

Příprava preparátu pro světelnou mikroskopii

Jen malý počet živočišných tkání a buněk je vhodný pro přímé histologické studium. Aby bylo možné studovat různé tkáně a využít současné rozlišovací schopnosti světelných mikroskopů, je nutné zhotovit preparáty, tj. tkáně šetrně a rychle usmrtit, připravit z nich dostatečně tenké řezy a tyto obarvit.

1) Fixační činidla

Fixační činidla slouží k rychlému usmrcení buněk a tkání. Volba konkrétního činidla závisí na sledované buněčné struktuře, neboť různé fixační látky fixují různé tkáňové komponenty. Různé složky fixačních tekutin také - hlavně ve spojení s barvicími technikami - mohou ovlivnit výsledný obraz, téměř vždy se jedná o chemický proces. Nejčastěji užívané fixační činidla jsou formaldehyd, glutaraldehyd a OsO₄ (oxid osmičelý).

V řadě případů je možné využít metody freezing-drying (zmrazení tkáně a její vakuové vysušení ve zmrzlém stavu). Ovšem i tato technika má svá úskalí. Je možno zpracovat jen drobné kousky tkání, protože v bloku hlouběji uložené buňky promrzají pomalu (stačí se vytvořit ledové krystaly, které roztrhají buňky) a tak centrální části bloku jsou zničeny.

2) Zalévání

Aby bylo možné zhotovit dostatečně tenké a kvalitní řezy pro mikroskopické studium, je téměř vždy nutné tkáň zalít do média, které ji zpevní a vytvoří dostatečně homogenní blok, dovolující krájení. Pro světelně mikroskopické studium zpravidla užíváme řezy tlusté 4-20 μm. Nejběžněji se pro světelnou mikroskopii užívá zalévání do parafinu. Většina zalévacích médií však není mísitelná s vodou a proto musí být tkáň odvodněná a prosycená médiem, ve kterém se zalévací hmota rozpouští. Obvykle se tkáň odvodňuje vzrůstající alkoholovou řadou (etylalkohol 70%, 80%, 90%, 96% a xylen). Po odvodnění musí být tkáň ještě prosycená rozpouštědlem zalévacího média. Pro parafin je to nejčastěji toluen. Při pokojové teplotě je parafin tuhý, proto musíme tkáň, kterou takto zaléváme, vystavit zvýšené teplotě (cca 60 °C), kdy je parafin již tekutý. Bohužel zvýšená teplota vede k denaturaci enzymů a smršťování tkáně.

3) Krájení na mikrotomech

Vlastní krájení řezů se provádí na mikrotomech. Jsou to jednoduché přístroje, kde je nůž veden v rovině kolmé na blok, a ten je při každém řezu posunován šroubem do výšky řezu. Existuje několik modifikací způsobu krájení:

- pevný nůž, pohybuje se blok
- pevný blok, pohybuje se nůž
- nůž a blok se pohybují proti sobě

K lepení parafinových řezů na podložní skla se nejčastěji užívá bílek-glycerin, někdy želatina nebo některá syntetická lepidla. Parafinové řezy po nalepení a usušení musí být odparafinovány a převedeny zpět do vody. Ve většině případů jsou pak barveny.

4) Barviva a barvení

K barvení užíváme jednak přirozená, jednak syntetická barviva. Stále ještě jsou užívána 4 přirozená barviva:

- 1) hematoxylin - který je extraktem z kampeškového dubu (*Haematoxylon campechianum*),
- 2) karmín - extrakt ze samiček červce nopálového (*Coccus cacti*),
- 3) orcein - extrakt z některých lišejníků
- 4) šafrán - extrakt z blizen šafránu (*Crocus sativus*).

První dvě barviva patří mezi "jádrová" - bazická, orcein má různá použití (dle přípravy barvicího roztoku), šafrán je kyselé barvivo na kolagen.

Podstatně více je barviv syntetických a lze je rozdělit na barviva bazická a kyselá. Ze základních jmenujme eozín (barví acidofilní struktury buněk), fluorescein, metylenová modř (barví bazofilní struktury), Janusova zeleň (barví mitochondrie) a sudanová čern (barví tuky).

V předcházejících řádkách bylo vícekrát užito termínů "bazofilní", "bazické" a "acidofilní", "kyselé" barvivo. Toto označení znamená, že kyselé barvivo je schopné vazby na pozitivně nabitě komponenty tkáně (bazické na negativně nabitě komponenty) a vytvoří barevnou sůl.

Málokdy se pro přehledné preparáty užívá jen jedno barvivo. Většinou se užívá jejich kombinace. Nejjednodušší a snad nejčastěji užívané barvení je hematoxylin-eozín, kterým obarvíme jádra a různé bazofilní substance modře, ostatní části preparátu v různých odstínech červené.

Chceme-li obarvit v preparátech elastickou tkáň, která se běžně nezbarví, musíme užít specifické barvicí metody. Je to např. barvení orceinem, který tato vlákna zbarví červenohnědě.

K barvení krevního nátěru (případně roztěrů kostní dřeně) nejčastěji užíváme panoptického barvení podle Pappenheima. Při tomto postupu se užívá barvení dvou směsí barviv - podle May-Grünwalda a podle Giemsa-Romanowskyho.

Provedení barvení nátěru:

- 1) Krevní nátěr, po dokonalém zaschnutí, překryjeme několika kapkami May-Grünwaldova roztoku a ponecháme působit po dobu 3 minut. (Tato fáze postupu je fixace nátěru metanolem.)
- 2) Na nátěr přikapeme stejný počet kapek destilované vody o neutrálním pH a roztoky promícháme. (Teprve nyní dochází k barvení nátěru. Neutrální pH destilované vody, nebo lépe ústojného roztoku, je důležité pro správné vybarvení krevních elementů.) Zředěné May-Grünwaldovo barvivo po 1 minutě slijeme a bez opláchnutí na roztěr nakapeme
- 3) zředěné barvivo dle Giemsa-Romanowskyho (0,3 ml barviva do 10 ml destilované vody nebo ústojného roztoku o pH 7). Necháme barvit 12 - 15 minut.
- 4) Barvivo opět slijeme, nátěr opláchneme ústojným roztokem a usušíme na vzduchu. Zpravidla nátěry nemontujeme pod krycí skla.

Výsledek barvení:

Erytrocyty růžové (zbarven je hemoglobin), jaderný chromatin je červenofialový (různě sytý), cytoplazma monocytů je světle blankytně modrá, cytoplazma lymfocytů je rovněž modrá, někdy temnější (početnější ribosomy), azurofilní granula, zvláště agranulocytů, svítivě červená (metachromatické zbarvení), acidofilní granula eozinofilních granulocytů medová až růžová, bazofilní granula jsou hnědavá až hnědofialová, trombocyty mají hyaloméru modrou a centrální chromoméru zbarvenou purpurově. V bazofilních granulocytech se nezřídka nepodaří zbarvit granula, neboť jsou ve vodě rozpustná.