

Histologie a embryologie

praktické cvičení

Program 1. praktika

- **obecné informace**

(organizace výuky)

- **histologie a embryologie**

(co je předmětem studia)

- **zpracování tkání**

(laboratorní metody)

- **demonstrace histologických preparátů**

(barvení různými metodami)

Organizace praktik

- Začátek - přesně
- Přezouvání
vstup do mikroskopického sálu i do seminární místnosti pouze v přezůvkách nebo návlecích
- Šatna – odložit svršky a zavazadla (zajistit doklady, cennosti, mobil - ztráty a nálezy – info u dr. Daňkové)
- Mobil – vypnutý nebo v tichém režimu
- mikroskopický sál = laboratoř
– zákaz konzumace jídla a nápojů v šatně a v sále,
– zákaz kouření na celé LF
- BOZP
- Pracovní místo zůstává stálé během semestru! Student je osobně a hmotně odpovědný za poskytnuté pomůcky

- Průběh praktika
 - úvod – výklad + demonstrace
 - vlastní práce
- Samostatná práce studenta – studium preparátů ve světelném mikroskopu a fotografií v atlasu EM; jejich kreslení a popis = **vyhotovení protokolu**; protokol je na konci praktika zkontrolován.
- Student, který zjevně práci odbyl a tedy nebude mít vyučujícím podepsaný protokol, musí dané praktikum nahradit
- Student musí být připraven na dané praktikum
- Rozvrh a sylaby (programy) přednášek a praktických cvičení – viz nástěnka a webové stránky ústavu
- Pomůcky (vlastní)
 - sešit nebo volné papíry – formát A4, bez linek, dle šablony
 - měkká tužka, pastelky
- Přestávka – 10 minut
- Konec praktika – vyhlásí vedoucí cvičení

Protokol č. Jméno:

Datum: Ročník: Skupina:

TÉMA:

Seznam preparátů ke studiu:

Číslo název (barvení)

.....

Atlas EM: doporučené obrázky ke studiu

str. název elektronogramu

.....

Pokyny pro vypracování protokolu

1. Student vyhotoví barevné nákresy histologických preparátů (pastelky) nebo černobílé nákresy obrázku z atlasu elektronogramů (obyčejná tužka).
2. Každý nákres musí být opatřen následujícími údaji:
 - název preparátu s uvedením metody barvení (viz Seznam výše), event. název elektronogramu.
 - zvětšení: 10 x 4 / 10 x 10 / 10 x 20 / 10 x 40 (tj. okulár x objektiv) nebo celk. zv.: 40x / 100x / 200x / 400x
 - popis obrázku.

Kontrola protokolu

Praktické cvičení: řádné náhradní datum:

.....
 podpis učitele

Protokol č. Jméno:

Datum: Ročník: Skupina:

www.med.muni.cz/histology

Zápočet

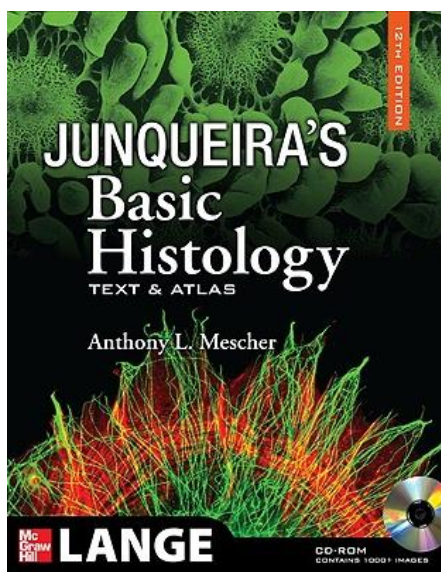
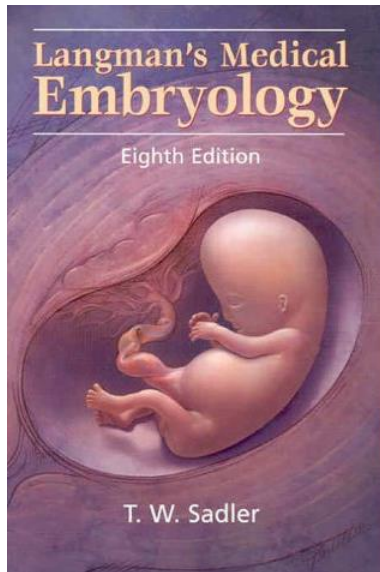
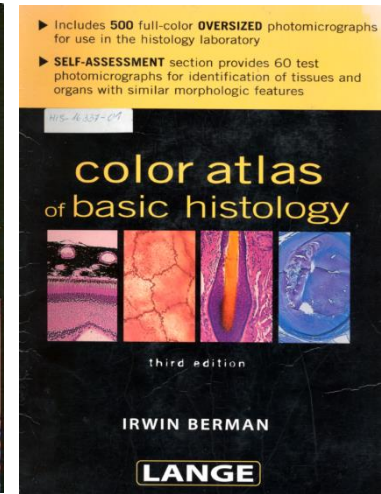
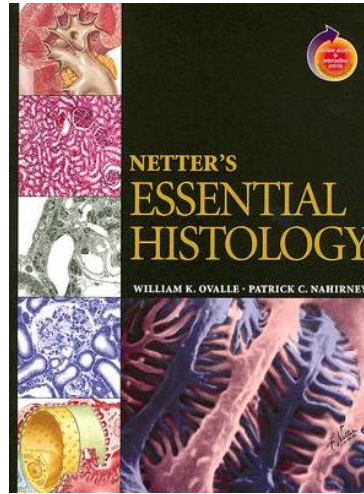
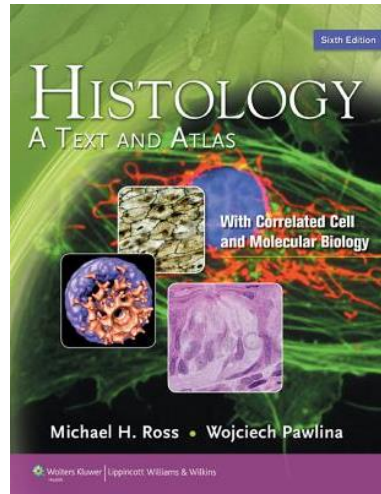
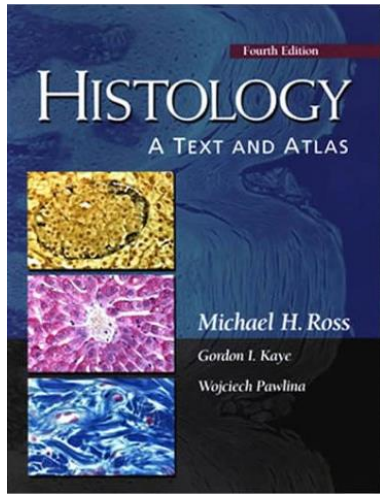
- 100% účast v praktických cvičeních; max. 30% nahrazených absencí
- Každý student je vyzkoušen **4x** za semestr
- Zkouší se písemně (**test**) zejména znalost základních struktury a jejich odborné (latinské) názvy na základě připravených obrázků
- Pro získání zápočtu je nutné splnit všechny testy
- V případě neúspěchu je možná jedna oprava (**opravný test**), poté následuje ve stejném zkouškovém období opravný **zápočtový test** (dle SZŘ) pokrývající celý semestr
- Obrázky jsou přístupné v MedAtlasu nebo studijních materiálech praktik
- V případě neúspěchu u zápočtového testu, nebude zápočet udělen. Omluvenky z termínu opravného testu pouze cestou IS.

Nahrazování praktik

- *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
- další info:

<http://www.med.muni.cz/histology/vyuka/faq/>

Doporučená literatura



Ústav histologie a embryologie
LF MU

Mikroskopická anatomie
Obecná histologie

...

nebo

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

DOPOI



FACULTY
OF MEDICINE

Guide to General Histology and Microscopic Anatomy

MASARYKOVA UNIVERZITA
Lékařská fakulta

Petr Vaňhara, Miroslava Sedláčková,
Irena Lauschová, Svatopluk Čech, Aleš Hampel

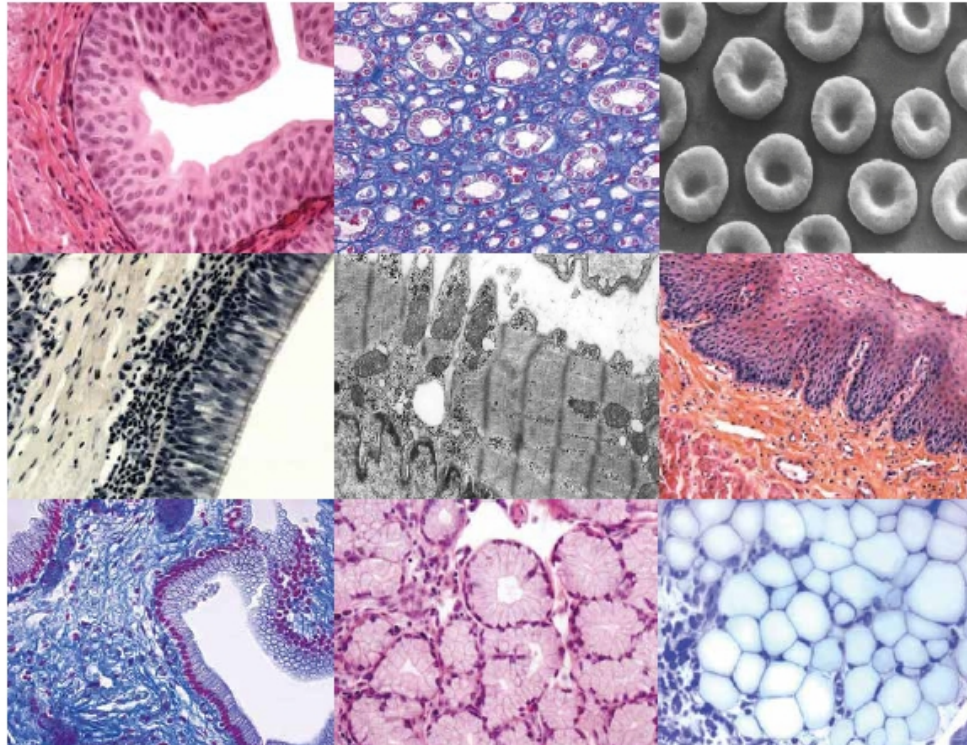
MASARYKOVA UNIVERZITA
Lékařská fakulta

MIKROSKOP ANATOM

Drahomír Horký, Svatopluk

EMBRYOLOGIE DVĚKA

Drahomír Horký, Miroslava Sedláčková



BRNO 2011



BRNO 2011

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, gynekologie, patologie a soudní lékařství, ...

EMBRYOLOGIE

– nauka o prenatálním (intrauterinním) vývoji jedince

- **obecná embryologie** (do konce 2. měsíce – EMBRYO - zárodek)

od gametogeneze po raný embryonální vývoj

- **speciální embryologie** (od 3. měsíce do porodu – FETUS - plod)

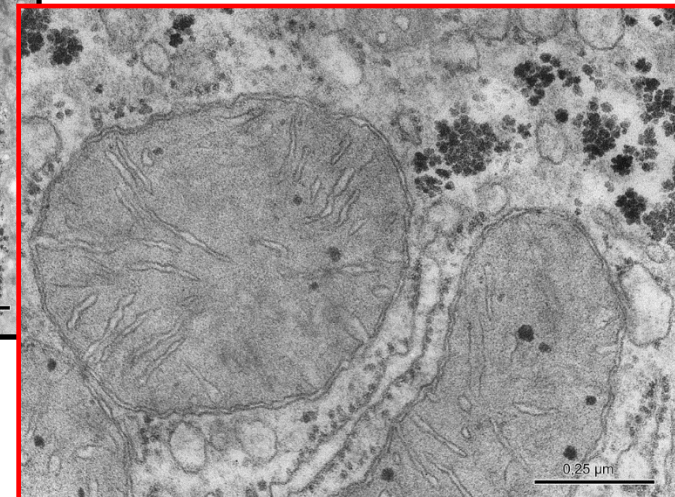
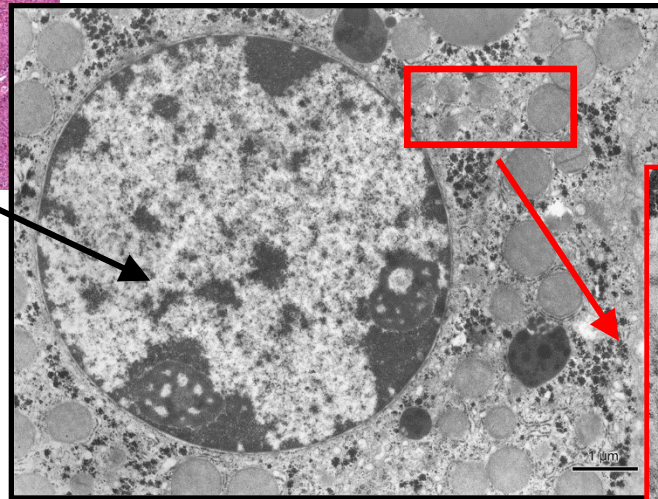
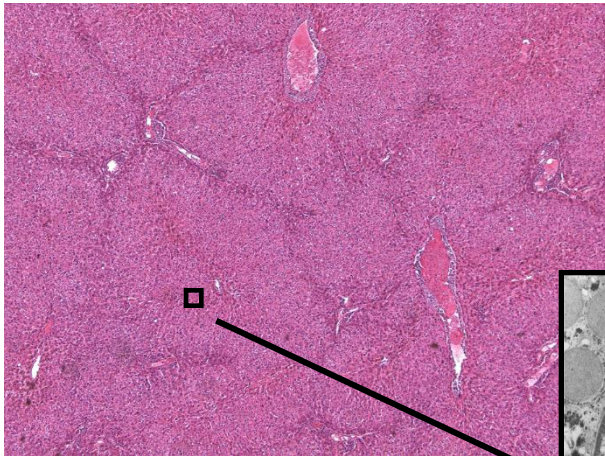
organogeneze (vývoj orgánů v jednotlivých systémech)

- **teratologie** – defektní vývoj orgánů (příčina, důsledek), vrozené vývojové vady (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 pediatrickém lékařství, asistovaná reprodukce

Histologie

- Rozlišovací schopnost oka – $\sim 0,1$ mm
- Rozlišovací schopnost SM – $\sim 0,1 - 0,2$ μm
- Rozlišovací schopnost EM – $\sim 1,5$ 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)

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 **5 – 10 mm³**, 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, sraštění, 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

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

- **anorganická** – ANORGANICKÉ kys. – chromová, osmium tetraoxid (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, paraplant, 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

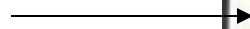
Zalévací komůrky - **papírové**



- **kovové** s orientačními plastovými prstenci

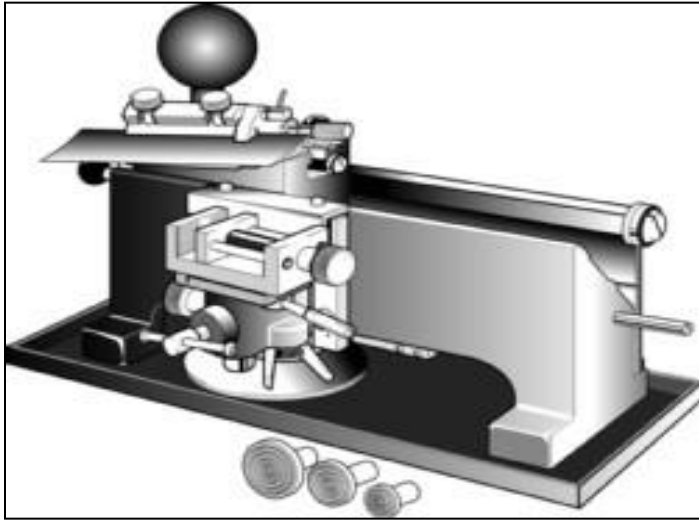


výsledek zalití

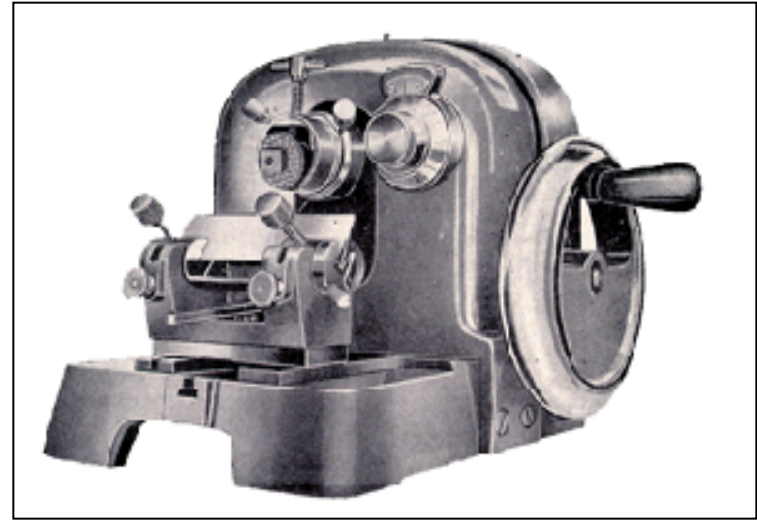


KRÁJENÍ

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

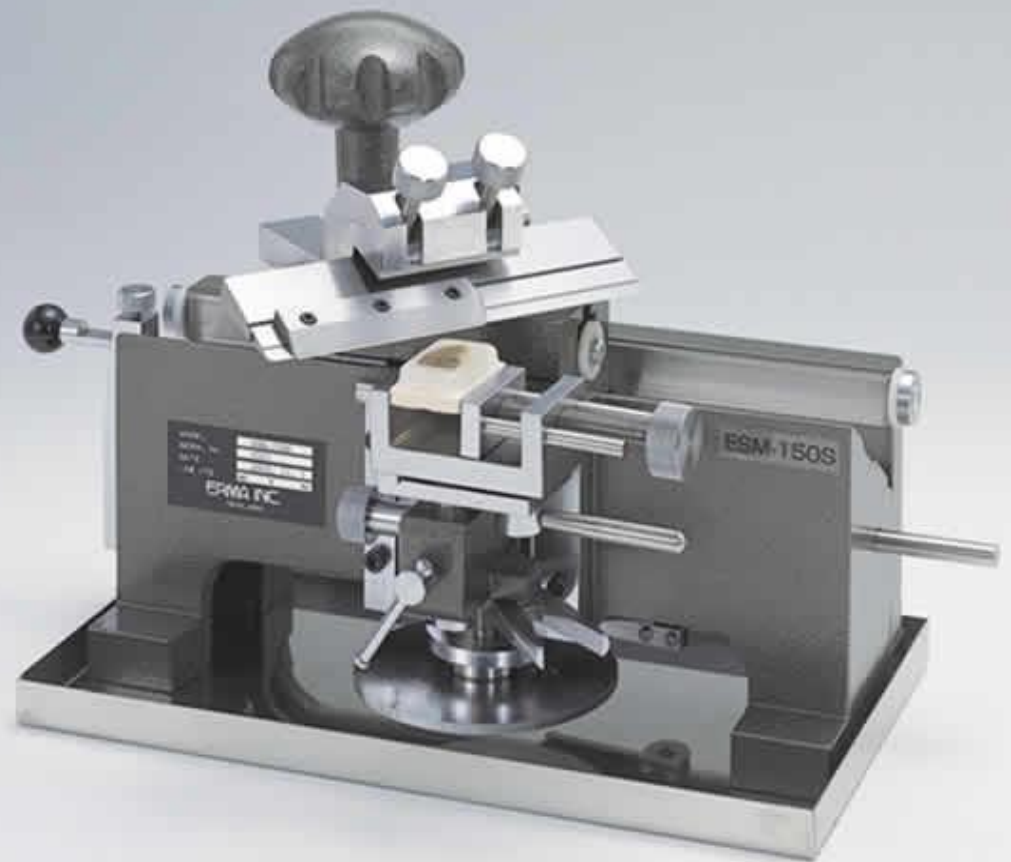


Sáňový mikrotom – blok je upevněný v držáku, nůž nebo břitva se pohybuje horizontálně



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

Sáňový mikrotom



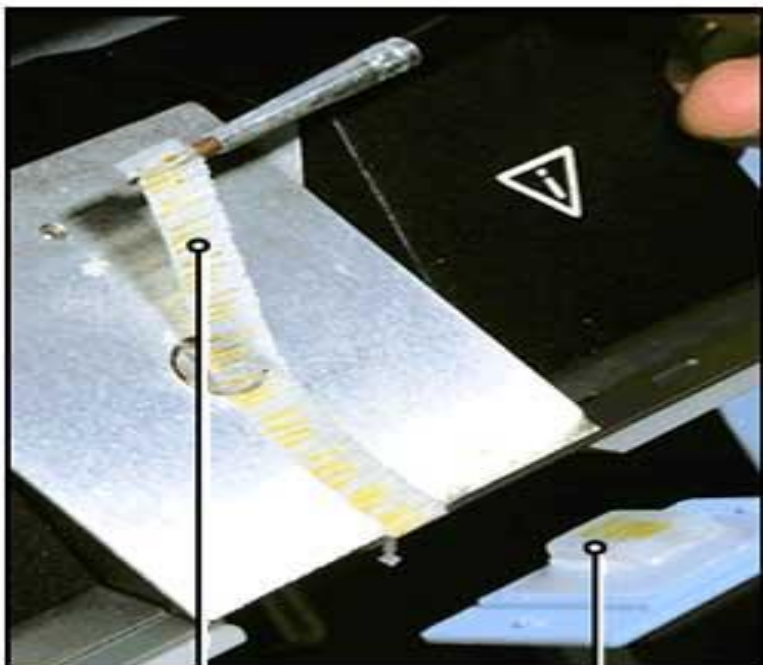
Rotační mikrotom



kryostat

= rotační mikrotom v mrazicím boxu (-60°C);

zmrzlou tkáň lze krájet bez zalévání



páska řezů

parafinový bloček



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).



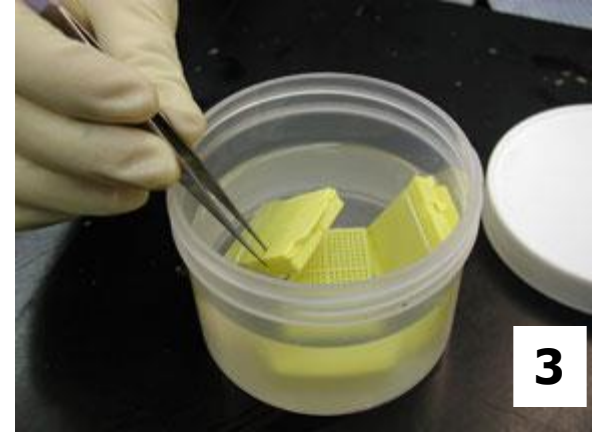
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv.
Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylénem.



1



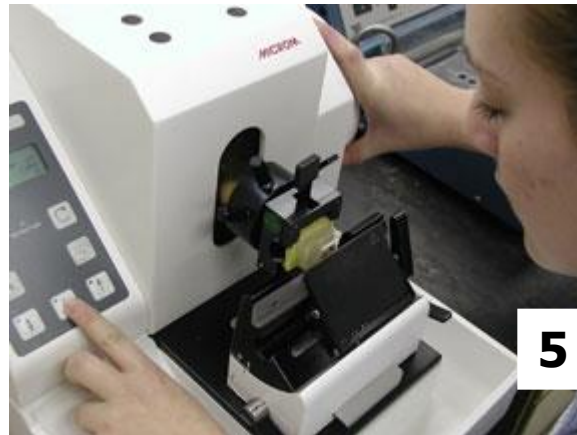
2



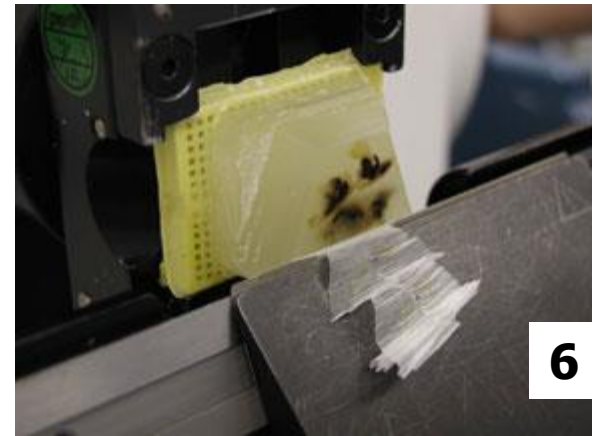
3



4



5



6



7



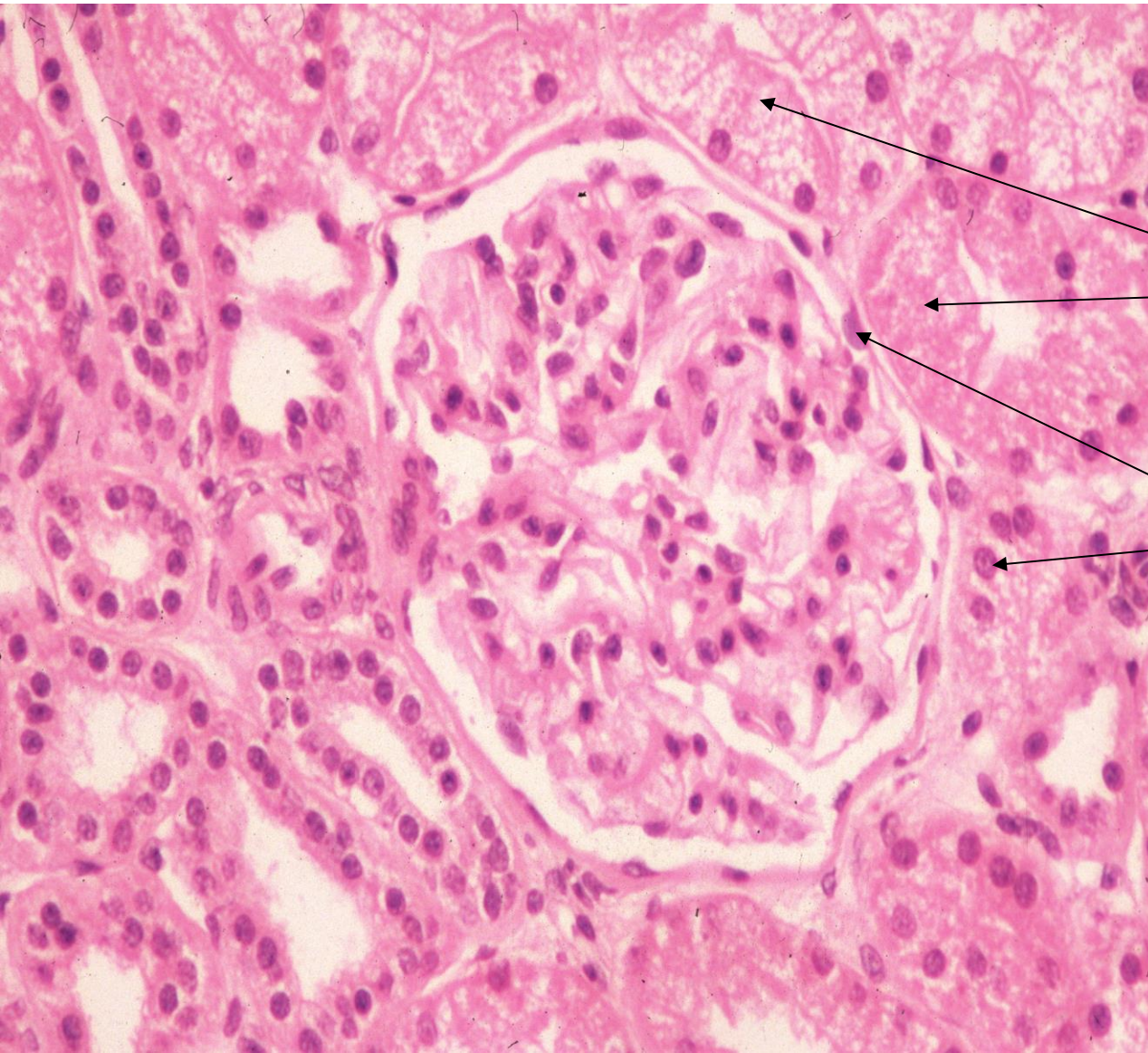
8

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)



cytoplazma

jádra

- **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)

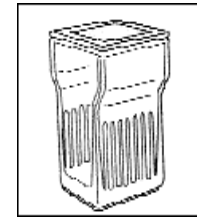
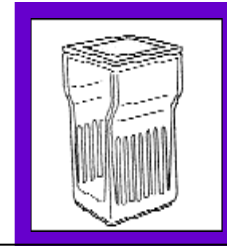
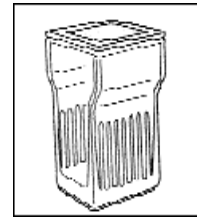
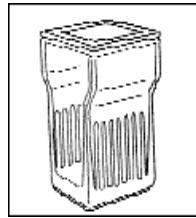
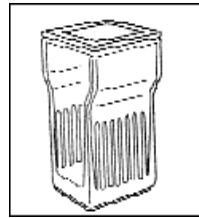
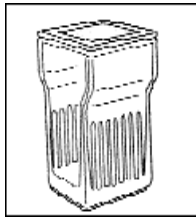
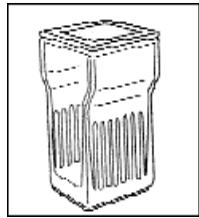
deparafinace

rehydratace

praní

barvení

diferenciace



xylén I

xylén II

100%
etanol

96%
etanol

H₂O

hematoxylin

kyselý
etanol

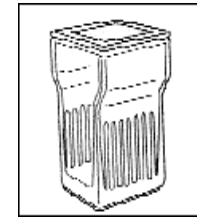
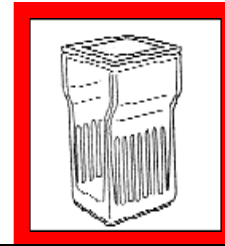
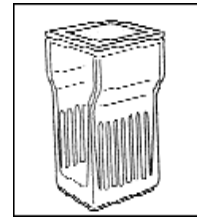
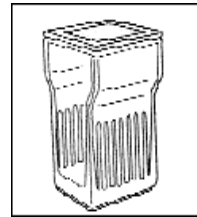
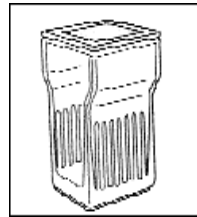
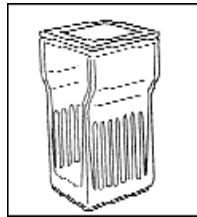
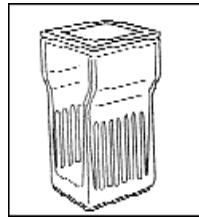
projasnění

dehydratace

praní

barvení

praní



xylén IV

xylén III

100%
etanol

96%
etanol

H₂O

eosin

H₂O

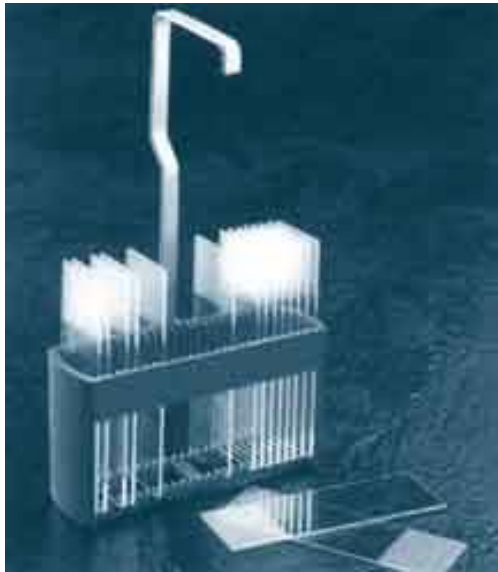
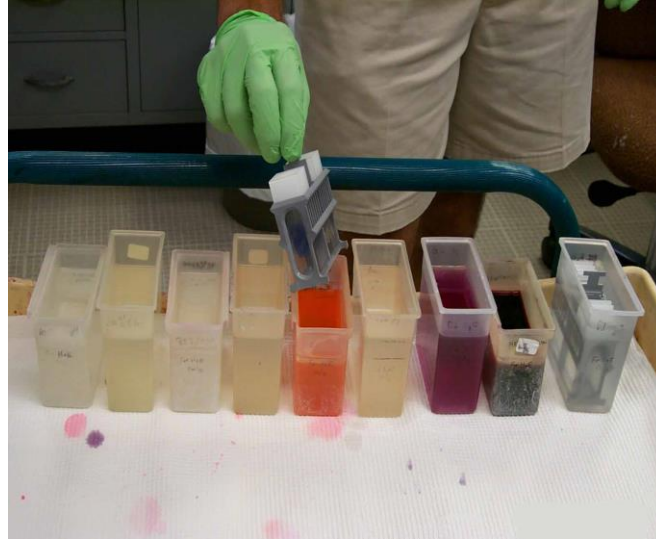
RUTINNÍ BARVENÍ: HEMATOXYLIN EOSIN (HE)

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

≈

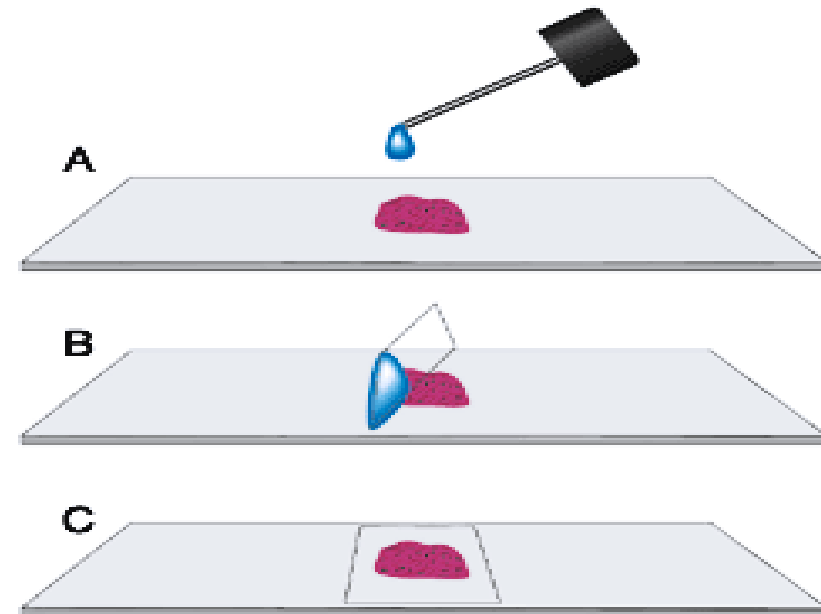
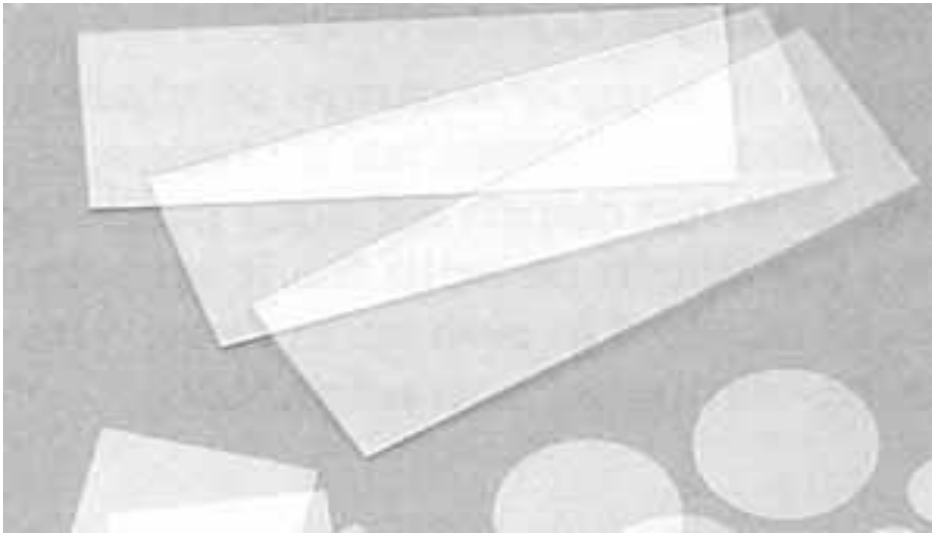


- **Leica ST 4040** Lineární barvicí automat - velkokapacitní barvení vzorků jedním programem (např. H&E až 1000 skel).



MONTOVÁNÍ

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

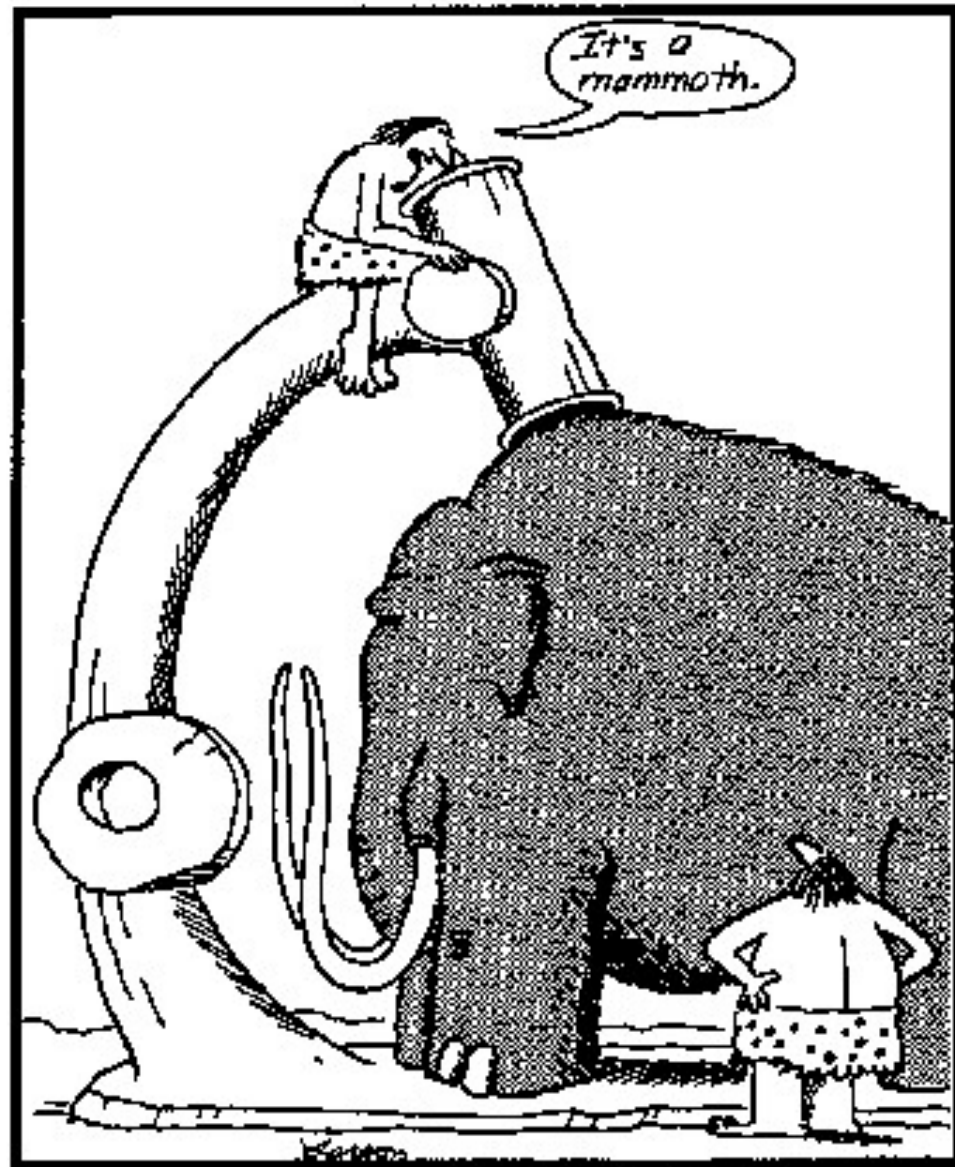


- rozpustná v xylenu – kanadský balzám
- rozpustná ve vodě – glycerin-želatina, arabská guma

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

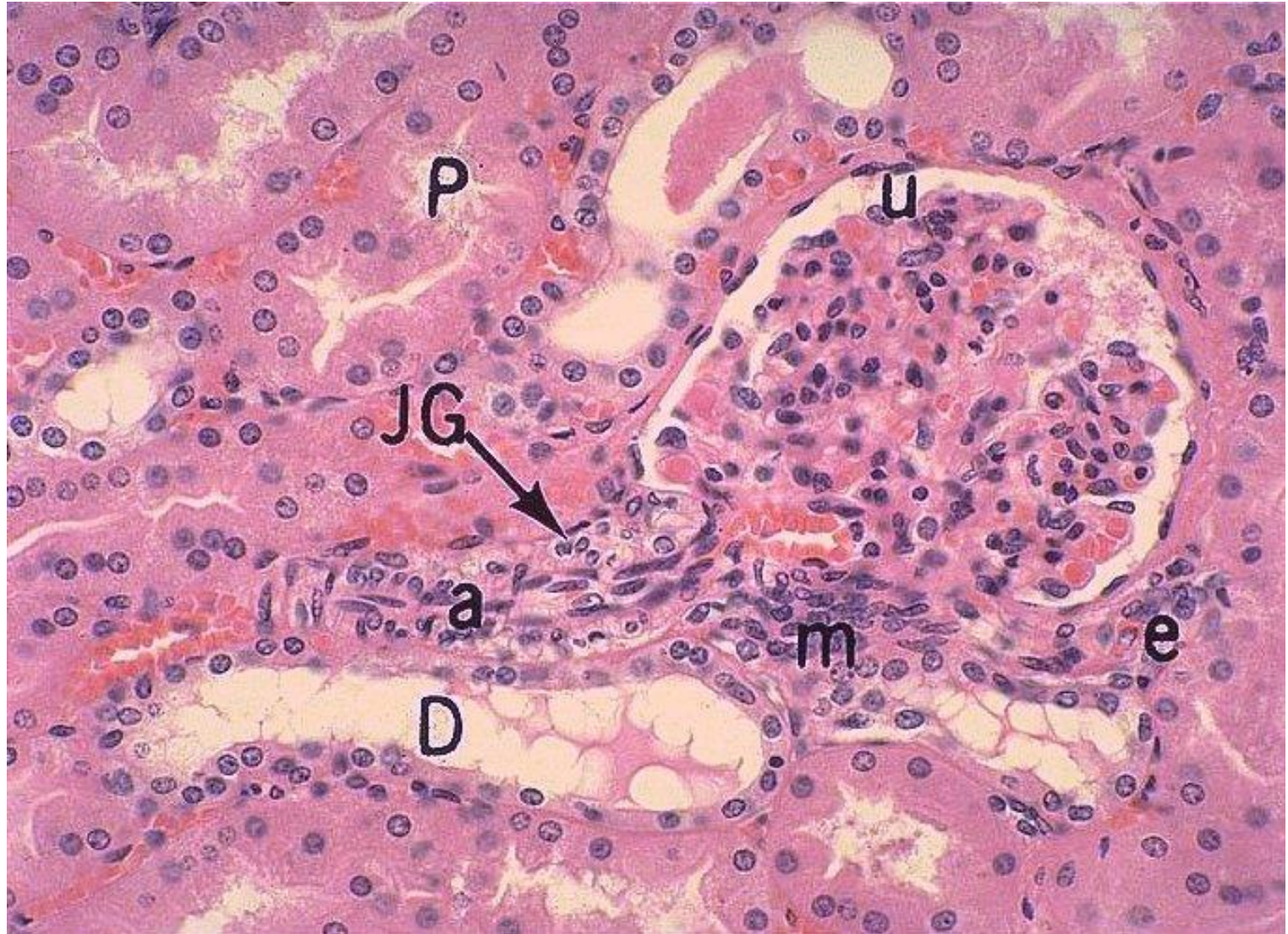


→ **trvalé histologické preparáty ke studiu v SM**



Early microscope

Hematoxylin a eosin (HE)



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 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-PI* komplexů nebo Ag-PI + PI* (sekundární značená PI),

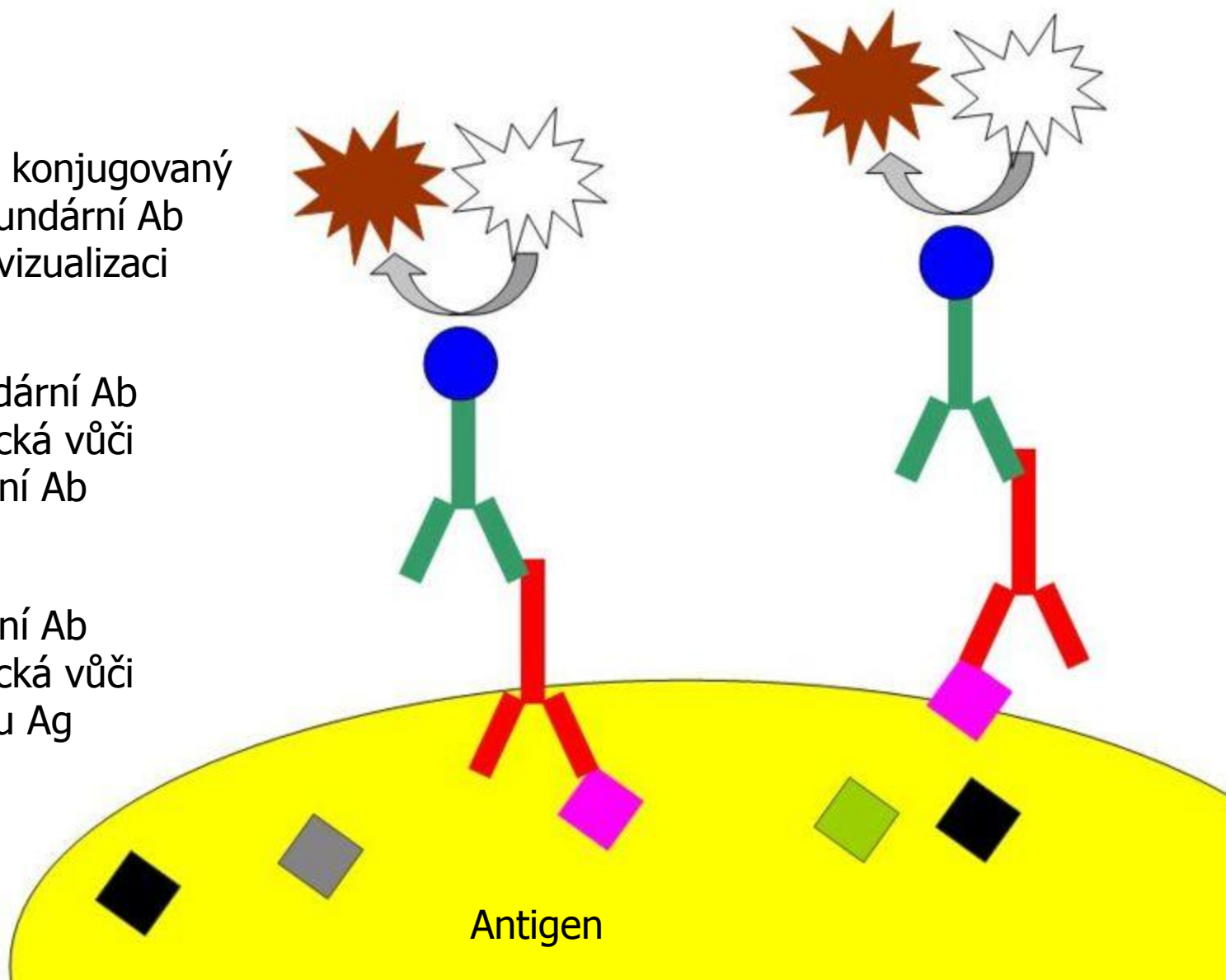
*marker:

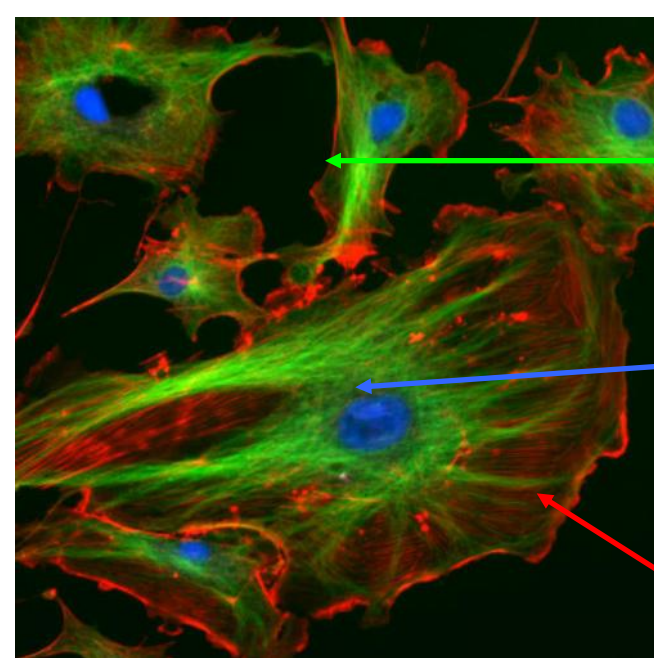
1. fluorochromy – rhodamin, Texas red, FITC
2. enzymy – křenová peroxidáza (HRP), AF, acetylcholinesteráza
3. radioizotopy (I^{125})

Enzym konjugovaný
se sekundární Ab
zajistí vizualizaci

Sekundární Ab
specifická vůči
primární Ab

Primární Ab
specifická vůči
epitopu Ag

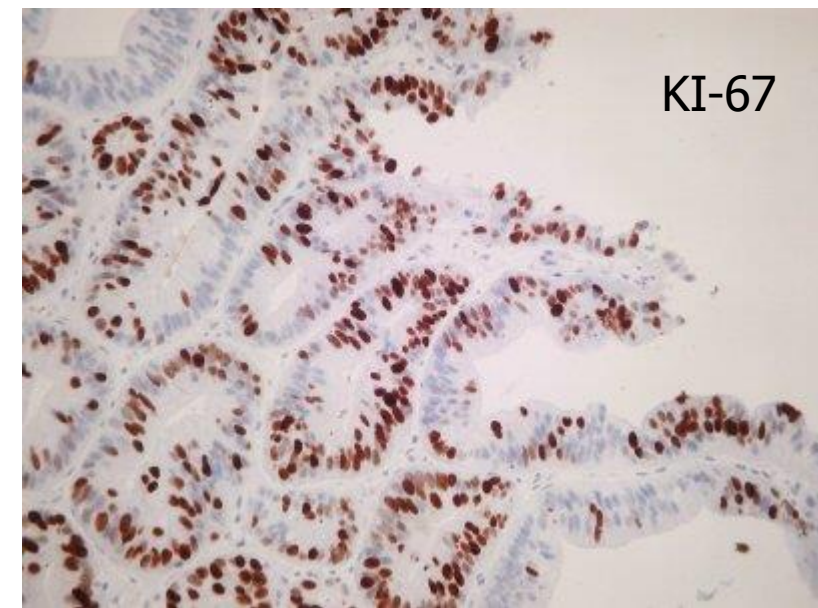
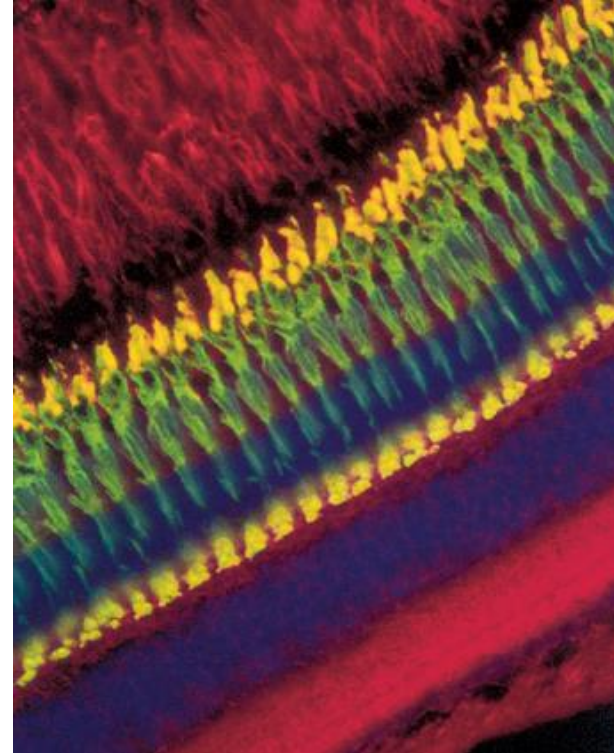




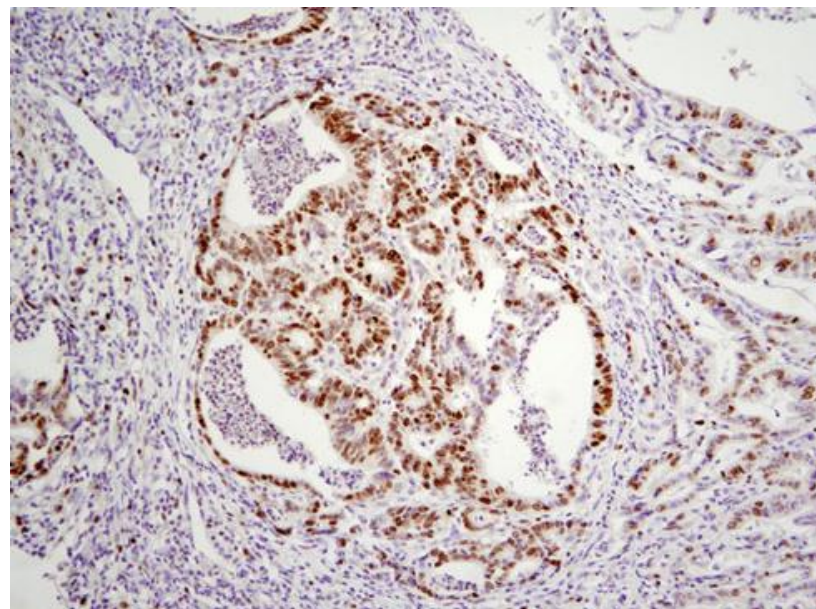
Aktin (cytoskelet)

DAPI (jádno)

Mikrotubuly (cytoskelet)

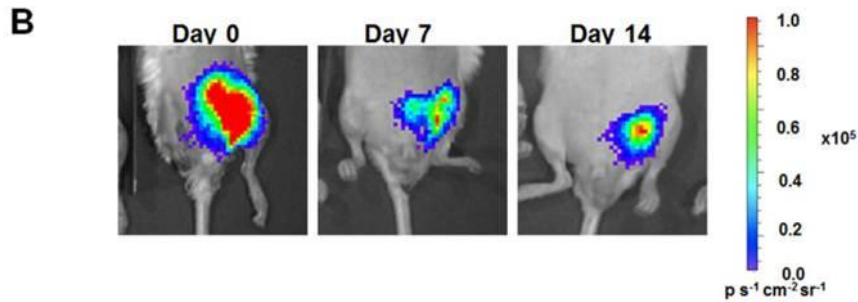
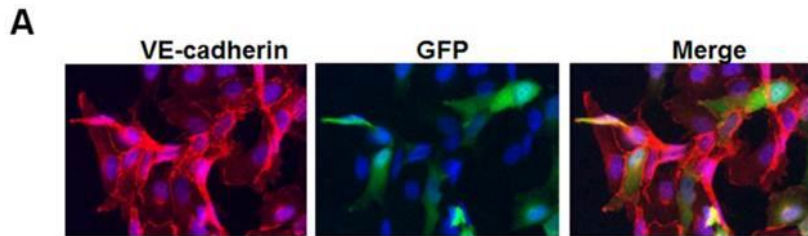


KI-67



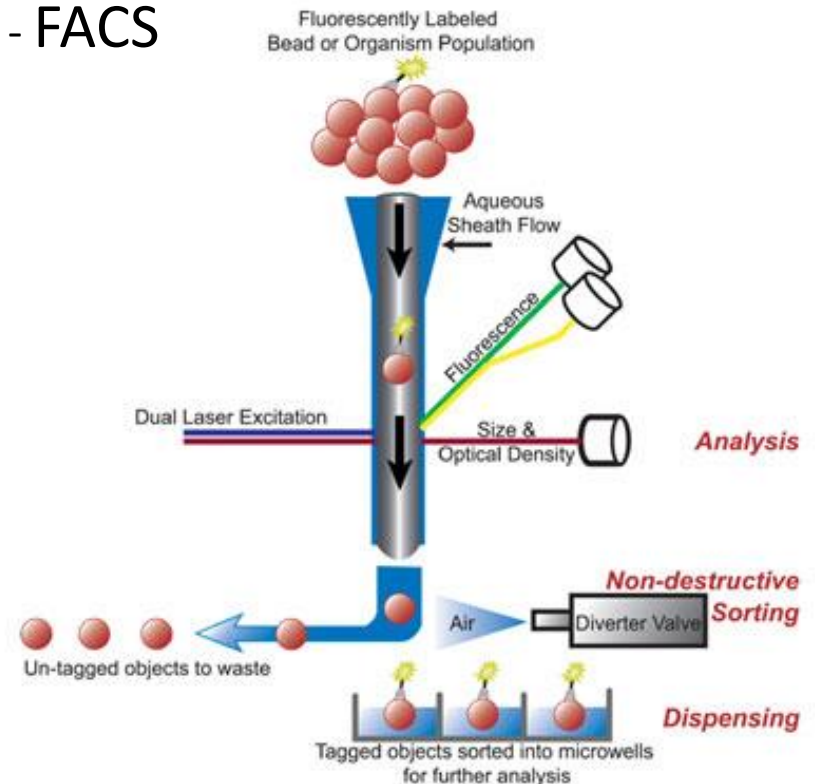
In-vivo/live cell imaging

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



doi:10.7150/thno.3694

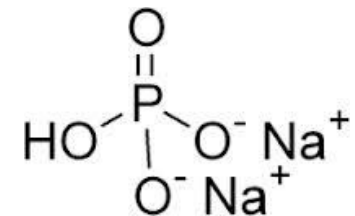
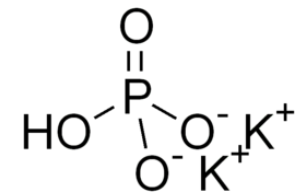
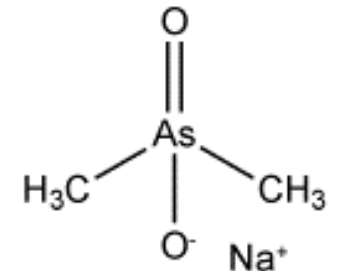
- FACS

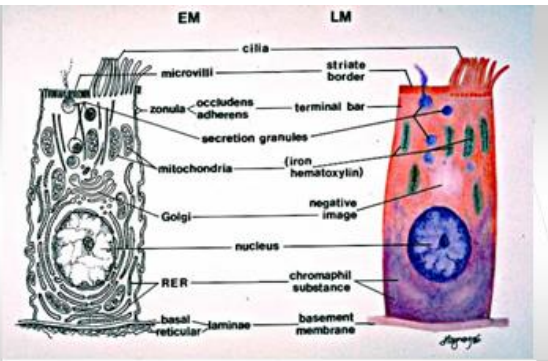


Zpracování tkání pro elektronovou mikroskopii (EM)

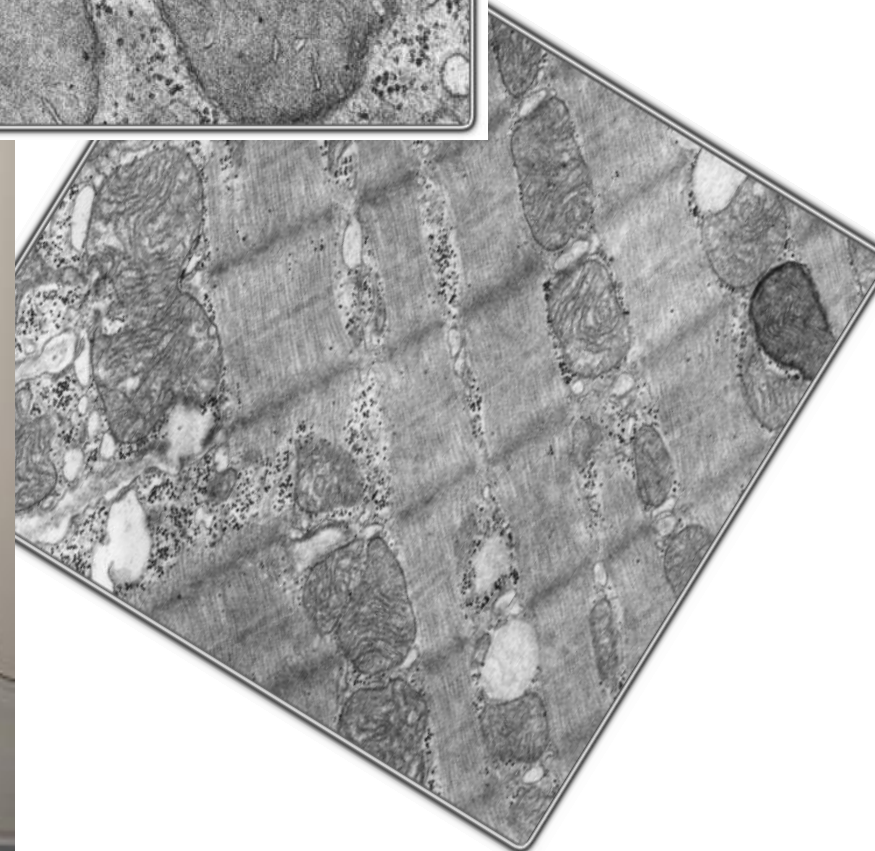
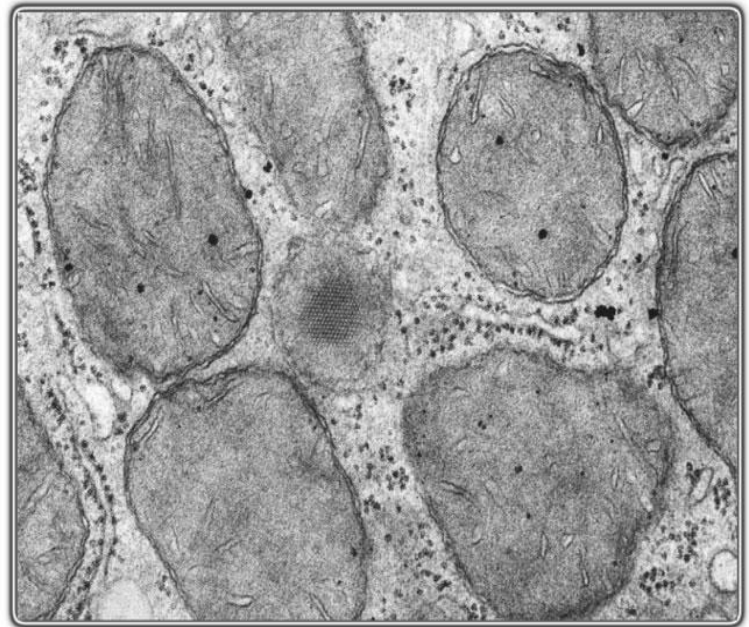
Požadavky na pracovní podmínky:

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





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



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

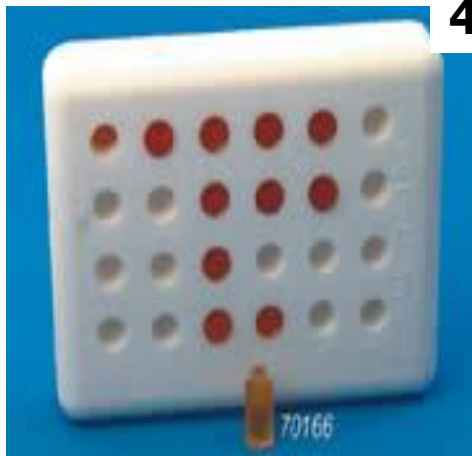
Zalévací komůrky:



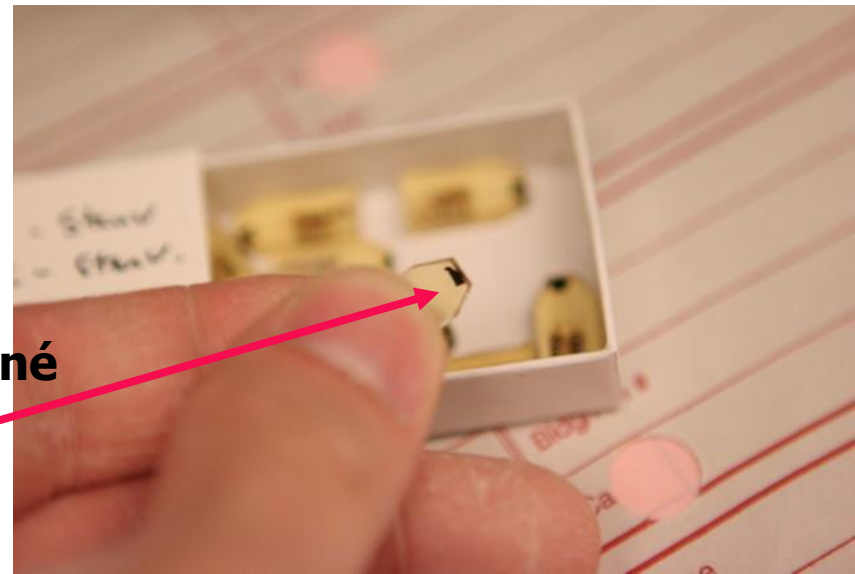
želatinové (1), plastové (2)

nosiče (držáky) kapslí (3)

ploténky s komůrkami
(4, 5)



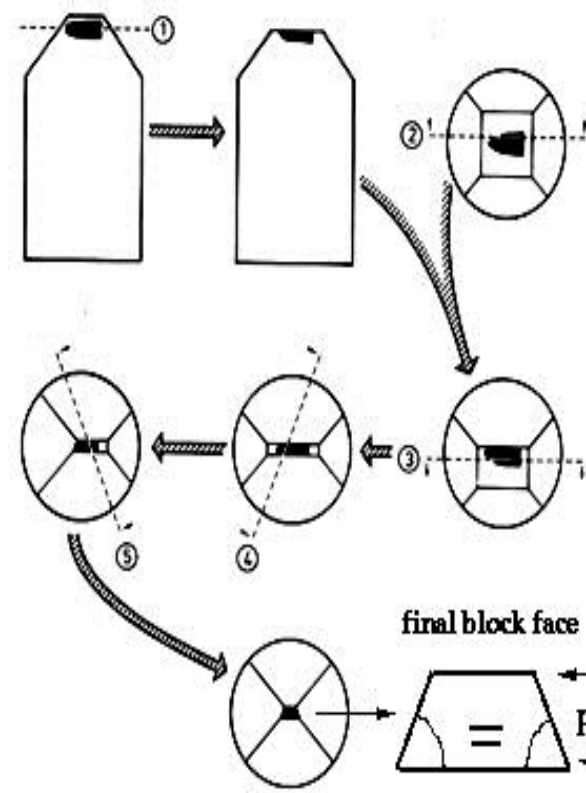
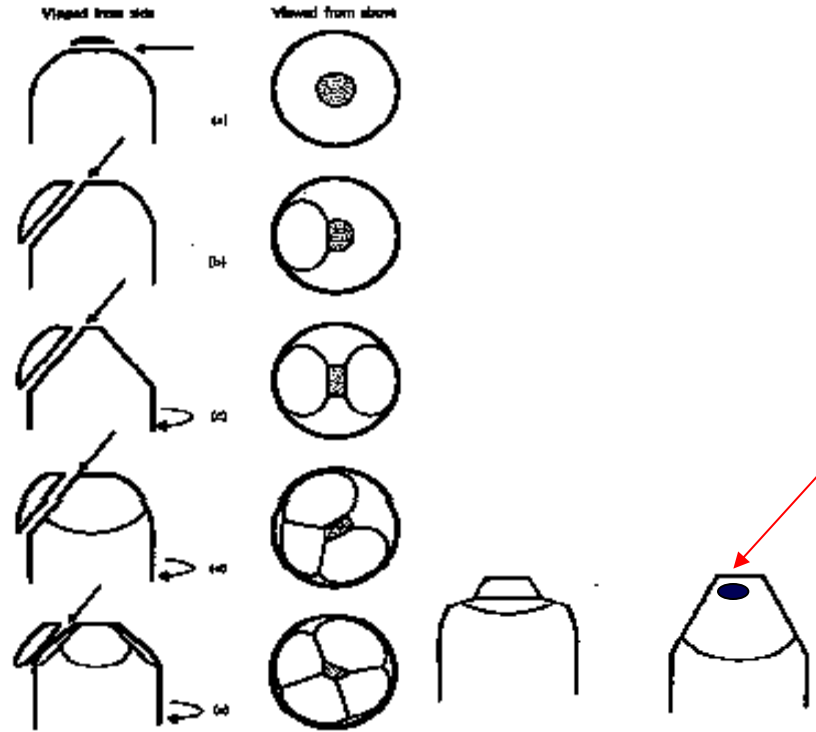
bločky připravené
pro krájení



Úprava pyramidy (trimování)

Odstranění přebytku tvrdého zalévacího media a zhotovení pyramidy s minimální řeznou plochou (0.1 mm²).

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)

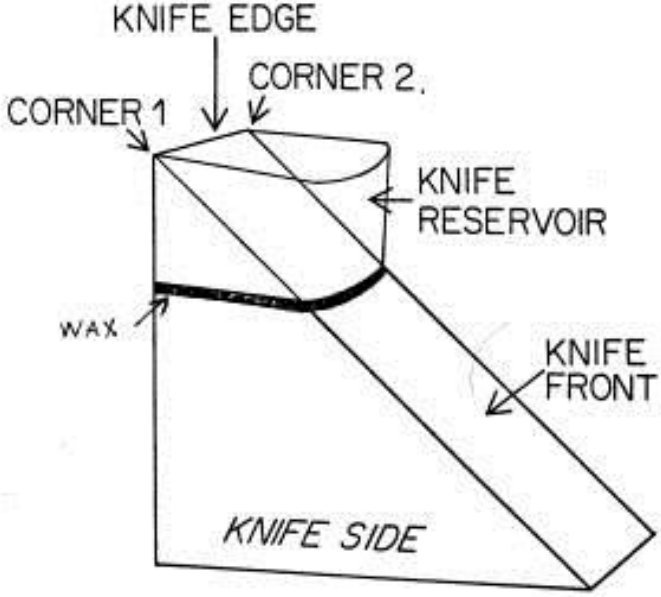


Just Right-Egyptian Pyramid with top cut off

KRÁJENÍ

- po odstranění přebytku media (trimming) a vytvoření pyramidy se z malé plošky (0.1 mm²) 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)

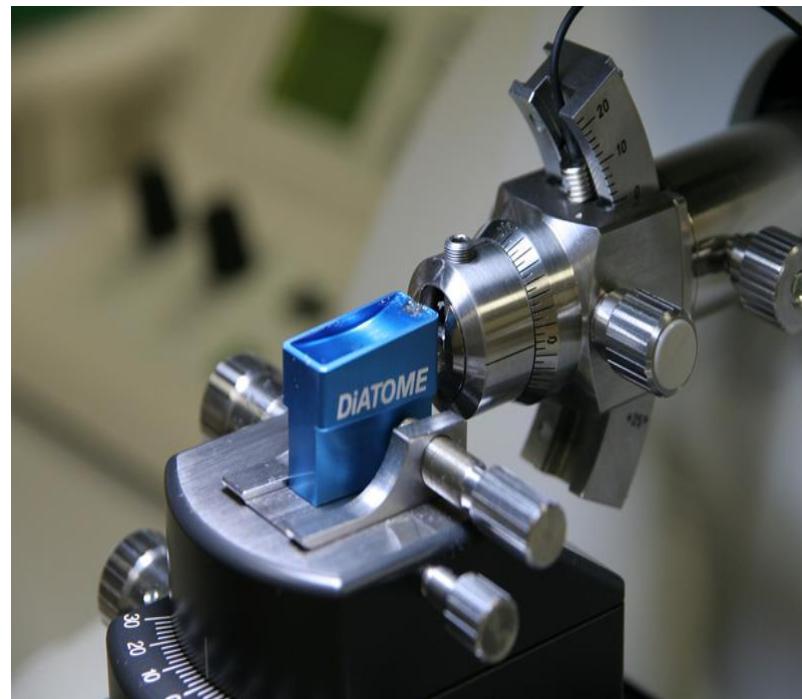
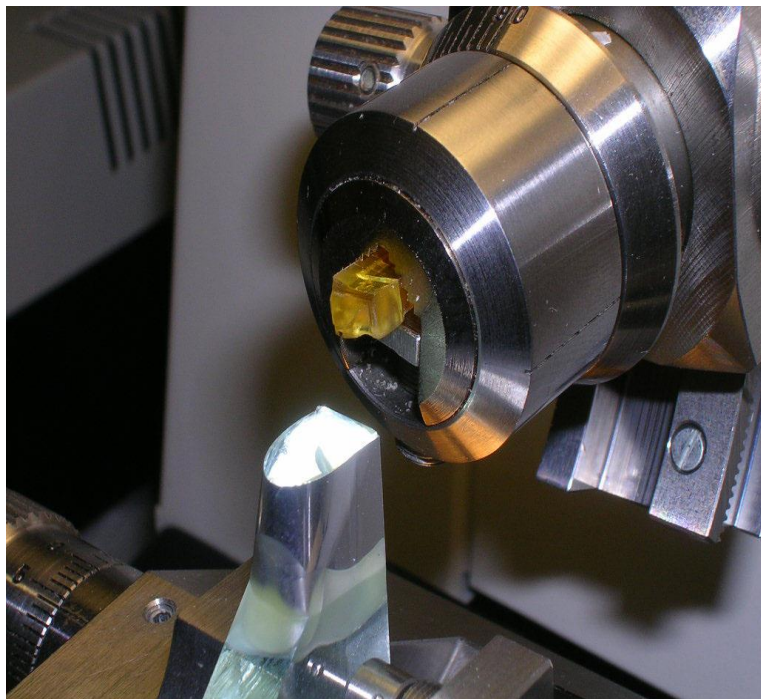




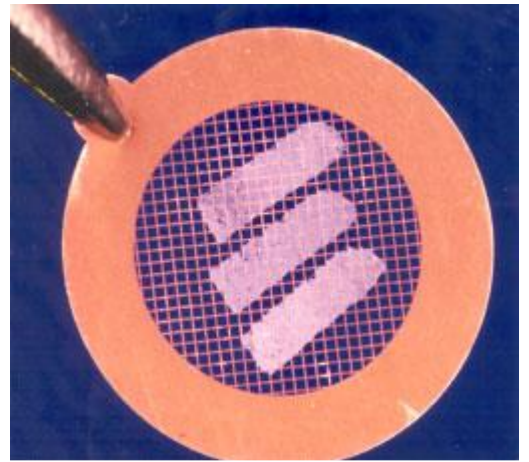
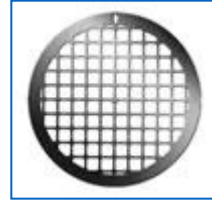
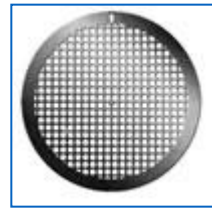
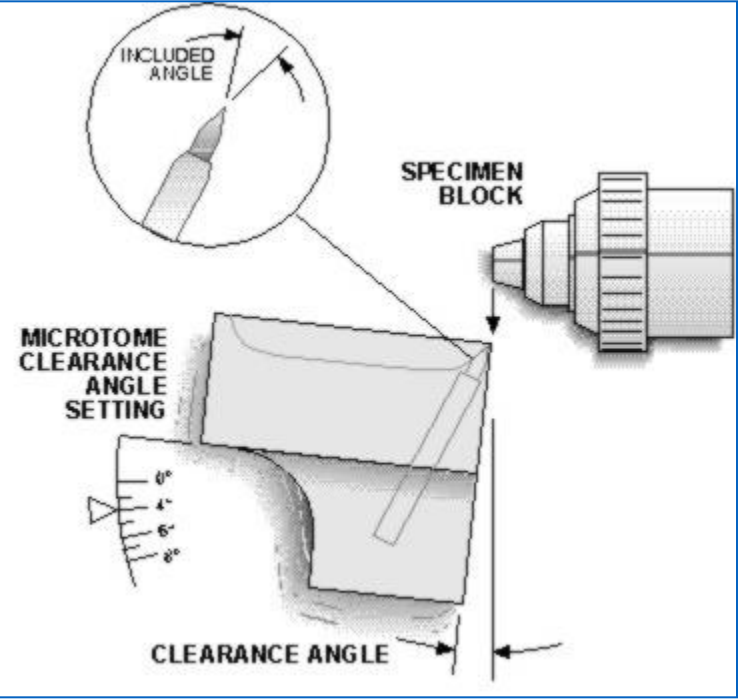
Ultramikrotomové nože:

skleněný

diamantový

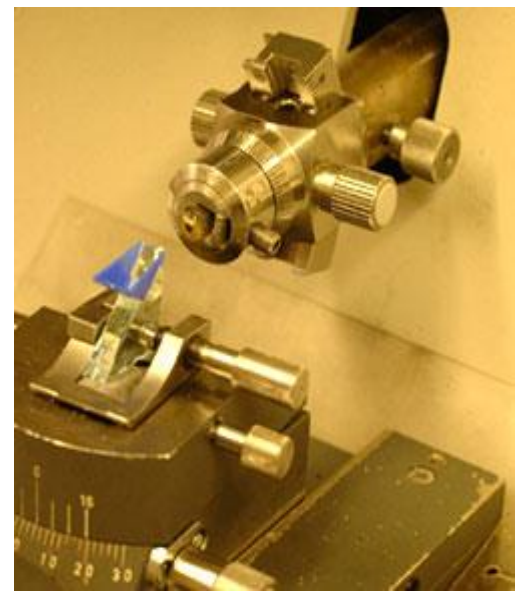
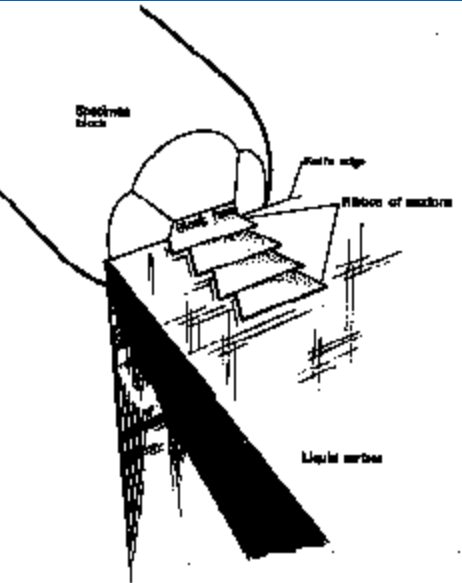
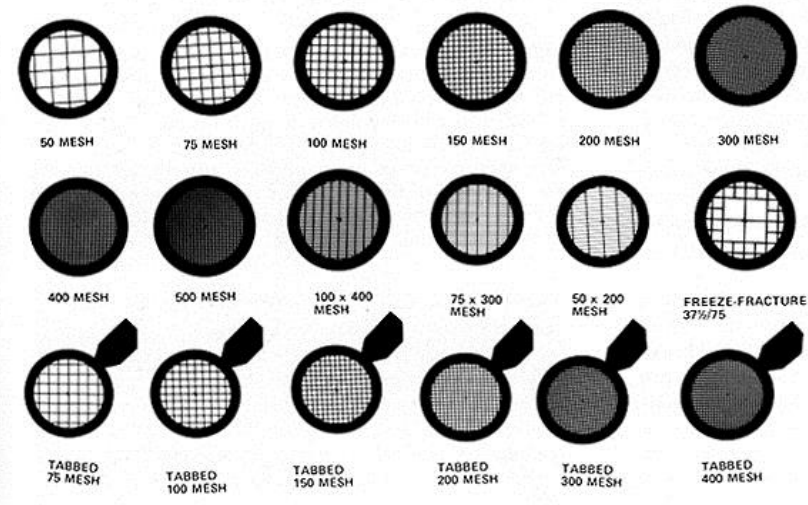


Krájení, nosné sítě



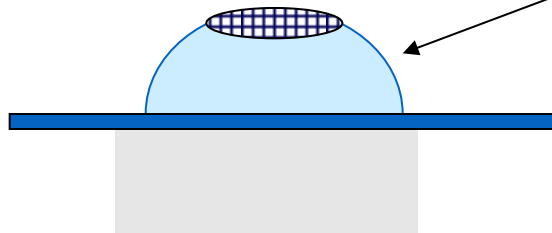
Sítka se 3 páskami řezů

typy sítěk



KONTRASTOVÁNÍ

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



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

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 (<i>hematoxylin – eosin</i>)	těžké kovy (<i>uranylacetat, citrát Pb</i>)
Montování	+	---
Výsledek	histologický preparát	foto z fluoresc. stínítka - elektronogram

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

Děkuji za pozornost

Petr Vaňhara, PhD.
pvanhara@med.muni.cz