

Minta előkészítés fény- és elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatokhoz

Az élő sejtek és szövetek közvetlen, ún. vitális mikroszkópi vizsgálatára csak korlátozott lehetőségünk van. Előkészítő eljárás nélkül csak az önmagukban is jól átvilágítható tárgyak tanulmányozhatók (pl. egysejtű élőlények, testfolyadék-, vér-, nyirok- és likvorsejtek, egyes növényi és állati szaporítósejtek, bizonyos szövettenyészeti egysejtrétegek, algák, növényi epidermisz-nyúzat sejtjei stb.). Ez esetekben is elsősorban különleges mikroszkópi eljárásokkal (pl. fáziskontraszt-, interferencia mikroszkópia) nyerhetünk csak kielégítő információkat a sejtek struktúrájáról és működéséről. Gyakran alkalmazott módszer a sejtek **vitális festése**. Ez esetben élő sejtek által felvehető színes, vagy ultraibolya fényben fluoreszkáló anyagokat (pl. neutrál vörös, tripánkék, akridin-oranzs stb.) alkalmazunk a sejtek egyes részleteinek láthatóvá tételére. Közismert példa erre a papucsállatkák fagocitotikus anyagfelvételének, és a felvett táplálék sorsának kongóvörös indikátor szemcsék segítségével történő követése.

Az esetek többségében azonban a vitális vizsgálatok nem szolgáltatnak elegendő információt, és ezért a mikromorfológiai vizsgálatokat több lépésből álló előkészítő munka előzi meg, mely kettős célt szolgál.

1.) Kellő vékonyságú, az alkalmazott fény-, illetve elektronsugárással **jól átvilágítható** készítményeket kell előállítani. Ezek lehetnek fénymikroszkópos (ún. szövettani) és elektronmikroszkópos (ultravékony) **metszetek**, különböző **kenetek** (pl. vérkenet, csontvelőpontátum stb.) és **replikák** (felületi minták).

2.) Az egyes szövet-, illetve sejt-komponensek eredetileg csekély **fénytörés- vagy elektronszórásbeli különbségeit meg kell növelni** a preparátumban, hogy az egyes alkotórészek jól felismerhetők, egymástól elkülöníthetők legyenek. Ez a cél a fénymikroszkópiában különböző színű **festékekkel**, az elektronmikroszkópiában pedig **nehézfém-tartalmú vegyületekkel** történő festéssel érhető el. A **fénymikroszkópos festés elvi alapja** az, hogy a különböző színű vegyületek meghatározott sejt-, illetve szövetkomponensekhez kötődnek, mégpedig az esetek egy részében specifikusan.

Az **elektronmikroszkópos festés** pedig azon alapul, hogy az egyes organellumok, illetve részeik különböző mértékben kötik (adszorbeálják, sókötést képeznek vagy redukálják) a nehézfémionokat, ami viszont elektronszórásbeli különbségek formájában jelentkezik. Az elektronsugárással átvilágított metszetnek a szcintillációs ernyőre vetített képén ezért az elektronáteresztő anyagot tartalmazó struktúrák helye fényleni fog (a róla készült fényképen világos vagy fehér lesz), míg az elektronszóró struktúráknak megfelelő helyeken nem lesz felvillanás, az ernyő sötét marad (a fényképen sötét vagy fekete lesz).

Vagyis az elektronmikroszkópi képen a nehézfémek eloszlása adja az egyes struktúrák képe közötti **kontrasztot**. Ezért az elektronmikroszkópiában használatos “festékanyagokat” kontrasztosító anyagoknak, magát az eljárást pedig **kontrasz-tosításnak** nevezzük.

Az előkészítő eljárások elméleti és gyakorlati tudománya a mikrotechnika.

A **mikrotechnika tárgykörébe** tartoznak mindazon módszerek, melyek segítségével a biológiai anyag mikroszkópi megfigyelésre alkalmassá tehető, mégpedig bármikor azonos eredménnyel megismételhető (reprodukálható) módon.

A mikrotechnikai feldolgozás legfőbb **célja** az, hogy mikroszkópi megfigyelésre alkalmas preparátumok előállítása közben az élő anyag strukturális (és igen gyakran bizonyos funkcionális) sajátosságait úgy őrizzük meg, hogy az a lehető legkevésbé térjen el az élő állapottól. Vagyis az előkészítés okozta torzulásokat a lehető legalacsonyabb szinten kell tartanunk, hogy ezáltal a **műtermék** (artefactum) képződését elkerüljük. Minél jobb optikai

felbontóképességű vizsgálómódszer számára készítjük elő a biológiai anyagot, annál nagyobb figyelmet kell fordítanunk erre a követelményre.

A mikrotechnika eredetileg csak szövettani eljárásokat jelentett. Ma már azonban külön ágazatai alakultak ki. Közöttük legjelentősebbek a hisztó- és citokémia, ezen belül az enzim- és immunhisztokémia, valamint az ultramikrotechnika és ennek speciális ágai, mint pl a fagyasztva töréses- és maratásos replikáció eljárásai. A klasszikus szövettani technikában a morfológiai szemléletmód uralkodott, vagyis a szerkezet bármilyen áron történő megőrzése, gyakran a funkció terhére is. A mikrotechnika korszerűbb ágazatai ezzel szemben morfofiziológiai irányzatúak. Ez azt jelenti, hogy a sejtek, szövetek felépítése mellett, egyidejűleg a bennük végbemenő folyamatok vizsgálatára is törekedtek, mégpedig struktúrához kötötten, legalább fénymikroszkópos szinten, de egyre növekvő mértékben ultrastrukturálisan is. Ennélfogva lehetőség nyílik a leíró fény- és elektronmikroszkópos anatómia, az élettan, biokémia és a molekuláris biológia eredményeinek összehangolására. A morfológia ma már a felvetődött biológiai, rendszerint működési probléma megoldásának egyik eszköze és nem korlátozódik a pusztá leírásra.

A mikrotechnika jelentőségét nem nehéz belátni. Az előzetes preparáló munka a mikroszkópi megfigyelések döntő tényezője, mivel megszabja a mikroszkópi vizsgálatok eredményességét, vagyis azt, hogy a metszetek, illetve preparátumok milyen mértékben informálnak a sejtek, szövetek eredeti morfológiai, kémiai és élettani állapotáról. Éppen ezért a vitális megfigyelések jelentősége, ott, ahol lehetségesek, összehasonlító szempontból nem lebecsülendő. Megfelelő körülmények között értékes kontroljai lehetnek a mikrotechnikai úton előállított preparátumoknak.

A biológiai anyag előkészítésének általános menete

A mikrotechnika alapvető követelményeiből következik, hogy mind a szövettani, mind pedig az ultravékony **metszetek** előállításának általános menete elvileg azonos az állati és növényi objektumok esetében egyaránt. A végső cél: olyan jól metszhető minta (ún. blokk) nyérése, amelyben a biológiai anyag a lehető legkevesebb torzulást mutatja az élőhöz képest.

Az előkészítés főbb lépései a következők:

- 1.) **Anyagpreparálás és rögzítés** (fixálás): az élő anyag strukturális és kémiai stabilizálása.
- 2.) **Kimosás**: a rögzítőszer eltávolítása vízzel, vagy egyéb oldószerrrel.
- 3.) **Víztelenítés** (dehidráció): a szövet víztartalmának vízelvonószerekkel történő kivonása és azokkal való helyettesítése abból a célból, hogy a biológiai anyag a nem vízdékony, többnyire nagy viszkozitású beágyazóanyagokkal, illetve azok szerves oldószereivel (=intermedier anyagok) átítható legyen.
- 4.) **Beágyazás**: a vizsgálandó anyag folyékony beágyazószerekkel történő átíratása és a beágyazásra használt közeg kikeményítése. A kikeményített, beágyazószerrrel átíratott és körülvevő anyagot nevezik blokknak. A blokk mechanikai tulajdonságai olyanok már, hogy belőle megfelelő vékonyságú metszetek nyerhetők.
- 5.) **Metszetkészítés**: a blokk felszeletelése a vizsgálat céljából és az alkalmazott mikroszkóp fajtájától függően a kívánt vastagságban.
- 6.) **A metszetek festése**: a szövetelemek fény-, illetve elektronszórásbeli különbségeinek növelése.

A fenti procedura az első lépéstől az utolsóig kompromisszumok sorozata, mivel a vizsgálandó anyag mindvégig olyan reagensekkel kerül közvetlen kontaktusba, melyek nem közömbösek számára. Tökéletes, minden kívánalomnak megfelelő rögzítő-, beágyazó-, és víztelenítő anyagok nincsenek, ezért a végső cél érdekében az adott reagens néhány hátrányos tulajdonságával mindig meg kell alkudnunk. Ezért a sikeres eredmény elérése érdekében fontos a nagyszámú tapasztalati (irodalmi) adat figyelembe vétele.

Az anyagpreparálás és rögzítés

Az anyagpreparálás

A rögzítés a biológiai anyag makromolekuláinak és néhány egyéb kémiai komponensének azonnali stabilizálását (inszolubilizálását) jelenti, azok előfordulási és/vagy működési helyén. A fehérjék rögzítését tekintve az a cél, hogy az élő struktúrában elfoglalt helyükön gyors eljárással gelifikáljuk őket, hogy megakadályozzuk az élő struktúra átrendeződését. Ezért például a növényi anyagot lehetőleg a begyűjtéssel egyidejűleg kell a rögzítőbe helyezni, az állatokból és az emberből nyert anyagot is azonnal rögzíteni kell, hogy a sejt reakcióit, majd a sejthalál után bekövetkező önmészési és bomlási folyamatokat megakadályozzuk.

Igen fontos a rögzítendő anyag helyes és gyors kipreparálása, helyes méreteinek megválasztása, hogy megfeleljen a későbbi eljárásoknak, a vizsgálat céljainak. Vágásra mindig éles eszközt kell használni, a csipesszel megfogott és ezért roncsolt részeket pedig ne vigyük a rögzítő folyadékba. A növényi anyagokat hűtött tárgylemezen preparáljuk, majd fixáljuk.

A rögzítés

A különböző sejt- és szövetkomponensek eltérő módon viselkednek az egyes rögzítőszerrel szemben, vagyis minden célra, minden szövetfélésegre, minden sejt típusra alkalmas univerzális rögzítőszer nincs! Az egyes festési eljárások is többnyire csak egy adott fixálószer alkalmazása után végezhető el sikeresen.

Ezért a fixálószer megválasztásakor figyelembe kell venni a vizsgált célt és a vizsgálat tárgyának minőségét. Jó iránymutatásul szolgálnak erre a különböző mikrotechnikai kézikönyvek, melyekben a fenti kívánalmaknak megfelelő csoportosításban találhatóak a különböző rögzítőszerrel, számos empirikusan nyert adat alapján.

Mivel a rögzítés utáni struktúrának a lehető leghűbben kell tükröznie az élő struktúráját, nem megfelelő az olyan rögzítőszer, mely az alkalmazott vizsgálati módszerrel észlelhető méret- vagy alakváltozást okoz a vizsgált objektumban: zsugorítja vagy duzzasztja a sejtet vagy az organellumokat, felszakítja a membránokat stb.

Fontos követelmény a rögzítőszerrel szemben az is, hogy ne okozza vagy ne tegye lehetővé az organellumok vagy a sejt megőrzendő anyagainak kioldódását, valamint azt is, hogy a rögzített anyag ne váljék túl keménnyé: metszhető maradjon. Mivel kisebb változásokat, sőt esetleg műtermékeket bármely rögzítő okozhat, ajánlatos többféle rögzítő kipróbálása egy-egy vitatott morfológiai eredmény igazolására.

Ha például egy adott struktúra elektronmikroszkóppal megfigyelhető képe több fixáló alkalmazása után is egyezik, akkor igen valószínű, hogy a kapott kép a natív struktúrát tükrözi. Ehhez aztán már újfajta rögzítő hatását is viszonyítani lehet.

Az ideális fixálószer pH, ozmolaritás és ionösszetétel szempontjából, a lehető legélethűbb rögzítés érdekében, pontosan egyezik az élő szövet vagy sejt természetes külső környezetével (az extracelluláris tér testfolyadékával, illetve a vérplazmával). Egysejtűek vagy szövettenyészetből származó sejtek rögzítésekor viszonylag könnyen biztosítható a természetes külső környezet, ha a fixáló ágenst a tenyészet közegében oldjuk, vagy ha a tenyészet cseppjét a rögzítőszer gőzeiben stabilizáljuk. Ha a megfelelő pH-, ozmolaritás- és koncentráció-viszonyokat nem tartjuk be, fixálás alatt lényeges elváltozások jönnek létre. Ezek rendszerint morfológiai jellegűek, mint pl. a hiper-ozmózis hatására bekövetkező zsugorodás. De lehetnek funkcionálisak is, mint pl. a szekréciónak a tartalmának exocitotikus kiürülése, enzimdiffúzió vagy enzimaktivitás csökkenés, továbbá a miofibrillumok kontrakciója afiziológias mennyiségű Ca^{++} ion jelenlétében stb. Általában elmondható, hogy a céltól is függően a rögzítő kationkoncentrációja lényeges lehet (főként a K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++}). Például a membránkötött lipidek stabilizálására kétértékű kationokat (1–2mM/l $CaCl_2$) használnak, a formaldehid alapú fixálóknál. A Ca ionok jól stabilizálják a

membránokat, foszfolipideket, magorsófonalakat. Direkt összefüggés mutatható ki a rögzítés közbeni lipidreakció mértéke és rögzítő Ca-ion tartalma között.

Az igen alacsony, illetve magas ionerősségű közegben élő egy- vagy többsejtű szervezetek, különböző szövetek, teljes szervek megfelelő rögzítése csak úgy lehetséges, ha a fixálószer pH-, ozmotikus- és ionösszetételbeli viszonyait az extracelluláris uralkodó viszonyokhoz igazítjuk. Erre szolgálnak az ún. hordozóoldatok (vehiculumok), melyekben a rögzítőszeret oldjuk. Ezek a fénymikroszkópiában rendszerint nem döntő tényezői a jó rögzítésnek. Az enzimhisztó- és -citokémiai és az elektronmikroszkópos technikában viszont elengedhetetlenül fontosak. A hordozóoldatok anyagai különböző pufferkomponensek, néha NaCl és ozmotikusan aktív anyagok (pl. szukróz). Ezek menyiségi és minőségi megválasztása tapasztalati adatokon alapul, aminek egyik legfőbb oka, hogy a rögzítő anyag elméletileg meg nem jósolható hatással lehet az adott membrán permeabilitására. Ennek okát abban kell keresni, hogy az élő és a rögzítőbe vitt sejtek membránjainak permeabilitása eltér egymástól.

A helyes fixálás szempontjából a rögzítőfolyadék ún. effektív ozmózis nyomása számít, melynek értéke nem azonos a fixáló folyadék teljes, elméleti ozmózis nyomásával. A fagyáspontcsökkenés alapján mért teljes ozmolaritás ugyanis a csakis vizet átengedő félígáteresztő hártýára vonatkozó érték, vagyis értéke a hordozóoldat és rögzítőanyag együttesen vett Raoult koncentrációjából (molalitás) adódik. Mivel a rögzítőkeverék egyes komponensei, elsősorban maga a rögzítőágens rögzítés közben átjutnak a membránokon, az átjutó komponensek saját tényleges ozmotikus nyomása az időben változik, és mindenképpen csak egy tört része a koncentrációja alapján számított vagy mért ozmózis nyomásnak. A rögzítőkeverék tényleges ozmolaritását a membránokon át nem jutó anyagokkal állítjuk be a kívánt mértékre.

A melegvérű gerinces állatok vérplazmájának ozmózis nyomása pl. 300–400 mOsmol. Az ezzel közel azonos nyomásértékű 3%-os glutáraldehid tehát vérsejtekre nézve elvileg izoozmózisnak lenne tekinthető, a gyakorlatban azonban önmagában hipoozmotikus, vagyis duzzaszt. Hordozóoldat alkalmazásával izoozmotikussá téve azonban egymástól eltérő koncentrációjú glutáraldehid koncentrációkkal (pl. 2.5–6.5%) is egyformán jó eredmény érhető el.

Nem lehet teljesen eltekinteni a rögzítőanyag saját tényleges ozmotikus aktivitásától sem, amit minden ozmotikusan aktív rögzítőszerrel bizonyos arányban az effektív ozmózis nyomásba be kell számítani (pl. glutáraldehid esetében az ozmotikus koncentráció 1/4-ét). Felmerül a kérdés: fontos-e az ozmotikus koncentráció olyan fixálóokban, melyek rögzítőanyaga megszünteti a plazmamembrán félígáteresztő tulajdonságát? Ha a sejt hártýa ozmotikusan inaktív válik, akkor a sejten belüli kolloid ozmózis nyomás csökken az eredeti értékhez képest, és látszólag feleslegesek a ozmotikumok. Azonban minden esetben több kevesebb idő telik el a fixáló ágens sejtekbe, majd az organellumokba történő behatolásig (pl. OsO₄ esetében 2–10 perc) így a gyakorlatban az ilyen rögzítő ozmolaritását is be kell állítani a megfelelő értékre.

A fixálószer pH-ja 6.5 és 8.0 között változhat. A gyakorlatban rendszerint enyhén lúgos pH-jú (7.2–7.4) fixálókat használnak. Ilyen hidrogénion koncentráció biztosítja ugyanis a makromolekulák, elsősorban a fehérjék legnagyobb hatásfokú megőrzését. Speciális esetekben, pl. egy adott fehérje eredményes rögzítésére indokolt lehet a kifejezetten lúgos vagy savas közeg használata, amikor is a fixáló pH-jának (megközelítőleg) egybe kell esnie a kérdéses fehérje izo-elektromos pontjával. Például a magfehérjék és az osztódási orsó mikrotubulusainak rögzítésére gyengén savas (pH=6) foszfát-pufferben oldott OsO₄ használatos.

A fixálófolyadék pH-jának stabilizálásához (valamint az izoozmózis beállításához) stb. elvileg bármely pufferrendszer használható, a gyakorlatban azonban leginkább a foszfát- és a kakodilát-pufferek terjedtek el. Mindkettő kevésbé labilizálja a membránokat.

A rögzítés ideje esetenként más és más. Az időoptimum szintén empiriával határozható meg. Függ a szervdarabka nagyságától, minőségétől, a rögzítőszer diffúziós tulajdonságaitól és a hőmérséklettől. Kisebb szövetdarabok fixálása, jól penetráló rögzítőszerrel rövidebb ideig tarthat és fordítva. Igen fontos, hogy betartsuk az adott anyag és rögzítőszer együttesére nézve optimális rögzítési időt. Az optimálisnál rövidebb idejű fixálás után a későbbi lépésekben műtermékek keletkezhetnek, míg annál hosszabb idejű rögzítés az anyag túlkeményedését okozza.

A fixálás hőmérséklete az általános szövettani gyakorlatban rendszerint "szobahő". Sok esetben azonban, főleg az elektronmikroszkópos citokémiai eljárásoknál hidegen (0C° és 4C° között) rögzítünk. Erre a fehérjék oldékonyságának minimumon tartása: a diffúziós jelenségek csökkentése céljából van szükség.

A rögzítés módja alapvetően kétféle lehet: immerziós és perfúziós. Az immerziós eljárás azt jelenti, hogy a szövetdarabkát a fixáló folyadék fölöslegben lévő mennyiségébe merítjük. A perfúziós rögzítésen azt értjük, hogy a fixálószeret átáramoltatjuk a kérdéses szervben, annak érrendszerébe iktatott kanül segítségével. Ezt célszerűen működő vérkeringésű, narkotizált élő állaton végzik el.

A kétféle eljárás külön-külön is alkalmazható, egymásutáni használatuk eredményesebb (perfúzió után immerzió). Üreges szervek immerziós fixálása előtt célszerű a rögzítőoldatot előzetesen a szerv üregébe fecskendezni.

A kétfajta eljárás közül a perfúziós fixálás tekinthető tökéletesebbnek: a perfundált szerv az erek felől belül is jól fixálódik. A kizárólag immerziósan rögzített (bármely kicsiny) biológiai anyagnak csak a felszíni sejtsorai fixálódnak jól, vagy jobban a beljebb esőkkel szemben. A fixálószeresek ugyanis nagyon sok esetben megváltoztatják egyrészt a membránok ozmotikus tulajdonságait, a rögzítőfolyadékkal legkorábban érintkező felszíni sejtsor áteresztőképességét, majd fokozatosan a mélyebben fekvőket is.

A fixálandó anyag egyes, a rögzítővel különböző időben érintkező részei a kromatográfias eljárásoknál használt adszorbensekhez hasonlóan viselkednek a rögzítőfolyadék különböző alkotóelemeivel szemben. Így a mélyen fekvő részek nem ugyanazzal az összetételű rögzítőfolyadékkal találkoznak először, mint a széli sejtek, és ezért másként fixálódnak. Fontos tehát, különösen a jó ultrastruktúra megőrzése érdekében, minél kisebb méretű mintát rögzíteni.

A rögzítőszeresek összetételük szerint lehetnek egyszerű fixálók és rögzítőkeverékek. Az egyszerű fixálók többnyire aldehidek, szerves savak vagy nehézfém-sók vizes oldatai. A rögzítőkeverékek lényegében az egyszerű fixálókból tevődnek össze olyan minőségben és mennyiségben olyan arányban, hogy hátrányos tulajdonságaikat kölcsönösen kiegyenlítsék.

Néhány gyakori egyszerű fixáló

Az ozmiumsav a kristályos, bomlékony ozmium-tetraoxidnak 1–2%-os vizes oldata. Gőzeit is alkalmazzák izolált sejtek, kenetek, hártypreparátumok rögzítésére. A legjobb, legrégebben használt fénymikroszkópos rögzítő, azonban relative nagy molekulamérete miatt a diffúziós képessége kicsi. Következésképpen a nagyobb szövetdarabok belsejében lényeges strukturális változások mennek végbe a teljes rögzítés előtt. Ezért csak igen kis méretű minták (0.5–2.0 mm élhosszúságúak) rögzítésére alkalmas. Az elektronmikroszkópi gyakorlatban általánosan használják, elsősorban az aldehidekben történő rögzítést követően, ún. utórögzítőszerként, illetve fixálókeverékekben. Az aldehides rögzítésre azért van szükség, mert az ozmiumsav bizonyos mértékű lipidoldó tulajdonságánál fogva megszünteti a membránok ozmotikus aktivitását. Ezt az aldehides rögzítés kivédi. Az ozmiumsav a telítetlen zsírsavláncokkal való addíciós reakciója, valamint a fehérjék –SH–, hidroxil– és egyéb oldalcsoportjaihoz történő kapcsolódása közben könnyen redukálódik. Az ennélfogva kiváló fém ozmium helyben marad és fény, illetve elektronmikroszkóposan is jól feltünteteti (kontrasztosítja) a lipoproteid membránok felszínét.

Az aldehidek vízaddicionáló tulajdonságuk révén stabilizálják a fehérjéket (ún. dehidratációs aggregáció), illetve közvetlenül reakcióba is lépnek velük.

A formaldehid (formalin, formol) a legolcsóbb, igen jó fixáló, diffúziós képessége legnagyobb az aldehidek között. A fehérjéket az aminocsoportjaikkal képezett Schiff-bázis-szerű termékei révén denaturálja. 4–10%-os vizes oldatát szokás használni, nemcsak önmagában, hanem számos rögzítőkeverékben is. A zsírsavakat, lipideket jól megőrzi, melyek dehidralás alatti vesztesége nagymértékben redukálható Ca^{++} ionok hozzáadásával. Kiterjedten alkalmazzák citokémiai reakciók előtt, neutralizált (pH=7.0) szacharózzal izoozmotikussá tett formában. Minthogy a közönséges formalin jelentős mennyiségű (11–16%) metanollal szennyezett, elektronmikroszkópos előfixálásra a kristályos formaldehidből nátrium-hidroxiddal dekondenzálható tiszta formáját használják.

A glutáraldehid a formaldehidhez hasonló tulajdonságú rögzítő. Mivel lassabban penetrál, hatására kisebb mértékben lépnek fel zsugorodási jelenségek, mint a formaldehid használatakor. Viszont gyorsabban reagál a fehérjékkel, és lévén dialdehid, keresztkötésekkel eredeti helyükön rögzíti azokat, mielőtt kioldódnának, vagy diffúziós jelenségek lépnének fel. Tehát térhálót létrehozva igen jól megőrzi az alapplazma szerkezetét, és a benne rögzített anyagok kimosóoldatban hosszú ideig (hetekig) eltarthatók bármiféle változás nélkül. Enzimcitokémiai célokra kiváló, mivel igen sok enzim aktivitását megőrzi.

Az uranil-acetát túltelített (kb. 2%-os) vizes oldatát gyakran használják az ozmiumsav utórögzítést követően ún. harmadik rögzítőszerként, főleg állati eredetű szövetek esetében. Elősegíti a mag anyagainak jó megtartását, és további stabilitást nyújt a foszfolipid tartalmú struktúráknak, elsősorban a membránoknak. Oxidáló struktúrákon fém uránná redukálódik, melynek a fém ozmiumhoz hasonlóan nagy az elektronszóró képessége, így azzal együtt mint előkontrasztosító anyag is jelentős az uranil-acetát.

A káliumpermanganát az aldehid alapú fixálók bevezetése előtt (1963) közkedvelt rögzítő volt a növényi ultramikrotechnikában, kiváló penetrációs készsége és membránstruktúrák kontrasztos megjelenése miatt. Utóbbi jelenség azonban a membránhoz kötött anyagok (fehérjék, nukleinsavak, lipidek stb.) fixálás és dehidralás alatti kioldódása terhére jön létre. Ezért ma már csak elvétve használatos.

Korábban egyszerű fixálóként használatosak voltak még: az etilalkohol, az acetone, az ecet–és triklórecetsav, a pikrinsav, a szublimát (HgCl_2), a káliumbikromát ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Ma már inkább fixálókeverékek komponensei.

Rögzítőkeverékek

A fénymikroszkópiában használt egyes rögzítőkeverékek összetételét és használatát a jegyzet “Függelék” c. részében ismertetjük.

Az elektronmikroszkópiában használatos rögzítőkeverékek közül a legelterjedtebb a glutáraldehid–paraformaldehid tartalmú Karnowsky-féle fixáló keverék. Jó eredménnyel alkalmazható nagyobb szervdarabkák előrögzítésére is. A formaldehid meggyorsítja a glutáraldehid penetrációját, így a mélyebben fekvő részek is viszonylag jól fixálódnak.

A glutáraldehid és ozmiumsav keveréke: elsősorban az ozmiumsav penetrációjának meggyorsítására használatos. A keverék nem stabil, mivel komponensei egymással is reagálnak, ezért használat előtt mindig frissen kell összeönteni (2.5% GA és 1% OsO_4 végkoncentráció), majd jégen kell tartani a fixálás alatt is. Kizárólag állati eredetű objektumok rögzítésére szolgál.

A kimosás

Célja a fixálófolyadék eltávolítása a már rögzített szervdarabból. Ez technikailag azt jelenti, hogy a rögzítőszeret kimosófolyadékkal cseréljük fel, ami történhet egyszerűen úgy, hogy a fixálószeret előbb leöntjük az üvegedényben maradó anyagról, precízebb munkánál (pl. elektronmikroszkópos gyakorlatban) pedig a visszamaradó cseppeket leszívással (Pasteur-

pipetta vagy vízlégszivattyú segítségével) távolítjuk el. A kimosásra használt folyadék a fénymikroszkópiában rendszerint csapvíz. Pufferelt, izoozmotikus fixálók után azonban a rögzítőszer nélküli hordozó oldatot kell tartalmaznia. Az ozmotikusan aktív anyagok kimosófolyadékba való bevitele viszont általában szükségtelen olyan fixálók után, melyek a plazmamembrán ozmotikus aktivitását megszüntetik. Előfordul az is, hogy a kimosófolyadék nem más, mint a soronkövetkező vízlevonószer, olyan esetekben, ha a rögzítőfolyadék maga is tartalmazza a kérdéses vízlevonó anyagot. Például a Carnoy-oldat (összetétele: 6:3:1=abs.etanol:kloroform:ecetsav) kimosása etanollal történik.

Víztelenítés (dehidráció)

Célja a víznek vagy kimosópuffernek a szövetekből való eltávolítása. Erre azért van szükség, mert a beágyazószer (kivéve egyes vízdékony műgyantákat) vízben nem oldódik. A dehidráció tehát olyan vízlevonószerekkel kell, hogy történjen, melyek jól keverednek a beágyazóközeggel is. Ezeket a reagenseket növekvő koncentrációjú oldataik sorozatában használjuk, a fokozatosság biztosítása érdekében.

A két legáltalánosabban használt víztelenítő anyag az etanol és az aceton, mind a fény-, mind az elektronmikroszkópos technikában. Az etanol kevésbé erélyes vízlevonó hatásánál fogva kiméletesebb eljárást, jobb megtartást eredményez, vagyis kevésbé zsugorít. A víz elvonásán kívül keményíti is az anyagot, amire a jó metszhetőség érdekében van szükség. A víztelenítésre használt ún. felszálló alkohol sor tagjai: az 50-, 70-, 80-, 96%-os és abszolút etanol. A tökéletesebb hatás érdekében az egyes fokozatokat mindig nagy feleslegben kell használni és célszerű több, legalább két váltásban cserélni őket. A víztelenítés időoptimuma tapasztalatilag állapítható meg és a biológiai anyag fajtájától függően más és más. Túl hosszú idő alatt az anyag túlkeményedik és metszésre alkalmatlanná válik, metszés közben töredezik. A dehidráció morfológiai, kémiai változásokat okoz a biológiai anyagban, melyekkel, mint elkerülhetetlen torzulásokkal, mindig számolni kell. E változások nagyrésztben lipidek kioldódásából származnak. Az etilalkohol (főként 70%-os koncentráció felett), az aceton, a propilénoxid kiváló lipidoldószer. Az anyag összlipidtartalmának 95%-át is kivonhatják a procedúra alatt. A lipidkimutatásokhoz ezért aldehid rögzítést követő fagyasztómikrotómiát, elektronmikroszkópos célra pedig vízdékony műgyantába történő beágyazást kell alkalmazni.

A fehérjék egy része szintén extrahálódhat. A lipidekkel ellentétben főleg az alacsonyabb koncentrációjú víztelenítőkre érzékenyek. 96%-os vagy abszolút etilalkoholban, illetve propilénoxidban gyakorlatilag nincs proteinvesztés, hiszen ezek maguk is fehérjekicsapó rögzítőszer.

A lipid és proteinreakció minden esetben a szövet, a sejtek és a szubcelluláris komponensek zsugorodását okozza. A víztelenítés alatti változások, hatékony fixálás után kismértékűek, tehát a dehidráció anyag megválasztása nem kritikus.

A beágyazás, blokk készítés

A dehidráció követően gyakran kell használni olyan szerves oldószereket, melyek alkalmasak a beágyazószernek a szövetmintába való bevitelére és azokkal való lehető legkövetesebb átítatására. Ezek a köztes szerepet betöltő ún. intermedierek. Elegyednek a beágyazásra használt anyagokkal és magukkal a vízlevonószerekkel is. Emellett nagymértékben illékonyak, elpárolgásuk után a tiszta oldószertmentes beágyazószer hagyják vissza a szövetben. Hátrányos tulajdonságaik, hogy gőzeik belélegezve mérgezőek, gyúlékonyak és robbanásveszélyesek. Kezelésük körültekintést igényel. Alkalmazásuk a fokozatosság elvén alapul, részben a nem kívánatos hatások (pl. zsugorodás) elkerülésére, részben pedig azért, hogy a nagyviszkozitású beágyazószerekkel (pl. műgyanták) lépésről-lépésre telíthető legyen a szövet. A vizsgálandó anyagot előbb a víztelenítő és intermedierek anyagok 1:1 arányú keverékével, majd az intermedierek anyag és a beágyazószer 2:1, 1:1, 1:2

arányú keverékével, végül pedig a tiszta intermédiummal itatjuk át. Intermedier anyagok a fénymikroszkópiában elsősorban a paraffin oldószerei: a benzol, metilbenzoát, kloroform, továbbá xilol, toluol, sztirol stb.

Az ultramikrotechnikában intermédiumként rendszerint propilénoxidot (1,2-epoxi-propán) használnak, bár a legtöbb műgyanta jól oldható a dehidráló reagensekben is. A propilénoxid azonban teljes víztelenítést eredményez, hiszen az epoxidja a minta maradék víztartalmát is addicionálja. Így a műgyanta elektronmikroszkópos dimenziókban is jól átítatja az anyagot.

Beágyazás alatt a víztelenített szövetdarabka olyan folyékony beágyazóanyaggal való átítatását értjük, amely kellő körülmények között megkeményedve, blokk formájában jól összetartja az objektumot és alkalmassá teszi kellő vékonyságú metszetek készítésére.

A beágyazás gyakorlati kivitelezése úgy történik, hogy a rögzített és/vagy víztelenített anyagot az intermédium és beágyazószer megfelelő arányú keverékéből kiemeljük (pl. csipesszel vagy bontótű segítségével) és azt tiszta beágyazóközegbe helyezzük, majd azt kikeményítjük.

Az ideális beágyazószerral szemben támasztott követelmények a következők:

- jól kell oldódnia az intermedier anyagban;
- megkeményedve, könnyen metszhető kell legyen a kívánt vastagság elérése céljából;
- kémiaiilag nem változtatja meg a szövetet (nem reagálhat vele, nem extrahálhatja az anyagait);
- a procedura alatti térfogatváltozásnak a lehető legkisebbnek kell lennie, hogy ne okozzon torzulást a biológiai anyagban;
- a beágyazott anyag hosszú ideig eltartható legyen benne, hogy bármikor újabb metszetek készülhessenek belőle.

A fénymikroszkópos beágyazás, beágyazóanyagok.

Legelterjedtebben a paraffint, másodsorban a celloidint (cellulóz-dinitrát) használják. A paraffin olcsó, közömbös, igen jó beágyazószer, önmagában rideg, törékeny. A könnyűpárlatoktól megtisztított paraffinba ezért 5%-nyi tisztított méhviaszt (cera alba) kell keverni, hogy jól metszhető legyen. Ezután 3–5 mm vastagságú metszetek is készíthetők belőle. A paraffinnal történt átítatást, magas olvadáspontja miatt (op=54–56 °C) termosztátban kell végezni. A magas hőfok viszont mindig több-kevesebb zsugorodást idéz elő az anyagban. Ezért a lazább szerkezetű szerveket előnyösebb celloidinbe ágyazni. A celloidinbe ágyazott anyagokból viszont csak viszonylag vastagabb metszetek készíthetők. Az eredeti paraffin-méhviasz keverék helyett ma már inkább szintetikus “viaszokat” használnak (pl. Paraplast).

A celloidin-paraffin, ún. kettősbeágyazás során mindkét beágyazószer előnyös tulajdonságai érvényre jutnak. Egymás után mindkét beágyazószerral átítatva az anyagot, a zsugorító hatás csökken és relatíve vékony metszetek készíthetők.

A víz, pontosabban a jég is lehet beágyazóközeg. A már fixált vagy rögzítetlen biológiai anyag jégbe ágyazott (fagyasztott) blokkjából készülnek az ún. fagyasztott metszetek a hagyományos dehidrálni és beágyazási procedura, és az általuk okozott elváltozások kiiktatásával. Fagyasztott metszetek szükségesek az enzimek, lipidek stb. kimutatásához, de olyan esetben is, ha strukturális és egyéb szempontból összehasonlítást kívánunk tenni a sejtek eredeti natív állapota és a rögzített, beágyazott anyag között. Ha a fagyasztott anyagból mélyhűtött térben (kriosztátban) készített metszet jégtartalmát szublimáltatjuk, fagyasztva-száritott metszetet kapunk. Ezt különösen a lipidek kimutatásában jelentős módszer.

A fénymikroszkópos beágyazás menete.

A víztelenítés után a minta etanol : intermedier 1:1 arányú keverékbe, majd a tiszta intermedierbe (pl. benzolba) kerül, ahonnan az intermedier és a paraffin 1:1 arányú keverékébe visszük át, rendszerint néhány órára. Ezután a paraffin arányát növeljük (pl. 1:2), majd egy éjszaka elteltével mintánkat olvadt (58 °C) paraffinba helyezzük át, ismét több óras

diffúziós időre. A paraffint ezután többször több órára váltjuk, hogy az oldószer nyomait is eltávolítsuk a mintából. A végső paraffint alkalmas kiöntőformába öntjük, majd a mintát behelyezve hagyjuk kihűlni és ezáltal megszilárdulni. Így megkaptuk a paraffinos blokkot.

Az elektronmikroszkópos beágyazószerke

Elektronmikroszkópos preparátumok készítésére a paraffinnál jóval keményebb és szívósabb anyagot kell használni, melyek alkalmasak 100 Å-ös nagyságrendű vékony metszetek készítésére, továbbá ellenállnak az elektronsugárzásnak és a vele járó hőhatásoknak. Az ultramikrotechnikában hagyományosan a műgyantákat használják beágyazószerként. A műgyantáknak a szövetek átitatására használt monomerjei polimerizáció révén, hő hatására katalitikus reakcióval kemény, térhálós blokkot képeznek. A műgyantákat a monomerek kémiai szerkezete és a polimerizáció mechanizmusa szerint csoportosítják. Adott csoportokon belül is különböző gyári és kereskedelmi neveken kerülnek forgalomba.

A metakrilát alapú poliészter gyanták ma már inkább csak történeti jelentőségűek. Hátrányos tulajdonságaik (erős lipidkioldó és zsugorító hatás, igen kismértékű stabilitás az elektronsugárral szemben stb.) miatt kiszorultak az általános használatból. Monomerjei a metakrilsav metil- és butil-észterei. Még leginkább a vízdékony változatok vannak használatban.

A poliészter gyanták tulajdonképpen di-karbonsavak diolokkal alkotott polikondenzációs termékei (telítetlen poliészterek). Korábban kiterjedten használták a Vestopal W és a Selectron márkanevű beágyazószerkeket. Ujabbán az epoxi-műgyanták ezeket is kiszorították.

A vízdékony műgyanták (pl. a “ glikol-metakrilát” vagy az N,N-dimetilamino-metakrilát), alkalmasak a dehidrááló anyagok helyettesítésére és ezáltal a víztelenítés alatt egyébként kioldódó anyagok (főleg lipidek) megőrzésére. A polimer azonban többnyire rosszul metszhető. Ezért csak ritkán, speciális célra alkalmazzák.

Az epoxi-műgyanták általánosan elterjedt beágyazószerke. Előnyük, hogy a polimerizációs térfogatváltozásuk kicsi. Nevüket a molekulák láncvégi két szénatomjukon található epoxi-csoportjukról kapták. A műgyanták e csoportjában a polimerizáció nem kettős kötések felszakításával történő ún. etilénikus polimerizáció, mint a metakrilát-, vagy poliészter típusú műgyanták esetében. A kiindulási anyag (epoxid) itt nagymolekula, már maga is polimer: poli-(glicerín-ariléter), melynek láncai két végállású szénatomjukon viselik az epoxi csoportot. Az epoxi-csoport reagál minden olyan anyaggal, mely mozgékony hidrogént tartalmaz (R-OH, R-SH, R-NH₂, R-COOH). A további polimerizációhoz és a térháló kialakításához két azonos reaktív csoportot tartalmazó molekulákat: di-karbonsavakat, di-aminokat, diolokat és ditiolokat kell használnunk. A reakció során az epoxid felszakad, és a másik reaktív csoportot addicionálja. A mozgékony hidrogént az epoxid oxigénje veszi fel, míg a láncvégi szénatomja a reakciópartner nukleofil szabad gyökével kapcsolódik össze. Így nagy lánchosszúságú polimerek alakulnak ki. A monomerek másik reaktív csoportja a hidroxil-gyök. Ezek a monomerek fajtái szerint változó számban találhatóak a láncmolekula hossza mentén. Könnyen észtersíthető pl. dikarbonsavanhidridekkel, melyek diészter kötésben keresztkötéseket alkotva kapcsolják egymáshoz a láncmolekulákat. Az ilyen adalékanyagokat térhálósító vagy keményítő anyagoknak nevezik. Ilyen keményítő (hardener) például a dodoceniil-szukcinil-anhidrid (DDSA) vagy az 1-metil-5-norborén-2,3-dikarbonsav anhidrid (MNA) vagy más névvel metil-endometilén-tetrahidroftálsavanhidrid, de lehet a keményítő diol, ditiol is.

A gyorsító (accelerátor) nevű komponenes rendszerint erős szerves bázis, gyakran terciér-amin, mint pl. a 2,4,6-trisz-(dimetilaminometil)-fenol (DMP-30) vagy az N-benzil, N,N-dimetilamin (BDMA). A gyorsító elsősorban az epoxidvégekkel reagálva a lánchosszabbításban szerepel.

A lágylító adalék (flexibilizer, plasticizer) a polimer (blokk) rugalmasságát növeli, a kedvező metszési tulajdonságok kialakítása érdekében adagoljuk a keverékhez. Leggyakrabban dibutilftalátot (DBP) használunk.

A savanhidridek epoxi csoportokkal alkotott észterkötései lúgérzékenyek, mely lehetővé teszi a műgyantának a metszetből való részleges kioldását nátrium–hidroxiddal. Ennek többféle előnye lehet: lehetővé tehet citokémiai azonosításokat az ultravékony metszeteken, valamint azt, hogy blokkból készült félvékony metszeteket vízdékony festékekkel könnyen meg lehessen festeni. Toluidinkékkal, metilénkékkal, vagy növényi anyagoknál savanyú fukszinnal a lúggal nem kezelt félvékony metszeteket is megfesthetjük. Ily módon fénymikroszkóposan is tájékozódhatunk anyagunkról és a blokkból készült próba–metszet alapján jelöljük ki az ezután készítendő ultravékony metszet határait. Újabban a szövettanban is terjed az igen jó felbontású képet adó félvékony metszetek használata. Az epoxi– műgyantákat Araldit, Durcupan ACM, Epon 812, illetve Spurr médium néven hozzák forgalomba.

A különböző epoxi–műgyanták gyári kiszerezésében megtalálhatók mindazon komponensek (monomerek, keményítők, gyorsítók és lágylítók), melyek a polimer kialakításához szükségesek. Ezeket kell összeönteni tapasztalatilag megállapított arányban a kívánt tulajdonságú polimer előállításához. Az így kapott “keverék” használható az anyag átítatására. Kezelésére nagy gondot kell fordítani: huzamosabb érintkezés a keverékkel bőrgyulladást okozhat.

Az elektronmikroszkópos beágyazás gyakorlati kivitelezése

A víztelenített minta az intermedier (többnyire epoxi–propán) oldószerből a vele hígított beágyazókeverékbe kerül. A beágyazókeverék általában meglehetősen viszkózus folyadék. A biológiai anyag átítatását keveréssel, áramoltatással célszerű segíteni, ami a gyakorlatban egy egyszerű keverőszerkezettel valósítható meg. Ennek kisfordulatszámú szinkron (óra) motorral meghajtott ferde helyzetű tengelyére a keverékben lévő mintákat tartalmazó üvegcsék számára furatokkal ellátott tárcsát helyeztek el. A ferde síkban forgó tárcsában az üvegcsék alján lévő anyag állandó mozgásban van. Ez a minta felszínén felkeveri a diffúziós koncentrációgradienst, ezekkel növelve az átítatás sebességét. Az üvegcséket az átítatás közben nyitva kell tartani, hogy az oldószer gőzei szabadon távozhassanak.

A beágyazás utolsó lépéseként a hígítatlan beágyazókeveréket zselatin (gyógyszeres) kapszulákba, vagy külön erre a célra készített szilikongumi formákba, esetleg vastagabb alumínium fóliából hajtogatott dobozokba öntjük. Ezekben helyezük el, csipesszel (esetleg plexiből készült eszközökkel stb.), óvatosan megfogva a biológiai anyagot, mégpedig kapszulánként egyesével, vagy a dobozokba (annak méretétől függően) 6–10 db-ot, egymástól kb. 5–8 mm távolságban; ügyelve arra, hogy az anyag metszendő felszíne a blokk kifaragása szempontjából megfelelő irányba nézzen.

Az egyes anyagminták azonosítására minden egyes minta mellé grafitceruzával írt jelzéssel ellátott keskeny papírcsíkot illesztünk.

Ezután a keveréket melegítőszekrénybe (termosztát) tesszük, a beágyazószer polimerizációjának hőmérsékletére. Epoxi gyanták esetében a teljes polimerizáció 60 C°-on kb. 24–48 óra.

A beágyazás alatt bekövetkező morfológiai változások már elhanyagolható mértékűek.

Ha a beágyazás utolsó lépéséhez kiöntőformának zselatinkapszulát használtunk, akkor csak a kapszula anyagát kell eltávolítani a felszínről, és a kapszula formájában polimerizálódott, a biológiai anyagunkat tartalmazó műgyanta, méreteinél fogva blokként kezelhető.

Ugyancsak a kívánt alakú blokkot kapjuk, ha a beágyazást szilikongumi sablonban végeztük. Az alumínium fóliából készült dobozokba ágyazott anyag közötti műgyanta elfűrészelésével téglatest alakú blokkot alakíthatunk ki.

Metszetkészítés

A metszetkészítés célja a blokknak fény-, illetve elektronsugárral átvilágítható vékonyságú szeletekre (metszetekre) darabolása.

A fénymikroszkópia igényeit általában 3–10, maximálisan 15–30 μm vastagságú metszetek tökéletesen kielégítik.

A biológiai célokra maximum 100 kV gyorsítófeszültséggel dolgozó elektronmikroszkóp számára készült ultravékony metszetek vastagsága azonban az elektronsugarak korlátozott áthatolóképessége miatt és a felbontóképesség kihasználása érdekében nem haladhatja meg a 100 nm-t (1000 Å), de igen kívánatos ennél lényegesen vékonyabb (30–60 nm) metszeteket készíteni. A metszetkészítés eszközei a mikrotómok. A fénymikroszkópia céljait szolgáló metszeteket precíziós eszközökkel, a különböző rendszerű mikrotómokkal, az ultravékony metszeteket pedig az ún. ultramikrotómokkal állítjuk elő.

Mindenfajta mikrotóm két fő funkciós részből áll: úgy mint statikai egységből és metszőszerkezetből. A mikrotómok alapvető konstrukciós elve, hogy nagy fajtsúlyú anyagból (pl. öntöttvas) készült statikai egység nagy stabilitást biztosítson a metszőszerkezet számára. Különösen fontos ez az ultramikrotómok esetében.

Az alábbiakban ismertetjük a fénymikroszkópia céljait szolgáló mikrotómok típusait.

Szánkamikrotóm

A paraffinos metszetek készítésére legelterjedtebben használt eszköz a szánkamikrotóm. Működésének lényege az, hogy a szánkára szerelt befogóba erősített kés vízszintes síkban csúsztatható a jól rögzített blokk felett. Az olvasztott paraffinnal fakockákra ragasztott blokk, a tér mindhárom irányában orientálható blokkbefogóban van elhelyezve, miáltal a kés élének síkja közelébe emelhető, mégpedig úgy, hogy csonkagúla alakúra kifaragott blokk fedőlapja és egyik éle is párhuzamos állásba kerüljön a kés élével (ún. kézi vagy durva beállítás).

A tárgybefogó finom emelését mechanikai áttételes emelőszerkezet biztosítja. A metszés a szánka hátulról előre húzásakor történik.

Az emelőszerkezet 1–1 metszet lehúzása után, a kés hátsó holtpontra való visszaállításakor, vagy kézzel vagy pedig mechanikus félautomata segítségével. Utóbbi esetben az emelést a késtartónak az emelőszerkezet hátul elhelyezett vezérlő eleméhez való ütközése biztosítja. A kívánt metszetvastagságot előre be kell állítani a vezérlő elem μm beosztással ellátott részén.

A metszeteket megnedvesített ecsettel szedjük le a késről, majd tiszta, zsírtalanított, előzetesen tojásfehéj: glicerin=1:1 arányú keverékével (ragasztóanyag) bekent és desztillált vízzel lecseppentett tárgylemezre visszük át. Ezután Bunsen-égő felett óvatosan kisimítjük őket a vízfelszínen, ügyelve arra, hogy csak meglágyítsuk a paraffint, de meg ne olvasszuk. Ezt követően a metszeteket a termosztátban a tárgylemezre szárítjuk.

A Minot (ejtsd: mino) rendszerű kerekemikrotóm

A szánkamikrotómtól való leglényegesebb eltérése, hogy az álló helyzetben lévő rögzített kés előtt a blokk mozgatható, mégpedig függőleges irányban le és fel. A blokk mozgatása egy oldalt elhelyezett, fogantyúval ellátott kerék forgatásával történik. A blokk előretolását a mikrotóm kerekének minden egyes körbefordítása után mechanikus félautomatika biztosítja, a kívánt és előre beállított metszetvastagságnak megfelelően.

A kerekemikrotóm előnye, hogy a kerék folyamatos forgatása esetén az egymás után lehúzott metszetek, szomszédos, párhuzamos széleikkel összetapadva, hosszú szalagszerű csíkok formájában, ún. sorozatmetszetként szedhetők le.

A fagyasztó mikrotómok

Segítségükkel a rögzített, de hagyományosan be nem ágyazott, illetve sok esetben rögzítetlen biológiai anyagból készíthetők metszetek, melyek következképpen mentesek a kemikáliákkal történő víztelenítés és beágyazás okozta változásoktól. A fagyasztó mikrotómok általában a szánkamikrotómok elvei szerint működnek. Tárgyasztaluk mélyhűthető. Korábban folyékony szén-dioxidos hűtést alkalmaztak, melynek helyét ma már a Peltier (ejtsd: peltyié) elv alapján történő termoelektromos hűtés vette át. A mikrotóm tárgyasztalába egy Peltier elem van beépítve, ami nem más, mint két, egymáshoz illesztett (rétegdioda rendszerű) félvezető, amelyek egymástól csak a szennyező szilícium vagy

germánium arányában különböznek. A Peltier elem legfontosabb hasznosítható tulajdonsága, hogy egyenirányított áramkörbe kapcsolva az elektromosságot hővé alakítja, mégpedig úgy, hogy a félvezetők egyike hűl, a másik pedig egyidejűleg melegszik. A mikrotóm tárgyasztalának lapja rendeltetésszerűen a lehűlő félvezető, melynek felülete króm réteggel van bevonva, vagy kerámia borítású. Az alul elhelyezkedő, melegedő félvezető hőfeleslegét áramló vízhűtéssel vezetjük el.

A fagyasztó asztal hálózatról maximum 12V feszültségű egyenáramot leadó tápegységről üzemeltethető. Az áram erőssége 5–20A között változtatható, mellyel egyidejűleg a tárgyasztal felszínén mérhető hőmérséklet 0– és -30 C° között változik. Egy adott szerv vagy szövetfésülés optimális metszési hőfoka tapasztalati úton állapítható meg. A rutinszerűen használt 10A áramerősség kb. -14 – -18 C°-nak felel meg.

Az elektromos hűtésű fagyasztó mikrotóm ma már minden igényesebb (pl. enzimdiagnosztikai) eljárásnál nélkülözhetetlen. Gyorsan és a környezet hatásaitól függetlenül, stabilan tartott hőfokon hűt. A gyors hűtésnek köszönhetően a víz üvegszerűen, a folyadékállapothoz képest kevésbé változva fagy meg. Ellenkező esetben nagyobb, hatszöges jégkristályok nőnek, melyek a sejtek struktúráját elroncsolják. Hasonló veszélyt jelent, ha a fagyasztott szövetminta felenged és újból megfagy.

A kriosztát vagy kriomikrotóm részben a környezeti hatások (hő) kizárására konstruált eszköz. Lényege egy Minot rendszerű kerekemikrotóm, amely szabályozható hőmérsékletű mélyhűtőtérben van elhelyezve. A mikrotóm egy, a mélyhűtőtér falán átvezetett tengelyű kerékkel kívülről működtethető. A mintát rögzítve vagy rögzítetlenül fagyasztjuk a fém tárgyasztalra, melyet ezután a mikrotóm tárgybefogójába helyezünk. A kriomikrotómmal viszonylag nagyobb, több cm² alapterületű anyagból is igen vékony 2–3µm-es metszeteket készíthetünk. Ezeket fedőlemezre szedjük le. A fedőlemezre “olvadt” metszet továbbvitele kényelmes és méreteikből adódóan gazdaságos (idő+reagens megtakarítás) is. Ha a metszeteket a mélyhűtött térben hagyjuk 10–60 percig, jégtartalmuk elszublimál, és ún. fagyasztva–száritott met-szeteket kapunk, melyek előnye például, hogy víztelenítés (lipidextrakció) nélkül végezhető rajtuk lipidfestés.

Napjainkban igen fontosak a teljesen automatizált működtetésű standard vastagságú metszeteket készítő kriomikrotómok, elsősorban a kvantitatív citokémiában és a citopatológiai diagnosztikában.

Smith és Farquhar féle szövetseleltelő

Teljesen automatizált, hálózatról (220V) üzemeltethető, beépített tápegységű mikrotóm, amelynek függőleges síkban mozgó kése 50–200 lecsapás/perc, szabályozható frekvenciával felszeleteli az aldehidben rögzített, alvadt zselatinba ágyazott szövetdarabkákat. A szeletek vastagsága 20–230 µm között állítható. Ezeket a vastag metszeteket arra használjuk, hogy rajtuk enzimidokémiailag reakciókat végzünk, majd ozmiumsavas utórögzítés után műgyantába ágyazva őket, ultramikrotómmal ultravékony metszeteket készítünk belőlük és azt elektronmikroszkóppal vizsgáljuk (elektron citokémia). Így elkerültük a fagyasztás elektronmikroszkópos dimenziókban műterméket előidéző hatásait.

Az ultramikrotómok

A fénymikroszkópos metszetek készítésére használt mikrotómok működésére jellemző, hogy egy metszési cikluson belül a blokk és a kés két ízben találkoznak egymással. Metszés kizárólag csak az első találkozás alkalmával történik, a második találkozás a konstrukciós megoldásokból adódik. Egy metszési ciklus alatt azon mozgások összességét kell értenünk, melyek a blokk, vagy a kés két azonos (felső, illetve hátsó) holtponthelyzetbe kerülése között történnek és egy metszet lenyesését eredményezik. Az ez alatt eltelt idő az ún. ciklusidő.

Az ultramikrotómok működésüket tekintve, durva megközelítéssel a Minot rendszerű mikrotómokhoz hasonlíthatók. Az első ultramikrotóm megfelelően átalakított, acélpengével

metsző Minot féle kerekemikrotóm volt. A jelenleg használatos típusokra is jellemző, hogy a szorosan befogott kés előtt mozog a blokk, mégpedig függőleges síkban. Azonban a vékony metszeteket készítő mikrotómokkal szemben az ultramikrotómok eltérő konstrukciós megoldása az, hogy egy metszési cikluson belül a blokk és a kés egyszer találkoznak egymással, mégpedig a metszési szakaszban. A visszatéréskor a kést a blokk elkerüli.

A jó minőségű ultravékony metszetek kinyerésének egyik döntő tényezője a kés, annak is elsősorban az éle. Az ultramikrotechnikában nem alkalmazhatók fém kések, mivel élüket nem lehet kellő finomsággal megmunkálni. Ezért az ultramikrotómok késeit kristályrácsos szerkezetű igen kemény anyagból készítik (gyémánt vagy nátron-üveg). A gyémánt kések igen drágák, de élük felújítható. Lényegesen olcsóbbak az üvegekések.

Az üvegekések készítése üvegcsíkokból történik, leggyakrabban erre a célra konstruált ún. késtörő berendezésekkel. A legjobb kések az öntött, rendszerint szabványméretű (pl. 28mm széles, 7mm vastag, 34cm hosszú) svéd gyártmányú (LKB) üvegcsíkokból készíthetők.

Az üvegcsíkokból először 28x28mm élhosszúságú, 7mm vastagságú négyzetes hasábokat képezünk vidia vagy gyémántheggyel történő karcolás után. Ezekből a négyzetes üvegdarabokból törjük az oldalnézetben háromszögalakú késeket a következő módon: bekarcoljuk őket, mégpedig az átlós iránytól kissé eltérően, úgy hogy a bekarcolás a négyzet csúcsai előtt néhány milliméterrel végződjön. A bekarcolásmentes csúcsi részekben az üveg szabadon (karcolás által nem irányítottan) törik, az átlótól bal felé görbülve, és ennél fogva a négyzet csúcsai alatt egy-két milliméterrel az üvegcsík eredeti, gyárilag tört (7mm vastagságú) felszínén fejeződik be. Így egy 7mm hosszú éldarabot kapunk, amely megközelítőleg három zónára oszlik, ezek balról jobbra haladva a következők:

- a.) tökéletes éldarab, ún. metszőél;
- b.) nagyon finom mikrorepedéseket tartalmazó éldarab;
- c.) durva repedések, fogazottság miatt használhatatlan éldarab.

A használható metszőél hossza attól függ, hogy az élben végződő törés helyzete mennyire közelíti meg a kiindulási üvegnégyzetek csúcsát. Ideális esetben ez a távolság nem haladja meg a 0.5–1 mm-t.

A hasznos éldarab kialakulásának helye mindig a törés kezdetének helyét jelzi, itt volt a legkisebb az üveg törési sebessége. Innen ún. stresszvonala indul ki (ívalakban balról jobbra, lefelé), ezt érte a törési procedura alatt a legkisebb nyomás, és legkisebb a belső feszültsége is. A belső feszültségből származó mikrorepedések száma és mérete a törési sebesség növekedésének irányában (jobbra) nő.

A kés élének ellenőrzése sztereomikroszkóp alatt történik, fekete alapon. A mikrorepedések fényinterferencia alapján jól felismerhetők a sötét háttérben.

A mikrorepedéseket tartalmazó hibás rész csak fénymikroszkópos célokat szolgáló ún. félvas-tag metszetek előállítására alkalmas, ultravékony metszetekére nem, mivel azokat a kés élére merőleges, párhuzamos csíkokban felszántja és ezáltal vizsgálatra alkalmatlanná teszi.

A kés lényeges tartozéka az ún. metszetgyűjtő medence. A kinyert metszetek felfogására készül fémből vagy öntapadós ragasztószalagból. A kés élének magasságában illesztjük fel és az illeszkedési helyeken olvasztott paraffinnal kibélelve tesszük vizet át nem eresztővé. A benne lévő desztillált víz, illetve a felületi feszültség csökkentésére használt 10%-os acetont vagy dioxán felszínén egymást követő metszetek a korábbiakat elöretolják és szomszédos párhuzamos széleikkel összetapadva szalagszerű, jól kihalászható metszetsorozatot alkotnak.

A metszetgyűjtő medencével ellátott kést a késtartóba fogjuk be. A késtartó a tér három síkjában orientálható és lehetővé teszi, hogy a kés metszőélét párhuzamos állásba hozzuk a kifaragott blokkfelszín egyik éldarabjával.

Az ultramikrotóm mozgó része a blokkbefogó szerkezet, mely három irányba mozdulhat el.

- a.) Előre a kés irányába. Ez az előtolás;

- b.) A metszési ciklus ún. metsző üteme: eredménye a metszet;
- c.) Oldalra ív mentén. Ez a ciklus az ún. elkerülő ütem vagy visszatérési mozgás, amely biztosítja, hogy a blokk eredeti helyzetébe (felső holtpont) való visszatérése során ugyanazon a metszési cikluson belül nem találkozzon ismételten a késsel.

Az elkerülő ütemet egyes műszerek esetében (pl. LKB ULTROTOM és Porter–Blum MT2) a késtartó szerkezet mechanikus hátrahúzóda helyettesíti a felső holtpontba való visszatérés alatt.

A blokkbefogó szerkezet visszatérési mozgására a berezgés elkerülése érdekében van szükség. Ha ugyanis a blokk és a kés egymáshoz képest valamilyen oknál fogva rezegni kezd, olyan metszet keletkezik, amely a rezgés periódusának megfelelően a metszőélel párhuzamos lefutású vastagabb és vékonyabb szakaszokat (csíkokat, barázdákat, angolul: chatter) tartalmaz, ami vizsgálatra alkalmatlanná teszi az anyagot. Az egyenetlen hullámos metszetszél a kontrasztosítást is hátrányosan befolyásolja. A kiemelkedő részek jobban, a közöttük elhelyezkedők kevésbé vagy egyáltalán nem érintkeznek a kontrasztosító folyadékkal.

A berezgést több különböző tényező válthatja ki. Elkerülése érdekében nagyon fontos, hogy a mikrotóm mozgatható alkatrészeit (pl. befogott kés vagy blokk stb.) metszés előtt gondosan rögzítsük, betartsuk a blokk kifaragásának előírásait, a keménységének és rugalmasságának megfelelő késszöveget és metszési sebességet használjunk.

A blokkbefogószerkezet a tér mindhárom síkjában állítható. Ez tartja a blokkot rögzítő ún. befogófejet. Az orientálhatóságot, vagy ívalakban meghajlított, forgatható acélsínek vagy pedig kettős gömbcsukló biztosítja.

A blokkbefogószerkezetet metszés előtt úgy kell beállítani, hogy az előzetesen kifaragott és benne rögzített blokk a saját felső és alsó holtponthelyzete között mozogva félúton találkozzon a kés élével. Erre azért van szükség, mert a metszés a blokk lecsapó mozgásának körívéhez tartozó húr felezőpontjába eső érintő-síkban a legmegfelelőbb.

Ezenkívül ügyelni kell arra, hogy a kifaragott blokk hosszabbik éle feltétlenül párhuzamos helyzetbe kerüljön a kés élével, különben nem kapunk szalagszerű metszetsorokat és nagyobb a berezgésveszély ha a rövidebb él találkozik a kés élével.

A blokk kifaragása a befogófejben, sztereomikroszkóp alatt történik, borotvapengével vagy gyári blokkfaragó szerkezettel (pl. LKB gym. Pyramiton, TM–60-as Reichert faragó eszköz). Faragáskor a beágyazott anyag környezetétől sokszögalakú gúlat képezve kell eltávolítani a műgyantát. A meghagyott beágyazóközeg így kellő támasztékot ad és ezáltal csökkenti a berezgésveszélyt. A metszésre szánt csúcsi anyagrézletet ideális esetben trapézalakú csonkagúla formájúra faragjuk, melynek magassága és fedőlapjának élhosszúsága nem haladhatja meg az 1–2mm-t. A biológiai anyag kiválasztott metszetszélén a fedőlapon kell, hogy elhelyezkedjen. Ha a metszendő anyag nem homogén összetételű (pl. több sejttípusból áll), akkor a blokkból előbb ún. félvastag (0.5–1µm-es) metszeteket készítünk, azt megfestve választjuk ki a bennünket érdeklő részleteket. Ezután a blokk kifaragását úgy fejezzük be, hogy a kívánt részlet kerüljön a végleges vékonymetszési felszínre.

A befogott blokk előtolását a különböző gyártmányú ultramikrotómok különböző elveken valósítják meg. Az ún. mechanikus előtolás esetében (pl. a Porter Blum készülék) a blokk előtolását mechanikus félautomatika biztosítja.

A hőkitágulásos (termodilatációs) elven működő ultramikrotómok esetében az előtolás elektromos fűtéssel létrehozott hőtáguláson alapul. A blokkbefogószerkezetet hordozó tengely egy megfelelő alakban kiképzett és tekerccsel körülvett fémrúd végéhez illeszkedik. A tekerccset áramkörbe iktatva, a fémrúd a tekerccsen keresztülhaladó áram hatására melegszik és kitágul, vagyis a rúd hossza megnő. Minthogy a rúd az egyik végén rögzítve van, a hőkitágulás a blokkbefogót hordozó, ún. szabad végén érvényesül, ami a blokk előtolását eredményezi. Az előtolás sebessége a hőközlés függvényében, egy meghatározott időintervallumon belül konstans. Ily módon azonos vastagságú metszetek készíthetők állandó ciklusidő mellett.

Újabban kizárólag elektromos meghajtású ultramikrotómok készülnek. Ezeknél a motor fordulatszámának (ciklusidő), a metszési ütem sebességének, és az előtolásnak az elektromos szabályozásával alakítható ki a szükséges metszetvastagság. Azonos előtolás esetén nagyobb ciklusidő vastagabb metszeteket eredményez.

Az előtolás mértéke a fűtőtekercsen áthaladó áram erősségének változtatásával szabályozható, nagyobb áramerősség (fűtés) esetén egy időegység alatt az előtolás mértéke nagyobb lesz, vastagabb metszetek készülnek és fordítva. Az automatizált ultramikrotómok lehetőséget adnak arra is, hogy a metszés sebességét a műgyanta keménységéhez igazítsuk. A viszonylag puhább polimerek metszésekor ugyanis nagyobb a valószínűsége a berezgésnek. Míg az átlagosnál keményebb blokkokat jobban tudjuk nagyobb metszési sebességgel metszeni, a puhábbaknál kisebb metszési sebességgel a berezgés gyakorlatilag megszüntethető, ha ugyanakkor a kés dőlésszögét is az átlagosnál kisebbre állítjuk. Keményebb blokkoknál viszont célszerűbb a dőlésszög növelése.

Az UM-ok tartozéka egy binokuláris mikroszkóp feltét (különböző nagyítású objektívekkel) és egy nem nagy hő sugárzó és fehér fényű lámpa. Ezek segítségével történik a kés és a blokkfelszín egymáshoz viszonyított orientálása, a metszetek vastagságának ellenőrzése, illetve kihasználásuk.

A metszetek vastagságáról a rajtuk, mint plánparalell lemezekon létrejövő fényinterferencia jelenség alapján győződhetünk meg. Mivel az interferencia szín a metszetvastagság függvénye, a metszeteket kihalászásuk előtt színük alapján szelektálhatjuk. Vizsgálatra csak a sötétszürke (40nm vastagságot meg nem haladó) szürke (40–50nm), ezüst (50–70nm) és legfeljebb arany (70–90nm) színűek alkalmasak. A bíbor (90nm), ibolyakék és zöld színű (150nm-nél vastagabb) metszetek gyakorlatilag használhatatlanok.

Az ultramikrotechnika mai fejlettsége mellett nem ritka a 20nm-nél vékonyabb metszet sem.

Az ultravékony metszet kezelése.

A metszetek összegyűjtése és kisimítása (acetonnal, kloroformmal vagy xilollal átitatott szűrőpapírcsík közelítésekor keletkező gőzben) a metszetgyűjtő medencében történik. Innen halásszuk ki őket az előre előkészített tárgytartó rácsra.

A tárgytartó rács (mikrorostély, grid) nyílásokkal ellátott színesfémből (általában bronz) fotooptikai fémmaratással készült 2–4mm átmérőjű korong. Rajta a nyílások száma rendszerint 50, 100, 200, 300, 400 vagy esetleg 50-nél kevesebb is lehet. A nyílások általában négyzet alakúak, de téglalap, kör stb. formákat is használnak. Minél nagyobb a rács nyitottsága, annál nagyobb az elektronsugárral átvilágítható része (ún. transzmissziós arány) de egyúttal annál kisebb alátámasztási felületet biztosít a metszeteknek. Ezért felszínüket gyakran hordozóhártyával vonják be.

Legelterjedtebben a viszonylag nagy alátámasztást nyújtó és jónak mondható transzmissziós arányú (75%) 200 nyílással ellátott mikrorostélyokat használjuk.

A rácsokat vékonyságuk, sérülékenyséjük miatt igen óvatosan óráscsipesszel kell megfogni. Igen fontos továbbá, hogy tiszta pormentes helyen tároljuk és használat előtt lipidoldószerezrel (pl. kloroform) zsírtalanítsuk őket, hogy megelőzzük az elektronmikroszkóp lencséinek szennyeződését. Az elektronsugárzás hatására ugyanis a felmelegedő rostélyról az illékonyabb szennyeződések elgőzölgnek és a hidegebb felületeken lerakódnak.

A hordozóhártya a rács felszínének bevonására készített 5–10nm filmréteg. A metszetek elektronsugárzással szembeni ellenállóképességét, stabilitását fokozza, a rács ugyanis a sugárzás hatására kisebb–nagyobb mértékben felmelegedvén tágul, és kiterjedésekor (különösen szögletes nyílásúak) magával húzza és szétszakíthatja, főleg a legvékonyabb, legértékesebb metszeteket. A hordozóhártya anyaga és készítésének módja rendkívül változatos. Ismertesek szerves anyag alapú (leggyakrabban 0.1%-os kloroformban oldott formvarból vagy kollodiumból készült) és különböző szervesetlen anyagokból (C, SiO₂, Al–Au stb.) előállított

hordozóhártyák. Esetenként kétféle anyag kombinációja is lehetséges (pl. szénnel bevont formvar film). A legtöbb jó tulajdonsággal a szénhártya rendelkezik: vékony, zavaró struktúráktól mentes, kémiai hatásokkal szemben ellenálló.

A szerves anyag alapú hordozóhártya készülhet a film oldott anyagának víz felszínére csöppentésével, vagy úgy, hogy oldataikkal kémiailag közömbös és sima felszínű anyagot (pl. üveg) vonunk be, majd az oldószer elpárolgása után a víz felszínére úsztajuk. A víz felszínén úszó, bármely módszerrel készült filmek a rájuk helyezett mikrorostélyhoz szorosan tapadnak és így azokkal együtt kiemelhetők. A szerves anyagból álló hártyákat vákumban történő hőszublimáltatással állítunk elő.

A festés

A fénymikroszkópos festés

Minden sejt vagy szövettani készítményt (leszámítva a pigment tartalmú sejtekét) vizsgálat előtt, a vizsgálat kívánalmainak megfelelően meg kell festeni. Mivel a mikrotechnikában használt festékek túlnyomó többsége vizes oldat, a paraffinblokkból készült metszeteket festés előtt előkezelésnek kell alávetni, festés után pedig gondoskodni kell arról, hogy a festett preparátum vizsgálatra alkalmas és tárolható legyen. A festett preparátumot fényvel szemben megfelelő törésmutatójú és egyben tartósítást is biztosító közegbe kell vinni.

A paraffinos metszetek előkezelésének első lépése a deparaffinálás. A festékoldatokkal nem elegyedő paraffinnak metszetekből való kioldása rendszerint xilollal történik. Ezután a paraffin oldószerének eltávolítására és a metszetek vízzel történő átítatására van szükség, amit az ún. leszálló alkoholsor különböző koncentrációjú tagjainak (abs., 96%, 60%, 50% etilalkohol) egymás után történő cseréjével érünk el, és közvetlenül festés előtt desztillált vizes öblítést alkalmazunk. A gyakorlatban ez úgy történik, hogy a lemezen lévő metszeteket visszük keresztül az oldószereket tartalmazó festőküveták sorozatán. A festési időt a gyakorlatban empiriával kell meghatározni. Egy adott festékanyaggal való színeződés sok esetben kizárólagos egy specifikus makromolekulát tartalmazó struktúra vagy organellumra nézve. Egy adott struktúraelem, valamely festékekkel történő specifikus színeződésének mechanizmusa lehet kémiailag vagy fizikai alapon jól definiálható, de lehet kevésbé ismert, vagy tisztázatlan is. Például az Orange G nevű festék a citoplazmában található valamennyi organellumot megfesti.

A sejtek vagy szövetek savas természetű (hozzáférhető negatív gyököket tartalmazó) komponensei a kationokban gazdag ún. bázikus festékekkel (szerves bázisokkal) festődnek. A bázisos festékekkel színeződő struktúrákat összefoglaló néven bazofil anyagoknak nevezzük, a reakció látható, pozitív eredményét pedig bazofiliának. A bazofilia függ a festékoldat pH-jától. Alacsony pH-n (2–3) csak az erősen savas, magasabb pH (4–5) mellett az összes savas anyagok, míg semleges és gyengén savas pH mellett sok egyéb anyag is specifikusan festődik. A legismertebb bázikus festékek a hematoxin, a toluidinkék és a metilénkék. Vannak továbbá a szövetekben acidofil anyagok is, amelyek savas jellegű festékekkel történő festődése az acidofilia jelensége. A savas festékek közül az eozinnal történő színeződést külön is szokás megkülönböztetni: ez az eozinofilia. Az acidofilia is Ph-függő jelenség. Savas pH mellett csak a bázikus komponensek, míg lúgos pH mellett sokkal több anyag festhető savanyú festékekkel.

Szövettani festésekhez általában nem egyetlen festékoldatot, hanem kettőt–hármat használunk egymás után. (ún. szukcedán festés). Ilyen a hematoxin–eozinnal történő ún. mag–plazma festés. Ez esetben a hematoxinnal előbb bazofilia festést végzünk. Ekkor a DNS-t és RNS-t tartalmazó sejtkomponensek és ha jelen vannak a savanyú mukopoliszacharidok festődnek. Ezután vizes eozinnal közel semleges pH mellett általános, ún. plazmafestést végzünk. A mag és a riboszóma tömegek (pl. durva felszínű ER) a felvett hematoxintól lilásbarnára, míg a többi anyagok rózsaszínűre (eozin–vörösre) színeződnek.

Hasonló gyakran használt kombinált szövettani festés az Azan–festés (Azokarmin–Anilin kék). Ez esetben előbb az azokárminnal magfestést, majd az ún. Mallory oldattal (anilin kék+Orange G) kötőszöveti és plazmafestést végzünk. A magok, a vörösvérsejtek és a nyálka kárminpirosra, a kötőszövet kollagén rostjai kékre vagy sárgára színeződnek. A Mallory–festést, mivel különböző festékeket egyazon oldatban tartalmazza, a szimultán festések közé sorolják.

A legtöbb festék a saját színével megegyező színűre festi a vele kapcsolatba lépő komponenseket, amit ortokromatikus színeződésnek (ortokromázia) nevezünk. Ezzel szemben, ha a festék saját színétől eltérő színben tüntet fel valamely struktúrát a metakromázia jelenségéről van szó. Vannak festékek, melyek bizonyos struktúrákat ortokromatikusán, másokat viszont metakromatikusán festenek: ilyen pl. a bázikus toluidinkék, amely oldatának pH-jától függően vagy csak a nukleinsav tartalmú komponenseket színezi kékre, vagy magasabb pH-n azokkal együtt savas fehérjéket is, viszont a savas proteoglikánokat és sok más struktúrát pl. a növényi sejtek cellulóztartalmú sejtfalát vörös ibolya, a fásodott sejtfalakat viszont zöld színben tünteti föl. A metakromatikusán festő anyagok közül ismertebb még a tionin és az Azur–A. A metakromaziás festődés mechanizmusa feltehetően az, hogy egyes makromolekulák felületükön festékmolekulákat adszorbeálnak. Ha a makromolekulák felületi festékkötő helyeinek rendeződése olyan, hogy a festékmolekulák aggregálódását is lehetővé teszik, a festékmolekulák adszorpciós polimerizálódása következik be. A metakromázia tehát bizonyos szabad gyökök periodikus felületi elrendeződéséhez kötött jelenség. Fizikai alapja az, hogy a polimerizált festékmolekula és a monomerek oldatának fényabszorpciós maximuma egymástól eltérő. A toluidinkék esetében a metakromázia foka függ a negatív gyökök termé-szetétől. Legerősebben a szulfátcsoporttal rendelkező vegyületek (pl. a savas proteoglikánok, mucin, hialuronsav, a porcállományban a kondroitin–szulfát, heparin stb.), majd a foszfát–, karboxil–, végül a karbometil–csoporttal rendelkező vegyületek adják.

A festési módszer progresszív jellegű, ha a metszet által felvett festék mennyiségét a festés idejével szabályozzuk. Regresszív a festés, ha a metszetet erősen túlfestjük, majd a felesleget megfelelő oldattal kivonjuk belőle. Mivel ilyenkor a különböző sejtalkotókból különböző mennyiségben oldódik ki a festék, a festék kivonást differenciálásnak nevezzük. Bizonyos mértékű differenciálódás majdnem mindig lezajlik a festést követő víztelenítés alatt. A leggyakrabban alkalmazott regresszív festékek a Mallory–, az Azan– és a Papanicolou–festés.

A festett fénymikroszkópi preparátumok tartósítása

A festett, vizes preparátum vizsgálatra nem alkalmas, mert törésmutatója túl alacsony, ezért valamint tartósítása céljából kanadabalzssammal (egy fenyőféle tisztított gyantája) kell átítatni és fedőlemezrel lefedni. A kanadabalzsam oldására xilol a legmegfelelőbb. Mivel azonban a xilol vízzel nem elegyedik, a kanadabalzsamot megelőzi a festett, vizes preparátum felszálló alkoholsorral történő fokozatos víztelenítése. Ez 70%, 96%-os és abszolút etilalkohol egymásutáni kicserélésével történik. Az alkohol a festékek egy hányadát is kioldhatja, tehát differenciálhat is. Ezután kétszer váltott xilol, majd xilolos kanadabalzsam–oldattal történő lecseppentés és lefedés következik. A frissen lefedett metszetek a fénymikroszkóp felbontóképességét teljesen kihasználva csak 1–2 napos száradási idő után vizsgálhatók. A tárgylemez és a fedőlemez közötti közeg törésmutatója csak akkor válik teljesen megfelelővé, ha a xilol már teljesen elpárologott és a gyantaoldat üvegszerűen megszilárdult. Az ilyen preparátum, ha az alkoholt tökéletesen eltávolítottuk, évekig eláll és vizsgálható. Idővel azonban a némileg savas kanadabalzsamban a szerves festékek elbomlanak. Ha a kanadabalzsam helyett glicerint használunk a preparátum azonnal vizsgálható, de csak kevéssé tartós.

A félvastag metszetek festése

A műgyantába ágyazott biológiai anyagból készített félvastag metszetek fénymikroszkópos vizsgálata hasznos kontrolja lehet az ultravékony metszeteknek. Például képet kaphatunk a

műtermék jelenlétéről vagy hiányáról, kiválaszthatjuk az elektronmikroszkópos vizsgálatra szánt részleteket.

Ehhez azonban előbb meg kell festeni őket. A festés leggyakrabban toluidinkékkal vagy metilénkékkal történik. Az esetek nagy részében elegendő bóraxos toluidinkék–metilénkék oldattal melegíteni a metszeteket, de szükségessé válhat a műgyanta lúgos (n NaOH) oldattal való előzetes oldása (duzzasztása) is. A félvastag metszetek kanadabalzsammal lefedhetők.

Az ultravékony metszetek festése: a kontrasztosítás

I. Pozitív kontrasztosítás

Az ultravékony metszetek “festése” nehézfémionokat tartalmazó anyagok (pl. uranil–acetát, ólom–citrát, ólom–acetát) segítségével történik.

Ezek oldatába helyezük meghatározott időre a metszeteket hordozó mikrorostélyokat. A módszer a sejtstruktúrák elektronoptikai kontrasztját azáltal fokozza, hogy a folyadékkal érintkező metszefelszínen (és kis részben a metszetbe diffundálva is) a nehézfém redukálni képes struktúrákon fém válik ki. A metszefelszínen az ólomsók esetében a levegő szén–dioxid tartalma ólom–karbonátok kicsapódását okozhatja, ezért a kontrasztosítást zárt térben, szilárd nátrium–hidroxid jelenlétében kell végezni, mely a légtér szén–dioxidját karbonát formájában megköti. Az aspecifikus csapadékképződés elkerülése céljából a blokkok kifარagásától kezdve nagy tisztaságot kell biztosítani, mert a metszetek felszínére tapadt szennyezéseken is ólomtartalmú csapadék válhat ki.

Az elektronmikroszkópi metszetről készült képen a biológiai anyag kontrasztja (feketése, elektronoptikai sűrűsége) tehát egyaránt ered az ozmium rögzítés, az uranil–acetátos utó-rögzítés (blokk kontrasztosítás), továbbá az uranil–acetátos és az ólomsós metszet kontrasztosítás során kivált nehézfémek jelenlététől. A sejt vizes fázisában lévő redukáló anyagokban, valamint lipoproteid membránok, vizes fázisok felé néző határ felületein vízben oldott sóikból a fémek kiválnak. Ezért a membránok, és ezzel az egyes organellumok határfelületei kirajzolódnak és a sejt membránszerkezete feltárul az elektronmikroszkópi képen. Az elektronszóró nehézfém tartalmazó képletek az elektronmikroszkóp ernyőjén feketék, itt nincs elektronbecsapódás, nincs felvillanás. A tisztán ozmium rögzítéssel létrehozott kontrasztot (“feketedést”) az illető anyag struktúra ozmiofiliájának nevezik. Ha kontrasztosításra a fentemlített egyéb nehézfémeket is felhasználják, akkor a sötét struktúrát elektrondenz (elektronoptikailag sűrű) szerkezetnek nevezik.

II. Negatív kontrasztosítás

Neve jelzi, hogy alkalmazása esetén az egyébként sötét részletek a képen világos struktúráként (és fordítva) fognak jelentkezni. Ezt az eljárást hártýára vitt sejtfrakciókon és fagyasztott anyagból (beágyazás nélkül) készített és hártýára vitt ultravékony metszeteken (krioultramikrotómia) vagy makromolekulák, vírusok, baktériumok keneteinek vizsgálatára alkalmazzák. A festendő anyagra rendszerint foszfórwolframsav vagy uranil–acetát oldatát cseppentik, majd leszívják. A preparátum mélyedéseiben levő oldat beszárad, a kiemelkedő részek azonban kontrasztanyag–mentesek maradnak. Az ily módon megfestett és elektronszórása révén sötét háttérből kiemelkedő struktúraelemek “negatív kontrasztjuk” (fehér színük) révén jól elötűnnek és így térbeli alakjukra vonatkozó információkat nyerhetünk róluk a transzmissziós elektronmikroszkópban. Következésképpen, a negatív festés kiváló kontrolja lehet az ultravékony metszeteken látható sejtalkotóelemek tanulmányozásának, pl. a mitochondrium belső membránja, illetve a riboszómák szerkezete stb. esetében.

A fagyasztva töréses és fagyasztva maratásos technika

Az eljárás lényege az, hogy a lehető leggyorsabban megfagyasztott biológiai anyagot eltörjük és törési felszínéről platina (Pt) és szén (C) árnyékolt replikát (levonatot) készítünk,

amely a felületről leválasztva transzmissziós elektronmikroszkópban nézhető. Ezzel a módszerrel a sejtek belső, törési felszínei vizsgálhatók.

Az eljárás során a törés rendszerint a strukturálisan leggyengébb pontokon (pl. a membránok belsejében a bimolekuláris lipidréttegben következik be) következésképpen ezzel a technikával a biomembránok belsejéről olyan információk nyerhetők, melyeket nehéz, vagy lehetetlen metszetvizsgálattal nyerni. Ilyen pl. az integrális membránfehérjék (intramembrán részecskék, IMP) lokalizációjának feltárása. A replikáról készült kép a vékonymetszetből nyerhető 2 dimenziós képpel szemben térhatású. A módszerrel elvileg élő állapotban megfagyasztott anyagból is lehet replikát készíteni, ennek azonban nehézségei vannak. A fagyasztással járó térfogatváltozások ugyanis könnyen szétroncsolják a membránokat. Ezért az üvegszerű fagyást (vitifikáció) elősegítő krioprotektív anyaggal (pl. 30%-os glicerinnel) kell a biológiai anyagot átítani. A glicerinnel, kiváltva az élő sejt reakcióját, az eredeti állapottól eltérést okoz. Ezért előtte az esetek többségében glutáraldehid rögzítést használunk.

Az előkészítést követő munka lépései a következők:

1.) Az anyag fagyasztása folyékony nitrogénnel hűtött és cseppfolyósított gázban, leggyakrabban Freon-22-ben történik. Lényeges a fagyás minél nagyobb sebessége. A fagyasztás nem történhet közvetlenül folyékony nitrogénben, mert a mintától felmelegedő nitrogén a minta felszínét nem nedvesíti kellően és ezért buborékképződés közben forrni kezd. A keletkező nitrogén-gáz köpeny jelentősen lelassítja a fagyást. A freonban megfagyasztott anyagokat folyékony nitrogénben tároljuk.

2.) A törés és maratás. A fém tárgytartóba elhelyezett biológiai anyag a fagyasztva törő berendezés folyékony nitrogénnel hűtött tárgyasztalára kerül, ahol ezután zárt térben 10^{-6} torr nyomást (vákumot) hozunk létre, ami megakadályozza az anyagfelszín felmelegedését, és szükséges a Pt és C gőzöléséhez. A készülékbe egy speciális mikrotóm és egy fém, illetve szén-gőzölgető berendezés van beépítve.

A fagyasztott anyag törése a készülék folyékony N_2 -nel hűtött késével történik. A folyamat nem hagyományos értelmű metszés, a fagyott anyag törik, illetve hasad, így sajátos domborzati viszonyok keletkeznek a felületén. Ha erről a felszínről azonnal replikát készítünk, akkor fagyasztva töréses (freeze fracture) módszerről beszélünk, ilyenkor a membránokban futó lipidfázis törésfelületei tárulnak fel. Ha egy membrán citoszólhoz vagy a kariolimfához fagyott lemeze marad a minta felszínén, akkor a kapott felszínt P-felzínnek nevezzük. Ha ez a felszín törött le, és az organelum üregéhez, vagy az extracelluláris térhez fagyott lemez felszínét szemlélhetjük, akkor az illető membrán E-felzínéről beszélünk. Nem szabad elfelejteni, hogy ilyenkor a membrán lapjával párhuzamos hasadási, tehát nem a valódi, hanem egy mesterségesen hasított belső felszínt vizsgálunk.

Ha a felszínről 1–5 percig vizet (jeget) hagyunk szublimálni, akkor a törési felszín mellett a membránok valódi határfelületei is feltárulnak. Ez a fagyasztva maratásos (freeze etching) módszer. Így nem csak egyes membránok belső, hidrofób felszínei, hanem a citoszól, a kariolimfa vagy az extracelluláris tér, illetve az organelum ürege felé eső felszínei is részben feltárhatók.

3.) Az árnyékolás. A törést vagy maratást követően a kérdéses felszínre 45° -os szögből jövő Pt-gőzöket bocsátunk, melyek a hideg felszínen vékony filmmé csapódnak ki. A Pt film, mivel oldalról, ferde szög alatt érkezik, a felszín domborzati viszonyaitól függően rakódik le, nem egyenletes vastagságban az egész felszínen. A kiemelkedő struktúrák ellentétes oldalán Pt-árnyék, Pt-mentes területek is lesznek. Ezért a Pt-gőzölés után a felszínre felülről, 90° -os szögben szén gőzölünk egyenletes vastagságban. Így a felszínnek megfelelő domborzatú Pt-C hártát kapunk. Erről a replikáról a minta felolvasztása után Na-hipoklorittal lemaratható a biológiai anyag. A replika ezután mikrorostélyra szedhető és zsírtalanítás után azonnal vizsgálható. A Pt-árnyékolás miatt az elektronmikroszkópi kép térhatású.

HISZTOKÉMIAI ÉS CITOKÉMIAI ALAPISMERETEK

Bevezetés

A hisztokémia metodikai segédtudomány. Mindössze pár évtizedes múltra tekint vissza. A mikrotechnikából önállósult. Történetében az alapkövet L. Lisson 1936-ban megjelent "Histo-chemie animale: Methods et problems" c. munkája jelentette. Kialakulását majd továbbfejlődését alapvetően két tényező határozta meg. Az egyik a morfológiában fellépő funkcionális szemléletmód, a másik az a körülmény, hogy a sejt- vagy szövethomogenizátumok, sejtfrakciók biokémiai elemzéséből nem mindig derül ki, hogy bizonyos kémiai komponensek hol és hogyan, milyen sejtalkotórészekhez kötődve helyezkednek el, továbbá, hogy előfordulásuk milyen működési folyamatokkal kapcsolatos. A hiszto- vagy szövetcémia tárgya a sejtek, szövetek kémiai felépítésének és az alkotóelemek lokalizációjának feltárása. Amennyiben ez kizárólag a sejt szintjére vonatkoztatott a cito- vagy sejtkémiai elnevezést használjuk.

A hiszto- vagy citokémiai munka tulajdonképpen szövettani-sejttani preparátumokon végzett olyan kémiai-biokémiai eljárások alkalmazását jelenti, melyek egy adott, ismert mechanizmusú de legalábbis ismert specifitású reakció alapján alkalmasak a sejteket és a szöveteket felépítő makromolekulák vagy funkciók azonosítására, lokalizálására, azaz közvetlen vagy közvetett úton láthatóvá tételére. Az eljárások rendszerint kvalitatív, ritkábban kvantitatív információt eredményeznek.

A hisztokémia feladata kettős. Részben az egyes sejtkomponensek kémiai jellemzése és egymástól való elkülönítése, másrészt a kémiailag ismert komponensek *in situ* lokalizálása legalább sejtes vagy szubmikroszkópikus szinten.

A szűkebb értelemben vett vagy leíró hisztokémián a sejtek, szövetek makromolekuláit (fehérjék, poliszacharidok, nukleinsavak, lipidek), illetve anorganikus alkotóelemeit közvetlenül kimutató, direkt eljárásokat értjük. Funkcionális hisztokémián pedig a sejtek és szövetek működéséről, a bennük végbemenő folyamatokról felvilágosítást nyújtó, indirekt eljárásokat. Pl. ha az egyes enzimfehérjék azonosítására nincsenek specifikus fehérjekimutatási eljárásaink, az enzimreakciók helye azonban termékeik kémiai reakcióival láthatóvá tehető.

A hisztokémiai reakciókat megfelelően ellenőrzött körülmények között kell végeznünk, és számos kiegészítő eljárást kell alkalmaznunk, valamely reakció specifitásának ellenőrzésére. Ilyen, általánosan használt kontrol eljárások közé tartoznak a következők:

a.) Bizonyos anyagok szelektív extrakciója: ha többfajta anyagra specifikus módszert alkalmazunk, akkor külön-külön történő kioldásukkal ellenőrizhető lokalizációjuk.

b.) Szelektív blokkolási eljárások. Ezeket is akkor használjuk, ha az alkalmazott hisztokémiai eljárás többféle anyagra nézve lehet egyidejűleg specifikus, és el kell döntenünk, hogy közülük melyiket mutattuk ki. Ilyenkor egyes szóbjágható anyagfajták reaktív csoportjait festés előtt kémiailag átalakítjuk nem reagáló csoportokká.

c.) Enzimemésztési eljárások. Ezek lényege az, hogy a vizsgálati anyagunkat az adott reakció kivitele előtt, a kimutatandó vegyületet specifikusan bontó enzimmel kezeljük. Pl. az RNS festődés azonosítására egy párhuzamos metszeten a festés előtt RN-áz emésztést alkalmazunk, majd a két metszetet összehasonlítjuk.

d.) A szubsztrátmentes közegben történő inkubálást, valamint a specifikus gátlások módszerét enzimaktivitást kimutató eljárásokban használják, mint kontrol.

A hisztokémiai eljárásokat szükségképpen mindig valamilyen mikrotechnikai eljárás előzi meg. A kimutatásokat többnyire rögzített preparátumokon végezzük, de ismeretes egy sor olyan eljárás is, melyeket előnyösebb fixálatlan anyagból készült fagyasztott metszeten végezni (pl. egyes enzimek: glükóz-6-foszfátáz, dehidrogenáz, ATP-áz kimutatása).

A következőkben, a teljesség igénye nélkül, néhány különböző típusú makromolekula és anorganikus sejt-komponens hisztokémiai kimutatásának legáltalánosabban használt eljárásait ismertetjük.

A nukleoproteidek kimutatása

A nukleoproteidek fehérjékből és nukleinsavakból épülnek fel. A nukleinsavak hisztokémiai azonosítása részben a cukorkomponensük, részben pedig a purin és pirimidin bázisok ibolyántúli (UV) fényben mutatott jellegzetes abszorpciójuk alapján lehetséges. Fényelnyelési maximumuk 260nm. Az abszorpció kvantitatív mérése képezi az alapját az ún. Caspersson féle UV mikrospektrográfias nukleinsav kimutatási módszernek.

DNS–RNS együttes kimutatása metilzöld–pironin festéssel

A kimutatás elvi alapja az a fizikai tény, hogy a fenti két bázikus festék szelektíve kötődik a nukleinsavakhoz, mégpedig azok eltérő polimerizáltsági fokától függően. A metilzöld a magasabb polimerizáltsági fokú DNS-hez ($MT=1-8 \times 10^6$ dalton) kapcsolódik és azt zöldeskékre színezi, a pironin pedig ibolyáspirosra festi az alacsonyabb polimerizáltságú fokú RNS-t ($MT=10-100 \times 10^3$ dalton). Azok a hatások tehát, melyek a DNS depolimerizációját okozzák, a DNS tartalmú struktúrákat is pironinofillá teszik. A pironin RNS specifitásának ellenőrzésére ribonukleáz emésztést alkalmazhatunk.

A festés a legtöbb fixálószer használata után keresztülvihető, azonban ha ribonukleáz emésztést akarunk végezni, nem használhatók nehézfém-só (bikromát-, Hg^{++} , ozmium- stb.) tartalmú fixálók. Ezek ugyanis az RNS-el ribonukleáz–reazisztens komplexet képeznek. Némileg ellenáll a ribonukleáz emésztésnek a formalinban fixált szövet RNS tartalma is.

Míthogy kontrolált körülmények között (ionmilió, pH, hőmérséklet) a metilzöld sztöchiometrikusan kötődik a DNS-hez, a reakció morfolometriás úton kvantitatívva tehető. Ezt a lehetőséget azonban ritkán használják, szemben a Feulgen–reakció mennyiségi elemzésével.

Dezoxiribonukleáz kimutatás Feulgen–reakcióval

Az eljárás (ejtsd: fajlgen) az aldehidek kimutatására általánosan használt Schiff–reakciónak a dezoxiribóz kimutatására alkalmazott változata. A Schiff–reakció lényege az, hogy a kénessavval elszíntelenített fukszin (leukofukszin) amino–csoportjait ($R'-NH_2$) aldo–csoportokkal ($R-CHO$) $R-CH=N-R'$ típusú Schiff–bázissá kondenzálódnak, amely ismét színes (bíborszínű) vegyület.

A Feulgen–reakció mechanizmusa: enyhe savas hidrolízis (nHCl, 60 C°-on 10–60 perc) hatására a DNS molekuláról a purin bázisok (adenin, guanin) lehasadnak. A maradék polinukleotid, az apurinsav reagál a Schiff–reagensként használt leukofukszinnal, ugyanis a purinbázisok leválása után az eredetileg gyűrűs formában (furanóz) jelenlévő 2–dezoxiribóz molekulák aldehiddé alakulva válnak szabaddá és a szabad aldo–csoportok a leukofukszinnal színes végterméket képeznek.

A Feulgen–reakció végeredményeképpen kapott szín intenzitása függ a hidrolízis idejétől, hőfokától, pH-jától, erélyesebb hidrolízis alatt ugyanis a DNS fokozatosan depolimerizálódik.

A savas hidrolízis hatására szabaddá váló aldo–csoportok más aldehyd–reagensekkel (pl. ezüst–tükör–reakció) is láthatóvá tehető, másrészt az aldehyd reakcióbeli szerepe aldehyd–blokkolókkal (lásd PAS reakció leírása) igazolható.

A Feulgen–reakció, kontrolált körülmények között specifikus a DNS-re. Az RNS ugyanis enyhe savas hidrolízis során nukleozidokra vagy kisebb egységekre bomlik, melyek a festés során kioldódnak a metszetekből. Az eljárás mikrofolmetriás méréssel kiegészítve alkalmas a sejt-mag DNS tartalmának viszonylagos mennyiségi meghatározására és megfelelő módosításokkal elektronmikroszkópos citokémiai célokra is.

Az ún. Feulgen–Schiff–tallium–etilát-os módszer azon alapul, hogy a hidroxilamin és DNS hidrolízisével feltárt aldo–csoportok kapcsolódásakor keletkező $R-CH=N-OH$ típusú aldoxim másodlagosan nagy elektronszórású termék alakítható, mégpedig az aldoxim szabad $-OH$ csoportjainak Tallium–etiláttal történő reagáltatásával. A reakció cserebomlás, a tallium az

aldoxim –OH csoportjával képez alkoholátot, míg az etanol felszabadul. Az eljárás igen nagy érzékenységű és specifikus a DNS-re nézve, amit dezoxiribonukleázzal emésztett kontrol metszetekkel lehet igazolni. Ilyenkor nem kapunk reakcióterméket a DNS helyén.

A DNS elektronmikroszkópos kimutatásának további lehetősége a Feulgen–ezüst reakció. Ennek során a savas hidrolízissel nyert szabad aldo–csoportokat ezüst tartalmú aminokkal (pl. az ezüstnek hexametilén–tetraminnal képzett komplexsze, az Ag–meténamin), illetve valamilyen protein–fém komplexszel (pl. tioszemikarbazid–ezüst proteinát) reagáltatják. A keletkező ezüst–tartalmú reakciótermék kontrolált körülmények között szelektíve jelöli a DNS-t.

A DNS elektronmikroszkópos kimutatása előtt nem szabad ozmiumsavban fixálni a biológiai anyagot, mivel az reakcióba lép az aldehidek azonosítására használt reagensekkel. A glutáraldehidben történő fixálást is lehetőleg kerülni kell, mert a fehérjéhez kötődött rögzítő szabad aldo–csoportjai festődésüknél fogva aspecifikus reakciótermékek keletkezését eredményezik. Ez azonban kontrol eljárásokkal kiszűrhető. A legmegbízhatóbb eredményt a formalinban rögzített anyagokban kapunk.

A ribonukleinsav kimutatása

Az RNS fénymikroszkópos hisztokémiai kimutatására leggyakrabban bázikus festékeket (pl. toluidinkék, pironin, metilénkék stb.) alkalmaznak. A toluidinkék savas közegben (pH 2.7–4.5) specifikusan kötődik a nukleinsavakhoz. A pH növelésével azonban más anyagok is megfestődnek. A bazofiliáért tehát az alkalmazott pH-tól függően, vagy az RNS tartalmú komponensek, vagy pedig savanyú fehérjék, illetve savas proteoglikánok felelősek.

A reakció RNS specifikusának ellenőrzése ribonukleáz emésztéssel történik. Festés előtt a metszeteket 0.1%-os RN–áz vizes oldatával cseppentjük le és 37C°-n 30 percig inkubáljuk. A ribonukleáz emésztés után az RNS tartalmú komponensek bazofiliája eltűnik, vagy jelentősen gyengül, az egyéb komponensek bazofiliája pedig változatlan marad.

Pironinnal történő festés után az RNS–tartalmú komponensek bazofiliája (pironinfília) szintén megszüntethető ribonukleáz emésztéssel.

Tekintve, hogy egy adott sejt citoplazmájának bazofiliája egyenes arányban áll az RNS tartalommal (riboszómák), a toluidinkékkel vagy pironinnal történő festés eredményéből következtetni lehet a sejttípus fehérjeszintézisének intenzitására.

A szénhidrátok kimutatása

Az állati szervezetben előforduló szénhidrátok, illetve szénhidráttartalmú anyagok közül hisztokémiailag legfontosabbak a poliszacharidok, a glikoproteidek, valamint glikolipidek.

A poliszacharidok főleg tartaléktápanyagok, a növényekben pedig a sejtfalak anyagai. Az állati szervezetben előforduló legismertebb intracelluláris poliszacharid a glikogén, a növényekben pedig a keményítő.

A poliszacharidok külön csoportját képezik a nitrogént (aminocukrokat) tartalmazó glikoz-amino–glikánok, régebbi nevükön mukopoliszacharidok. Ezeknek két, kémiai összetételüket tekintve is eltérő csoportját szokás megkülönböztetni, mégpedig a savanyú, illetve a neutrális mukopoliszacharidokat. A glikozamino–glikán oldalláncot viselő glikoproteideket nevezik proteoglikánoknak.

Az állati sejtek felszínét borító sejtköpeny (glycocalyx) glikoproteidjei citokémiai szempontból igen nagy jelentőségűek. A glycocalyx glikoprotein–komponenseire jellemző, hogy molekulatömegük kicsi, a baktériumokban és az állati sejtekben egyaránt előforduló szialinsavat (N–acetylneuraminsav) tartalmazza, uronsavak viszont nem találhatók benne. A sejtköpeny tanulmányozása méreteinél fogva (10–20 nm vastag) kizárólag elektronmikroszkóppal lehetséges. Az ilyen vizsgálatok jelentősége egyre nő, mivel a glicocalix tartalmazza a sejtfelszíni receptorokat, melyek a külvilág szabályozó anyagaival (ligandumok: hormonok, immunanyagok, endocitózis induktorok stb.) igen specifikus kötést létesítve közvetítik a szabályozó hatásait a sejt számára.

A glikolipidek zsírsavból, szfingozinból és cukrokból álló vegyületek. Hisztokémiailag legjelentősebbek a plazmamembrán és a lizoszómák glikolipid komponensei. Legnagyobb mennyiségben az idegszövetben található glikolipidek (cerebrozidok).

A PAS (Periodic–Acid–Schiff) reakció

Alapelve hasonló a Feulgen–reakcióhoz: az oxidálással képzett aldocsoportokat Schiff–reagenssel tüntetjük fel.

A reakcióban használt perjódsav (HJO_4) szelektíve oxidálja az 1,2–glikol–, az 1–hidroxil–2–amino–, az 1–hidroxil–2–alkilamino és az 1–hidroxil–2–keto csoportokat, továbbá a telítetlen zsírsavakat. Ezek közül legfontosabb az 1,2–glikol csoporttal (pl. a heparinban és a porc alapállományának chondroitin–szulfátjában).

A perjódsav jelentősége egyéb oxidálószerrel szemben nemcsak specifitása, hanem az is, hogy kontrolált körülmények között a keletkező aldo–csoportokat nem oxidálja tovább, így azok aldehid reagenssel (Schiff–reagens) kimutathatók. A perjódsavval kémiaiilag reagáló kismolekulájú anyagok, mint pl. aminosavak (szerin, treonin, hidroxiprolin stb.) adenilsav, ATP stb. a festés alatt kimosódnak, és nem adnak hisztokémiai reakciót. Nagy részük koncentrációja nem is éri el a szövetekben vagy sejtekben a láthatóvátételhez szükséges, ún. hisztokémiai küszöbértéket. A fehérjékbe beépült aminosavak szintén nem adnak PAS–reakciót. Pozitív PAS–reakciót adó vegyületek a következők: minden poliszacharid és poli vagy oligoszacharid–tartalmú vegyület, kivéve a savas mukopoliszacharidokat és mukoproteineket, egyes telítetlen lipidek: foszfolipidek és lipoproteinek. A PAS–pozitív reakciót adó anyagok kémiai azonosítása specifikus kontrol eljárásokkal történik. Ilyenek lehetnek:

a.) Lipidextrakció: a PAS–reakció kivitele előtt, abból a célból, hogy a lipidtartalmú vegyületeket kizárjuk a reakcióból. Az extrakció a párhuzamos metszetek egyikének meta–nol:kloroform=1:1 arányú keverékében való inkubálással történik 60°C -on 48 óra hosszat.

b.) Enzimemésztési eljárások: valamely hidrolizálható PAS pozitív komponensnek a reakcióból való kizárása céljából. Például a glikogén PAS pozitívitasának specifitása amiláz–emésztéssel ellenőrizhető. A kontrol metszeteket a PAS–reakció kivitele előtt 0.02 M-os foszfátpufferben (pH=6.0) oldott 0.1%-os amilázzal inkubáljuk 37°C -n 60 percig. Ezalatt a glikogén vagy keményítő kioldódik a metszetből. Az ezután is PAS–pozitívnek megmaradó helyek más anyagot tartalmaznak. A párhuzamosan festett metszeteket összehasonlíthatjuk az emésztésnek alávetetttel és az eredményekből következtethetünk a glikogén jelenlétére és lokalizációjára.

c.) Blokkolási eljárások alkalmazása: például annak igazolására, hogy a perjódsav specifikusan vicinális hidroxil–, illetve hidroxil–amino csoportokat oxidál–e vagy mást. A fenti csoportok acetilálás után perjódsavval nem reagálnak.

A glikogén PAS–reakcióval történő kimutatásánál és az eredmények kiértékelésénél igen fontos figyelembe venni a rögzítés körülményeit. A kémiai fixálószer szövetekbe való behatolása során megváltozhat a glikogén sejteken belüli eloszlása. A glikogén szemcsék főleg az alkoholtartalmú rögzítőszer behatolásával egyirányban elmozdulhatnak és a sejtek ellenkező oldalán összecsapzódnak. Ezenkívül a fixálószer sejtekbe való behatolásáig a glikogenolitikus folyamatok nagy intenzitása miatt a rögzített szervdarabka középső részein a glikogén bomlásával kell számolnunk. Vizes fixálószer alkalmazásakor fennáll a glikogén kioldódásának veszélye is és így téves negatív reakciót kaphatunk. Ezért a számunkra ismeretlen anyag glikogéntartalmának és lokalizációjának biztos megítéléséhez célszerű a vizsgálandó anyagmintát a lehető leggyorsabban rögzítőbe vinni és egyidejűleg többféle rögzítőszerrel használni, másrészt a vizsgálandó anyagot és valamely, glikogéntartalmára és megoszlására nézve már jól ismert szövetet (pl. máj, izom) párhuzamosan kezelni a fixálás és a PAS–reakció kivitelezésekor. A PAS–pozitív anyag hiánya vagy jelenléte és/vagy lokalizációja a kérdéses szövet sejteiben az ismert anyaggal való összehasonlítás alapján állapítható meg. Ha a kontrol metszeteken is negatív eredményt kapunk, akkor a fixálás

körülményein kívül, elsősorban a reakciókörülményeket kell felülvizsgálni. (Ilyen és hasonló megoldásokon alapuló eljárásokat alkalmazhatunk bármely hisztokémiai reakció megbízható értékeléséhez, főleg olyan kimutatások esetében, melyeknél nagy a hibalehetőségek száma.)

A PAS-pozitivitás helyes értelmezéséhez megengedhetetlen, hogy a perjódsav akár csak nyomokban is az anyagunkban maradjon, mert az mint oxidálószer később visszaszínezhetheti a Schiff-reagenst és téves pozitív reakcióhoz vezet. Ezért a metszeteket a perjódsavas oxidálás után alaposan ki kell mosni.

Hasonlóan a Feulgen-reakcióhoz megfelelő módosításokkal lehetőség van a PAS pozitív anyagok elektronmikroszkópos kimutatására is, amely legelterjedtebben az ún. "PA-Silver" reakcióval történik. Az eljárás során a perjódsavas fixálással nyert szabad aldo-csoportokkal AG-metánamin reagáltatunk a Schiff-reagens helyett. A metszeteket 3%-os frissen készített metánamin + 5%-os AgNO₃ + 5%-os Na-tetraborát oldatában "festjük" szabad szemmel barnulásig (40–60 perc). Előtte legelőnyösebb neutrális formalinban fixálni az anyagot.

A poliszacharidok elektronmikroszkópos kimutatása

Kimutatásukra a hozzájuk specifikusan kapcsolódó, nehézfémion tartalmú reagensek egész sora alkalmas, minthogy a kapcsolódás következtében létrejövő termék elektronenzitásánál fogva könnyen felismerhető. Legismertebb általános poliszacharid-festő a foszforwolframsav. Nagy előnye, hogy csapadékának szemcsemérete igen kicsi, ezért relatíve kis mennyiségben előforduló poliszacharidok esetében is igen pontos lokalizációt tesz lehetővé. Említésre méltó, a fénymikroszkópiában pektinfestőként közismert, kis móltömegű polikationként viselkedő vegyület, a ruténium vörös, amely elektrosztatikusan nagy specificitással kötődik a polianionokhoz, közöttük a szialoglikoproteinekhez. Közismert továbbá a kolloidális lantán vegyületek (La-III-oxid, LA(KMnO₄)₃ stb.) intracelluláris tért festő tulajdonsága. A szoros sejtkapcsolatok kivételével mindenütt kötődnek a sejtek felszínét borító glycocalyx anyagához, a vele való "festődés" mechanizmusa azonban nem ismert.

A szénhidrátok metakromáziás festése

A metakromázia az a jelenség, amikor egy színezék valamely struktúrát önszínétől eltérő színben fest meg. Ennek mechanizmusa a struktúrában lévő negatív gyökök periodikus felületi elrendeződésén alapul. Metakromáziában a legkülönbözőbb vegyületek festődhetnek. Legintenzívebben a periodikusan szulfát-csoporttal rendelkező makromolekulák, köztük pl. a savas glikozamino-glikánok adják a reakciót. A metakromáziásan festődő poliszacharidok identifikálására hialuronidáz emésztést alkalmazunk, melynek hatására depolimerizálódnak és elvesztik metakromáziájukat.

Lipidek hisztokémiai kimutatása

A lipidek (lipoidok) a sejten belül mikroszkópikus nagyságú cseppek formájában, mint ún. szabad lipidek, vagy pedig a biomembránok komponenseiként fordulnak elő, mint kötött lipidek. A kötött lipidek hisztokémiailag nem mutathatók ki, mert vagy diszperzitásuk foka miatt részecskéik mérete nem haladja meg a fénymikroszkóp felbontóképességét, vagy fehérjékkel való kapcsolatuk gátolja a kimutatásukat. A szabad lipidek többsége fénymikroszkóppal, élő sejtekben is jól elkülöníthető a citoplazma egyéb részeitől, mivel cseppeket alkot, vagy vakuólákban halmozódik fel.

Primer lumineszcenciás lipidkimutatás

Az eljárás azon alapul, hogy egyes lipidek, mint pl. a lipofuszin, valamint egyes szteroidok és az A-vitamin autolumineszcenciával rendelkezik.

Lumineszcenz festékekkel történő lipidkimutatás

A módszer az alkalmazott zsírolédkony lumineszcenz festékek (rhodamin, pironin, fosphin 3R, koffeinos benzinprén stb.), nagy lipidoldékonysága miatt igen nagy érzékenységgű. Így

alkalmazásukkal olyan helyeken is kimutathatók lipidek, ahol más módszerekkel nem sikerül. A kvarckondenzorral és ultraibolya fényforrással felszerelt lumineszcenciás mikroszkópban vizsgált metszetek (autolumineszcenciával rendelkező vagy lumineszkáló festékekkel festett) lipidtartalmú részei meghatározott, a lipid koncentrációjától függő színben (sárgás–fehértől a kékes–zöldig) azonosíthatók. Nagyobb koncentráció esetén a színeződés a nagyobb hullámhossz felé tolódik el. Az eljárás alkalmas relatív mennyiségű megállapítások vagy következtetések levonására is.

Lipidkimutatás festékek segítségével

A lipidek hisztokémiai kimutatásában rutinszerűen használt módszerek azon alapulnak, hogy az ún. zsírfestő anyagok megoszlási hányadosa a festékek oldószere és a lipidek között kifejezetten az utóbbiak számára kedvez. A zsírfestékek alkalmazásával azonban nem különíthetők el egymástól a különböző szerkezetű lipidek, azok festődésében jelentkező színárnyalatbeli különbségek csak az oldódási viszonyok (megoszlási hányados) kis különbségéből adódnak. Így a szerkezetileg igen különböző lipidek festődése azonos is lehet. A leggyakrabban használt zsírfesték a Szudán–fekete, illetve a Szudán–vörös festékcsalád (Szudán II.B, IV.B, VII.B). Zsírfestésre a Szudán festékek 70%-os etanolban oldott, telített oldatát használjuk. A Szudán–fekete festési skálája nagyobb, a legtöbb lipid kimutatására alkalmas, feltünteti a plazmamembránt is.

A lipidek fixálására általában formalint használunk, ami azonban nem tekinthető teljesen közömbösnek, mivel a lipidek egy része főleg a foszfolipidek, formalinban történő fixálás alatt is kioldódhatnak a vizsgálandó anyagból. A kioldódás csökkentésére használjuk az ún. formalin–kalcium fixálást. A Ca^{++} -ionok a molekulák közti hidkötések révén már igen kicsi (0.5–1.0%-os) koncentrációban is megakadályozzák a lipidek oldatba menését. Hasonló hatású a Cd^{++} és a Co^{++} -ionok rögzítőszerben való jelenléte is.

Enzimek hisztokémiai kimutatása

A hisztokémia fejlődésében külön fejezetet nyitott a hidrolitikus enzimek kimutatására szolgáló eljárások felfedezése, amely elsősorban a magyar Gömöri György nevéhez fűződik. Gömöri és vele egyidőben, de tőle függetlenül a japán Takamatsu, 1939-ben közölte a lúgos foszfátázok hisztokémiai azonosítására szolgáló eljárást. (Bizonyos oxidatív enzimek kimutatásának lehetőségeire már Lisson 1936-ban megjelent könyvében is találunk utalásokat.)

Az enzimcitokémiai eljárások jellegüket tekintve indirekt technikák azaz, az eljárások során nem magukat az enzimfehérjéket mutatjuk ki, hanem azok aktivitásából következtetünk előfordulásukra. A kimutatások célja valamely struktúrához kötött működésre való következtetés. Minthogy az enzimcitokémiai reakciókat a sejt egy bizonyos specifikus struktúrájára (pl. egyes organellumra, plazmamembránra stb.) vonatkoztatjuk, vagyis az enzimek élő sejtekben lévő hovatartozásának, elrendeződésének (lokalizációjuknak) legmegbízhatóbb megítélésére törekszünk, azt mondjuk, hogy specifikus cito–topobiokémiai reakciókat végzünk.

Az enzimek kimutatásának alapjai

Az enzimcitokémia alapja az, hogy az adott enzimreakció termékei vagy azok egyike olyan reakcióba vihetők, hogy belőlük a keletkezésük, vagyis az enzim aktivitásának a helyén, azonnal keletkezzen oldhatatlan és lehetőleg fény–, illetve elektronmikroszkópban látható csapadék.

A szubsztrátból keletkező termék önmagában, keletkezési formájában is lehet oldhatatlan vegyület, más esetekben az ún. lecsapó reagenssel képez csapadékot. Ez utóbbi vagy maga a végtermék, vagy pedig olyan köztes termék, amely további reakciókkal tehető fény– vagy elektronmikroszkópban észlelhető végtermékké.

Amennyiben a végtermék nehézfémionokat tartalmaz, az enzimaktivitás vizsgálata egyúttal elektronmikroszkóposan is lehetséges.

Az enzimkimutatáshoz az enzimműködés számára mesterségesen biztosítunk megfelelő közeget (inkubáló oldatot), mely az enzim szubsztrátumát, a megfelelő pH-t biztosító pufferoldatot, az enzimreakcióhoz szükséges anyagokat (pl. ionok, koenzimek), valamint ha szükséges, a kicsapóreagenst tartalmazza. Az enzimreakció hőmérsékleti optimumán tartott inkubáló oldatba helyezük a vizsgálandó anyag fagyasztott-, fagyasztva szárított- vagy szövetszeletelővel készített metszeteit. A reakció optimális idejét szervenként empiriával határozzuk meg.

Az enzimek kimutatásához szükséges, hogy azok a szükséges minimális mennyiségben, a hisztokémiai küszöbérték feletti koncentrációban legyenek jelen a sejten. Ez alatt az a legkisebb enzimaktivitás értendő, amely az alkalmazott eljárással mikroszkópikusan érzékelhető mennyiségű terméket hoz létre.

A mindennapos gyakorlatban ez azt jelenti, hogy enzimműködés következtében a citokémiai reakció során létrejött reakciótermék (csapadék) szemcsemérete eléri az alkalmazott mikroszkópfajta felbontóképességét. A csapadék szemcsemérete viszont molekuláinak egyedi átmérőjétől, a molekulák összmennyiségétől és egy területegységre eső számától függ. A citokémiai küszöbértéket az enzimaktivitás termékének diffúziója is befolyásolja. A kedvező küszöbérték eléréséhez szükséges, hogy az enzim által átalakított szubsztrát termékei keletkezési helyükön azonnal oldhatatlan csapadékot képezzenek. Ezekből a kicsapóreagenst mindig nagy feleslegben kell alkalmazni. Továbbá követelmény az is, hogy az adott enzim se diffundáljon vagy inaktiválódjon a kimutatási eljárás alatt.

A fentiek alapján könnyen belátható, hogy az enzimkimutatási eljárások reakciókörülményeinek és a műtermékek képződési lehetőségeinek ismerete igen fontos. Hogy megbízhatóan meghatározhassuk azt, hogy a kapott reakciótermék eloszlása mennyiben felel meg a vizsgált enzim élő sejten belüli lokalizációjának, minden esetben kiegészítő, kontrol eljárásokat kell végezni.

Az enzimecitokémiai eljárások és a műtermékképződés

A legtöbb hamis eredményt a fixálatlan vagy elégtelenül rögzített anyagokban történő kimutatáskor kapjuk. A fixálás tehát alapvető fontosságú. Rögzítéskor az enzimfehérjéket aktív, struktúrához kötött állapotban kell megőriznünk. A rögzítőszernek tehát biztosítani kell az enzimek azonnali irreverzibilis immobilizációját, de nem szabad őket inaktiválnia. A fixált anyagok enzimaktivitása a rögzítést követő eljárások alatt rendszerint csökken. Ez a csökkenés az enzimfehérjék oldható funkciójának kioldódásából vagy részleges inaktivációjából adódik. A veszteség mértéke függ az adott faj, sejtípus, illetve a fixálóreagens sajátosságaitól.

Enzimkimutatási reakciók előtt rögzítőszerként legelterjedtebben aldehidek használatosak (formaldehid, glutáraldehid), mégpedig semleges pH-ra pufferelt oldatok formájában. Az enzim molekulák azonnali immobilizálása érdekében fontos, hogy a fixálószer gyorsan penetráljon. A glutáraldehid penetrációját di-metil-szulfoxid (DMSO) hozzáadásával lehet gyorsítani. A fixálás ideje minden esetben a rögzítendő szervdarabka minőségének és méreteinek, valamint a rögzítő anyagának függvénye. A fixálási idő növekedésével azonban az enzimek aktivitása csökkenhet. Egy-két órás rögzítéssel általában még nem okoznak lényeges aktivitásbeli veszteséget, az idő további növelésével viszont rendszerint egyenes arányban nő az enzimveszteség, kb. 24–48 óráig.

A tapasztalatok szerint, ha a fixálást követően megfelelő összetételű gumiarabicum-szacharóz tartalmú vagy más kimosóoldatban tartjuk az anyagot megfelelő ideig, bizonyos enzimek fokozatosan reaktíválódnak. Ez esetekben néhány órás vagy néhány napos kimosást kell alkalmazni.

Az enzimcitokémiai eljárások eredményét a mikrotechnikai eljárások is befolyásolják. Ha pl. a fagyasztott blokkban nagy jégkristályok keletkeznek, ezek roncsolják az organelláris membránokat, sőt a plazmamembránt is. Ez pedig ahhoz vezet, hogy az eredetileg membrán által körülvevett térben lévő enzimek eldiffundálnak és rendellenes helyen lesznek kimutathatók, azaz műtermék keletkezik. Ezért lényeges, hogy az anyag igen gyorsan fagyjon meg, és metszés közben ne legyen kitéve ismételt felengedésnek és megfagyásnak. Ezért a gyorsfagyasztó termoelektromos, esetleg kriosztátos eljárásokat célszerű alkalmazni az enzimcitokémiában. Teljesen elkerülhető a fagyasztás a szövetszeletelő alkalmazásával. Ezt azonban csak elektron–citokémiai célból használhatjuk, mivel az így készült szeletek túl vastagok fénymikroszkópi célra, viszont műgyantába ágyazás után kiváló elektronmikroszkópi metszetek készíthetők belőlük.

Az indukáló közeg pH-jának a kimutatandó enzim pH–optimumával megegyezőnek vagy azonosnak, stabilnak kell lennie az inkubálás egész ideje alatt. A pH–eltolódás megváltoztatja az átalakítási, illetve a köztes– vagy végtermék oldékonyságát, és azok diffúziójából eredően hamis eredményre vezet. Az inkubáló oldatnak az enzimműködés hőmérsékleti optimumán tartása igen fontos. Nem megfelelő hőmérsékleti viszonyok mellett az enzimaktivitás csökken, a reakció időben elhúzódik és az enzimmolekulák vagy pedig a termékek diffúziója következik be.

A szubsztrátumnak az adott enzimfehérjére nézve specifikusnak kell lennie és nem szabad spontán lebomlania. A szubsztrátum spontán hidrolízise aspecifikus csapadék kialakulásához vezet.

A reakciótermékekkel szemben fontos kívánalom, hogy a keletkezési helyén azonnal oldhatatlan csapadék formájában váljon ki, az összes utókezelés során őrizze meg stabilitását, vagyis ne diffundáljon, vízben és szerves oldószerekben oldhatatlan maradjon, az elektronmikroszkópos kimutatások esetében pedig ellenálló legyen a lúgos vegyhatású kontrasztosító anyagok és az elektronsugarak hatásának. A reakció köztes– vagy végtermékének ezen kívül nem lehetnek olyan poláros csoportjai, melyek más struktúraelemhez specifikusan kötődhetnek. Minden ellenkező esetben téves lesz az eredmény.

Az enzimreakciók specificitásának ellenőrzése

A kontrol eljárások számos fajtája ismeretes:

- a.) szubsztrátum–mentes közegben való inkubálás az enzim szubsztrátum specificitásának ellenőrzésére;
- b.) az enzimfehérjék hővel történő denaturációja, mégpedig az inkubálás előtt, az enzimaktivitástól független specifikus reakciók kizárására;
- c.) specifikus gátlási eljárások az enzimspecificitás igazolására. Például a savas foszfatázok citokémiai azonosításakor NaF-dal történő előkezelés. A NaF a lizoszómális savas foszfatáz erős specifikus inhibitora, míg a lúgos foszfatázok NaF rezisztensek. A lúgos foszfatázok azonosítása viszont az ő specifikus inhibitoraikkal (cisztein, alfa–fenil–alanin stb.) vagy KCN-dal történő előinkubálással, illetve az inhibitorok egyikének az inkubáló keverékhez való hozzáadásával lehetséges. Ha a specifikus inhibitorral történt inkubálás után is kapunk citokémiai aktivitást, akkor az más enzimtől ered.

Az enzimek hisztokémiai jelentőséggel rendelkező csoportjai

I.) A hidrolázok: hidrolitikus reakciókat katalizálnak. Szubsztrátum–specificitásuk alapján a következőképpen osztályozzuk a hidrolázokat.:

A.) Észterázok: észterkötéseket hidrolitikus úton hasító enzimek. Az észteresítő savgyök szerint osztályozzuk őket.

1.) Acetil–észterázok: az ecetsav észtereit (acetátokat) bontó enzimek. Az acetátészterázok hisztokémiaileg elkülöníthető csoportjai:

- a.) alkilészterázok: N–mentes alkoholok acetátjait hasító enzimek;

b.) *kolinészterázok*: melyek szubsztrátumai a kolin észterei. Ide tartoznak az acetilkolinint specifikusan bontó ún. specifikus kolinészteráz és az egyéb kolinésztereket hidrolizáló nem specifikus kolinészterázok.

2.) Zsírsvészterázok (lipázok): az 5-nél nagyobb szénatomszámú zsírsavak észtereinek hasítói;

3.) Foszfátázok vagy foszfoészterázok: a foszforsav észtereit bontó enzimek.

– foszfo-monoészterázok, melyeknek fontosabb hisztokémiai csoportjai pH-optimumuk alapján a következők:

a.) *lúgos foszfatázok*, pl. a hexóz-2-foszfatáz;

b.) *neutrális foszfatázok*, pl. a glükóz-6-foszfatáz;

c.) *savas foszfatázok*, pl. a mononukleotidokat bontó nukleozid-5'-foszfatáz vagy a foszfoproteinek foszfát-észter-kötéseit hidrolizáló savas foszfoprotein-foszfatáz stb.

A kémhatásra vonatkozó megjelölés mindig az enzimreakció pH-optimumára vonatkozik.

– foszfo-di-észterázok, pl. RN-áz, DN-áz;

– pirofoszfatázok, pl. a Golgi komplexum cisz membránjaira jellemző tiamin-pirofoszfatáz vagy ATP-áz;

4.) Szulfatázok, a kénsav észtereinek hidrolizálói, pl. aril-szulfatáz; fenol-szulfátokat bont.

5.) Hialuronidázok, specifikusan a hialuronsav észtereit hasító enzimek;

6.) Glikozidázok: a glikozidos kötések hidrolizáló enzimek, pl. amiláz, alfa-glikozidáz, N-acetil-glükóz-aminidáz stb.

B.) Más kötések, pl. peptidkötéseket bontó hidrolázok (peptidázok proteinázok) hisztokémiailag kevésbé jelentősek.

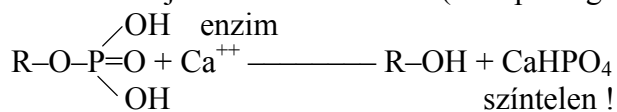
C.) A hidrolázok kimutatásának kémiai alapjai

A hidrolitikus enzimek kimutatására szolgáló eljárások két formája ismeretes. Vagy a szubsztrátumról enzimatikusan lehasított savmaradék ionokat tesszük láthatóvá, vagy pedig szubsztrátum-maradékot, amely leggyakrabban alkohol vagy fenol típusú vegyület. A kétféle eljárás lényegét a foszfatázok kimutatására használt reakciók alapján ismertetjük.

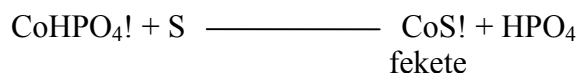
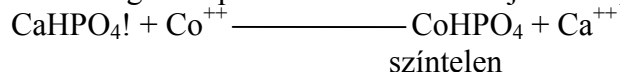
A Gömöri-féle nehézfém-sós módszerek a szubsztrátumról lehasított foszfát- vagy szulfát-ionok láthatóvátételén alapulnak. Pl. a lúgos és savas foszfatáz kimutatási eljárásokhoz rendszerint Na-béta-glicerofoszfátot használunk szubsztrátumként.

a.) Lúgos foszfatáz kimutatása Gömöri-féle módszerrel

Az eljárás lényege az, hogy az enzim hatására lehasadó foszfátionok az inkubáló keverékben jelenlévő Ca^{++} ionok (lecsapóreagens) hatására $CaHPO_4$ formájában válnak ki:



A keletkezett $CaHPO_4$ -ot a továbbiakban mikroszkópban látható terméké alakítjuk. Ebből a célból a metszeteket valamilyen Co-II só oldatával, majd $(NH_4)_2S$ -dal kezeljük (oldhatósági különbségen alapuló cserebomlások zajlanak le):



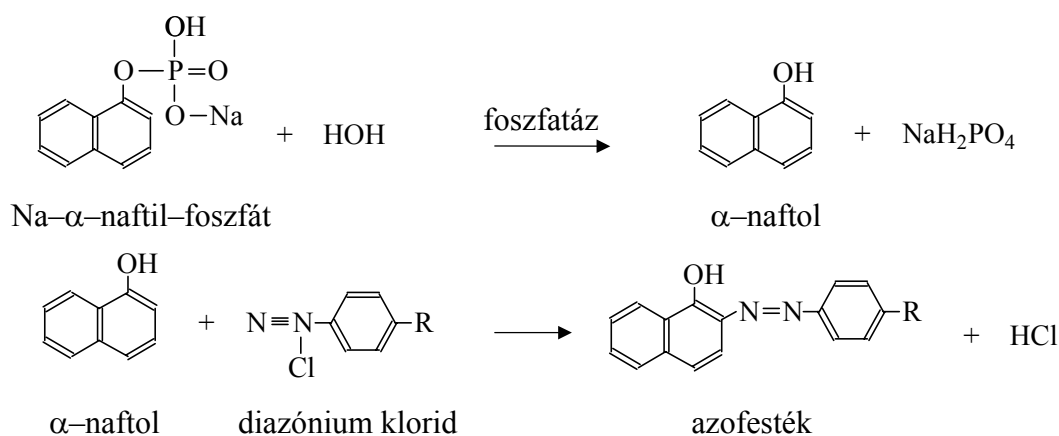
Az enzim aktivitásának helyein tehát végeredményben kékes-fekete színű CoS csapadék képződik. Egy másik lehetőség szerint a $CaHPO_4$ ezüstfoszfáttá alakítható, majd az utóbbi reakció útján fémezüstté. A CoS nehézfémion tartalmánál fogva EM-os kimutatásra is alkalmas. Figyelembe kell azonban venni, hogy a CoS kismértékben ozmiumsavban oldódik, ezért kontrollként ozmiumsavas utófixálás nélküli preparátumot is kell használni.

b.) A savas foszfatázok Gömöri-módszerrel történő kimutatása abban különbözik a fentiektől, hogy a lehasított foszforsav-maradékot Pb-ionokkal kötjük meg. A keletkezett ólomhidrogénfoszfát fénymikroszkópos láthatóvá tétele ugyancsak $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ -dal történik, a reakció végtermékeként pedig sötétbarna vagy barnásfekete színű PbS csapadékot kapunk. Elektronmikroszkópos kimutatás esetén az $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ -dal történő átalakítás értelemszerűen elmaradhat, hiszen a PbHNO_4 is elektronszóró csapadék. A savas foszfatázok Gömöri-féle reakcióval történő kimutatása alkalmas a lizoszóma-enzimek fény- és elektronmikroszkópos lokalizálására egyaránt.

c.) Glükóz-6-foszfatáz kimutatása Gömöri-féle módszerrel. A kimutatás azon alapul, hogy a szubsztrátumról lehasított foszfát ionokat az inkubáló médiumba vitt $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ fémionjai csapják ki, mégpedig ólomhidrogénfoszfát keletkezése közben. A fénymikroszkópos láthatóvátétel az ólomfoszfát $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ -dal történő reagáltatására alapul. A kialakuló PbS csapadék a fénymikroszkópos láthatóvá tétel az ólomfoszfát $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ -dal történő reagáltatásán alapul, mégpedig ólom-hidrogén-foszfát keletkezése közben. A kialakuló Pb csapadék sötétbarna, barnás-fekete színe jelzi az enzimaktivitás helyeit. A módszer alkalmas az enzim elektronmikroszkópos kimutatására is. A glükóz-6-foszfatáz reakció, szemben a savas és lúgos foszfatázok kimutatásával, csakis fixálatlan anyagból készült metszeteken mutatható ki. Az enzimet még az igen kíméletes hatású aldehid-fixálók is teljesen inaktíválják. Az inkubálás pH optimuma 7.6.

A szubsztrátmaradék láthatóvátételén alapuló enzimkimutatási eljárásokat az ún. azofestékes módszerek példáján keresztül ismertetjük.

Ezekben az eljárásokban fenolos hidroxilok észtereit (pl. Na-alfa-naftil-foszfát) használjuk szubsztrátumnak, és így enzimreakcióban a sav mellett az észterből fenol típusú termék (példánkban az alfa-naftol) keletkezik. Ezt a fenol típusú vegyületet az inkubáló oldatba vitt diazónium sóval (pl. orto-aminotoluol-diazónium-klorid=Fast Garnet) azofestékké alakítjuk. A reakció elvi alapja az, hogy a fenolos hidroxilt tartalmazó vegyületek (miként a magban szubsztituált aminok is) diazónium sókkal kapcsolási reakcióba vihetők. A reakció végterméke a savanyú azofesték, amely rossz vízdékonyságánál fogva az enzim aktivitásának helyét jelzi, élénk színénél fogva pedig jó fénymikroszkópos azonosítást tesz lehetővé. α



A kimutatásnál figyelembe kell venni, hogy általában minden diazónium só vagy bomlásterméke bizonyos mértékig gátolja a legtöbb enzim működését. A reakció használhatósága függ az aromás mag szubsztituenseitől is, ezek befolyásolják a kapcsolási reakció sebességét, a hasítási és végtermékek oldhatósági viszonyait, ezért kontrollként többféle szubsztrátumot (naftol-AS-típusú vegyületek), illetve hasonló okokból többféle diazóniumsót (Fast-Blue B, Fast Red, hexazotizált para-rozanilin stb.) célszerű használni.

Az azofestékes módszereket több szempontból előnyösebbnek tartják a Gömöri típusúnál. A szubsztrátum bontása gyors, a keletkező azofesték adott körülmények között oldhatatlanabb,

mint a CaHPO_4 . Ennélfogva az inkubálási idő rövid, csak néhány perc, és a diffúziós hibalehetőségek kisebbek, a lokalizáció biztosabb.

Az azofestékes eljárások után a biológiai anyag által megkötött, de el nem reagált diazóniumsók lassan bomlanak. A bomlás nitrogéngáz keletkezésével jár. Ezért az inkubálás után kimosott metszeteket a tárgylemezen, glicerinbe helyezve néhány óráig lefedetlenül kell tárolni, hogy a gázbuborékok távozhassanak belőle. Ellenkező esetben a fedőlemez alatt felgyűlő nitrogénbuborékok a mikroszkópi vizsgálatot zavarják.

Egyes enzimek, például a lúgos foszfatáz azofestékes kimutatását kiterjedten alkalmazzák az enzimhez kötött antitest módszeren alapuló immuncitokémiai reakciókban (lásd ott).

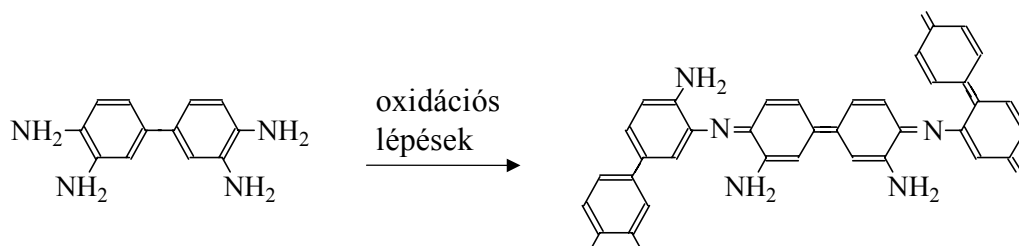
II. Az oxidoreduktázok közül hisztokémiai szempontból az alábbi csoportok a jelentősebbek:

A.) *Dehidrogenázok*, olyan enzimek, melyek a protonátvitelt katalizálják valamely szubsztrátumról egy másik organikus vegyületre;

B.) *Oxigenázok*, melyek H^+ -acceptora a molekuláris oxigén;

C.) *Peroxidázok*, a protonokat peroxidokra átvivő enzimek; citokémiai kimutatásuk az igen sűrűn alkalmazott módszerek közé tartozik.

A kimutatás azon alapul, hogy a szubsztrátum (3,3-di-amino-benzidin-tetrahidroklorid vagy DAB) az enzim hatására és H_2O_2 jelenlétében oxidálódik, az oxidált termék pedig színes csapadék. Fénymikroszkópos célokra formalinban fixált anyag fagyasztott metszeteit telített DAB 1.0%-os hidrogénperoxidot tartalmazó oldatában inkubáljuk. A DAB, mint az aromás aminok általában, oxidatív polimerizáció révén oldadatlan terméké alakul (benzidin-kék), amely színénél fogva jól azonosítható. A reakció alkalmazható elektronmikroszkópos kimutatásra is, ugyanis a benzidin-kék erősen ozmiofil, így az ozmiumsavban történő utófixálás során elektronszóróvá válik. A reakciótermék ozmiofiliája a molekuláiban lévő szabad amino ($-\text{NH}_2$) csoportoknak köszönhető.



di-amino-benzidin

ozmiofil polimer ("benzidin-kék")

A peroxidázt könnyű kimutathatóságánál fogva más specifikus molekulák, illetve sejtfunkciók jelölésére is felhasználják. Például a tormából előállított peroxidázt az endocitózis elektronmikroszkópi követésére lehet felhasználni. A torna-peroxidázt mint fehérjét a vizsgált sejthez adják, mely endocitózissal felveszi azt. A továbbiakban a peroxidáz aktivitás kimutatása segítségével azonosíthatók az endoszómák, illetve követhető sorsuk a sejten belül. Gyakran alkalmazott módszer, hogy a peroxidáz molekulát kémiai, például glutáraldehid keresztkötéssel egy másik specifikus fehérjemolekulához kötik, és az így létrehozott komplexet a vizsgálandó sejtekhez adják. Miután a komplex az illető fehérjemolekula specifikus receptoraihoz kötődött, rögzítik a sejteket, és a peroxidáz citokémiai kimutatása segítségével teszik láthatóvá, illetve jelölik meg a sejt felszíni receptorokat. Hasonló elven alapul a peroxidáz felhasználása az immuncitokémiában (lásd ott).

Anorganikus sejt komponensek kimutatása

Az élő sejtben csaknem valamennyi makro- és mikroelem előfordul. Ezek közül citokémiai jelentősége elsősorban a kalciumnak, a vasnak, valamint a cinkcsoport elemeinek van. Az anorganikus elemek sejtben belüli előfordulása kötött vagy szabad, diffúzibilis formájú lehet.

Az előbbieket kimutatását éppen kötött voltuk, leggyakrabban fehérjéhez való kapcsolódásuk nehezíti, a szabadon előfordulók esetében viszont éppen a diffúzibilitás teszi lehetetlenné a citokémiai kimutatást. A lokalizációt az is nehezíti, hogy az anorganikus ionok koncentrációja csak ritkán éri el a kimutatásukhoz szükséges ún. hisztokémiai küszöbértéket, vagy ha igen, akkor az eljárás alatt vagy változik a helyzetük vagy pedig teljesen kioldódhatnak.

Ca⁺⁺ ionok kimutatása

Fe⁺⁺⁺ (ferri)–ionok kimutatása Perls–féle berlini–kék reakcióval

Perls 1867 óta használt eljárásával a sejtekben kötött formában organikus molekulákba épülve előforduló ferri ionok sárga vérlúgsóval (kálium–hexacianoferrát–II, berlini–kéket, vas–III–hexaciano–ferrát) képezve reagálnak. A ferri ionok kimutathatóságának előfeltétele, hogy azokat a reakcióba vitel előtt fel kell szabadítanunk szerves kötéseikből. Erre a célra leggyakrabban a metszeteket 10%-os HCl-ben előkezeljük.

Immuncitokémiai eljárások

Az utóbbi 25–30 évben egyre nagyobb teret hódító immuncitokémiai eljárások bevezetése Pepe (1961) nevéhez fűződik. A módszer rendkívül nagy jelentőségét az adja meg, hogy segítségével egyes specifikus fehérjemolekulák struktúráján belüli helye adható meg normális vagy kísérletes körülmények között. Az eljárások során az immunológiai– és hagyományos szövettani módszereket kombináljuk. A jól ismert antigén–antitest reakció elvén alapul, melynek a citokémiában való felhasználását az teszi lehetővé, hogy az antitesthez fény– vagy elektronmikroszkóppal, illetve esetenként mindkettővel is észlelhető anyag kapcsolható.

Első lépésként a kimutatandó fehérjét kell tiszta állapotban előállítani. Ezt, mint antigént egy másik állatfaj szervezetébe juttatják be, ahol specifikus ellenanyag (antitest) termelődik velük szemben. Az antitestekhez, kinyerésük után fény– vagy elektronmikroszkóposan látható anyagokat kapcsolnak kémiai úton, így kapjuk az ún. jelzett antitesteket, melyekkel a vizsgálandó objektumokat reagáltatjuk. A reakció eredményeképpen a jelzett antitestek specifikus antigénjeikre kötődnek, helyük egyúttal a kérdéses fehérje lokalizációját jelzi.

Az antitestek jelzésére a fénymikroszkópiában általában fluoreszkáló festékeket (pl. fluorescens izotiocianát–FITC) az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz pedig legelterjedtebben kolloidális arany szemcséket (korábban pedig ferrintint) használnak, de egy sor más, elektronszóró anyagot tartalmazó vegyület alkalmazása is lehetséges.

Gyakori különböző enzimeknek az ellenanyaghoz való kötése is, ilyenek pl. torma–peroxidáz vagy foszfatázok. Ez esetben az enzimmal konjugált antitest kötődése után peroxidáz, illetve savas foszfatáz kimutatást kell végezni, és ennek reakcióterméke jelzi az antigén helyét.

Az immuncitokémiai módszer jelentősége rendkívül nagy. Segítségével olyan specifikus fehérjék mutathatók ki, melyek vizsgálatára más módszerek nem kínálkoznak. Újabban már az enzim–fehérjék kimutatásában is egyre terjed az immuncitokémia, lassan kiszorítva a klasszikus enzim–citokémiai módszereket.

Az eljárás igen nagy érzékenységgű. Egy adott sejtben vagy organellumban rendkívül kis mennyiségben előforduló makromolekulákat nagy biztonsággal, specifikusan lehet lokalizálni.

A módszer alkalmazásának feltétele, hogy az antigén reakcióképes állapotban hozzáférhető legyen az antitest számára. Ezért a céltól függően többféle mikrotechnikai eljárást is alkalmazhatunk az enzimmucitokémiában. Az antitestet sikeresen adhatják natív vagy aldehid rögzített anyagból, de egyes esetekben közönséges epoxi–gyantába ágyazott blokkból készített metszethez is. Más eljárás szerint az aldehidben rögzített szervdarabkához adják a ferrintinhez vagy arany szőlészecskéhez kötött antitestet, majd az anyagot epoxigyantába ágyazzák és metszik.

MIKROSKÓPOS MORFOMETRIA SZTEREOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL

Bevezetés

Azzal összhangban, hogy a morfológiai kutatások egyre inkább funkcionális célokat szolgálnak, állandóan növekszik a morfológiai kép mennyiségi kiértékelésének jelentősége is. A sejt különböző állapotaiban, például a sejt differenciálódási vagy leépülési, továbbá kóros és kísérletesen előidézett változások során változhat az egyes organellumok részesedése a sejt térfogatából. Ez történhet az illető organellum térfogatának, alakjának, számának változásával, amit az egységnyi sejtterfogatba foglalt specifikus organelláris membránmennyiség (felület) változása kísérhet. Az ilyen kérdések megválaszolásához szükséges adatokat a sejtek metszeteiről készült képekről kell nyernünk.

Azt a gondolatot, hogy a kétdimenziós metszeten megjelenő struktúrák (komponensek) mennyiségi viszonyai tükrözik a térbeli viszonyokat, a múlt század közepén Delesse (ejtsd: dölesz) francia geológus fogalmazta meg először. A róla elnevezett Delesse–elv szerint **egy adott szilárd test és a benne levő strukturálisan elkülöníthető randomeloszlású komponens térfogataránya megegyezik a megfelelő területek arányával az anyagból készült síkmetszet felületén.**

A háromdimenziós szerkezetnek, a térbeli viszonyoknak a kétdimenziós kép alapján történő rekonstrukciójával a **sztereológia** foglalkozik. A **morfometria** a morfológiai arányok és változások mennyiségi adatokkal való jellemzése. A sztereológiai módszerek alapján történő morfometriai analízisre mind fény-, mind elektronmikroszkópos metszetek esetében lehetőség van.

A mikroszkópos, elsősorban transzmissziós elektronmikroszkóppal végzett morfometria általánosan elfogadott módszere a 60-as évek végére alakult ki. Ennek első széles körben használt összefoglalását E.R. Weibel svájci kutató tette közzé 1969-ben. Részben ennek az összefoglaló cikknek köszönhető, hogy a nemzetközi irodalomban egységesen használt definíció és jelölésrendszer terjedt el, amelyet mi is követünk.

Ugyanannak a szerkezetnek a térben és síkban való megjelenését és a hozzá tartozó paraméterek jelölését az ábra mutatja. Az I. táblázat tartalmazza a morfometriában használatos összes paraméter definícióját, jelölését és dimenzióját.

A Delesse–elv sejtekre vonatkozó megfogalmazását a következő kifejezés adja meg:

1.

$$\frac{V_C}{V_T} = E \left(\frac{A_C}{A_T} \right);$$

vagy ha A_T változó

2.

$$\frac{V_C}{V_T} = \frac{E(A_C)}{E(A_T)},$$

ahol: V_C : a vizsgálandó komponens térfogata;

V_T : a térfogat, amelyben a vizsgálandó térfogat elhelyezkedik;

A_C : a vizsgálandó komponens által elfoglalt terület a metszeten;

A_T : a vizsgálandó komponens tartalmazó térfogatnak a metszeten elfoglalt területe;

E : elméleti átlag;

A fenti összefüggést a gyakorlatban a következő képletekkel közelítjük meg:

3.)

$$\frac{V_C}{V_T} \sim \left(\frac{\overline{A_C}}{\overline{A_T}} \right);$$

vagy ha A_T változó

4.

$$\frac{V_C}{V_T} \sim \frac{\overline{A_C}}{\overline{A_T}};$$

A fenti kifejezések egy adott komponensnek egy egységnyi térfogatban elfoglalt térfogatarányát (V_V) adják meg. A későbbiekben látni fogjuk, hogy viszonylag egyszerű módon lehetőség van annak mérésére és kiszámítására is, hogy egységnyi térfogatban mekkora egy komponens határolófelületének nagysága (S_V), vagy egy fonalas szerkezetnek a hossza (L_V). A komponensek egységnyi térfogatban mért számának meghatározása meglepő módon igen bonyolult, még egyféle méretű és gömb alakú struktúrák esetében is.

A minta előkészítésével kapcsolatos feladatok

Az előkészítés legfontosabb lépései transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok esetén a következők: rögzítés, beágyazás, metszés, fénykép készítése.

A rögzítés és beágyazás során el kell érni a kielégítő megtartást, azaz, hogy a vizsgálandó jelenség szempontjából ne történjék zavaró műtermékképződés. Maximálisan ki kell zárni a térfogatváltozások lehetőségét és biztosítani kell azt, hogy az anyagnak jó legyen a kontrasztja, vagyis a világos és sötét részek, a membránok és membránnal határolt organellumok határozottan elkülöníthetők legyenek.

Jó minőségű, egyenletes és minél vékonyabb metszetekre van szükségünk. A metszet vastagságához (40–100 nm) közelálló méretű objektumok esetében fellép az ún. Holmes-hatás.

A Holmes-hatás mértéke a részecske átmérője (D) és a metszetvastagság (t) arányától függ. Tökéletes kontraszt esetén, ha $D < 15t$ a túlbecslés több mint 12%, ha $D < 8t$ a túlbecslés nagyobb mint 20%. Ilyen esetekben feltétlenül korrigálni kell. A korrekcióhoz ismerni kell a D és t értékét. Mivel a kontraszt általában nem tökéletes, a Holmes-hatás az esetek nagy részében csökken, vagy kiegyenlítődik.

A metszetekről az elektronmikroszkópban céljainknak megfelelő nagyítású képet (negatív), majd pozitív képet készítünk. Eközben szigorúan ügyelnünk kell a nagyítási arányok pontos betartására. A folyamat során a fotóanyagban is területváltozás, pl. zsugorodás léphet fel, amit, ha a pontosság igényli, korrigálni kell.

A mintavétel módszere

Elektronmikroszkópos vizsgálatok esetében az egyes szerveknek általában csak egy kicsi része vizsgálható, ezért fontos, hogy a minta reprezentatív legyen. A javasolt mintavételi eljárás in vivo kísérletek esetén a következő:

- 1.) a 3–6 állatból vett szövetmintát egyenként 6–8, 2–3 mm széles, 5–8 mm hosszú csíkra vágjuk;
- 2.) az állatonként 6–8 szövetszeletből 3–6 csíkot rögzítés után beágyazunk;
- 3.) véletlenszerűen kiválasztunk állatonként 1–3 blokkot;
- 4.) minden blokkból 1–1 sorozat metszetet készítünk;
- 5.) minden sorozat metszetből találmra egy metszetet kiválasztunk;
- 6.) a kiválasztott metszetről adott számú, pl. 6–8 fényképet készítünk oly módon, hogy a fényképen szereplő szövetrészletet véletlenszerűen (“random”) módon választjuk ki.

A fenti eljárás kielégítő eredményt ad a legtöbb nem réteges felépítésű, ún. parenchimális szerv esetében. Irányított mintavételre van szükség, ha a vizsgált szövetben a sejtek határozott rétegekben helyezkednek el, vagy erősen polarizált, egyik irányban megnyúlt felépítésűek.

Ebben az esetben speciális elővizsgálatok és korrekció nélkül a kapott adatok nem vonatkoztathatók mennyiségileg az egész szövetre.

Térfogatarányok (volumenfrakció: V_V) meghatározása

A (3) és (4) összefüggés értelmében a térfogatarányok meghatározásához a szóban forgó struktúrák által a metszeten elfoglalt területek mérésére van szükség. Egyszerű módszer a kérdéses területek körülrajzolása és kivágása. Az így kapott profilok súlya arányos az általuk elfoglalt területtel. Körhöz közelálló profilok területét jó pontossággal mérhetjük az ún. poláris planiméter segítségével. Miután a szerkezet követőpontját körülvezettük a szóbanforgó profil kerületén a területre vonatkozó adat a műszer számláló szerkezetén leolvasható.

A területek mérésére széleskörben elterjedt módszer az analizálandó fényképre helyezett tesztpontok, tesztvonalak rendszerének alkalmazása. A mérés pontossága függ az alkalmazott tesztrendszer tulajdonságaitól. Különböző feladatok megoldásához más és más tesztrendszer lehet a legalkalmasabb. Így a leginkább elterjedt egyszerű-, vonal- és négyzethálórendszer mellett alkalmazzák pl. a szabályosan elhelyezkedő pontok rendszerét.

A különleges megközelítést nem igénylő mérések esetében legelterjedtebb módszer a kettős négyzetháló alkalmazása. A négyzetháló metszéspontjai szabályos pontrendszert alkotnak. A terület mérése a mérendő struktúra metszet felszínére eső metszéspontok megszámlálásával történik. A munkát jelentősen meggyorsítja, hogy a nagyobb méretű struktúrák (pl. sejtmag) méréséhez elegendő a nagyobb osztás metszéspontjainak megszámlálása.

A (4) összefüggésnek megfelelően

5)

$$V_V = \frac{\bar{A}_C}{A_T};$$

Ha az egyenletes ponteloszlású tesztrendszer (négyzetháló) segítségével végzett pontszámlálásos területmérést alkalmazzuk, akkor

6)

$$V_V = \frac{P_C}{P_T};$$

V_V tehát dimenzió nélküli szám. A szemléletesség kedvéért gyakran a mm^3/mm^3 dimenziót tüntetjük fel, ami természetesen éppúgy lehetne km^3/km^3 is. Gyakoribb, hogy százalék, vagy ezrelék (mm^3/mm^3) százszoros vagy ezerszeres szorzatát jelenti.

A négyzetháló méretét (osztását), kettős hálózat esetén a kétféle osztás arányát a vizsgálandó objektum tulajdonságai szabják meg.

Általános követelmény, hogy a mérendő legkisebb struktúrára is legalább egy pont essék. Érdekes, hogy a végső eredmény pontosságát nem növeli, ha az egyes struktúrákat igen pontosan mérjük meg, tehát osztásnak ezen túlmenő finomítása fölösleges. A fényképre helyezhető teszthálózat előállítása egyszerű. A céljainknak megfelelő osztású négyzethálót kinagyított formában, vagy ha az osztás elég nagy (pl 8–10 mm), akkor eredeti nagyságban lerajzoljuk, lefényképezzük és megfelelő méretű diaképet készítünk róla, avagy fénymásolóval megfelelő írásvetítő fóliára másoljuk.

A szükséges mérések számának meghatározása

Ha az eddig felsorolt követelmények alapján tisztáztuk azt, hogy melyik a mérés elvégzése szempontjából optimális végső nagyítás, milyen a teszthálózatunk legkedvezőbb osztása, elkészítettük hálózatunkat, rátérhetünk az elővizsgálatok utolsó lépésére. Ennek célja, hogy megállapítsuk, hány fénykép adatainak lemérésére van szükség ahhoz, hogy a kapott érték megbízhatóan pl. $\pm 10\%$ határon belül maradjon.

Az erre alkalmazható leginkább szemléletes és egyszerű módszer az ún. progresszív átlagértékek kiszámítása. Ehhez egy várhatóan közepes értéket adó kísérlet mintáiból

lemérjük, mondjuk 50 fénykép adatait. Kiszámítjuk $\overline{V_{V1-2}}$, $\overline{V_{V1-3}}$; $\overline{V_{V1-50}}$ adatainak számtani középértékét. A $\overline{V_{V1-50}}$ értékét 100%-nak véve az egyes progresszív átlagértékeket ($\overline{V_{V1-2}}$, $\overline{V_{V1-3}}$, $\overline{V_{V1-50}}$) az utolsó érték %-ában grafikusán ábrázoljuk. Az ábrához hasonló eredményt kapunk, ahol könnyen megállapítható, hogy a progresszív átlagérték milyen számú fénykép kiértékelése után marad tartósan pl. $\pm 10\%$ eltérést jelentő értéke között. Ha 50 fénykép adatainak lemérése után ez nem történik meg, akkor a mérések számát a szükséges mennyiségig növeljük.

Adott térfogatban lévő (S_V) felület meghatározása.

A membrán és egyéb határfelületek arányainak vizsgálatakor a legtöbb esetben kellően kicsi a nagyítás ahhoz, hogy a metszeteinket vonalként kezelhessük. Ez ad lehetőséget arra, hogy a felületarányok meghatározását vonalhosszak mérésére vezessük vissza. A vonalhosszúságok mérésére használható a térképészeti kerék. A készüléket a vonalon végigvezetve (gurítva) a könnyen átalakítható skáláról a pontos nagyítás ismeretében közvetlenül a μm -ben mért hosszúság leolvasható.

Elterjedt módszer, hogy a képre helyezett szabályos rövid tesztvonalak rendszerét, vagy az egész képen áthúzódó szabályos vonalrendszert használunk. Ez utóbbi célra jól alkalmazható az előző fejezetben ismertetett kettős négyzetháló vízszintes vonalrendszere.

S_V meghatározásához a következő képletből indulunk ki:

(7)

$$S_V = \frac{4m}{W}$$

ahol m a szóbanforgó területet határoló vonal egységnyi teszterületre eső hossza.

Az m kiszámítása az egész képen áthúzódó párhuzamos vonalrendszer használata esetén a következő képlet alapján történik:

(8)

$$m = \frac{I}{2L_T} \text{ mm/mm}^2 \text{ fénykép}$$

ahol L_T a fényképre (teszterületre) eső teljes tesztvonal hossza, I a tesztvonalak és a szóbanforgó objektum kontúrjára eső metszéspontjainak száma.

A fénykép nagyítását figyelembe véve

(9)

$$m = \frac{I}{2L_T} \frac{\text{nagyítás}}{1000} \mu\text{m/mm}^2$$

vagyis

(10)

$$S_V = \frac{2I}{L_T} \frac{\text{nagyítás}}{1000} \mu\text{m/mm}^2$$

Adott osztású négyzetháló esetén:

(11)

$$L_T = P_T f$$

ahol P_T a fényképre (teszterületre) eső tesztpontok száma, az f faktor segítségével pedig a tesztvonalak hosszát számítjuk át mm-re, tehát f értéke azonos a két szomszédos tesztpont között mm-ben kifejezett távolsággal.

A térfogati arány meghatározásánál leírtakhoz hasonlóan a felületek mérésekor is meg kell terveznünk és el kell készítenünk a méréshez a teszhálózatot és el kell végeznünk a szükséges minták számának meghatározását.

Adott térfogatban lévő struktúra hosszának (L) meghatározása

Ahhoz, hogy ez a feladat elvégezhető legyen, teljesülnie kell annak a feltételnek, hogy a vizsgálandó fonalas szerkezet a metszeten jól azonosítható legyen mindenfajta metszési síkban. A különböző lefutású szerkezetek különböző síkban történő metszése más–más képet adhat, a rajtuk mért adatok pedig más–más eredményhez vezethetnek, ezért lényeges, hogy a metszeteket hasonló módon orientáljuk.

L_V meghatározásához meg kell számolnunk a mérendő struktúra metszeteinek számát (N_C) az adott teszterületen belül. Ha az eddigi példánkban használt négyzethálós tesztrendszert alkalmazzuk, akkor a számítás (10) kifejezéshez hasonló képlet alapján jutunk.

(12)

$$L_V = \frac{2N_C \text{ nagyítás}}{Pf} \mu\text{m} / \mu\text{m}^3$$

Természetesen ez esetben is el kell készítenünk az alkalmas osztású tesztálózatunkat és meg kell határozni a szükséges minták számát.

Az objektum méretére és az egységnyi térfogatban lévő objektumok számának (N_V) meghatározása

A metszet vastagságánál nagyobb objektumok méretének meghatározása nem könnyű feladat. Jó közelítéssel elfogadható sztereológiai–morfometria módszer jelenleg csak gömb alakú testek esetében áll rendelkezésre.

Gömbök véletlenszerű metszésének eredményeképpen körprofilok sorzatát kapjuk. A metszetek méreteloszlását (gyakorisági hisztogram) egyféle méretű gömb esetében a ábra mutatja. Ha D a gömb átmérője, akkor a profilok 86.6%-ának átmérője nagyobb, míg 13.4%-ának átmérője kisebb, mint $0.5 D$.

Az egyszerű hisztogram méreteloszlásának ismeretében lehetőség nyílik komplex hisztogramok analízisére is. Minimálisan 1500–2000 profil átmérőjének lemérése után hisztogramot készítünk. A hisztogram jobb szélén elhelyezkedő legnagyobb méretű profilokból kiindulva rekonstruálható az ezen átmérőjű granulomok eloszlása. Az így kapott adatokat a mért adatokból kivonva megkapjuk azt a hisztogramot, amely már nem tartalmazza a legnagyobb méretű granulomokat és így tovább. Az eljárást az ábra szemlélteti.

Ha a populáció egyforma átmérőjű (D) gömbökből áll, akkor

(13)

$$D = \frac{4d}{\pi^2}$$

ahol a gömbmetszetek átlagos átmérője d . Ezt a metszeten mért profilátmérők (d_1, d_2, \dots, d_n) átlaga adja meg. A (13) kifejezésben egyre kevésbé egyforma a részecskék mérete. Ilyen esetben a következő formula ad segítséget.

(14)

$$\bar{D} = \frac{\pi}{2} \frac{N}{\frac{1}{d_1} + \frac{1}{d_2} + \frac{1}{d_N}}$$

ahol D az adott gömb alakú testek populációjába tartozó átlagos átmérője, N pedig a mért profilok száma. Az egységnyi testerületre eső profilok átlagos száma (N_A) nemcsak a vizsgált objektumnak egy adott térfogatban mért számától (N_V), hanem az objektumok méretétől és alakjától is függ.

Véletlenszerűen elhelyezkedő gömb, vagy közel gömb alakú objektum esetében:

(15)

$$N_V = \frac{N_A}{D}$$

Amennyiben ismerjük egy adott objektum átlagos térfogatát (V_0) a térfogati arány (V_V) segítségével kiszámíthatjuk egységnyi térfogatban mért számát.

(16)

$$N_V = \frac{V_V}{V_0}$$

Az adatok statisztikai kiértékelése

A kiértékelés módszerének megválasztását döntően befolyásolja, hogy adataink milyen eloszlást követnek. Igen sok citológiai paraméter normál (Gauss), vagy közel normál eloszlást mutat. Más paraméterek (különösen ritkán előforduló struktúrák) inkább a Poisson (ejtsd: poasszon) eloszlást követik.

A kiértékelés előtt célszerű felvenni az adatok gyakorisági eloszlását (hisztogram) és megállapítani az eloszlás jellegét. V_V , S_V , L_V és N_V meghatározásakor legcélszerűbb ha az egyedi adatnak (x) az egy fényképről származó értékét tekintjük.

Legalább 30 (n) adatból kiindulva, normál eloszlás esetében az alábbi kiértékelési eljárást alkalmazhatjuk. Kiszámítjuk az átlag:

(17)

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

a szórásnégyzet

(18)

$$s^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

a standard deviáció

(19)

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

és a standard hiba

(20)

$$S.E. = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

értékét.

A minták közötti különbségek szignifikanciájának vizsgálatára Student-féle "t" próbát alkalmazunk. Ennek értelmében:

(21)

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

ahol

(22)

$$S^2 = \frac{\sum 1 (x - \bar{x})^2 + \sum 2 (x - \bar{x})^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

I. táblázat
A sztereológiában használatos jelölések

Jel	Definíció	Dimenzió
P	Pontszám	–
P _P	Az összes pontok egy adott struktúrára eső hányada	–
PP _L	Egységnyi tesztvonal hosszra eső metszéspontok száma	–
P _A	Egységnyi tesztterületre eső pontok száma	μm ⁻¹
P _V	Egységnyi tesztterületben lévő pontok száma	μm ⁻²
L	Egy adott elem vagy tesztvonal hossza	μm
L _L	Egy adott elemre eső tesztvonalhossz egységnyi tesztvonalhosszra számítva	μm/μm
L _A	Lineáris elemek hossza egységnyi tesztterületre számítva	μm/μm ²
L _V	Lineáris elemek hossza egységnyi tesztterületben	μm/μm ³
A	Elem vagy teszt–area területe	μm ²
S	Felszín vagy határfelület területe	μm ²
A _A	Area arány, azaz egy adott struktúra metszetének területe egységnyi tesztterületre vonatkoztatva	μm ² /μm ²
S _V	Felszín egységnyi tesztterületre vonatkoztatva	μm ² /μm ²
V	Háromdimenziós objektumok térfogat vagy tesztterület	μm ³
V _V	Térfogatarány, egy adott struktúra térfogata egységnyi térfogatra vonatkoztatva	μm ³ /μm ³
N	Adott objektumok száma	–
N _L	A tesztvonal metszéspontjainak száma egy adott objektummal, egységnyi tesztvonal hosszra számítva	μm ⁻¹
N _A	Egy adott objektum síkmetszeteinek száma egységnyi teszt–areára vonatkoztatva	μm ⁻²
N _V	Egy adott objektumszám egységnyi tesztterületben	μm ⁻³
L	A tesztvonal adott profilra eső átlaghossza (L _L /N _L)	μm
A	Átlagos profilterület (A _A /N _A)	μm ²
S	Átlagos felszín–terület (S _V /N _V)	μm ²
V	Átlagos térfogat (V _V /N _V)	μm ³
D	Átlagos átmérő (pl. egy granulum populáció tagjaié)	μm
d	Egy profil–populáció átlagos átmérője	μm
v	Sejt vagy organellum átlagos térfogata	μm ³

AZ ELEKTRONSUGÁRZÁS ALKALMAZÁSA ANYAGVIZSGÁLATRA (BEVEZETÉS AZ ELEKTRONMIKROSKÓPOS MÓDSZEREKHEZ)

Bevezetés

Az elektronoptikai anyagvizsgáló műszerek kifejlesztésével és a biológiai kutatásokba történt bevezetésével lehetővé vált, hogy a vizsgált objektumok szerkezetéről és anyagi összetételéről lényegesen részletesebb – jobb felbontású – információkat nyerhessünk, mint a fényoptikai műszerek segítségével.

A felbontóképesség (d) az a legkisebb távolság, melyen belül az adott optikai berendezés által produkált képen két egyedi szerkezeti részlet még különálló pontként látszik. Az Abbe által levezetett összefüggés szerint az optikai felbontás (=feloldás), diszkrimináció:

$$d = \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

ahol λ az alkalmazott sugárzás hullámhossza, n a tárgy és az objektív közötti közeg törésmutatója, α pedig az objektív fénylásszöge (a tárgypontból a tárgylencse átmérőjének két végpontjához húzott egyenesek által bezárt szög fele).

A közönséges fénymikroszkóp felbontóképessége elvileg nem lehet jobb, mint $d=200$ nm. Ugyanis $\sin \alpha$ növelésének technikai akadályai vannak. Ha pedig a fény hullámhosszát csökkentjük, és ibolyántúli fényt használunk, akkor 200 nm hullámhosszig használhatók a (ritkán igénybevett) kvarcmikroszkópok. A spektrumban a kisebb hullámhosszak felé haladva a röntgen (0.016 nm–60 nm), majd a γ sugárzás következik. Ezeknek a sugárzásoknak az optikai kezelése egyre bonyolultabb és igényesebb technikailag (lásd röntgen analízisről szóló részt). Ezért hullámhossz csökkentések céljára az ún. korpuszkuláris sugárzások közül mindenekelőtt a könnyen kezelhető elektronsugárzás látszott a legmegfelelőbbnek. Ez az alap gondolat vezetett az elektronoptikai anyagvizsgáló műszerek kifejlesztéséhez.

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

De Broglie mutatta ki, hogy minden m tömegű és v sebességű anyagi részecskéhez λ hullámhosszúságú mozgás tartozik, ahol h a Planck-féle állandó. Ez azt jelenti, hogy a mozgó részecskéhez tartozó hullámhossz a részecske sebességével csökken. Nagysebességű elektronsugárzással dolgozó műszerekben a sugárzás hullámhossza jelentősen csökkenthető a fényoptikai műszerekben alkalmazott sugárzásokhoz képest.

Ha az elektronok sebessége 10^7 , 10^8 , 10^9 vagy 10^{10} cm/s akkor a megfelelő hullámhossz értékek 7.26×10^{-7} , 7.26×10^{-8} , 7.26×10^{-9} , 6.85×10^{-10} cm. Ezzel szemben a látható fény közepes hullámhossza 5×10^{-5} cm, az ultraibolya fényé pedig 2.5×10^{-5} cm. Az elektronoptikai műszerekben alkalmazott elektronsugárzás hullámhossza tehát a látható fény hullámhosszának 50–100 ezred része, speciális fizikai célokra használt elektronmikroszkópok esetében pedig egymilliomod része is lehet. A modern elektronoptikai műszerek felbontása gyakorlati okokból ma még nem javult ilyen arányban, de körülbelül ezerszer jobb ($d=0.2$ nm= 2Å) lehet, mint a fénymikroszkópoké. Ilyen felbontás mellett már bizonyos nagyobb méretű molekulák is elkülöníthetők egymástól. A biológiai anyagok vizsgálatához általában nincsen szükség ennél jobb felbontásra.

Az elektronoptikai készülékek működési alapelve

Az elektronsugárzással működő különböző készülékek lényegében mind katódsugárcsőeknek tekinthetők, melyekben az elektronsugárforrásból származó elektronsugár útját és sűrűségét (A/cm^2) a térerősség elektrosztatikus vagy elektromágneses változtatásával szabályozzák. Az elektronsugárzáshoz szükséges szabad elektronok létrehozása az ún. elektron-ágyúval történik, amely az elektronforrásból (katód), a vezérlőrácsból (Wehnelt-henger) és a

pozitív pólusból (anód) áll. Minden korszerű elektronmikroszkóp izzó katóddal működik. Ezekben wolfram ötvözetekből készült vékony huzalt melegítenek 2600–2700 K hőmérsékletre, amikor elektronok lépnek ki a huzalból, ami körül ezért tértöltés alakul ki (termoelektromos hatás). A fűtés állandó értékű egyenárammal történik. A katód és az anód között a műszer fajtájától és a céltől függően 5–100 kV–1 MV potenciálkülönbséget, ún. gyorsítófeszültséget tartunk fenn. Elektronmikroszkópban ez a potenciálkülönbség úgy jön létre, hogy a katód a negatív pólus, míg az anód és a tárgyasztal földpotenciálon van. Az anód, amely a katód közelében van, egy furattal van ellátva, hogy a gyorsuló elektronok átjuthassanak a tárgyasztal felé.

Ez az elektronnyaláb az, melyet az anyagvizsgálatokhoz hasznosítunk. A nyalábban haladó elektronok sebessége a gyorsítófeszültség növekedtével nő, tehát a hullámhossz ennek megfelelően a gyorsítófeszültség emelkedtével csökken. Ez azt jelenti, hogy a készülék elméleti felbontóképessége (a felbontás–d–reciproka) a gyorsítófeszültség növelésével szintén nő.

Az elektronmikroszkópokban és az elektron–mikroanalizátorokban különböző okokból rendkívül kis átmérőjű irányított sugárnyaláb szükséges. A katódszálat hajtű– vagy hurokalakúra hajlítják, illetve v–alakú katódot képeznek, és úgy helyezik el, hogy a lehető legkisebb felületű hegye a lemezalakú anód közepén lévő köralakú furat közepére mutasson. A kilépő sugárnyaláb átmérőjét így első pillanatban a katódszál hegyének felülete, pontszerűsége határozza meg. A katódot teljesen körülveszi a Wehnelt–henger, amelyben a centrális helyzetű furat és néhány száz volt negatív előfeszültség van a katódhoz képest. A katódot, a Wehnelt–henger furatát és az anódfuratot igen pontosan központosítani (centráljni) kell egymáshoz képest, vagyis a katód hegye és a két köralakú furat középpontja egy egyenesbe kell, hogy essék.

A katód és az anód közötti gyorsító tér áthatol a Wehnelt–henger furatán is, és átszívja a fűtőszál csúcsán kilépő, illetve a szál körüli tértöltést képező elektronokat. Amikor a Wehnelt–hengeren a katódhoz képest növeljük a negatív előfeszültséget, kevesebb “pozitív erővonal” jut át rajta, és az izzó katód kisebb szakaszára hat a gyorsítóter. A Wehnelt–henger bizonyos negatív feszültségen teljesen le is zárhatja az elektronok útját, tehát úgy működik, mint egy vezérlőrács az elektronsövekben (pl. a triódákban). Vezérli a sugáráram intenzitását és a sugárnyaláb keresztmetszetében mérhető áramsűrűséget (A/cm^2). Az elektronagyú tehát lényegében egy trióda rendszer, amely, amennyiben a fénymikroszkóp megvilágító rendszeréhez hasonlíthatjuk, akkor a fényforrás, kollektorlencse és a kollektorblende szerepét játsza az elektronoptikai műszerekben. Az elektronagyúból kilépő sugárzás forgás–szimmetrikus nyalábot alkot, mely az anódfuraton történt átlépése után azonnal kezd kúpszerűen széttartani. A Wehnelt–henger megfelelő alakú formáinak tervezésével olyan elektronagyúkat is előállítanak, amelyekből a kilépő elektronsugár egy távolabbi fókuszpontig haladva összetart, és az elektronok csak az itt történő keresztesződés után tartanak szét. Ezek az ún. távfókuszáló lencsék.

Az anódfuraton átlépett sugárnyaláb további kezelése, fókuszálása, szűkítése és tágítása is forgás–szimmetrikus térben történik, úgy, hogy e tér belsejében szabályozzuk a térerősséget ún. elektronoptikai lencsékkel. Ezek elektrosztatikus vagy elektromágneses alapon működnek. Közös jellemzőjük, hogy lényegében gyűrű alakúak a vasmagjaik, melyeknek forgásszimmetrikus belső terében változtatjuk a térerősséget.

Anyagvizsgálat elektronsugár segítségével

Az elektronforrás és az elektronoptikai rendszer segítségével előállított elektronsugarat a fénymikroszkóphoz hasonlóan használhatjuk biológiai preparátumok vizsgálatához, ultravékony metszetek vagy replikák készítése és azok megfelelő előkészítése után (lásd ott). Ezt a módszert nevezzük transzmissziós elektronmikroszkópiának (TEM), ennek részletesebb ismertetése külön fejezetben található.

Elektronsugárzás alkalmazásával azonban több, új lehetőséget is kapunk az anyag behatóbb vizsgálatára. Ha ugyanis anyagmintákat fókuszált elektronsugárral “bombázunk”, akkor a besugárzás hatására fellépő másodlagos jelenségek (anyagi válaszok) segítségével a minta anyagi összetételéről, anyagainak eloszlásáról, kristályszerkezetéről, kémiai kötéséről stb. kaphatunk ismereteket. E másodlagos jelenségek az elektron– és röntgen–jelenségek, valamint egyéb analitikai lehetőségek.

Elektron–jelenségek

a.) A visszaszórt (reflektált) elektronok

A vizsgált anyagmintába ütköző elektronok egy része annak atomjaival rugalmasan ütközve visszaverődik. Ez nemcsak a felületi atomokról történhet meg, hanem olyan szóródó elektronok is kijuthatnak az anyagból, melyek annak egy bizonyos, kis mélységében ütköztek atomokkal. A visszaszórt elektronok tehát az anyag jellemző vastagságú felületi rétegéből származnak. Mennyiségük a becsapódási felület elemi összetételéből, azaz atomjainak effektív tömegszámától függ. A legnehezebb elemekből álló felületek a beljük csapódó elektronok 50%–át is visszaverik, míg a legkönnyebb elemek atomjain csak igen kis mértékű a szóródás.

A visszaszórt elektronok mennyisége és haladási iránya erősen összefügg a becsapódási felület domborzati viszonyaitól is. Energiájuk viszonylag nagy, a becsapódó elektronokéhoz közelálló, a rugalmas ütközés ugyanis kismértékű energiavesztéssel jár.

b.) A másodlagos elektronok

A becsapódó (elsődleges) elektronok által vizsgált felszín atomjaiból kiűzött elektronok, melyek a tárgyat elhagyják. Ezek mennyisége nem áll egyszerű összefüggésben a vizsgált felületet alkotó atomok tömegszámával. Kilépési irányuk és mennyiségük erősen függ a vizsgált felület topográfiájával. Energiájuk a becsapódó elektronokéhoz viszonyítva kicsi. Ezért csak sokkal kisebb mélységből tudnak a felszínre jutni és kilépni az anyagmintából, mint a visszaszórt elektronok. A másodlagos elektronok közé tartoznak az Auger (ejtsd: ozsé) elektronok is (lásd röntgen analízis).

c.) Az adszorbeált elektronok

A becsapódó elektronok egy hányada olyan mélyre hatolt és lelassult, valamint a másodlagos elektronok egy része olyan mélyen fekvő atomokból keletkezett, hogy nem képes a tárgyat elhagyni, abban felgyülemlik, a tárgy a negatív töltését növeli, és az ún. adszorbeált áram formájában (V/A méréssel mérhető, vagy az elektron adszorpció mértéke így az időben is követhető, regisztrálható. Ha a vizsgált anyag nem jó elektromos vezető vagy félvezető, akkor az elektronbecsapódások a negatív töltések egyenetlen eloszlását eredményezik a felszínén. Ez az eloszlás jellemző az anyagi összetételre (vezetők és rosszabb vezetőkől álló inhomogenitásra), a felületi rétegek anyagi minőségére, az anyag elektromos kapcsolataira, hőmérsékletére és a félvezetők esetén annak típusára is. Mivel a felület töltésviszonyai befolyásolják az onnan eredő visszaszórt és másodlagos elektronok számát is, ezek segítségével a felületi töltéseloszlás is vizsgálható.

d.) Az áthatolt (transzmittált) elektronok

Ha a vizsgált anyag eléggé vékony, akkor a becsapódó elektronok egy része áthatolt rajta. A transzmittált elektronáram fordítottan arányos a vizsgált anyag vastagságával és atomjainak effektív tömegszámával. A nagyobb tömegszámú elemek atomjait tartalmazó rétegek elektron denzitása nagyobb: több elektront szórnak vissza, és kevesebbet engednek át, mint a kisebb tömegszámú elemek atomjait tartalmazó azonos vastagságú rétegek.

A transzmittált elektronokat a transzmissziós elektronmikroszkópiában és a pásztázó elektronmikroszkópiában egyaránt felhasználják metszetek és egyéb vékony rétegek elektron denzitás–eloszlásának képi megejelenítésére (részletesebben lásd a megfelelő fejezetet).

Röntgen (X)–sugárzási jelenségek

A mintába csapódó elektronok, amennyiben nem verődnek vissza, akkor a minta atomjaival, molekuláival összetettebb kölcsönhatásba lépnek. Ennek egyik következményeként a mintából röntgensugarak lépnek ki: folyamatos és karakterisztikus röntgen sugárzást észlelhetünk.

a.) Folyamatos röntgen sugárzás

Ha az elektronok nem ütköznek is a minta atomjaival (elektronburkával), azok elektromágneses tere hat rájuk. Mint minden elektromos töltés, mely változó elektromágneses térben mozog (Maxwell), az elektronok is veszítenek mozgási energiájukból, és ez a veszteség folytonos elektromágneses sugárzásként jelenik meg (fékezési sugárzás).

Az így kisugárzott foton hullámhossza az alkalmazott néhány kV gyorsítófeszültséggel elérhető sebességeknél a röntgen tartományba esik. Ebből következik, hogy a becsapódó elektronok energiája az a maximális energia, amelyre a röntgen foton szert tehet, ez egyben a sugárzás minimális hullámhosszát is megszabja (ún. rövidhullámú határ). A folytonos röntgen sugárzás (kontinuus) spektrumának jellegzetessége, hogy a rövidhullámú hatástól kezdve az intenzitás fokozatosan növekszik, majd (lassabb ütemben) nullához tart. A folytonos spektrumban a fékező anyagtól függő hullámhossz (energia) diszkrét értéknél intenzitás maximumok ún. karakterisztikus csúcsok jelennek meg. A folyamatos sugárzás összes intenzitása (a görbe integrálja) a becsapódó elektronok számával és a minta atomjainak effektív megtöltésével növekszik. A spektrum rövidhullámú határa (az energia maximuma) a beeső elektronok energiájával (gyorsítófeszültség növelésével) növekszik.

b.) Karakterisztikus röntgen sugárzás

Amennyiben a becsapódó elektronok "eltalálják" a minta atomjainak elektronburkát, akkor onnan elektront (elektronokat) löhetnek ki. Ezeket mint másodlagos elektronokat detektálhatjuk. Ha az elektronok a belső (K vagy L) héjról lökődnek ki, helyettük valamelyik külső pályáról ugrik le elektron. A két pályaenergia különbsége röntgenfotonként kisugárzódik. Ez a karakterisztikus röntgen sugárzás, amelynek energiája (hullámhossza) a kibocsátó atomra jellemző, intenzitása pedig a koncentrációval arányos. A karakterisztikus sugárzás energia vagy hullámhossz szerinti analízise alapján a minta mennyiségi és minőségi összetétele meghatározható (lásd SEM röntgen mikroanalízis).

Egyéb analitikai lehetőségek

Ha a becsapódó elektron nem a legbelső (K, L) héjról taszít ki elektront, hanem külsőbről, annak pótlása és a pályaenergiakülönbségek kisugárzása éppúgy megtörténik, mint a karakterisztikus röntgensugárzás keletkezésekor, de ebben az esetben az energiák különbsége (a keletkező foton hullámhossza) az UV vagy látható fény tartományába esik. Ez esetben katód lumineszcenciáról beszélünk.

Alkalmas detektorral a keletkező UV vagy látható fény analizálható. További lehetőségeket jelent, hogy mind az elektron, mind a röntgen sugárzás alkalmas diffrakciós vizsgálatokra, ez azonban inkább speciális készüléken vizsgálható.

A számos lehetőség közül végezetül a vizsgált tárgyban keletkező áramot, feszültséget stb. hasznosító módszereket említjük meg. A tárgyban keletkező adszorbeált elektronok, ha folyamatos elvezetésükről gondoskodunk, a letapogatás alatt folyamatosan mérhetők, és képalkotásra is felhasználhatók. Az adatok a tárgy vezetőképességét, e szempontból való homogenitását jellemzik. A pásztázó elektronmikroszkópban az is vizsgálható, hogy a tulajdonságok hogyan alakulnak például hőközlés, mechanikai behatások vagy pl. működés (félvezetők vizsgálata stb.) hatására.

A pásztázó elektronmikroszkóp

A pásztázó vagy letapogatónyalábos elektronmikroszkóp a vizsgált tárgy felszínén mozgatott elektronpróbával működő készülékek csoportjába tartozik. Angol neve Scanning Electron Microscope (a továbbiakban SEM) szó szerint pásztázó elektronmikroszkópot jelent.

A SEM működésének elvi tervezését M. Knoll végezte el 1935-ben. Az első működő készüléket M. von Ardenne építette Németországban. A SEM további, háború utáni fejlesztése elsősorban angol kutatók érdeme. 1995-ben C.W. Oatley (esjtsd: ótli) és munkatársai készítették Cambridge-ben az első sorozatban gyártott készüléket.

Az elektronagyúból kilépő fókuszált elektronsugárzás (elsődleges vagy primer elektronok) egy, az elektronmikroszkóp oszlopában elhelyezett eltérítőkercs működésének eredményeképp végigpásztázza, más szóval letapogatja a vizsgált tárgy felszínét. A tárgyból kilépő szignálok az érzékelőegységbe (detektor), majd a tovább erősített és feldolgozott videojelek végül egy képcsőbe kerülnek. Ebben szintén van egy eltérítőkercs, melynek működése az oszlopban lévővel szinkronizált. Az eltérítőkercsek működését egy közös eltérítő (scan-) generátor szabályozza. A cső saját elektronsugara tehát ugyanúgy pásztázza végig a katódsugárcső fluoreszkáló ernyőjét, mint ahogyan a letapogató elektronnyaláb a preparátumot.

A detektorból érkező jelek módosítják az ernyő saját sugarának egyébként egyenletes intenzitását, így a kép egymás alá rajzolt vonalakból és egy-egy vonalon belül hol sötétebb, hol világosabb szakaszokból tevődik össze. A vonalakon belül a különböző világosságú és vastagságú szakaszok aszerint változnak, hogy a tárgy szignálemissziója (pl. másodlagos elektron vagy röntgen kibocsátás) az adott területen milyen mérvű volt.

A SEM segítségével a vizsgált tárgyak felszínéről igen nagy mélységélességű, erősen térhatású kép keletkezik.

A jobb készülékek felbontóképesége ma már eléri 3 nm-t is. Az elérhető nagyítás felső határa 200 000-szeres. Jó minőségű, éles kép készítése függ a preparátum minőségétől, tisztaságától és a SEM beszabályozhatóságától.

A SEM nagyobb szerkezeti egységei

A SEM több részből álló, összetett műszer. Első látásra is megkülönböztethető része a rezgésmentesen rögzített oszlop a hozzá futó nagyfeszültségű kábellel. Az oszlop felső részében van az elektronagyú, majd lejjebb az elektromágneses lencsék, az eltérítőkercsek és a tárgykamra. Ez utóbbin látjuk kívülről a tárgyasztal mozgatható csavarjait és a kamra oldalába épített érzékelőegységeket. Az érzékelőegységből kilépő jelek erősítéséhez és képpé formálásához szükséges elektronikus apparátust és egyéb segédberendezéseket, továbbá a kijelző (képpalkotó) képcsőveket rendszerint az oszlop előtt és két oldalán kialakított pulton, illetve az alatta lévő szekrényekben helyezték el. A vákumszisztem tagjai közül az ún. elővákuomot létrehozó rotációs szivattyúkat a rezgésveszély miatt többnyire nem építik egybe a mikroszkóppal, a végleges nagyvákuumot (néhányszor 10^{-5} torr) előállító diffúziós szivattyúk és egyéb vákuumtechnikai eszközök az oszlop alatti térben vannak elhelyezve.

A gyorsítófeszültség értéke általában 0–50 kV-ig folyamatosan változtatható. Növelésével egy határig javul a felbontóképeség, bár ez a vizsgált anyagtól is nagymértékben függ. A megnövekedett áthatolóképeségű, nagyobb energiájú elektronok ugyanis egyre vastagabb rétegből indukálnak elektronemissziót, ami fokozatosan a kép élességének rovására megy. Az elektronforrást elhagyó sugárzás fokozatosan szétterül, újrafókuszálása a lencsék feladata. Az elektronnyaláb először a kondenzor lencsén lép át, majd összeszűkülve az eltérítőkercsekhez jut. Itt a tekercseken átjutó áram növelésével nő az elektronokra ható eltérítő erő, és ezzel arányosan nagyobb lesz a letapogatott felület is. A tekercseken átfolyó áram csökkentésével a letapogatott terület egyre kisebb.

Az eltérítőkercsekből kilépő sugárkévét az objektív és az objektívblende szűkíti le a végleges méretre. Tágabb furatú blendét használva a mélységélesség és a feloldás csökken, a kép fényerőssége nő. Szűkebb furatú blendét alkalmazva a mélységélesség nagyobb, a kép részletesebb lesz, a jeleket viszont jobban kell erősíteni. Bizonyos fokú erősítés után a készülék ún. háttérzaja már zavarja a kép felbontását.

A vizsgálandó anyagok a megfelelő előkészítés után (lásd külön) egy zsilipelt nyíláson át kerülnek a minden irányban forgatható és dönthető tárgyasztalra, hogy a már evakuált oszlopba ne kerüljön nagy mennyiségű levegő. A zsilipkamra előzetesen az üzemi vákumra szívható.

A SEM képkalkotása

A szekunder elektron–detektornak a sugárzás útjába eső belső tagja a kollektorrács. A kollektorrács feszültsége a földeléshez képest lehet pozitív és negatív is. Ha a pozitív feszültséget növeljük, a negatív töltésű elektronok egyre nagyobb számban kerülnek a mögötte elhelyezkedő szcintillátorba. A feszültség csökkentésével, illetve negatív feszültséggel a kisebb energiájú szekunder elektronok nem képesek eljutni a szcintillátorba, szélsőséges esetben tehát nem kapunk képet.

Az elsősorban szekunder elektronokból felépülő kép részletdús, szinte árny nélküli. A kép jellege olyan, mintha felülről megvilágított mintát szemlélnénk, annak ellenére, hogy a detektor egy bizonyos szögől, oldalról gyűjti a minta felületéről az elektronokat. Ennek oka az, hogy a másodlagos elektronok (viszonylag kis energiájúak) a pozitív kollektor–feszültség hatására könnyen elhajlanak, és így a detektor az egy pontból származó valamennyi elektront begyűjti. Tehát azokat is, amelyek eredeti haladási irányuknál fogva, vagy a mintafelületen levő akadályok miatt nem juthatnának el a detektorhoz. Vagyis az elektronok a detektor “szem”pontjából be nem látható helyekről is bejutnak a detektorba.

A visszaszórt elektronok detektálását két egymással szemben elhelyezett szcintillációs detektor végzi. A két detektorból érkező jel a SEM elektronikája segítségével sokrétű információt nyújt. A visszaszórt elektronok energiája nagy, megközelíti a becsapódó elektronok energiáját. Ha csak egy detektort alkalmaznánk, a kapott kép “kemény”, túl éles kontúrú lenne, mintha pontszerű fényforrás világítaná meg a mintát, amelyet a fényforrás oldaláról nézünk. Két detektor esetében azonban, ha a két jelet elektronikusan kivonjuk egymásból, a minta felszíni egyenetlenségei élesebben tűnnek elő, ugyanakkor árnyaltabb, részletdúsabb képet kapunk. Ez az ún. topográfias üzemmód. Mindkét üzemmódban a detektorokból kapott jelek erősítés után kerülnek a képernyőre.

Képmódosító eljárások és különleges üzemmódok

A SEM-ben keletkező kép minősége és paraméterei többféleképpen módosíthatók, így egy tárgyfelszínről eltérő információkat nyerhetünk.

1.) Az Y–modulációs egység bekapcsolásakor video–erősítőből kilépő jelek a katódsugárcső sugarát a függőleges (Y) tengelynek megfelelően modulálják. Ez azt jelenti, hogy a kép az eddigi egymást követő egyenes, de hol sötétebb, hol világosabb vonalszakaszok helyett azonos fényességű, de váltakozó magasságú görbékéből áll.

Egy–egy görbe a letapogatott vonal elektronmikroszkópos grafikonja. A tárgy letapogatásából származó sok–sok ilyen vonal együttese a szintvonalas térképhez hasonlíthatóan állítja össze az erősen térhatású képet. Az eljárás igen jól használható kis kiemelkedésekkel tagolt felszínek domborzatának hangsúlyosabbá tételére.

2.) Sztereoképpárok készítése: a primer sugárzás beesési szögének változtatásával sztereoszópkóban vizsgálható és mérhető képpárok készíthetők, segítségével háromdimenziós modelleket készíthetünk.

3.) Sztriboszkópos felvételek: a primer sugárzás különböző frekvenciával történő szaggatása gyorsan lejátszódó folyamatok fényképezéséhez használható (pl. az elektronsugárzás által okozott károsodások megfigyelése).

4.) Hűtés, fűtés, egyéb behatások: a SEM-ben a vizsgált tárgyak hőmérséklete a vizsgálat alatt is változtatható, kb. -100 C° –tól $+1500\text{ C}^{\circ}$ -ig. A módszer lehetővé teszi fagyási, olvadási és egyéb hőmérsékletfüggő folyamatoknak a nyomon követését. A készítmény a tárgykamrában mechanikai hatásoknak is kitéhető (nyomás, húzás, csavarás stb.).

5.) A transzmissziós pásztázó elektronmikroszkópban a detektor a tárgy alatt található, mely, minthogy az elektronoknak át kell haladniuk rajta, nem lehet vastagabb, mint kb. 1000 Å. A SEM tehát metszetek vizsgálatára is használható.

Röntgen sugár mikroanalízis

A nagyenergiájú elektronsugár által letapogatott mintából kilépő karakterisztikus röntgen sugarak energiájuk vagy hullámhosszuk alapján analizálhatók, ennek megfelelően energia, illetve hullámhossz diszperzív rendszerről beszélünk. Fontos megjegyezni, hogy mindkét módszer megvalósítható akár transzmissziós akár scanning elektronmikroszkóppal.

A hullámhossz és energiadiszperzív módszer közötti gyakorlati különbség az, hogy az energiadiszperzív kisebb energiájú elektronsugárzást igényel, viszont a hullámhosszdiszperzív módszer analitikailag pontosabb.

a.) Energiadiszperzív röntgenanalízis

A mintából kilépő röntgen sugarakat ún. félvezető detektor érzékeli, amelyhez sokcsatornás analizátor kapcsolódik. Mivel a detektor a becsapódó röntgen foton energiájával arányos jelet ad, az analizátorban a teljes (vizsgált) energiatartomány gyakorisága tárolódik, onnan előhívható, a teljes röntgen spektrum megjeleníthető.

b.) Hullámhossz diszperzív röntgenanalízis

Ebben az esetben a röntgen sugarak detektálását megelőzi hullámhossz szerinti szétválasztásuk. Ezt az ún. analizátorkristály végzi, amely nem más mint egy röntgenoptikai rács. Ha a minta (röntgen forrás), az analizátorkristály és a detektor egy körön helyezkedik el (ún. Rowland-kör), akkor az analizátorkristály helyzetének változtatásával változik a detektorra bocsátott hullámhossz is. Alkalmasan választott rácsállandójú kristály segítségével felvehető a spektrum. A leggyakrabban használt detektor a proporciális számláló, amely a becsapódó röntgen foton energiájával és intenzitásával arányos elektromos jelet ad. Ez megfelelő erősítés után a SEM rövid és hosszú utánvilágítású ernyőin képként megjeleníthető, vagy ha a mintának egy adott pontját vizsgáljuk, akkor beütésszámot kaphatunk eredményként. A minta vizsgálatára több lehetőségünk van.

1.) Pontanalízis. Az elektronsugarat egy pontra fókuszáljuk. Ha az analizátorkristályt mozgatjuk, akkor ebben az esetben a minta adott pontjának röntgen spektrumát detektálhatjuk. Ha az analizátorkristályt egy adott elem karakterisztikus hullámhosszára állítjuk, akkor mennyiségi analízist végzünk.

2.) Vonalminti analízis. A fókuszált elektronsugár ekkor a minta felületének egy általunk beállított (egyenes) vonalán halad végig. Adott elemnek a mintán belüli eloszlását mutatja meg, így főként inhomogén mintáknál érdemes használni.

3.) Pásztázó röntgen analízis. A fókuszált elektronsugár a scanning üzemmódhoz hasonlóan a minta felületének egy területét tapogatja le. Az analizátorkristály beállításának megfelelően a keresett elem felületi eloszlása jeleníthető meg a képernyőn.

A CENTRIFUGÁLIS ÜLEPÍTÉSSEL TÖRTÉNŐ FRAKCIONÁLÁS ELMÉLETI ALAPJAI

A diszperz rendszerek részecskéinek mozgásait döntően két tényező eredőjének tekinthetjük. A részecskék ki vannak téve a nehézségi erőter hatásának, és ezért sűrűségüknek megfelelően vagy ülednek (szedimentáció), vagy pedig a diszperzió felszínére igyekezve fölözödnék (flotáció). A gravitációs erő hatására történő mozgások ellen hat a részecskék hőmozgása, amely haladó mozgásból (transzlációs diffúzió) és forgó mozgásból (rotációs diffúzió) tevődik össze. A nem-légüres közegben üledő (nem szabadeső) testre ható tényleges nehézségi erő (F_g) kiszámításánál a felhajtóerőt is figyelembe kell venni, vagyis az üledő test tömegét ($m_s=V\rho$) az általa kiszorított közeg tömegével csökkenteni kell (Archimédész törvénye). Ezért

$$F_g = V(\rho_s - \rho_0)g = V\Delta\rho g; \quad (1)$$

ahol V = a részecske térfogata;
 ρ_s = a részecske sűrűsége;
 ρ_0 = a közeg sűrűsége;
 $\Delta\rho = \rho_s - \rho_0$;

A fenti összefüggésből világos, hogy a diszpergált részecskék $\Delta\rho$ pozitív értékei esetén a nehézségi erő irányába mozogva üledni, míg negatív értékei esetén azzal ellentétes irányba emelkedve fölözödni fognak.

Ha pedig $\Delta\rho = 0$, azaz a részecske és a közeg sűrűsége egyenlő, akkor a részecske a közegben lebegve legfölből hőmozgást végezhet.

A részecskék üledés (szedimentáció) vagy fölöződés (flotáció) közben surlódó közegben mozognak, és ezért a súrlódási erő (F_f) is hat rájuk, a gravitációs mozgásuk ellenében:

$$F_f = f_0 \frac{dx}{dt}; \quad (2)$$

ahol: f_0 = a súrlódási (frikciós) állandó;
 x = az út;
 t = az idő;
 $\frac{dx}{dt}$ = a gravitációs mozgás sebessége.

A súrlódási együtthatót (f) vizes közegre és gömb alakú ideális részecskékre vonatkoztatva Stokes (1856) definiálta az alábbiak szerint:

$$f_0 = 6\eta r_0 \pi; \quad (3)$$

ahol: η = a közeg belső súrlódása;
 r_0 = a részecske sugara.

A részecskék akkor végeznek egyenes vonalú, egyenletes gravitációs mozgást, ha a rájuk vonatkozó súrlódási és gravitációs erő egyensúlyba jutott ($F_f = F_g$), azaz

$$f_0 \frac{dx}{dt} = V\Delta\rho g; \text{ ahonnan} \quad (4)$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{V\Delta\rho}{f_0} g; \quad (5)$$

A (3)-at, valamint a részecske térfogatát ($v=4/3\pi r^3$) az (5)-be helyettesítve az alábbi összefüggést kapjuk:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{2r_0^2 \Delta\rho}{9\eta} g; \quad (6)$$

Ezt az egyenletet az ideálistól eltérő, nem gömb alakú részecskék ülepedésére is alkalmazni lehet, ha bevezetjük az ún. sztérikus faktort vagy súrlódási arányt:

$$\Theta = f / f_0; \quad (7)$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{2r_0^2 \Delta\rho}{9\eta\Theta} g; \quad (8)$$

ahol: r_0 = az ülepedő részecske térfogatával egyenlő gömbtérfogat sugara
 Θ = ülepedő részecske súrlódási együtthatójának az azonos térfogatú gömbalakú részecske súrlódási együtthatójához viszonyított aránya.

A Θ értékeit forgásellipsoidokra vonatkozóan Svedberg és Pedersen (1946) táblázatokba foglalták. Ezek közül néhány értéket megadunk az I. táblázatban, ahol a súrlódási arányt a forgástengely felének (r_1) és az ellipsoid egyenlítői sugarának (r_2) függvényében találjuk meg.

Az ülepedés sebessége a (8) szerint tehát arányos a részecskeméret négyzetével, a részecske és közeg sűrűségének különbségével, és fordítottan arányos a közeg belső súrlódásával. Ez az ún. Stokes-féle egyenlet vizes közegben ülepedő vagy fölöződő, $1\mu\text{m}$ -nél nagyobb sugarú, tehát fénymikroszkópikus vagy nagyobb méretű, sima felszínű részecskék ülepedésére érvényes, ha nem hatnak rájuk egyéb erők. A sejtszervecskék és töredékeik méretei azonban a kolloid részecskék mérettartományába tartoznak (átmérőjük: $1\text{ nm} - 0.5\mu\text{m}$).

Az ilyen szubmikroszkópikus részecskék gravitációs mozgásának sebessége még viszonylag nagy sűrűségkülönbség esetén is nagyon csekély, továbbá az $1-2\mu\text{m}$ és ennél kisebb átmérőjű részecskék már hőmozgást is mutatnak, mely részben a gravitációs mozgás ellen hat. Ezért az ülepedési (fölöződési) sebességet centrifugális erőter alkalmazásával kell megnövelni. Ez esetben a Stokes-egyenletbe (8) a nehézségi állandó (g) helyébe a centrifugális gyorsulás (γ) értékét (9) kell behelyettesíteni.

$$\gamma = \omega^2 x \quad \text{és} \quad (9)$$

$$\omega = 2\pi n; \quad (10)$$

ahol: ω = a szögsebesség;
 x = a forgástengelytől mért aktuális távolság;
 n = a másodpercenkénti fordulatszám.

$$\frac{dx}{dt} = \frac{2r_0^2 \Delta\rho}{9\eta} \gamma = \frac{2r_0^2 \Delta\rho}{9\eta} \omega^2 x = \frac{8\pi^2 r_0^2 \Delta\rho}{9\eta} n^2 x; \quad (11)$$

A közegnél nagyobb sűrűségű (ülepedő) részecskék centrifugális, míg a közegnél kisebb sűrűségű (fölöződő) részecskék ezzel ellentétes irányú centripetális mozgást végeznek.

Tekintve, hogy a gyakorlatban alkalmazott centrifugális gyorsulások a gravitációs állandó $10^2 - 5 \times 10^5$ -szerese közé esnek, a hőmozgás és a gravitációs mozgások ülepités vagy fölöződés ellen ható komponenseit számításainkban elhanyagolhatjuk.

Az összefüggésből látható, hogy e mozgások sebessége egyenes arányban nő a forgástengelytől mért távolsággal, továbbá a szögsebesség, illetve a fordulatszám négyzetével.

A centrifugális ülepités itt közölt összefüggéseinek a következők az ideális körülményei:

- a részecske sugara 50 nm körüli;
- a közeg sűrűsége 1g/cm³ körüli;
- a közeg viszkozitása 1 centipoise körüli.

E feltételnek leginkább a 20 C^o hőmérsékletű vízben ülepedő gömb alakú részecskékből álló szuszpenziók felelnek meg. Ha (9) számú egyenlet szögsebességet tartalmazó alakját átrendezzük úgy, hogy az anyagi minőségre jellemző konstansok az egyik, a dinamikai adatok a másik oldalra kerüljenek:

$$\frac{2r_0^2 \Delta \rho}{9\eta} = \frac{dx/dt}{\omega^2 x} = \underline{s}; \quad (12)$$

akkor láthatjuk, hogy centrifugális ülepítésnek kitett rendszer fontos jellemzője az ülepedő (fölszűrődő) részecske egységnyi szöggyorsulására vonatkoztatott ülepedési (fölszűrődési) sebessége is, amit ezért az illető részecske adott közegben mért ülepedési együtthatójának (szedimentációs koefficiensének) neveznek. Jele \underline{s} , dimenziója szekundum (s). Az \underline{s} értékének nagyságrendje vízben oldott makromolekulák esetében 10⁻¹³ s, amit kényelmi okokból 10¹³-nal megszorított formájában Svedbergekben (S) szokás kifejezni. Eszerint tehát S=10⁻¹³s.

A Svedberg egységeket elsősorban a nagyobb méretű részecskék jellemzésére szokás használni.

Például a 80S-el jelzett eukarióta riboszóma ülepedési együtthatója s=8x10⁻¹², az ún. 5S RNS-é pedig 5x10⁻¹³. Ha Svedbergekben megadott ülepedési együtthatót használjuk, akkor az egyenletekben a 10⁻¹³ szorzótényezőnek is szerepelnie kell.

$$\frac{dx}{dt} = \underline{s} \omega^2 x = S 10^{-13} \omega^2 x; \quad (13)$$

A (12) sz. egyenlet alapján látható, hogy \underline{s} értéke egyaránt függ a közeg sűrűségétől, a részecske méretétől és alakjától. A szedimentációs koefficiens részben tehát függ a közeg kémiai összetételétől. A szedimentációs egyenletek érvényességének fontos előfeltétele azonban, hogy az ülepedő részecske mérete és alakja ne függjön a közeg természetétől. Abból a célból, hogy a különböző rendszerekben mért értékei összehasonlíthatóak legyenek, \underline{s} értékét egy egyezményes T hőmérsékletre és M közegre (médiumra) vonatkoztatva adjuk meg: \underline{s}_{TM} . A gyakorlatban a 20 C^o-os vízben történő ülepítésre vonatkoztatott $\underline{s}_{20,v}$ értékeket használjuk. Ha az ismert ülepedési együtthatójú részecskéket ettől eltérő T hőmérsékleten és M médiumban ülepítjük, akkor mivel a (12) és (13)-ból:

$$\frac{dx}{dt} = \underline{s}_{TM} \omega^2 x; \quad (14)$$

és mert

$$\frac{\underline{s}_{TM}}{\underline{s}_{20,v}} = \frac{\Delta \rho_{TM}}{\eta_{TM}} \times \frac{\eta_{20,v}}{\Delta \rho_{20,v}}; \quad (15)$$

az ülepedés sebességét az alábbi egyenlet adja meg:

$$\frac{dx}{dt} = \underline{s}_{20,v} \frac{\Delta \rho_{TM} \eta_{20,v}}{\eta_{TM} \Delta \rho_{20,v}} \omega^2 x; \quad (16)$$

ahol 20,v indexet tartalmazó állandók 20 C^o-os vízben, a TM indexet tartalmazók pedig az aktuális médiumban T hőmérsékleten mért értékek. Ha az egyenletben szereplő $\underline{s}_{20,v}$ -t, valamint a sűrűségi és viszkozitási adatokat legalább hozzávetőlegesen ismerjük, az összefüggés alapján kiszámítható, vagy becsülhető a részecske ülepedési sebessége.

A leírt összefüggések alapján ismert körülmények között történő ultracentrifugálással meghatározhatók az ülepedő részecske anyagi jellemzői, legkönnyebben ülepedési együtthatója.

A (13) számú egyenletből \underline{s} integrált alakja:

$$\underline{s} = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{\omega^2 (t_2 - t_1)}; \quad (17)$$

ahol x_1 és x_2 az ülepitéskor az ülepedő részecskékből képződött koncentrációgradiens maximumának távolsága a forgástengelytől t_1 , illetve t_2 időpontban. Az ülepedési koeficiens ismeretében az ún. részecskemolekulatömeg is kiszámítható Svedberg (1940) egyenlete alapján:

$$M = \frac{RT\underline{s}}{D(1 - \bar{v}\rho_0)} = \frac{RT(\ln x_2 - \ln x_1)}{D\omega^2(1 - \bar{v}r_0)(t_2 - t_1)}; \quad (18)$$

ahol:

M = a részecskemolekulatömeg;

R = az általános gázállandó;

T = az abszolút hőmérséklet;

D = a diffúziós állandó;

\bar{v} = a részecske parciális fajtérfogata ($\frac{1}{\rho_s}$)

Ha a centrifugálást anyagi jellemzők (M , ρ_s , részecsketömeg v , r_0 , \underline{s} stb.) meghatározására használjuk, akkor analitikai ultracentrifugálásról beszélünk. Az analitikai ultracentrifugák közös alapelve az, hogy műszaki megoldásaik lehetővé teszik, a részecskék, vagy makromolekulák ülepedésének folyamatos optikai követését a centrifugálás közben. Ennek leggyakrabban használt módszere az ún. mozgó határ, vagy másnéven a süllyedő meniszkusz módszere. Ha ugyanis a centrifugális erőter elég nagy, az adott makromolekulától vagy részecskéktől mentes oldószerréteg keletkezik, a cella forgástengelyhez közeli végében. A molekulákat tartalmazó réteg, és a tiszta oldószer között egy optikailag detektálható határ (meniszkusz) van. Ez a határ fokozatosan halad centrifugális irányban. E meniszkusz süllyedési sebességét mérve lényegében a (17) és (18) sz. egyenlet szerint számítják az ülepedési együtthatót, illetve a részecskemolekulatömeget. E mellett még ún. kis sebességű egyensúlyi centrifugálási módszert is kifejlesztettek. Az analitikai centrifugálás elméletének és gyakorlatának részletesebb ismertetése a kolloidikai és biokémiai kutatómódszertan feladata. Megjegyzendő, hogy a centrifugálásos molekulatömeg meghatározási módszer egyéb biokémiai és molekuláris biológiai módszerek kialakulásával ma már teljesen háttérbe szorult.

Megfelelő technikai megoldásokat alkalmazva (lásd később) a centrifugálás alkalmas arra is, hogy egy diszperz rendszer részecskéit a közegből kiülepítsük, illetve, hogy egy heterogén diszperz rendszer különböző sebességgel ülepedő részecskéit egymástól elkülönítsük és további vizsgálatok céljára a többi részecskétől megtisztítsuk. Az ilyen eljárásokat preparatív centrifugálásnak nevezzük, amit a preparatív kémiában, biokémiában és az iparban is széleskörűen alkalmaznak.

A legdifferenciáltabb preparatív ülepitési módszerek a sejtfractionálási eljárásokban használatosak. Ezek lényege az, hogy a szöveteket, sejteket, valamely eljárással összetörve és felhígítva homogenizátumot állítanak elő, és ebből preparálják, majd tisztítják a különböző sejtalkotókat, illetve azok töredékeit.

A különböző sejtípusok egyes organelleimainak mérete nagyon különbözhet, és a specifikus membránjaik összetételében, következésképpen a sűrűségeikben is lehetnek különbségek, melyeket nem mindig ismerünk. Ezért a centrifugálás paramétereit (fordulatszám, idő) a gyakorlatban nem a Stokes egyenlet alapján történő számítással, hanem empirikus próbálkozásokkal határozzuk meg. Egy adott centrifuga és forgófej esetében a centrifugálás idejét és a fordulatszámot variálhatjuk. Mivel azonban az ülepedési sebesség a

forgástengelytől mért távolságtól függ (azzal egyenes arányban nő) ezzel a fordulatszámmal csak az adott geometriájú forgófejben jellemezhetjük az ülepítési folyamatot. Belátható, hogy egy bizonyos centrifugális gyorsulási érték rendkívül különböző fordulatszámú pörgetéssel érhető el, attól függően, hogy az e szempontból vizsgált pont milyen radiális (x) távolságban van a forgástengelytől. Annak érdekében, hogy az egyik bizonyos centrifugával kapott eredmények egy másfajta készülékkel is reprodukálhatóak legyenek, a centrifugálás idejét és a centrifugacső valamely pontján érvényes centrifugális gyorsulás értékeit szokták megadni. Ugyanis a (9) és a (13) alapján a centrifugális ülepítés egyenlete az alábbi, egyszerű formában is felírható:

$$\frac{dx}{dt} = s\gamma ; \quad (19)$$

A centrifugális gyorsulás a (19) és a (10) sz. egyenletekből:

$$\gamma = (2\pi n)^2 x ; \quad (20)$$

Az egyenletben a másodpercenkénti fordulatszámot, a gyakorlatban azonban a percenkénti fordulatszámot használjuk. Ennek jele: RPM (revolutiones pro minutum).

$$\gamma = \left(\frac{2\pi\text{RPM}}{60}\right)^2 x ; \quad (21)$$

Az így számított helyett a nehézségi gyorsulásra vonatkoztatott ún. relatív centrifugális erőter (RCE, az angolnyelvű irodalomban RCF: relative centrifugal force) fogalmát vezették be. Ez annak mértéke, hogy a centrifugális gyorsulás hányszorosa a nehézségi gyorsulás ($g = 981 \frac{\text{cm}}{\text{s}^2}$) értékének, tehát:

$$\text{RCE} = \left(\frac{2\pi\text{RPM}}{60}\right)^2 \frac{1}{g} x = \left(\frac{2\pi}{60}\right)^2 \frac{1}{g} \text{RPM}^2 x ; \quad (22)$$

Mivel a sejtfractionálás gyakorlatában nem ritka a 10^4 – 10^5 nagyságrendbe tartozó percenkénti fordulatszámok alkalmazása, a fenti képletet kezeesebbé teszi, ha ezresével számoljuk a fordulatszámokat:

$$\text{RCE} = \left(\frac{2\pi 10^3}{60}\right)^2 \frac{1}{g} \left(\frac{\text{RPM}}{10^3}\right)^2 x ; \quad (23)$$

Ezután az állandók értékeit behelyettesítve és elvégezve a számtani műveleteket az összefüggés az alábbira egyszerűsödik:

$$\text{RCE} = 11.18 \left(\frac{\text{RPM}}{10^3}\right)^2 x ; \quad (24)$$

Ez megadja, hogy a forgástengelytől mért x távolságban az adott RPM mellett a gravitációs állandó hányszorosát teszi ki (hány g) a centrifugális gyorsulás.

A gyakorlatban a centrifugálás idejét percekben (vagy órákban) és az RCE értékét “g”-ben adják meg (pl. 60 perc centrifugálás 100 ezer g-vel). Tudni kell azonban, hogy a megadott érték mit jelent pontosan. Egy adott centrifugált térfogatnak (az edénynek, csőnek stb.) a forgástengelyhez legközelebbi pontján az RCE értéke minimális (g_{\min}), a legtávolabbi pontján az RCE értéke maximális (g_{\max}), míg a kettő közötti félúton átlagos ($g_{\text{átl}}$). Lelkiismeretes adatközlő mindig jelzi, hogy melyik “g-értéket” adja meg általában az utóbbi kettő közül.

A gyakorlat megkönnyítése céljából egyes centrifugagyártó cégek olyan ún. rotordiagramokat is csatolnak a forgófejekhez, melyekről leolvashatók az alkalmazott fordulatszámhoz tartozó RCE_{\max} értékek. Olyan megoldások is vannak, hogy RCE értékeit egyidejűleg leolvashatjuk az adott fordulatszám mellett x függvényében is.

Még egyszer hangsúlyoznunk kell, hogy bár a RCE és a centrifugálás percekben megadott idejének alapján a centrifugálás körülményei pontosan reprodukálhatók, igazán hasznosan csak a sejtfractionálásos módszer empirikus kidolgozásában használhatók. Az ülepedési sebesség, idő és egyéb jellemző adatok a Stokes egyenlet alapján számíthatók ki.

A differenciális centrifugálás

E módszer segítségével a diszpergált részecskék különböző fizikai tulajdonságú frakcióit nyerhetjük. Az eljárásban a közeg sűrűsége és viszkozitása nem változik az ülepedő részecske útvonala mentén, tehát a részecskét egy adott közegből, vagy esetleg egy adott sűrűségű folyadékra át ülepitjük ki.

Ha a heterogén diszperz rendszer részecskéi között nagy a sűrűségkülönbség, akkor az ρ értékeik, illetve ülepedési sebességeik között számottevő különbség lesz, ami elsősorban a sűrűségkülönbségből származik. Különösképpen nyilvánvaló ez, ha a sűrűségviszonyok olyanok, hogy egyfajta részecske ülepedő, míg egy másfajta pedig fölöződő mozgást végez. Ha biológiai anyagból készült homogenizátumot vízben vagy annál kevésbé sűrűbb közegben centrifugálunk, akkor elsősorban csak a raktározott zsírnemű anyagok, és egyes speciális részecskék, pl. a májsejtek szekréciós lipoproteideket tartalmazó váladékszemescei fölöződnek. A többi sejt- és szövetalkotórész ülepedni fog. A sejtalkotók, illetve a homogenizáláskor belőlük keletkezett töredékek közötti sűrűségkülönbség nem nagy érték, hiszen sűrűségük 1,13–1,40 g/cm³ közé esik. Ilyen esetben a részecskék között létező térfogat- és esetleg alakbeli eltérések válhatnak az ρ -értékbeli különbségek döntő tényezőivé. A ábrán jól érzékelhető, hogy patkány májból készült homogenizátumban az endoplazmatikus hálózat, a peroxisómák, a lizoszómák, a mitochondriumok, a plazmamembrán és a vörösvértestek sűrűsége egyaránt az 1.133–1.22 g/cm³ sűrűség tartományba esik, ugyanakkor Svedbergekben kifejezett ülepedési együtthatójuk 10¹–10⁶ S-ig terjed. Az öt nagyságrendet is elérő eltéréseket a részecskeméret (rádiusz) eltérések okozzák. Az ábrán világosan látható, hogy a plazmamembrán méret szempontjából igen különböző töredékei, bár azonos sűrűségű, de igen széles határokon belül változó ρ értékekkel jellemezhető részecske populációt alkotnak.

Belátható, hogy az ilyen kicsiny sűrűségkülönbség ellenére a különböző méretű részecskék adott közegben, adott centrifugális fordulatszám mellett is igen különböző sebességgel fognak ülepedni. Mivel az ρ -értékbeli különbségeikért döntően a részecskék méretkülönbségei felelősek, azt mondhatjuk, hogy a differenciális centrifugálással a részecskéket térfogatuk szerint frakcionálhatjuk.

A feladat rendszerint az, hogy a homogenizátumból egy vagy több, esetleg az összes lehetséges sejtfractionációt állítsuk elő. A homogenizátum különböző térfogatú részecskékből álló heterogén szuszpenzióknak tekinthető. A centrifugálással előbb a legnagyobb, majd az RCE és idő fokozatos növelésével az egyre kisebb részecskéket egymás után különítjük el a médiumból.

Ha a kiülepitési szándékozott részecske ülepedési együtthatóját eléggé pontosan ismerjük, a teljes kiülepitéshez szükséges szedimentációs időt a Stokes egyenlet integrált alakja (17) alapján számíthatjuk ki:

$$t_2 - t_1 = \frac{1}{\rho} \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{\omega^2} \quad (25)$$

ahol $x_1 = x_{\min}$, vagyis a centrifugált szuszpenzió meniszkuszának és $x_2 = x_{\max}$, vagyis a centrifugált szuszpenziót tartalmazó edény fenekének távolsága a forgástengelytől. $x_2 - x_1$ pedig egyenlő azzal az úttal, amelyet a t_1 időpontban a meniszkuszban tartózkodó részecskéknek t_2 időpontig megtesz az edény fenekéig. Tehát $t_2 - t_1 = t_s$ szedimentációs idővel.

Ha az egyenletbe ω percenkénti fordulatszámokból kifejezett értékét behelyettesítjük (20), és a fordulatszámokkal 1 000 RPM egységekben számolunk:

$$t_s = \frac{1}{s} \frac{\ln x_{\max} - \ln x_{\min}}{\left(2\pi \frac{\text{RPM}}{60}\right)^2} = \frac{1}{s} \frac{\ln x_{\max} - \ln x_{\min}}{\left(\frac{2\pi 10^3}{60}\right)^2 \left(\frac{\text{RPM}}{10^3}\right)^2}; \quad (26)$$

Ebből a konstansokat kiemelve és a számításokat elvégezve:

$$t_s = \frac{1}{1096.58 s} \frac{\ln x_{\max} - \ln x_{\min}}{\left(\frac{\text{RPM}}{10^3}\right)^2}; \quad (27)$$

Egy adott centrifuga adott forgófeje esetében x_{\max} és x_{\min} értékei is adottak, és jellemző a forgófejre egy technikai okokból előírt maximális fordulatszám is. A forgófej ezen állandó értékeit is az együtthatóba bevonva a (27) összefüggésből

$$t_{s(\min)} = \frac{K_{\max}}{s}; \quad (28)$$

ahol K_{\max} az ún. rotor–konstans, amit egyes centrifugagyártó cégek táblázatban adnak meg forgófejeikre vonatkozóan.

A (28) egyenlettel tehát az számítható ki a K –faktor ismeretében, hogy s ülepedési együtthatójú részecskék a maximális megengedett sebességével pörgetett forgófejben mennyi idő alatt ülepszik ki a meniszkusztól az edény fenekére. Evidens, hogy ezalatt az idő alatt a szuszpenzió minden s ülepedési együtthatójú részecskéje kiülepszik. Ez a $t_{s(\min)}$ idő az s részecske K rotorban történő kiülepítéséhez szükséges minimális idő, mert ha a megengedett maximálisnál kisebb fordulatszámot használunk, akkor mivel a (27)-ből értelemeszerűen:

$$K_{\max} = \frac{\ln x_{\max} - \ln x_{\min}}{1096.58 \left(\frac{\text{RPM}_{\max}}{10^3}\right)^2}; \quad (29)$$

és

$$K = K_{\max} \frac{\text{RPM}_{\max}^2}{\text{RPM}^2}; \quad (30)$$

ezért

$$t_s = \frac{K}{s} = \frac{K_{\max} \text{RPM}_{\max}^2}{s \text{RPM}^2} = t_{s(\min)} \frac{\text{RPM}_{\max}^2}{\text{RPM}^2}; \quad (31)$$

az egyenletekben RPM_{\max} a forgófej maximális megengedett fordulatszáma, K_{\max} a rotorkonstans, K az aktuális fordulatszám RPM mellett érvényes rotorállandó, t_s pedig az s részecske szedimentációs ideje RPM aktuális fordulatszám mellett.

Egy viszonylag egynemű szövetből, pl. májból készített homogenizátumban, ha a sejtek megfelelő mértékig összetört (fragmentált) állapotban vannak, a sejtmagok a legnagyobb térfogatú részecskék. A centrifugálás idejét úgy választjuk meg, hogy adott centrifugán kiválasztott fordulatszám mellett az összes sejtmag az üledékbe jusson, és az ülepedés e ponton fejeződjék be. Ezzel a lépéssel két sejtfrakcióhoz jutottunk.

Az üledék (szedimentum) az ún. nyers sejtmag (nukleáris) frakció kvantitatíve tartalmazza a sejtmagokat, azonban azoknál kisebb részecskékkel szennyezett. Ez a következőkkel magyarázható. A centrifugálás előtt a homogenizátumban a különböző méretű részecskék eloszlása elvileg egyenletes. Centrifugálási időnek azt az időtartamot választottuk ki, ami alatt azok a sejtmagok is eléri az üledék felszínét, amelyek eredetileg a centrifugacsőnek a forgástengelyhez legközelebb eső pontján voltak. Ez alatt az idő alatt eléri a szedimentum térfogatát azok a részecskék is, amelyek olyan közelről indultak, hogy kisebb sebességük ellenére is bejuthattak az üledékbe. A nyers frakcióból a kisebb részecskéket az üledék új médiumban történő többszöri reszuszpendálásával és újracentrifugálással lehet kimosni. Ha a

szedimentumot a homogenizátum kiindulási térfogatára újra felszuszpendáljuk, akkor a kapott szuszpenzió sejtmag-koncentrációja ugyanakkora lesz, mint a homogenizátumé volt, a kisebb részecskéké azonban annak csak az a hányada, amelyik a szedimentumba jutott. Ezért minden egyes újrafelszuszpendálás utáni ultracentrifugálás során a kiindulásival azonos mennyiségű sejtmag kerül a szedimentumba, a kisebb részecskékből azonban egyre kevesebb. Három-hat ilyen mosás után már megkapjuk az ún. tisztított sejtmag frakciót.

A centrifugálás után az üledék fölött maradó szuszpenziót felülúszónak (szupernatans) nevezzük. A magfrakció feletti felülúszó neve: poszt-nukleáris szupernatans (PNS). Ez olyan értelemben tiszta, hogy nincsenek benne sejtmagok, azonban nem tartalmazza az összes citoplazmatikus részecskét, tehát nem tekinthető tiszta citoplazma frakciónak.

Ha ennek valamely részecske-fajtáját kvantitatíve kívánjuk kinyerni, akkor a további preparálás előtt hozzá kell önteni a szedimentum tisztításából származó felülúszókat is. A magfrakció sejttípustól függően 500–1000 g_{max} érték mellett 10–20 percig történő centrifugálással nyerhető ki (médiüm: 0.25 M/l szacharóz). A PNS-ből az RCE emelésével, megfelelő idő kiválasztásával nyerhető a méret szerint következő sejtalkotó frakciója.

A PNS-ben a magok után következő részecske mérettartomány növényi sejtekben a vakuólumoké és/vagy a plazmizomoké, majd ezt követi a mitochondriumoké. Állati sejtekben a magokat méret szerint általában a mitochondriumok, esetleg egyes sejttípusokban előbb az azoknál nagyobb váladékszemesek követik. Ha a PNS-t az előbbinél nagyobb RCE alkalmazásával megfelelő ideig centrifugáljuk, akkor előállítható a fentemlített organellumok nyers, majd tisztított frakciója. Például, állati sejtek mitochondrium frakciójának kinyeréséhez általában 10–20 percig tartó, RCE=3000–10 000 g_{max} melletti centrifugálást használnak. A mitochondriumok, a lizoszómák és a peroxiszómák egy része sok sejttípusban azonos mérettartományba esik, és ezért differenciális centrifugálással egymástól szét nem választhatók. Ilyen sejtek (pl. májsejtek) esetében gyakran előbb kiülepítik a 3 000–4 500 g_{max} /10 perc/ mellett képződő ún. nehéz mitochondrium frakciót. Ez mitochondriumokban dúsabb, míg az azután kb. 7 000 g_{max} /20 perc/ alkalmazásával előállított ún. könnyű mitochondrium frakció a kisebb méretű mitochondriumokat és a lizoszómák, valamint a peroxiszómák zömét tartalmazza. Természetesen mindkét mitochondriális szubfrakció szennyezett az említett három organellumnál kisebb részecskékkal is. Ezek azonban többszöri mosással eltávolíthatók. A nyers mitochondrium frakció fölött a posztmitochondriális szupernatans (PMS) képződik. Ez apró vezikulákat tartalmaz, melyek a homogenizáláskor keletkeztek (lásd ott) a durva felszínű ER, a sima felszínű ER, a Golgi-komplexum elemeiből, valamint a plazmamembránból. Ugyancsak e felülúszóban található a szabad riboszómák, valamint oldott állapotban a citoplazma matrix és a citoszól. A posztmitochondriális felülúszó ultracentrifugálásával (100 000 g_{max} , 1 óra, 0.25 M/l szacharóz médiumban) előállíthatjuk a szabad riboszómákat is magába foglaló nyers mikroszóma frakciót. A fennmaradó, ülepedhető részecskéket már nem tartalmazó posztmikroszómális felülúszó nem más mint a homogenizáló közeggel hígított citoplazma alapállomány és a citoszól. A különböző membránorganellumok mikroszómális vezikuláinak térfogata az általában szokásos homogenizálási eljárások (lásd ott) után nem különbözik olyan diszkrét értékben, hogy differenciális centrifugálással kielégítően szétválaszthatassuk őket egymástól.

Mivel azonban bizonyos sűrűségkülönbség van a részecskék között, szokás a nyers mikroszómát két szubfrakcióra bontani. Az ún. nehéz mikroszóma frakció (20–30 000 g_{max} , 10–20 perc) apró lizoszómákat, a durva felszínű ER-ből származó vezikulákat, továbbá, ha voltak a sejtekben, akkor mikroperoxiszómákat, vagy például szinaptikus vezikulákat tartalmaz. A sima felszínű ER, és Golgi komplex membránjainak és vezikuláinak többsége és a riboszómák a könnyű mikroszóma frakcióban (kb. 100 000 g_{max} , 1 óra) nyerhetők ki. A nehéz és könnyű mikroszóma azonban csak nyers frakciónak tekintendő, mert kölcsönösen átszennyezik egymást. Ez érthetővé válik, ha a ábrát tanulmányozzuk, mely megmutatja

például, hogy az endoplazmatikus retikulum mikroszomális részecskéinek 1,13 és 1,20 közé eső sűrűsége mellett ρ értékük a 10^1 – 5×10^4 S között kontinuumot alkot, és így átfedésben van a riboszómákkal és a lizoszómákkal, illetve a peroxiszómákkal.

A mikroszóma frakció szubfrakciói már csakis az ún. sűrűség–gradiens centrifugálással, vagyis kismértékű sűrűségkülönbségeiket kihasználva tisztíthatók tovább.

A differenciális centrifugálással nyert sejtfrakciók anyag összetétel (lipid–fehérje arányuk, minőségük, enzimösszetételük, membránjuk és beltartalmuk összetétele) szempontjából, valamint funkcionális szempontból vizsgálhatók. Utóbbi esetben a tisztított vagy nyers szedimentumokat a kísérletező által megszabott médiumokban felfuszpendálják és enzimek, kötőfehérjék, transzportrendszerek működését, sejtanyagcsere folyamatok lefolyását lényegében biokémiai módszerekkel (in vitro) vizsgálhatják.

Azonban a biokémiai vizsgálatokkal ellentétben így módon egy, a sejtől kiszakított, sok komponensből integrálódó működő struktúrát vizsgálhatunk, ezért a sejtfrakciókban nyert információk nélkülözhetetlen kiegészítői az élő sejtek és szövetek felhasználásával szerzett adatoknak. A vizsgált struktúrákat kiszakítottuk a sejten belüli szabályozás hatása alól. Működésük kísérletes befolyásolása azonban (pl. egyes citoszól fehérje faktorok vagy kismolekulák hozzáadása stb.) pótolhatatlan eszközt jelenthet az intracelluláris szabályozás megismerésében. Igen jelentős a máj mikroszomális frakcióinak felhasználása például a xenobiotikumok metabolizmusának felderítésében. Az ER méregtelenítő folyamatainak megismerése ugyanis elengedhetetlen része minden toxikológiai és gyógyszerbiokémiai vizsgálatnak, tehát a gyógyszerkutatás és a kemoterápia fejlesztésének. A centrifugációs ülepítési eljárásoknak a biológiai kutatásokba történt bevezetése Albert Claude belga kutató érdeme, aki először (1940) alkalmazva a differenciális centrifugálást, a sejtbiokémiai és molekuláris biológiai kutatások beláthatatlan távlatait nyitotta meg. Életművét 1975-ben ismerték el az orvostudományi Nobel díj odaítélésével.