

1.GAIA: MATERIAL BIOLOGIKOEN PRESTAKUNTZA ETA BERE BEHAKETA MIKROSKOPIOAN

1.SARRERA:

Material biologikoen prestakuntza histologikoa, intereseko lagina edo egitura (organoa, hosto zatia) disezcionatzen den momentutik mikroskopioan begiratzen dugunerarteko prozesua da. Behaketa egokia izateko xafla egonkor fin eta kontrastatuak prestatzea ezinbestekoa da.

Intereseko lagina erauztean, prestaketa azkar egitea garrantzitsua da, izan ere, lagineko zeluletara oxigenorik iristen ez bada hauek **estres** bat jasango dute eta zelula anoxikoak (oxigenorik ez dutenak) nekrosi bidez hilko dira. Ondorioz, lisosomak kanporatuko dira eta autolisi eta heterolisi prozesuak gertatuko dira. Mikroskopioan behaketa egiterakoan, prozesu hauek ekidin behar ditugu, bizitza errealeko laginaren antolaketa zelularra intersatzen zaigulako.

Edozein laginetarako prestakuntza prozesua:

1. Disezcionatu
2. Ehunaren zati txikiak lortu: argi mikroskopiorako 2-3mm eta mikroskopio elektronikorako 1mm
3. Fitxapena: egokia ez bada gehigarria den estresa gehitu
4. Deshidratazioa
5. Inklusioa (parafinan) → Parafinazko blokeak lortu
6. Blokeen mozketa
7. Blokeak portetara itsatsi
8. Ebakien tindaketa eta estalkia jarri

Edozein urratsetan akatsak egiteak eragina izango du laginaren kalitatean. Fitxapena eta deshidratazioa egokia ez bada berriz egitea komeni da.

2. ARGI MIKROSKOPIORAKO PRESTAKUNTZA

2.1.FIXAPENA:

2.1 Definizioa: Lagin biologikoaren post mortem usteldura ekiditeko tratamendua

2.2 Helburuak:

1. Lagina bakterioen eta autolisi bitartez sortutako erasoetatik babestea.

2. Laginaren egiturak egonkortzea.
3. Lagina ondoren etorriko diren prozesuetatik babestea.
4. Xafla gardenak lortzeko gotormena (babesa) ematea.
5. Laginaren koloregarritasuna handitzea.

2.3 Motak:

2.3.1 Fixapen fisikoa:

- **Beroaren bitartez** (ebaporazioa): Lagina tanpoi batean sartu eta mikrouhinean berotzen da. Lagineko proteinak desnaturalizatu eta koagulatzen dira prozesu biologiko guztiak geldiaraziz, autoliseriketa sahiestuz. Lagin biologikoek egitura galtzen dute, eta kalitate txarreko lagina lortzen da beraz ez da metodo ohikoa.
- **Hotzaren bitartez**: Lagina nitrogeno likidoan sartu (-196 °C) eta jarduera biologiko guztiak blokeatzen dira eta autolisi eta heterolisi prozesuak ekiditu egiten dira. Baina metodo horrek badu arazo bat, zelulen osagai nagusia ura da eta tenperatura baxuetan izotz kristal bihurtzen da. Izotzaren bolumena urarena baino handiagoa denez, kristal hauek ehunak edo zelulak apur ditzake eta lagina mikroskopioan behatzean zelulak apurtuta ikusiko dira.

Izotz kristal horien sorrera ekiditeko lagina kriogenizazioaren aurka babesten da sakarosazko medio batean sartuz edo DMS erabiliz. Horrela, izozketa azkar egiten da eta ura ez da izotz moduan kristalizatzen, forma amorfo bat hartzen du eta egituraren jasandako kalteak ez dira horren bortitzak.

Horrez gain liofilizazioa izeneko prosezua erabiltzen da. Lagina izoztu ondoren hutsean sublimatu eta egitura biologikoen apurketa ekiditzen da. SEMen asko erabilia.

2.3.2: Fixapen kimikoa:

Fixatzaile izeneko likido simpleak etanola, azido azetiko, azido pikrikoa, merkurio kloruroa, formaldehidoa glutaldehidoa... edo konposatuak (aurrekoen nahasteak direnak) Carnoy (etanola+azetiko+kloroformo), Bouin (formaldehido, pikrikoa, ...), Ciaccio (azetiko+kromio konposatua) erabiltzen dira.

Ez dago fixatzaile idealik, interesatzen zaigun egituraren arabera bata edo bestea erabiliko dugu.

Funtsean, bi fixatzaile mota daude:

- **Prezipitazioa**: Alkoholek proteinak prezipitatzen dituzte hauen funtzioa bertan behera utziz. Ez dute egitura tertziarioan eragiten.

- **Koagulazioa:** Aldehidoek proteinen amino taldearekin erreakzionatu eta hauen artean lotzen dira morfologian eragin gabe. Fixatzaile koagulatzaile nagusienak formaldehidoa eta glutaldehidoa dira.

1. Formaldehidoa tamaina txikia duenez organoan errazago barneratzen da
2. Glutaraldehidoa: Proteinak elkarren artean ondo lotzen ditu baina periferia bakarrik fixatzen du, molekula handia izanik zentrorra ez delako ongi heltzen eta heterolisi eta autolisi prozesuak hasten dira.

Guzti hori ekiditzeko fixatzaile konposatuak erabiltzen dira (konposatu txikiagoak) azkarrago barneratu eta fixapen hedatuagoa ahalbideratzen dutenak, adibidez azido azetikoak

2.3.3 Immersioa: Lagina fixatzailez inguratzen da. Egitura biologikoen barneko ura kanporatzen da eta fixatzailearen bolumena oso txikia bada, kanpora irteten den urak fixatzailea diluitzen du, beraz, erabili beharreko fixatzaile bolumenak laginarena baino 8-10 aldiz izan behar du.

2.3.4 Perfusioa: Odol hodiak fixatzeko erabilia. Fixatzailea orratz baten bitartez injektatzen da intereseko animaliaren bihotzean. Hala, animaliaren bihotza bizirik dagoen bitartean, bihotzak odola ponpatzean fixatzailea organismo osoan zehar banatzen du, bertako ehunak fixatuz. Animalia fixatzailearen bitartez hiltzen dugu.

2.3.5 Fixatzaile ohikoak: Aztertzen ari garen ehunaren arabera fixatzailearen eta bai ehunaren ezaugarriak ezagutu behar ditugu. Esate baterako, Bouin fixatzaile orokorra proteina eta sakaridoentzako oso egokia da. Bestalde, Ciacchio fixatzailea oso berezia da, hau ikerketa zehatzetarako erabiltzen da, lipidoak mantentzen baititu. Osagaitzat duen potasio bikromatoak oso ondo fixatzen ditu lipidoak. Neuronen axoiarako mielinan dauden lipidoen azterketarako erabiltzen da fixatzaile hau.

Fixatzaileek fixatze denbora egokia behar dute, hau fixatu nahi dugun ehunaren arabera ere bada. Fixapen azkar bat egiteko Carnoy erabil daiteke, ordea Davidsonaren fixapen denbora luzeagoa da, honek formaldehido eta azido azetikoak du.

2.3.6 Fixapen bolumena: Immersio bitartez fixatzen diren laginetan fixapen bolumena laginaren bolumenaren 8/10 da. Fixatzailea ehun eta zeluletara barneratzen da eta bertan dagoen ura kanporatu egiten da, fixatzailearen bolumena txikiegia bada arrainaren ehunetatik kanporatzen den ur honek fixatzailearen kontzentrazioa txikitzen du eta ez litzateke modu egokian emango pausu hau. Hori dela eta, fixapen denbora luzatu egin beharko litzateke. Horrenbestez, fixatzaile bolumen handiak erabiltzea da egokiena.

2.3.7·Oharra: Alde batetik, ahal den neurrian, ahalik eta laginaren zatirik handiena fixatzailerara esposatu behar dira. Adibidez, animaliak fixatu nahi baditugu, hoberena arraina zabalduta eta organoak fixatzailearekin kontaktuan jartzea da. Animalia zuzenean fixatzailearekin nahastuko bagenu fixatzailea animaliarekin tegumentuarekin kontaktuan egongo litzateke eta ez litzateke erraz barneratuko organoetara. Fixatzailea intereseko organora iristen denerako zenbait autolisi prozesu emango dira, beraz eskuratzen dugun irudi mikroskopioa ez litzateke egokia izango.

Halaber, laginaren tamaina egokia izatea beharrezkoa da, lagina oso handia izanez gero, gure lagina cassette-arekin kontaktuan egon baitaiteke, eta beraz, fixatzailea gune horietan laginarekin kontaktuan ez da egongo. Hortaz gain, fixapen denbora egokia izatea ere garrantzitsua da, fixatzailea lagineko gune guztietara irits dadin.

2.3.8·Fixapenean parte hartzen duten faktoreak

pH-a kontuan hartu beharreko faktorea da. Kasu batzuetan indargetzaile batzuen bidez pH neutroa hurbiltzen dira, pH oso azidoak proteinak desnaturalizatu eta honela ehunak ezaugarriak galtzea eragiten duelako. Ehunaren morfologia edota egitura aztertu nahiko bagenu pHa neutroa mantentzea ez da hain garrantzitsua ordea histokimika baten bidez proteina aztertu nahiko bagenu komenigarria da.

Temperatura ere faktore garrantzitsua da. Kasu batzuetan fixatzailea 4°C tan mantentzen da autolisi prozesuak ekiditeko, ordea temperatura baxuetan fixatzailearen erreakzio kimikoak motelagoak dira eta fixapena motelagoa izango da. Hori dela eta, hainbat fixatzailekin lan egitean, lana temperatura baxuan edo giro tenperaturan egitea antzekoa da.

Bestalde, **sarkortasuna**, fixatzaileak ehunean barneratzeko duen gaitasuna da, hau lehen aipatu dugu.

Azkenik **osmolaritatea** kontuan hartu beharreko beste faktore bat da; izaki bakoitzean presio osmotikoa ezberdina izaten da, fixatzaileek ehunak pixka bat konprimatu egiten dituzte eta horregatik fixatzaile hipotonikoak erabiltzen dira. Ehunaren arabera kontzentrazioa eta denbora ezberdina izango da. Adibidez, hezur edo muskulu bat fixatzeko kontzentrazioa altuagoa izango da eta fixatze denbora ere.

2.3.9·Post fixapena: Lagina behin fixatuta dugunean, zenbait kasutan post-fixapeneko tratamendua egiten da. Hau bereziki hezurra edo kartilagoarekin lan egiten dugunean erabiltzen da, hau da, gogorrak diren ehunetan. Ebaki finak hauetatik eskuratzea zaila denez, lagin hauek biguntzeko eta honela ebakigarriagoak egiteko laginak deskaltzifikatu egin behar dira.

Nola deskaltzifikatzen dira? %10 azido formikoan 2-5 egun mantenduta edota EDTA erabiltzen da. EDTA kaltzio bahitzailea da, mediotik jada kaltzioa kentzean hezurra bigunagoa izango baita. Tratamendu hau orokorrean nahiko luzea da eta deskaltzifikazio tratamendu eta denborak lagin bakoitzaren arabera dira.

2.2. DESHIDRATAZIOA

Behin lagina fixatua dagoenean lagina deshidratatu egin behar da. Xafla fina eskuratu eta tindatu ondoren ehun gehienak ez dute baimentzen ebaki finak eskuratzea. Ebaki fin hauek lortzeko gure laginak gogortu egin behar dira. Gaur egun **parafina** erabiltzen da histologian. Giro tenperaturan solidoa da eta guztiz hidrofobikoa den argizaria da; gure lagina fixatzailean murgildu, lagin biologikoan dagoen ur guzti hori kendu eta parafinagatik ordezkatzeko da.

Fixapenaren ondorioz gure laginak oso hidratatuak daudenez hurrengo pausua lagin hauek **deshidratatzea** izango da. Horretarako alkohola edota azetona bezalako disoluzioak erabiltzen dira. Graduazio gorakorreko alkoholetan sartzen da (%70, %80...), honela ehuna deshidratatzea lortzen da.

Normalean deshidratazio pausuak errepikatu egiten dira. Kontzentrazio jakin bateko alkohol disoluziotik bi aldiz pasatzen da (hau da, bi aldiz %70 eko kontzentrazioa duenetik, ondoren %80koa duenetik beste bi aldiz...). Errepikapen honen bitartez laginak %70eko alkohola duela ziurtatzen dugu, lehenengo aldiz egitean oraindik ura egon daiteke eta. Honela lagina guztiz deshidratatua dagoela ziurtatzen da. Normalean alkohola (metanol edota etanola) erabiltzen da, azetona egokiagoa da honen bidez tenperatura baxutan kalitate oneko laginak eskuratzen baitira.

2.3 GARBIKETA

Deshidratazioaren ondoren, alkohola (etanola eta metanola batez ere) parafinarekin ez dira guztiz nahasgarriak. Alkohola ura baino nahasgarriagoa den arren ez dira guztiz nahastera iristen. Garbiketa prozesu hau zenbait bitartekariren bidez gauzatzen da, hauek hidrokarburoen eratorriak dira eta proteinen errefraczio-indize berdina izaten dute. Garbiketa likido hauek disolbatzaile organikoak dira, xilenoa eta toluenoa hain zuzen ere, hauek alkoholarekin ondo nahasten dira eta bereziki parafinarekin.

Azetona erabiliz gero bitartekari hau ez da beharrezkoa.

2.4 INKLUSIOA

Behin garbiketa pausua egin dugula, 55°C tara dagoen parafina likidotan sartzen da (laginaren tamainaren arabera denbora ezberdina izango da). Parafina giro tenperaturara atera eta solidifikatzen da gure lagina gogortuz. Honela mikrotomoan laginaren ebaki fina eskuratu ahalko dugu. Zenbait laginetarako erretxina sintetikoak erabiltzen dira, hauek likidoak dira normalean, beroa erabili ordez argi ultramoreen bidez edo eta beste erretxina baten bidez polimerizatu eta gogor daitezkeenak, lagina tenperatura altuetan jartzea ekidinez.

2.5 MOZKETA

Aurrez gogorturiko laginak mozteko mikrotomoa erabiltzen da, makina honek tungsteno edota altzairuzko aihotza du eta 5µm-tako ebaki uniformeak egitea ahalbidetezen du. Ondoren hauek ur beroan flotatzen uzten dira. Ebakia beirazko portara atxikitzeke albumina (edo beste pegamentu sintetiko batzuk) erabiltzen da itsasgarri modura, arrautzaren zuringoan aurkitzen da. Bukaeran porta 40-45°C tako ur bainu batean murgildu eta estufa baten bidez ura ebaporatzen da, ebakia kristalera itsatsita gelditzen delarik. **FIXAPENA EGOKIA EZ BADA EBAKI FINAK LORTZEA ZAILA DA.**

2.6 IRUDI KONTRASTEA

Behin ebaki fina eskuratu dugunean laginak kontrastea lortzeko tintaketa erabiltzen da. Ehun biologiko gehienek ez dute kolorerik eta ez dute kontrastea eskuratzeko ahalmenik, beraz ezin dira mikroskopioan behatu. Kontraste hau **tintatzaileen** bidez eskuratzen dute normalean laginek; kontrastea lortzeko beste metodo bat **metal impregnazio** bitartez da, metodo hau mikroskopio elektronikoan erabiltzen dira, zenbait metalek proteinekin afinitatea dute, hortaz proteinetan aberatsa diren laginetan kontraste handia lortzen da. Horrela, eremu oso iluna sortzen bada tindatu ostean, eremu hori proteinetan aberatsa izango da, eremua argiagoa bada aldiz, eremua proteinetan urria izango da.

Tindatzaileak molekula konplexuak dira, pisu molekular handia dute eta haibat talde kimiko ezberdin edukitzen dituzte. Talde kimiko horietan bi egitura kimiko bereizgarri aurkitzen dira: **Kromoforoa** eta **auxokromoa**. Tindatzailearen egitura kromoforoa eta auxokromoa dela esan dezakegu, hala eta guztiz ere, beste hainbat talde kimiko ere dauzkate. Bi talde kimiko hauek, funtzio ezinbestekoak betetzen dituzte tindatzailean. Kromoforoak kolorea

sortarazten duten talde kimikoak dira, auxokromoak aldiz, sustratu tintagarriekiko tindatzailearen elkargarritasunaren erantzuleak dira.

Auxokromoei dagokienez, elkargarritasun honen erantzunaren ondorioz, **tindatzaile eta sustratu tintagarriaren artean lotura** sortuko da. Batzuetan, lotura hau ez da modu *zuzenean* emango eta tindatzailea bitartekari edo estekatzaile bati lotuko zaio, ondoren tindatu beharreko molekulari lotuko zaiolarik. Pauso batean desberdintzen dira azalduriko prozesuak.

Kromoforo ezagunak dira karbonilo taldea, alkiloa eta auxokromo batzuk kloruroa, hidroxiloa eta bromuroa. Bi talde hauen arteko **desberdintasunak** garrantzizkoak dira, horiek esleitzen baitie tindatzaileari bere funtzioa. Kromoforoei dagokienez, **lotura bikoitzak** edukitzen dituzte eta lotura bikoitz hauek argia xurgatzeko ahalmena ematen diete. Lotura hirukoitzak ere eduki ditzazkete, baina kasu gehienetan lotura bikoitzak edukitzen dituzte. Auxokromoei dagokienez, oso **ugariak** dira eta batzuetan lehen aipatu bezela, estekatzaile baten beharra erakuts dezakete.

Gure laginak tindatzen ditugunean haibat fenomenoren artean, bi bereziki garrantzitsu gerta daitezke, **metakromasia** eta **polikromia**.

Metakromasia tindatzaile molekulak elkarrengandik oso gertu daudenean gertatzen da. Bi talde kromoforoak molekulenak oso gertu badaude kolore bat sortuko da, molekula-mota bakar baten modura baidihardute. Bi molekulen talde kromoforoak urruti badaude aldiz, bata bestearekin ez da interferentziarik egongo eta beste kolore ezberdin bat sortuko da. Toludina urdinaren kasua aztertuz, molekulak elkarrengandik gertu badaude laginak kolore morexka moduko bat hartuko du, eta urruti daudenean aldiz kolore urdin antzerakoa. Fenomeno honen iturria kromoforoen lotura bikoitz, hirukoitz eta laukoitzen **gainezarmenean** datza. Argi mikroskopioak argia igorriko du, argiaren fotoiak gure begira iritsiko dira, fotoi hauek laginera iritsiko dira baina tindatzailearen talde kromoforek dauzkaten lotura bikoitzak zeharkatzeko arazo handiak edukiko dituzte eta ondorioz, dispertsioa sortuko da, kolore ezberdiñei lekua emanez. Fenomeno fisiko bat da aipatua.

Bigarren fenomeno **polikromia** da. Kasu honetan, tindatzailea oso konplexua izango da, kromoforo bat baina gehiago edukiko ditu. Fenomeno honek eman diezagukeen abantaila tindatzaile bakar bat erabilita kolore ezberdinak eskuratzeko ahalmena da. Kolore ugariz ikusiko dugu molekula tindatzaile desberdinak daudelako.

3. ARGI MIKROSKOPIORAKO PRESTAKUNTZA

Demagun zebra arrain batekin laborategian esperimentu bat egin nahi dugula. Bihotza eta gibela aztertuko ditugu baina orain pauso bat gehiago eman eta bihotz zeluletako mitokondrioak aztertuko ditugu. Kasu honetan, gure lagina mikrometro bat baina handiagoa ez da, horregatik argi mikroskopioa baina **bereizmen handiagoa** duen **mikroskopio elektronikoa** erabiliko dugu.

Horrela argi mikroskopioaren moduan, prestakuntza histologikoa egingo dugu, pauso batzuetan aldaketa txiki batzuk eginda.

1-Disekzioa

Hasteko, ehun freskoa disekzionatuko dugu, **oso zati txikietan** (1mm³ inguruko zatiak). Kubo formako zatiak lortuko ditugu. Mikroskopio elektronikoan disekzioa oso oso zehatza eta zuzen izan behar da.

2-Fixapena

Argi mikroskopioan egiten denaren berdina. Bi motako fixapenak daude, fixapen kimikoa eta fixapen fisikoa baina fixapen kimikoa da erabiliena. Bertan likido simpleak etanola, azido azetiko, azido pikrikoa, merkurio kloruroa, formaldehidoa glutaldehidoa... edo konposatuak (aurrekoen nahasteak direnak) Carnoy (etanola+azetiko+kloroformo), Bouin (formaldehido, pikrikoa, ...), Ciaccioa (azetiko+kromio konposatua) erabiltzen dira.

(Oharra argi mikroskopioaren zatitik kopiatua)

Fixapen fisikoa:

- **Beroaren bitartez** (ebaporazioa): Lagina tanpoi batean sartu eta mikrouhinean berotzen da. Lagineko porteinak desnaturalizatu eta koagulatzen dira prozesu

bilologiko guztiak geldiaraziz, autoliseriketa sahiestuz. Lagin biologikoek egitura galtzen dute, eta kalitate txarreko lagina lortzen da beraz ez da metodo ohikoa.

- **Hotzaren bitartez:** Lagina nitrogeno likidoan sartu (-196 °C) eta jarduera biologiko guztiak blokeatzen dira eta autolisi eta heterolisi prozesuak ekiditu egiten dira. Baina metodo horrek badu arazo bat, zelulen osagai nagusia ura da eta tanpoeratura baxuetan izotz kristal bihurtzen da. Izotzaren bolumena urarena baino handiagoa denez, kristal hauek ehunak edo zelulak apur ditzake eta lagina mikroskopioan behatzean zelulak apurtuta ikusiko dira.

3-Post-fixapena

Fixapena egin ondoren, **osmio tetroxidoa** duen disoluzioan sartuko dugu lagina. Osmio tetroxidoaren sarkortasuna glutaraldehidoa baina mugatuagoa da baina lipidoak fixatzen ezin hobe da. Batzuetan, fixapen zehatza lortu nahi bada, fixatzaile nahasketa erabiltzen da. Adibidez, glutaraldehidoa eta osmio tetroxidoa nahastu ditzakegu. Glutaraldehidoak proteinak fixatuko ditu eta osmio tetroxidoak aldiz lipidoak.

4-Laginaren deshidratazioa

Laginaren deshidratazioa egingo dugu alkohola erabiliz. Adibidez: azetona, etanola...

5-Laginen inklusioa

Kasu honetan, argi mikroskopioan parafina erabiltzen zen moduan, mikroskopio elektronikoan erretxina berezi batean inkluituko dugu lagina. Lagina erretxinazko kapsula batzuetan sartuko dugu. Beroa eta UV argia erabiliz polimerizatu egingo da. Laginak pilula baten tamaina edukiko du.

6-Erretxina blokeak lortu

Inklusioaren ostean erretxina blokeak lortuko ditugu.

7-Erretxina blokeak moztu

Erretxina blokeak moztuko ditugu **ultramikrotomoa** erabiliz. Ebaki ultrafinak izango dira. Ultramikotomoak beira edo diamantezko aihotza edukiko du. 60-90 nm-ko lodiera duten mozketak egingo ditu. Lortuko dugun lagina mehea eta homogeneoa izango da.

8-Ebakiak sareetara itsatsi

Behin ebakiak ditugula sare desberdinetara itsatsiko ditugu. Sare hauek gehienetan metalezkoak izaten dira (Cu, Ni, Al, Au...). Gure ebakia **metalezko sarearen** gainean jarriko dugu. Kontuan hartu batzuetan gerta daitekela gure lagina juxtu sareak harrapatu eta ikusi ahal ez izatea. Mesh sareak deitzen dira eta 1.0 mm-koak izaten dira.

9-Ebakien tindaketa

Behin itsatsita lagina ez dugu tindatuko argi mikroskopioan bezela, baizik eta **kontrastea** emango diogu. Metal astunak erabilko ditugu prozesu honetan, hala nola, uranilo azetatoa, beruna zitratoa....Metal astun hauek proteinekin eta proteinetan aberatsak diren laginekin lotzeko joera dute. Proteinetan aberatsa den laginaren zatia oso iluna izango da, proteinetan urria den laginaren zatia aldiz argiagoa. Zelularen mintza adibidez oso iluna izango da proteina ugari txertatuta dituen bikapa lipidikoa duelako, hetrokromatina eta nukleoloa ere ilunak izango dira dituzten histona proteinengatik, mitokondrioen mintz bikoitzak ere proteina mordoa edukiko ditu eta oso iluna izango da...

Iluntasun argitasun fenomeno hau **elektroien portaeran** datza. Beruna eta uranioa metal oso handiak dira, esan bezela edukiko ditugu sarexka eta gainean gure lagina. Mikroskopio elektronikoak igorritako elektroiak sarea pasako dute baina beruna eta uranioa kolpatzean errebotatu eta atzera bueltatuko dira eta beraz argia bertara ailegatuko ez denez eremu horiek oso ilunak izango dira. Aldiz beruna eta uraniloa ez dagoen eremuetan (proteinarik gabeko eremua) elektroiek inolako eragozpenik gabe zeharkatuko dute lagina eta ondorioz eremu horiek argia ailegatzen denez oso argiak izango dira. Nahiz eta beruna zitratoa eta uranilp azetatoa bakarrik aipatu ditugun, bestelako metal astun batzuk ere erabili ditzakegu,

esatebaterako, kaltzioa... Ondorio bezela esan dezakegu gune elektroluzidoek proteina gutxi edukiko dituztela.

FIXAPEN FISIKOA (Fixatu gabeko materiala?)

Zenbait kasutan fixapen kimikoa ezin da erabili beraz fixapen fisikoa erabilikon dugu. Teknika fisiko erabiliena hotzaren bidezkoa da. Arratoi baten bihotza fixatzean esaterako, bihotza murgilduko dugu nitrogeno likidotan (GOGORATU AURRETIK KRIOBABESTU DEZAKEGULA KRISTALAK SORTZEA ERAGOTZIZ ETA ONDORIOZ EHUNAK KALTETZEA EKIDINEZ) eta gero lagin horren mozketara egin beharko dugu.

Lagina izoztuta dagoenez oso gogorra egongo da. Ebaki finak lortzea erraza izango da baina hotz katea jarraitu egin behar da, lagina hotzetan mantendu behar da. Horrela lagina izotzetako mikrotomo berezietan sartuko dugu, **kriostato-kriotomoan**. Hemen lagina mozten da 0°C azpitik 20°C tara, izotz katea prozesuan zehar mantentzen delarik. Hotz katea ez galtzeko kriobabestutako lagina moztu egiten da, ebakiak ondoren portetan itsatsiko ditugu. Teknika honek laginari ematen dion gogortasunari esker oso erraza izango da ebaki ultrafinak lortzea baina gogoratu behar dugu **hotz katea mantentzea** ezinbestekoa dela.

Helburua **azalerak** ikustea da. **Ebakirik ez** da egiten. Ondoren, **deshidratatzen** da (alkohola edo azetonarekin, graduazioa handituz). **Ez** dago **postfixapenik** (ez dugu nahi apurtu, gogortasuna berdina da), azalerak bakarrik interesatzen baitzaizkigu. Gero, baldintza oso berezietan sartu: **CO₂** likidoetan, T baxuetan eta P altuan. Oso azkar **ebaporatu** (sublimazioa deitzen zaio), non ezin den kolapsatu CO₂ gure laginean, hots, hutsak geratzen dira egiturak (hori esan nahi du “ez kolapsatzeak”, ez betetzea). Geroago, lagina **estalzen da urrezko edo karbonozko film batez**. Izan ere, lagina hauskorkorra da, eta elektroiez bonbardeatzean, apurtu ahal. Hortaz, urrea edo karbonoa babesletzat jotzen du (urrea garestiago da, baina babesle hobeagoa).

HISTOKIMIKA

Definizioz, zelula eta ehunen in situ karakterizazio kimikoa xedetzat duen azterketa mikroskopikoen multzoa dugu, hau da, interesezko egiturak tindatzeko soilik.

Substantzia kimiko bat edo **jarduera metaboliko bat** aurkitzeko teknika da. Adb: lipidoak non daude, nola daude, zer egiten ari dira, ... Bestela esanda, zelulen izate kimikoak identifikatzea, lokalizatzea eta in situ kuantifikatzea (zelula eta ehunetan). Osagai estatikoen (karbohidrato, lipido, azido nukleiko, proteinak...) eta jarduera entzimatiakoak eta prozesu metabolikoak (zurgapena, endozitosia, garraioa, sintesia) *in situ* aztertzea. Horretarako, tindaketa berezi daude **modu espezifikoan gure molekulari/prozesuari lotu**.

- **Zitokimika:** Transmisio mikroskopio elektronikoan
- **Histokimika:** Mikroskopio fotonikoan.

ELEMENTU ESTATIKOENTZAT

ERREAKZIO MOTAK:

1. Erreakzio zuzena:

Tindatzaile bat osagai jakin bati lotuko zaie ,eta hori tindatuko du

Ferroszianuro potasikoa -SH asko dituen proteinetara lotuko da eta hauek prezipitautko ditu

2. Erreakzio ez zuzena:

Adb. ohikoena **PAS (Periodic Acid Schiff):** glukogenoa edo zenbait polisakarido ikusteko erabiltzen da. Ehuna azido periodikoa duen disoluzioan sartu eta glukogenoa azidoaren eraginez aldehido tadeetan bilakatuko da. Aldehidoak ez dira oraindik ikusgarriak baina Schiff-arekiko afinitatea dute. Ondoren lagina, Schiff-arekin errakzionarazi eta honek aldehidoak tindatuko ditu, azken finean glukogenoa tindatzen dugu.

- Arazoa: ez ditu bakarrik aurretik glukogenoa ziren aldehidoak tindatuko, baizik eta lehendik zeuden aldehidoak ere tindatuko ditu. Hau ekiditeko **tindaketa kontrola** egin behar da.

Horretarako bi porta hartzen dira, bati aipatutako prozesua aplikatzen diogu.

Besteari ordea, azido peryodikotan sartu aurretik porta glukogenoa liseritzen

edo apurtzen duen soluzio batean sartzen da. Horren ondoren aipaturiko azido periodiko eta Schiff konposatuak gehitzen zaizkio.

Modu honetan, lehen laginean jatorriz zeuden aldehidoak zein diren jakitea da eta gune hori seinale faltsutzat joko da. (kontrol negatiboa da porta hau). Ebakien arteko aldea minimoa izateko mozketak bat lagintzat hartzen da eta hurrengo kontrolatzat.

BESTE HISTOKIMIKA MOTA BATZUK

1. **Oil red O tindaketa:** Lipidoekiko afinitatea. Fixapena egiteko, lipiodentzako espezifiko eta deshidratazioarekiko erresistentea den fitxatzaile bat erabili daiteke (osmioa ohikoena) edo lagina fisikoki fitxatu behar da (hotzaren bidez). Bestela lagina alkoholekin deshidratatzean, lipidoak galtzen dira. Horregatik adipozitoak “hutsak” egongo bailira ikusten dira.
2. **Feulgen tindaketa :** DNAREN detektapenerako. Intereseko egitura zuzenean ikusten da, ez dago seinale faltsurik.
3. **Metalak detektatzeko teknika desberdinak:** Bi kontrol erabiltzen dira, bata metala duena (kontrol positiboa, ugaztunen gibela adibidez, jakin badakigualako burdina duela) eta bestea metalik ez duena (kontrol negatiboa, adibidez, muskuiluen zakatzak).
4. **Konbinazioa:** kartilagoak eta hezurak ikusteko, adibidez, tindatzaileak konbinatzen dira.

AUTORRADIOGRAFIA

Autoradiografiaren bidez elementu erradioaktiboak detekta daitezke. **Helburua** elementu kimiko jakin bat lokalizatzea eta bere hedapena zehaztea da. Horretarako, demagun, esate baterako, ehun bati karbono edo potasio **erradioaktibo** batera gehitzen dugula, eta ehunetik nola mugitzen den aztertu nahi dela. Horretarako, elementu arrotz hori animali bizian gehitu ondoren, fixatu, ebakiak lortu eta laginaren gainean gelatina (AgBr daramana) berezia eranstean da eta elementu erradioaktiboa zilar kristalekin erreakzionatzen du eta prezipitarazten du zilarra. Beraz, prezipitatua ikusten dudana tokian (intensitate handiagoa ageri dute, beltzak ikusten dira) egongo da ioi erradioaktiboa, eta, berez, ezagutu nahi genuen elementu kimikoa ere.

Era horretan, elementu horiek ordu desberdinean duten kokapena aztertuz, elementu horiek edota elementu horiei loturiko molekulek duten ibilbidea azter daiteke, eta zelula barnean molekulen garraioa nolakoa den aztertu daiteke, hots, elementuen ibilbidea antzeman daiteke. Palade 70. Hamarkadan antzeman ahal izan zuen potasioa zuten aminoazidoen (Lys) ibilbidea, EEPr, Golgi cis aldera, Golgi trans aldera, ... (EXOZITOSI PROZESUA DESKRIBATU AHAL).

JARDUERETARAKO

10. Entzimen histokimika

Entzimen histokimika entzimen jarduera detektatzea eta ikusaraztea helburu duen teknika da. Normalean bi hurbilketa erabiltzen dira: jarduera baten ekoizkina edo **produktua** ikusaraztea, gatz zehatz batekiko afinitatea baitute; eta, interesezko entzima zein den ezagutzen bada, fluoreszentiadun edo koloredun **inhibitzaileak** erabiltzea, bai entzimarekiko bai eta jarduerarekiko espezifikoak izan daitezkeenak, horiek entzimei lotu zatzaizkien jarduera entzimatikoa ikusarazteko.

Argi dago jarduera entzimatikoa bat ikusteko beharrezkoa da jarduera entzimatikoa **preserbatzea**. Horretarako, laginak fisikoki fixatu behar dira, kimikoki fixatutako laginetako entzimetan aldaketa konformazionalak eragiten baitira, horiek inaktibatuz. Hori dela eta, beharrezkoa da lagina **fisikoki fixatzea**. Hala, lagina **izoztu** (nitrogeno likidoa erabiliz) eta kriotomoaren bidez moztu da, laginaren ebaki bat eskuratzeko. Ebakia ondoren portara itsatsi eta giro tenperaturara berriro igarotzean jarduera entzimatikoa berreskuratzen da. Horren ondoren, jarduera ikusarazteko, arestian aipatu moduan, bai interesezko entzimak sintetiza dezakeen produktua nahiz entzima tindatu daiteke.

Modu eksklusiboan izoztutako materialaren gainean burutzen dira histokimika entzimatikoa, eta teknika hauetan ere **kontrol negatiboa** erabiltzea beharrezkoa da, laginak berez hartuko duen kolorea aztertzeko eta alderatzeko.

11. Immunohistokimika/ Immunozytokimika

Immunozytokimika eta immunohistokimika tekniken bidez proteina espezifikoa ikusarazten dira. Teknika horiek antigeno (aztertu nahi dugun proteina) eta antigorputzen arteko lotura espezifikotik oinarritzen dira. Metodo horiek era egokian garatu ahal izateko antigenoen **morfologia** mantentzea guztiz beharrezkoa da, aldaketa morfologikoa gertatuz gero antigorputzak ez baitu antigenoa identifikatu eta beraz ezingo da kontraste egokia eman. Beraz, halako teknikak ezin dira proteina sentikorrek erabili. Izan ere, normalean fixatzaile kimikoek proteinen arteko loturak eragiten dituzte, hainbat aldaketa (koagulazioak, desnaturazio txikiak...) eragiten dituztenak. Hori dela eta, beste hainbat fixatzaile ez erasokor erabili behar dira, interesezko proteina eraldatzen ez dutenak, besteak beste, metanol, etanol, Carnoy edo azido azetikoak, fixapena hain ona ez den arren antigenizitatea babesten baitute.

Antigorputzak B linfotik sortzen dira eta espezifikotasun handia duten antigenoekiko. Normalean 3 antigorputz mota erabiltzen dira antigenoak ehunetan detektatzeko: **antigorputz poliklonalak**, **monoklonalak** eta **errekonbinanteak**.

Antigenoaren barnean antigorputzerako lotura gune edo **epitopo** desberdinak daude. Antigorputz poliklonalak, euren artean guztiz identikoak ez direnez antigenoko epitopo desberdinetara lotzeko gaitasuna dute. Antigorputz monoklonalak, berriz, euren artean guztiz berdinak direnez, identikoak diren epitopotara lotuko zaizkie.

11.1 Antigorputzen lorpena

Antigorputz **poliklonalak** eskuratzeko animalia (untzia edo arratoia, besteak beste) kitzikatzen da interesezko antigenoa injektatuz. Animalia horien sistema immunea aktibatzen da orduan, arrotza den proteina bat detektatzen baitute. Era horretan, organismoak antigeno horren aurkako antigorputzak sortzen ditu, eta animaliaren odola edo barne fluidoak erauzi eta antigorputzak isolatuz, antigeno hori espezifikoki ezagutzen duten antigorputzak lor daitezke.

Kitzikatutako animalia horren organo batetik (Esaterako, barea) B linfotik bat erauzi egiten da, epitopo bakarrean lotzen diren antigorputzak sintetizatzen dituen. Isolatutako B

linfzito hori ondoren minbizi zelula batekin fusionatzen da **hibridoma** deritzon zelulak sortzeko. Hibridoma horretatik zelula ugari sortuko dira eta gehienak interesezko ezaugarriak ez dituzten arren, prozesu konplexu ugariaren bidez aldi berean B linfzito eta minbizi zelulen ezaugarriak dituzten zelulak isolatzea lor daiteke. Horiek interesezko antigorputzak sintetizatzeaz gain etengabe zatitzeko ahalmena (baldintzak egokiak diren bitartean) izango dute. Era horretan, guztiz identikoak diren **antigorputz monoklonalak** lortuko dira, B linfzito bakar batetik abiatuta sortu baitira. Hala, antigorputz horiek antígenoaren epitopo bakarrera lotuko zaizkio.

Antigorputz poliklonalek **espezifikotasun espektro** zabalagoa dute, antígenoaren epitopo bakar bat baino gehiagora lotu baitaitezke. Hori dela eta, posible da aztertutik laginean antzeko epitopoa duten proteinak egotea, eta beraz antigorputzak bertara lotu eta positibo faltsuak eskuratzea. Antigorputz monoklonalen kasuan halako fenomenoak gerta daitezke ere, baina ez dira hain ohikoak. Gainera antigorputz poliklonalen kasuan, gehiago eskuratu nahi badira beharrezkoa da beste animalia bat injektatzea, eta monoklonalen kasuan, berriz, lortu den hazkuntza zelularreko zelulak guztiz identikoak direnez, soilik antigorputz gehiago sintetiza daitezen itxaron behar da.

11.2 Detekzio metodo ez zuzena

Antigorputzak oso txikiak dira mikroskopioan ikusi ahal izateko, eta, beraz, antígeno antigorputz erreakzioa ez da ikusgarria. Hori dela eta, hori detektatzeko antigorputz horrek kolorea ematen dion edo eta fluoreszentzia ematen dion molekula bat lotuta darama. Hainbat kasutan molekula hori ere ikustea oso zaila da mikroskopioan, oso seinale ahula ematen baitu.

Hori dela eta, beharrezkoa da **detekzio metodo ez zuzena** erabiltzea. Horretarako, antigorputz primario horiek (markatzailerik gabe) lotuta dituen ehuna antigorputz sekundario bat duen disoluzioan barneratzen da.

Antigorputz sekundario horiek normalean bat baino gehiago dira eta bai kolorea bai fluoreszentzia (fluorokoromoen bidez) izan dezakete. Horiek antigorputz primarioetara lotzen zaizkie, antigorputz primarioa nahiz antígenoa markatuz. Era horretan, antígeno primarioei antígeno sekundario bat baino gehiago lotzen zaizkio, seinalea asko handitzen da eta antígenoaren (aztertu nahi dugun elementuaren) kokapena ikusgarriagoa egitea lortzen da.

Gainera, askotan antigorputz tertziarioak erabiltzen dira sekundarioei lotzeko. Hala, seinlea nahi beste anplifika daiteke.

Zenbait kasutan, antigorputz primarioetara lotzen zaizkien entzimak (normalean peroxidasa) erabili egiten dira, substratu batekin erreakzionaraztean kolorea duten produktua sortarazten dutenak, eta beraz, antigenoa ikusarazten dutenak. Beste kasu batzuetan, antigorputzak abidina ematen du lotuta eta honek molekula fluoreszente bat edota entzima bat eman dezake.

Zuzenean antigorputz primarioak markatzaile gisa diharduen fluorokromo bat dauka edo entzima bat.

Mikroskopia elektronikoan immunohistokimika edo immunoiztokimika ere buutu daiteke. Hala ere, mikroskopia mota honetan koloreak ezin dira ikusi. Mikroskopia elektronikoetan antigorputz-antigeno lotura ikusi ahal izateko metal astunak erabili behar dira; esaterako, urrea (Au). Gure antigorputzari tamainu jakin bateko urre partikula bat gehitzen zaio koloide gisa eta honek kolorea eman beharrean, mikroskopioan gune elektrodentsoa eta beraz, iluna ikusiko dugu. Prozesu hau metodo zuzenetan zein metodo ez-zuzenetan erabili daiteke eta zenbait kasutan ere, bigarren antigorputz bat ere erabili daiteke.

Mikroskopia elektronikoan seinalea anplifikatzeko beste teknika bat dago. Zilarra (Ag), nitrato gisa dagoenean, urrearen inguruan nukleatu egiten da; beraz, urre partikula bakoitzaren inguruan zilar partikula kopuru jakina izango dugu. Modu honetan, nere marka handitzen da eta seinalea anplifikatu, hain zuzen ere. Gutxi erabiltzen den arren, transmisio mikroskopia elektronikoan ere entzimak erabili daitezke eta hauek substratuaren presentzian, nolabaiteko egitura elektrodentsoaren izaera duen produktua sortzea bideratzen dute, esaterako, peroxidasa.

Aminopeptidasa entzimaren kokapena eta bere jarduera.

Gamma tubulina markatu dugu eta TEM erabiliz non dagoen detektatu dezakegu. Puntu beltz bakoitza urre koloide bana da.

Fluoreszenteak erabiliz ger, antigorputz bat baino gehiago erabili ditzazket, antigorputz horiek fluorokromo desberdina duten bitartean. Antigorputz desberdinak ere erabili daitezke. Urrearen tamaina desberdina bada, normalean, antigorputz ezberdinak erabiliko ditugu

In Situ HIBRIDAZIOA

Interesezko egitura proteina berezi bat ez bada, baizik eta bere sintesia eragiten duen mRNA, **in situ hibridazioa** deritzon teknika erabili behar da. Normalean teknika horretarako erabiltzen diren ebakiak oso finak izan behar dira (1-2µm) eta gainera, aurretik lagina ondo fixatutako egon behar du. Horretarako, batetik DNA helize bikoitza osatzen duten **harizpiak banatzen** dira azidoan barneratuz, eta, bestetik, jadanik ezaguna den RNA molekula horrekiko **osagarria** den sekuentzia sintetizatzen da, eta ondoren hainbat metodoen bidez markatzen da: markatzaile erradiaktiboak, fluorokromoak, koloratzaileak etab. Sekuentzia osagarri hori laginean dagoenari lotuko zaio, euren osagarritasunari esker, eta marka horren bidez interesezko sekuentzia non dagoen jakitea lortzen da. Normalean 400 basetik gorako sekuentziekin lan egitea zaila da, nahiko zaila baita halako kate luzeak ehunean barneratzea, beraz, base pare gutxiko DNA zatiekin egiten da lan.

In situ hibridazio teknikak erabiltzean kontrol negatibo taldeak egiten dira. Horretarako, nire portan ondoz-ondoko bi ebaki egiten ditut. Batean, kontroleko laginean bilatzen ari garen sekuentziaren sekuentzia osagarria kokatzen da, hibridazioa eraginez. Bigarrenean, ordea, bilatzen ari naizen sekuentzia bera jartzen dut eta beraz, lortuko dugun laginean ez litzateke hibridaziorik gertatu beharko. Izan ere, posible liteke hibridaziorako erabilitako RNA sekuentzia zelulan kokaturiko beste hainbat elementuekin (lisosomak, hondakin gorputzak) lotzea, eta, beraz, **positibo faltsuak** izenekoak sortzea.

Puntuak RNA sekuenziak erre partikulaz markatuta.