

Biologie živočichů - cvičení

Základy práce s mikroskopem, histologie

Helena Nejezchlebová
helanej@sci.muni.cz

Cíle lekce

- ✓ student se seznámí se základními fakty o světelné mikroskopii vč. správného postupu mikroskopování
- ✓ student nastuduje strukturu vybraných histologických preparátů

Studijní materiály

- ✓ www.sci.muni.cz/ptacek
- ✓ Junqueira L.C., Carneiro J., Kelly R. *Základy histologie*. H+H, Jinočany. 1997, 502 s.
- ✓ Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. Překlad 3. vydání. Grada, Praha. 2012, 556 s.
- ✓ Knoz J. *Obecná zoologie. I Taxonomie, látkové složení, cytologie a histologie. II Organologie, rozmnožování, vývoj živočichů a základy biologie*. PřF UJEP, Brno. 1984.

Histologie

- ✓ nauka o tkáních (*histos* = tkáň, *logos* = nauka, řeč.), mikroskopická anatomie zaměřená na studium tkání
- ✓ tkáně se diferencují a specializují během ontogenetického vývoje. Původně většinou z jediné buňky při pohlavním rozmnožování (nebo skupiny buněk při rozmnožování nepohlavním) se vytvářejí dělením a uspořádáním (polohou) první tzv. **zárodečné listy**, ze kterých se postupně diferencuje další tkáň.
- ✓ v nejjednodušším případě je tkáň tvořena jediným typem buněk s určitou funkcí
- ✓ často je základní buněčný typ doplněn jedním či více typy buněk jiných (fixní a volné buňky)
- ✓ epitely, pojiva, svaly, nervové tkáně

Světelná mikroskopie

✓ základní technika pro pozorování ve všech oborech, kde předmětem pozorování je buňka (tkáň, pletivo, ...), protože rozlišovací schopnost této techniky odpovídá velikosti buňky/organel.

✓ **světelný mikroskop:**

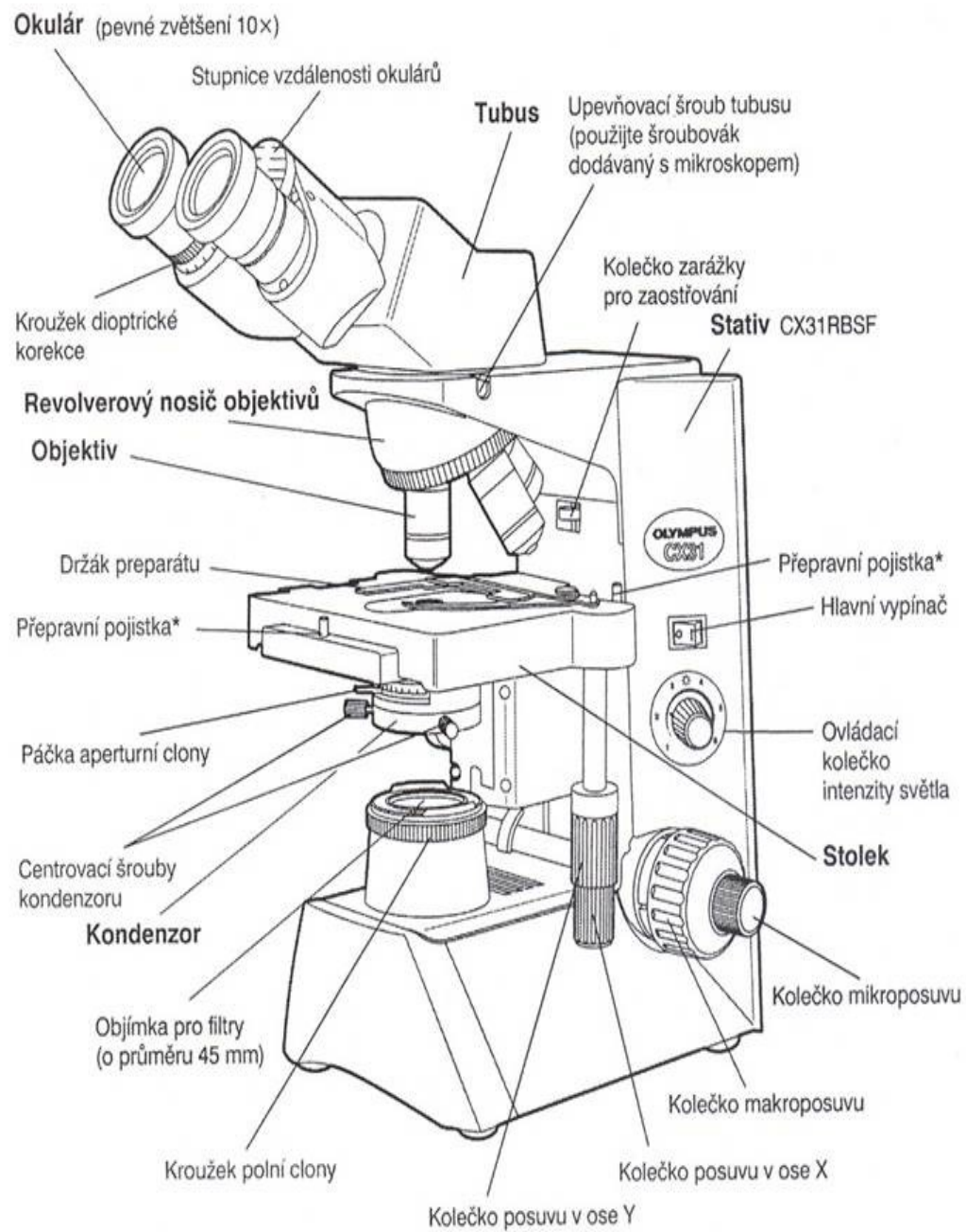
- optický přístroj, založený na interakci fotonů a tkáňových složek
- teor. rozlišovací schopnost $0,17 \mu\text{m}$
- zvětšuje obraz až 1 500x
- obraz je převrácený a zvětšený

✓ **zásada: Postupujeme od celku k detailům**



Stavba mikroskopu

- ✓ **optické části:** okulár, objektiv
- ✓ **osvětlovací části:** zdroj, kondenzor, clona polní a aperturní
staré mikroskopy: zrcátko 😊
- ✓ **mechanické části:** podstavec, nosič, tubus, revolverový měnič objektivů, stolek - křížový posuv, mikro- a makrošroub
- ✓ jednotky měření používané v histologii: μm , nm , dříve mikrony μ (stejná hodnota jako μm) a Å (1 $\text{ångström} = 10^{-10} \text{ m}$)



Jak správně mikroskopovat?

- ✓ zkontrolujeme mikroskop.
- ✓ zkontrolujeme preparát okem (proti světlu) – získáme orientační představu o počtu, umístění, velikosti mikroskopovaných objektů. Případně preparát očistíme (alkoholéther, alkohol).
- ✓ umístíme preparát krycím sklem nahoru na stolek, přichytíme svorkou. Stolek je vyšroubovaný úplně nahoru (za pomoci makrošroubu).
- ✓ začínáme mikroskopovat **nejmenším objektivem** (4x) tak, že pomalu pohybujeme stolcem dolů až do okamžiku, kdy je obraz ostrý.
- ✓ máme-li takto zaostřeno, pokračujeme při druhém nejmenším zvětšení, analogicky **postupujeme k objektivům s větším zvětšením**.
- ✓ u silnějších objektivů pozor na **rozdrčení krycího skla** preparátu!

Objektiv

- soustava čoček zajišťujících zvětšení a rozlišení
- čočky: skleněné nebo plastové, alespoň 1 plocha je kulová (vypouklá nebo vydutá)
- vytváří skutečný, převrácený, zvětšený obraz (okulár tento obraz zvětšuje – funkce lupy - a promítá na sítnici pozorovatele).

- demonstrace: Objektivem 4x pozorujeme vytištěné a vystřižené písmo: co je v zorném poli vpravo/nahoře, je v preparátu vlevo/dole. Tím se řídíme při hledání objektu v preparátu

- celkové zvětšení: součin zvětšení objektivu a okuláru

- údaje na objektivu: např. 10x /0,45 (zvětšení objektivu/ numerická apertura NA)

- numerická apertura NA → rozlišovací schopnost RS (čím blíže je NA k 1, tím RS větší). U imerzních objektivů je NA i RS vyšší.

$$NA = n \cdot \sin \alpha/2 \quad \alpha \text{otvorový úhel, } n \text{index lomu prostředí}$$

Objektivy

- ✓ suché: mezi čočkou a preparátem je vzduch
- ✓ ponorné (imerzní): při pozorování ponořeny do tekutiny (voda/olej). Imerzní kapalina má podobný index lomu jako sklo, k odklonu světelných paprsků dochází v menší míře než u světelného mikroskopu a objektiv jich potom zachytí více

Zásady práce s imerzním objektivem:

- ✓ **imerzní tekutina se aplikuje na krycí sklíčko** (1 kapka stačí) a objektiv se do této kapky zanoří, mezi preparátem a objektivem nesmí být vzduch. Po ukončení mikroskopování **imerzní objektiv očistíme** (alkoholether (3:7), alkohol)!
- ✓ **imerzní tekutina se nesmí používat s objektivy, které nejsou imerzní!!!**

Kondenzor

- ✓ soustava čoček, soustřeďujících paprsky na preparát
- ✓ **zásada**: čím silnější objektiv, tím výše je kondenzor
- ✓ v blízkosti kondenzoru: **aperturní clona**, optimálně otevřená na **80 % numerické apertury** použitého objektivu
- ✓ používání clon vyžaduje určitou zkušenost

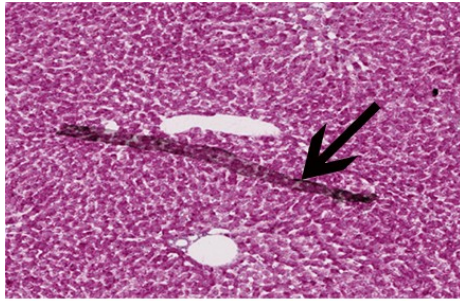
Ekvivalentní obraz, artefakt

✓ obraz fixovaných buněk může být jiný než u živých buněk, ale vlastnosti těchto umělých obrazů mohou být při nezměněné metodě konstantně dobře reprodukovatelné (je možno zpětně určit poměry panující za živa), jde o tzv. **ekvivalentní obrazy**

✓ **artefakt** = nereprodukovatelná změna (sraženina barviva, přehyb, trhlinka, ...)

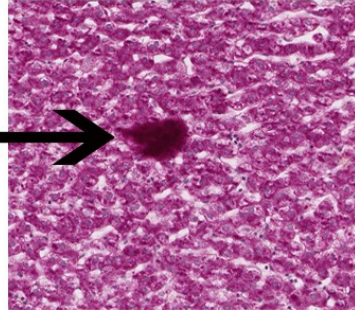


Artefakty

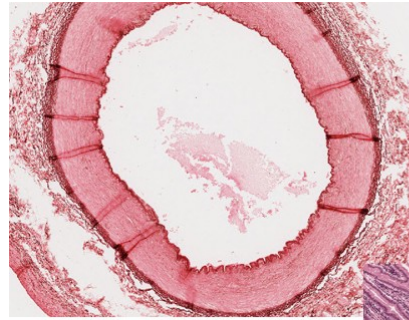


These are examples of artefacts taken from the liver (slide 14).

The artefact indicated by the arrow to the left is a foreign body introduced to the slide, probably when the slide had its coverslip applied.

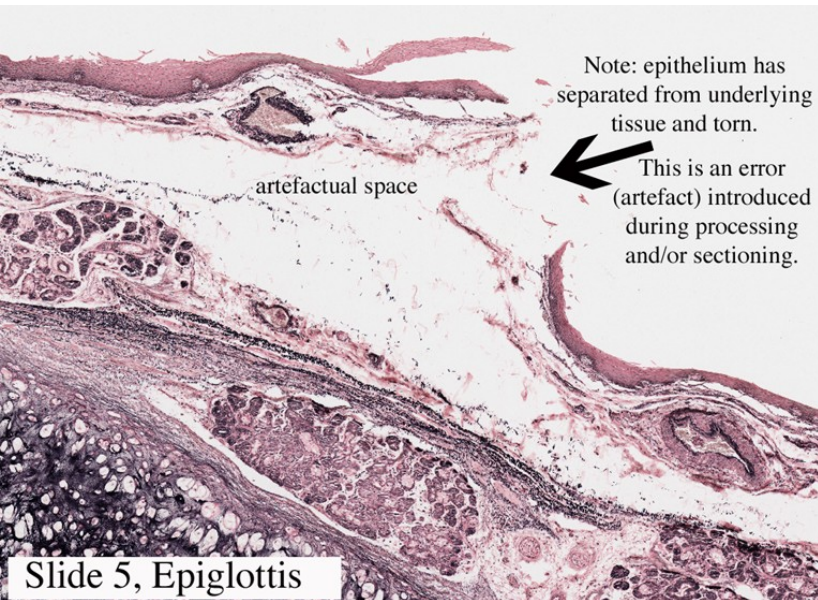
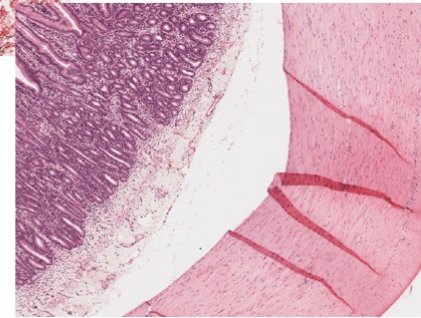


The artefact indicated by the arrow to the right is probably a clump of stain precipitate (a solid part of the stain that has come out of solution). This probably occurred during the staining process.



Folds

Depending upon the type of tissue, some sections may contain folds - these are regions where the tissue has doubled up on itself, giving it an appearance of greater staining. This can be seen in these micrographs with the darker pink or red stripes. The micrograph below (from slide 69) also demonstrates some shrinkage artefact, whereby the smooth muscle (eosinophilic tissue) has separated from the overlying connective and epithelial tissues.



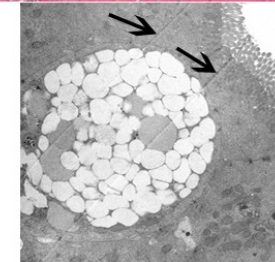
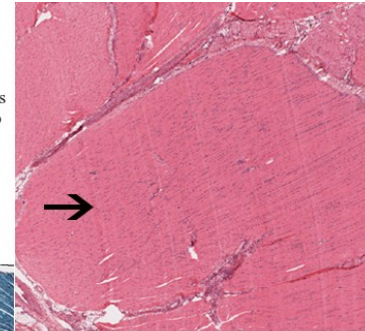
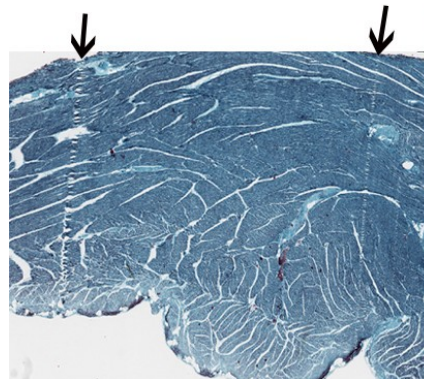
Note: epithelium has separated from underlying tissue and torn.

artefactual space

This is an error (artefact) introduced during processing and/or sectioning.

Sectioning Artefacts

The arrows indicate lines present in the sections. These lines represent scratches that were present on the microtome blade's surface that then scored the section as it was cut. Transmission electron micrographs may also have such artefacts - they are commonly known as knife marks (a diamond knife is used for TEM).



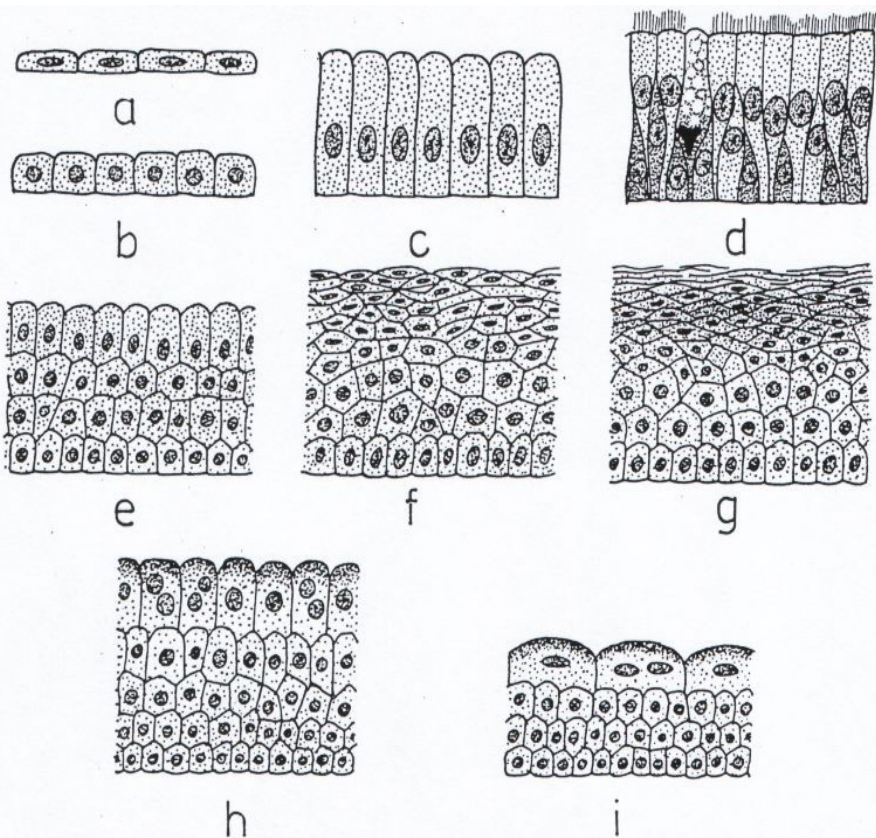
Řízené studium preparátů

Epitely, svaly, pojiva

Ve vztahu ke studovaným preparátům prosím věnujte pozornost výkladu vyučující, je návodný pro vypracování protokolu

Epitely

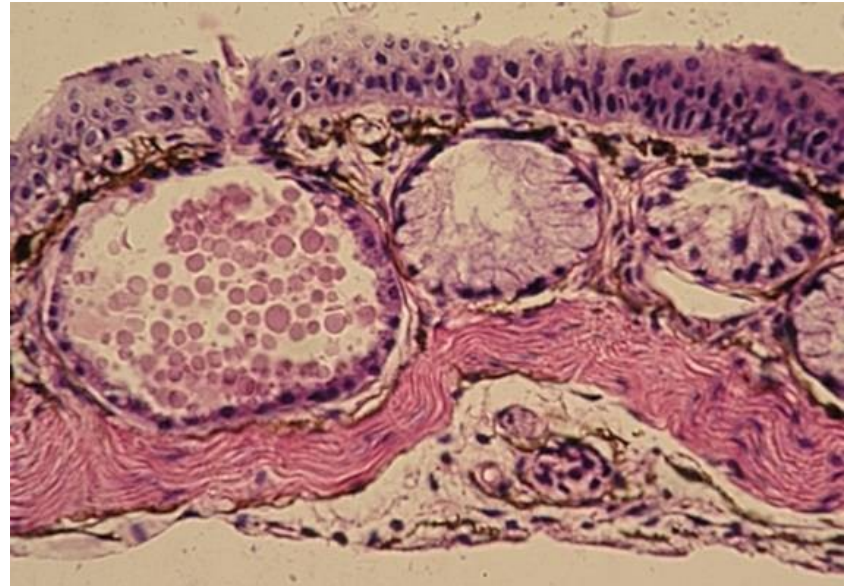
- souvislá hustá vrstva buněk navzájem těsně sousedících, minimální množství mezibuněčné hmoty, buňky dosedají na tenkou blanku (bazální membránu)



- ✓ a. jednovrstevný dlaždicový epitel
- ✓ b. jednovrstevný kubický epitel
- ✓ c. jednovrstevný válcový (cylindrický) epitel
- ✓ d. cylindrický víceřadý řasinkový epitel
- ✓ e. vícevrstevný kubický epitel
- ✓ f. vícevrstevný dlaždicový (nerohovějící) epitel
- ✓ g. vícevrstevný dlaždicový (rohovějící) epitel
- ✓ h. tzv. přechodný epitel - stěna prázdného dutého orgánu
- ✓ i. přechodný epitel (naplněný močový měchýř)

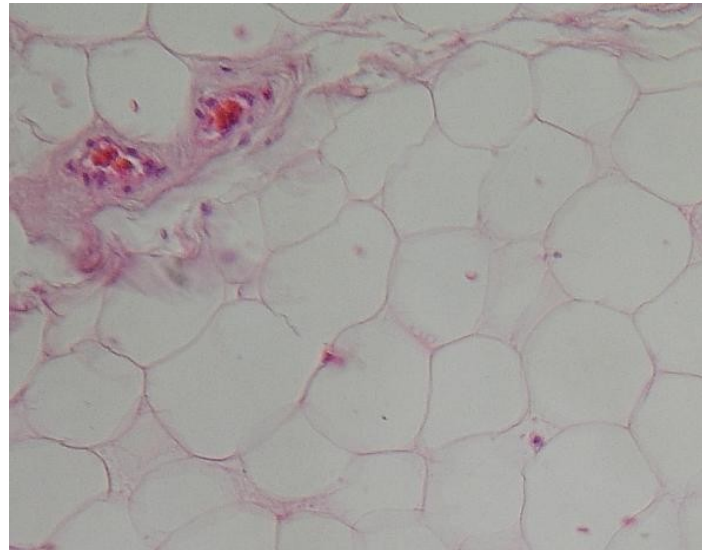
Krycí epitel

- ✓ **studovaný preparát = řez kůží žáby**
- ✓ **epidermis:** mnohvrstevný epitel žlaznatý nerohovatějící
- ✓ **škára:** jedová žláza vlevo (ohraničená granula), dále hlenové žlázy, jde o exoepitelové alveolární mnohobuněčné žlázy
- ✓ **podkožní vazivo:** silná vrstva, zpevňuje kůži (růžově zbarvené)
- ✓ zcela dole je relativně volné řidší pojivo upevňující kůži ke skeletu a svalstvu. V něm se nachází příčně rozříznutá céva s jádrem vybavenými erytrocyty.
- ✓ silná pigmentace všech kožních útvarů (ochrana funkčních a kmenových buněk).



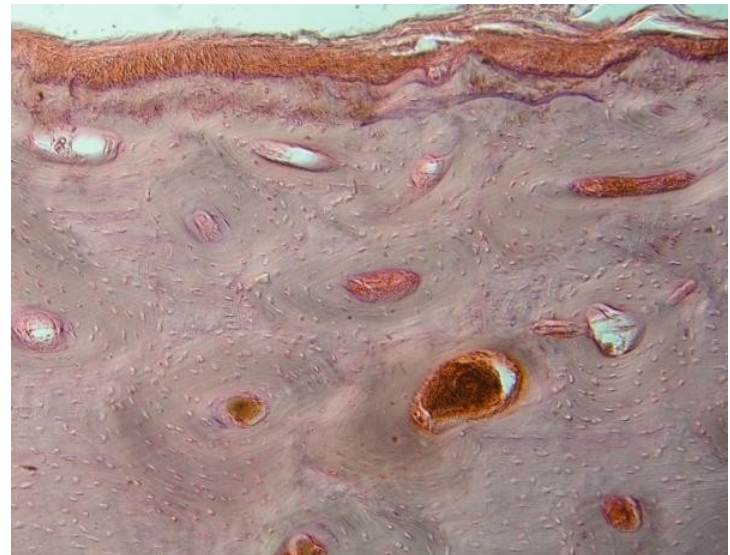
Pojiva

- ✓ prostorové tkáně, spojují tkáně v orgány, původ hlavně z mezodermu a z něj odvozeného mezenchymu
- ✓ epitely mají velmi málo mezibuněčných hmot, u pojiv jsou naopak většinou výrazné
- ✓ **funkce**: strukturální, střežací, ochranná a obranná, výživa, transport, reparace
- ✓ **buňky fixní** (fibroblasty/-cyty, osteoblasty/-cyty, ...) a **volné** (makrofágy, lymfocyty, plazmatické buňky, ...)
- ✓ **mezibuněčná hmota** (matrix): **amorfní** (různě tuhá) a **vláknitá** složka (kolagen, elastin, retikulární vlákna)



Pojiva oporná

- ✓ **studovaný preparát = kompaktní kost:** sekundární lamelózní kost, osteoblasty/-cyty, matrix kalcifikovaná, kolagenní vlákna uspořádaná do lamel
- ✓ komplex koncentrických lamel obklopujících kanálek s krevními cévami a nervy v řídkém vazivu = **Haversův systém = osteon**, osteocyty jsou v lakunách. Osteony komunikují s periostem pomocí příčných či šikmých Volkmannových kanálků, které přivádějí cévy z periostu.
- ✓ dutiny houbových kostí a dutiny dlouhých kostí obsahují kostní dřev:
 - červená kostní dřev (hematopoetická)
 - žlutá kostní dřev (tuk)



Svaly

✓ prostorové specializované tkáně: kontraktilní systémy (aktin, myosin, dynein u řasinek) a excitovatelné cytoplazmatické membrány (sarkolema), schopné reagovat na nervové stimuly

✓ **obratlovci:** hladká, příčně pruhovaná a srdeční svalovina, nespecifický kontraktilní systém (myoepitely)

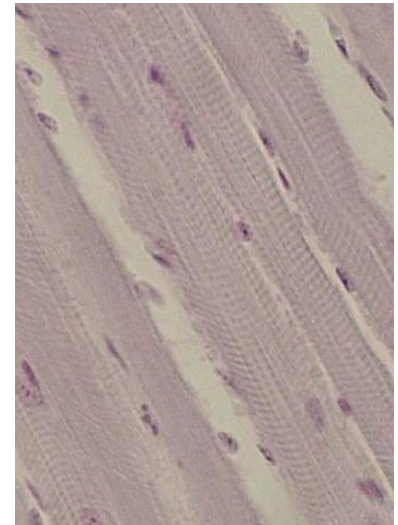
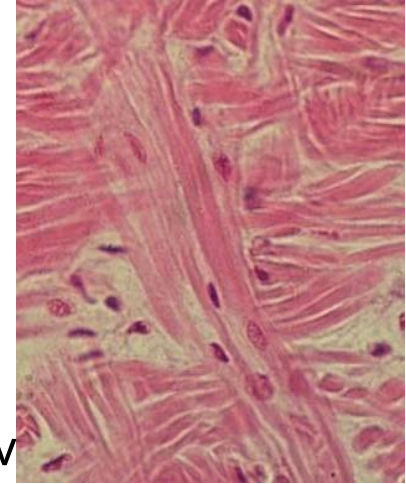
✓ **hladké svaly:** jednotlivé vřetenovité buňky, ve stěně cév a dutých orgánů, v dermis kůže a klcích střeva

- u bezobratlých: pohyb vnitřních orgánů i lokomoce (kontrola CNS), výjimka: např. členovci

✓ **kosterní svaly (příčně pruhované):** ze soubuní (syncytia): jádra buněk pod sarkoplazmou (u myokardu a hladké sval. jsou centrálně)

✓ **studovaný preparát = myokard (srdeční svalovina):**

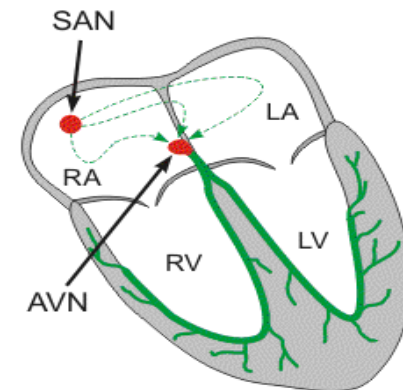
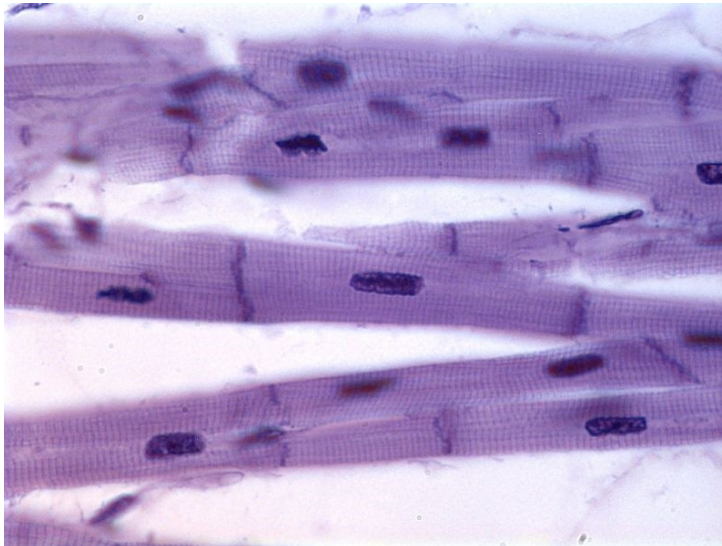
viz dále



Myokard

- studovaný preparát

- v srdci, pulmonárních cévách u některých živočišných druhů
- z kardio(myo)cytů spojených interkalárními disky
- příčné pruhování jako u kosterní svaloviny, ale jádra uložena centrálně
- smršťuje se automaticky (pacemakers: sinoatriální Keith - Flackův a atrioventrikulární Aschoff - Tawarův uzel), převodní systém je tvořen buňkami Purkyňových vláken
- vegetativní nervy jsou schopny ovlivnit frekvenci stahů



SAN, sinoatrial node; AVN, atrioventricular node; RA, right atrium; LA, left atrium, RV, right ventricle; LV, left ventricle.

Přehled úkolů

- ✓ **nastudujte mikroskopickou stavbu těchto preparátů:**
 - mnohovrstevný epitel nerohovatějící (řez kůží žáby) - 6
 - kompaktní kost - 18
 - myokard (srdeční svalovina) - 25

- ✓ **důkladně si osvojte základní postup mikroskopování**

- ✓ **detailně se seznamte s obsluhou mikroskopu:**
<http://www.sci.muni.cz/~anatomy/>

- ✓ **domácí úkol: protokol** (nelinkovaná A4, teorie + nákresy: max. 2 obr. na 1 A4, kreslíme tužkou, popis propiskou, odevzdejte za týden)