# Fény-, és elektronmikroszkópos preparatív módszerek

Készítette: Tánczos Bence

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Mikrobiális Biotechnológiai és Sejtbiológiai Tanszék

Debrecen,
2011

# 1. Bevezetés

Ezen jegyzetem célja bemutatni nagy vonalakban, hogy a mai szövettani, illetve mikroszkópos kutatási munkálatok közül, milyen eljárásokkal dolgoztam az évek alatt, ezek az eljárások milyen szerepet töltenek be abban, hogy egy adott minta (legyen az szövetminta, sejttenyészet, stb.) milyen fázisokon megy végig a makroszkópos megfigyeléstől, az ultrastuktúrális elemzésig, és kiértékelésig.

Bemutatom mind a klasszikus, mind az elektronmikroszkópos minta kimetszés, fixálás, beágyazás, festés, és kiértékelés általános módszereit, és leírom saját tapasztalataim is.

Ezen bevezető után rátérnék majd a különböző preparatív fázisok kifejtésére részletesebben. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy mindkettő mikroszkópos eljárás nagy pontosságot, és odafigyelést igényel, így elkerülendő a műtermék (*artefactum*[1]) képződése, ami hamis információkkal szolgálhat, és rontja a kapott preparátum minőségét is.

Végül pedig rátérek majd, az így elkészített preparátumok mind fény-, mind elektronmikroszkópos vizsgálatára, és kiértékelésére.

[1] Artefactum (lat.) Műtermék. mesterségesen létrehozott anyag vagy elváltozás, pl. mikrobiológiai festések alkalmával keletkező olyan részecske, amely a festés melléktermékeként áll elő, de a festendő objektumnak nem része.

# 2. Kifejtés

Az egész folyamat, mint minden tudományos munka alapja, hogy előre eltervezzük, fejben végigvisszük, hogy milyen lépéseket szeretnénk végrehajtani. Majd ezeket rögzítjük egy előzetes kísérleti tervben, amihez mindig hozzá tudunk nyúlni, ha valamikor elakadunk. Opcionális ugyan, de hasznos, ha a használandó receptúrákat is rögzítjük a kísérleti tervben.

Majd miután összeállt az eljárás elméletben, elkezdjük a fázisokat lépésenként végigvinni.

## 3.1 Minta kimetszése:

Itt meg kell állapítani, hogy milyen mintával fogunk dolgozni, és hogy az milyen módon szeretnénk eltávolítani a testből. Többféle módszer létezik. Ide tartozik a standard biopsziás mintavétel, ami műtéteknél gyakori. Továbbá a hagyományos szövettanban elfogadott minta kimetszési módszer is, amit holt testeken szoktak alkalmazni. Ennél fontos, hogy szakszerűen, éles, és tiszta eszközökkel, azokat rendeltetésszerűen használva tárjuk fel a tetemet. A gyorsaság is fontos, tekintve a test a halál beállta után azonnal bomlásnak indul, és olyan biokémiai utak aktiválódnak, amik mindig rontják a szövetek, szövetminta állapotát. Értem ez alatt a hipoxiás sokkot, az ozmotikus viszonyok megváltozását, az anyagcsere folyamatok leállását. Továbbá fontos megjegyezni, mivel a vér áramlása megáll, és az elkezd megalvadni, a vér fixálása, vagy ha az bármilyen szempontból zavarná a további vizsgálatokat, annak eltávolítása fontos!

A vizsgálandó szövetből mintát veszünk, mégpedig úgy, hogy vagy az egész szervet eltávolítjuk, vagy az adott mintát, és az azt körülvevő részt.

## 3.2 Minta kimosása, és fixálás:

Miután a vizsgálandó szövetmintát eltávolítottuk a testből, a minta fixálása, és kimosása létfontosságú a munka pontos, és precíz elvégzése érdekében. A vértől meg kell szabadulni, ha megkívánja a munka, mert sok esetben a bomlástermékei elszíneződést, zavart okozhatnak a festésben. Ezért alakultak ki a fixálásnak eltérő módszerei, amik az adott mintához illeszkednek.

A két módszer amit megkülönböztetünk, a perfúziós, és az immerziós fixálás. Az immerziós módszer lényege az, hogy a mintát belemerítjük a fixáló szer 5-7 szeres többletébe. Ezzel azt érjük el, hogy a minta amíg lebeg a fixáló szerben, addig fixálódik, lassan, kívülről befelé penetrálva (átjárva) a mintát halad a fixatív anyag. Pont ezen oknál fogva a nagyobb méretű, vagy bomlásra hajlamosabb (pl.: agyszövet/idegszövet) szöveteket, perfúziós fixálással rögzítjük.

A perfúziós fixálás lényege ez, hogy az adott szövetet, az élőlényben hagyják a fixálás ideje alatt. Itt ugyanis az történik, hogy az érrendszerben keringő folyadékot lecserélik a fixáló szerre. Ez körülményesebb, nagyobb precizitást, jobb felszereltséget, és nagyobb tapasztalatot igényel mint az immerziós eljárás, de sokkal szebb, és alaposabb módszer is. Perfúziós fixálásra jó példa az intrakardiális perfúziós fixálás, amikor az adott egyed vérét, a szívbe vezetett kanülök segítségével lecserélik pufferelt fixáló szerre.

Fontos még itt megjegyeznem, hogy a puffereknek, illetve a pufferelt fixáló szereknek kiemelt fontosságot kell tulajdonítanunk, hiszen a puffer rendszerek óvják meg az ozmotikus sokktól a szövetet. Mint eddig láthattunk, a bomlási folyamatokon kívül, a mikrobiális emésztés mellett, az ozmotikus viszonyok megváltozás is negatív hatással van a szövetminta minőségére. Tekintve a sokkhatás amit a minta elszenvedhet, ha nem pufferelt rendszerbe tesszük a pufferelt szervezet után, tönkreteszi szubcelluláris szinten, ami kihat(hat) a mikroszkópos kép minőségére is.

Klasszikus szövettanban az immerziós fixálás a közkeletű, ezen belül is a 4%-os formalinos[2] fixálás. Ennek több válfaja is létezik. A 4%-os paraformaldehid[3] oldatot (a formalint már nem használják kezelhetetlensége, és nagyfokú citotoxicitása miatt, helyette a polimerjét: paraformaldehidet használnak) nem szükséges pufferelni, mert ez a koncentráció önmagában fiziológiásnak számít ozmotikus szempontból. De ha az ember jó munkát akar végezni, akkor a gyakorlatban használatos még a Neutral Buffered Formalin is.

Ennek az a lényege, hogy a 4%-os paraformaldehid oldatot, még foszfát-puffer segítségével megfelelő pH-ra állítjuk, ami élőlénytől függ. Ez a pH érték fajra jellemző. Emberben 7,2, kutyában 7,4 vadászgörényben 7,3 pH.

Elektronmikroszkópiában eltérő fixálási módszert alkalmazunk. Mivel itt a subcelluláris szintekben vagyunk érdekeltek, úgymond a szövetminta ultrastruktúrája, finomszerkezete érdekel minket, itt speciális fixálást alkalmazunk. A rögzítő anyag itt a glutáraldehid[4]. A glutáraldehid a formaldehiddel szemben nem mono-aldehid, hanem di-aldehid. Ami azt jelenti ez esetben, hogy a fehérje molekulákat egy 3D-s, úgymond térhálós szerkezetbe foglalja majd be, ezzel segítve a mint finomszerkezetének megmaradását.

---

2 Formalin: A formaldehid (metanol) vizes oldata, a legegyszerűbb aldehid. Fertőtlenítő, és tartósító szer. A fehérjékben, és DNS-ben levő elsődleges aminosav csoportokat kereszt csatolja egy -$CH_2$ csoporttal.

3 Paraformaldehid: A formaldehid könnyen kezelhető, kevéssé toxikus polimerje. (Polioximetilin)

4 Glutáraldehid: Dialdehid, kétszer annyi kötést alakít ki mint a formaldehid. Gyorsan fixál, és erős fertőtlenítő hatással bír.

Az elektronmikroszkópiában továbbá nehézfémekkel is történik fixálás. A nehézfémes fixálás elve az, hogy a fém bekötődik a fehérjékbe, úgymond denaturálja azok szerkezetét valamilyen szinten, ezzel is segítve a szövet keményebbé, intaktabbá válását. Ezt a fixálási módszert a szövettan hajnalán használták, a ma konvencionális fixáló szerek kora előtt. Ezen módszer előnye az elektronmikroszkópiában továbbá az, hogy egy úgymond elő kontrasztozást is biztosít számunkra, ami segíti a minta kezelését, és a további vizsgálatokat.

A fixálás ideje módszer, és mintafüggő. A fénymikroszkópiában 1-3 nap formalinos, vagy paraformaldehides 4-10%-os oldatban való fixálás az elfogadott. Ez szobahőmérsékleten történik, szemben az elektronmikoszkópos fixálással, ahol 2 órától, akár egy estén át történhet a fixálás is 4° C-on.

Bátorkodnék megjegyezni, hogy amennyi szövet, és labor, annyi féle fixálás létezik. Elektronmikorszkópiában vagy glutáraldehid 1%-os oldatát, vagy 4% formalin 1% glutáraldehid oldatot használnak.

Mindemellett, egy további fixálást, illetve elő kontrasztozást is szoktak itt alkalmazni ozmium-tetroxiddal[5]. Mivel nehézfém, ezért kötődik a membránokhoz, valamint további rögzítést biztosít a mintának.

Ide tartozik még, hogy bizonyos módszerek egy szacharóz tartalmú oldatos fázist is előírnak a fixálás során. Ezen oldat egy ozmotikus védőfunkciót lát el, úgymond „puffereli” a szövetet, hogy a fázis váltások, vagy az esetleges fixálószerbeli változás ne, vagy csak minimális károsodást okozzon a szövetmintákban. Ilyen esetben 8%-os, 0,2 mol-os szacharóz oldatot szoktak beiktatni a preparáció menetébe.

### 3.3 Dehidrálás:

A fixálás utáni legfontosabb művelet a dehidrálás. Ez egy abszolút mértékig előkészítő

[5] $OsO_4$: toxikus nehézfém, 1%-os vizes oldatát használják az előkontrasztozáshoz. Jó lipid, és membrán festék/rögzítő, mivel a foszfolipidekben gazdag régiókhoz kötődik. Régóta használt festő anyag a szövettanban.

lépés, aminek feladata a minta vízmentesítése, és előkészítése a beágyazásra. Itt figyelni kell a megfelelő fázisok kikeverésére, és a minta fázisokban töltött időtartalmára is, ugyanis a különböző fázisok, különböző módon hatnak a mintára. Ezt az alábbiakban fejtem ki.

Általánosan elfogadott, és elterjedt módszer az etanolos[6] dehidrálás. Ennek az a lényege, hogy egyre növekvő koncentrációjú, frissen, és tisztán kikevert, úgymond felszálló alkohol sorban elvonjuk a vizet a mintából. Itt a következő fázisokat használjuk: 50% -70% -80% -96% -100% -100% etanol, és xilol[7].

Empirikus úton megállapították, hogy a 70% alatti alkohol „macerálja" a mintát, vagyis roncsolja a szerkezetét, a 70%-os etanol úgymond inert, tehát nem okoz a minta szerkezetében változást, a 70%-nál nagyobb töménységű alkohol, pedig keményíti a mintát.

A xilol vagy benzol, intermedier anyagként van jelen a dehidráló sor végén. Feladata a mintából az alkohol kimosása, a xilollal való impregnációja, és a minta tartósítása, tekintve itt is korlátlan ideig tartható el a szövetminta. Azért intermedier anyag, mert elegyedik az etanollal, és oldja a paraffint, amibe beágyazzuk a mintát. Az időtartamokat mintája szabja meg, de általában 30 perc-1,5 óra az általánosan elfogadott idő, és a tapasztalatok azt mutatják, hogy érdemes figyelni a mintákat a különböző fázisokban, nehogy túlkeményedjenek.

Az elektronmikroszkópos beágyazás is felszálló alkohol sorral kezdődik, de nem xilol a sor vége (tekintve nem paraffinba, hanem műgyantába történik a beágyazás), hanem propilén-oxid[8]. Itt 1-2 óráig tiszta propilén oxidban, utána pedig propilén-oxid műgyanta 1-1, majd 1-2 arányú elegyébe kerül a minta.

### 3.4 Beágyazás:

6 Etanol: etil-alkohol. Nagy töménységben higroszkópos (vízelvonó) anyag. Vízzel korlátlanul elegyedik.

7 Xilol: dimetil-benzol. Aromás szénhidrogén, amit főleg oldószerként használnak festéseknél, ez esetben a paraffin oldószere, és tartósító anyag.

8 Propilén-oxid: alacsony forráspontú (34 °C), gyúlékony, toxikus vegyület, feladata a maradék etanol eltávolítása a mintából, és a műgyanta oldószere.

A beágyazás feladata a minta metszhető formátumba való helyezése. Általánosságban annyit lehet elmondani a beágyazásról, hogy a szövetmintát egy olyan anyagba helyezzük, ami szilárdítást, és jó kezelhetőséget biztosít a metszés során. Ez a klasszikus hisztotechnológiában paraffin, míg az elektronmikroszkópiában epoxi műgyanta, vagy araldit.

Itt még megjegyezném, hogy a modern szövettanban kialakultak alternatív eljárások a minta-előkészítést illetően. Ide tartozik a kriomikrotómia, amikor mindenféle kémiai kezelés nélkül, fixálás nélkül metsszük a mintát egy hűtött környezetben, ezzel elkerülve a fehérjék szerkezetének átalakulását, lehetővé téve az immunhisztokémiai jelöléseket. Illetve a vibratómos metszés technikája aminek lényege, hogy a mintát szintén fixálás nélkül, celluloidban, vagy agarózba ágyazzuk, és egy rezgő pengével rendelkező, úgymond vibratómmal lemetsszük. Ennek a módszernek a hátránya, hogy a kés rezgése miatt (úgy vág mint az elektromos kenyérszeletelő kés, tehát a pengét síkban jobbra-balra mozgatja a mintában) csak „nagyon vastag” metszetek vághatók le (15-35um).

A klasszikus szövettani beágyazás úgy történik, hogy a már dehidrált mintát, a xilol fázis után kivesszük, és át helyezzük xilol-paraffin 56° C-os elegyébe. Az 56° C azért fontos ennél a fázisnál, mert ez pont az a hőmérséklet ahol a paraffin olvadt állapotban van, de még nem annyira meleg, hogy jelentős hő általi roncsolás lépjen fel a mintában. Ebben a fázisban a minta 1-1,5 órát tölt. Itt elkezdi átjárni a paraffin, és kezd a xilol kimenni a mintából. Majd a következő két, vagy három fázis a tiszta paraffin. A fázisok mennyiségét, a minta milyensége írja elő. Minél szebb, mélyebb szövettani vizsgálatot akarunk elvégezni a mintán, annál tisztább, és több, úgymond finomabb fázisokat kell alkalmazni. Itt 1,5-2 órát tölt a minta, végül egy estére a végső, úgymond kiöntő paraffinba kerül egy estére, ahol végleg átjárja a paraffin a mintát.

Miután a minta megfelelő mennyiségű időt töltött a paraffinban, elkezdődhet a kiöntés a fázisa. A kiöntés lényegében a minta paraffinba való foglalását, és a minta végleges előkészítését jelenti. Ez a következő módon zajlik. Vagy előre legyártott patológiai kiöntő kazettába, vagy általunk hajtogatott papír csónakba, a minta méretétől függően, de legalább egy ujjnyi vastagságban tiszta paraffint öntünk. Ebbe a paraffinba a tiszta paraffin fázisból át tesszük a mintát. Közben figyelni kell arra, hogy a szövetet óvatosan csomagoljuk ki a gézből, eltávolítsuk a jelölő papírt, és még melegen helyezzük be a csónakba.

Nagyon fontos hogy a minta ne hűljön ki áthelyezés közben, különben buborék ragadhat rá, ami rontja a metszés minőségét. Ha mégis buborékos lenne a minta, akkor lángban felforrósított csipesszel, óvatosan a minta mellől eloszlatjuk a buborékot, vigyázva, hogy ne érintsük a mintát. Ezután a csónakot behelyezzük a fagyasztóba 5-10 percre, majd a hűtőbe egy estére. Azért fontos a paraffin gyors lehűtése, mert különböző lehűlési sebességnél, más módon alakul ki a paraffin belső szerkezete.

Lassú lehűlésnél, egy kristályosabb, úgymond borsós, morzsalékos szerkezet alakul ki, ami rendkívül rosszul metszhető, mert morzsolódik metszés közben. Gyors lehűtésnél egy amorfabb szerkezet alakul ki, ami jól metszhető, így erre kell törekedni.

Az elektronmikroszkópos beágyazás merőben más technika mint a klasszikus paraffinos beágyazás. Itt egy kemény műgyantába ágyazzuk a mintát. A gyanta típusát laborja válogatja, de a két legnépszerűbb az Epoxi-Durcupan, és az Araldit névre hallgató típusok. Én az epoxi gyantával végeztem a beágyazásokat. Ez egy több komponensű gyanta keverék lényegében, ami áll egy alap médiumból, amihez keményítő adalékot, és gyorsító (akcelerátor) adalékot adunk a kikeverés során. A keveréknek van standard protokollja, de ezen lehet változtatni, úgymond személyre szabni a gyanta minőségét bizonyos határok között.

A minta kiöntése zselatin kapszulákba történik. Ezek a kapszulák olcsóak, és könnyen kezelhetőek. Az előkészített szövetet kivesszük az előző, műgyantás fázisból, majd finoman áthelyezzük egy zselatin kapszulába, amibe előzőleg egy kevés műgyantát tettünk, majd feltöltjük a kapszulát. A következő lépés, a gyanta megszilárdítása. Ez 45-50 °C-on történik, egy polimerizátorban[9]. Itt egy napig hagyjuk a gyantát megszilárdulni. Megjegyezném, hogy ennél a beágyazásnál kétféle, eltérő protokoll is használható. Az egyik az általam leírt, úgymond „lassú" protokoll. A másik a „gyors" protokoll abban tér el, hogy módosítunk a gyanta összetételén, kicsit több akcelerátor hozzáadásával, és nagyobb hőmérséklettel a polimerizátorban (55-60° C). Így az egy estét 3-5 órára le tudjuk csökkenteni, csak így fennáll a veszélye annak, hogy nem lesz olyan jó minőségű a gyanta miután megkötött.

[9] Polimerizátor: a hőre keményedő műanyagok szilárdítására használt, szabályozható hőmérsékletű eszköz.

## 3.5 Metszés

A metszés a szövettani preparatív munka legművészibb, vagy éppen legmonotonabb része. Ez az a fázis, amikor az általunk jól elkészített szövetmintából, vékony szeleteket, ún. metszeteket húzunk le a mintáról. Ezzel tesszük alkalmassá a festésre, és a későbbi kiértékelésre. A szövettani gyakorlatban a technológia fejlődésével egyre több, és egyszerűbb metszési módszer, és eszköz került erre a szakterületre.

A klasszikus paraffinos hisztotechnikánál a mikrotómnak nevezett eszközt használjuk. Ennek több válfaja létezik, de a legrégebbi, és legegyszerűbb a szánkamikrotóm. Ahhoz, hogy ezzel tudjunk dolgozni, előbb a mintát alkalmassá kell tenni a mikrotómmal való munkára. Ez úgy történi, hogy miután a blokkunk kész van, kivesszük a beágyazó kazettából/ papír csónakból. Majd forró szikével, vagy spatulával formára vágjuk, és ráragasztjuk egy blokkfának, vagy tőkének nevezett tárgyra. A tőke adja nekünk az alapot, amivel be tudjuk rögzíteni a mintát a mikrotómba. A szánkamikrotómos metszés elve, hogy a tőkére helyezett mintát, ún. mintabefogó pofák közé szorítjuk, ez egy a tér három irányába orientálható része az eszköznek. A minta egy helyben rögzített, csak a mintabefogó magassága állítható. A kés mozog, egy vízszintes sínen a mintatartó felett. A minta felszínét párhuzamosan orientáljuk a kés pengéjével, majd felemeljük abba a magasságba, ahol már belemetsz a mintába. A kés dőlésszöge, és metszési szöge is állítható, és állítani is kell.

A dőlésszög a kés vízszintessel bezárt szöge, amit a minta valamint a paraffin keménysége szab

meg. Minél keményebb a minta, annál kisebb dőlésszög a javasolt, de ennek megvan az a hátránya, hogy túl kis szögnél a metszetek fel fognak gyűrődni a késre. A metszési szöget a metszés módja határozza meg. Ez a szög a mintával bezárt szöge a késnek. 60°-os szög ideális a metszéshez. De ha sorozatmetszeteket akarunk készíteni, akkor a sínnel beárt 90°-os szög az ideális, vagyis ha a kés pengéje, és a minta vízszintesen vannak felül nézetben. A késsel kapcsolatos további információ, hogy háromszög alapú hasáb alakúak, általában facettázott élre fentek, és acélból készülnek. Mivel rendkívül élesek, ezért hamar kicsorbulnak a mintán, így után élezni lehet őket, de szakemberre bízva (orvosi műszerészek) rendkívül jó élre lehetséges szert tenni. A facetta egy szögbeli törést jelent a késen. Értem ez alatt, hogy a háromszögletű él „tetejére" egy további, a belső tengellyel 60°-os szöget bezáró él van fenve. Ennek funkciója, hogy a metszet könnyebben csúszik fel a kés pengéjére, és nehezebben kopik a kés.

A hagyományos metszet vastagság 10 ηm (tíz mikrométer). Ettől eltérni természetesen lehet, de nagy tapasztalatot igényel. Lehetséges 1 ηm-es metszeteket készítése is, de ahhoz már nagy kézügyesség, tapasztalat, és ideális hőmérsékleti viszonyok kellenek. Ugyanis a hőmérséklet is rendkívüli módon befolyásolja a metszetek minőségét. Minél melegebb a kés, illetve a blokk, annál jobban gyűrődnek, kenődnek a metszetek.

Fontosnak tartom megjegyezni, hogy ha sorozat metszeteket készítünk, akkor amikor még a minta a blokkfán van, a mintatartóba való befogás előtt, trapéz alakúra vágjuk a paraffint a minta körül, hogy segítsen megállapítani a metszetek sorrendjét amikor sorozat metszünk.

Miután sikerült a késre lehúznunk a metszeteket, utána egy puha sörtéjű ecsettel, vagy csipesszel óvatosan, a metszet minimális károsításával, és vigyázva, hogy a kér éléhez ne érjünk, levesszük a metszetet a késről. Ezután hideg vizes fürdőre helyezzük a metszeteket. Ez azért kell, hogy kicsit kisimuljanak. Majd mielőtt tárgylemezre tennénk, a metszetet, meleg vízre tesszük, hogy a gyűrődésektől megszabaduljunk, és szebb legyen a minta. Majd előzőleg zsírtalanított, portalanított, és adhéziós réteggel bevont tárgylemezre finoman „felsöprögetjük" ecsettel a metszeteket. Majd megjelöljük a tárgylemezt a következő módon:(a mintákat a lemez felső 2/3-adára vesszük fel, az alsó részre jön a jelölés)

- minta jelölése és száma
- tárgylemez száma
- dátum
- monogram (vagy ezzel egyenértékű jelölés a készítőnek)

Végül pedig egy napig hagyjuk, hogy a minták alaposan rögzüljenek a tárgylemezre.

Az elektronmikroszkópos metszés egy ultramikrotómnak nevezett, teljesen automata

eszközzel zajlik. Ennek működési elve, hogy a műgyantába ágyazott mintát behelyezzük a mintabefogóba. Ez a része az eszköznek – a szánkamikrotómmal szemben – a mozgó rész. A minta vertikálisan (föl-le) mozog a kés előtt. A metszetvastagságot hőtágulás szabályozza. Értem ez alatt, hogy mivel rendkívül kis vastagságú minták szükségesek az elektronmikroszkópiában, így nanométeres (nm) mérettartományban mozognak a minták. A kések itt üvegből, vagy gyémántból készülnek, ún. pattintással, vagy töréssel. Azért nem élezett fémet használnak, mert nem lehet olyan élesre fenni a fémet, amit ez a módszer megkíván. Az üveg késekkel kapcsolatos további információ, hogy könnyen kopnak, tekintve a műgyanta nagyon kemény, ezért többet szoktuk „legyártani" belőlük, hogy gyorsan lehessen cserélni őket, illetve, hogy ezeket speciális üvegből készítik, hogy ideális törésfelületet kapjunk. Az ideális vágó él itt a kés pengéjének bal oldalát foglalja el, az él 1/3-ad hosszában, itt a legélesebb a kés. A kést az erre a célra kialakított speciális rögzítő fejbe helyezzük, ami előtt mozog majd a minta.

A mintát miután kivettük a polimerizátorból, savas oldatba[10] tesszük, hogy leoldódjon a zselatin kapszula. Ezután megszárítjuk a mintát, és előfaragjuk. Az előfaragással megszabadítjuk a felesleges gyantától a szövetmintát, mégpedig úgy, hogy a minta körül egy gúlát alakítunk ki penge segítségével. Miután ezzel megvagyunk, behelyezzük a gyantát az ultramikrotómba, és befejezzük a befaragást. Ez úgy történik, hogy az előzőleg kialakított gúla csúcsára, ahol a minta helyezkedik el, egy trapéz alakú felületet alakítunk ki.

Ez a trapéz csak úgy mint a paraffinos mikrotómiában, segít megállapítani nekünk, hogy milyen sorrendben következnek a minták egymás után, ha sorozatmetszeteket készítünk.

Miután kész a befaragás, lecseréljük az elhasználódott üvegkést, és elkezdjük a lényegi metszést. Ekkor a késre egy kádnak nevezett eszközt helyezünk. Ennek a funkciója, hogy a benne levő vízen fognak a metszetek lebegni, amíg fel nem vesszük őket. Ez a kád készülhet fémből, és műanyagból, illetve speciális irizáló arany szalagból, amit fogorvosi viasszal, vagy paraffinnal rögzítjük a késre. Az irizáló szalag azért nagy segítség, mert interferenciát hoz létre a metszeteken, és az interferencia színből lehet következtetni a metszetvastagságra. Az ideális

[10] Ez a savas oldat bármi lehet. Általában 10%-os ecetsav, vagy 5%-os sósav oldatot használnak a kapszula leoldására.

metszetvastagság a 9-12 nm, ez ezüst/kék interferencia színnel mutatkozik. Miután sikerült metszeteket készítenünk, azok a kádban levő vízen úsznak. (Megj.: a vízbe acetont szoktak tenni, hogy csökkenjen a felületi feszültsége. Így könnyebb a mintákat felvenni)

A metszeteket egy grid, vagy mikrostély fantázia névre hallgató „tárgylemezre" vesszük fel. A grid egy vékony, kör alakú rézháló, vagy egy középen ovális lyukkal ellátott vékony rézlemez. Ezzel úgymond „lehalásszuk" a mintákat a víz felszínéről. A kádból felvett metszeteket hagyjuk kicsit száradni pormentes helyen, majd eltesszük őket gridboxba. Továbbá a grideket ellátják egy formvar[11] filmmel, vagy gyárilag, vagy házilag. Ez a film azt segíti, hogy a minták nem szakadjanak át a rajtuk levő víz súlyától, amikor kivesszük őket, illetve segíti a minták rögzülését a griden. A formvar film egy a poli-vinil-formal acetonos oldatának polimere, ami egy gyorsan szilárduló műanyag. Készítése úgy zajlik, hogy egy csepp oldatot rácseppentünk egy tárgylemezre, majd egy másik tárgylemezzel, mintha vérkenetet készítenénk, határozott mozdulattal szögben tartva, elkenjük a folyadékot, ekkor jön létre a formvar film. Ezt aztán körbevágjuk szikével, vagy pengével, és óvatosan víz felszínére húzzuk. Majd az előzőleg zsír, és portalanított grideket óvatosan ráhelyezzük a film felszínére. (A grideknek van egy matt, és egy fényes oldala. Érdemes a matt oldallal lefelé a filmre helyezni, és a továbbiakba a matt oldara felvenni a mintákat, így megkönnyítve a saját dolgunkat.)

Felvesszük a formvar filmen úszó grideket egy papír segítségével, majd a grideket óvatosan egy jól záró gridboxba helyezzük, és készek a felhasználásra.

## 3.6 Festés és kontrasztozás

[11] Formvar: (polivinil-formal) szerves vagyület, rendkívül sokrétű felhasználással, a ragasztótól kezdve, a védő rétegig.

A szövettani preparatív technikákban többféle néven illetjük az adott metszet, minta vizsgálatra alkalmassá tételét. A klasszikus szövettanban ezt festésnek, az elekrtonmikorszkópiában kontrasztozásnak, az immunhisztokémiában, és a fluoreszcens mikroszkópiában pedig jelölésnek hívják. Így lehet könnyen megkülönböztetni a hogy milyen technológiával lettek feldolgozva a szövetminták.

### 3.6.1 Fénymikroszkópos festések

A klasszikus hisztotechnológiában rendkívül sok festés alakult ki a tárgy fejlődése során. A leggyakrabban használt a hematoxili-eozin festés. Ez mondhatni általános a gyakorlatban. Minden szövettani alapkutatás ezzel kezdődik, mert kevés anyagot igényel, gyorsan elvégezhető, és viszonylag nehéz elrontani. Ennek a festésen a lényege, hogy egy savas, és egy bázikus festékkel festjük meg a mintát, amit a sav-bázis folyamatok elvén alapulva működnek. Értem ez alatt, hogy a savas festék a bázikus sejtalkotókhoz kötődik, ilyenek például a fehérjék, és a különböző depoziktok (Lewy-testek[12], Mallory-testek[13]) a sejteken belül.

A bázikus festék, más néven magfesték a savas sejtalkotókhoz, vagyis a nukleinsavakhoz (DNS, RNS, riboszómák) kötődnek.

Ennél a festésnél a magfesték, vagyis a bázikus festék a hematoxilin. Ez egy természetes anyag, a leukotoxilin[14] fémionos oldattal kezelt változata. Sok válfaja létezik, a festéket alkotó szerves molekulához kötött fémiontól függően. Értelem szerűen, a fémion milyensége határozza meg a festék színét, és affinitását a sejtalkotókhoz való kötődés során. Gyakori fajtája a Delafield-féle alumínium-hematoxilin. Ez egy vöröses színű festék, ami kötődés után, oxidáció hatására kékes-lila színűvé válik. Úgy készül, hogy a leukotoxilinból alkoholos, vagy vizes oldatot készítünk, és ammóniák-tomsót adunk hozzá. A timsóból az alumínium-ion hozzákötődik a leukotoxilin szerves molekulájához, és létrehozza a festéket. Fontos az oxidáció ennél a folyamatnál, azért ha magunk készítjük el a hematoxilint, akkor szabad levegőn kell hagyni 1-3 hónapot érlelődni a festéket mielőtt használatra kész lenne. Másik gyakran használt hematoxilin

[12] Lewy-testek: Parkinson-, és Altzheimer-kórnál a neuronokban felhalmozódó abnormális fehérje aggregációk.

[13] Mallory-testek: a májsejtek citoplazmájában felhalmozódó fehérje lerakatok, amik főleg a masszív alkoholizmusban elhunyt betegekben mutathatók ki.

[14] Másnéven hematein, a *Haematoxylum campechianum* törzséből kivont szerves festékalapanyag.

a Weigert-féle vashematoxilin. Itt vas-(III)-kloridot adunk a leukotoxilinhoz, és egy barnás festéket kapunk.

A savas festék az eozin. Ez egy piros színű por, aminek az oldata is piros. Mesterséges analógja a Chromotop-2R. A két festék hasonló festődést ad, Chromotop-2R előnye, hogy olcsóbb, és könnyebben hozzáférhető mint az eozin. Ezzel szebben az eozin könnyebben, és szebben festi meg a mintát.

Az alábbiakban leírom a standard hematoxilin-eozin festés protokollját.

- Rehidrálás
  - Xilol I.és II. 5-5 perc
  - 100% etanol 5 perc
  - 96% etanol 5 perc
  - 80% etanol 5 perc
  - 70% etanol 5 perc
  - 50% etanol 5 perc
  - Desztillált víz 5 perc
- Festés
  - Timsós hematoxilin 10 perc
  - Csapvizes mosás merítésnyi idő
  - Derítés sósavas etanolban 1-3 másodperc
  - Csapvizes mosás merítésnyi idő
  - Csapvizes mosás 45 perc
  - Csapvizes mosás merítésnyi idő
  - Eozin 10 perc
  - Desztillált vizes öblítés merítésnyi idő

- Dehidrálás
  - 50% etanol 2 perc
  - 70% etanol 2 perc
  - 80% etanol 2 perc
  - 96% etanol I és II 5-5 perc
  - 100% etanol I ésII 5-5 perc
  - Xilol I és II 5-5 perc
- Lefedés

A festés menete a következő szerint valósul meg. Először is a már tárgylemezre megfelelően rögzült metszetekből eltávolítjuk a paraffint, hogy alkalmas legyen a vizes bázisú festékek felvételére. Ez úgy történik, hogy festő küvettákba két fázis xilolt öntünk, és 10-10 percig hagyjuk, hogy kioldja a paraffint. (A xilol erősen párolgó, aromás vegyület, nagy a toxicitása, így elszívó fülke alatt, speciális nitril kesztyűben lehet vele csak dolgozni.) Szemrevételezve a mintákat meg tudjuk állapítani, hogy mennyire deparaffinállódtak, úgy, hogy fény fele tartva őket, ha fehér szennyezőket, vagy kristályokat látunk a minta körül, akkor még egy fázis xilolt kell alkalmazni.

Ezután következik a rehidrálás. Ennek lényege, hogy egyre hígabb alkoholos oldatokban (leszálló alkohol sor), felvizesítjük a most még vízmentes mintát, hogy képes legyen felvenni a festékeket. Az alkohol sor végén desztillált vizet használunk.

Most következik a magfestés. Itt hematoxilin oldatába merítjük a mintát, és közben figyeljük, hogy mennyire veszi fel a festéket. Tíz perc általában elég, hogy a minta megfestődjön, és a festék bekötődjön. Ekkor még vörös a hematoxilin, mert nem oxidálódott. Csapvízbe picit belemerítjük, hogy kimossuk a felesleges festéket. Majd sósavas etanolban derítjük a mintát. Ez a lépés nagy figyelmet, és óvatosságot igényel. A lényege, hogy a sósavas

etanol gyorsan el oxidálja a festéket a mintában, és kimossa a felesleget.

De annyira potens az anyag, hogy ki is moshatja a bekötődött festéket a mintából, így 1-2 másodpercre szabad csak belemeríteni a metszeteket, és utána gyorsan csapvízbe kell helyezni őket, hogy lemossuk a felesleges sósavas etanolt.

A derítés után következik a folyóvizes oxidálás 45 perces fázisa. Itt már a festék pirosból, lilás, kékes színre vált szemmel láthatóan. Ennek az a lényege, hogy a mintában levő összes festék normálisan eloxidálódjon, és megkapja végleges színét, megtörténjen a rögzülés a molekulákhoz, és végleg kimossuk a felesleges festéket, hogy ne zavarjon a továbbiakban.(Tudományos érdekesség, hogy ehhez a fázishoz a szakirodalom is kútvizet javasol, a nagy mennyiségű oldott oxigén, és magas ion tartalom miatt.)

A hosszú csapvizes mosás után, következik a háttérfestő, vagyis az eozin. Ezen festék vörös színű oldata, vörös színű háttérfestést fog nekünk adni. Lényegében minden mást megfest amit a hematoxilin nem festett meg. Ha a festés megtörtént, akkor óvatosan kimossuk a felesleges festéket a mintából. Itt nagyon kell vigyázni, mert az eozin könnyebben kioldódik, még kötött állapotban is, mint a hematoxilin, ezért a további fázisokban figyelni kell a minták színét. Ha mégis kioldódott volna a festék, akkor kerül elő ennek a festésnek a legnagyobb előnye, hogy ez egy progresszív festés. Vagyis ahogy haladunk előre a fázisokkal, úgy egyre több festék kerül a mintába, így ha nem festődött meg eléggé, akkor mindig vissza lehet térni az előző fázisokba, és újrakezdeni a festést. Ez nem azt jeleni, hogy a végtelenségig lehet újrapróbálkozni, ugyanis minden egyes fázis, mivel potens vegyszerekről beszélünk, folyamatosan rontja a minta minőségét kicsit.

A dehidrálás fázisai felszálló alkoholsorból állnak, és előkészítik a mintát a festés befejezésére, a végleges lefedésre. Ki kell vonni a vizet a mintából, hogy konzerválni lehessen.

A dehidrálás végén, a két xilolos fázissal végleg kitisztítjuk a metszeteket.

Majd a lefedésnél, egy entellan[15] nevű műanyagot cseppentünk a tárgylemez azon részére, ahol a minták vannak. Ezután az entellan cseppre óvatosan rátesszük a fedőlemezt, vigyázva, hogy ne legyen alatta buborék. Ezt úgy lehet elérni, hogy a fedőlemez egyik oldalát ráhelyezzük a tárgylemezre, és egy tűvel finoman mint egy ráborítjuk a fedőlemezt a mintákra, majd finoman kinyomkodjuk a levegőt ami esetleg a fedőlemez, és a tárgylemez közé szorult. Óvatosan letöröljük a felesleges entellant a tárgylemez széleiről, nehogy később zavarja a minták kiértékelését, majd hagyjuk 1-2 napot, hogy a xilol elpárologjon az entellanból, és értékelhetjük is a mintákat.

A sav-bázis alapokon nyugvó festések mellett a szövettanban alkalmaznak még molekula méreten, úgymond leszorításos módon működő festések is, ilyenek a trikróm festések. Ezeknek az elve, hogy legalább két különböző affinitású, és molekula méretű festékből álló keverékek, amik együttesen adják a végleges festést a szövetben. Úgy működik, hogy kettő vagy több savas affinitású festéket alkalmaznak a szöveten, és a festési mintázatot, a festés mértékét egy polisavval, általában foszfor-molibdén savval, vagy foszfor-wolfrámsavval módosítják, mégpedig azon az elven, hogy azokba a régiókba, ahova a festék gyengébben kötődött, a polisav lelöki festék molekuláit, és bekötődik a helyére. A legelső ilyen festés a Mallory-trikróm festés volt, ami a vörösvértesteket narancs, az izmokat vörös, a kollagént kéken festette. A többi trikróm festés ennek valamilyen módosításaként alakult ki a szövettan története során.

Fontos megjegyezni a metakromázia jelenségét itt, ami azt jelenti, hogy bizonyos festékek a szövetekben együttesen, interferencia alapon egy harmadik színt hoznak létre. Ez a jelenség főleg az anilin festékeknél mutatkozik. Például a toluidin kék festék ha porc szövetbe kötődik, akkor kék helyett rózsaszínen festődik. Ennek a jelenségnek a hiánya az ortokromázia jelensége.

[15] Egy szerves vegyület, aminek a törésmutatója megegyezik az üvegével, és a Kanada balzsam helyettesítésére fejlesztették ki.

### 3.6.2 Elektronmikroszkópos kontrasztozások

Az elektronmikroszkópos jelölési módszer, kontrasztozás nevet viseli. A kontrasztozás elve az, hogy a nehézfémek, rendkívül erős affinitást mutatnak a biológiai szerkezetek iránt, így jól kötődnek a mintáinkhoz. A transzmissziós elektronmikroszkóp (továbbiakban TEM rövidítéssel hivatkozok erre a kifejezésre) működése indokolja a nehézfémek alkalmazását ezen esetben. Ugyanis a TEM a hagyományos fénymikorszkóppal ellentétben, nem a lámpa, vagy a Nap fényét használja megvilágító forráskánt, hanem egy elektron ágyú által előállított koherens elektronsugarat. Azért használnak elektronokat ebben a rendszerben, mert az elektronok, nagyobb energiával, és kisebb hullámhosszal rendelkeznek mint a látható fény fotonjai. A mikroszkópiában használatos megvilágító fény hullámhossza, és energiája befolyásolja a mikroszkóp felbontó, és feloldó képességét, vagyis a kialakult, látott kép minősét, és nagyítás mértékét. Ezt az értéket a numerikus apertúra adja meg, ami minden fénymikroszkópos objektív sajátja, és a megvilágító fény hullámhossza, és a lencsébe beeső fénysugár fél szöge alapján számítandó arányszám. Ez az elektronsugár áthalad a gridre felvett mintán (aminek a nehézfém tartalma elnyeli az elektronokat) majd egy fluoreszcens ernyőbe csapódva képet alkot a minta szerkezetéről.

Az ernyőn kialakuló fekete-fehér kép sötétebb pontjai az elektrondenz (elektron elnyelő) régiók. Ezek azok a struktúrák, amik több nehézfémet akkumuláltak a későbbiekben pontosan ismertetett kontrasztozási eljárás alatt. Mivel egy koherens elektronsugár a képalkotó „fényünk”, ezért ez a rendszer csak speciális körülmények között működik. Mivel a nagy energiával gyorsított (18-21 kV) elektronok, könnyen elnyelődnének a levegőben, és így nem alakulna ki kép, csak zaj, zavar lenne, ezért a rendszerben nagy vákuum uralkodik, segítve az elektronok haladását. Továbbá fizikai (pl. üveg) lencsék alkalmazása sem lehetséges, szintén az elekronelnyelődés miatt, ezért úgynevezett elektromágneses lencséket alkalmaznak. Ezek az elektromos lencsék lényegében olyan kör alakú fém tekercsek (szolenoidok) amiknek a fókuszáló képességét (numerikus apertúra), és felbontó képességét a rajtuk átfolyó áram erősségével tudjuk változtatni. Ugyanis az átfolyó áram erőssége, hatással van a tekercs mágneses mezejére, továbbá a részecskék sebességére, a Lorentz-, és Faraday-törvényének értelmében. Így lényegében a TEM felbontó képessége, és nagyítása sokkal nagyobb, mint a

fénymikroszkópoké.

A fentebb leírt információkkal indokolható az, hogy az elektronmikorszkópos kontrasztozás miért nehézfémekkel történik. A nehézfémekkel való munka nagy elővigyázatosságot, és odafigyelést igényel, ugyanis rendkívül toxikus, urán, ólom, és ozmium vegyületekkel dolgozunk, ezért kötelező a védőkesztyű, az elszívófülke, és a laborköpeny használata.

A kontrasztozás úgy történik, hogy a gridek (minták) számától függően, egy Petri-csészébe egy darab nátrium-hidroxid pasztillát teszünk, ennek az az oka, hogy megakadályozzuk a kontrasztozó anyagok szén-dioxiddal való csapadék képződését a mintában, ami akár tönkre is teheti az elektronmikroszkópos megfigyeléseinket (*artefactum* képződés). Ezután az első Petri-csészébe 4-6 csepp 1%-os uranil-acetát[16] oldatot cseppentünk, amit fecskendő szűrővel ellátott fecskendővel cseppentünk, hogy ne szennyezzük a mintát az esetlegesen kicsapódott fémsóval. Majd a cseppek tetejére – mintával lefelé – ráfektetjük a grideket, és 15 percig hagyjuk, hogy kontrasztozódjon. Ezután egy desztillált vizes mosás következik, amit az ólom-citrátos[17] fázis követ. Itt szintén alkalmazandó a nátrium-hidroxid[18] pasztilla, a lezárt Petri-csésze, és a fecskendő szűrő. Ez a fázis 5 percen keresztül zajlik. Majd egy desztillált vizes öblítés, és óvatos szűrőpapíros szárítás következik.

Személyes tapasztalatom a kontrasztozást illetően, amikor a nehézfémet tartalmazó oldat

[16] Uranil-acetát: az uránium ecetsavval alkotott vegyülete. Enyhén α-sugárzó, vízoldható vegyület.

[17] Reinolds-féle ólom citrát: az elektronmikroszkópiához kifejlesztett ólom-citrát oldat, ami minimálisan védve van összetételéből adódóan a kicsapódástól, így könnyebben elkerülhető az *artefactum* képződés.

[18] Nátrium-hidroxid: (NaOH) pasztilláját használjuk ebben a munkában, lúgos anyag, $CO_2$ megkötő tulajdonsága miatt használjuk.

cseppjeinek tetejére helyezzük a mintát, akkor nagyon óvatosan kell eljárni, különben a grid nem marad meg a csepp felszínén, hanem belemerül a cseppbe, és rendkívül nehéz onnan kiszedni utána. Illetve, a desztillált vizes öblítésnél úgy kell eljárni, hogy a griddel, csak meg simítjuk a víz felszínét, mert az esetlegesen rosszul rögzített minták könnyen le eshetnek ilyenkor a gridről. Továbbá, amikor a felesleges folyadékot leitatjuk a grid felszínéről, akkor csak a grid széléhez kell érinteni, óvatosan a szűrőpapírt, mert ha a gridre rányomjuk a papírt, akkor az leszedi a mintákat.

Az elektronmikroszkóp működése a következő. Az elektron ágyúból jövő elektronsugarat a kondenzor appertúra fókuszálja, majd az objektív appertúrán áthaladva vetődik a sugárnyaláb a mintára. Az objektív lencsék, diffrakciós lencsék továbbítják az elektronsugarat. Ezután a projektív lencse levetíti nekünk a detektorra, sok esetben a fluoreszcens ernyőre.

### 3.6.3 Fluoreszcens mikroszkópos jelölés

A fluoreszcens mikroszkópiában alkalmazott „festési” eljárás a fluoreszcens jelölés. Úgy működik, hogy egy világító festéket, egy fluorokrómot adunk a vizsgálandó mintához. Ezek a fluorokrómok olyan, több aromás gyűrűt, és sok delokalizát elektront tartalmazó vegyületek, amik az adott célcsoporttal való kapcsolódás után, valamilyen hullámhosszú gerjesztő fény hatására, fényt bocsájtanak ki magukból. Általában mesterséges vegyületekről van szó, amik vagy specifikusan a nukleinsavakhoz, vagy a fehérjékhez kötődnek. Az élővilágban fellelhetőek természetes fluorokrómok is, ilyen például a klorofill, ami zöldes-sárgán fluoreszkál ha gerjesztő fénybe kerül, vagy bizonyos mikroorganizmusok, például gombák is állítani elő fluoreszcens anyagokat, ilyen az afla-toxin, aminek változatait a fluoreszcens fényük alapján különböztetnek meg.

Ahhoz, hogy megértsük a fluoreszcens festékek működését, tisztáznunk kell néhány alapfogalmat. Ide tartozik az emisszió, az adszorpció, és a Stokes-shift fogalmát. Az adszorpció ez esetben azt jelenti, hogy melyik az a hullámhossz tartomány, amit a festék molekulái

elnyelnek, és az ezen a szinten levő fotonok energiáját elnyeli. Az emisszió az a hullámhossz, amin a festék molekulája kibocsájtja az adszorpció során felvett fotonok energiáját. Az a jelenség, hogy az elektromágneses sugárzások (fény, röntgen, elektronsugárzás) hullámhossza, és energiája között fordított arányosság van (tehát minél kisebb a hullámhossz, annál nagyobb az energia) az alapja a Stokes-shift fogalmának. Ez úgy mutatkozik meg, hogy alacsonyabb az adszorpciós hullámhossz, mint az emissziós hullámhossz. Ez azzal magyarázható, hogy az alacsonyabb hullámhosszú fényben levő nagyobb energiájú részecskék, átadják az energiájuk egy részét festék molekuláinak, amit azok alacsonyabb energia szinten, nagyobb hullámhosszú fotonok formájában fognak emittálni.

Általunk gyakran használt mesterséges fluorokrómok közé tartozik a DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), vagy a propidium-jodid. Ezek a fluoreszcens festékek rendkívül karcinogének, mert közvetlen a DNS-hez kötődnek, így előírás a kesztyűben való munka.

A DAPI működését tekintve egyszerű fluoreszcens festék. Elektronaffinitási, és molekula stabilitási okokból kifolyólag, a kétszálú DNS nagy árkába kötődik be, és bekötődés után gerjeszthető 358 nm (ultra-viola) hullámhosszú fénnyel, aminek hatására 461 nm (kék) kezd el világítani. Érdekes tulajdonsága, hogy képes a sejtmembránon átdiffundálni, így alkalmas az élő sejtek megfestésére is.

A propidium-jodid egy rendkívül toxikus fluorokróm, tekintve képes interkalálódni a bázispárok közé. Ezen tulajdonságából kifolyólag alkalmas a flow-citometriás mérésekre, és a quantitatív DNS, vagy RNS mérésre. Továbbá alkalmas a sejtciklus elemzésére, valamint nekrotikus, apoptotikus, és egészséges sejtalakok megkülönböztetésére is. 488 nm-en gerjesztődik, és 562-588nm-en emittál. Ez a különbség az emissziós spektrumban a szerint módosul, hogy a kötődés helye, erőssége, és milyensége mennyire módosítja a molekula elektronszerkezetét.

További gyakran használt fluoreszcens festék a nátrium-fluoreszcein. Abszorpciója 494 nm, emissziója 521 nm. Egy széles körben elterjedt, sokoldalú molekuláról van szó, aminek származékait sok területen felhasználják, például ilyen származék a FITC (fluoreszcens-izotiocianát) is.

Minden fluoreszcens festékhez külön protokoll van forgalomba, festékenként, és mintánként változó. Az általunk használt DAPI protokoll a következő módon valósítható meg.

Ha sejtkultúrából szeretnénk mintát készíteni, akkor a sejteket különleges preparálás (duzzasztás, sejtmag feltárása, sejtmagok kicsöppentése) után metanollal fixáljuk a magokat a tárgylemezhez, majd elkezdjük a fluoreszcens festést. Itt 10 umol-os DAPI oldathoz hozzákeverünk egy anti-fade médiumot. Az anti-fade médium egy olyan glicerines keverék, ami védi a festéket az idő előtti kifakulástól (fade out). A fixált tárgylemezekre 10-20 uL DAPI-anti-fade keveréket adunk, lefedjük fedőlemezzel, és már vizsgálhatjuk is a mintát.

Ha szövettani metszetet szeretnénk DAPI-val kezelni, akkor először rehidrálni kell a mintát. Miután kész a rehidrálás, leitatjuk a vizet a mintáról, és megcseppentjük a DAPI-anti-fade keverékkel, lefedjük fedőlemezzel, és vizsgáljuk fluoreszcens mikroszkóppal.

A fényforrásból (XBO[19], HBO[20]) érkező fény kiválasztott hullámhosszát az excitációs filter különíti el, ez lesz a gerjesztő fény. A mintából érkező emittált fényt az emissziós filter szűri meg, ez azért szükséges, hogy ne legyen zavaros a mikroszkóp által alkotott kép.

## 3. Fény-, és elektronmikroszkópos minták kiértékelése, és hibái

Ahhoz, hogy jobban megérthessük a minták kiértékelését, tisztában kell lennünk mind a fény-, mind az elektronmikroszkóp működésével, és képalkotásával, és tisztázni kell a képalkotással kapcsolatos alapfogalmakat.

Az ilyen alapfogalmak közé tartozik a feloldóképesség. Ez azt jelenti, hogy a mikroszkóp, ennél konkrétabban az objektívek adataiból kiszámolt arányszám. Ez azt mutatja

[19] XBO: xenongőz lámpa, más néven xenon ív lámpa, feladata az egyenletes, és erős fény létrehozása.
[20] HBO: higanygőz lámpa, ennek feladata erős, és egyenletes UV fény létrehozása.

meg, hogy két egymás mellett levő pontot, mennyire tudunk megkülönböztetni egymástól. Értem ez alatt, hogy kis feloldóképességnél a két egymás mellett levő pont egy pontnak mutatkozik, nagy feloldóképességnél a két pontot, két individuális pontnak látjuk. Más néven ezt numerikus apertúrának nevezzük. Ez függ a megvilágító fény hullámhosszától, a lencsék fizikai paramétereitől, és a megvilágító fény lencsébe esésének fél szögétől.

További ilyen fogalom a fókuszsík és a fókuszpont. A fókuszpont az a geometriai optikai számításokból adódó pont, ahol a képalkotó fénysugár, egy pontban egyesül. Az ezen pont által metszett sík, a fókuszsík. Ebben a síkban lesz a legélesebb a látott kép, itt lehet értékelni a mintákat.

## 4.1 Fénymikroszkópos minták kiértékelése

A fénymikroszkópos minták kiértékelése több szempont szerint történik. Az egyik szempont az, hogy a festés megfelelő-e. Ezt úgy deríthetjük ki, hogy megnézzük a mintát mikroszkóp alatt, és az ott látottakat rögzítjük, és össze hasonlítjuk a protokollban leírtakkal. Ha ez megfelelő, akkor kis nagyításon, végigpásztázzuk a mintát, hogy általános képet kapjunk róla, és észre vegyük az esetleges anomáliákat. Ezek az anomáliák lehetnek festék foltok, amiket a nem megfelelő kimosás okozott, és így nem tartozik a mintához a jelenség, tehát artefactum, vagyis műtermék. Ha eddig nincs hiba a festésben, akkor tovább vizsgáljuk a mintát nagyobb nagyításon, és az általunk előre felállított kritériumok szerint elemezzük. Itt szeretném megjegyezni, hogy sok esetben észrevehetőek a mintában szakadások, amiket a mikrotóm nem megfelelően éles kése okozhatott, esetleg a dehidrálás, rehidrálás okozta artifact-ok, amikor bizonyos sejtek szétestek.

Ezek általában vele járó hibák, tökéletes minta nincs, tekintve sok potens kémiai anyaggal érintkezik a minta, és a melegítési, hűlési fázisok okozta károsodások. Ezeket a hibákat sok gyakorlattal csökkenteni lehet, de mindig számolni kell velük.

## 4.2 Fluoreszcens minták kiértékelése

A fluoreszcens mikroszkópos minták kiértékelése egyszerűbb mint a klasszikus szövettani mintáké, mert a laboratóriumi dolgozó a festés után, azonnal értékelheti a mintákat. Itt kevesebb, de jellegzetesebb hiba, vagy műtermék jöhet létre. Ide tartozik az aspecifikus floureszcens kötődés, ami erős hátteret, vagy zajt ad a képalkotásba. Ennek oka lehet a túl tömény, vagy túl sok festőoldat. Gyakori hiba még az, ha nem figyelünk az esetleges autofluoreszcens[21] anyagokra a mintában, mert az esetleg interferálhat a festékünkkel, és nehezebben lehet értékelni a mintát. Tapasztalataim szerint a fade out, vagyis a festék elhalványulása is állandó probléma ezen mintáknál. Ennek több oka lehet. Az egyik, hogy sokáig figyeljük az adott régiót, és a festék egyszerűen kiég a mintából. A másik ok, hogy külső fényforrás is gerjeszti a mintában levő festéket. De a leggyakoribb ok, hogy kevés az anti-fade médium a mintában.

## 4.3 Elektronmikroszkópos minták kiértékelése

Eddigi tapasztalataim szerint az elektronmikroszkópos mintákkal való munka során lehetett a legtöbb, a mintára végzetes hibát ejteni. Ha bármilyen hiba történt a preparatív eljárás során, vagy bármilyen műtermék képződött, azt csak a minta kiértékelésénél lehet észrevenni, és nem lehet esetleges finomítással kiküszöbölni, hanem kidobható az egész blokk. Gyakori hiba, hogy nem megfelelően történt meg a kontrasztozás, és fémsó kicsapódás lett a mintában. További hiba, hogy nincs jól beállítva az elektronmikroszkóp, és túl nagy energiával rendelkeznek az átvilágító elektronok, és a szemünk láttára égetik szét a mintát.

[21] Autofluoreszcencia: természete gerjeszthetőség a fény bizonyos hullámhosszai által. Főleg a NADPH, és flavinok, valamint a klorofill tartalmú szöveteknél.