



Centrum pro výzkum  
toxických látek  
v prostředí

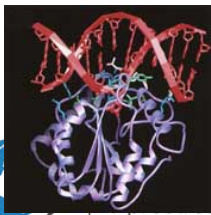
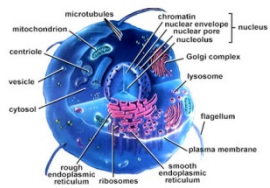
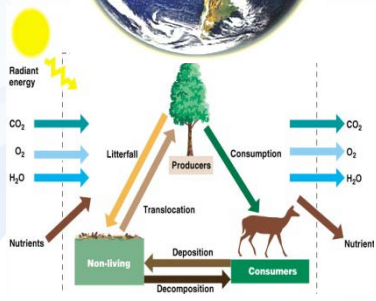
# Biomarkery a histologické analýzy v biotestech a v terénních studiích

## Klára Hilscherová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovace tohoto předmětu je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



pro výzkum  
látek  
di

Biosféra

Ekosystém

Společenstvo

Populace

Jedinec

Soustava orgánů  
Orgán  
Tkáň  
Buňka  
Organela  
Biomolekula

**NÍZKÁ**

**VYSOKÁ**

Ekologická  
relevance  
Trvání odpovědi  
Dlouhodobější  
následky

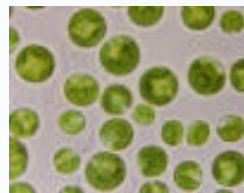
Flexibilita  
Schopnost určit  
příčinu  
Specifita  
Citlivost

**VYSOKÁ**

**NÍZKÁ**

# BIOMARKERY

- Časné varovné signály potenciálního poškození organismu i celé populace, časný marker toxicity (*i bez morfologických změn*)
- Vybrané parametry, jejichž měřitelné změny jsou prvními, časnými odpověďmi na expozici cizorodými látkami („early warning of biological impact“).
- Cizorodými látkami způsobené změny buněčných nebo biochemických složek, struktur, nebo funkcí, které jsou měřitelné v biologickém vzorku
- Citlivé, rychlé odpovědi, mohou ukazovat mechanismus účinku, předcházejí viditelným symptomům toxicity
- Nejlépe prostudovány u vyšších živočichů (savců, ryb)
- Možno sledovat i u druhů ze standardních akvatických biotestů (řasy, makrofyta, bezobratlí)



# Biochemické markery

- screeningové metody s vysokou predikční schopností, alternativa/doplnění ke stávajícím metodám.
- používány v základním toxikologickém, ekotoxikologickém a farmakologickém výzkumu, v medicínské diagnostice.
- některé obecně akceptovány.
- řada parametrů testována jako potenciální biochemické markery.
- potenciál využití jako alternativní metody pro toxikologické hodnocení nových xenobiotik.

Výhoda biologických a biochemických indikátorů kontaminace: schopnost vypovídat o vlivu znečištění v celém jeho komplexu, se všemi synergistickými a antagonistickými vlivy mezi jednotlivými znečišťujícími komponenty.



# Biochemické markery

**Princip:** toxické látky v subletálních koncentracích způsobují změny hodnot hematologických, biochemických ukazatelů, nespecifické imunity, vyvolávají histopatologické změny v tkáních.

Po vstupu cizorodých látek do organismu či buňky dochází:

- k jejich vazbě na buněčné receptory kontrolující klíčové buněčné pochody,
- ke vzniku reaktivních intermediátů,
- k inhibici určitých enzymových aktivit a dalším procesům, které předcházejí toxickým a dalším negativním efektům na úrovni buňky, orgánů, organismů a populací.



# Biochemické markery toxicity

- indikují mechanismus toxicity, nikoliv určitou cizorodou látku.
- některé biochemické parametry specificky odrážejí expozici některou třídou nebo skupinou kontaminantů.
- biologickými modely jsou nejčastěji jaterní tkáň, i další tkáně dle typu biomarkeru a cíle studie, primární hepatocyty nebo permanentní linie odvozené od hepatocytů, případně odebraná krev či jiné tělní tekutiny
- Vhodně zvolené biomarkery jsou významnými indikátory zdravotního stavu organismů v monitorovaném ekosystému.
- Předností je schopnost detekovat toxické účinky látek před manifestací jejich účinku, tzn. před narušením fyziologických funkcí jako např. růstu, vývoje, reprodukce.



**Biomarkery** = biochemické či fyziologické indikátory expozice nebo vlivů xenobiotik na suborganismální nebo organismální úrovni

**Výhoda: odpovídají na expozici = reagují pouze na polutanty dostupné pro organismus.**

Vhodné biomarkery by měly splňovat následující vlastnosti:

- (i) senzitivní ve srovnání s ostatními biomarkery;
- (ii) specifická ke konkrétním druhům chemických xenobiotik;
- (iii) permanentní odpověď;
- (iv) jasnost v interpretaci a propojení na vlivy vyšší úrovně;
- (v) spolehlivost, reprodukovatelnost;
- (vi) preciznost, jednoduchost a nízké náklady;
- (vii) aplikovatelnost v terénních podmínkách a validace v terénu

# BIOMARKERY EXPOZICE

- identifikují látku v systému a interaktivní produkt mezi xenobiotikem a endogenní složkou nebo jiné skutečnosti v biologickém systému způsobené expozicí.
- charakterizují množství toxikantu, které proniklo do organismu
- neposkytují příliš informací o následcích expozice, různě specifické

# BIOMARKERY ÚČINKU-VLIVU

- biochemické změny, které se projevily jako výsledek negativní interakce toxikantu a biologického systému a mohou vyústit až v patologické poškození organismu





# Biomarkery expozice

## I. Stresové proteiny (proteiny teplotního šoku)

- nespecifické, indukovatelné u rostlin i živočichů

## II. Inhibice esterázové aktivity (acetylcholinesterázy)

- enzym nervového systému živočichů, specifická odpověď
- po expozici organofosfátových pesticidů a karbamátů
- primární toxický vliv těchto látek, stupeň inhibice enzymů je v úzkém vztahu k expozici tkání

Acetylcholinesteráza (AChE): zejména v mozku, červených krvinkách a plasmě některých obratlovců, zodpovědná za hydrolýzu acetylcholinu, hlavního přenašeče nervových vzruchů mezi nervovými buňkami. Její inhibice silně ovlivňuje přenos nervových signálů.

## III. Metalothioneiny

- cytoplasmické kovy-vážící proteiny, vyskytují se u řady eukaryot, indukce po expozici kovy, biomarkery vlivu toxických kovů.
- skupina proteinů s nízkou molekulovou hmotností, vysokým obsahem aminokyselin obsahujících sulfhydrylové skupiny (zejména cystein) a schopností vázat těžké kovy. K jejich zvýšené syntéze dochází při zvýšené koncentraci iontů kovů, jak esenciálních, tak toxických



# BIOMARKERY EXPOZICE

## IV. Indukce detoxikačních enzymů u rostlin i živočichů

A. Enzymy I. fáze biotransformace – enzymy MFO (monooxygenázy smíšené funkce) – indukce enzymů cytochromu P450 (EROD, MROD, PROD)

**cytochrom P4501A** - biomarker expozice důležitých skupin organických látek

- hladina cytochromu indukována 2,3,7,8-tetrachlodibenzo-p-dioxinem a příbuznými látkami, PCB, PAH
- cytochromy P450 (CYP) jsou hemoproteiny schopné vázat molekulární kyslík a vsunovat jeho jeden atom do molekuly substrátu, kterým mohou být i cizorodé látky, které jsou jedním nebo více cytochromy přeměněny tak, aby mohly být z organismu např. exkretovány.

B. Enzymy II. fáze biotransformace – glutathion transferázy (GST), uridinedifosfoglukuronosyl transferázy, sulfotransferázy



# Biomarkery účinku

- I. **Parametry oxidativního stresu** - produkce kyslíkových radikálů, aktivita antioxidantních enzymů, koncentrace neenzymatických antioxidantů, oxidativní poškození makromolekul
- II. **Parametry energetické bilance organismu** – obsah lipidů, proteinů, uhlovodíků a aktivita elektronového transportu
- III. **Indikátory narušení metabolismu** - metabolické enzymy pyruvát kináza, laktát dehydrogenáza, isocitrát dehydrogenáza
- IV. **Biomarkery zatížení endokrinního systému** - vitelogenin, hormony T3 a T4, enzymy metabolismu steroidních hormonů.
- V. **Genotoxické biomarkery** (narušení integrity DNA – zlomy v DNA, mikrojadérka)
- VI. **Histologicko-patologické změny některých orgánů**



# BIOMARKERY ÚČINKU

## Parametry oxidativního stresu

- produkce kyslíkových radikálů – superoxid, peroxid vodíku, hydroxylový radikál
- aktivita antioxidantních enzymů – glutathion peroxidáza, glutathion reductáza, superoxidáza, kataláza
- koncentrace neenzymatických antioxidantů
- oxidativní poškození makromolekul – lipidní peroxidace, oxidativní adukty DNA, produkty oxidace proteinů

Jedná se biomarkery organochlorových pesticidů, PCB, pesticidů typu paraquat apod.

**Genotoxické biomarkery** (narušení integrity DNA – zlomy v DNA, mikrojadérka) - využívány při hodnocení zatížení ekosystémů látkami s genotoxickým účinkem, které indukují vznik chromosomálních aberací a mutací.

alternativa detekce - metody PCR, RT-PCR a DNA-fingerprintingu, test mikrojadér, kometový test

Test mikrojadér (MNT) - jednoduchá orientační metoda ke stanovení genotoxicity. Pozitivní po působení PCB, benzpyrenu, benzidinu, apod.

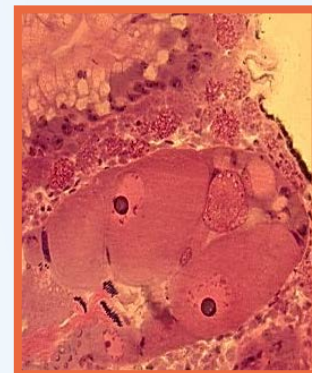


# Biomarkery účinku na endokrinní systém

## Stanovení produkce vitelogeninu

- Vitelogenin je bílkovina produkovaná jaterními buňkami ryb, obojživelníků, plazů a ptáků.
- Produkce je indukována vazbou estrogenů na jaderné receptory.
- U samic je vitelogenin transportován do vaječnicků, kde tvoří součást žloutkových proteinů.
- U samců je hladina endogenních estrogenů přirozeně velmi nízká, a proto je i produkce vitelogeninu minimální
- Po působení ED's s xenoestrogenním účinkem (např. ethinylestradiol, chlordan, toxafen, dieldrin, 4-nonylfenol) dochází u obou pohlaví ke zvýšení hladin vitelogeninu – výrazné zejména u samců
- Naopak působením antiestrogenních ED's (např. metoxychloru) se produkce vitelogeninu minimalizuje pod měřitelnou úroveň.
- Sledován zejména u ryb a obojživelníků

Další parametry: vitelin, cytochromy, hladiny hormonů  
Histochemická charakteristika a lokalizace



# Doporučené metody pro biologické monitorovací programy ve vodním prostředí na národních úrovních

Metoda	Organismus	V současnosti používán v monitorovacích programech	Biomarker látek	Biologický význam
Tvorba DNA aduktů	Ryby, mlži	Francie, Holandsko, Švédsko, USA	PAU, nitro látky, aminotriazinové pesticidy	Parametr genotoxických vlivů, citlivý indikátor minulé a současné expozice
Inhibice acetylcholinesterázy	Ryby, koryši, mlži	Francie	Organofosfáty a karbamáty nebo podobné molekuly, možné řasové toxiny	Parametr expozice
Indukce metallothioneinů	Ryby	Monitoring and Research Programme of the Mediterranean Action plan, Holandsko	Indukce metallothioneinových proteinů vlivem určitých kovů (Zn, Cu, Cd, Hg)	Parametr expozice a disturbance metabolismu mědi a zinku
Indukce ethoxyresorufin-O-deetylázy (EROD) nebo cytochromu P450 1A	Ryby	Německo, Francie, Holandsko, UK, Belgie, Monitoring and Research Programme of the Mediterranean Action plan, Norsko	Indukce enzymů detoxikujících planární organické kontaminaty (PAU, planární PCB, dioxiny)	Možný prediktor patologie vlivem mechanistických propojení, senzitivní indikátor současné expozice
Inhibice $\Delta$ -amino levulinové kyselina (ALA-D), indukce vitellogeninu	Samci a juvenilní jedinci ryb	Holandsko, UK	Estrogenní látky	Parametr feminizace samčích ryb a reprodukční poškození

# Biomarkery - závěry

- Biomarkery = citlivé indikátory zatížení organismů environmentálními stresory a subletálních účinků
- Umožňují náhled do subletálních fyziologických procesů – charakterizují mechanismus účinku
- Specifické markery – informují o přítomnosti specifického stresoru
- Použitelnost určitého biomarkeru pro každý nový druh musí být validována a optimalizována, musí být posouzena jeho relevance a míra odpovědi pro nový druh
- Nezbytný multiparametrický přístup
- Studium spojení časných subletálních biochemických a buněčných změn s dlouhodobějšími negativními účinky na úrovni populace a společnosti



# 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 eko/toxikologii:

- 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

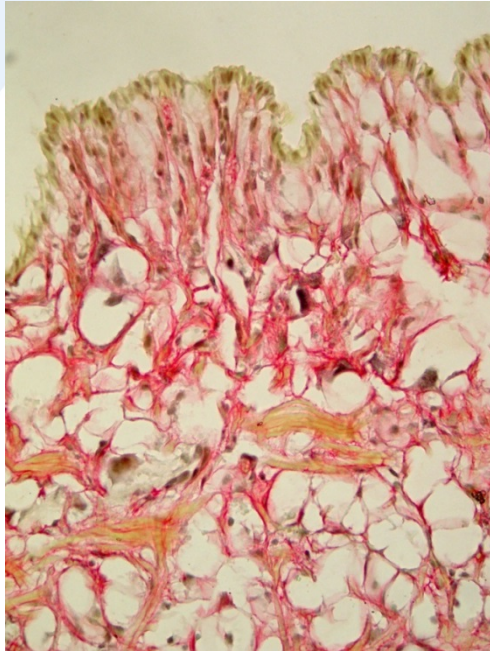
(jater, gonád, plic, ústního ústrojí)





# 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

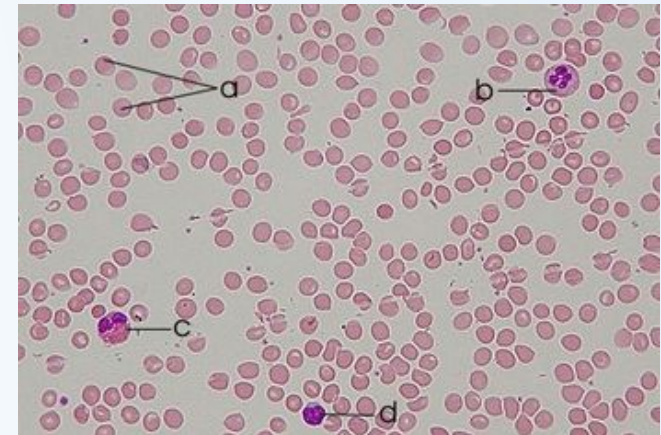
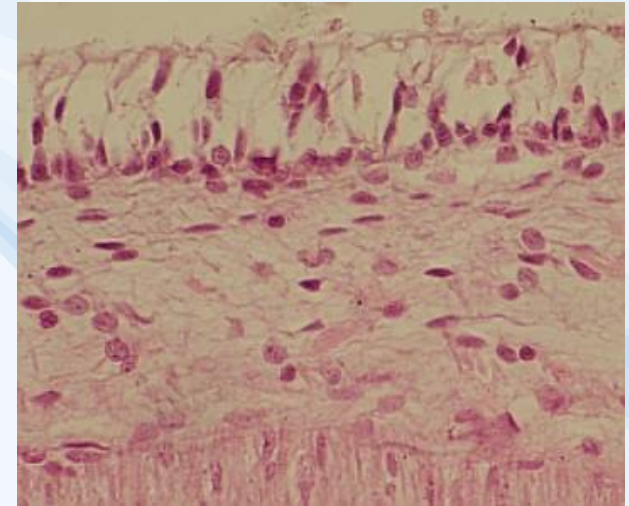


kolagenové  
vazivo měkkýše

## 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<sup>3</sup> ( cca do velikosti 1 × 1 × 0,5 cm pro světelnou mikroskopii )
- v případě potřeby oplach v fyziologickém roztoku
- FIXACE - ihned po odběru !!!
- pečlivé označení vzorku

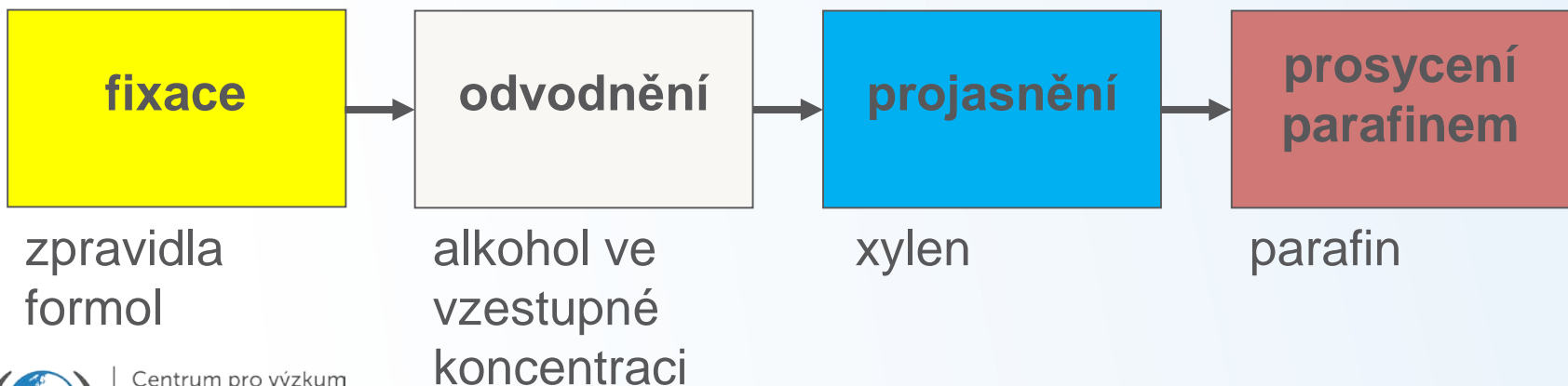
## MOŽNOSTI ZPRACOVÁNÍ

- 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 (1cm<sup>2</sup>, 1mm<sup>2</sup>)
  - 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=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 $\mu\text{m}$   
- tkáň průhledná a dobře studovatelná
- mikrotom = přístroj na řezání jemných vrstev preparátů pro mikroskop
- pro světelné mikroskopické studium bývají řezy tlusté 4 - 20  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$
- sáňkový, rotační, diskový, ultramikrotom, laserový mikrotom, atd. (poslední dva využití 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 tkáně 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 částí 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.

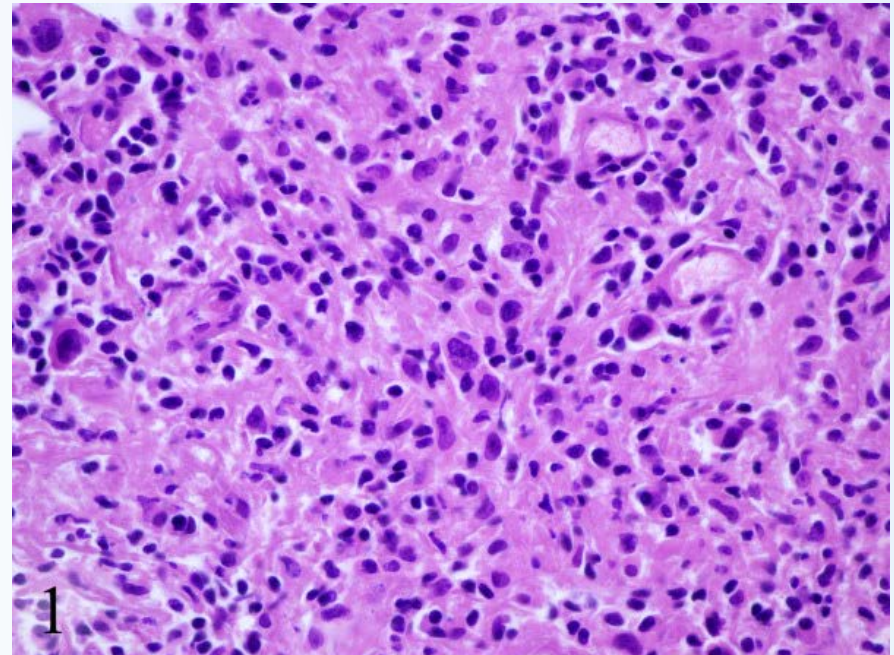
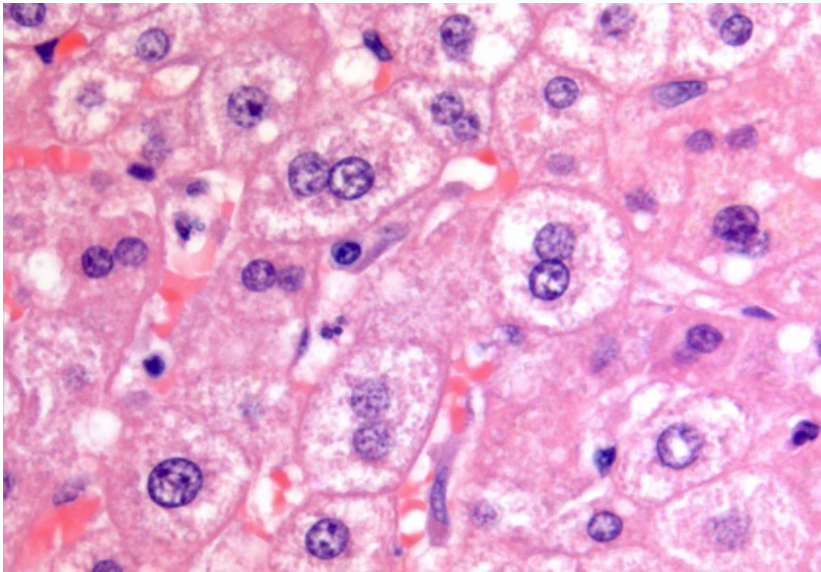
Základní rozdělení:

- 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

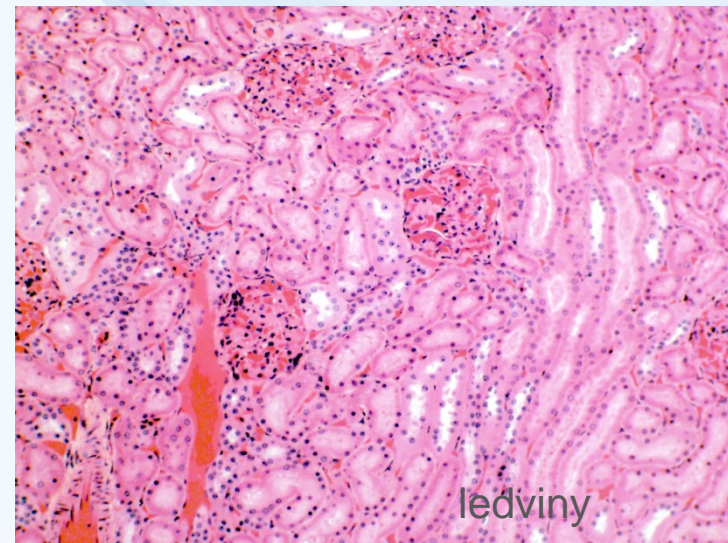
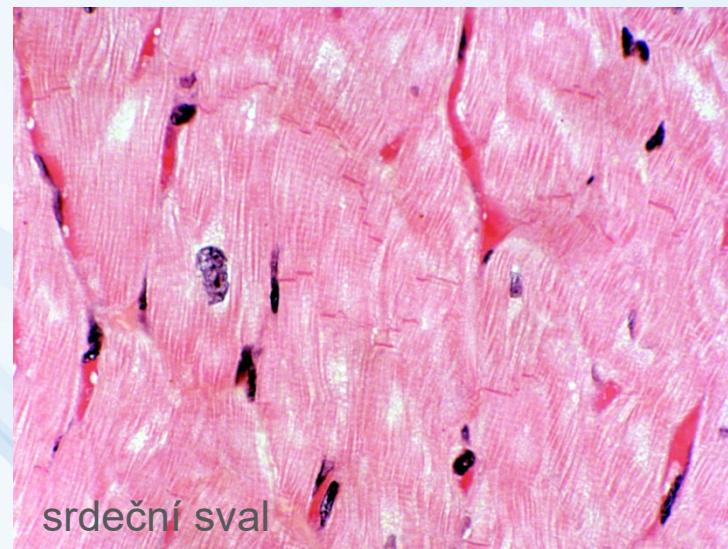
# Hematoxylin - eosin

- **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=2D0rj0m6dVs>

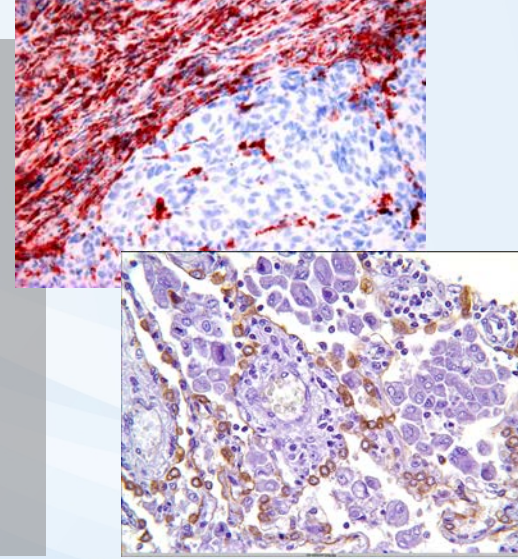


Výsledky barvicích metod					
Barvení	Barvivo	Jádro	Kolagen	Svaly	Poznámka
Hematoxylin-eosin	Hematoxylin Eosin	modré až černé	růžový	růžové	
Weigert – van Gieson	Weigertův hematoxylin Saturnová červeň Trinitrofenol	hnědé	červený	žluté	místo Saturnové červeni se používá také kyselý fuchsin, žluté -vše 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 <sub>3</sub>		hnědý	šedo-černé	retikulární vlákna - černá
Heidenhainův železitý hematoxylin HŽH	Heidenhainův železitý hematoxylin	hnědé až černé		šedo-černé	



# Histochemie

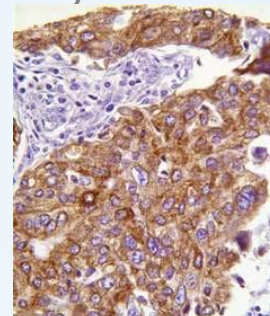
- pomocí chemické reakce prokazuje ve vzorku přítomnost látek (např. enzymatická aktivita) – selektivní barvení
- popisuje morfologii buněk, chemické látky v buňkách prokazuje přítomnost např. polysacharidů, lipidů, enzymů



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

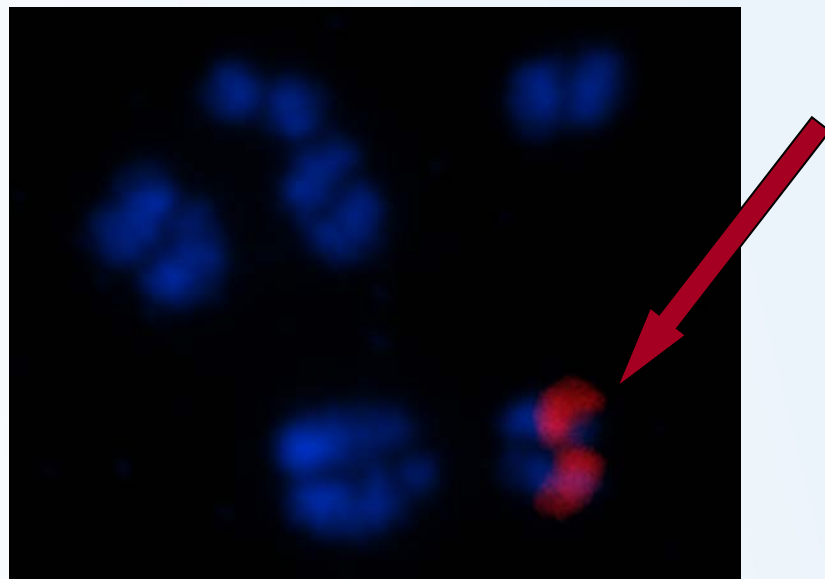
Imunochemické barvení:

- 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



## 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 sklička 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

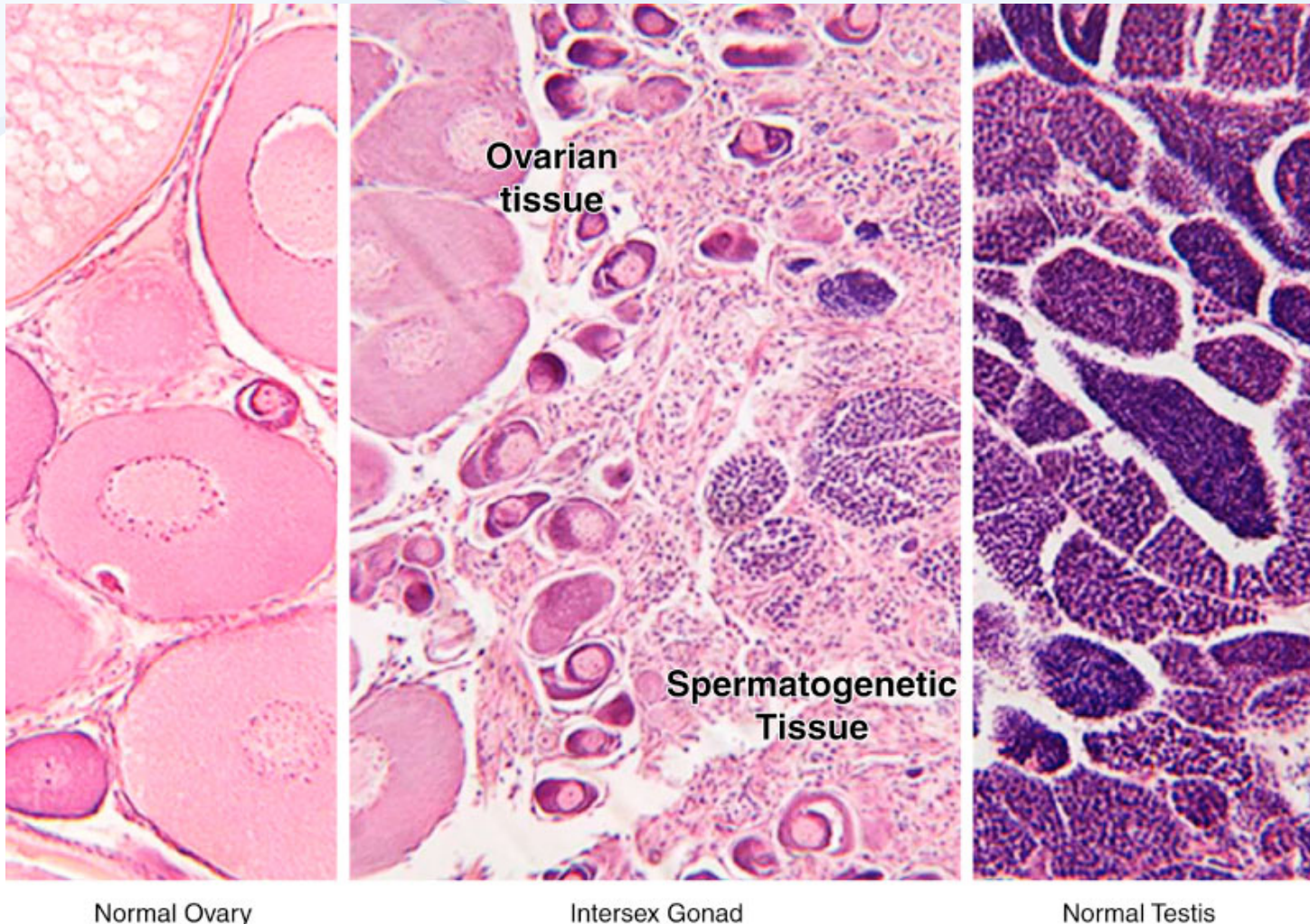


# Postup

<b>Parafínové řezy</b>	<b>Kryostatové řezy</b>
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



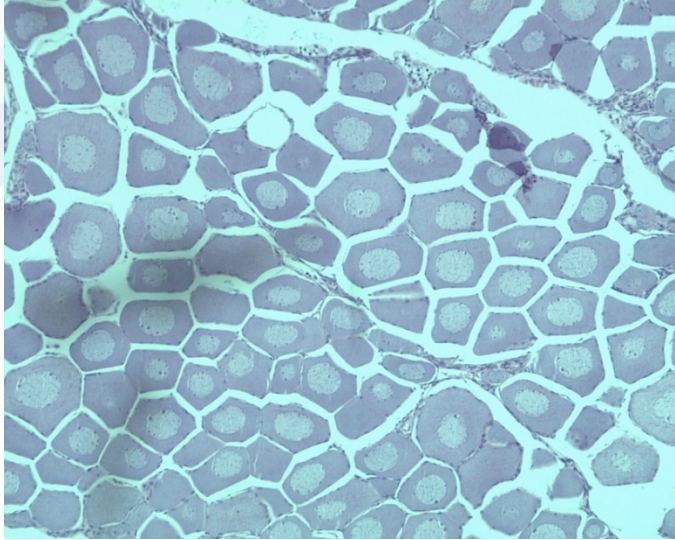
**Intersex - pohlavní orgány pakaprovice severního (*Catostomus commersoni*)**

Vlevo a vpravo – vaječník a varle ryb z referenční lokality

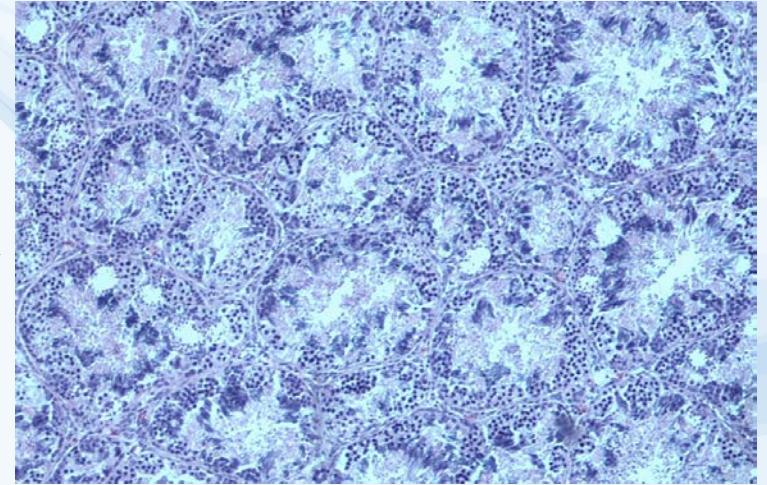
Uprostřed – intersexová tkáň ryby odebrané pod výpustí ČOV



# Obojživelníci – histologie gonád

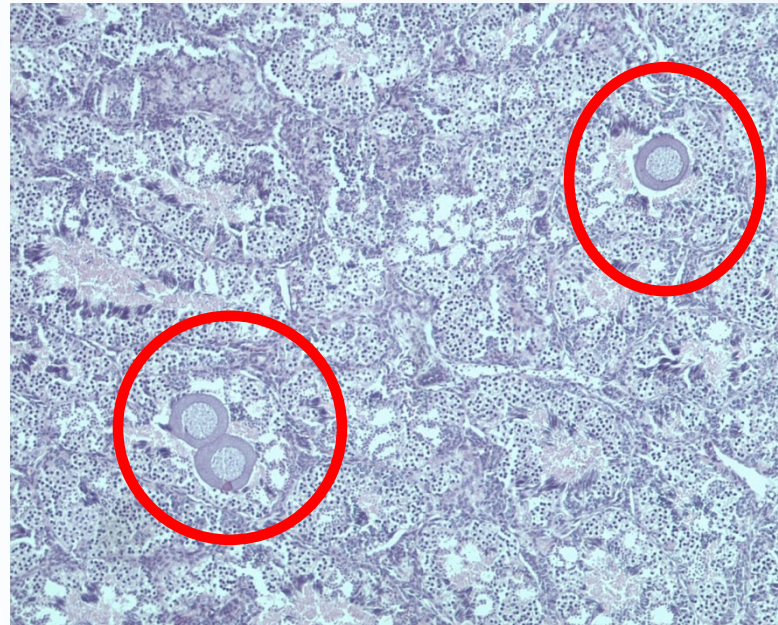


vaječník



varlata

intersex



# Mikroskopie

## Světelná mikroskopie

- Objektiv – hlavní, tvoří obraz předmětu - skutečný zvětšený a převrácený
- Okulár – zvětšuje obraz 5-25x, koriguje optické vady čoček objektivu
- předmět umístujeme 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  $\mu\text{m}$ ) - zvětšení = objektiv x okulár (max. 1500-2000x)



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

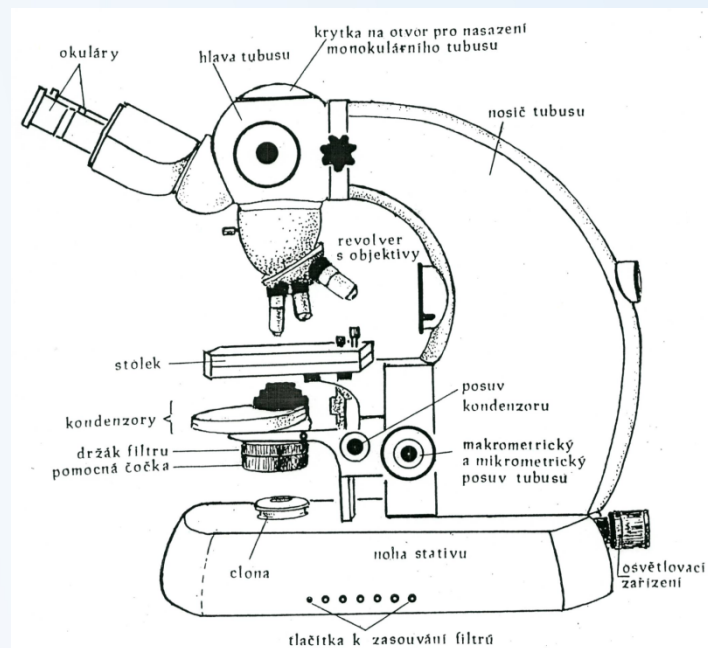
## Elektronová mikroskopie (1-0,2 nm)

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



# Elektronový mikroskop

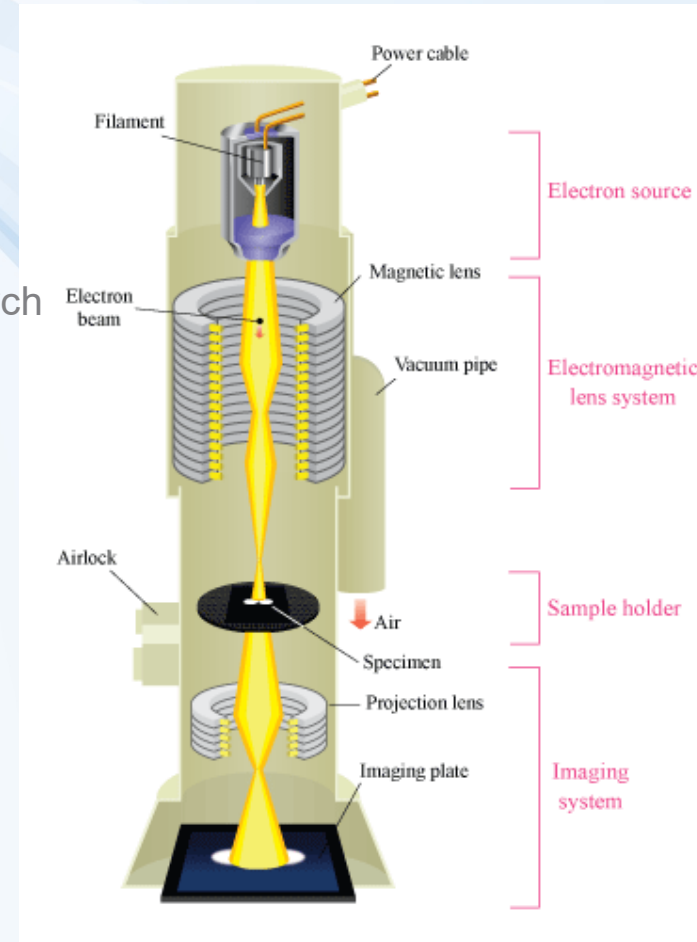
- místo světla (fotonů) tok elektronů ve vakuu, místo optických čoček elektromagnetické
- vlnové délky urychlených elektronů o mnoho řádů menší než fotonů viditelného světla -> mnohem vyšší rozlišovací schopnost - mnohem vyšší zvětšení
- řezy krájené na ultramikrotomu
- studium cytologických detailů

## 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 1mm<sup>2</sup>)
  - Fixace dvoustupňová
  - Odvodnění (aceton)
  - Prosycení (směs epox. pryskyřice s tužidlem)
  - Vytvrzení a zalití (epoxidové pryskyřice, metakryláty)
  - Krájení (ultramikrotomy – 30 – 60nm)
  - Přenesení na nosné terčičky
  - Kontrastování (uranyl acetát)

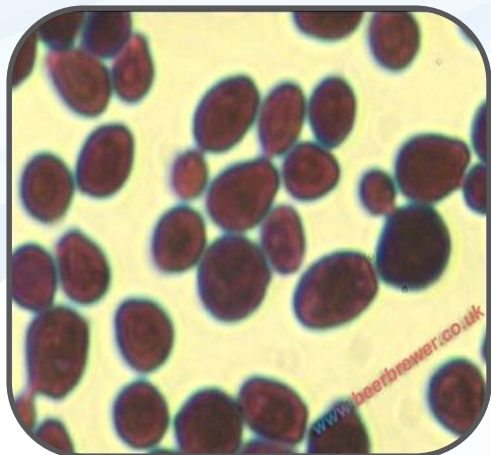
## Rastrovací/scanovací elektronový mikroskop (SEM)

- 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

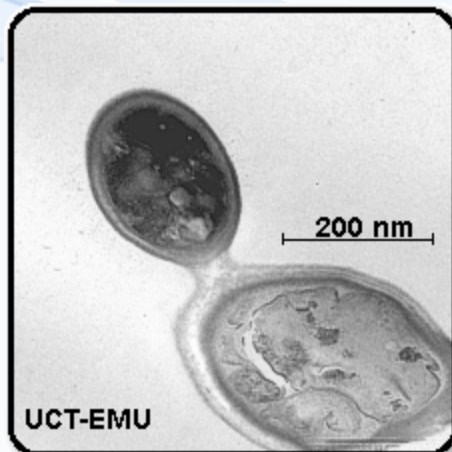




## Pučení kvasinek



Světelný mikroskop



TEM

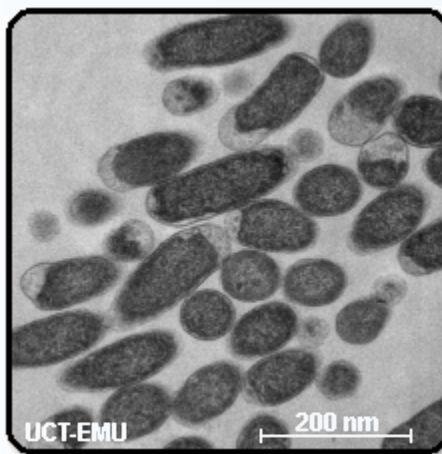


SEM

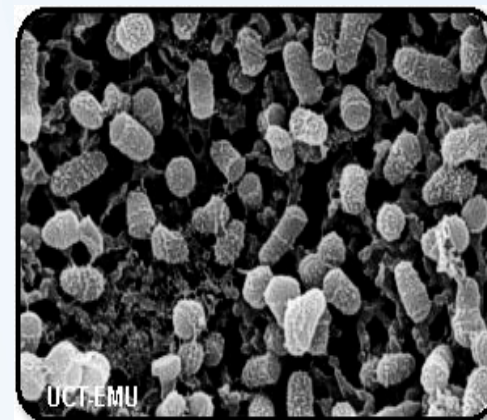
## Bakterie *E. coli*



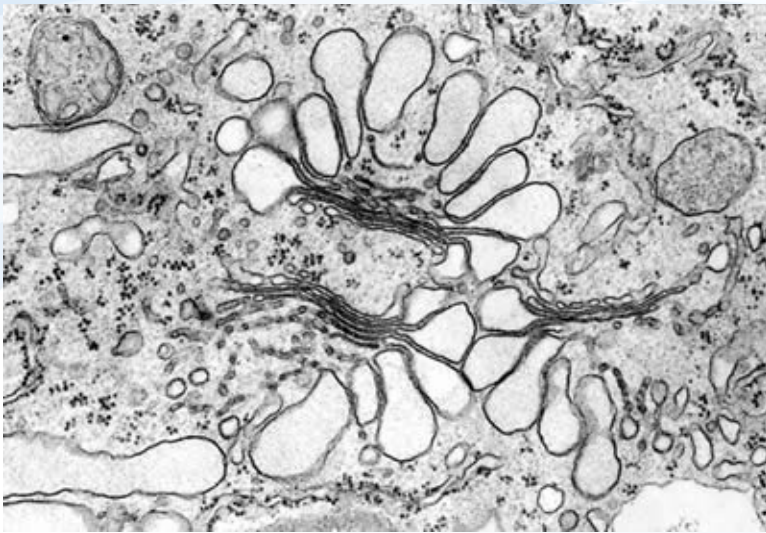
Světelný mikroskop



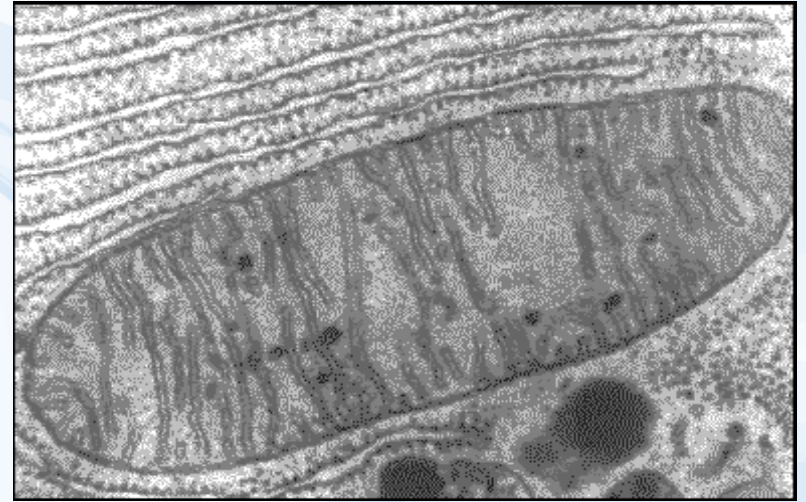
TEM



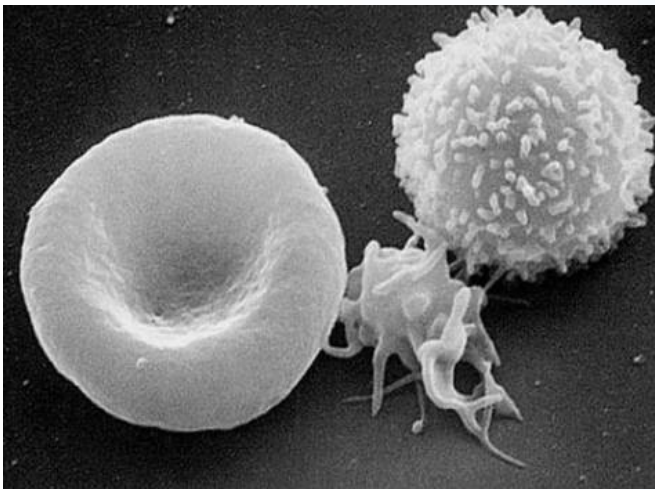
SEM



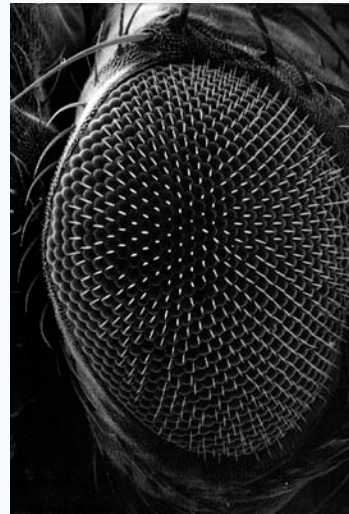
TEM – golgiho aparát



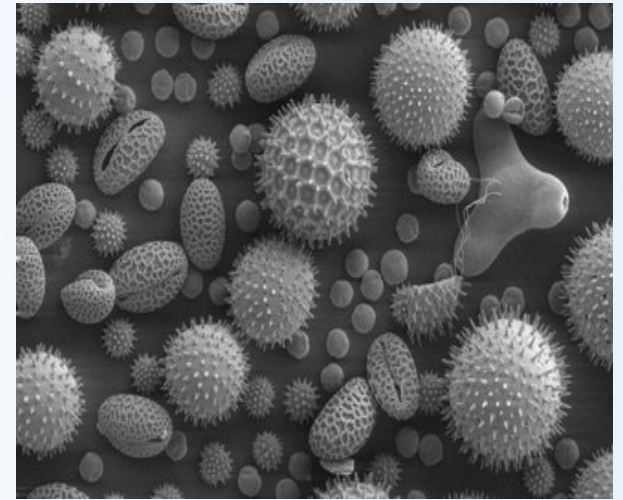
TEM - mitochondrie



SEM – krevní buňky



oko *Drosophily*



SEM – pylová zrna

