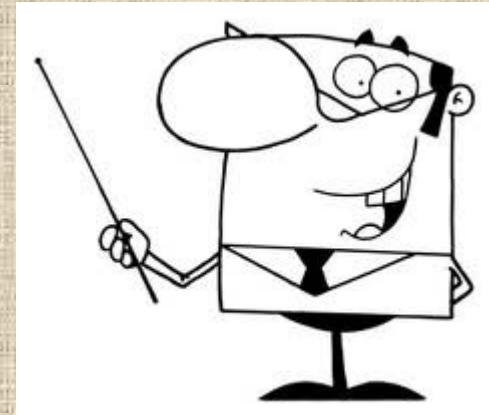


# Histologie - cvičení

Laboratorní zpracování tkání a orgánů  
pro světelnou a elektronovou mikroskopii



# HISTOLOGIE

- Nauka o stavbě normálních, tj. zdravých buněk, tkání a orgánů na mikroskopické a submikroskopické úrovni
  - **obecná histologie** + cytologie
  - **speciální histologie** = mikroskopická anatomie (stavba orgánů jednotlivých systémů)
- význam histol. Vyšetření v klinické praxi: onkologie, chirurgie, hematologie, patologie a soudní lékařství

# Zpracování tkání a orgánů pro účely histologického vyšetření ve světelném mikroskopu (příprava trvalého histologického preparátu)

- **ODBĚR** vzorků
- **FIXACE** tkání
- **PRANÍ**
- **ZALÉVÁNÍ** (parafinové bločky)
- **KRÁJENÍ**
- **NAPÍNÁNÍ A LEPENÍ** řezů
- **BARVENÍ** řezů
- **MONTOVÁNÍ** ⇨ trvalé preparáty

# ODBĚR MATERIÁLU

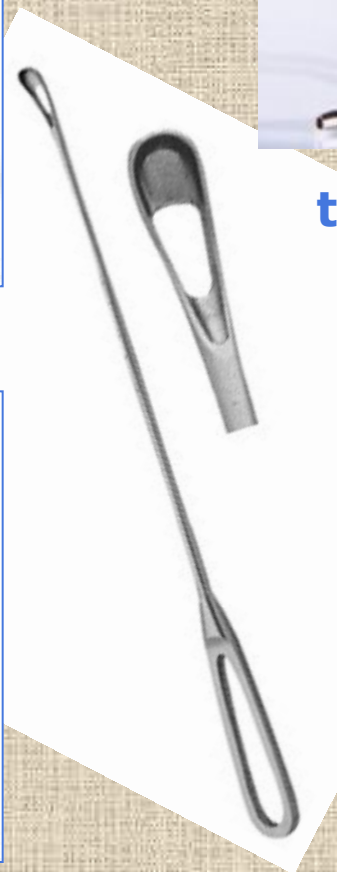
- velikost odebraného vzorku tkáně **5 – 10 mm<sup>3</sup>**, fixace následuje bezprostředně!
- **biopsie** z živého organismu (v průběhu chirurgických zákroků; neinvazivní odběr – stěr z povrchu sliznice)
  - excise (vyříznutí)
  - punkce dutou jehlou (jaterní nebo ledvinný parenchym, kostní dřeň)
  - kyretáž (např. endometrium)
- **nekropsie** z mrtvého organismu (pitva); laboratorní zvíře



# Pomůcky k odběru:



**trokar** – dutá jehla s mandrenem



**kyreta**

# FIXACE

Cílem fixace je zachování struktury buněk a tkání ve stavu, který je co nejpodobnější tomu, v němž se vyskytují zaživa - „šetrné“ usmrcení buňky s minimem artefaktů

Fixace předchází vysoušení, svraštění a autolýze tkáně. Zastaví metabolické děje jejich zpomalením (v případě zmrazení) či inaktivací enzymů a dalších proteinů (denaturace = změna konformace)

## Požadavky na fixační činidlo

- zachovat strukturu
- rychle prostoupit tkáň
- neovlivňovat výsledek barvení

# FIXACE

## fyzikální

- vysokou teplotou (var, žíhání nad plamenem)
- nízkou teplotou (lyofilizace, mrazová substituce
  - kryoprezervační látky)

## chemická - roztoky organických a anorganických látek

- imerze – ponoření do fixativa
- perfuze – promývání (intravenózní aplikace fixativa)

# Chemická fixativa

- Organická**
- Aldehydy – formaldehyd (*SM*)  
glutaraldehyd (*EM*)
  - Alkoholy – etanol 96 – 100 % (absolutní etanol)  
– methanol, aceton
  - Organické kyseliny – led. octová, pikrová, trichloroctová

- Anorganická**
- Anorganické kys. – chromová,
  - Soli těžkých kovů –  $\text{HgCl}_2$ , oxid osmičelý ( $\text{OsO}_4$ )

**Směsi:** FLEMMING ( $\text{OsO}_4$ ), ZENKER, HELLY, SUSANNA ( $\text{HgCl}_2$ ),  
BOUIN (kys. pikrová), CARNOY (alkohol)

Postup fixace – vzorek přelit 20 – 50 násobným množstvím fixačního činidla  
(1  $\text{cm}^3$  : 20 – 50 ml), 12 – 24 hodin při pokojové teplotě



# PRANÍ a ZALÉVÁNÍ

- odstranění fixačního činidla ze vzorku; výběr vypíracího roztoku závisí na fixaci: **voda** nebo **alkohol** (70-80%)
- **Prosycení, zalévání** – příprava vzorků pro krájení (tvrzení)  
Zalévací média – prosycují (prostupují) vzorek a tvrdnou
  - ve vodě rozpustná: želatina, celodal (polymer močoviny a formolu)
  - ve vodě nerozpustná: parafin, paraplast(vzorky se musí odvodnit – vzestupná alkoholová řada)

## Zalévání do parafinu

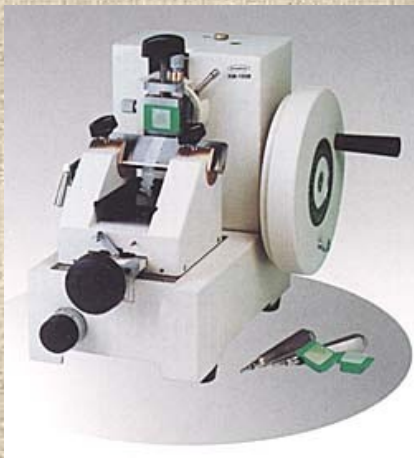
- **Odvodnění** – odvodnění fixovaných vzorků v zestupnou řadou etanolu (50%, 70%, 90%, 96% každá lázeň 2 – 6 hodin)
- **Projasnění** – vytěsnění alkoholu médiem, které se mísí s parafinem – benzen nebo xylol
- **Prosycení** – rozpuštěným parafínem (bod tání 56°C)
- **Zalítí** – plastové, papírové nebo kovové komůrky
  - komůrky jsou rychle ochlazeny ponořením do studené vody



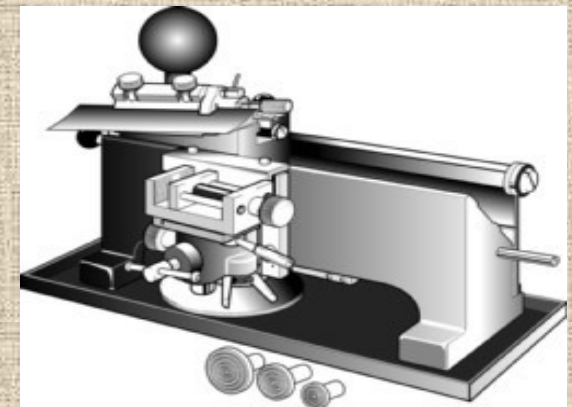
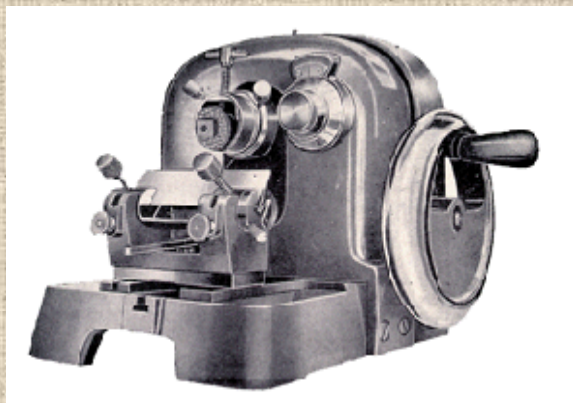
# KRÁJENÍ

- Mikrotomy – světelný mikroskop - tloušťka řezů 1 – 10  $\mu\text{m}$
- Ultramikrotomy – elektronová mikroskopie – 100 nm

Rotační mikrotom – nůž je fixní, držák s bločkem se pohybuje vertikálně



Sáňkový mikrotom – blok je upevněný v držáku, nůž se pohybuje horizontálně





# ZAMRAŽENÍ

- Alternativa k zalévání – nativní i fixovaný vzorek
- Kryostat – zmrazení na  $-20$  a méně  $^{\circ}\text{C}$
- Kryotom – mrazicí rotační mikrotom ( $0-60$   $^{\circ}\text{C}$ )





# NAPÍNÁNÍ ŘEZŮ

- Napínání:  
na hladině teplé vody (45°C)  
se řezy narovnají a vypnou
- Lepení:  
z vody jsou řezy přeneseny  
na podložní skla s adhezivním  
filmem (želatina nebo směs  
glycerin-bílek) a uloženy do  
termostatu (37° C).



Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv.

Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylénem.

# BARVENÍ

Pro zviditelnění struktur v řezu – buňka a její součásti  
vykazují různou afinitu k barvivům:

**chromofilní** (chromatofilní) x **chromofobní**

Nejčastěji barvení na základě pH struktury

- **zásaditá** (bazická) barviva („jaderná“) – reagují s kyselými strukturami buňky a tkání (NK v jádře aj.)

**bazofilie** – bazofilní struktury

- **kyselá** barviva („cytoplazmatická“) – reakce se zásaditými strukturami

**acidofilie** – acidofilní struktury v buňce

polychromatofilní (heterofilní) – afinita k oběma druhům barviv

- **ORTOCHROMAZIE**- buněčné struktury se barví stejnou barvou, jakou má barvivo (HE)
- **METACHROMAZIE**- buněčné struktury se barví jinou barvou, jakou má barvivo

Př. **toluidinovou modří** se v žírných buňkách barví jádra **modře** (ortochromaticky) a granula **červenofialově** (metachromaticky)



# TYPY BARVENÍ

- rutinní, přehledná – HE, AZAN - demonstrují všechny základní složky
- speciální – vizualizace vybraných struktur, cytologické
  - Massonovy trichromy: žlutý - HEŠ, modrý - AZAN, zelený trichrom (kolag.vlákná)
  - orcein, aldehydový fuchsin (elast.vlákná) aj.
  - Imunohisto- a imunocytochemické metody
- impregnační – AgNO<sub>3</sub> (nervová nebo retikulární vlákna)



# HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)

**Hematoxylin – zásaditý**  
**Eosin – kyselý**

## **Postup:**

- Odstranění parafinu xylenem
- Rehydratace sestupnou řadou alkoholů (100% →96% →80%)
- Barvení hematoxylinem ⇒ **jádra - modro-fialová**
- Diferenciace kys. alkoholem a vodou (odstranění přebytku barviva)
- Barvení eosinem ⇒ **růžová - cytoplazma, vazivo, svaly**
- Praní ve vodě (odstranění přebytku barviva)
- Dehydratace „vzestupnou“ řadou alkoholů (80% →96%)
- Projasnění v xylenu



# HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)

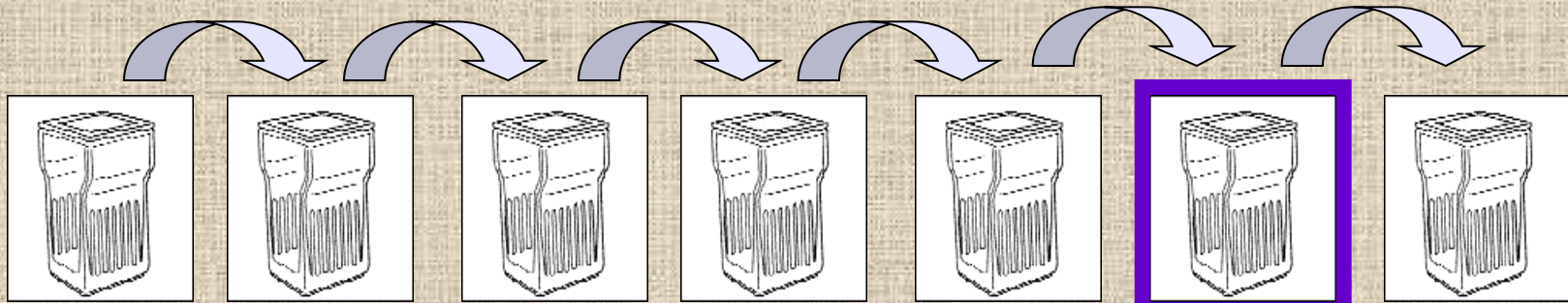
deparafinace

zavodnění

praní

barvení

diferenciace



xylén I

xylén II

100%  
etanol

96%  
etanol

H<sub>2</sub>O

hematoxylin

kyselý  
etanol

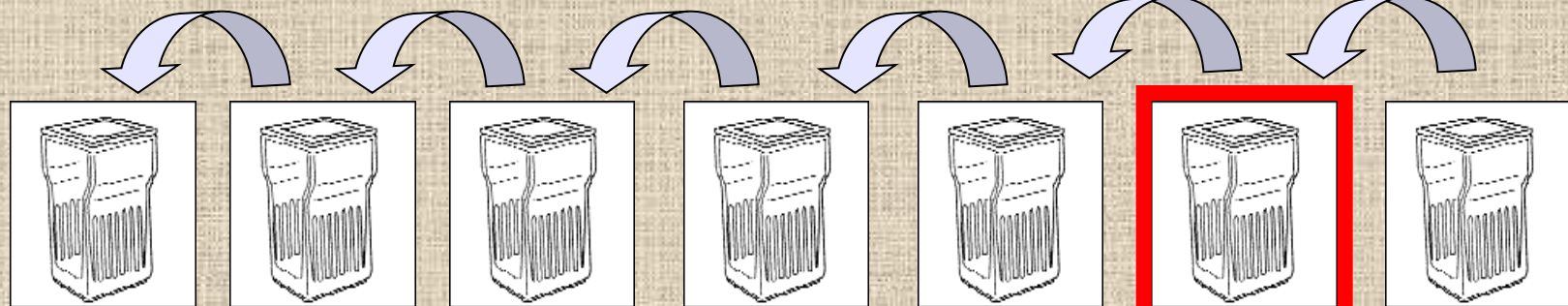
projasnění

odvodnění

praní

barvení

praní



xylén IV

xylén III

100%  
etanol

96%  
etanol

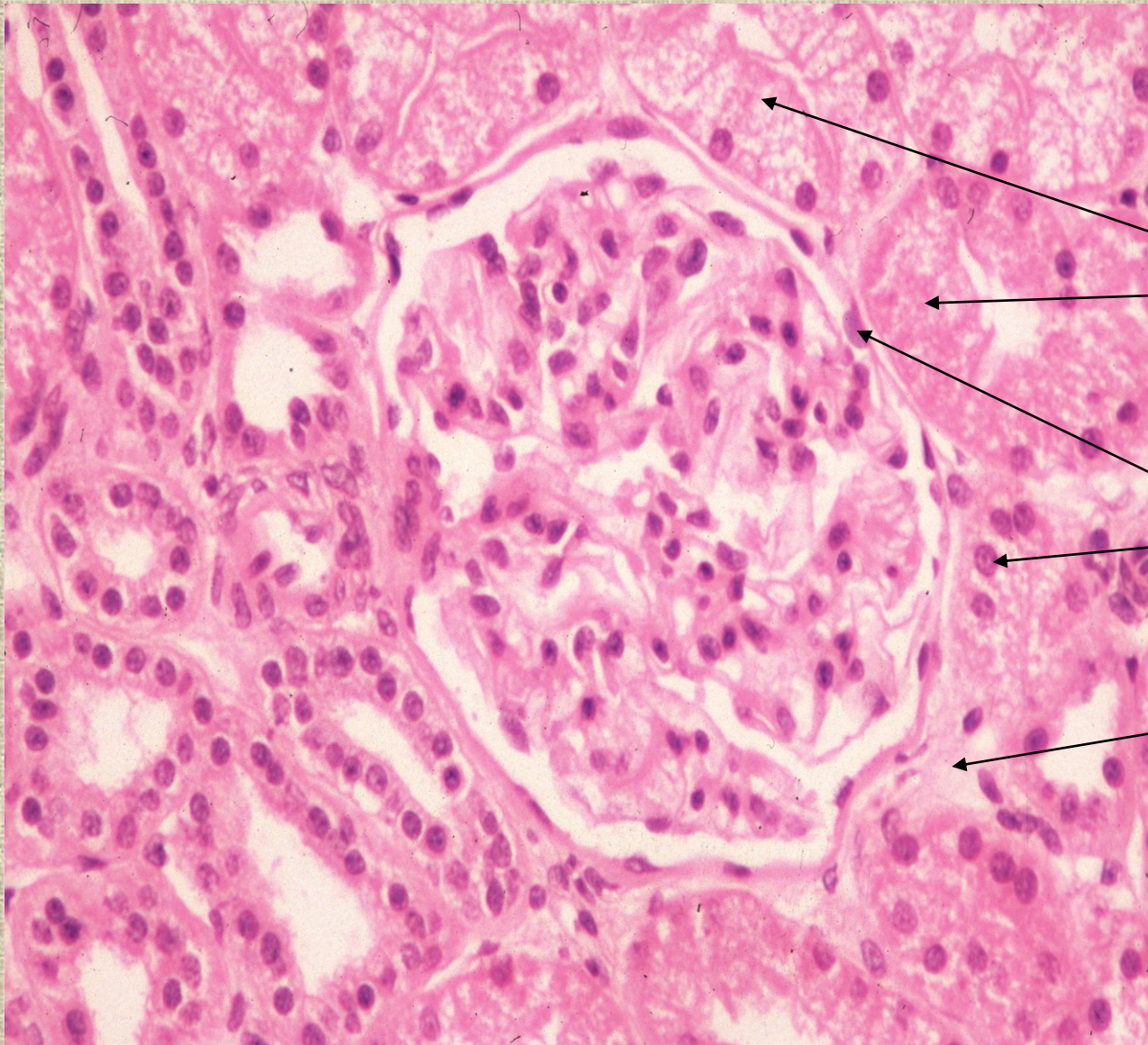
H<sub>2</sub>O

eosin

H<sub>2</sub>O



# Hematoxylin a eosin (HE)



cytoplazma

jádra

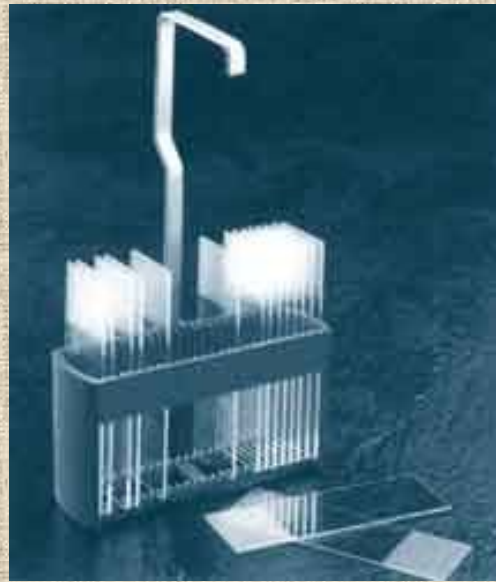
kolagenní vazivo



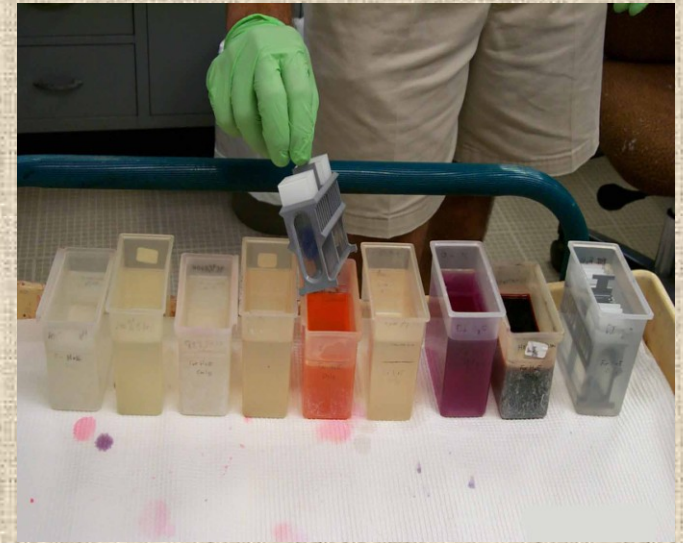
# Pomůcky pro barvení



kyveta



nosič skel (košíček)





# Autotechnikon, barvicí automat (automat pro barvení)



řada boxů (kyvet) s barvicími  
medii



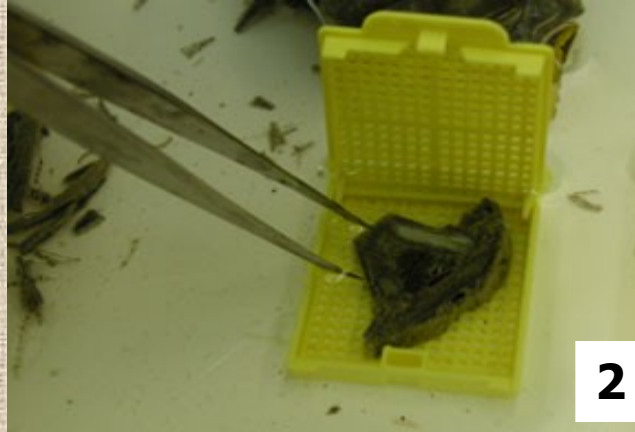
- **Leica ST 4040** Lineární barvicí automat - velkokapacitní barvení vzorků jedním programem (např. H&E až 1000 skel). Modulární systém. Během barvicího procesu je uživatel chráněn aktivním odsáváním skrz uhlíkový filtr (lze napojit na centrální odtah v laboratoři ).



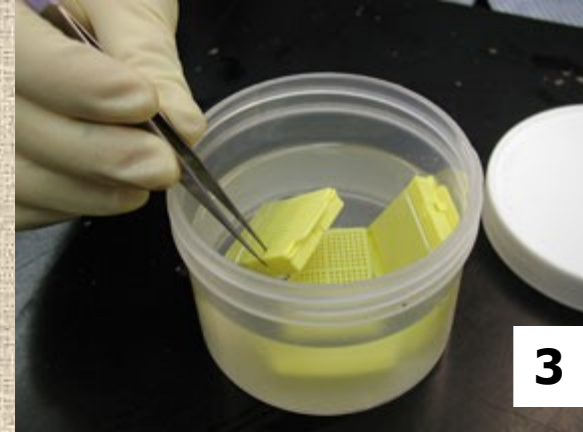




**1**



**2**



**3**



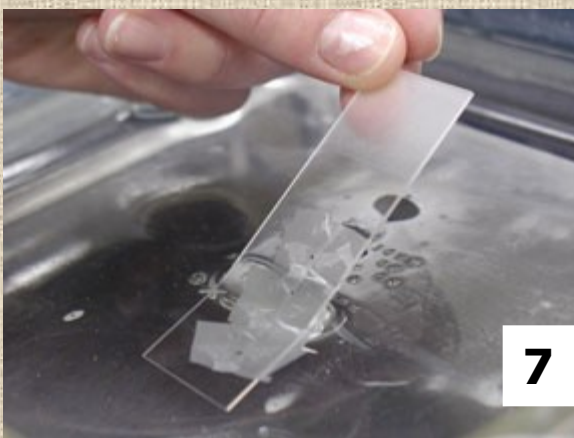
**4**



**5**



**6**



**7**



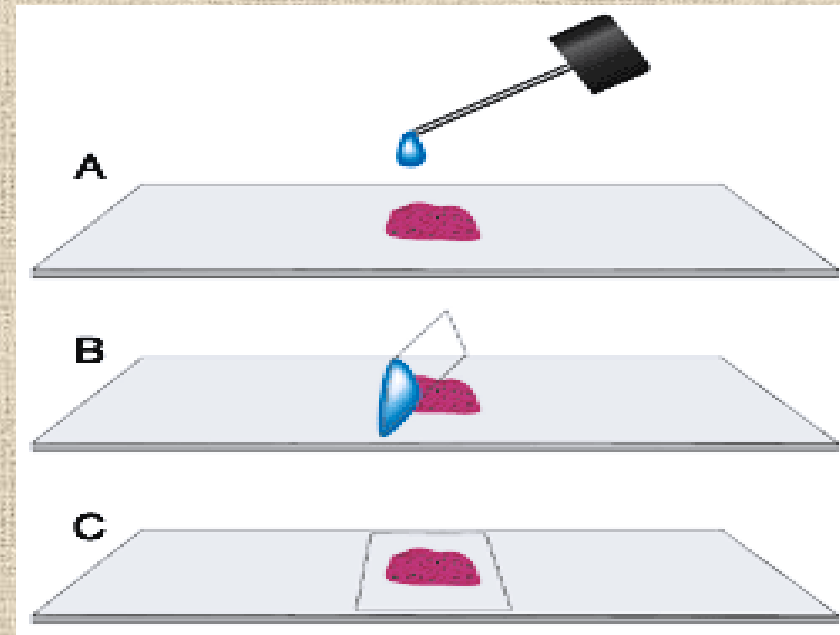
**8**

- 1 – odběr**
- 2, 3 – fixace**
- 4 – zalévání**
- 5 – krájení**
- 6,7 – napínání řezů**
- 8 – barvení**



# MONTOVÁNÍ

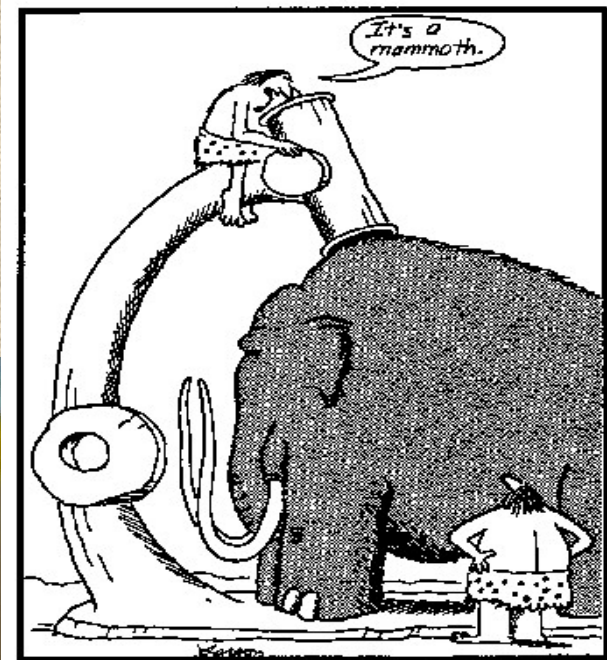
- uzavření preparátu – kapkou montovacího media a krycím sklíčkem ⇒ trvalý preparát



Montovací media:

- rozpustná v xylenu – kanadský balzám
- rozpustná ve vodě – glycerin-želatina, arabská guma

## Trvalé histologické preparáty ke studiu v SM



Early microscope

# Výsledky barvení:

- **HE** = *Hematoxylin* – *Eosin*

jádra – modro-fialová

cytoplazma a kolagenní vlákna – růžová

svalová tkáň – červená



- **HEŠ** = *Hematoxylin* – *Eosin* – *Šafrán*

kolagenní vlákna – žlutá



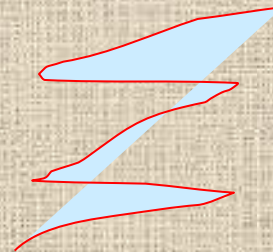
- **AZAN** = *AZokarmín* – *Anilinová modř* – *oranž G*

jádra – červená

erytrocyty – oranžové

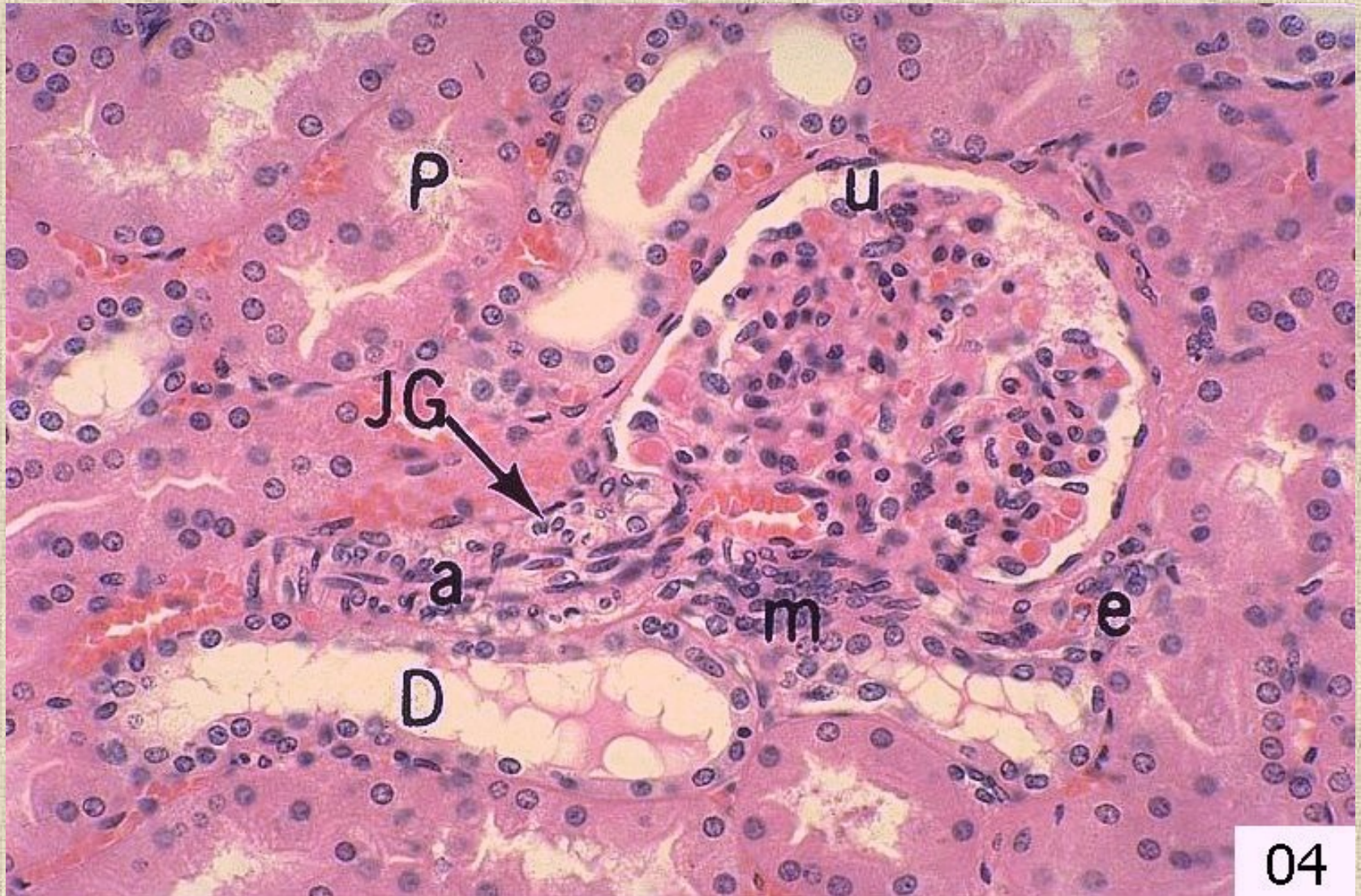
svalová tkáň – červená

kolagenní vlákna – modrá



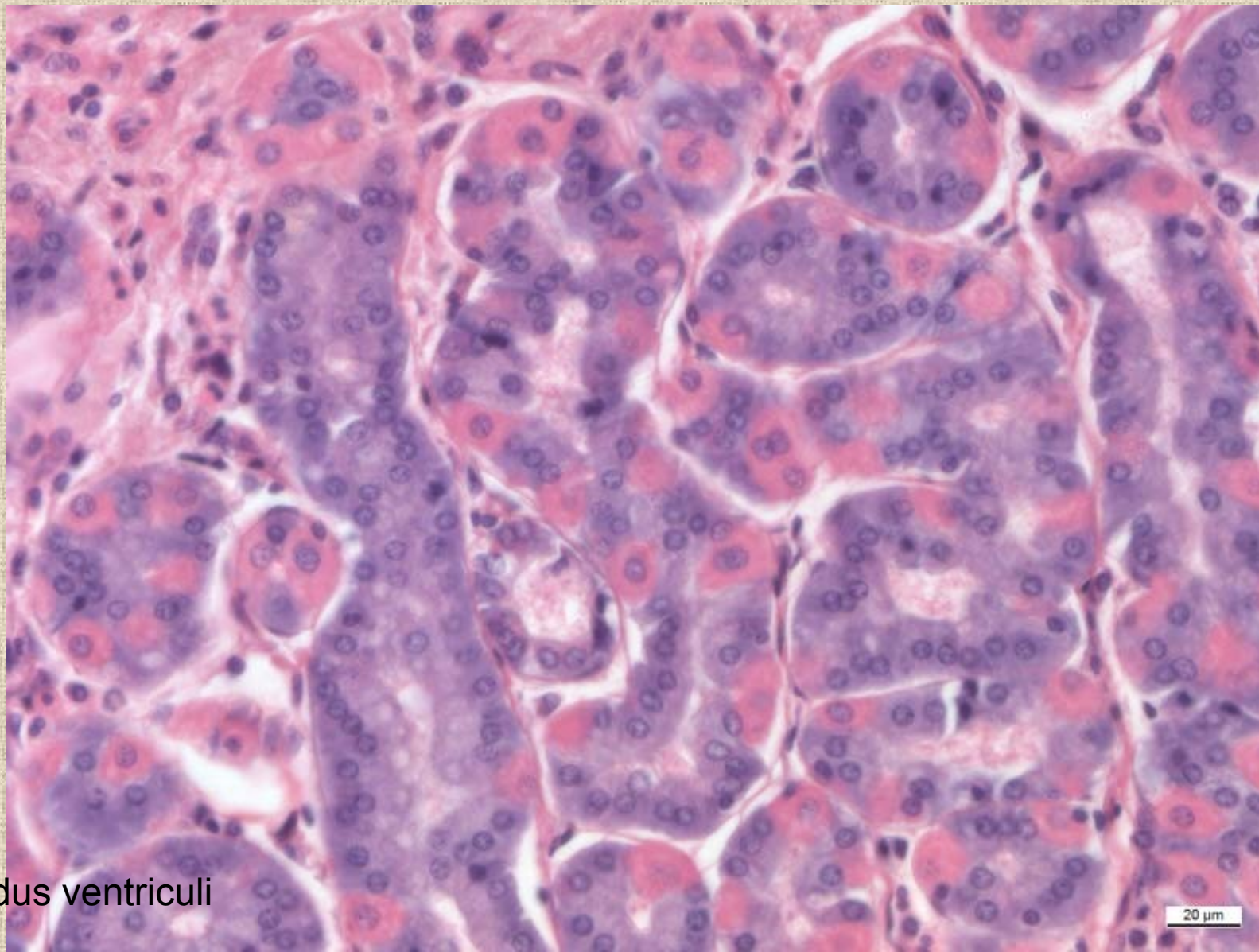


# Hematoxylin a eosin (HE)





# basofilní x acidofilní cytoplazma



fundus ventriculi

20  $\mu$ m



# Hematoxylin, eosin a šafrán (HEŠ)

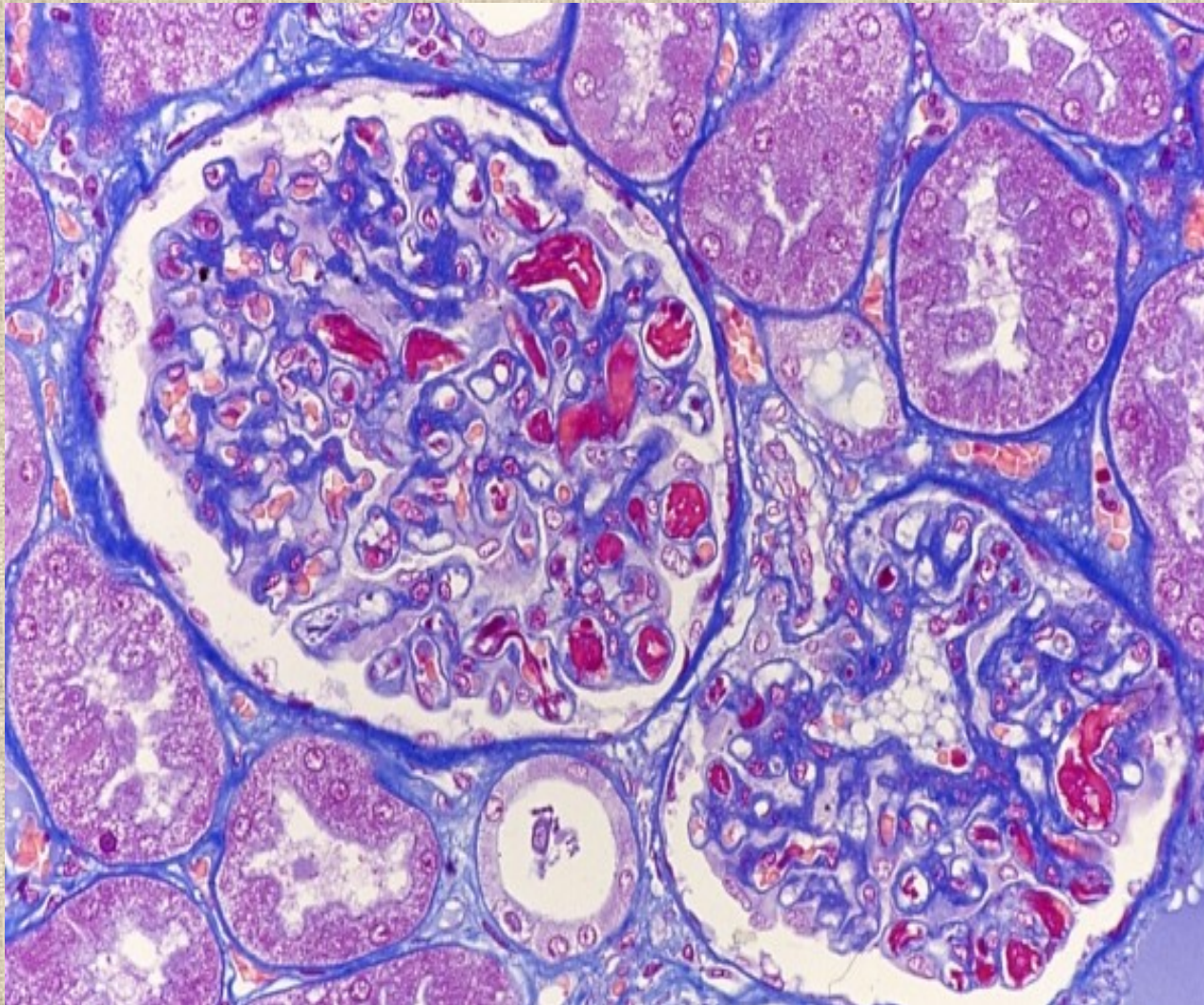


chrupavka

kolagenní vlákna žlutá



# Azokarmín a anilin. modř (AZAN)

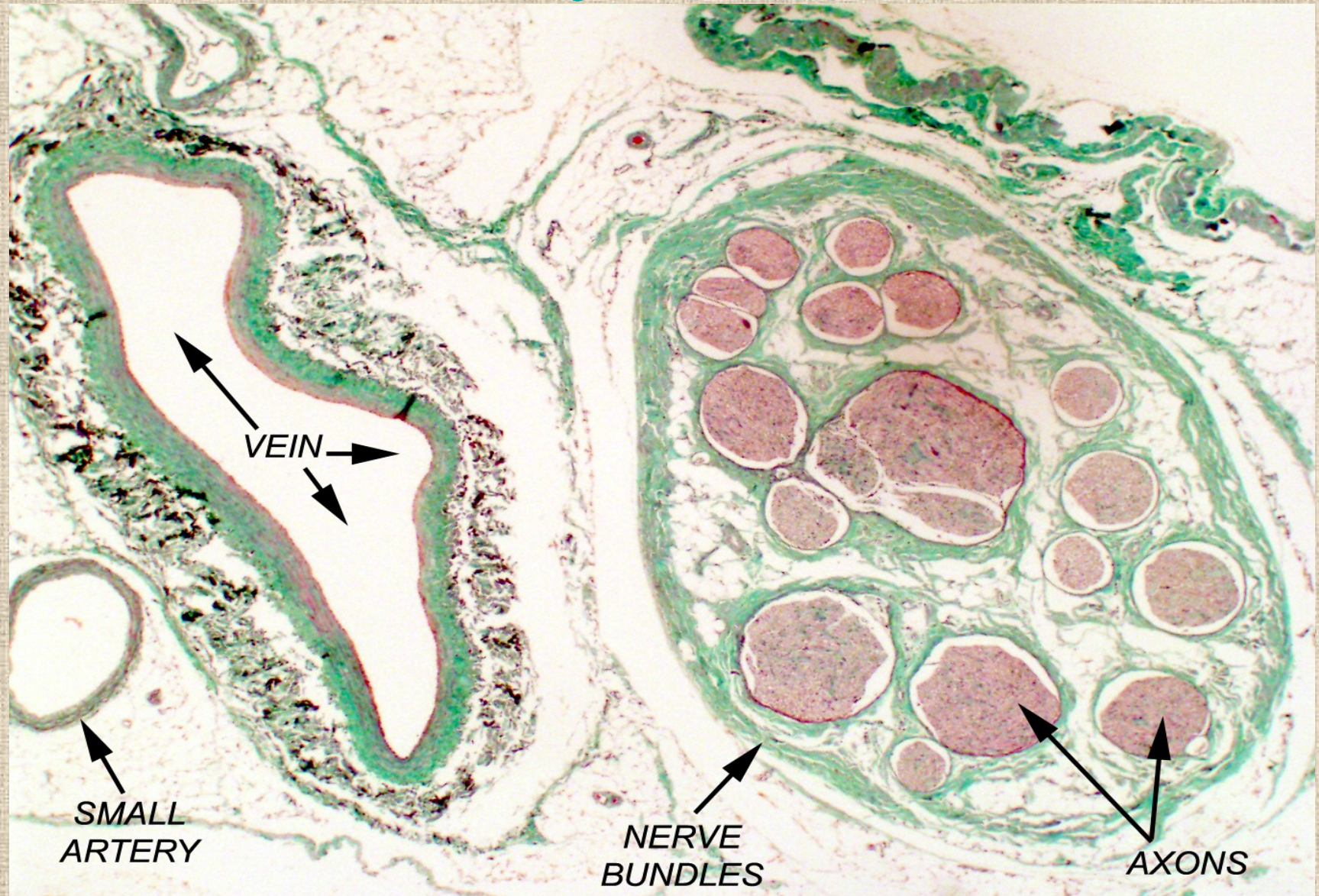


ledvina

kolagenní vlákna modrá



# Zelený trichrom



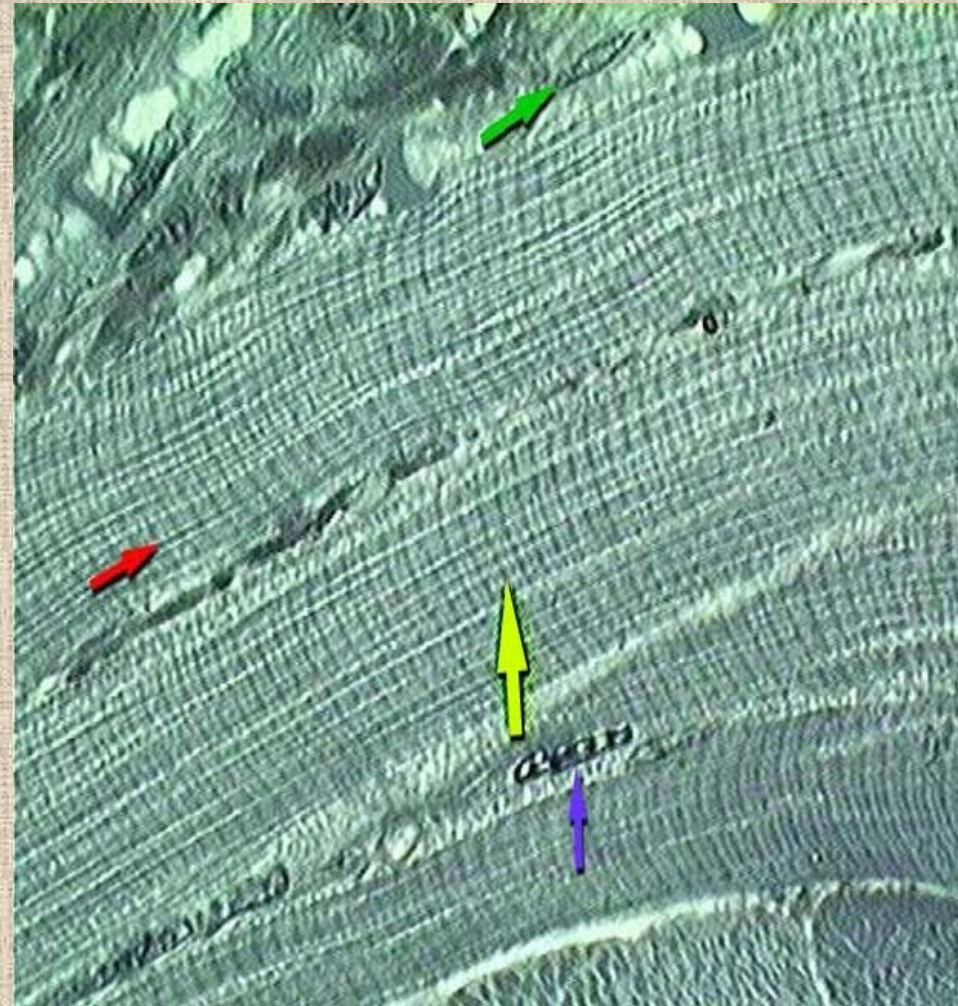
kolagenní vlákna zelená



# Cytologická barvení – podle Heidenhaina



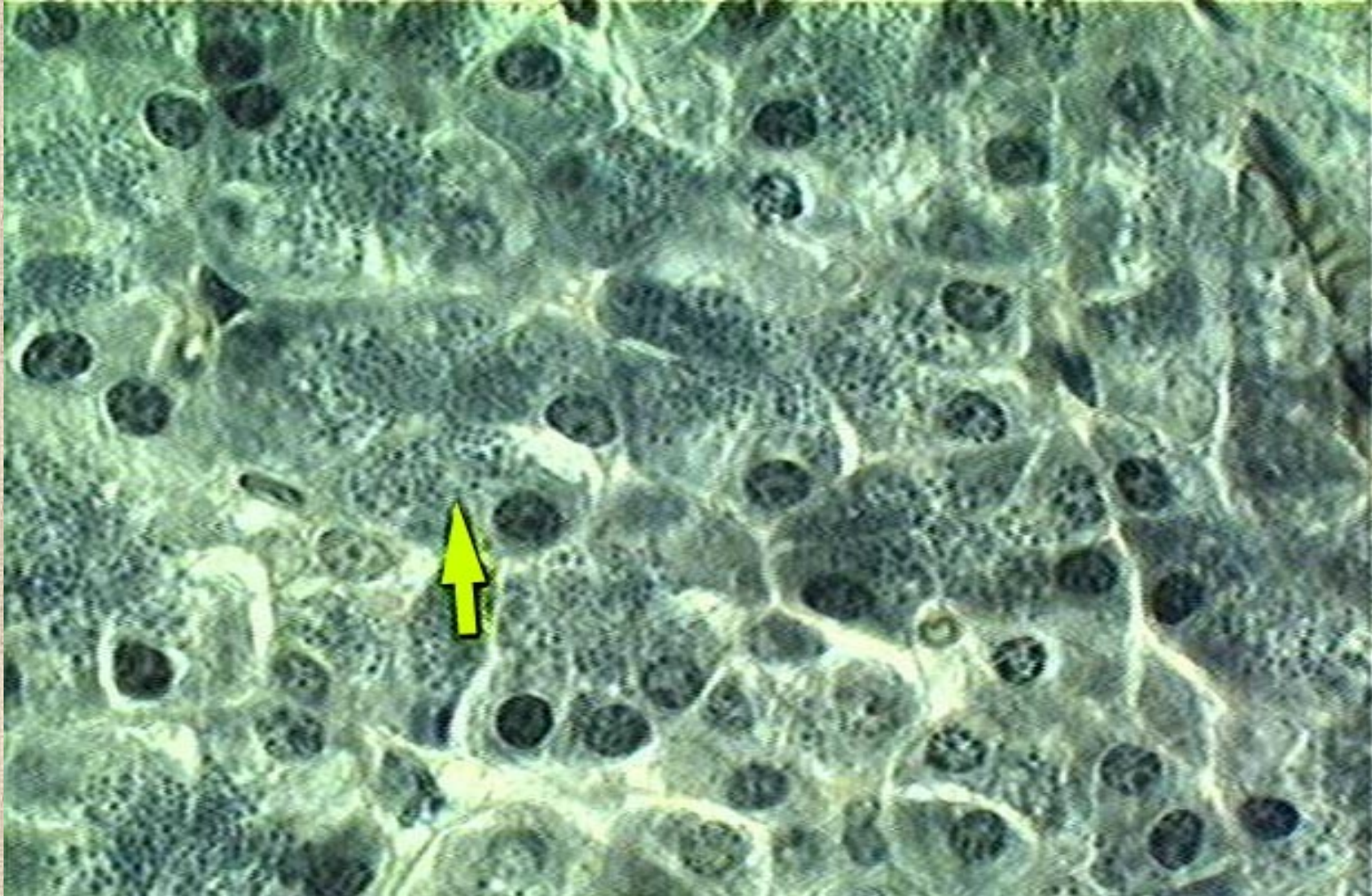
**kosterní svalová tkáň**



**železitý hematoxylin**



# Cytologická barvení – podle Heidenhaina



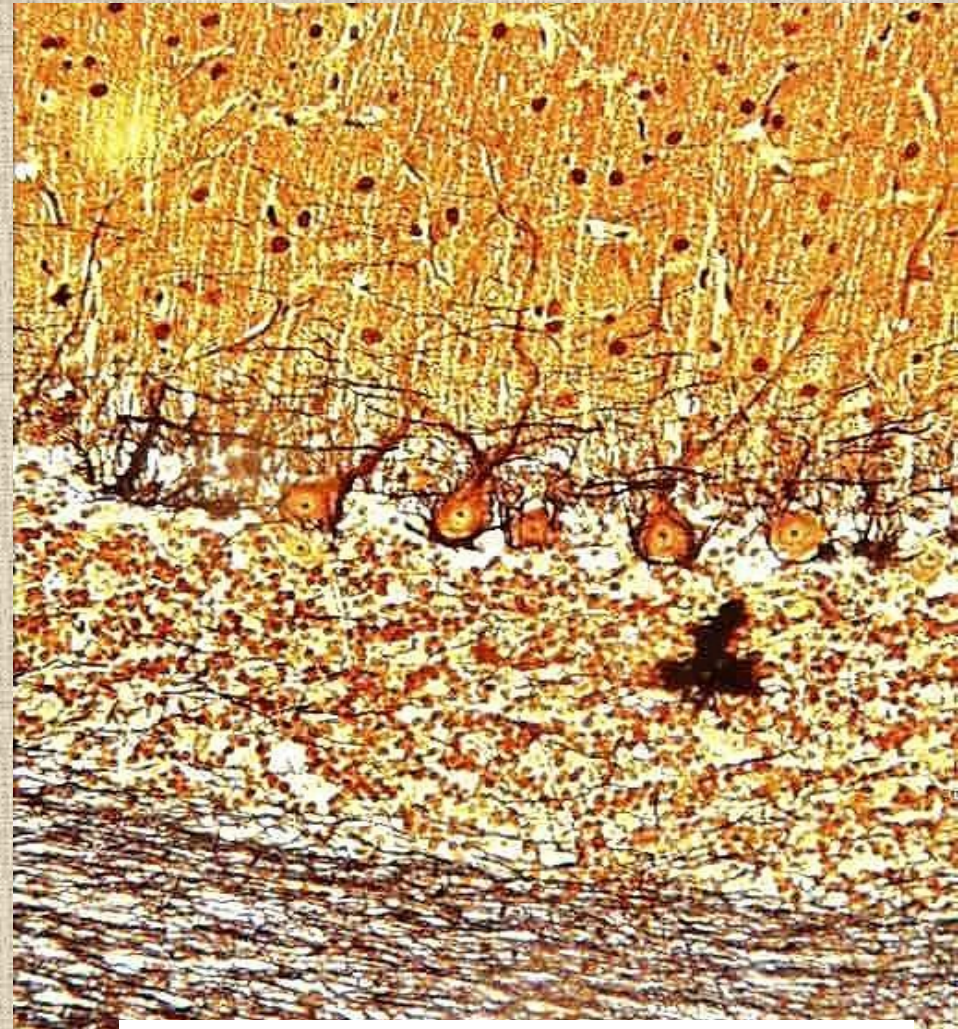
**mitochondrie v hepatocytech**



# Impregnace „stříbrem“



**slezina – retikulární vlákna**



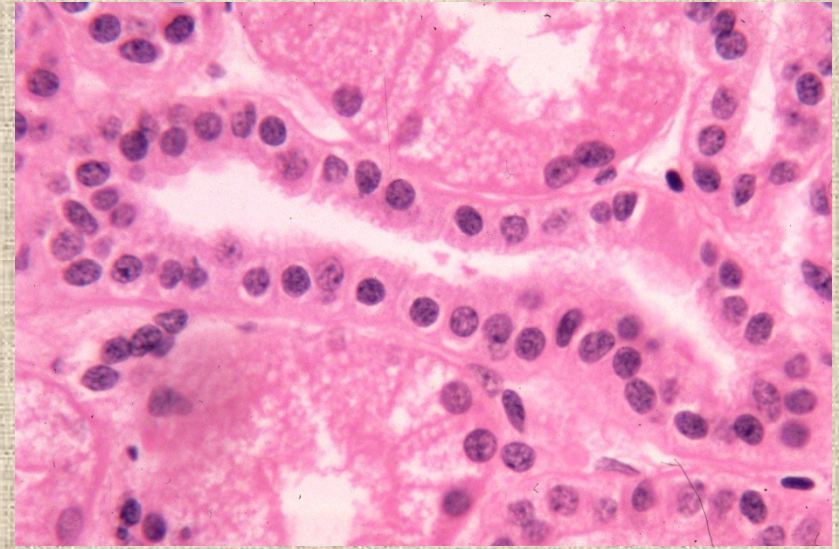
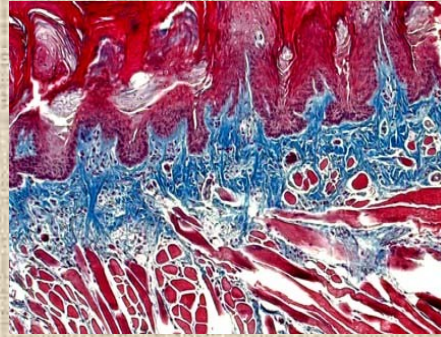
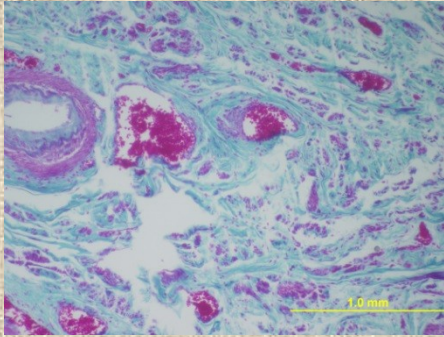
**cerebellum – nervová vlákna**



## Barvicí metody:

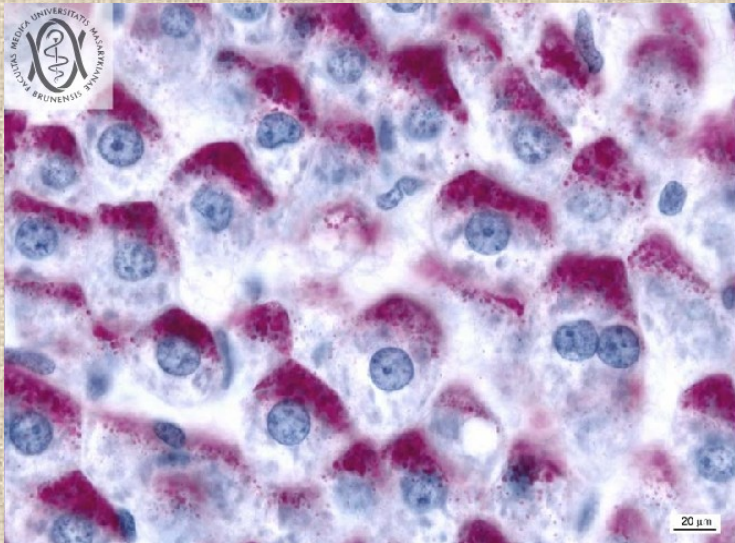
přehledné – AZAN, HE

demonstrují všechny složky tkání



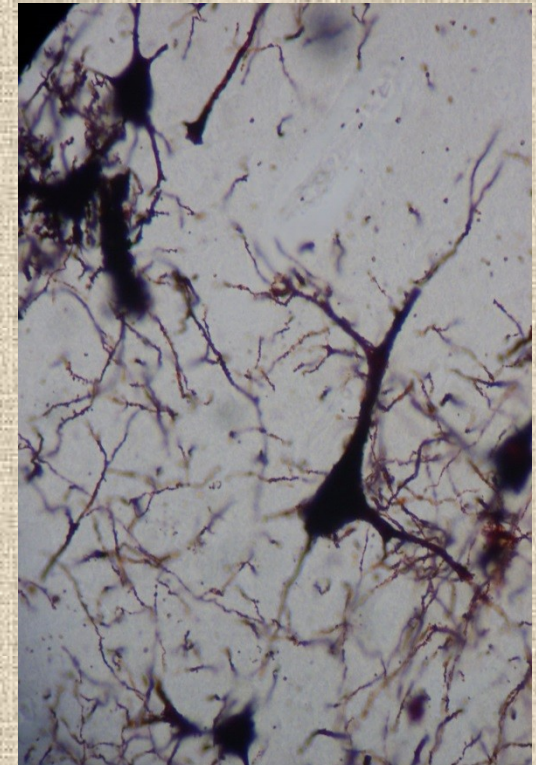
speciální

zdůrazňují určité buněčné nebo tkáňové složky



impregnační

soli Ag, Au  
nebo Os





# Zpracování tvrdých tkání (zub, kost)

- dekalifikace (odvápnění) – převedení nerozpustných vápenatých solí do roztoku pomocí kys. mravenčí nebo chelatonu (EDTA), časově náročné – dny až týdny
- výbrusy – tenké ploténky (50 – 70  $\mu\text{m}$ ) zhotovené postupným zbrušováním materiálu (brusky, matné sklo, pasty, prášky) – nelze barvit

Výbrus zubu

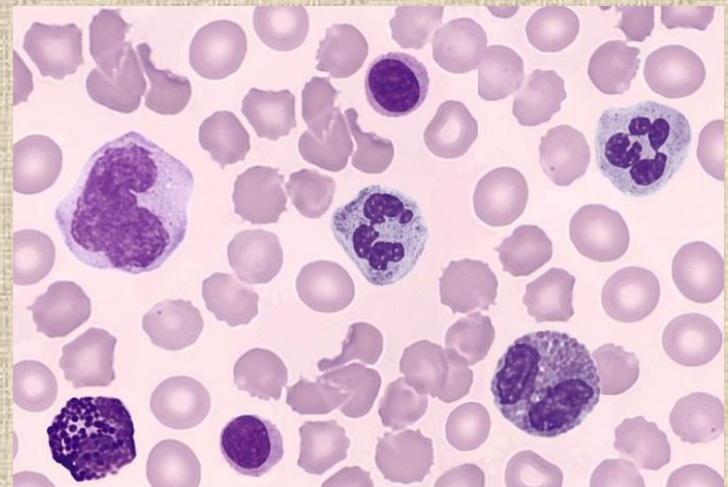
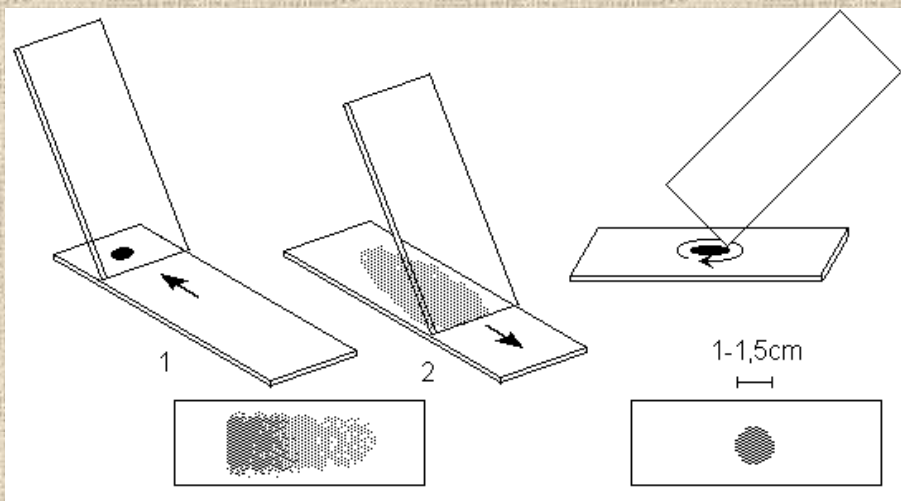


# Zpracování krve – krevní nátěr

Kapka krve rozetřená do tenké vrstvy na podložním skle

-dvě směsi barviv - podle **May-Grünwalda** (eozinát azuru II. rozpuštěný v metanolu) a **Giemsy-Romanowskeho** (eozinát metylenové modři a eozinát metylenazuru rozpuštěný ve směsi stejných dílů metanolu a glycerolu).

- Imerze - nahrazení vzduchové mezery mezi čelní čočkou objektivu mikroskopu a preparátem vrstvou imerzní tekutiny – index lomu  $>1$  =  $\uparrow$ NA



# Histochemické metody

- lokalizace chemických látek v buňce
  - průkaz proteinů (detekce  $-NH_2$  nebo  $-COOH$  konce)
  - DNA, RNA (reakce pentóz) – Feulgenova metoda (DNA ~)
  - metylová zeleň a pyronin (DNA ~ i RNA ~)
  - sacharidů – PAS reakce (oxidace  $-OH$  na aldehyd) ~
  - lipidů – např. lysochromy (barviva rozpustná v tucích)
  - pigmentů – přímo
  - anorg. látek (Fe, Ca, Zn) – postupy analytické chemie

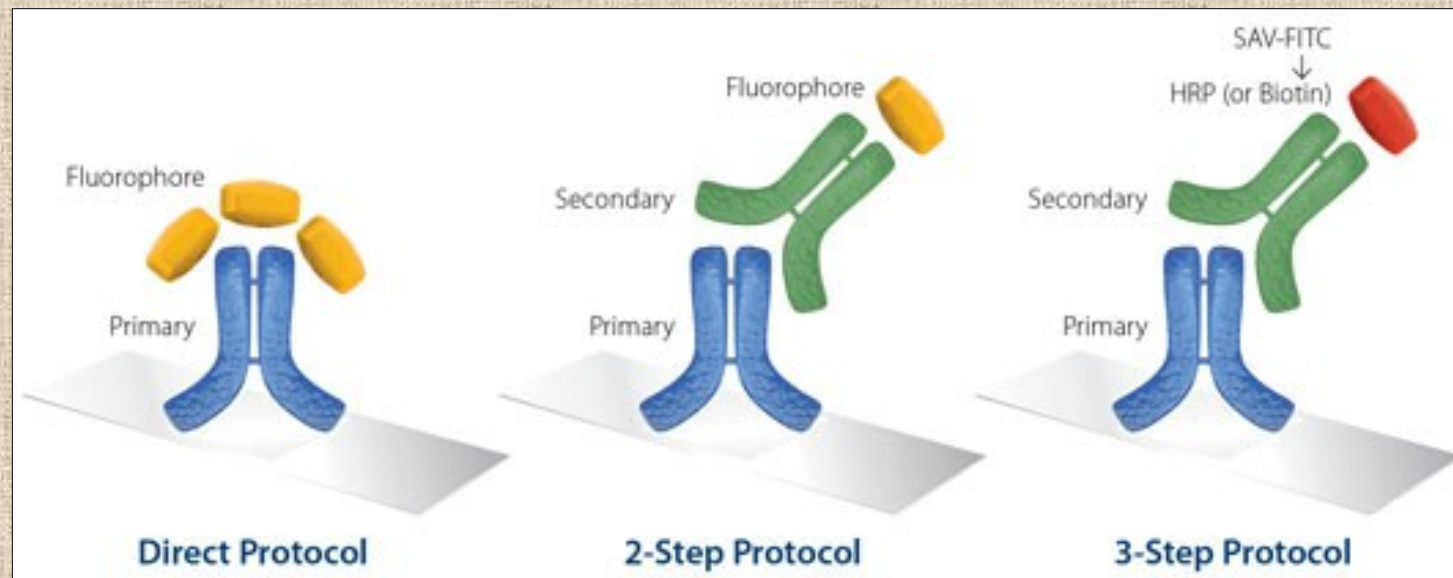


# Imunocyto- a imunohistochemie

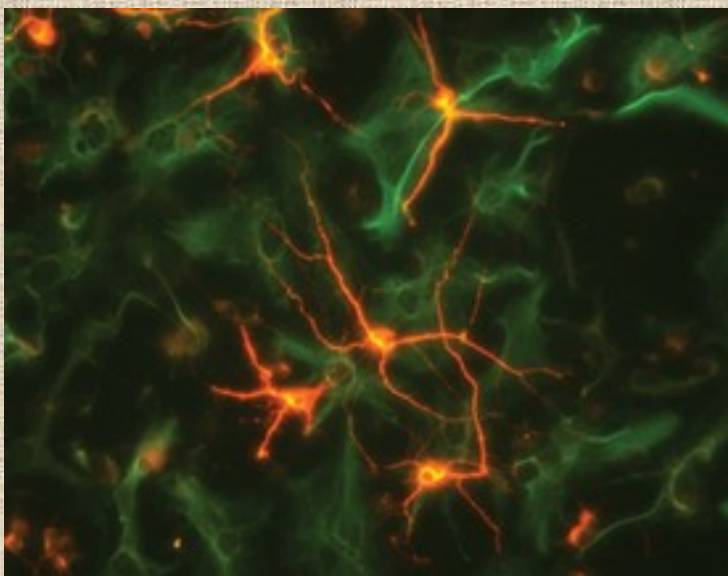
- detekce pomocí vazby značené protilátky

Ag-Ab komplexy (přímý důkaz) nebo Ag-Ab-Ab (sekundární nepřímý důkaz)

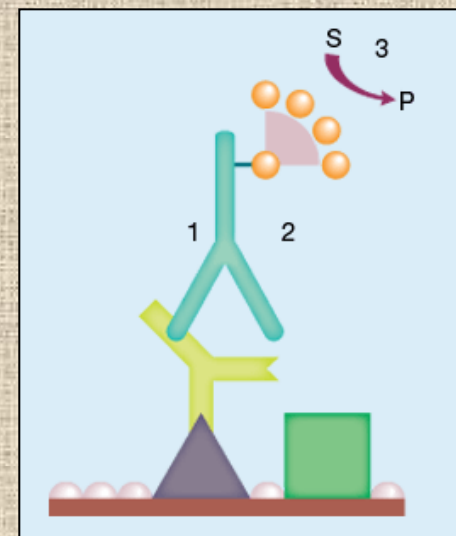
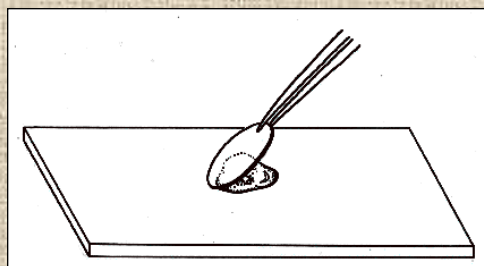
Značení: - fluorochromy – rodamin, texaská červeň  
- enzymy – křenuv peroxidáza, AF, acetylcholinesteráza  
- radioizotopy (jódu)



# Imunocytochemická metoda



Detekce GFAP - astrocyty





# Elektronová mikroskopie

## Elektronový mikroskop

- Obraz je tvořen elektronovým paprskem ve vakuu
- čočky – elektromagnety
- projekce na fluorescenční stínítko

## Transmisní (prozařovací) el. mikroskop - **TEM**

- Snímán průchod elektronového paprsku, rozlišení 0,2-0,3 nm  
(reálně 5 nm)

## Rastrovací (řádovací, scan) el. mikroskop – **SEM**

- Snímán odraz elektronového paprsku, rozlišení 10-20 nm

# Zpracování tkání pro elektronovou mikroskopii (EM)

Požadavky na pracovní podmínky:

- pH všech roztoků (medií) 7,2 – 7,4. (pufry – kakodylátový nebo fosfátový)
- bezprašnost
- roztoky (media) – šetrné působení na tkáně (! – minimum artefaktů)



# POSTUP

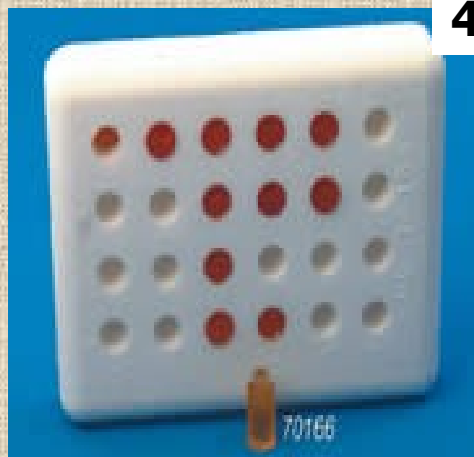
- **ODBĚR** – okamžitá fixace, velikost tkáňového bločku do  $1 \text{ mm}^3$
- **FIXACE** – glutaraldehyd (vazba aminoskupin) +  $\text{OsO}_4$  (vazba lipidů) – dvojitá fixace
- **PRANÍ** – kakodylátový pufr
- **DEHYDRATACE** – alkohol, aceton
- **ZALÉVÁNÍ** – vzorky se vkládají do želatinových kapslí nebo forem z plastu vyplněných zalévacím médiem. Používají se epoxidové pryskyřice (Epon, Durcupan, LR White, LR Gold, Araldite) – ve vodě nerozpustná media

## Zalévací komůrky:

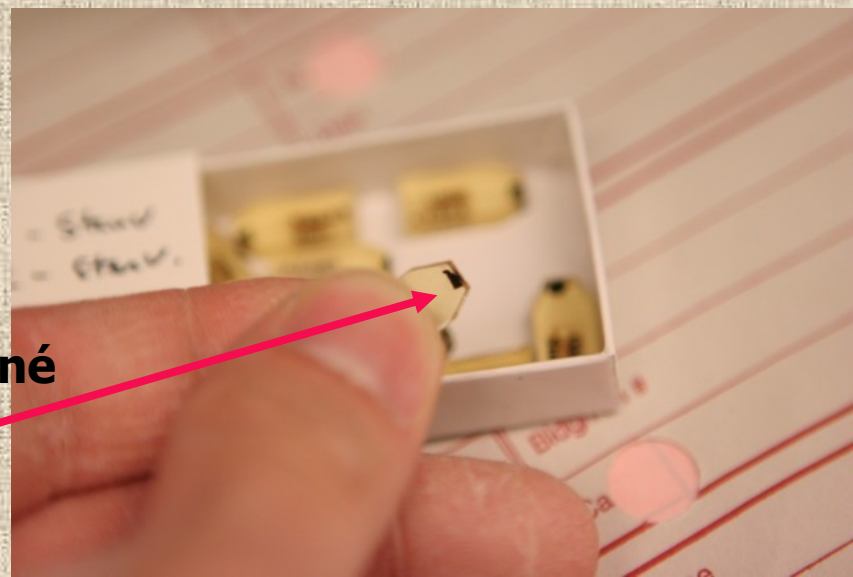
želatinové (1), plastové (2)

nosiče (držáky) kapslí (3)

ploténky s komůrkami  
(4, 5)



bločky připravené  
pro krájení

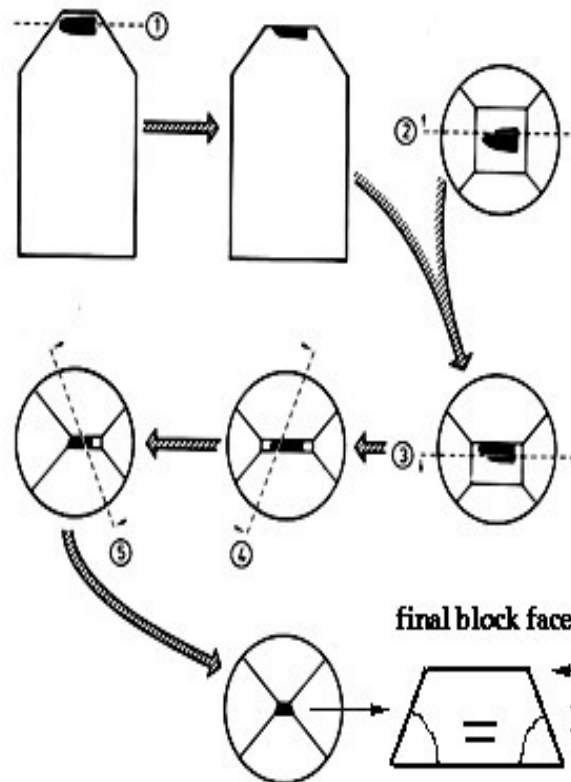
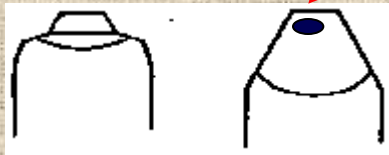
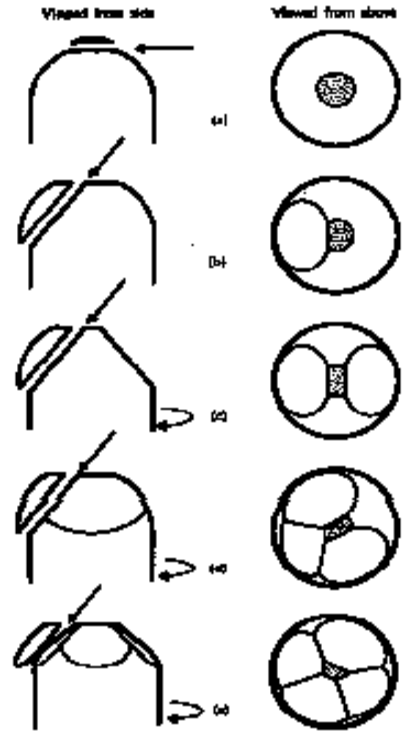




# Úprava pyramidy (trimování)

Odstranění přebytku tvrdého zalévacího media a zhotovení pyramidy s minimální řeznou plochou (0.1 mm<sup>2</sup>).

*Minimum tkáně (černý shluk) ve vrcholu pyramidy*



Pyramid Side Profile



Too Steep-Trans Am Building  
(not rigid-vibrations)



Too Flat-Pyramid of the Sun  
(section size changes rapidly)



Just Right-Egyptian Pyramid  
with top cut off

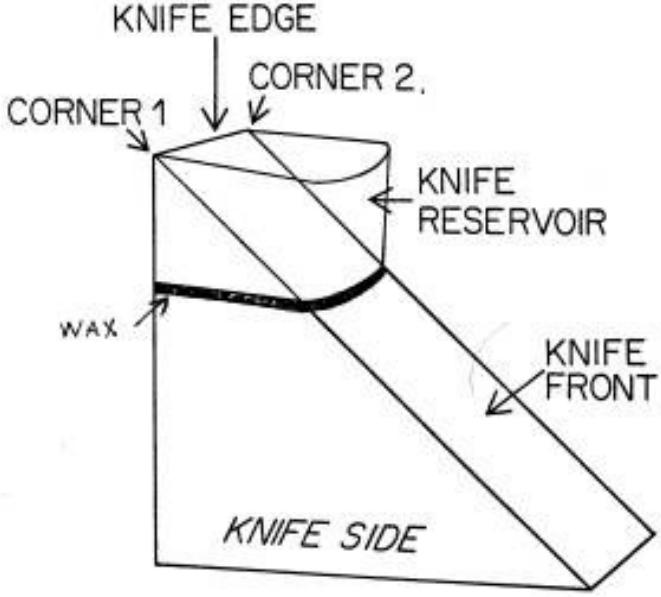


# KRÁJENÍ

- po odstranění přebytku media (trimming) a vytvoření pyramidy se z malé plošky ( $0.1 \text{ mm}^2$ ) krájí jednotlivé ultratenké řezy (70 – 100 nm)  
**ultramikrotomy**
- používají se skleněné nebo diamantové nože s vaničkou – řezy splývají na hladinu vody ve vaničce a odtud jsou přeneseny na síťky (Cu)



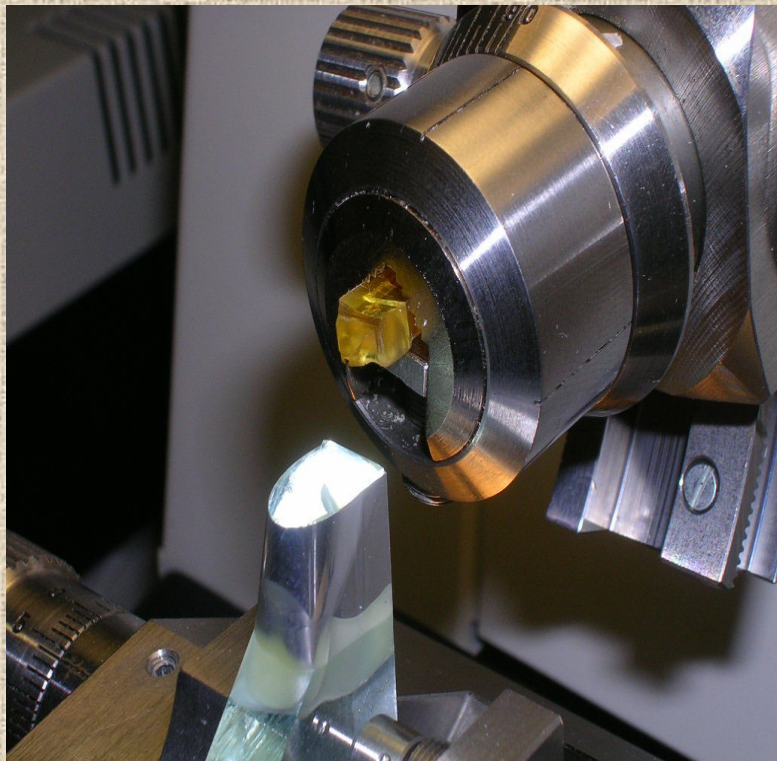




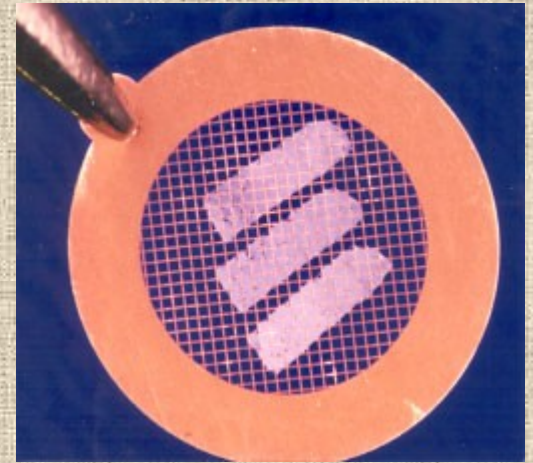
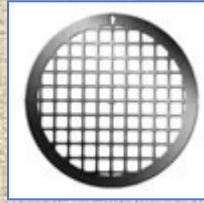
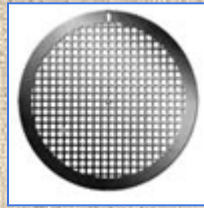
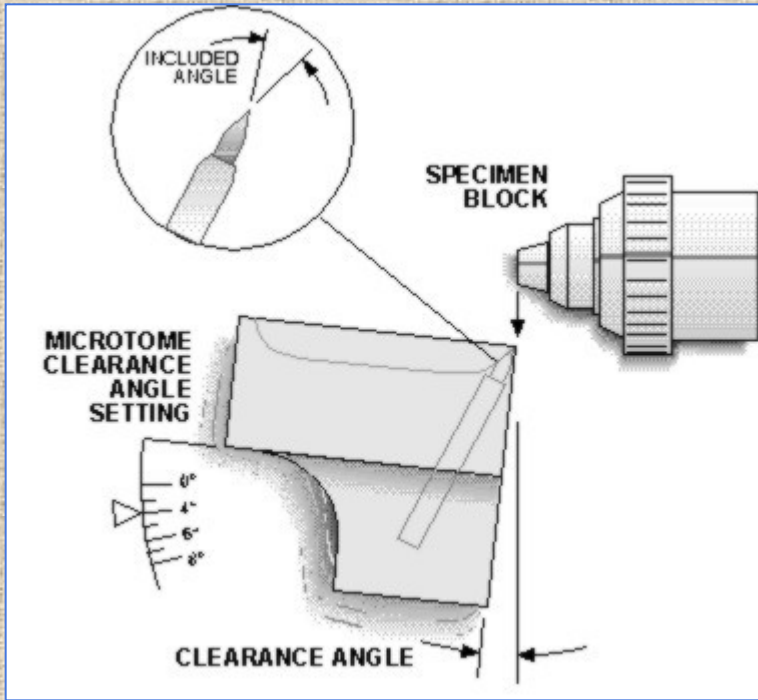
# Ultramikrotomové nože:

skleněný

diamantový

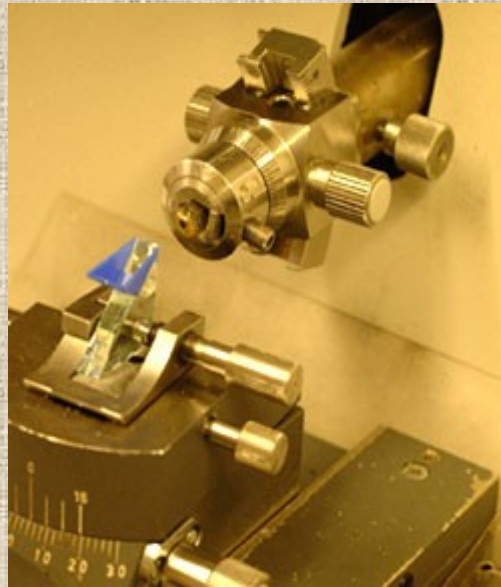
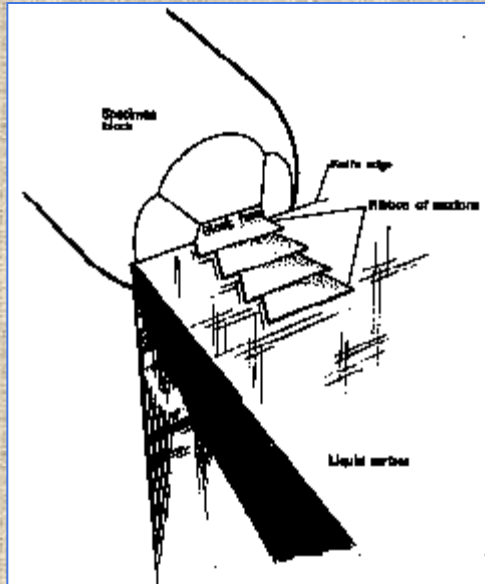
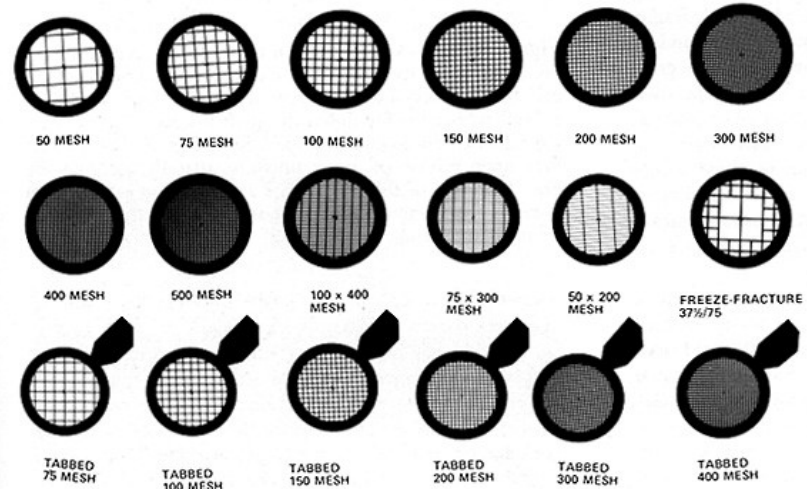


# Krájení, nosné sít'ky



Sít'ka se třemi řezy

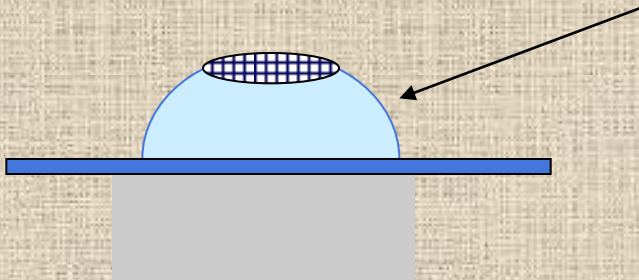
## typy sítěk



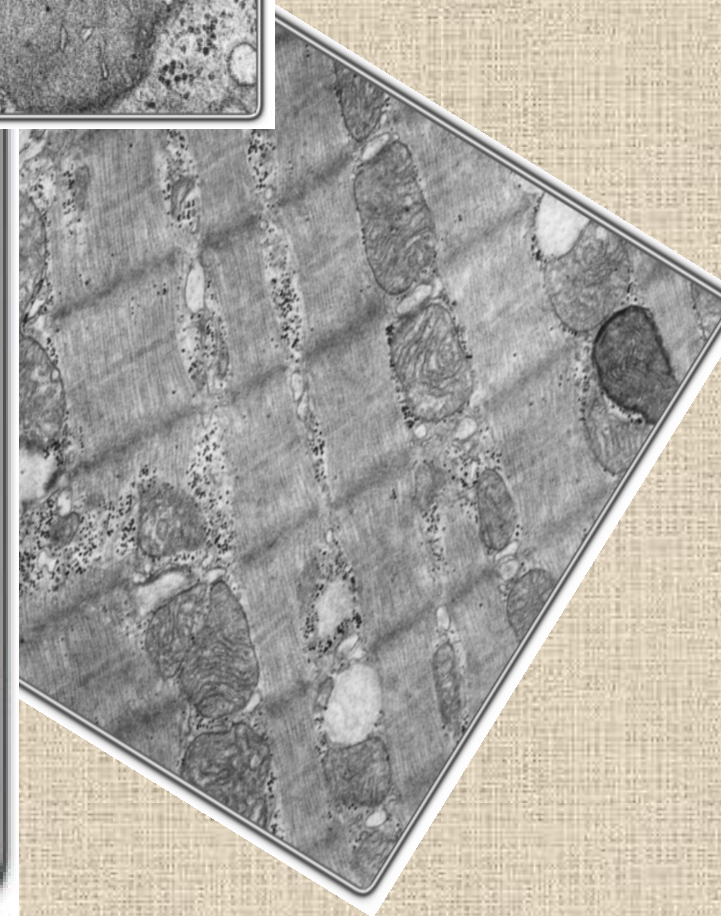
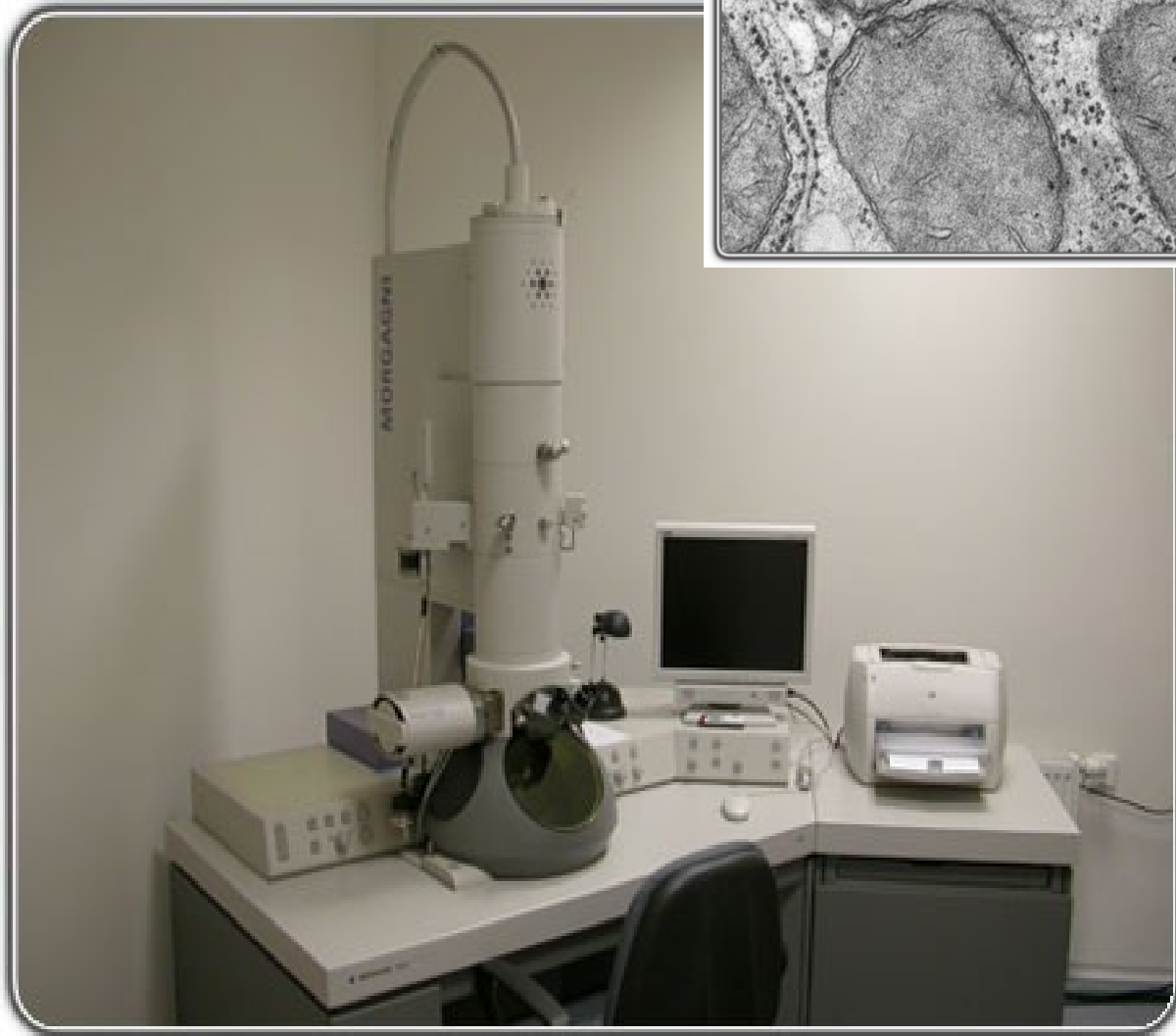
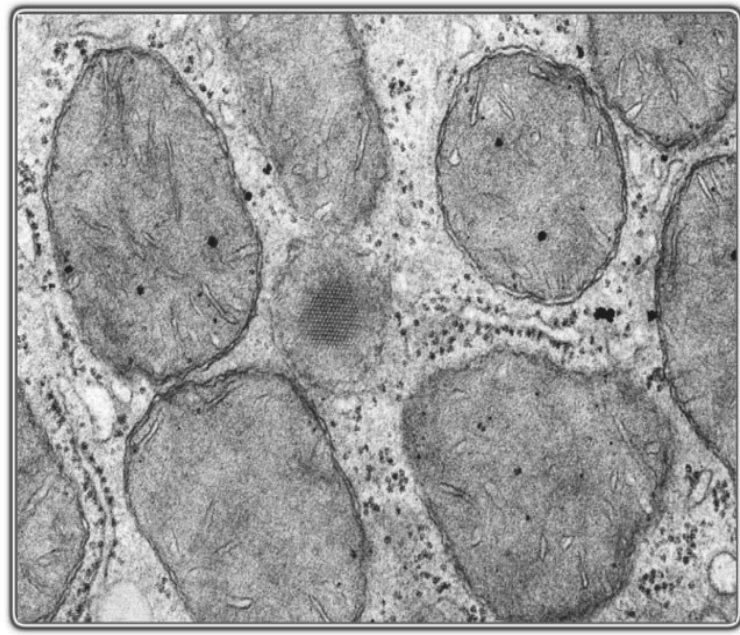


# KONTRASTOVÁNÍ

- princip odlišení struktur – různý rozptyl svazku elektronů v závislosti na densitě struktur; „elektronová barviva“ – směsi těžkých kovů: uranylacetát nebo citrát olovnatý



Na kapce barviva je položena nosná síťka tak, aby ultratenké řezy byly vystaveny působení barviva.

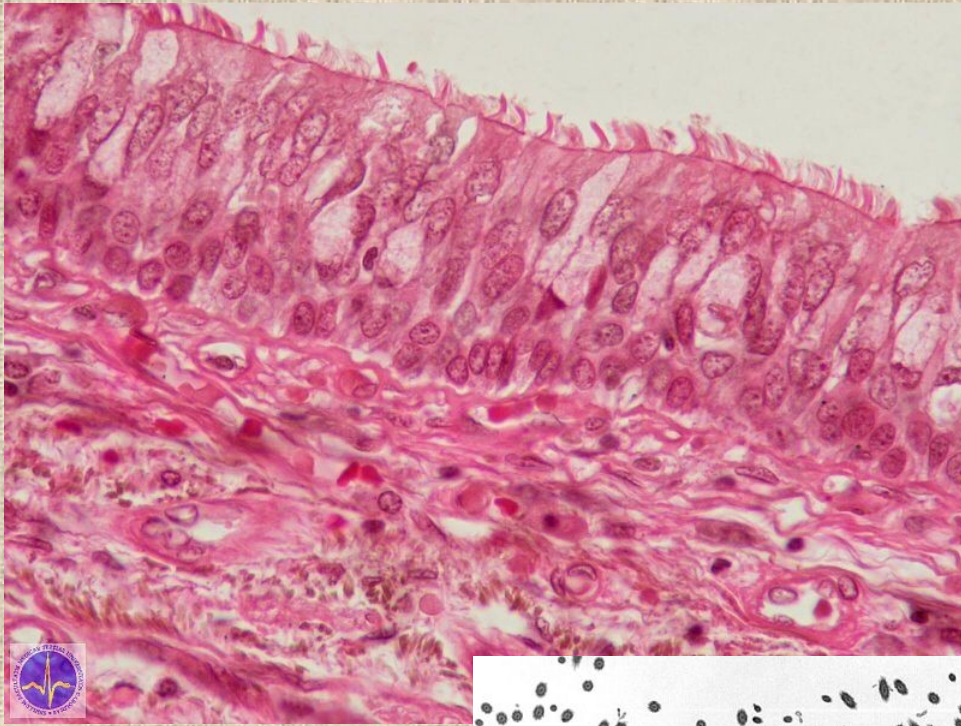




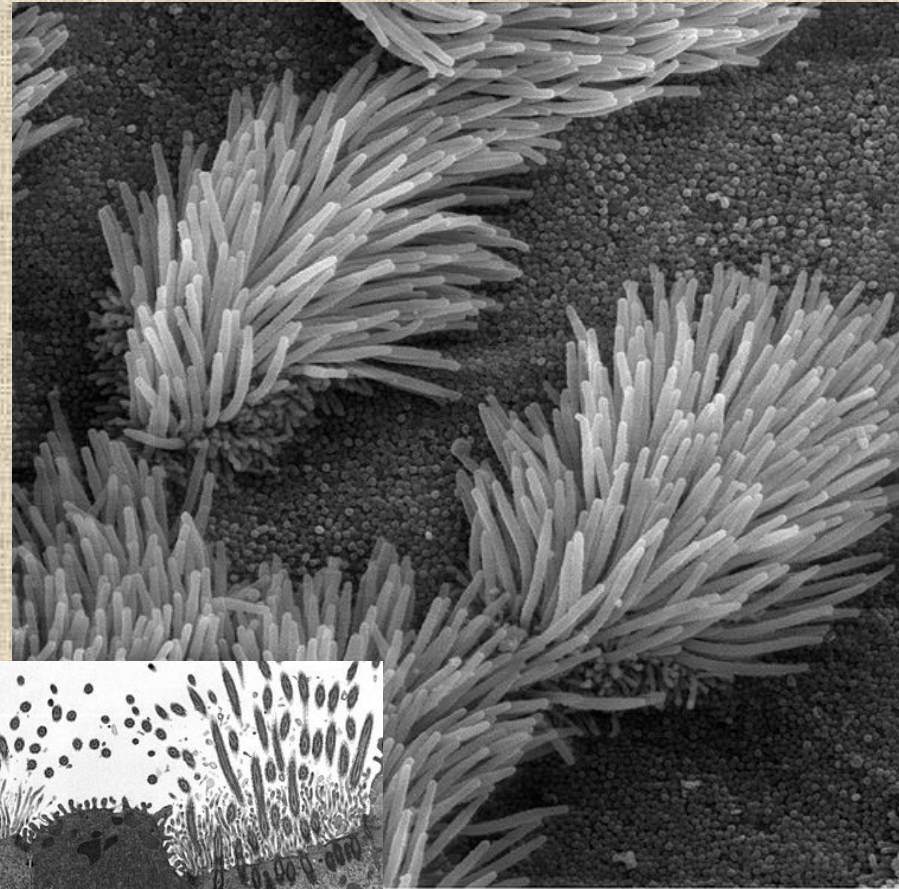
## Rozdíly mezi SM a EM

	<b>SM</b>	<b>EM</b>
Odběr	< 1 cm <sup>3</sup> minuty	< 1 mm <sup>3</sup> sekundy
Fixace	formaldehyd 12 – 24 hod.	glutaraldehyd 1 – 3 hod.
Zalévání	parafin	epoxid. pryskyřice (Durcupan)
Krájení Tloušťka řezů	mikrotom 5 – 10 μm	ultramikrotom 50 – 100 nm
Barvení (LM) Kontrastování (EM)	barviva ( <i>hematoxylin – eosin</i> )	těžké kovy ( <i>uranylacetat, citrát Pb</i> )
Montování	+	---
Výsledek	histologický preparát	foto z fluoresc. stínítka - elektronogram

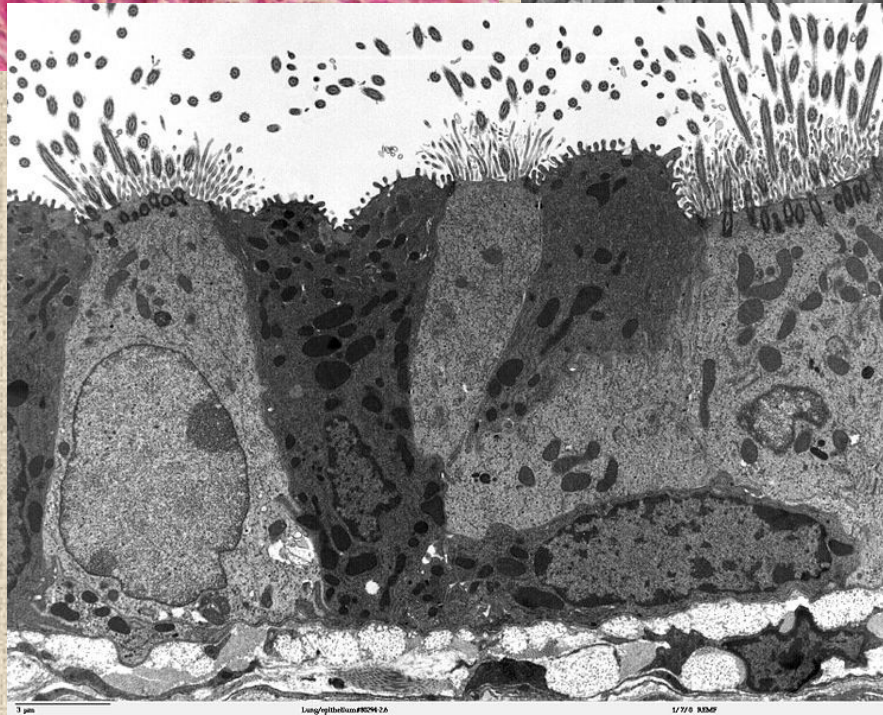
# Trachea – řasinkový epitel



SM



SEM



TEM



## Co byste určitě měli znát:

Fáze zpracování tkání a orgánů pro účely světelné mikroskopie

- Odběr materiálu, fixace a fixační činidla
- Zalévání a zalévací média
- Mikrotomy – krájení, lepení parafinových řezů
- Barvení parafinových řezů hematoxylinem a eozinem (co je zbarveno a jak)

Postup při vyšetření v prozařovacím elektronovém mikroskopu