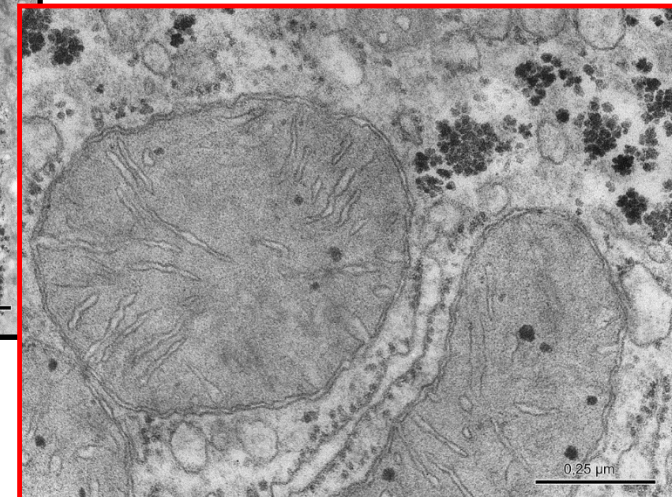
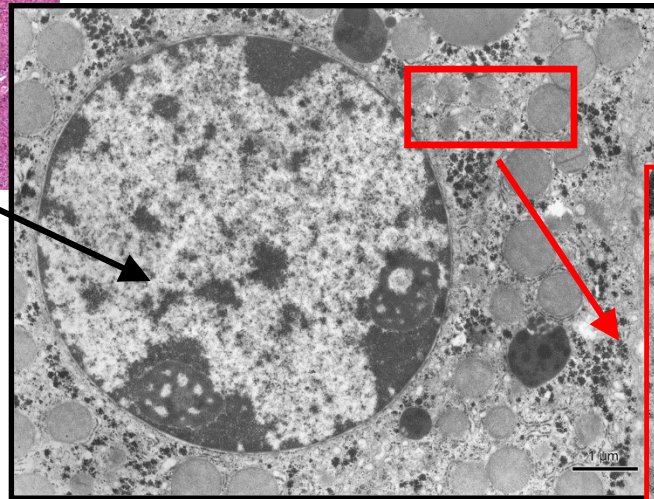
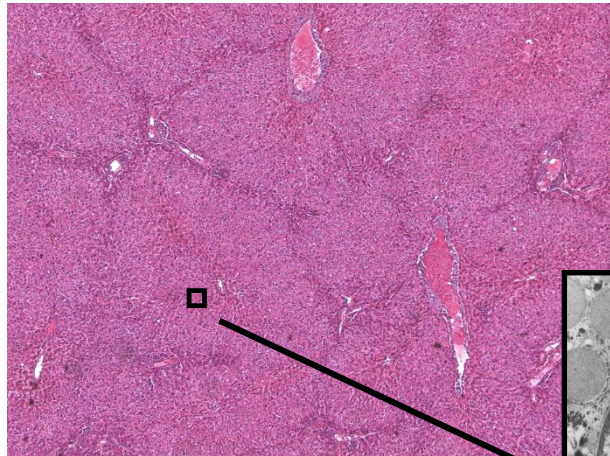


ÚVOD DO HISTOLOGICKÉ TECHNIKY A ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PRO SVĚTELNOU A ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII

ÚHE LF MU, 2016

Histologie

- Rozlišovací schopnost oka – $\sim 0,1 \text{ mm}$
- Rozlišovací schopnost SM – $\sim 0,5 \mu\text{m}$ (běžně)
- Rozlišovací schopnost EM – $\sim 1,5 \text{ nm}$



Zpracování tkání a orgánů pro účely histologického 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)

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 dřeň)
 - = kyretáž (např. endometrium)
- **nekropsie** z mrtvého organismu (pitva); laboratorní zvíře
- velikost odebraného vzorku **5 – 10 mm³**, fixace následuje bezprostředně!
- označení

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 předcházet 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

CHEMICKÁ FIXACE

Fixační činidla:

organická

- ALDEHYDY
 - formaldehyd (*LM*)
 - glutaraldehyd (*EM*)
- ALKOHOL – 96 – 100 % Ethanol
- ORGANICKÉ kyseliny – led. octová, pikrová, trichloroctová

anorganická

- ANORGANICKÉ KYSELINY - kys. chromová, oxid osmičelý (OsO_4)
- SOLI TĚŽKÝCH KOVŮ – HgCl_2

směsi:

FLEMMING (OsO_4), ZENKER, HELLY, SUSA (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: „tvrzení“ měkkých tkáňových vzorků krájitelnými médii

Zalévací média

- ve vodě rozpustná – želatina, celodal, vosky
- ve vodě nerozpustná – parafin, paraplást, celoidin

Zalévání do parafinu

- **dehydratace** – odvodnění fixovaných vzorků (parafin se s vodou nemísí; vzestupnou řadou etanolu (50%, 70%, 90%, 96% každá lázeň alkoholu 2 – 6 hodin)
- **projasnění** – vytěsnění alkoholu médiem, které se mísí s parafinem – benzen nebo xylen
- **infiltrace** – rozpuštěným parafínem (bod tání 56°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

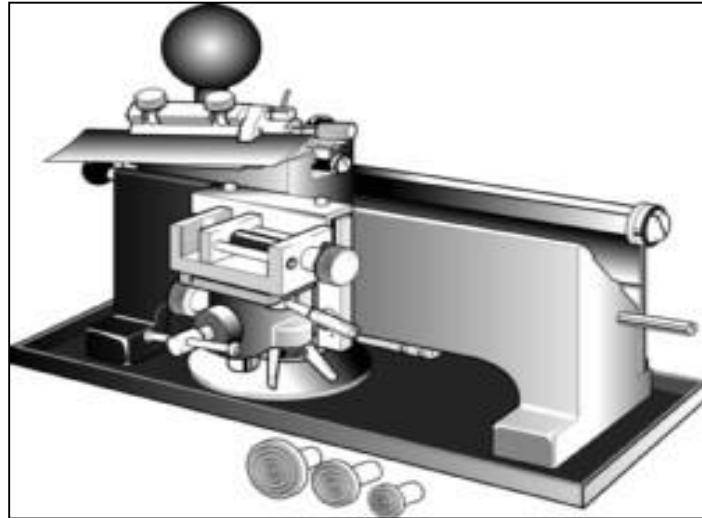


výsledek zalití

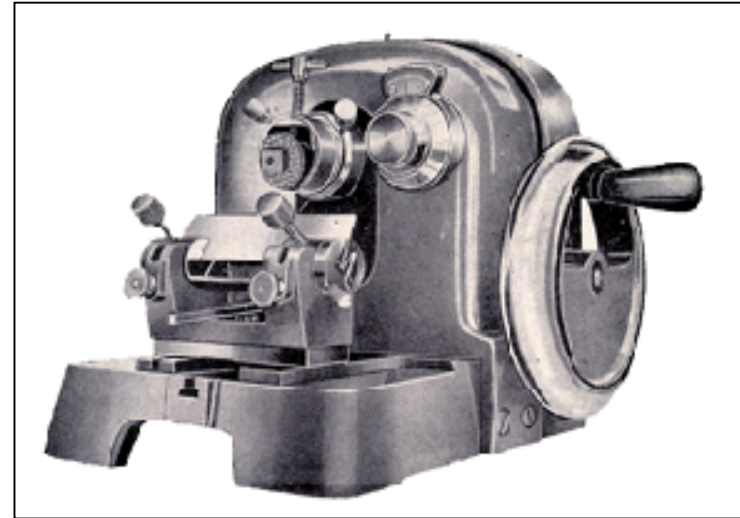


KRÁJENÍ

- Mikrotom – regulace tloušťky řezů: 5 – 10 μm je optimum



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



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



Sáňový mikrotom



Rotační mikrotom



kryostat

= rotační mikrotom v mrazicím boxu ($-15-60^{\circ}\text{C}$)
zmrzlou tkáň lze krájet bez zalévání

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).



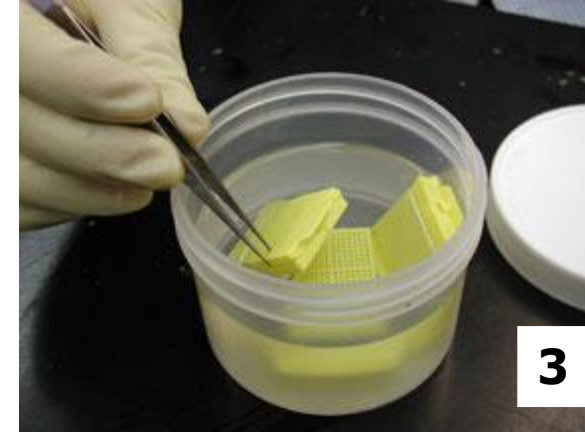
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv
Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylénem.



1



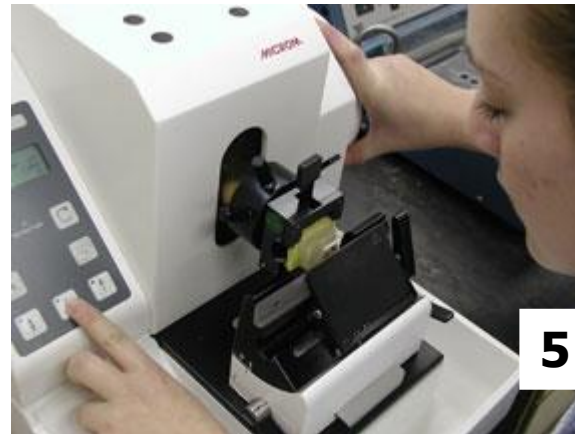
2



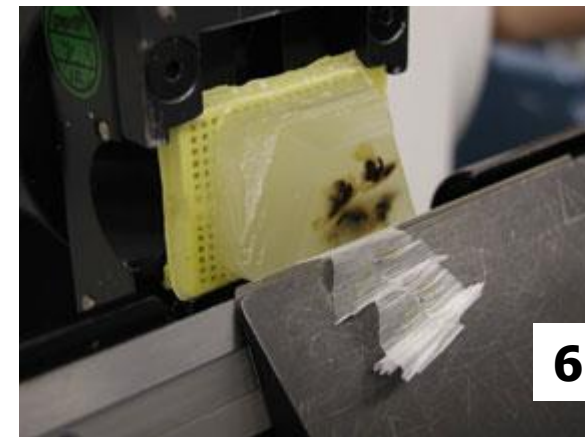
3



4



5



6



7



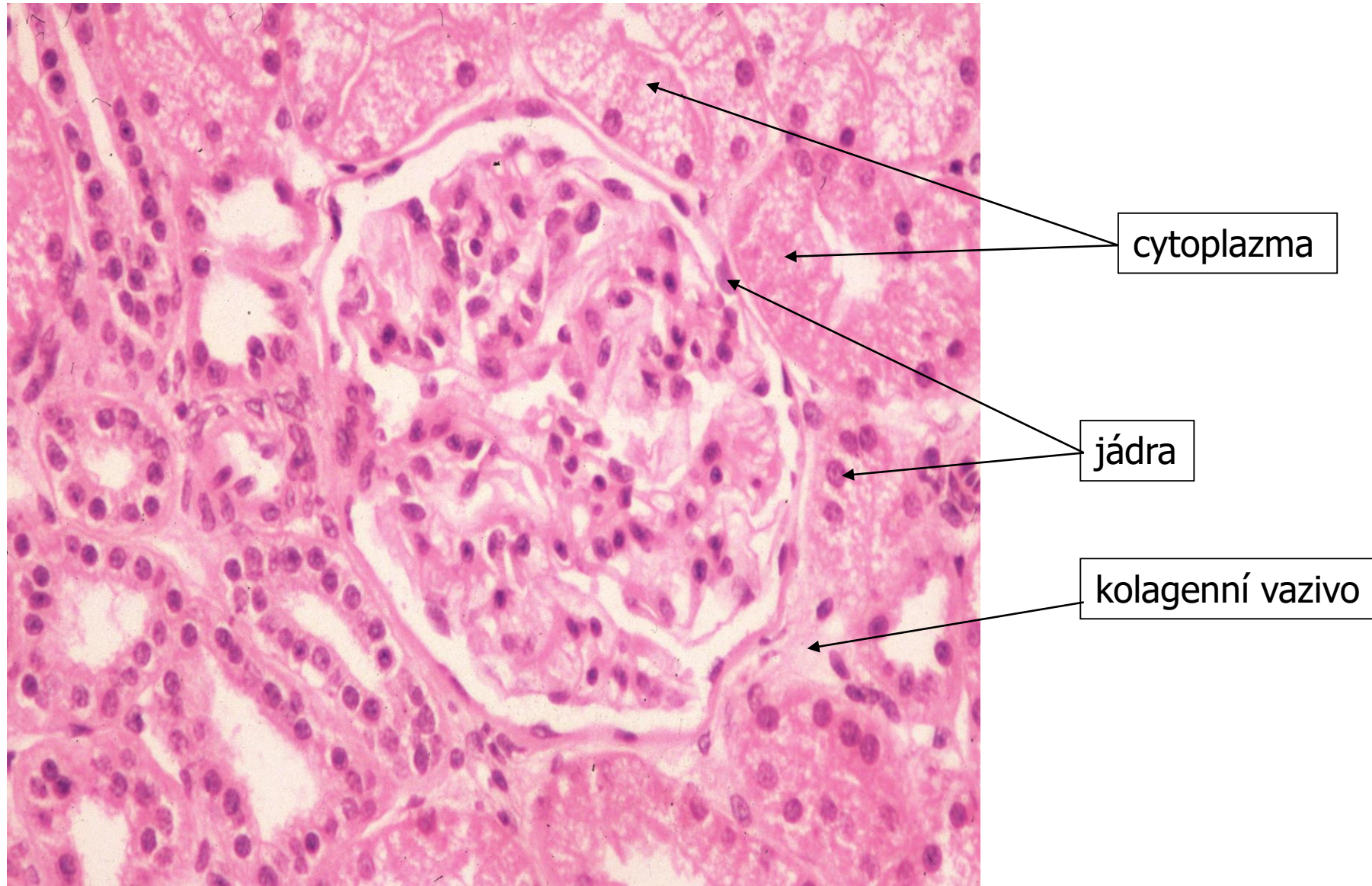
8

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

BARVENÍ

- zviditelnění struktur v řezu – buňka a její součásti vykazují afinitu k barvivům dvou skupin:
 - 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
- chromofilní /chromatofilní/ x chromofobní
- polychromatofilní – afinita k oběma druhům barviv

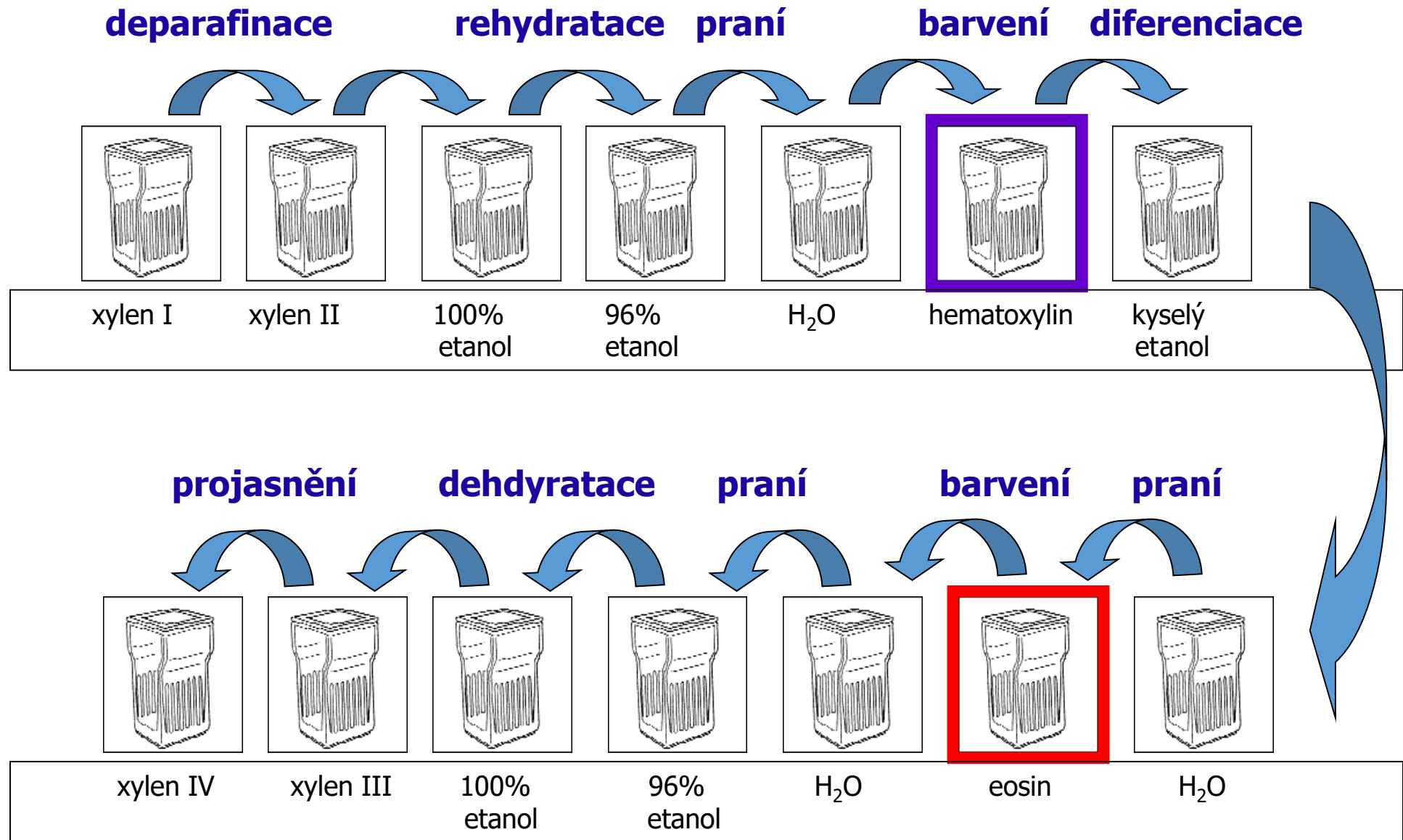
Hematoxylin a eosin (HE)



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

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

HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)



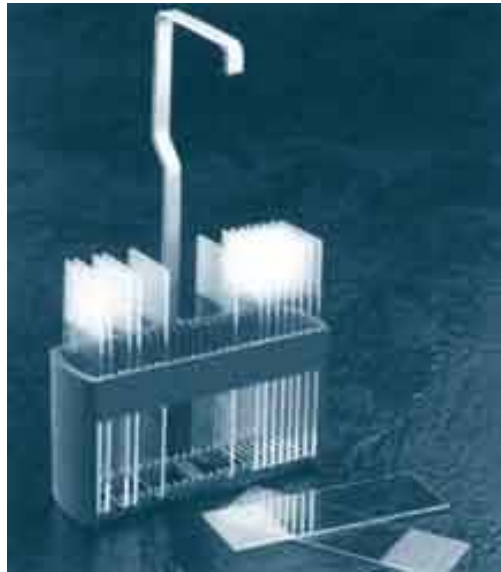
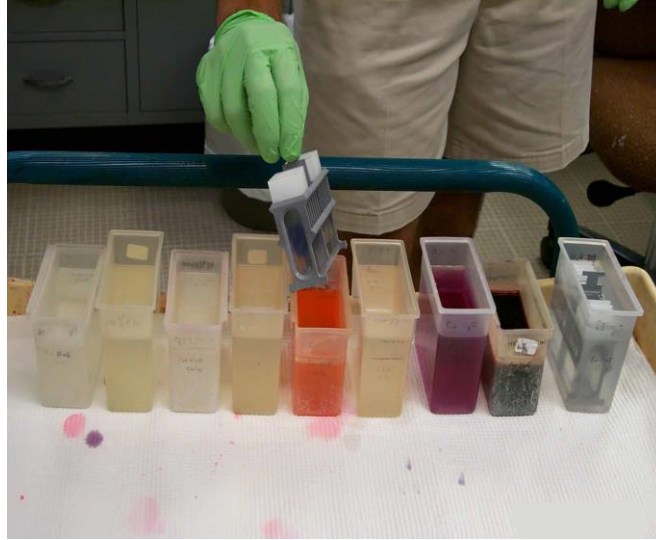
RUTINNÍ BARVENÍ: HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)

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







řada boxů (kyvet) s barvicími médii

≈

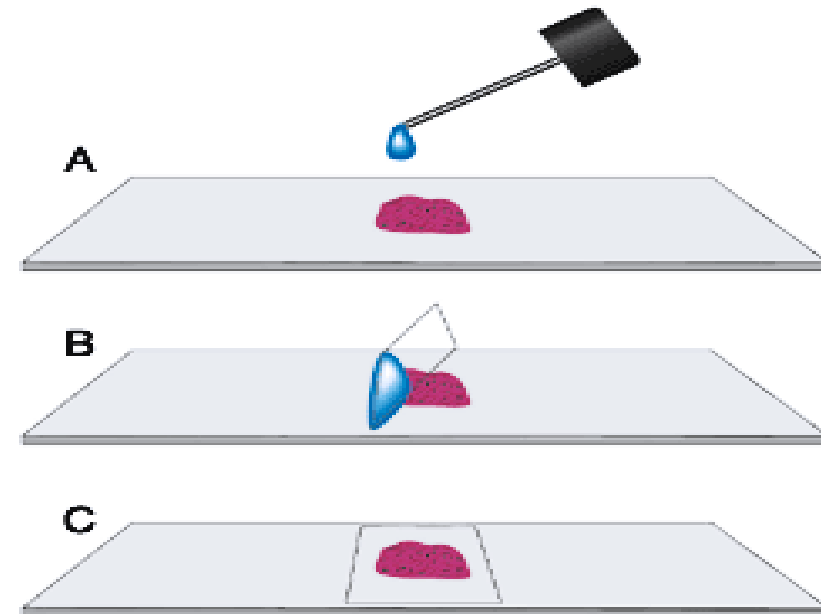
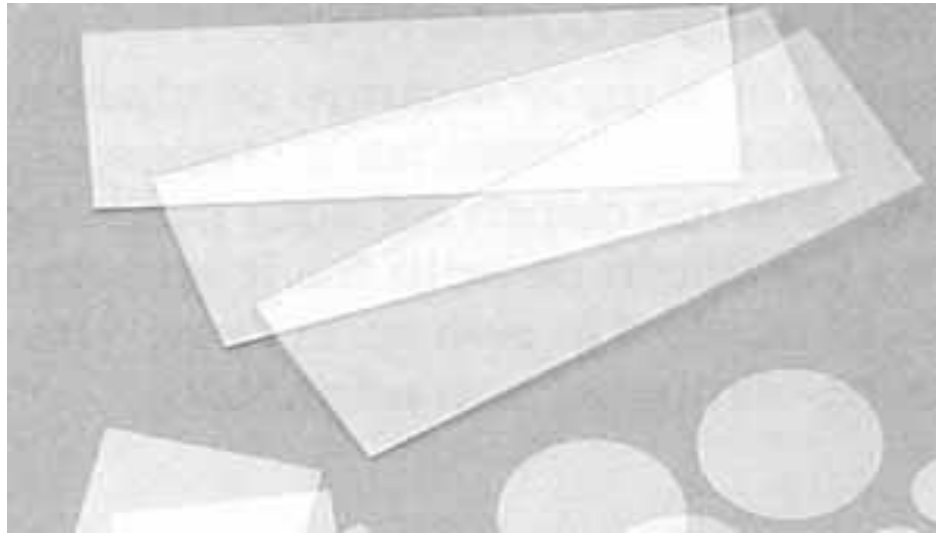


- **Leica ST 4040** Lineární barvicí automat - velkokapacitní barvení vzorků jedním programem (např. H&E až 1000 skel).



MONTOVÁNÍ

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



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



trvalé histologické preparáty ke studiu v SM

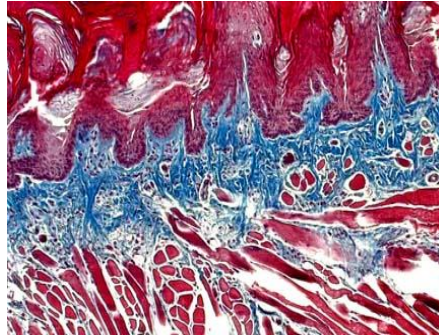
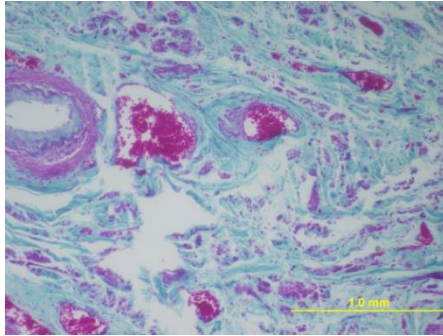
TYPY BARVENÍ

- rutinní, přehledná – HE, AZAN (demonstrují všechny zákl. složky)
- speciální – vizualizace vybraných struktur
 - Massonovy trichromy: žlutý - HEŠ, modrý - AZAN, zelený trichrom (kolag.vlákná)
 - orcein, aldehydový fuchsin (elast.vlákná) aj.
- impregnační – AgNO₃ (nervová nebo retikulární vlákna)

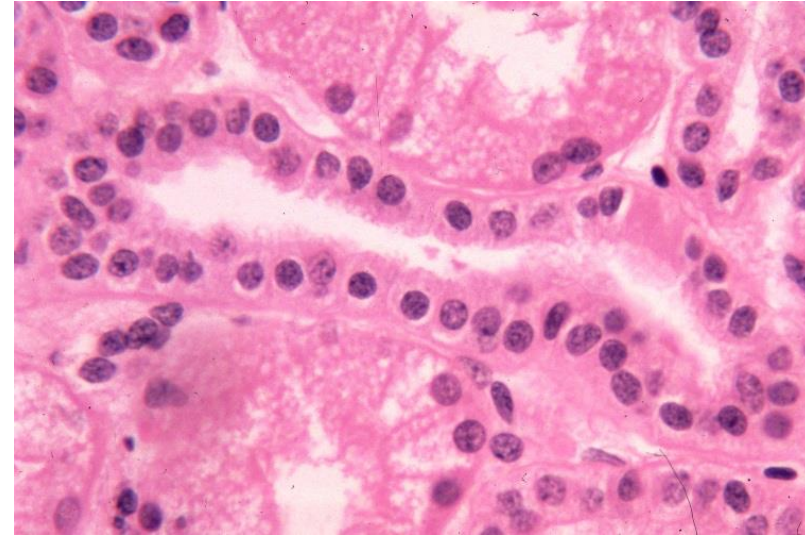
Barvicí metody:

přehledné – HE, AZAN

demonstrují všechny složky tkání

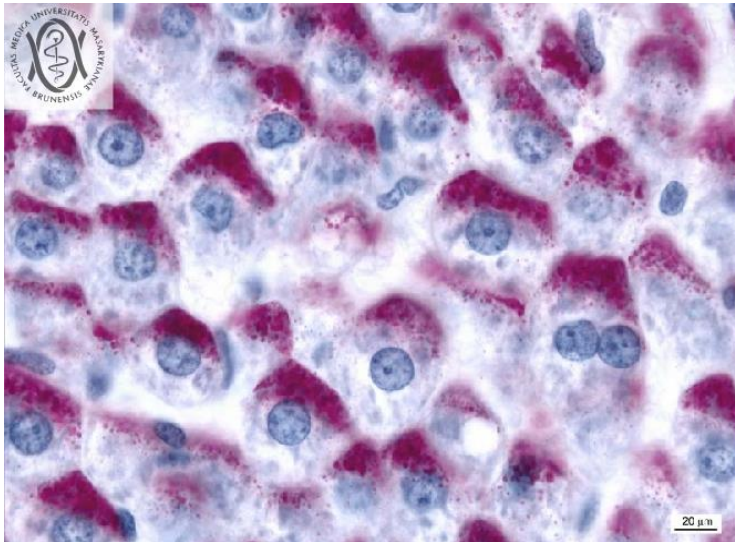


HE – nejpoužívanější barvení

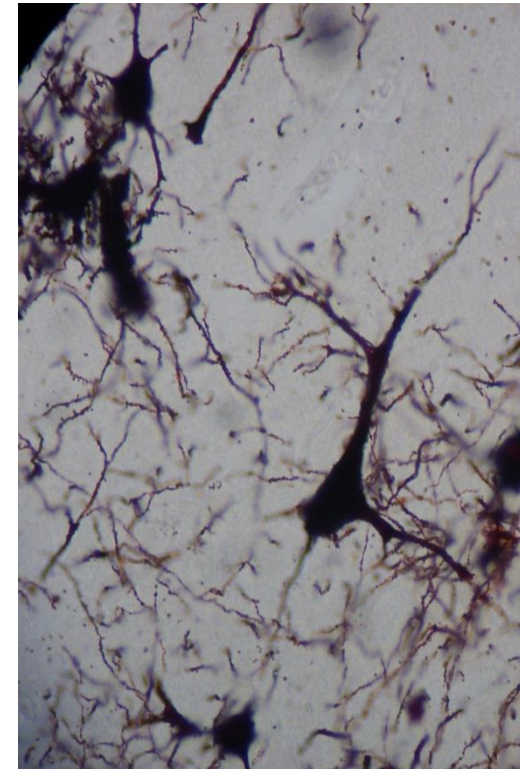


speciální

zdůrazňují určité buněčné nebo tkáňové složky



mpregnační
oli 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

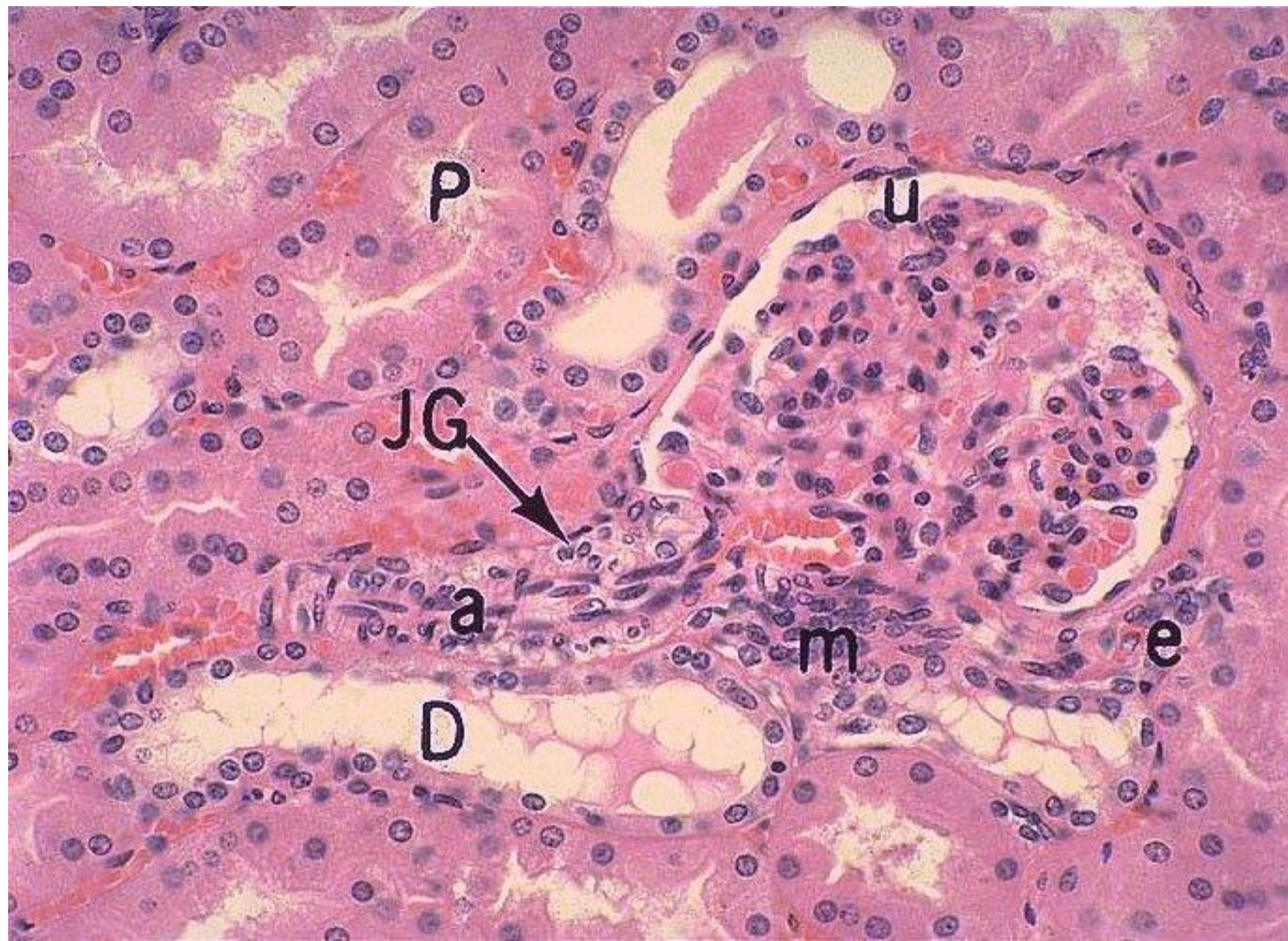
AZAN = *AZokarmín – Anilinová modř – oranž G*

jádra – červená

erytrocyty – oranžové

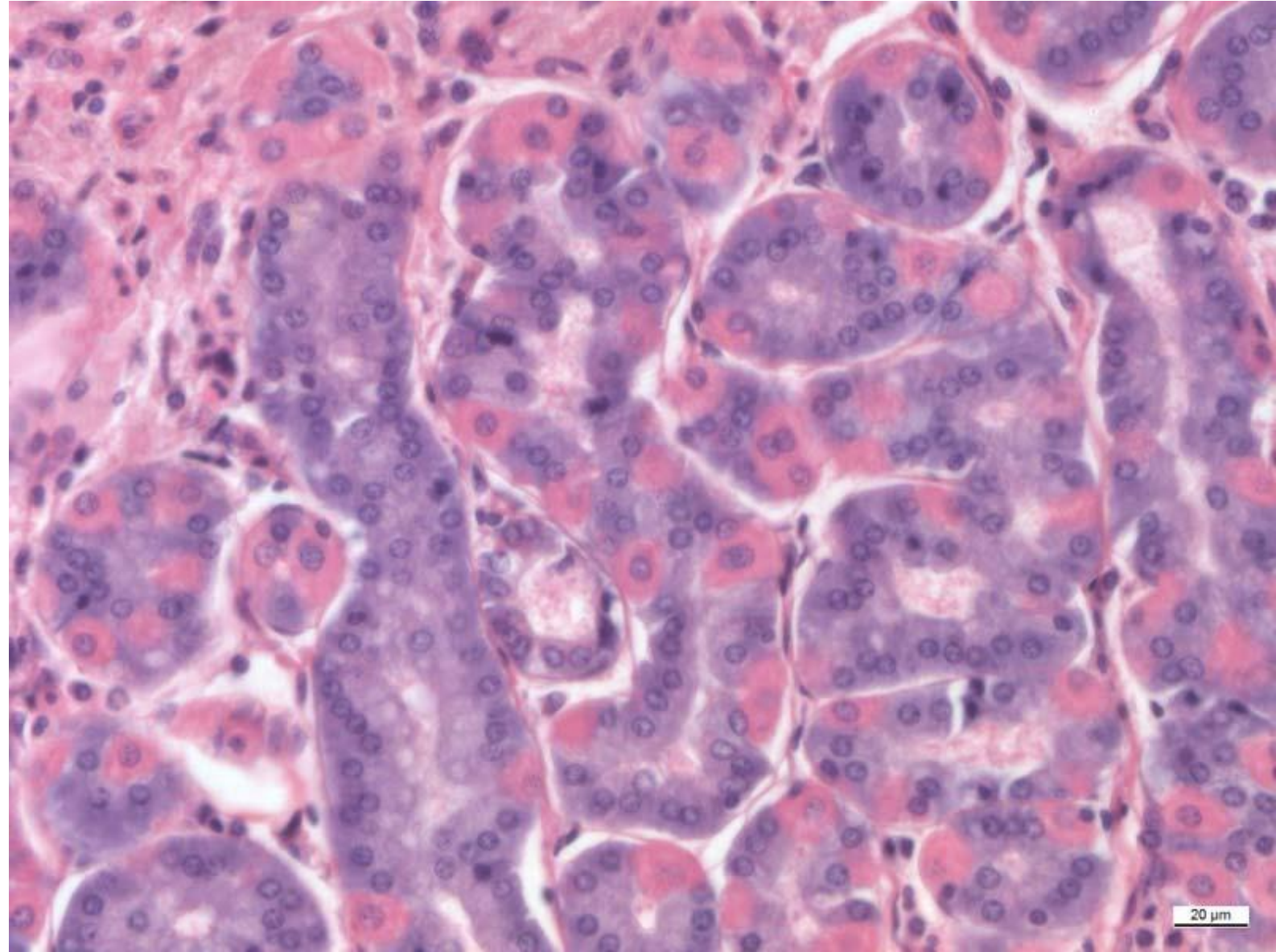
svalová tkáň – červená

kolagenní vlákna – modrá



Hematoxylin a eosin (HE)

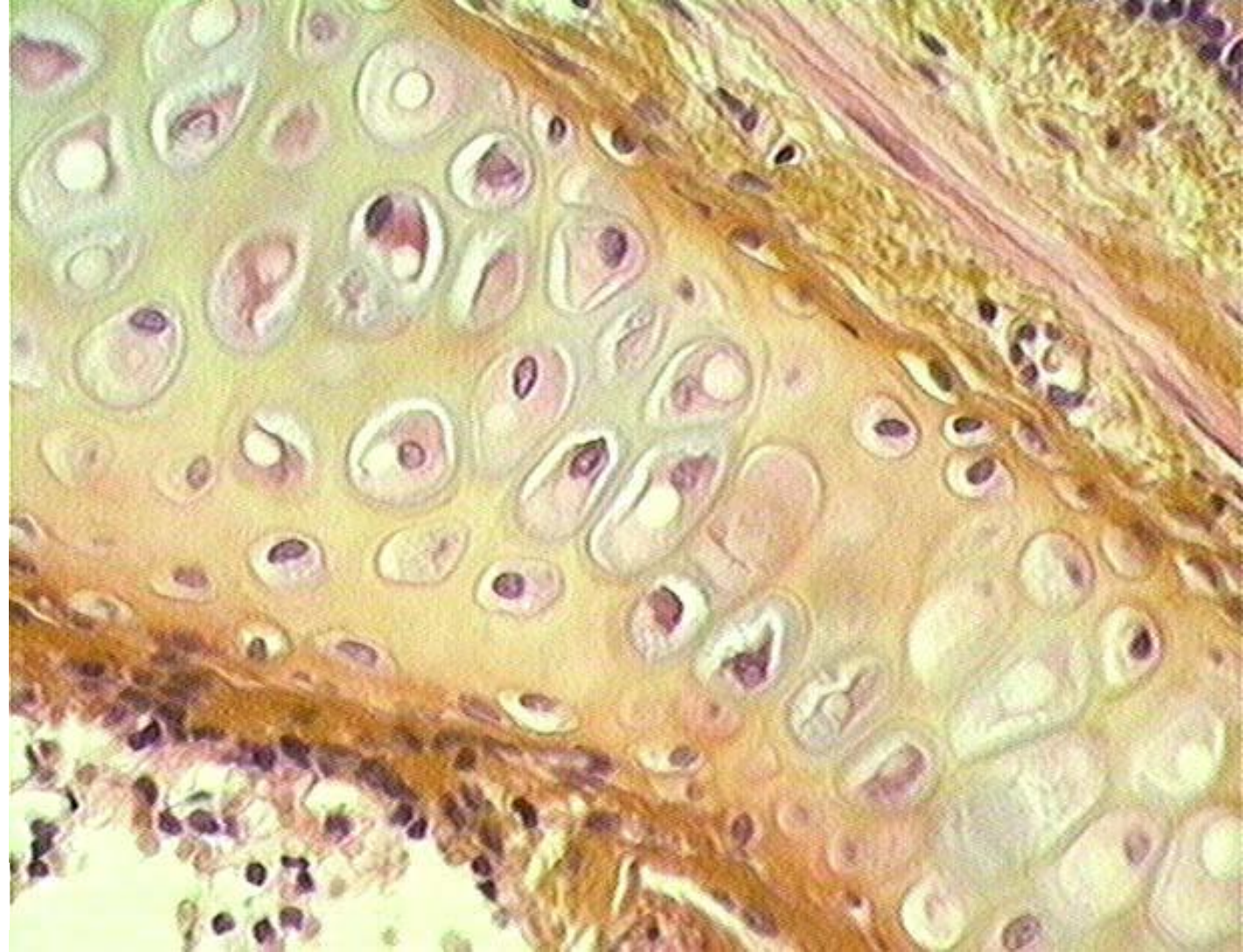
basofilní x acidofilní cytoplazma



fundus ventriculi

20 µm

Hematoxylin, eosin a šafrán (HEŠ)

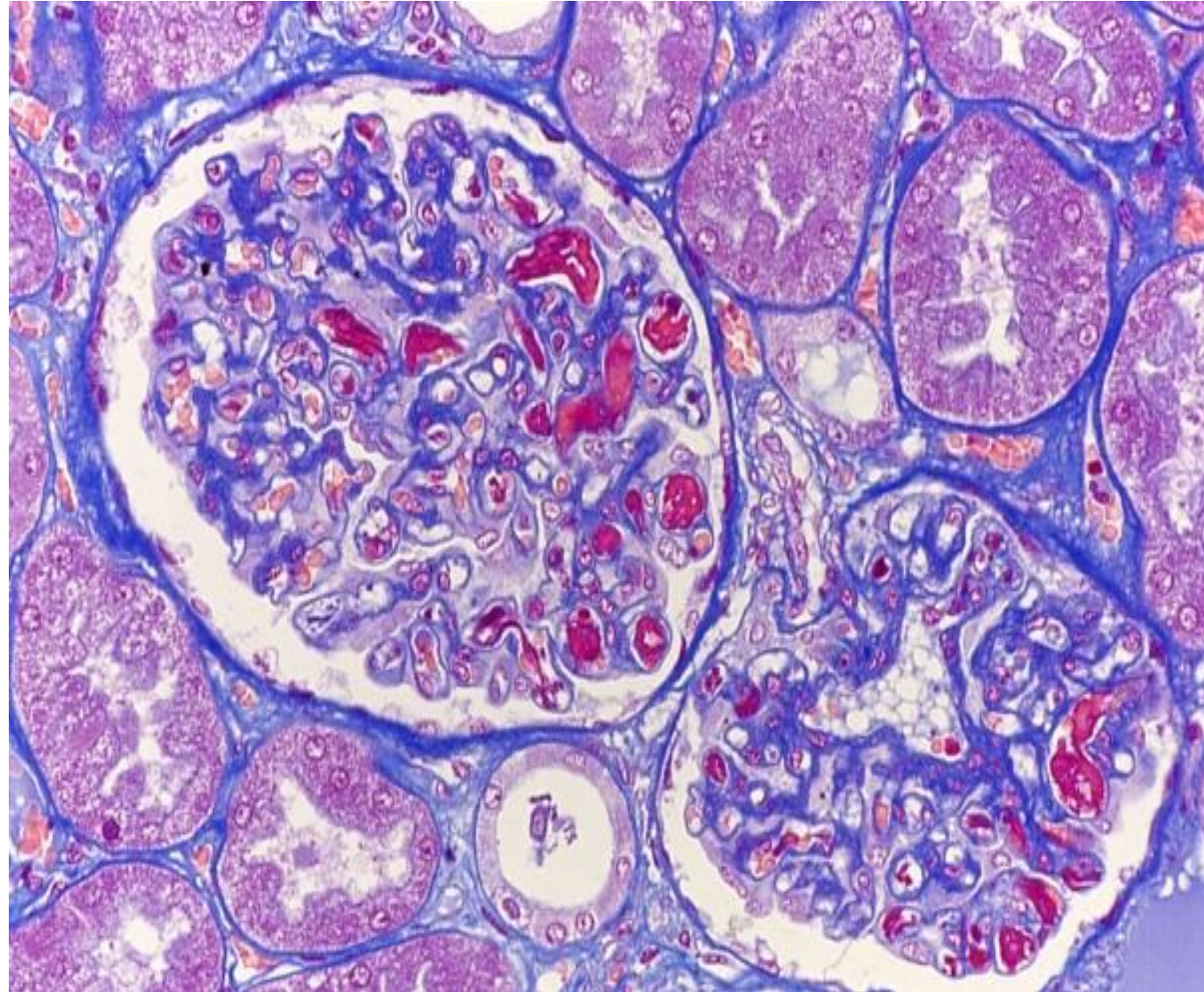


chrupavka
kolagenní vlákna žlutá

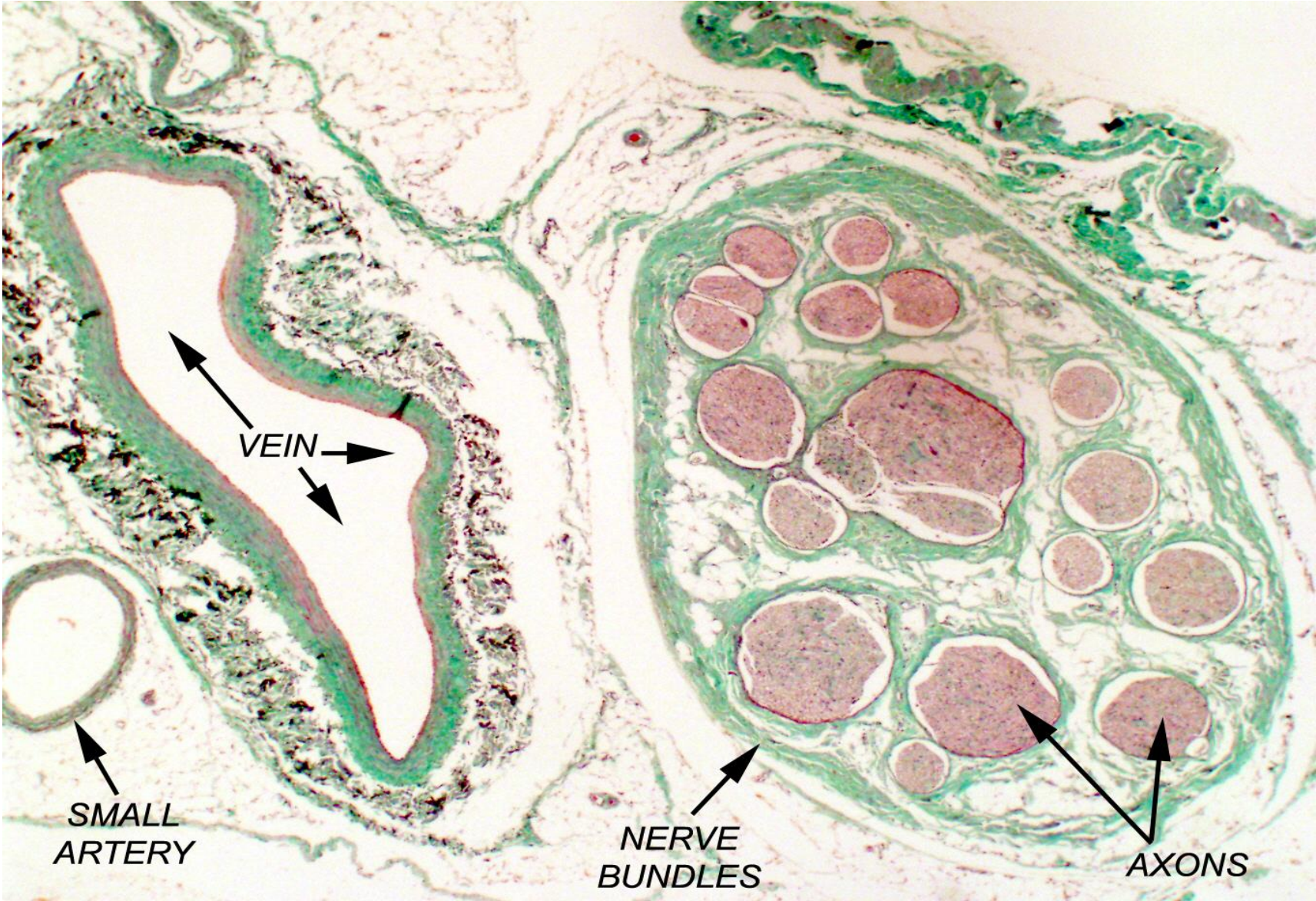
Azokarmín, anilinová modř, oranž G (AZAN)

ren

kolagenní vlákna modrá

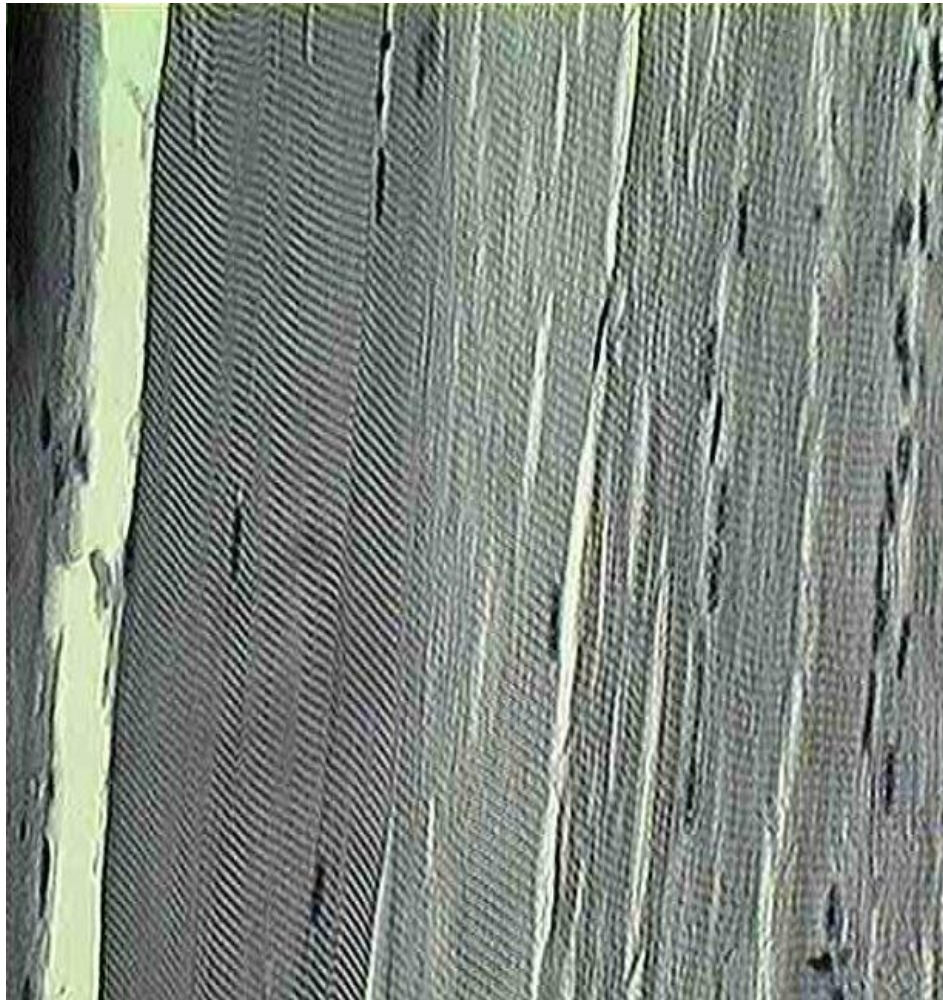


Zelený trichrom

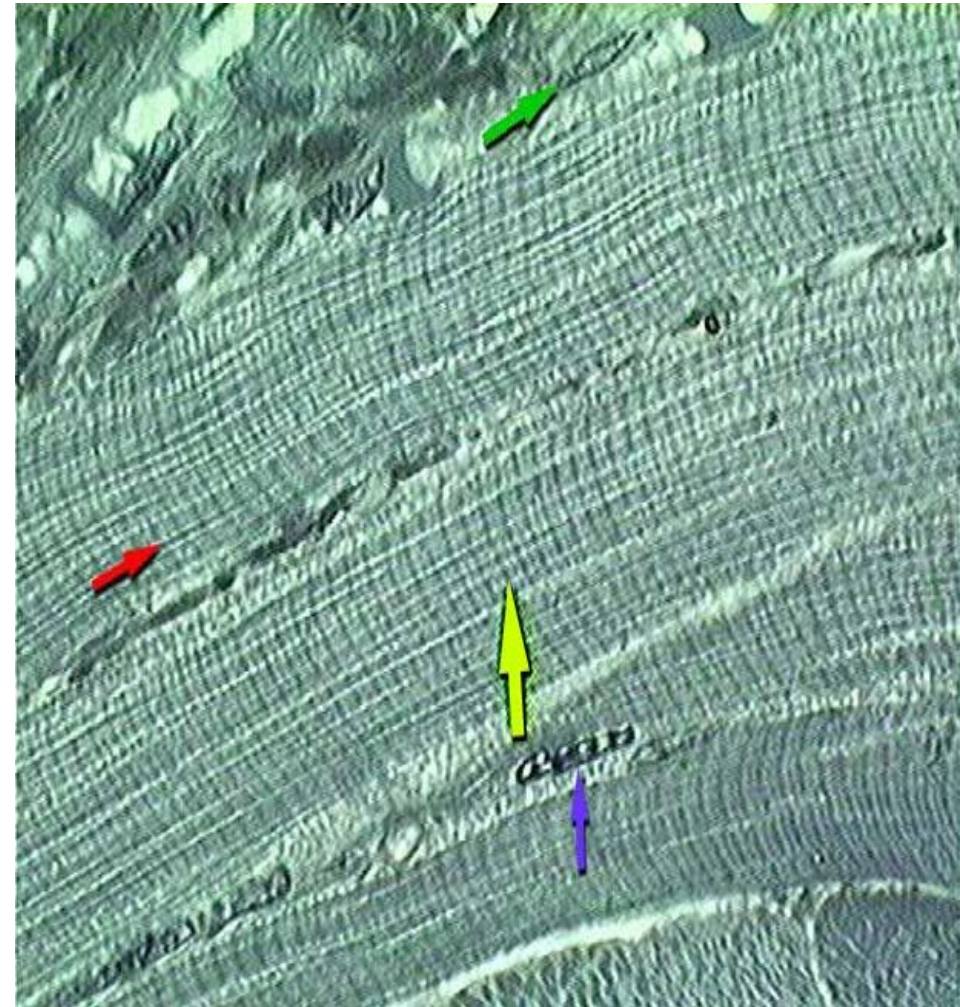


kolagenní vlákna zelená

Cytologická barvení – podle Heidenhaina



kosterní svalová tkáň

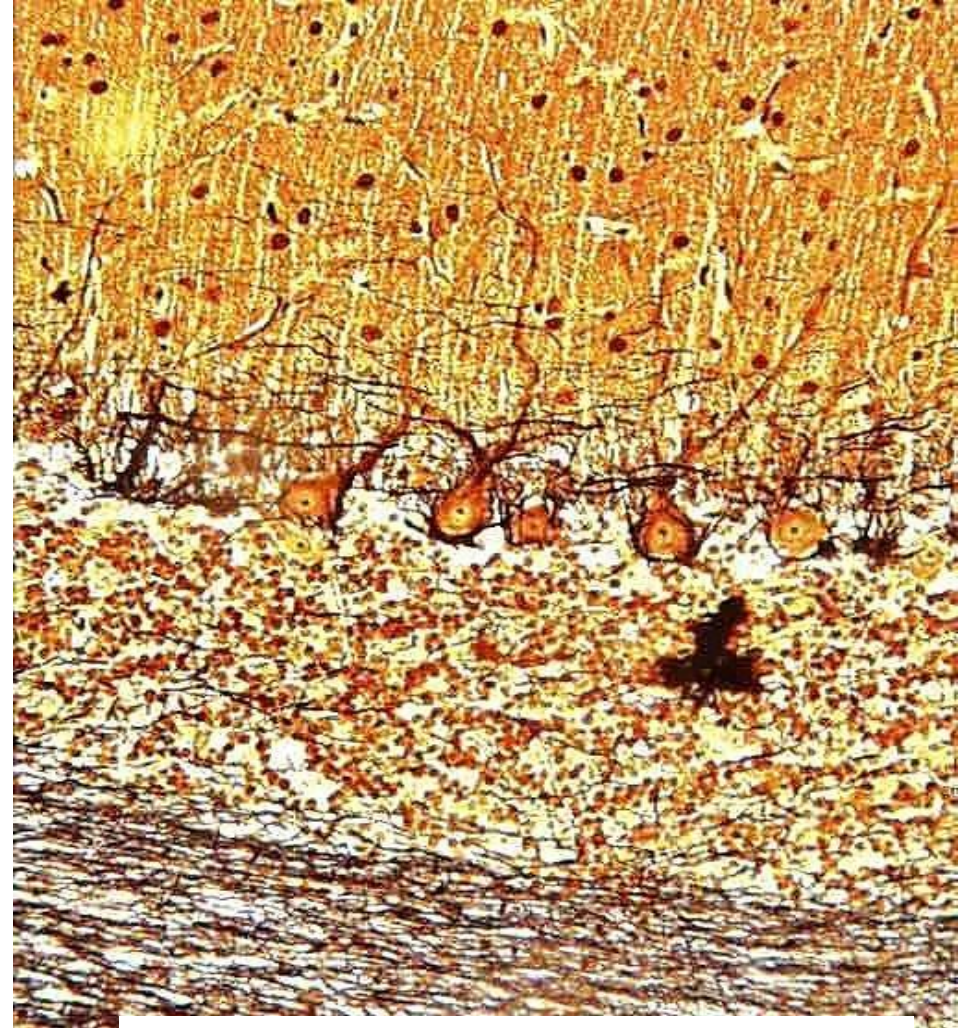


železitý hematoxylin

Impregnace „stříbrem“



slezina – retikulární vlákna



cerebellum – nervová vlákna

Zpracování tvrdých tkání (zub, kost)

- dekalifikace (odvápňování) – převedení nerozpustných vápenatých solí do roztoku pomocí kys. mravenčí nebo chelatonu (EDTA), časově náročné – dny až týdny
- výbrusy – tenké ploténky (50 – 70 μm) zhotovené postupným zbrušováním materiálu

HISTOCHEMIE & IMUNOHISTOCHEMIE

- Význam:

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-Ab* komplexů nebo Ag-Ab + Ab* (sekundární značená Ab)

- * - marker

1. fluorochromy – rhodamin, Texas red, FITC

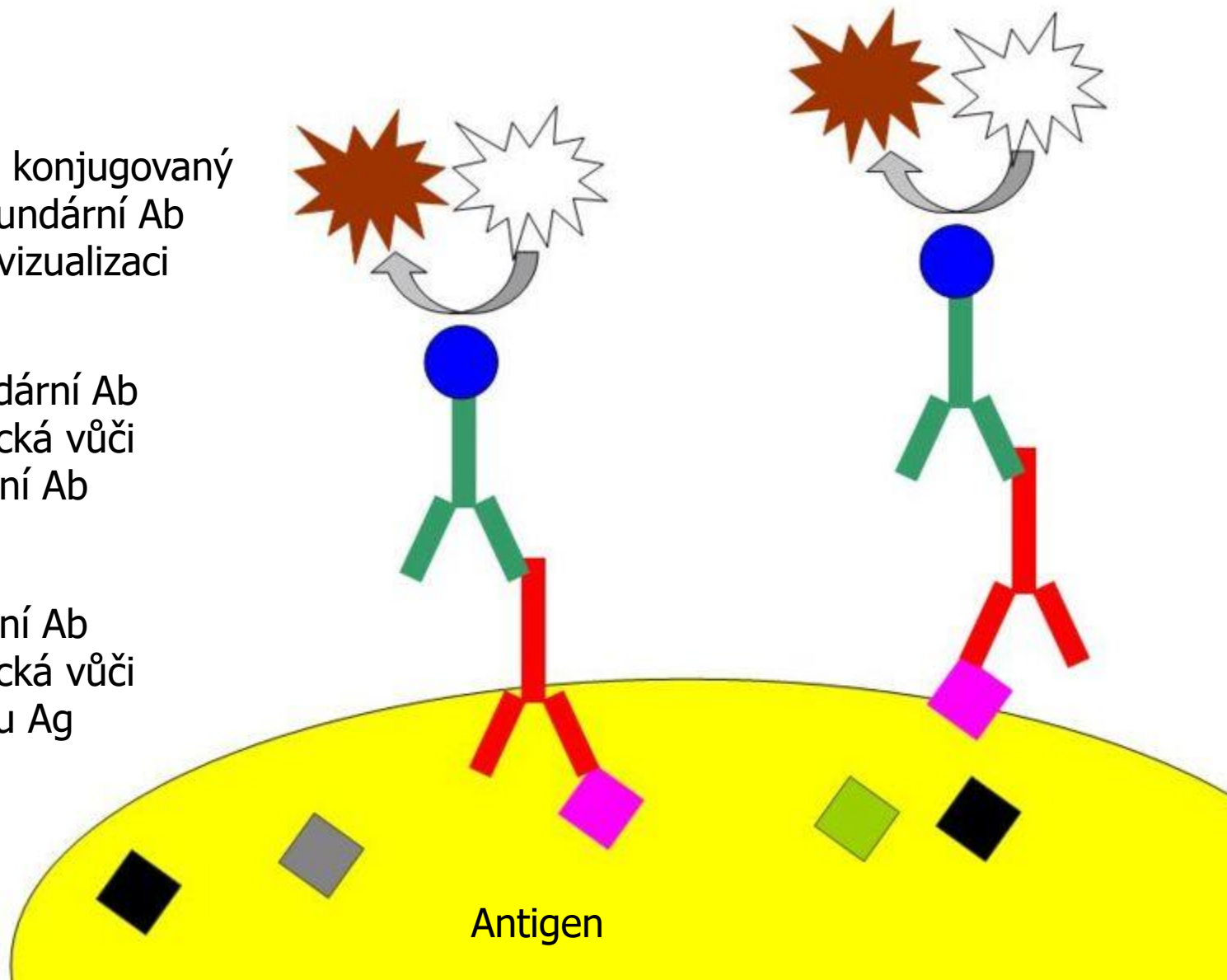
2. enzymy – křenová peroxidáza, AF, acetylcholinesteráza,

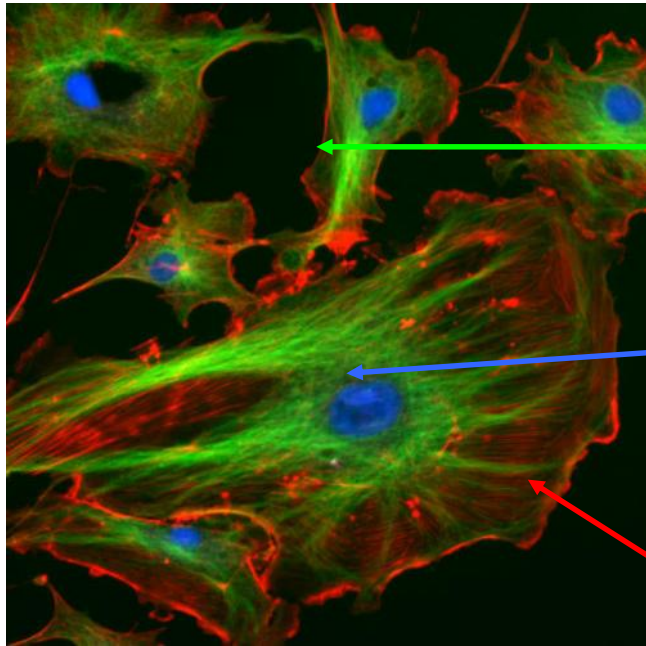
3. radioizotopy (I^{125})

Enzym konjugovaný
se sekundární Ab
zajistí vizualizaci

Sekundární Ab
specifická vůči
primární Ab

Primární Ab
specifická vůči
epitopu Ag

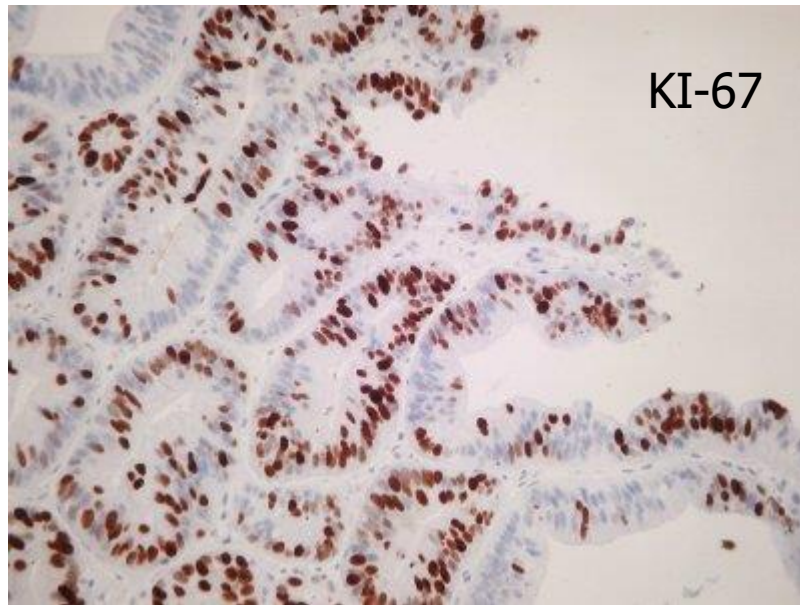
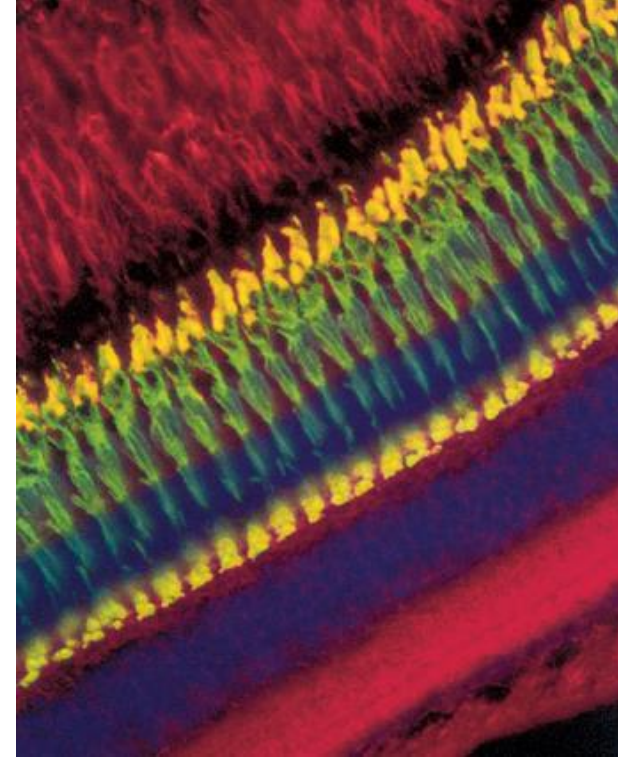




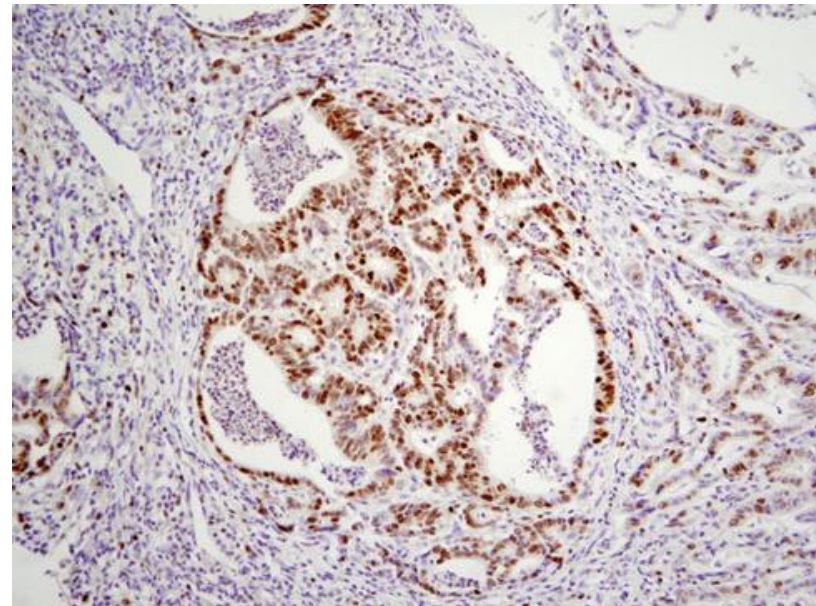
Aktin (cytoskelet)

DAPI (jádno)

Mikrotubuly (cytoskelet)



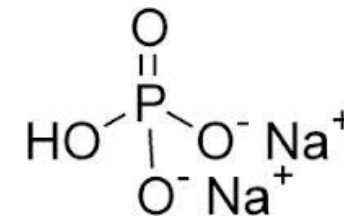
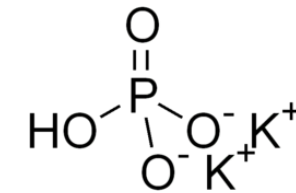
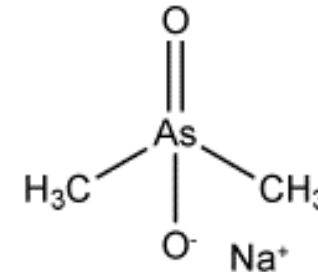
KI-67



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 tkáň (minimum artefaktů)



POSTUP

- **ODBĚR** – okamžitá fixace, velikost tkáňového bločku do 1 mm³
- **FIXACE** – glutaraldehyd (vazba aminoskupin) + OsO₄ (vazba lipidů) – dvojitá fixace
- **PRANÍ** – destilovaná voda
- **DEHYDRATAČE** - alkohol
- **ZALÉVÁNÍ** – vzorky se vkládají do želatinových kapslí nebo forem z plastu vyplněných zalévacím médiem (polymerizace – změna skupenství). Používají se epoxidové pryskyřice (Epon, Durcupan, Araldite) – ve vodě nerozpustná media

Zalévací komůrky:



1



2

želatinové (1), plastové (2)

nosiče (držáky) kapslí (3)

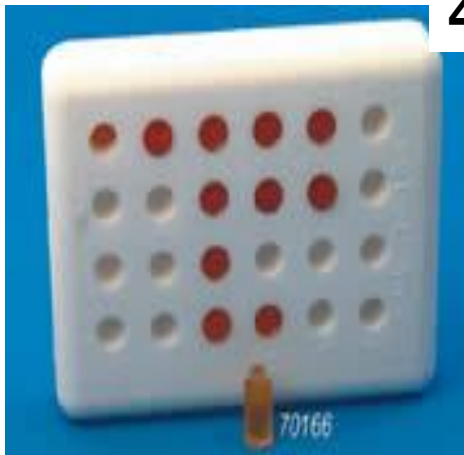
ploténky s komůrkami
(4, 5)



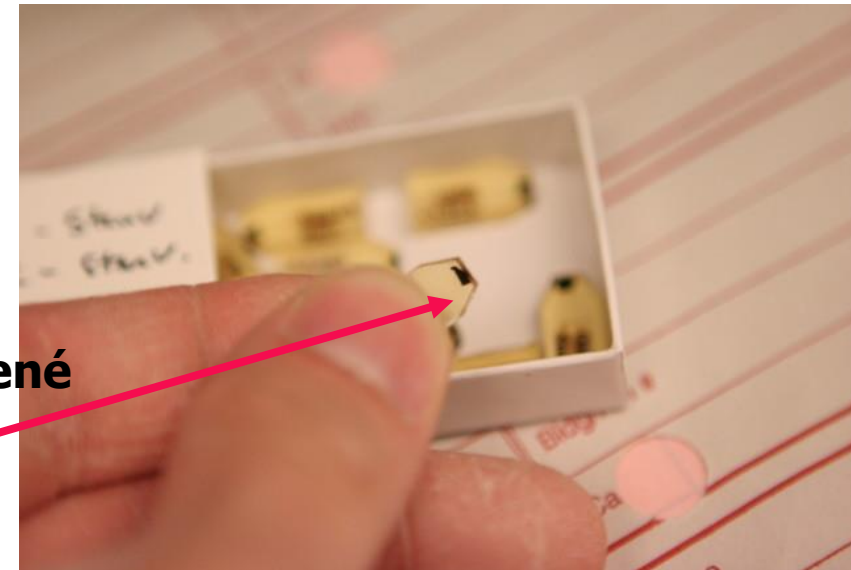
3



4,5



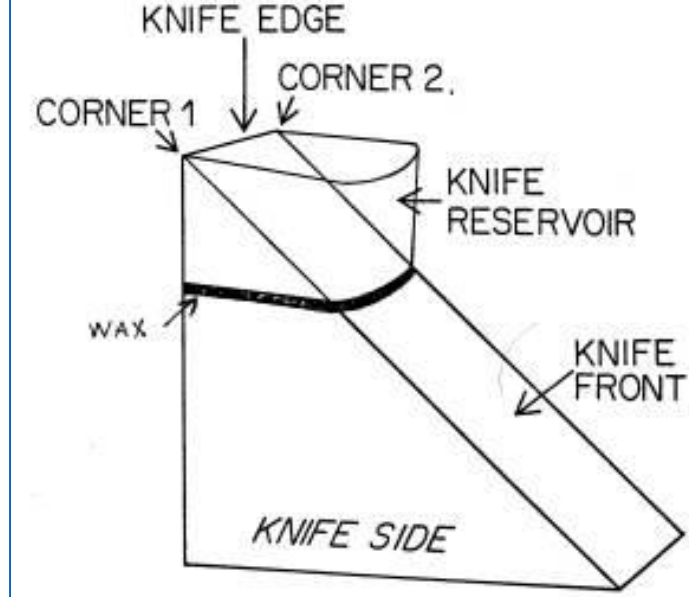
bločky připravené
pro krájení



KRÁJENÍ

- po odstranění přebytku media (trimming) a vytvoření pyramidy se z malé plošky (0.1 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 sítky (Cu)

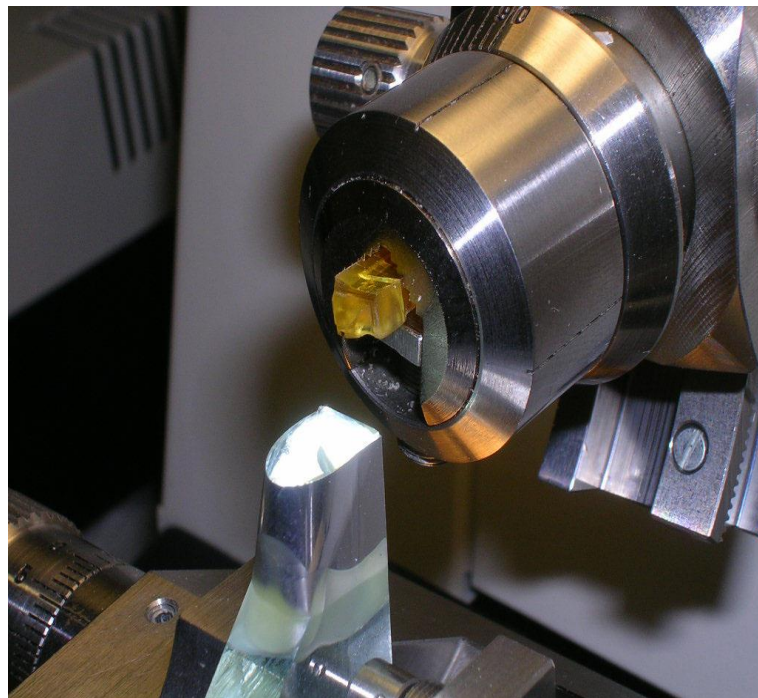




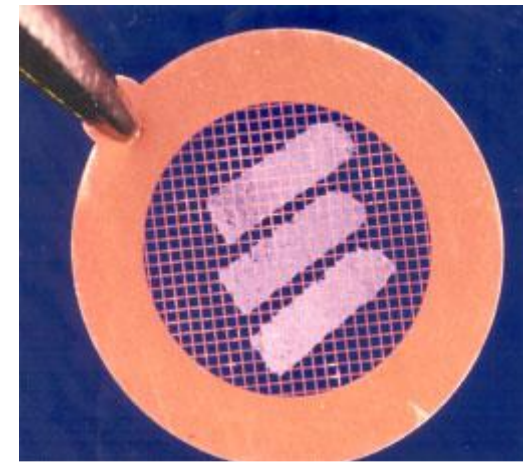
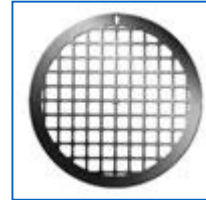
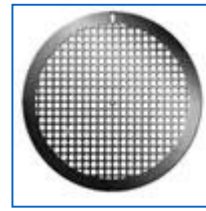
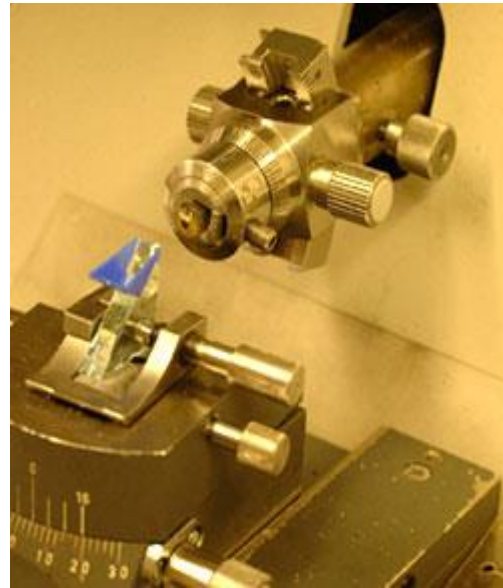
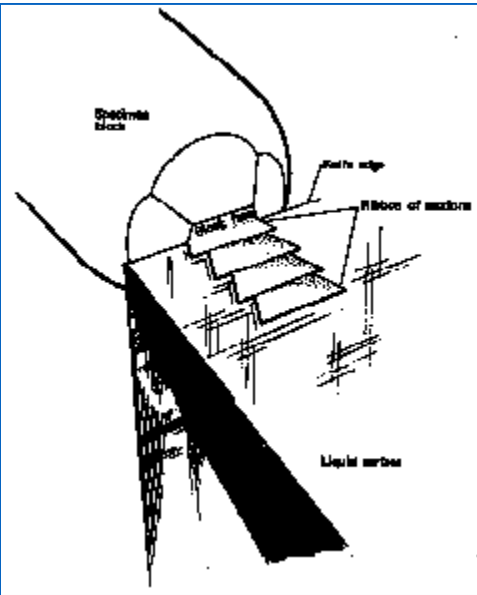
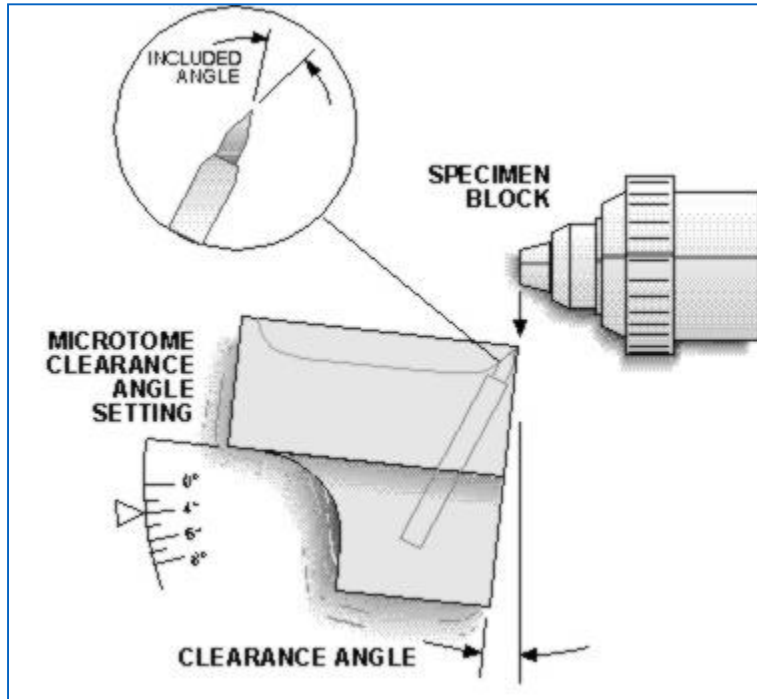
Ultramikrotomové nože:

skleněný

diamantový

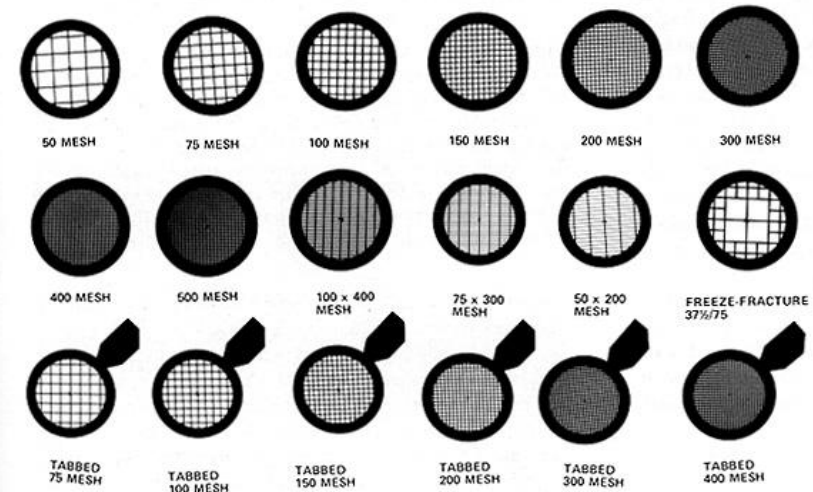


Krájení, nosné sítě



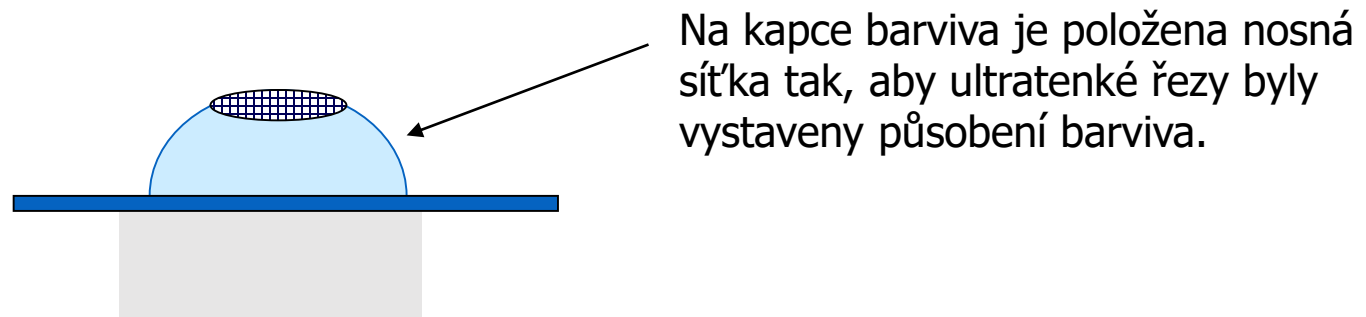
Sítka se 3 páskami řezů

typy sítěk



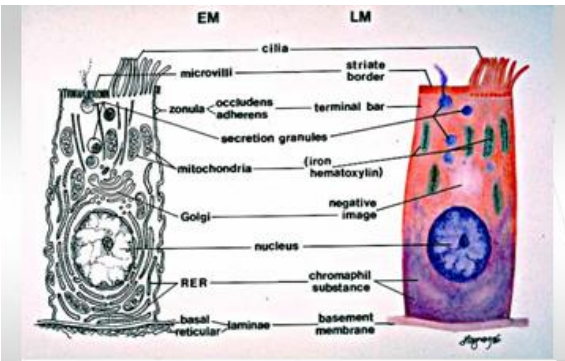
KONTRASTOVÁNÍ

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



Rozdíly mezi SM a EM

	SM	EM
Odběr	< 1 cm ³ minuty	< 1 mm ³ 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 (hematoxylin – eosin)	těžké kovy (uranylacetat, citrát Pb)
Montování	+	–
Výsledek	histologický preparát	foto z fluoresc. stínítka - elektronogram



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

