

# Praktikum z histologie a embryologie

# Program 1. praktika

- **obecné informace** (organizace výuky)
- **histologie a embryologie**  
(co je předmětem studia)
- **zpracování tkání** (laboratorní metody)
- **demonstrace histologických preparátů**  
(barvení různými metodami)



# Zápočet

- 100% účast v praktických cvičeních
- Každý student je vyzkoušen 4x za semestr
- Zkouší se písemně zejména znalost základních struktur a jejich odborné (latinské) názvy na základě připravených obrázků, součástí testu jsou i otázky z učiva aktuálního praktika
- Pro získání zápočtu je nutné splnit všechny testy
- V případě neúspěchu je možná jedna oprava, poté následuje ve stejném zkouškovém období opravný zápočtový test (dle SZŘ) pokrývající celý semestr

- Obrázky jsou/postupně budou/ přístupné v MedAtlasu nebo studijních materiálech praktik
- V případě neúspěchu u opravného testu, nebude zápočet udělen. Omluvenky z termínu opravného testu pouze cestou IS.

## **Nahrazování praktik**

- omluvy na základě neschopenky, jinak výjimečně po předchozí domluvě se svým vyučujícím
- nahrazování oznámit vedoucímu paralely (tomu, kdo má výklad)
- zapsat se do sešitu (před nebo po výkladu)
- na konci praktika předložit vedoucímu praktika protokol k podpisu

# DOPORUČENÁ LITERATURA

MASARYKOVA UNIVERZITA  
Lékařská fakulta

MASARYKOVA UNIVERZITA  
Lékařská fakulta

MASARYKOVA UNIVERZITA  
Lékařská fakulta

## MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE

Drahomír Horký, Svatopluk Čech

## PŘEHLED OBECNÉ HISTOLOGIE

Svatopluk Čech, Drahomír Horký

## PŘEHLED EMBRYOLOGIE ČLOVĚKA

Svatopluk Čech, Drahomír Horký, Miroslava Sedláčková



BRNO 2011

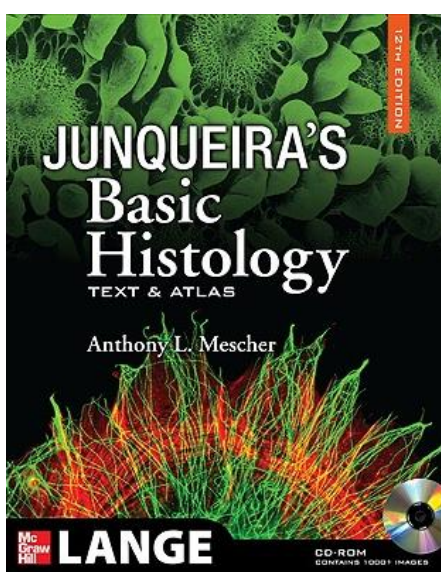
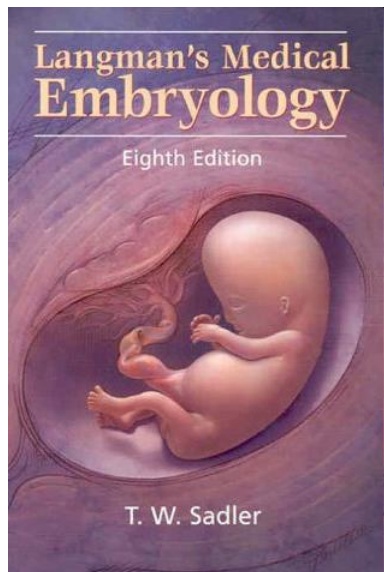
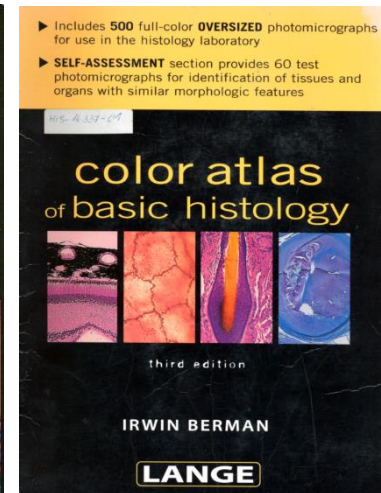
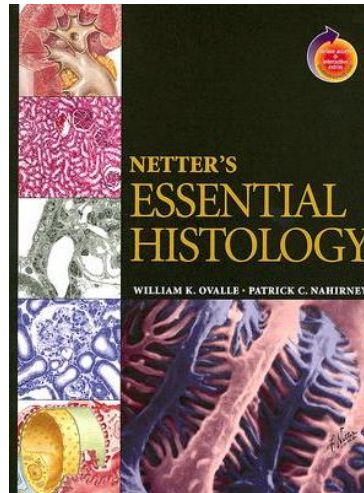
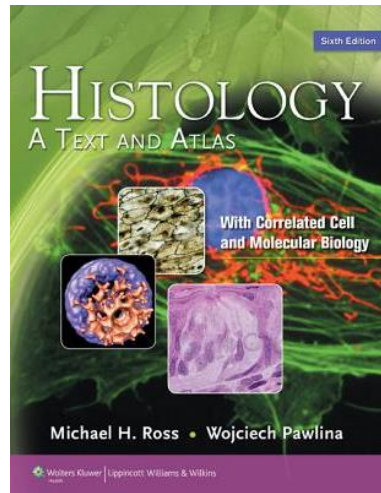
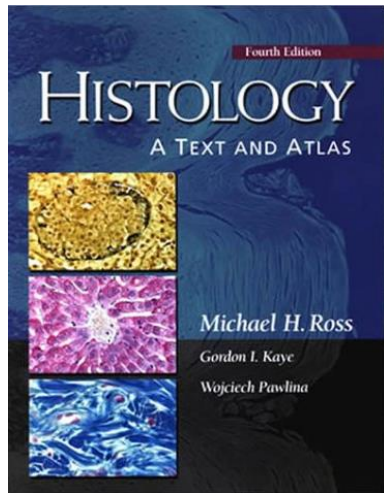


BRNO 2011



BRNO 2011

# Doporučená literatura



Ústav histologie a embryologie  
LF MU

**Mikroskopická anatomie**  
**Obecná histologie**

...

nebo

<http://www.med.muni.cz/histology/education>

# HISTOLOGIE

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



# EMBRYOLOGIE

– nauka o prenatálním (intrauterinním) vývoji jedince

- **obecná embryologie**

od gametogeneze po raný embryonální vývoj, vývoj a význam extraembryonálních struktur

- **speciální embryologie** organogeneze (vývoj orgánů v jednotlivých systémech)

do konce 2. měsíce – **EMBRYO** - zárodek

od 3. měsíce do porodu – **FETUS** - plod

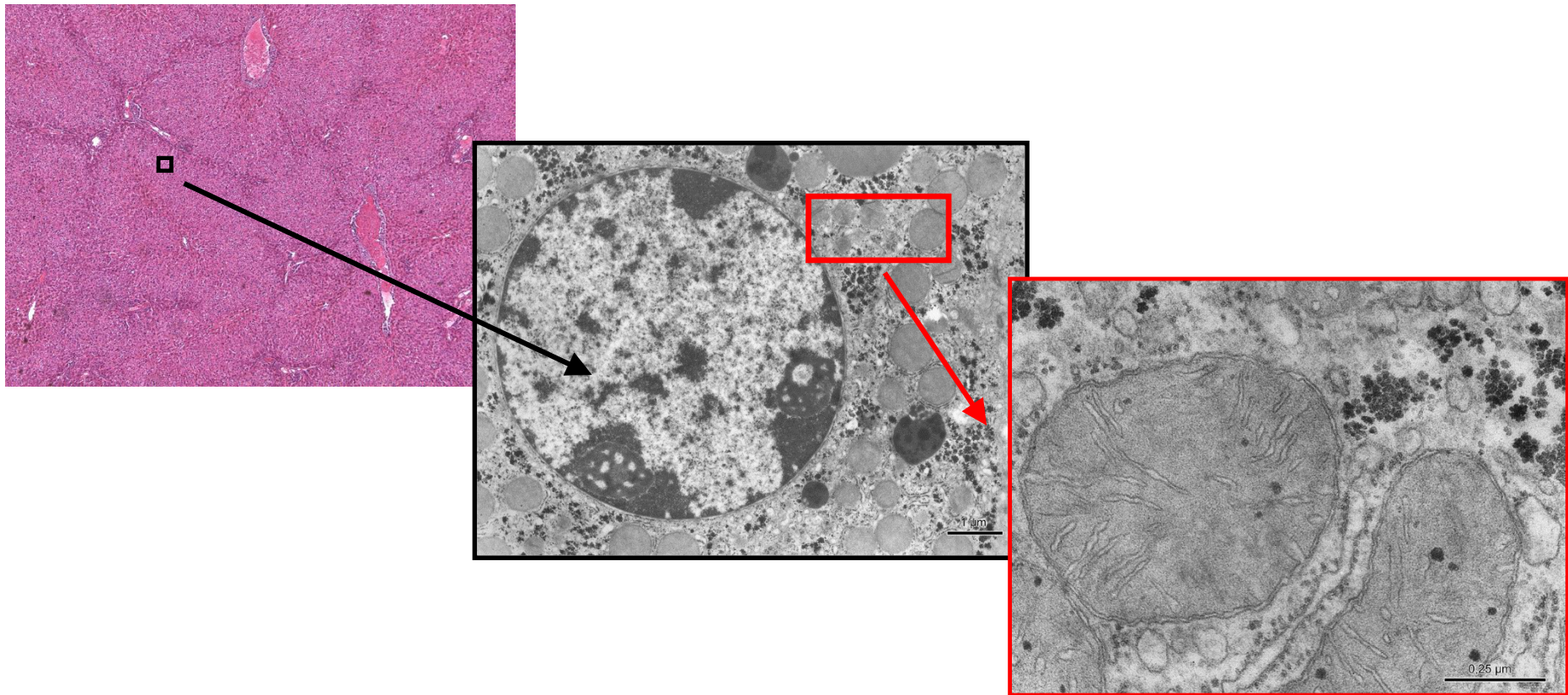
# EMBRYOLOGIE

- **teratologie** – příčiny a projevy vrozených vývojových vad (VVV = malformace = anomálie); metody prenatálního screeningu – ultrasonografie, amniocentéza, genetické vyšetření chromozomálních aberací (diagnostika, prevence a terapie)
- význam v klinické praxi: prenatální péče v gynekologii, porodnictví a pediatrii, asistovaná reprodukce

# Histologie



- Rozlišovací schopnost oka –  $\sim 0,2$  mm
- Rozlišovací schopnost SM –  $\sim 0,2$   $\mu\text{m}$
- Rozlišovací schopnost EM –  $\sim 0,2$  nm



# Zpracování tkání a orgánů pro vyšetření ve světelném mikroskopu

(příprava trvalého histologického preparátu)

- **ODBĚR** vzorků
- **FIXACE** tkáňových bločků
- **PRANÍ**
- **ZALÉVÁNÍ** - (parafinové) bločky
- **KRÁJENÍ** - řezy
- **NAPÍNÁNÍ A LEPENÍ** řezů
- **BARVENÍ** řezů
- **MONTOVÁNÍ** (uzavírání)

# 1. ODBĚR MATERIÁLU

- malý kousek tkáně (orgánu) je odebrán a rychle vložen do fixačního media:
- **biopsie** z živého organismu (v průběhu chirurgických zákroků; neinvazivní odběr – stěr z povrchu sliznice)
  - = excise (vyříznutí)
  - = punkce (dutou jehlou – jaterní nebo ledvinový parenchym, kostní dřev)
  - = kyretáž (např. endometrium)
- **nekropsie** z mrtvého organismu (pitva); laboratorní zvíře
- velikost odebraného vzorku do **1 cm<sup>3</sup>**, fixace následuje bezprostředně!
- označení

# Pomůcky k odběru:



**trokar** – dutá jehla s mandrenem



**kyreta**

## 2. FIXACE

- Definice: denaturace a stabilizace proteinů v buňce

(„šetrné usmrcení buňky“ s minimem artefaktů)

- Důvod fixace: chemická nestabilita tkáně – vysoušení, svraštění, autolýza v důsledku působení bakterií, hypoxie;
- Fixace má zabránit těmto změnám a stabilizovat strukturu vzorku. Během fixace jsou proteiny konvertovány do inaktivní, denaturované formy.

# 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 aplikací fixativa

## Požadavky na fixační činidlo

- zachovat strukturu
- rychle penetrovat do tkáňového bločku
- neovlivňovat výsledek barvení



## Fixační činidla:

- **organická** – ALDEHYDY – formaldehyd (*LM*)
  - glutaraldehyd (*EM*)
  - ALKOHOL – 96 – 100 % (absolutní etanol)
  - ORGANICKÉ kyseliny – led. octová, pikrová, trichloroctová
- **anorganická** – ANORGANICKÉ kys. – chromová, osmium tetroxid ( $\text{OsO}_4$ )
  - SOLI TĚŽKÝCH KOVŮ –  $\text{HgCl}_2$
- **směsi:** FLEMMING ( $\text{OsO}_4$ ), ZENKER, HELLY, SUSA ( $\text{HgCl}_2$ ), BOUIN (kys. pikrová), CARNOY (alkohol)

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

# PRANÍ a ZALÉVÁNÍ

- odstranění fixačního činidla ze vzorku; výběr vypíracího media závisí na fixaci: voda nebo alkohol (70-80%)
- důvod zalévání: homogenizace tkání, „tvrzení“ měkkých tkáňových vzorků dobře krájitelnými médii

# Zalévací média

- ve vodě rozpustná – želatina, celodal
- ve vodě nerozpustná – parafin, paraplast, celoidin

# Zalévání do parafinu

- **dehydratace** – odvodnění fixovaných vzorků (parafin se s vodou nemísí) vzestupnou řadou etanolu (50%, 70%, 90%, 96%, 100%, každá lázeň alkoholu 2 – 6 hodin)
- **projasnění** – vytěsnění alkoholu médiem, které se mísí s parafinem – ~~benzen~~ nebo xylén
- **prosycení (infiltrace)** – rozpuštěným parafínem (bod tání  $56^{\circ}\text{C}$ ); provádí se v TERMOSTATU: parafinová lázeň – 3 x 6 hodin.
- **vlastní zalití** – do komůrek (plastové, papírové nebo kovové). Do komůrek se nalije rozpuštěný parafín a do něj se vloží tkáňové vzorky. Komůrky jsou rychle ochlazeny ponořením do studené vody. Parafinové bločky se po vynětí z komůrek zbaví přebytku parafínu a jsou připraveny ke krájení.



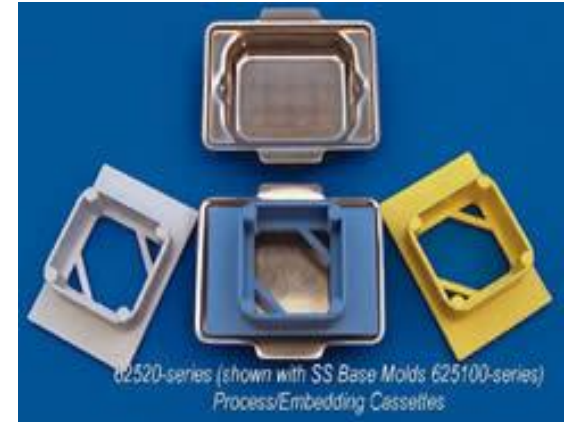
**Leica TP 1020**

odvodňovací tkáňový automat

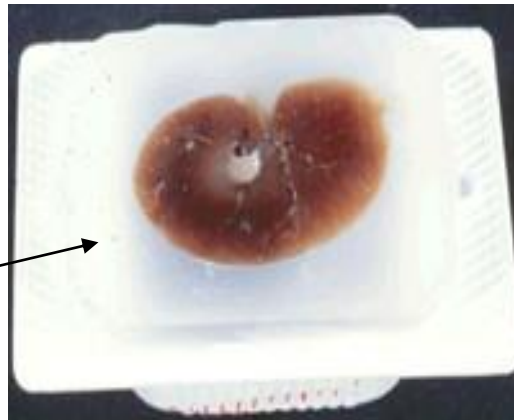


## Zalévací komůrky - **papírové**

- **kovové** s orientačními plastovými prstenci



výsledek zalití



# KRÁJENÍ

- Mikrotom – regulace tloušťky řezů: 5 – 10  $\mu\text{m}$



**Sáňový mikrotom** – blok je upevněný v držáku, nůž nebo břitva se pohybuje horizontálně

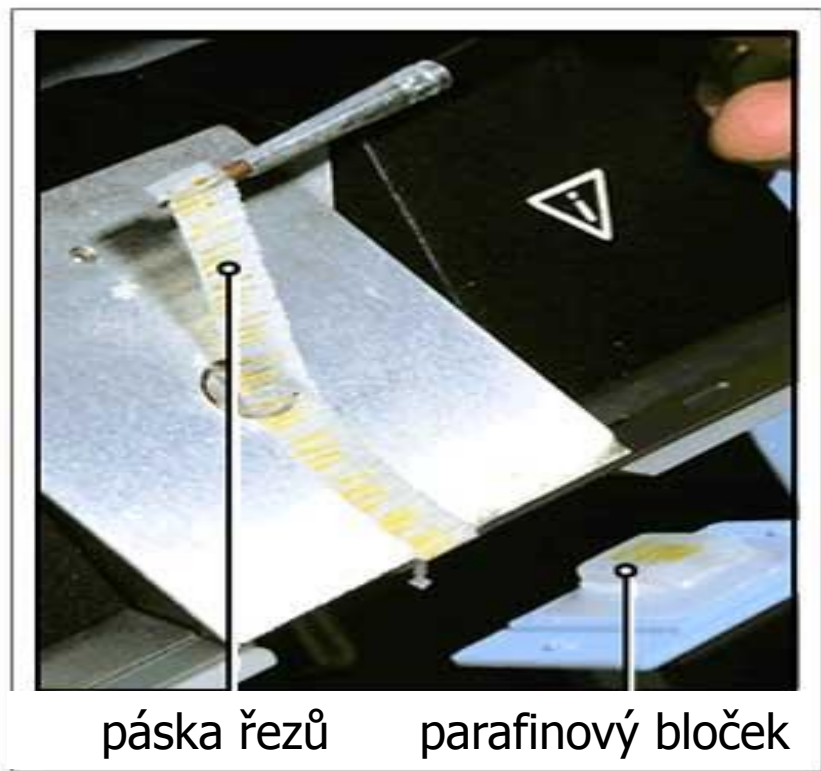


**Rotační mikrotom** – nůž je fixní, držák s bločkem se pohybuje vertikálně



## kryostat

= rotační mikrotom v mrazicím boxu ( $-60^{\circ}\text{C}$ );  
zmrzlou tkáň lze krájet bez zalévání





# NAPÍNÁNÍ A LEPENÍ 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).



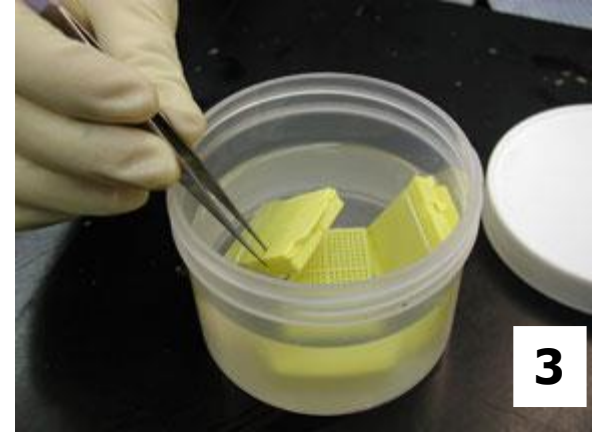
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv.  
Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylénem.



**1**



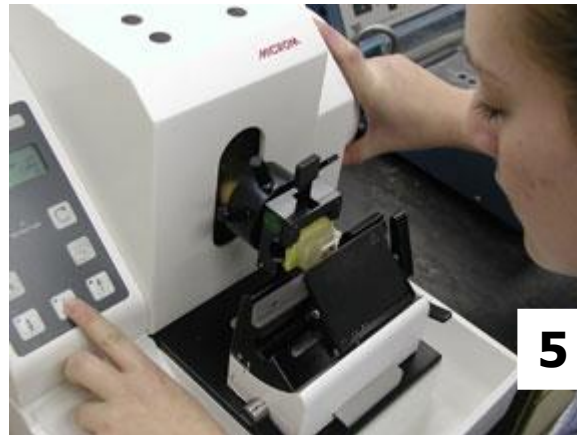
**2**



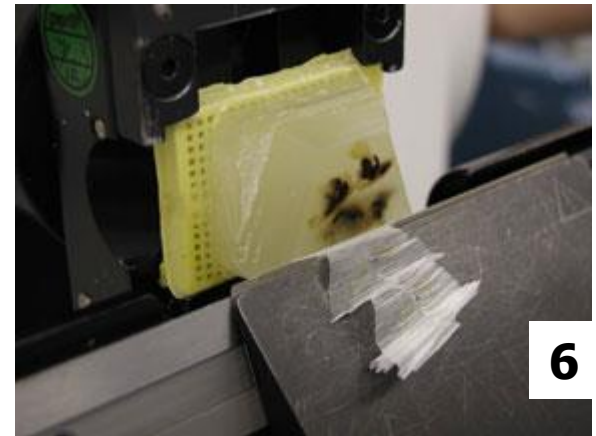
**3**



**4**



**5**



**6**



**7**



**8**

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

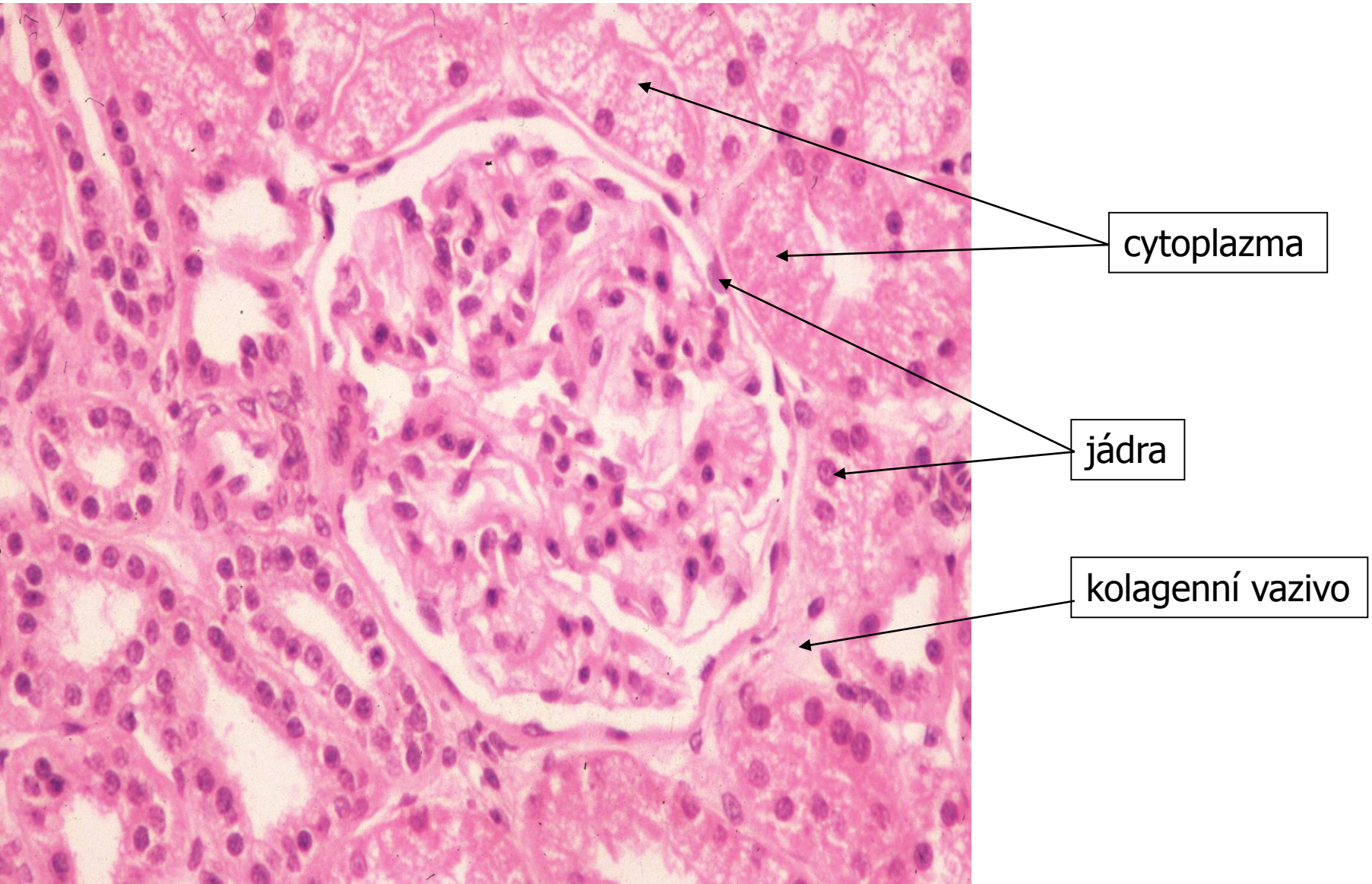
# BARVENÍ

- zviditelnění struktur ve tkáni – buňka a její součásti vykazují afinitu k barvivům dvou skupin:
  - **zásaditá /bazická/ barviva („jaderná“)** – reagují s kyselými strukturami buněk a tkání (NK v jádře aj.)
    - bazofilie** – schopnost vázat bazická barviva
  - **kyselá barviva („cytoplazmatická“)** – reagují se zásaditými strukturami
    - acidofilie** – schopnost vázat kyselá barviva
- struktury chromofilní x chromofobní



# Hematoxylin a eosin (HE)

H (modrý) = zásadité barvivo, E (červený) = kyselé barvivo



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

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

# HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)

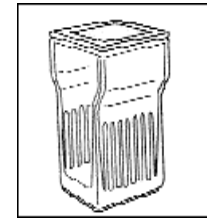
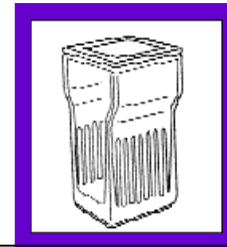
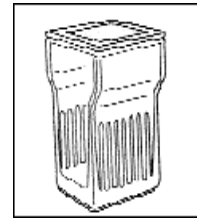
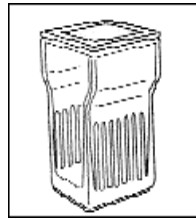
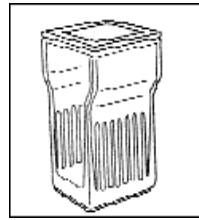
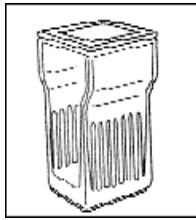
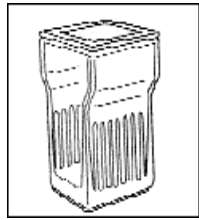
deparafinace

rehydratace

praní

barvení

diferenciace



xylén I

xylén II

100%  
etanol

96%  
etanol

H<sub>2</sub>O

hematoxylin

kyselý  
etanol

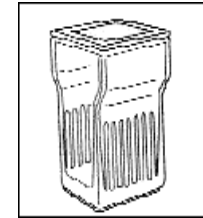
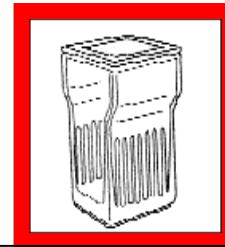
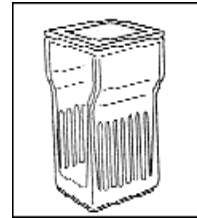
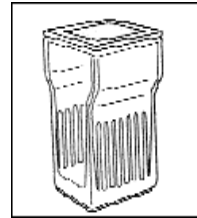
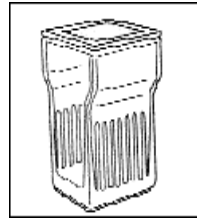
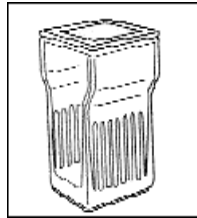
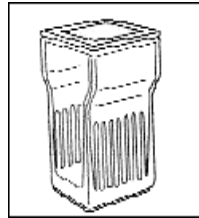
projasnění

dehydratace

praní

barvení

praní



xylén IV

xylén III

100%  
etanol

96%  
etanol

H<sub>2</sub>O

eosin

H<sub>2</sub>O

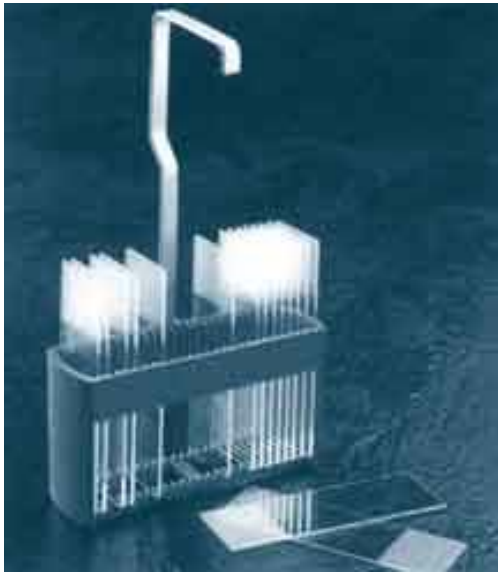
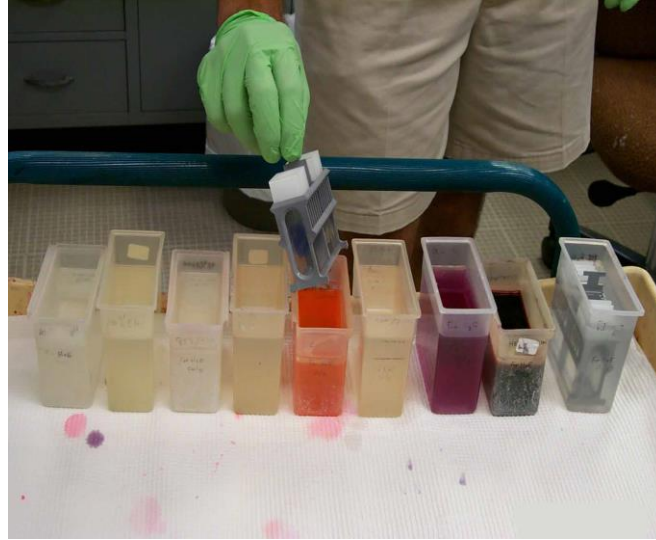
# RUTINNÍ BARVENÍ: HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)

## Postup:

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









# Barvicí automat



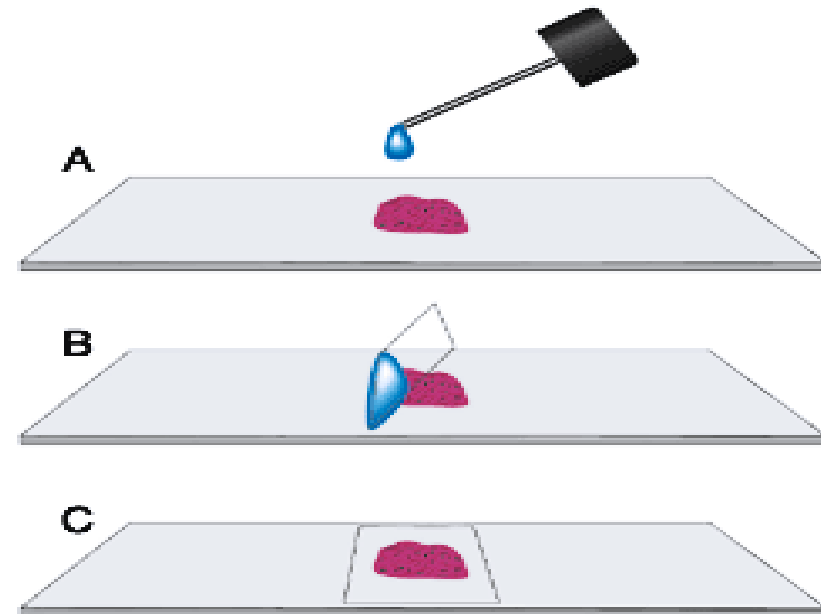
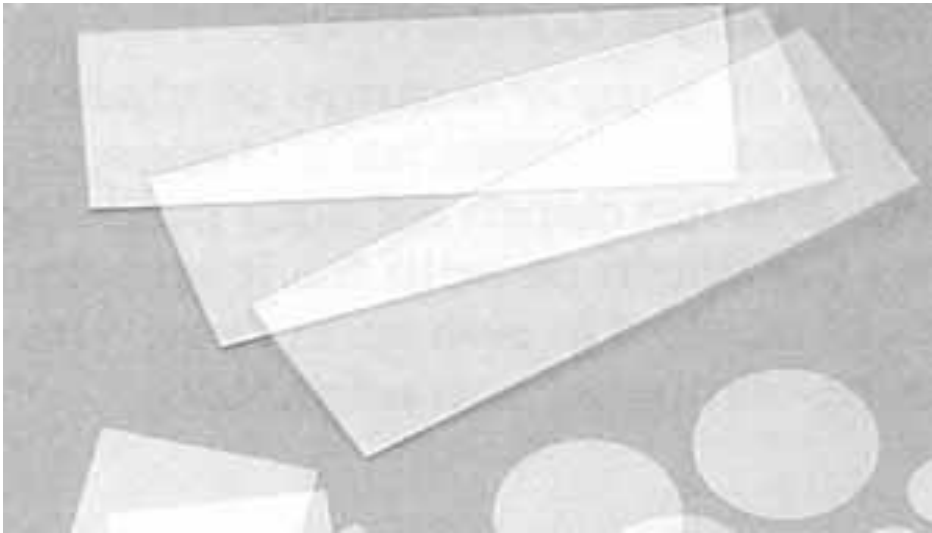
řada boxů (kyvet) s barvivy

≈



# MONTOVÁNÍ

- uzavření preparátu – kapkou montovacího media a krycím sklíčkem  $\Rightarrow$  trvalý preparát



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



**trvalé histologické preparáty ke studiu v SM**

# TYPY BARVENÍ

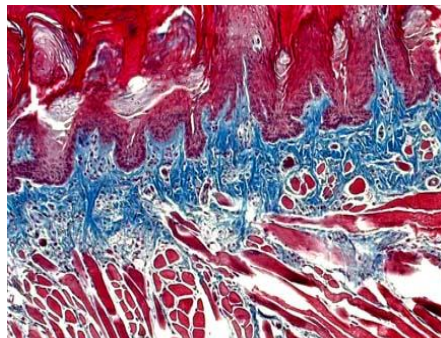
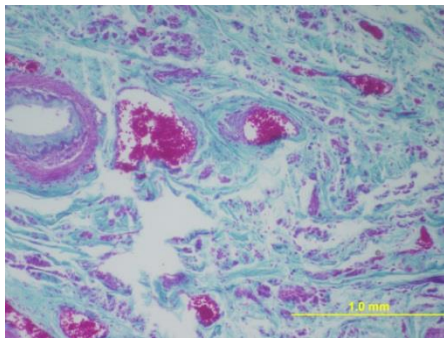
- rutinní, přehledná – HE, AZAN (demonstrují všechny zákl. složky tkáně)
- speciální – vizualizace vybraných struktur
  - Massonovy trichromy: žlutý - HEŠ, modrý - AZAN, zelený (kolag.vlákná)
  - orcein, aldehydový fuchsin (elast.vlákná) aj.
- impregnační – AgNO<sub>3</sub> (nervová nebo retikulární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



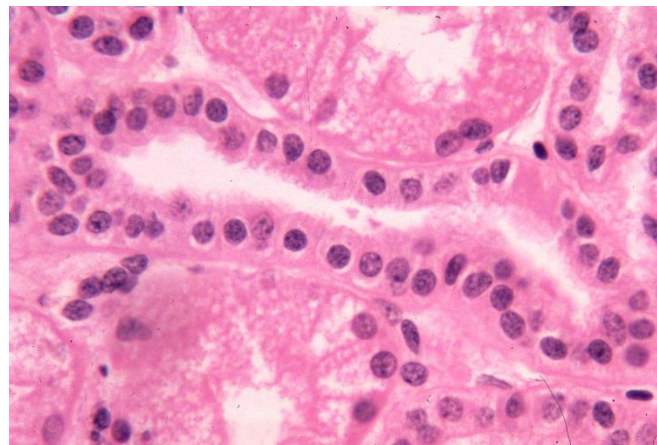
# Barvicí metody:

přehledné – HE, AZAN

demonstrují všechny složky tkání

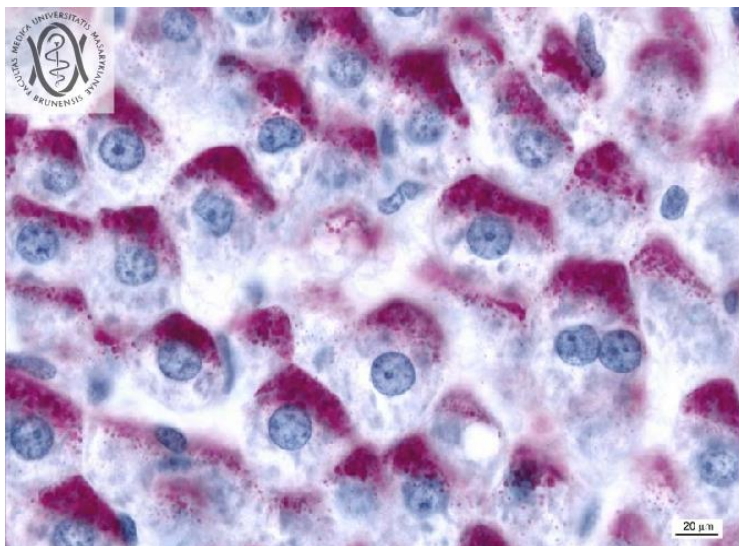


HE – nejpoužívanější barvení

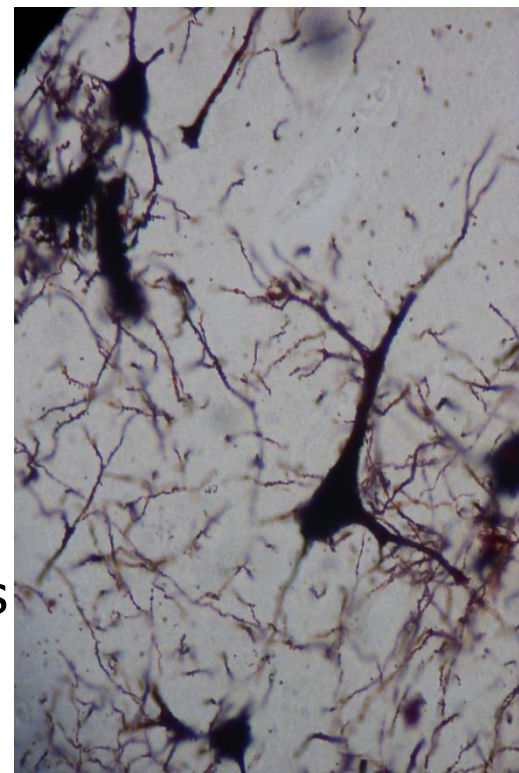


speciální

zdůrazňují určité buněčné nebo tkáňové složky



impregnační  
soli Ag, Au nebo Os

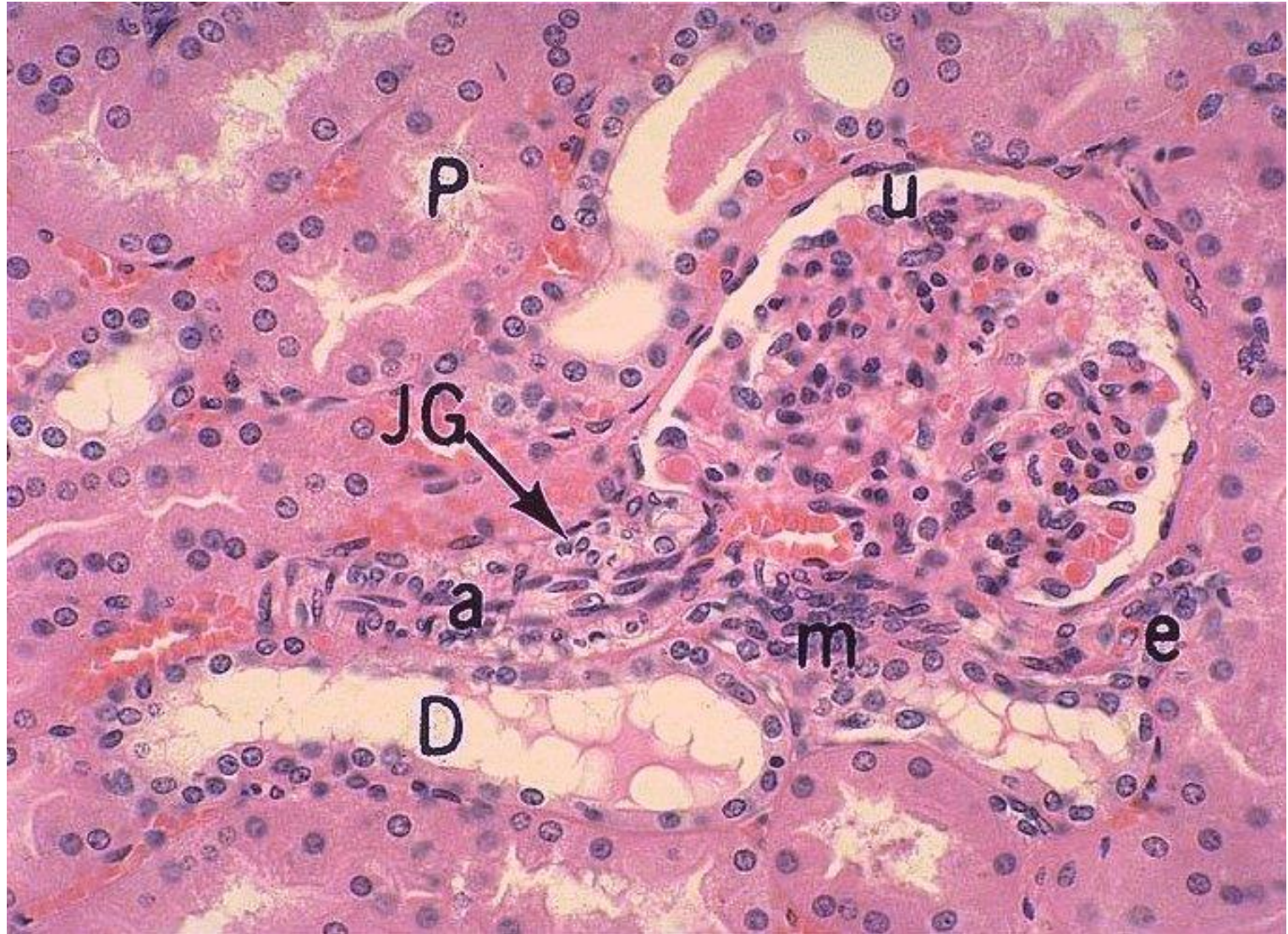


## Výsledky barvení:

- **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

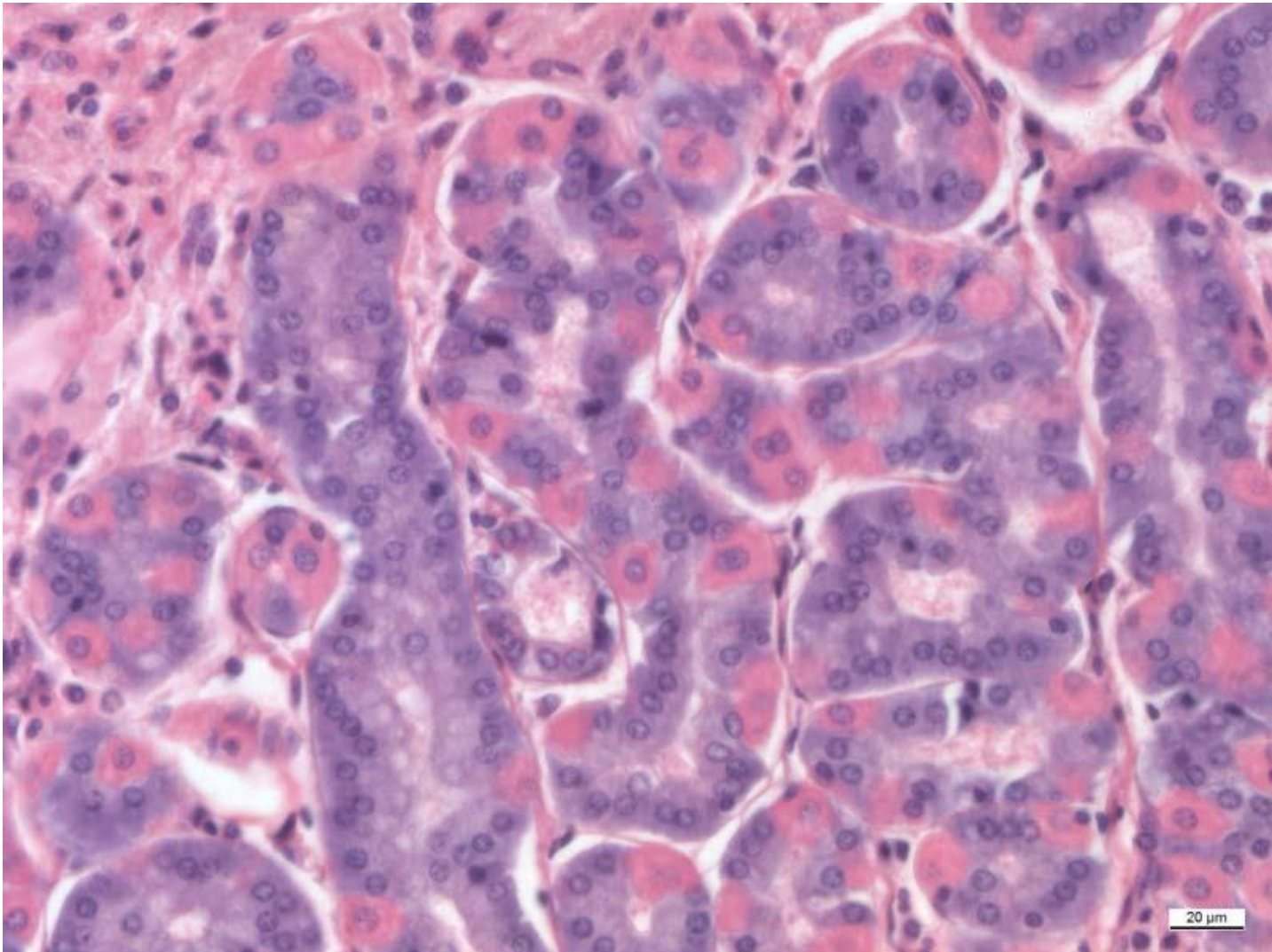


# Hematoxylin a eosin (HE)





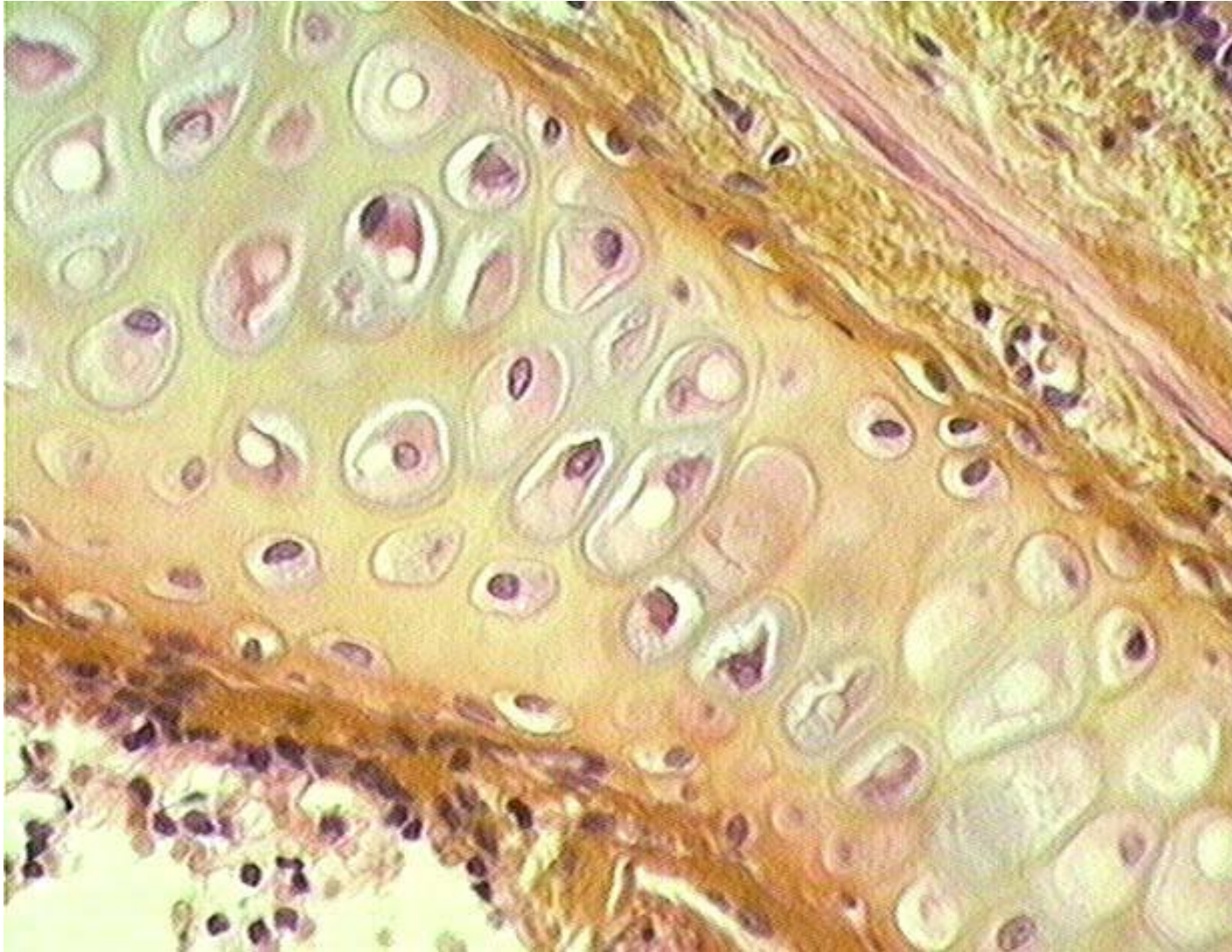
# basofilní x acidofilní cytoplazma



fundus ventriculi



# Hematoxylin, eosin a šafrán (HEŠ)

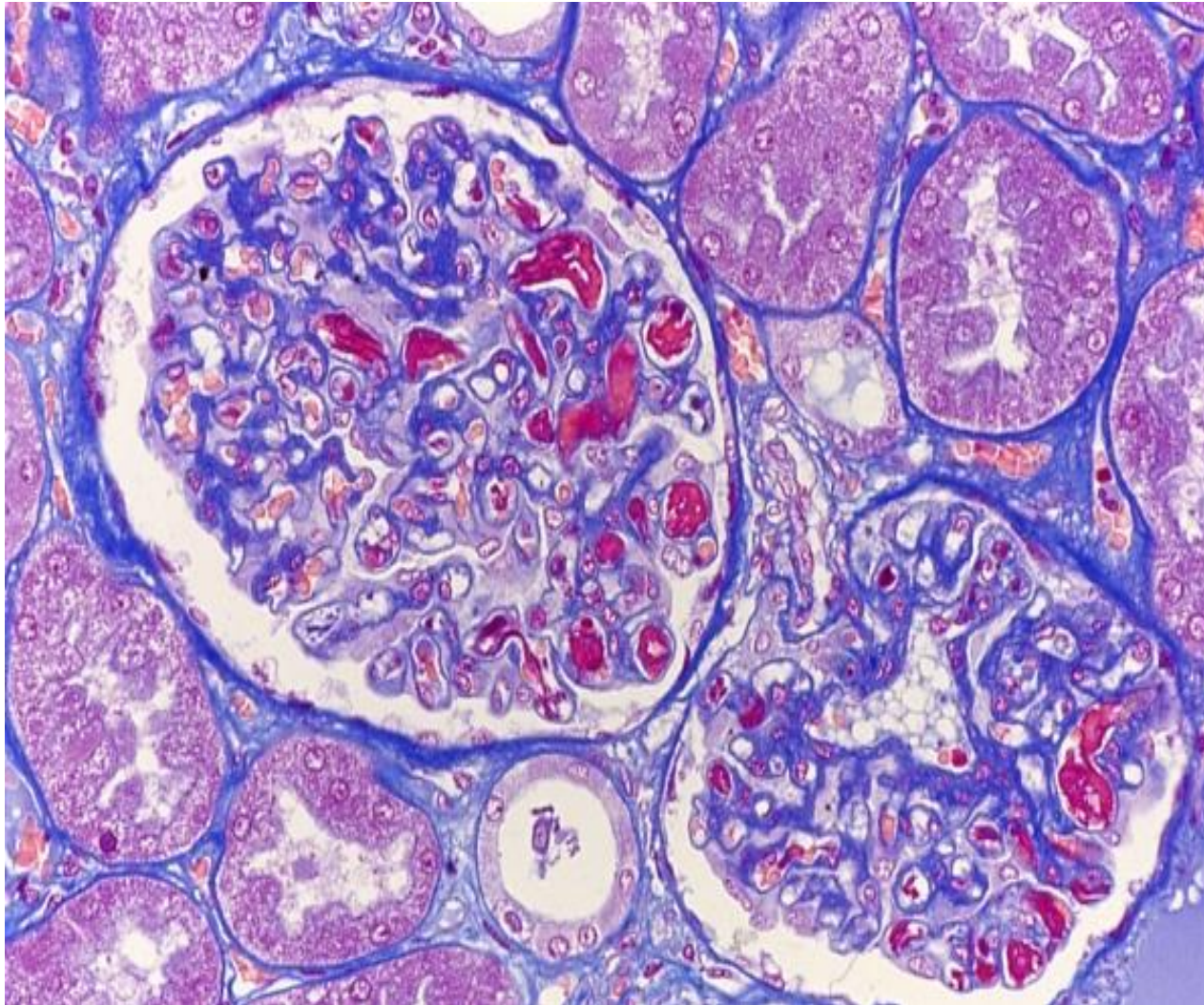


chrupavka

kolagenní vlákna žlutá



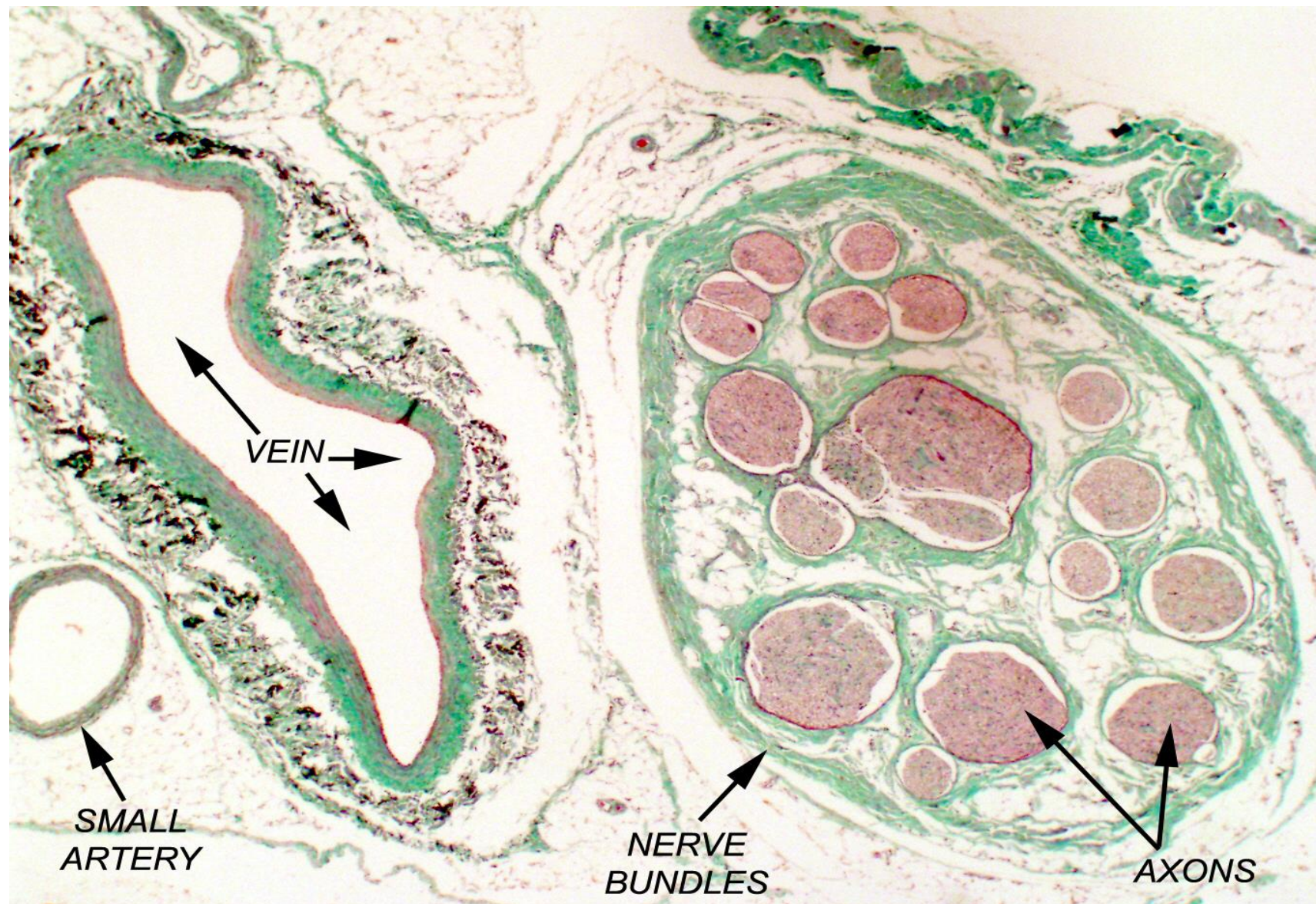
# Azokarmín a anilin. modř (AZAN)



kolagenní vlákna modrá



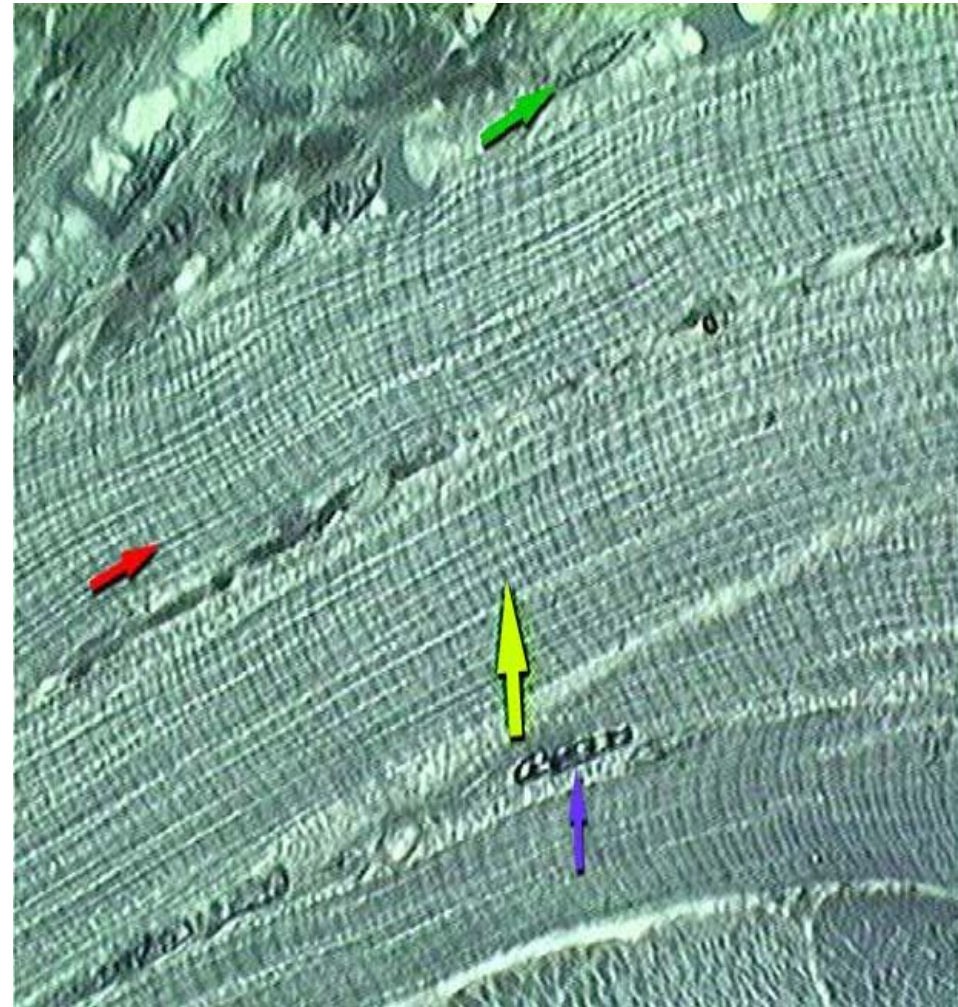
# Zelený trichrom



kolagenní vlákna zelená



# Cytologická barvení – podle Heidenhaina

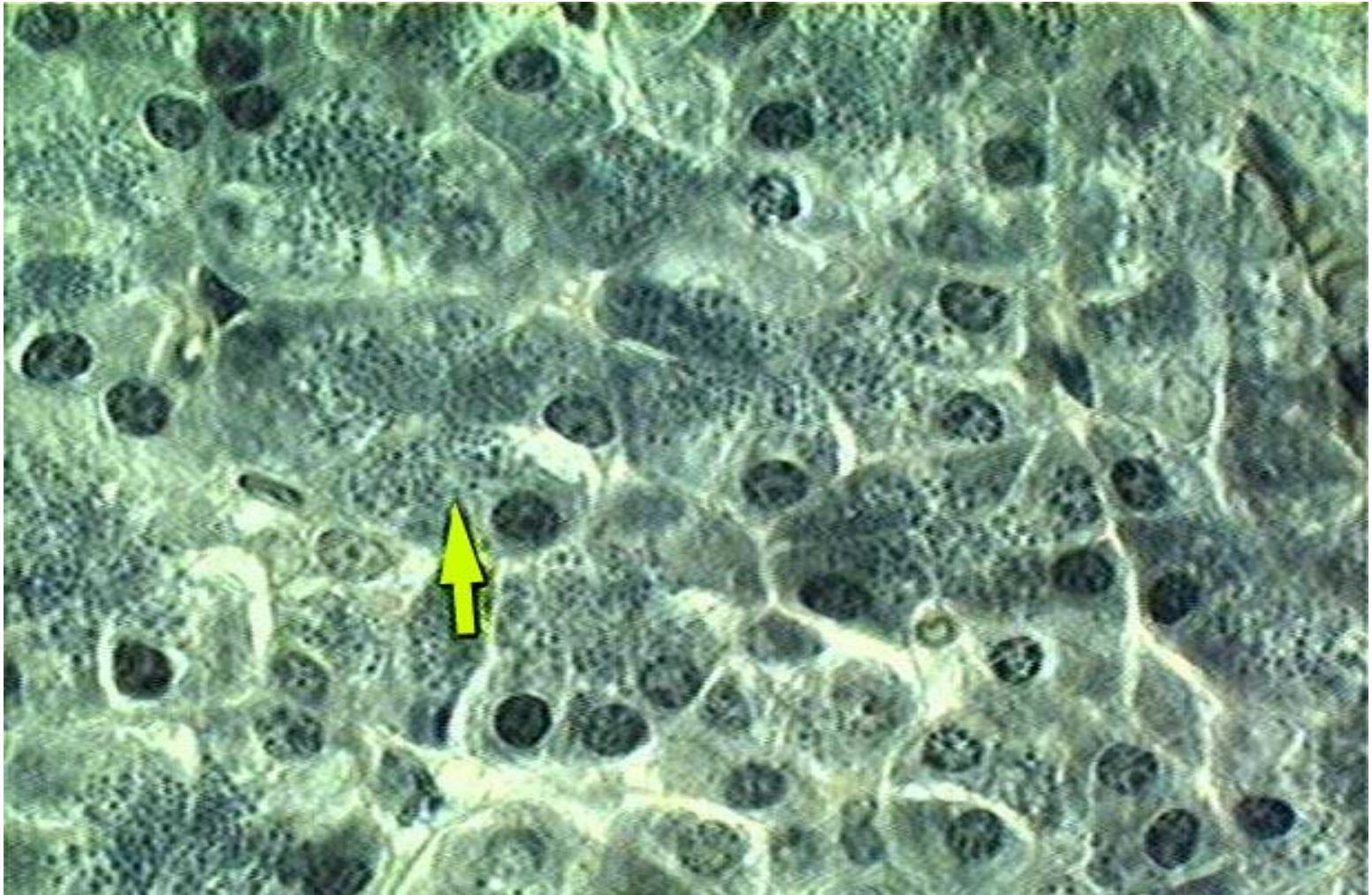


**kosterní svalová tkáň**

**železitý hematoxylin**



# Cytologická barvení – podle Heidenhaina



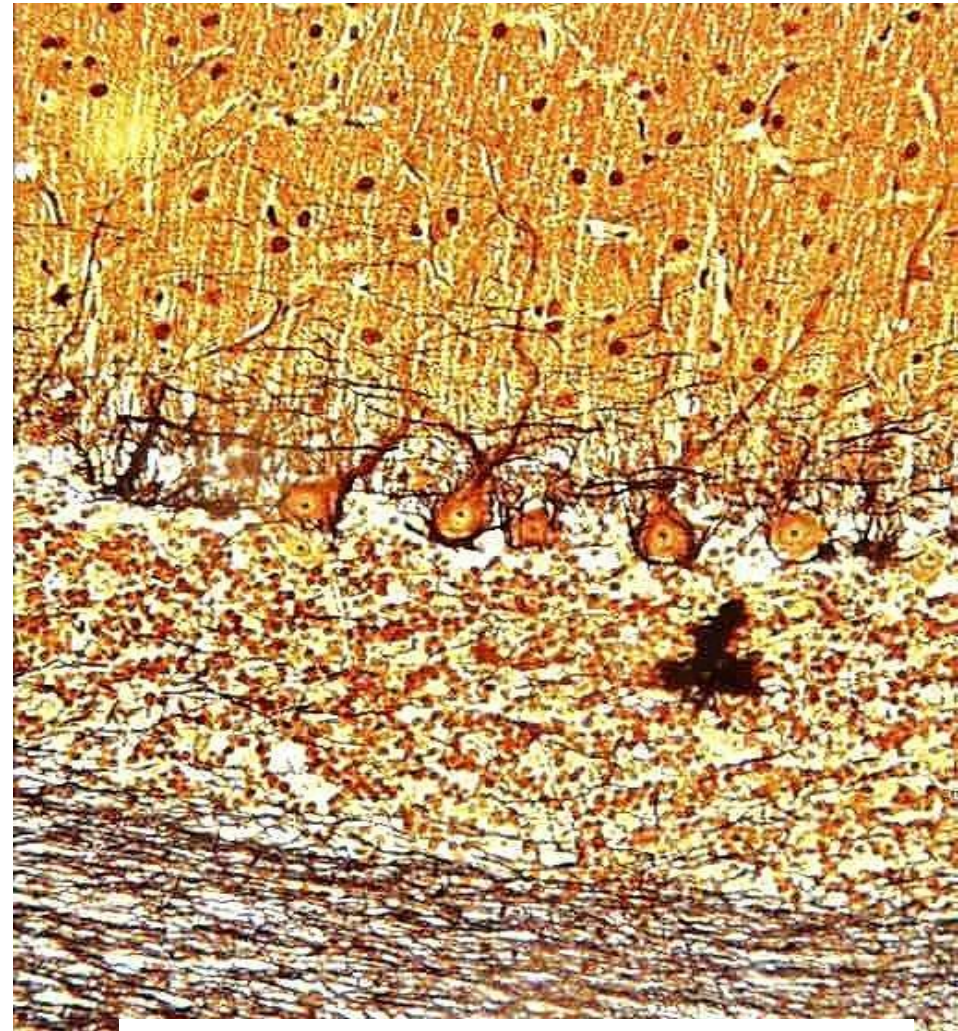
**mitochondrie v hepatocytech**



# Impregnace „stříbrem“ ( $\text{AgNO}_3$ )



**slezina – retikulární vlákna**



**cerebellum – nervová vlákna**

# Zpracování tvrdých tkání (zub, kost)

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

# Histochemie & Imunohistochemie

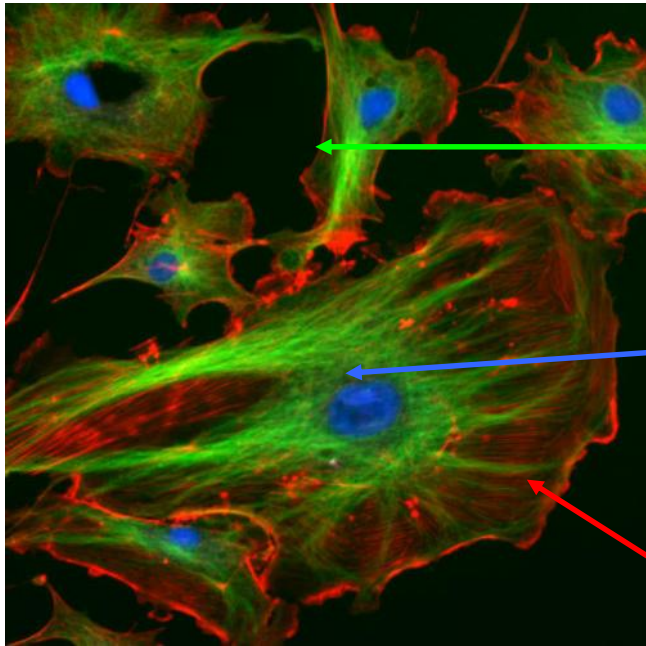
zjišťování povahy a lokalizace chemických látek v buňce „in situ“ (průkaz biomolekul - proteinů, AA, NA, sacharidů, lipidů, enzymů, pigmentů, anorg. látek – Fe, Ca, Zn aj.)

- Provedení:  
detekce Ag-PI\* komplexů nebo Ag-PI + PI\* (sekundární značená PI)

\* - marker

1. fluorochromy – rhodamin, Texas red, FITC
2. enzymy – křenová peroxidáza, AF, acetylcholinesteráza,
3. radioizotopy ( $I^{125}$ )

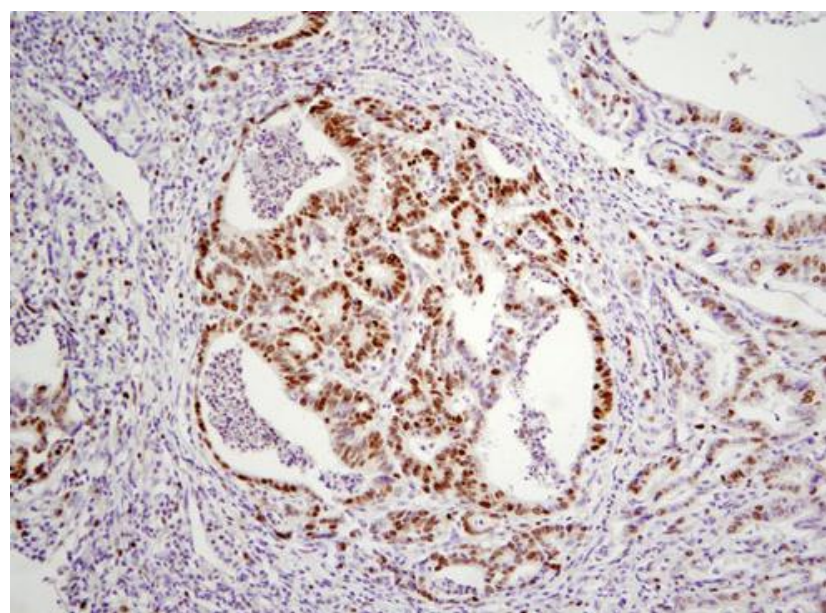
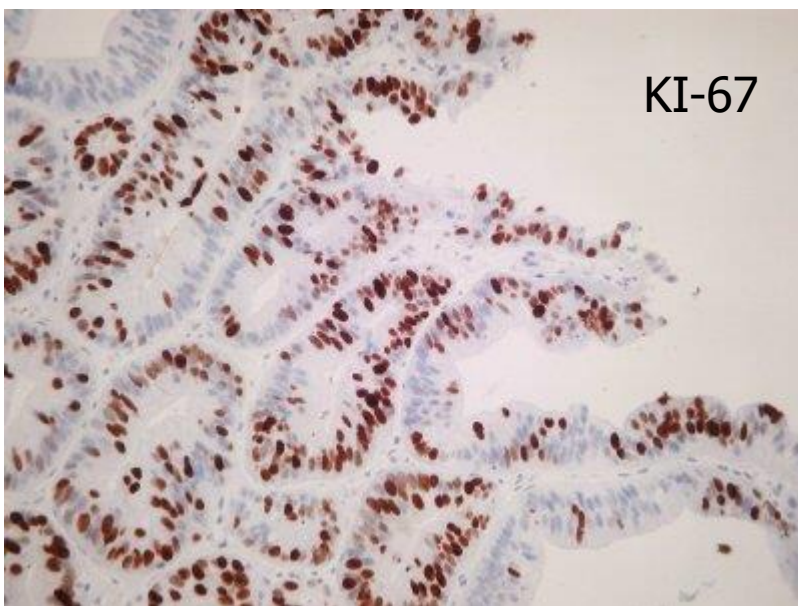
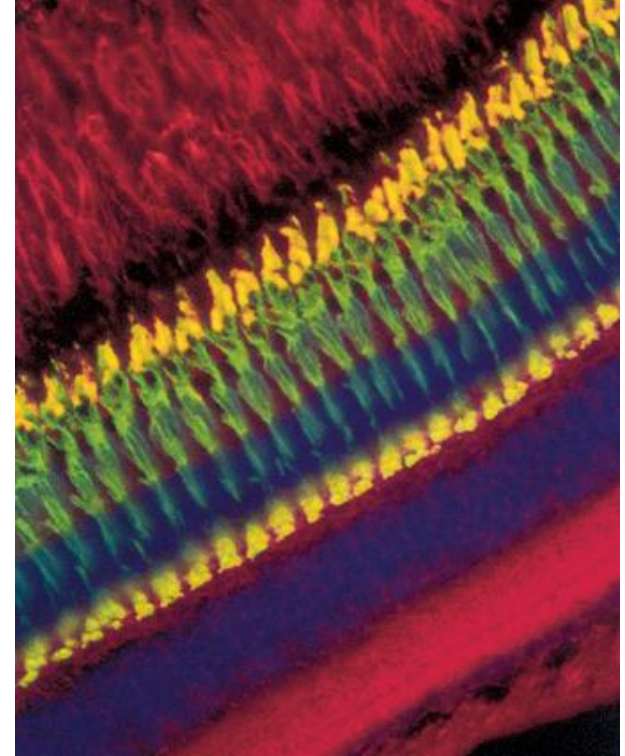




Aktin (cytoskelet)

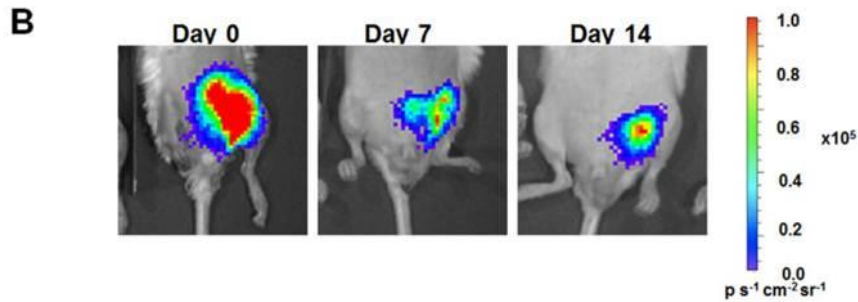
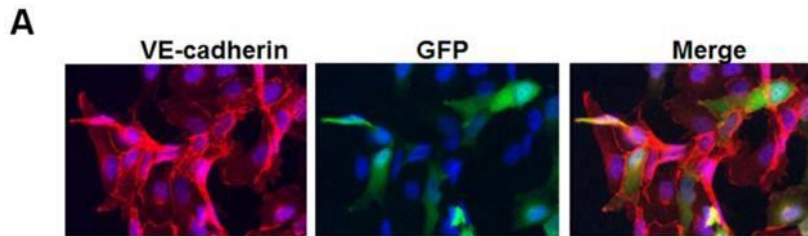
DAPI (jádno)

Mikrotubuly (cytoskelet)



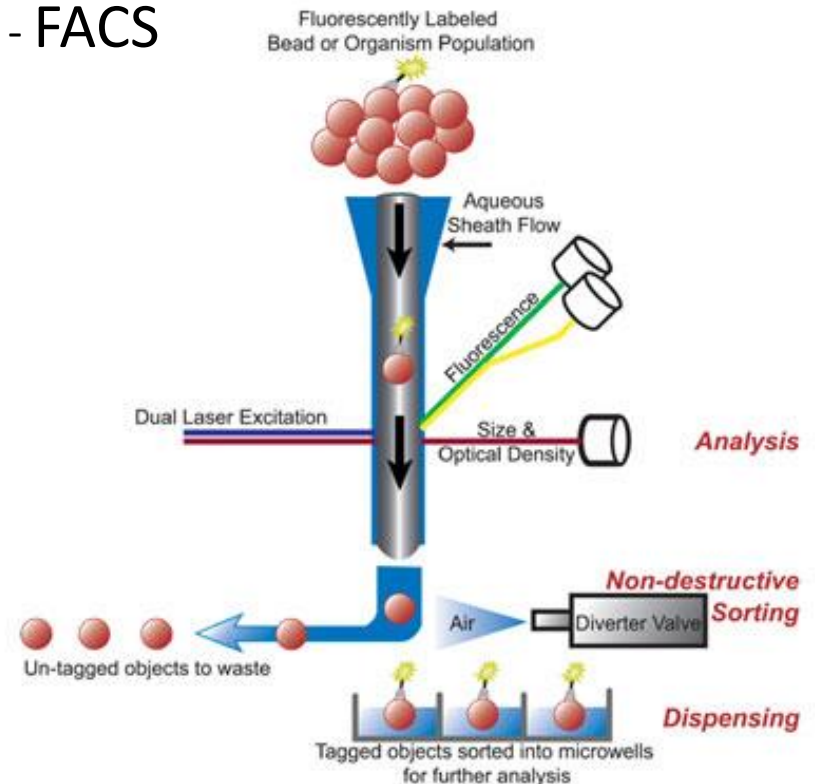
# In-vivo/live cell imaging

- US, MRI, PET...
- Buňky s fluorescenčním reportérem



doi:10.7150/thno.3694

- FACS



# Zpracování tkání pro elektronovou mikroskopii (EM)

Požadavky na pracovní podmínky:

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

# POSTUP

- **ODBĚR** – okamžitá fixace, velikost tkáňového bločku do 1 mm<sup>3</sup>
- **FIXACE** – glutaraldehyd (vazba aminoskupin) + OsO<sub>4</sub> (vazba lipidů) – dvojitá fixace
- **PRANÍ** – destilovaná voda
- **DEHYDRATAČE** - alkohol
- **ZALÉVÁNÍ** – zalévací media rozpustná nebo nerozpustná ve vodě (polymerizace – změna skupenství). Epoxidové pryskyřice (Epon, Araldit), polyestery, metakryláty.



# Zalévací komůrky:

želatinové (1), plastové (2)



1



2

nosiče (držáky) kapslí (3)

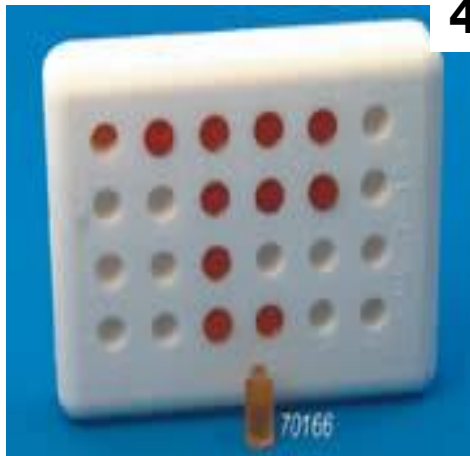


3

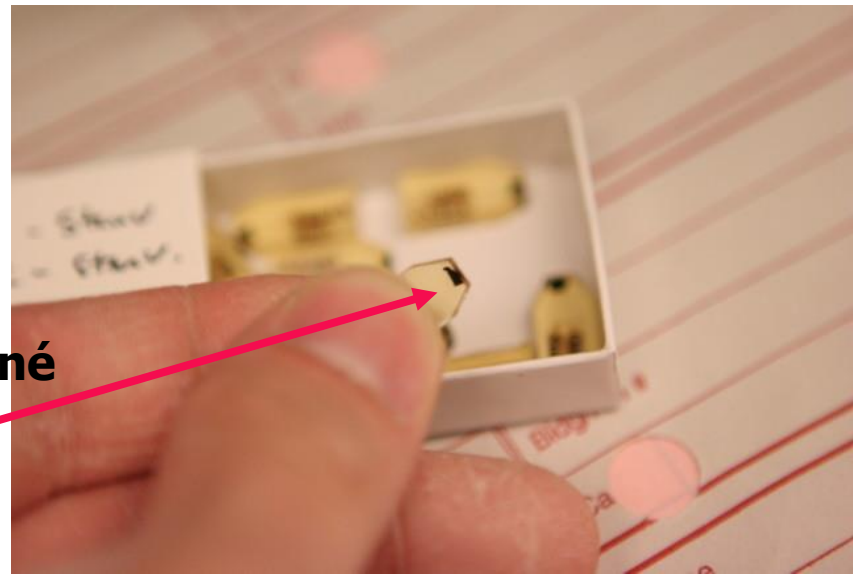
silikonové ploténky s komůrkami (4, 5)



4,5



**bločky připravené pro krájení**

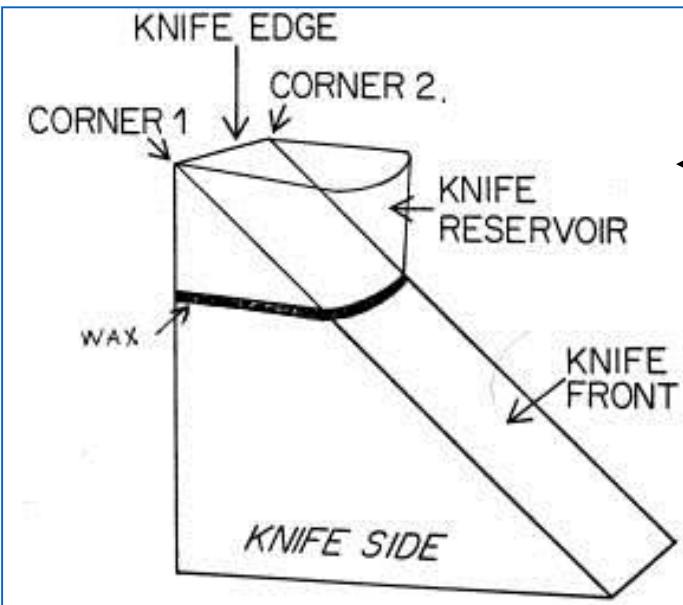


# KRÁJENÍ

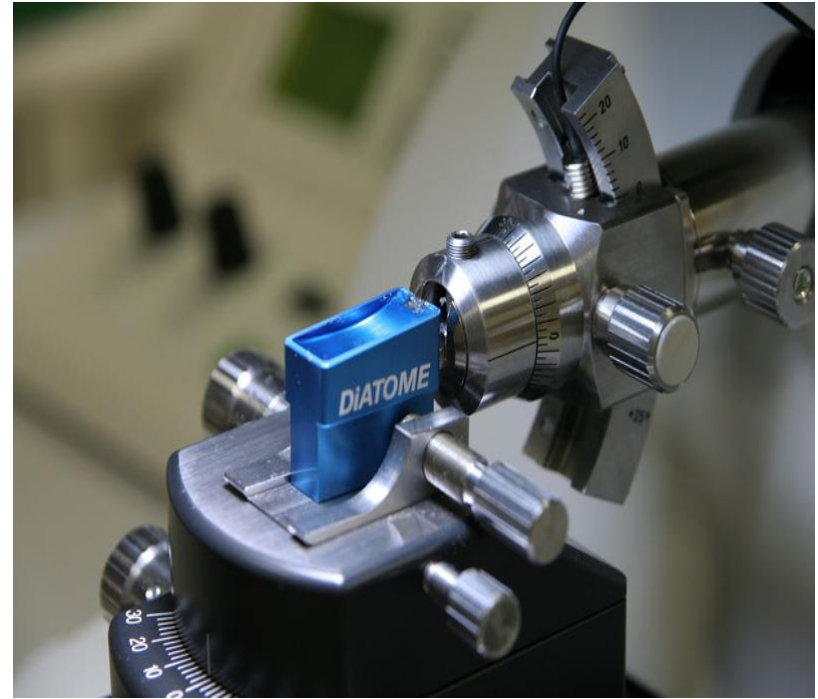
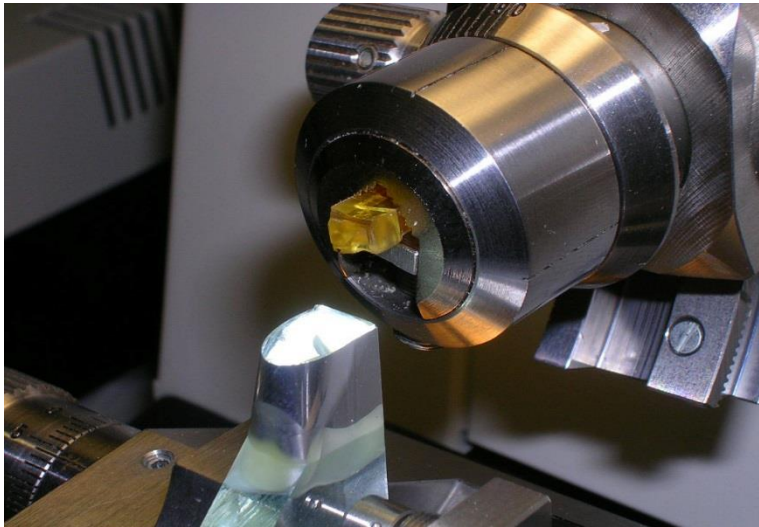
- ultramikrotomy, řezná plocha  $0.1 \text{ mm}^2$ , ultratenké řezy (70 – 100 nm)
- skleněné nebo diamantové nože s vaničkou – řezy splývají na hladinu vody a jsou přeneseny na sítky (Cu, Ni)



# Ultramikrotomové nože:

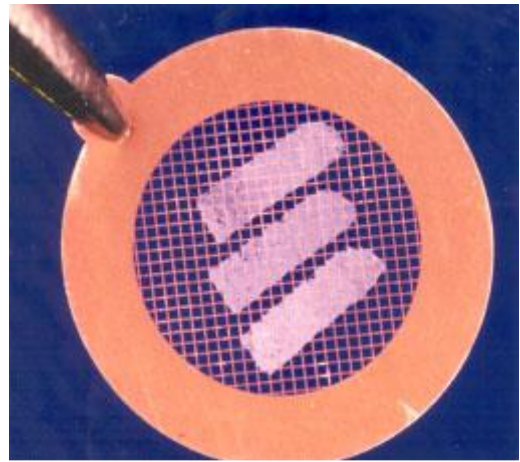
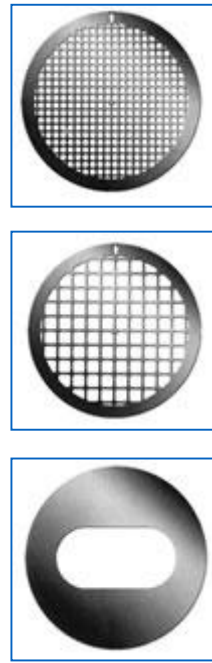
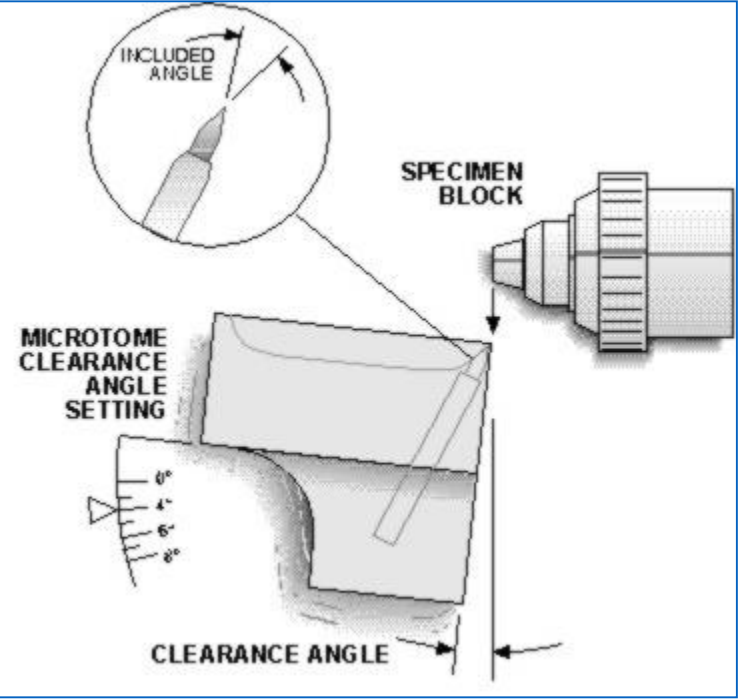


**skleněný**  
**diamantový**



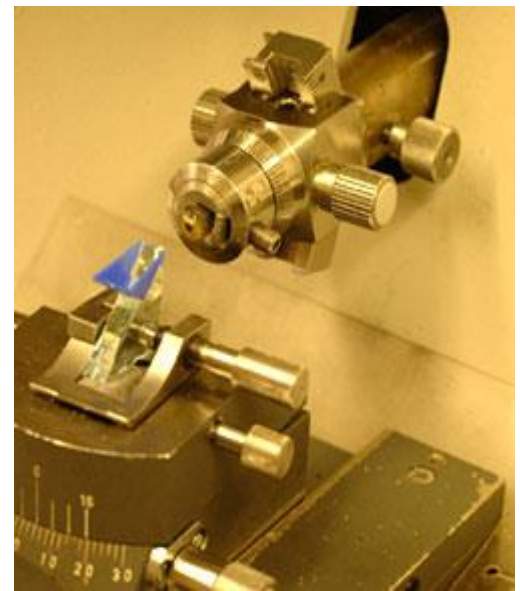
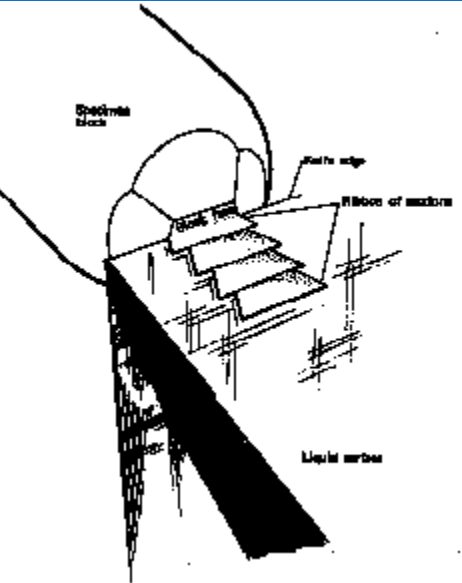
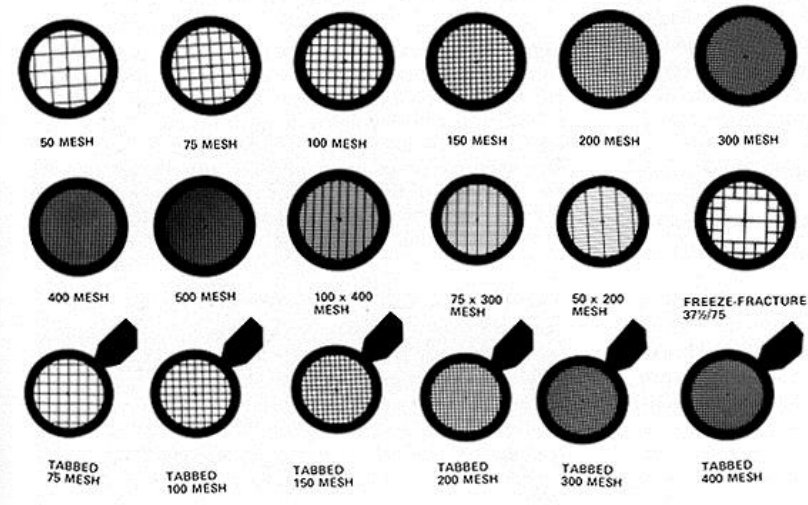


# Krájení, nosné sítě



**Sítka se 3 páskami řezů**

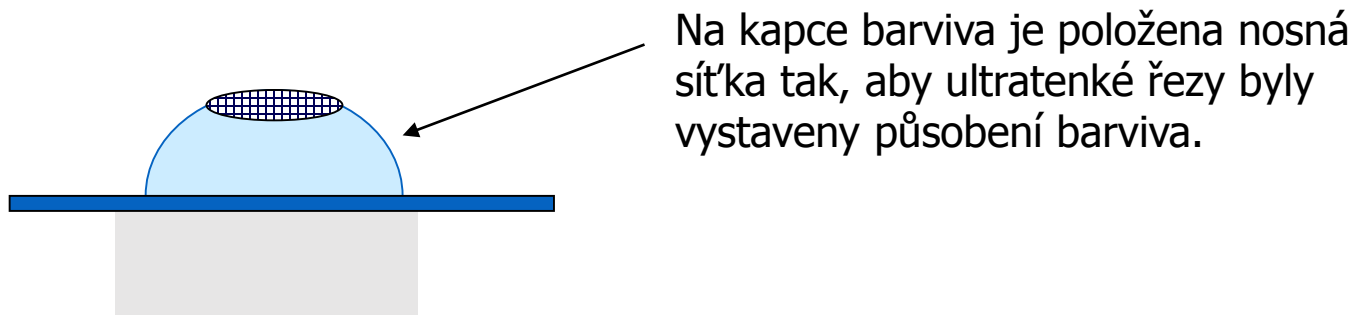
## typy sítěk



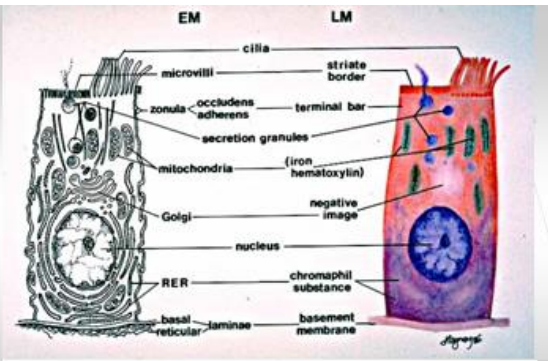


# KONTRASTOVÁNÍ

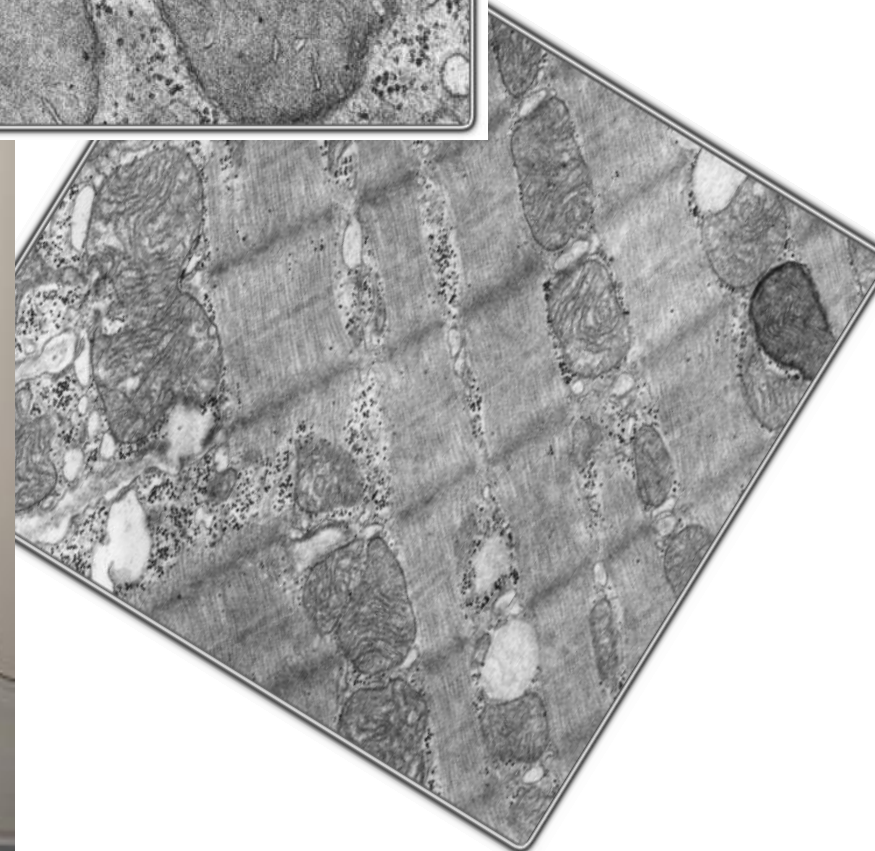
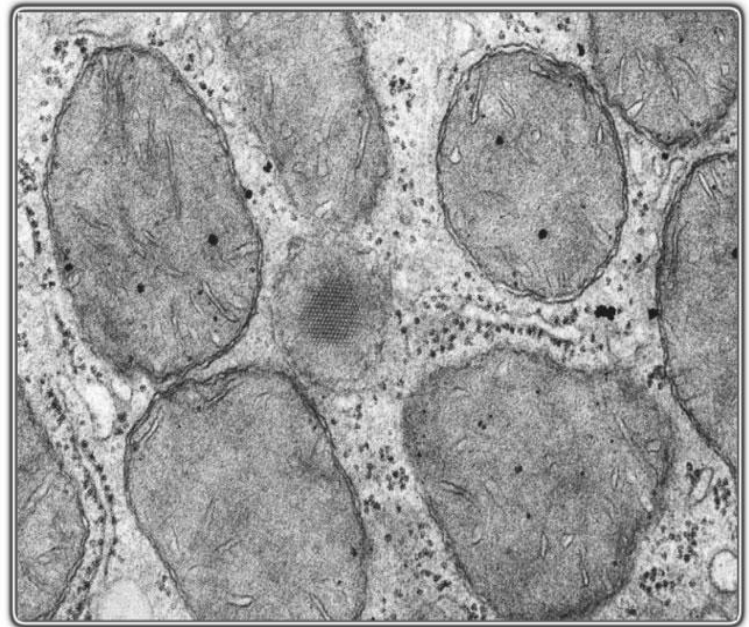
- princip odlišení struktur – rozptyl svazku elektronů v závislosti denzity struktur ; „elektronová barviva“ – směsi těžkých kovů: uranylacetát nebo citrát olovnatý

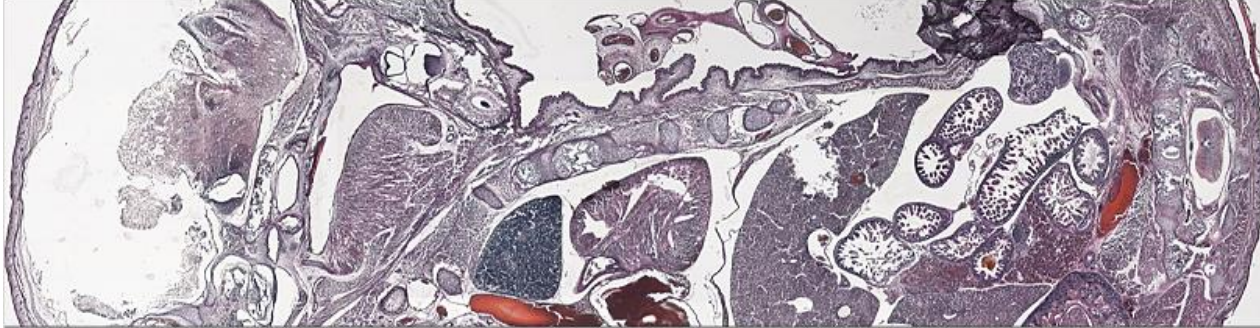


Rozdíly mezi SM a EM		
	<b>SM</b>	<b>EM</b>
Odběr	< 1 cm <sup>3</sup> minuty	< 1 mm <sup>3</sup> sekundy
Fixace	formaldehyd 12 – 24 hod.	glutaraldehyd 1 – 3 hod.
Zalévání	parafin	epoxid. pryskyřice (Durcupan)
Krájení Tloušťka řezů	mikrotom 5 – 10 μm	ultramikrotom 50 – 100 nm
Barvení (LM) Kontrastování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



Columnar epithelial cell in electron (EM) and light (LM) microscope





Děkuji za pozornost