

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

Obecný postup klasické histologické metody (parafínová metoda)

- odběr materiálu
- fixace vzorků
- odstranění fixáže propíráním
- dehydratace
- prosycení rozpouštědlem parafínu
- prosycení parafínem
- zalití do parafínu
- řezání a lepení parafínových řezů
- odparafínování řezů
- rehydratace řezů
- barvení řezů, event. dehydratace
- 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
- **označení objektů** během jejich zpracování - cedulky z tvrdšího papíru popsané **obyčejnou tužkou** (na rozdíl od inkoustů per a fixů se nerozpouští), provázejí objekty během dalších kroků až k jejich zalití do média

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 **sloučeniny 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

Požadavky na fixaci

- zachování buněk a pletiv ve stavu co **nejbližšímu k živému stavu**
- optimální **zachování struktury** pletiva, buněk a organel **beze změny tvaru a objemu** - snížení strukturálních změn a změn chemického složení
- zafixování (upevnění) buněčných složek a materiálu v dané pozici, tak aby zde zůstaly i **během dalšího zpracování** = strukturální proteiny a jiné sloučeniny se musí změnit na nerozpustné ve všech reagentech, se kterými přijdou v průběhu celého procesu do styku
- zachování struktury buňky při co nejmenších chemických změnách, tak aby byla **zachována enzymatická aktivita** pro detekci enzymů, integrita epitopů pro imunodetekce, ...
- perfektní fixace = **jen teoretická**

Fixace

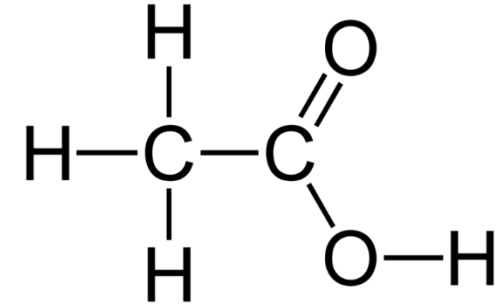
- fyzikální
 - vysoušení
 - vysoká teplota - koagulace bílkovin, tání tuků
 - chladová
 - „freeze drying“
 - „freeze substitution“
- chemická
 - **fixativa koagulující** - etanol, metanol, aceton, kyselina pikrová = denaturace bílkovin - změny sekundární a terciární struktury vyvolané koagulačními fixačními činidly ovlivňují funkci bílkoviny, snižují její rozpustnost, koagulace cytoplazmatických proteinů **ničí strukturu organel** (např. mitochondrie)
 - **fixativa nekoagulující** - nedochází ke koagulaci bílkovin, ale k jejich propojení chemickou vazbou - zachovávají se 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

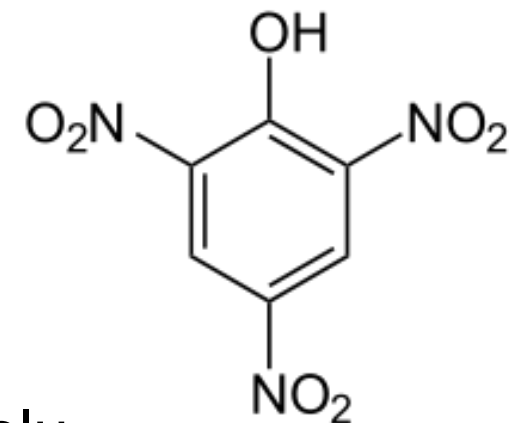


- proniká rychle
- koaguluje jaderný chromatin, ale plazmatické struktury poškozují, mechanismus fixace je nejasný
- pletiva zůstávají měkká - použití pro karyologická studia
- někdy je nahrazována vyšším homologem = kyselinou propionovou, která nemá tak negativní účinky na cytoplazmu
- 96% při 16,6°C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



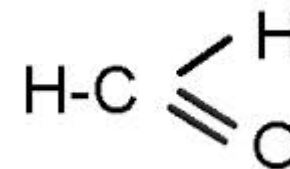
triviální název „ledová kyselina octová“

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

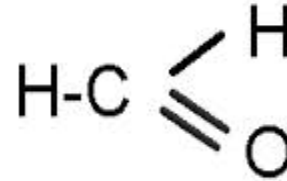


- 1859 syntetizoval chemik **Alexandr Butlerov**
- o 8 let později jej **Hoffman** potvrdil jeho definitivní chemickou strukturou
- vzhledem ke složitosti syntézy jej histologové těžko užívali před těmito objevy
- již koncem 19. století **Luis Pasteur** fixoval formaldehydem mozky lidí postižených vzteklinou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

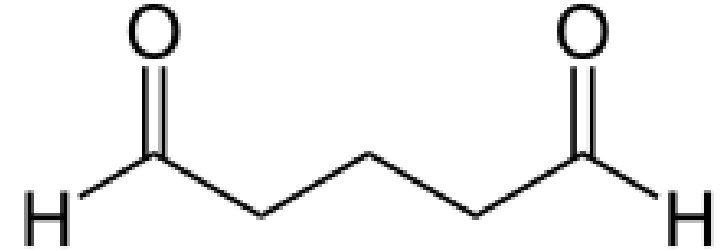


Formaldehyd

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



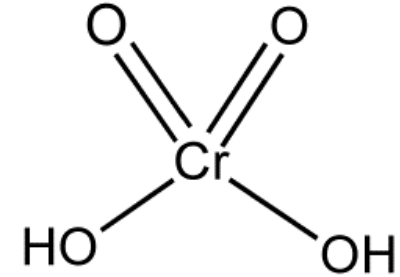
Glutaraldehyd



- 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
- proniká do pletiv **pomaleji**
- zesíťování bílkovin pletiva po fixáži GA je mnohem pevnější - způsobuje **větší tvrdost pletiv**

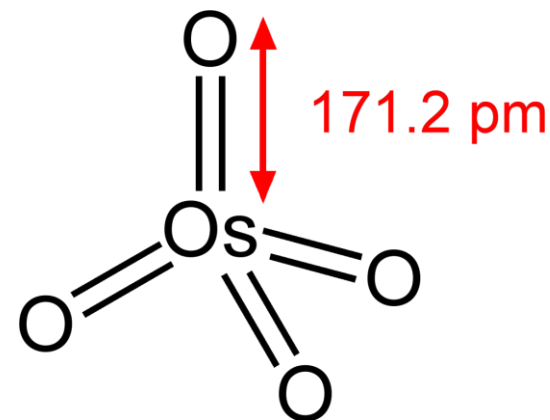
Karnovského fixáž = kombinace formaldehydu a glutaraldehydu v kakodylátovém pufru
http://en.wikipedia.org/wiki/Karnovsky_fixative

Kyselina chrómová



- **CrO₃**
- **koaguluje** hrubě proteiny a NK
- dobře fixuje **jádro**, **chromozomy** 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



- **OsO₄**
- **vysoce toxický**, nutno dodržovat bezpečnostní pravidla
- nejčastěji se používá při přípravě materiálu pro elektronovou mikroskopii - jako **postfixace po aldehydových fixacích** při zalévání do pryskyřice

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 (6 : 3 : 1)

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% CrO_3 (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 et al. 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	20	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

Faktory ovlivňující fixaci

- **teplota** - rychlost penetrace, rychlost chemických reakcí a to nejen reakce fixativa s komponenty buňky, ale i reakce spojené s metabolismem (autolyze, obranné reakce,....)
- často se používá pro citlivé aplikace **fixace při nízké teplotě 4°C**
- snížením teploty ale dojde i ke snížení rychlosti působení fixace
- v některých případech může vést působení nízké teploty k nežádoucím cytologickým změnám (např. **rozpad mikrotubulů**)

Faktory ovlivňující fixaci

- **pH** ovlivňuje komponenty buňky (např. konformaci bílkovin, stabilitu membrán)
- někteří autoři ukazují, že pH ovlivňuje spíše rychlost autolyze a destrukčních procesů než samotný průběh fixace (Johansen, 1940)
- ale např. rychlost reakce aldehydů s bílkoviny je citlivá k pH (nejefektivnější je obvykle při **pH 7 - 7,4**) (Pearse, 1980)
- u silně kyselých fixáží dochází k výraznému "rozpuštění" některých struktur (např. vakuol)
- optimální pH pro fixaci může být variabilní v rámci buněčných komponent (např. bílkoviny cytoplasmy x bílkoviny jádra) a proto se často používá hodnota blízko optima cytoplazmatických bílkovin, tj. okolo **pH 6,8**

Faktory ovlivňující fixaci

- **používané pufr**y - koncentrace pufru by neměla vyvolávat výrazné osmotické změny
- pufr nesmí reagovat s fixačním činidlem (např. TRIS nebo EDTA obsahují aminoskupiny které reagují s aldehydy)
- nejčastěji používané jsou:
 - fosfátový pufr (0,025 - 0,1M při pH6,8),
 - HEPES (0,05M, pH7),
 - PIPES
- **čas** - doba fixace určuje množství vzniklých vazeb a efektivitu fixace (např.změny aktivity peroxidázy po různých dobách fixace formaldehydem)

Faktory ovlivňující fixaci

- **rychlost pronikání fixace** - spolu s rychlostí reakce vedoucí k fixaci určuje celkovou rychlost fixace objektu
 - závisí na teplotě, typu fixační látky (např. formaldehyd proniká výrazně rychleji než glutaraldehyd)
 - velikosti a povaze objektu (obtížně proniká impregnovanými vrstvami, kompaktním pletivem, naopak snadno parenchymatickým pletivem s bohatými intercelulárami)
- **dostatečné množství fixáže** - zabrání vyčerpání fixující látky a jejímu naředění přidáním objektu; větší objem znáze pufruje změny, obvykle udávané množství se podle autorů pohybuje mezi 20-100x objemu pletiva

Vypírání fixáže

- většina fixativ vyžaduje vyprání z objektu před dalším zpracováním
- k vyprání se používá pufr, nebo roztok použitý během fixace (samozřejmě bez fixativa)

Dehydratace

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

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 24 hod.

nutno použít intermédium = **xylene**

Dehydratace butanolovou řadou

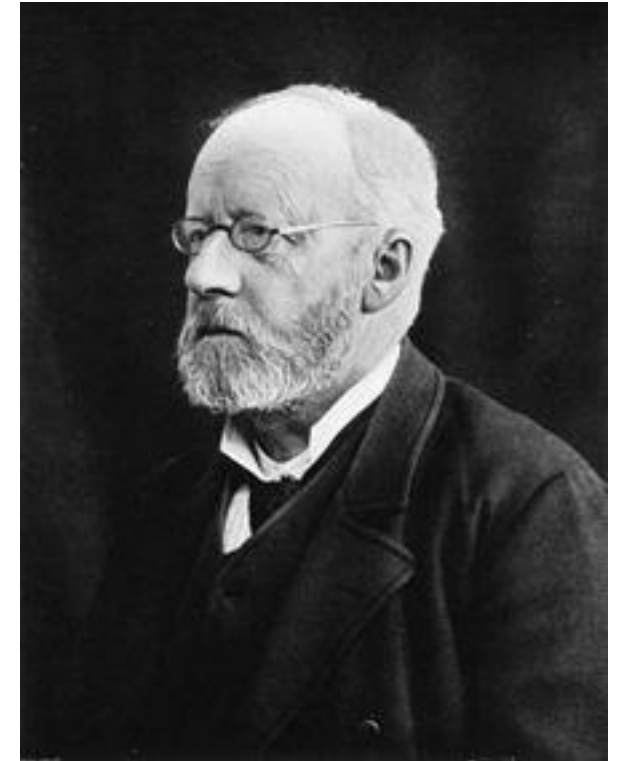
stupeň	% EtOH	% ButOH	% vody
I	20	10	70
II	25	15	70
III	30	25	45
IV	30	40	30
V	25	55	20
VI	20	70	10
VII	15	85	0
VIII	0	100	0

butanol je, narozdíl od etanolu,
rozpouštědlem parafínu

po fixaci 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 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

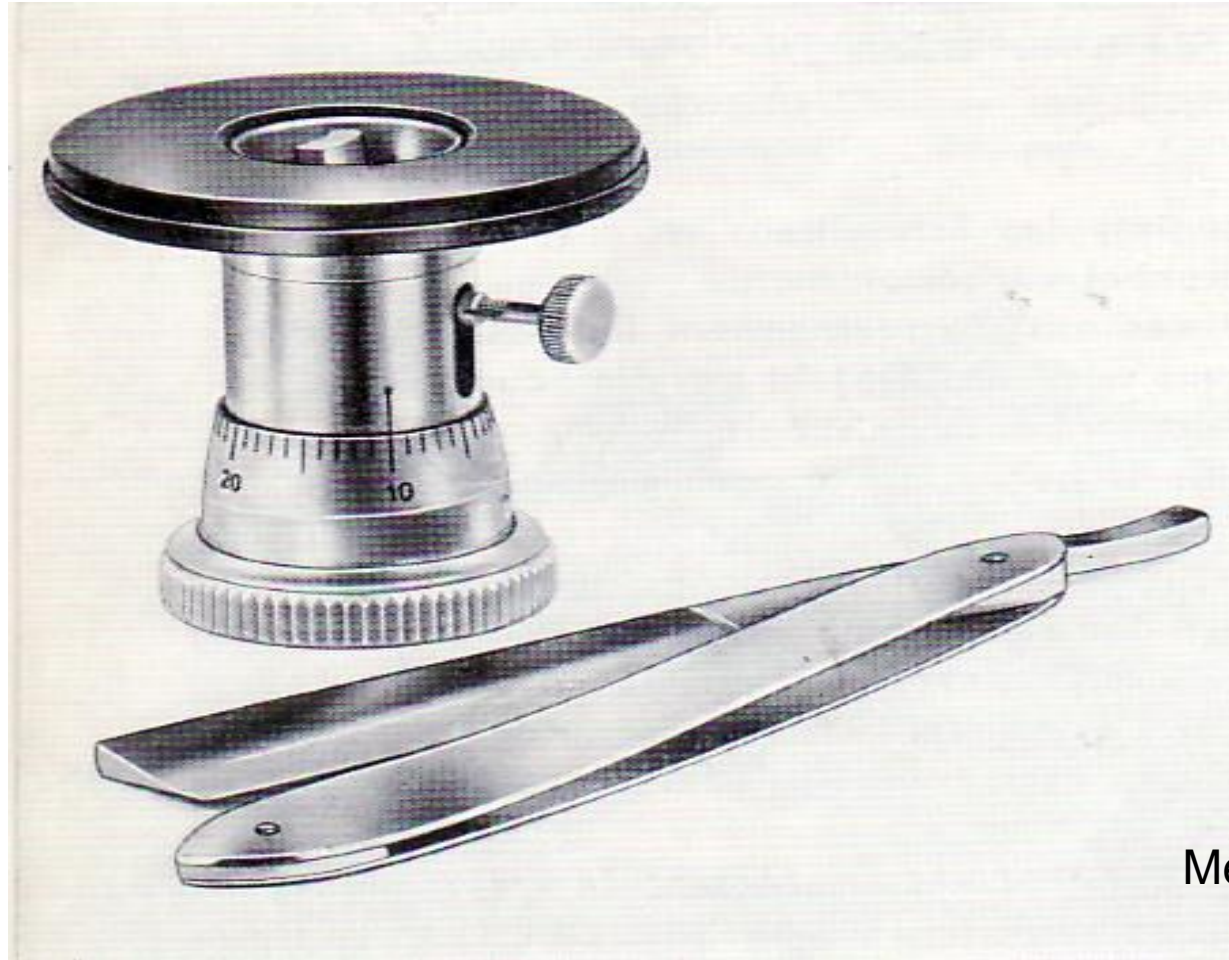


Theodor Albrecht Edwin Klebs
(1834 –1913)

Krájení řezů

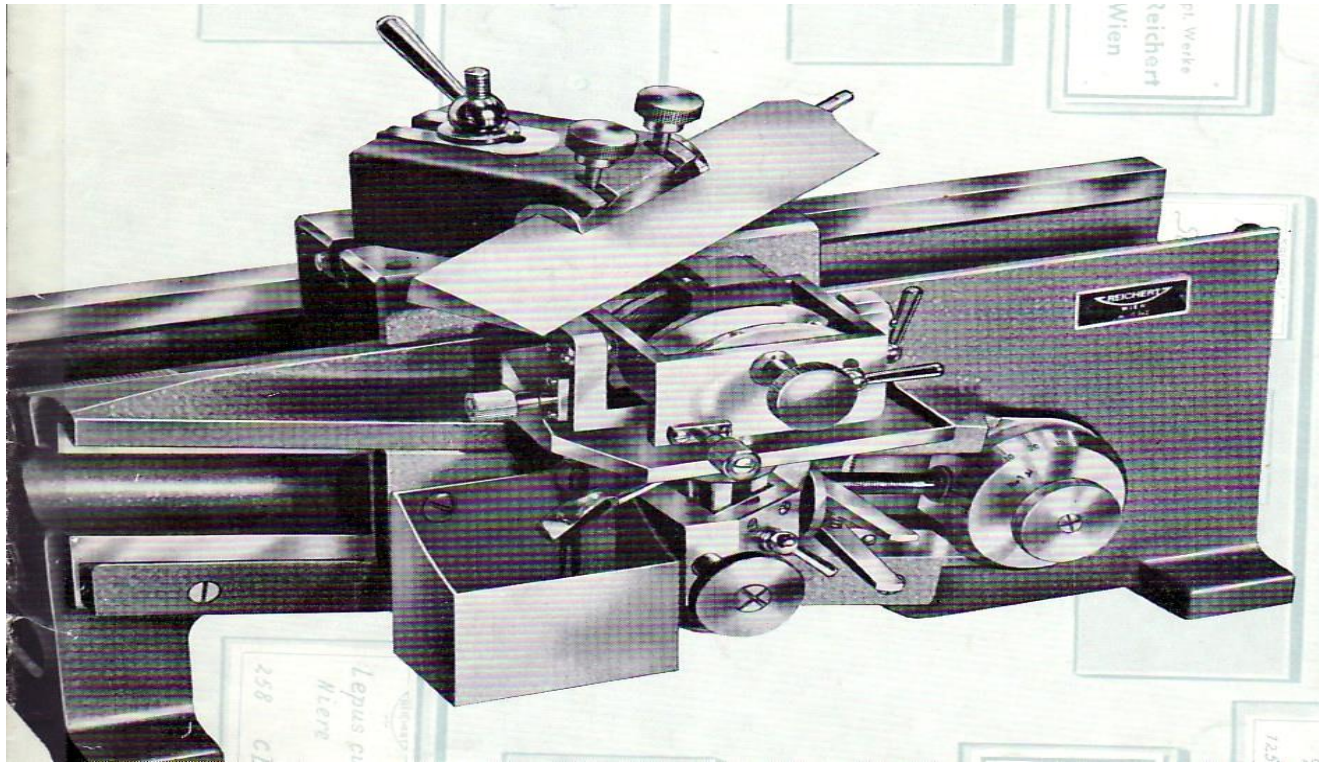
- vývoj krájecích přístrojů (J.E. Purkyněm nazvaných **mikrotomy**) nastal ve druhé polovině 19. stol.
- prvním mikrotomem byla dobře **nabroušená břitva** - v jedné ruce se držel bloček, pro bezpečnost zanořený např. do korkové zátky, a v druhé ruce břitva
- **ruční mikrotomy** se posléze zdokonalily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

Ruční mikrotom

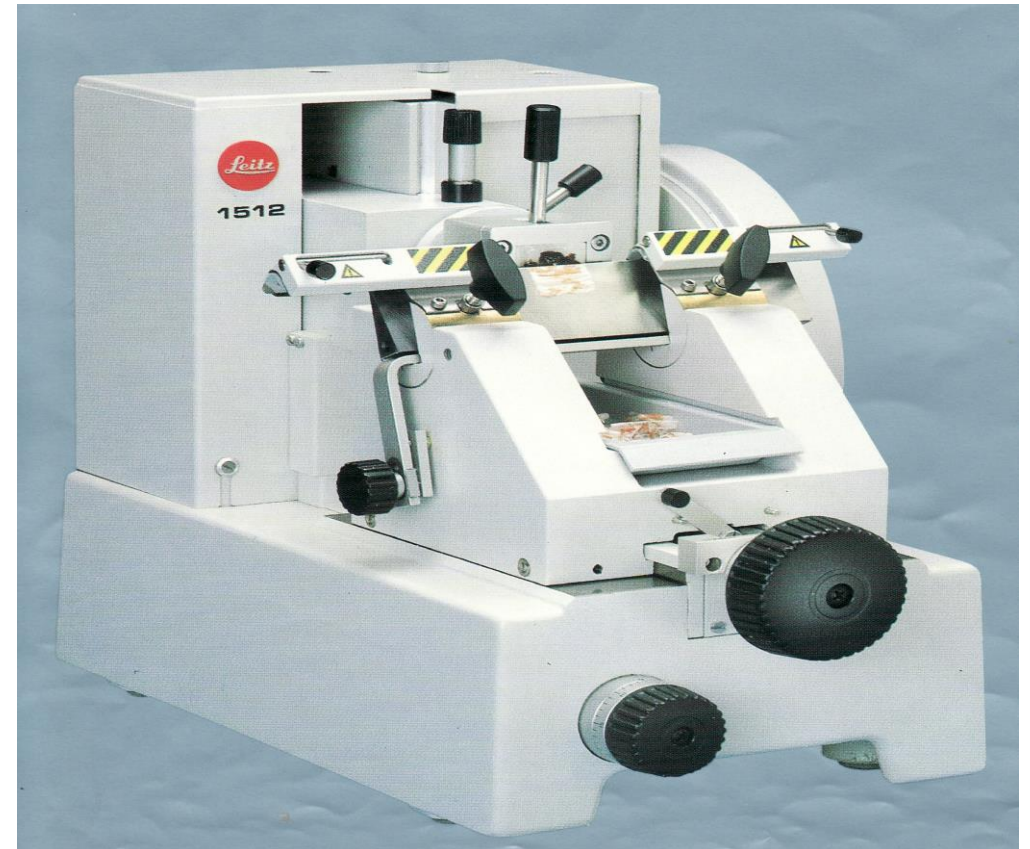


Meopta Praha

Mikrotomy strojové



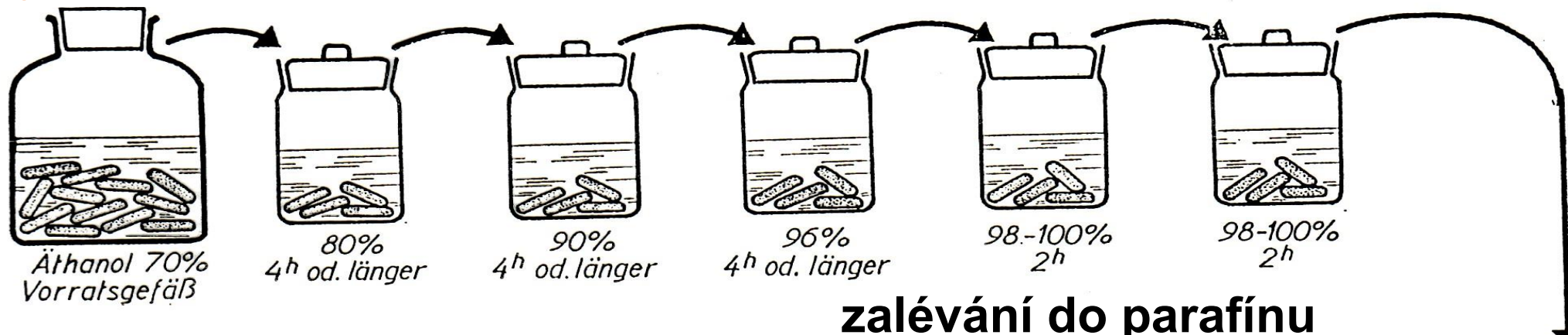
sáňkový mikrotom Reichert



rotační mikrotom Leitz

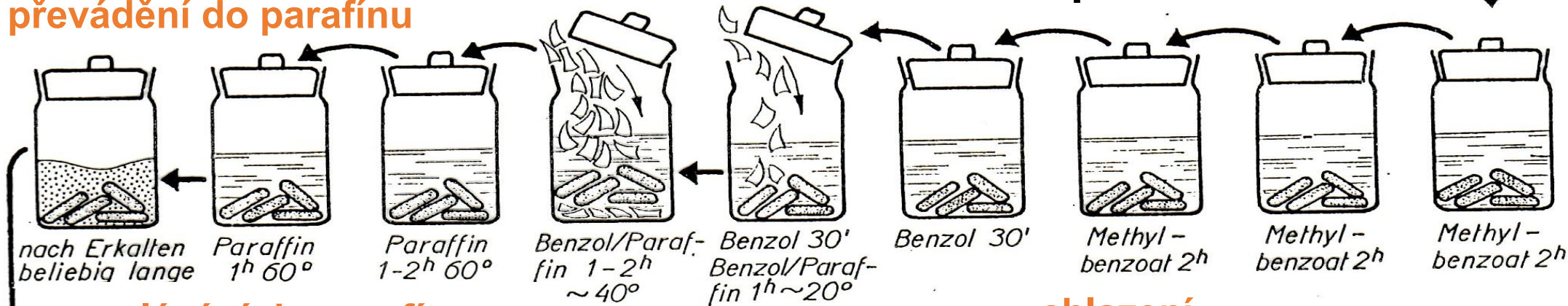
dehydratace

Braune et al. 1982



zalévání do parafínu

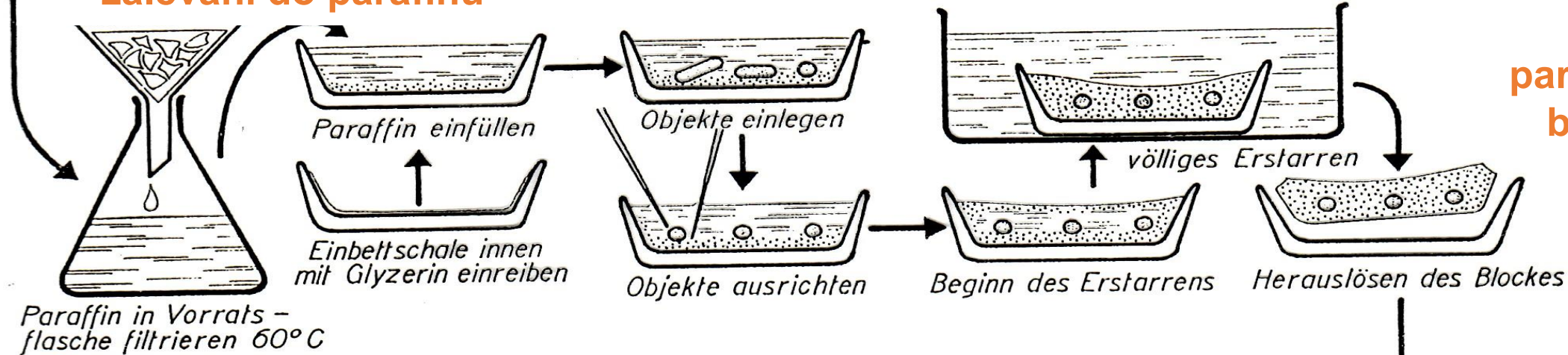
převádění do parafínu



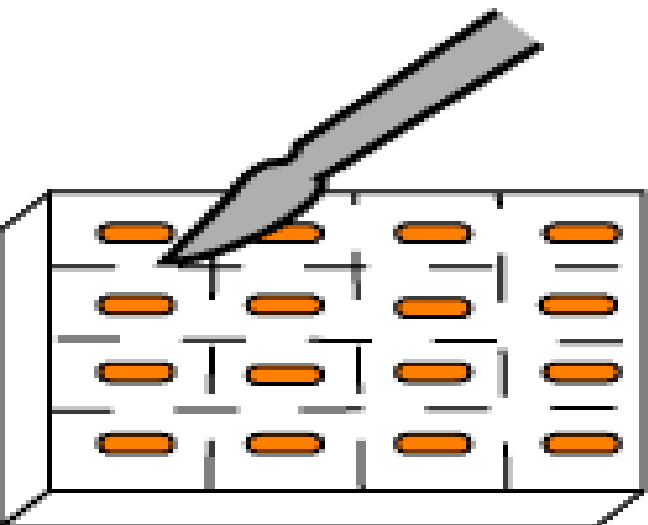
zalévání do parafínu

chlazení

parafínový bloček



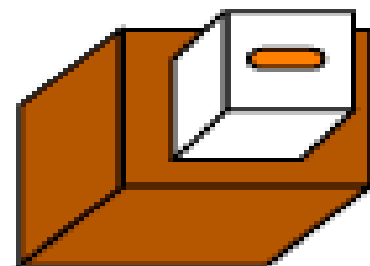
Příprava bločku ke krájení



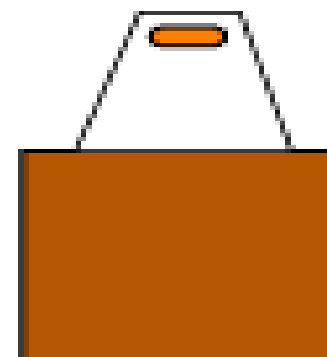
**dělení bloku
parafínu**



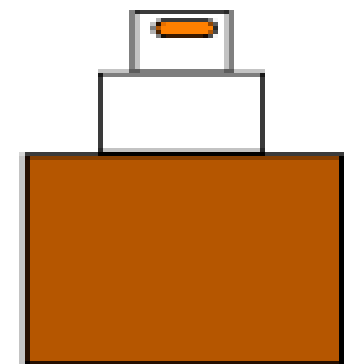
**izolovaný bloček
parafínu**



**přítavení bločku
parafínu na dřevěný
špalík**

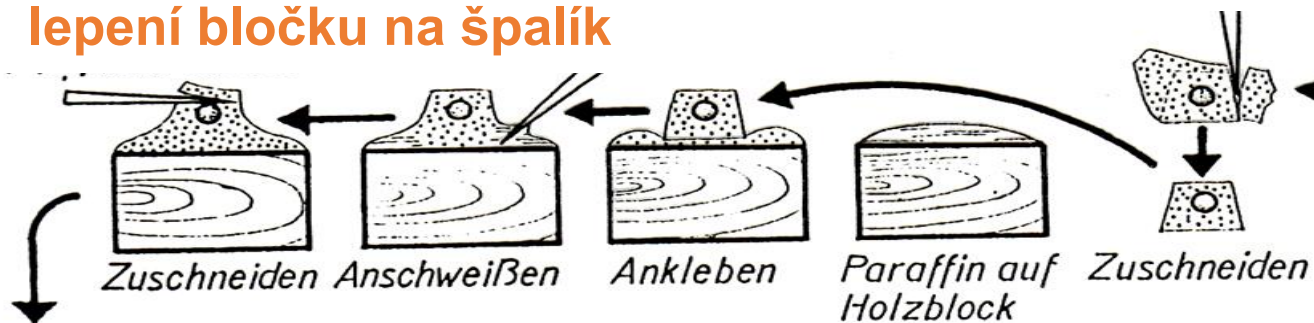


**trimování bločku
parafínu**

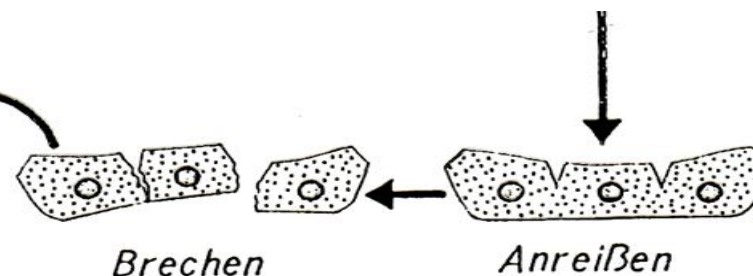


Krájení parafínových řezů

lepení bločku na špalík



rozdělení na bločky



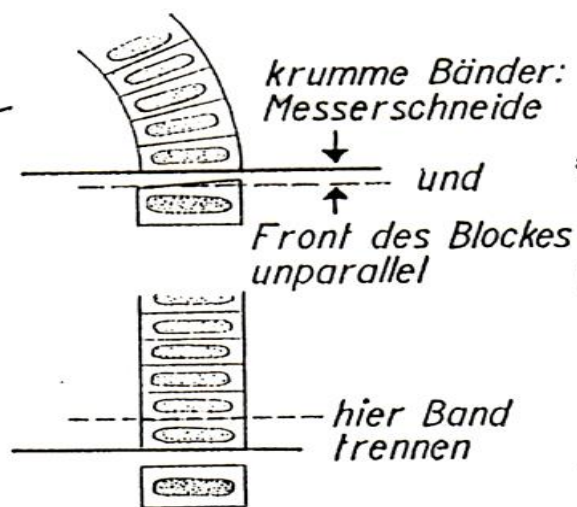
krájení řezů

Messerstellung:

richtig

zu flach

zu steil



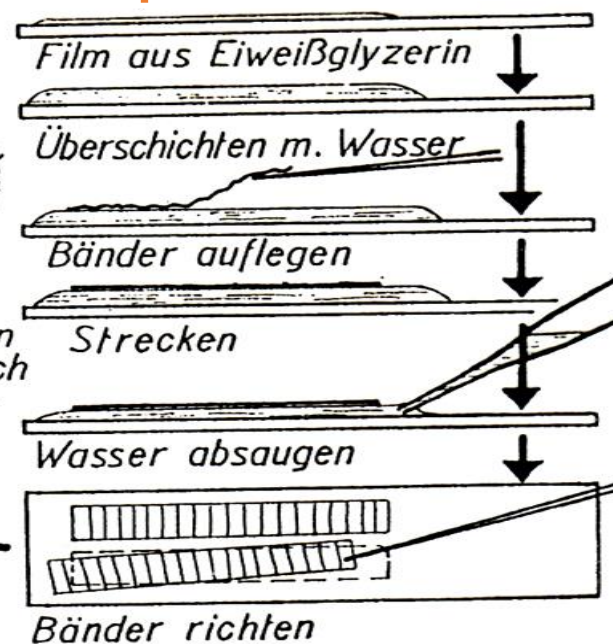
richtig

Schnitte zu dick Paraffin zu hart Raumtemperatur zu niedrig

Schnitte zu dünn Paraffin zu weich Raumtemperatur zu hoch

in den Trockenschrank (~ 50° C)

lepení řezů



Fixace vzorků 2011

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

Skleněné a porcelánové kyvety s víčkem



Hellendahl



Coplin



na 6 skel



Schiefferdecker



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)

rozklad bílého světla
po průchodu hranolem

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 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. **teorie π – el. páru**

Dělení barviv podle původu

- přírodní

karmín - červec nopálový

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

hematoxylin - dřevo kampešky (*Haematoxylon campechianum*)

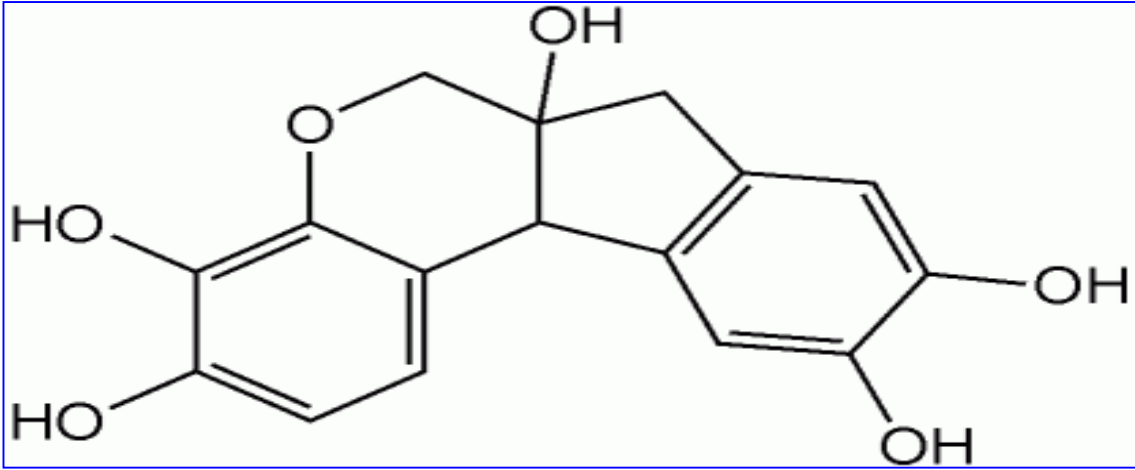
brasilin - dřevo druhů rodu *Caesalpinia* (*Caesalpinia sappan*, *C. brasiliensis*)

indigo - *Indigofera tinctoria*, *Isatis tinctoria*

juglon - listy, kořeny, kůra *Juglandaceae*

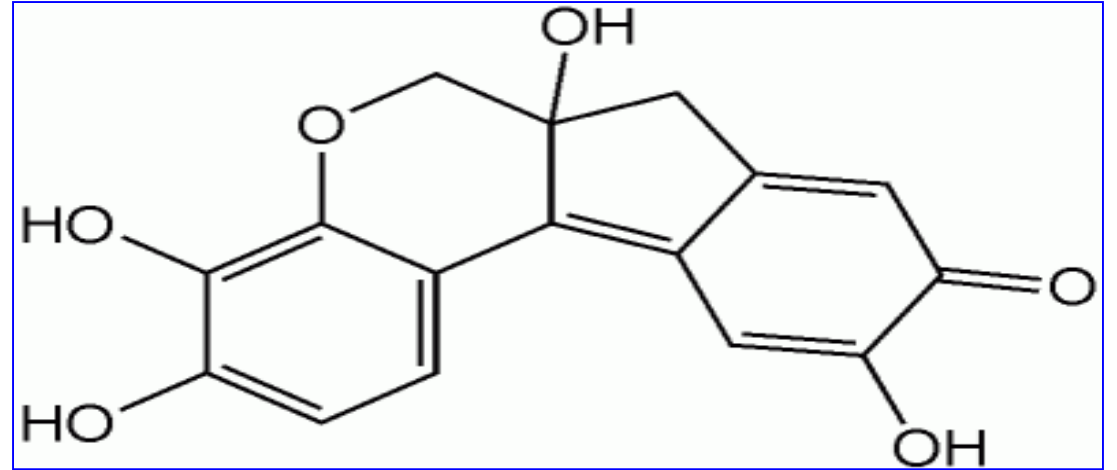
- syntetická

Hematoxylin a hematein



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

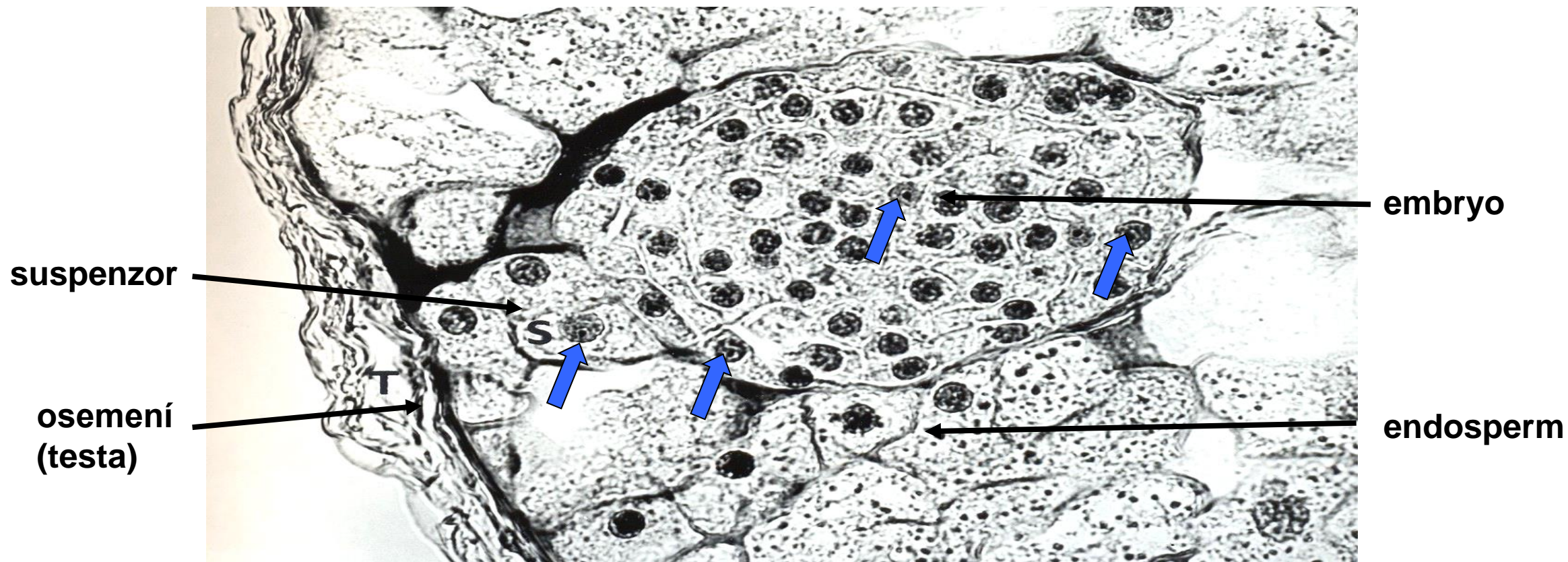
Natural Black 1 nebo C.I. 75290



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

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

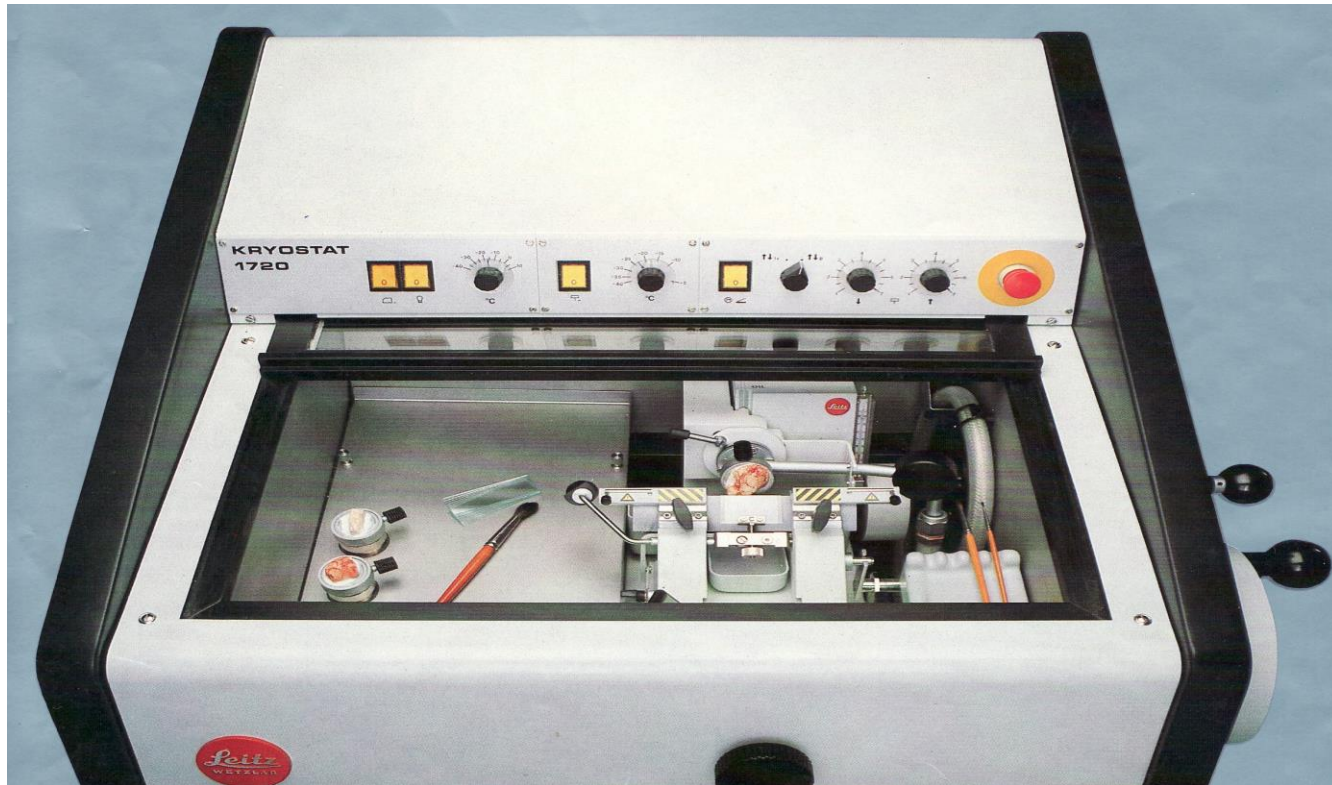
Podélný parafínový řez semenem sněženky *Galanthus nivalis* L.



regresivní barvení **Heidenheinovým železitým hematoxylinem**

optimální diferenciace = v jádách buněk embrya i endospermu jsou patrná tmavěji zbarvená jádérka, Fe^{3+} jako mořidlo

Kryostat



mikrotom pro přípravu řezů zmrazených objektů

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 a diferencujeme (**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 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, 5 - 15 min.
4. opláchnutí destilovanou vodou
5. odvodnění alkoholovou řadou
6. převod do xylenu
7. uzavření do Eukittu

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

Lepení řezů

- 1890 – Mayer: glycerol – bílek + fenol (thymol)
- chromová želatina („gelatin and chrome alum“)
- poly-L-lysin
- podložní skla SuperFrost Ultra Plus® - (pevný elektrostatický náboj) není nutno používat jiná adheziva
- sušení řezů na teplé ploténce

Montáž řezů

- nabarvené řezy je ještě potřeba zakonzervovat pod podložním sklem - říkáme „**zamontovat**“
- 1844 - **J. E. Purkyně** a jeho asistent **A. 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** (Eukitt®)

<http://ziva.avcr.cz/jan-evangelista-purkyne.html>

Odkazy na zajímavé stránky

O'Brien et al. (1964) Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by **Toluidine Blue O**

Parker et al. (1984) Toluidine Blue: A Simple, Effective Stain for Plant Tissues

<https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-toluidina.php>

<https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/6-tecnicas/1-introduccion.php>

<https://conductscience.com/safranin-staining/>

<https://www.plantintroduction.org/index.php/pi/article/view/1587> (safranin a astra blue)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4186213/> (srovnání metod detekce ligninu)

Liljegren S. **Phloroglucinol** Stain for Lignin. Cold Spring Harbor Protocols. 2010 (lignin)

<https://www.ableweb.org/biologylabs/wp-content/uploads/volumes/vol-19/9-yeung.pdf> (A beginner's guide...)

encyklopedie

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

