Ez biológiai mintáknál gyakran csak nehezen érhető el.

Bár sztereológiai módszerekkel kivitelezett morfolometriai vizsgálatok egyaránt végezhetők fény- és elektronmikroszkópos mintákon, a továbbiakban az elektronmikroszkópos vizsgálatok egyes elemeit ismertetjük.

Az elektronmikroszkópos minta előállításával kapcsolatos feladatok

Az előkészítés legfontosabb lépései a transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok során a következők: a kísérletbe bevont állatok megölése, szerv vagy szervdarabkák kivétele, rögzítése, beágyazása, metszet és fénykép készítése.

A rögzítés és beágyazás során törekedni kell a kielégítő megtartásra, azaz arra, hogy a vizsgálandó minta felépítése alapvetően ne változzék meg, a tanulmányozott jelenség szempontjából ne történjen zavaró műtermék képződés. Törekedni kell a térfogatváltozások minimalizálására. A különböző szervezetek és szervek eltérő felépítésűek (pl. víz-, lipidtartalom, kötőszövetes rostok aránya stb.), ezért a rögzítő- és beágyazó eljárások kiválasztásakor erre tekintettel kell lenni. A térfogatváltozást nem lehet elkerülni, csupán mértéke kérdéses. A minta egyes komponensei szöveti, sőt sejtszinten is eltérő mértékű térfogatsökkenést szenvednek el (6.8. ábra).



6.8. ábra. A mikroszkópos mintaelőkészítés egyik következménye lehet a minta egészének vagy egyes komponenseinek méretváltozása. *A* – A méretváltozás nélküli struktúra. *B* – A minta minden eleme egyforma mértékben zsugorodott (homogén méretváltozás). *C* – A körrel jelölt struktúra zsugorodott, miközben a szürkével jelölt nem (heterogén méretváltozás)

A kísérleti kezelés hatása lehet akár a minta egyes komponenseinek (pl. sejtalkotók) méretváltozása, zsugorodása vagy duzzadása.

Biztosítani kell azt, hogy a beágyazott és lemetszett anyagnak jó legyen a kontrasztja, elektrondenzitása, vagyis a metszetről készített felvételeken a világos és sötét részek, a membránok, a membránnal határolt organellek határozottan azonosíthatók és elkülöníthetők legyenek.

Jó minőségű, egyenletes és vékony metszetekre van szükség. A metszetkészítés során fellépő zavaró jelenség lehet a kés hibájából fakadó késcsik, a nem megfelelő összetételű vagy tökéletlenül térhálósított beágyazószer miatt fellépő torlódás, a metszet hordozófelületen történő tökéletlen kiterítése stb.

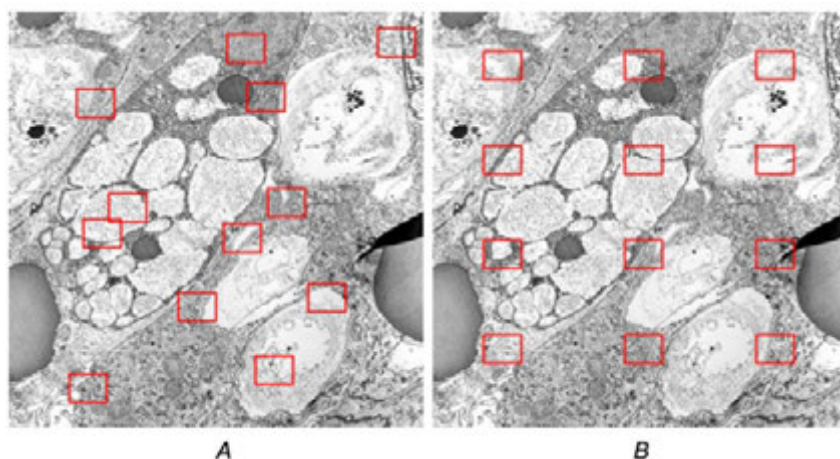
A metszet vastagságához (40-80 nm) közelítő méretű, közel gömb alakú objektumok esetében felléphet az ún. **Holmes-hatás**. Oka az, hogy a metszet valójában nem kétdimenziós, ezért vastagságától függően a metszetre került partikulumok profilja mikroszkópban vagy fotón nehezen vagy pontatlanul mérhető. A Holmes-hatás mértéke a részecske átmérője (D) és a metszetvastagság (t) arányától függ. Tökéletes kontraszt esetén, ha $D < 15t$ a túlbecslés több, mint 12%, ha $D < 8t$ a túlbecslés nagyobb, mint 20% lehet. Ilyen esetekben matematikai vagy sztereológiai módszereket alkalmazva a hatás által befolyásolt adatokat feltétlenül korrigálni kell. A korrekcióhoz ismerni kell D és t értékét. Azonban a kontraszt általában nem tökéletes, ezért a Holmes-hatás az esetek nagy részében elhanyagolható mértékűre csökken, vagy gyakorlatilag kiegyenlítődik.

A metszetekről az elektronmikroszkópban céljainknak megfelelő nagyítású képet kell készíteni. A fotó rögzítése történhet negatív filmre vagy digitális detektorral (CCD panel). A negatívot továbbnagyíthatjuk pozitív fotópapírra vagy digitalizálhatjuk. A nagyítás mértékét úgy kell megválasztani, hogy egyértelműen azonosíthatóak legyenek a mérendő struktúrák. A nagyítás csökkentése nagyobb mintaterületet eredményez, de kockáztatja a sejtalkotók biztos felismerését. A nagyítás növelése megkönnyíti az organellek elkülönítését és azonosítását, ám csökkenti az egy fotóra eső mintaterületet, így veszélyezteti annak reprezentativitását, végül is a mintaszám emelését eredményezi.

A mintavétel módszere

Elektronmikroszkópos vizsgálatok esetében az egyes szerveknek jellemzően csak egy kicsiny része vizsgálható. A mintavétel reprezentativitásának biztosítása szigorú mintavételi protokollal biztosítható. Biztosítani kell a

mintavétel torzításmentességét, melyre a vizsgálati objektum tulajdonságainak ismeretében több standardizált lehetőség is van (véletlen, rétegzett, random – szisztematikus stb.; 6.9. ábra).



6.9. ábra. Mintavétel *Chlorohydra viridissima* gastrodermiséből készített metszeten. A – véletlen mintavétel esetén előfordulhat, hogy a mintavételi területek túl közel esnek egymáshoz, ezért a mintahalmaz információtartalma nem reprezentálja a mérendő struktúrát. B – véletlen (random), szisztematikus mintavétel. A randomítás az első mintavételi terület véletlen kijelölésével biztosítható. A további mintavételi területek meghatározott rend szerint (szisztematikus) követik egymást

Izotróp minta esetén a mintagyűjtés szisztematikus, uniformizált, de a véletlenszerűséget is magában foglaló elemekből állhat.

Egy javasolt mintavételi eljárás *in vivo* kísérletek esetén a következő:

- 3–5 állatot vonunk be a vizsgálatba;
- minden állatból szövetmintát veszünk úgy, hogy a vizsgálandó szerv több részéből 2–3 mm széles, 5–8 mm hosszú csíkokat képezünk;
- állatonként 6–8 szövetcsíkot rögzítés után beágyazunk;
- állatonként (véletlenszerűen) kiválasztunk 4 blokkot;
- minden blokkból 1–1 sorozat metszetet készítünk;
- minden sorozat metszetből találomra egy metszetet kiválasztunk;
- a kiválasztott metszetekről 4 fényképet készítünk.

A fenti eljárás kielégítő eredményt ad a legtöbb nem réteges felépítésű, ún. parenchimális szerv esetében. Egy adott kísérletbe bevonandó állatok, blokkok és fotók számának meghatározására többféle, itt nem részletezett módszer is rendelkezésre áll.

Irányított, az adott helyzetre kidolgozott mintavételi eljárásra van szükség, ha a vizsgált szövetben a sejtek határozott rétegekben helyezkednek el (pl. bőr, agykéreg), vagy erősen polarizált, egyik irányban megnyúlva rendeződnek (pl. vázizom). Ebben az esetben speciális elővizsgálatok és korrekció nélkül a kapott adatok nem vonatkoztathatók az egész szövetre.

A szükséges mérések számának meghatározása

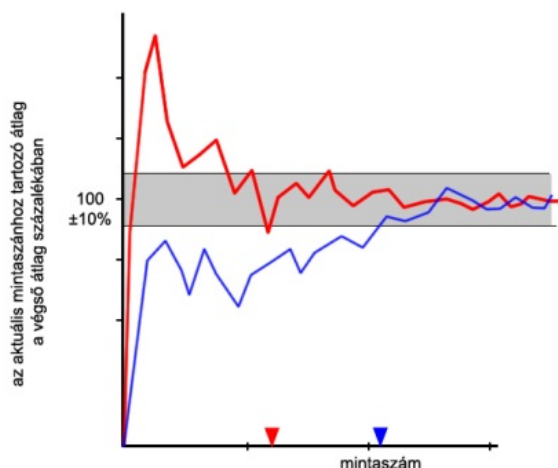
A kétdimenziós fényképeken, mintaterületeken a minta komponenseinek profiljain, azok egyes paramétereit pontokból, vagy vonalakkól, vagy négyzethálóból álló tesztrendszerrel lehet mérni. Ha tisztázódott az, hogy a mérés elvégzése szempontjából mekkora az optimális végső nagyítás, itt nem részletezett statisztikai módszerekkel meghatározható a tesztrendszer méretezése.

Általános követelmény, hogy a mérendő legkisebb struktúrára is legalább egy pont essék. Érdekes, hogy a végső eredmény pontosságát nem növeli, ha az egyes struktúrákat igen pontosan mérjük meg, tehát a négyzetrács osztásának ezen túlmenő finomítása fölösleges.

Megállapítható, hogy hány fénykép adatainak leolvasására van szükség ahhoz, hogy a mérések átlagértéke megbízhatóan pl. az átlag $\pm 10\%$ határon belül maradjon. Igen szemléletes és egyszerű módszer az ún. progresszív átlagértékek kiszámítása. Ehhez egy várhatóan közepes értéket adó kísérlet mintáiból leolvasjuk, mondjuk 50 fénykép

adatait. Kiszámítjuk $\overline{V_{V1-2}}, \overline{V_{V1-3}}, \dots, \overline{V_{V1-50}}$ adatainak számtani középértékét. A $\overline{V_{V1-50}}$ értékét 100%-nak

véve az egyes progresszív átlagértékeket ($\overline{V_{V1-2}}, \overline{V_{V1-3}}, \dots, \overline{V_{V1-50}}$) az utolsó érték %-ában grafikusán ábrázoljuk. Az 6.10. ábrához hasonló eredményt kapunk, ahol könnyen megállapítható, hogy a progresszív átlagérték mennyi fénykép kiértékelése után marad tartósan a $\pm 10\%$ eltérést jelentő értékek között. Ha 50 fénykép adatainak leolvasása után ez nem történik meg, akkor a mérések számát a szükséges mennyiségig kell növelni.

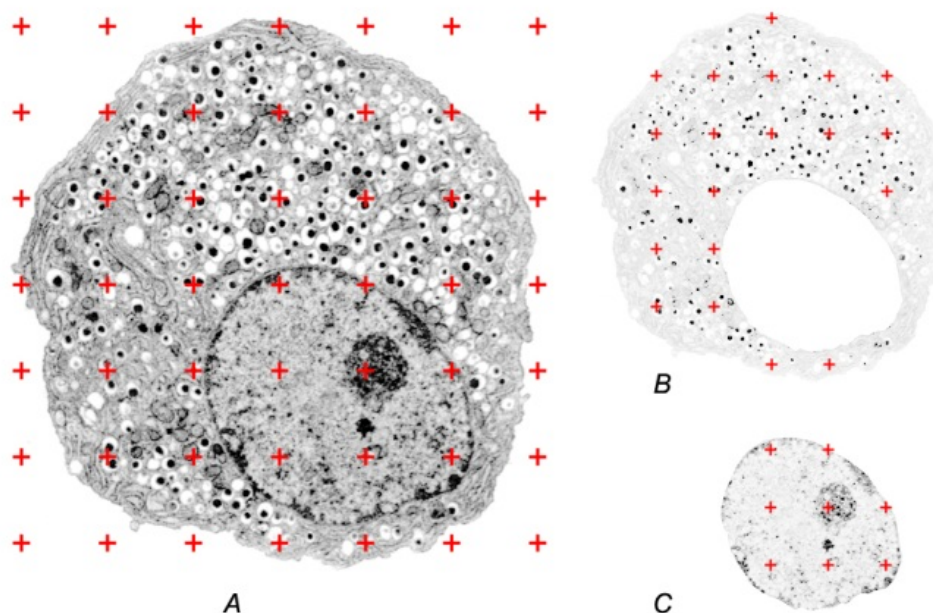


6.10. ábra. A méréshez szükséges mintaszám meghatározása progresszív átlag segítségével, a vizsgált objektum két különböző komponense (késsel és pirossal jelölve) esetében. A különböző variabilitású komponensekhez eltérő (piros és kék nyílfejek) mintaszám tartozhat

Térfogatarányok (volumenfrakció: V_V) meghatározása

A (3) és (4) összefüggés értelmében a térfogatarányok meghatározásához a szóban forgó struktúrák által a metszeten elfoglalt területek mérésére van szükség. Egyszerű módszer a kérdéses területek körülrajzolása és kivágása. Az így kapott profilok súlya arányos az általuk elfoglalt területtel. Körhöz közelálló profilok területét jó pontossággal mérhetjük az ún. poláris planiméter segítségével. Miután a szerkezet követőpontját körülvezettük a szóban forgó profil kerületén, a területre vonatkozó adat a műszer számláló szerkezetén leolvasható.

A területek mérésére széles körben elterjedt módszer az analizálandó fényképre helyezett tesztpontok, tesztvonalak rendszerének alkalmazása. A mérés pontossága függ az alkalmazott tesztrendszer tulajdonságaitól. Különböző feladatok megoldásához más és más tesztrendszer lehet a legalkalmasabb. Így a leginkább elterjedt egyszerű-, vonal- és négyzethálórendszer mellett alkalmazzák pl. a szabályosan elhelyezkedő pontok rendszerét.



6.11. ábra. A tesztpontok segítségével történik a metszet felszínén az összehasonlítani kívánt struktúrák területeinek mérése. A négyzethálót (ezen a példán $7 \times 7 = 49$ pontból áll) a fotóra helyezve (A) megszámlálható az egyes sejtorganelumokra eső pontok száma: a citoplazmára eső pontok (B; 20 pont) és a sejtmagra eső pontok (C; 8 pont) számának hányadosa adja meg az aktuális fotón az adott struktúrák területarányát, amely a Delesse-elv szerint megegyezik azok térfogatarányával

A különleges megközelítést nem igénylő mérések esetében legelterjedtebb módszer a kettős négyzetháló alkalmazása. A négyzetháló metszéspontjai szabályos pontrendszer alkotnak. A terület mérése a mérendő struktúra metszet felszínére eső metszéspontok megszámlálásával történik (point counting; 6.11. ábra). A munkát jelentősen meggyorsítja, hogy a nagyobb méretű struktúrák (pl. sejtmag) méréséhez elegendő a nagyobb osztás metszéspontjainak megszámlálása. A négyzetháló méretét (osztását), kettős hálózat esetén a kétféle osztás arányát a vizsgálandó objektum tulajdonságai szabják meg.

A (4) összefüggésnek megfelelően:

$$(11) \quad V_v = \frac{\bar{A}_c}{\bar{A}_T}$$

Egyenletes ponteloszlású tesztrendszer (négyzetháló) segítségével végzett pontszámlálós területmérést alkalmazva:

$$(12) \quad V_v = \frac{P_c}{P_T}$$

V_v tehát dimenzió nélküli szám. A szemléletesség kedvéért gyakran a mm^3/mm^3 dimenziót tüntetjük fel, ami akár éppúgy lehetne km^3/km^3 is. Gyakoribb, hogy százalék, vagy ezrelék százszoros vagy ezerszeres szorzatát jelenti.

Adott térfogatban lévő (S_v) felület meghatározása

A membránnal határolt sejtsejtszervecskék határfelületei arányainak vizsgálatakor a legtöbb esetben kellően kicsi a nagyítás ahhoz, hogy a metszeteket vonalként kezelhessük. Ez ad lehetőséget arra, hogy a felületarányok meghatározását vonalhosszak mérésére vezessük vissza. A vonalhosszúságok mérésére használható a térképészeti

kerék. A készüléket a vonalon végigvezetve (gurítva) a könnyen átalakítható skáláról a pontos nagyítás ismeretében közvetlenül a mikrométerben mért hosszúság leolvasható.

Elterjedt módszer, hogy a képre helyezett szabályos rövid testvonalak rendszerét, vagy az egész képen áthúzódó szabályos vonalrendszert használunk. Ez utóbbi célra jól alkalmazható az előző fejezetben ismertetett kettős négyzethálós vízszintes vonalrendszere.

S_V meghatározásához (a fénykép nagyítását is figyelembe véve) a következő képletből indulunk ki:

$$(13) \quad S_V = \frac{2I}{L_T} \frac{\text{nagyítás}}{1000} \mu\text{m/mm}^2$$

ahol L_T a fényképre (tesztterületre) eső teljes testvonal hossza, I a testvonalak és a szóban forgó objektum kontúrjára eső metszéspontjainak száma.

Adott osztású négyzetháló esetén:

$$(14) \quad L_T = P_T \cdot f$$

ahol P_T a fényképre (tesztterületre) eső testpontok száma, az f faktor segítségével pedig a testvonalak hosszát számítjuk át mm-re, tehát f értéke azonos a két szomszédos testpont között mm-ben kifejezett távolsággal.

A térfogati arány meghatározásánál leírtakhoz hasonlóan a felületek mérésekor is meg kell terveznünk és el kell készítenünk a méréshez a tesztálózatot és el kell végeznünk a szükséges minták számának meghatározását.

Adott térfogatban lévő struktúra hosszának (L) meghatározása

Ez a feladat abban az esetben végezhető el, ha a vizsgálandó fonalas szerkezet a metszeteken jól azonosítható mindenfajta metszési síkban. A különböző lefutású szerkezetek különböző síkban történő metszése más-más képet adhat, a rajtuk mért adatok pedig más-más eredményhez vezethetnek, ezért lényeges, hogy a metszeteket hasonló módon orientáljuk.

L_V meghatározásához meg kell számolnunk a mérendő struktúra metszeteinek számát (N_C) az adott tesztterületen belül. Ha az eddigi példánkban használt négyzethálós tesztrendszert alkalmazzuk, akkor a (13) kifejezéshez hasonló képlet alapján kapjuk meg az eredményt.

$$(15) \quad L_V = \frac{2N_C}{P_f} \frac{\text{nagyítás}}{1000} \mu\text{m}/\mu\text{m}^3$$

Természetesen ez esetben is el kell készítenünk az alkalmas osztású tesztálózatunkat és meg kell határoznunk a szükséges minták számát.

A sztereológiában használatos jelölések

Jel	Definíció	Dimenzió
P	Pontszám	—
P_P	Az összes pontok egy adott struktúrára eső hányada	—
PP_L	Egységnyi testvonal hosszra eső metszéspontok száma	—
P_A	Egységnyi tesztterületre eső pontok száma	μm^{-1}
P_V	Egységnyi tesztterületben lévő pontok száma	μm^{-2}
L	Egy adott elem vagy testvonal hossza	μm

Jel	Definíció	Dimenzió
L_L	Egy adott elemre eső tesztvonalhossz egységnyi tesztvonalhosszra számítva	$\mu\text{m}/\mu\text{m}$
L_A	Lineáris elemek hossza egységnyi tesztterületre számítva	$\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$
L_V	Lineáris elemek hossza egységnyi tesztterületben	$\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$
A	Elem vagy teszt-area területe	μm^2
S	Felszín vagy határfelület területe	μm^2
A_A	Area arány, azaz egy adott struktúra metszetének területe egységnyi tesztterületre vonatkoztatva	$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$
S_V	Felszín egységnyi tesztterületre vonatkoztatva	$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$
V	Háromdimenziós objektumok térfogata vagy tesztterület	μm^3
V_V	Térfogatarány, egy adott struktúra térfogata egységnyi térfogatra vonatkoztatva	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$
N	Adott objektumok száma	–
N_L	A tesztvonal metszéspontjainak száma egy adott objektummal, egységnyi tesztvonal hosszra számítva	μm^{-1}
N_A	Egy adott objektum síkmetszeteinek száma egységnyi teszt-areára vonatkoztatva	μm^{-2}
N_V	Egy adott objektumszám egységnyi tesztterületben	μm^{-3}
L	A tesztvonal adott profilra eső átlaghossza (L_L/N_L)	μm
A	Átlagos profilterület (A_A/N_A)	μm^2
S	Átlagos felszín-terület (S_V/N_V)	μm^2
V	Átlagos térfogat (V_V/N_V)	μm^3
D	Átlagos átmérő (pl. egy granulum populáció tagjaié)	μm
d	Egy profil-populáció átlagos átmérője	μm
v	Sejt vagy organellum átlagos térfogata	μm^3

Kérdések és feladatok

1. Határozza meg, hogy mivel és milyen módszerekkel foglalkozik a morfológia!
2. Fogalmazza meg a Delesse-elv definícióját! Adja meg, hogy milyen feltételek között érvényes!
3. Milyen szerkezeti sajátosságokkal jellemezhető az izotróp, illetve a nem izotróp struktúrájú test?
4. Soroljon fel néhány példát izotróp és nem izotróp biológiai mintákra és elemezve szerkezeti sajátosságait támassza alá állítását!
5. Mi a pontszámlálós módszer lényege, milyen morfológiai vizsgálatokra használható fel?
6. Milyen a torzításmentes és pontos becslés ismérve?
7. Miben különbözik a becslés pontossága a becslés hatékonyságától?
8. Milyen feltételeknek kell megfeleljen a mintavételezés?
9. Tervezzen mintavételezési eljárást a máj hepatocitái térfogatarányainak meghatározásához!
10. Milyen módszerrel lehet a sejtmag citoplazmához viszonyított térfogatarányát meghatározni?

7. fejezet - Függelék

Az itt következő receptgyűjtemény összeállításánál nem törekedtünk teljességre, hiszen egy-egy eljárásnak igen sokféle változata ismert és használatos. Az itt közölt eljárások tehát csak ízelítőt adnak ezek köréből. A leírásokat klasszikus hisztológiai könyvekből, illetve a tanszékünkön használatos, kipróbált és bevált receptekből állítottuk össze. Manapság a régi, hosszadalmas előkészítést igénylő munkafolyamatokat egyre inkább lerövidítik a készen kapható, előre összemért oldatok, a célirányosan kifejlesztett vegyszerek és eljárások. Az ezekben rejlő lehetőségeket azonban csak akkor tudjuk kihasználni és a saját céljainkhoz igazítani, ha alaposan ismerjük az adott módszer lényegét – ezt pedig mi sem tükrözi jobban, mint egy alapos, a felhasznált anyagokat, mennyiségeket, időket és hőmérsékleti értékeket tartalmazó leírás, azaz recept. A könyvben bemutatott eljárások illusztrálására tehát következzen itt néhány részletes leírás.

Vérkenet festése

May–Grünwald–Giemsa-festés

Oldatok:

- I. Giemsa-oldat: metilénkéket, az abból oxidációval származó azúr I-et és II-t, valamint eozint tartalmaz. A kereskedelembe kapható oldatot használat előtt desztillált vízzel vagy pufferoldattal hígítani kell (töményen ugyanis nem fest). Az oldat pH-értékét a rögzítés módjához kell igazítani: metil-alkoholos fixálás után a 6,5 pH-érték az optimális.
- II. May–Grünwald-oldat: a kereskedelembe készen kapható.

Festés:

1. A kenet rögzítése metil-alkohollal vagy tömény May–Grünwald-oldattal: 2–3 perc
2. Festés a felére hígított May–Grünwald-oldattal: 5 perc
3. A festéket leöntjük (öblítés nincs)
4. Festés híg Giemsa-oldattal (10 ml DV + 10 ml Giemsa-oldat): 15 perc
5. Öblítés DV-ben
6. Szárítás

Eredmény: Az eljárással a vörösvértestek rózsaszínűre, a fehérvérsejtek magvai ibolyáskékre festődnek. Az eozinofil granulociták szemcséi pirosra, a neutrofil sejtek granulomai világos ibolyakékre, míg a bazofil granulociták szemcséi kékre festődnek. A limfociták plazmája kék lesz. A kenetek lefedés nélkül immerziós olajjal vagy fedőlemezzel kisebb nagytású objektívekkel vizsgálhatók.

Egésztest-festések

Embriók festése

Csirkeembrió festése ozmium-tetroxiddal

A tojás és a magzatburkok felnyitása után a csirkeembriót a tojásból óvatosan kiemeljük, majd neutrális formalinban rögzítjük és ozmium-tetroxid oldattal festjük.

Az ozmium-tetroxid oldat készítése:

Az 1 g ozmium-tetroxid oldatot tartalmazó ampullát felnyitjuk, majd barna, jól záródó üvegedénybe dobjuk, és 100 ml desztillált vízzel felöntjük, majd vízfürdőn vagy 56 °C-os termosztátban melegítés mellett feloldjuk. Az ozmium-tetroxid végkoncentrációja 1% lesz. Ezt a törzsoldatot hűtőszekrényben tartjuk.

A munka menete:

1. a tojásból kiemelt embriót pufferoldatban leöblítjük,
2. neutrális formalin oldatban fixáljuk,
3. öblítjük desztillált vízben,
4. az elkészített ozmium-tetroxid oldatban festjük, míg közepesen barna színű nem lesz,
5. a felesleges festéket kimossuk desztillált vízben,
6. a preparátumot dehidráljuk felszálló alkoholsorban,
7. derítés (váltott xilolos kezelés) után óvatosan tárgylemezre helyezük (a négynaposnál idősebb embriók esetében ez vájt tárgylemez),
8. majd lefedjük.

Eredmény: a megfestett, eredetileg áttetsző szövetek láthatóvá, barna színűvé válnak.

Csirkeembrió festése Kernechtrot-festékkel

Az eljárás menete az ozmium-tetroxiddal történő festésnél ismertetett módszert követi. A festék készítése és a festés hasonló a metszeteknél ismertetett eljáráshoz, azzal a különbséggel, hogy itt értelemszerűen nincs szükség a festés előtti deparaffinálásra és rehidrálásra.

Porcos vázelemek feltüntetése: alciánkék-festés

A festésnek többféle, pl. embriókra és a különböző gerinces osztályok képviselőire kidolgozott változatai ismertek.

Itt a zebrahalra kidolgozott változatot közöljük¹.

Oldatok:

- I. Alciánkék oldat összetétele
 - a. 15 mg alciánkék,
 - b. 80 ml 90%-os etanol,
 - c. 20 ml jégcet.
- II. Tripszinoldat
 - a. 1 g tripszin,
 - b. 2 g borax (nátrium-tetraborát),
 - c. 100 ml desztillált vízben.
- III. Kálium-hidroxidos hidrogén-peroxid oldat:
 - a. adjunk kb. 5 ml hidrogén-peroxidot,
 - b. 100 ml 1%-os kálium hidroxid-oldathoz (1 g kálium-hidroxid 100 ml desztillált vízben).
- IV. Kálium-hidroxidos glicerín oldatsor (Mall-oldat):
 - a. 20 ml 87%-os glicerínoldat + 80 ml 1%-os KOH.
 - b. 40 ml 87%-os glicerínoldat + 60 ml 1%-os KOH.

A festés menete:

1. Fixálás: 10%-os neutrális formalinoldatban, néhány órától 1 napig, a mérettől függően.
2. Mosás folyó csapvízben, egy éjszakán át.
3. Festés alciánkék oldattal.
4. Rehidrálás leszálló alkoholsorban: abszolút alkohol, 80%, 60%, 40%, 20%-os etil-alkohololdat, desztillált víz, 1-1 óráig.
5. Emésztés tripszinoldattal (a lágy szövetek eliminálására), 1-2 nap (15-20 mm hosszú állatnál).
6. Macerálás kálium-hidroxidos hidrogén-peroxid oldatban
7. Kálium-hidroxidos glicerinsorozat, amíg a preparátum le nem süllyed az edény aljára
8. A kész preparátum tömény glicerín oldatban, zárt edényben eltartható.

Eredmény: az áttetsző testben a porcos vázelemek kékek.

¹ <https://wiki.zfin.org/display/prot/A+Simple+Whole-Mount+Staining+Protocol+For+Bone+And+Or+Cartilage+In+Adults+And+Larvae>

Csontos vázelemek feltüntetése: alizarinvörös festés

Az eljárásnak többféle változata ismert, amelyek más-más állatcsoport és/vagy testméret esetében adnak jó eredményt. Alább a zebrahálra kidolgozott változatot közöljük²:

Oldatok:

- I. Nátrium-tetraborát (borax) oldat: 30 ml telített nátrium-tetraborát oldat + 70 ml víz.
- II. Alizarinvörös festékoldat: 1%-os KOH-oldathoz annyi festéket adunk, hogy az oldat színe mély bordó legyen.
- III. Kálium-hidroxidos glicerindatok:
 1. 20 ml 100%-os glicerindat + 80 ml 1%-os KOH.
 2. 40 ml 100%-os glicerindat + 60 ml 1%-os KOH.
- IV. Alkoholos glicerindat tárolásra: 70ml 87% glicerín + 30 ml 70% alkohol
 1. Fixálás: 10 %-os neutrális formalinoldatban, néhány órától 1 napig, a mérettől függően.
 2. Mosás folyó csapvízben, egy éjszakán át.
 3. Nyúzás (ha lehetséges) és eviszcerálás (zsigerek eltávolítása).
 4. Kálium-hidroxidos hidrogén-peroxid oldat, amíg a pigmentáció kifehéredik, illetve a fekete pigment halványbarna lesz, 1 nap (15–20 mm hosszú állatnál).
 5. Mosás csapvízben.
 6. Nátrium-tetraborát oldat, 12 óra–1 éjszaka.
 7. Festés alizarinvörös oldatban.
 8. Mosás csapvízzel, 30 perc.
 9. Emésztés tripszinoldattal (a lágy szövetek eliminálására), 1–2 nap (15–20 mm hosszú állatnál).
 10. Kálium-hidroxidos glicerinsorozat, amíg a preparátum le nem sülyed az edény aljára, általában 1-1 éjszaka.
 11. A kész preparátum alkoholos glicerindatban, zárt edényben eltartható.

Eredmény: az áttetsző testben a mésztartalmú vázelemek piros színűek lesznek.

Csont-porc (alciánkék-alizarinvörös) kombinált festés

Az eljárásnak többféle változata ismert, amelyek más-más állatcsoport és/vagy testméret esetében adnak jó eredményt.

Oldatok:

- I. Ammóniás etanol: 100 ml 70%-os etanolhoz 10 csepp ammónium-hidroxidot adunk.
- II. Alciánkék oldat:
 - a. 10 mg alciánkék
 - b. 80 ml 90%-os etanol
 - c. 20 ml jégecet
- III. Alizarin-red-S oldat: 2%-os KOH oldatban annyi alizarinvörös festéket oldunk, hogy az oldat színe bíborvörös legyen.

A munka menete:

1. Amennyiben lehetséges és szükséges, a tetemet megnyúzzuk még friss állapotban. A hasüregi szerveket eltávolítjuk.
2. Fixálás: 7–10%-os formalinban.
3. Kimosás: 1-2 napig folyó csapvízben.
4. A porcfestés előkészítése 70%-os ammóniás etanolban, 1-2 napig.
5. Porcfestés alciánkék oldatban, 1-2 nap.
6. Differenciálás 96%-os etanolban, 1-2 nap (többször cserélve, amíg az alkoholba kék festék oldódik ki).
7. Leszálló alkoholsor: 70, 50, 30%-os etilalkohol, 1-1 nap.
8. Desztillált vízes mosás, 1 nap.
9. Csontfestés alizarin-vörössel (alizarin-red-S), 1-2 nap.
10. Differenciálás 2-5 % KOH-ban, amíg az oldat színes lesz.

² <https://wiki.zfin.org/display/prot/A+Simple+Whole-Mount+Staining+Protocol+For+Bone+And+Or+Cartilage+In+Adults+And+Larvae>

11. Víztelenítés, derítés felszálló glicerinsorban: 40-, 60-, 80%-os, majd tömény glicerín (87%)

A preparátum lezárt, átlátszó falú edényben tárolható.

Eredmény: az áttetsző testben a porcok vázelemek kék, a mésztartalmú elemek piros színűek lesznek.

Általános áttekintésre szolgáló szövettani festések

Sejtmagok festése hematoxin festéssel

A hematoxin többnyire timsós oldatban vagy timsós pácolás³ után kerül alkalmazásra. Az érés alatt az alumíniumionok hatására a hematoxinból hematein képződik. Az érést mesterségesen is előidézhethetjük, ilyenkor a festék azonnal használható.

A hematein a fémion közvetítésével kapcsolódik a szövetek negatív töltésű csoportjaihoz (nukleinsavak, fehérjék). Ha csak magfestést szeretnénk elérni, akkor ezt a festékoldathoz adott savval vagy a timsótartalom növelésével érhetjük el.

A timsós hematoxin indikátor jellegű: semleges vagy lúgos közegben sötétkék, savas közegben barnásvörös. A kék színt legalább 5 perces csapvízes mosással (kékítés), a barnás színt 2%-os ecetsavas öblítéssel érhetjük el.

Erlich-féle savas hematoxin

Oldatok:

- I. 2 g hematoxint 90 ml 96%-os etil-alkoholban feloldunk, majd a térfogatot kiegészítjük 100 ml-re.
- II. 3 g kálium-alumínium-szulfátot ($KAl(SO_4)_2$) és a 0,4 g kálium-jodidot (KJO_3) desztillált vízben oldjuk, és a térfogatot kiegészítjük 100 ml-re.

A festék összeállítása:

1. A két oldatot összeöntjük.
2. Hozzáadunk:
 - a. 100 ml glicint és
 - b. 10 ml tömény ecetsavat.
3. Olyan edényben érleljük 14 napig, szobahőmérsékleten, amely biztosítja a szellőzést. Többször összerázzuk.

A festés menete:

1. A fénymikroszkópos metszetek deparaffinálása és rehidrálása.
2. Hematoxin-oldat, 15–60 másodperc.
3. Desztillált vizes öblítés.
4. Csapvízes mosás (átfolyó vízzel), 10 perc.
5. Desztillált vizes öblítés.
6. Víztelenítés és lefedés.

Eredmény: a magok kék.

Mayer-féle timsós hematoxin

Festékoldat készítése:

1. 1 g hematoxint melegítés közben kevés DV-ben feloldunk,

³ Az indirekt vagy pácfestékek oldata önmagában nem festő hatású. Alkalmazásuk előtt a metszetet fém- (vas-, alumínium-, króm-) sókkal kezelni kell, vagy a festékoldathoz kell a fém sókat adni. A fém sók a festéket oxidálják. Ehhez idő kell, ez az úgynevezett érlelési idő.

2. a térfogatot DV hozzáadásával kiegészítjük 1000 ml-re.
3. Hozzáadunk:
 - a. 0,2 g nátrium-jodátot,
 - b. 50 g timsót,
 - c. 50 g klorál-hidrátot,
 - d. 1 g citromsavat.

Festés:

1. A fénymikroszkópos metszetek deparaffinálása és rehidrálása.
2. Festés a hematoxin-oidatban: 5 perc.
3. Csapvizes mosás (kékítés): 5–10 perc.
4. Víztelenítés és lefedés.

Eredmény: a magok sötétkékek. Klorál-hidrát és citromsav nélkül a porc és a nyálka is festődik.

Heidenhain-féle vashematoxin

Oldatok:

1. Pácoltat: 2,5%-os vastimsó-oldat (ferri-ammóniumsulfát, amelynek csak ép, ibolyaszínű kristályai alkalmasak!).
2. 1%-os alkoholos hematoxin-oidat:
 - a. 1 g hematoxilint oldunk 10 ml 96%-os etanolban,
 - b. a térfogatot DV hozzáadásával kiegészítjük 100 ml-re,
 - c. legalább 4 hétig érleljük.

Festés:

1. A fénymikroszkópos metszetek deparaffinálása és rehidrálása.
2. Pácolás a pácoltatban: festés előtt 2–12 óráig.
3. Öblítés: DV-ben.
4. Festés (esetleg hígított) az 1%-os alkoholos hematoxin-oidattal: 1–36 óráig (a hígítás szükséges mértéke tapasztalati úton határozható meg).
5. Öblítés csapvízzel.
6. Differenciálás: a pácoltatban mikroszkóp alatt.
7. Csapvizes mosás (többször váltva): legalább 30 perc.
8. Víztelenítés és lefedés.

Eredmény: a sejtmag, a magvacskák, mitokondriumok, sejtközpont, a harántcsikolt izomrostok csikolata fekete vagy kékesfekete.

Weigert-féle vashematoxin

Oldatok:

- I. 1 g hematoxin 100 ml 96%-os etanolos oldatban,
- II. 1,5 g kristályos ferri-kloridot (ferrum sesquichloratum) 98 ml DV-ben oldunk, majd 1 ml tömény sósavat adunk hozzá.

Mindkét oldat korlátlan ideig eláll.

Festés:

1. A fénymikroszkópos metszetek deparaffinálása és rehidrálása.
2. Festés a fenti két oldat 1:1 arányú, frissen összeöntött keverékében: 5–10 perc.
3. Öblítés csapvízben.
4. Differenciálás 0,1%-os sósavas alkoholban.
5. Kimosás csapvízben.
6. Víztelenítés és lefedés.

Azonnal használható hematoxin-oldat: hemalaun

Az oldat összetétele:

Desztillált vízben, szobahőmérsékleten feloldunk:

1. 1 g kristályos hematoxilint,
2. 0,2 g nátrium-jodátot,
3. 50 g kálium-alumínium-szulfátot,
4. 50 g klorál-hidrátot,
5. 1 g citromsavat.
6. Oldódás után szűrjük, azonnal használható.

A festés menete:

1. A fénymikroszkópos metszetek deparaffinálása és rehidrálása,
2. 5 %-os foszforwolfrámsavas kezelés: 1 perc,
3. festés hemalaun oldattal: 15 perc,
4. kimosás csapvízben,
5. víztelenítés és lefedés.

Kernechtrot-festés

Oldatok:

- I. 5%-os alumínium-szulfát vagy kálium-timsó oldat: 5 g alumínium-szulfát vagy kálium-timsó 100 ml desztillált vízben oldva.
- II. Festékoldat készítése:
 - a. 0,1 g Kernechtrot festékport oldunk 100 ml 5%-os alumínium-szulfát vagy kálium-timsó oldatban forralással;
 - b. lehűlés után az oldatot megszűrjük.

A festés menete (metszetek esetében):

1. A fénymikroszkópos metszetek deparaffinálása és rehidrálása,
2. desztillált vizes öblítés,
3. Festés a szűrt festékoldattal: 1–5 perc,
4. a metszetek dehidrálása és lefedése.

Eredmény: a sejtmagok vörösek, a citoplazma és a sejtközi állomány rózsaszínű

A citoplazma festése

Eozin

Citoplazma festésére az eozin 1 %-os vizes oldatát használhatjuk:

A festékoldat készítése:

1. 0,5–1 g eozint desztillált vízben feloldunk,
2. térfogatát kiegészítjük 100 ml-re,
3. 1 csepp 2%-os ecetsavat adunk hozzá.

Megjegyzés: a festéket magfestékekkel kombinálva használjuk (l. alább). Festésre az eozin 1%-os alkoholos oldatát is használhatjuk.

Kombinált mag- és citoplazmafestés

Hematoxin-eozin festés I.

Oldatok:

- I. Erlich-féle hematoxin-oldat
- II. 1%-os vizes eozinoldat

A festés menete:

1. A fénymikroszkópos metszetek deparaffinálása és rehidrálása.
2. Erlich-féle hematoxin, 15–16 másodperc.
3. Desztillált vizes öblítés.
4. Csapvizes mosás (differenciálás), 10 perc.
5. Desztillált vizes öblítés.
6. 0,1 %-os eozinoldat +1 csepp 2%-os ecetsav 4'.
7. 96%-os etanollal öblítés.
8. Víztelenítés és lefedés.

Hematoxin-eozin festés II.

Oldatok:

- I. Mayer-féle timsós hematoxinoldat
- II. 1%-os vizes eozinoldat

A festés menete:

1. A fénymikroszkópos metszetek deparaffinálása és rehidrálása.
2. Festés timsós hematoxinoldattal: 2–5 perc.
3. Kékités csapvízben.
4. Öblítés desztillált vízben.
5. Festés vizes eozinoldattal: 0,5–1 perc.
6. Öblítés és differenciálás desztillált vízben.
7. Víztelenítés és lefedés.

Az eredmény: a magok kékek, a citoplazma piros. Az utóbbi festődés intenzitása az eozinhoz adott sav mennyiségével szabályozható (alacsonyabb pH-n a festődés erősebb, de túl sok sav az eozint kicsapja).

Kötőszövet kimutatása

Azan-festés

Oldatok:

- I. Azokármín-oldat:
 - a. 1 g azokármín G port 100 ml desztillált vízben felfoszpendálunk,
 - b. az oldatot felforraljuk, majd
 - c. lehűtjük.
 - d. Szűrőpapíron átszűrjük (a szuszpenzió egy része a szűrőpapíron visszamarad.)
 - e. A selymesen csillogó szüredékhez 1%-nyi jégecet (tömény ecetsavat) adunk.
- II. Mallory-oldat
 - a. 0,5 g anilinkéket,
 - b. 2 g Orange G-t feloldunk desztillált vízben,
 - c. 8 ml jégecet (koncentrált ecetsavat) adunk hozzá,
 - d. a végtérfogatot beállítjuk 100 ml-re.

- e. Az oldatot felforraljuk és
- f. szűrjük.

Megjegyzés: az oldatot használhatjuk 1:2 arányban desztillált vízzel hígítva.

III. Alkoholos anilinoldat:

- 1. 0,1 ml anilin-olaj 100 ml 96%-os etanolban

IV. Jégecet-alkohol:

- 1. 100 ml 96%-os etanol
- 2. 1 ml jégecet

V. Foszforwolfrámsav-oldat

- 1. 5 g foszforwolfrámsav 100 ml desztillált vízben

A festés menete:

- 1. Deparaffinálás és rehidrálás,
- 2. 3%-os kálium-bikromátos pácolás (ha az anyag nem bikromátos-szublimátos rögzítőszerrel volt fixálva): 20 perc–több óra.
- 3. Magfestés: 1%-os, 56 °C-ra előmelegített azokármín-oldatban, jól zárható edényben (küvettában), termosztátban: 5–10 perc.
- 4. A küvétát kivesszük a termosztátból, és hűlni hagyjuk.
- 5. Öblítés desztillált vízben.
- 6. Differenciálás mikroszkópos kontroll mellett 1%-os alkoholos anilinoldatban, amíg a magstruktúra meg nem jelenik.
- 7. A differenciálás leállítása 1%-os jégecet-alkoholban: 0,5–1 perc.
- 8. Pácolás és a kötőszövet elszíntelenítése 5%-os foszforwolfrám-savban: 2 óra.
- 9. Öblítés desztillált vízben.
- 10. Festés Mallory-oldatban: 0,5–2 perc (hígított oldat használata esetén 90–120 perc).
- 11. Öblítés desztillált vízben.
- 12. Differenciálás 96%-os etanolban.
- 13. Víztelenítés és lefedés.

A festés eredménye: a sejtmagok pirosak, a kötőszöveti alapállomány és a kollagénrostok élénk kékek, a harántcsikolt izomrostok ibolyás színűek, a vörösvértestek pirosak vagy narancssárgák.

Nyálka kimutatása

PAS festés

Oldatok:

I. Schiff-reagens:

- a. 1 g bázikus fukszint 300 ml-es lombikban 200 ml forró desztillált vízzel rázogatós közben feloldunk,
- b. 50 °C-ra lehűtjük és jól záródó üvegbe szűrjük,
- c. 20 ml 1 N sósavat adunk hozzá,
- d. 25 °C-ra hagyjuk kihűlni.
- e. Hozzáadunk 1 g vízmentes NaHSO₃-ot és
- f. sötétben 24 óráig állni hagyjuk.

II. Perjodátoldat:

- a. 0,4g kálium-perjodátot
- b. 20 ml desztillált vízben feloldunk,
- c. 0,25 ml 1 M-os sósavat adunk hozzá.

A festés menete:

- 1. Deparaffinálás és rehidrálás.
- 2. Káliumperjodát, 4-5 perc.
- 3. Csapvizes mosás, 10 perc.

4. Desztillált vizes öblítés.
5. Schiff-reagens, 15 perc.
6. Kénssavas víz (Na-biszulfid oldat), 10 perc.
7. Csapvizes mosás, 10 perc.
8. Desztillált vizes öblítés,
9. 96%-os etanol, 5 perc
10. Víztelenítés és lefedés.

Eredmény: a szénhidráttartalmú struktúrák élénk pirosak.

Lipidek kimutatása

Szudánfekete festés

A festékoldat készítése:

0,7 g szudánfekete B-t melegítéssel 100 ml propilén-glikolban oldunk, majd melegen szűrjük.

A festés menete:

1. Fixálás kalciumtartalmú formalinban;
2. beágyazás, metszés/fagyasztva metszés;
3. mosás propilén-glikolban, 3–5 perc;
4. festés szudánfekete oldattal, 5–7 perctől 20–30 percig (a szerv lipidtartalmától függ, mikroszkópos kontrollal beállítható);
5. differenciálás 85 ml propilén-glikol és 15 ml desztillált víz keverékében, 2–3 perc;
6. öblítés desztillált vízben;
7. magfestés: a vörös magfestőket ajánljuk, pl. Kernechtrot, 5 perc;
8. öblítés desztillált vízben;
9. lefedés glicerín-zselatin keverékben.

Eredmény: A lipidek kékesfeketék, a sejtmagok vörösek.

Megjegyzés: az 1.–2. lépések helyett lehet fagyasztott metszeteket készíteni.

Oilred festés

A törzsoldat készítése:

0,2–0,5 g Oilred festéket 10 ml izopropil-alkoholban oldunk (az oldat telített lesz)

A festékoldat készítése:

6 ml izopropil-alkoholos festék törzsoldathoz 4 ml desztillált vizet adunk. Az oldatot 5–10 percig állni hagyjuk, majd szűrjük, és azonnal használjuk.

A festés menete:

1. Fixálás kalciumtartalmú formalinban;
2. beágyazás, metszés/fagyasztva metszés;
3. festés Oilred festékoldattal, 10 perc;
4. mosás csapvízzel, 1-2 perc;
5. magfestés hematoxilinnel, kékítés;
6. öblítés desztillált vízzel;
7. lefedés glicerín-zselatin keverékben.

Idegszövet festése

Idegrostok festése ozmium-tetroxiddal

A festékoldat készítése:

0,5–1 g ozmium-tetroxidot oldunk 100 ml desztillált vízben.

A festés menete:

1. A metszeteket deparaffináljuk, rehidráljuk,
2. desztillált vizes öblítés,
3. festés 0,5–1%-os ozmium-tetroxid-oldattal, amíg a metszet közepes barna lesz,
4. többszörös desztillált vizes öblítés,
5. víztelenítés,
6. a metszetek tárgylemezre helyezése,
7. lefedés.

Eredmény: A festést követően a metszetek teljes felülete barna lesz, de a rostkötegek és pályák feketésbarna színnel tűnnek elő.

Luxol fast blue-krezilibolya festés

Oldatok:

- I. 0,1% Luxol fast blue festékoldat:
 - a. 0,1 g Luxol fast blue festékport oldunk
 - b. 100 ml 95%-os etil-alkoholban, majd
 - c. 0,5 ml jégecet (tömény ecetsav) mérünk hozzá.
- II. 0,1% krezilibolya festékoldat:
 - a. 0,1 g krezilibolya festékport oldunk
 - b. 100 ml desztillált vízben, hozzáadunk
 - c. 10 csepp tömény ecetsavat, végül
 - d. szűrjük.
- III. 0,05% lítium-karbonát-oldat:
 - a. 0,05 g lítium-karbonátot bemérünk
 - b. 95 ml desztillált vízbe, majd a
 - c. térfogatot kiegészítjük 100 ml-re.

A festés menete:

1. Deparaffinálás, rehidrálás 95%-os etil-alkoholig.
2. Festés Luxol fast blue festékoldattal 56 °C-on, egy éjszakán át (fagyasztott metszeteknél maximum 16 óra).
3. Kimosás: a festék feleslegét 95%-os etil-alkoholban eltávolítjuk.
4. Öblítés desztillált vízzel.
5. Differenciálás lítium-karbonát-oldatban, 30 másodperc,
6. differenciálás 70%-os etil-alkoholban, 30 másodperc,
7. öblítés desztillált vízben.
8. Mikroszkópi ellenőrzés: a fehérállomány élesen elkülönül a szintelen, festetlen szürkeállománytól. Ha szükséges, az 5–7. lépéseket megismételjük.
9. Festés krezilibolya festékoldatban, 30–40 másodperc,
10. öblítés desztillált vízben.
11. 96%-os etil-alkohol, 5 perc (mikroszkópos kontroll).
12. Dehidrálás (tömény alkohol, xilol I és xilol II), 5–5 perc.
13. Lefedés.

A vibratómmal vagy fagyasztva metszett metszetekből az 1. lépés után a lipideket ki kell vonni 1:1 arányú etil-alkohol:kloroform keverékkel (néhány óra–egy éjszaka), majd a metszeteket vissza kell vinni 95%-os alkoholig.

Félvékony metszetek festése

Toluidinkék festés

Törzsoldatok:

- I. 1%-os azúr II oldat: 1 g azúr II festéket oldunk 50 ml desztillált vízben;
- II. 1%-os borax oldat: 1 g boraxot oldunk 50 ml desztillált vízben és ebben feloldunk 1 g toluidinkék festéket, majd az így összeállított oldatot felfőzzük.

A festékoldat elkészítése: összemérünk

1. 50 ml I. oldatot és
2. 50 ml II. oldatot, majd hozzáadunk
3. 25 gr szacharózt.

A metszetek festése: A tárgylemezre szárított félvékony metszetre néhány csepp festékoldatot cseppentünk, majd láng fölött vagy melegítőasztalon (pl. 86 °C-on) felmelegítjük. A láng fölött addig tartjuk a tárgylemezt, amíg a festékcsepp peremén arany színű gyűrű nem jelenik meg. Vigyázat, a festéket túlhevíteni, felforralni nem szabad!

Eredmény: a metszet részletei ortokromázia esetében kékeslilák, metakromázia esetén lilás-vörösek.

Metilénkék–azúr II festés

A festékoldatot többféleképpen is készíthetjük, itt csak egy változatot mutatunk be. Kapható elkészített, rögtön használható formában is.

Törzsoldatok:

- I. 1% metilénkék oldat (1 g festék 100 ml desztillált vízben oldva),
- II. 1% azúr II oldat (1 g festék 100 ml desztillált vízben oldva),
- III. 1% Na_2CO_3 oldat

A festékoldat készítése: használat előtt az I., II. és III. törzsoldatokat 1:1:2 arányban összeöntjük. A kapott keveréket esetleg tovább hígíthatjuk háromszorosára.

A festés menete: A tárgylemezre szárított félvékony metszetre néhány csepp festékoldatot cseppentünk, majd láng fölött vagy melegítőasztalon (pl. 86 °C-on) felmelegítjük. A láng fölött addig tartjuk a tárgylemezt, amíg a festékcsepp peremén arany színű gyűrű nem jelenik meg. Vigyázat, a festéket túlhevíteni, felforralni nem szabad! Amikor melegítőasztalt használunk, a festés idejét, amely függ a beágyazószertől és a metszet vastagságától is, tapasztalati úton határozhatjuk meg.

Eredmény: a metszet részletei kék színben jelennek meg.

Metilénkék–bázikus fukszin festés

Oldatok:

- I. 0,5%-os bázikus fukszin oldat
- II. 1%-os metilénkék–azúr II. oldat (l. ott)
- III. 1%-os Na_2CO_3 oldat

A festés menete:

1. metilénkék–azúr II festés láng fölött,

2. öblítés Na_2CO_3 oldatban,
3. festés bázikus fukszinnal láng fölött.

Eredmény: A sejtek kék, a lipidcseppek zöld, a rugalmas rostok bordó, a kötőszöveti alapállomány és a kollagén rostok rózsaszínűek lesznek.

Hematoxin-eozin és Azan-festés

Félvékony metszetek festésére a mikrotechnikai festékeket forgalmazó cégek által kifejlesztett és előre összeállított festékoldatokat ajánljuk, amelyekkel a mellékelt használati útmutató alapján dolgozhatunk.

Ezüstimpregnáció

Oldatok:

- I. 2%-os ezüst-nitrát (AgNO_3) oldat,
- II. 2%-os oxálsav oldat,
- III. 2–3%-os nátrium-tioszulfát (NaS_2O_3) oldat.
- IV. Az előhívó összetétele:
 - a. 40 ml 3%-os zselatin oldat,
 - b. 10 ml 2%-os AgNO_3 oldat,
 - c. 4 ml 1%-os hidrokinon oldat.

Megjegyzés: a hívó oldatot használat előtt kell összeállítani, s az csak egyszer használható! Maga a 2-os ezüst-nitrát oldat rövid ideig sötét üvegben tárolható.

A festés menete:

1. A műgyanta eltávolítása: nátrium-etoxid maratás, 15 perc;
2. öblítés abszolút alkoholban;
3. mosás abszolút alkoholban, 5 perc;
4. 70%-os alkoholos kezelés, 5perc;
5. desztillált vizes mosás, legalább 5 perc
6. Inkubálás 2%-os AgNO_3 oldatban 50°C -on, sötétben, 1–2 óra.
7. Öblítés desztillált vízben, sötétben, 1–2 perc.
8. Hívás az elő hívó oldatban, sötétben, 1–2 perc.
9. Öblítés desztillált vízben, 5 perc
10. inkubálás 2%-os oxálsav oldatban, 3–4 perc,
11. öblítés desztillált vízben,
12. Inkubálás NaS_2O_3 -oldatban, 5 perc,
13. folyóvizes mosás, 5 perc.
14. Víztelenítés, lefedés.

Hisztokémiai reakciók

Gömöri-féle lúgos foszfátáz kimutatás

Oldatok:

- I. Inkubáló oldat: feloldunk
 - a. 0,6 g nátrium-glicerofoszfátot vagy nátrium- β -glicerofoszfátot (ennek hasítása gyorsabb),
 - b. 1 g kalcium-kloridot,
 - c. 0,5 g nátrium veronált
 - d. 90 ml desztillált vízben, majd
 - e. a térfogatot kiegészítjük 100 ml-re.
 - f. A kész oldathoz aktivátorként 10%-os magnézium-klorid oldatból 0,5 ml-t adunk.
- II. 1–2%-os kalcium-klorid vagy kalcium-nitrát oldat

- a. 1 vagy 2 g kalcium-kloridot vagy ~-nitrátot oldunk desztillált vízben, majd
- b. a térfogatát kiegészítjük 100 ml-re.
- III. 2%-os kobaltsóoldat:
 - a. 5 g kobalt-szulfátot/kobalt-nitrátot, ~-kloridot oldunk desztillált vízben, majd
 - b. a térfogatát kiegészítjük 100 ml-re.
- IV. 0,5–1%-os ammónium-szulfid oldat:
 - a. 0,5–1 g ammónium-szulfidot feloldunk desztillált vízben, majd
 - b. a térfogatát kiegészítjük 100 ml-re.

Az eljárás menete:

1. Inkubálás az inkubálóoldatban 37 °C-on, 1–2 óra,
2. öblítés kalcium-klorid vagy ~-nitrát oldatban, 1–2 perc.
3. Inkubálás kobaltsóoldatban, 5 perc,
4. négyszer váltott alapos és gyors öblítés lúgosított desztillált vízben (a desztillált vízhez veronálpuffert adhatunk),
5. inkubálás ammónium-szulfid oldatban, 3–5 perc,
6. mosás csapvízben, 10 perc,
7. víztelenítés, 4–5 perc,
8. lefedés.

Kiértékelés: az eredmények értékelésekor vegyük figyelembe, hogy az esetleges beágyazás során az enzim aktivitása jelentősen csökken, és az inkubálás (1. lépés) idejének hosszával arányosan egyre nagyobb mértékű diffúziós műterméket kapunk.

Gömöri-féle savas foszfátáz kimutatás

Oldatok:

- I. Inkubáló oldat: feloldunk
 - a. 0,6 g ólomnitrátot
 - b. 500 ml 0,05 M-os pH 5 acetátpufferben, majd hozzáadunk
 - c. 50 ml 3%-os nátrium-β-glicerofoszfát oldatot.
 - d. Az oldatot 37 °C-os termosztátban pár óráig állni hagyjuk, majd
 - e. megszűrjük. Ezután
 - f. a térfogatához mérten kb. 5 %-nyi desztillált vízzel felhígítjuk.
- II. 2–3%-os ecetsav oldat
- III. Híg, kb. 0,5%-os ammónium-szulfid oldat

Az eljárás menete:

1. Fixálás 10%-os neutrális formalinban, 0 °C körüli hőmérsékleten, 12–24 óra;
2. Folyóvízes kimosás, 30–60 perc;
3. 5–7 μm vastag metszetek készítése fagyasztó mikrotommal vagy kriosztáttal
4. Inkubálás az inkubáló oldatban 37 °C-on, 2–8 óráig.
5. Gyors öblítés desztillált vízben;
6. Öblítés 2–3%-os ecetsav oldatban;
7. Öblítés desztillált vízben.
8. Inkubálás híg, kb. 0,5%-os ammónium-szulfid oldatban, 3–5 perc,
9. Mosás csapvízben, 5–10 perc;
10. Esetleges hematoxin-eozin festés;
11. lefedés glicerines zselatinban.

Megjegyzés: A kész metszetek vízteleníthetők és ezután lefedhetők, de a xilolos kezelés halványítja a csapadék színét. A csapadék elektronmikroszkópban is látható.

Pufferek, pufferrendszerek

Sörensen-féle foszfát puffer

Törzsoldatok:

I. 0,25 M dinátrium-hidrogén-foszfát, 1000ml

Elkészítése:

	mólsúly (MW)	bemérendő mennyiség
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	177,99	44,50 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	268,08	67,02 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	358,15	89,54 g

A kimért mennyiségű anyaghoz desztillált vizet adunk, abban feloldjuk, majd a térfogatot kiegészítjük 1000 ml-re.

II. 0,25 M kálium-dihidrogén-foszfát, 1000 ml

Elkészítése:

34,02 g KH_2PO_4 -ot (MW=136,09) beoldunk 900 ml desztillált vízbe, majd a térfogatot kiegészítjük 1000 ml-re.

A használt puffer: 0,125 M, 100 ml, pH 7,0–7,5

Készítése: keverjük össze

1. 35 ml I. és
2. 15 ml II. törzsoldatot,
3. egészítsük ki a térfogatát desztillált vízzel 100 ml-re

Megjegyzés: Fixáló készítése estén a törzsoldatokat ugyanilyen arányban öntjük össze. Ebben az esetben csak annyi desztillált vizet adunk a keverékhez, amennyivel a fixáló hozzáadása után azt 100 ml-re kiegészítjük.

Kakodilátpuffer

Törzsoldatok:

I. 0,2 M nátrium-kakodilát, 1000ml oldat készítése:

42,8 g $\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ (MW = 214,03) anyagot desztillált vízben oldunk, majd a térfogatát kiegészítjük 1000 ml-re.

II. 0,2 M sósavoldat készítése:

- a. 10 ml koncentrált (36–38 %-os) HCl-oldatot lassan belepipettázunk
- b. 603 ml desztillált vízbe.

A használandó puffer: 0,1 M, 100 ml

Elkészítése:

1. 50 ml I. oldathoz adjunk a II. (sósav) oldatból annyit, amennyi a kívánt pH eléréséhez szükséges (l. alábbi táblázat),
2. egészítsük ki a térfogatát desztillált vízzel 100 ml-re, vagy
3. hígítsuk 1:1 arányban a kívánt fixálóval.

pH	sósav oldat
6,4	18,3
6,6	13,3
6,8	9,3
7,0	6,3
7,2	4,2
7,4	2,7

Veronal-acetát puffer

Törzsoldat készítése:

0,28 M, 100 ml

Oldjunk fel desztillált vízben:

1. 2,98 g nátrium-veronált ($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}_2\text{Na}$, MW = 206,18)
2. és nátrium-acetátot az alábbi táblázat szerint:

nátrium-acetát, vízmentes	CH_3COONa	MW = 82.03	1,15 g
nátrium acetát, hidratált	$\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$	MW = 136.09	1,90 g

3. A térfogatát egészítsük ki 100 ml-re.

A puffer készítése:

1. 5 ml veronál-acetát törzsoldathoz adjunk
2. 15 ml desztillált vizet,
3. 0,1 M sósavoldattal állítsuk be a kívánt pH-t.

Az oldat nem tárolható még 4 °C -on sem.

Rögzítőszerke, keverékek, kimosók

Neutrális formalin-szukróz

A rögzítő összeállítása:

1. 50 ml 0,25 M Sörensen-pufferhez hozzáadunk
2. 20 ml tömény formalint, pH~7,2,
3. 30 ml desztillált vizet,
4. 2,5 g szacharózt.

A rögzítés ideje: 24–48 óráig

Kimosás: Sörensen-pufferben

A rögzítőszerke és a már fixált anyagot jégsezkrényben kell/lehet tárolni (kb. 1 hónapig).

Kalcium tartalmú formalin lipidek rögzítéséhez

Az oldat összetétele:

- 10 ml formalin,

- 10 ml 10%-os, vízmentes kalcium-kloridból készített oldat,
- 80 ml desztillált víz.

A fixálás ideje: 1–2 nap.

Kimosás: Sörensen-pufferben.

Bouin-rögzítőkeverék

Telített pikrinsavoldat: 30–50 g pikrinsavat 1000 ml meleg desztillált vízben oldunk, jól elkeverünk, majd az oldatot hűlni hagyjuk. Az edény alján oldatlan pikrinsavnak kell leülepednie.

A rögzítőoldat összetétele:

1. 15 ml telített vizes pikrinsav-oldat,
2. 5 ml formalin,
3. 1 ml jégecet (koncentrált ecetsav).

A fenti komponenseket közvetlenül a rögzítés előtt, frissen kell összeönteni.

A rögzítés menete:

1. Rögzítési idő: 1–2 órától 12–24 óráig (a minta nagyságától és jellegétől függően).
2. Kimosás: 80%-os etanolban addig, amíg pikrinsav oldódik ki a mintából. (Ez a lépés a későbbi festést akadályozó pikrinsav eltávolítását is szolgálja. Megjegyezzük, hogy a pikrinsav feleslegét a metszés után – a víztelenítés során – magukból a metszetekből is kivonhatjuk.)

Carnoy-keverék

A rögzítőoldat összetétele:

1. 60 ml abszolút etanol,
2. 30 ml kloroform,
3. 10 ml jégecet (tömény ecetsav).

A rögzítés menete:

1. Rögzítési idő: 10 perctől 4–5 óráig (az anyag nagyságától függően).
2. Kimosás: abszolút vagy 80%-os etanolban, 24 óra.
3. Beágyazáshoz használt intermedier, majd beágyazás.

Karnovsky-keverék

A rögzítőoldat összetétele:

1. 1,5% paraformaldehid,
2. 1% glutáraldehid,
3. 0,125 M Sörensen-puffer.

A rögzítés menete:

1. A rögzítés ideje: 1-2 óra.
2. Kimosás, tárolás: 0,125 M Sörensen pufferben, pH 7,4.

Elektronmikroszkópos munkához ajánlott rögzítőkeverékek

Rutin fixáláshoz ajánlott rögzítőkeverék

A rögzítő összetétele:

- 1,5% PFA,
- 1% GA,
- 2-3 mM CaCl_2 ,
- 1% cukor,
- 0,1M Na-kakodilát,
- pH 7.4.

Immunjelöléshez ajánlott rögzítőkeverék

A rögzítőkeverék összetétele:

- 3–4% PFA,
- 0,05–0,2% GA,
- 2-3 mM CaCl_2 ,
- 1% szacharóz,
- 0,1M Na-kakodilát,
- pH 7.4.

Víztelenítés, paraplasztos (paraffinos) beágyazás előtt

A rögzítőszer kimosása után felszálló alkoholsort használunk, amelyben az alkohol koncentrációja fokozatosan emelkedik. Az alacsonyabb koncentrációjú tagokat elhagyhatjuk, ha a rögzítőszer kimosása is alkohollal történik: a víztelenítést ekkor elegendő a 80%-os etanollal kezdenünk.

A felszálló alkoholsor tagjai:

1. 50%-os etanol: 2–4 óra,
2. 70%-os etanol: 2–4 óra,
3. 80%-os etanol: 2–4 óra,
4. 90%-os etanol: 6 óra,
5. 96%-os etanol: 6 óra,
6. abszolút etanol.

Hosszabb szünetet a 70 vagy 80%-os alkoholban tarthatunk.

Deparaffinálás és rehidrálás

A festés előtt a metszetekből kioldjuk a beágyazószert (aromás oldószerrel), majd azokat leszálló alkoholsoron visszük végig.

1. Xilol I.: 15 perc,
2. xilol II.: 15 perc,
3. abszolút etanol: 5 perc,
4. 96%-os etanol: 5 perc,
5. 90%-os etanol: 5 perc,
6. 80%-os etanol: 5 perc,

7. 70%-os etanol: 5 perc,
8. desztillált vizes öblítés.

A lefedés előtti dehidrálás és derítés

A festés után víztelenítésre etil-alkoholt használunk. Egyes festékek ebben kioldódnak, ezért a metszeteket csak rövid ideig szabad vele kezelni. A metszet (fel)derítése során annak fénytörését homogénné tesszük, így a festékek színei élénkebbek lesznek.

A víztelenítés és a derítés lépései:

1. 96%-os alkohol: öblítés,
2. abszolút alkohol: 1–2 perc,
3. a körbetörölgetett metszetet lecseppentjük terpeneollal vagy bergamottolajjal,
4. xilol I: 5 perc,
5. xilol II: 5 perc.

Ezt követi a lefedés.

Beágyazás fénymikroszkópos vizsgálathoz

Beágyazás paraplasztba

Metilbenzoát-celloidin oldat: 10 g celloidint 1000 ml metilbenzoátba teszünk, majd alaposan elkeverjük (az üveget 12 óráig fejre állítva tartjuk, ezt követően alaposan összerázzuk).

A víztelenítés utáni lépések:

1. metilbenzoát-celloidin: amíg a minta átderül (áttetszővé válik),
2. metilbenzoát celloidin: paraplaszt 2:1 keveréke: 56 °C termosztátban,
3. metilbenzoát celloidin: paraplaszt 1:1 keveréke: 56 °C termosztátban,
4. metilbenzoát celloidin: paraplaszt 1:2 keveréke: 56 °C termosztátban,
5. paraplaszt (előparaplaszt), 56 °C-os termosztátban,
6. paraplaszt (beágyazó vagy kiöntő paraplaszt): 56 °C-os termosztátban,
7. orientálás (a minta megfelelő síkba állítása meleg csipesszel),
8. gyors lehűtés jeges vízfürdőben,
9. a megszilárdult blokk kiütése a beágyazóformából,
10. a blokk kifaragása (a felesleges beágyazószer eltávolítása): az anyag fölött 10–15 mm-nyi, körülötte pedig 3–4 mm-es szegélyt hagyunk.

Alternatív beágyazás, metil-benzoát helyett toluolt használva:

1. metilbenzoát-celloidin: amíg a minta átderül (áttetszővé válik),
2. toluol: paraplaszt 2:1 keveréke: 56 °C-os termosztátban,
3. toluol: paraplaszt 1:1 keveréke: 56 °C-os termosztátban,
4. toluol: paraplaszt 1:2 keveréke: 56 °C-os termosztátban,
5. paraplaszt (előparaplaszt), 56 °C-os termosztátban,
6. paraplaszt (beágyazó vagy kiöntő paraplaszt): 56 °C-os termosztátban,
7. orientálás (a minta megfelelő síkba állítása meleg csipesszel),
8. gyors lehűtés jeges vízfürdőben,
9. a megszilárdult blokk kiütése a beágyazóformából,
10. a blokk kifaragása.

Beágyazás elektronmikroszkópos vizsgálathoz

Konkrét eljárást itt nem közlünk, mivel a forgalomban lévő, többkomponensű beágyazószerek mellé a gyártók használati utasítást mellékelnek. A beágyazást ennek útmutatása alapján végezzük.

Beágyazószert eltávolítása műgyantába ágyazott félvékony metszetekből

Az epoxi-műgyanták kioldására túltelített nátrium-metoxid és nátrium-etoxid oldatot is használhatunk. Az utóbbi elkészítését közöljük.

Nátrium-etoxid oldat készítése: üvegedényben annyi nátrium-hidroxidot oldunk abszolút etanolban, hogy az túltelített legyen (edény alján maradjon feloldatlan anyag). Az edényt lezárjuk, sötét helyre tesszük (alufóliával beburkoljuk) és napokig állni hagyjuk. Érés közben az oldat színe sárásbarna lesz. Használat előtt az oldat felülúszójából kellő mennyiséget leöntünk és azt szűrjük, a kapott oldatot szükség szerint etanollal akár háromszorosára is hígíthatjuk.

Az eljárás menete:

1. Maratás küvettában, 15–20 perc,
2. öblítés abszolút etanolban.
3. Ha szükséges, desztillált vizes öblítés kétszer.

Megjegyzés: a kezelés ideje függ a beágyazószertől, a metszet vastagságától és a maratószer hígításától, így igen változó lehet.

Immuncitokémiai jelölés beágyazás után (postembedding)

Kétlépcsős immunjelölés

Oldatok: a vegyszerforgalmazó cégek által készen kapható, elektronmikroszkópos munkához kifejlesztett oldatokat ajánljuk, amelyek por alakjában kaphatók és csak a megadott módon hígítani kell őket. Ez alól kivétel a hidrogén-peroxid és a Tween20.

- I. 5%-os hidrogén-peroxid (H₂O₂) oldat maratáshoz
- II. PBS: foszfát puffer, pH 7,2–7,4;
- III. PBS+1%-os BSA oldat, pH 7,2–7,4;
- IV. blokkoló oldat: 3%-os tejpor/PBS oldat, pH 7,2–7,4
- V. TBS, pH 8–8,2
- VI. TBS+1%-os BSA, pH 8–8,2
- VII. TBS+1%-os BSA+0,05% Tween 20 (TTBS)
- VIII. első ellenanyag: a kívánt koncentráció eléréséhez szükséges mennyiség PBS+1,5%-os tejpor PBS+0,5%-os BSA oldatban oldva;
- IX. arannyal konjugált második ellenanyag: a kívánt koncentráció eléréséhez szükséges mennyiség TBS+1%-os BSA+0,05% Tween 20 (TTBS) oldatban oldva.

Az eljárás menete:

1. Maratás 5%-os H₂O₂ oldattal szobahőmérsékleten, 5 perc;
2. mosás szupertiszta vízzel, 3x5 perc;
3. mosás PBS-ben, 5 perc;
4. inkubálás PBS+1%-os BSA oldatban szobahőmérsékleten, 5 perc;
5. Blokkolás 3%-os tejpor/PBS oldatban szobahőmérsékleten, 20–30 perc.

6. Inkubálás az első ellenanyaggal 4 °C-on, egy éjszakán át.
7. Mosás PBS+1%-os BSA oldatban szobahőmérsékleten, 2x5 perc.
8. Mosás TBS+1%-os BSA oldatban szobahőmérsékleten, 5 perc.
9. Mosás TBS+1%-os BSA+0,05%-os Tween 20 oldatban szobahőmérsékleten, 5 perc.
10. Inkubálás arannyal konjugált második ellenanyaggal 4 °C-on, minimum 6 óra.
11. Mosás TBS oldatban, 3x5 perc;
12. Mosás szupertiszta desztillált vízben, 2x5 perc;
13. öblítés szupertiszta desztillált vízben (gördülő cseppes módszer);
14. a rostélyok szárítása.

Háromlépcsős immunjelölés

Oldatok: a vegyszerforgalmazó cégek által készen kapható, elektronmikroszkópos munkához kifejlesztett oldatokat ajánljuk, amelyek por alakjában kaphatók és csak a megadott módon higítani kell őket. Ez alól kivétel a hidrogén-peroxid és a Tween20.

- I. 5%-os hidrogén-peroxid (H_2O_2) oldat maratáshoz
- II. PBS (foszfát puffer), pH 7,2–7,4;
- III. PBS+1%-os BSA oldat, pH 7,2–7,4;
- IV. blokkoló oldat: 3%-os tejpor/PBS oldat, pH 7,2–7,4
- V. TBS, pH 8–8,2
- VI. TBS+1%-os BSA, pH 8–8,2
- VII. TBS+1%-os BSA+0,05% Tween 20 (TTBS)
- VIII. első ellenanyag: a kívánt koncentráció eléréséhez szükséges mennyiség PBS+1,5%-os tejpor+0,5%-os BSA oldatban oldva;
- IX. biotinnal konjugált második ellenanyag: a kívánt koncentráció eléréséhez szükséges PBS+1,5%-os tejpor+0,5% BSA oldatban oldva;
- X. arannyal konjugált anti-biotin ellenanyag: a kívánt koncentráció eléréséhez szükséges mennyiség TBS+1%-os BSA+0,05% Tween 20 (TTBS) oldatban oldva;

Az eljárás menete:

1. Maratás 5%-os H_2O_2 oldattal szobahőmérsékleten, 5 perc;
2. mosás szupertiszta vízzel, 3x5 perc;
3. mosás PBS-ben, 5 perc
4. inkubálás PBS+1%-os BSA oldatban szobahőmérsékleten, 5 perc;
5. Blokkolás 3%-os tejpor/PBS oldatban szobahőmérsékleten, 20–30 perc.
6. Inkubálás az első ellenanyaggal 4 °C-on, egy éjszakán át.
7. Mosás PBS+1%-os BSA oldatban szobahőmérsékleten, 2x5 perc.
8. Inkubálás a második, biotinnal konjugált ellenanyaggal szobahőmérsékleten, 1 óra.
9. Mosás PBS+1%-os BSA oldatban szobahőmérsékleten, 2x5 perc.
10. Mosás TBS+1%-os BSA oldatban szobahőmérsékleten, 5 perc.
11. Mosás TBS+1%-os BSA+0,05%-os Tween 20 oldatban szobahőmérsékleten, 5 perc
12. Inkubálás arannyal konjugált anti-biotin ellenanyaggal 4 °C-on, 5–6 óra.
13. Mosás TBS oldatban, 3x5 perc;
14. Mosás szupertiszta desztillált vízben, 2x5 perc;
15. öblítés szupertiszta desztillált vízben (gördülő cseppes módszer);
16. a rostélyok szárítása.

Kontrasztosítás

Ultravékony metszetek rutinvizsgálatokhoz

Oldatok:

- I. Ólomcitrát oldat:
 - a. felforralunk 7,5 ml szupertiszta vizet, majd lehűtjük,

- b. 330 mg ólomnitrátot ($\text{Pb}/\text{NO}_3/$) feloldunk benne,
 - c. alaposan elkeverjük (vortex), majd
 - d. 440 mg trinátrium-acetátot ($\text{Na}_3/\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7/\text{x}_2\text{H}_2\text{O}$) hozzáadunk,
 - e. alaposan elkeverjük (vortex).
 - f. Állni hagyjuk 30 percig, közben néha rázogatójuk: az oldat tejfehér lesz
 - g. 2 ml 1N NaOH-ot hozzácsepegtetünk
 - h. 12,5 ml végtérfogatig szupertiszta vízzel felengedjük ($\text{pH} \approx 12$)
- II. Uranyl-acetát oldat:
- a. 2 g uranyl-acetátot bemérünk
 - b. 50 ml 50%-os, szupertiszta vízzel készített metil-alkohol oldatba

A kontrasztosítás menete:

1. uranyl-acetát 20 perc
2. desztillált vizes öblítés, szárítás
3. ólom-citrát 8 perc

A fenti eljárás epoxi-gyantába ágyazott metszetekre vonatkozik, azt minden esetben a használt beágyazószerhez kell igazítani. Immuncitokémiai mintán rövidebb időket javasolunk.

A nem saját ábrák forrása

2.2.D

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blood_film_01.jpg?uselang=hu

2.3.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:B-cell_chronic_lymphocytic_leukemia_%28B-CLL%29.jpg?uselang=hu

2.5.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bone_marrow_biopsy.jpg?uselang=hu

2.6.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:AML-M4EO.jpg>

2.7.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:AML_M6,_multinucleated_erythroblast.jpg?uselang=hu

2.8.A

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Morbus_Fabry_kidney_biopsy_01.jpg?uselang=hu, Pr Marie-Claire GUBLER, Paris, France (D. P. Germain: Fabry disease. In: Orphanet journal of rare diseases Vol. 5, 2010, 30, PMID 21092187. PMC 300961. (Review))

2.8.B

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Morbus_Fabry_kidney_biopsy_02.jpg?uselang=hu, Pr Laura BARISONI, New-York University, New York, USA. (D. P. Germain: Fabry disease. In: Orphanet journal of rare diseases Vol. 5, 2010, 30, PMID 21092187. PMC 300961. (Review))

2.8.C

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Morbus_Fabry_kidney_biopsy_TEM_03.jpg?uselang=hu, Pr Marie-Claire GUBLER, Paris, France. (D. P. Germain: *Fabry disease*. In: *Orphanet journal of rare diseases* Vol. 5, 2010, 30, PMID 21092187. PMC 300961. (Review))

2.12.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:NCP14053.jpg?uselang=hu>, NCP14053

2.13.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PMID19190758_PLoS_0004371.png, Popp A, Urbach A, Witte OW, Frahm C, 2009 Adult and Embryonic GAD Transcripts Are Spatiotemporally Regulated during Postnatal Development in the Rat Brain. PLoS ONE 4(2): e4371. doi:10.1371/journal.pone.0004371 PMID 19190758

2.14.

http://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Coronary_Arteries.tif&page=1&uselang=hu

2.18.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Vibratome.jpg?uselang=hu>

2.23.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tissue_processing__Paraffin_inclusion_of_a_histological_sample.jpg

2.31.

http://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:EPA_GULF_BREEZE_LABORATORY_PATHOBIOLOGY_LAB._LAB_ASSISTANT_CUTS_HISTOLOGIC_SECTION_-_NARA_-_546327.tif&page=1&uselang=hu

2.32.

http://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:EPA_GULF_BREEZE_LABORATORY_PATHOBIOLOGY_LAB._LINDA_SHARP_ASSISTANT_TO_THE_PATHOBIOLOGIST,_MAKE_SLIDES_OF..._-_NARA_-_546288.tif&page=1&uselang=hu

2.43.

László Valéria szíves ajándéka, Kovács Péter felvétele (Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem)

2.44.A, B

László Valéria szíves ajándéka, Kovács Péter felvételei (Genetikai-, Sejt- és Immunbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem)

2.54.A

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zacharias.jpg>

2.54.B

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:First_compound_microscope.jpg?uselang=hu

2.55.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Jan_Verkolje_-_Antonie_van_Leeuwenhoek.jpg

2.56. bal

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:14_Robert_Hooke._Pencil_Drawing.jpg

2.56. jobb

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:15_Memorial_Portrait_at_The_Open_University.JPG

2.57.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hooke_Microscope.jpg?uselang=hu

2.58.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:HookeFlea01.jpg?uselang=hu>

2.59.A

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscope_%22Nachet_et_Fils%22.jpg?uselang=hu, Didier Descouens

2.59.B

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Field_Microscope_Set.jpg?uselang=hu, Stewart Mcfadyen

2.60.A

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Johann_Christian_Reil.jpg

2.60.B

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_brain_view_on_transverse_temporal_and_insular_gyri.JPG?uselang=hu, John A Beal, PhD Dep't. of Cellular Biology & Anatomy, Louisiana State University Health Sciences Center Shreveport, 6

2.61.

A Carl Zeiss szíves ajándéka.

2.62.

A Carl Zeiss szíves ajándéka.

2.63.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Robert_Koch_in_seine_Laboratorium.jpg?uselang=hu

2.64.

A Carl Zeiss szíves ajándéka.

2.65.

A Carl Zeiss szíves ajándéka.

2.66.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carl_Reichert_optician.jpg?uselang=hu

2.67.A

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Microscope_Zeiss_1879.jpg

2.67.B

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Old_light_microscope.jpg?uselang=hu

2.71.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coma_and_chromatic_aberration.jpg?uselang=hu

2.73.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spherical-aberration-disk.jpg>

2.91.B

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PurkinjeCellCajal.gif>

2.91.C

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cajal-mi.jpg?uselang=hu>

2.92.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cameralucida01.jpg?uselang=hu>

2.93.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zernike_Nobel.jpg?uselang=hu

2.94.

Dr. Török Júlia Katalin szíves ajándéka

2.97.B

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:LCD_polarization.JPG?uselang=hu

2.100.

Dr. Török Júlia Katalin szíves ajándéka

2.102. Portré

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Richard_Adolf_Zsigmondy.jpg

2.103

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ochsenfurt_St_Andreas_innen_03.jpg, Photo: Andreas Praefcke

2.105.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zebrafish-Embryo-dark-field.jpg?uselang=hu>, Giudicelli F, Özbudak EM, Wright GJ, Lewis J., PLoS Biol 5(6): e150. doi:10.1371/journal.pbio.0050150. Figure 9. Online, Zebrafish embryos in dark field illumination.

3.1.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bernardino_de_Sahagun.jpg

3.2.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Portrait-of-Monardes-1569.png>

3.3.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ggstokes.jpg>

3.4.

<http://www.fizyka.umk.pl/%7Elum98/aj.html>

3.6.

Rob Lavinsky, <http://www.irocks.com/>

3.12.

Nayoun Won, Nanotrio.com

3.13.

<http://en.wikipedia.org/wiki/User:Zephyris>

3.21.

http://www.optarius.co.uk/Dichroic_Mirror.html

3.23.

<http://micro.magnet.fsu.edu/optics/timeline/people/ploem.html>

3.26.

Research in Veterinary Science Volume 85, Issue 3, December 2008, Pages 418–432

3.54.

<http://umchemistry.cox.miami.edu/MurthyGroup/pundits.html>

4.3.

<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Ruska-microscope-sketch.png>

4.63A.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Drosophilidae_compound_eye_.jpg

4.63.B

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flea_Scanning_Electron_Micrograph_False_Color.jpg

4.63.C

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:144592main_061303_DB16-T25.jpg?uselang=hu

6.2.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bonaventura_Cavalieri.jpeg

6.3.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Achille_Delesse.jpg?uselang=hu

6.5.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:ERW_portrait_2009.jpg, Barbara Krieger

Filmek

1. Vérkenet készítése és festése:

<http://www.youtube.com/watch?v=XBCxusLUe68>

2. Vérkenet készítése és festése (Wright-Giemsa festés):

<http://www.youtube.com/watch?v=9xBcm-1NMqk>

3. A mikrotechnika lépései (általános áttekintés):

<http://www.youtube.com/watch?v=TLm37BbR1mo>

4.-5. Beágyazás (automata):

<http://www.youtube.com/watch?v=VIuIVY4Vf0w>

<http://www.youtube.com/watch?v=sgAwHumFRLY>

6.-7. Metszés (kerekes mikrotom):

<http://www.youtube.com/watch?v=qGyE4p9XanA>

<http://www.youtube.com/watch?v=6ZBHveyKEI>

8. Metszetek kisimítása vízfürdőn:

<http://www.youtube.com/watch?v=cbQnZr0wx0I>

9. Metszés (kriosztát):

<http://www.youtube.com/watch?v=VyvyxsNKNOQ>

10. Metszetek festése automatában:

<http://www.youtube.com/watch?v=Zhm35EXHa0E>

11. Metszetek festése és lefedése automatában:

<http://www.youtube.com/watch?v=2gCn-tM6B1U>

12. Sejtszámlálás Bürker-kamrában:

<http://www.youtube.com/watch?v=MKS0KM3lr90>

13. Ultravékony metszetek készítése:

<http://www.youtube.com/watch?v=es1sOxMPELo>

14.-16. Az elektronmikroszkóp:

<http://www.youtube.com/watch?v=fToTFjwUc5M>

<http://www.youtube.com/watch?v=j2A6KeWrqeM>

http://www.youtube.com/watch?v=_kpN2jPjRYs