

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, chemické a fyzikálně-chemické**

Fyzikální fixační prostředky - ovlivňují transportní funkci vody a tím naruší enzymaticky katalyzované reakce v buňkách

1. fixace působením nízké teploty: rychlé zmrazení, "suchý led", tekutý dusík
2. fixace vysušením tkáně za nízké teploty (freezing-drying): mrazová sublimace (histochemie – průkaz aktivity enzymů)
3. Fixace mikrovlnným zářením

Chemické fixační prostředky – založeno na působení par nebo roztoků účinných látek (fixačních tekutin), které ve vhodné koncentraci vyvolávají jemnou a šetrnou denaturaci enzymových proteinů

Fyzikálně chemické metody – kombinace obou předchozích (např. chlazená fixační tekutina – etanol vymražený v -20°C)

Požadavky na fixaci

- Musí rychle působit v celém vzorku
- Musí co nejlépe zachovat strukturu buňky, tkáně, orgánu, celého objektu
- Musí zachovat další požadované zpracování (vyšetření, barvitelnost) vzorků

Fixujeme

- pokud možno živé objekty (buňky, tkáně, organizmy)
- přiměřeně velké vzorky menší živočichy fixujeme celé
- větší živočichy před fixací narkotizujeme (éter, chloroform, hmyz zchladíme)
- dostatečné množství fixační tekutiny - až 5x větší objem
- Vzorek nesmí plavat, ani se přilepit ke dnu
- řádně uzavřít, řádně popsat

Chemické fixační prostředky

Etanol, metanol, aceton - Extrahují lipidy a tkáň po nich značně ztvrdne a smrští se. Používají se většinou ve směsích

Organické kyseliny - Octová, trichloroocetová 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.

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, které ho znehodnocují a mohou způsobit nekvalitní fixaci. 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 (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, tkáň se dehydratuje, extrahují se 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 vzniká oxidací formaldehydu kyselina mravenčí (změna pH, poškození tkáně), uchovávání v hnědých lahvích
- výhody: dobře sráží bílkoviny, dobře proniká, dobře konzervuje, levný, jednoduchá příprava i v terénu

Kyselina octová (100%)

- krystalizuje při 17° C → ledová k. 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

- směs nasyceného vodného roztoku k. pikrové, 30% formaldehydu a k. octové→žlutá barva (k. 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

AFA

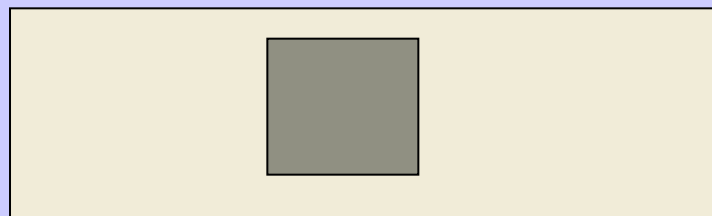
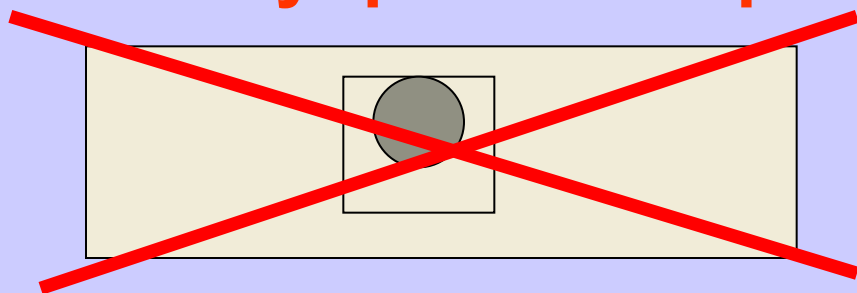
Davidsonova fixáž

Uzavírací média

Funkce:

- pozorovací prostředí (průhledné, bezbarvé, optimální index lomu)
- konzervace (zabraňuje rozkladu objektů)
- zachování zbarvení (nesmí odbarvovat nabarvené preparáty)

musí být pod celou plochou krycího sklíčka !!!



Rozdělení

s vodou mísitelná

- glycerol
- glycerin-želatina
- Liquido-Faure

s vodou nemísitelná

- Kanadský balzám
- Dammara
- syntetické pryskyřice

Uzavírací média s vodou mísitelná

- montování neobarvených objektů, které vyžadují 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 (např. 4% formaldehyd) 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 - **rámujeme**

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
- **rámuje**

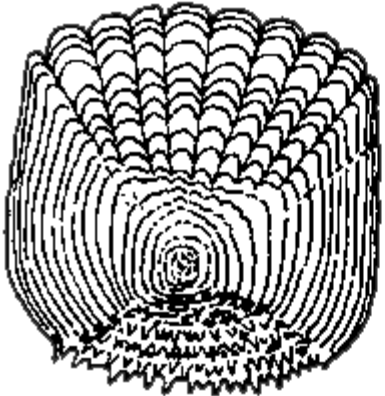
Liquido-Faure

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, koryši



ktenoidní



cykloidní

glycerol - šupiny ryb - rámovat

Přenést šupinu na podložní sklo (je převedená v glycerolu)

dokápnout glycerol

Přikrýt krycím sklíčkem - rámovat



glycerol- želatina: rámovat – chvostoskoci jsou v glycerolu, přenést aspoň 5 jedinců na podložní sklo, zakápnout rozehrátou glyc.-žel., přikrýt krycím sklem - rámovat



chvostoskok *Podura aquatica*

Liquido-Faure:

Varroa destructor – fixace 70% etanol
nejdříve kapka média, rychle přenést objekt, ponořit do média a orientovat ho, přikrýt krycím sklem –
nerámuje se
sušit v termostatu při 40°C

