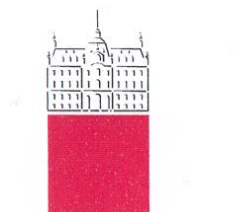


Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



Inštitut za biologijo celice

Daša Zupančič

**MIKROSKOPIRANJE, MIKROSKOPSKE METODE
IN CELIČNI ORGANELI**

Študijsko gradivo

1. PONATIS, 2017

Naslov: Mikroskopiranje, mikroskopske metode in celični organeli
Avtor: Daša Zupančič
Izdaja: 1. Ponatis
Izdajatelj in založnik: Ljubljana, Medicinska fakulteta, Inštitut za Biologijo celice, Univerza v Ljubljani
Leto izdaje: 2017
Format: PDF
Spletno mesto: <http://www.ffa.uni-lj.si/knjiznica/e-knjige/>
<http://www.mf.uni-lj.si/ibc/3435-literatura>

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

576.3(075.8)(076)(0.034.2)

ZUPANČIČ, Daša

Mikroskopiranje, mikroskopske metode in celični organeli [Elektronski vir] : študijsko gradivo /
Daša Zupančič. - 1. ponatis. - El. knjiga. - Ljubljana : Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo
celice, 2017

Način dostopa (URL): <http://www.ffa.uni-lj.si/knjiznica/e-knjige/>

Način dostopa (URL): <http://www.mf.uni-lj.si/ibc/3435-literatura>

ISBN 978-961-267-084-9 (pdf)

289345280

To delo je na voljo pod pogoji slovenske licence Creative Commons 2.5, ki ob priznavanju avtorstva dopušča
nekomercialno uporabo, ne dovoljuje pa nobene predelave.

Kazalo vsebine

1.1 VAJA: UVOD V MIKROSKOPIRANJE IN KLASIČNI SVETLOBNI MIKROSKOP	4
1.2 VAJA: TIPI SVETLOBNIH MIKROSKOPOV IN OBLIKE EVKARIONTSKIH CELIC	9
1.3 VAJA: ELEKTRONSKI MIKROSKOPI	14
2.1 VAJA: CITOLOŠKE, HISTOLOŠKE IN ELEKTRONSKOMIKROSKOPSKE METODE	17
2.2 VAJA: HISTOKEMIJSKE METODE	22
2.3 VAJA: CELIČNI ORGANELI IN ENCIMSKA HISTOKEMIJA	25

PREDGOVOR

Študijsko gradivo **Mikroskopiranje, mikroskopske metode in celični organeli** je namenjeno študentom Laboratorijske biomedicine, Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani, ki opravljajo del vaj pri predmetu Biologija celice z genetiko na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Prvi del (poglavja 1.1 do 2.3) predstavlja osnovno gradivo, ki omogoča študentu pripravo na vaje. Drugi del (navodila za vaje), vsebuje navodila in naloge, ki jih mora študent na vajah opraviti. Ta del si mora vsak študent natisniti in prinesiti na vaje. Pravilno izpolnjene, pregledane in podpisane naloge so dokazilo o aktivnem sodelovanju na vajah. Znanje potrebno za pozitivno opravljanje kolokvija bodo študentje pridobili na vajah.

ZAHVALA

Najlepša hvala vsem sodelavcem Inštituta za biologijo celice za dolgoletno uspešno sodelovanje, na osnovi katerega je nastalo pričujoče študijsko gradivo. Posebej se zahvaljujem prof. dr. Petru Veraniču, predstojniku Inštituta za biologijo celice, prof. dr. Roku Romihu, prof. dr. Mateji Erdani Kreft in asist. dr. Nataši Resnik za neprecenljive predloge in komentarje.

1.1 VAJA: UVOD V MIKROSKOPIRANJE IN KLASIČNI SVETLOBNI MIKROSKOP

Mikroskope uporabljamo za opazovanje objektov, ki so premajhni, da bi jih videli s prostimi očmi. Poznamo dve osnovni vrsti mikroskopov, tj. svetlobne mikroskope, ki omogočajo opazovanje tkiv in celic ter elektronske mikroskope, ki omogočajo opazovanje celične ultrastrukture in makromolekul. Objekt opazovanja mora biti pritrjen na objektno stekelce za svetlobno mikroskopijo ali na kovinsko mrežico za elektronsko mikroskopijo, kar imenujemo preparat.

Sestavni deli klasičnega svetlobnega mikroskopa so prikazani na sliki 1. Le ti se delijo na optične dele (na sliki 1 označeni modro), ki so odgovorni za nastanek slike, in mehanske dele (na sliki 1 označeni vijolično), v katere so vpeti optični deli in ki omogočajo delo z mikroskopom. Naloge posameznih delov mikroskopa so navedene v tabeli 1.



Slika 1: Klasični svetlobni mikroskop z glavnimi sestavnimi deli.

Tabela 1:

Optični sestavni deli	Naloga
Žarnica	Vir svetlobe.
Kolektor	Zbere svetlobne žarke in jih usmeri v gorišče kondenzorja.
Kondenzor	Zbere svetlobne žarke iz kolektorja in jih usmeri v ravnino preparata.
Objektiv	Ustvari povečano sliko preparata in prispeva k ločljivosti mikroskopa.
Okular	Poveča sliko, ki jo ustvari objektiv, in ne prispeva k ločljivosti.
Mehanski sestavni deli	
Podstavek	Nosilni podstavek mikroskopa; v njem je nameščena žarnica.
Makrometrski vijak	Grobo ostrenje pri objektivih 4× in 10×.
Mikrometrski vijak	Fino ostrenje pri objektivih 40× in 100×.
Vijak za nastavitev višine kondenzorja	Uravnavanje Köhlerjeve osvetlitve.
Objektna mizica	Na njej je vpet preparat.
Vijak za pomik po objektni mizici	Pomikanje preparata po objektni mizici.
Revolver	V njem so vpeti objektivi in z njim vstavimo željen objektiv v optično os.
Stativ	Nosilno stojalo mikroskopa.
Glava	Vanjo sta nameščena okularja.

Povečava in ločljivost sta osnovni lastnosti mikroskopa, ki zagotavljata kakovost slike opazovanega preparata. Smiselne povečave sodobnih svetlobnih mikroskopov segajo od okrog 10× do okrog 1000×. Skupno povečavo mikroskopa dobimo, ko pomnožimo povečavo okularja (le ta je običajno 10×) in objektiv (na primer 4×, 10×, 40×, 100×). Povečava pove, kolikokrat je slika, ki jo da mikroskop, večja od slike, ki jo vidimo s prostimi očmi, ne prispeva pa k pridobivanju novih informacij. Če želimo na povečani sliki videti več detajlov, moramo uporabljati leče z boljšo ločljivostjo (slika 2). Ločljivost namreč predstavlja najmanjšo oddaljenost med dvema točkama, pri kateri ju še vidimo ločeni. Izračunamo jo po enačbi:

$$d = (0,61 \times \lambda) / NA_{\text{objektiva}}$$

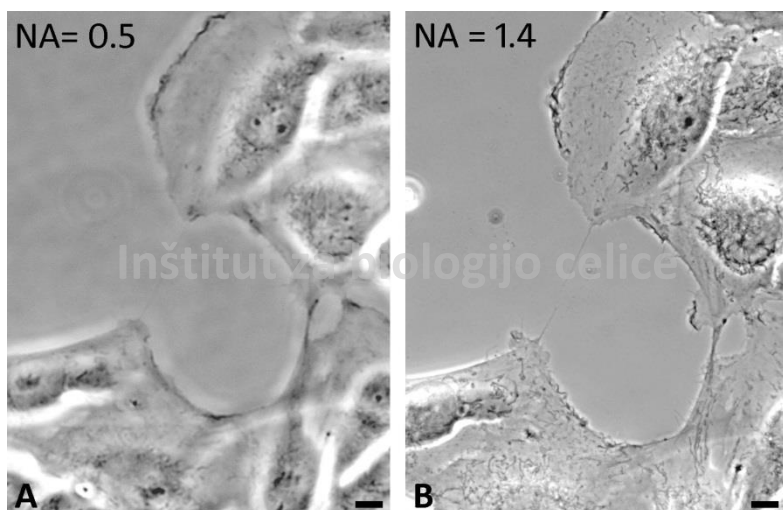
d – ločljivost

λ – lambda – valovna dolžina svetlobe (za vidno svetlobo je povprečna valovna dolžina 550 nm)

NA_{objektiva} – numerična apertura objektiva - $NA = n \times \sin \alpha$

n – lomni količnik snovi med lečo objektiva in preparatom

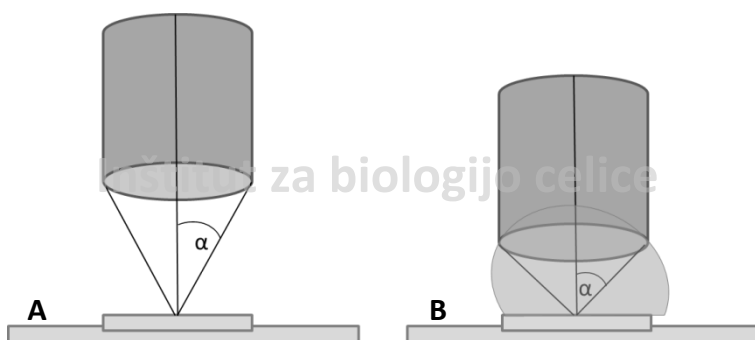
α – polovica kota, pod katerim pade svetloba v objektiv



Slika 2: Urotelijske rakave celice T24, ki rastejo v kulturi, posnete z (A) objektivom z manjšo numerično aperturo ($NA = 0.5$) in z (B) objektivom z večjo numerično aperturo ($NA = 1.4$). Merilo: $5\ \mu m$.

Snov med lečo objektiv in preparatom je lahko zrak ($n = 1$) in tak objektiv imenujemo suhi objektiv (slika 3A), ali pa imerzijsko olje ($n = 1.5$) in tak objektiv imenujemo imerzijski objektiv (slika 3B). Lomni količnik stekla (objektno stekelce in krovnik) je 1.5. Za ločljivost objektiv velja naslednje:

- pri suhih objektivih se žarki pri prehodu iz zraka v steklo in obratno lomijo in torej spremenijo svojo smer, zaradi česar jih manj pride v objektiv in sta NA in d suhih objektivov zato slabši kot pri imerzijskih objektivih;
- če zmanjšamo delovno razdaljo (razdalja med objektivom in preparatom) se poveča kot α in zato se poveča NA, razdalja d se zmanjša, kar pomeni, da je ločljivost objektiv boljša (vendar mora biti slika v gorišču).



Slika 3: Suhi objektiv (A) ima daljšo delovno razdaljo in manjši kot α , med čelno lečo objektiv in krovnikom pa je zrak. Imerzijski objektiv (B) ima krajšo delovno razdaljo in večji kot α , med čelno lečo objektiv in krovnikom pa je imerzijsko olje.

Osnovni koraki dela s klasičnim svetlobnim mikroskopom so naslednji:

- prižgemo žarnico,
- odpremo zaslonko kolektorja in zaslonko kondenzorja,
- v optično os vstavimo objektiv z majhno povečavo (objektiv $4\times$, povečava mikroskopa $40\times$),
- na objektno mizico vpneemo preparat s krovnikom obrnjenim navzgor,

- preparat (objekt) premaknemo v snop svetlobe,
- izostrimo sliko preparata (objekta),
- naravnamo okularja (medzenična razdalja in dioptrija vsakega očesa),
- pregledamo celoten preparat,
- del preparata, ki nas zanima, premaknemo na sredino vidnega polja,
- zasučemo revolver tako, da je v optični osi objektiv s srednjo povečavo (10×),
- naravnamo Köhlerjevo osvetlitev:
 - zaslonko kolektorja zapremo,
 - s pomočjo vijaka za premik kondenzorja izostrimo sliko roba zaslonke kolektorja (slika 4),
 - zaslonko kolektorja odpiramo dokler ni osvetljeno celo vidno polje,
- jakost svetlobe naravnamo s potenciometrom žarnice,
- ustrezen kontrast slike dosežemo z zapiranjem in odpiranjem zaslonke kondenzorja.



Slika 4: Mikrografija ostrega roba kolektorske zaslonke pri naravnavanju Köhlerjeve osvetlitve.

Osnovni koraki dela z imerzijskim objektivom so naslednji:

- najprej izostrimo sliko preparata pri objektivu s 40× povečavo,
- zasučemo revolver, da je optična os v sredini med objektivoma 40× in 100× (imerzijski objektiv),
- kapljico imerzijskega olja kapnemo na osvetljen del preparata,
- imerzijski objektiv počasi vstavimo v optično os in njegovo čelno lečo potopimo v olje,
- ostrimo le z mikrometrskim vijakom,
- po uporabi obvezno očistimo preparat in čelno lečo imerzijskega objektiva z alkoholom in vato.

Kadar na mikroskop namestimo kamero, lahko sliko, ki jo vidimo, tudi fotografiramo in posnetek imenujemo mikrografija.

Dimenzije struktur v preparatu merimo s pomočjo okularnega merilca, ki ga moramo predhodno umeriti za vsak objektiv posebej. S tem določimo mikrometrsko vrednost okularnega merilca pri različnih povečavah mikroskopa. V ta namen uporabimo objektni mikrometer, na katerem meri vsak razdelek 10 μm (slika 5).



Slika 5: Mikrografija objektnega mikrometra pri objektivih s povečavami 4×, 10× in 40×.

1.2 VAJA: TIPI SVETLOBNIH MIKROSKOPOV IN OBLIKE EVKARIONTSKIH CELIC

1. TIPI SVETLOBNIH MIKROSKOPOV

Svetlobni mikroskop je lahko prirejen in nadgrajen za različne namene. Spodaj so naštet in na kratko opisani največkrat uporabljeni tipi svetlobnih mikroskopov.

1. Stereoskopski mikroskop ali lupa

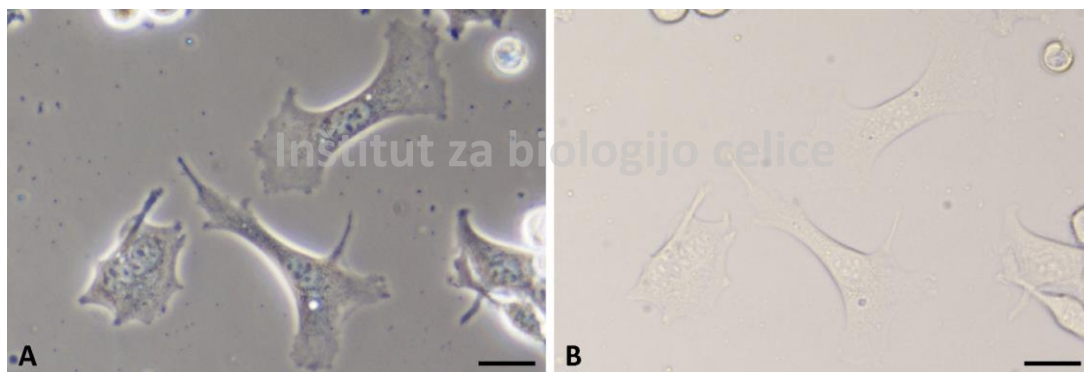
- Manjše povečave – do 200×
- Velika delovna razdalja omogoča rezanje koščka tkiva.
- Objektivni omogočajo tridimenzionalno gledanje in večjo globinsko ostrino (slika 6).
- Dodatne prizme med objektivom in okularjem obrnijo sliko, tako da je slika koščka tkiva orientirana tako, kot da bi gledali košček tkiva s prostimi očmi.
- Kondenzorja ni.



Slika 6: Mikrografija posneta s stereoskopskim mikroskopom. Svež vzorec humanega urotelijskega papiloma odvzetega med biopsijo. Merilo: 2 mm.

2. Faznokontrastni mikroskop

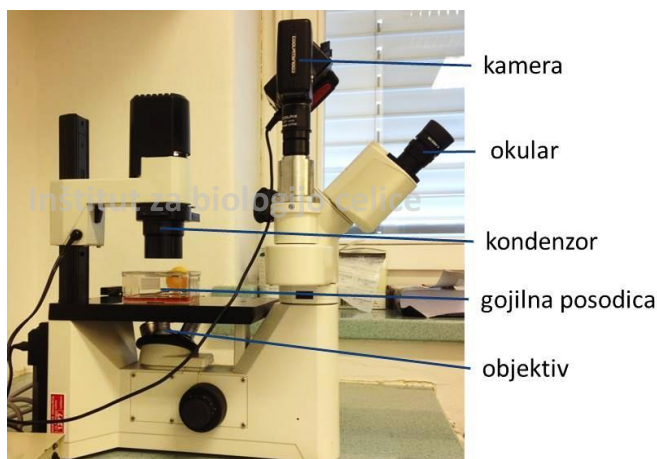
- Opazovanje neobarvanih, živih celic, ki so nekontrastne.
- Najprej poveča fazni zamik, ki nastane na preparatu.
- Ker naše oko razlik v fazi svetlobnega valovanja ne zazna, je faznokontrastni mikroskop prirejen tako, da le te spremeni v razlike v amplitudi svetlobnega valovanja, kar vidimo kot različno jakost svetlobe (slika 2 in 7).
- Ima dva dodatna sestavna dela: kolobarjasto kondenzorsko zaslonko, ki prepušča le kolobar svetlobe, in fazno ploščico, ki ima izbrušen kolobarjast utor enakih dimenzij (slika 2 in 7).



Slika 7: Mikrografija neobarvanih evkariontskih celic posneta (A) s faznikontrastnim mikroskopom in (B) s klasičnim svetlobnim mikroskopom. Merilo: 50 μm .

3. Invertni mikroskop

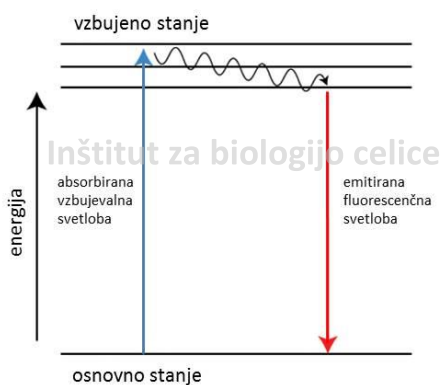
- Opazovanje živih celic, ki rastejo v celični kulturi v gojilni posodi (slika 7).
- Objektivi so pod objektno mizico, na katero postavimo gojilno posodico s celicami, ki rastejo po dnu posodice (slika 8).
- Višina posodice tako ne ovira izostrovanja in ne omejuje delovnih razdalj objektiva.
- Vir svetlobe, kolektor in kondenzor so nad objektno mizico.
- Lahko je prirejen tako, da je tudi faznikontrastni, fluorescenčni ali konfokalni mikroskop.
- Opazujemo lahko tudi histološke preparate.



Slika 8: Invertni mikroskop z gojilno posodico na objektni mizici in nameščeno kamero.

4. Fluorescenčni mikroskop

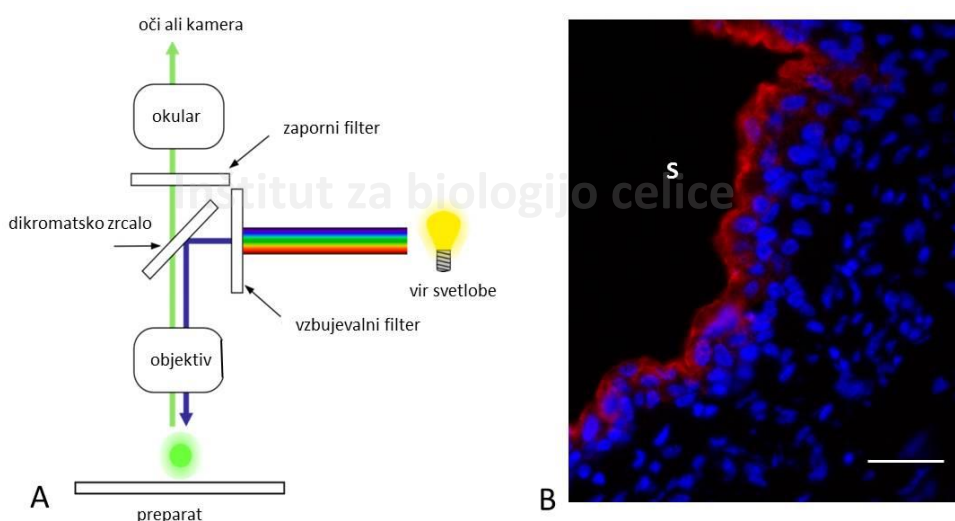
Fluorescenčni mikroskop izkorišča dejstvo, da so nekatere molekule sposobne fluorescirati. To pomeni, da so sposobne sprejeti oziroma absorbirati svetlobo s krajšimi valovnimi dolžinami, kot je na primer modra svetloba, in nato oddajati oziroma emitirati svetlobo z daljšimi valovnimi dolžinami, kot je na primer zelena ali rdeča svetloba (slika 9). Absorbirani svetlobi pravimo tudi vzbujevalna svetloba in emitirani svetlobi običajno rečemo fluorescenčna svetloba. Molekule, ki fluorescirajo, imenujemo fluorescenčna barvila ali fluorokromi.



Slika 9: Energetskega stanja atoma med absorpcijo vzbujevalne svetlobe in emisijo fluorescenčne svetlobe.

Fluorescenčni mikroskop ima za svoje delovanje prirejeno zgradbo (slika 10):

- Vir svetlobe je živosrebrova ali ksenonova žarnica, ki oddaja spekter svetlobe od vidne do ultravijolične.
- Vzbujevalni filter je za žarnico in prepušča le vzbujevalno svetlobo.
- Dikromatsko zrcalo je za vzbujevalnim filtrom in vzbujevalno svetlobo odbija na preparat, fluorescenčno svetlobo, ki jo oddajajo molekule preparata pa prepušča.
- Objektiv opravlja tudi nalogo kondenzorja, torej zbere svetlobne žarke vzbujevalne svetlobe v ravnini preparata.
- Vzbujevalna svetloba v preparatu vzbudi fluorescenco, če so v njem prisotni flourokromi.
- Zaporni filter je za dikromatskim zrcalom in pred okularji in prepušča le fluorescenčno svetlobo (zato je ozadje črno).



Slika 10: A) Shematski prikaz glavnih sestavnih delov in poti svetlobnih žarkov skozi fluorescenčni mikroskop. B) Urotelij sečnega mehurja posnet s fluorescenčnim mikroskopom (modro so označena jedra celic, rdeče so označeni proteini uroplakini, ki so značilni za površinske urotelijske celice, S – svetlina sečnega mehurja). Merilo: 100 μ m.

5. Konfokalni mikroskop

- Nadgradnja fluorescenčnega mikroskopa.
- Laser osvetljuje preparat po točkah.
- Fluorescenčno svetlobo iz posamezne točke zazna detektor in slika nastane na računalniškem zaslonu.
- Vsebuje dve zaslonki z zelo majhnima odprtinama (angl. pinhole).
- Omogoča optično rezanje in tridimenzionalno rekonstrukcijo preparata.

2. OBLIKE EVKARIONTSKIH CELIC

Zgradba evkariontske celice in naloge njenih osnovnih sestavnih delov so prikazane v tabeli 2.

Tabela 2:

STRUKTURA	NALOGA
Plazmalema (celična membrana ali plazemska membrana)	Ločuje celično notranjost od zunajceličnega okolja, omogoča kontrolirano izmenjavo snovi in komunikacijo med celicami ter med celico in medceličnino.
Citoplazma:	Notranjost celice, kjer potekajo življenjski procesi.
- citosol	Gelu podobna znotrajcelična raztopina.
- citoskelet	Mrežje strukturnih proteinov, ki omogoča celici vzdrževanje oblike, gibljivost in znotrajcelične Transporte. Sodelujejo tudi pri delitvi celice.
- membranski predelki (vezikli, organeli)	Z membrano obdane strukture s točno določeno vsebino in nalogo.
Jedro	Celični organel, kjer se nahaja celični genom (vse molekule DNA, razen mitohondrijskih).

Evkariontske celice so velike v povprečju od 10 do 100 μm . Pri človeku so najdaljše živčne celice (nevroni), ki lahko merijo tudi do 0,5 m, najmanjše pa so brezjdrne krvne celice trombociti, ki so veliki 2 do 3 μm . Celice večceličnega organizma se povezujejo med seboj in pri sesalcih tvorijo štiri osnovne vrste tkiv:

- Krovno tkivo ali epiteliji ločujejo zunanost organizma od njegove notranjosti (na primer epitelij kože) ter meji na svetline notranjih organov (na primer želodčni epitelij, črevesni epitelij, epitelij sečnega mehurja, itd.).
- Vezivno tkivo, kamor uvrščamo tudi maščobno tkivo, hrustančno in kostno tkivo ter po nekaterih nomenklaturah tudi kri in hematopoetsko tkivo.
- Mišično tkivo, kjer razlikujemo gladkomišično in prečnoprogasto mišično tkivo.
- Živčno tkivo, ki vključuje centralni in periferni živčni sistem ter senzorne organe za vid in sluh.

Celice, ki sestavljajo ta tkiva, imajo določeno obliko, na katero vplivajo sosednje celice, medceličnina in citoskelet. Najznačilnejše oblike celic in primeri zanje so navedene v tabeli 3.

Tabela 3:

OBLIKA CELICE	PRIMER
Kroglasta	Krvne celice: eritrociti, levkociti, trombociti Jajčna celica (oocit)
Izodiametrična	Jetrne celice (hepatociti) Maščobne celice (adipociti)
Vretenasta	Prečnoprograste mišične celice Gladkomišične celice
Asimetrična	Živčne celice (nevroni) Kostne celice (osteociti)
Ploščata	Endotelijske celice kapilar
Kubična	Epitelijske celice žleze ščitnice in mlečne žleze
Visokoprizmatska	Črevesne absorpcijske epitelijske celice (enterociti), epitelijske celice želodca in žolčnika

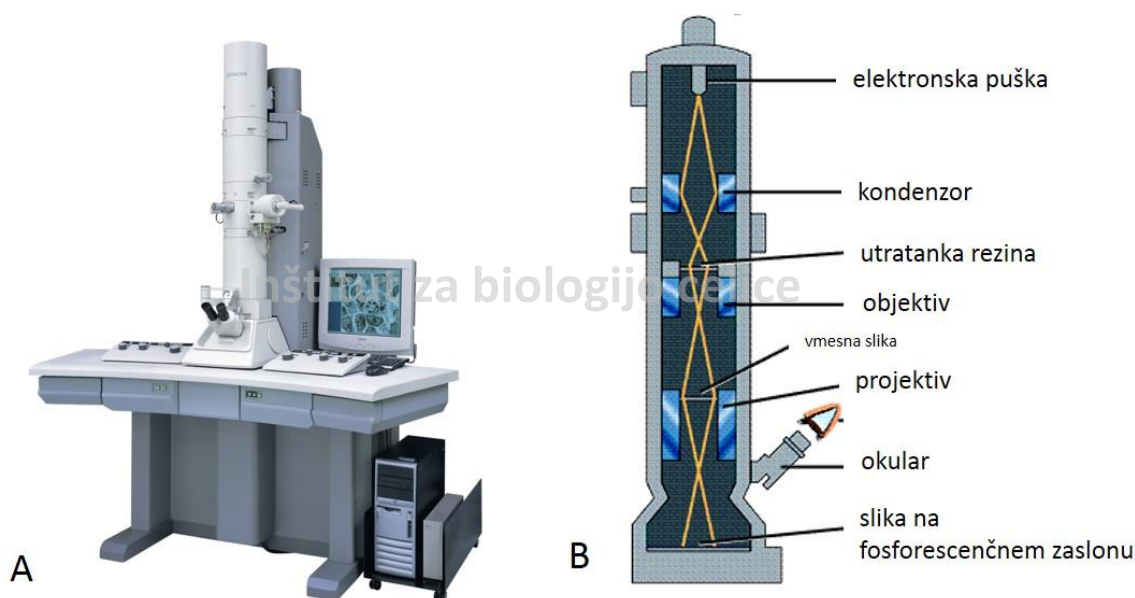
1.3 VAJA: ELEKTRONSKI MIKROSKOPI

V elektronski mikroskopiji se namesto svetlobnega valovanja ($\lambda \approx 550\text{nm}$) uporablja valovanje pospešenih elektronov z zelo kratkimi valovnimi dolžinami ($\lambda \approx 0,005\text{nm}$), kar omogoča veliko večje povečave (do $1.000.000\times$) in boljšo ločljivost (do 1 nm). Razlikujemo dve osnovni vrsti elektronskih mikroskopov, katerih glavne značilnosti so navedene spodaj. Pri obeh vrstah mora biti v celotni cevi mikroskopa vakuum, sicer bi se elektroni zadevali ob molekule zraka.

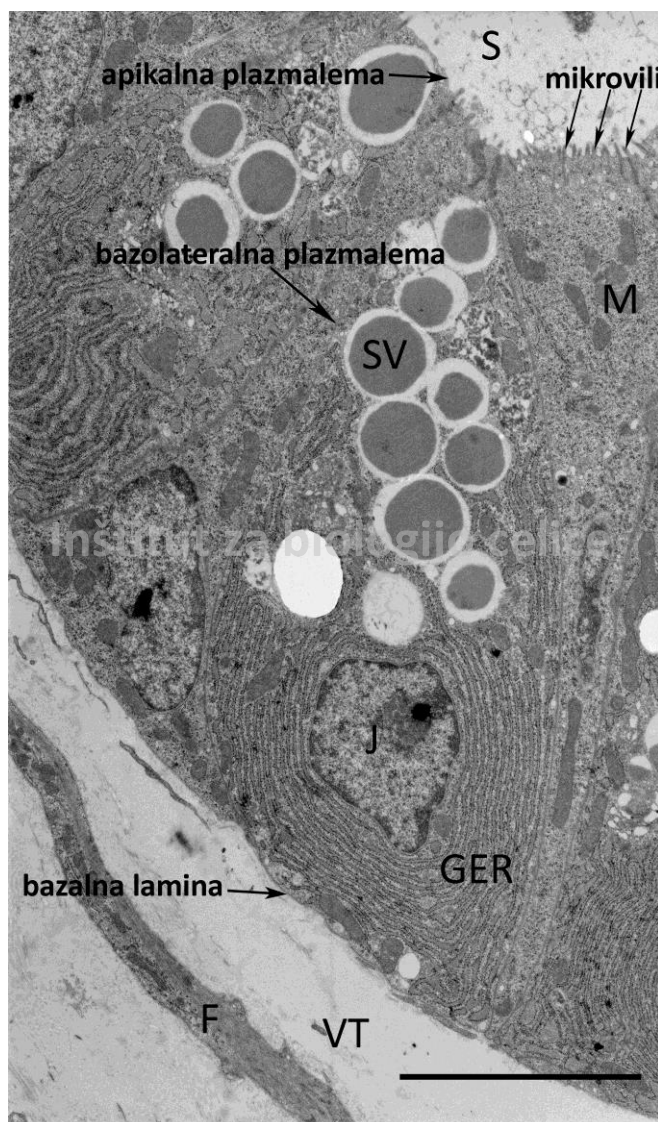
1. Presevni elektronski mikroskop (angl. transmission electron microscope - TEM)

- Opazujemo celično ultrastrukturo.
- Elektroni presevajo preparat.
- Zaradi sipanja elektronov na atomih težkih kovin, ki jih vnesemo v preparat, vidimo sliko ultrastrukture celic (slika 12).

Presevni elektronski mikroskop in njegovi glavni sestavni deli so prikazani na sliki 11.



Slika 11: A) Presevni elektronski mikroskop. B) Shematski prikaz glavnih sestavnih delov in poti elektronov po cevi presevnega elektronskega mikroskopa.



Slika 12: Mikrografija ultrastrukture črevesnega epitelijskega tkiva, posneta s presevnim elektronskim mikroskopom. S – svetlina, M – mitohondrij, SV – sekrecijski vezikel, J – jedro, GER – granularni ali zrnati endoplazemski retikulum, VT – vezivno tkivo, F – fibroblast. Merilo: 5 μ m.

Naloge posameznih glavnih delov presevnega elektronskega mikroskopa so navedene v tabeli 4.

Tabela 4:

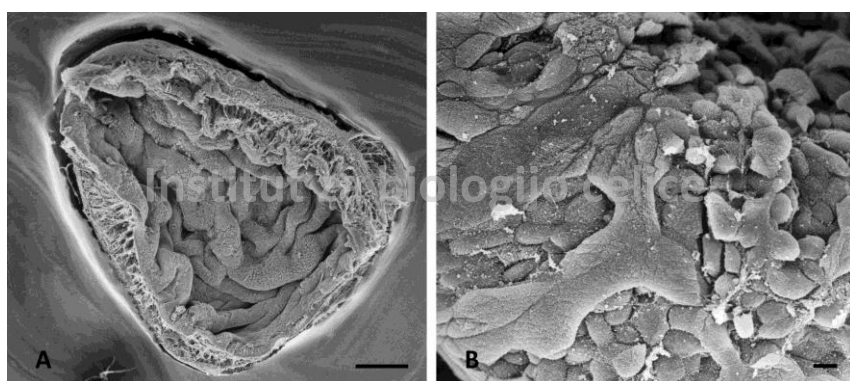
SESTAVNI DEL	NALOGA
Elektronska puška	Vir valovanja pospešenih elektronov, ki ustvari snop elektronov.
Kondenzor	Sistem elektromagnetnih leč, ki zberejo snop elektronov in jih usmeri v ravnino preparata.
Objektiv	Ustvari povečano sliko preparata, prispeva k ločljivosti mikroskopa in omogoča ostrenje slike.
Projektiv	Sliko poveča in projicira na fosforescenčni zaslon.
Fosforescenčni zaslon	Ko nanj padejo elektroni, nastane slika.
Stereomikroskop za opazovanje zaslona	Dodatno poveča sliko na zaslonu.
Fotografska plošča ali čip digitalne kamere	Omogoča fotografiranje slike, ki jo vidimo na fosforescenčnem zaslonu; na ta način nastane mikrografija.

2. Vrstični elektronski mikroskop (angl. scanning electron microscope - SEM)

- Opazujemo površino preparata.
- Elektronski snop (primarni elektroni) potuje od točke do točke (skenira) po površini preparata.
- Ob skeniranju primarni elektroni izbijajo iz preparata sekundarne elektrone.
- Detektor zbira sekundarne elektrone, scintilator in fotopomnoževalka pa pretvorita signal sekundarnih elektronov v električni signal, ki ga vidimo na zaslonu (slika 13).
- Slike površine (reliefa, topografije) preparata lahko fotografiramo in dobimo mikrografijo (slika 14).



Slika 13: Vrstični elektronski mikroskop.



Slika 14: Mikrografija površine epitelijskega sečnega mehurja (urotelija), posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom. A) Košček stene sečnega mehurja. B) Urotelijske celice, ki z apikalno plazmalemo mejijo na svetlino sečnega mehurja. Merilo: A) 500 μm ; B) 10 μm .

2.1 VAJA: CITOLOŠKE, HISTOLOŠKE IN ELEKTRONSKOMIKROSKOPSKE METODE

1. Sveži mikroskopski preparat

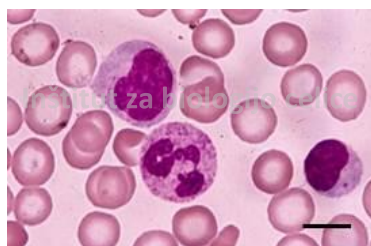
Sveži mikroskopski preparati so lahko:

- žive celice, ki rastejo v kulturi;
- živi enocelični organizmi;
- celice, ki jih lahko enostavno pridobimo iz večceličnega organizma, kot so na primer krvne celice, spermiji in celice ustne sluznice.

Celice vsebujejo okrog 80 % vode in so zato v klasičnem svetlobnem mikroskopu slabo kontrastne. Za boljšo kontrastnost celic le te obarvamo z vitalnimi barvili ali pa uporabimo faznokontrastni mikroskop. Kadar gojimo celice v celični kulturi jih lahko transficiramo, tako da izražajo zeleni fluorescenčni protein (angl. green fluorescent protein – GFP), ki fluorescira pod fluorescenčnim mikroskopom.

2. Razmazi in fizikalna fiksacija s sušenjem

Krvne celice ali celice različnih sluznic (maternični vrat, grlo) lahko enostavno razmažemo po objektnejem stekelcu in posušimo na zraku. Tako pripravljen razmaz se lahko pobarva na primer z barvilom MGG (May-Grunwald-Giemsa) (slika 15).



Slika 15: Razmaz krvnih celic (eritrociti, limfociti in granulociti) pobarvan z barvilom MGG. Merilo: 10 μm .

3. Trajni histološki preparati

Gre za tkiva večceličnih organizmov, narezana na dovolj tanke rezine (okrog 3 do 10 μm), da lahko svetloba skozi preseka. Običajno se trajni histološki preparati pripravijo iz parafinskih rezin v diagnostiki in raziskovalnem delu. Natančni postopki priprave trajnega histološkega preparata so navedeni v navodilih za vaje.

Glavne faze priprave parafinskih rezin:

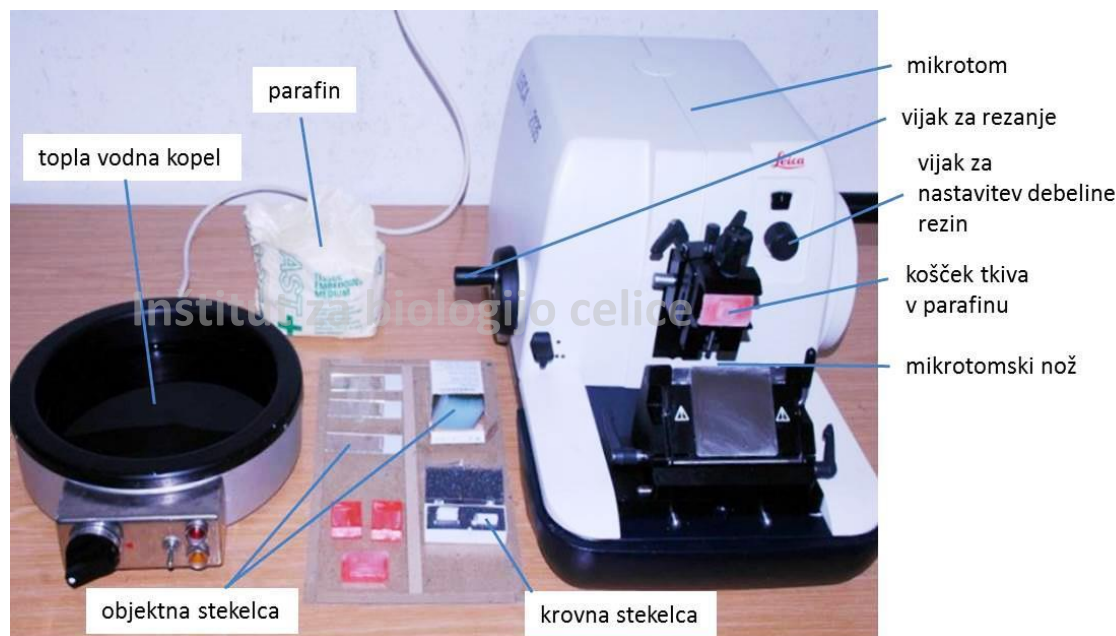
- Fiksacija, ki omogoči, da se tkivo in celice ohranijo, čim bolj podobne, kot so bile v živem organizmu.
- Kemijska fiksacija s formaldehidi, ki zamrežijo proteine, in tako ustavijo vse življenjske procese, morfologija celic pa ostane podobna kot v živem organizmu.
- Za kemijsko fiksacijo se uporabljajo tudi alkoholi in organske kisline, ki proteine denaturirajo.

- Pod lupo tkivo razrežemo na koščke velikosti od 1 mm³ do 1 cm³ (slika 16), nato pa pustimo v fiksativu čez noč na 4°C.



Slika 16: Pod lupo lahko razrežemo tkivo na koščke primerne velikosti.

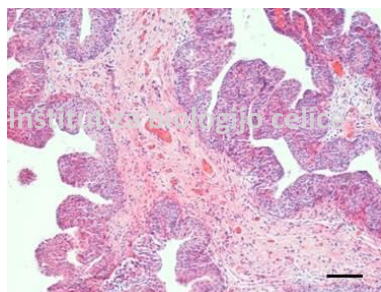
- Po izpiranju fiksativa koščke tkiva postopno dehidriramo in privedemo do hidrofobnega tekočega parafina (65 °C), s katerim se prepojijo.
- Pri sobni temperaturi je parafin v trdnem stanju in kot tak omogoča rezanje parafinskih rezin z mikrotomom (slika 17).



Slika 17: Mikrotom za rezanje parafinskih rezin in topla vodna kopel na kateri se parafinske rezine zgladijo, preden jih poberemo na objektna stekelca.

- Ker je parafin hidrofoben, histološka barvila pa hidrofilna (topna v vodi), je potrebno parafinsko rezino pred barvanjem deparafinirati in hidrirati.

- Za klasično histološko barvanje se uporabljata barvili hematoksilin (obarva jedra modro-vijolično) in eozin (obarva citoplazmo rožnato-rdeče) (slika 18). Parafinske rezine lahko uporabimo tudi za histokemijske metode.
- Da zagotovimo trajnost histološkega preparata, obarvano rezino ponovno dehidriramo in zalijemo s Kanadskim balzomom ali umetno smolo DPX ter pokrijemo s krovnim stekelcem.



Slika 18: Klasično histološko barvanje s hematoksilinom in eozinom. Parafinska rezina papilarnega urotelijskega karcinoma. Merilo: 100 μ m.

Trajni histološki preparati se lahko pripravijo tudi iz zamrznjenih rezin. Zamrznjene rezine se uporablja takrat, kadar je potrebno tkivo hitro pregledati (na primer med operacijo) ali kadar bi kemijska fiksacija, dehidracija in vroč parafin poškodovali sestavine celic in tkiv, ki nas zanimajo. Pred zamrzovanjem lahko tkivo kemijsko fiksiramo in/ali prepojimo s krioprotektivnim sredstvom, ki zmanjša nastajanje kristalov vode in s tem omogoči boljšo ohranjenost celične strukture. Za rezanje uporabljamo kriostat s hladno komoro, v kateri je kovinski nož (slika 19). Zamrznjene rezine lahko kemijsko fiksiramo in nato pobarvamo s hematoksilinom in eozinom ter pripravimo trajni histološki preparat podobno kot iz parafinskih rezin. Lahko pa jih uporabimo za histokemijske metode.



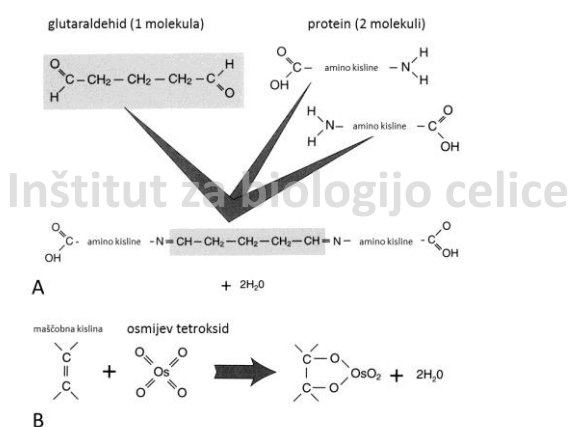
Slika 19: Kriostat je naprava za rezanje zamrznjenih rezin.

4. Priprava preparatov za elektronsko mikroskopijo

Pri elektronski mikroskopiji, kjer so povečave in ločljivosti večje, je potrebna veliko večja pazljivost pri pripravi preparata kot za svetlobno mikroskopijo. V nasprotnem primeru so artefakti (napake, ki nastanejo na preparatu zaradi postopka priprave) preveliki. Za TEM moramo pripraviti ultratanko rezino, da bodo elektroni presevali skozi jo. Pri SEM debelina preparata ni pomembna, košček tkiva mora biti le dovolj majhen, da ga lahko vnesemo v mikroskop.

Glavne faze priprave ultratankih rezin:

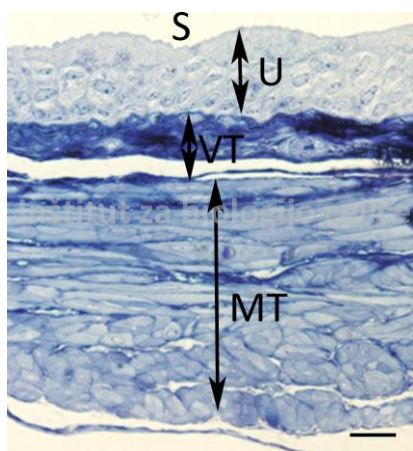
- Fiksacija z mešanico formaldehida in glutaraldehida (slika 20A).
- Koščki tkiva morajo biti manjši kot za svetlobno mikroskopijo (največ 1 mm³).
- Tkivo razrežemo pod lupo (slika 16).
- Fiksacija traja 2 do 3 ure na 4 °C.
- Izpiranje fiksativa s kakodilatnim pufrom.
- Postfiksacija z osmijevim tetroksidom, ki se veže na nenasičene maščobne kisline (slika 20B) in tako fiksira lipidne molekule – predvsem vse membrane. Osmij je atom težke kovine, na katerem se elektroni sipajo in tako doprinese h kontrastnosti membran.
- Izpiranje in dehidracija.
- Prepajanje z umetno smolo (Epon).
- Postopna polimerizacija Epona pri vedno višjih temperaturah (od 35 °C do 80 °C).
- Rezanje poltankih rezin debeline 1 µm z ultramikrotomom in steklenim nožem (slika 21A).
- Barvanje poltankih rezin s toluidinskim modrilom (slika 22).
- Pregledovanje poltankih rezin s klasičnim svetlobnim mikroskopom in orientacija v preparatu.
- Rezanje ultratankih rezin debeline od 40 do 80 nm z ultramikrotomom in diamantnim nožem iz zanimivega dela koščka (slika 21B).
- Pobiranje ultratankih rezin iz kadičke z vodo na kovinske mrežice.
- Kontrastiranje ultratankih rezin (je analogno barvanju parafinskih in zamrznjenih rezin) z mešanico uranilacetata in svinčevega citrata.
- Sušenje na zraku.



Slika 20: A) Glutaraldehyd zamreži proteinske molekule tako, da poveže dve molekuli med seboj. B) Osmijev tetroksid se veže na dvojne vezi nenasičenih maščobnih kislin.



Slika 21: A) Ultramikrotom je naprava za rezanje poltankih in ultratankih rezin. B) Diamantni nož in Epski blok s koščkom tkiva sta vpeta v ultramikrotom.



Slika 22: Poltanka eponska rezina pobarvana s toluidinskim modrilom. Prečni prerez stene sečnega mehurja (S – svetlina sečnega mehurja, U – urotelij – epitelij sečnega mehurja, VT – vezivno tkivo, MT – mišično tkivo). Merilo: 20 µm.

Tudi v presewni elektronski mikroskopiji se lahko namesto prepajanja z umetno smolo uporablja zamrzovanje in pripravi krioultratanke rezine.

Za SEM so faze priprave vzorcev do prepajanja z umetno smolo podobne kot za TEM. Namesto prepajanja z umetno smolo po dehidraciji košček tkiva posušimo, prilepimo na kovinski nosilec in naprašimo s prevodno kovino na primer z zlatom (slika 23). Kontrastiranje ni potrebno, saj dobimo kontrastno sliko zaradi reliefa površine preparata.



Slika 23: Posušen in z zlatom naprašen košček tkiva je prilepljen na kovinski nosilec, ki je vpeta v držalo za vnos v vrstični elektronski mikroskop.

2.2 VAJA: HISTOKEMIJSKE METODE

Uporabljajo se za ugotavljanje prisotnosti in lokacije določenih kemijskih sestavin celic in tkiv. Pri vseh histokemijskih metodah mora biti končni reakcijski produkt:

- stabilen,
- netopen,
- obarvan pri svetlobni mikroskopiji oziroma elektronsko gost pri presevalni elektronski mikroskopiji.

V tabeli 5 so navedene molekule in histokemijske metode, s katerimi jih dokazujemo.

Tabela 5:

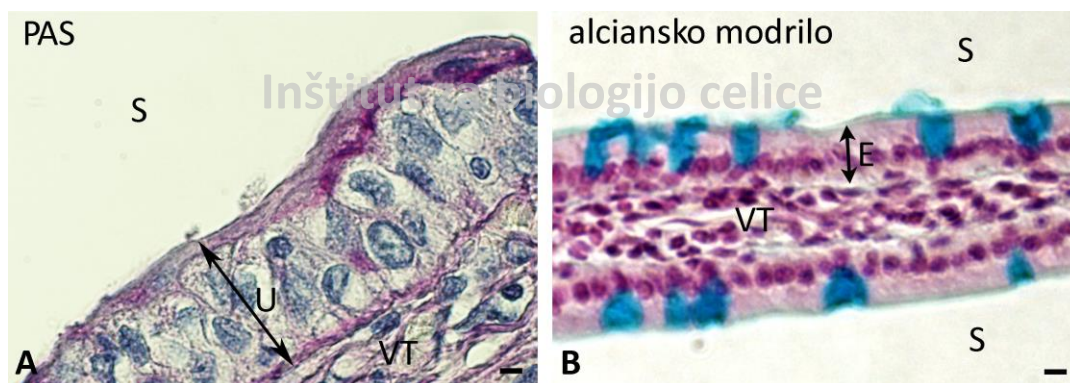
1) Skupina makromolekul	Histokemijska metoda
Nukleinske kisline	Feulgenova reakcija
Ogljikovi hidrati:	
Nevtralni proteoglikani	Reakcija PAS
Polisaharidi	Reakcija PAS
Kisli glikoproteini in glikolipidi	Alciansko modrilo
Kisli proteoglikani	Alciansko modrilo
2) Določena molekula ali njen del	
Določeno zaporedje nukleotidov (DNA ali RNA)	In situ hibridizacija (ISH)
Določen protein	Imunooznačevanje
Aktivnost določenega encima	Encimska histokemija

1. Reakcija PAS (angl. Periodic Acid Schiff)

- Za ugotavljanje enostavnih polisaharidov (glikogen, škrob) in nevtralnih proteoglikanov.
- Na parafinskih rezinah.
- Poteka v dveh korakih:
 - periodova kislina → nastanek prostih aldehydskih skupin,
 - Schiffov reagent se veže na proste aldehydne skupine in se pri tem obarva rdeče-vijolično (slika 24A).

2. Alciansko modrilo

- Za ugotavljanje kislih proteoglikanov, ki imajo številne negativno nabite skupine.
- Na parafinskih rezinah.
- Poteka v enem koraku:
 - alciansko modrilo, ki ima pozitivne naboje, se veže na sulfatne in karboksilne skupine, ki imajo negativne naboje, in jih obarva modro (slika 24B).



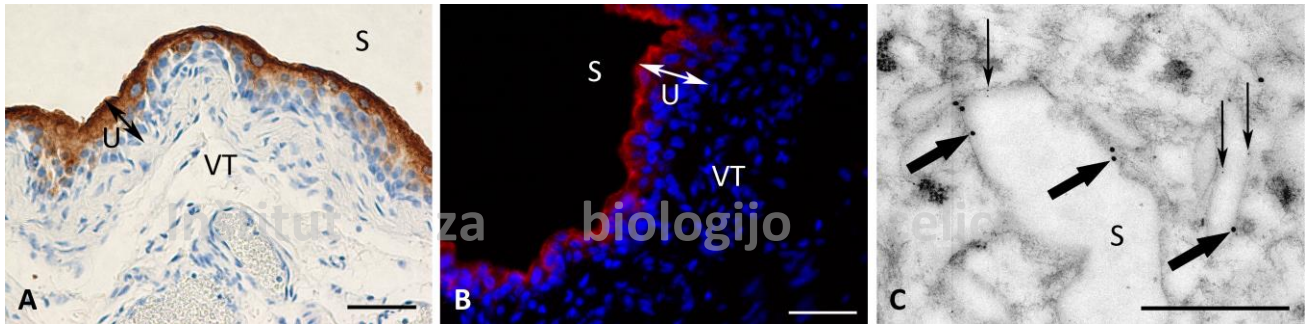
Slika 24: Dokazovanje ogljikovih hidratov z (A) reakcijo PAS v uroteliju sečnega mehurja in z (B) alcianskim modrilom v črevesnem epiteliju. S – svetlina sečnega mehurja oz. črevesa, U – urotelij, VT – vezivno tkivo, E – črevesni epitelij. Merilo: 10 µm.

3. Imunooznačevanje (imunohistokemija (IHC) na ravni tkiv, imunocitokemija (ICC) na ravni celic)

- Za ugotavljanje proteinov, ki delujejo kot antigeni za organizem druge živalske vrste.
- Na parafinskih (slika 25A), zamrznjenih (slika 25B) in krioultratankih rezinah (slika 25C).
- Najpomembnejša je izbira ustreznega primarnega protitelesa:
 - poliklonska protitelesa so izdelana s pomočjo laboratorijskih živali,
 - monoklonska protitelesa so izdelana v celični kulturi enega kлона celic, ki sintetizirajo ta protitelesa.
- Primarno protitelo se specifično veže na antigen oziroma protein, ki nas zanima.
- Po izpiranju primarnih protiteles damo na rezine raztopino sekundarnih protiteles.
- Sekundarna protitelesa so običajno poliklonska in izdelana proti primarnemu protitelesu (to pomeni, da je primarno protitelo antigen, proti kateremu laboratorijska žival izdelava protitelesa).
- Na sekundarno protitelo mora biti vezan označevalec, da vidimo mesto vezave na rezini (različni označevalci, metode vizualizacije in za detekcijo označevalca potrebni mikroskopi so navedeni v tabeli 6).

Tabela 6:

Označevalec	Metoda vizualizacije	Mikroskop
Fluorokrom (na primer FITC)	/	Fluorescenčni mikroskop
Encim (na primer peroksidaza)	Encimska histokemija	Klasični svetlobni mikroskop
Biotin	Metoda kompleksa avidin biotin (ABC)	Klasični svetlobni mikroskop
Koloidno zlato	/	Elektronski mikroskop

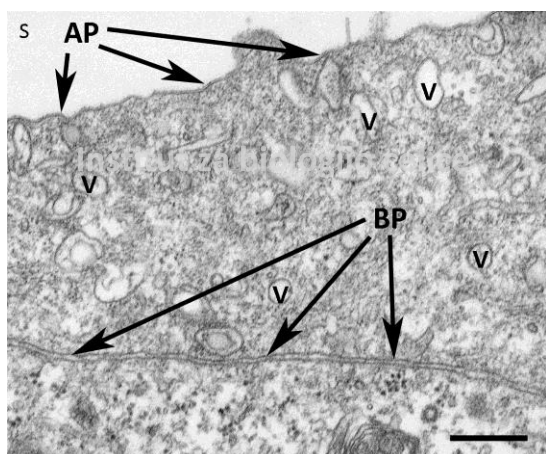


Slika 25: Imunooznačevanje uroplakinov, ki so proteini, specifični za površinske celice urotelija sečnega mehurja. A) Rjavo obarvanje v površinskih urotelijskih celicah, kjer so prisotni uroplakini. B) Rdeča fluorescenca v površinskih urotelijskih celicah, kjer so prisotni uroplakini. C) S 5 nm koloidnim zlatom (tanke puščice) so označeni uroplakini III in s 25 nm koloidnim zlatom (debele puščice) so označeni uroplakini Ia v apikalni plazmalemi površinskih urotelijskih celic in v membrani vezikla površinske urotelijske celice. S – svetlina sečnega mehurja, U – urotelij, VT – vezivno tkivo. Merilo: A, B) 50 μ m; C) 500 nm.

2.3 VAJA: CELIČNI ORGANELI IN ENCIMSKA HISTOKEMIJA

1. BIOLOŠKA MEMBRANA

- Membrano sestavlja lipidni dvosloj (fosfolipidi, glikolipidi, holesterol), v katerega so vezani membranski proteini.
- Na zunajcelični strani plazmaleme in na znotrajsvetlinski strani membran določenih celičnih organelov in veziklov so na lipide in proteine vezani ogljikovi hidrati.
- Biološke membrane sestavljajo ves endomembranski sistem evkariontske celice, kamor uvrščamo vse celične organele in najrazličnejše vezikle (slika 26).
- Plazmalema polariziranih epiteljskih celic je s tesnimi stiki razdeljena na apikalno plazmalemo, ki meji na zunanost organizma ali na svetline notranjih organov, ter bazolateralno plazmalemo, ki meji na sosednje celice (slika 26).

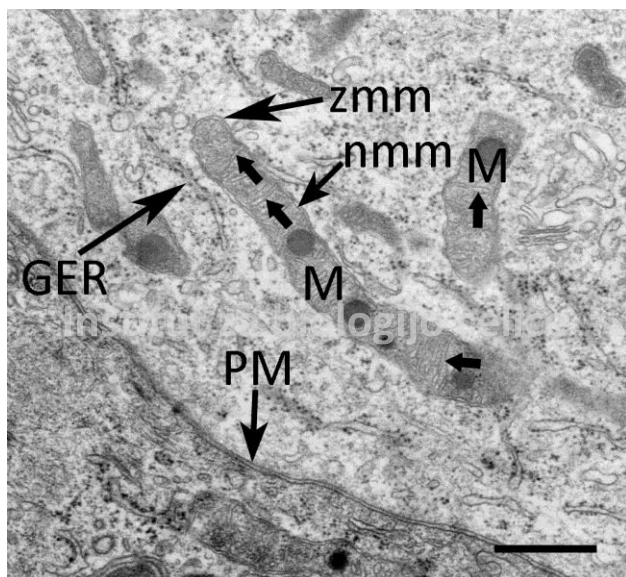


Slika 26: Vezikli (V) v citoplazmi epiteljske celice. Apikalna plazmalema (AP) meji na svetlino organa. Bazolateralna plazmalema (BP) meji na sosednjo epiteljsko celico. S – svetlina. Merilo: 200 nm.

2. CELIČNI ORGANELI

2.1. Mitochondrij

- Celični organel obdan z dvojno membrano (slika 27):
 - zunanja mitohondrijska membrana,
 - notranja mitohondrijska membrana je nagubana v kriste.
- Med membranama je medmembranski prostor, v notranjosti pa matriks mitohondrija.
- Večina mitohondrijskih proteinov je kodiranih na jedrnih molekulah DNA in se sintetizirajo na prostih ribosomih v citosolu.



Slika 27: Mitochondriji (M) z zunanjo mitohondrijsko membrano (zmm), notranjo mitohondrijsko membrano (nmm) in kristami (debele puščice). PM - plazmalema; GER – granularni endoplazemski retikulum. Merilo: 300 nm.

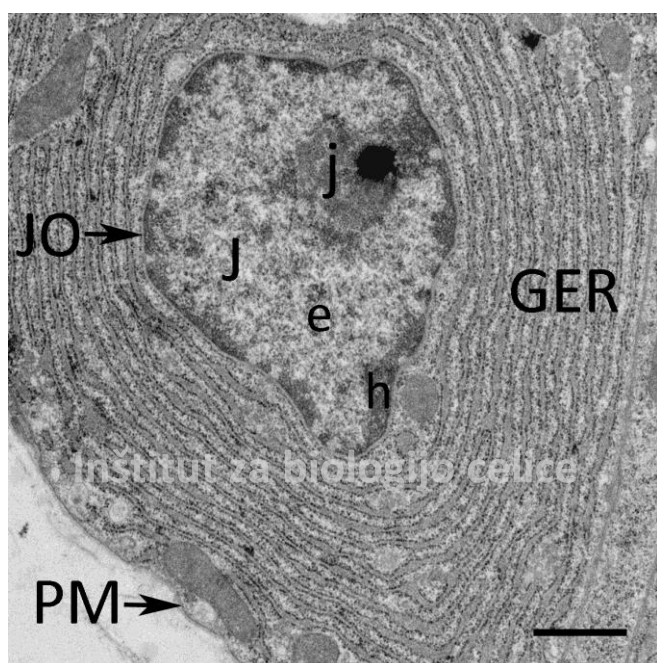
Osnovni deli mitohondrija, njihove glavne sestavine in naloge so navedeni v tabeli 7.

Tabela 7:

Del mitohondrija	Sestavine	Naloga
<u>Matriks</u>	Raztopina, ki vsebuje:	
	- <u>Encime</u> <u>Krebsovega</u> <u>ali</u> <u>citratnega</u> <u>cikla</u>	Energetsko bogati elektroni, ki pridejo iz molekul hrane se vežejo v NADH in FADH ₂ .
	- <u>Mitohondrijska</u> <u>DNA</u>	Kodira zapis za nekaj proteinov notranje mitohondrijske membrane.
	- <u>Ribosomi</u>	Omogočijo sintezo proteinov zapisanih v mitohondrijski DNA.
<u>Notranja</u> <u>mitohondrijska</u> <u>membrana</u>	Lipidni dvosloj po sestavi podoben plazmalemi prokariontske celice, ki je naguban v <u>kriste</u> in vsebuje:	Oksidativna fosforilacija.
	- <u>encimi</u> <u>dihalne</u> <u>verige</u>	Postopen prenos energetsko bogatih elektronov iz NADH in FADH ₂ do kisika (zato oksidativna). Hkrati energija teh elektronov omogoča nastanek elektrokemijskega koncentracijskega gradienta vodikovih protonov.
	- <u>proteinski</u> <u>kompleksi</u> <u>sintaze</u> <u>ATP</u>	Elektrokemijski koncentracijski gradient vodikovih protonov poganja sintezo energetsko bogatih molekul ATP (s fosforilacijo ADP), ki jih celica uporablja za energetske zahtevne procese.
<u>Zunanja</u> <u>mitohondrijska</u> <u>membrana</u>	Lipidni dvosloj po sestavi podoben plazmalemi evkariontske celice, ki vsebuje membranske proteinske komplekse <u>porine</u>	Prepuščanje vseh molekul velikih do 5000 Da, tudi molekul ATP.

2.2 Jedro

- Celični organel obdan z jedro ovojnico (slika 28), ki je sestavljena iz notranje in zunanje jedrne membrane.
- Na zunanjjo jedrno membrano so lahko pritrjeni ribosomi in na nekaterih mestih se nadaljuje v membrano zrnatega endoplazemskega retikuluma.
- Pod notranjo jedrno membrano je gost preplet intermediarnih filamentov iz laminov, ki tvorijo jedro lamino – le ta daje jedru mehansko odpornost in se povezuje tako na notranjo jedrno membrano kot na kromatin (molekule DNA navite okrog velikih proteinskih molekul histonov).
- V jedrni ovojnici so jedrne pore, sestavljene iz velikih proteinskih kompleksov, ki omogočajo transport snovi med citoplazmo in jedrom.
- V jedru poteka podvojevanje DNA (replikacija) in prepisovanje genov (transkripcija).
- V jedru je kromatin različno močno zgoščen:
 - heterokromatin je bolj zgoščen, nahaja se pod jedro ovojnico (slika 29), v njem ne poteka prepisovanje genov.
 - evkromatin je manj zgoščen (slika 28) in v njem poteka prepisovanje genov.
- V jedru je eno ali več posebnih področij, ki jih imenujemo jedrca (slika 28):
 - v jedrcu se prepisujejo molekule rRNA (ribosomska RNA) in nastajajo male in velike podenote ribosomov.



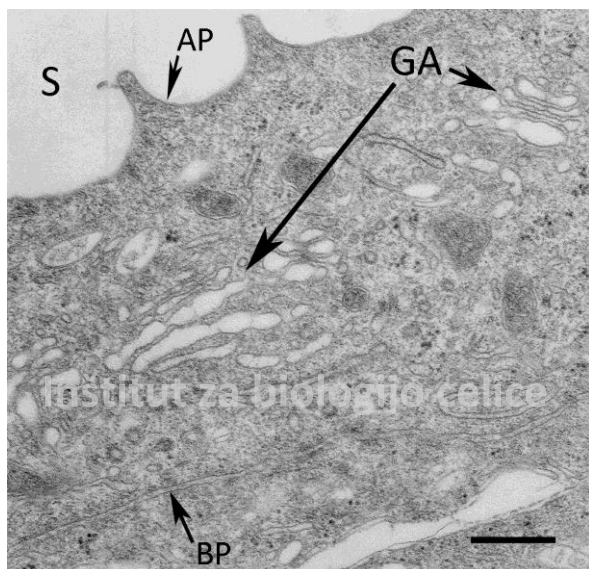
Slika 28: Jedro (J) je obdano z jedro ovojnico (JO) in vsebuje evkromatin (e), heterokromatin (h) in jedrce (j). PM - plazmalema; GER – granularni endoplazemski retikulum. Merilo: 1 μ m.

2.3 Endoplazemski retikulum

- Celični organel, ki ga funkcionalno delimo na dva dela.
- Zrnati ali granularni endoplazemski retikulum (GER):
 - zgrajen iz sploščenih cistern, na katere so na citosolni strani pritrjeni ribosomi (slika 28).
 - na teh ribosomih se sintetizirajo proteini (translacija) endoplazemskega retikuluma, Golgijevega aparata, lizosomov, peroksisomov, plazmaleme in sekrecijski proteini.
 - hkrati s sintezo se proteini kotranslacijsko translocirajo v svetlino GER-a, kjer poteka njihovo zvijanje.
- Gladki ali agranularni endoplazemski retikulum (AER):
 - zgrajen iz razvejanih cevčic brez vezanih ribosomov.
 - v njem poteka sinteza lipidov (v večini celic) in steroidnih hormonov (v celicah spolnih žlez) ter tudi razstrupljanje (v hepatocitih).

2.4 Golgijev aparat

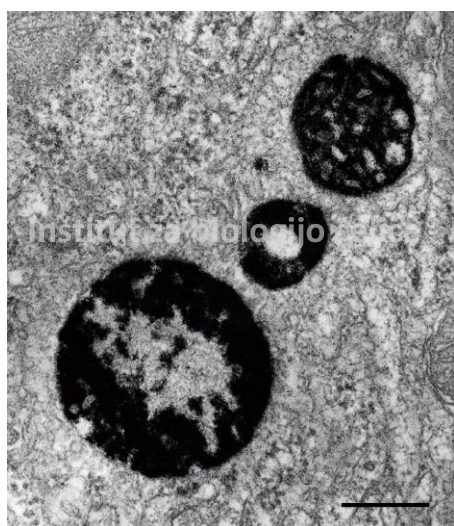
- Kompleksen celični organel (slika 29), ki je zgrajen iz treh delov:
 - cis Golgijevo mrežje, kamor pridejo pravilno zviti proteini iz GER z vezikularnim transportom.
 - Golgijeva skladovnica (cis, mediana in trans cisterna) kjer poteka glikozilacija teh proteinov.
 - trans Golgijevo mrežje, kjer se dokončno glikozilirani proteini razporejajo v transportne vezikle, s katerimi se transportirajo do mesta svojega delovanja.



Slika 29: Golgijev aparat (GA) je sestavljen iz skladovnic Golgijevih cistern in Golgijevega mrežja. BP – bazolateralna plazmalema; AP – apikalna plazmalema. Merilo: 200 nm.

2.5 Lizosom

- Celični organel obdan z enojno membrano, ki vsebuje več kot 40 različnih vrst encimov (vsi so kisle hidrolaze).
- V membrani lizosoma so poleg ostalih membranskih proteinov tudi protonske črpalke, ki zagotavljajo kisel pH (4.5-5) v notranjosti lizosoma.
- Lizosomski encimi so aktivni le v kislem pH in razgrajujejo vse biološke makromolekule (proteini, ogljikovi hidrati, lipidi, nukleinske kisline):
 - snovi iz zunajceličnega prostora, ki jih celica endocitira, in se v poznem endosomu razgradijo.
 - celici lastne sestavine, ki so izrabljene, poškodovane ali odvečne in se s procesom avtofagije omejijo v avtofagosomu ter po zlivanjem z lizosomom razgradijo.
- Transportni proteini v membrani lizosoma transportirajo končne produkte razgradnje (aminokisline, sladkorji, maščobne kisline, nukleotidi) v citosol, kjer jih celica uporabi.



Slika 30: Lizosomi označeni z encimsko histokemijsko reakcijo na kisko fosfatazo. Merilo: 200 nm. Vir: Alberts et al., 2008.

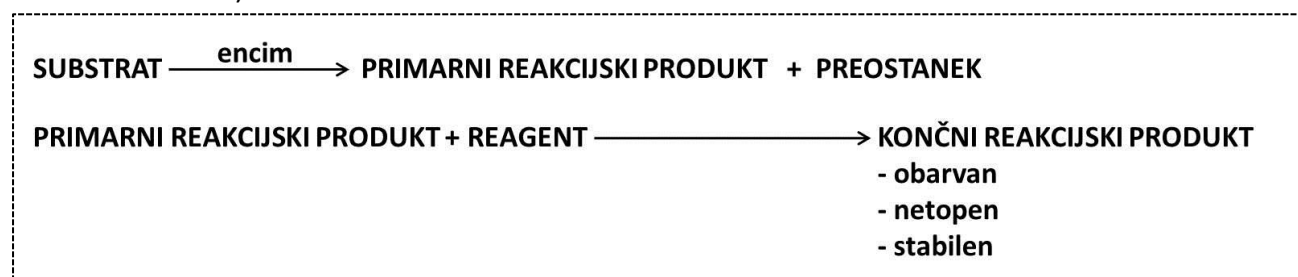
2.6 Peroksisom

- Celični organel obdan z enojno membrano, v katerem v kemijskih reakcijah nastaja in se uporablja vodikov peroksid.
- V peroksisomih je več kot 50 različnih vrst encimov, ki razgrajujejo predvsem maščobne kisline, različne toksine in alkohol.
- Večina peroksisomskih proteinov se sintetizira na prostih ribosomih v citosolu in se s selektivnim transportom transportirajo v peroksisome.
- Nekaj membranskih proteinov peroksisomov izvira iz membran endoplazemskega retikuluma, od koder se z vezikularnim transportom transportirajo do peroksisomov.

3. ENCIMSKA HISTOKEMIJA

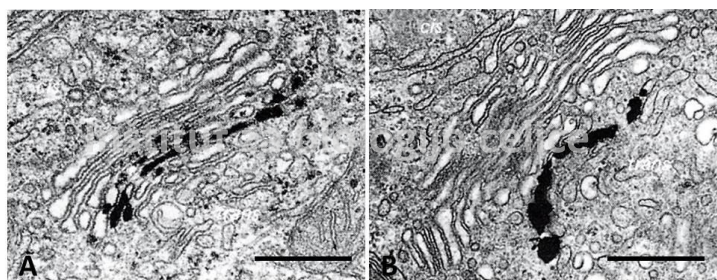
Histokemijska metoda, s katero ugotavljamo aktivnost določenega encima.

- Najprej je treba izbrati ustrezen substrat, ki je specifičen in reagira z encimom, ki nas zanima.
- V raztopini substrata lahko inkubiramo koščke tkiva (angl. pre-embedding) ali pa rezine (angl. post-embedding), vendar pred tem ne smemo uničiti encimske aktivnosti (zato pogosto uporabljamo blago kemijsko fiksacijo ali zamrzovanje).
- Po reakciji substrata in encima nastane na tem mestu primarni reakcijski produkt (slika 31).
- Sledi inkubacija z reagentom, ki je izbran tako, da reagira s primarnim reakcijskim produktom in nastane obarvan, stabilen in netopen končni reakcijski produkt (slika 31).



Slika 31: Shematski prikaz encimske histokemije.

- Kadar izvajamo encimsko histokemijo za TEM, mora biti končni reakcijski produkt elektronsko gost.
- Ker vsebuje vsak celični organeli svoje specifične encime, lahko tak encim uporabimo kot markerski encim za določen organel (slika 32 in tabela 8).



Slika 32: Golgijev aparat označen z encimsko histokemijo. A) Encim nukleozid difosfataza v trans Golgijevi cisterni. B) Encim kislja fosfataza v trans Golgijevem mrežju. Merilo: 500 nm. Vir: Alberts et al., 2008.

Tabela 8:

Markerski encim	Celični organel
citokrom oksidaza	mitohondrij
katalaza	peroksisom
kislja fosfataza	lizosomi, trans Golgijevo mrežje
nukleozid difosfataza	trans Golgijeve cisterne

3. NAVODILA ZA VAJE

1.1 vaja: UVOD V MIKROSKOPIRANJE

NAVODILA:

1. Priprava mikroskopa za mikroskopiranje:
 - a) spoznavanje in uporaba delov mikroskopa,
 - b) naravnavanje Köehlerjeve osvetlitve.
 2. Mikroskopiranje histološkega preparata:
 - a) mikroskopiranje pri majhni (4×), srednji (10×) in veliki (40×) povečavi objektiva.
 3. Uporaba imerzijskega objektiva (100×)
 4. Umerjanje okularnega merilca s pomočjo objektnega mikrometra.
-

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Izračunajte maksimalno ločljivost svetlobnega mikroskopa. Maksimalna numerična apertura je 1.4; srednja valovna dolžina vidne svetlobe je 550 nm.

2. Izračunajte ločljivost svojega mikroskopa pri vseh štirih objektivih in rezultate vpišite v tabelo.

Objektiv	NA	Ločljivost
4×		
10×		
40×		
100×		

3. Določite mikrometrsko vrednost okularnega merilca pri majhni (4×), srednji (10×) in veliki (40×) povečavi objektiva.

Pregledal: _____

1.2 vaja: VRSTE MIKROSKOPOV IN OBLIKE EVKARIONTSKIH CELIC

NAVODILA:

1. Celice kroglaste oblike – eritrociti dvoživke:

a) mikroskopiranje preparata.

2. Celice izodiametrične – jetrne celice ali hepatociti:

a) mikroskopiranje preparata.

3. Celice visokoprizmatske oblike – črevesne absorpcijske epitelijske celice ali enterociti:

a) mikroskopiranje in risanje preparata: apikalna plazmalema, bazolateralna plazmalema, citoplazma, jedro, bazalna lamina.

4. Celice vretenaste oblike – gladkomišične celice:

a) mikroskopiranje in risanje preparata: plazmalema, citoplazma, jedro.

5. Celice asimetrične oblike – živčne celice ali nevroni:

a) mikroskopiranje in risanje preparata: plazmalema, citoplazma, jedro, telo živčne celice, začetni deli citoplazemskih izrastkov.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Narišite, označite in izmerite celice visokoprizmatske, vretenaste in asimetrične oblike. Risbo opremiti z naslovom in merilcem.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

Pregledal: _____

1.3 vaja: ELEKTRONSKI MIKROSKOP

NAVODILA:

1. Presevni in vrstični elektronski mikroskop.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Kolikšna je ločljivost svetlobnega in elektronskega mikroskopa?

2. Utemeljite, zakaj je ločljivost elektronskega mikroskopa večja kot ločljivost svetlobnega mikroskopa.

Pregledal: _____

2.1 vaja: CITOLOŠKE, HISTOLOŠKE IN ELEKTRONSKOMIKROSKOPSKE METODE

NAVODILA:

1. Izdelava trajnega histološkega preparata iz parafinskih rezin:

- kemijska fiksacija s 4% formaldehidom (2 uri),
- rezanje tkiva na koščke ustrezne velikosti,
- izpiranje fiksativa s fosfatnim pufrom (pH = 7.6),
- dehidracija koščkov tkiva z etanoli naraščajočih koncentracij (70%, 90%, 100%),
- zamenjava 100% etanola s ksilolom,
- prepojitev tkiva s tekočim parafinom (65°C),
- vlivanje tekočega parafina v kalup in vklapljanje koščka tkiva,
- strjevanje parafina na sobni temperaturi,
- rezanje parafinskih rezin z mikrotomom,
- pobiranje rezin na objektnike,
- raztapljanje parafina v ksilolu (deparafiniranje),
- zamenjava ksilola s 100% etanolom,
- hidracija rezin z etanoli padajočih koncentracij (90 %, 70 %, 50 %) in vodo,
- barvanje jeder s hematoksilinom (1 minuto),
- izpiranje barvila z vodo,
- barvanje citoplazme z eozinom (1 min.),
- izpiranje barvila z destilirano vodo,
- dehidracija rezin z etanoli naraščajočih koncentracij (70%, 90%, 100%),
- zamenjava 100% etanola s ksilolom,
- vklapljanje v kanadski balzam,
- pokrivanje s krovnikom,
- mikroskopiranje.

2. Izdelava trajnega histološkega preparata iz zamrznjenih rezin:

- odvzem tkiva iz organizma,
- rezanje na koščke ustreznih velikosti,
- prepajanje s krioprotektivnim sredstvom (1 minuto),
- zmrznenje koščka tkiva v tekočem dušiku,
- rezanje zamrznjenih rezin v kriostatu,
- pobiranje rezin na objektnike,
- barvanje jeder s hematoksilinom (1 minuto),
- izpiranje barvila z vodo,
- barvanje citoplazme z eozinom (1 min.),
- izpiranje barvila z destilirano vodo,
- (tak preparat se lahko opazuje pod mikroskopom, a ni trajen)
- dehidracija rezin z etanoli naraščajočih koncentracij (70%, 90%, 100%),
- zamenjava 100% etanola s ksilolom,
- vklapljanje v kanadski balzam,
- pokrivanje s krovnikom,
- mikroskopiranje.

3. Poltanke rezine – barvanje s toluidinskim modrilom:

- kemijska fiksacija z mešanico 4% formaldehida in 2% glutaraldehida (2 uri),
- rezanje tkiva na koščke ustrezne velikosti,
- izpiranje fiksativa s kakodilatnim pufrom,
- postfiksacija z osmijevim tetroksidom (1 ura),
- izpiranje v destilirani vodi,
- dehidracija tkiva z etanoli naraščajočih koncentracij (30%, 50%, 70%, 90%, 100%),
- zamenjava 100% etanola s propilen oksidom,
- prepojitev koščka tkiva mešanico propilenoksida in Epona,
- prepojitev koščka tkiva z Eponom,
- polimerizacija Epona v termostatu (5 dni),
- rezanje poltankih rezin z ultramikrotomom,
- segrevanje objektnika s poltanko rezino nad gorilnikom,
- dodajanje kapljice toluidinskega modrila na rezino,
- barvanje (1 – 2 min.),
- izpiranje barvila z vodo,
- sušenje objektnega stekelca nad gorilnikom,
- mikroskopiranje nepokritega preparata.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Izpolnite tabeli:

	PARAFINSKE REZINE	ZAMRZNJENE REZINE
Način fiksacije		
Vklopno sredstvo za rezanje		
Naprava za rezanje		
Debelina preparata		
Obstojnost preparata		
Namen uporabe		

Ime in priimek: _____

Datum: _____

	Klasični svetlobni mikroskop	Presevni elektronski mikroskop (TEM)	Vrstični elektronski mikroskop (SEM)
Način fiksacije			
Debelina preparata			
Način kontrastiranja			

2. Shematsko prikažite glavne faze priprave trajnega histološkega preparata iz parafinskih rezin ter pri vsaki fazi napišite, zakaj je potrebna.

Pregledal: _____

2.2 vaja: HISTOKEMIJSKE METODE

NAVODILA:

1. **Reakcija PAS – nevtralni proteoglikani na površini želodčnega epitelija:**
a) mikroskopiranje in risanje preparata: plazmalema, citoplazma, jedro, bazalna lamina, nevtralni proteoglikani označeni z reakcijo PAS.
 2. **Alciansko modrilo – kisli proteoglikani v hrustančnem tkivu:**
a) mikroskopiranje in risanje preparata: plazmalema, citoplazma, jedro, lakuna, hondrocit, kisli proteoglikani označeni z alcianskim modrilom, medceličnina hrustanca.
 3. **Alciansko modrilo – kisli proteoglikani v sekrecijskih celicah tankega črevesa:**
a) mikroskopiranje preparata.
 4. **Imunohistokemija intermediarnih filamentov citokeratinov v epiteliju grla človeka:**
a) mikroskopiranje preparata.
-
-

Ime in priimek: _____

Datum: _____

NALOGE:

1. Narišite in označite hrustančno tkivo, v katerem so kisli proteoglikani označeni z alcianskim modrilom. Risbo opremite z naslovom in merilcem.

Ime in priimek: _____

Datum: _____

2. Narišite in označite želodčni epitelij, v katerem so nevtralni proteoglikani označeni z reakcijo PAS. Risbo opremite z naslovom in merilcem.

Pregledal: _____

2.3 vaja: CELIČNI ORGANELI IN ENCIMSKA HISTOKEMIJA

NAVODILA:

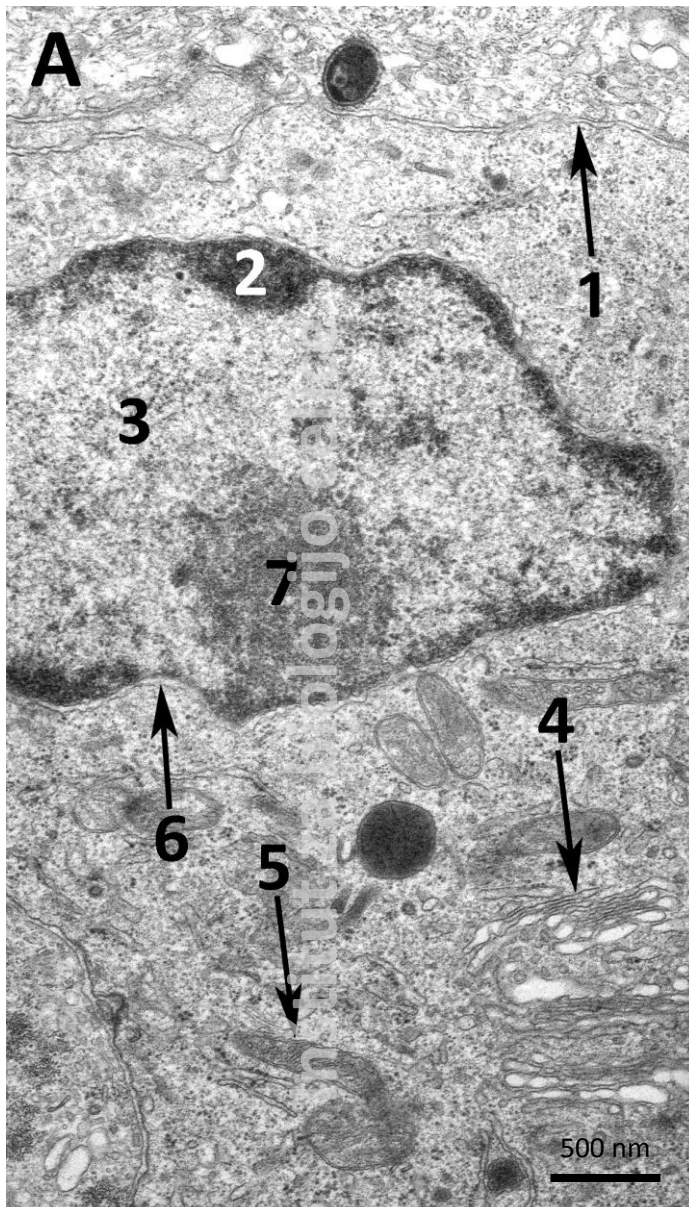
1. Mitohondriji v jetrnih celicah:
 - a) Mikroskopiranje preparata.
 2. Mikrografije ultrastrukture celic: Atlas mikrografij.
-
-

Ime in priimek: _____

Datum: _____

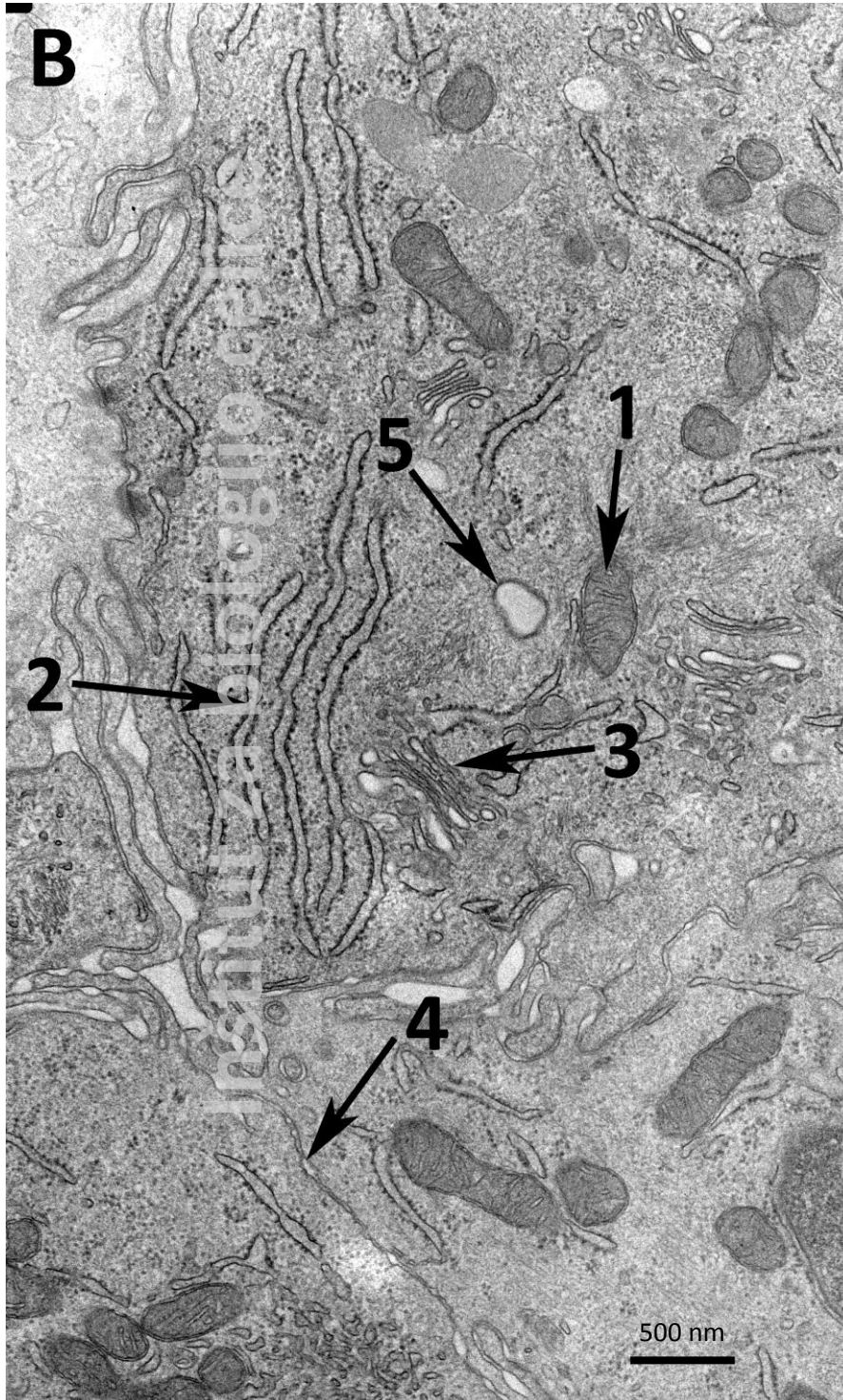
NALOGE:

1. Na mikrografijah A, B in C prepoznajte označene strukture in jih poimenujte.



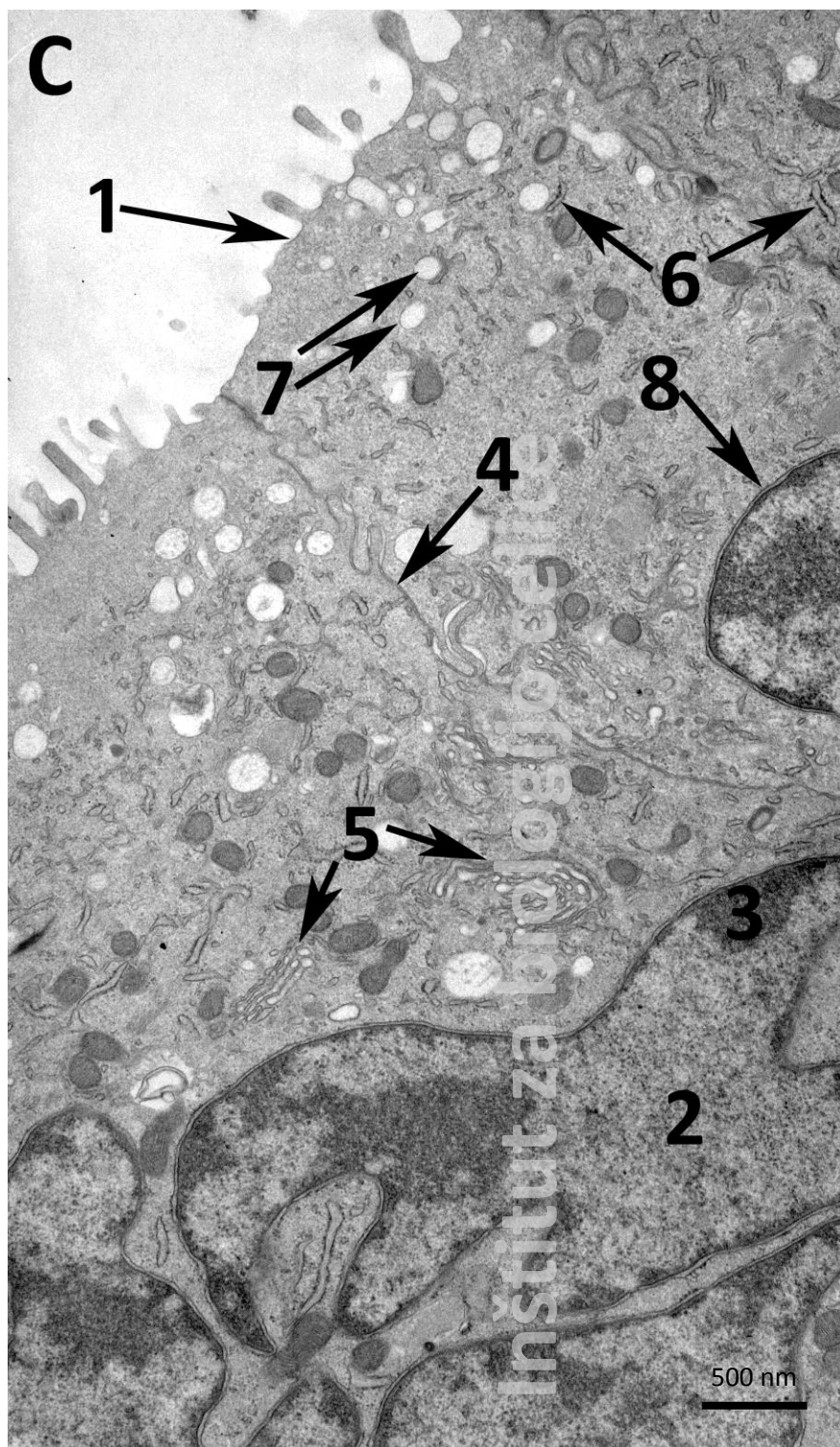
Ime in priimek: _____

Datum: _____



Ime in priimek: _____

Datum: _____



Pregledal: _____

LITERATURA:

Jezernik Kristijan, Veranič Peter, Sterle Maksimilijan; Celična biologija. DZS, 2015.

Erman Andreja, Hudoklin Samo, Kreft Erdani Mateja, Resnik Nataša, Romih Rok, Zupančič Daša; Celična biologija Atlas mikrografij. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, 2013.

Kreft Erdani Mateja, Erman Andreja, Hudoklin Samo, Nataša Resnik, Romih Rok, Daša Zupančič; Celična biologija. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, 2015.

Alberts Bruce, Bray Dennis, Hopkin Karen, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Walter Peter; Essential Cell Biology, Fourth Edition, Garland Science, 2014.

Kierszenbaum L. Abraham; Histology and Cell Biology, Mosby, 2002.

Ross H. Michael, Reith J. Edward, Romrell J. Lynn; Histology, A Text and Atlas, Second Edition, Williams & Wilkins, 1989.

Bancroft D. John, Gamble Marilyn; Theory and practice of histological techniques, Fifth Edition, Churchill Livingstone, 2002.