

# 1

## Η Ιστολογία και οι Μέθοδοι Μελέτης της

### ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗ

Μονιμοποίηση	22
Σκλήνωση & Κοπή	23
Χρώση	24

### ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Μικροσκοπία Φωτεινού Πεδίου	27
Φθορίζουσα Μικροσκοπία	28
Μικροσκοπία Αντίθεσης Φάσης	28
Συνεστιακή Μικροσκοπία	29
Πολωτική Μικροσκοπία	30

### ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης	32
Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης	32

### ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

### ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΣΤΩΝ & ΚΥΤΤΑΡΩΝ

### ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

### ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Ανοσοϊστοχημεία	37
Τεχνικές υβριδισμού	40

### ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΣ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΤΩΝ ΔΟΜΩΝ ΣΤΙΣ ΙΣΤΙΚΕΣ ΤΟΜΕΣ

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΒΑΣΙΚΩΝ ΣΗΜΕΙΩΝ

**Ι**στολογία είναι η μελέτη των ιστών του σώματος και του τρόπου που αυτοί είναι οργανωμένοι ώστε να σχηματίσουν τα όργανα. Η ελληνική ρίζα του όρου *Ιστός* σημαίνει είτε «ύφασμα», είτε «δίκτυο», σημασίες που αμφότερες είναι κατάλληλες, αφού οι ιστοί είναι πλέγματα από νημάτια και ίνες, κυτταρικά ή ακυτταρικά, με μεμβρανική επικάλυψη. Η ιστολογία περιλαμβάνει όλους τους τομείς της ιστικής βιολογίας, εστιάζοντας στον τρόπο με τον οποίο η δομή και η διάταξη των κυττάρων εξυπηρετεί την εξειδικευμένη λειτουργία του κάθε οργάνου.

Οι ιστοί έχουν δύο διαδραστικά συστατικά: κύτταρα και εξωκυττάρια ουσία (ΕΚΟ). Η ΕΚΟ αποτελείται από πολλά είδη μακρομορίων, τα περισσότερα από τα οποία σχηματίζουν περίπλοκες δομές, όπως κολλαγόνα ινίδια και βασικές μεμβράνες. Η ΕΚΟ υποστηρίζει τα κύτταρα και το υγρό που μεταφέρει θρεπτικά στοιχεία στα κύτταρα και απομακρύνει τους καταβολίτες και τα εκκρινικά τους προϊόντα. Τα κύτταρα παράγουν ΕΚΟ και παράλληλα επηρεάζονται και πολλές φορές ελέγχονται από τα μόρια του υποστρώματος. Κύτταρα και υπόστρωμα αλληλεπιδρούν εκτεταμένα, με πολλά συστατικά της μεσοκυττάριας ουσίας να αναγνωρίζονται και να προσφύονται σε επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς. Πολλοί από αυτούς τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς διατρέχουν την κυτταρική

μεμβράνη και συνδέονται με δομικά συστατικά μέσα στα κύτταρα. Έτσι, κύτταρα και ΕΚΟ αποτελούν ένα συνεχές που λειτουργεί μαζί και αντιδρά μαζί σε ερεθίσματα και αναστολές.

Κάθε ένας από τους βασικούς ιστούς του σώματος σχηματίζεται από πολλούς τύπους ειδικών κυτταρικών σχέσεων μεταξύ κυττάρων και ΕΚΟ. Αυτές οι χαρακτηριστικές σχέσεις διευκολύνουν την αναγνώριση των τύπων των ιστών από τους φοιτητές. Τα όργανα σχηματίζονται από ένα τακτικό συνδυασμό πολλών ιστών, και ο ακριβής συνδυασμός αυτών των ιστών επιτρέπει τη λειτουργία του κάθε οργάνου και του οργανισμού ως όλον.

Το μικρό μέγεθος των κυττάρων και των συστατικών της ΕΚΟ καθιστά απαραίτητη για την Ιστολογία τη χρήση μικροσκοπιών και μοριακών μεθόδων μελέτης. Η πρόοδος της βιοχημείας, της μοριακής βιολογίας, της φυσιολογίας, της ανοσολογίας και της παθολογικής ανατομικής είναι ουσιώδης για την γνώση της βιολογίας των ιστών. Η εξοικείωση με τα εργαλεία και τις μεθόδους του κάθε κλάδου της επιστήμης είναι σημαντική για την καλύτερη κατανόηση του αντικειμένου. Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται ανασκόπηση πολλών από τις πλέον κοινές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για να μελετηθούν κύτταρα και ιστοί, εστιάζοντας στις μικροσκοπικές μεθόδους.

## ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ ΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗ

Η πιο κοινή διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση των ιστών είναι η προετοιμασία ιστοικών τομών ώστε να μπορούν να μελετηθούν με το οπτικό μικροσκόπιο. Κάτω από το μικροσκόπιο, οι ιστοί εξετάζονται οπτικά με μία ακτίνα διερχόμενου φωτός. Επειδή οι περισσότεροι ιστοί και τα όργανα είναι αρκετά παχείς για να διέλθει το φως διά μέσου αυτών, πρέπει να κοπούν σε διαφανείς λεπτές τομές, που απλώνονται σε γυάλινα πλακίδια για μικροσκοπική εξέταση.

Το ιδεώδες μικροσκοπικό παρασκεύασμα πρέπει να είναι διατηρημένο έτσι ώστε ο ιστός στο τζαμάκι να έχει την ίδια δομή και μοριακή σύνθεση που είχε στο σώμα. Εντούτοις, πρακτικά, αυτό σπάνια είναι εφικτό και συχνά υπάρχουν τεχνικά σφάλματα, παραμορφώσεις και απώλεια συστατικών λόγω της διαδικασίας προετοιμασίας. Τα βασικά βήματα που χρησιμοποιούνται στην προετοι-

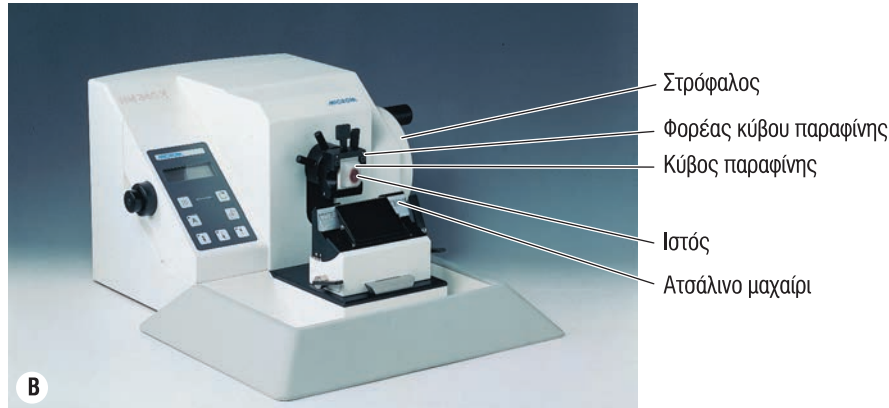
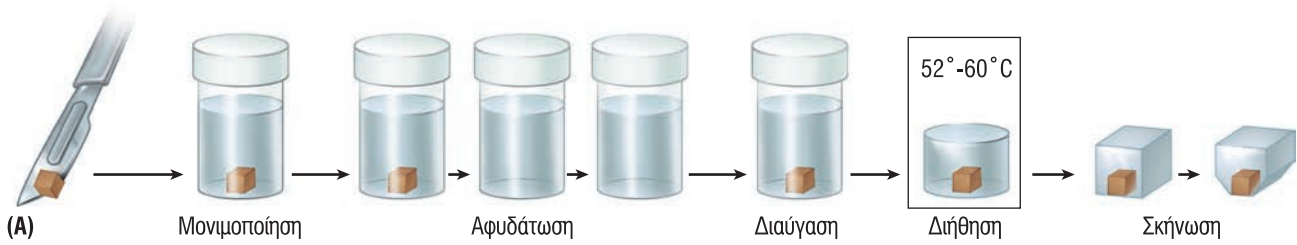
μασία των ιστών για το οπτικό μικροσκόπιο εμφανίζονται στην Εικόνα 1-1.

## Μονιμοποίηση

Τα τεμάχια των οργάνων που αφαιρούνται από το σώμα αρχίζουν να επεξεργάζονται όσο το δυνατόν πιο σύντομα, προκειμένου να αποφευχθεί η πέψη των ιστών από τα ένζυμα που βρίσκονται μέσα στα κύτταρα (αυτόλυση) ή από βακτήρια και να διατηρηθεί η δομή των ιστών και των κυττάρων. Αυτή η αρχική επεξεργασία -**μονιμοποίηση**- συνήθως περιλαμβάνει εμβάπτιση μέσα σε διαλύματα σταθεροποιητικών ή διασυνδετικών (cross-linking) χημικών ενώσεων, που αποκαλούνται **μονιμοποιητικά**. Επειδή το μονιμοποιητικό πρέπει να διαχυθεί πλήρως μέσα στους ιστούς και να διατηρήσει όλα τα κύτταρα, οι ιστοί συνήθως κόβονται σε μικρά τεμάχια πριν από τη μονιμοποίηση, ώστε να διευκολυνθεί η διείσδυσή του και να διασφαλισθεί καλύτερα η διατήρηση των ιστών. Η ενδαγγειακή διάχυση μονιμοποιητικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ορισμένα όργανα ή πειραματόζωα. Επειδή το μονιμοποιητικό σε αυτή την περίπτωση φθάνει γρήγορα στους ιστούς διαμέσου των αγγείων, η μονιμοποίηση είναι βελτιωμένη.

Ένα μονιμοποιητικό που χρησιμοποιείται ευρέως για την οπτική μικροσκοπία είναι η φορμόλη, ένα ρυθμιστικό ισοτονικό διάλυμα φορμαλδεΰδης 37%. Η χημική διαδικασία που διέπει τη μονιμοποίηση των διαφόρων συστατικών των ιστών είναι περίπλοκη και δεν είναι πάντοτε πλήρως κατανοητή. Τόσο η φορμαλδεΰδη, όσο και η γλουταραλδεΰδη, ένα μονιμοποιητικό που χρησιμοποιείται στην ηλεκτρονική μικροσκοπία, αντιδρούν με τις αμινομάδες (NH<sub>2</sub>) των πρωτεϊνών των ιστών, εμποδίζοντας την αποσύνθεσή τους. Η γλουταραλδεΰδη ενισχύει αυτή τη μονιμοποιητική δράση όντας μία διαλδεΰδη ικανή επίσης να διασυνδέει πρωτεΐνες.

Για τη μεγαλύτερη μεγέθυνση και ανάλυση πολύ μικρών δομών στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, η μονιμοποίηση πρέπει να γίνει προσεκτικά ώστε να διατηρηθεί η «υπερμικροσκοπική» λεπτομέρεια. Προς αυτό το σκοπό και προκειμένου να προετοιμαστούν οι ιστοί για τέτοιου είδους μελέτη, τυπικά χρησιμοποιείται μία μέθοδος διπλής μονιμοποίησης με ρυθμιστικό διάλυμα γλουταραλδεΰδης, που ακολουθείται από εμβάπτιση σε ρυθμιστικό διάλυμα τετροξειδίου του οσμίου. Το τετροξείδιο του οσμίου διατηρεί (και βάφει) τα μεμβρανικά λιπίδια, καθώς και τις πρωτεΐνες.



**ΕΙΚΟΝΑ 1-1** Κοπή μονιμοποιημένου και σκηνωμένου ιστού.

Οι περισσότεροι ιστοί που μελετώνται ιστολογικά, προετοιμάζονται όπως φαίνεται ανωτέρω, με τα ακόλουθα βήματα **(Α)**:

- **Μονιμοποίηση:** Μικρά τεμαχίδια ιστού τοποθετούνται σε διαλύματα χημικών ουσιών που τους συντηρούν με διασταυρούμενη σύνδεση πρωτεϊνών και απενεργοποίηση των ενζύμων αποικοδόμησης.
- **Αφυδάτωση:** Ο ιστός μεταφέρεται σε μία σειρά αλκοολικών διαλυμάτων αυξανόμενης συγκέντρωσης, που τελειώνει στο 100% και απομακρύνει όλο το νερό.
- **Διαύγηση:** Η αλκοόλη απομακρύνεται από το τολουόλιο ή άλλους παράγοντες στους οποίους είναι αναμιγμένη τόσο η αλκοόλη, όσο και η παραφίνη.
- **Διήθηση:** Ο ιστός τοποθετείται μετά σε λιωμένη παραφίνη, έως ότου καταστεί διηθημένος πλήρως από αυτή την ουσία.
- **Σκλήνωση:** Ο κύβος παραφίνης που προκύπτει, περικλύπεται ώστε να εκτεθεί η επιφάνεια του ιστού για κοπή με μικροτόμο.

Παρόμοια βήματα χρησιμοποιούνται στην προετοιμασία των ιστών για την ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης

(ΗΜΔ), εκτός του ότι χρησιμοποιούνται ειδικά μονιμοποιητικά και αφυδατωτικά διαλύματα, ενώ τα δείγματα είναι μικρότερα και σκηνώνονται σε εποξικές ρητίνες, που γίνονται σκληρότερες από την παραφίνη και επιτρέπουν έτσι την κοπή πολύ λεπτών τομών.

**(Β)** Ο **μικροτόμος** χρησιμοποιείται για την κοπή ιστών σκηνωμένων σε παραφίνη, για την οπτική μικροσκοπία. Το παρασκεύασμα του ιστού τοποθετείται στο φορέα του κύβου παραφίνης και στην κάθε στροφή του τροφάλου από τον τεχνολόγο, ο φορέας προχωρά μία ελεγχόμενη απόσταση, γενικά ανάμεσα σε 1 και 10  $\mu\text{m}$ . Μετά από κάθε κίνηση προς τα εμπρός, ο ιστός περνάει πάνω από την αιχμή ενός ατσάλινου μαχαίριου και κόβεται μία τομή με πάχος ίσο με την απόσταση που προχώρησε προς τα εμπρός ο κύβος παραφίνης. Οι τομές παραφίνης τοποθετούνται πάνω σε γυάλινα πλακίδια, αφήνονται να κολλήσουν και στη συνέχεια αποπαραφινώνονται και βάφονται για μελέτη στο οπτικό μικροσκόπιο. Για το ΗΜΔ, προετοιμάζονται τομές λεπτότερες του 1  $\mu\text{m}$ , από κύτταρα σκηνωμένα σε ρητίνη και χρήση ενός υπερμικροτόμου με γυάλινο ή διαμαντένιο μαχαίρι.

## Σκλήνωση & Κοπή

Οι ιστοί εγκλείονται (σκηνώνονται) μέσα σε ένα στερεό μέσο που διευκολύνει την κοπή τους. Προ-

κειμένου να κοπούν πολύ λεπτές τομές, οι ιστοί θα πρέπει να διαποτισθούν μετά τη μονιμοποίηση με ένα υλικό σκλήνωσης που να προσδίδει μία άκαμπτη σύσταση στους ιστούς. Τα υλικά σκλήνωσης

περιλαμβάνουν την παραφίνη και πλαστικές ρητίνες. Η παραφίνη χρησιμοποιείται ως ρουτίνα για την οπτική μικροσκοπία και οι ρητίνες τόσο στην οπτική, όσο και στην ηλεκτρονική μικροσκοπία.

Πριν από την έγκλειση σε παραφίνη ή σκλήνωση των ιστών προηγούνται δύο άλλα σημαντικά βήματα: η **αφυδάτωση** και η **διαύγαση**. Κατά την αφυδάτωση, το νερό εξάγεται από τους μονιμοποιημένους ιστούς με τη διαδοχική μεταφορά τους διαμέσου μίας διαβαθμισμένης σειράς μειγμάτων αιθανόλης και νερού, συνήθως από 70% σε 100% αιθανόλη. Μετά η αιθανόλη αντικαθιστάται από ένα οργανικό διαλύτη που είναι αναμιξιμος τόσο με την αλκοόλη, όσο και με το υλικό σκλήνωσης. Καθώς ο διαλύτης διαποτίζει τους ιστούς, αυτοί καθίστανται πιό διαφανείς (υφίστανται διαύγαση). Ο πλήρως διαυγασμένος ιστός τοποθετείται μετά σε λιωμένη παραφίνη, μέσα σε κλίβανο με θερμοκρασία 52°-60°C. Σε αυτή τη θερμοκρασία ο διαλύτης της διαύγασης εξατμίζεται και ο ιστός γεμίζει με λιωμένη παραφίνη. Ο σκληνωμένος ιστός κατόπιν σκληραίνει σε ένα μικρό δοχείο (καλούπι) παραφίνης, σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ιστοί που εγκλείονται σε πλαστική ρητίνη, επίσης αφυδατώνονται με αιθανόλη και, ανάλογα με το είδος της ρητίνης που χρησιμοποιείται, ακολούθως διαποτίζονται με διαλύτες πλαστικού. Η αιθανόλη ή οι διαλύτες αργότερα αντικαθιστώνται με διαλύματα πλαστικού και σκληραίνουν με την προσθήκη πολυμεριστών που προκαλούν διασταυρούμενες συνδέσεις. Η σκλήνωση σε πλαστικό δεν χρειάζεται τις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται για τη σκλήνωση σε παραφίνη και έτσι αποφεύγεται η συρρίκνωση των ιστών και η μείζων παραμόρφωσή τους.

Ένας σκληρός κύβος που περιέχει τον ιστό και παραφίνη τοποθετείται σε ένα όργανο που λέγεται **μικροτόμος** (Εικόνα 1-1) και κόβεται με μία ατσάλινη λεπίδα σε εξαιρετικά λεπτές τομές. Οι τομές παραφίνης είναι κομμένες συνήθως σε πάχος 1-10 μm, ενώ τα μαχαίρια από διαμάντι ή γυαλί των υπερμικροτόμων παράγουν τομές πάχους κάτω του 1 μm για την ηλεκτρονική μικροσκοπία. Ένα μικρόμετρο (1 μm) ισούται με 1/1000 του χιλιοστού (mm) ή  $10^{-6}$  m. Άλλες μονάδες διαστάσεων που χρησιμοποιούνται συχνά στην Ιστολογία περιλαμβάνουν το νανόμετρο (1 nm = 0,001 μm =  $10^{-6}$  mm =  $10^{-9}$  m) και το angstrom (1 Å = 0,1 nm ή  $10^{-4}$  μm). Οι πολύ λεπτές τομές τοποθετούνται σε γυάλινα πλακίδια και βάφονται για την οπτική μικροσκοπία ή σε ειδικά πλέγματα για χρώση και εξέταση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

## ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Οι βιοψίες είναι δείγματα ιστών που αφαιρούνται κατά τη διάρκεια μίας επέμβασης ή ιατρικών πράξεων ρουτίνας. Στην αίθουσα χειρουργείου ή στο ιατρικό κέντρο, οι βιοψίες μονιμοποιούνται σε δοχεία φορμόλης για περαιτέρω επεξεργασία αργότερα και μικροσκοπική ανάλυση σε παθολογοανατομικό εργαστήριο. Όταν απαιτούνται αποτελέσματα τέτοιων αναλύσεων πριν από την περάτωση μίας ιατρικής πράξης, π.χ. για να γνωρίζουμε αν μία εξεργασία είναι κακοήθης προτού κλείσει ο χειρουργός τον ασθενή στο χειρουργείο, χρησιμοποιείται μια πολύ ταχύτερη διαδικασία. Η βιοψία ψύχεται ταχέως σε υγρό άζωτο, διατηρώντας τις κυτταρικές δομές, ενώ ταυτόχρονα ο ιστός είναι σκληρός και έτοιμος να κοπεί σε λεπτές τομές. Ένας μικροτόμος που λέγεται **κρουσάτης**, μέσα σε ένα θάλαμο βαθείας κατάψυξης, χρησιμοποιείται για να κοπεί ο ιστός και οι ψυκτικές τομές τοποθετούνται σε ένα τζαμάκι για ταχεία χρώση και μικροσκοπική εξέταση από ένα παθολογοανατόμο.

Η κατάψυξη των ιστών είναι επίσης αποτελεσματική για την ιστοχημική μελέτη πολύ ευαίσθητων ενζύμων ή μικρών μορίων, επειδή η κατάψυξη σε αντίθεση με τη μονιμοποίηση δεν απενεργοποιεί τα περισσότερα ένζυμα. Τέλος, επειδή οι διαλύτες διαύγασης, όπως το τολουόλιο, διαλύουν τα λιπίδια των κυττάρων, οι τομές κρουσάτη είναι επίσης χρήσιμες όταν πρέπει να μελετηθούν ιστολογικά δομές που περιέχουν λιπίδια.

## Χρώση

Τα περισσότερα κύτταρα και συστατικά της εξωκυττάριας ουσίας είναι τελείως άχρωμα και για να εξετασθούν μικροσκοπικά οι τομές των ιστών θα πρέπει τυπικά να χρωματισθούν (να βαφούν). Οι μέθοδοι χρώσης έχουν επινοηθεί όχι μόνο για να καταστήσουν εμφανή τα διάφορα συστατικά των ιστών, αλλά και για να επιτρέψουν να μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ αυτών των συστατικών. Οι χρωστικές βάφουν τα συστατικά των ιστών περισσότερο ή λιγότερο εκλεκτικά, με πολλές από αυτές να συμπεριφέρονται ως όξινες ή βασικές χημικές ενώσεις που σχηματίζουν ηλεκτροστατικούς δεσμούς (άλατα) με ιονισμένες ρίζες των μορίων των ιστών. Κυτταρικά συστατικά όπως τα νουκλεϊκά οξέα με ένα καθαρά αρνητικό φορτίο (ανιονικά) χρωματίζονται περισσότερο με βασικές χρωστικές και αποκαλούνται **βασεόφιλα**. Κατιονικά συστατικά, όπως οι πρωτεΐνες με πολλές ιονισμένες αμι-

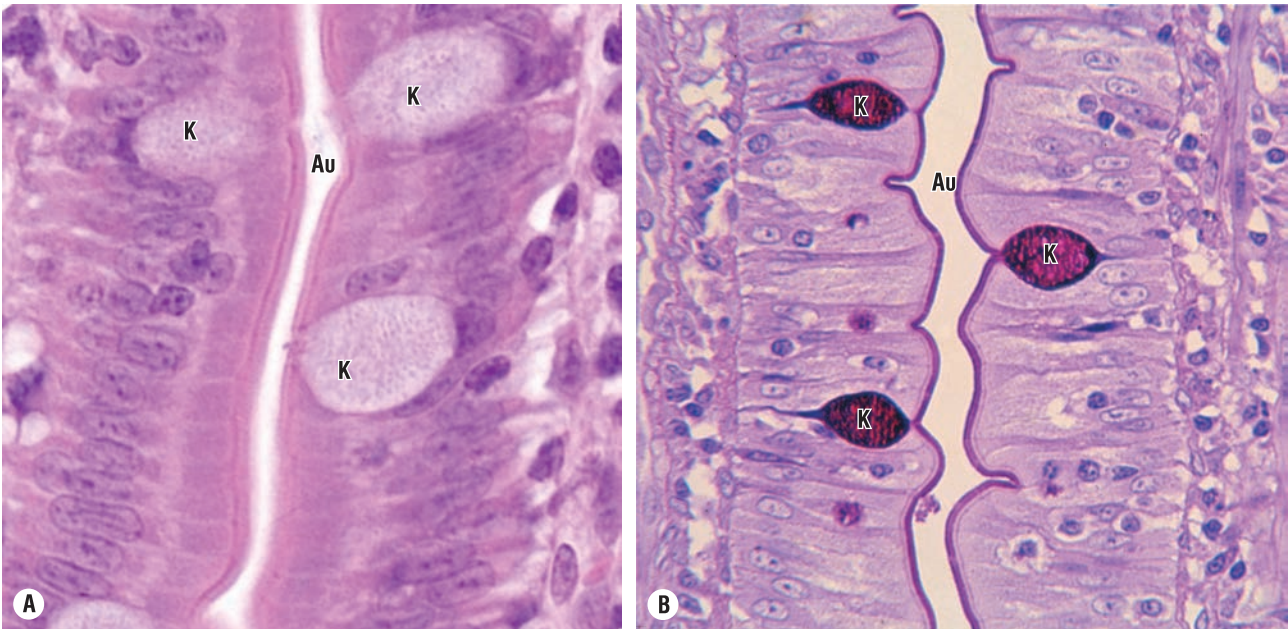
νομάδες, έχουν συνάφεια με όξινες χρωστικές και ονομάζονται **οξεόφιλα**.

Παραδείγματα βασικών χρωστικών είναι το κυανό της τολουϊδίνης, το κυανό της Αλσατίας (Alcian blue) και το κυανό του μεθυλενίου. Η αιματοξυλίνη συμπεριφέρεται ως βασική χρωστική και βάφει τα βασεόφιλα κυτταρικά συστατικά. Τα κύρια συστατικά των ιστών που ιονίζονται και αντιδρούν με τις βασικές χρωστικές, ενεργούν έτσι επειδή διαθέτουν οξέα στη σύνθεσή τους (DNA, RNA και γλυκοζαμινογλυκάνες). Οι όξινες χρωστικές (π.χ. εωσίνη, orange G και όξινη φουξίνη) βάφουν τα οξεόφιλα συστατικά των ιστών, όπως τα μιτοχόνδρια, τα εκκριτικά κοκκία και το κολλαγόνο.

Από όλες τις μεθόδους χρώσης, ο απλός συνδυασμός **αιματοξυλίνης και εωσίνης (A&E)** είναι αυτός που χρησιμοποιείται συχνότερα. Η αιματοξυλίνη παράγει ένα σκοτεινό μπλε ή ιώδες (μωβ)

χρώμα, βάφοντας το DNA στον πυρήνα και άλλες βασεόφιλες δομές (όπως τα πλούσια σε RNA μέρη του κυτταροπλάσματος και τη μεσοκυττάρια ουσία του χόνδρου). Σε αντίθεση η εωσίνη βάφει ροζ άλλα συστατικά του κυτταροπλάσματος και το κολλαγόνο (Εικόνα 1-2A). Άλλες χρωστικές, όπως είναι οι τρίχρωμες (χρώση Masson, χρώση Mallory) χρησιμοποιούνται σε πιο περίπλοκες ιστολογικές μεθόδους. Οι τρίχρωμες χρωστικές εκτός από την πολύ καλή κατάδειξη των πυρήνων και του κυτταροπλάσματος, βοηθούν καλύτερα από την A&E στην διάκριση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας.

Η χημική βάση άλλων μεθόδων χρώσης είναι πιο περίπλοκη από αυτή των ηλεκτροστατικών αντιδράσεων που υφίστανται στη βασεοφιλία και οξεοφιλία. Το DNA μπορεί ειδικά να ταυτοποιηθεί και να ποσοτικοποιηθεί στους πυρήνες με τη χημική



**ΕΙΚΟΝΑ 1-2** Χρώση αιματοξυλίνης και εωσίνης (A&E) και περιοδικού οξέος-Schiff (PAS).

Φωτογραφία (OM) επιθηλίου που επαλείφει το λεπτό έντερο **(A)** χρωματισμένο με A&E και **(B)** με αντίδραση PAS για γλυκοπρωτεΐνες. Με την A&E, οι βασεόφιλοι πυρήνες των κυττάρων βάφονται ιώδεις (μωβ), ενώ το κυτταρόπλασμα βάφεται ροζ. Οι κυτταρικές περιοχές με άφθονους ολιγοσακχαρίτες στις γλυκοπρωτεΐνες τους, όπως τα προς τον αυλό τελικά άκρα των κυττάρων **(Au)** ή τα διάσπαρτα βλεννοεκκριτικά καλκοειδή κύτταρα **(K)**, χρωματίζονται ασθενώς. Εντούτοις, με την PAS η χρώση των κυττάρων είναι πιο έντονη προς τον αυλό, εκεί όπου

οι προβάλλουσες μικρολάχνες έχουν μία εμφανή στιβάδα γλυκοπρωτεϊνών προς τον αυλό (Au) και στα πλούσια σε βλέννη εκκριτικά κοκκία των καλκοειδών κυττάρων. Οι γλυκοπρωτεΐνες των κυτταρικών επιφανειών και η βλέννη είναι PAS-θετικές λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες αντίστοιχα. Στον ιστό που βάφηκε με PAS έχει χρησιμοποιηθεί η αιματοξυλίνη ως αντίχρωση ώστε να αναδειχθούν οι πυρήνες των κυττάρων. Αμφότερες οι εικόνες με μεγέθυνση X300.

ση της αντίδρασης Feulgen, στην οποία τα σάκχαρα της δεσοξυριβόζης υδρολύονται με αραιό υδροχλωρικό οξύ και ακολουθεί **εφαρμογή αντιδραστήριου περιοδικού οξέος-Schiff (PAS)**. Αυτή η αντίδραση PAS βασίζεται στη μετατροπή των 1,2 γλυκολικών ομάδων που υπάρχουν στα σάκχαρα σε αλδεϋδικές ρίζες, που στη συνέχεια αντιδρούν με το αντιδραστήριο Schiff για να παράξουν ένα μωβ ή πορφυρό χρώμα.

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν μία ετερογενή ομάδα στους ιστούς, απαντώντας είτε σε μία ελεύθερη κατάσταση, είτε συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες και λιπίδια. Επειδή περιέχουν σάκχαρα που είναι εξόζες, πολλοί πολυσακχαρίτες μπορούν να αναδειχθούν με την αντίδραση PAS. Ένας πολύ κοινός ελεύθερος πολυσακχαρίτης στα κύτταρα των ζώων είναι το **γλυκογόνο** και μπορεί να αναδειχθεί με την PAS στο ήπαρ, τους γραμμωτούς μύες και άλλους ιστούς στους οποίους αθροίζεται.

Βραχείες αλυσίδες διακλαδιζόμενων σακχάρων (ολιγοσακχαρίτες) προσφύονται σε ειδικά αμινοξέα των **γλυκοπρωτεϊνών**, καθιστώντας έτσι τις περισσότερες γλυκοπρωτεΐνες PAS-θετικές. Η εικόνα 1-2B δείχνει ένα παράδειγμα κυττάρων που βάφονται με την αντίδραση PAS. Οι **γλυκοζαμινογλυκάνες** (GAGs) είναι ανιονικοί, μη-διακλαδιζόμενοι πολυσακχαρίτες με μακριές αλυσίδες, που περιέχουν αμινωμένα σάκχαρα. Πολλές GAGs συντίθενται, ενώ προσφύονται σε ένα πρωτεϊνικό πυρήνα και αποτελούν μέρος μίας τάξης μακρομορίων που λέγονται **πρωτεογλυκάνες**, οι οποίες μετά την έκκρισή τους αποτελούν ένα σημαντικό συστατικό της ΕΚΟ (βλέπε Κεφάλαια 5 και 7). Οι GAGs και πολλές όξινες γλυκοπρωτεΐνες δεν αντιδρούν με την χρώση PAS, αλλά λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε ανιονικές καρβοξυλικές και θειϊκές ομάδες, εμφανίζουν ισχυρές ηλεκτροστατικές αντιδράσεις με την alcian blue και άλλες βασικές χρωστικές.

Βασεόφιλο ή PAS-θετικό υλικό μπορεί να ταυτοποιηθεί περαιτέρω, μετά από προεργασία μίας ιστικής τομής με **ενζυμική πέψη**, με ένα ένζυμο που διασπά ειδικά ένα υπόστρωμα. Για παράδειγμα, προεργασία με ριβονουκλεάση θα ελαττώσει σημαντικά την βασεοφιλία του κυτταροπλάσματος με μικρή συνολικά επίδραση στον πυρήνα, υποδεικνύοντας έτσι την σημασία του RNA για τη χρώση του κυτταροπλάσματος. Παρομοίως, οι ελεύθεροι πολυσακχαρίτες διασπώνται από την αμυλάση και έτσι η αμυλάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάκριση του γλυκογόνου από τις γλυκοπρωτεΐνες σε PAS-θετικό υλικό.

Σε πολλές μεθόδους χρώσης, ορισμένες δομές όπως οι πυρήνες καθίστανται εμφανείς, ενώ άλλα μέρη του κυττάρου παραμένουν ελεύθερα χρώσης. Σε τέτοιες περιπτώσεις χρησιμοποιείται μία **αντίχρωση** για να δώσει πρόσθετες πληροφορίες. Η αντίχρωση είναι συνήθως μία απλή χρώση που εφαρμόζεται χωριστά για να επιτρέψει την καλύτερη αναγνώριση των πυρήνων και άλλων δομών. Στη χρώση A&E, η εωσίνη είναι η αντίχρωση στην αιματοξυλίνη.

Δομές των κυττάρων πλούσιες σε λιπίδια καταδεικνύονται καλύτερα με **λιποδιαλυτές χρωστικές** και αποφεύγοντας τα βήματα που απομακρύνουν τα λιπίδια, όπως επεξεργασία με θερμότητα, οργανικούς διαλύτες ή παραφίνη. Τυπικά, τομές κρουστάτη βάφονται με αλκοολικά διαλύματα κορεσμένα με λιπόφιλες χρωστικές, όπως το **μελανό του Sudan**, το οποίο διαλύεται στις πλούσιες σε λιπίδια δομές των κυττάρων. Εξειδικευμένες μέθοδοι για την εντόπιση της χοληστερόλης, φωσφολιπιδίων και γλυκολιπιδίων είναι χρήσιμες για τη διάγνωση μεταβολικών νόσων στις οποίες υπάρχουν ενδοκυττάριας αθροίσεις αυτών των διαφορετικών λιπιδίων. Επιπρόσθετα, για τη χρώση των ιστών με χρωστικές, μία συνήθης μέθοδος για την ανάδειξη συγκεκριμένων ινών της ΕΚΟ και ειδικών κυτταρικών στοιχείων του νευρικού ιστού είναι οι **τεχνικές εμπότισμού μετάλλων**, που συνήθως χρησιμοποιούν άλατα αργύρου.

Η όλη διαδικασία από την μονιμοποίηση μέχρι την παρατήρηση ενός ιστού στο φωτομικροσκόπιο, μπορεί να πάρει από 12 ώρες έως 2 1/2 ημέρες, ανάλογα με το μέγεθος του ιστού, το μονιμοποιητικό, το υλικό σκλήνωσης και τη μέθοδο χρώσης. Το τελικό βήμα πριν από τη μικροσκοπική παρατήρηση είναι η κάλυψη του πλακιδίου με μία προστατευτική γυάλινη καλυπτρίδα, που συγκολλάται με μία διαυγή κολλητική ουσία.

## ΟΠΤΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

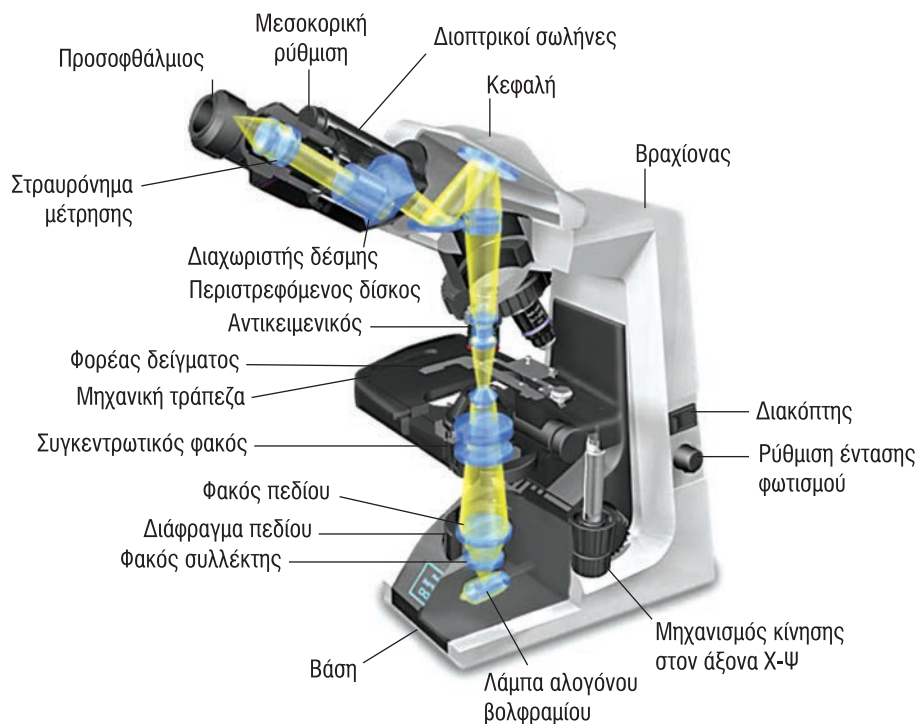
Η συμβατική μικροσκοπία φωτεινού πεδίου, όπως και η φθορίζουσα, η αντίθεσης φάσης, η διαφορικής παρεμβολής (συμβολής), η συνεστιακή και η πολωμένη μικροσκοπία, βασίζονται όλες στην αλληλεπίδραση του φωτός με τα συστατικά των ιστών και χρησιμοποιούνται για να αναδειχθούν και να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά των ιστών με διαφορετικούς τρόπους.

## Μικροσκοπία Φωτεινού Πεδίου

Με το **μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου (OM)**, που χρησιμοποιείται ευρέως από τους φοιτητές ιστολογίας, εξετάζονται χρωματισμένες τομές με κανονικό φως, το οποίο περνάει μέσα από το παρασκεύασμα. Το μικροσκόπιο περιλαμβάνει ένα οπτικό σύστημα και μηχανισμούς για να μετακινεί και να εστιάζει το παρασκεύασμα (Εικόνα 1-3). Τα οπτικά εξαρτήματα συνίστανται σε τρεις φακούς. Ο **συγκεντρωτικός** συλλέγει και εστιάζει έναν κώνο φωτός που φωτίζει το προς παρατήρηση αντικείμενο. Ο **αντικειμενικός** φακός μεγεθύνει και προβάλλει την εικόνα του αντικειμένου προς την

κατεύθυνση του προσοφθάλμιου. Ο **προσοφθάλμιος** μεγεθύνει περαιτέρω αυτή την εικόνα και την προβάλλει στον αμφιβληστροειδή του παρατηρητή ή σε μία διάταξη συζευγμένου φορτίου (charge-coupled device - CCD) που είναι ευαίσθητη σε φως χαμηλής έντασης και είναι συνδεδεμένη με οθόνη και κάμερα. Η συνολική μεγέθυνση προκύπτει από το γινόμενο της μεγεθυντικής ισχύος του αντικειμενικού και του προσοφθαλμίου φακού.

Ο κρίσιμος παράγοντας για να πάρουμε μία καθαρή και λεπτομερή εικόνα με ένα οπτικό μικροσκόπιο είναι η **διακριτική του ισχύς**, οριζόμενη ως η μικρότερη απόσταση μεταξύ δύο σωματιδίων, τα οποία μπορούν να διακριθούν ως χωριστά αντικεί-



**ΕΙΚΟΝΑ 1-3** Εξαρτήματα και δίοδος του φωτός στο μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου.

Φωτογραφία μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου που δείχνει τα μηχανικά του εξαρτήματα και τη δίοδο του φωτός από τη λυχνία της βάσης ως το μάτι του παρατηρητή. Το οπτικό σύστημα έχει τρεις τύπους φακών:

- Ο **συγκεντρωτικός** συλλέγει και εστιάζει μία κωνική δέσμη φωτός που φωτίζει την τομή του ιστού στο πλακίδιο που βρίσκεται στην τράπεζα.
- Ο **αντικειμενικός** φακός μεγεθύνει και προβάλλει τη φωτιζόμενη εικόνα του αντικειμένου προς τον προσοφθάλμιο φακό. Οι εναλλάξιμοι αντικειμενικοί φακοί με διαφορετικές μεγεθύνσεις, που χρησιμοποιούνται ως

ρουτίνα στην ιστολογία, περιλαμβάνουν έναν X4 για παρατήρηση μεγάλης περιοχής του ιστού σε μικρή μεγέθυνση, έναν X10 με μεσαία μεγέθυνση για παρατήρηση μικρότερου πεδίου και έναν X40 με υψηλότερη μεγέθυνση για παρατήρηση με μεγαλύτερη λεπτομέρεια.

- Οι δύο προσοφθάλμιοι μεγεθύνουν την εικόνα ακόμη περισσότερο, X10 και την προβάλλουν στον παρατηρητή, αποδίδοντας συνολική μεγέθυνση X40, X100 ή X400 αντίστοιχα.

(Με την ευγενή παραχώρηση της Nikon instruments).

μενα. Η μέγιστη διακριτική ισχύς του οπτικού μικροσκοπίου είναι περίπου 0,2 μm, μία ισχύς που αποδίδει καλές εικόνες σε μεγέθυνση 1000-1500 φορές. Αντικείμενα μικρότερα ή λεπτότερα από 0,2 μm (όπως ένα ριβόσωμα, μία μεμβράνη ή ένα νημάτιο ακτίνης) δεν είναι διακριτά με αυτό το όργανο. Παρομοίως, δύο δομές όπως τα μιτοχόνδρια, θα φανούν ως ένα αντικείμενο αν έχουν απόσταση μικρότερη από 0,2 μm. Η ποιότητα της εικόνας –η καθαρότητα και οι λεπτομέρειές της– εξαρτάται από τη διακριτική ισχύ του μικροσκοπίου. Η μεγέθυνση έχει αξία μόνο όταν συνοδεύεται από υψηλή ανάλυση. Η διακριτική ισχύς ενός μικροσκοπίου εξαρτάται κυρίως από την ποιότητα του αντικειμενικού φακού. Ο προσοφθάλμιος μεγεθύνει μόνο την εικόνα που προσλαμβάνει από τον αντικειμενικό. Δεν βελτιώνει την ανάλυση. Γι' αυτό το λόγο, όταν συγκρίνονται αντικειμενικοί φακοί διαφορετικών μεγεθύνσεων, αυτοί που προσφέρουν τις μεγαλύτερες μεγεθύνσεις έχουν επίσης και την υψηλότερη διακριτική ισχύ.

Ψηφιακές κάμερες που είναι υψηλής ευαισθησίας στο φως, ενισχύουν την ισχύ των μικροσκοπίων φωτεινού πεδίου και των άλλων οπτικών μικροσκοπίων, επιτρέποντας τη λήψη εικόνων κατάλληλων για ποσοτική ανάλυση και άμεση εκτύπωση. Τα όρια της οπτικής μικροσκοπίας έχουν επανακαθορισθεί με τη χρήση ψηφιακών καμερών και προγραμμάτων ενίσχυσης εικόνας (π.χ. βελτίωση αντίθεσης), τα οποία επιτρέπουν να αναλυθούν αντικείμενα στη βιντεο-οθόνη, που δεν είναι άμεσα ορατά με τον προσοφθάλμιο φακό. Τέτοια συστήματα είναι επίσης χρήσιμα για τη μελέτη ζωντανών κυττάρων για μεγάλες χρονικές περιόδους, επειδή χρησιμοποιούν φως χαμηλής έντασης που αποφεύγει την καταστροφή των κυττάρων από τη θερμότητα πιο έντονου φωτισμού. Η ανάπτυξη λογισμικού για ανάλυση εικόνας επιτρέπει την ταχεία μέτρηση και ποσοτική μελέτη των μικροσκοπικών δομών.

### Φθορίζουσα Μικροσκοπία

Όταν ορισμένα κυτταρικά υποστρώματα ακτινοβοληθούν από φως κατάλληλου μήκους κύματος, εκπέμπουν φως μεγαλύτερου μήκους κύματος, ένα φαινόμενο που αποκαλείται **φθορισμός**. Στη **φθορίζουσα μικροσκοπία**, οι ιστικές τομές ακτινοβολούνται συνήθως με υπεριώδες φως (UV) και η εκπομπή είναι στο ορατό μέρος του φάσματος. Οι φθορίζουσες ουσίες εμφανίζονται λαμπερές μέσα σε ένα σκοτεινό φόντο. Για αυτή τη μέθοδο, το μι-

κροσκόπιο έχει μία πηγή υπεριώδους φωτός και ειδικά φίλτρα τα οποία επιλέγουν ακτίνες διαφορετικού μήκους κύματος που εκπέμπουν οι ουσίες.

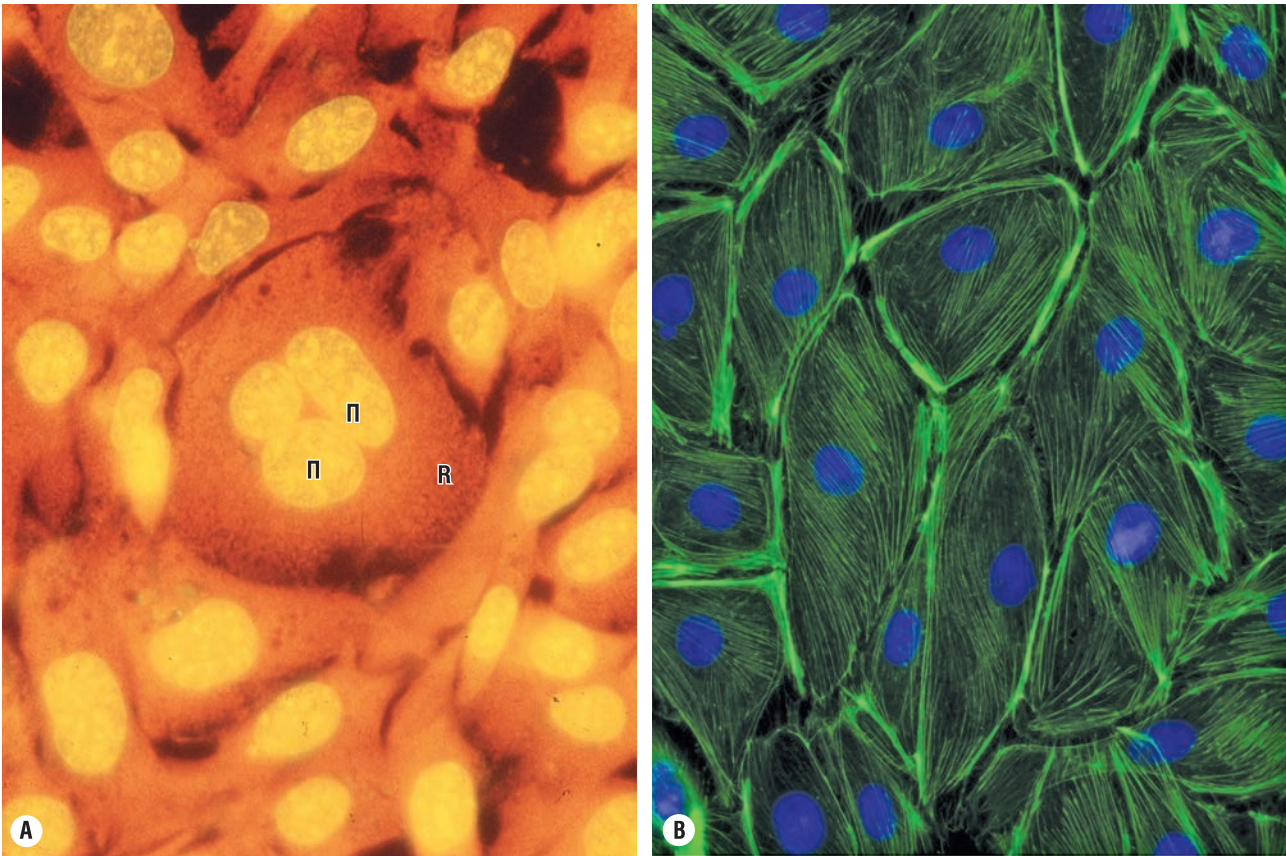
Φθορίζουσες χημικές ουσίες με συνάφεια για ειδικά κυτταρικά μακρομόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φθορίζουσες χρωστικές. Το πορτοκαλί της ακριδίνης, που συνδέεται με το DNA και το RNA, είναι ένα παράδειγμα. Όταν παρατηρούνται στο μικροσκόπιο φθορισμού, αυτά τα νουκλεϊκά οξέα εκπέμπουν ελαφρώς διαφορετικό φθορισμό, επιτρέποντας έτσι να τα εντοπίσουμε ξεχωριστά μέσα στα κύτταρα (Εικόνα 1-4A). Άλλες χημικές ενώσεις όπως το DAPI και η χρώση Hoechst συνδέονται ειδικά στο DNA και χρησιμοποιούνται για να βάψουν τους πυρήνες των κυττάρων, εκπέμποντας ένα χαρακτηριστικό γαλάζιο φθορισμό κάτω από το υπεριώδες φως. Μία άλλη σημαντική εφαρμογή της φθορίζουσας μικροσκοπίας είναι η σύζευξη χημικών ενώσεων όπως η φλουοροσκεΐνη με μόρια που μπορούν να συνδεθούν ειδικά με συγκριμένα κυτταρικά συστατικά κι έτσι να επιτρέψουν την ταυτοποίηση αυτών των δομών κάτω από το μικροσκόπιο (Εικόνα 1-4B). Τα αντισώματα που είναι σεσημασμένα με φθορίζουσες χημικές ενώσεις είναι εξαιρετικά σημαντικά για τις ανοσοϊστολογικές χρώσεις (βλέπε το υποκεφάλαιο Ανάδειξη Συγκεκριμένων Μορίων).

### Μικροσκοπία Αντίθεσης Φάσης

Τα μη-χρωματισμένα κύτταρα και οι τομές των ιστών είναι συνήθως διαφανή και άχρωμα και μπορούν να μελετηθούν με αυτά τα τροποποιημένα μικροσκόπια. Οι λεπτομέρειες των κυττάρων φυσιολογικά είναι δύσκολο να διακριθούν σε μη-χρωματισμένες τομές επειδή όλα τα μέρη του παρασκευάσματος έχουν παρόμοια οπτική πυκνότητα. Εντούτοις, η **μικροσκοπία αντίθεσης φάσης** χρησιμοποιεί ένα σύστημα φακών που παράγει ορατές εικόνες από διαφανή αντικείμενα και μάλιστα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ζωντανά κύτταρα σε κυτταροκαλλιέργειες (Εικόνα 1-5).

Η μικροσκοπία αντίθεσης φάσης βασίζεται στην αρχή ότι το φως αλλάζει την ταχύτητά του όταν διέρχεται μέσα από κυτταρικές και εξωκυτταρικές δομές με διαφορετικούς δείκτες διάθλασης. Αυτές οι διαφορές χρησιμοποιούνται από το σύστημα αντίθεσης φάσης ώστε οι διάφορες δομές να εμφανισθούν φωτεινότερες ή σκοτεινότερες αναμεταξύ τους. Καθόσον επιτρέπει την εξέταση των ιστών χωρίς μονιμοποίηση ή χρώση, τα μικροσκόπια αντίθεσης φάσης είναι όργανα που χρησι-





**ΕΙΚΟΝΑ 1-4** Εμφάνιση των κυττάρων με τη φθορίζουσα μικροσκοπία.

Τα συστατικά των κυττάρων συχνά χρωματίζονται με χημικές ουσίες ορατές με τη φθορίζουσα μικροσκοπία.

**(Α)** Το πορτοκαλί της ακριδίνης συνδέεται με τα νουκλεϊκά οξέα στους πυρήνες των κυττάρων (**Π**) και εκπέμπει κίτρινο φως, ενώ το κυτταρόπλασμα αυτών των κυττάρων από νεφρικό σωληνάριο, που περιέχει RNA (**Ρ**), εμφανίζεται πορτοκαλί.

**(Β)** Κύτταρα σε καλλιέργεια χρωματισμένα με DAPI (4',6-διαμινο-2-φαινυλινδόλη) που συνδέεται με το DNA και φλουοροσκεΐνη-φαλλοϊδίνη που συνδέεται με τα νημά-

τια της ακτίνης, εμφανίζουν τους πυρήνες τους με μπλε φθορισμό και τα νημάτια της ακτίνης βαμμένα πράσινα. Έτσι, παρέχονται με ευκολία σημαντικές πληροφορίες, όπως η αυξημένη πυκνότητα μικρονημάτων στην περιφέρεια του κυττάρου. Αμφότερες με μεγέθυνση X500.

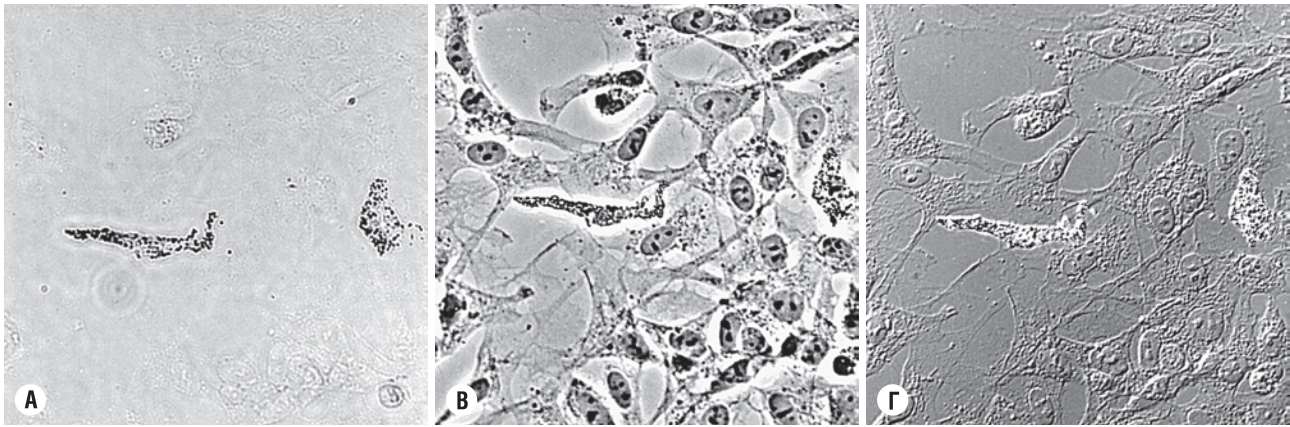
*(Η Εικόνα 1-4B, με την ευγενή παραχώρηση των Drs Claire E. Walczak και Rania Risk, Indiana University School of Medicine, Bloomington).*

μποποιούνται ευρέως σε εργαστήρια κυτταροκαλλιεργειών. Μία τροποποίηση της μικροσκοπίας αντίθεσης φάσης είναι η **μικροσκοπία διαφορικής παρεμβολής ή συμβολής**, που χρησιμοποιεί την οπτική Nomarski, και παράγει εμφανέστερες και τρισδιάστατες (3D) εικόνες ζωντανών κυττάρων (Εικόνα 1-5Γ).

### Συνεστιακή Μικροσκοπία

Με το σύνηθες μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, η

δέσμη του φωτός είναι σχετικά μεγάλη και φωτίζει όλο το αντικείμενο. Η περίσσεια φωτός ελαττώνει την αντίθεση μέσα στην εικόνα και μειώνει την διακριτική ισχύ του αντικειμενικού φακού. Η συνεστιακή μικροσκοπία (Εικόνα 1-6) αποφεύγει αυτά τα προβλήματα και επιτυγχάνει υψηλή ανάλυση και ευκρινή εστίαση χρησιμοποιώντας (1) ένα μικρό σημείο με υψηλή ένταση φωτός, συνήθως από ένα laser και (2) ένα πεδίο με μία πολύ μικρή οπή μπροστά από τον ανιχνευτή εικόνας. Η σημειακή φωτεινή πηγή, το εστιακό πεδίο του φακού και η



**ΕΙΚΟΝΑ 1-5** Εμφάνιση άβαφων κυττάρων σε τρεις τύπους οπτικής μικροσκοπίας.

Ζωντανά κύτταρα της νευρικής ακρολοφίας που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια, εμφανίζονται διαφορετικά στις διάφορες τεχνικές οπτικής μικροσκοπίας. Εδώ, το ίδιο πεδίο άβαφων κυττάρων, που περιλαμβάνει δύο διαφορετικά κύτταρα με κοκκία χρωστικής, παρουσιάζεται με χρήση τριών διαφορετικών μεθόδων (όλα με μεγέθυνση X200):

**(Α) Μικροσκοπία φωτεινού πεδίου:** Χωρίς μονιμοποίηση και χρώση, αναγνωρίζονται μόνο δύο κύτταρα με κοκκία χρωστικής.

**(Β) Μικροσκοπία αντίθεσης φάσης:** Τα κυτταρικά όρια, οι πυρήνες και οι κυτταροπλασματικές δομές, έχοντας διαφορετικούς διαθλαστικούς δείκτες, επηρεάζουν

διαφορετικά τη φάση του φωτός και παράγουν εικόνες αυτών των χαρακτηριστικών σε όλα τα κύτταρα.

**(Γ) Μικροσκοπία διαφορικής παρεμβολής ή συμβολής:** Οι κυτταρικές λεπτομέρειες απεικονίζονται με διαφορετικό τρόπο με τη χρήση της οπτικής Nomarski. Η μικροσκοπία αντίθεσης φάσης, με ή χωρίς παρεμβολή, χρησιμοποιείται ευρέως για να παρατηρούνται ζωντανά κύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες ιστών.

*(Με την ευγενή παραχώρηση της Dr Sherry Rogers, Department of Cell Biology and Physiology, University of New Mexico, Albuquerque, NM).*

μικρή οπή του ανιχνευτή, είναι όλα οπτικά συζευγμένα ή ευθυγραμμισμένα, το ένα με το άλλο στο εστιακό πεδίο (συνεστιακό) και το μη-εστιασμένο φως δεν διέρχεται μέσα από την οπή. Αυτό βελτιώνει σημαντικά την ανάλυση του εστιασμένου αντικειμένου και επιτρέπει τον εντοπισμό των συστατικών στοιχείων του παρασκευάσματος με πολύ μεγαλύτερη ακρίβεια από το μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου.

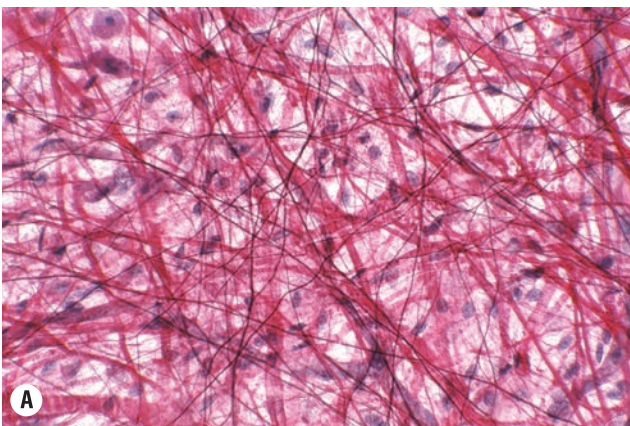
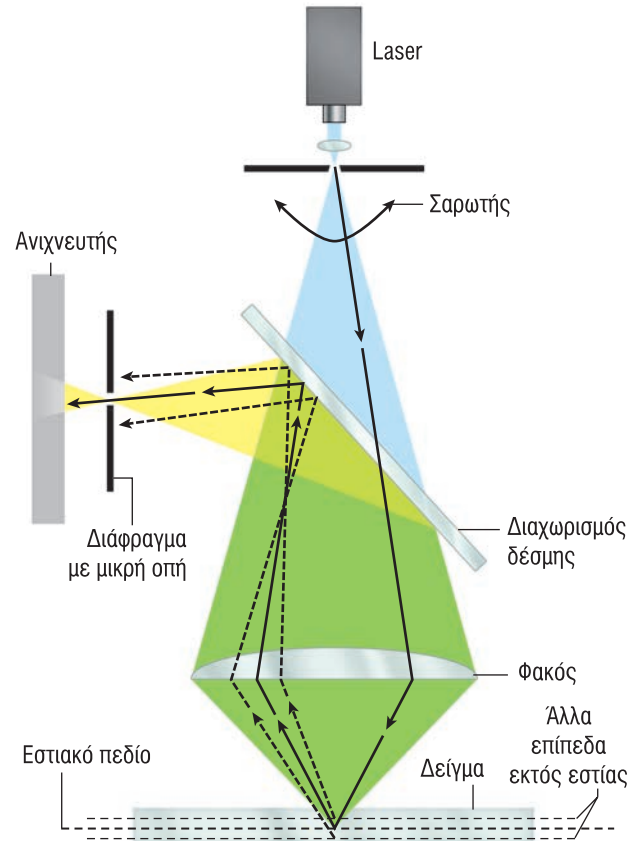
Τα συνεστιακά μικροσκόπια περιλαμβάνουν ένα σύστημα κατόπτρων ελεγχόμενο από υπολογιστή (διαχωριστής δέσμης) που μετακινεί το σημείο φωτισμού σε όλο το παρασκεύασμα αυτόματα και γρήγορα. Ψηφιακές εικόνες που λαμβάνονται από πολλά διαφορετικά σημεία ενός πολύ λεπτού πεδίου εστίασης, χρησιμοποιούνται για να δημιουργήσουν μία «οπτική τομή» αυτού του πεδίου. Η δημιουργία τέτοιων οπτικών τομών σε μία σειρά από διαδοχικά εστιακά πεδία ενός παρασκευάσματος, επιτρέπει την ψηφιακή ανασύσταση μίας τρισδιάστατης (3D) εικόνας.

## Πολωτική Μικροσκοπία

Η πολωτική μικροσκοπία επιτρέπει την αναγνώριση χρωματισμένων ή μη-χρωματισμένων δομών που απαρτίζονται από υπομονάδες με υψηλή οργάνωση. Όταν το κανονικό φως διέρχεται από ένα **πολωτικό** φίλτρο, εξέρχεται δονούμενο μόνο προς μία κατεύθυνση. Αν τοποθετηθεί ένα δεύτερο φίλτρο στο μικροσκόπιο, πάνω από το πρώτο, με τον κύριο του άξονα κάθετο στον άξονα του πρώτου φίλτρου, τότε δεν περνάει καθόλου φως. Αν, εντούτοις, ανάμεσα στα δύο φίλτρα υπάρχουν ιστικές δομές που περιέχουν προσανατολισμένα μακρομόρια, η επαναλαμβανόμενη δομή τους περιστρέφει το φως που αναδύεται από τον πολωτή και αυτά εμφανίζονται ως φωτεινές δομές μέσα σε ένα σκοτεινό φόντο (Εικόνα 1-7). Η ικανότητα στροφής στην κατεύθυνση του πολωμένου φωτός λέγεται **διπλοθλαστικότητα** και είναι χαρακτηριστικό των κρυσταλλικών ουσιών ή ουσιών που περιέχουν μόρια με υψηλή οργάνωση, όπως είναι η

**ΕΙΚΟΝΑ 1-6 Αρχή της συνεστιακής μικροσκοπίας.**

Παρόλο που μόνο ένα πολύ μικρό σημείο φωτός, προερχόμενο από ένα επίπεδο μίας τομής, διέρχεται από μία μικρή οπή και φθάνει στον ανιχνευτή, ακτίνες προερχόμενες από άλλα πεδία εμποδίζονται από το πέτασμα. Έτσι, ένα μόνο πολύ λεπτό πεδίο του παρασκευάσματος εστιάζεται κάθε φορά. Το διάγραμμα εμφανίζει την πρακτική διάταξη του συνεστιακού μικροσκοπίου. Φως από μία πηγή laser προσπίπτει στο παρασκεύασμα και ανακλάται. Ένας διαχωριστής δέσμης κατευθύνει το ανακλώμενο φως σε μία μικρή οπή και στον ανιχνευτή. Φως από συστατικά του παρασκευάσματος, πάνω ή κάτω από το επίπεδο εστίασης αποκλείονται από το διάφραγμα. Το laser σαρώνει το παρασκεύασμα, έτσι ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί μία μεγάλη περιοχή του παρασκευάσματος.



**ΕΙΚΟΝΑ 1-7 Εμφάνιση ιστού με μικροσκοπία φωτεινού πεδίου και πολωτική μικροσκοπία.**

Η πολωτική οπτική μικροσκοπία παράγει εικόνες μόνο σε υλικά που έχουν επαναλαμβανόμενη, περιοδική μακρομοριακή δομή. Χαρακτηριστικά χωρίς τέτοια δομή δεν είναι εμφανή. Τμήματα από λεπτό, μη-τεμαχισμένο μεσεντέριο βάφονται με picosirius red, ορσεΐνη και αιματοξυλίνη, τοποθετούνται σε πλακίδια και παρατηρούνται με μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου **(Α)** και πολωτικό μικροσκόπιο **(Β)**.

- (Α)** Με το μικροσκόπιο φωτεινού πεδίου, οι κολλαγόνες ίνες εμφανίζονται κόκκινες, μαζί με λεπτές ελαστικές ίνες και τους πυρήνες των κυττάρων.
- (Β)** Με το πολωτικό μικροσκόπιο, μόνο οι κολλαγόνες ίνες είναι ορατές και εμφανίζουν έντονα κίτρινη ή πορτοκαλί διπλοθλαστικότητα (Α: Χ40, Β: Χ100).

κυτταρίνη, το κολλαγόνο, τα μικροσωληνάρια και τα νημάτια ακτίνης.

## ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης και σάρωσης βασίζεται στην αλληλεπίδραση των συστατικών των ιστών με δέσμες ηλεκτρονίων. Το μήκος κύματος της δέσμης των ηλεκτρονίων είναι πολύ βραχύτερο από αυτό του φωτός, επιτρέποντας έτσι 1000 φορές αύξηση στην ανάλυση (μεγέθυνση).

### Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης

Η **ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (ΗΜΔ)** είναι ένα σύστημα απεικόνισης που προσφέρει ανάλυση γύρω στα 3 nm. Αυτή η υψηλή ανάλυση επιτρέπει να αναδειχθούν λεπτομέρειες σε μεγεθύνσεις έως και 400.000 φορές. Δυστυχώς, αυτό το επίπεδο μεγέθυνσης έχει εφαρμογή μόνο σε μεμονωμένα μακρομόρια και σωματίδια. Πολύ λεπτές τομές ιστών μπορεί να παρατηρηθούν με λεπτομέρεια σε μεγεθύνσεις έως και 120.000 φορές.

Στο ΗΜΔ, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1-8Α, μία κάθοδος από ένα μεταλλικό νημάτιο εκπέμπει ηλεκτρόνια που κινούνται προς μία άνοδο, μία μεταλλική πλάκα με μία κεντρική οπή, που σχηματίζει μία δέσμη καθώς τα ηλεκτρόνια διέρχονται μέσα από αυτή. Η διαφορά τάσης μεταξύ καθόδου και ανόδου ποικίλει αδρά μεταξύ 60 και 120 KV, παράγοντας ηλεκτρόνια διαφορετικού μήκους κύματος. Η δέσμη εστιάζεται διερχόμενη μέσα από μία σειρά από ηλεκτρομαγνήτες, των οποίων η ισχύς είναι επίσης κυμαινόμενη.

Ο πρώτος φακός είναι συγκεντρωτικός, εστιάζοντας τη δέσμη των ηλεκτρονίων σε μία τομή του παρασκευάσματος. Μερικά ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με τα άτομα της τομής και αλλάζουν πορεία, ενώ άλλα διέρχονται από το παρασκεύασμα χωρίς να επηρεάζονται. Τα ηλεκτρόνια που διέρχονται μέσα από το παρασκεύασμα φθάνουν στον αντικειμενικό φακό, που σχηματίζει μία εστιασμένη και μεγεθυμένη εικόνα, η οποία στη συνέχεια μεγεθύνεται περισσότερο από άλλους φακούς και τελικά συλλαμβάνεται και προβάλλεται σε μία οθόνη. Η εικόνα του παρασκευάσματος δείχνει περιοχές λευκές, μαύρες και με αποχρώσεις του γκρι, που ανταποκρίνονται σε περιοχές μέσα από τις οποίες τα ηλεκτρόνια έχουν περάσει ελεύθερα

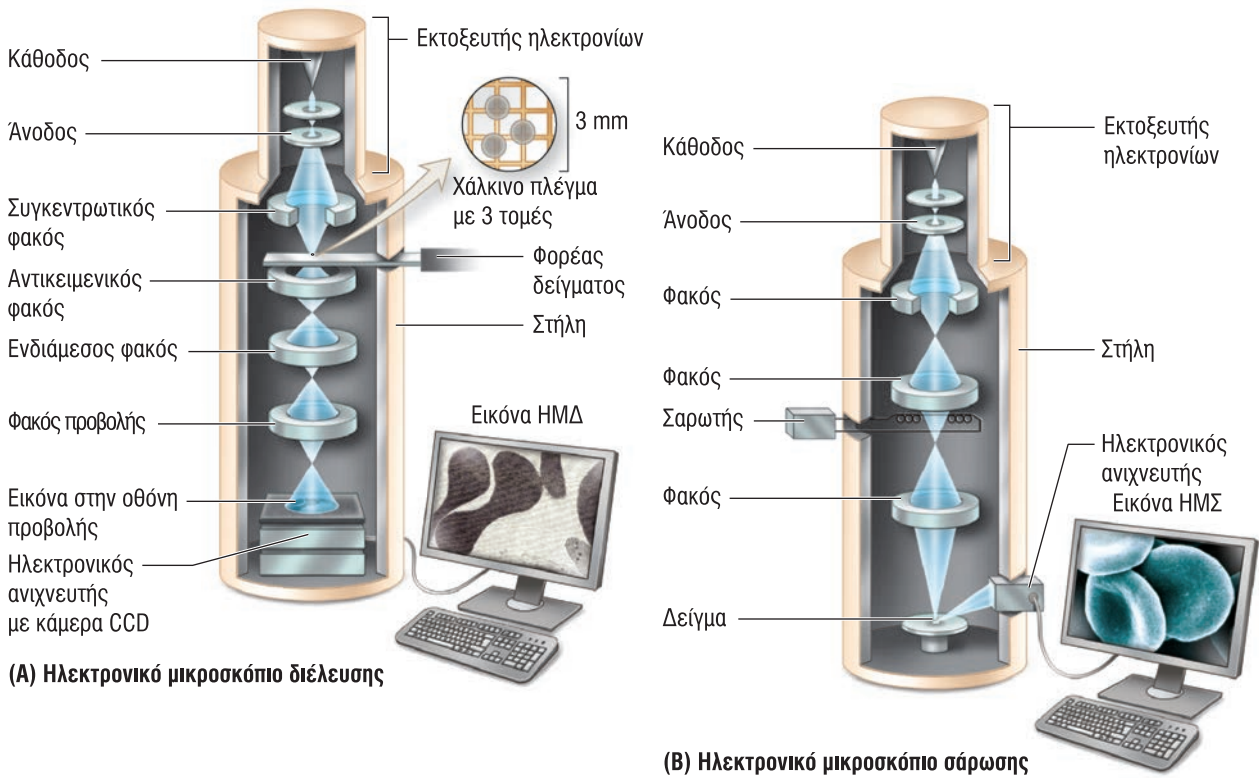
(που εμφανίζονται ως φωτεινές περιοχές ή ηλεκτρονικά-διαφανείς) και περιοχές όπου τα ηλεκτρόνια έχουν απορροφηθεί ή εκτραπεί (που εμφανίζονται σκοτεινότερες ή περισσότερο ηλεκτρονικά-πυκνές). Για να βελτιωθεί η αντίθεση και η ανάλυση στο ΗΜΔ, συχνά προστίθενται στα μονιμοποιητικά υγρά ή τα αφυδατωτικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για να επεξεργασθούν οι ιστοί, χημικές ενώσεις με **βαρέα μεταλλικά ιόντα**. Αυτά περιλαμβάνουν το τετροξείδιο του οσμίου, τον κίτρικό μόλυβδο και χημικές ενώσεις ουρανιού, οι οποίες συνδέονται με κυτταρικά μακρομόρια, αυξάνοντας την ηλεκτρονική τους πυκνότητα και τη διακριτότητά τους.

Το ΗΜΔ κανονικά απαιτεί πολύ λεπτές τομές (40-90 nm). Γι' αυτό ο ιστός σκηνώνεται σε ένα σκληρό εποξικό υλικό και κόβεται με ένα γυάλινο ή διαμαντένιο μαχαίρι. Οι τομές συλλέγονται πάνω σε μικρά μεταλλικά πλέγματα και τοποθετούνται στη στήλη του μικροσκοπίου για μελέτη.

Η **κρυοθραύση** ή **ψυκτοτεμαχισμός (cryofracture)** και η **ψυκτοεξάχνωση (freeze etching)** είναι τεχνικές που επιτρέπουν τη μελέτη κυττάρων με το ΗΜΔ, χωρίς μονιμοποίηση και σκλήνωση. Ο ψυκτοτεμαχισμός είναι ιδιαίτερα χρήσιμος στη μελέτη της δομής των μεμβρανών των κυττάρων. Σε αυτές τις μεθόδους, πολύ μικρά παρασκευάσματα ιστών ψύχονται ταχέως με υγρό άζωτο και είτε θραύονται (τεμαχίζονται), είτε κόβονται με μαχαίρι. Με την εφαρμογή λεπτών επιστρωμάτων εξαχρωμένης πλατίνης ή άλλων βαρέων μετάλλων, παράγεται σε κενό ένα αντίγραφο της εκτεθειμένης παγωμένης επιφάνειας. Μετά την απομάκρυνση του οργανικού υλικού, το αντίγραφο της κομμένης επιφάνειας μπορεί να μελετηθεί στο ΗΜ. Τα τυχαία επίπεδα τεμαχισμού στις μεμβράνες, συχνά διαχωρίζουν τις λιπιδικές διπλοστιβάδες, εκθέτοντας έτσι τα πρωτεϊνικά συστατικά, των οποίων το μέγεθος, το σχήμα και η κατανομή θα ήταν αδύνατο να μελετηθούν με άλλες μεθόδους.

### Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Η **ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (ΗΜΣ)** προσφέρει τη δυνατότητα παρατήρησης επιφανειών κυττάρων, ιστών και οργάνων με υψηλή ανάλυση. Όπως το ΗΜΔ, αυτό το μικροσκόπιο παράγει και εστιάζει μία πολύ στενή δέσμη ηλεκτρονίων, αλλά σε αυτό το όργανο η δέσμη δεν διέρχεται μέσα από το παρασκεύασμα (Εικόνα 1-8Β). Αντίθετα, η επιφάνεια του παρασκευάσματος πρώτα ξηραίνεται και μετά ψεκάζεται και καλύπτεται από



**ΕΙΚΟΝΑ 1-8 Ηλεκτρονικά μικροσκόπια.**

Τα ηλεκτρονικά μικροσκόπια είναι μεγάλα όργανα, που στεγάζονται γενικά σε εξειδικευμένες εγκαταστάσεις.

**(Α)** Σχηματική άποψη των κύριων εξαρτημάτων ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου διέλευσης (ΗΜΔ), το οποίο είναι διαμορφωμένο, μάλλον σαν ένα ανεστραμμένο οπτικό μικροσκόπιο. Ένα μεταλλικό νήμα (συνήθως βολφράμιο), που είναι η κάθοδος και βρίσκεται στην κορυφή της μικροσκοπικής στήλης, εκπέμπει ηλεκτρόνια μέσα σε κενό που ταξιδεύουν προς την άνοδο, επιταχυνόμενα από τάση 60 έως 120 kV. Τα ηλεκτρόνια που διέρχονται από μία οπή της ανόδου, σχηματίζουν μία δέσμη, που εστιάζεται ηλεκτρομαγνητικά από κυκλικά ηλεκτρικά σπειράματα, με τρόπο ανάλογο με αυτόν που επιδρούν οι οπτικοί φακοί στο φως.

Ο πρώτος φακός είναι συγκεντρωτικός και εστιάζει τη δέσμη στην τομή. Μερικά ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με τα άτομα της τομής, και είτε απορροφώνται, είτε διασπείρονται σε διάφορο βαθμό, ενώ άλλα διέρχονται μέσα από το παρασκεύασμα, χωρίς καμία αλληλεπίδραση. Τα ηλεκτρόνια που φθάνουν στον αντικειμενικό φακό, σχηματίζουν μία εικόνα, η οποία στη συνέχεια μεγεθύνεται και τελικά προβάλλεται σε μία φθορίζουσα οθόνη ή σε συσκευή συζευγμένου φορτίου (CCD) με κάμερα και οθόνη.

Σε μία εικόνα ΗΜΔ, περιοχές του παρασκευάσματος μέσα από τις οποίες διέρχονται τα ηλεκτρόνια, εμφα-

νίζονται φωτεινές (ηλεκτρονικά διαφανείς), ενώ πυκνότερες περιοχές ή αυτές που δεσμεύουν ιόντα βαρέων μετάλλων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας του παρασκευάσματος, απορροφούν ή εκτρέπουν τα ηλεκτρόνια και εμφανίζονται σκοτεινές (ηλεκτρονικά πυκνές). Γι' αυτό τέτοιες εικόνες είναι πάντοτε λευκές, μαύρες ή με αποχρώσεις του γκρι.

**(Β)** Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (ΗΜΣ) έχει πολλές ομοιότητες με το ΗΜΔ. Εντούτοις, εδώ η εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων δεν διέρχεται μέσα από το παρασκεύασμα, αλλά μάλλον μετακινείται διαδοχικά (σαρώνει) από σημείο σε σημείο, σε όλη την επιφάνεια, με τον ίδιο τρόπο που μία δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει μία οθόνη τηλεόρασης. Για το ΗΜΣ, τα παρασκευάσματα καλύπτονται με μεταλλικά άτομα με τα οποία αλληλεπιδρά η δέσμη των ηλεκτρονίων, παράγοντας ανακλώμενα ηλεκτρόνια και άλλα, νεοεκπεμπόμενα δευτερογενή ηλεκτρόνια. Όλα αυτά συλλαμβάνονται από ένα ανιχνευτή, μεταδίδονται σε ενισχυτές και επεξεργάζονται για να δώσουν μία ασπρόμαυρη εικόνα σε μία οθόνη. Το ΗΜΣ δείχνει μόνο επιφανειακές απόψεις του καλυμμένου παρασκευάσματος, αλλά με μία έντονα τρισδιάστατη ποιότητα με σκιές. Το εσωτερικό των οργάνων ή κυττάρων μπορεί να αναλυθεί αφού κοπεί, ώστε να εκτεθούν οι εσωτερικές τους επιφάνειες.

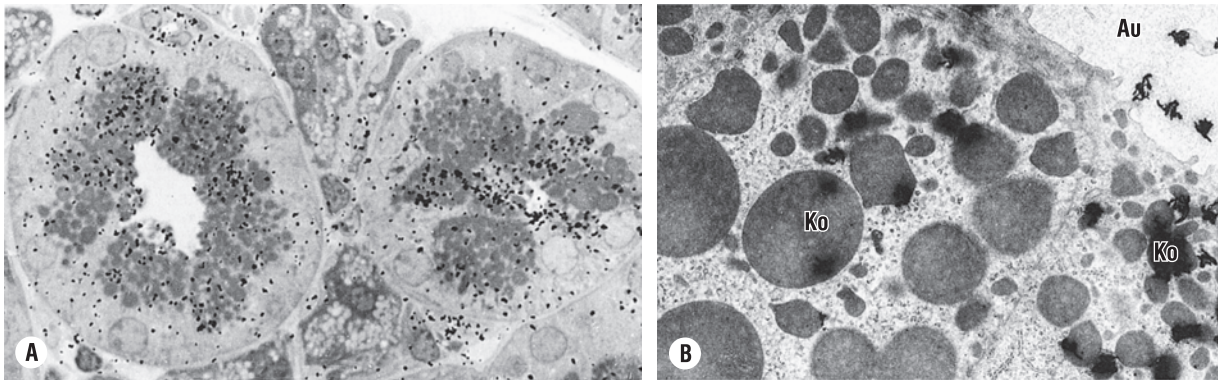
ένα πολύ λεπτό στρώμα από βαρύ μέταλλο (συνήθως χρυσός) μέσα από το οποίο τα ηλεκτρόνια δεν διέρχονται με ευκολία. Όταν η δέσμη σαρώνει σημείο προς σημείο όλο το παρασκεύασμα, αλληλεπιδρά με τα άτομα του μετάλλου και παράγει ανακλώμενα ηλεκτρόνια ή δευτερογενή ηλεκτρόνια που εκπέμπονται από το μέταλλο. Αυτά συλλαμβάνονται από έναν ανιχνευτή και το παραγόμενο σήμα επεξεργάζεται για να δώσει μία ασπρόμαυρη εικόνα σε μία οθόνη. Οι εικόνες του ΗΜΣ είναι συνήθως εύκολο να ερμηνευθούν επειδή παρουσιάζουν μία τρισδιάστατη άποψη που φαίνεται σαν να φωτίζεται από πάνω, με τον ίδιο τρόπο που σε ένα μεγάλο αντικείμενο δημιουργούνται ανταύγειες και σκιές όταν το φως πέφτει από επάνω.

## ΑΥΤΟΡΑΔΙΟΓΡΑΦΙΑ

Η μικροσκοπική **αυτοραδιογραφία** είναι μία μέθοδος εντοπισμού νεο-συντεθειμένων μακρομορίων

(DNA, RNA, πρωτεΐνες, γλυκοπρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες) σε κύτταρα και ιστούς. Οι ραδιοσημασμένοι μεταβολίτες (νουκλεοτίδια, αμινοξέα, σάκχαρα) που ενσωματώνονται μέσα στα μακρομόρια, εκπέμπουν μία ασθενή ακτινοβολία που περιορίζεται στην συγκεκριμένη περιοχή που εντοπίζονται τα μόρια. Πλακίδια με ραδιοσημασμένα κύτταρα ή τομές ιστών καλύπτονται μέσα σε σκοτεινό θάλαμο, από φωτογραφικό γαλάκτωμα που περιέχει κρυστάλλους βρωμιούχου αργύρου, οι οποίοι δρουν ως μικροανιχνευτές της ακτινοβολίας, με τον ίδιο τρόπο που αποκρίνεται στο φως το φωτογραφικό φιλμ. Μετά από επαρκή χρόνο έκθεσης μέσα σε αδιαφανή κουτιά, τα πλακίδια επεξεργάζονται φωτογραφικά. Οι κρύσταλλοι του βρωμιούχου αργύρου ανάγονται από την ακτινοβολία και παράγουν μικρούς μαύρους κόκκους μεταλλικού αργύρου, οι οποίοι είτε κάτω από οπτικό μικροσκόπιο, είτε με το ΗΜΔ υποδεικνύουν τις θέσεις των ραδιοσημασμένων μακρομορίων στον ιστό (Εικόνα 1-9).

Η αυτοραδιογραφία ιστών και κυττάρων δίδει



**ΕΙΚΟΝΑ 1-9** Μικροσκοπική αυτοραδιογραφία.

Οι αυτοραδιογραφίες είναι παρασκευάσματα ιστών στα οποία, σωματίδια που αποκαλούνται **κόκκοι αργύρου**, υποδεικνύουν κύτταρα ή περιοχές των κυττάρων όπου συντίθενται ειδικά μακρομόρια, λίγο πριν από τη μονιμοποίησή τους. Εδώ παρουσιάζονται αυτοραδιογραφίες από σιελογόνο αδένά ποντικού, που έχει ενεθεί με  $^3\text{H}$ -φουκόζη, οκτώ ώρες πριν τη μονιμοποίηση του ιστού. Η φουκόζη ενσωματώθηκε στους ολιγοσακχαρίτες, ενώ η ελεύθερη  $^3\text{H}$ -φουκόζη απομακρύνθηκε κατά τη μονιμοποίηση και την κοπή του αδένου. Η αυτοραδιογραφική επεξεργασία και η μικροσκόπηση αναδεικνύουν την εντόπιση των νεο-συντεθειμένων γλυκοπρωτεϊνών που περιέχουν σάκχαρα.

**(Α)** Οι μαύροι κόκκοι αργύρου από το φωτοευαίσθητο υλι-

κό που καλύπτει το παρασκεύασμα, είναι ορατοί πάνω από τις κυτταρικές περιοχές με εκκριτικά κοκκία και στον αυλό, υποδεικνύοντας έτσι την εντόπιση γλυκοπρωτεϊνών. X1500.

**(Β)** Ο ίδιος ιστός επεξεργασμένος για αυτοραδιογραφία ΗΜΔ παρουσιάζει κοκκία αργύρου με σπειροειδή ή άμορφη μορφολογία, που εντοπίζονται πάλι κυρίως πάνω από κοκκία (**Κο**) και στον αυλό του αδένου (**Αυ**). X7500.

(Η Εικόνα 1-9B, με την ευγενή παραχώρηση από τους Drs Ticiano G. Lima και A. Antonio Haddad, School of Medicine, Ribeirão Preto, Brazil).

πολλές πληροφορίες. Αν χρησιμοποιηθεί μία ραδιοσημασμένη πρόδρομη ουσία του DNA (όπως η σεσημασμένη με τρίτιο θυμιδίνη), είναι δυνατό να γνωρίζουμε ποιά και πόσα κύτταρα του ιστού διπλασιάζουν το DNA τους και ετοιμάζονται να διαιρεθούν. Μπορεί επίσης να αναλυθούν δυναμικά γεγονότα. Για παράδειγμα, αν επιθυμεί κάποιος να γνωρίζει πού παράγεται μία πρωτεΐνη μέσα στο κύτταρο, αν εκκρίνεται και τη διαδρομή της στο κύτταρο προτού αυτή εκκριθεί, ενίονται ραδιοσημασμένα αμινοξέα σε πολλά πειραματόζωα και οι ιστοί συλλέγονται σε διαφορετικούς χρόνους μετά τις ενέσεις. Η αυτοραδιογραφία των ιστών από διαδοχικά χρονικά διαστήματα θα υποδείξει την πορεία των ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών.

## ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ & ΙΣΤΩΝ

Τα ζωντανά κύτταρα και οι ιστοί μπορούν να διατηρηθούν και να μελετηθούν σε καλλιέργεια έξω από το σώμα (*in vitro*). Μέσα στον οργανισμό (*in vivo*) τα κύτταρα λούονται μέσα σε υγρό που προέρχεται από το πλάσμα του αίματος και περιέχει πολλά διαφορετικά μόρια που απαιτούνται για την επιβίωση και την ανάπτυξη τους. Οι κυτταροκαλλιέργειες έχουν ανεκτίμητη αξία για τη μελέτη της λειτουργίας αυτών των μορίων. Επιτρέπουν επίσης την άμεση παρατήρηση της κυτταρικής συμπεριφοράς κάτω από μικροσκόπιο αντίθεσης φάσης. Πολλά πειράματα που τεχνικά δεν μπορούν να πραγματοποιηθούν στο ζωντανό πειραματόζωο, μπορούν να επιτευχθούν *in vitro*.

Τα κύτταρα και οι ιστοί αναπτύσσονται σε περίπλοκα διαλύματα γνωστής σύνθεσης (άλατα, αμινοξέα, βιταμίνες) στα οποία προστίθενται συστατικά του ορού ή συγκεκριμένοι αυξητικοί παράγοντες. Για την προετοιμασία των καλλιεργειών από ένα ιστό ή όργανο, τα κύτταρα πρέπει να διαχωρισθούν μηχανικά ή ενζυματικά. Αφού τα κύτταρα απομονωθούν, μπορούν να καλλιεργηθούν σε ένα καθαρό δοχείο στο οποίο προσκολλώνται, συνήθως ως μία μονή στιβάδα κυττάρων (Εικόνα 1-5). Καλλιέργειες κυττάρων που απομονώνονται με αυτό τον τρόπο λέγονται **πρωτογενείς κυτταροκαλλιέργειες**. Πολλοί τύποι κυττάρων, αφού απομονωθούν από φυσιολογικούς ή παθολογικούς ιστούς, μπορούν να διατηρηθούν *in vitro* για μεγάλο χρονικό διάστημα επειδή καθίστανται αθάνατοι και αποτελούν μία μόνιμη **κυτταρική σειρά**. Τα περισσότερα κύτταρα που λαμ-

## ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Οι κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιούνται ευρέως για να μελετηθούν οι μοριακές αλλοιώσεις που συμβαίνουν στον καρκίνο, να αναλυθούν μολυσματικοί ιοί, το μυκόπλασμα και ορισμένα πρωτόζωα, καθώς και για πολλές γενετικές και χρωσωμικές αναλύσεις ρουτίνας. Καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας που απομονώθηκαν από μία ασθενή (που αργότερα ταυτοποιήθηκε πως ήταν η Henrietta Lacks, που πέθανε από τη νόσο το 1951), χρησιμοποιήθηκαν για να θεμελιωθεί μία από τις πρώτες κυτταρικές σειρές, είναι γνωστά ως **κύτταρα HeLa** και χρησιμοποιούνται για την έρευνα της δομής και της λειτουργίας των κυττάρων σε ολόκληρο τον κόσμο.

βάνονται από φυσιολογικούς ιστούς έχουν μία πεπερασμένη, γενετικά καθορισμένη διάρκεια ζωής. Εντούτοις, ορισμένες αλλαγές (ορισμένες σχετιζόμενες με ογκογονίδια – βλέπε Κεφάλαιο 3), μπορεί να προκαλέσουν αθανασία του κυττάρου, μία διαδικασία που αποκαλείται **μετασχηματισμός** (*transformation*) και είναι παρόμοιες με τις αρχικές αλλοιώσεις ενός φυσιολογικού κυττάρου που μεταλλάσσεται σε καρκινικό. Με τη βελτίωση της τεχνολογίας των κυτταροκαλλιεργειών, οι περισσότεροι κυτταρικοί τύποι μπορούν τώρα να διατηρηθούν στο εργαστήριο. Όλες οι διαδικασίες με ζωντανά κύτταρα και ιστούς πρέπει να εκτελεσθούν μέσα σε αποστειρωμένο περιβάλλον, χρησιμοποιώντας στείρα διαλύματα και όργανα ώστε να αποφευχθεί μόλυνση από μικροοργανισμούς.

Όπως φαίνεται στο κεφάλαιο 2, η *in vitro* επώαση ζωντανών κυττάρων με νέες φθορίζουσες χημικές ενώσεις που προσλαμβάνονται και μεταβολίζονται σε συγκεκριμένα διαμερίσματα του κυττάρου, παρέχει μία νέα μέθοδο προσέγγισης στην κατανόηση της δομής και της λειτουργίας αυτών των διαμερισμάτων. Άλλες ιστολογικές τεχνικές που εφαρμόζονται στις κυτταροκαλλιέργειες έχουν ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση της εντόπισης και της λειτουργίας των μικροσωληναρίων, των μικρονηματίων και άλλων συστατικών του κυτταροσκελετού.

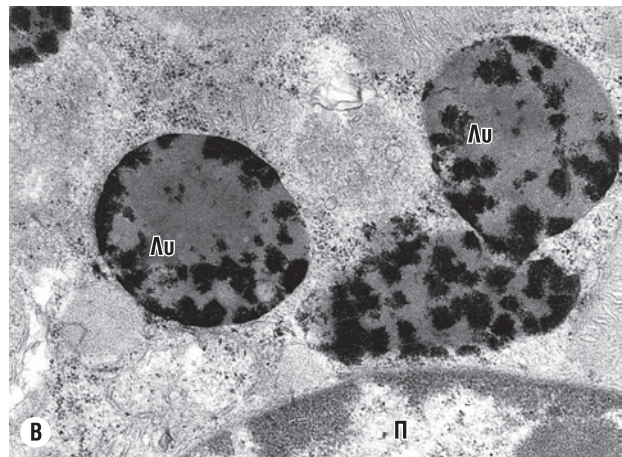
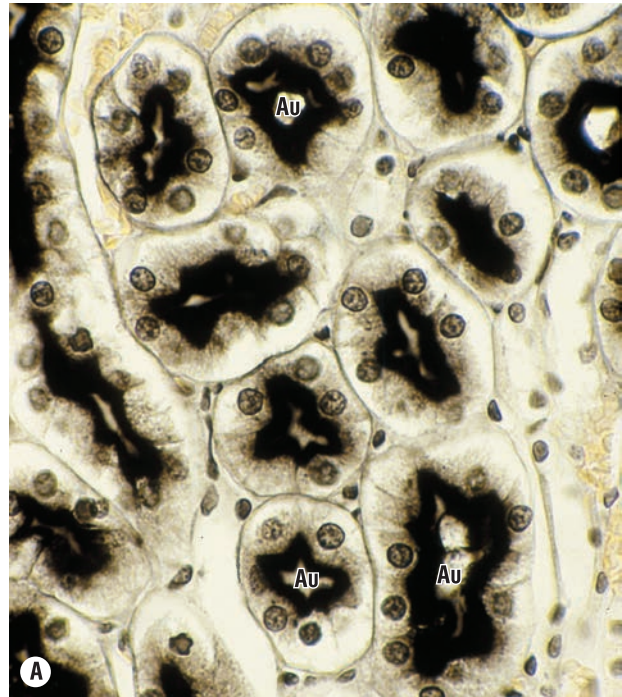
## ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Η **ενζυμική ιστοχημεία** (κυτταροχημεία) είναι μία μέθοδος για τον εντοπισμό κυτταρικών δομών με

τη χρήση ειδικών ενζυματικών δραστηριοτήτων που υπάρχουν σε αυτές τις δομές. Για να είναι διατηρημένα αυτά τα ένζυμα, οι ιστοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούν συνήθως μη-μονιμοποιημένους ή ελαφρώς μονιμοποιημένους ιστούς και κόβονται σε κρουστάτη, ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητα αποτελέσματα από τη θερμότητα και τους οργανικούς διαλύτες πάνω στην ενζυματική δραστηριότητα. Η ενζυμική ιστοχημεία περιλαμβάνει τα ακόλουθα: (1) Οι ιστικές τομές εμβαπίζονται σε ένα διάλυμα που περιέχει το υπόστρωμα του προς εντοπισμό ενζύμου. (2) Το ένζυμο αφήνεται να δράσει πάνω στο υπόστρωμά του. (3) Σε αυτό το στάδιο ή αργότερα, η τομή τοποθετείται σε επαφή με μία χημική ένωση-δείκτη που αντιδρά με το προϊόν της ενζυματικής δράσης πάνω στο υπόστρωμα. (4) Το τελικό προϊόν του δείκτη πρέπει να είναι αδιάλυτο και ορατό με την οπτική ή την ηλεκτρονική μικροσκοπία, έχοντας χρώμα ή ηλεκτρονική πυκνότητα και να καθιζάνει πάνω στη περιοχή του ενζύμου, ώστε να επιτρέπει να εντοπισθεί η θέση του μικροσκοπικά.

Παραδείγματα ενζύμων που μπορούν να ανιχνευθούν ιστοχημικά περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- **Φωσφατάσες**, οι οποίες διασπούν τους δεσμούς ανάμεσα σε φωσφορικές ομάδες και φωσφορυλιωμένα μόρια. Μπορούν να ανιχνευθούν τόσο αλκαλικές φωσφατάσες (αυτές που έχουν μέγιστη δραστηριότητα σε αλκαλικό pH), όσο και όξινης φωσφατάσες (Εικόνα 1-10).
- **Αφυδρογονάσες**, οι οποίες αφαιρούν ιόντα υδρογόνου από ένα υπόστρωμα και το μεταφέρουν σε ένα άλλο, εντοπίζονται με επώαση των ιστικών τομών σε ένα διάλυμα με υπόστρωμα που περιέχει ένα μόριο που προσλαμβάνει υδρογόνο και κατακρημνίζεται σαν μία αδιάλυτη χρωματισμένη χημική ένωση. Τα μιτοχόνδρια μπορούν να ταυτοποιηθούν εξειδικευμένα με αυτή τη μέθοδο, επειδή σε αυτό το οργανίδιο υπάρχουν αφυδρογονάσες ανάμεσα στα ένζυμα του κύκλου του κιτρικού οξέος (Krebs).
- **Υπεροξειδάση**, η οποία προάγει την οξειδωση υποστρωμάτων με τη μεταφορά ιόντων υδρογόνου στο υπεροξειδίο του υδρογόνου, σχηματίζοντας μόρια νερού και εντοπίζεται συχνά με ιστοχημική μέθοδο. Κύτταρα ή ιστικές τομές επάζονται σε ένα υπόστρωμα που περιέχει υπεροξειδίο του υδρογόνου και 3,3 διαμινοβενζιδίνη (DAB), το οποίο οξειδώνεται από την παρουσία υπεροξειδάσης και παράγει ένα αδιάλυτο, καστανό, ηλεκτρονικά πυκνό ίζημα.



**ΕΙΚΟΝΑ 1-10** Ενζυμική Ιστοχημεία.

- (A) Μικροφωτογραφία από εγκάρσιες τομές νεφρικών σωληναρίων που έχουν επεξεργασθεί ιστοχημικά για να αναδείξουν αλκαλικές φωσφατάσες, παρουσιάζουν έντονη δραστηριότητα αυτών των ενζύμων στην κορυφαία επιφάνεια των κυττάρων, προς τον αυλό (Au) των σωληναρίων. X200.
- (B) Εικόνα ΗΜΔ ενός νεφρικού κυττάρου, στο οποίο η όξινη φωσφατάση εντοπίζεται ιστοχημικά σε τρία λυσοσώματα (Au) κοντά στον πυρήνα (Π). Το σκοτεινό υλικό μέσα σε αυτές τις δομές είναι φωσφορικός μόλυβδος που καθιζάνει σε θέσεις με δραστηριότητα όξινης φωσφατάσης. X25.000.

(Η Εικόνα 1-10, με την ευγενή παραχώρηση από τον Dr Eduardo Katchburian, Department of Morphology, Federal University of São Paulo, Brazil).



## ΙΑΤΡΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Πολλές ενζυμικές ιστοχημικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται στο ιατρικό εργαστήριο και περιλαμβάνουν την αντίδραση Perl – κυανό της Πρωσσίας για τον σίδηρο (χρησιμοποιείται για τη διάγνωση νοσημάτων αποθήκευσης σιδήρου, όπως η αιμοχρωμάτωση και η αιμοσιδήρωση), οι αντιδράσεις PAS-αμυλάση και κυανό της Αλσατίας (Alcian blue) για γλυκογόνο και γλυκοζαμινογλυκάνες (για την ανίχνευση γλυκογόνωσης και βλεννοπολυσακχαριδώσεων) και αντιδράσεις για λιπίδια και σφιγγολιπίδια (για την ανίχνευση σφιγγολιπιδώσεων).

## ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΕΙΔΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Ένα ειδικό μακρομόριο που υπάρχει σε μία ιστική τομή, μπορεί μερικές φορές να ταυτοποιηθεί με τη χρήση σεσημασμένων χημικών ενώσεων ή μακρομορίων που συνδέονται *ειδικά* με το μόριο που μας ενδιαφέρει. Οι χημικές ενώσεις που αντιδρούν με το μόριο πρέπει να είναι ορατές με το οπτικό ή το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, έχοντας την κατάλληλη σήμανση. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες σήμανσεις περιλαμβάνουν φθορίζουσες ουσίες, ραδιενεργά άτομα που μπορούν να ανιχνευθούν με αυτοραδιογραφία, μόρια υπεροξειδάσης ή άλλα ένζυμα που μπορούν να ανιχνευθούν με ιστοχημεία και μεταλλικά σωματίδια (συνήθως χρυσός) που μπορούν να παρατηρηθούν στο οπτικό ή το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Αυτές οι μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να ανιχνεύσουν ειδικά σάκχαρα, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα.

Παραδείγματα μορίων που αντιδρούν ειδικά με άλλα μόρια περιλαμβάνουν τα ακόλουθα:

- Η **φαλλοϊδίνη** είναι μία χημική ένωση που εκχυλίζεται από το μανιτάρι *Amanita phalloides* και αντιδρά ισχυρά με την ακτίνη. Η φαλλοϊδίνη, σεσημασμένη με φθορίζουσες χρωστικές χρησιμοποιείται συχνά για να αναδείξει την ακτίνη μέσα στα κύτταρα (Εικόνα 1-4B).
- Η **πρωτεΐνη A** προέρχεται από το βακτηρίδιο *χρυσίζων Σταφυλόκοκκος* και συνδέεται με την περιοχή Fc του μορίου της ανοσοσφαιρίνης (αντίσωμα). Έτσι η σεσημασμένη πρωτεΐνη A μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό των φυσικά απαντώμενων ή των τεχνητά εφαρμοσμένων αντισωμάτων που συνδέονται με κυτταρικές δομές.

- Οι **λεκτίνες** είναι πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες, προερχόμενες κυρίως από σπόρους φυτών και συνδέονται με υψηλή συνάφεια και ειδικότητα με υδατάνθρακες. Διαφορετικές λεκτίνες συνδέονται με συγκεκριμένα σάκχαρα ή ακολουθίες καταλοίπων σακχάρων. Λεκτίνες σεσημασμένες με φθορίζουσες ουσίες χρησιμοποιούνται για να βάψουν συγκεκριμένες γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και γλυκολιπίδια και για να χαρακτηρίσουν συστατικά των μεμβρανών με ειδικές ακολουθίες καταλοίπων σακχάρων.

## Ανοσοϊστοχημεία

Μία αντίδραση υψηλής εξειδίκευσης μεταξύ μορίων είναι αυτή ανάμεσα σε ένα αντιγόνο και το αντίσωμά του. Για αυτό το λόγο, ιστολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν σεσημασμένα αντισώματα είναι εξαιρετικά χρήσιμες για την ταυτοποίηση και τον εντοπισμό πολλών συγκεκριμένων πρωτεϊνών και όχι μόνον αυτών που έχουν ενζυματική δραστηριότητα και μπορούν να καταδειχθούν με την ιστοχημεία.

Τα ανοσοκύτταρα του σώματος αντιδρούν και παράγουν **αντισώματα** έναντι άλλων μακρομορίων, που λέγονται **αντιγόνα** και αναγνωρίζονται ως ξένα, δεν αποτελούν δηλαδή φυσιολογικό μέρος του οργανισμού και είναι δυνητικά επικίνδυνα. Τα αντισώματα ανήκουν στην οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών που λέγονται **ανοσοσφαιρίνες** και παράγονται από τα λεμφοκύτταρα. Αυτά τα μόρια υπό φυσιολογικές συνθήκες συνδέονται ειδικά με τα αντιγόνα που τα προκαλούν και βοηθούν στην εξουδετέρωσή τους.

Η **ανοσοϊστοχημεία** χρησιμοποιείται πολύ ευρέως για να ανιχνεύσει συγκεκριμένες πρωτεΐνες (ή άλλα μόρια) που μας ενδιαφέρουν σε κύτταρα και ιστούς, τόσο για διαγνωστικούς, όσο και για ερευνητικούς σκοπούς. Αυτή η τεχνική απαιτεί ένα αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που πρόκειται να ανιχνευθεί, το οποίο σημαίνει ότι η πρωτεΐνη πρέπει να έχει απομονωθεί με βιοχημικές ή μοριακές μεθόδους, ώστε να παραχθούν αντισώματα έναντι αυτής. Για να παραχθούν αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης x ενός συγκεκριμένου είδους ζώου (π.χ. ανθρώπου ή ποντικού), η απομονωμένη πρωτεΐνη ενίεται σε ένα ζώο ενός άλλου είδους (π.χ. κουνέλι ή κατσίκα). Αν η ακολουθία των αμινοξέων είναι επαρκώς διαφορετική για αυτό το ζώο ώστε να το αναγνωρίσει ως ξένο –δηλαδή ως αντιγόνο– τότε το ζώο θα παράξει αντισώματα έναντι της πρωτεΐνης.

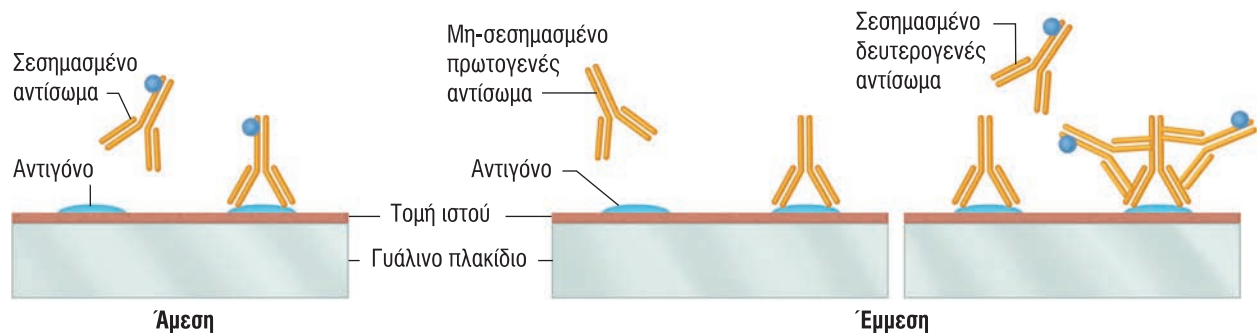
Στην ανοσοϊστοχημεία, μία ιστική τομή (ή κύτταρα σε καλλιέργεια) που πιστεύεται ότι περιλαμβάνει την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει, επωάζεται σε ένα διάλυμα που περιέχει σεσημασμένο αντίσωμα για αυτή την πρωτεΐνη. Το αντίσωμα συνδέεται ειδικά με την πρωτεΐνη, η εντόπιση της οποίας στον ιστό ή στο κύτταρο μπορεί μετά να παρατηρηθεί είτε με οπτικό, είτε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ανάλογα με το πως έχει σημασθεί το αντίσωμα. Τα αντισώματα συχνά σημαίνονται με φθορίζουσες ουσίες, με υπεροξειδάση ή αλκαλική φωσφατάση για ιστοχημική ανίχνευση ή με ηλεκτρονικά πυκνά σωματίδια χρυσού για ΗΜΔ.

Διαφορετικές ομάδες (κλώνοι) λεμφοκυττάρων του ζώου στο οποίο ενίεται το αντιγόνο, αναγνωρίζουν διαφορετικά μέρη της πρωτεΐνης x και κάθε κλώνος παράγει ένα αντίσωμα για το κάθε μέρος της. Αυτά τα αντισώματα συλλέγονται από το πλάσμα του ζώου και αποτελούν ένα μείγμα **πολυκλωνικών αντισωμάτων**, κάθε ένα ικανό να συνδέεται με ένα διαφορετικό τμήμα της πρωτεΐνης x.

Εντούτοις, είναι επίσης δυνατό, να ενεθεί η

πρωτεΐνη x σε ένα ποντίκι και μετά από λίγες ημέρες να απομονωθούν τα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα και να τοποθετηθούν σε καλλιέργεια. Η αύξηση και η δραστηριότητα αυτών των κυττάρων μπορεί να παραταθεί επ' αόριστον, συγχωνεύοντας τα με νεοπλασματικά λεμφοκύτταρα για να παραχθούν υβριδικά κύτταρα. Διαφορετικοί υβριδικοί κλώνοι παράγουν διαφορετικά αντισώματα για πολλά τμήματα της πρωτεΐνης x και κάθε κλώνος μπορεί να απομονωθεί και να καλλιεργηθεί χωριστά. Κάθε ένα από αυτά τα αντισώματα είναι ένα **μονοκλωνικό αντίσωμα**. Ένα πλεονέκτημα στη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων αντί των πολυκλωνικών, είναι ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα μπορεί να επιλεγεί ώστε να έχει υψηλή ειδικότητα και ισχυρή σύνδεση με την πρωτεΐνη που πρόκειται να ανιχνευθεί, με λιγότερη μη-ειδική σύνδεση με άλλες πρωτεΐνες που είναι παρόμοιες με αυτή που μας ενδιαφέρει.

Υπάρχουν **άμεσες και έμμεσες μέθοδοι ανοσοκυτταροχημείας** (Εικόνα 1-11). Στην άμεση μέθοδο, το αντίσωμα (είτε μονοκλωνικό, είτε πολυ-



**ΕΙΚΟΝΑ 1-11** Ανοσοκυτταροχημεία.

Η ανοσοκυτταροχημεία (ή ανοσοϊστοχημεία) μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση. Η **άμεση ανοσοκυτταροχημεία** (αριστερά) χρησιμοποιεί ένα αντίσωμα που στρέφεται έναντι της ιστικής πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει και σημαίνεται άμεσα με ένα δείκτη, όπως μία φθορίζουσα ουσία ή υπεροξειδάση. Όταν τοποθετούνται στο πλακίδιο με την τομή του ιστού, αυτά τα σεσημασμένα αντισώματα συνδέονται ειδικά με την πρωτεΐνη (αντιγόνο) έναντι του οποίου έχουν παραχθεί και μπορούν να γίνουν ορατά με την κατάλληλη μέθοδο. Η **έμμεση ανοσοκυτταροχημεία** (δεξιά) χρησιμοποιεί πρώτα ένα **πρωτογενές αντίσωμα** που στρέφεται έναντι της πρωτεΐνης (αντιγόνου) που μας ενδιαφέρει και εφαρμόζεται στην τομή του ιστού για να συνδεθεί με το ειδικό

αντιγόνο. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ένα **σεσημασμένο δευτερογενές αντίσωμα**, το οποίο (1) δημιουργείται σε ένα άλλο είδος και στρέφεται έναντι της ανοσοσφαιρίνης (αντισώματος) του είδους από το οποίο προέρχεται το πρωτογενές αντίσωμα και (2) είναι σεσημασμένο με φθορίζουσα ουσία ή υπεροξειδάση. Όταν το σεσημασμένο δευτερογενές αντίσωμα εφαρμόζεται στην τομή του ιστού, συνδέεται ειδικά με τα πρωτογενή αντισώματα, σημαίνοντας έμμεσα την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει στο πλακίδιο. Επειδή περισσότερα από ένα σεσημασμένα δευτερογενή αντισώματα μπορούν να συνδεθούν με κάθε μόριο πρωτογενούς αντισώματος, με την έμμεση μέθοδο ενισχύεται η σήμανση της πρωτεΐνης που μας ενδιαφέρει.