

KARIERA BARWNIKÓW W HISTOLOGII

Ewa Bres (Kraków)

Trudno sobie wyobrazić czasy kiedy badacze, chcąc opisać widoczne pod mikroskopem niewybarwione obiekty, musieli wykazać się niezwykłą pomysłowością, cierpliwością i doskonałym wzrokiem. Początkowo przedmiotem ich badań była topografia tkanek i budowa narządów organizmów żywych. W kolejnych latach zainteresowanie badaczy koncentrowało się na procesach metabolicznych, funkcjach komórek i tkanek oraz budujących je cząsteczkach, takich jak specyficzne białka, wielocukry i lipidy. Jednocześnie naukowcy stosowali coraz doskonalsze techniki i aparaturę badawczą. Niezależnie jednak od tego, jak zmieniały się cele badawcze i narzędzia, barwniki są niezmiennie integralną częścią badań w histologii – nauki o budowie i funkcjonowaniu tkanek.

Każdy czytelnik zainteresowany rozwojem nauki na pewno zadawał sobie pytanie, jak przebiegały początki stosowania barwników histologicznych i jakich informacji dostarczały one na temat topografii i budowy tkanek. Spróbujmy zatem prześledzić pokrótce historię barwników i przedstawić kilka najpopularniejszych technik barwień.

Początki barwień histologicznych i ich rozwój

Niektóre barwniki stosowane były już w starożytności do barwienia tekstyliów. Były to głównie barwniki naturalne – chlorofile, karotenoidy i antocyjany uzyskiwane poprzez gotowanie świeżych bądź suchych liści, korzeni, nasion i owoców roślin oraz koszenila – uzyskiwana poprzez gotowanie i wysuszenie na słońcu larw owadów – czerwców polskich (*Porphyrophora polonica*) oraz czerwców kaktusowych (*Dactylopius coccus*). Praktyczne wykorzystanie barwników do celów przemysłowych datuje się na okres średniowiecza, natomiast ich stosowanie do badań w naukach biologicznych zaczyna się w XVII wieku.

Rzeczony histologii zapoczątkowany został wraz z wynalezieniem mikroskopu. Pierwszy mikroskop, skonstruowany w XVI wieku w Holandii, nie zdobył uznania z powodu niewielkich powiększeń (10x). Przełomem w mikroskopii okazało się zastosowanie przez Brytyjczyka Roberta Hooke'a (1635–1703) w 1665 roku soczewki, dzięki czemu możliwe stało się kształtowanie wiązki światła i uzyskanie lepszej jakości obrazu. Dalsze ulepszenie mikroskopu przez Holendra Antoniego van Leeuwenhoeka (1632–1723)

pozwoiliło na obserwację niewybarwionych i niewymagających specjalnej obróbki małych obiektów żywych, takich jak rośliny, wodne mikroorganizmy, a także włosy i sierść ssaków w większym powiększeniu. Antoni van Leeuwenhoek uznawany jest nie tylko za ojca mikroskopii, ale także za pierwszego, który zaobserwował pod mikroskopem żywe komórki glonu z rodzaju *Spirogyra*, a także rzetelnie opisał ludzkie plemniki oraz erytrocyty. Van Leeuwenhoek w swych listach do Towarzystwa Królewskiego w Londynie (ang. *Royal Society of London*) opisuje użycie sproszkowanego szafranu zmieszanego z winem do lepszego uwidocznienia preparatów włókien mięśniowych pochodzących m. in. od krowy utuczonej i chudej. Listy te zawierają zatem informację o jednych z pierwszych udokumentowanych zastosowaniach barwnika do wybarwienia tkanek kręgowców.

Począwszy od drugiej połowy XVIII wieku badacze wybarwiali głównie tkanki roślinne ze względu na sztywność ich ścian komórkowych, mimo że występujące w komórkach roślinnych organelle, takie jak jądra komórkowe, chloroplasty i wakuole są stosunkowo dobrze widoczne pod mikroskopem bez specjalnego wybarwienia.

W 1839 roku niemieccy badacze Teodor Schwann (1810–1882), Matthias J. Schleiden (1804–1881) oraz Robert Remak (1815–1865) sformułowali komórkową teorię budowy organizmów żywych. Przedstawiła ona niezwykle zróżnicowanie struktur biologicznych i skłoniła badaczy do poszukiwania przyczyn obserwowanej różnorodności. Od 1850 roku powszechną praktyką stało się wykorzystywanie technik barwienia w mikroskopii, a niemiecki uczoney Joseph von Gerlach (1820–1896) w swej pracy o działaniu karminu na tkankę nerwową zwrócił szczególną uwagę na użyteczność barwienia tkanek w histologii i zachęcił wielu niemieckich badaczy do korzystania z barwników.

W drugiej połowie XIX wieku zaczęto na większą skalę produkować i stosować barwniki. Wprowadzono nowe barwniki pochodzenia naturalnego, np. hematoksylinę, alizarynę czy safraninę, jak również barwniki sztuczne syntetyzowane z aniliny. Mieszano różne barwniki i odkrywano dla nich coraz to nowe zastosowania.

Na przełomie XIX i XX wieku na zwiększenie zainteresowania histologią bez wątpienia wpływ miały badania hiszpańskiego patologa, laureata nagrody

Nobla, Santiago Ramón y Cajal (1852–1934). Jest on uznawany za ojca neurobiologii, pioniera badań nad anatomią centralnego i obwodowego układu nerwowego. Jego niebywale dokładne rysunki komórek nerwowych i innych związanych z nimi komórek (m.in. komórek neurogleju, komórek Schwanna) są wykorzystywane po dziś dzień w szkołach i na uczelniach jako materiały dydaktyczne.

Różnice w specyfice, jakości i kolorze barwników wytwarzanych w Europie i Stanach Zjednoczonych uświadomiły badaczom na początku XX wieku jak bardzo potrzebna była standaryzacja procedur produkcji barwników. Temat ten stał się przedmiotem dwóch konferencji, które skupiły kilkunastu czołowych naukowców, a w 1922 roku powołano tzw. Komisję ds. Standaryzacji Barwników Biologicznych (ang. *Commission on the Standardization of Biological Stains*), funkcjonującą po dziś dzień w USA.

Dalszy rozwój nauk chemicznych w XX wieku i lepsze zrozumienie reakcji chemicznych zachodzących w czasie barwienia tkanek uświadomiły naukowcom, jak wiele informacji można uzyskać dzięki różnicującemu wybarwianiu preparatów mikroskopowych tkanek (ryc. 1, 2).



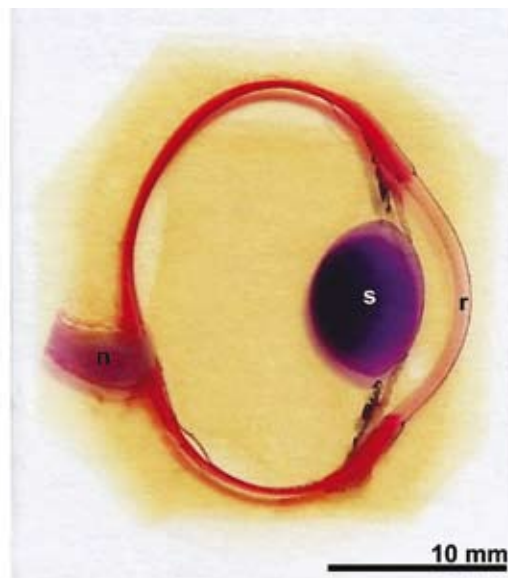
Ryc. 1. Preparat mikroskopowy z 1908 roku, ze zbiorów Zakładu Anatomii Porównawczej UJ. Bydło domowe (*Bos taurus*), przekrój poprzeczny przez układ pokarmowy, w – wątroba, t – trzustka, j – jelito. Fot. Dagmara Podkowa.

Barwienia histologiczne obecnie

Współcześnie stosowane techniki histologiczne opracowywane zostały dla tkanek kręgowców, ponieważ – w odróżnieniu od tkanek roślinnych – poszczególne organelle komórek kręgowców, takie jak jądra komórkowe czy składniki cytoplazmy, oglądane przy użyciu mikroskopii świetlnej bez zastosowania odpowiednich barwników pozostają niezróżnicowane.

Obecnie przedmiotem badań są zarówno tkanki roślinne jak i zwierzęce i w obu przypadkach ważny jest odpowiedni dobór techniki barwienia. Zależy on zarówno od typu analizowanej cząsteczki (białka, wielocukry, lipidy), jak i poziomu szczegółowości badań (mikroskopia świetlna, mikroskopia elektronowa). Przed przystąpieniem do procesu barwienia istotne jest odpowiednie przygotowanie tkanki. Najpierw tkankę należy utrwalić w utrwalaczu, który pozwala

na zachowanie struktury tkanki możliwie najbardziej zbliżonej do jej naturalnej struktury. Najpowszechniejsze utrwalacze to alkohol etylowy i metylowy,



Ryc. 2. Oko świni. Preparat mikroskopowy zatopiony w celoidynie, wykonany w 1930 roku (ze zbiorów Zakładu Anatomii Porównawczej UJ), n – nerw wzrokowy, r – rogówka, s – soczewka. Fot. Dagmara Podkowa.

kwasy octowy i pikrynowy, formaldehyd i glutaraldehyd. Najprostszym sposobem utrwalenia jest zanurzenie tkanki w utrwalaczu na określony czas, w ciągu którego grupy chemiczne utrwalacza usztywniają tkankę w różny sposób. Alkohole i większość kwasów powodują denaturację i wytrącenie się białek, natomiast utrwalacze aldehydowe wytwarzają wiązania krzyżowe wzmacniając dodatkowo strukturę tkanki. Utrwalone tkanki należy zatopić w odpowiednim do krojenia medium, np. parafinie, celoidynie, żelatynie czy żywicach (ryc. 3). Utwardzenie i zatopienie tkanki pozwala na pokrojenie jej na odpowiednio cienkie skrawki. Im cieńsze są skrawki, tym lepiej przecho-



Ryc. 3. Metody utwardzania materiału biologicznego. Opracowanie: Dagmara Podkowa, Ewa Bres.

dzi przez nie światło i tym lepiej struktura tkanki jest widoczna pod mikroskopem. Sposobem na utwardzenie tkanki może być również jej zamrożenie. Skrawki

skrawane są wtedy na specjalnym mikrotomie mroźniowym.

Przykładowo, tkanki utwardzone i zatopione w parafinie tną się na skrawki o grubości 5–7 μm i nakłada na szkiełka mikroskopowe. Przed przystąpieniem do procedury barwienia należy zanurzyć tak przygotowane skrawki w rozpuszczalniku organicznym w celu usunięcia hydrofobowej parafiny. Następnie skrawki nawadnia się w malejących stężeniach alkoholu i barwi. Po wybarwieniu skrawki odwadnia się we wzrastających stężeniach alkoholu i zatapia w balsamie kanadyjskim, permoncie lub innym medium o odpowiednich właściwościach optycznych, który twardniejąc daje trwałe preparaty mikroskopowe.

Przykładowe barwienia histologiczne

Barwienia przeglądowe

W różnicowaniu preparatów mikroskopowych tkanek zwierzęcych najczęściej spotykamy się z tak zwanymi barwieniami przeglądowymi. Cechuje je z reguły niska swoistość, gdyż barwnik może zostać związany przez wiele różnych cząsteczek. Barwienia przeglądowe stosuje się więc głównie do porównań topograficznych między różnymi typami tkanek. Przykładem barwienia przeglądowego jest barwienie hematoksyliną i eozyną. Jest ono uniwersalne i szybkie, toteż często stosuje się je w pracowniach histologicznych i histopatologicznych, jak również w placówkach dydaktycznych i instytucjach naukowych.

Hematoksylina to barwnik zasadowy uzyskiwany z drewna modrzejca kampechiańskiego (*Haematoxylum campechianum*). Barwi jądra komórkowe nadając chromatynie jądrowej zabarwienie od koloru niebieskiego do fioletowego. Sama hematoksylina jest barwnikiem słabym, dlatego łączy się ją z różnymi solami metali aby ułatwić wnikięcie barwnika do tkanki.

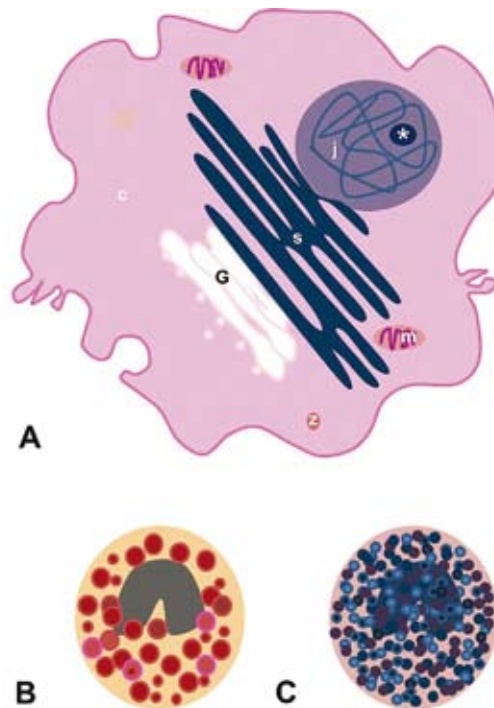
Eozyna jest pochodną fluoresceiny i reprezentuje barwniki kwaśne. Barwi cytoplazmę komórek na kolor różowy.

Schematyczny przykład barwienia hematoksyliną i eozyną przedstawia ryc. 4.

Barwienia trójbarwne

Barwienie trójbarwne (ang. *trichrome* – trzy kolory) specyficznie różnicuje tkankę łączną zawierającą włókna kolagenowe oraz tkankę mięśniową. W barwieniu tym używa się dwóch barwników kwaśnych oraz kwasu mineralnego, np. kwasu fosfowolframowego lub fosfomolibdenowego. Pierwszy czerwony barwnik kwaśny jest stosowany do przebarwienia całych skrawków tkankowych. Kwas mineralny zwiększa powinowactwo włókien kolagenowych do drugiego

barwnika kwaśnego – zielonego lub niebieskiego – zabarwiającego włókna kolagenowe. W rezultacie



Ryc. 4. Schematy przykładowych komórek wybarwionych hematoksyliną i eozyną.

A. Ogólny schemat komórki zwierzęcej. Organelle wybarwione hematoksyliną: jądro komórkowe (j) z chromatyną i jądrem (gwiazdka), mitochondrialny DNA (m), szorstka siateczka śródplazmatyczna (s). Struktury wybarwione eozyną: cytoplazma (c), ziarna wydzielnicze (z). Struktury niezabarwione: aparat Golgiego (G). B. Granulocyt kwasochłonny (eozynofil) zawiera w cytoplazmie ziarna wykazujące powinowactwo do barwników kwaśnych, barwiące się eozyną. C. Granulocyt zasadochłonny (bazofil) zawiera w cytoplazmie ziarna wykazujące powinowactwo do barwników zasadowych, barwiące się hematoksyliną. Opracowanie: Dagmara Podkova, Ewa Bres.

takiego barwienia otrzymuje się trzy kolory. Tkanika mięśniowa przyjmuje zazwyczaj kolor czerwony, a włókna kolagenowe kolor zielony lub niebieski.

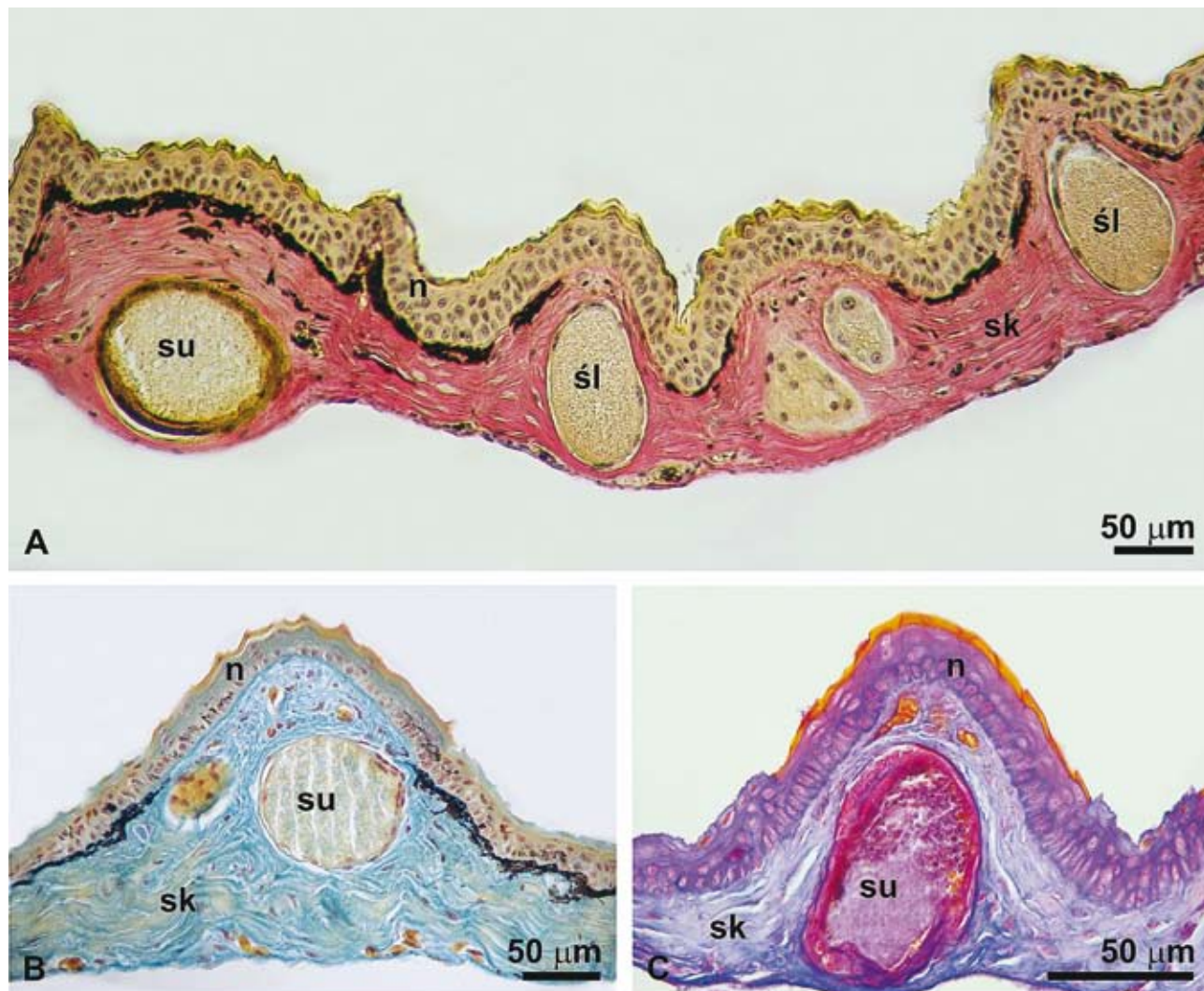
Barwienia różnymi trichromami przedstawiają ryc. 5, 6. Ryc. 7 ilustruje porównanie techniki barwienia przeglądowego z techniką barwienia trójbarwnego na przykładzie skóry żaby wodnej (*Pelophylax esculentus*).

Barwienia tkanki nerwowej

Kolejną grupą barwień histologicznych stosowanych dla tkanek kręgowców są barwienia specyficzne dla tkanki nerwowej. Wszystkie opracowane metody charakteryzują się selektywnością, ponieważ w przypadku tej tkanki wysoka zawartość lipidów oraz wyspecjalizowana struktura sprawiają, że zwykłe barwienia nie są dla niej wystarczające. Barwienia tkanki nerwowej różnicują jej poszczególne elementy strukturalne, czyli komórki nerwowe, osłonki mielinowe, komórki neurogleju. Do barwienia tkanki

nerwowej często stosuje się srebro i złoto, zgodnie z technikami opracowanymi m.in. przez Camillo Golgiego (1843–1926) oraz Santiago Ramóna y Cajala.

W technikach barwienia opracowanych przez Santiago Cajala, skrawki tkanek umieszczane są w roztworze z jonami srebra i redukującym je związkiem



Ryc. 5. Karlik szponiasty (*Hymenochirus boettgeri*). Przekrój poprzeczny przez skórę, **n** – naskórek, **sk** – włókna kolagenowe w skórze właściwej, **sl** – gruczoły śluzowe, **su** – gruczoły surowicze.

A. Trichrom Van Giesona. B. Trichrom Dubreuil i Curtisa. C. Trichrom Casona. Fot. Dagmara Podkowa.

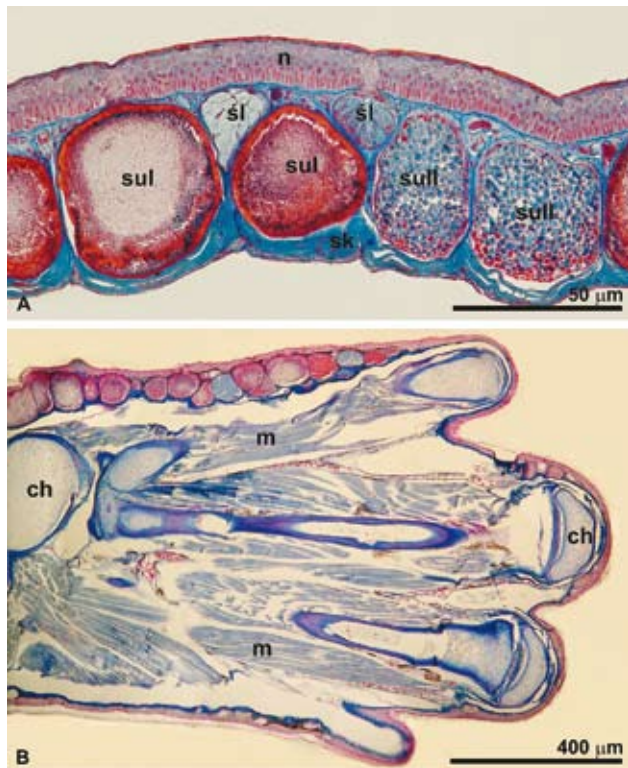
Camillo Golgi jako pierwszy wybarwił losowo srebrem ograniczoną pulę komórek tkanki nerwowej oraz przyczynił się do lepszego zrozumienia morfologii komórek nerwowych. Określone przez Golgiego mianem ‘czarnej reakcji’ (wł. *reazione nera*) barwienie umożliwiło mu obserwacje komórek nerwowych w mózgu. ‘Czarna reakcja’ polega na zatrzymaniu cząsteczek chromianu srebra na błonie komórek nerwowych. Czarny osad gromadzi się w ciele komórki nerwowej, aksonie oraz wszystkich dendrytach dając ostry ich obraz na żółtym tle. Wadą jest kapryśność techniki – nie wszystkie komórki nerwowe się wybarwiają. Zbiór barwień wykorzystujących utrwalenie tkanki w mieszaninie aldehydu-osmu-dichromianu potasu w połączeniu z impregnacją solami srebra nosi dziś nazwę technik Golgiego.

chemicznym. Na skutek zachodzącej reakcji chemicznej wytwarza się osad metalicznego srebra, który odkłada się na osłonkach mielinowych wypustek komórek nerwowych (ryc. 8). W celu zwiększenia kontrastu zabarwionych komórek nerwowych wyznakowane srebrem tkanki są często umieszczane w roztworze chlorku złota (tonowanie złotem).

Barwienie techniką Franza Nissla (1860–1919) wybarwia ziarna Nissla, inaczej tigroid, czyli specyficzne dla komórek nerwowych nagromadzenie szorstkiej siateczki śródplazmatycznej i miejsce intensywnej syntezy białek. Do barwienia służy większość barwników zasadowych, np. fiolet krezylu czy błękit toluidyny zabarwiających ziarna Nissla, nagromadzenia RNA oraz chromatynę jądrową na niebiesko.

Bardzo specyficzną techniką wykorzystywaną w badaniach komórek nerwowych jest wprowadzanie barwników lipofilowych, czyli tzw. ‘tracerów’. Jest to

uwidocznienie ciał komórek neurogleju wraz z ich wypustkami.

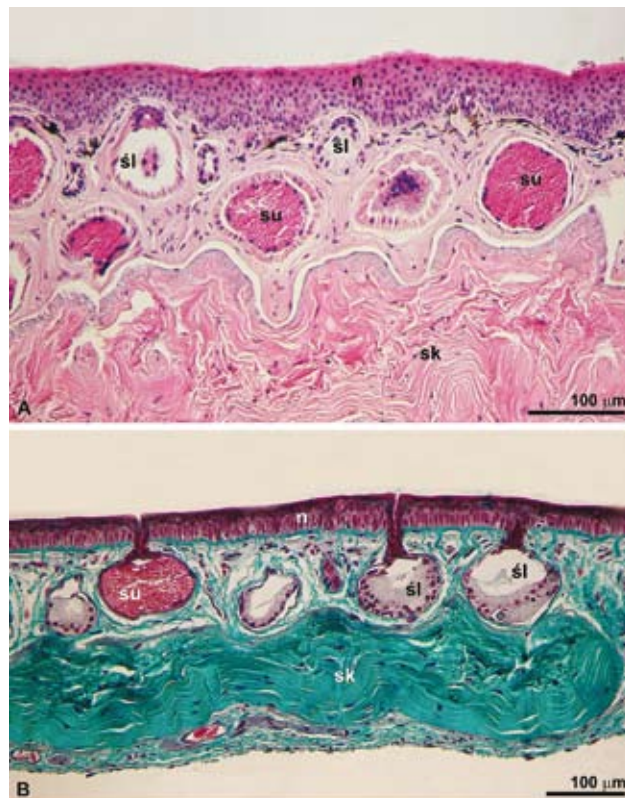


Ryc. 6. Kumak górski (*Bombina variegata*). Barwienie trichromem Pasiniego.

A. Przekrój poprzeczny przez skórę, n – naskórek, sk – włókna kolagenowe w skórze właściwej, sul – gruczoły surowicze I typu, sull – gruczoły surowicze II typu, śl – gruczoły śluzowe. B. Przekrój podłużny przez przednią kończynę, c – chrząstka, m – mięśnie. Fot. Dagmara Podkova.

obecnie najszerzej stosowana technika do śledzenia transportu wzdłuż ciała komórki nerwowej. Barwniki lipofilowe znakują komórki nerwowe poprzez boczną dyfuzję w ich błonie plazmatycznej. Nie są toksyczne i pozwalają na znakowanie zarówno żywych, jak i utrwalonych komórek nerwowych, a ich użycie gwarantuje otrzymanie doskonałego, trójwymiarowego obrazu tkanki nerwowej.

Znacznie trudniej uwidocznić jest w preparatach histologicznych komórki neurogleju. Neuroglej tworzą astrocyty, oligodendrocyty i mikroglej w centralnym systemie nerwowym oraz komórki Schwanna i komórki satelitarne w obwodowym systemie nerwowym. Komórki neurogleju wytwarzają mielinę, ochraniają i wspomagają komórki nerwowe w ich funkcjach. Choć jądra komórek neurogleju barwią się barwnikami zasadowymi takimi jak hematoksylina, ich ciała pozostają w barwieniach przeglądowych niewyróżnionowane. Dlatego stworzono techniki specjalnie dla komórek neurogleju takie, jak techniki Golgiego czy opracowane przez Carla Weigerta (1845–1904). Techniki te pozwalają na specyficzne

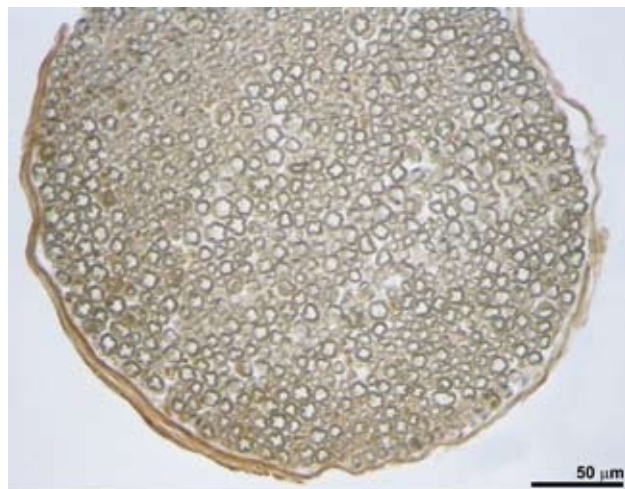


Ryc. 7. Żaba wodna (*Pelophylax esculentus*), przekrój poprzeczny przez skórę, n – naskórek, sk – włókna kolagenowe w skórze właściwej, su – gruczoły surowicze, śl – gruczoły śluzowe.

A. Hematoksylina i eozyna. B. Trichrom Gomoriego. Fot. Dagmara Podkova.

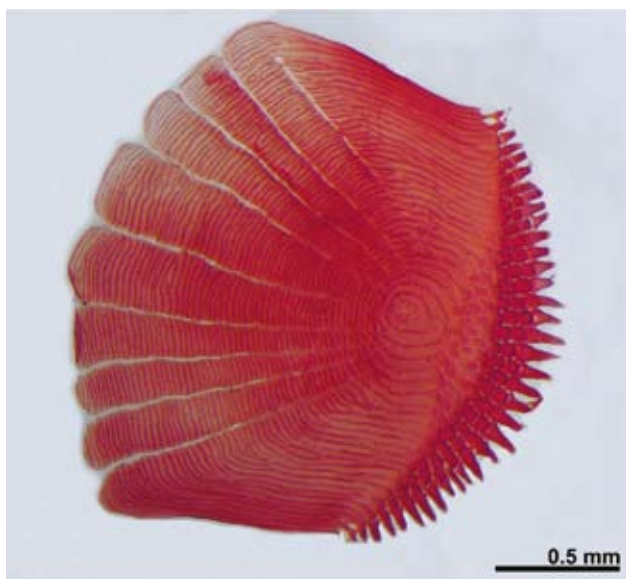
Barwienia alizaryną

Do wybarwienia tkanek zmineralizowanych, takich jak kości, zęby czy łuski kręgowców, które zawierają jony wapnia, stosuje się alizarynę. Tkanki takie szlifuje się mechanicznie do otrzymania płytek o grubości 20 µm. Płytki są następnie barwione alizaryną



Ryc. 8. Przekrój poprzeczny przez włókno nerwowe barwione metodą srebrzenia wg Bielschowskiego. Preparat ze zbiorów Zakładu Biologii i Obrazowania Komórki UJ. Fot. Dagmara Podkova.

przylączającą się do miejsc bogatych w wapń i uwiadaczniącą je na rubinowo. W przypadku łusek ryb nie trzeba wykonywać szlifów z uwagi na dużą cienkość tych struktur (ryc. 9). Najbardziej spektakularnym przykładem barwień alizaryną jest ukazanie budowy anatomicznej utrwalonego, całego organizmu *in situ* (czyli bez naruszenia struktury organizmu).



Ryc. 9. Łuska zgrzeblowata (ktenoidalna), jazgarza (*Acerina cernua*) wybarwiona alizaryną. Fot. Dagmara Podkowa.

Mówimy wtedy o tzw. preparatach alizarynowych (ryc. 10). Alizarynę można stosować w połączeniu z innymi barwnikami, np. błękitem alcjanu uwidaczniającym tkankę chrzęstną. Istnieją także kombinacje techniki alizarynowej z technikami histochemicznymi. Pozwalają one m.in. na uwidocznienie szkieletu wraz z układem nerwowym.

zachodzących pomiędzy składnikami komórki a barwnikami. Wprowadzony barwnik łączy się z ugrupowaniem chemicznym specyficznym dla danego rodzaju białek, wielocukrów czy lipidów. Prowadzi to do powstania stałych, widzialnych pod mikroskopem barwnych strąków. W celu lepszego

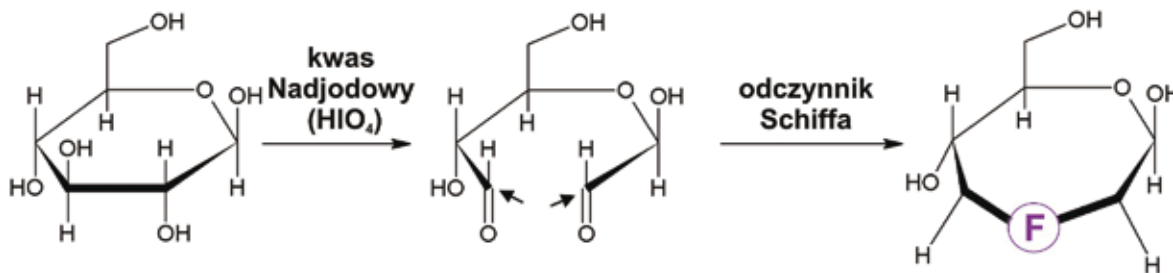


Ryc. 10. Barwienie szkieletu *in situ* alizaryną.

A. Kumak (*Bombina* sp.). Widok od strony brzusznej. Kości wybarwione na czerwono alizaryną, chrząstka wybarwiona na niebiesko błękitem alcjanu. B. Traszki zwyczajne (*Lissotriton vulgaris*). Widok od strony grzbietowej. Fot. Dagmara Podkowa.

wyróżnienia wybarwionych związków chemicznych często stosuje się barwniki kontrastujące, takie jak hematoksylina nadająca kolor jądom komórkowym lub czerwień jądrowa podbarwiająca cytoplazmę, jądra komórkowe i tkankę łączną.

Jest wiele przykładów barwień histochemicznych. Szeroko stosowana reakcja PAS (ang. *Periodic Acid Schiff reaction*) uwidacznia obojętne wielocukry (ryc. 11). Do wybarwiania substancji lipofilowych służy czerwień oleista, a błękit alcjanowy różnicuje kwaśne glikozaminoglikany wchodzące w skład błon podstawnych, elementów tkanki łącznej, chrzęstnej i kostnej czy wydzielin gruczołów (ryc. 12).



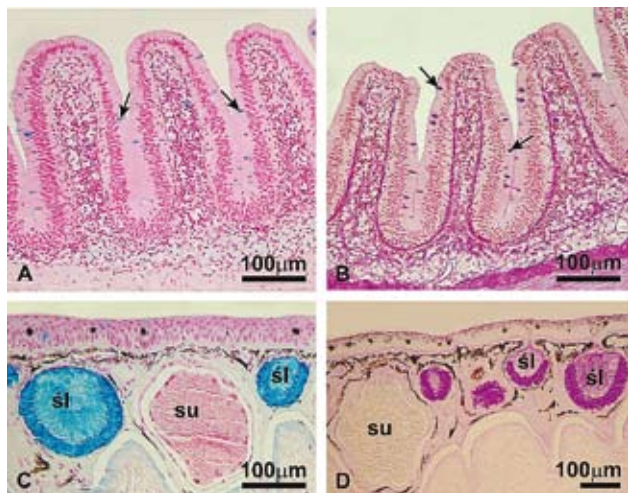
Ryc. 11. Przebieg reakcji PAS wykrywającej obojętne wielocukry (polisacharydy) zawierające pierścienie heksozowe. Utlenianie materiału w kwasie nadjodowym prowadzi do otwarcia pierścienia i powstania grup aldehydowych (strzałki). Odczynnik Schiffa, czyli odbarwiona forma fuksyny zasadowej przylączy się do grup aldehydowych dając barwny produkt reakcji (F). Zmodyfikowane wielocukry barwią się na kolor purpurowy. Opracowanie: Dagmara Podkowa.

Barwienia histochemiczne

Techniki histochemiczne mają na celu wyodrębnienie ugrupowań chemicznych tworzących komórki i tkanki nie zmieniając ich właściwości chemicznych i pozwalając na określenie charakteru tkanki. Histochemia opiera się na reakcjach chemicznych

Innym typem reakcji histochemicznych są reakcje uwidaczniające produkty aktywności enzymów, na przykład hydrolaz czy enzymów oksydacyjno-redukcyjnych. Zasada działania oparta jest na podaniu do środowiska reakcji substratu dla danego enzymu. W celu uwidocznienia powstałego produktu reakcji

stosuje się różnego rodzaju barwniki. Przykładowo, aktywność dehydrogenaz mleczanowych uwidacznia się stosując sole tetrazolowe. W formie utlenionej sole te są bezbarwne, natomiast pod wpływem reakcji dehydrogenazy z mleczanem, ulegają one redukcji dając niebiesko-granatowe zabarwienie.



Ryc. 12. Barwienie histochemiczne: błękit alcjanu i reakcja PAS. A–B. Jelito płotki (*Rutilus rutilus*). A. Błękit alcjanu, komórki kubkowe w nabłonku jelita zawierające kwaśne mukopolisacharydy zabarwione na kolor niebieski (strzałki). B. Reakcja PAS, komórki kubkowe w nabłonku jelita zawierające obojętne wielocukry zabarwione na purpurowo (strzałki). C–D. Skóra żaby wodnej (*Pelophylax esculentus*). C. Błękit alcjanu, gruczoły śluzowe (sl) zawierające kwaśne mukopolisacharydy zabarwione na kolor niebieski. D. Reakcja PAS, gruczoły śluzowe (sl) zawierające obojętne wielocukry zabarwione na purpurowo. Gruczoły surowicze (su) nie wykazały dodatniej reakcji na błękit alcjanu i PAS. Fot. Dagmara Podkowa.

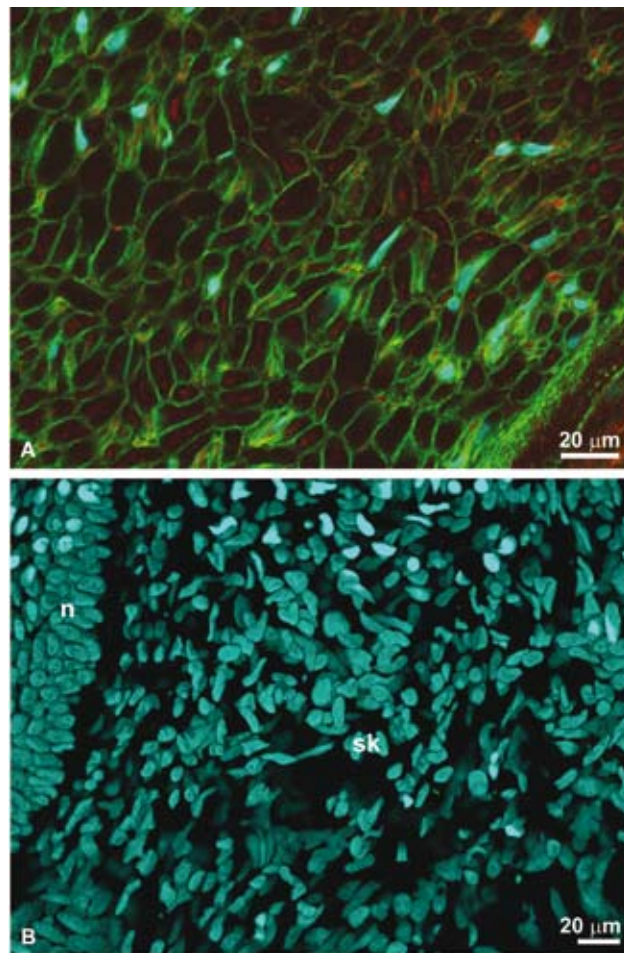
Barwienia immunohistochemiczne

Immunohistochemia to technika odnosząca się do procesu wykrywania antygenów, takich jak białka w komórkach lub tkankach, przy pomocy przeciwciał wiążących się specyficznie do antygenów tkankowych. Pozwala to na poznanie dokładnego miejsca lokalizacji białka w obrębie komórki i tkanki. Wizualizacja reakcji przeciwciała z antygenem odbywa się poprzez przyłączenie do przeciwciała enzymu, np. peryoksydazy, katalizującego powstanie barwnego produktu reakcji. Alternatywnie, do przeciwciała może być także dołączony barwnik fluorescencyjny, np. fluoresceina.

Immunohistochemia ma wiele zastosowań, m. in. do wykrywania białek odpowiedzialnych za procesy nowotworzenia, do identyfikacji białek obecnych w komórkach podlegających apoptozie, czyli zaprogramowanej śmierci komórkowej, jak i do znakowania komórek proliferujących, czyli mnożących się. Metody immunohistochemiczne pozwalają ponadto na specyficzne uwidocznienie komórek zawierających badane cząsteczki. W ten sposób można na przykład wybiórczo wybarwić w mózgu astrocyty, znakując zawarte

w nich specyficzne białko GFAP (ang. *Glial Fibrillary Acidic Protein*; kwaśne białko włóknkowe) albo wybiórczo wybarwić komórki nerwowe zawierające poszukiwany neuroprzekaznik peptydowy.

Ryc. 13A przedstawia preparat mikroskopowy nerwu kulszowego kumaka górskiego (*Bombina variegata*) wyznakowanego immunohistochemicznie.



Ryc. 13. Kumak górski (*Bombina variegata*). zdjęcia z mikroskopu konfokalnego należącego do: Confocal Microscopy Laboratory, Institute of Zoology, Jagiellonian University, LSM 510 META, Axiovert 200 M, ConfoCor 3 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany).

A. Preparat mrożeniowy nerwu kulszowego wyznakowany dwoma przeciwciałami I-rzędowymi (anty-lamininy i anty-S100) oraz skierowanymi przeciwko nim przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi z fluorochromami. Lamininy (wybarwione na zielono) to glikoproteiny będące głównym składnikiem błony podstawnej komórek. S-100 (wybarwione na czerwono) to specjalna rodzina białek obecna w komórkach Schwanna, melanocytach, keratynocytach czy komórkach dendrytycznych. Połączenie znakowania przeciwciałami oraz barwienia DAPI pozwoliło na określenie granic komórek (laminina, położenia jąder komórkowych (DAPI) oraz identyfikacji komórek Schwanna otaczających nerwy (S-100). B. Przekrój poprzeczny przez skórę. Jądra komórkowe wybarwione na niebiesko za pomocą DAPI-barwnika fluorescencyjnego silnie wiążącego się z DNA, n – naskórek, sk – skóra właściwa. Fot. Dagmara Podkowa, Ewa Bres.

Fluorescencja

Kolejną precyzyjną techniką jest fluorescencja. Fluorescencja jest to rodzaj świecenia (luminescencji) polegający na emitowaniu pochłoniętego wcześniej kwantu promieniowania elektromagnetycznego

przez daną organelę w komórce. Światło emitowane przez taką organelę odznacza się większą długością fali i mniejszą energią niż światło pochłonięte.

Tylko nieliczne organelle komórkowe, takie jak lizosomy i mitochondria, wykazują autofluorescencję, czyli naturalną emisję światła dzięki obecności w ich wnętrzu fluoroforów. W przypadku pozostałych organelli, ich wyodrębnienie odbywa się poprzez wyznakowanie fluoroforem sztucznie wprowadzonym do komórki. Fluorofory to związki chemiczne, które mogą absorbować energię o określonej długości fali, a następnie wyemitować światło o innej długości fali. Kolor fluorescencji zależy od własności fluoroforu. Przykładowe fluorofory najczęściej stosowane to DAPI – barwnik jądrowy (ryc.13B), fluoresceina czy jodek propidyny. Bardzo dużym zainteresowaniem cieszy się także fluorofor wyodrębniony z tkanek meduzy (*Aequorea victoria*). Jest to wykazujące autofluorescencję białko GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*), szeroko obecnie stosowane m.in. w inżynierii genetycznej do badań nad ekspresją genów.

Zastosowanie fluorescencji pozwala na znakowanie organelli komórkowych i związków chemicznych obecnych w komórce w minimalnych ilościach oraz na wgląd w toczące się we wnętrzu komórki procesy chemiczne. Oglądanie tkanek i komórek wyznakowanych fluorescencyjnie możliwe jest dzięki mikroskopii fluorescencyjnej.

Wraz z rozwojem nauk biologicznych i biotechnologicznych ciągłym modyfikacjom podlegają

tradycyjne techniki barwień, jak również pojawiają się nowe, bardziej zaawansowane. Obecnie stosuje się różne kombinacje opisanych powyżej technik histologicznych. Udoskonalenie procedur barwienia pozwala na poszerzenie możliwości klasycznych barwień histologicznych, zwiększenie precyzji i szybkości wykonania preparatu.

Nasze krótkie spotkanie z barwnikami histologicznymi i ich niezwykle interesującą historią powoli dobiega końca. Zapoznajmy się jeszcze ze zdjęciami preparatów mikroskopowych i alizarynowych przedstawiającymi niektóre z dawniej i obecnie stosowanych technik barwień histologicznych. Część preparatów mikroskopowych pochodzi ze zbiorów Zakładu Anatomii Porównawczej UJ z 1900 roku. Porównując współczesne preparaty mikroskopowe z XX-wiecznymi czytelnik może sam przekonać się o zmianach jakie zaszły w dziedzinie barwień histologicznych. Dotyczą one rodzaju używanych barwników oraz sposobu wykonania i opisu preparatów. Dawniej czynności te wymagały od badacza o wiele większego nakładu czasu i były bardzo pracochłonne.

Obecnie stosowane techniki barwień są wciąż udoskonalane i wspomagane coraz bardziej precyzyjną aparaturą badawczą. Kariera barwników w histologii trwa nieprzerwanie, a one same wciąż inspirują badaczy.

■ Mgr Ewa E. Bres jest doktorantką w Zakładzie Anatomii Porównawczej UJ przy Instytucie Zoologii UJ w Krakowie. E-mail: ewa.bres@uj.edu.pl.

ZWIERZĘTA-„MATEMATYCY” – FAKTY, ROZWAŻANIA

Jerzy Andrzej Chmurzyński (Warszawa)

Wprowadzenie. O czym będzie mowa?

Czyż zwierzę może być matematykiem?

– To zależy od rozumienia dwóch terminów. Jeśli *matematykę* będziemy rozumieli ściśle jako „zespół nauk posługujących się metodą dedukcyjną, zajmujących się głównie badaniem zbiorów liczb, punktów i innych elementów abstrakcyjnych”, a *matematyka* jako „pracownika naukowego zajmującego się matematyką”, albo jako osobę (a więc człowieka) „studiującą matematykę, uzdolnioną w tej dziedzinie” – to oczywiście zwierzę nie może być matematykiem!

Jeżeli wszakże dokonać pewnej modyfikacji znaczenia tych terminów (ktoś może powiedzieć...

manipulacji), to się okaże, iż istnieją zwierzęta, które można uznać za matematyków – choćby w cudzysłowie.

Przede wszystkim trzeba z definicji matematyka usunąć jednoznaczność charakterystykę podmiotu jako człowieka; wystarczy powiedzieć, że jest nim – „istota żywa”. A matematykę określimy po staroświecku jako „umiejętność posługiwania się liczbami i utworami przestrzennymi (figurami geometrycznymi)”; wszak gr. *mathēmatikē* wywodzi się z *máthēma* ‘umiejętność, a dopiero wtórnie – nauka’. Wypada też dopuścić, że „matematyk” nie musi *expressis verbis* posługiwać się liczbami, ale tym, co one wyrażają – a więc, że zajmuje się tym, co można *liczyć* i *mierzyć*: własnościami ciał, zjawiskami i relacjami.