

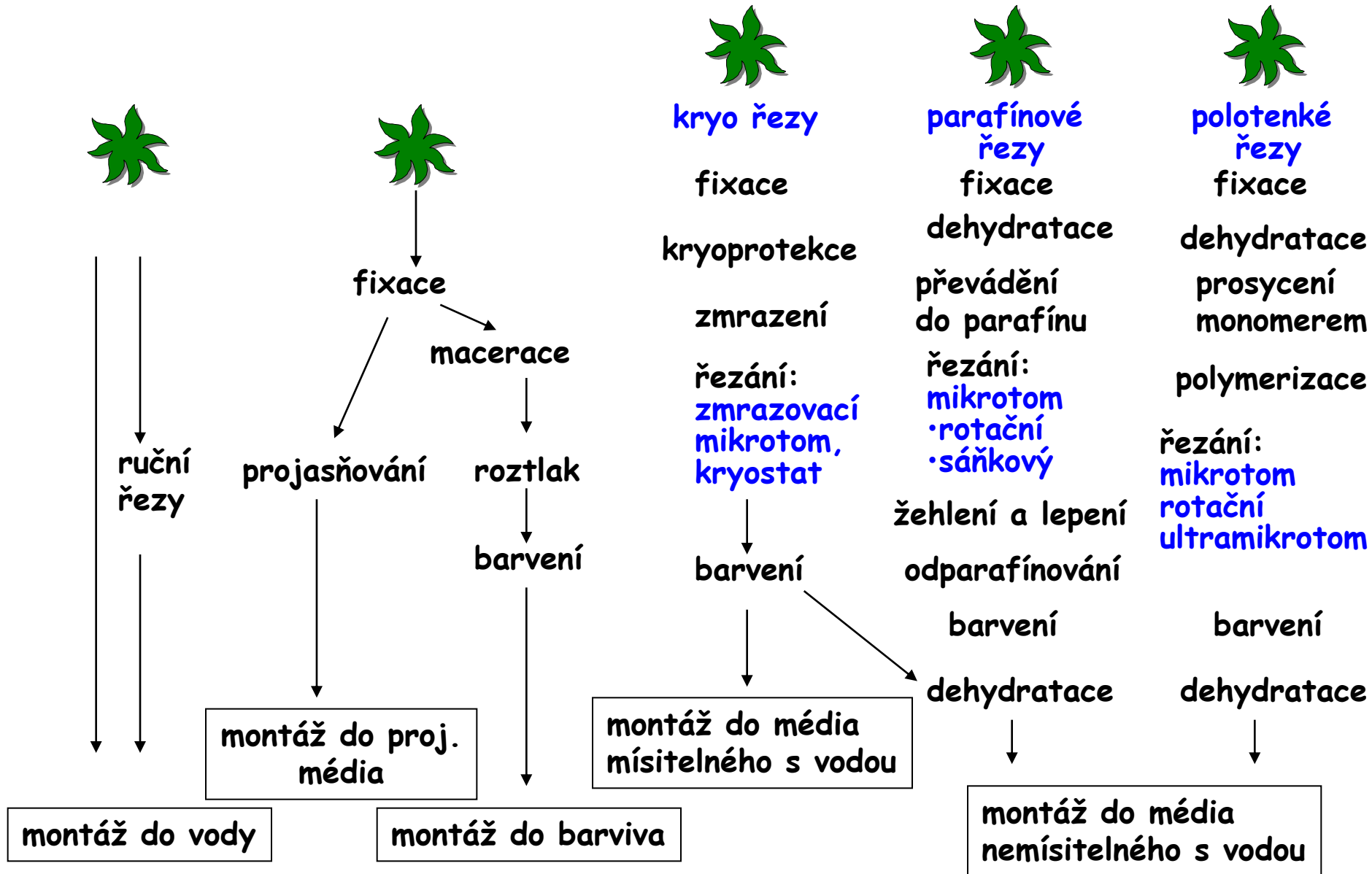
Řezové preparáty

Barvení histologické a histochemické

Řezy ruční - žiletka, břitva, ruční mikrotom

Řezy připravené mikrotomem

Schéma příprav mikroskopických preparátů



Ruční mikrotom



Fixace

- zachování buněk a pletiv ve stavu co nejbližšímu k živému stavu
- snížení strukturálních změn a změn chemického složení
- strukturální proteiny a jiné sloučeniny se musí změnit na nerozpustné ve všech reagensích, se kterými přijdou v průběhu celého procesu do styku
- perfektní fixace = jen teoretická

Fixace

- fyzikální

- vysoká teplota - koagulace bílkovin, tání tuků
- chladová
 - „freeze drying“
 - „freeze substitution“

- chemická

- **fixativa koagulující** - koagulace cytoplazmatických proteinů ničí strukturu organel (např. mitochondrie)
- **fixativa nekoagulující** - zachovávají organely (pro EM)

Fixační směsi - FAA (FPA)

Formaldehyde-Acetic (Propionic) acid - Aethanol

- 50% nebo 70% ethanol 90 ml
- ledová kyselina octová 5 ml
- 37 - 40% formaldehyd 5 ml

fixáž koagulující

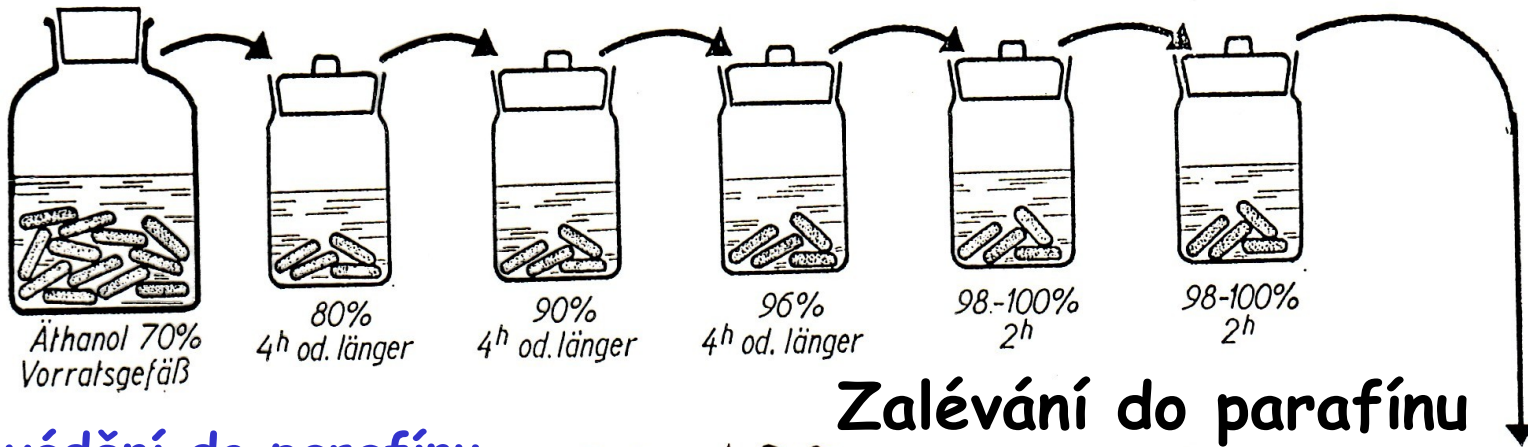
stálá

rychle proniká

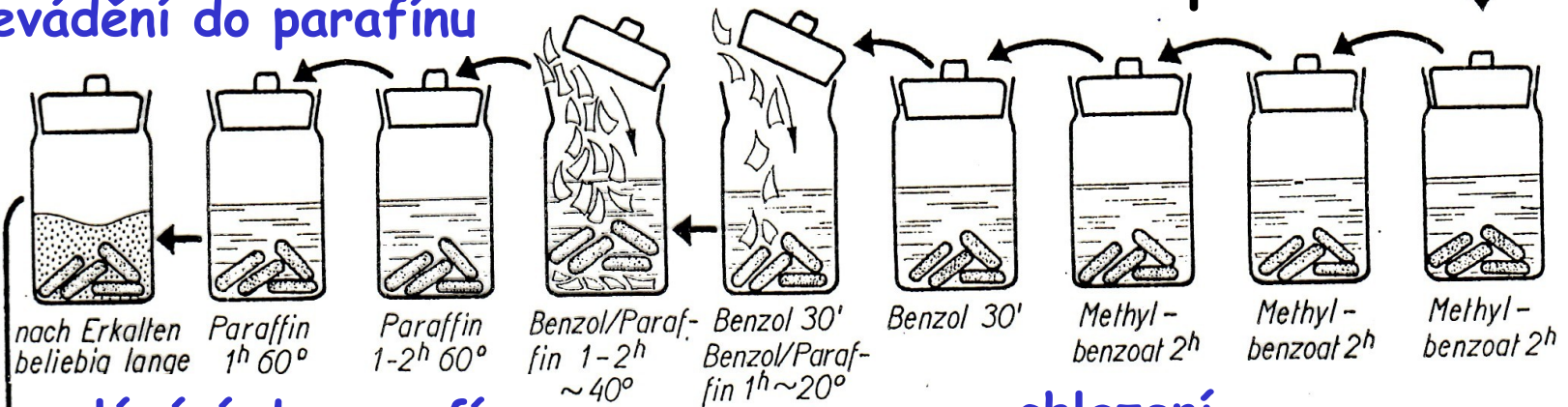
pro anatomické účely

Obecný postup parafínové metody

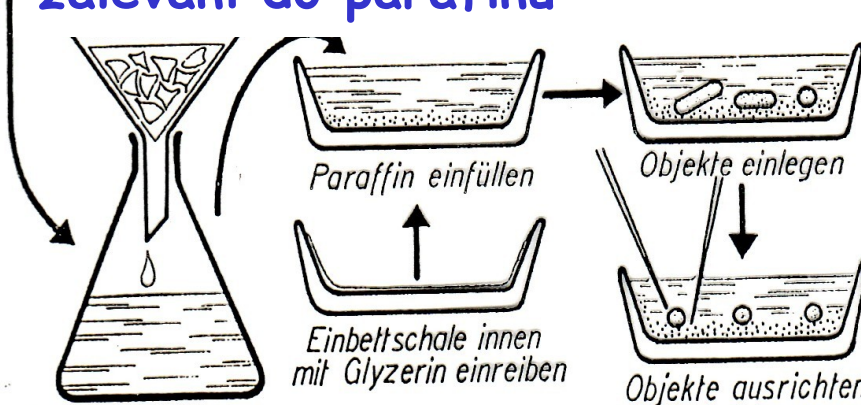
- Odběr materiálu - segmenty
- Fixace segmentů
- Dehydratace (etanolová řada vzestupná)
- Prosycení rozpouštědlem parafínu (xylén)
- Prosycení parafínem
- Zalití do parafínu
- Krájení, žehlení a lepení parafínových řezů
- Rozpuštění parafínu na řezech (xylén)
- Rehydratace řezů (etanolová řada sestupná)
- Barvení řezů
- Dehydratace nabarvených řezů
- Montáž (uzavírání řezů) do média nemísitelného s vodou (kanadský balzám, Eukitt®, Entelan, DPX)



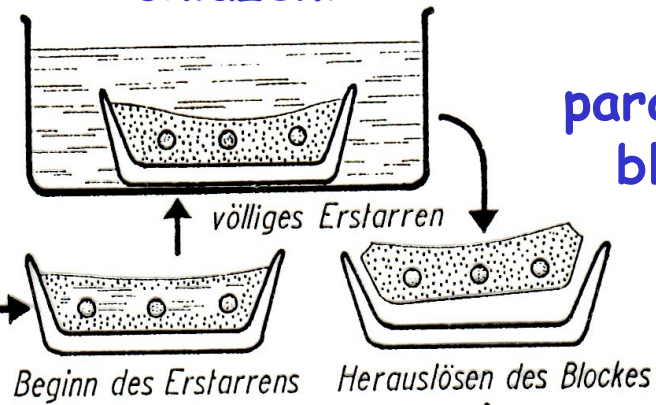
převádění do parafínu



zalévání do parafínu

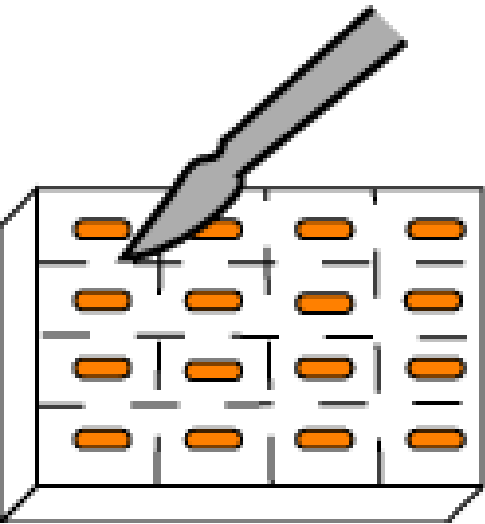


chlazení

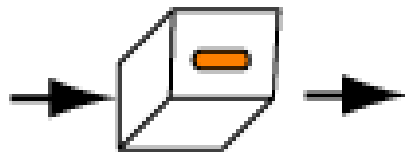


Paraffin in Vorratsflasche filtrieren 60°C

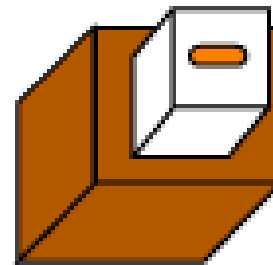
Příprava bločku ke krájení



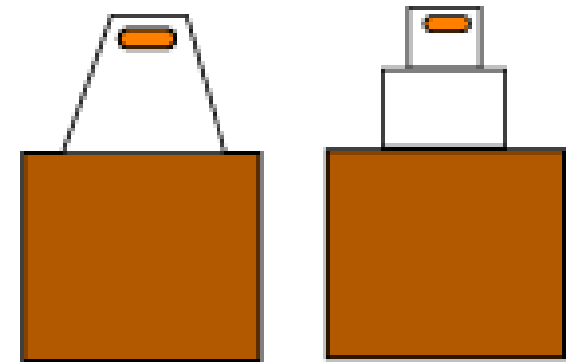
dělení bloku
parafínu



izolovaný
bloček
parafínu



přitavení bločku
parafínu na
dřevěný špalík

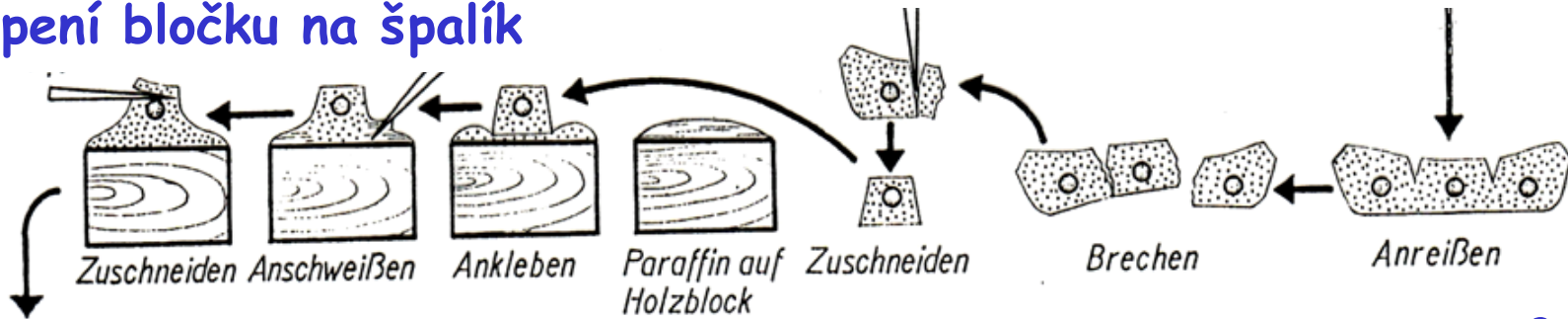


trimování
bločku
parafínu

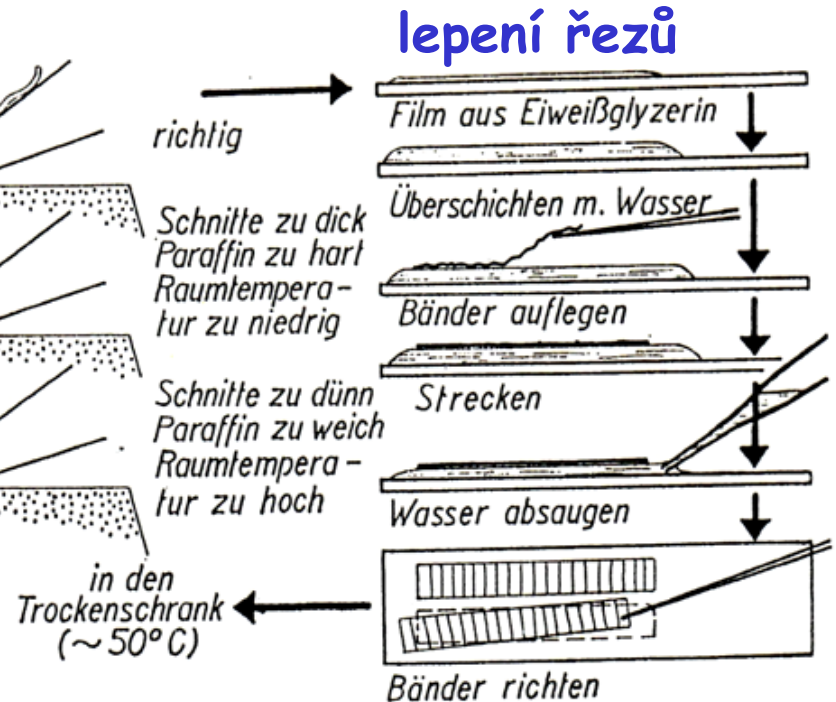
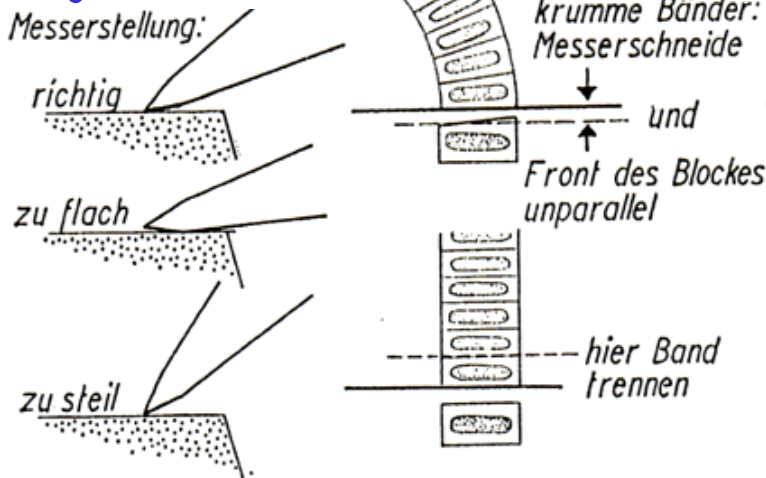
Krájení parafínových řezů

rozdělení na bločky

lepení bločku na špalík

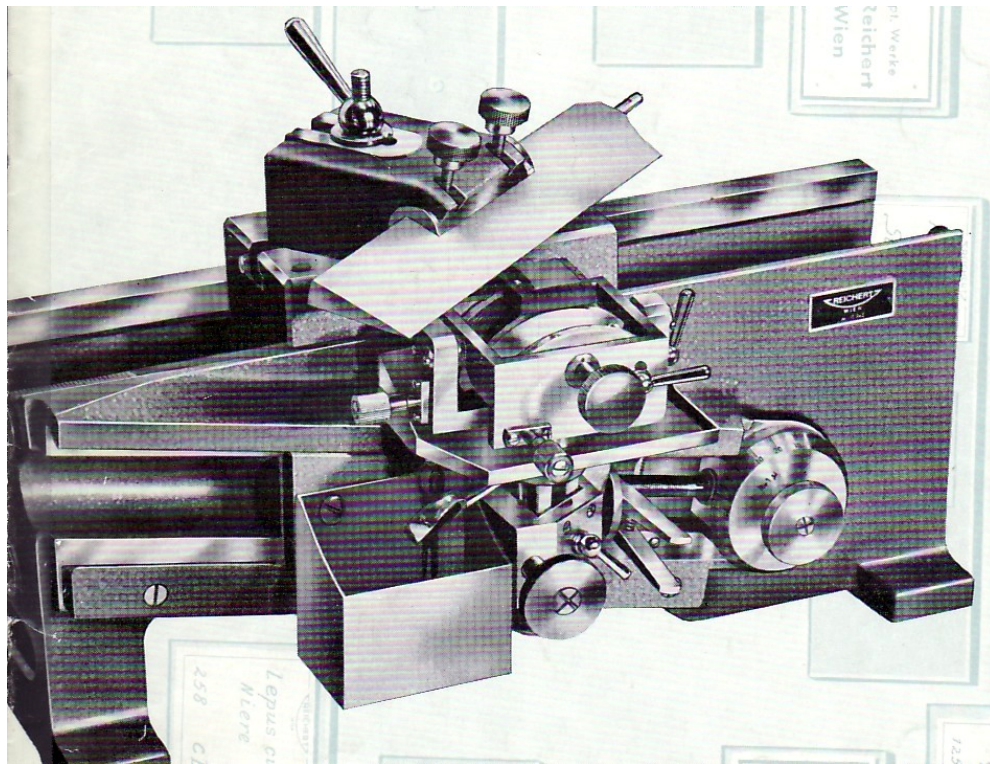


krájení řezů



Braune et al. 1982

Mikrotomy



sáňkový mikrotom Reichert



rotační mikrotom Leitz

Skleněné a porcelánové kyvety s víčkem



Hellendahl



Coplin



na 6 skel



Schieferdecker



Dóza s držákem skel



Sada plastových kyvet na barvení



skla v držáku se přenášejí z jedné lázně do druhé najednou

Barva

barva - vjem světla podle jeho kvality (λ)

purpurová	700 nm
červená	650 nm
oranžová	600 nm
žlutá	550 nm
zelená	500 nm
modrá	450 nm
fialová	400 nm



průchodem světla přes barevné preparáty dochází k absorpci světla komplementární barvy

Barvivo

- ne všechny barevné sloučeniny mohou být barvivem
- **barvivo** = barevná sloučenina, která může být navázána na substrát
- **barvivo histologické** - barví různé složky pletiv, používá se na základě empirických znalostí, chemismus reakce často není známý
- **histochemické barvení** - barvicí proces je vysoce specifický, je známá jeho chemická podstata

Teorie barevnosti

1. **chromoforová**: chromofor - má charakteristické uspořádání atomů, které je zodpovědné za absorpci světla v určité části spektra, auxochrom - část molekuly, která zodpovídá za vazbu na substrát
 - a) kyselé radikály: $-OH$, $-COOH$, $-SO_3H$ **anionická barviva**
 - b) bazické radikály: $-NH_2$ **kationická barviva**
2. **chinoidní struktury**
3. **π -el. páru**

Dělení barviv podle původu

- přírodní

karmín - červec nopálový

orcein - lišejníky (*Lecanora*, *Roccella*)

hematoxylin - dřevo kampešky (*Haematoxylon campechianum*)

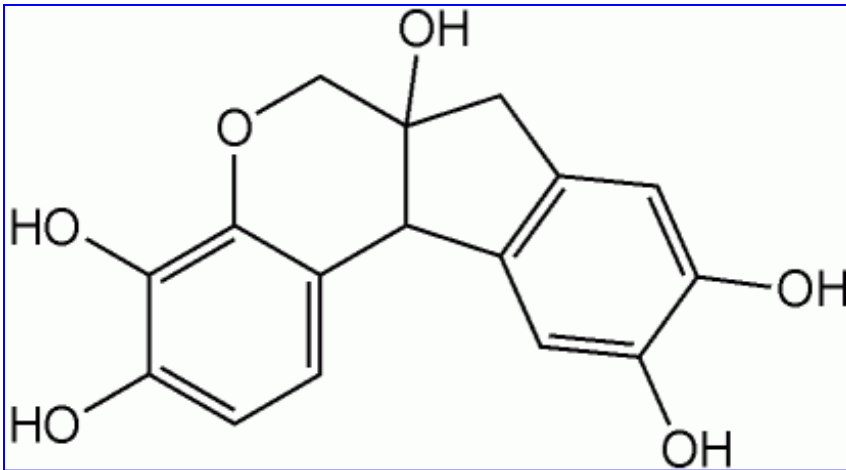
brasilin - dřevo druhů rodu *Caesalpinia* (*Caesalpinia sappan*, *C. brasiliensis*)

indigo - *Indigofera tinctoria*, *Isatis tinctoria*

juglon - listy, kořeny, kůra *Juglandaceae*

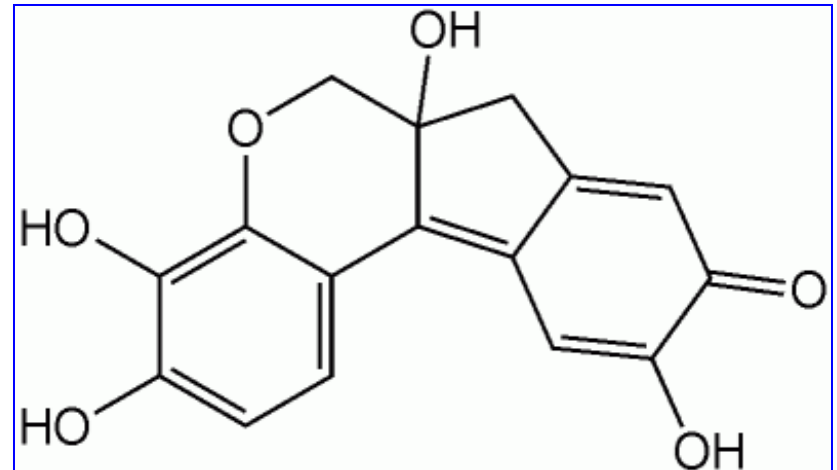
- syntetická

Hematoxylin a hematein



hematoxylin = sloučenina tmavě modrofialové barvy ze dřeva
Haematoxylon campechianum
Používá se s mořidly - nejčastěji Fe^{3+} nebo Al^{3+}

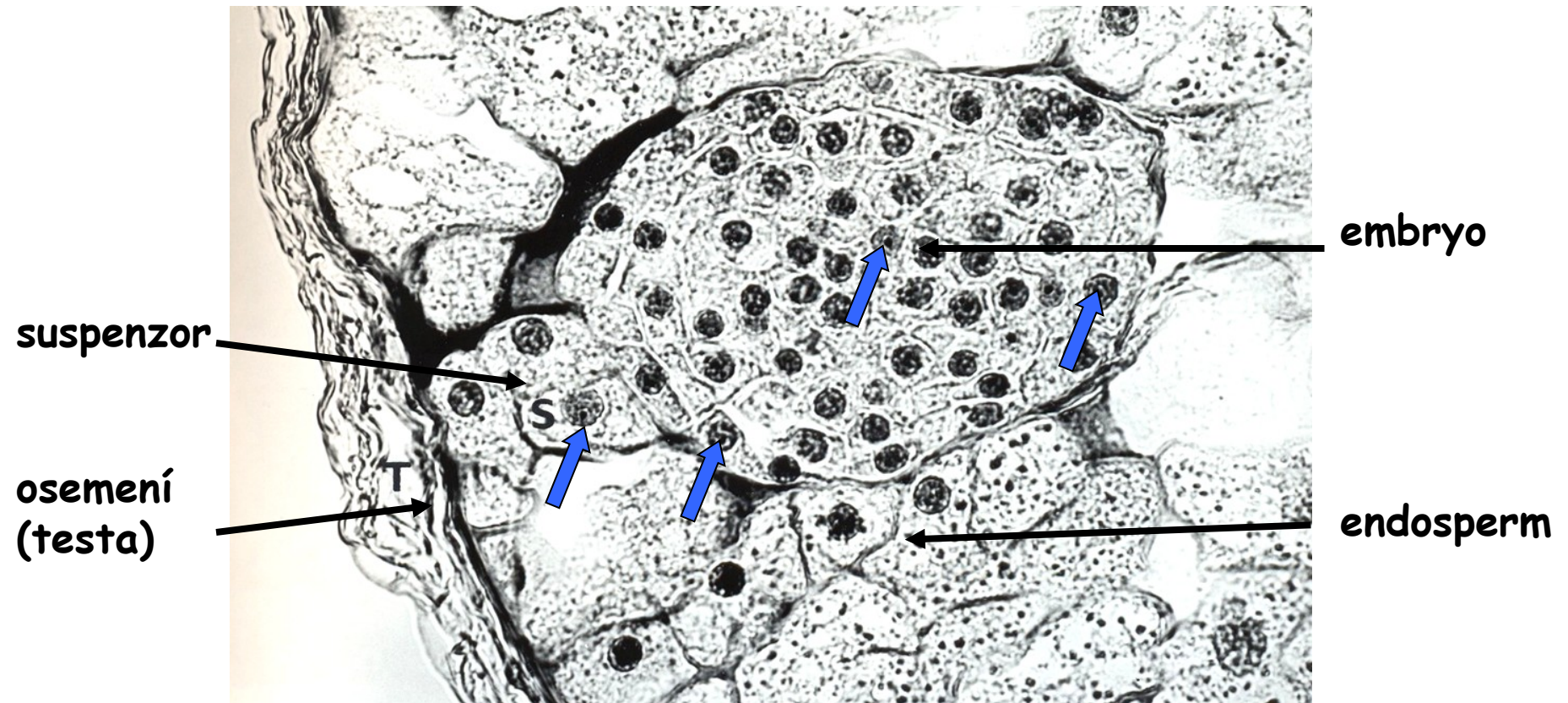
Natural Black 1 nebo C.I. 75290



barví teprve jeho oxidovaná forma = hematein

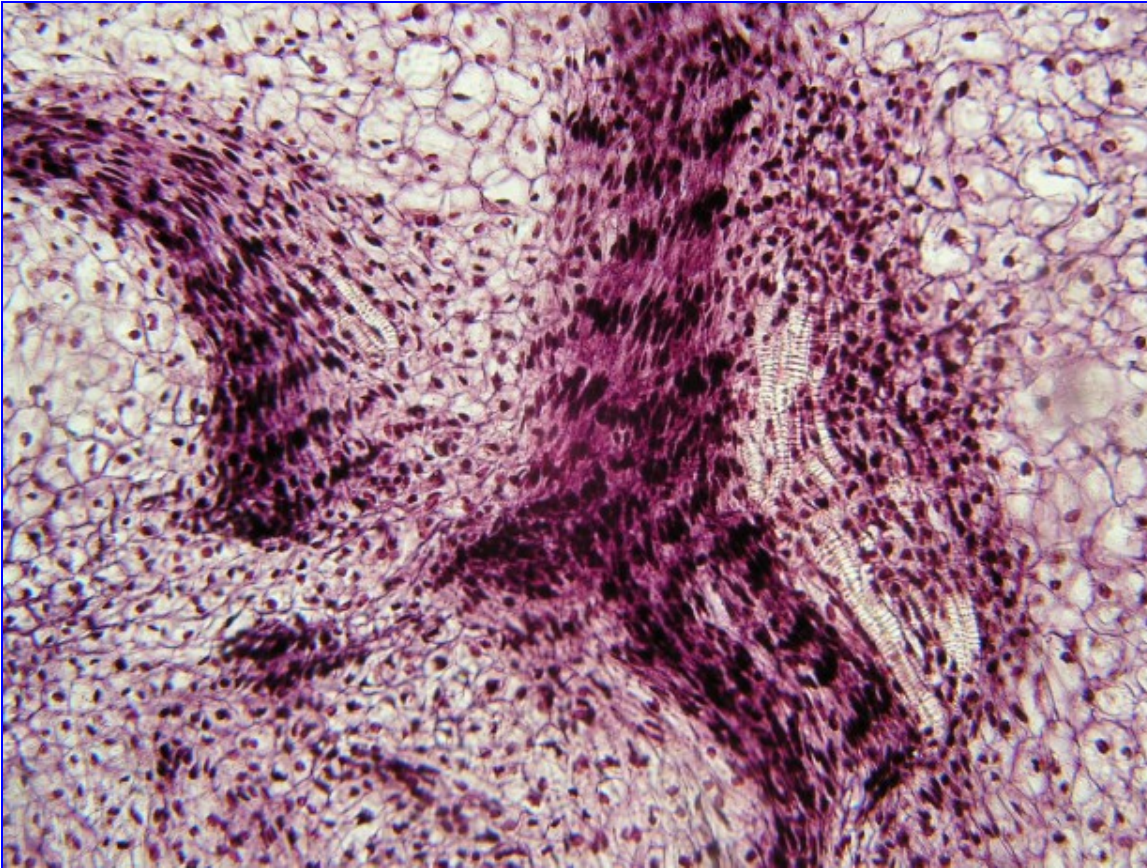
Ize barvit regresivní i progresivní metodou - záleží na formě aplikace mořidla

Podélný parafínový řez semenem sněženky *Galanthus nivalis* L.



regresivní barvení **Heidenheinovým železitým hematoxylinem**
optimální diferenciaci = v jádách buněk embrya i endospermu
jsou patrná tmavěji zbarvená jádérka, Fe^{3+} jako mořidlo

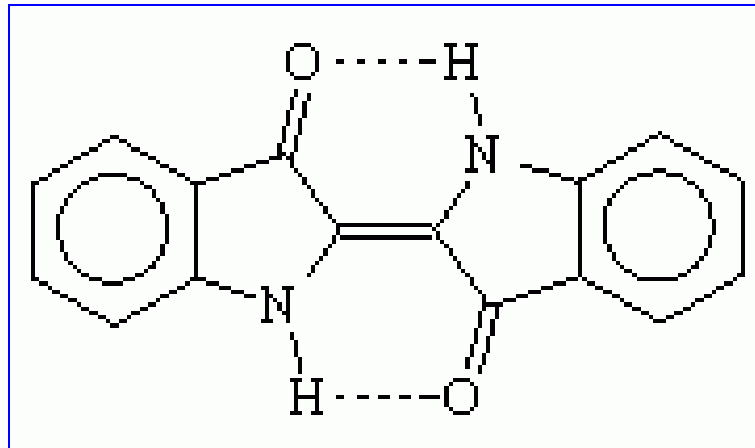
Parafínový řez poupětem máku, *Papaver somniferum*



Delafieldův
hematoxylin,
progresivní barvení,
 Al^{3+} jako mořidlo

kanadský balzám

Indigo

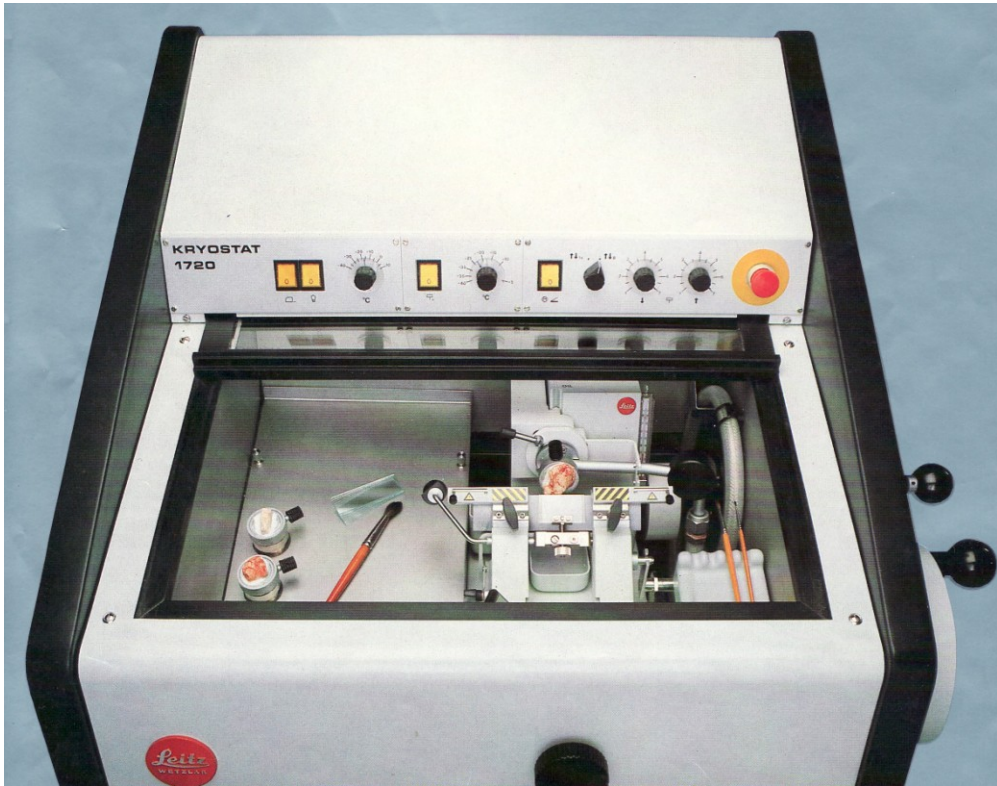


Indigofera tinctoria
Isatis tinctoria

dnes již vyráběné
synteticky

pro vlastní barvení řezů se nepoužívá, ale v histochemii jsou často používány tzv. **indigogenní metody**

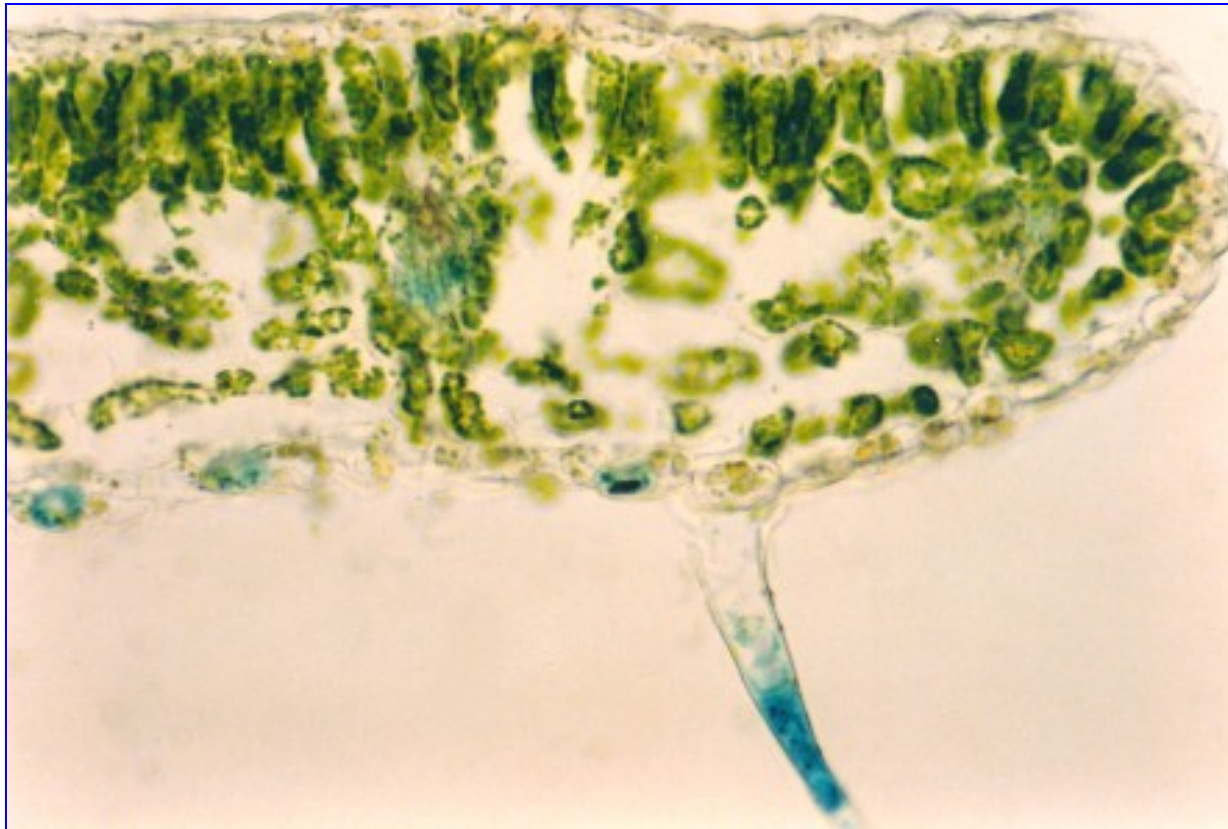
Kryostat



mikrotom pro přípravu řezů zmrazených objektů

Kryostatový řez listem tabáku

tloušťka řezu 30 μ m



Indigogenní metoda detekce aktivity β -glukosidasy se substituovaným indoxyl glukosidem jako substrátem

Dělení barviv podle chromoforů

1. nitrobarviva (trinitrofenol) $-\text{NO}_2$
2. azobarviva (oranž G, Bismarkova hněd', Sudan IV, Fast Blue B...) $-\text{N}=\text{N}-$
3. fenylmetanová barviva = arylmetanová (p-rosanilin, fuchsin, Magenta, genciánová violet', Fast green)
4. chinolinová barviva (indofenol, aziny)
5. xanthenová barviva (fluorescein, eosin, Giemza = azureosinát, rhodamin)
6. ftalocyaninová (alcianová modř)

Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

- **Barvení progresivní:** barvíme do žádané intenzity zbarvení (**Mayerův** nebo **Delafieldův hematoxylin**)
- **Barvení regresivní:** preparát přebarvujeme a pak postupně odbarvujeme (diferencujeme), podle afinity struktur k barvivu se některé odbarví zcela, jiné zůstanou zbarvené (**Heidenheinův železitý hematoxylin, safranin**)

Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

- **barvení simultánní**: směs barviv v jednom roztoku (složky nesmějí spolu reagovat) (**Alexander**)
- **barvení sukcedánní** (sukcesivní): dvě barviva po sobě, doplňují se barevné tóny, každé barvivo barví jiné struktury (**alcianová modř - pravá jaderná červeň, safranin - Fast Green, bazický fuchsin - pikroindigo karmín /Cajal - Brožkova metoda/**)

Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

- barvení substantivní:

barvení samotným barvivem ve vodném nebo etanolovém roztoku

- barvení adjektivní:

použití **mořidel** (soli kovů = kamence, tanin),

barvení adjektivní přímé = směs barviva a mořidla

(**Ehrlichův, Mayerův, Delafieldův hematoxylin**),

barvení adjektivní nepřímé = nejprve řezy moříme a pak barvíme (**Heideheinův železitý hematoxylin**)

Postup při podvojném sukcesivním barvení: alcianová modř - jaderná červeň stálá (Kernechtrot, nuclear fast red)

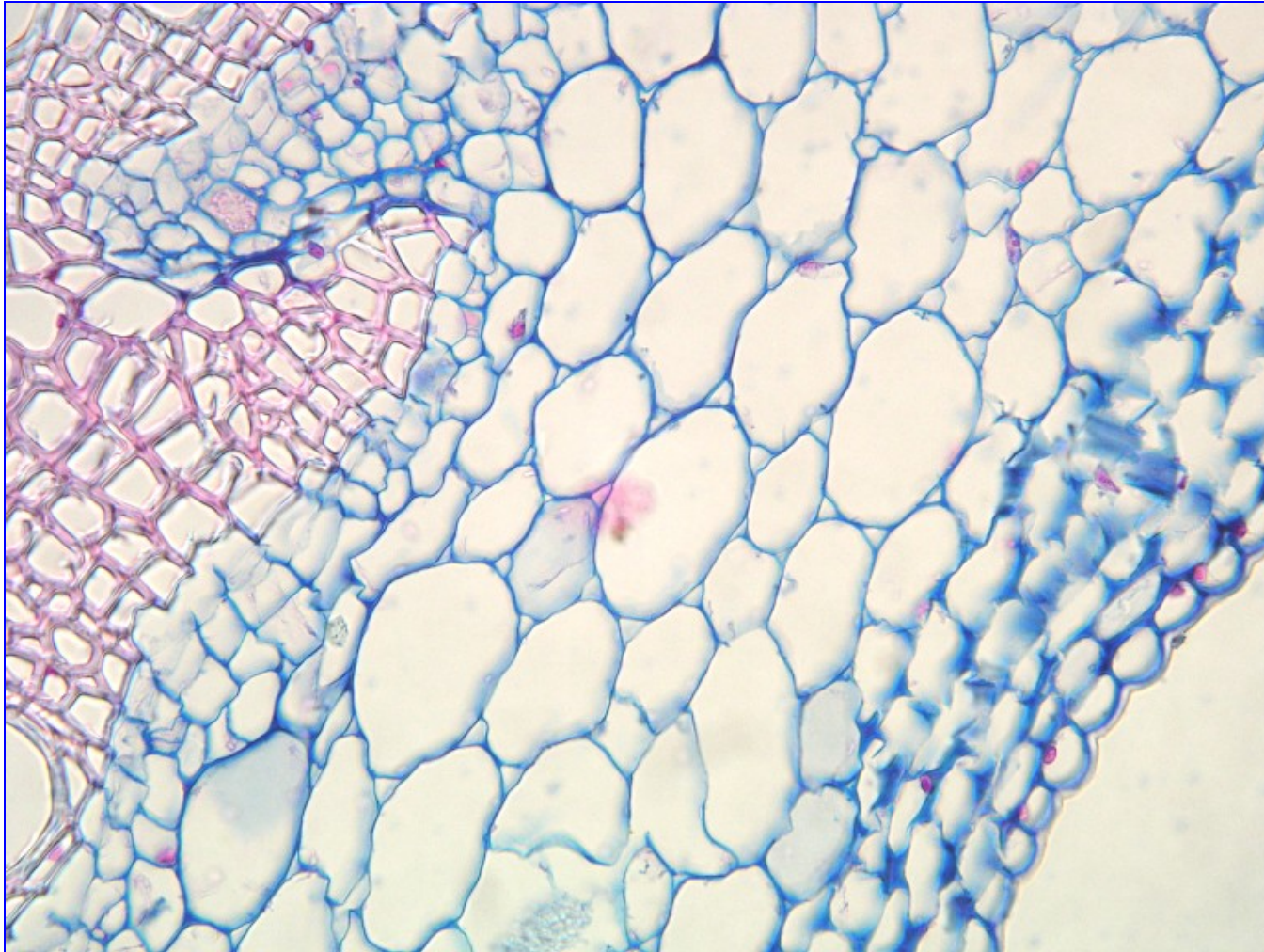
1. odparafínování řezů (xylen)
2. převedení řezů do vody
3. vlastní barvení:
 - a) 3% roztok kyseliny octové 10 min.
 - b) barvení buněčných stěn - 1% alcianová modř
v 1% kyselině octové 10 min.
 - c) opláchnutí 3% kyselinou octovou
 - d) praní v tekoucí vodě 10 min.
 - e) barvení buněčných jader - 0,1% jaderná červeň stálá
v 5% roztoku $Al_2(SO_4)_3$, 5 - 15 min.
4. opláchnutí destilovanou vodou
5. odvodnění alkoholovou řadou
6. převod do xylenu
7. uzavření do Eukittu

Podvojné barvení sukcedánní:
alcianová modř - pravá jaderná červeň



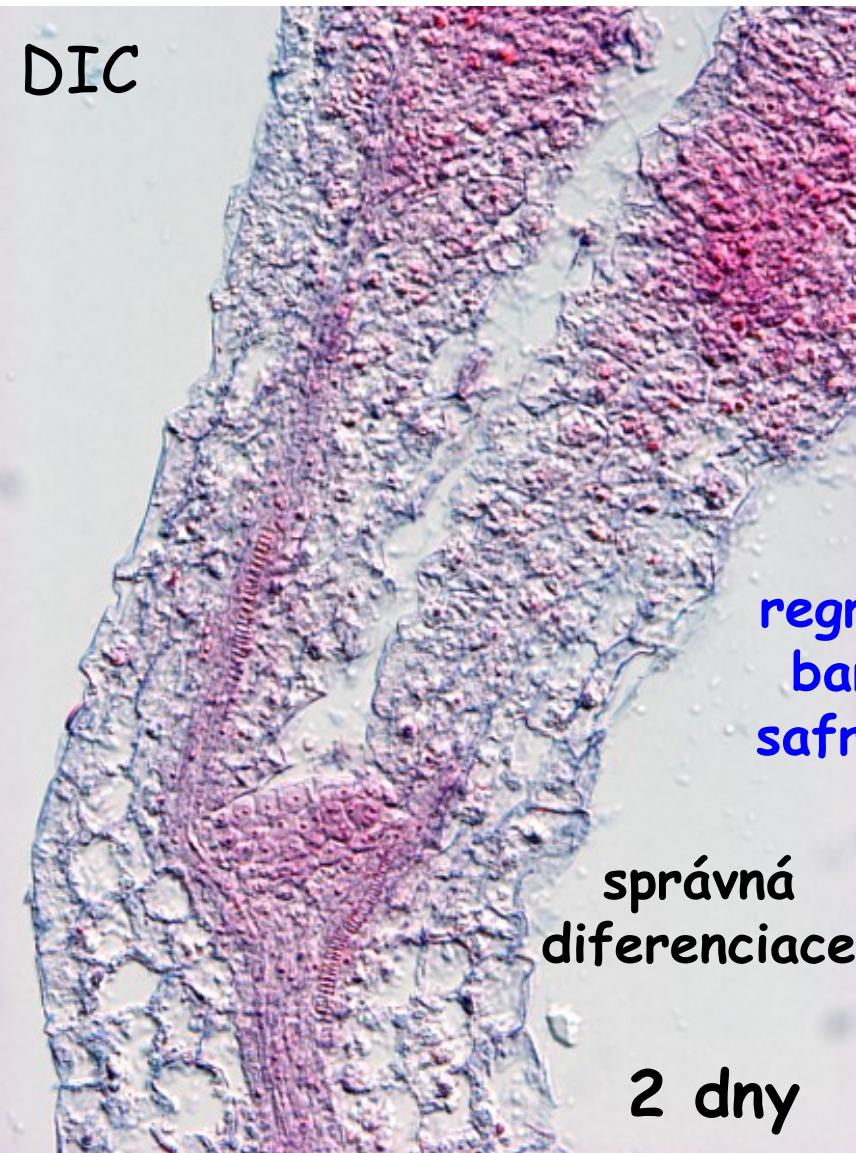
parafínový řez listem kosatce *Iris* sp.
tloušťka řezu 15 μ m

**Podvojné barvení sukcedánní:
alcianová modř - pravá jaderná červeň**



příčný řez
stonkem nocenky
Mirabilis jalapa
12 μm

Klíční rostlina *Arabidopsis* podvojn  barvení Safranin - Fast green



pod ln  paraf nov  řezy tloušťka řezu 8 μ m

Olympus BX-61

Odkazy na zajímavé stránky

Univerzita v Bristolu - metody histologického barvení

<http://www.bristol.ac.uk/vetpath/cpl/histmeth.htm>

stránky kurzu Botanická mikrotechnika UK Praha (A.Soukup, O.Votrubová)

<http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/prep/tprep.htm>

metody histologie a imunohistochemie

http://www.ihcworld.com/antibody_staining.htm

protokoly barvení pro pletiva zalitá v pryskyřici Energy Beam Sciences

<http://www.ebsciences.com/staining/orcein.htm>

encyklopedie

[http://cs.wikipedia.org/wiki/Barven%C3%AD_\(biologie\)](http://cs.wikipedia.org/wiki/Barven%C3%AD_(biologie))

<http://encyklopedie.seznam.cz/search/?s=barven%C3%AD&source=3>

fixace a protokoly základních barvení

<http://www.nottingham.ac.uk/pathology/default.html>

<http://stainsfile.info/StainsFile/jindex.html>