

TEKNIKA HISTOLOGIKOAK ETA ZELULEN HAZKUNTZAK

2. PRAKTIKA: BEHAKETA MIKROSKOPIKOA

Praktika honen helburuak gertakuntza histologikoaren prozesuan zehar aztertutako urrats guztietan gerta daitezkeen arazoak desberdintzea, prozesua zehar egindako akatsen konponbideak ulertzea eta behaketa mikroskopiko arruntak burutzeko beharrezkoa diren tresneria eta prozedurak menperatzea dira.

Horretarako, erabiliko dugun lagina muskuilu bat izango da.

LAGINA	URRATSAK	AKATSAK	KONPONBIDEAK
Muskulua	Ebaketa, muntaketa, tindatzean zein fixapenean	Burbuilak agertzea, larregi tindatzea, tolesdurak agertzea...	Tolesdurak ekiditeko kontu handiz harrapatu portarekin, tindaketa ongi burutzeko eta estalkia jartzean burbuilarik ez agertzeko. Fixapen arazoa bada berriz hasi
Oina	Ebaketan zein fixapenean	Urraketa	Fixapen arazoa bada berriz hasi behar gara, ebaketa bada gaizki egin dena ebaketa errepikatu.
Digestio-aparatua	Muntaketan, inklusioan zein mozketan	Tolesdurak agertzean edo apurketak ematea	Mozketa arazoa bada lagina berriz ebaki, muntaketa arazoak ekiditeko kontu estalkia jartzean
Zakatza	Tindaketan zein mozketan	Tindatzaile larregi edo mozketa txarra burutzea	Berriz moztu eta tindatu lagina
Gonada	Muntaketan	Burbuilak agertzea	Estalkia kontu handiz jarri, txarto jarritz gero prozesua errepikatu.

3. PRAKTIKA: GAINEZTADURA EPITELIOAK

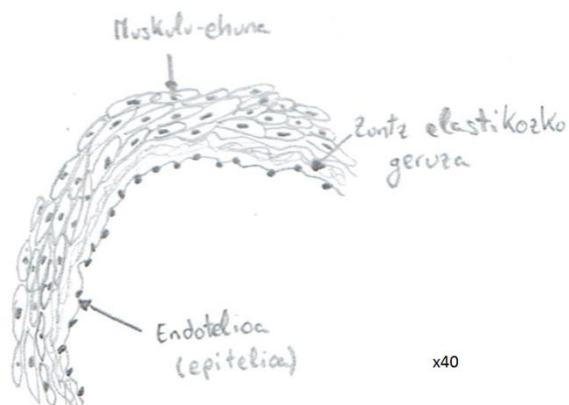
Praktika honen helburua epitelioen azterketa, deskribapena eta sailkapena burutzea da mikroskopioan, baita epitelio zelulen osagai estrukturalak ikastea (mintzen desberdintzapena).

Horretarako, ondorengo 5 laginak behatu dira mikroskopioan: arteriak eta zainak; giltzurruneko ehun adipotsu arrea; hestea; trakea eta esofagoa; eta larruazala.

○ ARTERIAK ETA ZAINAK

Lagin honetan endotelioa deituriko epitelio bakun eta laua aurkitu dugu, oso geruza fina. Arteria zein zainen barruko geruzan kokatzen da, eta bere azpian zuntz elastikozko geruza bat aurkituko dugu, zainetan askotan eratzen ez den arren. Zuntz elastikozko geruza horren ondoren muskulu-ehuna kokatuko da.

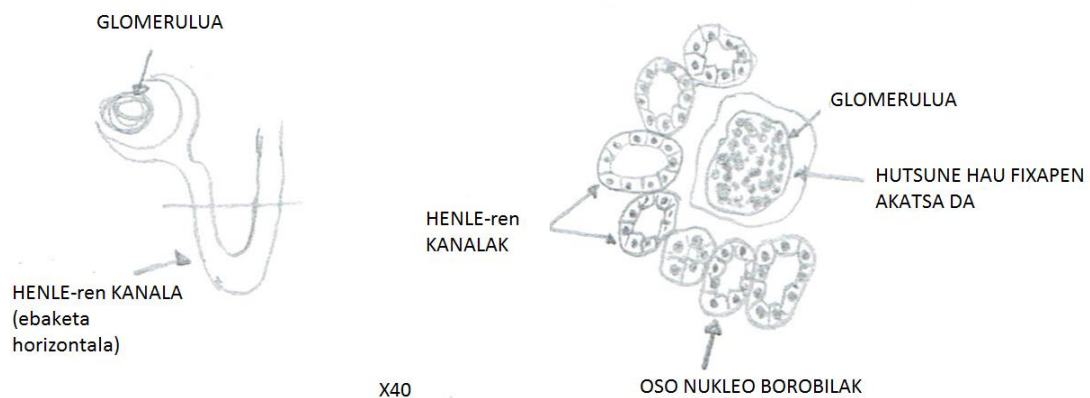
Tindaketa: Hematoxilina- Eosina.



○ GILTZURRUNEKO EHUN ADIPOTSU ARREA

Lagin honetan glomerulo izeneko egiturak identifikatu ditugu, eta horien inguruan kokatzen den epitelio kubiko eta bakuna aztertu dugu, Henle-ren kanala izeneko egiturak kokatzen dena. Horrez gain, glomeruloa gaineztatzen ere epitelio lau eta simple bat behatu dugu. Glomeruluen inguruan odol hodiak ere aurki ditzakegu.

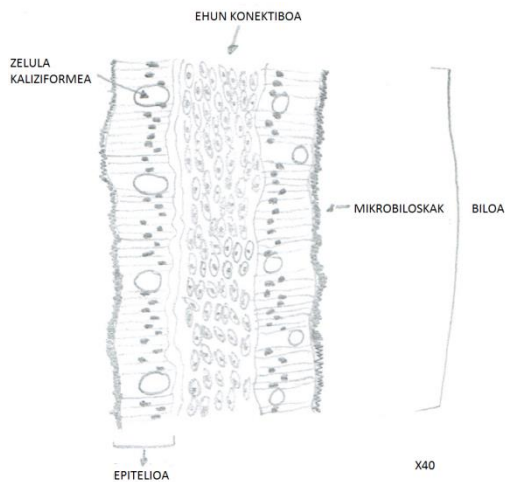
Tindaketa: Trikromikoa (Zielh- Nielsen)



- HESTEA (heste biloxka)

Epitelio sinple eta prismatikoa ikusiko dugu lagin honetan. Hiru ataletan banatuta lagina: epitelioa bi ertzetan eta tartean ehun konektiboa. Epitelioa zelula kaliziformeak ere aurkituko ditugu. Epitelio mikrobiloskaduna.

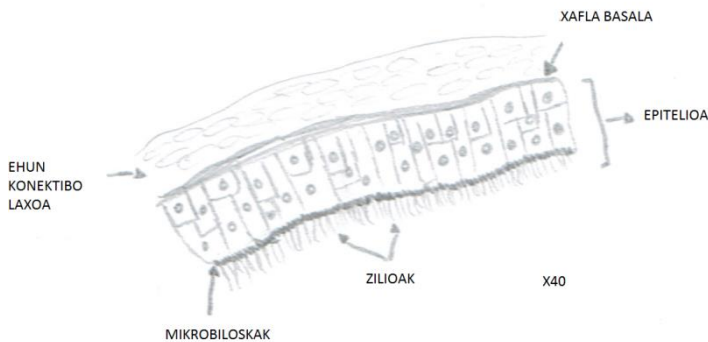
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.



- TRAKEA ETA ESOFAGOA

Trakea behatu dugu, oso egitura borobila. Epitelioa barruren dagoen geruza da, epitelio ziliatua, mikrobiloskaduna eta pseudogeruzatua (arnas bideko epitelio berezi bat da).

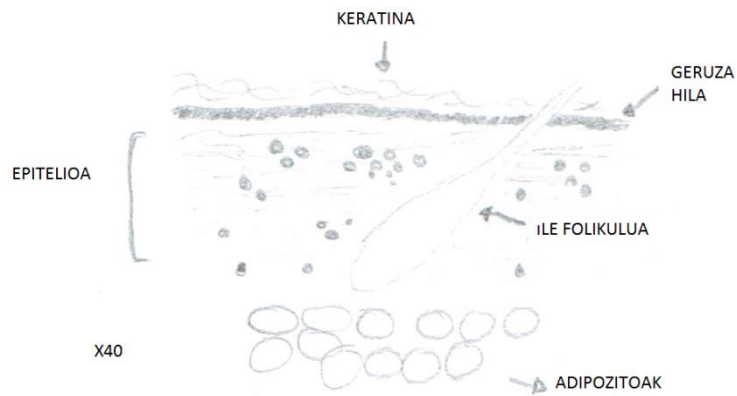
Tindaketa: Trikromikoa



- LARRUAZALA

Epitelio geruzatua, laua eta keratinizatua (keratina kanpoaldean dago). Keratinaren azpian kokatzen den geruza erdi hilda dago, horren azpiko geruza da garrantzitsuena. Ile folikuluak tartekaturik.

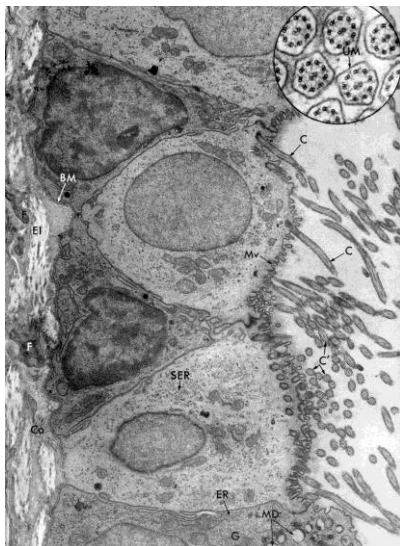
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.



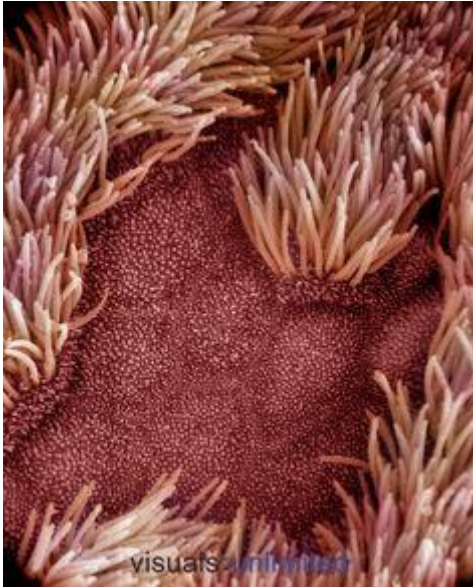
○ MIKROSKOPIO ELEKTRONIKOAREN ARGAZKIAK



1.irudia: Transmisio mikroskopio elektronikoazko hestearen irudia. Epitelio prismatikoa, mikrobiloskak eta zelulen arteko loturak oso ondo identifika daitezke.



2. Irudia: Saguzahar baten epitelio pseudogeruzatuaren argazkia transmisio mikroskopio elektronikoan. Zilioak eta mikrobilosken ezberdintasunak nabarmen ikus daitezke hemen. Jariapenarekin erlazionaturako zelula kaliziformeak ere ageri dira, non golgi aparatua eta erretikulua bereizten diren.



3. Irudia: Trakeako zelula ziliatuak eta ez- ziliatuak batera ekorketazko mikroskopia elektronikoko argazkian.

4. PRAKTIKA: GURUIN EPITELIOAK

Praktika honen helburua aurreko praktikaren berdina da, kasu honetan erabiliko ditugun laginak guruin epitelioak izan arren. Horretarako, hestea, ileko guruinak, listu guruinak, area eta tiroide eta paratiroidea behatuko ditugu.

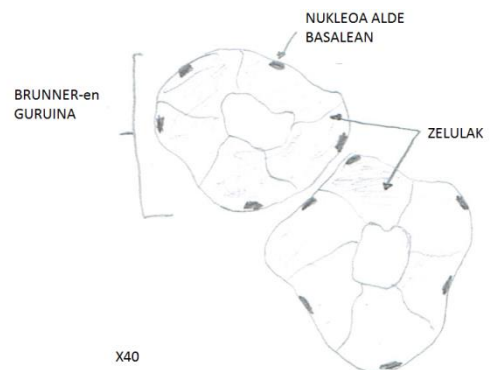
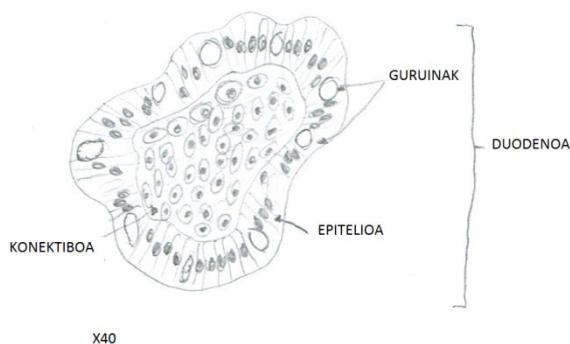
Guruina ehun konektiboan badago exoepiteliala dela esango dugu, bestela endoepiteliala.

○ HESTEA

Duodenoa behatuko dugu. Bertan, guruin unizelular endoepiteliala, gaineztadura epitelioaren barruan dagoena. Guruinak epitelioan kokatzen dira. Hestearen erdian zelula kaliziformeak daude.

Bestetik, Brunner guruinak ere ikus daitezke. Guruin exoepitelialak, konektiboan kokaturik daudenak eta plurizelularrak.

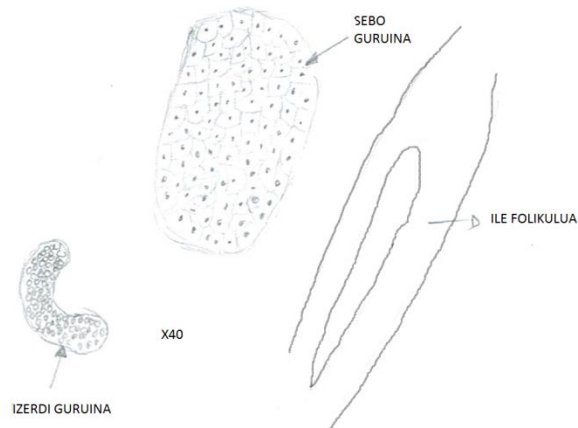
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.



○ ILEKO GURUINAK

Ile folikuluaren alboan kokatzen dira sebo guruin hauek, jariapen halokrinoa daukatenak. Jariapena exokrinoa ere izango da, kanpora jariatuko baita. Sebo guruin hauen azpian izerdi guruinak daude, apokrino eta tubularrak.

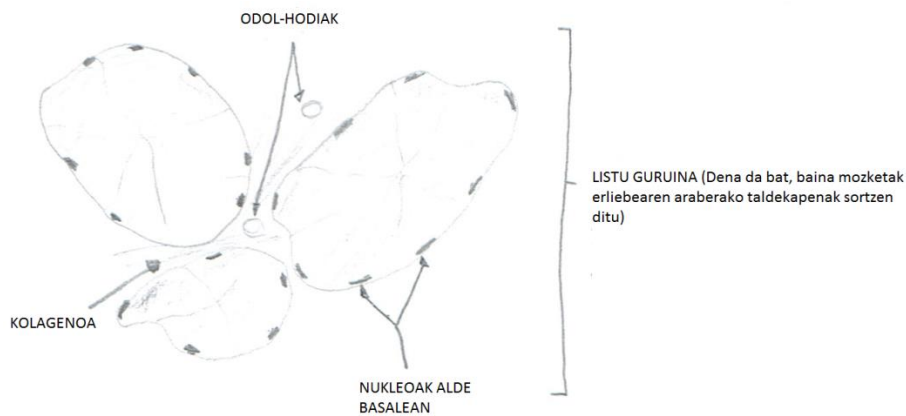
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.



○ LISTU GURUINA

Guruin exokrino eta plurizelularrak, inguruan kolagenoa daukatenak guruinak mantentzeko. Mukitsu eta apokrinoak.

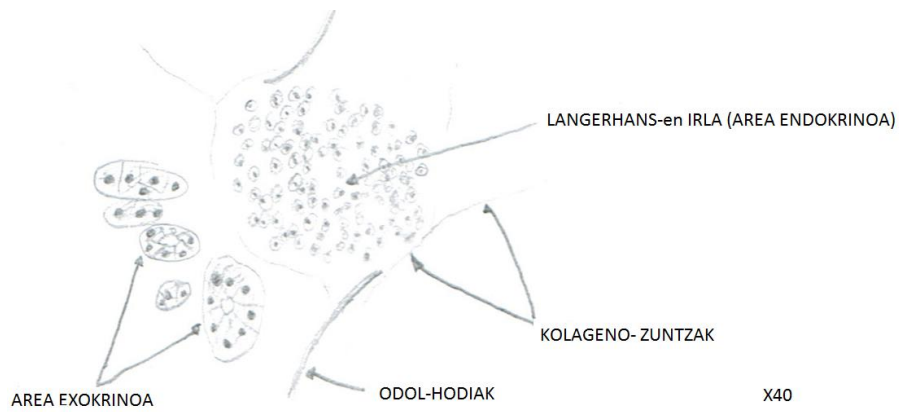
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.



○ AREA

Guruin anfikrinoa, hau da, jariapena odolera zein kanpo mediora: area exokrinoa oso serotsua da eta bere edukia digeriketa aparatua jariatzen du eta area endokrinoan intsulina sintetizatzen da adibidez, jariapena odolera eginez (Langerhans-en irlak ikusiko ditugu hemen).

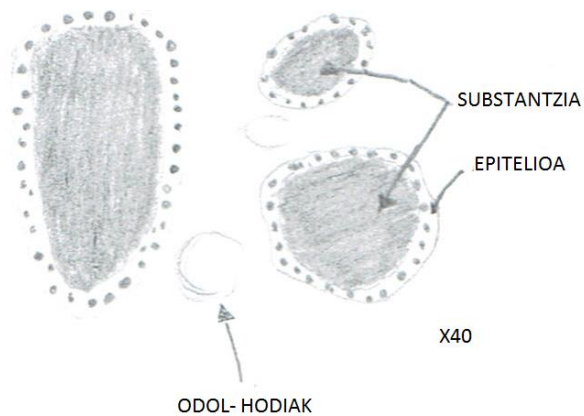
Tindaketa: Trikromikoa.



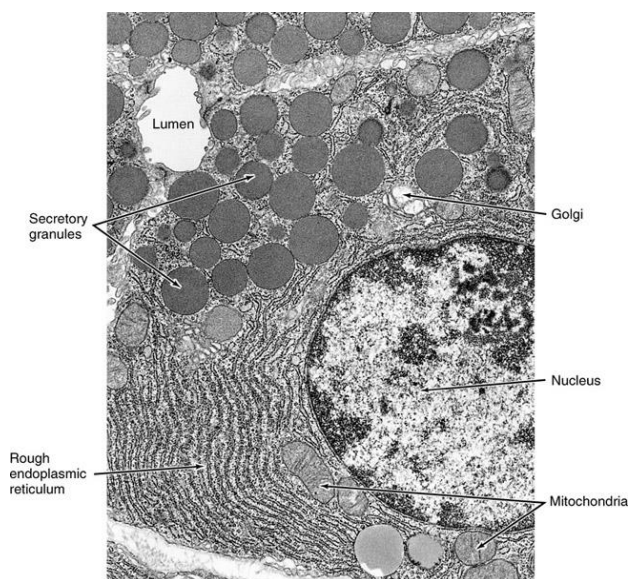
○ TIROIDEA ETA PARATIROIDEA

Tiroidea aztertuko dugu. Guruin endokrinoa, jariapena odolera. Hormona tiroidea sintetizatuko dute.

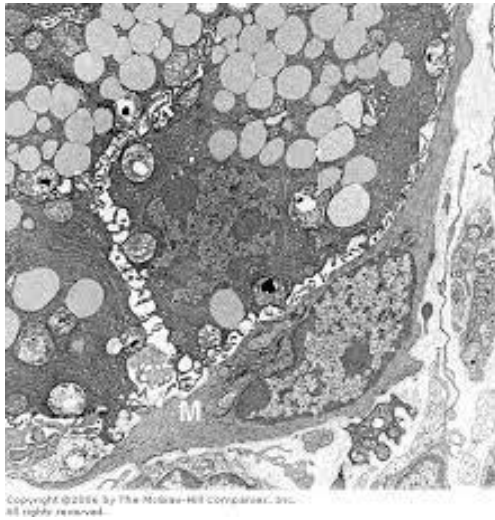
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.



○ MIKROSKOPIO ELEKTRONIKOZKO ARGAZKIAK



4.Irudia: Areko zelula baten argazkia transmisio mikroskopio elektronikoa, besikula jariatzaileak bereizi ditzakegu goikaldean.Oso elektrodentsuak, guruin serotsuak dira- eta, proteina jariatzaileak.



5.Irudia: Listu guruinen argazkia mikroskopio elektronikoan. Besikula argi horiek dira guruinek jariatuko dituztenak.



6.Irudia: Tiroidearen argazkia ekorketa mikroskopio elektronikoan. Barruan hormonak metatzen dituzte ondoren jariatzeko.

5.PRAKTIKA: EHUN KONEKTIBOA

Praktika honen helburua ehun konektibo mota ezberdinak bereiztea eta bere osagai eta proportzioen artean ehun konektibo ezberdinak lokalizatu eta desberdintzea da. Epitelioen

azpian dagoen konektiboa aztertuko dugu praktika honetan hain zuzen ere, normalean konektibo zuntzeskatu laxoa izango da.

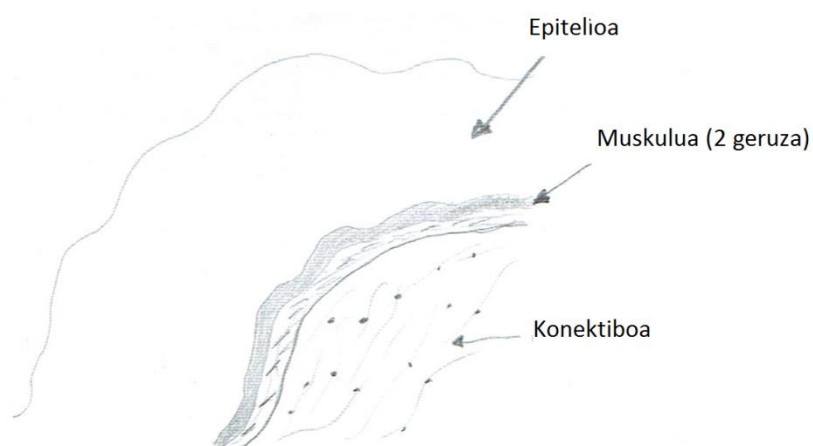
Horretarako, erabili ditugun laginak honako hauek dira: urdaila, hestea, kolona, gibleko ehun adipotsu arrea eta arteria eta zaina.

○ URDAILA

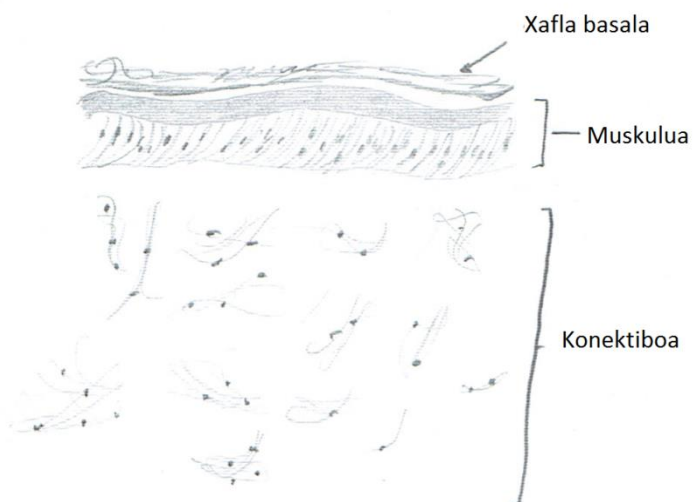
Fibroblasto aktiboak, oinarritzko substantzia asko eta zuntz gutxi, konektibo laxoa da. Lagin honetan, epitelioaren azpian muskulu geruza fin bat (*Muscularis mucosa* eta *muscularis externa*) egongo da eta azpian konektiboa. Xafla basala epitelioaren eta muskulu geruzaren artean kokatuko da.

Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.

x10



x40

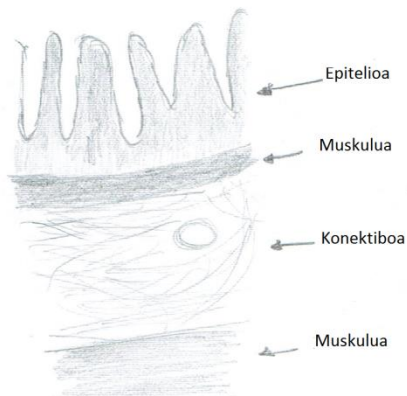


○ HESTEA

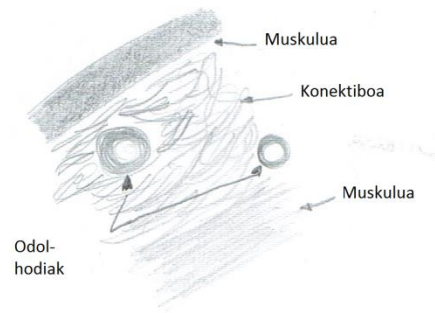
Urdailean baino zuntz gehiago, laxoa oraingo honetan ere. Adipozitoak ikusi ditzakegu talde txikitan.

Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.

x10



x40

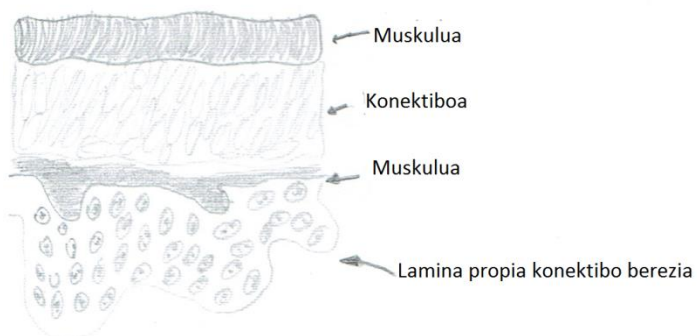


○ KOLONA

Ehun konektibo zuntzeskatu laxoa. Zuntz gehiago urdailean baino. “Lamina propia” izeneko konektibo berezia ikusi dezakegu lagin honetan, zelula kaliziformeak inguratuz.

Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.

x4



x40

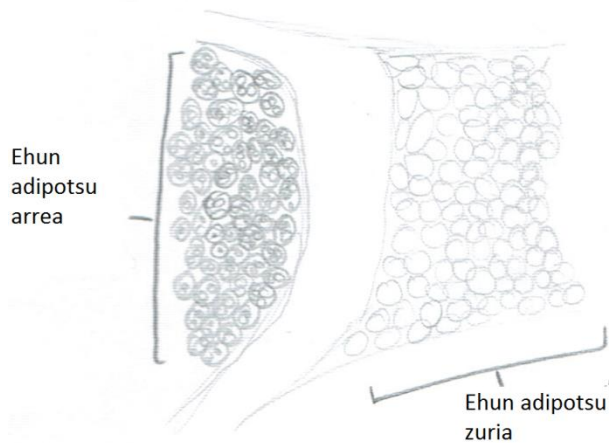


○ GIBELEKO EHUN ADIPOTSU ARREA

Ehun adipotsu arrea eta horren segidan ehun adipotsu zuria ikusi daitezke lagin honetan. Nukleoa erdian eta inguruan lipidozko tantak. Adipozito zurietan tanta bakarra egongo da eta adipozito arreetan lipidozko tanta ugari baina txikiagoak.

Tindaketa: Trikromikoa

x40

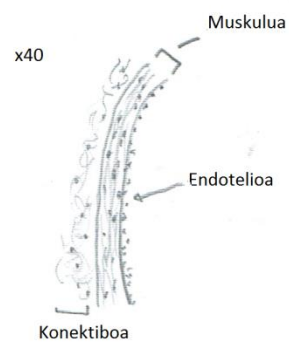
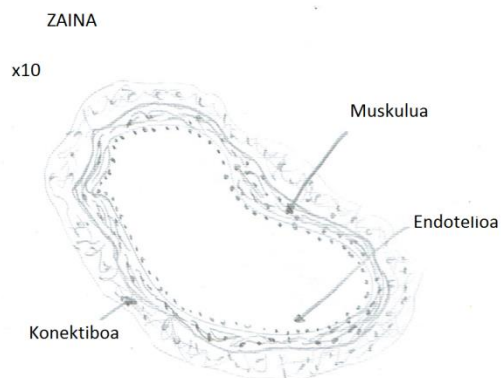
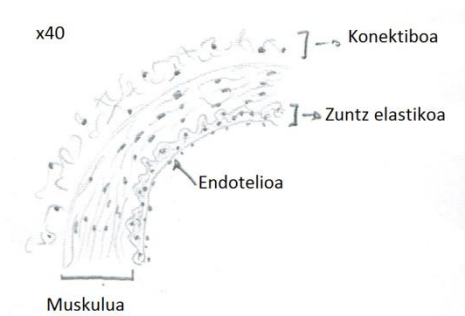
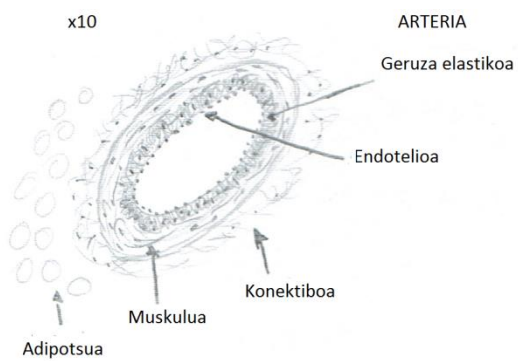


○ ARTERIA ETA ZAINA

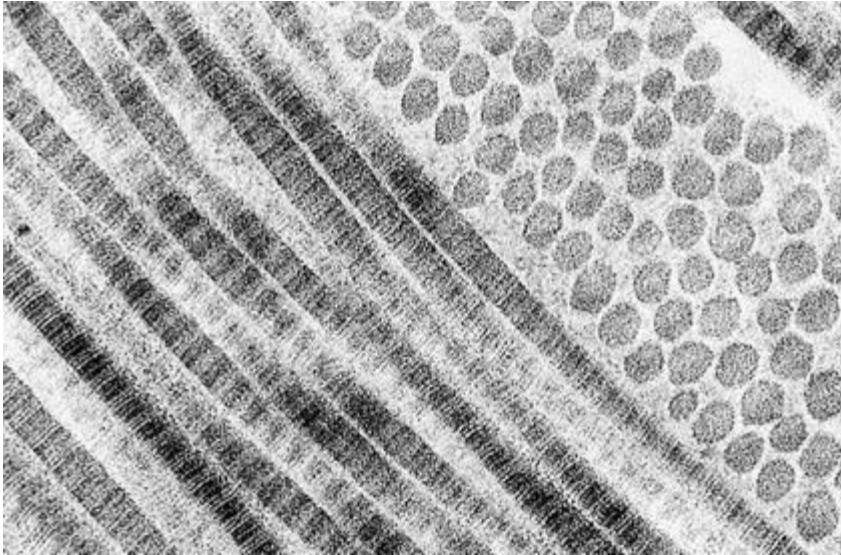
Barrutik kanpora, ordenan, endotelio geruza, geruza elastikoa (arteriaren kasuan), muskulu geruza, konektiboa eta ehun adipotsua aurkituko ditugu.

Konektiboa dentsoa eta zuntzeskatua izango da.

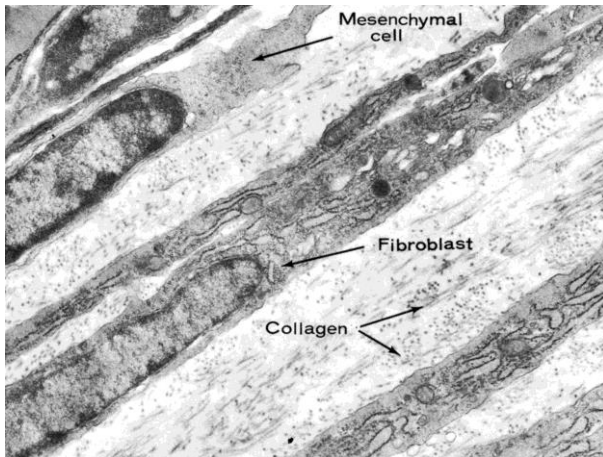
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina.



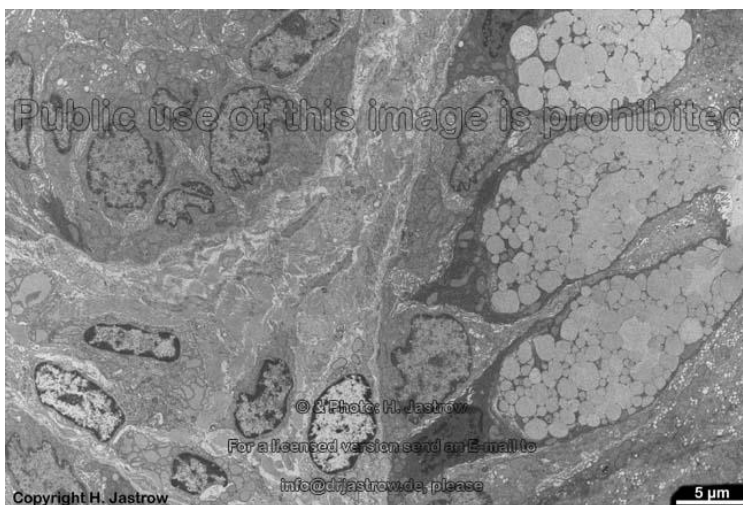
○ MIKROSKOPIO ELEKTRONIKOZKO ARGAZKIAK



7.Irudia: Giza kolageno zuntzak transmisiozko mikroskopia elektronikoan. Argazkian zuntzen luzetarako zein zeharkako ebaketak bereiztu ditzakegu



8.Irudia: Fibroblastoak garatzen ari den ehun konektiboan transmisiozko mikroskopia elektronikoan.



9.Irudia: Arratoi baten kolonaren ehun konektibo laxoaren transmisiozko mikroskopia elektronikoazko argazkia. Lamina propia konektibo berezia ikus daiteke.

6. PRAKTIKA: KARTILAGO ETA HEZURRAREN IKERKETA

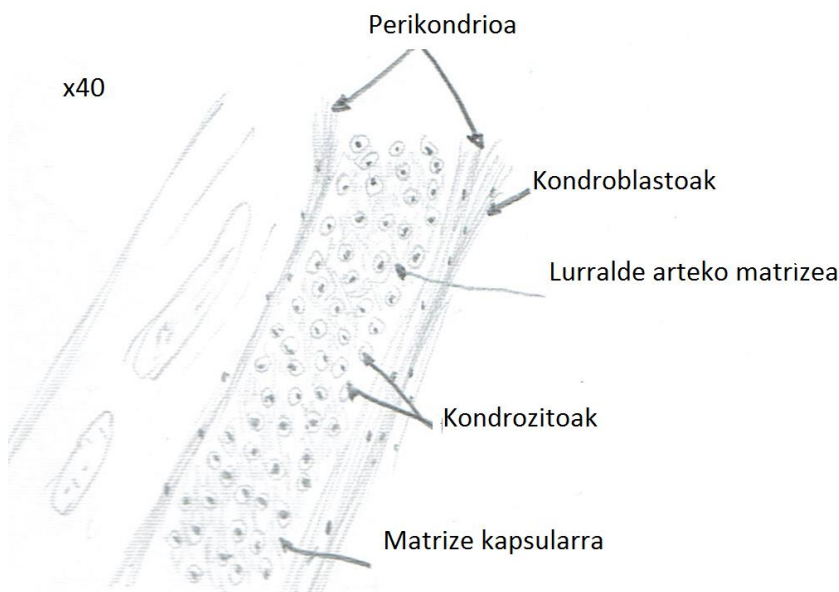
Praktika honen helburua kartilagoaren histologia deskribatzea eta hezuraren sintesi prozesua identifikatzea da.

Horretarako, ondorengo lagin hauek erabili ditugu: trakea eta esofagoa, garatzen ari den hezurra, hezur konpaktua eta odola.

○ TRAKEA ETA ESOFAGOA

Trakea aztertuko dugu lagin honetan. Kartilagoaren bi aldeetara perikondrio izeneko ehun zuntsekatua sortzen da, eta ehun horren inguruan fibroblastoak kondroblasto bihurtuko dira. Azken hauek matrize estrazelular berezi bat jariatuko dute eta matrize horretan murgilduta geratzean kondrozito bihurtuko dira. Kondrozitoen inguruan dagoen matrizea kapsularra izango da eta kondrozitotik kondrozitorarteko espazioa betetzen duenari lurralde arteko matrizea deituko diogu.

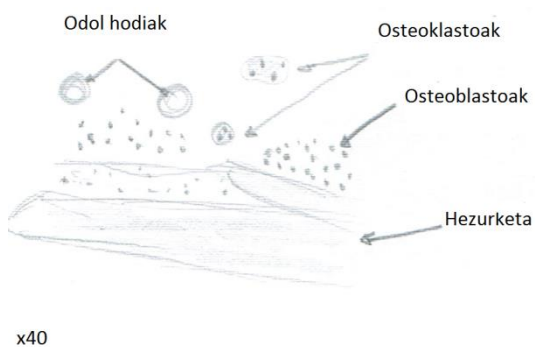
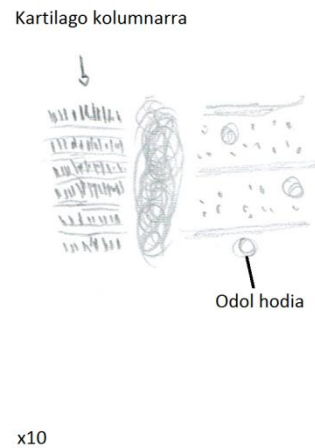
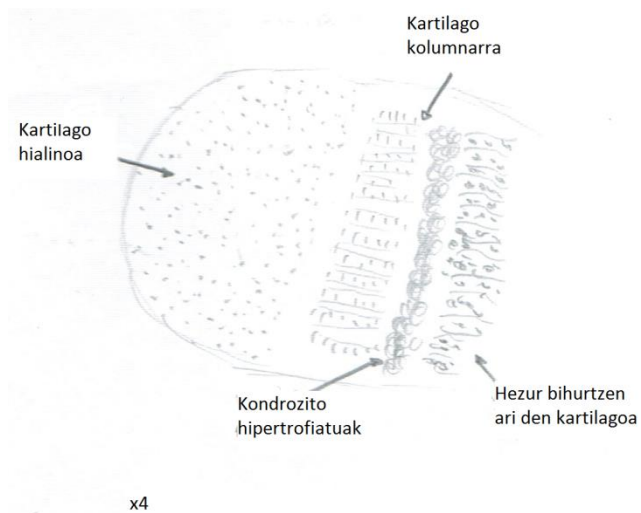
Tindaketa: Trikromikoa



○ GARATZEN ARI DEN HEZURA

Garapen fasean dagoen hezurrean kartilago kolumnarra identifikatuko dugu. Hezur bihurtzen hasi den kartilagoaren eta kartilagoaren arteko mugan kokatuko dira kondrozito hipertrofiatuak, kartilago hipertrofiatua eratuz. Mugaz bestaldean odol hodiak ikusiko ditugu, baita osteoklastoak, osteoblastoak eta eritrozitoak.

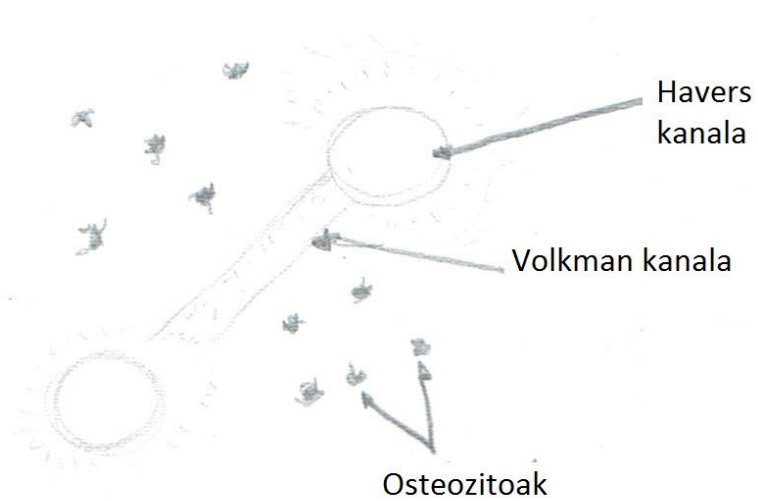
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina



○ HEZUR KONPAKTUA

Osteona izeneko egitura errepikatzen da hezurrean: erdialdean Havers kanala, horren inguruan osteozitoak geruza kontzentrikoetan antolatuta, Havers kanalak Volkman kanalen bitartez konektaturik daude.

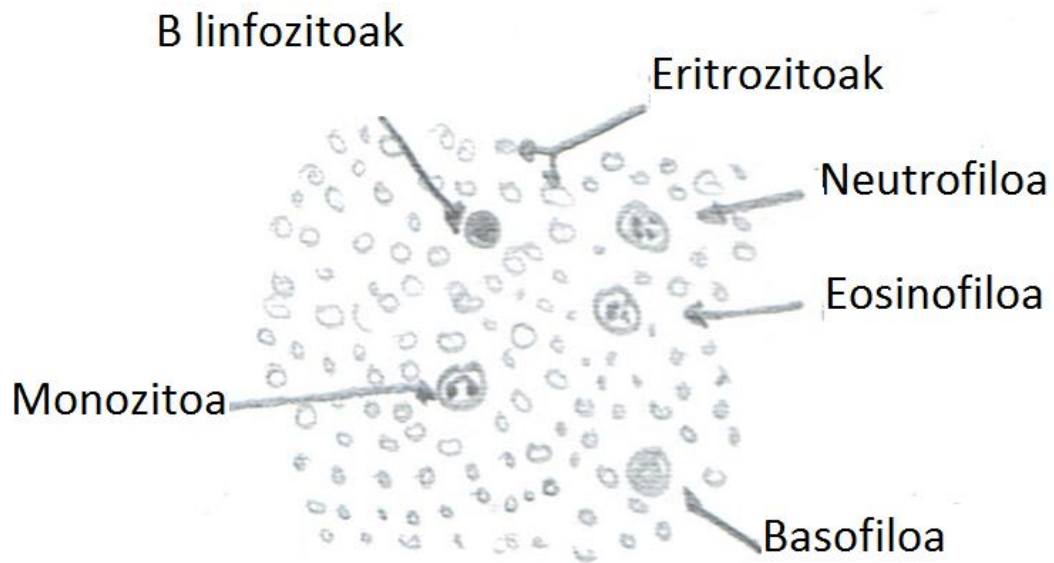
Tindaketa: Zilar inpregnazioa



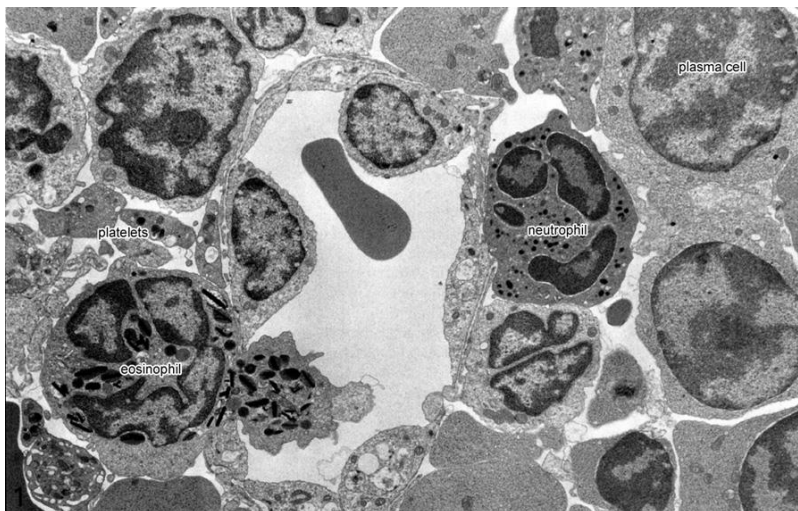
○ ODOLA

Nagusiki globulo gorriak, kontzentrazio askoz baxuagoetan globulo zuriak.

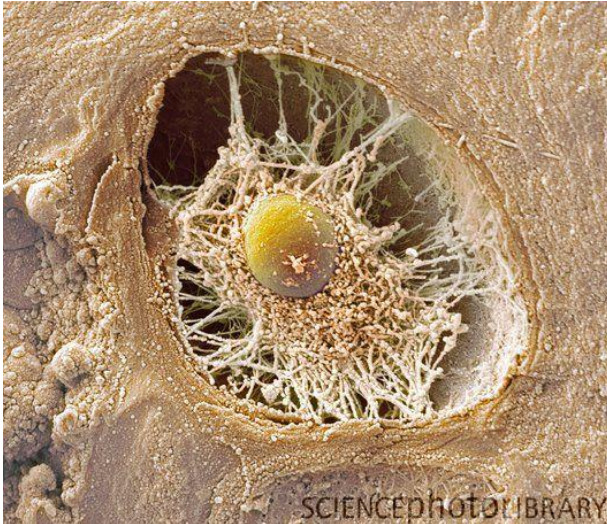
Tindaketa: Giemsa.



○ MIKROSKOPIO ELEKTRONIKOZKO ARGAZKIAK



10.Irudia: Odoleko zelulak transmisiozko mikroskopio elektronikoak. Bertan, zelula plasmaticoak, eosinofiloak, plaketak eta neutrofiloak bereizi ditzakegu.



11.Irudia: Ekorketako mikroskopio elektronikoan ateratako oso argazki berezia, non osteoklasto bat hezur matrizea liseritzen ari den.



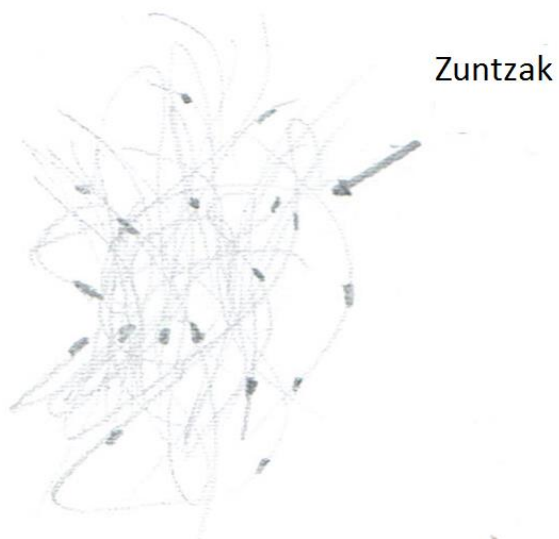
12.Irudia: Kartilago hialinoaren argazkia ekorketa mikroskopio elektronikoan.

7.PRAKTIKA: MUSKULU ETA NERBIO EHUNAK

○ MUSKULU LEUNA

Zelula luzeak, nukleoa erdian

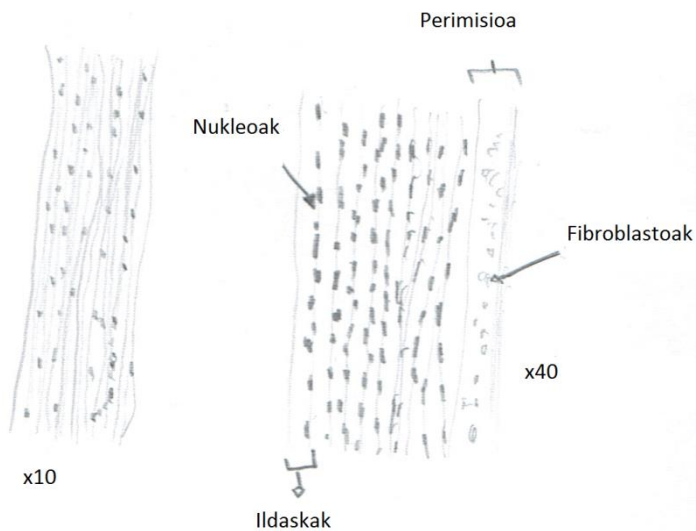
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina



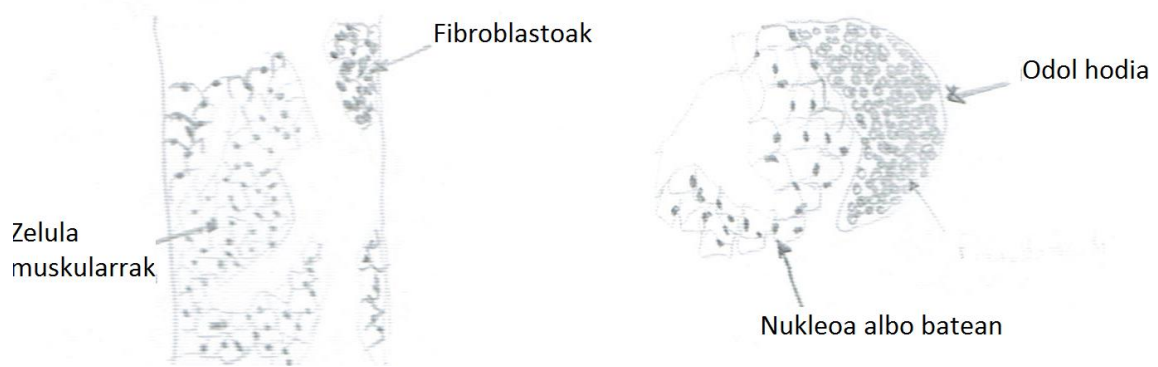
○ MUSKULU ILTASATUA

Bi ebaketa ezberdin

- Luzetarakoa: Ildaskak identifika ditzakegu. Epimizioa ildasken inguruan, geruza argiagoak (fibroblastoak). Epimizioaren kanpoaldean endomizioa odol hodiren batekin



- Zeharkakoa: Laukitxoak ikusiko ditugu, non zelulak ertzean ikusiko diren, barneko guztia aktina eta miosinaz osatuta dagoelako.

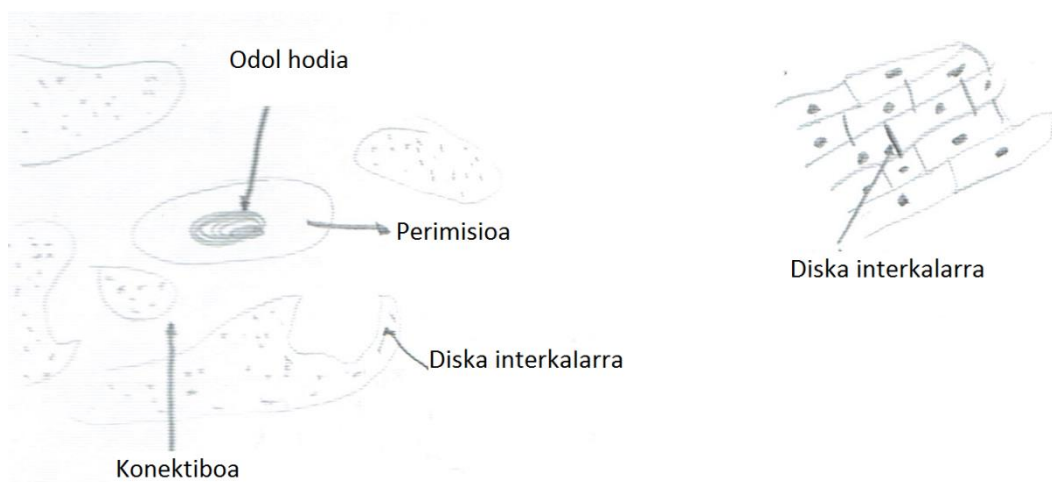


Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina (arraroa da ebakia lodiegia delako)

○ MUSKULU KARDIAKOA

Nukleo bakarreko zelulak normalean, batzuetan bi. Diska interkalarrak zelulen artean, lotura berezia. Hau ere ildaskatua da baina ez dira horrenbeste bereiziko. Fixapen akatsen ondorioz gune zuriak ikusiko dira.

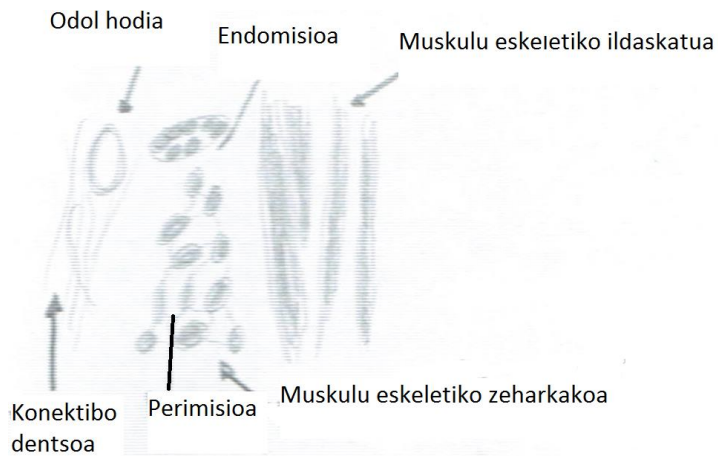
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina



○ MINGAINA

Ildaskatu eskeletikoa da. Muskuluan hainbat zentzutan antolatuta egoteak mingainari hainbat zentzutan mugitzea ahalbidetuko dio.

Tindaketa: Trikromikoa



○ HESTEA

Nukleo handi batzuk ikusiko ditugu bi geruza muskularren artean (bat luzetarakoa eta bestea zeharkakoa).

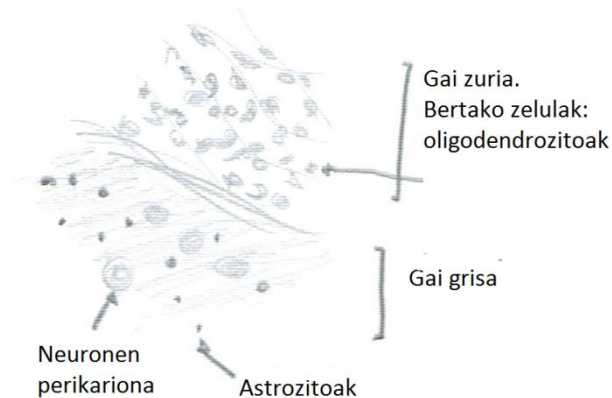
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina



○ HEZUR MUINA

Substantzia zuria eta grisa bereiziko ditugu. Grisean neurona handiak (perikariona alde honetan), astrozitoak (glia zelulak, tamaina txikia). Gai zuriko zelulak oligodendrozitoak izango dira.

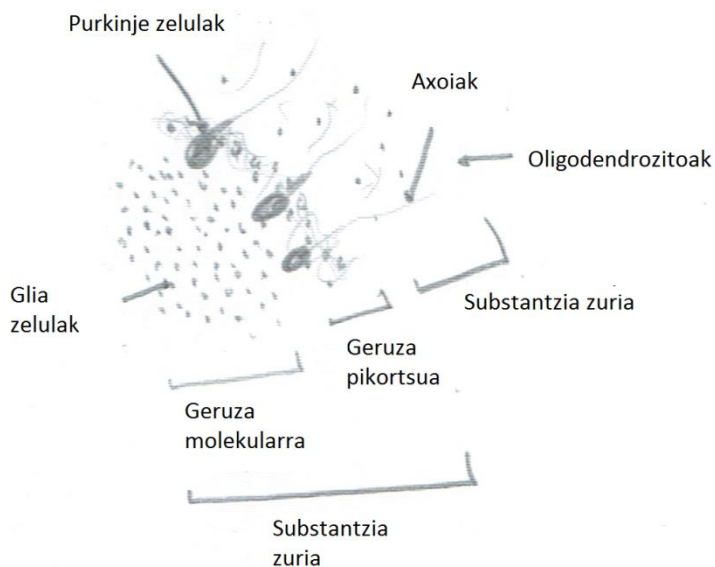
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina



○ ZEREBELOA

Hiru geruza ezberdin: pikortsua, molekularra eta substantzia zuria. Geruza pikortsua eta molekularra substantzia grisaren parte izango dira, eta beraien artean Purkinje zelulak kokatuko dira.

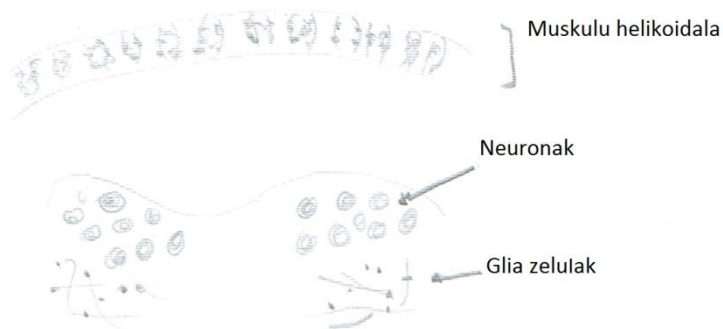
Tindaketa: Zilar inpregnazioa



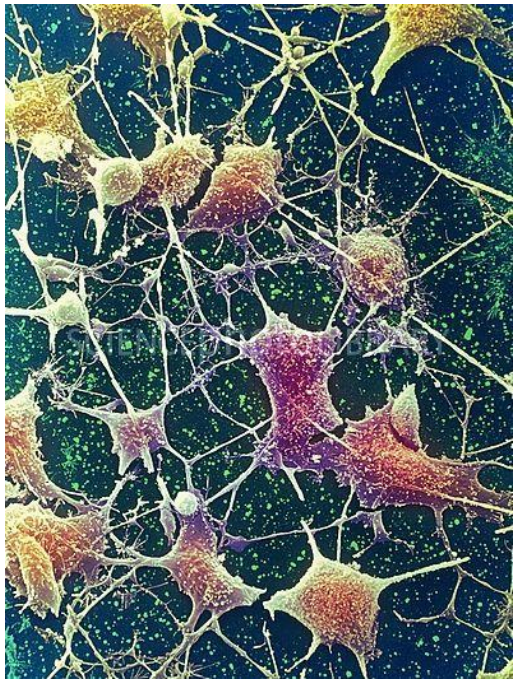
○ ZIZARE BATEN BURMUINA

Muskulu helikoidala bereiztu daiteke. Horrez gain, burmuinean ezingo dugu substantzia zuria eta grisa bereiztu. Zelula laguntzaileak eta neuronak baino ez dira egongo.

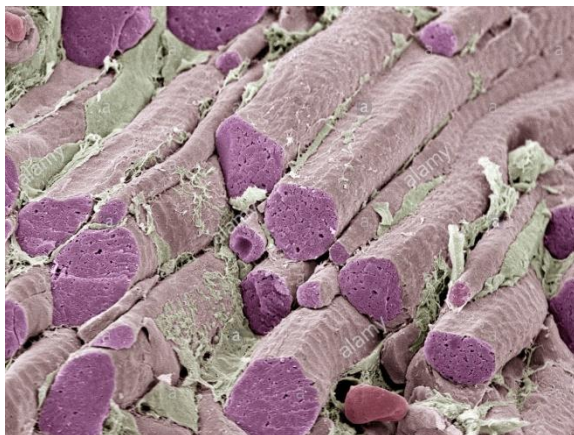
Tindaketa: Hematoxilina/ Eosina



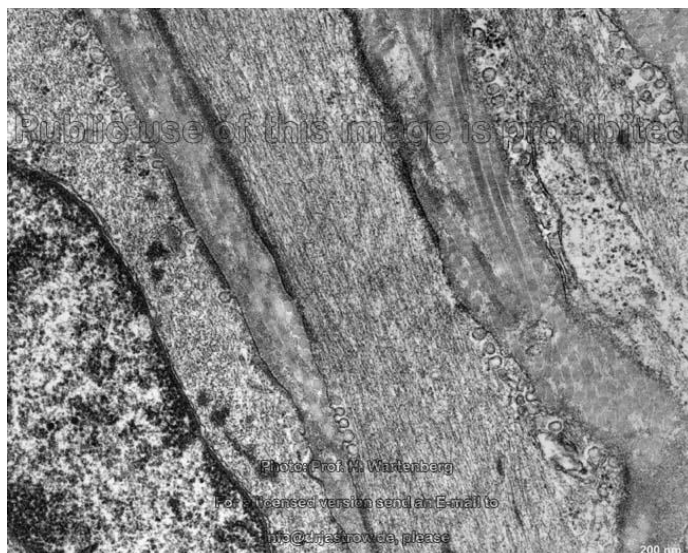
○ MIKROSKOPIO ELEKTRONIKOZKO ARGAZKIAK



13.Irudia: Neuronak ekorketa mikroskopiozko argazkian.



14.Irudia: Muskulu ildaskatu eskeletikoaren argazkia ekorketa mikroskopio elektronikoan. Zuntzen antolaketaz jabetzeko argazki oso aproposa.



15.Irudia: Aktinazko piruak transmisiozko mikroskopia elektronikoan

8.PRAKTIKA: ZELULEN HAZKUNTZAK: PROLIFERAZIO ZELULARRAREN ZINETIKA- SAIOAK

Proliferaio zelularra estimatzeko kontaketa zelularrak burutu genituen 3 egunetan zehar.

○ 1. EGUNA:

Zelula hazkuntzan zelulak behatu ondoren, EDTA eta tripsina gehitu genizkien transmintz proteinak apurtu eta atxikidura zelularra ekiditeko. Jarraian, 37°C-tan inkubatu genituen 5 minutuz zelulak askatu zitezen hazkuntza- ontzitik. Zelulak askatu zirela frogatu ondoren, kultibo medioa gehitu eta zentrifugatu egin genituen. Azkenik, berreseki eta kontaketarako prestatu genituen: 50 µl zelula eta 50 µl Tripan urdin nahastuz. Tripana hildako zelulen barrura sartuko da urdinez tindatuz hauek, bizirik dauden zelulak zuriak izango dira.

Kontaketa ganbaran 159 zelula behatu ziren 8 laukitxotan. 0.1 µl-ko bolumenean dauden zelulak kontatu zirenez, x10.000 egin behar izan genuen eta ondoren diluzio faktorearekin biderkatu genuen:

$$\frac{159}{8} \times 10.000 \times 2 = 422.500 \text{ zel/ml}$$

Ondoren, zelulen kontzentrazioa ezaguna izanik, hauek putzu ezberdinetan banatu ziren, bakoitzean zelula kopuru ezberdina gehituz: 1.putzuan 10.000 zelula, 2.putzuan 20.000, 3.putzuan 40.000 eta 4.putzuan 50.000.

○ 2. EGUNA:

Aurreko egunean prestatutako 4 putzuetako zelula kopurua neurtu genuen: 1.putzuan 7.500, 2.putzuan 25.000, 3.putzuan 47.000 eta 4.putzuan 40.000.

Bideragarritasuna %100-ekoa izan zen kasu guztietan, hots, ez genuen hildako zelularik aurkitu kontaketa ganbaretan.

Bideragarritasunaren ekuazioa: $Bideragarritasuna (\%) = \frac{\text{zelula bizirik}}{\text{zelula guztira}} \times 100 =$

○ 3. EGUNA:

4 putzuetako zelula kopurua neurtu genuen: 1.putzuan 12.500, 2.putzuan 25.000, 3.putzuan 50.000 eta 4.putzuan 40.000.

Bideragarritasuna %100-ekoa

○ BIKOIZKETA DENBORA

Bikoizketa denbora: $\frac{\text{denbora tarte} \times \ln 2}{\ln\left(\frac{\text{bukaerako zel.kopurua}}{\text{hasierako zel.kopurua}}\right)}$

• Asteazkenetik ostiralera:

1.putzuan zelula kopurua murriztu zen asteazkenetik ostegunera, baliteke kontaketa akats bat egon izana, baina ostiralean asteazkenean baino zelula kopuru handiagoa behatu genuen.

$$\frac{48 \text{ ordu} \times \ln 2}{\ln\left(\frac{12500}{10000}\right)} = 149.1 \text{ ordu}$$

$$2.\text{putzuan: } \frac{48 \text{ ordu} \times \ln 2}{\ln\left(\frac{25000}{20000}\right)} = 149.1 \text{ ordu}$$

$$3.\text{putzuan: } \frac{48 \text{ ordu} \times \ln 2}{\ln\left(\frac{50000}{40000}\right)} = 149.1 \text{ ordu}$$

4.putzuan: zelula kopurua murriztu egin da, beraz, ezin dezakegu bikoizketa denbora kalkulatu.

Oso kuriooa da nola 2 eguneko epean putzu guztietako bikoizketa denboraren kalkuluak berdin berdina eman digun kasu guztietan. Itxuraz nahiko bikoizketa denbora luzea dirudi, 2 egun eta erdikoa. Baliteke akatsen bat egon izana prozeduran zehar. Bestela, ikerketarako eta industriarako zelula nahiko desegokiak direla esan dezakegu.

BIBLIOGRAFIA

- 1. Irudia: <http://www.gettyimages.es/detail/foto/of-the-brush-border-of-intestinal-epithelial-cells-fotograf%C3%ADa-de-stock/128631728>
- 2. Irudia: http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/sbpm_histology_old/lab/micro_popup07.html
- 3. Irudia: <https://es.pinterest.com/pin/387942955382287213/>
- 4. Irudia: http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/histolog/classes_stud/en/med/lik/ptn/1/05%20Epithelial%20tissues.%20Glandular%20epithelium.%20Glands..htm
- 5. Irudia: http://book.myhistology.com/basic-histo/4.%20Epithelial%20Tissue_files.html

- 6. Irudia: <http://www.masterfile.com/search/en/scanning+electron+microscope+images>
- 7. Irudia: http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/histolog.../classes_stud/en/med/lik/ptn/1/07%20Connective%20tissues.%20Loose%20connective%20tissue.%20Dense%20connective%20tissue.%20Connective%20tissues%20with%20special%20properties..htm
- 8. Irudia: http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/sbpm_histology_old/lab/lab05_micrograph.html
- 9. Irudia: <https://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMColonE.html>
- 10. Irudia: <http://histology.medicine.umich.edu/resources/lymphatic-system>
- 11. Irudia: <https://es.pinterest.com/pin/220957925438912559/>
- 12. Irudia: <http://images.fineartamerica.com/images-medium-large/5-hyaline-cartilage-sem-steve-gschmeissner.jpg>
- 13. Irudia: <https://es.pinterest.com/explore/micrograf%C3%ADa-electr%C3%B3nica-de-barrido/>
- 14. Irudia: <http://www.alamy.com/stock-photo-skeletal-muscle-fibres-coloured-scanning-electron-micrograph-sem-endomysial-21201597.html>
- 15. Irudia: <https://www.unimainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAktinE.html>