

Histologické techniky v rostlinné embryologii

Fixace
Zalévání
Krájení řezů
Barvení řezů



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Histologie

- původ názvu = **z řečtiny:**
 - histos = tkáň**
 - logos = slovo, nauka**
- je vědní disciplína, která se zabývá studiem mikroskopické stavby živočišných tkání a rostlinných pletiv
- používá speciální techniky přípravy preparátů a mikroskop

Fixace

- rozkladné autolytické procesy začínají prakticky ihned po smrti buněk a nenávratně ničí jejich původní strukturu
- překonávají se fixací
- první znalosti o fixaci živočišných tkání (samozřejmě ne pro mikroskopii) pocházejí již z dob Hippokratových - používal **sloučenin rtuti**, byly známy i fixační účinky **alkoholu**
- rozvoj fixace **v pol. 19. století** hlavně s rozvojem **kožedělného průmyslu** (různé sloučeniny, např. kyselina octová, alkohol, kyselina chromová, kyselina pikrová)
- žádná metoda však nebyla jednoznačně optimální

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

chemická

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

Jednotlivá fixační činidla

Etanol (metanol, aceton)

- odstraňují vodu z bílkovin - štěpí vodíkové můstky a poškozují terciální strukturu = denaturace bílkovin
- rozpustné proteiny = koagulované - poškození membrán
- NK - nevysrážené, zůstávají rozpustné
- neproniká rychle, způsobuje objemové zmenšování
- v 96% ethanolu materiál křehne a tvrdne

Kyselina octová

- proniká rychle
- **koaguluje** jaderný chromatin, ale plazmatické struktury poškozují, mechanismus fixace je nejasný
- pletiva zůstávají měkká - použití pro **karyologická studia**
- někdy je nahrazována vyšším homologem = kyselinou propionovou, která nemá tak negativní účinky na cytoplazmu
- 96% při 16,6°C „mrzne“ na hmotu podobnou ledu = její triviální název „**ledová kyselina octová**“

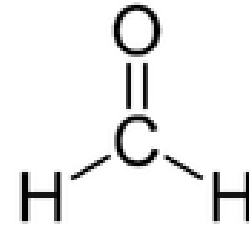
Kyselina pikrová = trinitrofenol

- žluté jehlicovité krystaly - rozpustné ve vodě a alkoholu
- v suchém stavu = třaskavina (uchovává se pod vodou)
- koagulace proteinů je způsobena tvorbou solí - pikrátů
- pikráty jsou rozpustné ve vodě - oplachování se musí provádět alkoholem a ne vodou!
- dobře proniká do pletiv a zlepšuje jejich barvitelnost

Formaldehyd

- 1859 syntetizoval chemik **Alexandr Butlerov**
- o 8 let později jej **Hoffman** potvrdil jeho definitivní chemickou strukturu
- vzhledem ke složitosti syntézy jej histologové těžko užívali před těmito objevy
- již koncem 19. století **Luis Pasteur** fixoval formaldehydem mozky lidí postižených vzteklinou
- 1895 **Ottův naučný slovník** píše o užití formaldehydu v mikroskopii jako o nové metodě.

Formaldehyd



- je plyn s bodem varu -21°C
- používá se jako
 - vodný roztok plynu (37- 40%) **formalín** nebo
 - pevný polymer - **paraformaldehyd**
- během skladování se zhoršuje kvalita formalínu vlivem tzv. **Canizariho reakce**, kdy vzniká kyselina mravenčí = prudké snižování pH
- po primární vazbě na různé funkční skupiny se vytvářejí křížové vazby („kroslinky“) - dochází k zesíťování molekul proteinů = **nekoagulační fixace**

Glutaraldehyd



- bezbarvá kapalina štiplavého zápachu
- je **toxický** a způsobuje vážné podráždění očí, nosu, krku a plic, bolesti hlavy, ospalost a závratě – pracovat v digestoři, **dodržovat zásady práce s toxickými látkami!**
- používá se samostatně nebo ve směsi s formaldehydem
- zesíťování bílkovin pletiva po fixáži GA je mnohem pevnější - způsobuje větší tvrdost pletiv

Kyselina chromová

- CrO_3
- koaguluje hrubě proteiny a NK
- dobře fixuje jádro, chromozómy fixuje výborně - chemismus reakce není dobře známý
- zlepšuje barvitelnost struktur
- musí být dlouhodobě propírána po fixáži tekoucí vodou (24 - 48 hod.), aby se nevytvořil nerozpustný zelený hydroxid chromitý

Oxid osmičelý

- OsO_4
- **vysoce toxický**, nutno dodržovat bezpečnostní pravidla
- používá se jako postfixace po aldehydových fixacích
- při zalévání do pryskyřice

Obecný postup klasické histologické metody (parafínová metoda)

- odběr materiálu
- fixace vzorků
- dehydratace
- prosycení rozpouštědlem parafínu
- prosycení parafínem
- zalití do parafínu
- řezání a lepení parafínových řezů
- odparafínování řezů
- barvení řezů
- montáž (uzavírání) řezů

Odběr materiálu

- rychlý
- pokud je nutná preparace – raději již ve fixáži
- velikost vzorků přiměřená – pro rychlý průnik fixáže do celého objektu
- volba segmentů podle plánovaného studia

Fixační směsi – FAA (FPA)

formaldehyde-acetic (propionic) acid – aethylalcohol

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

stálá

rychle proniká

vhodná pro studium anatomické stavby

Carnoyova fixáž

ethanol – chloroform - octová

- 100% (96%) ethanol 60 ml
- chloroform 30 ml
- kyselina octová 10 ml

proniká rychle - fixuje dobře **chromatinové struktury**

použití v cytologických studiích – např. pro sledování jaderného dělení při vývoji pylu nebo zárodečného vaku

Navašinova fixáž a CRAF



- 1% CrO₃ (kyselina chromová) 75 ml
- ledová kyselina octová 5 ml
- formaldehyd 37 – 40% 20 ml

vhodná pro mladé orgány

nutnost dlouhého vypírání v tekoucí vodě

Sergej Gavrilovič Navašin (*14.12.1857 – †10.11.1930), ruský botanik.

Působil jako profesor univerzity v Kyjevě, byl člen korespondent (od roku 1901), akademik Akademie věd v Rusku (od roku 1918) a Akademie věd v Ukrajině (od roku 1924). Zabýval se cytologií.

V roce 1898 objevil princip dvojitého oplození vyšších rostlin.

Chromové fixáže

(Sass 1951)

Podle: Lux <i>et al.</i> 2002	Navašin	CRAF				
		I	II	III	IV	V
1% kyselina chromová	75	20	20	30	40	50
1% kyselina octová		75				
10% kyselina octová			10	20	30	35
ledová kyselina octová	5					
formaldehyd 37-40%	20	5	5	10	10	15
destilovaná voda			65	42	20	

Volba fixází podle orgánů

Lux et al. 2002

Stonkové a kořenové apexy, pupeny bylin	Navašin, CRAF I, II, III
Listové pupeny dřevin	FAA, FPA
Mladé stonky a kořeny	CRAF II, III
Dřevnaté stonky a kořeny	CRAF IV, V, FAA, FPA
Mladé, jemné listy	CRAF II, III
Starší listy	FAA, FPA
Dužnaté listy sukulentů	CRAF I
Květní poupata	FAA, FPA, CRAF III
Tyčinky	CARNOY, CRAF III, FAA
Semeníky	CARNOY, CRAF III
Embrya	CRAF III
Mladé plody	CRAF III, FAA, FPA
Starší plody	CRAF III, FAA, FPA

Fixace vzorků 2011

- prašníky a pestíky z poupat lilie *Lilium* hybr.
- délka poupat: 9, 6 a 5 cm
- fixace **FAA** (s 50% EtOH) 88 hod.
- oplach 50% EtOH 2 x 30 min
- dehydratace **butanolovou řadou**
- prosycení **Paraplast Plus®**
- zalití **Paraplast Plus®**

Dehydratace

- během dehydratace dochází často k nejvýraznějším objemovým změnám a deformaci objektů
- postupné odvodňovací řady - převáděním objektů sérií roztoků s rostoucí koncentrací organických rozpouštědel dojde k postupnému odstranění vody v objektu
- odvodňovací řady:
 - etanolová
 - butanolová
 - acetonová

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

Dehydratace etanolovou řadou

stupeň	% etanolu ve vodném roztoku
I	30%
II	50%
III	70%
IV	90%
V	96%
VI	100%
VII	100%
VIII	100%

začátkem řady je stupeň s koncentrací vody odpovídající koncentraci vody v použité fixáži (např. po FAA s 50% etanolu začínáme od kroku II)

doba pobytu objektů v jednotlivých krocích závisí na charakteru a velikosti objektů

mladé malé objekty 1-2 hodiny

kompaktnější a větší objekty až 24hod.

nutno použít intermédium = xylen

Dehydratace butanolovou řadou

stupeň	% EtOH	% ButOH	% vody
I	20	10	70
II	25	15	60
III	30	25	45
IV	30	40	30
V	25	55	20
VI	20	70	10
VII	15	85	0
VIII	0	100	0

butanol je, narozdíl od etanolu,
rozpouštědlem parafínu

po FAA s 50% etanolem začínáme
dehydrataci od kroku III

Zalévání do médií - historie

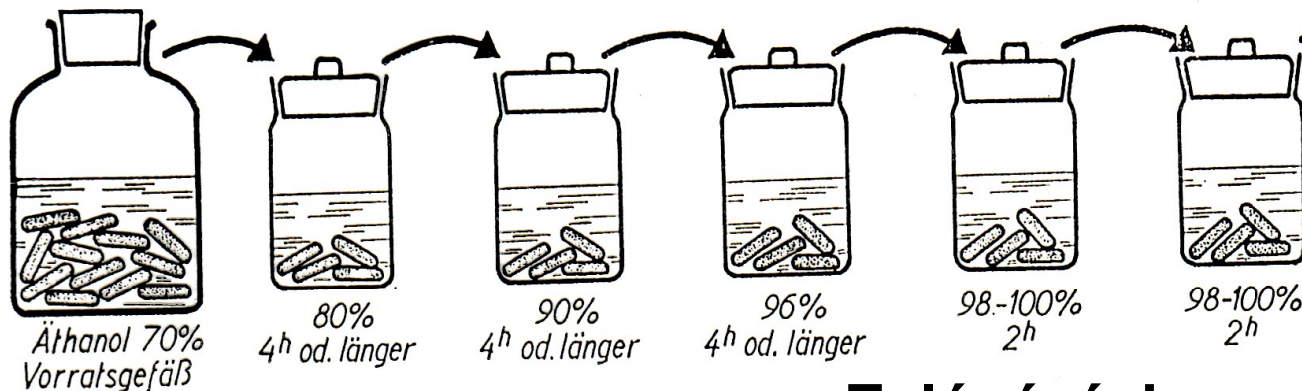
- zalévacími médii v histologii byly různé materiály, např. mýdlo, celoidin, různé druhy pryskyřice a vosk
- za autora techniky zalévání do parafínu je považován **Edwin Klebs**, vynikající patolog a metodologický průkopník, působící v Praze, Curychu a v Chicagu
- **1869** popsal tuto metodu, která spočívala v odvodnění tkáně alkoholem, následném vysušení a pak obalení ve vosku na způsob jakéhosi pláště, tkáň ale ještě nebyla voskem prosycena
- postupně se metody stále zlepšovaly

Infiltrace a zalití do média

- homogenní prosycení celého objemu objektu zalévacím médiem – postupné a pomalé
 - laboratorní teplota
 - 40°C
 - teplota tání parafínu
- podmínkou úspěšného zalití je úplné odstranění rozpouštědel

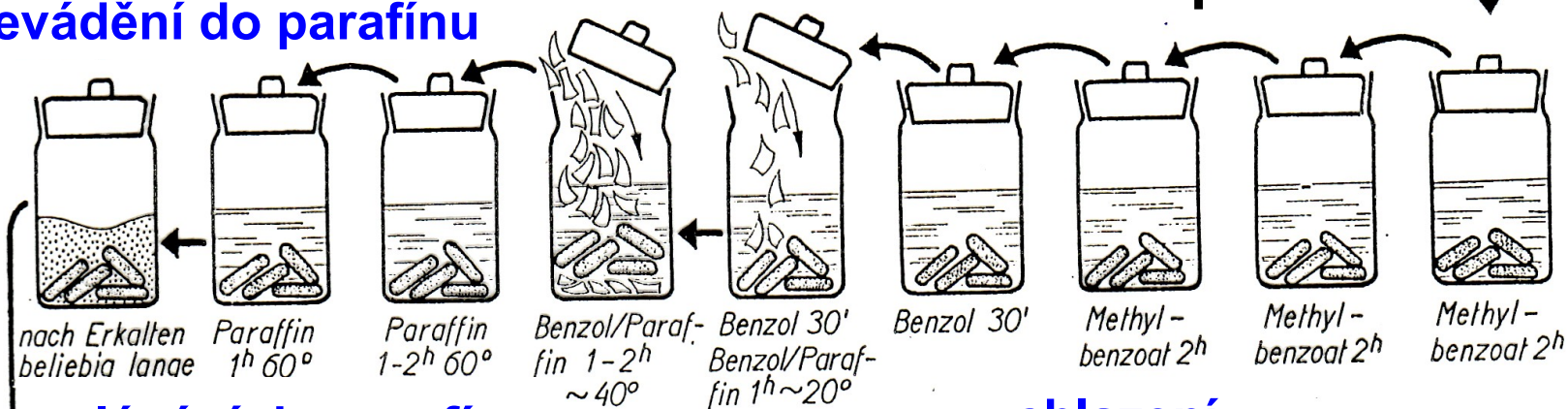
dehydratace

Braune et al. 1982



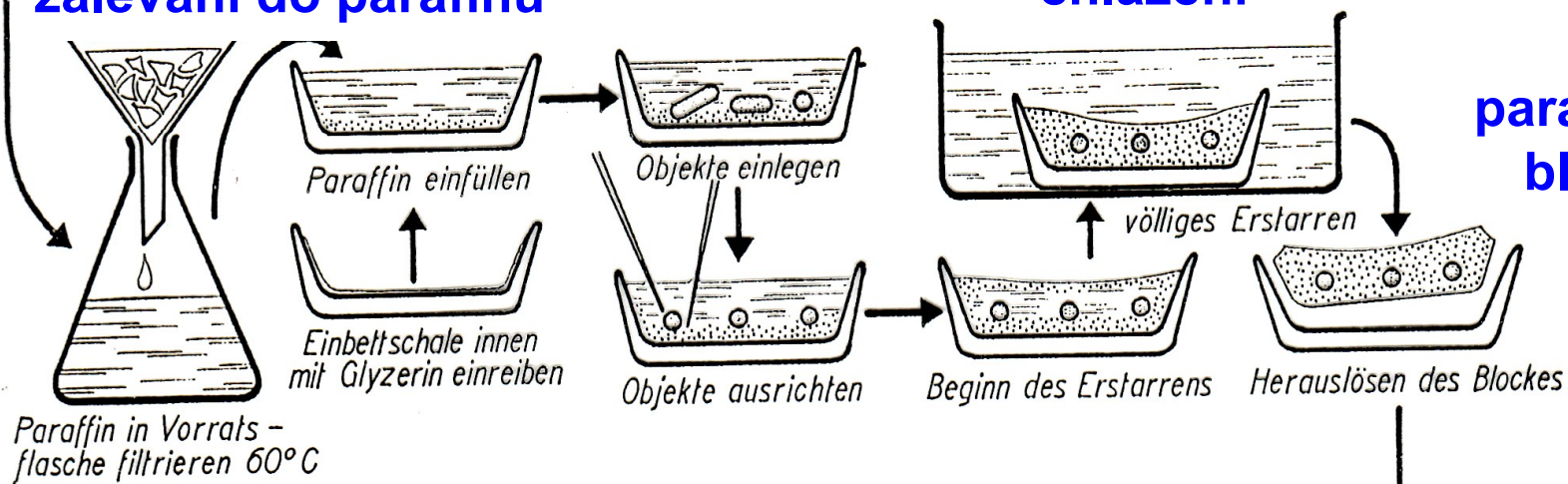
Zalévání do parafínu

převádění do parafínu



zalévání do parafínu

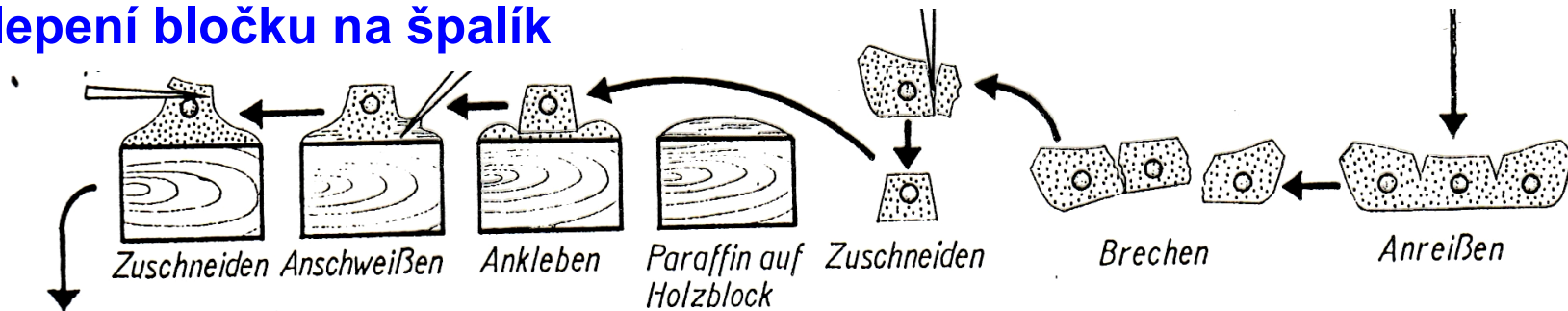
chlazení



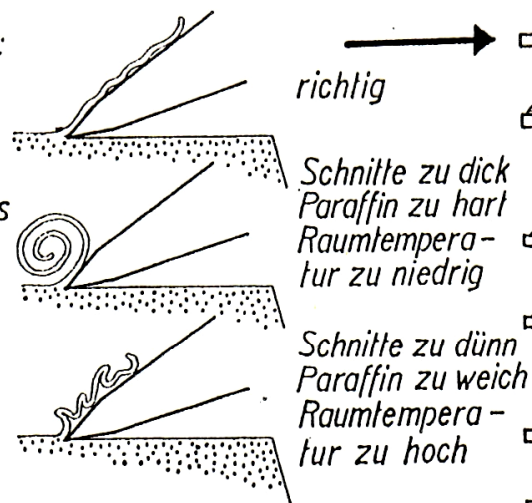
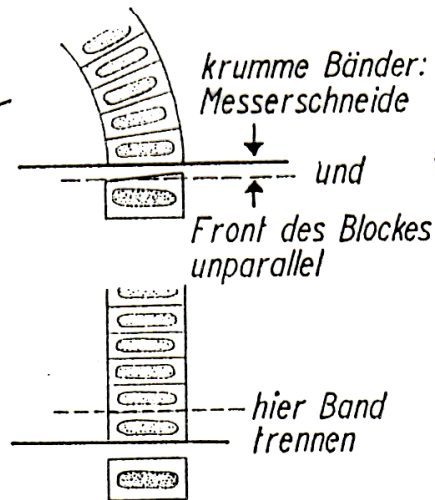
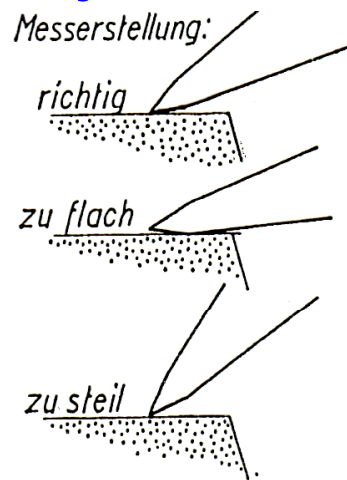
Krájení parafínových řezů

rozdělení na bločky

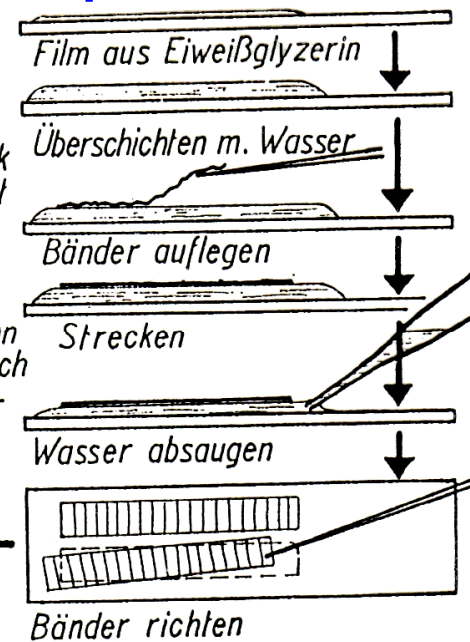
lepení bločku na špalík



krájení řezů



lepení řezů



Braune et al. 1982

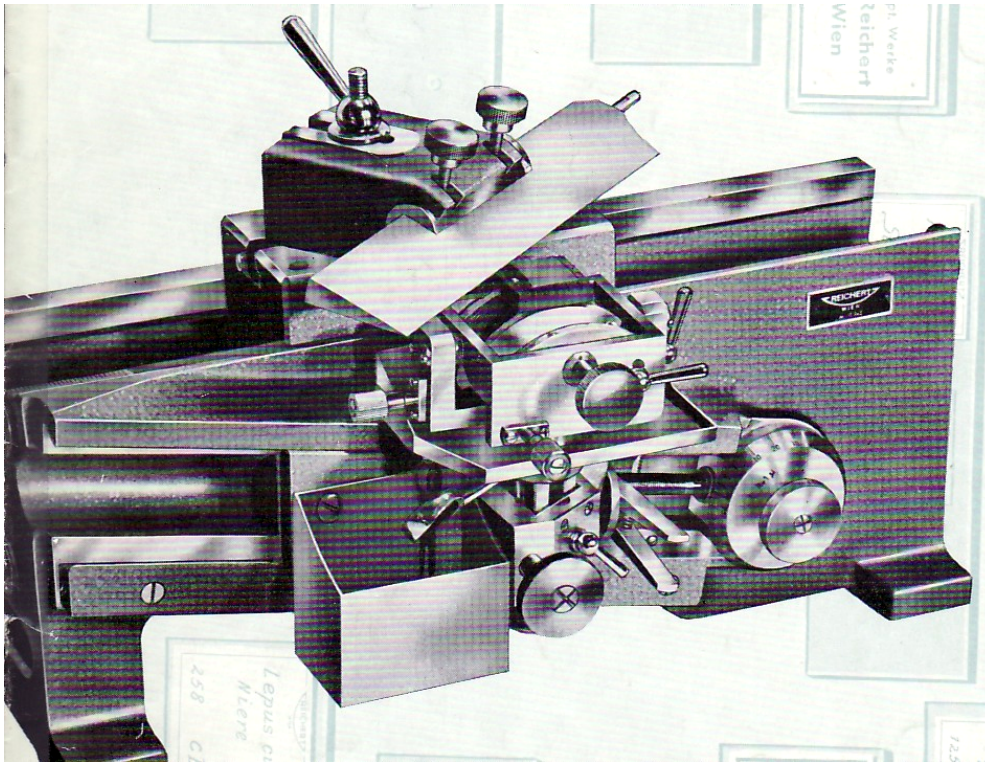
Krájení řezů

- vývoj krájecích přístrojů (J.E. Purkyněm nazvaných mikrotomy) nastal ve druhé polovině 19. stol.
- prvním mikrotomem byla dobře **nabroušená břitva** - v jedné ruce se držel bloček, pro bezpečnost zanořený např. do korkové zátky, a v druhé ruce břitva
- ruční mikrotomy se posléze zdokonalily v **mikrotomy strojové**, které snadno a rychle krájí kvalitní a celistvé řezy
- podle konstrukce a účelu použití se mikrotomy dělí na:
 - **sáňkové**
 - **rotační**

Ruční mikrotom



Mikrotomy strojové

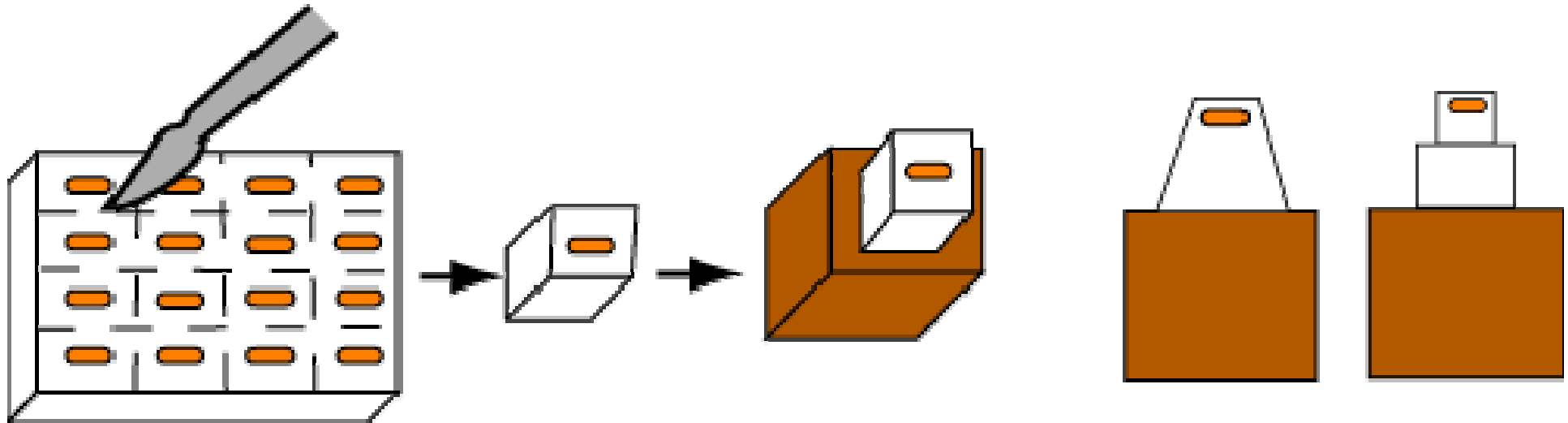


sáňkový mikrotom Reichert



rotační mikrotom Leitz

Příprava bločku ke krájení



**dělení bloku
parafínu**

**izolovaný
bloček
parafínu**

**přitavení bločku
parafínu na
dřevěný špalík**

**trimování
bločku
parafínu**

Lepení řezů

- 1890 – Mayer: glycerol – bílek + fenol (thymol)
- chromová želatina („gelatin and chrome alum“)
- poly-L-lysin
- podložní skla SuperFrost Ultra Plus® - není nutno používat adheziva

- sušení na teplé ploténce

Barvení histologické a histochemické

Pojmy:

barva

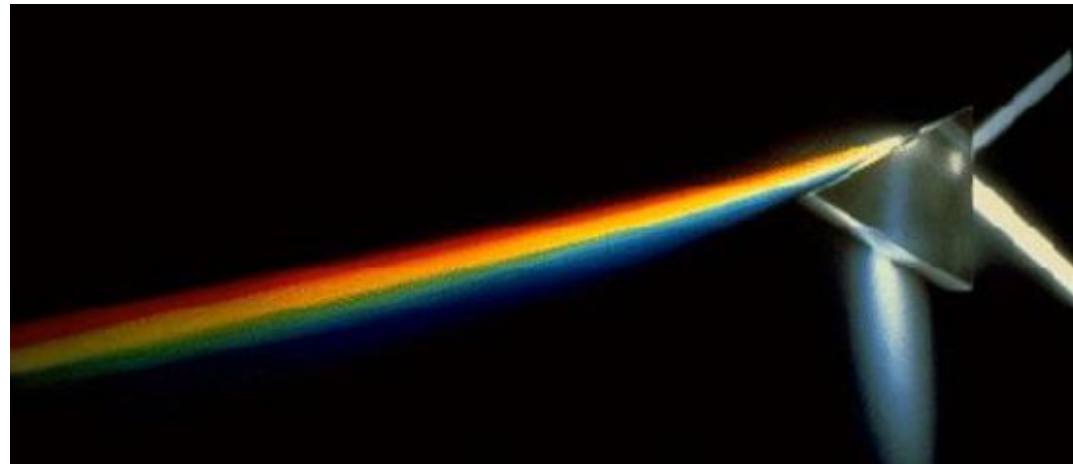
barvivo

barvení

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

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, -SO₃H anionická barviva
 - b) bazické radikály: -NH₂ kationická barviva
2. **chinoidní struktury**
3. **π – el. páru**

Barvivo

- ne všechny barevné sloučeniny mohou být barvivem
- barvivo = barevná sloučenina, která může být navázána na substrát
- **barvivo histologické** - barví různé složky pletiv
- **histochemické barvení** - barvicí proces je vysoce specifický, chemicky definovaný

Kriteria dělení barviv

- **rozpustnost** rozpustná ve vodě, v etanolu
- **způsob aplikace**
- **barva** červeně, modř, žlut', zeleň, hněd', čern
- **chemická struktura**
- **typy chromoforů**
- **původ** (přírodní, syntetická)

Dělení barviv podle původu

- přírodní

karmín - červec nopálový

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

hematoxylin - dřevo kampešky (*Hematoxylon campechianum*)

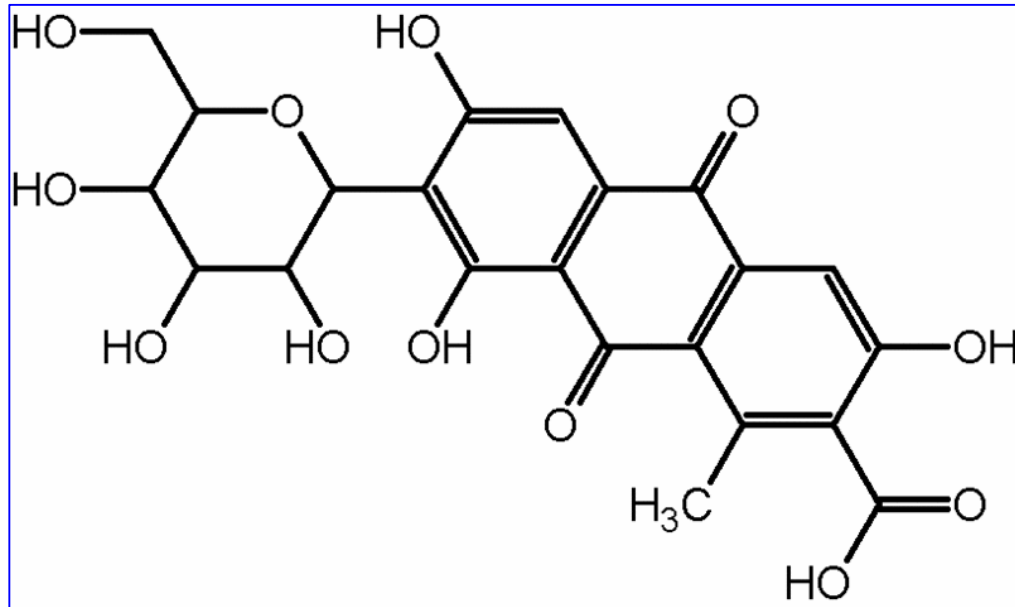
brasilin - dřevo druhů rodu *Caesalpinia* (*Caesalpinia sappan*, *C. brasiliensis*)

indigo - *Indigofera tinctoria*, *Isatis tinctoria*

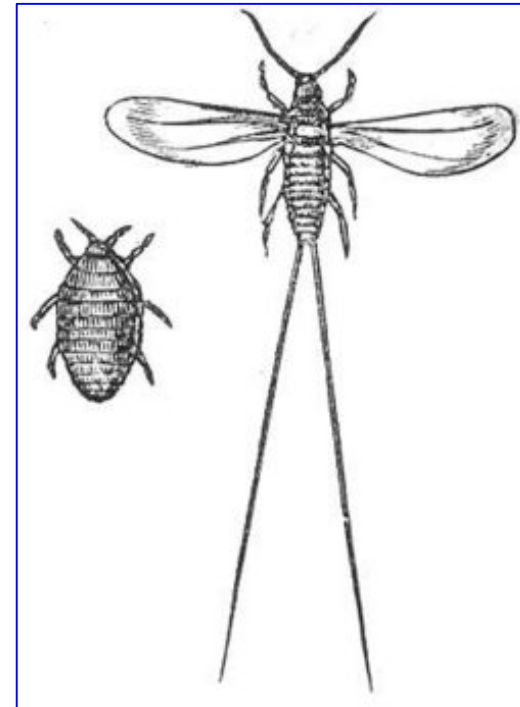
juglon - listy, kořeny, kůra (*Juglandaceae*)

- syntetická

Karmín

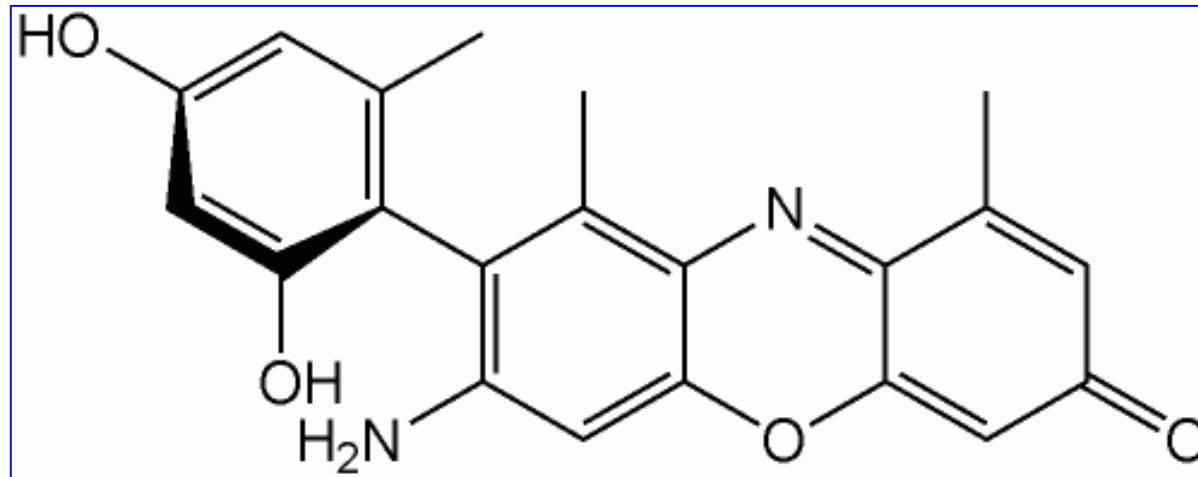


kyselina karmínová



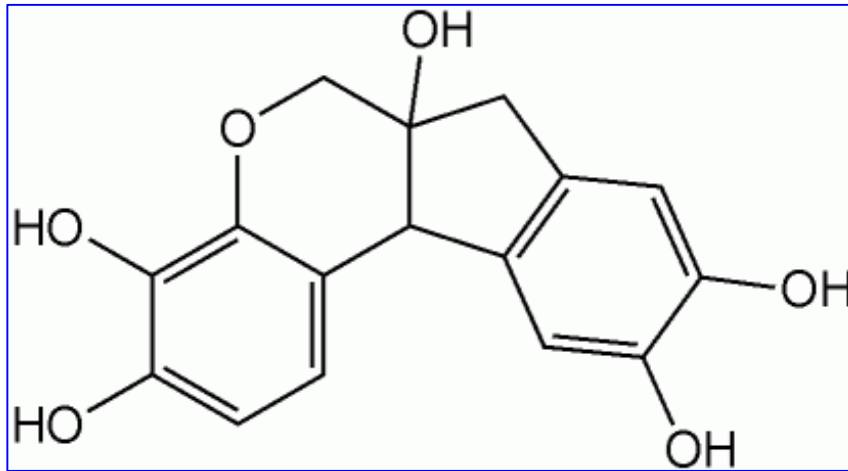
Dactylopius coccus

Orcein



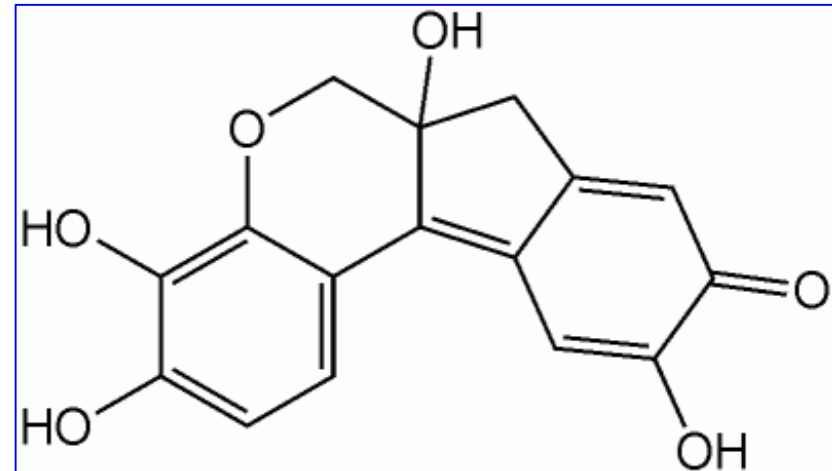
archil, orchil, lacmus, litmus a C.I. Natural Red 28,
potravinářské barvivo E 121

Hematoxylin a hematein



hematoxylin - sloučenina tmavě modrofialové barvy ze dřeva
Haematoxylon campechianum

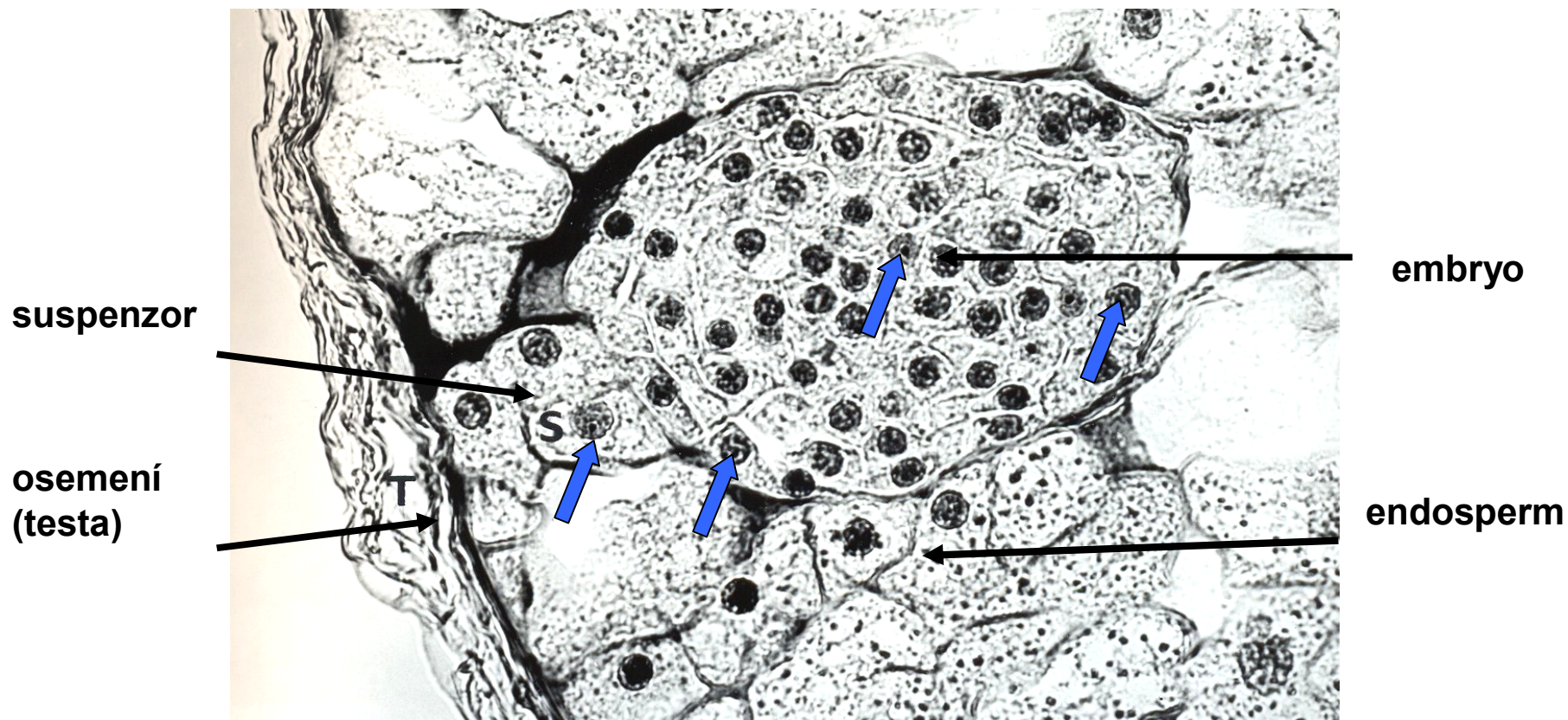
Používá se s mořidly - nejčastěji Fe^{3+} nebo Al^{3+}



barví teprve jeho **oxidovaná forma** = **hematein**

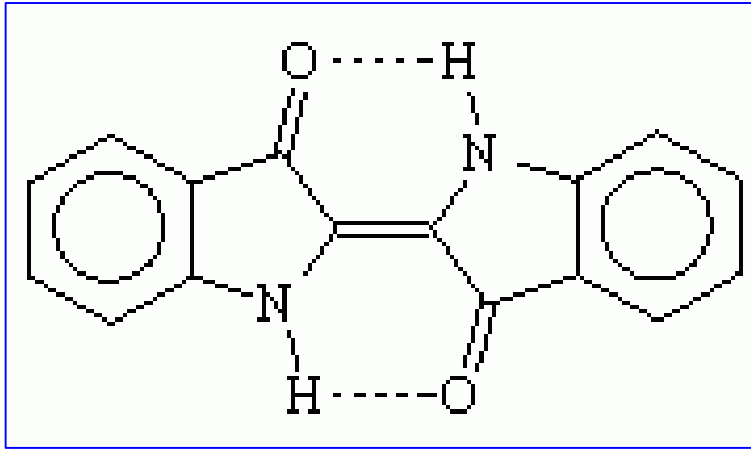
Ize barvit **regresivní** i **progresivní** metodou – záleží na formě aplikace mořidla

Podélný parafínový řez semenem sněženky *Galanthus nivalis* L.



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

Indigo



Indigofera tinctoria
Indigofera sumatrana
Isatis tinctoria

dnes již vyráběné
synteticky

pro vlastní barvení řezů se nepoužívá, ale v histochemii jsou často používány tzv. **indigogenní metody**, při kterých je indigo výsledným produktem reakce

Indigogenní metoda

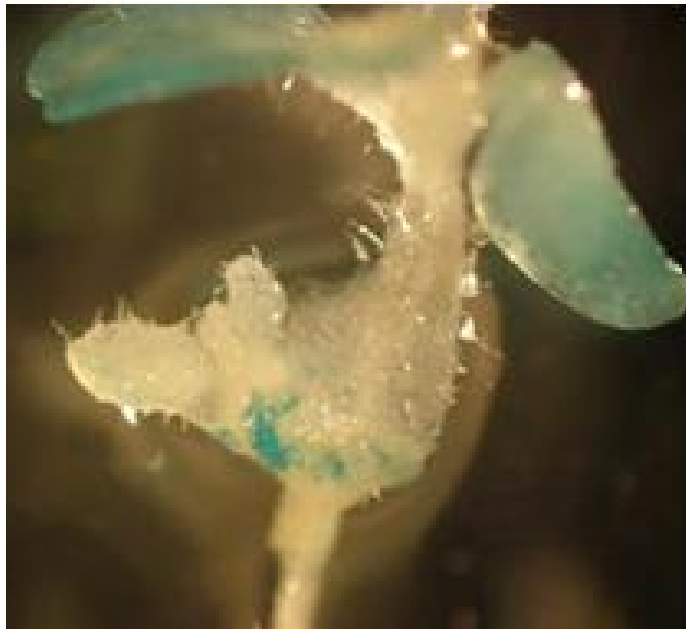


1. krok = štěpení substrátu enzymem
2. krok = dimerace a oxidace na indigo

detekce aktivity β -glukosidasy: substrátem pro enzym je
5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glukopyranosid

Indigogenní metoda histochemické lokalizace aktivity β -glukosidasy Zm-p60.1

inkubace celé rostlinky, kultivace 28 DAS na MS s *t*-Z



transgenní tabák se *Zm-p60.1*



netransgenní kontrola

substrát:

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glukopyranosid

Chmelík *et al.* 2010

Dělení barviv podle chromoforů

1. nitrobarviva (trinitrofenol) $-\text{NO}_2$
2. azobarviva (oranž G, Bismarkova hněď, 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 *in toto*

barvení celých objektů před zalitím a krájením řezů

Barvení řezů

řezy volné („free floating sections“)

řezy přilepené na podložním skle

Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

- **Barvení progresivní:** barvíme do žádané intenzity zbarvení
- **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

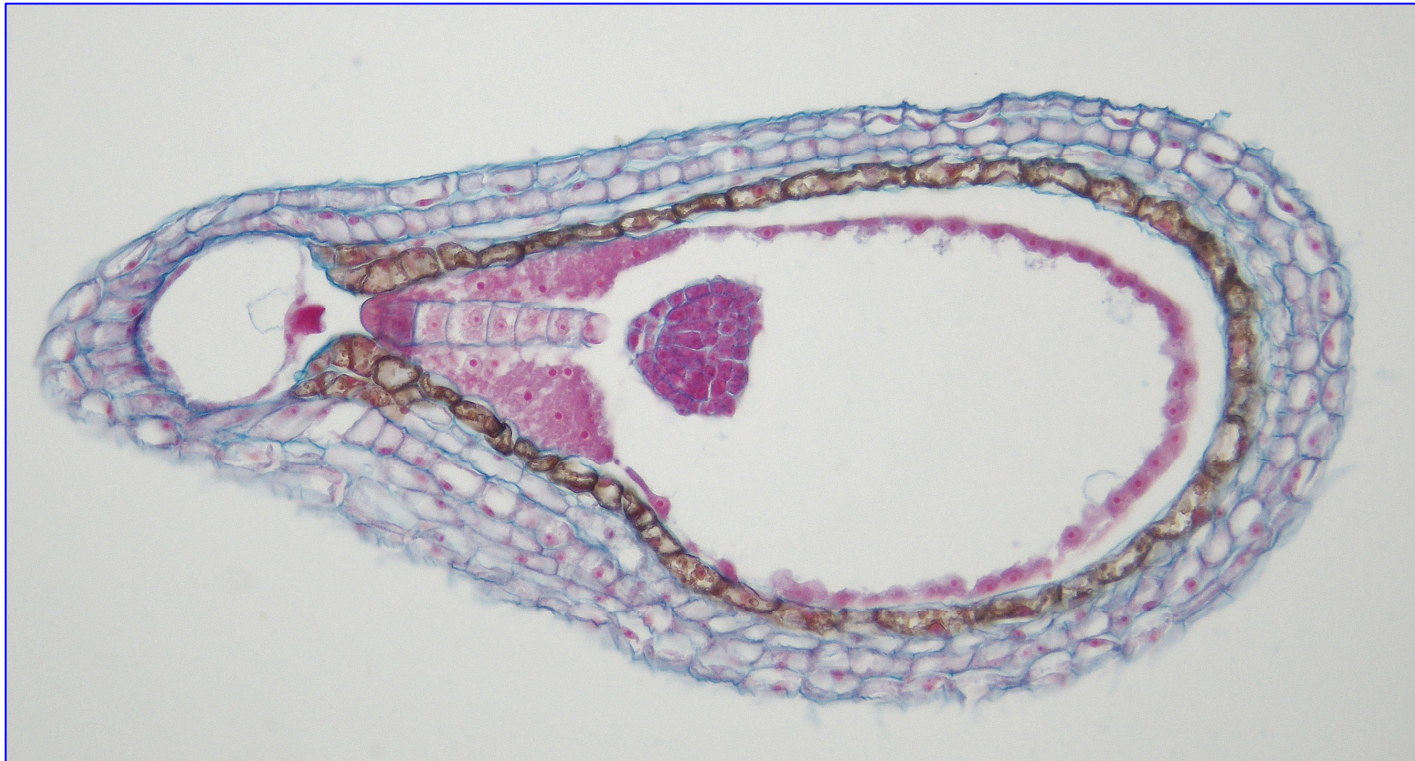
- **barvení ortochromatické**: pletivo se barví toutéž barvou jako má barvivo
- **barvení metachromatické**: jedním barvivem se některé struktury barví jiným tónem než ostatní (Stains - all)

Druhy a způsoby barvení podle výsledku a aplikace

- **barvení simultánní**: směs barviv v jednom roztoku, složky nesmějí spolu reagovat – Alexander 1969
- **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/

Podvojné sukcesivní barvení

alciánová modř – pravá jaderná červeň

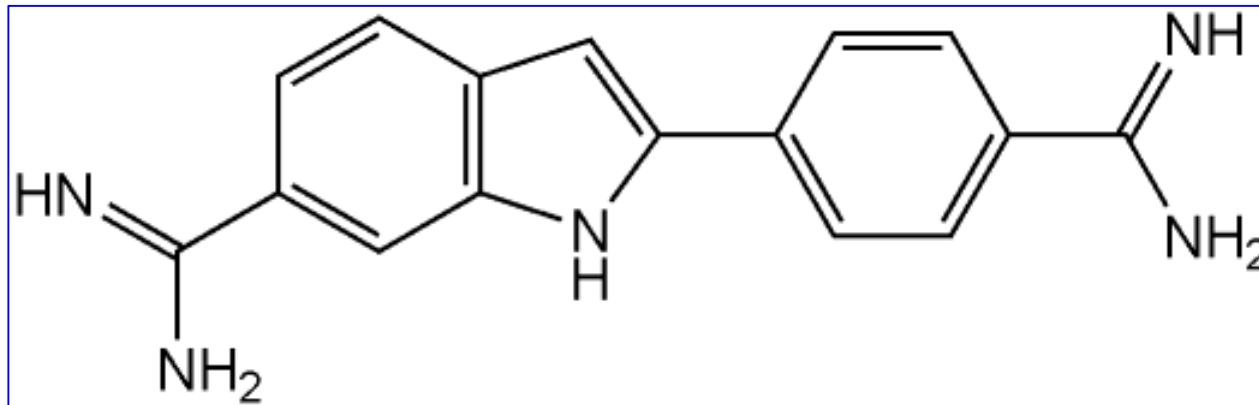


Podélný parafínový řez semenem *Capsella bursa-pastoris*
srdčité embryo a jaderný endosperm, v blízkosti suspensoru již
patrný počátek celularizace endospermu
tloušťka řezu 6 μm

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)

DAPI = 4',6-diamidino-2-fenyloindol



fluorescenční barvivo, které se silně váže na **DNA**
může procházet přes intaktní membrány (= je toxické a mutagenní) -
může být použito pro barvení živých i fixovaných buněk

často se používá pro **barvení jader**, **detekci mykoplazmat** a **virové DNA**
v buněčných kulturách

Montáž řezů

- nabarvené řezy je ještě potřeba zakonzervovat na podložním skle - říkáme „zamontovat“
- 1844 - **J.E. Purkyně** roku a jeho žák **Oschatz** popsali svoji metodu montování tak, že nabarvený řez prostě potřeli lakem. Užívali tzv. **kopálovou pryskyřici**, získanou z tropických stromů, ale znali již i **kanadský balzám**. Jejich preparáty z té doby jsou stále v dobrém stavu.
- kanadský balzám se užívá dodnes, ale používají se i **syntetické pryskyřice**

Odkazy na zajímavé stránky

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

[protokoly imunohistochemie](#)

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

[protokoly barvení pro pletiva zalitá v pryskyřici](#)

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

[encyklopedie](#)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Staining>