

578.6:578.64

ULTRATENKÉ ZMRAZENÉ ŘEZY V ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPII

Miloš NOVÁK, Pavel CHÝLE, Alexandra JELÍNKOVÁ

Vojenský ústav hygieny, epidemiologie a mikrobiologie, Praha

Ústav experimentální biologie a genetiky ČSAV, Praha

Příprava zmrazených ultratenkých řezů v elektronové mikroskopii, která je jednodušší a rychlejší než příprava preparátů a řezů běžným způsobem, byla vyvolána snahou o zachování některých ultrastruktur a enzymatických aktivit, které dosavadními zalévacími postupy byly narušeny nebo zcela inaktivovány. Tato metoda se stává prostředkem studia

ultrastruktury na nefixovaném nebo šetrně fixovaném materiálu s využitím moderních cytochemických metod. Výhody zkrácení vyšetřovacího postupu se v neposlední řadě uplatní při rychlé diagnostice v biologických a klinických laboratořích. Obtížnost přípravy ultratenkých zmrazených řezů nespočívá jen v jejich velmi malé tloušťce, která se pohybuje

okolo 70–90 nm, ale i v malé pevnosti zmrazené tkáně. Přes všechny výhody, které zmrazování vzorků skýtá ve srovnání s přípravou ultratenkých řezů v normálních zalévacích médiích, je nutno si uvědomit, že zde rovněž vznikají artefakty, byť jiného druhu, a to podmíněné samotným zmrazením biologických materiálů na nízkou teplotu.

První studie v biologii o používání této techniky se zabývaly strukturami citlivými na organická rozpustidla, a proto materiál ke studiu byl zaléván do želatiny (Fernández-Morán 1957) (6) nebo do albuminu (Kuhlmann a Miller 1971) (8). První zmrazené řezy byly krájeny na ultramikrotomu typu Porter-Blum, který byl k tomuto účelu vhodně uzpůsoben a byl umístěn v běžném kryostatu. Teplota bločku se pohybovala od -70°C do -90°C , teplota nože -25° až -70°C . Teplota v kryostatu byla okolo -35°C . Řezy byly sbírány do tekutiny (DMSO 40–60 %) o teplotě -25°C . Zásluhou řady autorů došlo ke zdokonalení této techniky a v krátké době byly některé ultramikrotomy vybaveny speciálním zařízením pro přípravu zmrazených ultratenkých řezů, aniž musel být ultramikroton umístěn v kryostatu. Firma LKB vyvinula zařízení pro přípravu těchto řezů, použitelné pro ultramikroton UT I a UT III s názvem CryoKit. Naproti tomu fa C. Reichert dodává jako speciální doplněk pro ultramikroton OmU 2 zařízení FC-150. Obdobné zařízení je pro ultramikroton OmU 3.

Někteří autoři používají různé postupy s cílem co nejvíce zrychlit a zjednodušit přípravu zmrazených ultratenkých řezů. Snaží se najít prostředky pro zpevnění křehké zmrazené tkáně. Zavádějí kryoprotektiva s cílem ochrany materiálu před poškozením krystalky vody. Zatím nejznámější a nejlepší postupy jednotlivých autorů jsme seřadili do tabulky a doplnili je naším novým postupem a zkušenostmi.

Fixace materiálu

Kousky tkáně ponoříme do 2,5% glutaraldehydu v 0,1 M fosfátovém ústoji, vychlazeném na $+4^{\circ}\text{C}$. K ředění 25% glutaraldehydu se může použít kakodylátový ústoj. Ostrou žiletkou rozkrájíme tkáň po 5minutové předfixaci na přibližnou velikost menší než 1 mm^3 . Poté dofixujeme stanovenou dobu (15–60 min. při $+4^{\circ}\text{C}$). V případě, že nebudeme zpevňovat vzorek želatinou nebo hovězím albuminem či jinými prostředky, vyjmeme kousek tkáně, který položíme na filtrační papír. Za pomoci žiletky pod zvětšovací sklem předběžně seřízneme materiál do tvaru pyramidy. Na držák vzorku položíme tkáň, a to po předchozím nakápnutí pod ní 6% metylcelulózy nebo ústojného roztoku. Na správném seříznutí pyramidy závisí další úspěch, proto skrojení věnujeme maximální péči. Pyramidu se snažíme utvořit přesnou, což usnadní konečnou úpravu, kterou provádíme již v kryokomoře po zmrazení tkáně.

Fernández-Morán (9) jako jediný použil speciální techniky, při které materiál zmrazil bez předchozí fixace, bez použití vitrificačních látek, nakrájel materiál na ultratenké řezy a prohlížel je ve speciálně upraveném elektronovém mikroskopu při zchlazení na -200°C tekutým heliem. Jedním z důvodů zavedení této techniky byla snaha odstranit chemickou fixaci a nahradit ji pochodem fyzikálním. Tato metoda je však nesmírně drahá a pro běžnou praxi prakticky nedostupná. Aby nedošlo k poškození tkáně po jejím rozmrazení, bylo použito šetrné fixace glutaraldehydem, který zachovává enzymatické aktivity a antigenní komponenty biologického materiálu. V podstatě jde o malé obměny postupu, který byl vypracován v laboratoři Bernhardově od roku 1967 (2). Podrobnosti různých modifikací jsou uvedeny v přehledné tabulce.

Ze zkušeností několika autorů se jeví jako nejvhodnější fixace 2,5% glutaraldehydem při teplotě $+3^{\circ}$ až $+4^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut až 2 hodin. K fixaci je nutno používat kvalitní glutaraldehyd. Není-li k dispozici, provádíme jeho přečištění. Po provedené fixaci je možno provést zmrazení tkáně a její nakrájení na ultratenké řezy. Tento postup vypracovala Sevéusová 1969 (10). Některé materiály jsou však velmi křehké a vyžadují zpevnění tkáně prosycením látkou, která podpoří soudržnost tkáně a zlepší její krájitelnost.

Prosycení materiálu

a) Albuminem

Materiál nakrájený a fixovaný glutaraldehydem se vloží do 10% až 20% hovězího albuminu v 0,2 M kakodylátovém ústoji o pH 7,2. Insolubilizaci provádíme přidáváním 25% glutaraldehydu po kapkách do konečné koncentrace 2,5%, během 2 minut při $+4^{\circ}\text{C}$.

b) Želatinou

Při použití želatiny se prosycovaný vzorek musí ponechat 5–20 minut při 37°C nebo 3–4 dny při $+4^{\circ}\text{C}$ v želatině, než je možno materiál krájet. Želatinu používáme nejčastěji ve 2% až 20% koncentraci. Rozpustíme ji v používaném ústoji a při 37°C vkládáme materiál do ní.

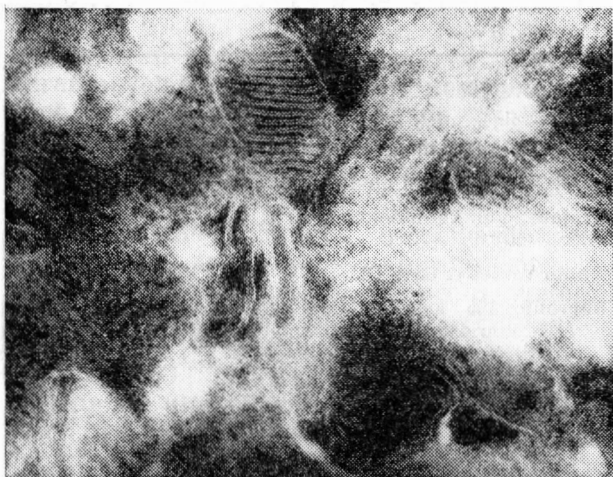
c) Thiogelem (Bernhard a Leduc 1967) (2) 10% thiogen A, mol. v. 10 000, se smíchá s 10% thiogelem B, mol. v. 100 000. Obě substance jsou v prášku a rozpustí se za silného míchání v destilované vodě při zahřátí na 80°C . Potom se ochladí na teplotu 37°C . Vzorek v thiogelu vkládáme do termostatu na 1 hodinu. Přidáním 5% DMSO se tekutý thiogel změní na vysoce elastický gel. Za 1–2 hodiny, kdy je vzorek uchováván při teplotě $+3^{\circ}\text{C}$, se může dále zpracovávat. Před krájením vzorek prosycujeme 50% glycerolem při pokojové teplotě. Vzorek se zmrazí a připevní kakodylátovým ústojem. Při krájení se používá nože zchlazeného na -23°C a vzorek je zchlazen na -70°C .

tabulka 1

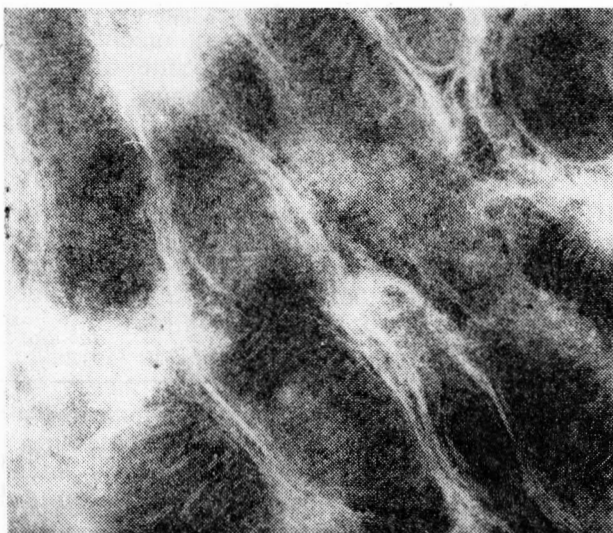
Bernhard a Leduc 1967 [2] Fixace: 2,5% glutaraldehyd pH 7,2 ředěný v 0,2 M kakodylátovém ústoji 1 hod. při +4 °C Zaliti: 20% želatina 5 až 20 min. při 37 °C nebo 3–4 dny při +4 °C Dofixování: 2,5% glutaraldehyd pH 7,2 15–30 min. Kryoprotekce: 30% glycerol 5 až 15 min. Zchlazení: tekutým dusíkem Krájení: teplota bločku –70° až –90 °C Náplň vaničky: 50% DMSO Barvení: uranylacetát 1 min. Negativní barvení: silikowolframát sodný 4% 10–20 vt. při +37 °C nebo kyselina fosfowolframová 1–2% pH 7,2 10–20 vt. při +40 °C Appleton 1968 [1] Zpracování řezů pro autoradiografii. Zmrazení provádí v tekutém dusíku a řezy krájí na sucho, tzn. bez vaničky na noži.	Sevéusová 1969 [10] Fixace: 2,5%–3% glutaraldehyd pH 7,4 v 0,1 M fosfátovém ústoji 15 min. při +4 °C Zchlazení: tekutým dusíkem Krájení: teplota bločku –70 °C až –140 °C, teplota nože –50° až –70 °C Náplň vaničky: 60% DMSO Barvení: 1% kyselina fosfowolframová pH 7,2 při +37 °C nebo 4% silikowolframát sodný při +37 °C Dollhopf a spol. 1969 [5] Fixace: 2,5% glutaraldehyd pH 7,0 ředěný v 0,1 M kakodylátovém ústoji 1 hod. při +4 °C Zaliti: 2% želatina při +37 °C Kryoprotekce: 50% glycerol 30 min., 75% glycerol 75 min., 100% glycerol 100 min. Krájení: teplota bločku –110 °C, teplota nože –40 °C Náplň vaničky: 50% DMSO
--	--

tabulka 2

Gahan a spol. 1970 [7] Fixace: 2,5% glutaraldehyd v 0,1 M kakodylátovém ústoji 2 hod. při +2 °C Kryoprotekce: 1% gummiakacia v 0,88 M sacharóze 30 min. až 2 hod. Zchlazení: –60 °C Krájení: teplota bločku –60° až –80 °C, teplota nože –30° až –40 °C Náplň vaničky: 60% DMSO Barvení: cytochemické reakce Kuhlmann a Miller 1971 [8] Fixace: jako jediný uvádí formaldehyd 4% nebo 1% až 2,5% glutaraldehyd pH 7,2 v 0,2 M kakodylátovém ústoji 50–60 min. při +4 °C Zaliti: bovinní sérumalbumin 10% až 20% v 0,2 M kakodylátovém ústoji. Insolubilizace prováděna přikapáváním 25% glutaraldehydu do konečné koncentrace 2,5%. Dokapávání trvá 2 min. při +4 °C Dofixování: 2,5% glutaraldehyd pH 7,2 15–30 min. ve výše uvedeném ústoji Kryoprotekce: 20% DMSO 10–20 min. při pokojové teplotě Zchlazení: tekutým dusíkem Náplň vaničky: 50% DMSO Krájení: teplota nože –50° až –70 °C Barvení: jako u jiných metod	Novák a Jelínková 1974 Fixace: 2,5% glutaraldehyd v 0,1 M fosfátovém ústoji při +4 °C 15 až 60 min. Zaliti a prosycení: polyetylenglykol 600 Fluka 15 až 60 min. i déle při pokojové teplotě Zchlazení: tekutý dusík Krájení: teplota bločku –110° až –120 °C, teplota nože –55 °C Náplň vaničky: 60% DMSO
---	---



Obr. 1. Ledvina, myš, zvětšení 75 000krát



Obr. 2. Ledvina, myš, zvětšení 70 000krát

d) Polyetylénglykolem

Novou metodu spojující proces podpory tkáně s ochranou kryoprotektivy v jednom úkonu jsme zavedli v naší laboratoři. Použitím polyetylénglykolu (polyglykolu) 600 fy Fluka (mol. v. 570–630) se tkáň po fixaci prosytí uvedenou látkou a po 15minutové až 60minutové expozici se provede rychlé zmrazení. U některých materiálů lze tuto dobu prosycování prodloužit. Polyglykol 600, který má bod tuhnutí okolo $+20$ až $+25$ °C, snadno proniká do tkáně a zároveň chrání tkáň před tvorbou krystalů. Po prosycení tkáně a rychlém zmrazení je možné tkáň ihned krájet na ultratenké řezy.

Dofixování materiálu

Jestliže nepoužíváme metody Sevéusové, provádíme po prosycení vzorku dofixování materiálu ponořením do 2,5% glutaraldehydu pH 7,2 po dobu 15 až 30 minut při pokojové teplotě.

Kryoprotekce

V případech, že zmrazujeme biologický materiál, chráníme ho vitrifikačními prostředky, které váží takové množství vody, že nemůže dojít k tvorbě krystalků. Tím dochází při snížení teploty k tzv. vitrifikaci, tj. ke vzniku gelu nebo tuhého amorfního roztoku, jako je tomu např. u skla (Činátl a Novák 1968) (4). V praxi se nejlépe osvědčilo použití 30% nebo postupně 50%, 70% až 100% glycerolu nebo 20% DMSO.

Úprava pyramidy a zmrazení tkáně

Bloček se před krájením vyřízne buď ze želatiny, nebo se upraví jen žiletkou po vyjmutí z fixačního roztoku. Při vyjmutí ze želatiny dbáme toho, aby okolo materiálu zůstala jen tenounká vrstvička želatiny nebo gelu. Po prosycení kryoprotektivy se na filtračním papíře dořízne čtyřboká pyramida. Zmrazení vzorku a tím i jeho připevnění na držák provádíme ve speciální nádobce. Dobře se osvědčila nádobka z polystyrénu, uprostřed které je vložena nádobka z PVC, sloužící k vlastnímu zmrazení. Do polystyrénové nádoby vlijeme tekutý dusík, do nádoby z PVC naléváme isopentan. Počkáme, až se isopentan vychladí. Toto nepřímé zchlazování vzorku musíme provádět proto, že je zapotřebí zajistit rychlé a stejnoměrné vychlazení vzorku, aby nedošlo k poškození materiálu vytvořením krystalků vody, když se nepoužije kryoprotektiv, ale i pak volíme raději rychlé nepřímé zchlazení. Zmrazíme-li vzorek přímo v tekutém dusíku, vzniká nebezpečí nerovnoměrného zchlazení a vytvoření krystalků v tkáni, neboť po vhození vzorku do tekutého dusíku se kolem bločku vytvoří páry dusíku, které zabraňují rovnoměrnému a rychlému zmrazení. Naproti tomu vychlazený isopentan ihned rovnoměrně ochladí celý vzorek. Kromě isopentanu se mohou používat i jiná chladicí média, která mají relativně vysoký bod varu a nízké body tání.

Před ponořením vzorku s držákem do chladicího média připevníme pyramidu na držák vzorku. K tomu používáme 6% metylcelulózu nebo ústojný roztok. Pracujeme opatrně a dbáme na to, aby nedošlo k posunutí pyramidy, popřípadě k jejímu překlopení na bok. Materiál upevňujeme na držák tak, aby široká základna pyramidy spočinula na držáku materiálu. Po zmrazení provádíme konečnou úpravu horní plošky pyramidy v kryokomoře pod stereomikroskopem. Plošku upravíme do příslušného tvaru plochy řezu žiletkou.

Krájení a odběr řezů

Řezy krájíme po předchozím vychlazení nože a vzorku na příslušné teploty. Řezy je možno krájet tzv. **na sucho**, tj. krájení nožem bez vaničky na noži. Řezeme nejprve tlusté řezy, silné 1–2 mikrony. Zpětně tyto silné řezy působí jako závaží, které táhne následné řezy dolů.

Ihned po zhotovení prvních tlustých řezů zapínáme automatický posuv, kterým pořizujeme řezy ultratenké. Shromažďování zmrazených řezů je velmi obtížné. Proužek řezů sbíráme na sítky pokryté formvarovou folií. Protože řezy během celého postupu nepřijdou do styku s žádným rozpustidlem (při zchlazování není u této metody používán isopentan), doporučuje se pro studium snadno difundujících struktur, např. steroidů, za použití autoradiografie nebo jiných cytochemických metod.

Christensen (3) krájel série ultratenkých řezů z čerstvých krysích jater o síle 100 nm diamantovým nožem při -75°C , série řezů krájel bez použití vaničky, na sucho a řezy sbíral na vychlazenou sítku s folií, kterou vysušoval s řezy pod proudem dusíku při teplotě -75°C .

Snadnější je však zachytávat řezy **do vaničky** naplněné vhodnou nemrznoucí tekutinou. Tekutina, kterou plníme vaničky, by měla být inertní vůči vzorku, aby nedocházelo k poškození ultrastruktury. Musí mít dostatečné povrchové napětí, vhodnou viskozitu, aby se řezy mohly při nízké teplotě udržet na hladině. Pro přípravu zmrazených ultratenkých řezů lze použít jak skleněných, tak i diamantových nožů. Pro skleněný nůž musíme zhotovovat speciální lepicí pásy, pokryté tenkou vrstvou kovu (výrobce firma Scotch). Krájení zahajujeme prvními silnějšími řezy okolo 80–90 nm, po obdržení těchto prvních řezů snížíme sílu řezů na 60–70 nm.

Dosažený výsledek velmi závisí na rychlosti krájení, úhlu nože a úhlu sklonu nože. Nemůžeme-li dosáhnout dobrých výsledků, provádíme **metodické krájení**, to znamená, že měníme systematicky rychlost krájení, úhel sklonu a úhel nože. Teplotu nože a vzorku volíme podle materiálu. Při krájení je zapotřebí, aby nedocházelo ke kolísání obou zvolených teplot. Ze zkušenosti naši i řady autorů volíme vyzkoušenou teplotu pro nůž a vzorek. Je těžké ji předem určit, protože jde o metodu poměrně novou a je zapotřebí tyto hodnoty případ od případu odzkoušet. Z naší praxe se osvědčila teplota nože -55°C , teplota vzorku -110° až -120°C . Úhel nože 50° , úhel sklonu nože 4° , rychlost krájení 2 mm/vt. Řezy sbíráme na sítku s folií. Při sběru držíme sítku v pinzetě skoro souběžně s povrchem tekutiny. Jestliže používáme k plnění vaničky DMSO, je zapotřebí po sebrání řezů na sítku provést jejich omytí destilovanou vodou při pokojové teplotě.

Barvení řezů

Negativní barvení provádíme 1% až 2% kyselínou fosfowolframovou 10 až 20 vteřin při 37°C pH 7,2, nebo barvíme 13% alkoholickým roztokem uranylacetátu v 50% alkoholu 2 minuty (můžeme použít i vodný roztok), s následným dobarvením citrátem olova podle Venabla a Coggeshalla (11) 2 minuty.

Demonstované snímky byly pořízeny z řezů krájených na CryoKitu LKB a fotografovaných v elektronovém mikroskopu JEM 7 A při 80 kV.

Souhrn

Je podán přehled metod přípravy ultratenkých zmrazených řezů pro elektronovou mikroskopii a popsána metoda zpevnění vzorku a ochrany před tvorbou krystalků ve zkoumaných tkáních polyethylenglykolem 600. Tento postup urychluje nesmírně obtížnou přípravu ultratenkých zmrazených řezů.

Literatura

1. Appleton, T.: Ultrathin sections for electron microscopy. Preliminary report, LKB Instruments, Inc., Rockville, Md., USA, 1968.
2. Bernhard, W., Leduc, E. H.: Ultrathin frozen sections: I. Methods and ultrastructural preservation. *J. Cell Biol.*, 34, 1967, s. 757–771.
3. Christensen, A. K.: Autoradiography of diffusible substances. Rothe, L. J., Stumpf W. E.: Acad. Press, N. Y., 1969, s. 349–362.
4. Činát, J., Novák, M.: Tkáňové a buněčné kultury. Příprava a pěstování. Praha, SZdN 1968, s. 202–219.
5. Dollhopf, F. L., Werner, G., Morgenstein, E.: Die Shandon-Reichert-Kühleinrichtung FC-150 zum Herstellen von Ultradünn- und Feinschnitten bei extrem niedrigen Temperaturen. II. Anwendungsbeispiele aus Biologie und Technik. *Mikroskopie*, 25, 1969, s. 33–47.
6. Fernández-Morán, H., Finean, J. B.: Electron microscope and low angle X-ray diffraction studies of the nerve myelin sheath. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3, 1957, s. 725–748.
7. Gahan, P. B., Greenoak, G. C., James, D.: Preparation of ultrathin frozen sections of plant tissues for electron microscopy. *Histochemie*, 24, 1970, s. 230–235.
8. Kuhlmann, W. D., Miller, H. R. P.: A comparative study of the techniques for ultrastructural localization of antienzyme antibodies. *J. Ultrastruct. Res.*, 35, 1971, s. 370–385.
9. Edelweiss, H.: Osobní sdělení.
10. Sevéus, L.: Cryosections; slightly fixed, unsupported (nongelatinated) and unprotected tissues. LKB Application Note, MLU/an-3. 1971.
11. Venable, J. H., Coggeshall, R.: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25, 1965, s. 407–408.