

Fixace

Uzavírací média

Co je to fixace...

- Tkáně a orgány po zástavě přísunu kyslíku rychle podléhají **autolýze**, která je způsobena degradací buněčného obsahu uvolněnými enzymy. K zamezení autolýzy se používá fixace, jejíž podstata tkví v koagulaci a **denaturaci bílkovin buněk a tkání**.
- Fixace je děj cílený, při kterém se objekty rychle usmrtí nebo se zastaví již započaté autolytické pochody.
- Fixace objektů (organizmů, vzorků z tkání a orgánů) se provádí pomocí fixačních prostředků, které se rozdělují na fyzikální a chemické.

Fixační prostředek musí...

- rychle pronikat do objektů
- co nejvíce zachovávat strukturu tkáně, orgánu nebo celého objektu
- zachovat barvitelnost tkáně

Jak správně fixovat...

- pokud možno živé objekty (organizmy, buňky, tkáně)
- menší živočichy fixujeme celé
- větší před fixací narkotizujeme
- dostatečné množství fixační tekutiny

Fixační prostředky

Fyzikální fixační prostředky

- fixace suchým teplem nebo varem
- lyofilizace (vyschnutí za nízké teploty; rychlé zmražení → sublimace zmrzlé vody při nízkém tlaku a teplotě v sušárně)
- mrazová substituce

Dvě poslední procedury nejsou fixací v pravém slova smyslu, protože proteiny jsou denaturovány pouze v omezené míře a zachovávají si antigenní vlastnosti.

Chemické fixační prostředky

Etanol, metanol, aceton

- extrahují lipidy a tkáň po nich značně ztvrdne a smrští se
- používají se většinou jen ve směsích

Organické kyseliny

- octová, trichlorooctová a kyselina pikrová, která se užívá v podobě nasyceného vodního roztoku v kombinaci s formolem a kyselinou octovou (Bouinova tekutina)

Sloučeniny těžkých kovů

- chlorid rtuťnatý (sublimát, HgCl_2), soli chromu ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) a oxid osmičelý (OsO_4), který kvalitně zachovává strukturu tkáně, strukturu membrán a jemně gelifikuje proteiny. Jeho nevýhodou je pomalý průnik do tkáně, inhibice enzymů a vysoká toxicita

Chemické fixační prostředky

Aldehydy: fixačním prostředkem číslo jedna je formaldehyd. Používá se zpravidla v 2-5 % koncentraci, doba fixace je 12-24 h. Formaldehyd uchovává zejména dobře proteiny a lipidy, nikoliv sacharidy. Při delším stání (hlavně na světle) částečně oxiduje v metanol a kyselinu mravenčí → znehodnocení a nekvalitní fixace. Nežádoucí příměs kyseliny mravenčí lze z formaldehydu odstranit práškovým uhličitánem vápenatým. Je třeba mít na zřeteli, že formaldehydové páry jsou agresivní a dráždivé! Glutaraldehyd ze skupiny dialdehydů kvalitně uchovává strukturu buněk a zčásti i aktivitu enzymatických bílkovin. Proto našel uplatnění zejména v elektronové mikroskopii, histochemii a ultrahistochemii. K dobré fixaci postačuje doba 2-4 h v pufrovaném roztoku.

Fixační směsi : Bouin, Suza, Zenker, Sublimát-alkohol, Davidson, AFA

Etanol – EtOH (alkohol, etylalkohol, líh,..)

- fixuje pouze ve vysoké koncentraci (70-100%)
- dodává se 96%-ní
- ředění destilovanou vodou
- denaturovaný 1% benzínu
- v nižší koncentraci: špatně proniká, smršťuje tkáň, rozpouští tuky
- při dlouhodobém uložení objektů v alkoholu → snižování barvitelnosti
- čistý etanol – analýza DNA

Metanol (absolutní)

- pro fixaci krevních nátěrů
- je jedovatý

Formaldehyd

- 35-40%-ní roztok = *100% formol*
- použití – 4%, ředí se obyčejnou vodou
- bezbarvý, dráždivý, na světle rozkládající → *kyselina mravenčí* (uchovávání v hnědých lahvích)
- výhody: dobře sráží bílkoviny, dobře proniká, nerozpouští tuky a lipidy, dobře konzervuje, levný, jednoduchá příprava,...

Kyselina octová (100%)

- krystalizuje při 17° C → ledová kyselina octová
- používá se ve fixačních směsích (se sublimátem, k. chromovou a k. osmičelou)
- kyselou reakcí usnadňuje a urychluje fixační účinek vlastních fixačních složek a zlepšuje barvitelnost

Sublimát (chlorid rtuťnatý)

- nejpoužívanější ze solí těžkých kovů
- tvoří bílé krystalky dobře rozpustné ve vodě a alkoholu
- jedovatý!
- používá se ve směsích (např. sublimát-k. octová, sublimát-alkohol)
- zachovává barvitelnost tkání, dobrá fixace jádra
- po fixaci zbývá ve tkáni sraženiny rtuti → artefakty (odstranění jodovou tinkturou nebo alkoholovým roztokem jodjodkalia po přidání do 70%-ního alkoholu-barva koňaku)
- výborný pro fixaci vlhkých roztěrů

Bouinova fixáž

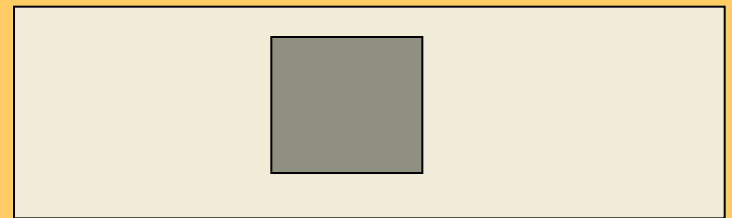
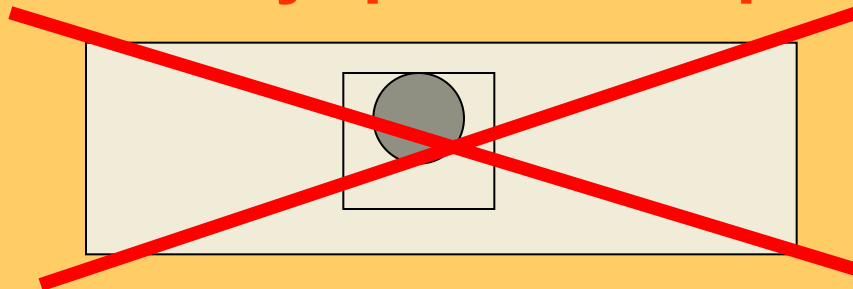
- nejpoužívanější fixační směs
- směs nasyceného vodného roztoku kyseliny pikrové, 30% formaldehydu a kyseliny octové → žlutá barva (kyselina pikrová)
- výhody: dobře proniká a fixuje, snadná příprava, objekty se po ní dobře barví, nemusí se z tkáně dlouho vypírat,..
- průměrná doba fixace: 24h→vypírání v 70%-ním alkoholu
- použití: řezové preparáty, skanovací elektronová mikroskopie

Uzavírací média

Funkce:

- pozorovací prostředí (průhledné, bezbarvé, optimální index lomu)
- konzervace (x rozklad tkáně)
- zachování zbarvení (nesmí odbarvovat nabarvené preparáty)

musí být pod celou plochou krycího sklíčka !!!



Rozdělení

1) *s vodou mísitelná*

- glycerol
- glycerin-želatina
- Liquido-Faure

2) *s vodou nemísitelná*

- Kanadský balzám
- Dammara
- syntetické pryskyřice (Eukitt)

Uzavírací média s vodou mísitelná

- montování neobarvených objektů (projasnění)



Glycerol (glycerín)

- mísí se s alkoholem i vodou
- vysoký index lomu (1,45)
- objekty do něho nemůžeme uzavřít přímo → smrštění, potrhání
- objekty fixované vodními fixážemi převádíme nejdříve do glycerinu s vodou (1:10 x 1:5)
- objekty fixované alkoholem převádíme do glycerinu s alkoholem (1:10 x 1:5) → vodu nebo alkohol necháme odpařit → **rámeček**

Glycerol-želatina

- = směs želatiny (tuhne), glycerol (projasňuje), destilovaná voda, krystalický fenol (proti plísni)
- rozehrátí ve zkumavce na vodní lázni
 - přenos na objekt na podložním sklíčku
 - překrytí krycím sklíčkem (bez bublin!)
 - očištění od přebytečného média
 - omytí formaldehydem, rámování
- použití: drobní korýši, hmyz,..
- nevhodné pro uzavírání barvených objektů → odbarvení

Liquido-Faure

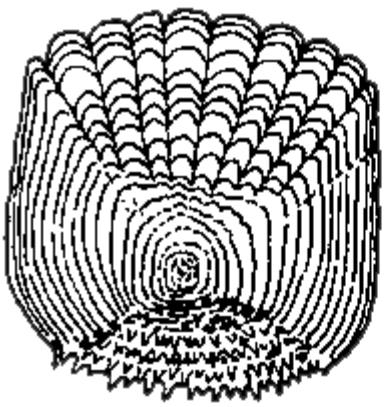
Swanovo médium, Berlesovo médium, Hoyerova směs atd.

- složení: destilovaná voda, arabská klovatina
glycerol, chloralhydrát
- výhody: může se současně používat jako fixační prostředek, dobře tuhne, nevyžaduje rámování
- vhodný pro uzavírání málo průhledných objektů → projasnění
- nevhodný pro: barvené objekty → odbarvení
- sušení preparátů v termostatu (40°C)

Polyvinylalkohol + kyselina mléčná

- bílý prášek (PVA)
- použití: textilní a farmaceutický průmysl
- pro přípravu uzavíracího média: 15% roztok PVA v destilované vodě
- projasňovací schopnost (k. mléčná)
- sušení v teple, nerámuje se
- použití: roztoči, vajíčka hlístic, korýši

Glycerol - šupiny ryb rámovat

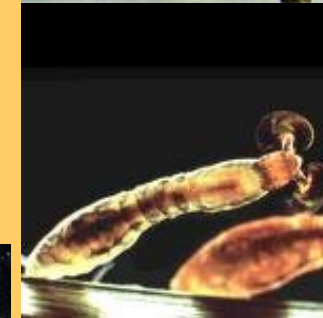


ktenoidní



cykloidní

Glycerol-želatina: larva muchničky rámovat komára, pakomára



© JER, WLU Dept. of Biology

chvostoskok *Podura aquatica*

Liquido-Faure:

Varroa destructor

nejdříve kapka média, rychle přenést objekt, ponořit do média a orientovat ho, přikrýt krycím sklem - nerámuje se

sušit v termostatu při 40;C

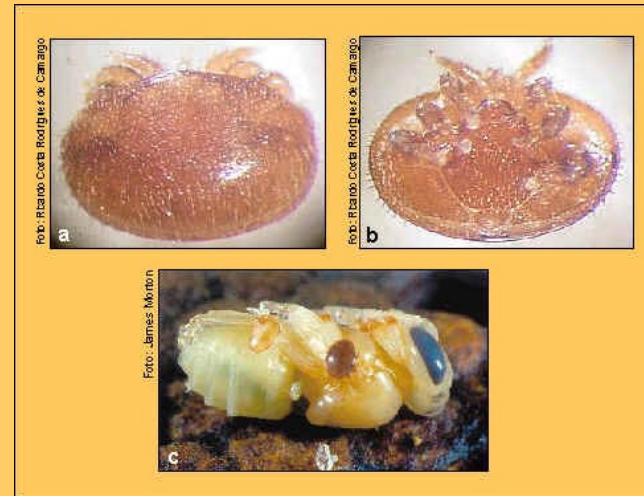


Foto: Ricardo Ceber Rodrigues & Camargo

Foto: Ricardo Ceber Rodrigues & Camargo

Foto: James Morton