

Tkáně/organismus

Metody studia tkání a orgánů

Klára Hilscherová
RECETOX

Obsah přednášky

Tři tematické bloky

1. Dráhy škodlivých účinků

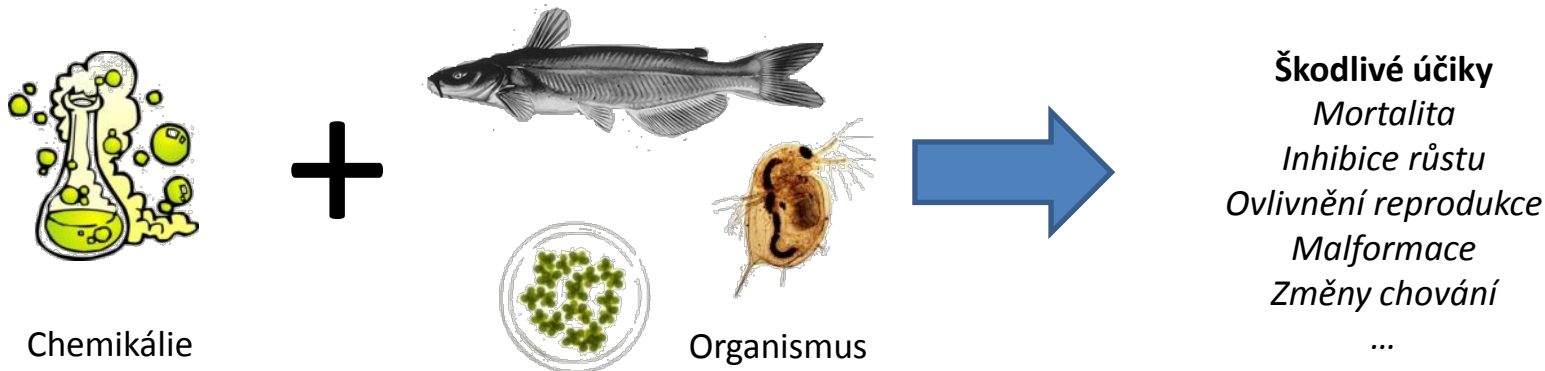
(Adverse outcome pathways)

2. Metody analýzy tkání

3. Transgenní organismy

Hodnocení toxicity chemických látek

Tradiční přístupy – Hodnocení škodlivého účinku na úrovni organismu

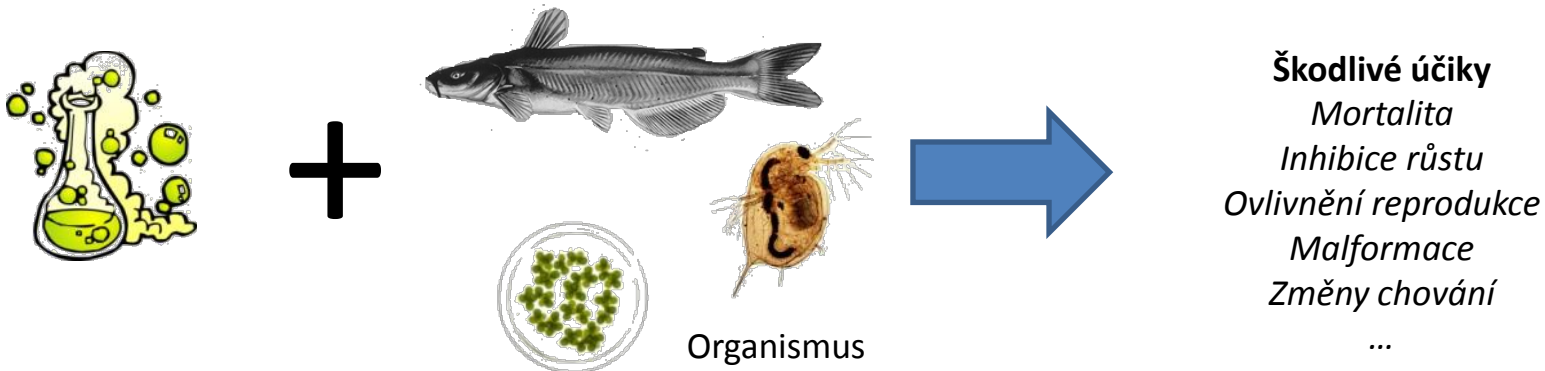


- Údaje o toxicitě existují pouze pro několik set z desítek tisíc látek, které jsou vyráběny/prodávány
 - Zásadní nedostatek informací ohledně potenciálních rizik řady látek
 - Rostoucí požadavky regulačních orgánů na toxikologická data pro velký počet látek – nemožné získat tradičními postupy
- ➔ Snaha o efektivnější, rychlejší a levnější přístupy k hodnocení bezpečnosti/rizika látek

Současné hodnocení nebezpečnosti – často k dispozici především krátkodobé, akutní testy, nebo jen základní dlouhodobější (mortalita, růst, reprodukce)
využívány extrapolace – z akutních na chronické účinky, mezi druhy
- používány faktory nejistoty – problematické – nemožno predikovat dlouhodobější subletální účinky z akutních testů, neznáme mechanismy

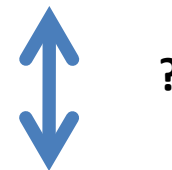
Hodnocení toxicity chemických látek

Tradiční přístupy – Hodnocení škodlivého účinku na úrovni organismu

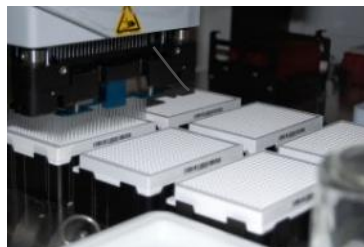
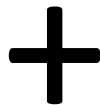


Nové přístupy

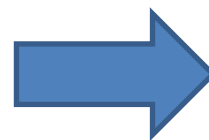
- Hodnocení účinků na nižších úrovních biologické organizace
- Ex vivo / in vitro / In chemico / In silico metody
- **ovlivnění genů, proteinů, buněčných funkcí, biomarkerů**
- Testování s vysokou propustností (HTS – high throughput screening)



10^4 Látek

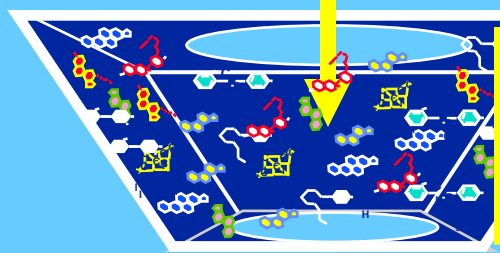


HTS



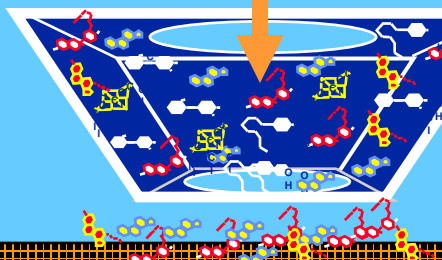
Chemicko-biologické interakce
Informace o mechanismech
Interakce s receptory
Ovlivnění signálních drah
Aktivity enzymů
Ovlivnění buněčných procesů
...

Inventarizace chemických látek

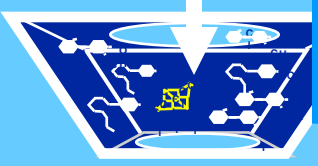


Existující znalosti
data ohledně expozice,
toxicity, SAR, QSAR

Proces
Prioritizace



In Vitro
charakterizace:
Molekulární interakce,
Buněčné odpovědi



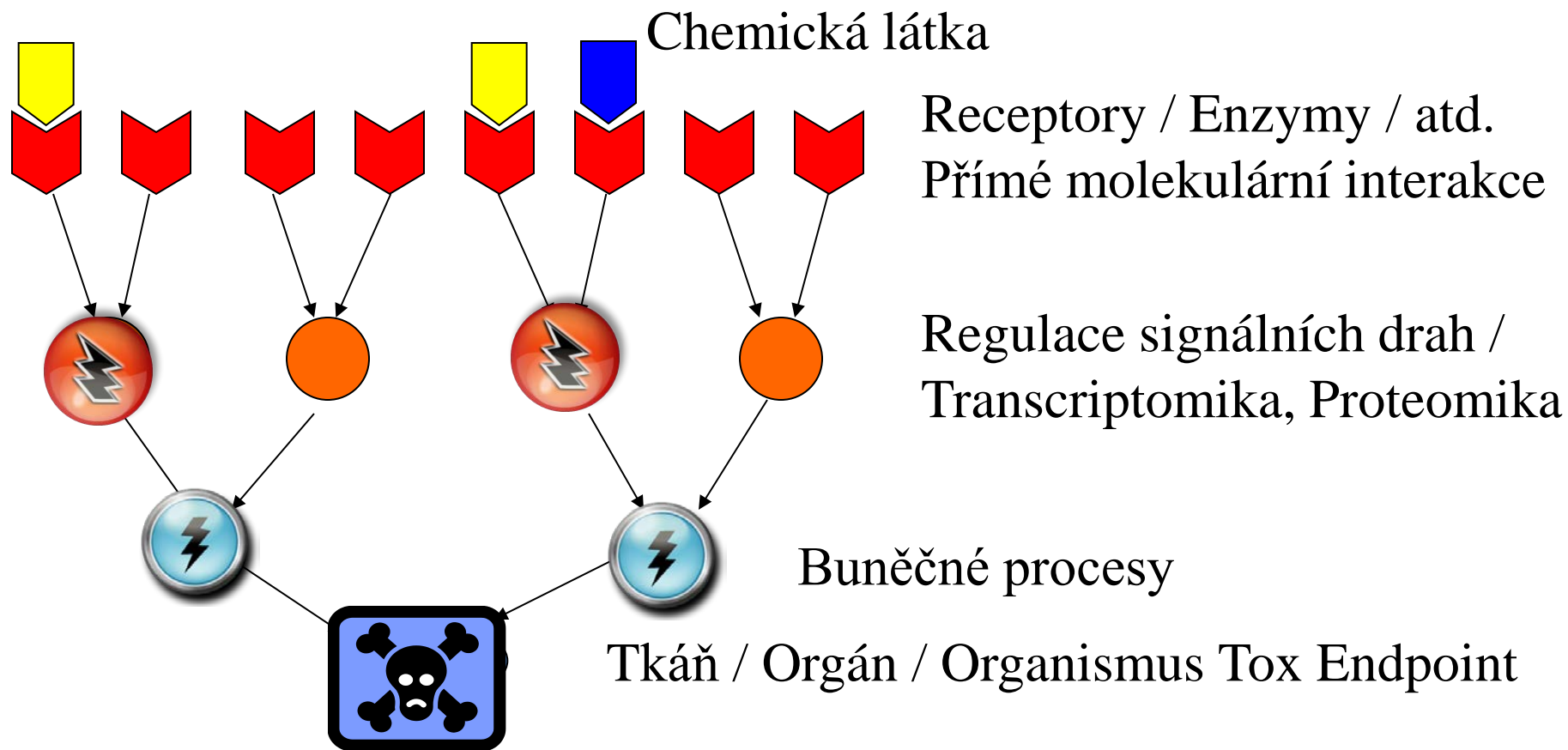
Efektivně cílené
In Vivo Testy

Výzkum:
Doplnění
informací

Hodnocení relevantních účinků

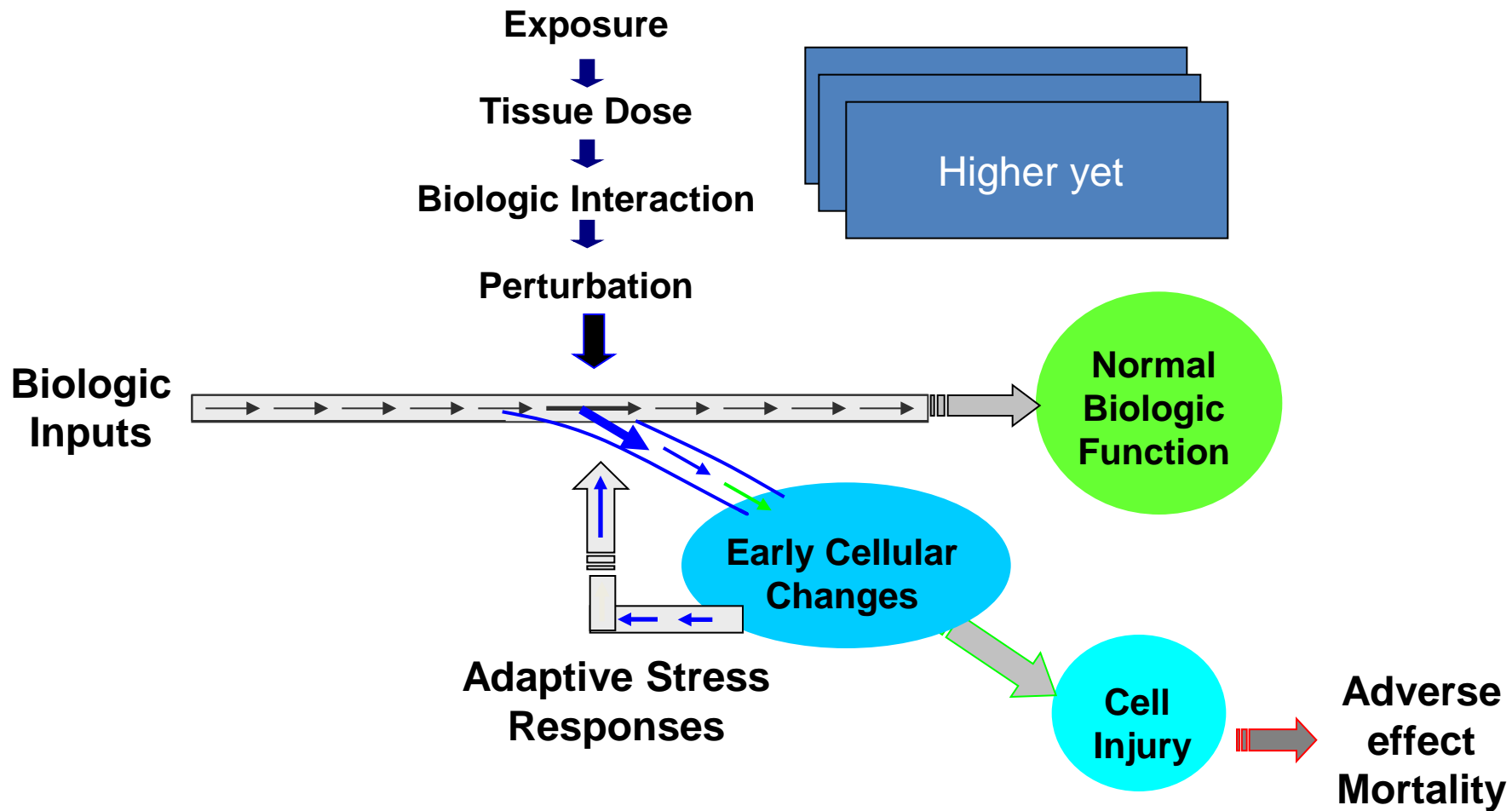
Hodnocení rizik

Dráhy toxicity

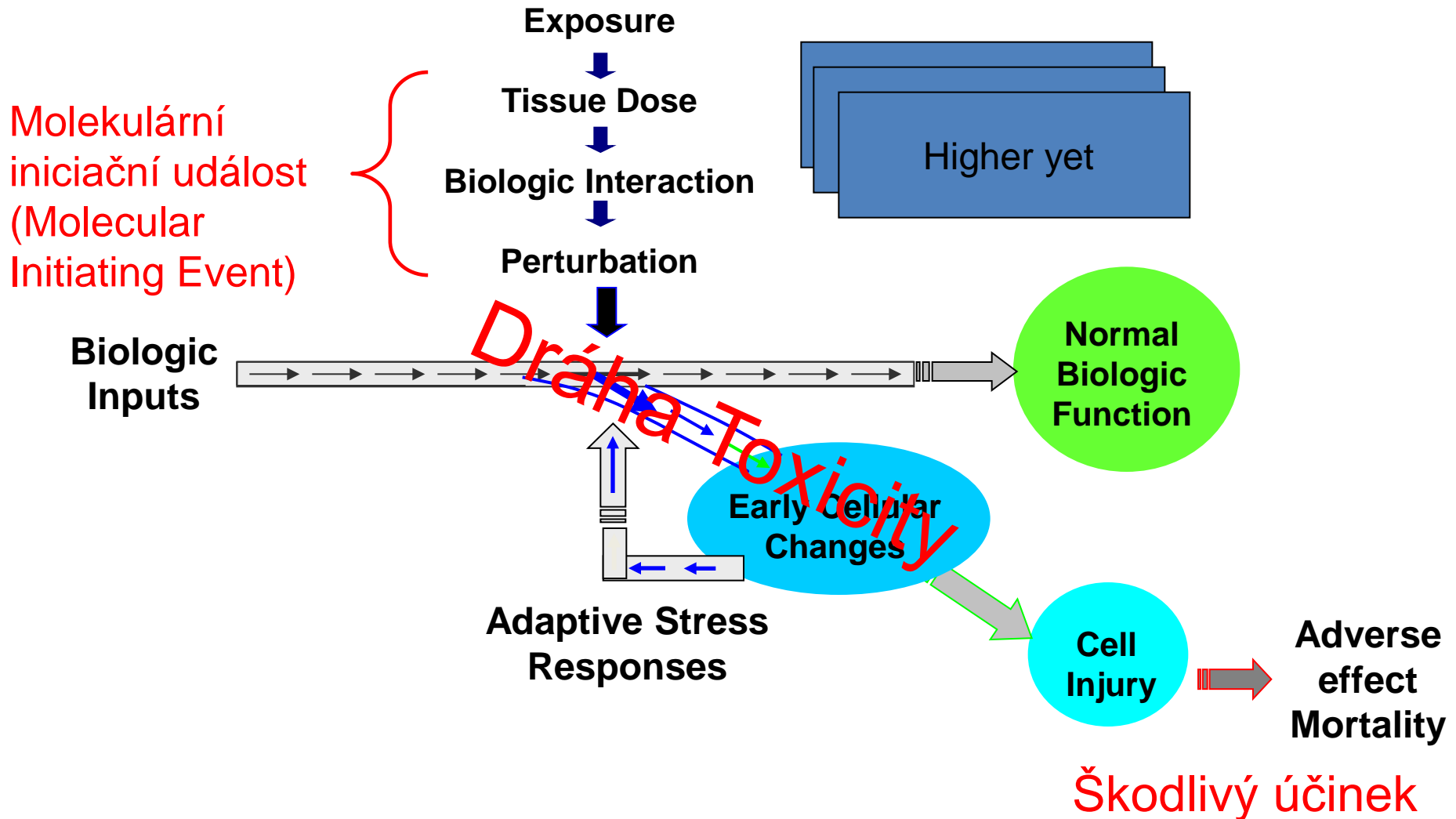


Biologické dráhy, jejichž narušení vede ke škodlivým účinkům látek

Nový přístup: Aktivace drah toxicity



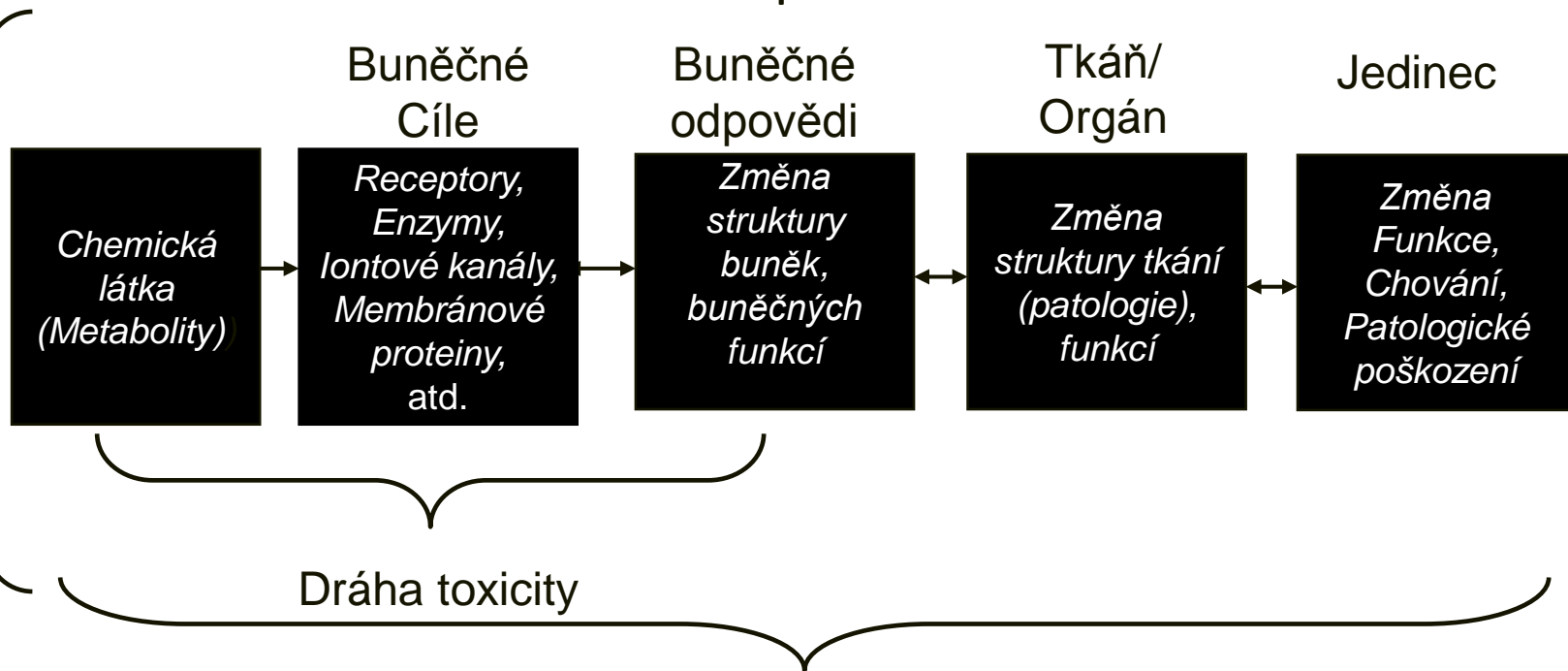
Nový přístup: Aktivace drah toxicity



Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway)

a Chemické Extrapolace

Testovány sady látek pro extrapolace v rámci databází (QSAR; Kategorizace; Analogie) – identifikace vlastností látek, které jim umožňují narušovat buněčné cíle



Dráha škodlivého účinku

Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway) = sled událostí od počátečního (iniciačního) bodu přes dráhu toxicity (Toxicity Pathway) ke škodlivému účinku

Toxická dráha/dráha toxicity (Toxicity Pathway) = dráha buněčné odpovědi, která pokud je dostatečně silně narušena, povede k negativním zdravotním účinkům

Vývoj a Rámec AOP / MOA

Mezinárodní spolupráce – vývoj rámců a modelů

OECD – Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway, AOP)

WHO – Mechanismy účinku (Mode of action, MOA)

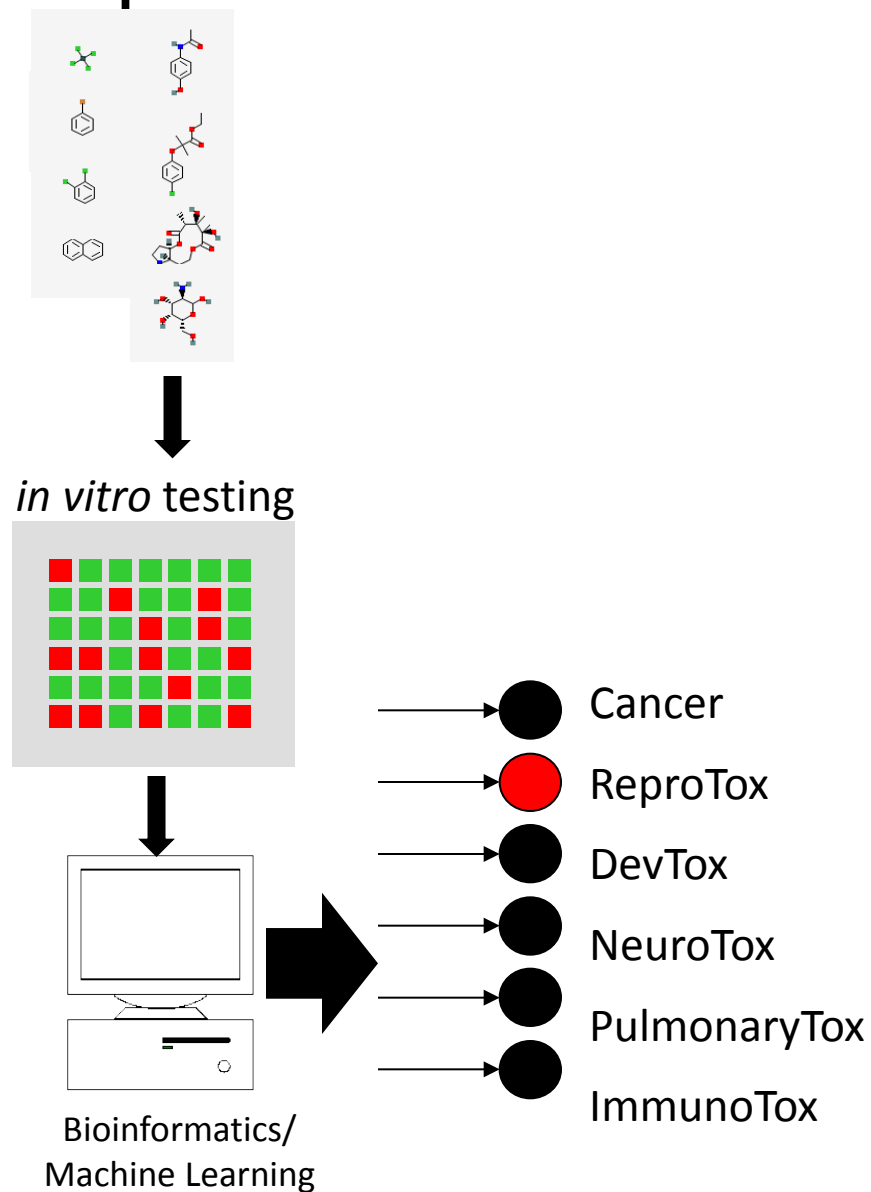
- Koncept rozvíjen/podporován v rámci **OECD, USEPA, EC-JRC, USFDA, WHO, US Army**
- **OECD Guidance document & a template for developing and assessing adverse outcome pathways (No. 184)**
 - Pravidla pro vývoj, hodnocení a schvalování AOP
 - Formální proces
- Vývoj & podpora informačních nástrojů pro **rychlé, široce dostupné sdílení již vytvořených AOP a pro budování nových AOP**
- => Inspirace sociálními médii, crowd-sourcing

Gerald T. Ankley et al. (2010) **Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment**. *Environmental Toxicology and Chemistry* [Volume 29, Issue 3](#), pages 730–741, March 2010

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.34/pdf>

Cíle a využití AOP konceptu

- porozumět toxicitě látek na molekulární úrovni
- Používat co nejméně pokusných zvířat (principy 3R)
- Postavit prediktivní modely
- Skrínig a prioritizace
- Studovat a hodnotit mnoho látek – zaměřit se na chybějící informace
- kombinovat High-throughput screening s počítačovými modely
- Zlepšit možnosti využití informací a dat o mechanismech účinku pro **hodnocení rizik a regulační účely**



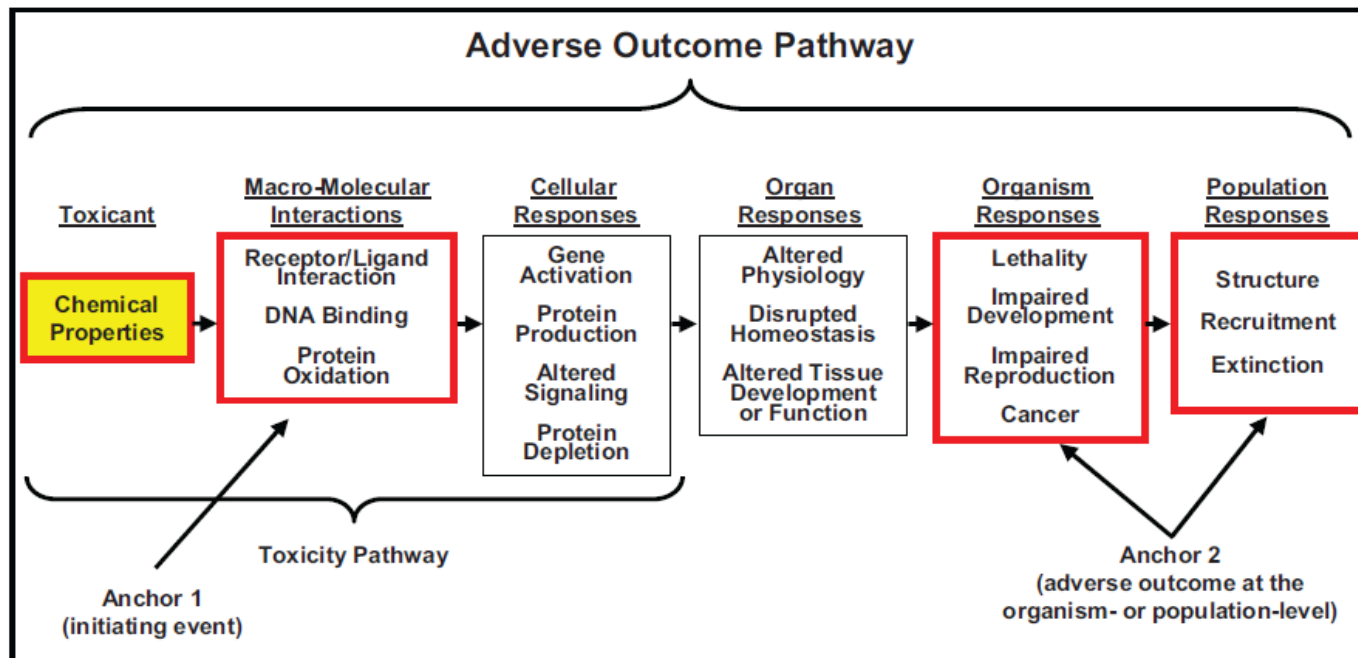
Hlavní principy AOP

Molekulární iniciační událost (Molecular Initiating Event)

interakce látky s biologickým systémem na makromolekulární úrovni

Klíčové události (key events)

- mezikroky, které jsou toxikologicky relevantní a vedou k škodlivému účinku
 - jsou základem pro formulování hypotéz a testování => musí být **experimentálně kvantifikovatelné**
- Molekulární iniciační událost nebo klíčové události (Key Events) – měřitelné *in vitro* - lze je zpravidla hodnotit pomocí **rychlých skriningových metod**
- Kauzální důkazy pro *in vivo* účinky
- AOP zahrnuje účinky na populační úrovni



Dráha škodlivého účinku Adverse Outcome Pathway



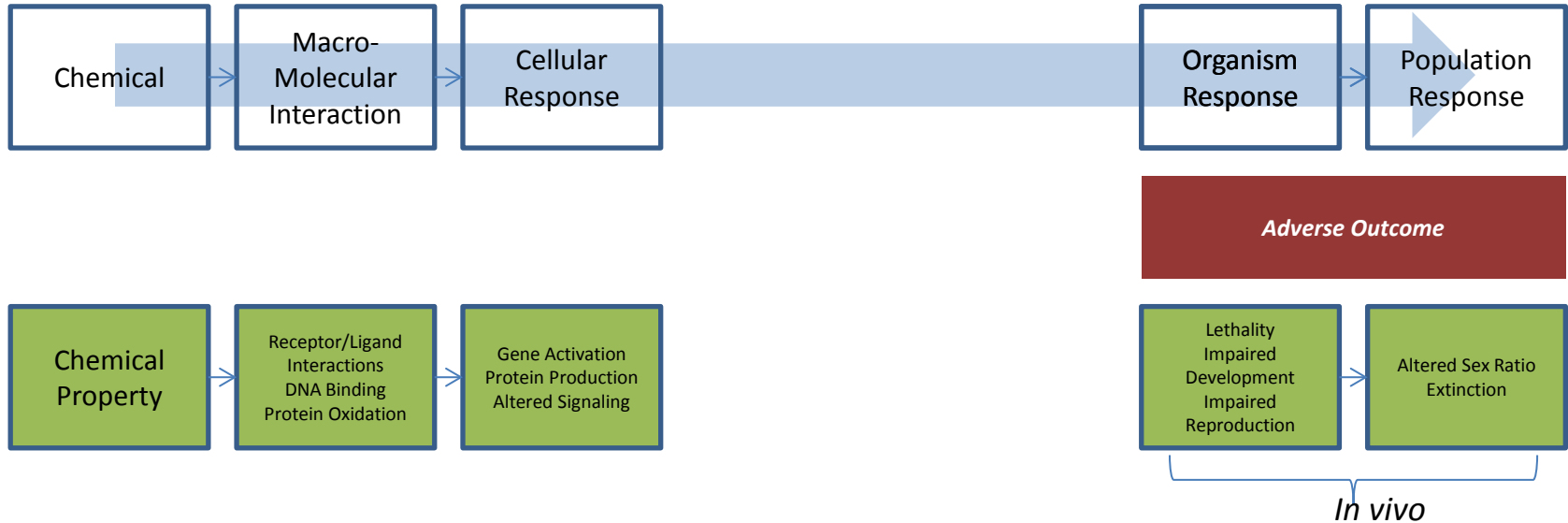
Dráha škodlivého účinku

Adverse Outcome Pathway



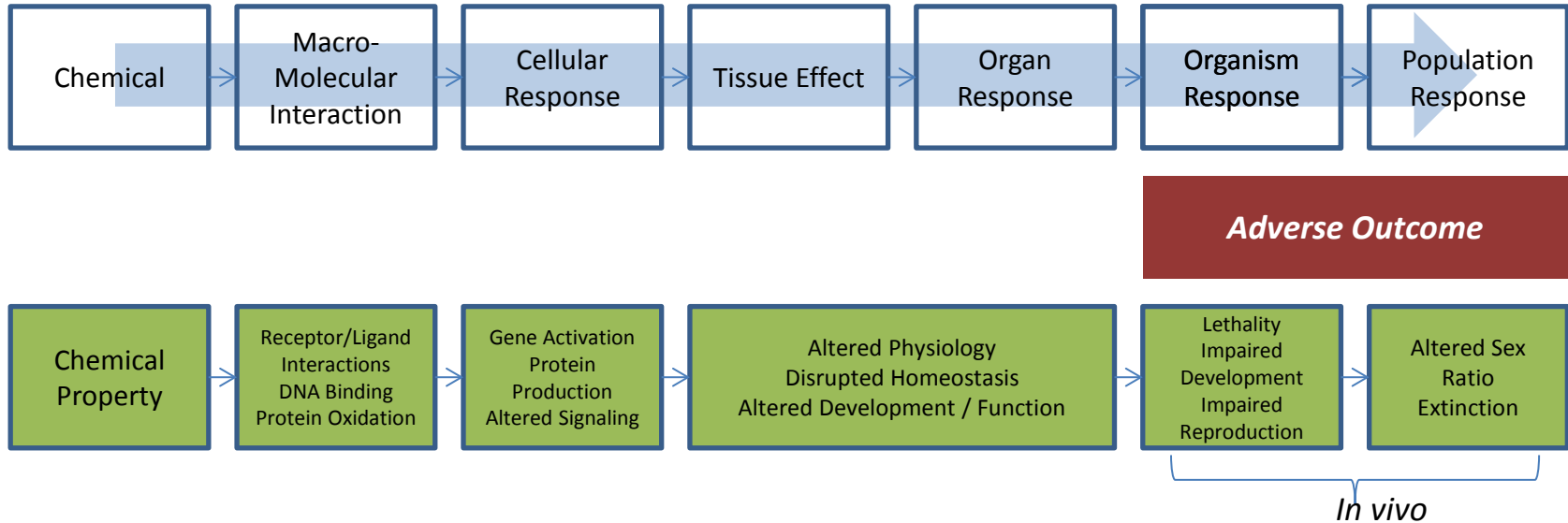
Dráha škodlivého účinku

Adverse Outcome Pathway



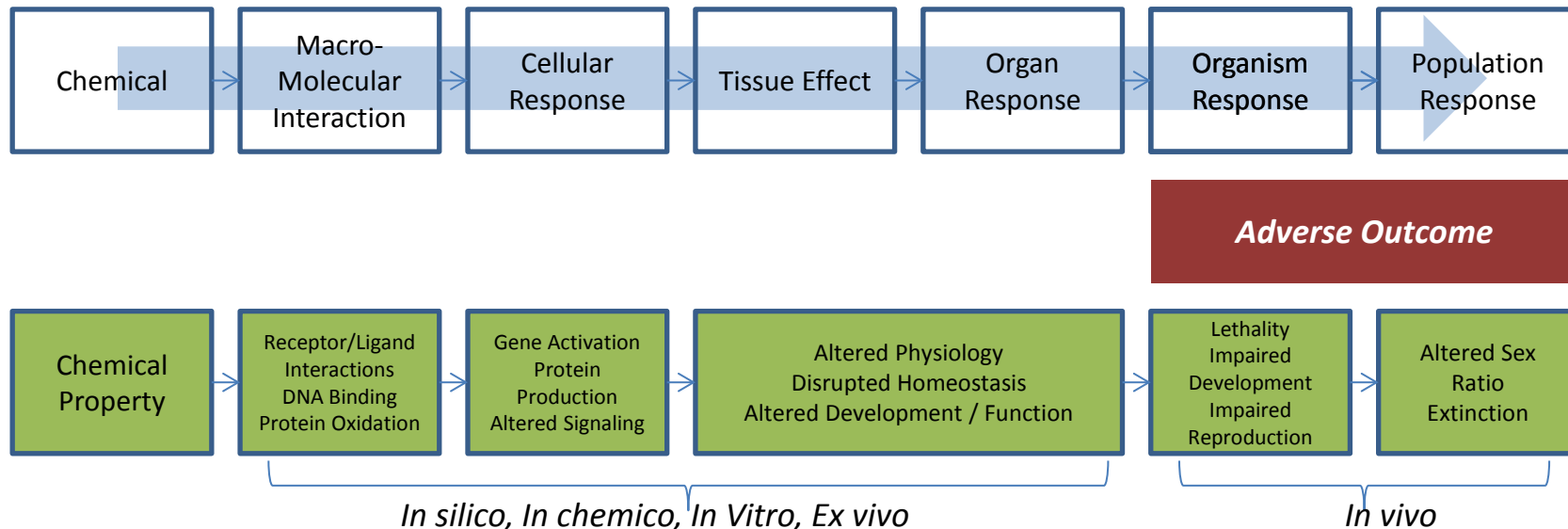
Dráha škodlivého účinku

Adverse Outcome Pathway



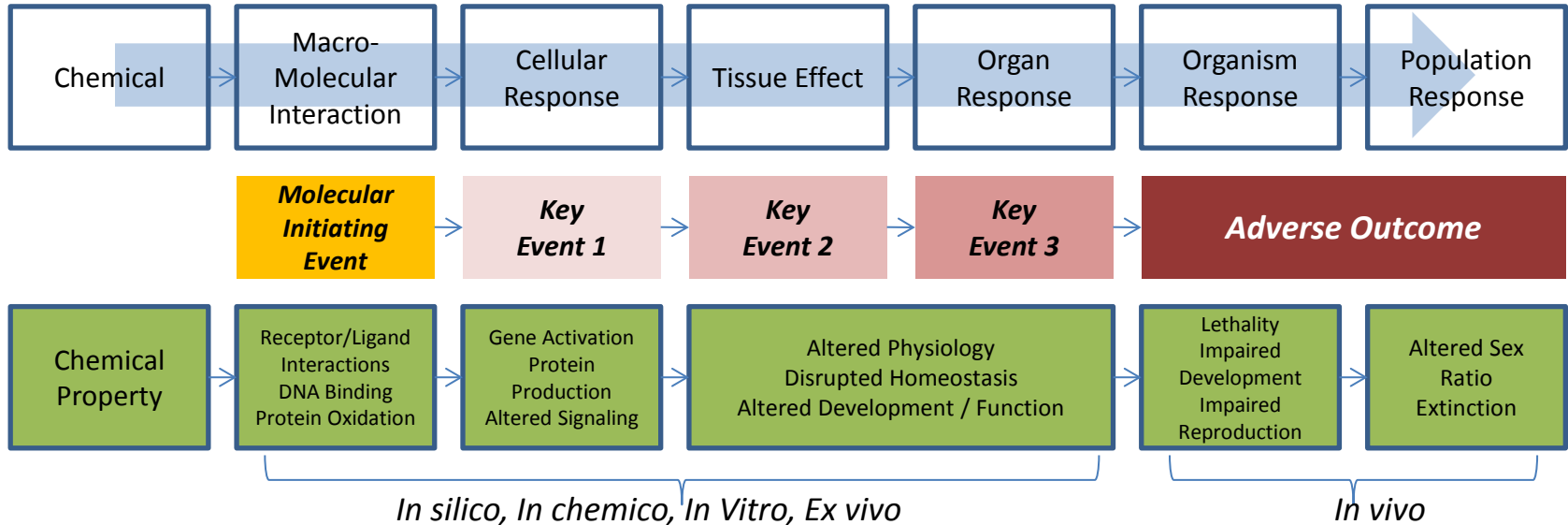
Dráha škodlivého účinku

Adverse Outcome Pathway

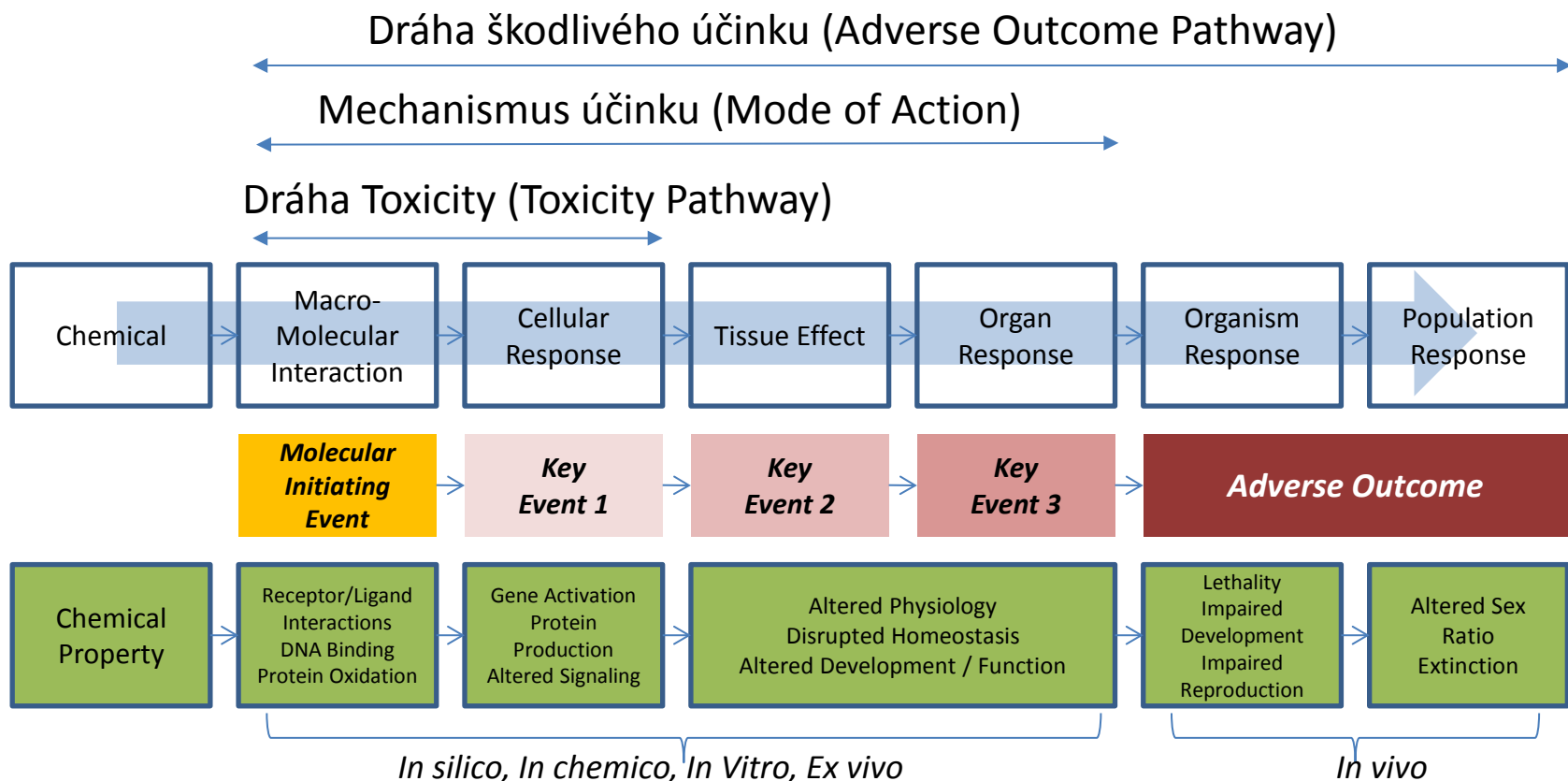


propojení informací o interakcích chemikálií s biologickými systémy (makromolekulami, buňkami, tkáňemi...) s informacemi o relevantních biologických odpovědích, které vedou **ke škodlivému účinku** (in vivo)

Dráha škodlivého účinku (Adverse Outcome Pathway)



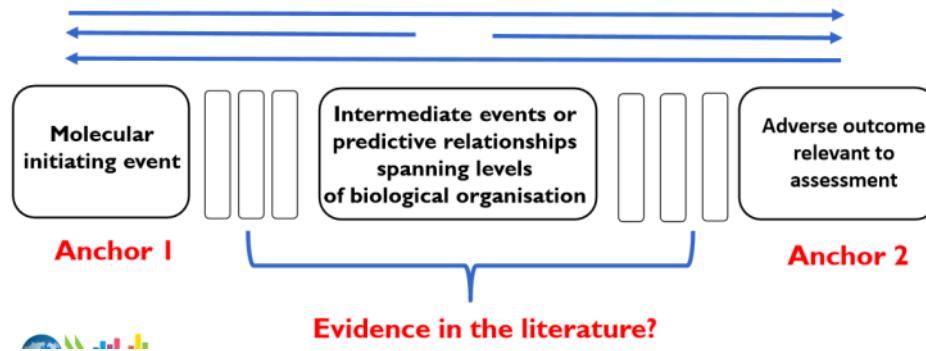
- série definovaných a kauzálně spojených událostí napříč různými úrovněmi biologické organizace, které vedou k poškození zdraví nebo (eko)toxicitě
- Využití existujících znalostí a informací k propojení dvou ukotvujících bodů: **Molekulární iniciační událost** (Molecular Initiating Event, MIE) a **Škodlivý účinek** (Adverse Outcome, AO) přes sérií mezikroků, tzv. **Klíčové události** (Key Events)
- AOPs umožňuje propojit výsledky z *in vitro* studií a *in vitro* screeningu se škodlivými účinky na úrovni organismu nebo populací



- série definovaných a kauzálně spojených událostí napříč různými úrovněmi biologické organizace, které vedou k poškození zdraví nebo ekotoxicitě
- Využití existujících znalostí a informací k propojení dvou ukotvujících bodů: **Molekulární iniciační událost** (Molecular Initiating Event, MIE) a **Škodlivý účinek** (Adverse Outcome, AO) přes sérií mezikroů, tzv. **Klíčové události** (Key Events)
- AOPs umožňuje propojit výsledky z *in vitro* studií a *in vitro* screeningu se škodlivými účinky na úrovni organismu nebo populací

Vývoj AOP

- Identifikace interakce látky s biologickým systémem na makromolekulární úrovni – **Kotva 1 = MIE**
- Identifikace konečného důsledku vyvolaného MIE – **Kotva 2 = AO**
- Identifikace jednotlivých mezikroků na základě známých / dostupných informací o AO



Konkrétní AOP: vždy 1 molekulární iniciační událost (MIE) => 1 dráha škodlivého účinku (AOP)

- stejná MIE může vést k jinému AO => vždy nutno definovat jako zvláštní AOP
- dvě různé MIE mohou vést ke stejnému AO => vždy nutno definovat jako zvláštní AOP
- počet definovaných klíčových událostí (KE) není omezen

MIE, KE, AO – mohou být sdíleny mezi různými AOPs => syntéza, propojení informací do jednoho celku

AOP Hodnocení

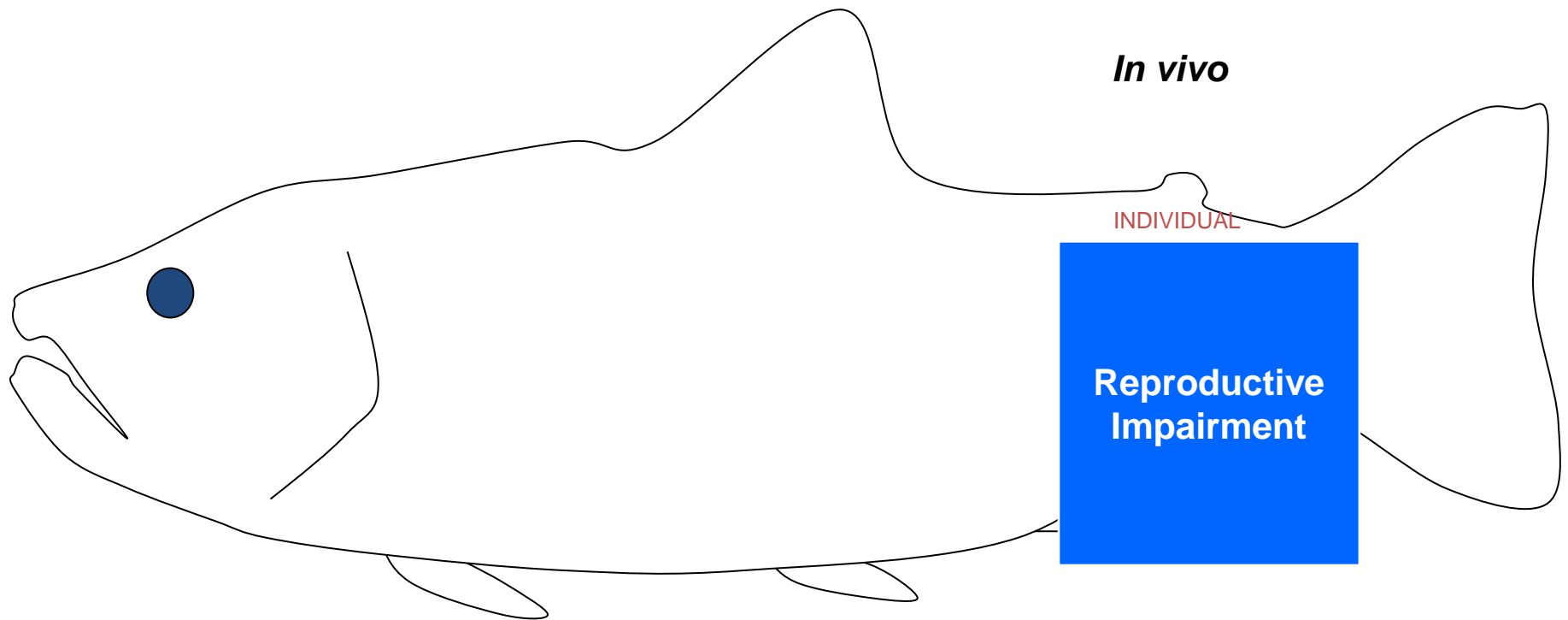
- Completeness (reliability & robustness)
- Qualitative Understanding
- Weight-of-Evidence supporting AOP (Bradford-Hill criteria)
- Quantitative Understanding

Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce

Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace

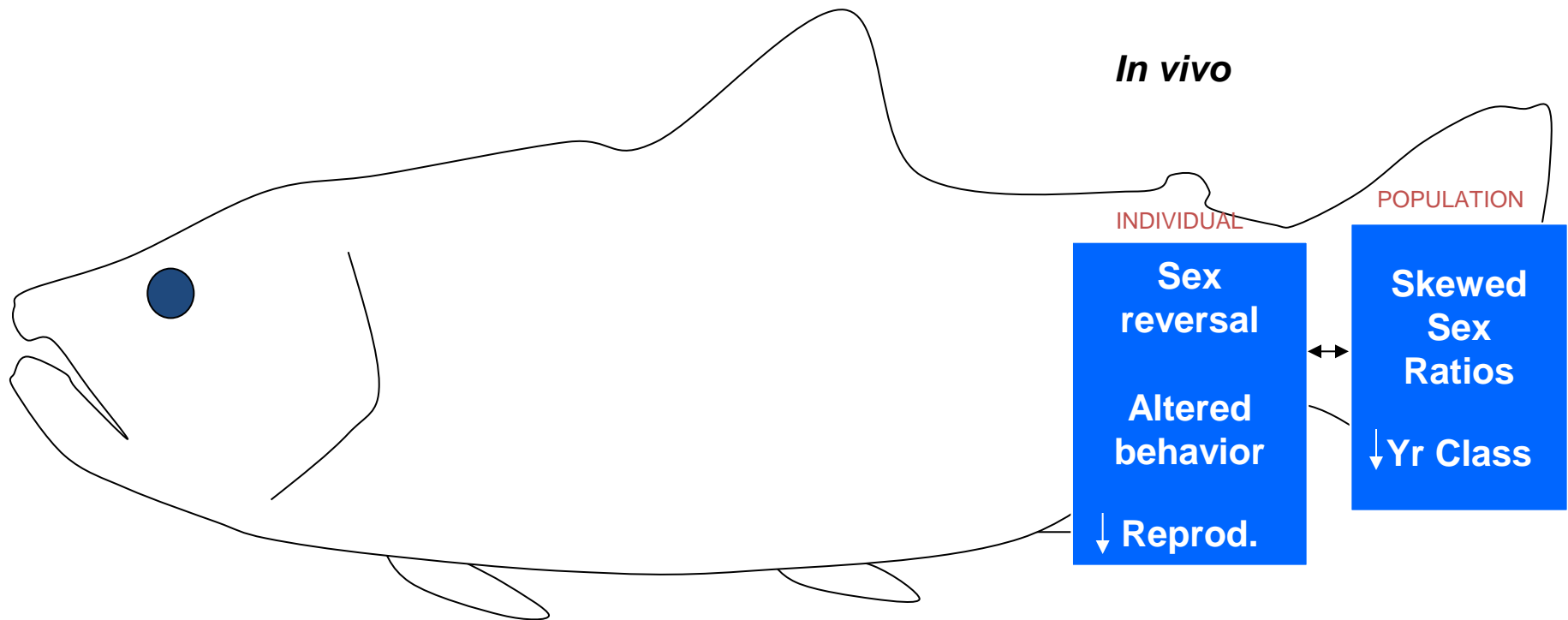


Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce

Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace

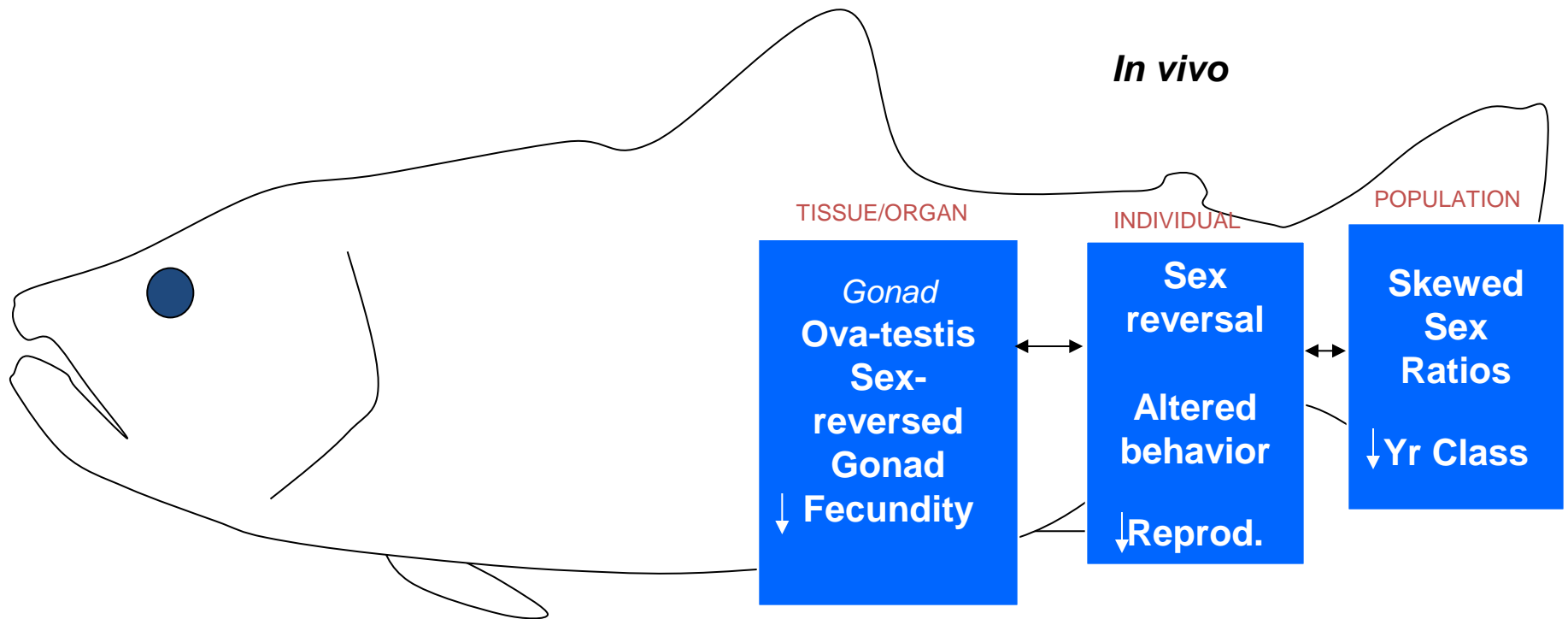


Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce

Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace

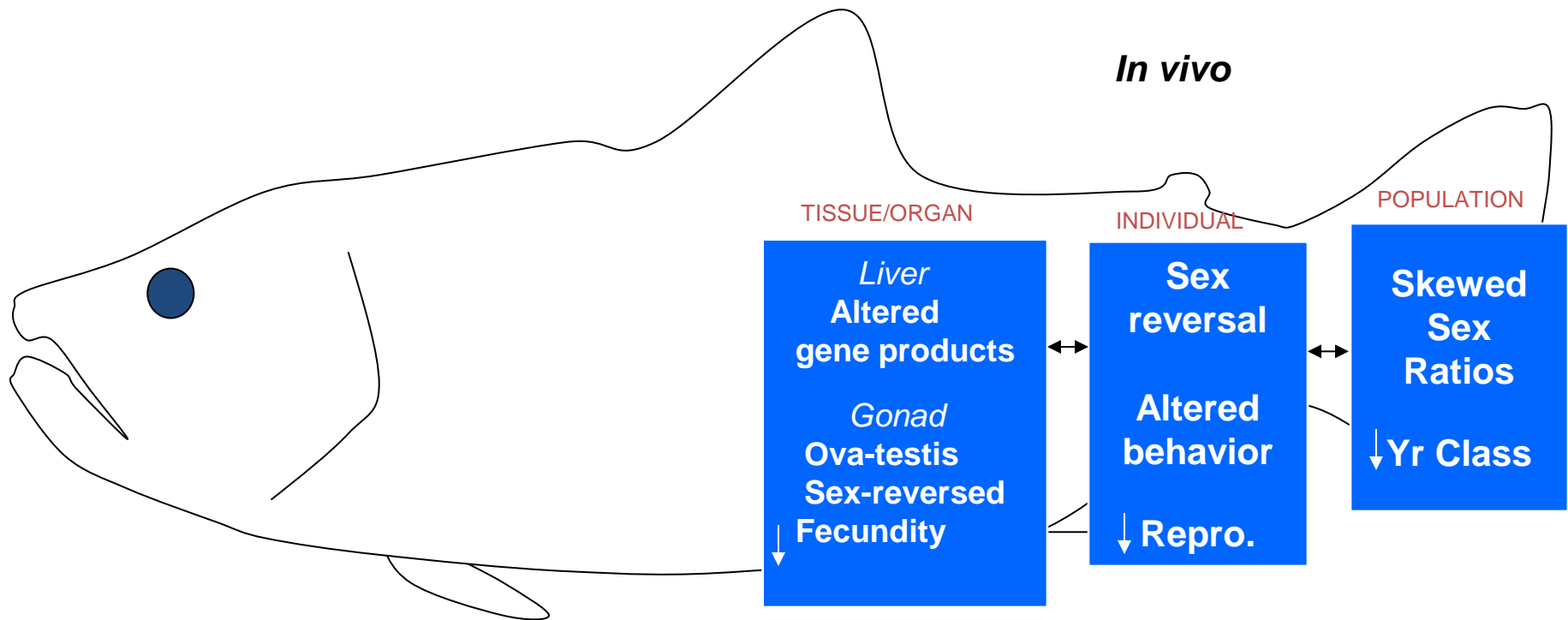


Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce

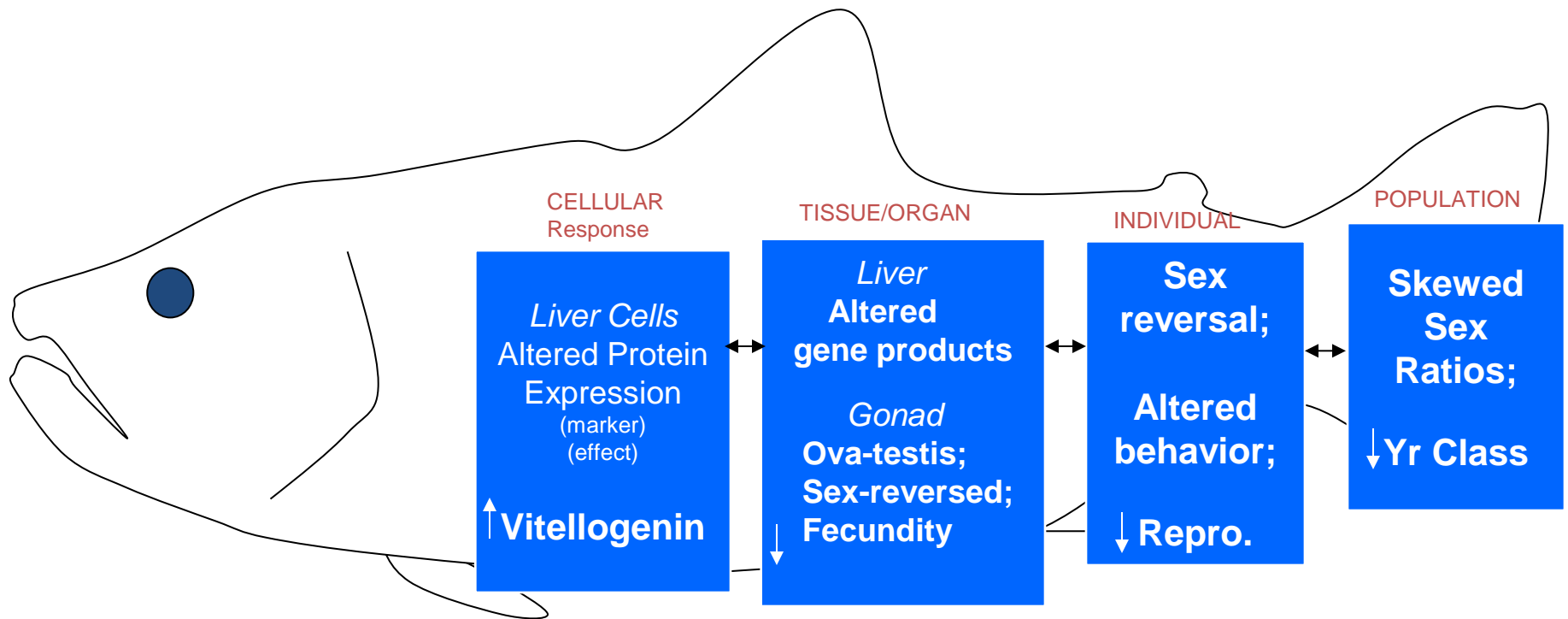
Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace



Adverse Outcome Pathway

ER-mediated Reproductive Impairment

Measurements across levels of biological organization

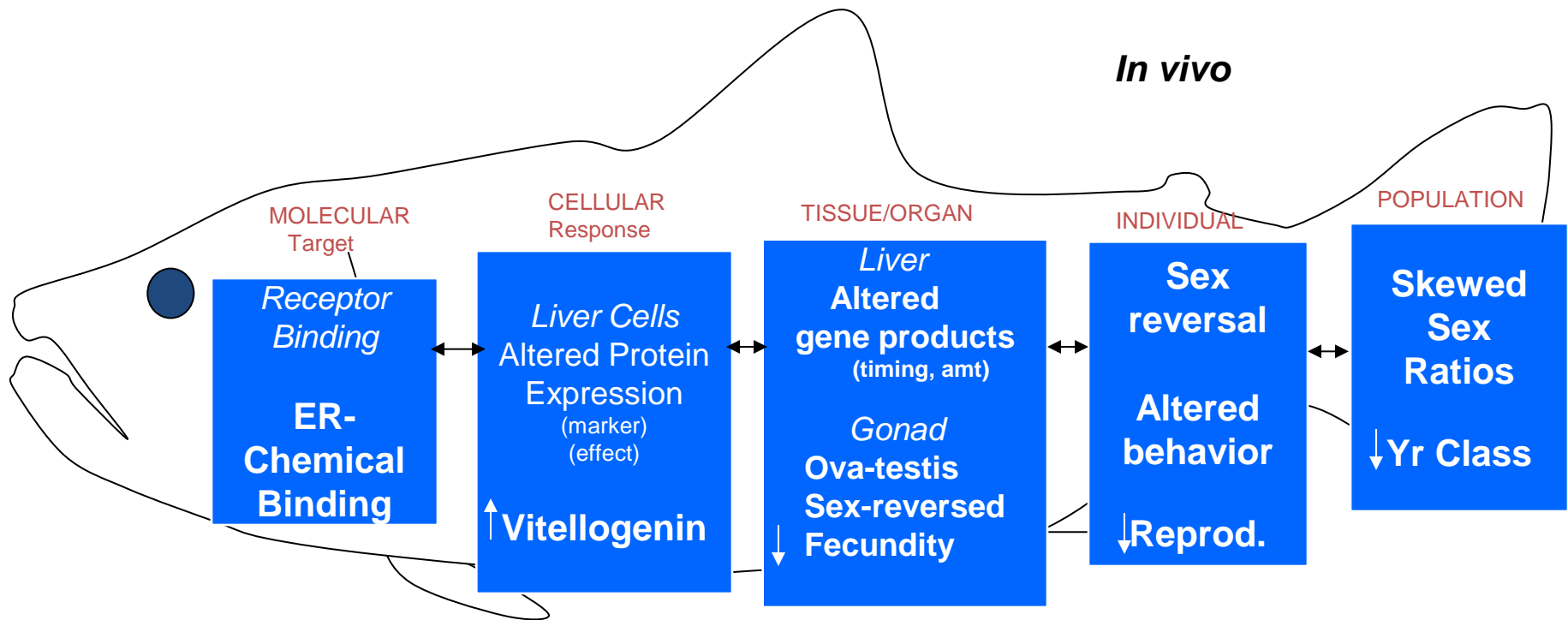


Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce

Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace

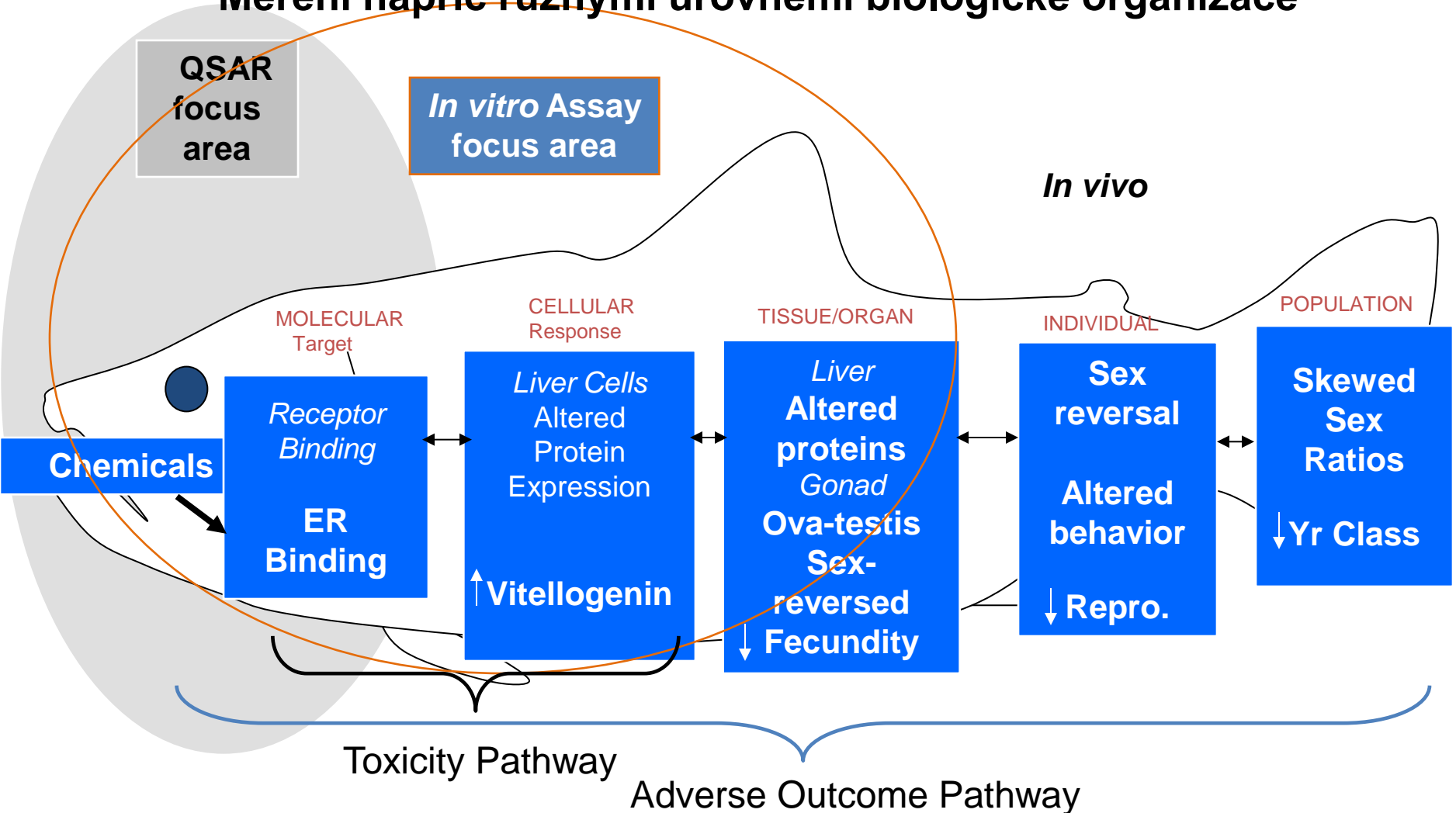


Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce

Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace

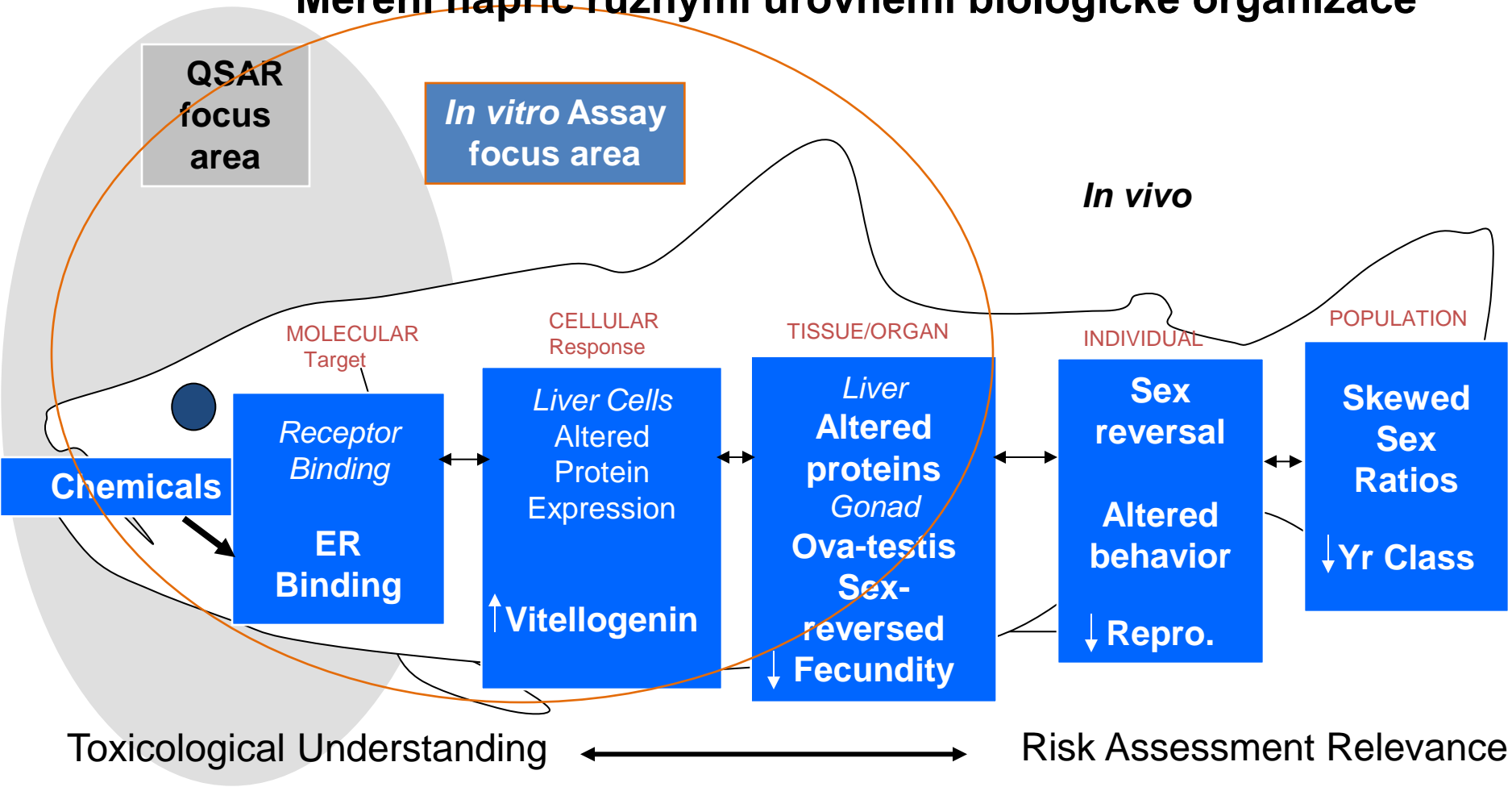


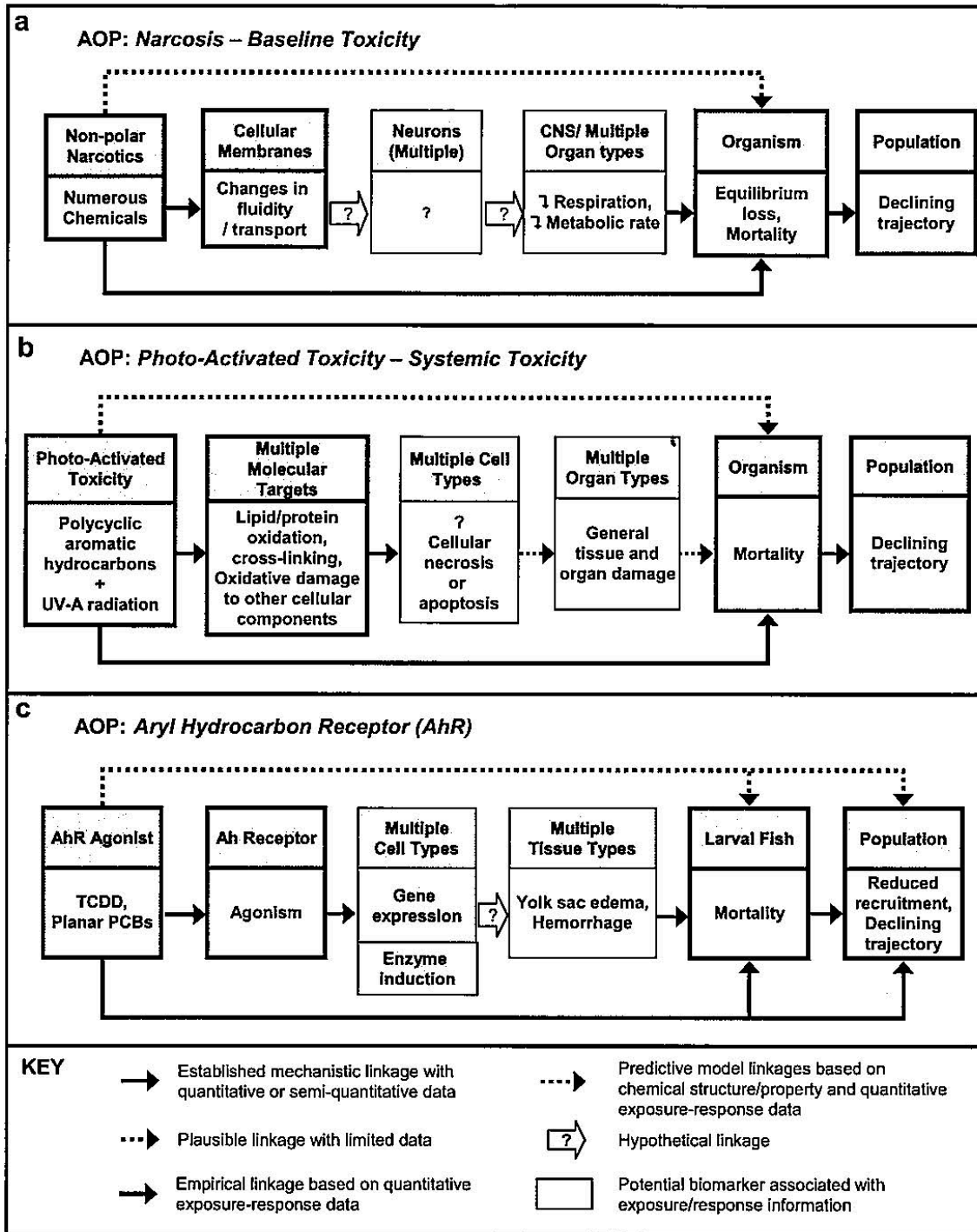
Dráha škodlivého účinku

(Adverse Outcome Pathway)

ER-zprostředkované narušení reprodukce

Měření napříč různými úrovněmi biologické organizace





Využití dráhy škodlivého účinku

Základ pro:

Extrapolace mezi chemickými látkami

Extrapolace mezi druhy

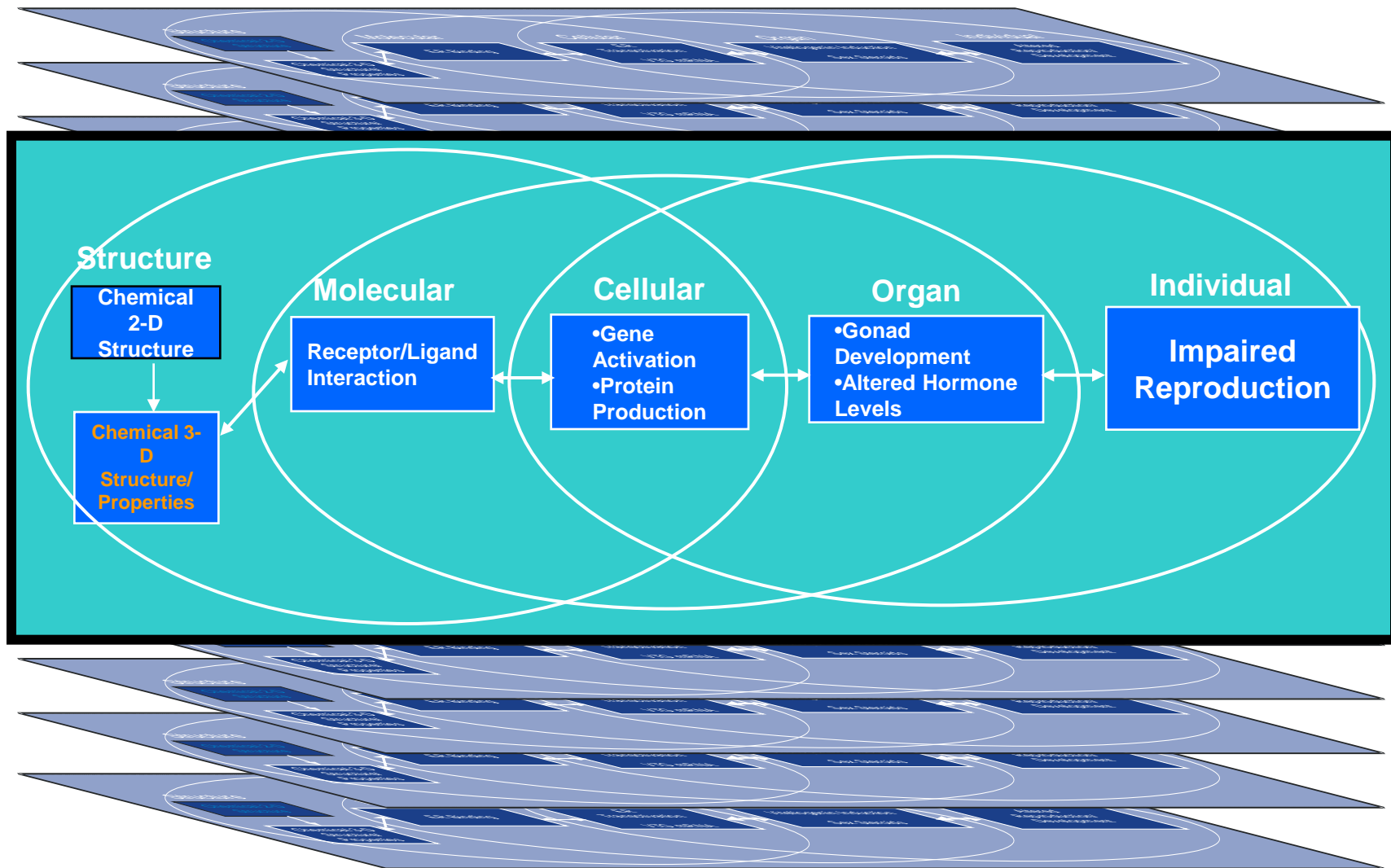
Extrapolace mezi úrovněmi biologické organizace

Definování parametrů charakterizace rizika, které potřebujeme zjistit:

- Prioritizace chemických látek pro další testování (využití QSAR modelování)
- Detailnější hodnocení rizika (např. stanovení referenční dávky, koncentračních limitů)

Typ potřebné informace se liší i dle akceptovatelné míry nejistoty

Mapování toxických drah, které vedou ke škodlivému účinku



Knihovny drah toxicity (Toxicological Pathways)

OECD-sponsorovaná AOP znalostní databáze (AOP Knowledgebase)

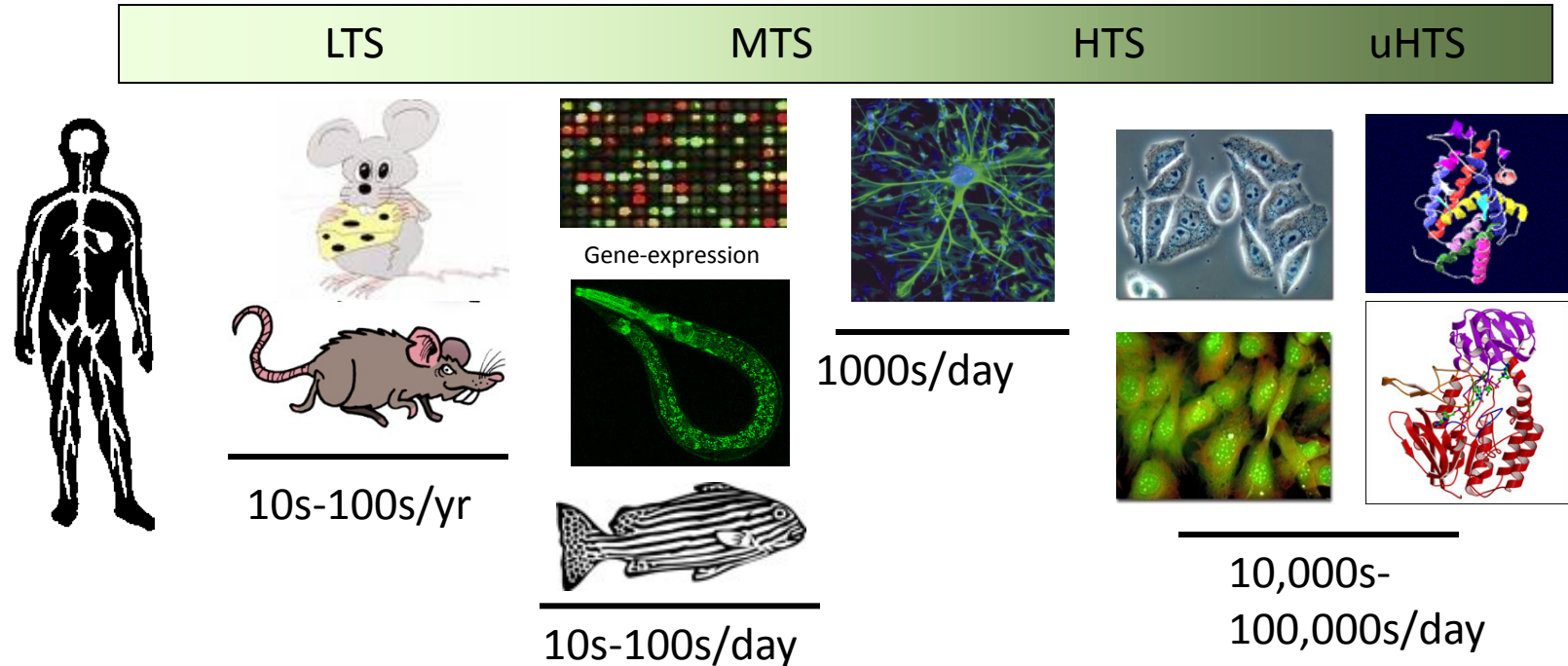
- Effectopedia (OECD)
- AOP Xplorer (US Army Corps of Engineers)
- Intermediate Effects DB (JRC)
- AOP Wiki
- https://aopkb.org/aopwiki/index.php/Main_Page
- Platforma odvozená od Wiki - pro vývoj a sdílení AOPs
- Společný projekt Evropské komise - JRC a [U.S. Environmental Protection Agency \(EPA\)](#)
- Editace možná pouze členy OECD AOP projektu



- <http://www.effectopedia.org/> -> odkaz na program pro spuštění Effectopedia
- Vizuální znázornění AOPs v **biologickém kontextu**:
 - Druh organismu, Životní stádium, Pohlaví, Trvání expozice, ...
- **Kvantitativní vztahy**
- **ADME** (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion)
- Otevřená platforma
- Není nutný formální souhlas pro přispěvatele
- Kredit pro autory i recenzenty/editory
- Možno vkládat i fragmenty informací, nejen celé AOPs
- Propojení s AOP Wiki & jinými (Export<->Import)

High-Throughput Screening Assays

batch testing of chemicals for pharmacological/toxicological endpoints using automated liquid handling, detectors, and data acquisition



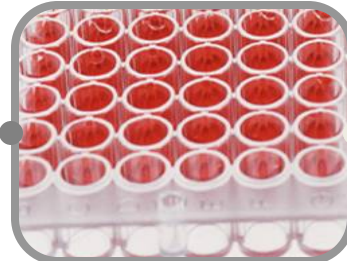
Human/ecological Relevance/
Cost/Complexity

Throughput/
Simplicity

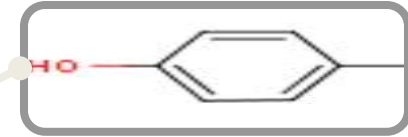
High Throughput Screening



HTS Robotic Platform



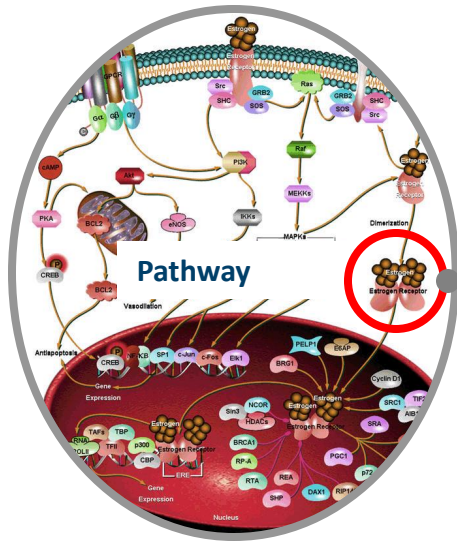
96-, 384-, 1536 Well Plates



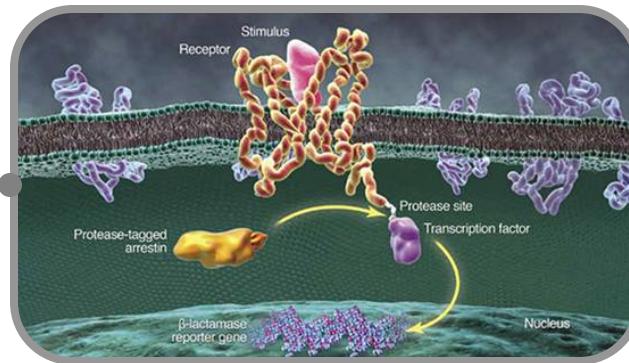
Chemical Exposure



Cell Population



Pathway



Assay Target Biology (e.g., Estrogen Receptor)

ToxCast = Toxicity Forecaster – Predikce toxicity

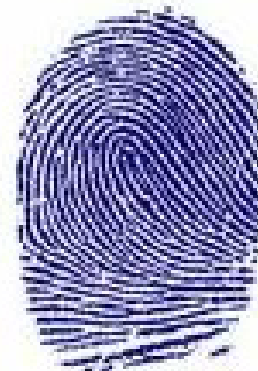
- 700 rychlých, automatizovaných screeningových testů (*in vitro*)
- Vybudování statistických počítačových modelů k predikci potenciální toxicity chemických látek
- Fáze 1: Screening více než 300 dobře charakterizovaných chemických látek
- Fáze 2: dalších 700 chemických látek s širokým záběrem struktur
- Následují další fáze - v současné době údaje pro více než 1850 látek
- Dlouhodobý, nákladný projekt (multi miliony dolarů)

<http://www.epa.gov/ncct/toxcast/>

⇒ dostupnost dat - **iCSS Dashboard**

<http://actor.epa.gov/dashboard/>

<http://www.epa.gov/ncct/toxcast/data.html>



ToxCast™

<http://actor.epa.gov/dashboard/>



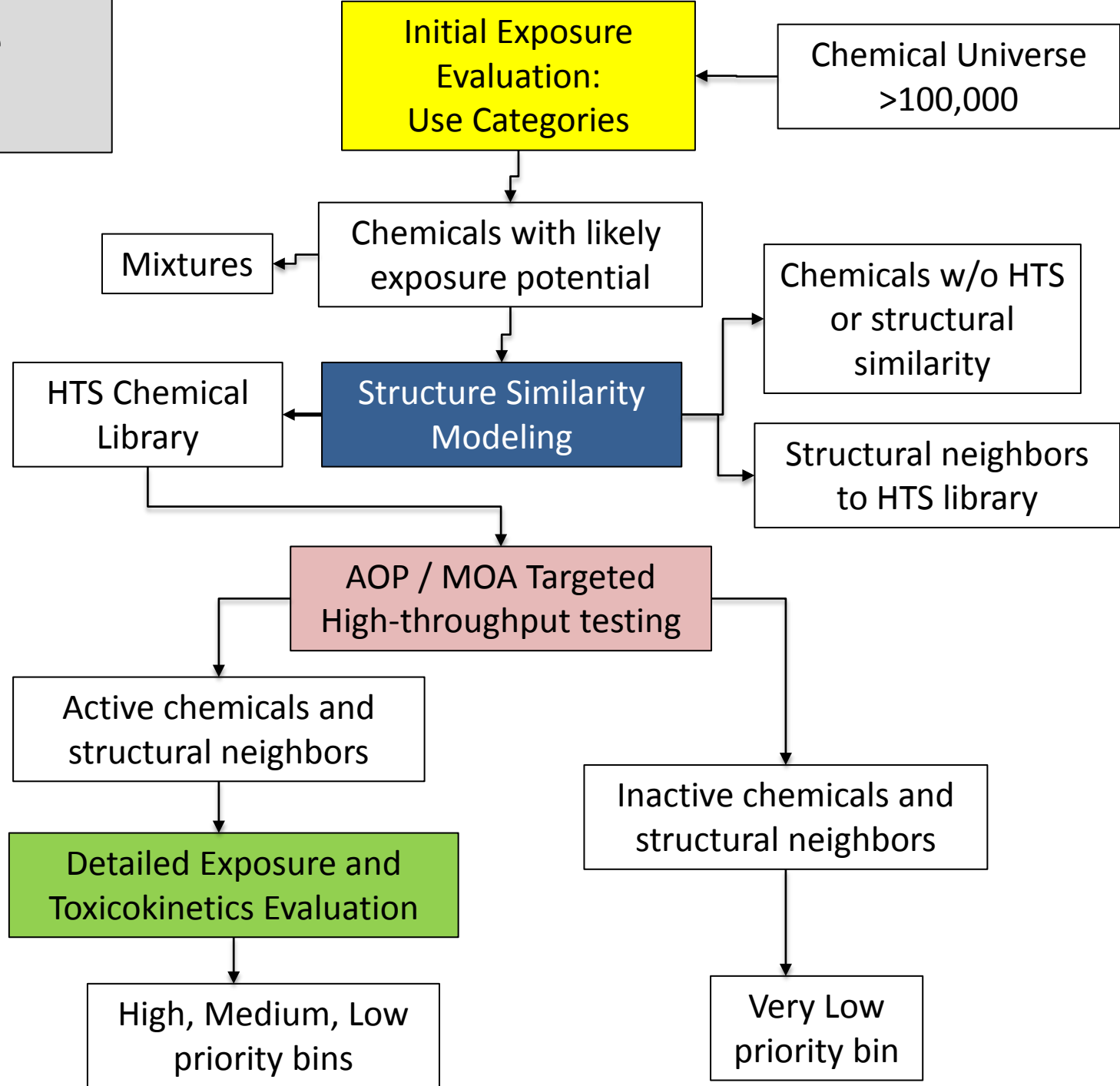
EPA has released the first beta version (version 0.5) of the **Interactive Chemical Safety for Sustainability** provides an interactive tool to explore rapid, automated (or in vitro high-throughput) chemical screening data federal Toxicity Testing in the 21st century (Tox21) collaboration.

The iCSS Dashboard contains the results from more than 800 Assay Endpoints (High-Throughput Screening-H assay sources). The release of the iCSS Dashboard coincides with the release of the ToxCast Phase II data. All assay description files, effect and endpoint data files from animal toxicity studies, concentration response data [ToxCast Data Download Page](#).

Users of the iCSS Dashboard v0.5 can perform basic data and chemical selection, as well as simple data exploration functionality and improve overall usability and performance. The initial release conveys the conceptual framework.

Please watch the video tutorial below that shows how to use the iCSS Dashboard through two examples.

Prioritizace dle míry rizika



Histologie – nauka o tkáních, studium tkání

(z řečtiny: *histos* = tkáň, *logos* = nauka)

Využití:

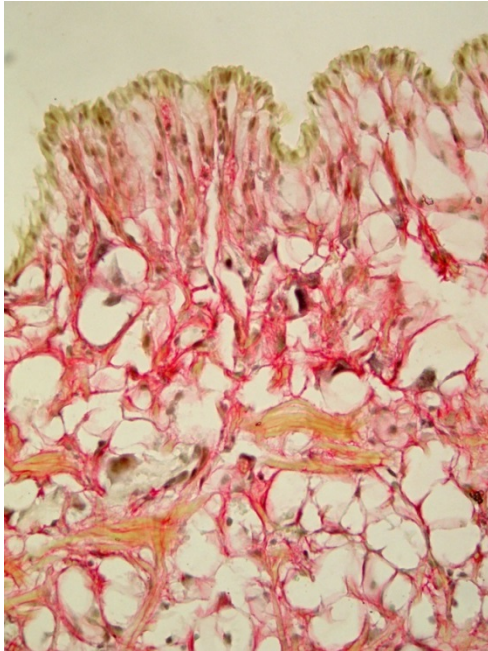
- zkoumání (patologických) změn tkáně
- pomocí histochemických technik lze prokázat přítomnost látek v buňkách a tkáních

V ekotoxikologii:

- drobnější organismy (bezobratlí) – často fixace a histologie celých jedinců
- obratlovci, větší organismy – odběr a zpracování vybraných tkání
- odebrané vzorky/tkáně z exponovaných organismů vs. kontroly
- organismy či tkáně organismů z prostředí s různým stupněm a typem znečištění/ stresorů
- histologie celých jedinců či výběr relevantních orgánů (jater, gonád, plic, ústního ústrojí)

Tkáň

- soubor morfologicky podobných buněk, které plní určitou funkci
- buňky tvořící tkáň mohou být stejného typu, nebo existují tkáně tvořené buňkami tvarově i funkčně rozdílnými

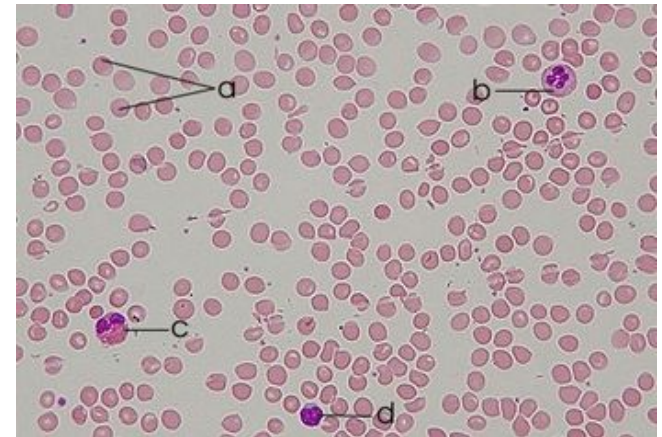
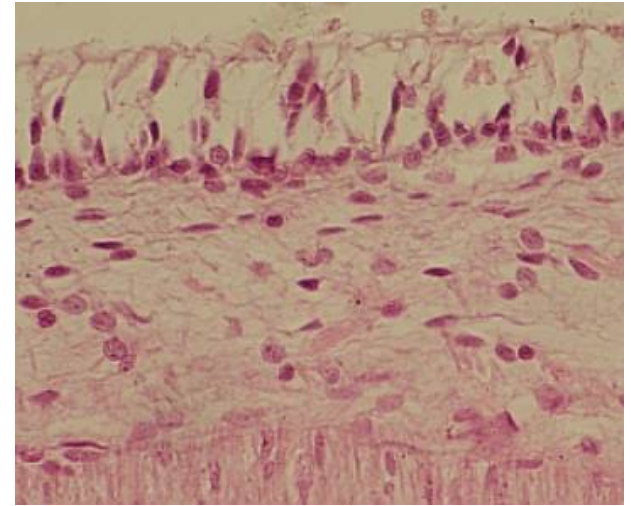


kolagenové
vazivo měkkýše

Typy tkání:

- epitelová (krycí)
- pojivová
 - * vazivo
 - * kost
 - * chrupavka
- svalová
 - * hladká
 - * příčně pruhovaná
- nervová
 - * neurony
 - * neuroglie
- tekutá
 - * krev
 - * míza

epitel



krev

Postup při přípravě preparátu

- Odběr tkáně/ vzorku
- Fixace - fixační činidla
- Zalévání
- Krájení
 - tkáně prosycené parafínem
 - zmrzlé tkáně
- Barvení
- Mikroskopická analýza

Odběr materiálu/tkáně

- Ze živého organismu (BIOPSIE)
- Z mrtvého organismu (NEKROPSIE)
- Nutná rychlá fixace tkáně, aby nedošlo k autolýze (rozklad vlivem vlastních enzymů a působením bakterií) - uložení ve fyziologickém roztoku nebo v lednici autolýze
NEZABRÁNÍ

Postup:

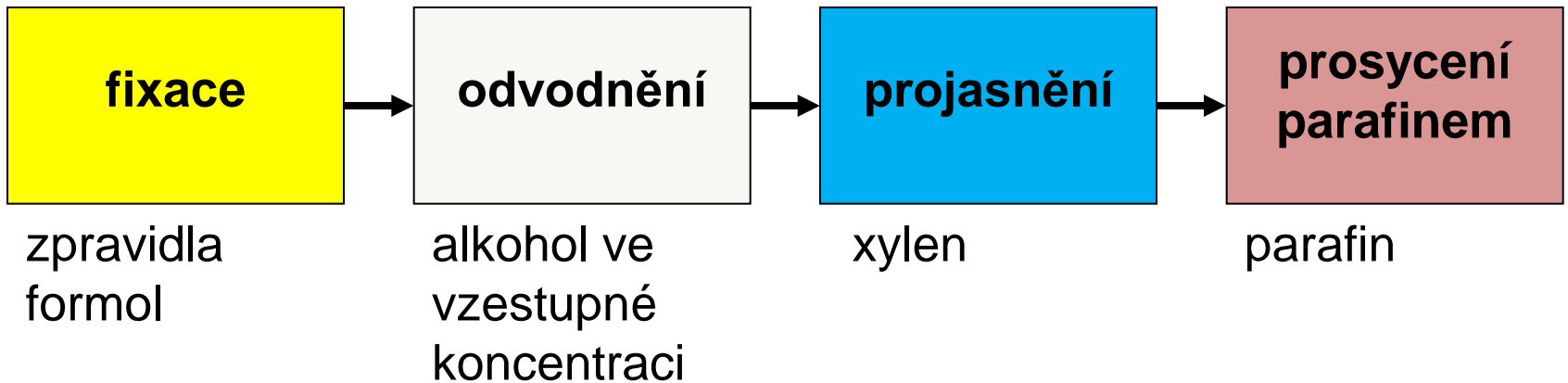
- oddělení vzorku - velikost tkáňového bločku max. 1cm^3 (cca do velikosti $1 \times 1 \times 0,5$ cm pro světelnou mikroskopii)
- v případě potřeby oplach v fyziologickém roztoku
- FIXACE - ihned po odběru !!!
- pečlivé označení vzorku

MOŽNOSTI ZPRACOVÁNÍ

- fixace a zalití tkáně do parafinu nebo jiného média
- zpracování tkáně ve zmrzlém stavu: zmrazení tkáně a vakuové vysušení ve zmrzlém stavu – pouze drobné kousky tkání

POSTUP PRO ZALITÍ DO PARAFINU

- fixace tkáně
- odvodnění tkáně (alkohol)
- projasnění tkáně (xylen)
- prosycení tkáně parafinem
- zalití do parafinu
- krájení bloků a natažení na podložní sklo



Fixace

- zastaví metabolické děje v buňce jejich zpomalením nebo denaturací enzymů
- rychlá a šetrná - brání autolýze tkání
- **Fyzikální metody:**
 - » Teplo (mikrovlnná trouba)
 - » Zmražení a vysušení za nízké teploty (tekutý dusík – 170 °C)
- při histologickém průkazu citlivých látek (např. enzymy)
- **Chemické metody:**
 - » Imerzní (ponoření do fixační tekutiny)
 - » Perfuzní (nástřik cév)
- **Podmínky fixace**
 - rychlost - odběr, dobrý průnik fixačních prostředků do tkáně – do celého vzorku, velikost vzorku (1cm², 1mm²)
 - co nejlepší zachování struktury
 - zachování barvitelnosti tkáně

Fixační činidla - Fixační tekutiny - Chemická fixace

Formaldehyd 4% = 10% neutrální formol	40% roztok formaldehydu ve vodě (nasycený roztok) = 100% formol
Bouinova tekutina (žlutá)	trinitrofenol, formol, kys.octová - proniká rychle, tkáň se po fixaci barví
Susa	chlorid rtuťnatý, chlorid sodný, kys.octová, kys.trichloroctová, formol
Zenkerova tekutina (oranžová)	chlorid rtuťnatý, dvojchroman draselný, síran sodný, kys. octová
Carnoy	ethanol, chloroform, kys.octová
Methacarn	methanol, chloroform, kys.octová



DALŠÍ ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ

Podstatnou část hmotnosti a objemu tkáně tvoří voda – nemísitelná s parafinem – nutno tkáň odvodnit a prosytit parafinem

1. odvodnění - alkohol ve vzestupné koncentraci

EtOH (60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%)



odvodňovací automat

Alkohol není rozpouštědlem pro parafin, je třeba ho z tkáně odstranit látkou, která by byla schopna napomoci prosycení tkáně parafinem – xylen. (mezistupeň v podobě odvodnění alkoholem není možné vynechat. Xylen je nemísitelný s vodou a nemůže tedy sloužit k odvodnění.)

2. projasnění = prosycení rozpouštědlem zalévacího

media (xylen, toluen, aceton)

– zpravidla postupně tři lázně xylenu

3. prosycení parafinem - tkáň prosytíme v rozpuštěném

parafinu - teplota do 58°C



Zalévání do média

<https://www.youtube.com/watch?v=h9cxu1UiH2U>

<https://www.youtube.com/watch?v=FaOWA-y9UKI>

- zalití tkáně do zalévacích médií, které ji zpevní a vytvoří homogenní blok vhodný ke krájení - pro zhotovení dostatečně tenkých a kvalitních řezů pro studium
- tkáň prosycená parafínem se zalévá do forem rozpuštěným parafínem
- zalévání do jiných médií – celoidinu (nitrocelulózy), celoidin – parafinu
- zalévání do médií rozpustných ve vodě – želatiny, celodalu, vosků rozpustných ve vodě
- v elektronové mikroskopii - zalévání do epoxidových nebo polyesterových pryskyřic
- tkáň je třeba vhodně orientovat, pečlivé značení vzorku
- zalévací automaty - parafín udržován v tekutém stavu (ohřívací box a zalévací komůrky stálé teploty). Součástí chladicí deska - zajišťuje rychlé tuhnutí vzorku.



Krájení na mikrotomech

- Tkáň je třeba nakrájet na řezy o tloušťce jedné vrstvy buněk, tedy 4–10 μm
- tkáň průhledná a dobře studovatelná
- mikrotom = přístroj na řezání jemných vrstev preparátů pro mikroskop
- pro světelné mikroskopické studium bývají řezy tlusté 4 - 20 μm , pro elektronové mikroskopy zpravidla 100 nm a tenčí
- tloušťka řezu se upravuje podle tkáně, která se krájí (např. podle její tvrdosti), běžně se používá tloušťka okolo 5 μm
- sáňkový, rotační, diskový, ultramikrotom, laserový mikrotom, atd. (poslední dva využítí zejména pro elektronovou mikroskopii), zmrazovací mikrotomy – liší se podle způsobu ovládání – pohyblivosti nože a dalších parametrů
- některé mikrotomy mohou být poloautomatické (elektronické řízení tloušťky, automatické provedení určitého počtu řezů ...)



KRÁJENÍ na mikrotomu

<https://www.youtube.com/watch?v=KnMdSgd5mts>



rotační



laserové



NATAHOVÁNÍ PREPARÁTŮ

- preparáty nakrájené na mikrotomech se umísťují na podložní skla k dalšímu zpracování
- nakrájené řezy se dávají do teplé vodní lázně, kde se řez roztáhne a následně se zanořením podložního skla a jeho vyzvednutím s preparátem na toto sklo natáhne a přilne
- nebo se na podložní sklo umístěné na speciální zahřívací plotně kápne voda a do ní se umístí preparát (z parafinového bloku ukrojená tkáň), který se natáhne a po odpaření vody přilne na sklo
- použití speciálních podložních skel, aby na nich tkáň držely

Zpracování tkáně ve zmrzlém stavu

- používá se zpravidla u „čerstvých“ tkání, ale je možné zpracovávat i tkáně fixované, záleží na typu tkáně
- krájení zmrazených tkání - zmrazovací mikrotom, kryostat = speciálně upravený mikrotom pro práci v hlubokém mrazu při teplotě okolo -15 až -22 °C, tloušťka řezů obvykle 7 μm.
- tkáň se zmrazí a následně se zmražená krájí
- vyšetření zmražené tkáně - v případě potřeby rychlé diagnostiky, nebo když je třeba tkáň zpracovat šetrně, aby nedošlo k porušení její struktury (chemické stavby) použitím postupů a chemikálií, které se používají při zalití do parafinu nebo jiných médií
 - Průkaz enzymů
 - Barvení a studium lipidů
 - Imunohistochemie

Barvení

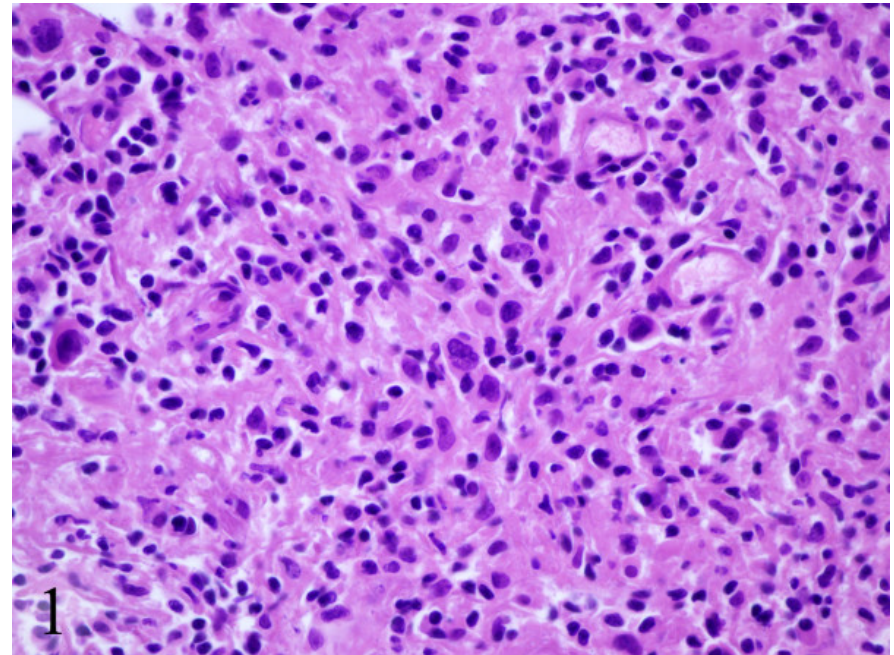
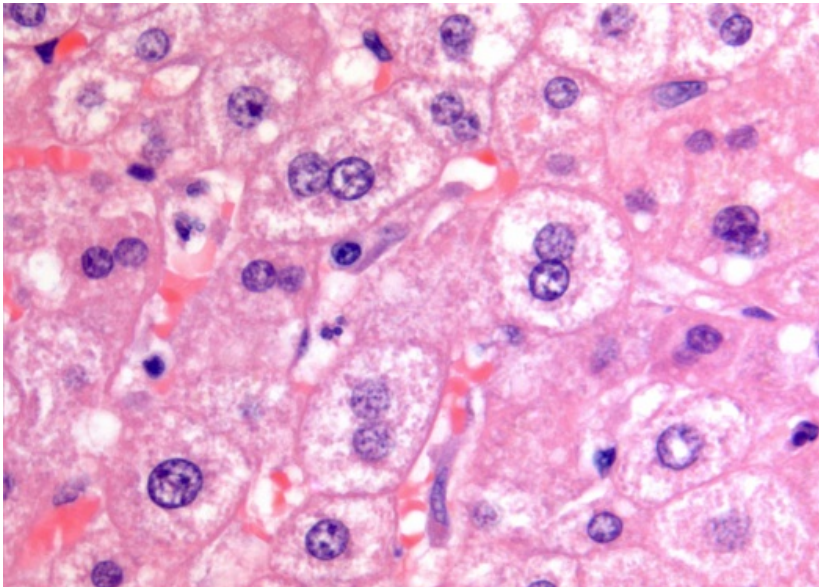
- Umožňuje rozlišení jednotlivých součástí buněk a tkání pro mikroskopickou analýzu - u neobarveného preparátu nerozeznáme jednotlivé složky tkáně, díky malé odlišnosti lomivosti světla
- Většina barviv je rozpustná ve vodě, proto je třeba z řezů odstranit parafin a znovu je zavodnit, aby bylo možno tkáně barvit.
- Různé druhy barviv používáme podle toho, co potřebujeme obarvit.

Základní rozdělení:

- barviva zásaditá (barví jádra)/ kyselá (barví cytoplazmu)
- přirozená (př. hematoxylin, šafrán)/umělá (anilín).
- Barvicí automaty - sestava lázní pro odparafinování, barvení, odvodnění a projasňování preparátů. Koše se skly jsou přenášeny z jedné lázně do druhé podle předem nastaveného času barvení a odkapávání. Čas barvení se nastavuje do 12 minut a je stejný pro každou lázeň. Obarvení preparátu závisí na typu reagensů a na počtu použitých identických lázní. Většina automatů - několik vzorků najednou podle různých barvicích protokolů (zpracování až 600 skel za hodinu).

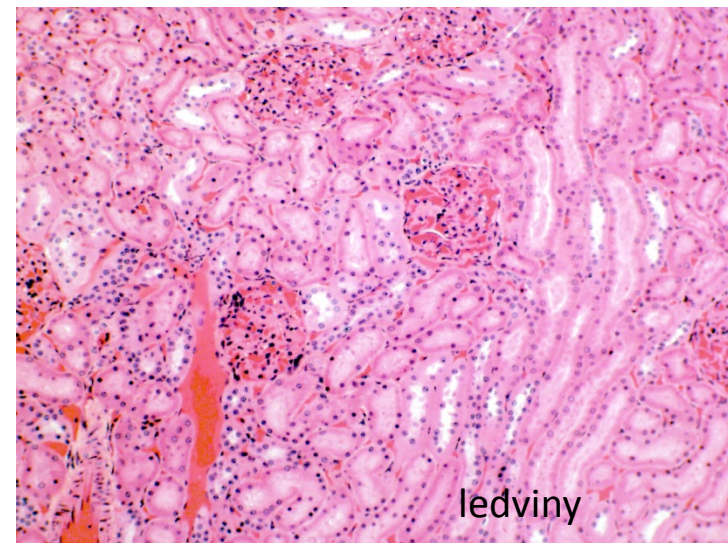
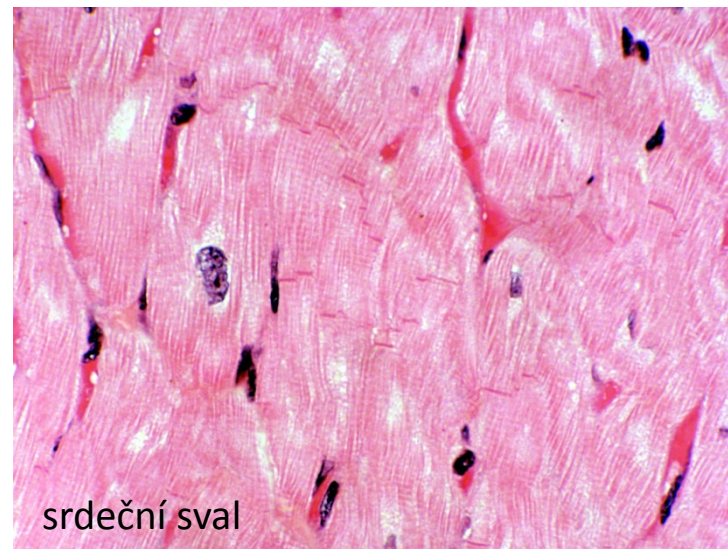
Hematoxylin - eosin

- **Hematoxylin** barví kyselé součásti buňky (bazofilní struktury)
 - DNA, RNA, tj. jádro, jadérko, ribozomy granulární endoplasmatické retikulum
 - tmavá – modrá až černá barva
- **Eosin** barví zásadité struktury buňky (acidofilní, eosinofilní)
 - hlavně proteiny, tj. cytoplasmu, mitochondrie, hladké endoplasmatické retikulum a kolagen v mezibuněčné hmotě
 - růžová až fialová barva



Barvení parafínových řezů

- Odparafínování
- Zavodnění
- Barvení hematoxylinem
- Praní v tekoucí vodě
- Barvení eosinem
- Odvodnění
- Projasnění
- Montování



Hematoxylin – eosin

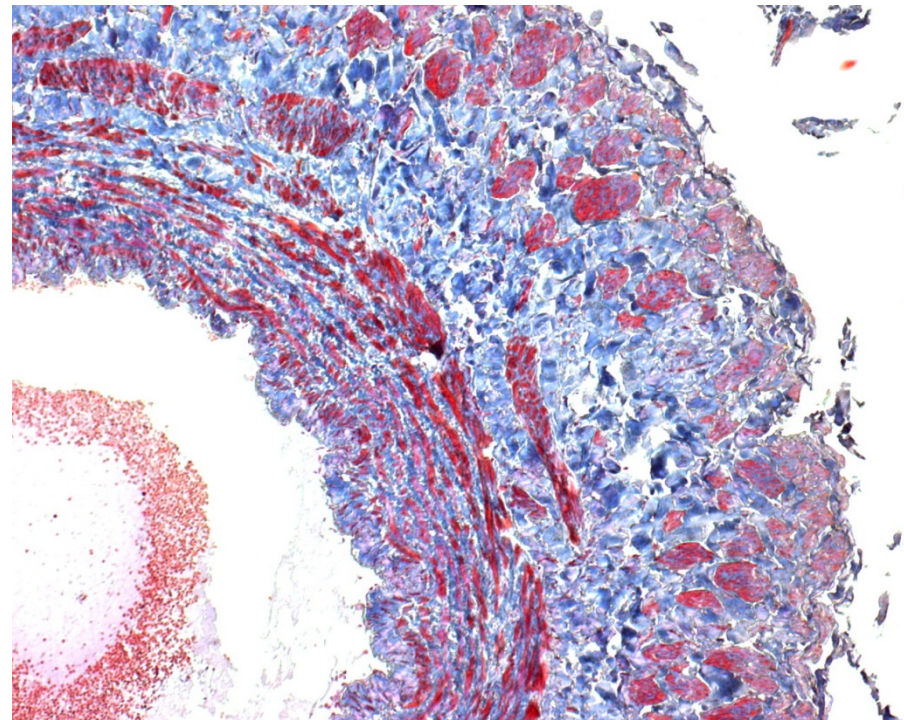
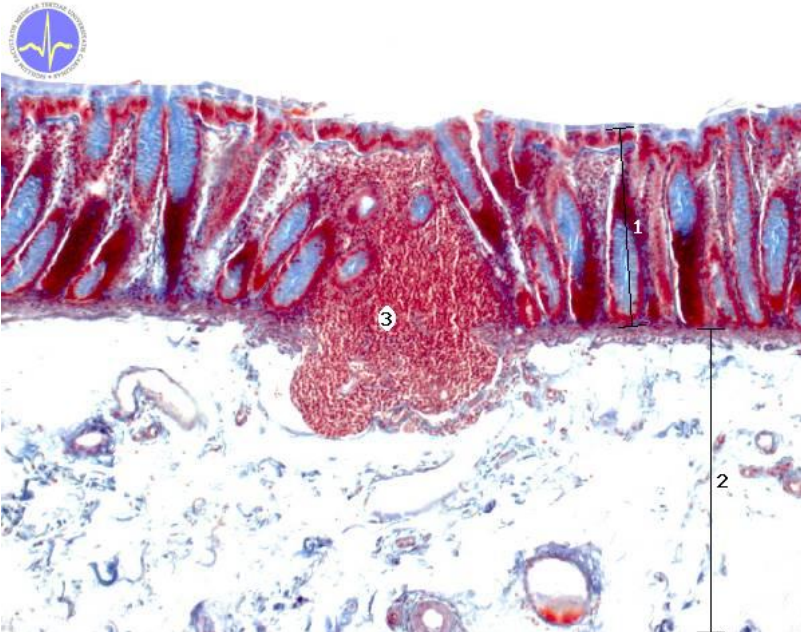
<https://www.youtube.com/watch?v=OZHGq6flt6Y>
<https://www.youtube.com/watch?v=2D0rj0m6dVs>

Výsledky barvicích metod

Barvení	Barvivo	Jádro	Kolagen	Svaly	Poznámka
Hematoxylin-eosin	Hematoxylin Eosin	modré až černé	růžový	růžové	
Weigert – van Gieson	Weigertův hematoxylin Saturnová červeň Trinitrofenol	hnědé	červený	žluté	místo Saturnové červeni se používá také kyselý fuchsin, žluté -vše kromě kolagenu
AZAN	Azokarmín Anilínová modř Oranž G	červené	modrý	oranžově červené	červené - erythrocyty modrý - mucin
Modrý Massonův trichrom	Hematoxylin Kyselý fuchsin Anilínová modř	modré až černé	modrý	červené	červené - erythrocyty modrý - mucin
Žlutý Massonův trichrom	Hematoxylin Erytrosin Šafrán	modré až černé	žlutý	červené	červené – erythrocyty možno použít i kyselý fuchsin a Tucheht gelb
Zelený Massonův trichrom	Hematoxylin Kyselý fuchsin Světlá zeleň	modré až černé	zelená	červené	červené - erythrocyty
Impregnace Ag	AgNO ₃		hnědý	šedo-černé	retikulární vlákna - černá
Heidenhainův železitý hematoxylin HŽH	Heidenhainův železitý hematoxylin	hnědé až černé		šedo-černé	

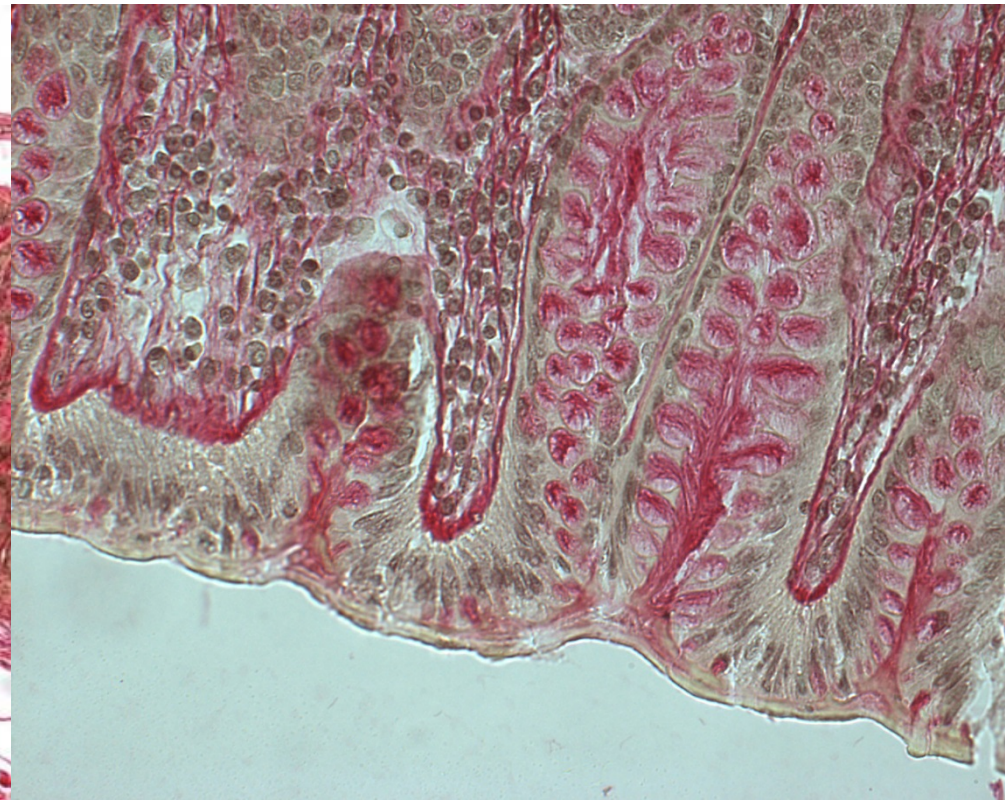
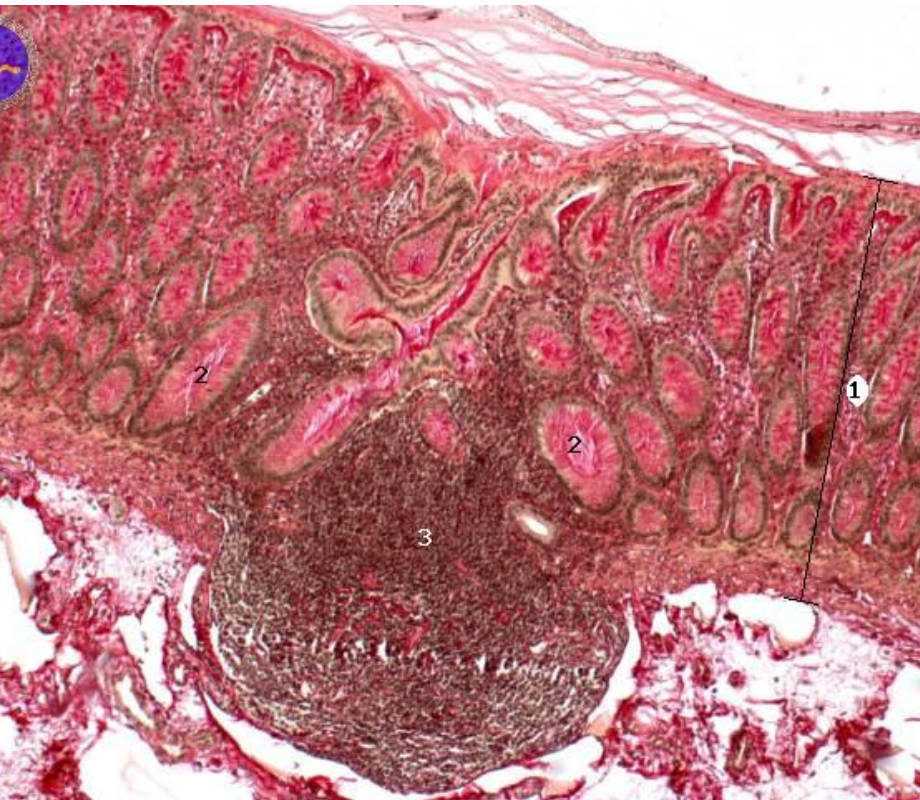
AZAN

- **Azokarmín** barví jadra červeně
- **Anilínová modř** barví kolagenní vlákna modře
- **Oranž G** barví cytoplasmu buněk a svaly oranžově
- Erythrocyty jsou červené



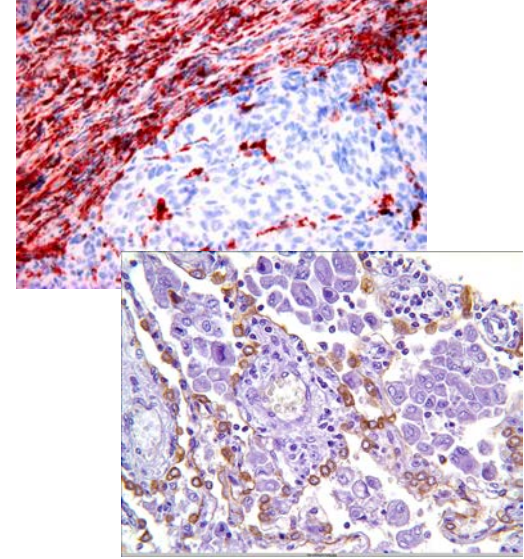
Weigert – van Gieson

- **Weigertův hematoxylin** barví jádra šedě
- **Saturnová červeň** (nebo kyselý fuchsin) barví kolagenní vlákna červeně
- **Kyselina pikrová** barví cytoplasmu buněk a svalovinu žlutě



Histochemie

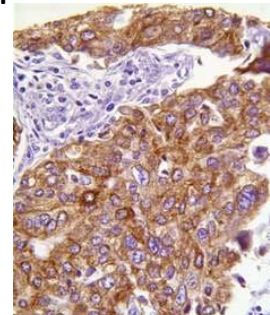
- pomocí chemické reakce prokazuje ve vzorku přítomnost látek (např. enzymatická aktivita) – selektivní barvení
- popisuje morfologii buněk, chemické látky v buňkách prokazuje přítomnost např. polysacharidů, lipidů, enzymů



Imunohistochemie - aplikace imunologických metod při studiu tkání nebo buněk
technika barvení histologických preparátů, která umožňuje znázornit přítomnost konkrétní látky pomocí specifických protilátek.

Imunochemické barvení:

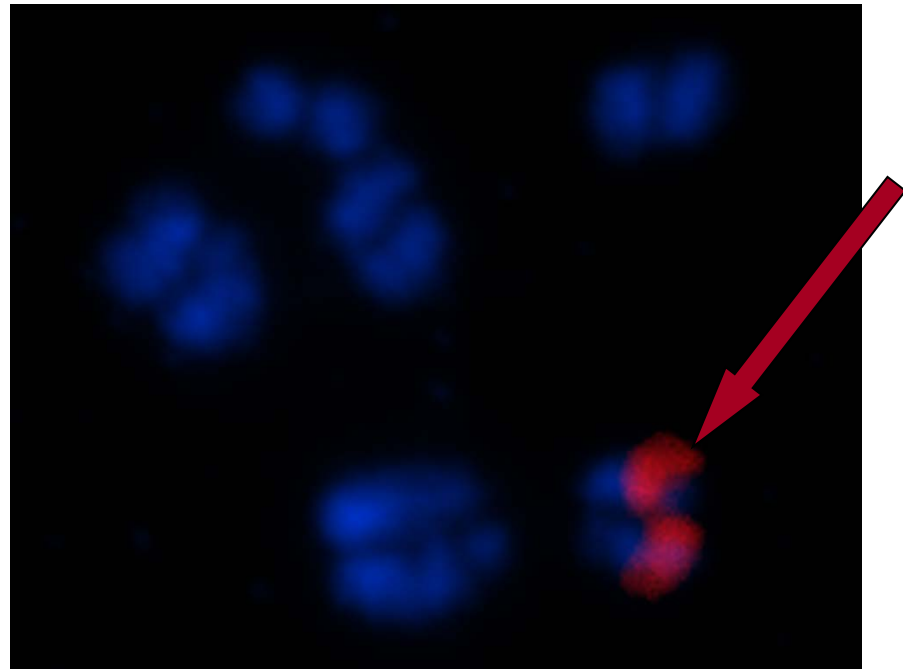
- 1) navázání protilátek proti konkrétním strukturám
 - 2) použití protilátky se značkou (např. s enzymem peroxidázou), které se váží na protilátky z prvního kroku
 - 3) inkubace se substrátem, který enzym přeměňuje na nerozpustný barevný produkt pozorovatelný pod mikroskopem – detekce cílové struktury
- Imunohistochemické barvení – např. detekce estrogenových a progesteronových receptorů



molekulární metody...ISH

ISH = *in situ* hybridizace

- použití značených sond, které se naváží (hybridizují) na odpovídající (komplementární) úseky nukleových kyselin
- sondy značené barvivem (CISH) či fluorescenčním barvivem (FISH)



Trvalý preparát

- Po obarvení se z tkáně znovu odstraní voda
- Trvalý preparát se připraví přilepením krycího skla pomocí montovacího media – např. kanadského balzámu (má stejný lom světla jako sklo) nebo umělých pryskyřic

Po zaschnutí vznikne TRVALÝ PREPARÁT

K některým barvicím přístrojům jsou připojeny rovnou i montovací automaty, kdy jsou pomocí robotického systému přikládány krycí sklíčka na obarvené preparáty.

Montovací médium = látka dokonale průhledná s vysokým indexem lomu:

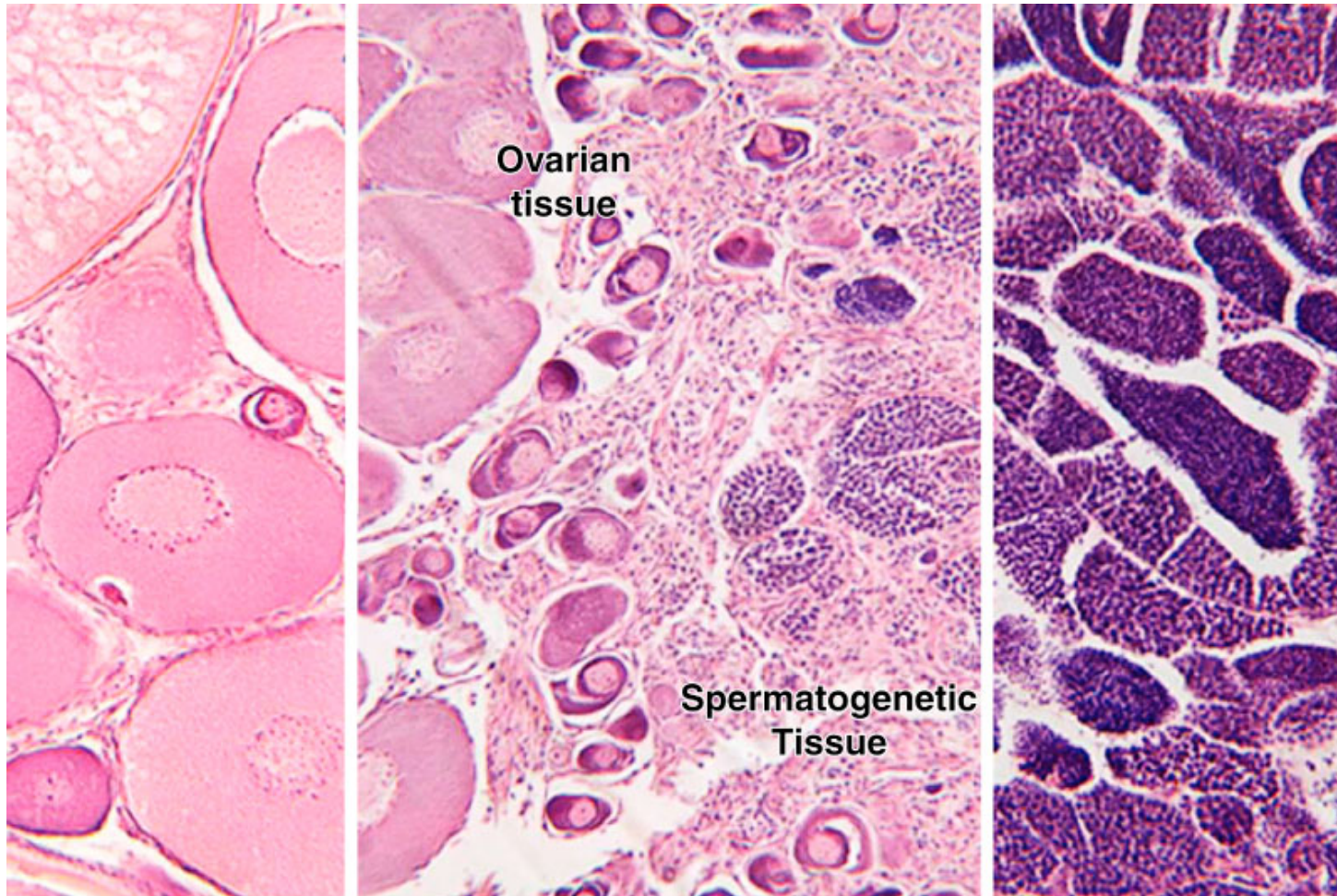
Nemísitelné s vodou - rozpouštějí se v xylenu (př. kanadský balzám, cedrový olej nebo syntetické pryskyřice) a je nutné preparáty odvodnit a prosytit.

Mísitelné s vodou - př. glycerin, glycerinová želatina, sirup z arabské gumy

Postup

Parafínové řezy	Kryostatové řezy
Fixace	Zmražení při $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$
Vypírání	
Odvodnění řadou alkoholů	
Prosycení rozpouštědlem	
Zalítí do parafínu	
Krájení	Krájení v kryostatu
Nalepení řezů na podložní sklo	Nalepení řezů na podložní sklo
Odparafínování a zavodnění	Někdy krátká fixace
Převedení do vody	
Barvení, histochemická reakce	Zejména histochemické reakce
Odvodnění a projasnění	Někdy odvodnění a projasnění
Montovací medium zpravidla bezvodé	Bezvodé medium nebo glycerin - želatina

Ryby – histologie gonád



Normal Ovary

Intersex Gonad

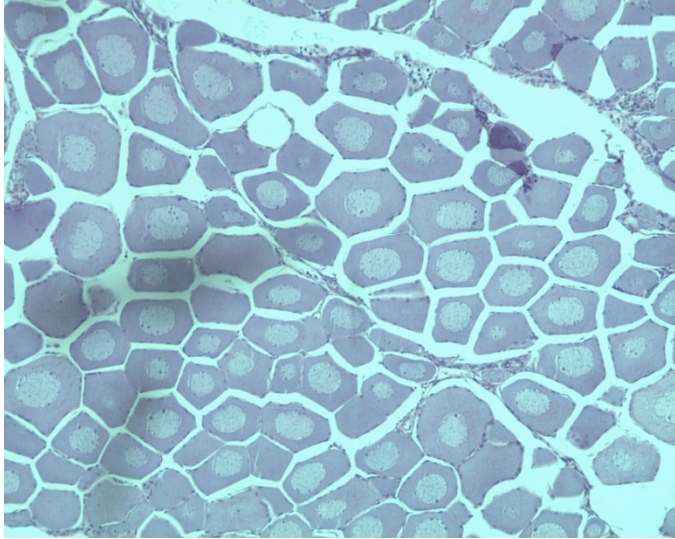
Normal Testis

Intersex - pohlavní orgány pakaprovice severního (*Catostomus commersoni*)

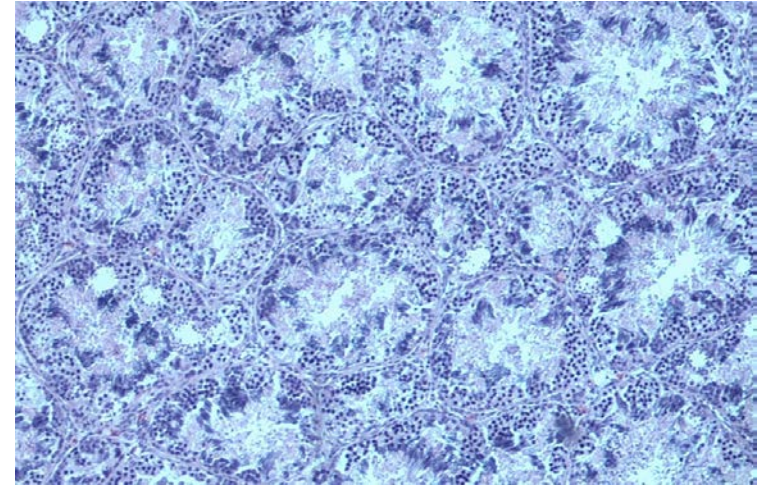
Vlevo a vpravo – vaječník a varle ryb z referenční lokality

Uprostřed – intersexová tkáň ryby odebrané pod výpustí ČOV

Obojživelníci – histologie gonád

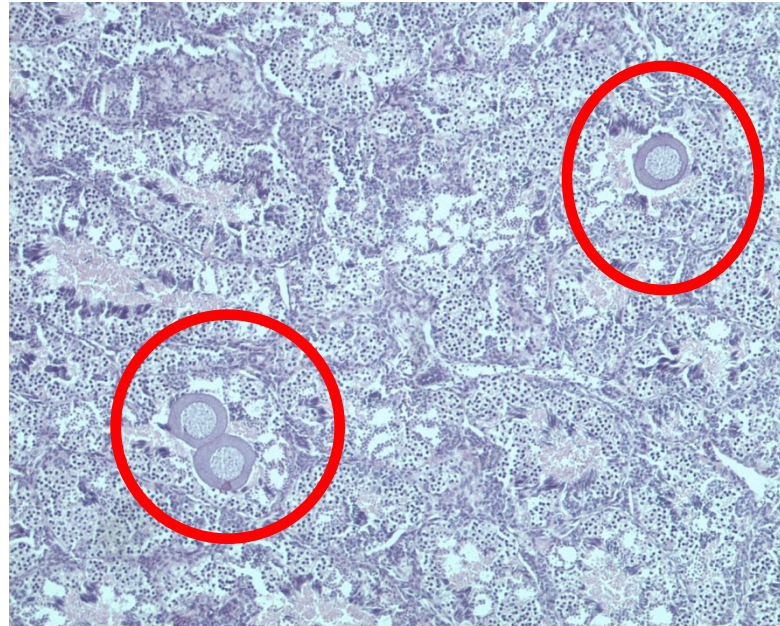


vaječník



varlata

intersex



Světelná mikroskopie

- Objektiv – hlavní, tvoří obraz předmětu - skutečný zvětšený a převrácený
- Okulár – zvětšuje obraz 5-25x, koriguje optické vady čoček objektivu
- předmět umísťujeme před předmětové ohnisko - paprsky (světla/elektronů) vystupují od předmětu do čočky, lámou se a vytvářejí zvětšený obraz.
- Rozlišovací schopnost - nejmenší vzdálenost mezi dvěma body, při které je ještě dovedeme rozlišit jako dva samostatné objekty
- Rozlišovací schopnost oka (0,2 mm)
- Světelná mikroskopie (0,2 μm) - zvětšení = objektiv x okulár (max. 1500-2000x)



Fluorescenční (luminiscenční) – látky po absorpci UV-záření vydávají barevné viditelné záření, přírodní nebo po navázání fluorochromů

Elektronová mikroskopie (1-0,2 nm)

Vlnová délka příslušející urychlenému elektronu je

přibližně 0,005nm => rozlišovací schopnost 0,0025nm

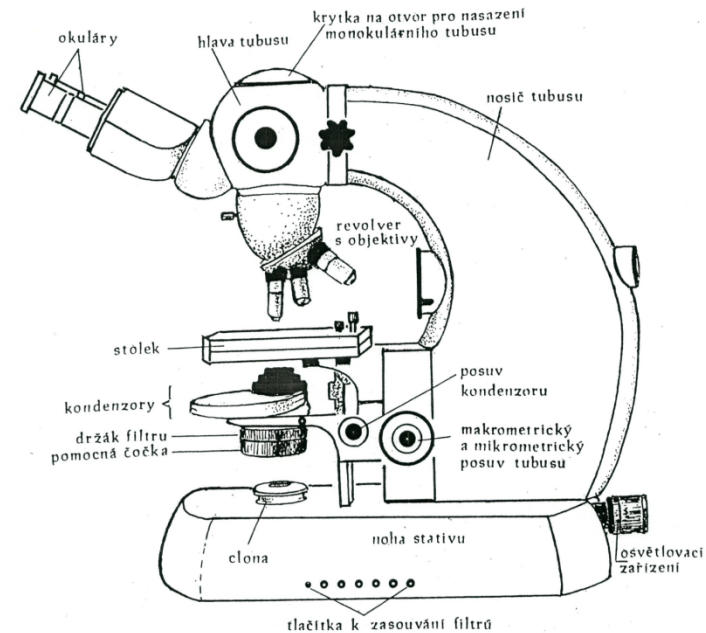
Prakticky 350 000 – 500 000 x víc než oko

Špičkové přístroje až 800 000 – 1 000 000 x

Obraz buď pozorován přímo nebo projektován na:

- fluorescenční stínítko
- fotografickou desku
- prostřednictvím kamery na monitor

Mikroskopie



Elektronový mikroskop

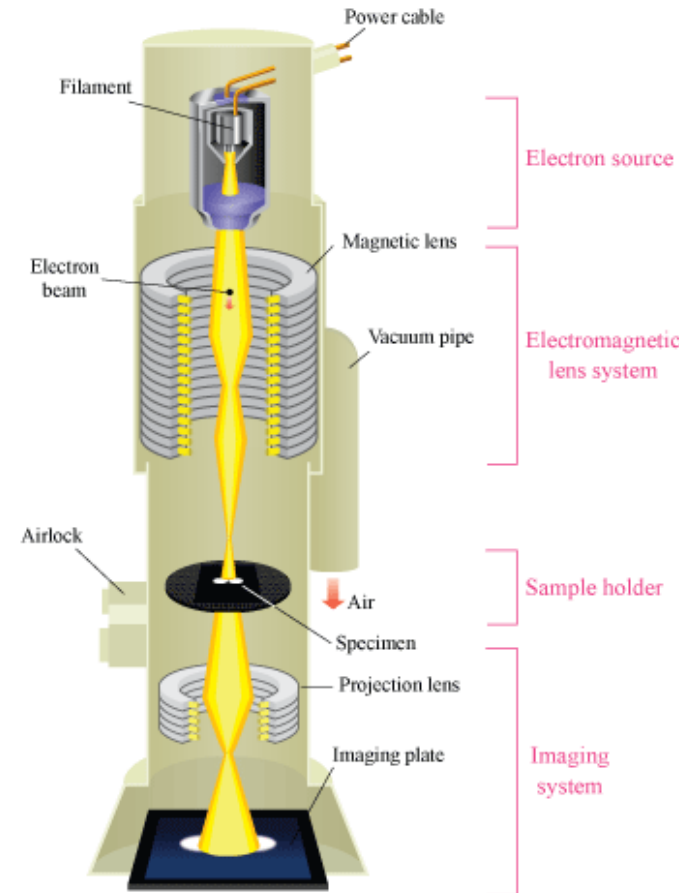
- místo světla (fotonů) tok elektronů ve vakuu, místo optických čoček elektromagnetické
- vlnové délky urychlených elektronů o mnoho řádů menší než fotonů viditelného světla -> mnohem vyšší rozlišovací schopnost - mnohem vyšší zvětšení
- řezy krájené na ultramikrotomu
- studium cytologických detailů

Transmisní elektronový mikroskop (TEM)

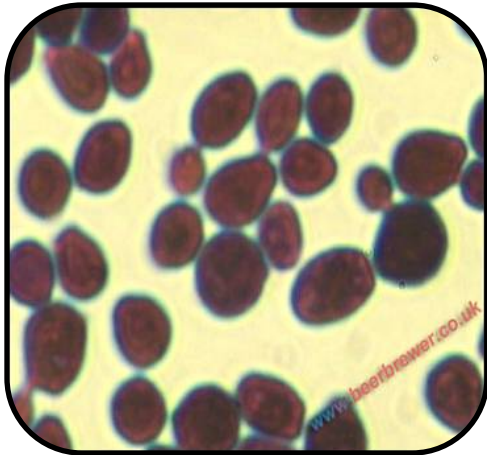
- nepohyblivý elektronový svazek, detekce elektronů prošlých vzorkem (TE) na fluorescenčním stínítku nebo detektorem
- elektrony přímo prostupují tenkým řezem (nm) a jsou detekovány (vnitřní struktury, atomy)
- Zpracování tkáně
 - Odběr (velikost vzorku max 1mm²)
 - Fixace dvoustupňová
 - Odvodnění (aceton)
 - Prosyčení (směs epox. pryskyřice s tužidlem)
 - Vytvrzení a zalití (epoxidové pryskyřice, metakryláty)
 - Krájení (ultramikrotomy – 30 – 60nm)
 - Přenesení na nosné terčíky
 - Kontrastování (uranyl acetát)

Rastrovací/scanovací elektronový mikroskop (SEM)

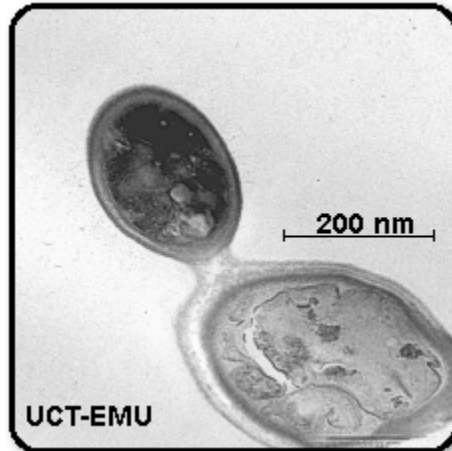
- povrch vzorku rastrován pohyblivým svazkem elektronů, zobrazení povrchu vzorku pomocí sekundárních elektronů (SE), odražených elektronů (BE), případně signálu z jiných detektorů
- úzký svazek elektronů projíždí preparát, odražené elektrony na stínítku dávají plastický obraz



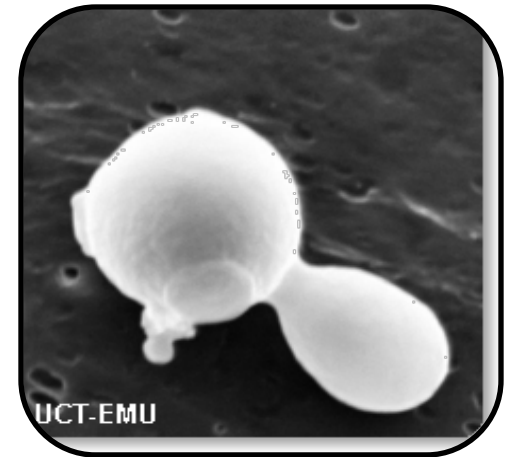
Pučení kvasinek



Světelný mikroskop



TEM

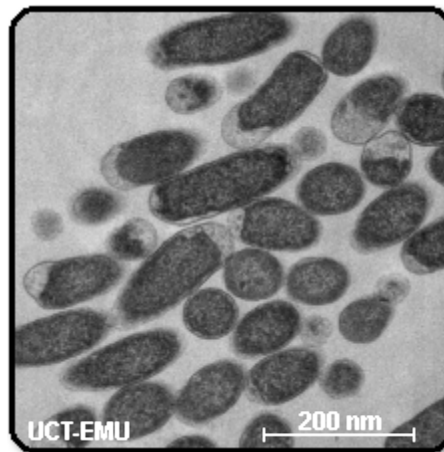


SEM

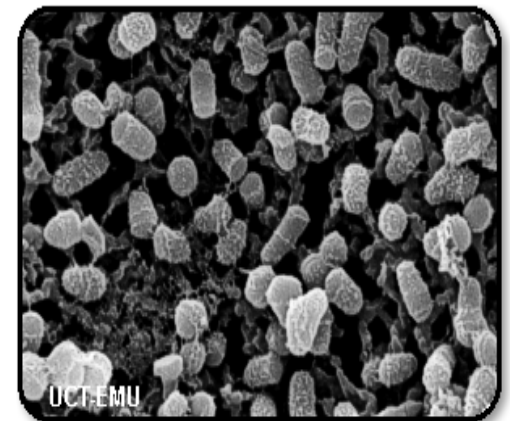
Bakterie *E. coli*



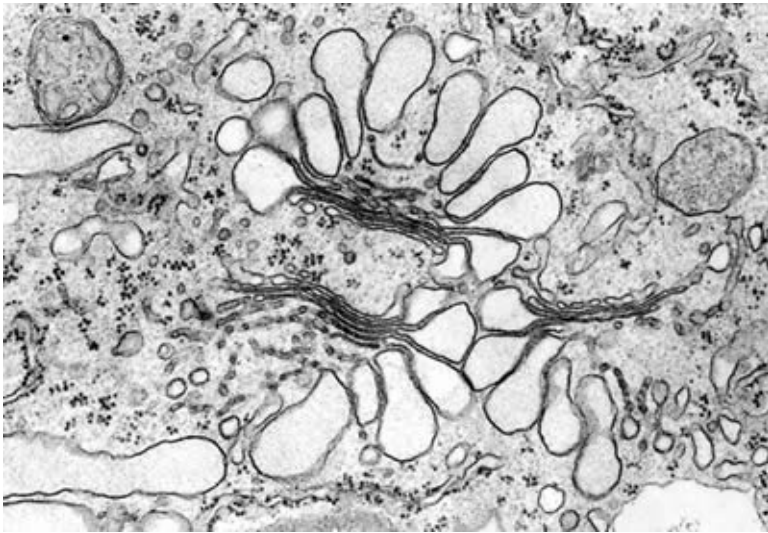
Světelný mikroskop



TEM



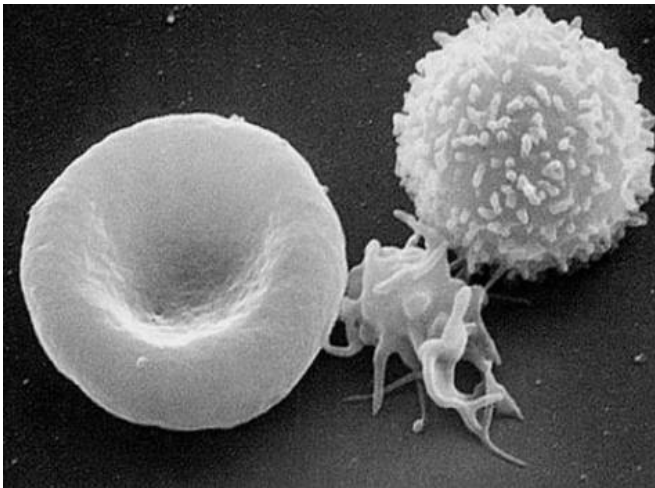
SEM



TEM – golgiho aparát



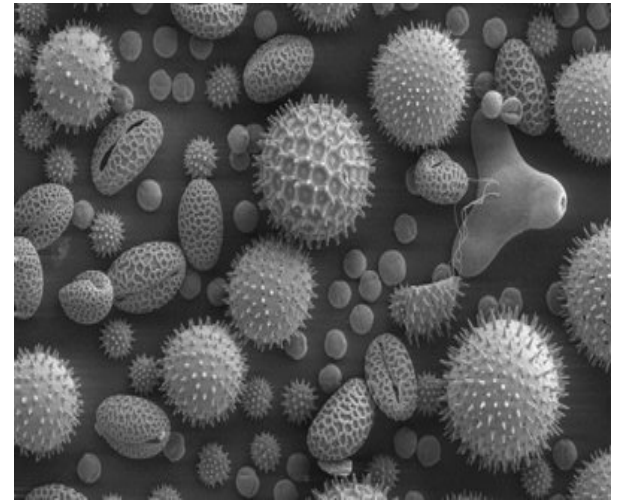
TEM - mitochondrie



SEM – krevní buňky



oko *Drosophily*



SEM – pylová zrna

Transgenní organismy

- **Transgenní** modely jsou vyvinuty vložením jednotlivých nebo více genů z jednoho druhu do DNA jiného druhu
- Organismy s novým genem v genomu (transgen)
- ve svém genomu obsahují nové geny, nebo geny pozměněné metodami rekombinantní DNA
- Geneticky modifikované

Vektory

- molekuly DNA, které zajistí vstup příslušného genu do buňky
- Plazmidy
- Bakteriofágy

Transgenní organismy v ekotoxikologii

- zejména ryby a obojživelníci – jejich embrya
- geny jsou vpraveny do oplodněných vajíček pomocí mikroinjekce DNA nebo elektroporace
- není potřeba implantovat embrya – vnější vývoj
- **geneticky modifikované** - biosensory znečištění prostředí – fluorescence v reakci na určitý typ znečištění
- výzkum mechanismů působení polutantů



Transgenní organismus má záměrně introdukovaný gen jiného druhu – vložen v procesu transgeneze

- **Krok 1 – konstrukce transgenu**

- 3 části:

- Promotor
 - Gen, který má být exprimován
 - Terminální sekvence



- **Krok 2 – Vnesení cizího genu do organismu**

- do oplodněných vajíček
 - mikroinjekce DNA
 - elektroporace

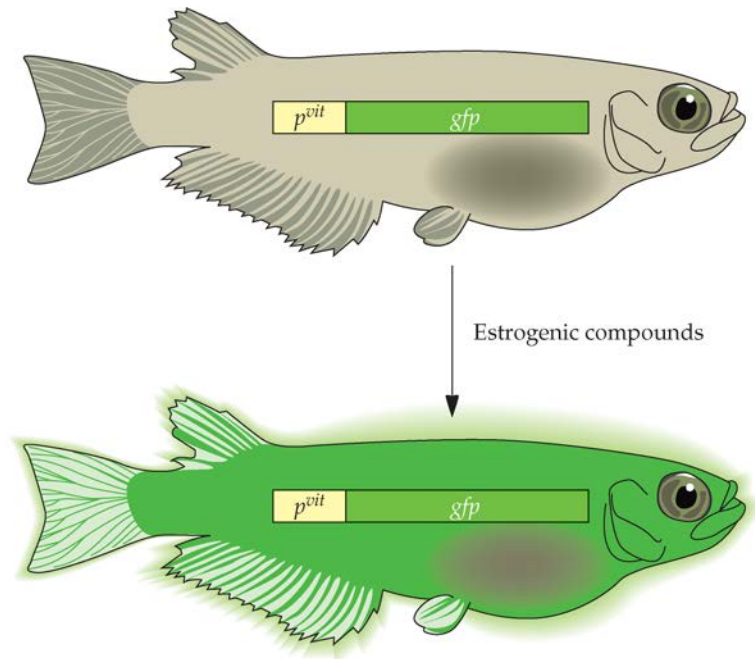
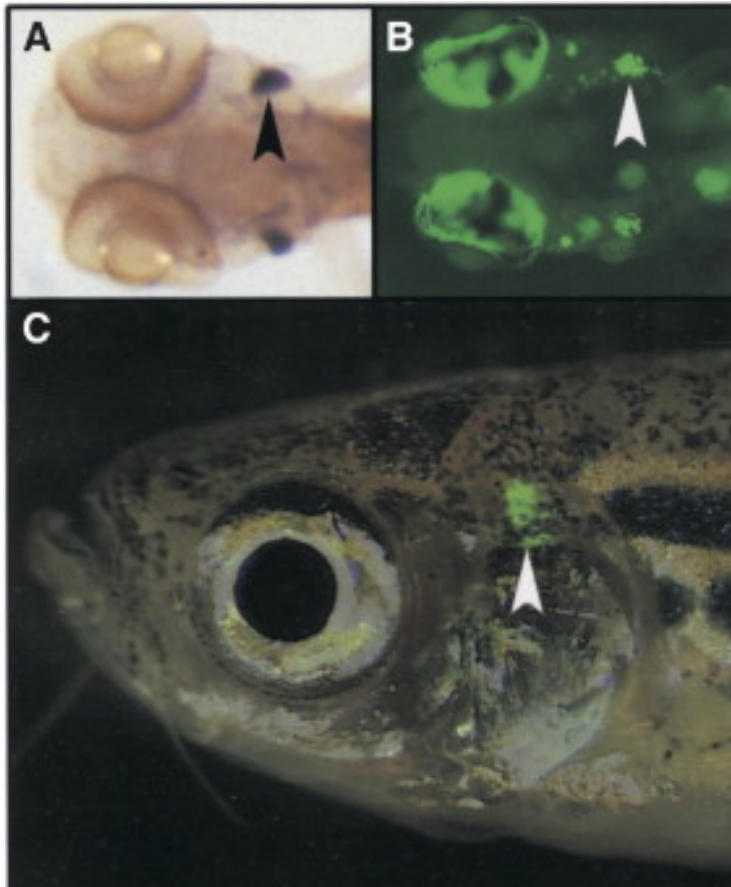
Vývoj transgenních organismů



- Ryby/obojživelníci mají velká a průhledná vajíčka, která umožňují relativně snadný přenos genů.
- Většina rybích vajíček injektována do hodiny po oplodnění, protože jsou vypuštěna ze samic (externí vývoj) a první dělení probíhá hodinu po oplodnění
- Obtížné injekce do vajíček některých druhů (např. lososovitých ryb) – mají tvrdý vnější obal (chorion)
- Externí vývoj – v akváriích s regulovanou teplotou
- Míra přežití (survival rates) rybích embryí po mikroinjekci (35%–80%) je mnohem vyšší než u savců, s tím že 10%–70% ryb je transgenních
- Transgenní jedinci dále chováni – další generace, případně křížení s netransfekovanými – vytvoření stabilních transgenních linií

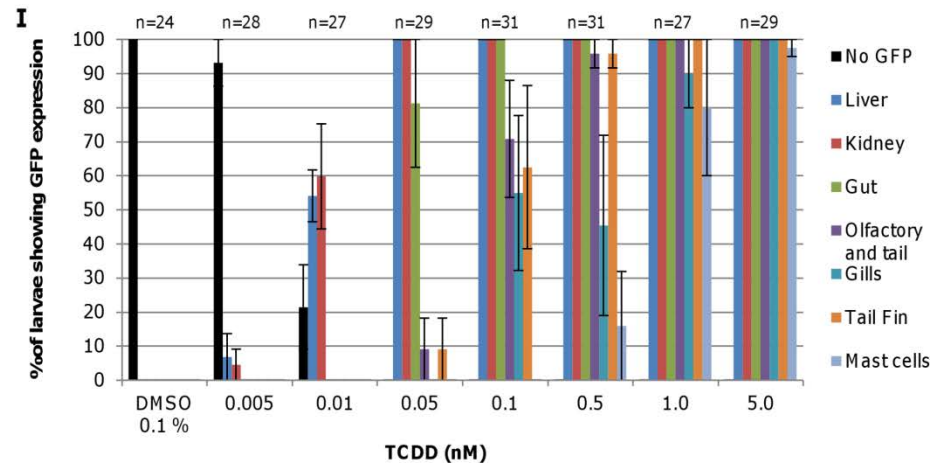
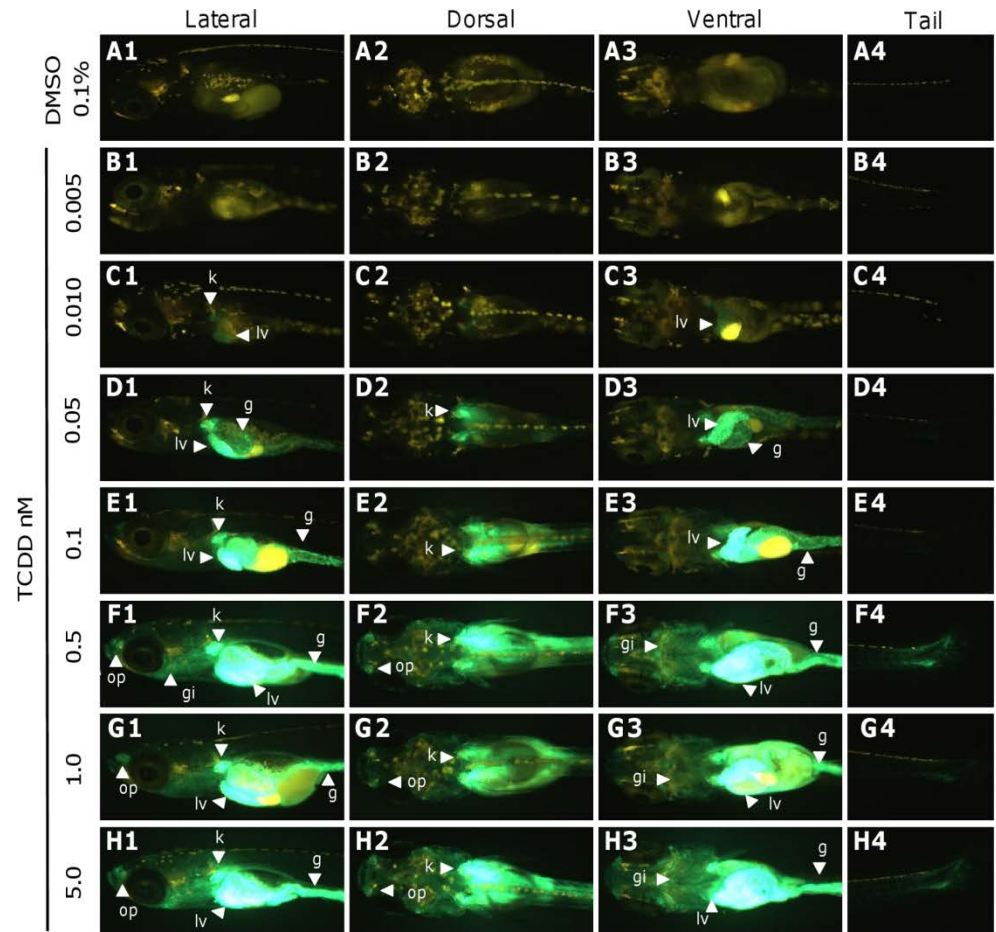
Transgenní ryby

- Hodně využívané druhy:
 - medaka japonská (*Oryzias latipes*), dánio pruhované (*Danio rerio*)
- geneticky modifikovány pro využití jako biosenzory environmentálních polutantů (např. estrogenů) s použitím promotoru indukovatelného estrogeny (promotor vitellogeninu), který reguluje expresi genu GFP (zelený fluorescenční protein)



GFP Transgenní Medaka (*Oryzias latipes*)

- s promotorem indukovatelným cyp1a induktory
- citlivý sensor a biologický indikátor přítomnosti TCDD a dalších persistentních organických látek



Transgenní bakterie/kvasinky běžně používány jako detektory znečištění životního prostředí a toxického potenciálu

– reporterové geny pod kontrolou promotorů, které reagují na přítomnost určitého typu látek

Detekce:

- Těžkých kovů
- Alkylfenolů, bisfenolu A
- Látek s aktivitou dioxinového typu
- Genotoxických látek
- Endokrinních disruptorů

