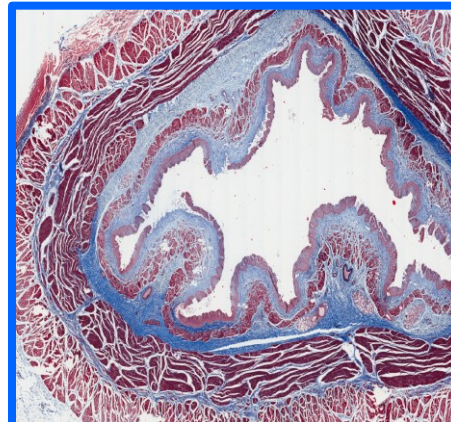
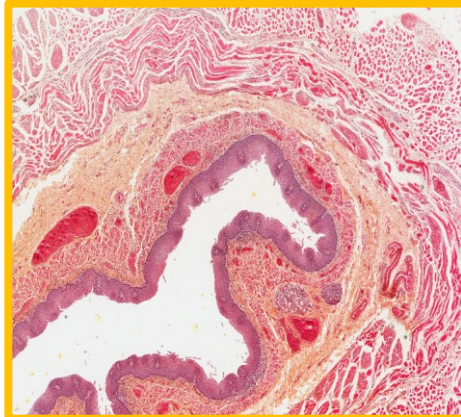
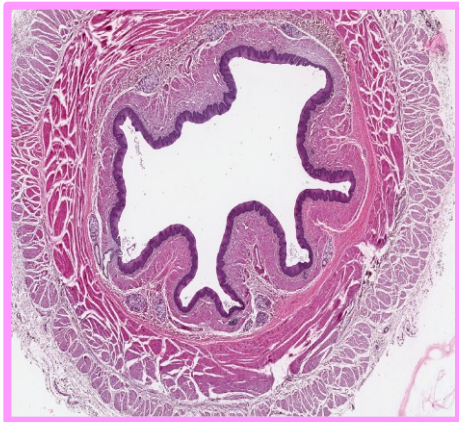




Základní barvicí metody v histologii

Práce se světelným mikroskopem



BARVENÍ

- zviditelnění struktur v řezu – 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** – bazofilní struktury
 - kyselá barviva („cytoplazmatická“) – reakce se zásaditými strukturami
 - ➡ **acidofilie** – acidofilní struktury v buňce
- chromofilní ≠ chromatofilní/ x chromofobní
- polychromatofilní – afinita k oběma druhům barviv

RUTINNÍ BARVENÍ: HEMATOXYLIN – EOSIN

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)

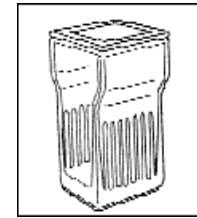
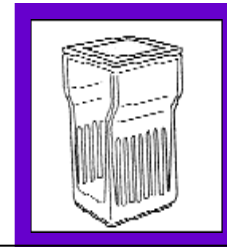
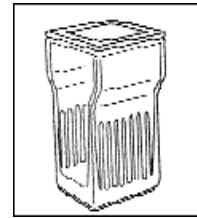
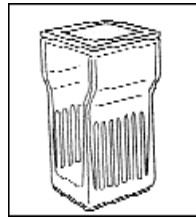
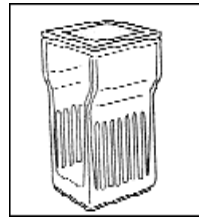
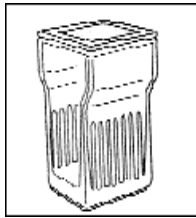
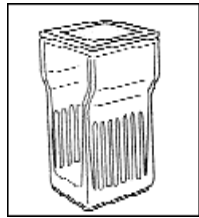
deparafinace

rehydratace

praní

barvení

diferenciace



xylen I

xylen II

100%
etanol

96%
etanol

H₂O

hematoxylin

kyselý
etanol

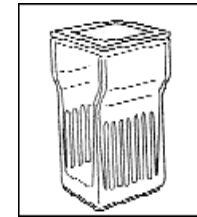
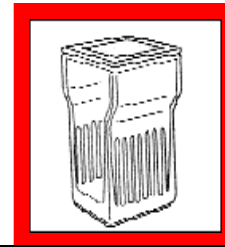
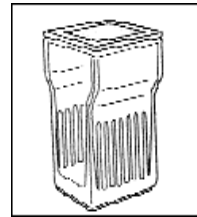
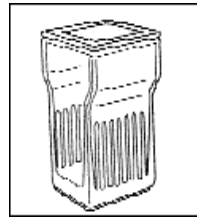
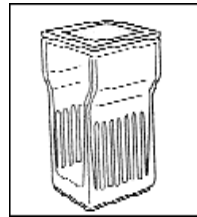
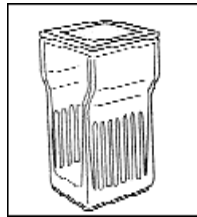
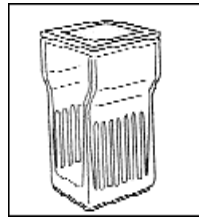
projasnění

dehydratace

praní

barvení

praní



xylen IV

xylen III

100%
etanol

96%
etanol

H₂O

eosin

H₂O



řada boxů (kyvet) s barvicími médii

≈

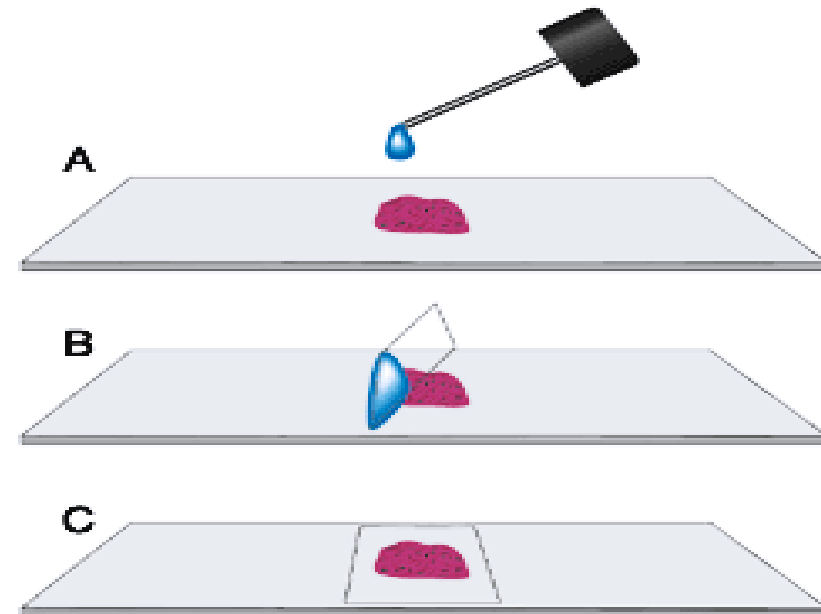
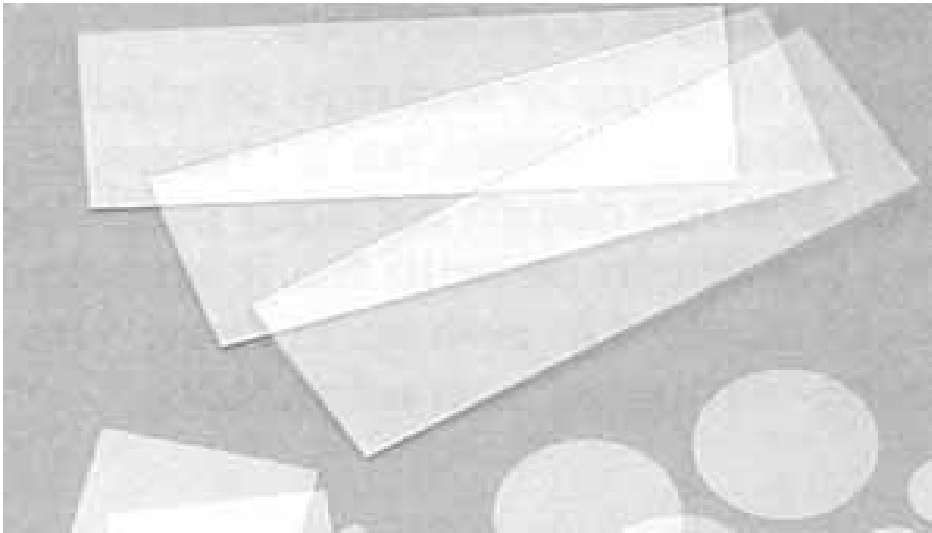


TYPY BARVENÍ

- 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 vlákná)

MONTOVÁNÍ

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



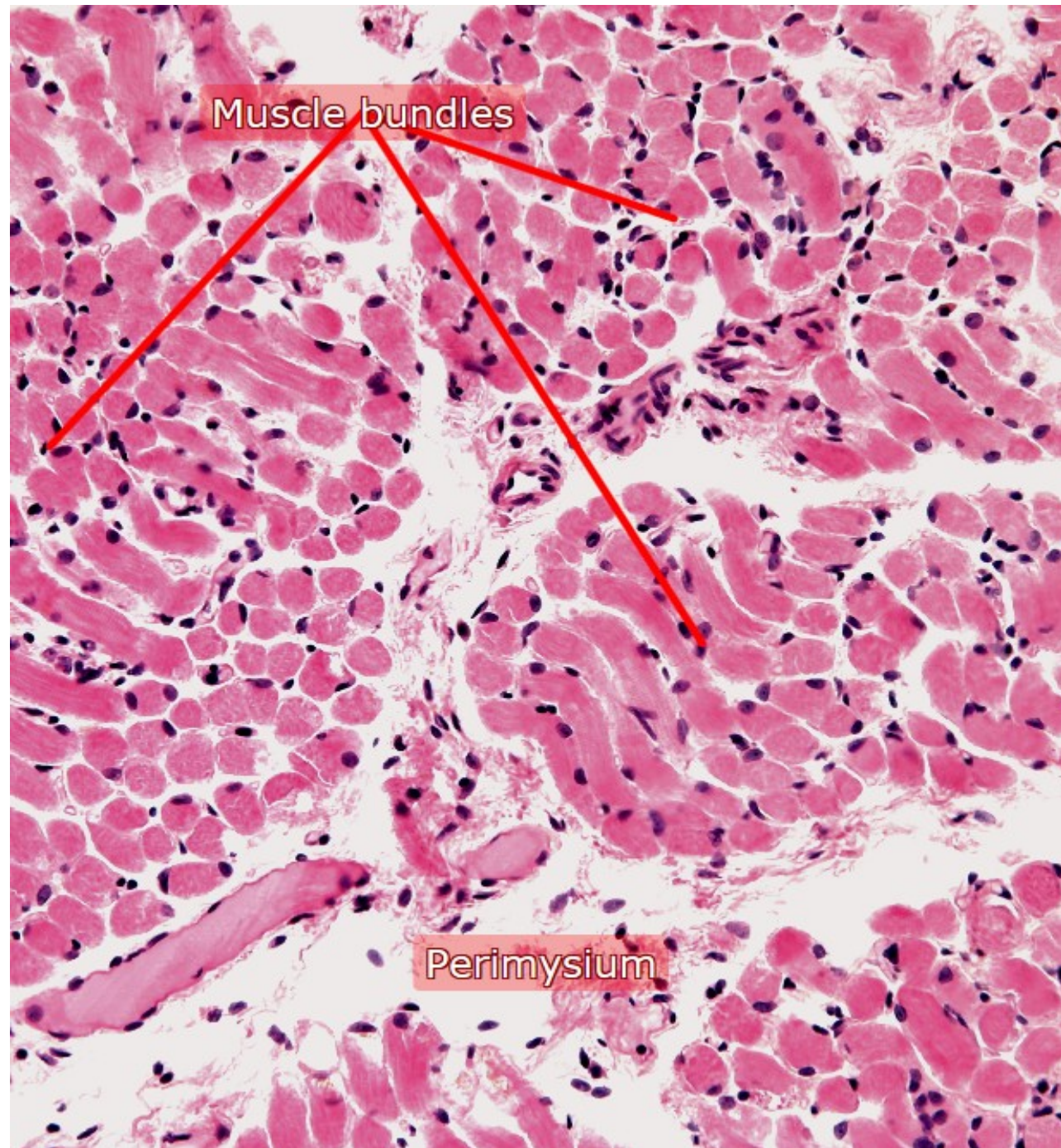
- rozpustná v xylenu – kanadský balzám
- rozpustná ve vodě – glycerin-želatina, arabská guma

Hematoxylin Eosin (HE)

Výsledek barvení:

jádra buněk – modrofialová
cytoplazma – růžová
kolagenní vlákna – růžová
svalové buňky – červené

2 – Apex linguae (HE)



Hematoxylin

Eosin

Šafrán

(HEŠ)

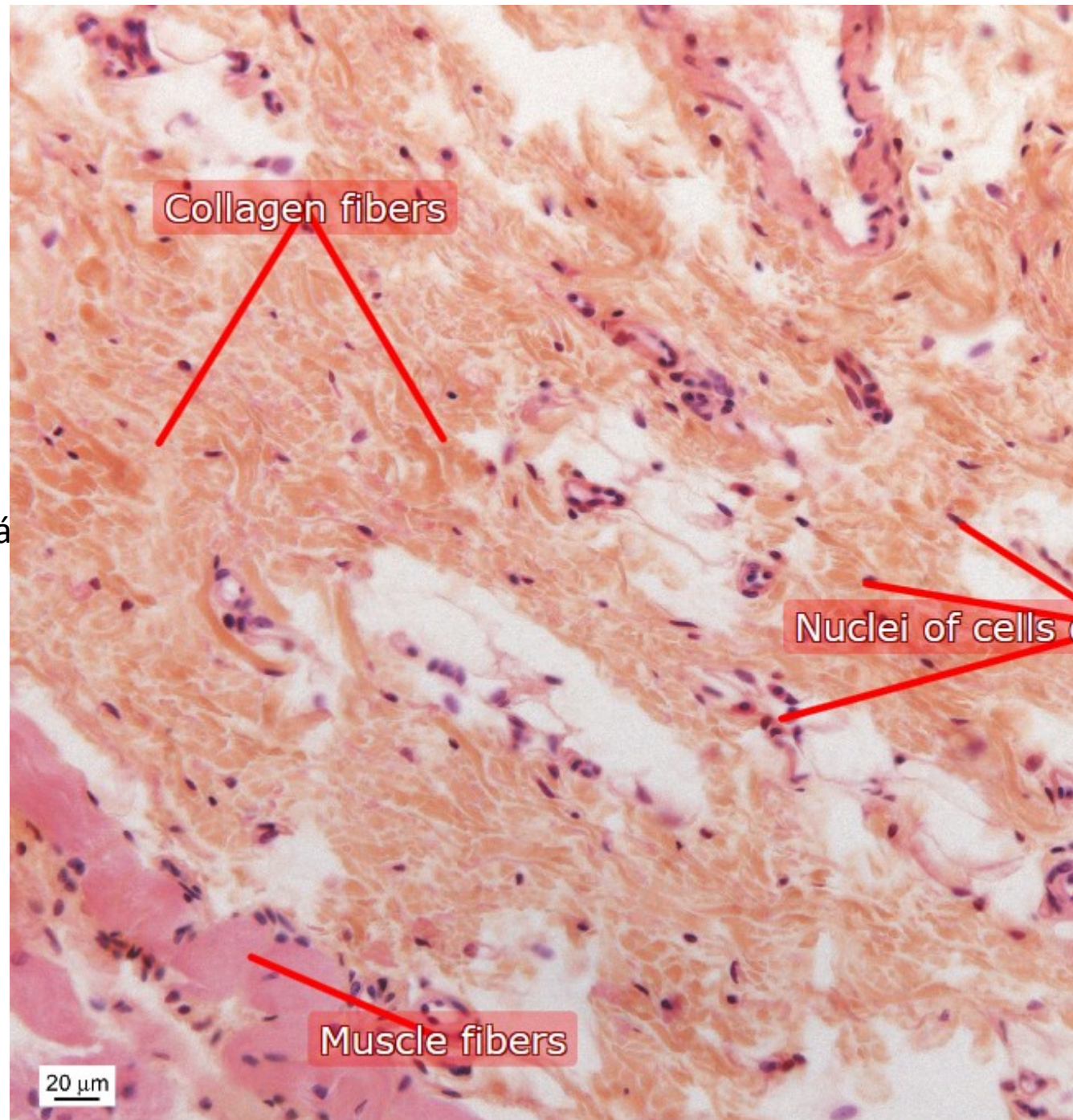
Výsledek barvení:

jádra buněk – modrofialová
cytoplazma – růžová
kolagenní vlákna – žlutá



žlutý Massonův trichrom

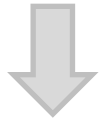
11 – Oesophagus (HES)



Azokarmin
Aniline blue
Orange G
(AZAN)

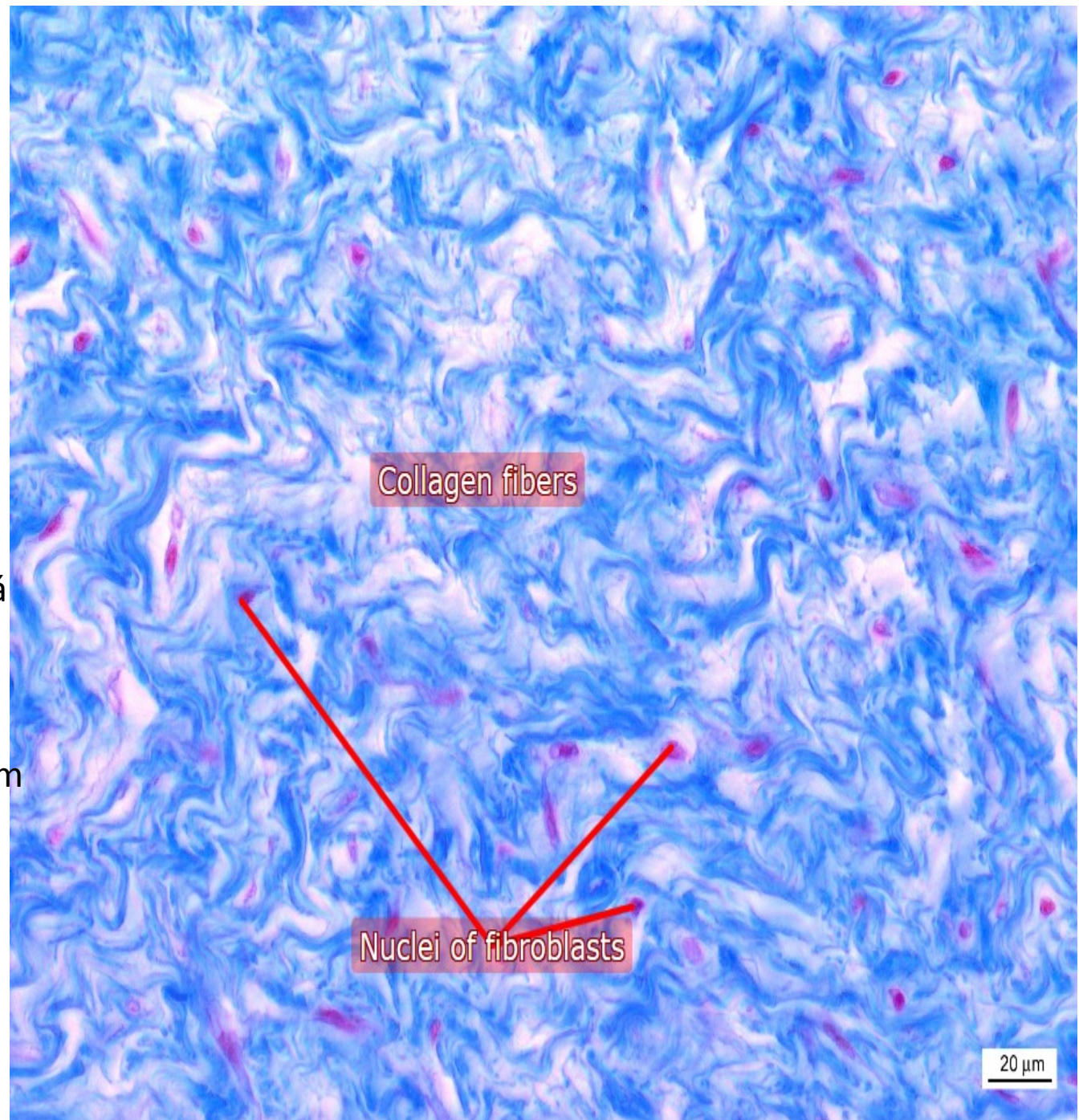
Výsledek barvení:

jádra buněk – purpurová
cytoplazma – růžová
kolagenní vlákna – modrá
erythrocyty – oranžové



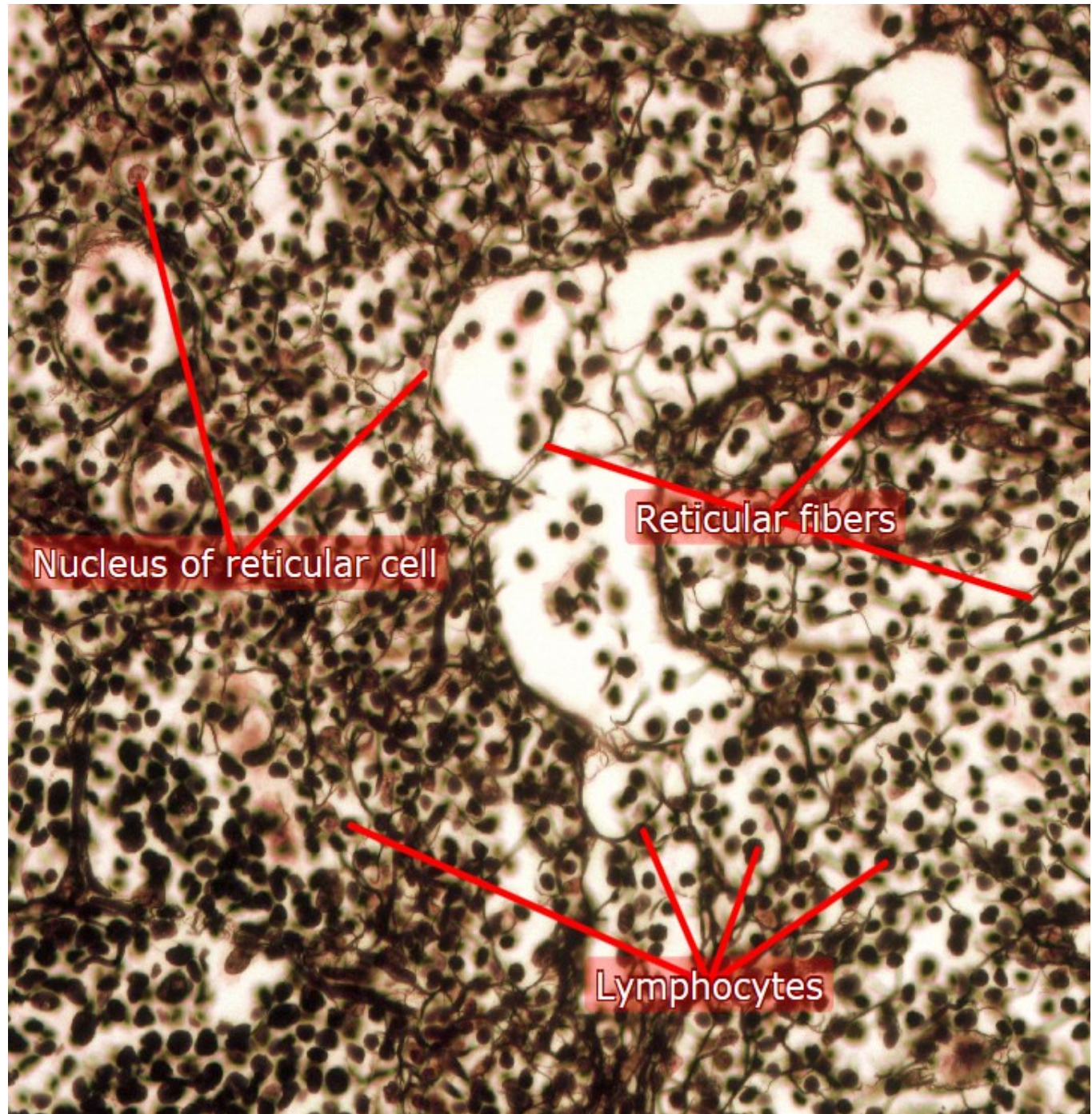
modrý Massonův trichrom

99 – Pupečník (AZAN)



Impregnance

AgNO₃



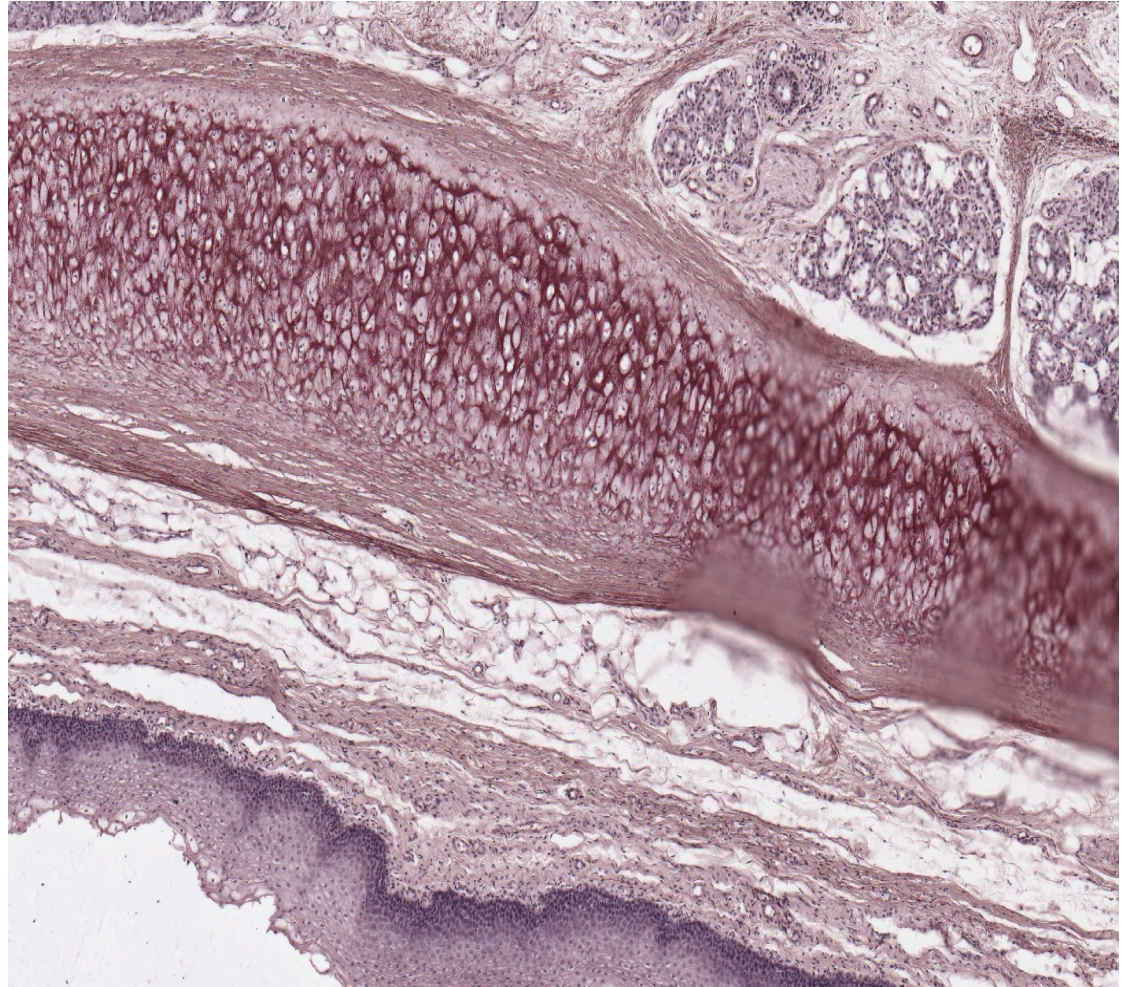
68 – Lien (impregnance)

Speciální metody barvení

Prep. 28 – elastická chrupavka

Barvení – **orcein**

Výsledek – purpurová **elastická**
vlákna

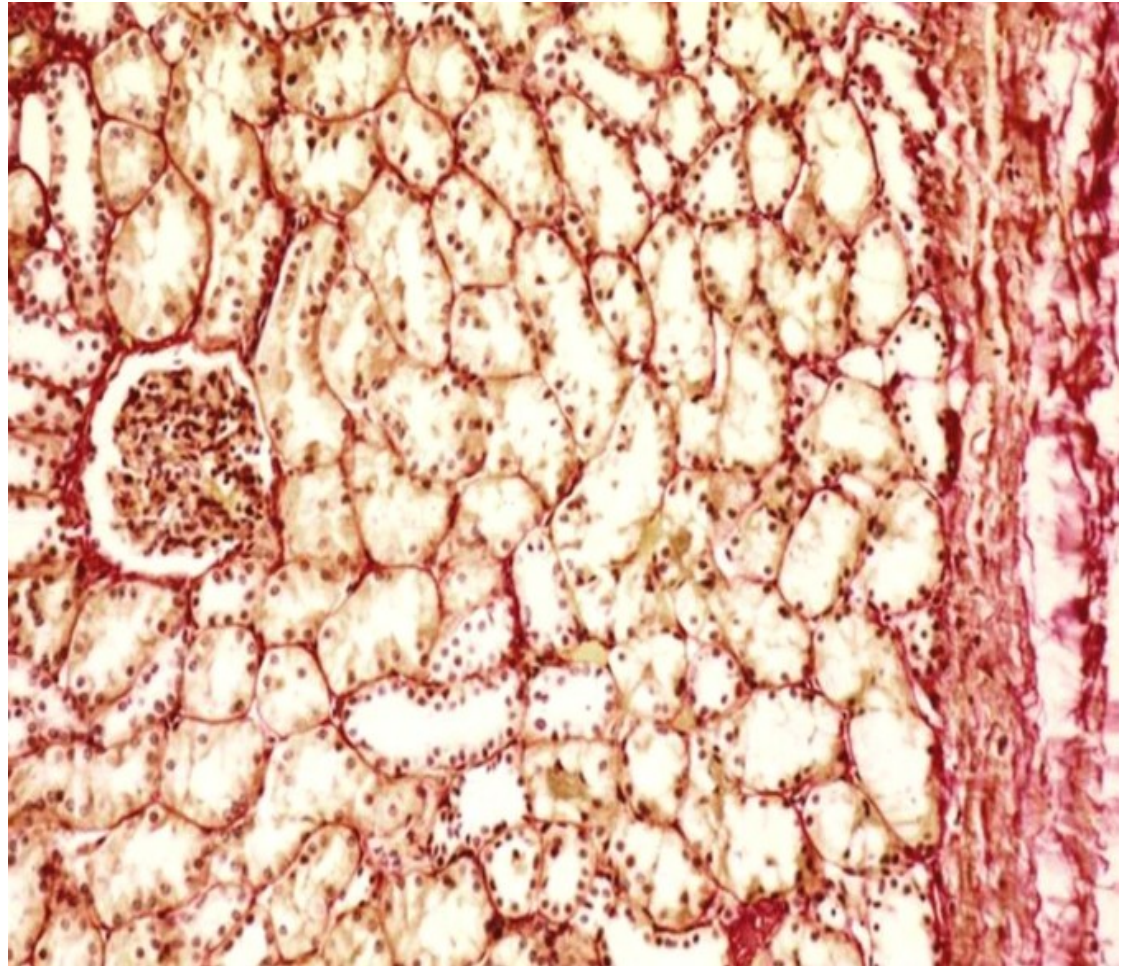


Speciální metody barvení

Prep. 31 – kůra ledviny

Barvení – **Weigert-van Giesson**

Výsledek – **třešňově červená
kolagenní vlákna**

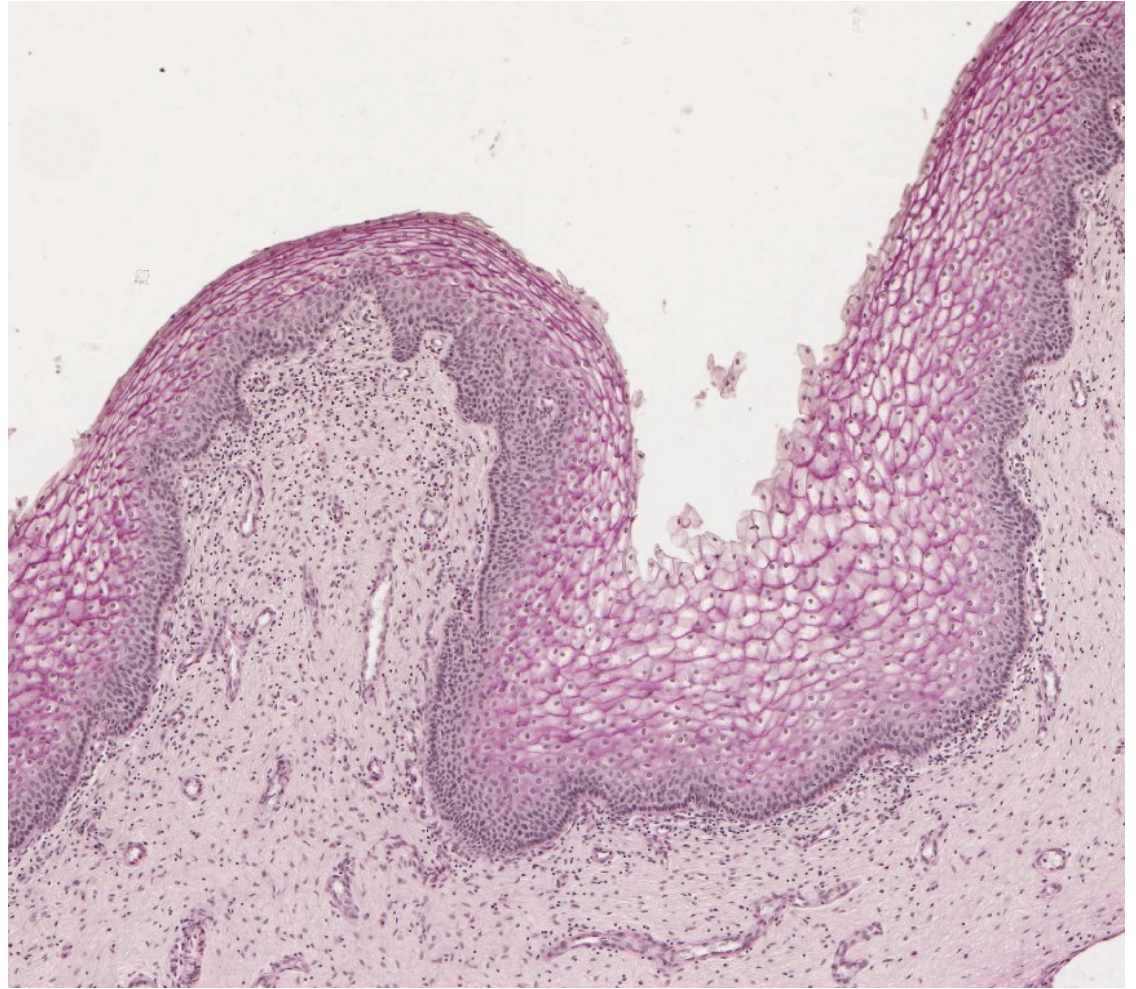


Speciální metody barvení

Prep. 49 – vagina - glykogen

Barvení – **Bestův karmín**

Výsledek – **tmavě růžový glycogen**

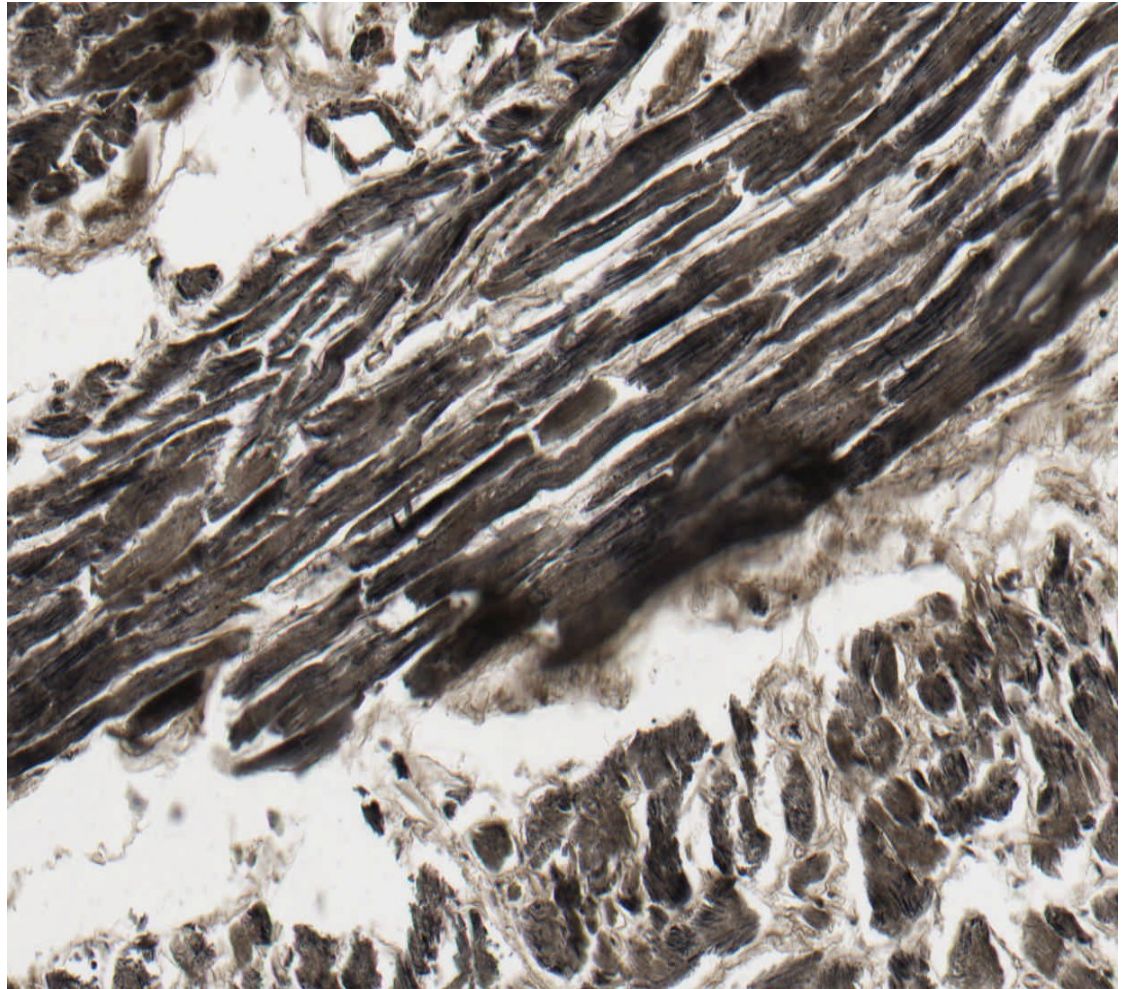


Speciální metody barvení

Prep. 65 – myocard

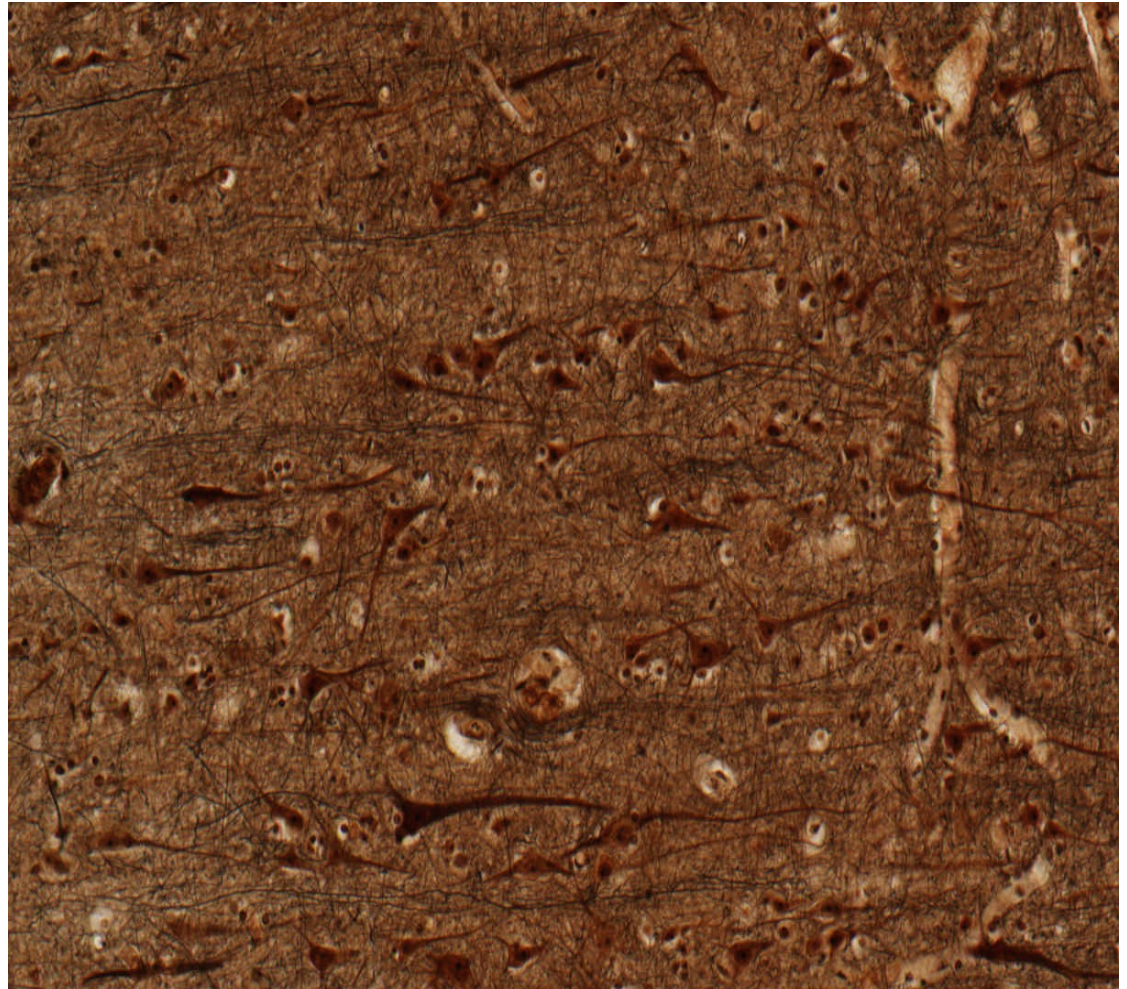
Barvení – **Heidenhain**

Výsledek – **černé kardiomyocyty**



Speciální metody barvení

Prep. 76 – cortex cerebri
Barvení – **impregnace**
Výsledek – **hnědé buňky,**
nerv. vlákna hnědočerná

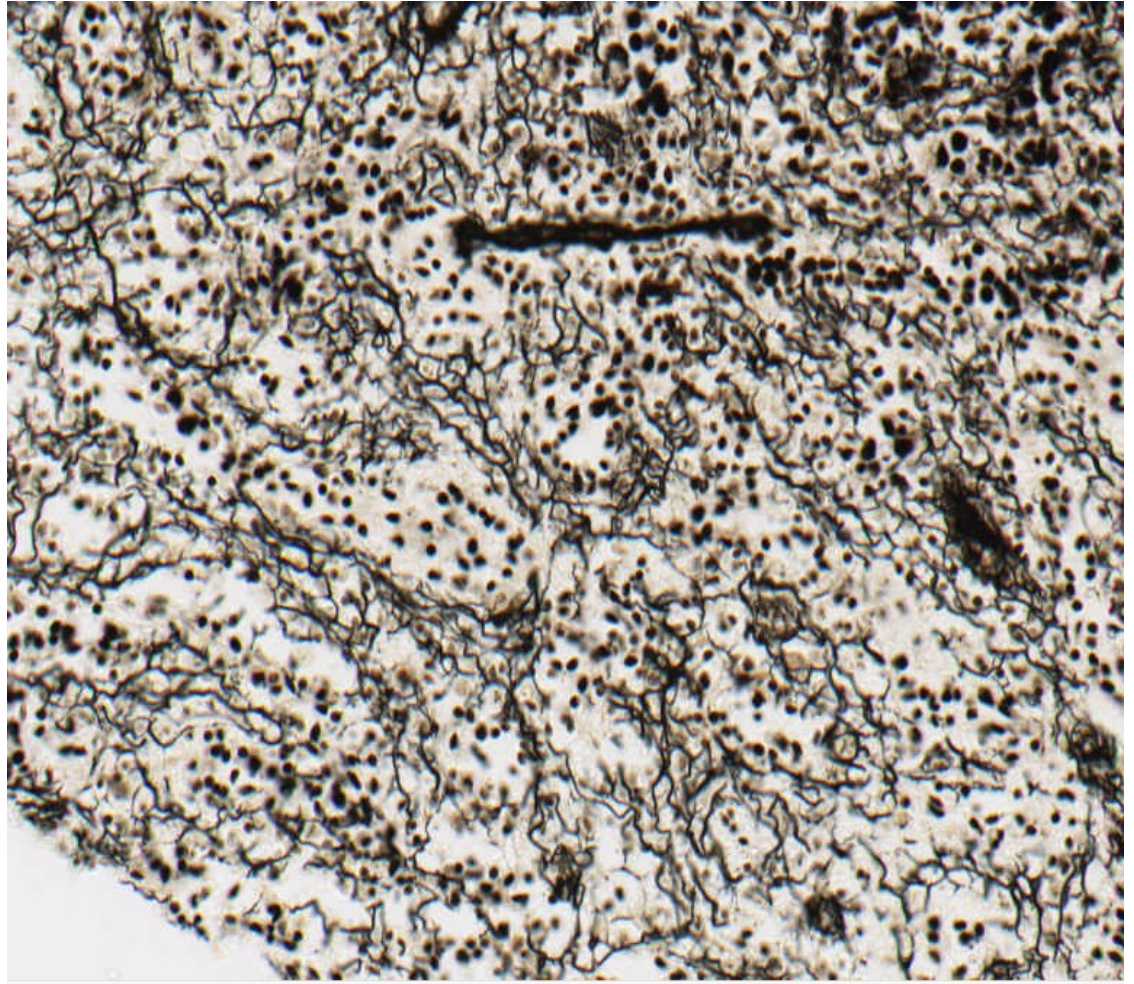


Speciální metody barvení

Prep 68 – lien

Barvení – **impregnace**

Výsledek – **černá retikulární vlákna**

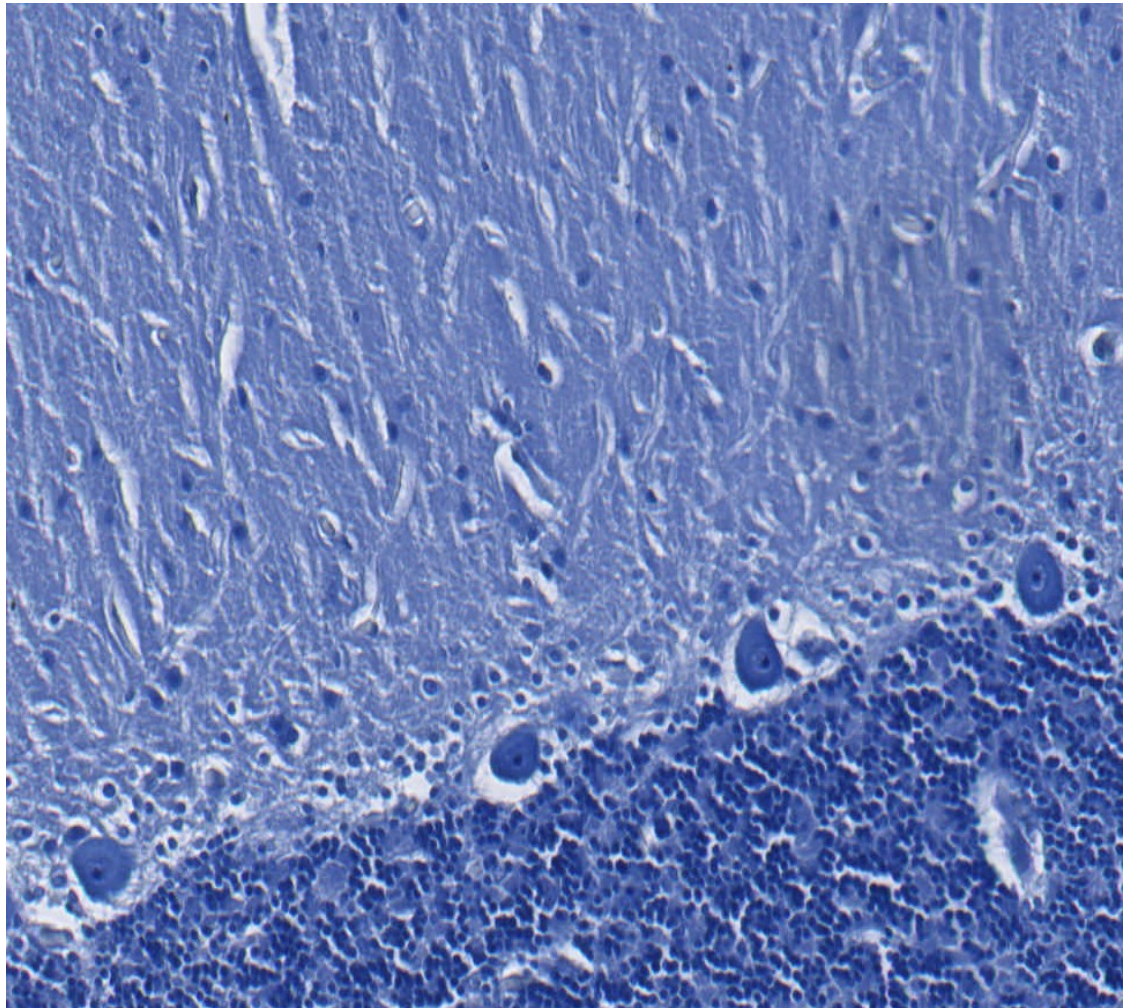


Speciální metody barvení

Prep. 78 – cerebellum

Barvení – **Nissl**

Výsledek – **modře gER, N, ncl.**

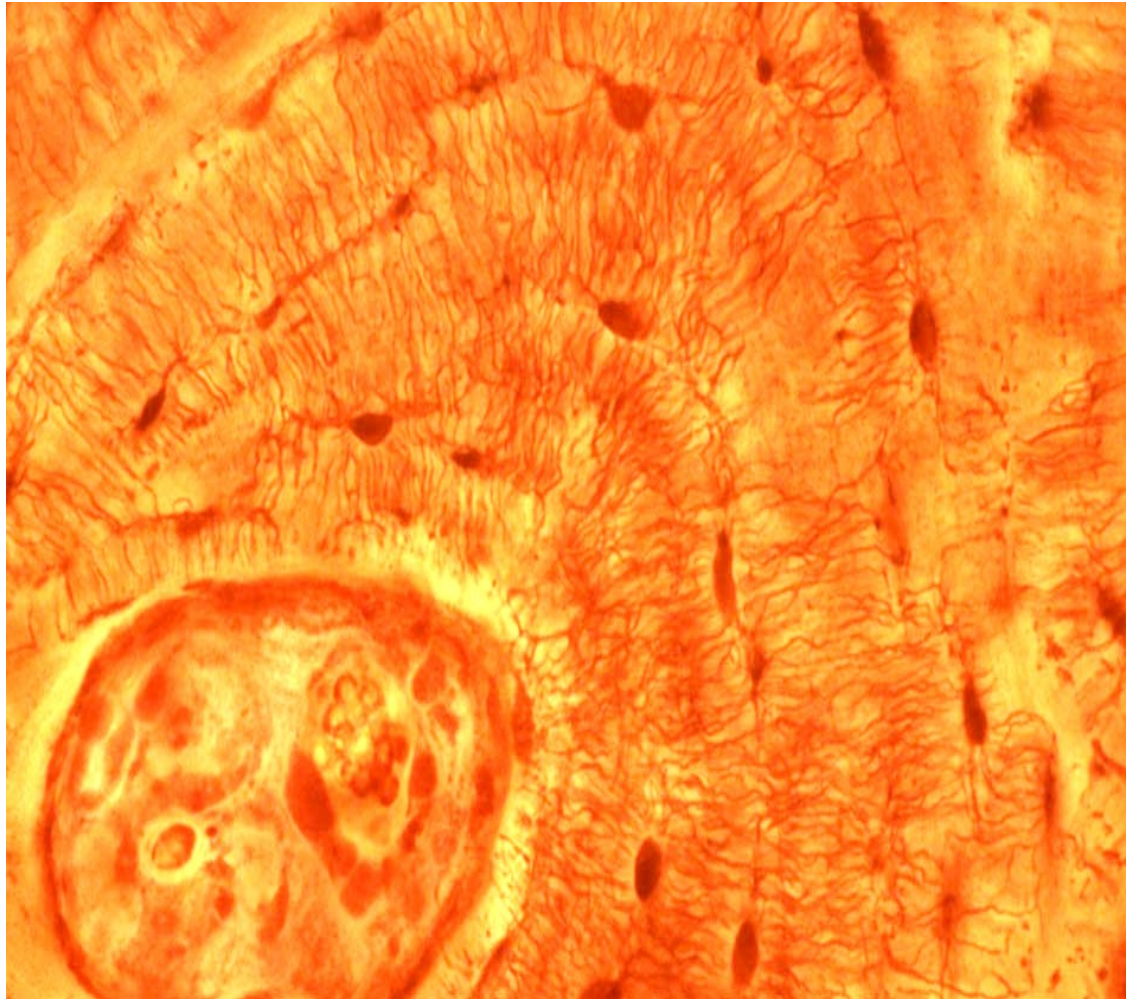


Speciální metody barvení

Prep. 95 – kost

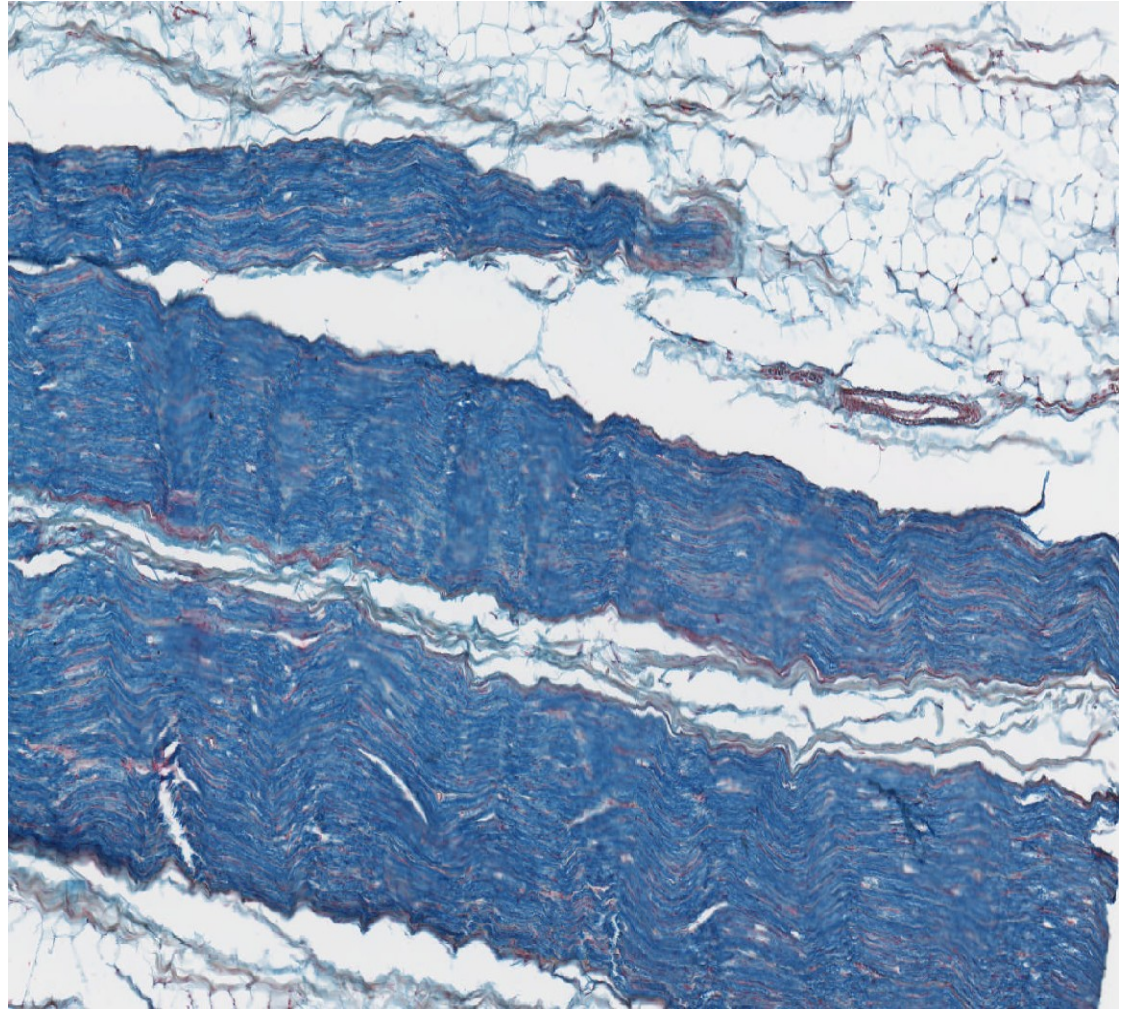
Barvení – **Schmorl**

Výsledek – **rezavě hnědá**
kostní tkáň



Speciální metody barvení

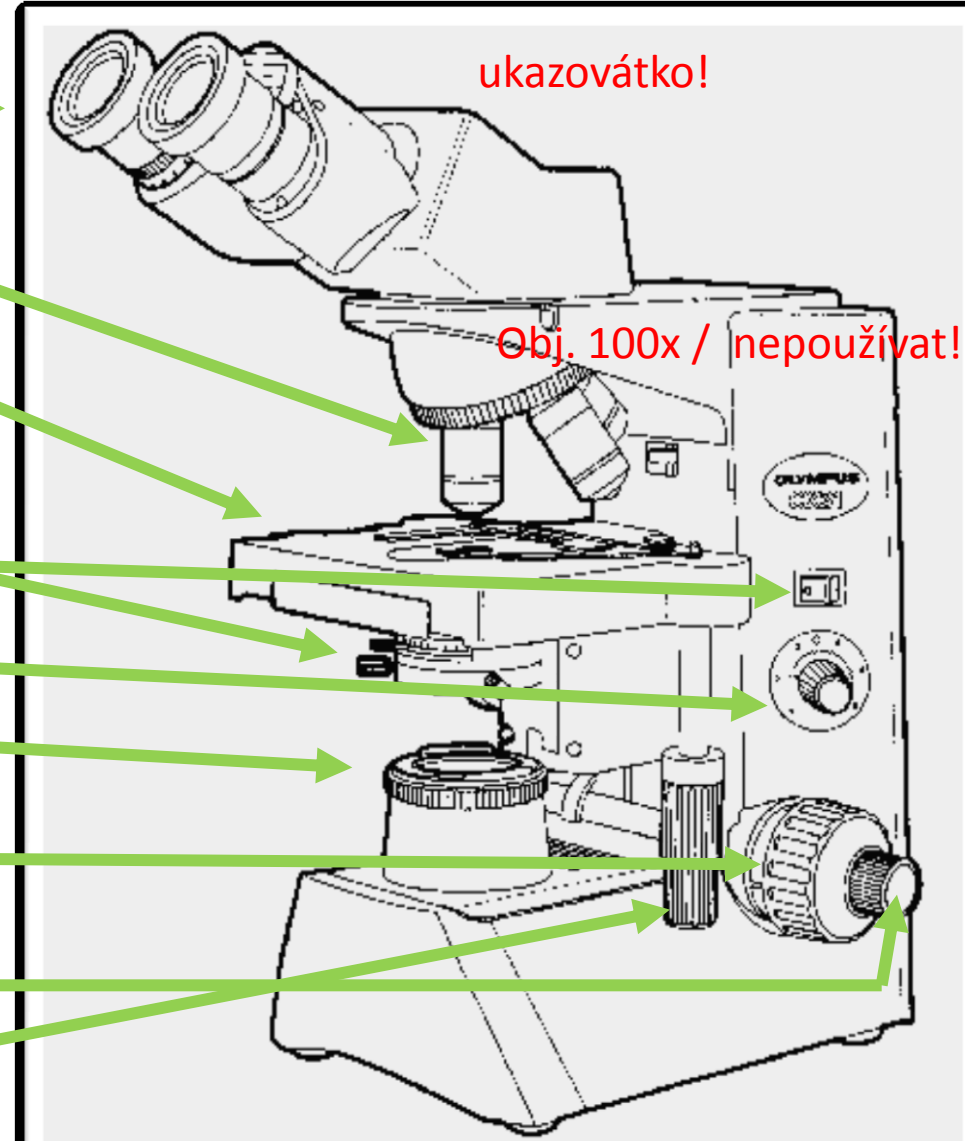
Prep. 87 – nerv - myelin
Barvení – **luxolová modř**
Výsledek – **modrý myelin**



Světelný mikroskop

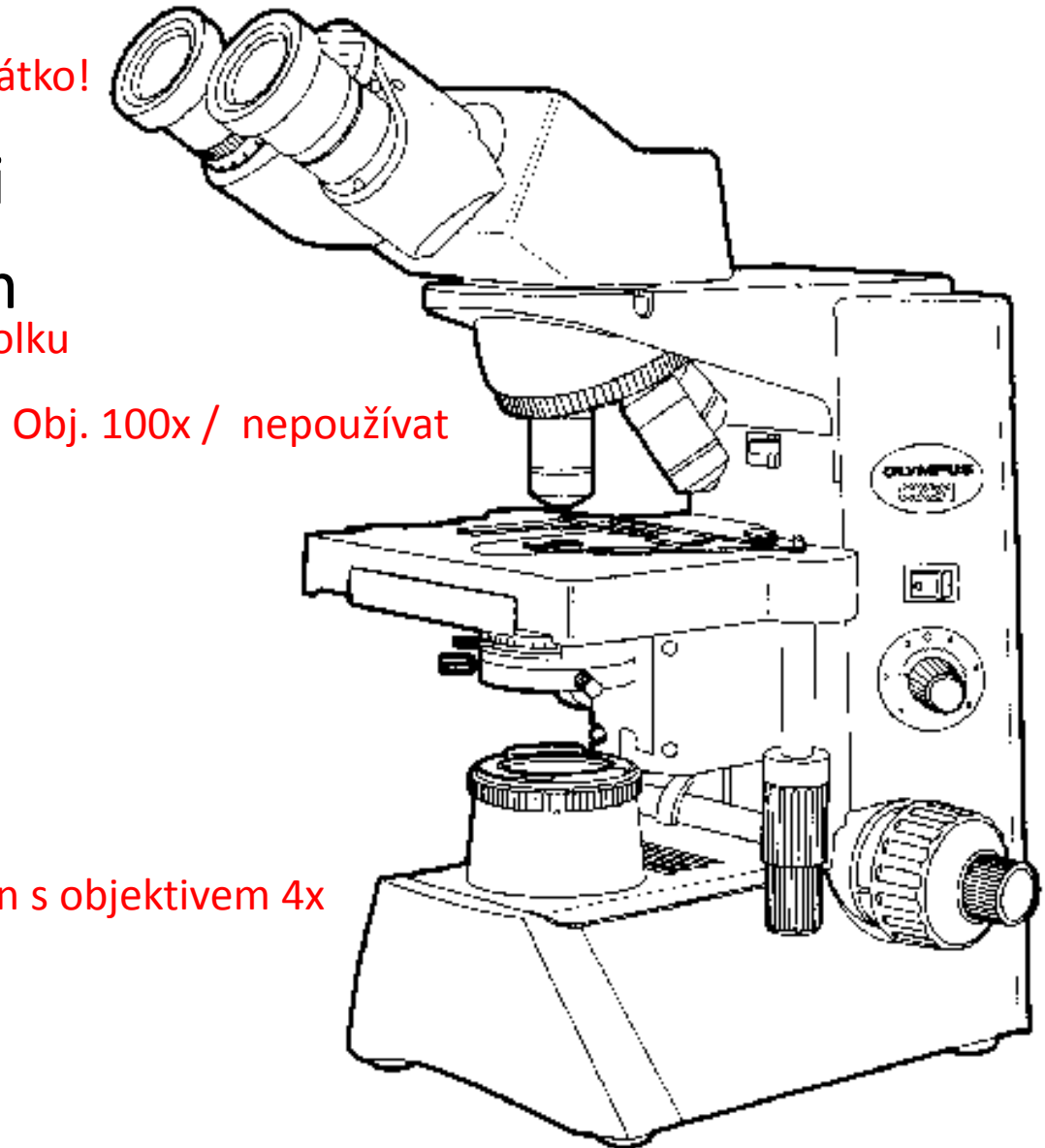
Orientace preparátu krycím sklem nahoru.

- okuláry
- objektivy s čočkami
4x, 10x, 40x, imerzní obj. – 100x
- stolek s preparátem
+pérko k fixaci preparátu na stolku
- clona
- on/off
- regulace intenzity světla
- zdroj světla
- makrošroub - ostřit jen s
objektivem 4x
- mikrošroub
- posun preparátu



Světelný mikroskop

- okuláry ukazovátko!
- objektivy s čočkami
- stolek s preparátem
+pérko k fixaci preparátu na stolku
- clona
- on/off
- regulace intenzity světla
- zdroj světla
- makrošroub - ostřit jen s objektivem 4x
- mikrošroub
- posun preparátu



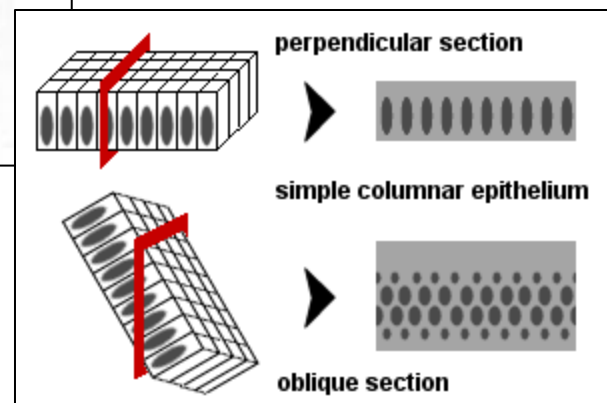
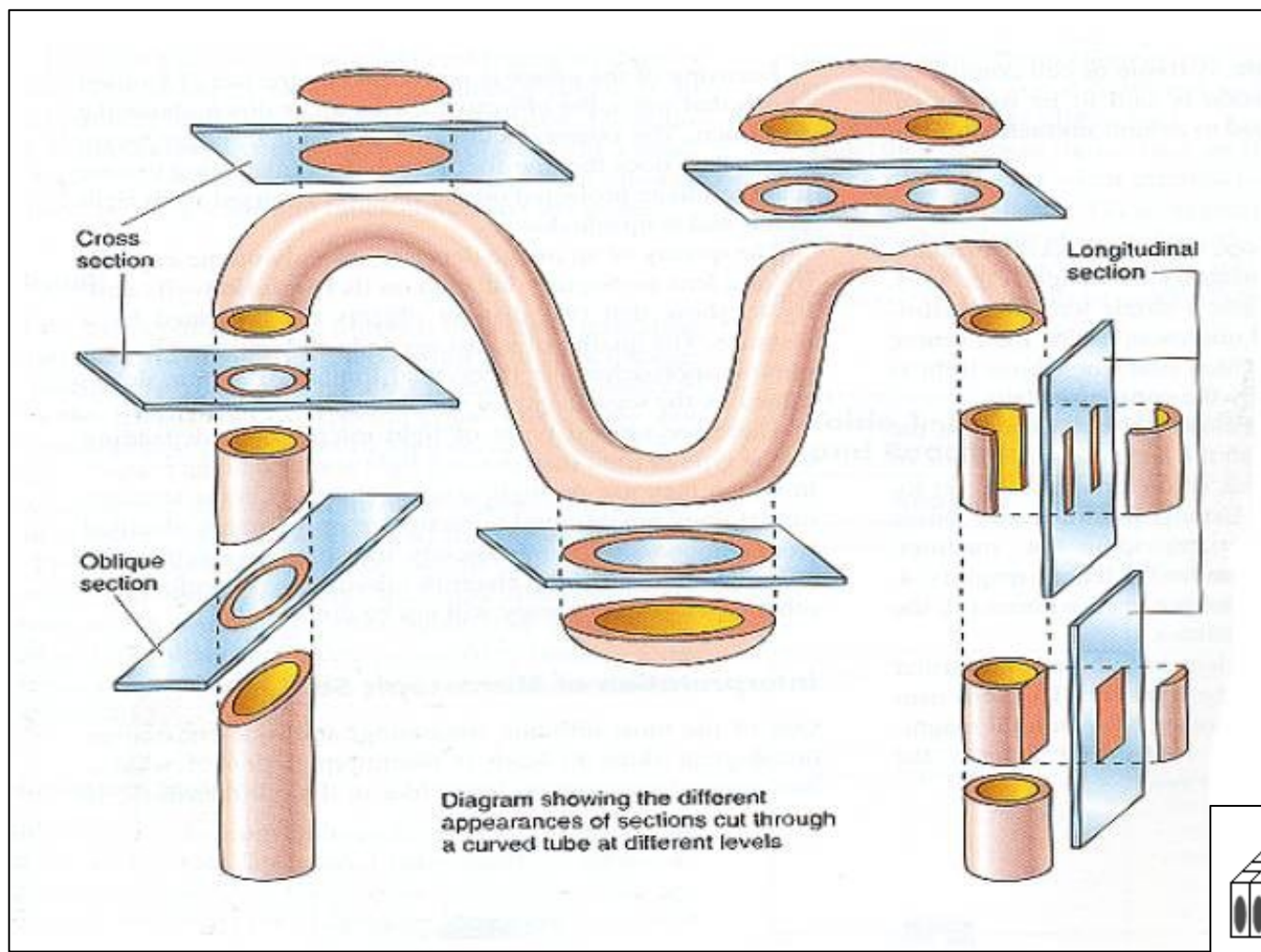
Instrukce

- Zapněte světlo.
- **Začněte s objektivem 4x.**
- položte preparát na stolek mikroskopu – krycím sklíčkem nahoru.
- Pohlédněte do mikroskopu a zaostřete. Použijte hrubé zaostření a jakmile je obraz víceméně vidět, použijte jemné ostření obrazu.
- Seřídte světlo.
- Seřídte okuláry.
- Přepněte na objektiv 10x. K zaostření obrazu by měl stačit šroub pro jemné ostření. Pokud ztratíte obraz, vraťte se k objektivu 4x a začněte znovu.
- Chcete-li vidět detailní obraz, přepněte na objektiv 40x. **Objektiv 100x nepoužívejte!**
- Chcete-li studovat další preparát, přepněte zpět na obj. 4x před výměnou preparátu.
- V každém okamžiku během praktika může být vyjmut **pouze jeden preparát**. NE víc!
- Po skončení práce s mikroskopem (na konci praktika), nastavte objektiv 4x ztlumte intenzitu osvětlení, zhasněte světlo, přikryjte mikroskop obalem.
- Na konci praktika bude krabice s preparáty zkontrolována za přítomnosti studenta, který s ní pracoval. Teprve pak může student opustit pracovní místo.

PRAVIDLA PRO ZACHÁZENÍ S PREPARÁTY

1. Na začátku každého praktika zkontrolujte sadu preparátů a zjištěné závady (např. chybějící nebo rozbitý preparát) oznamte učiteli.
2. Z krabice lze vyjmout vždy pouze jeden preparát!
3. Preparát na stolku mikroskopu musí být vždy orientován krycím sklíčkem nahoru, tj. proti čočce objektivu.
4. Při manipulaci s preparáty buďte maximálně opatrní; v případě poškození preparátu informujte učitele.
5. Na konci každého praktika nechte krabici s preparáty otevřenou ke kontrole, během níž musí student zůstat na svém pracovním místě.

ZOBRAZENÍ 3D ÚTVARŮ V 2D ROVINĚ ŘEZU



Základní barvicí metody v histologii

Práce se světelným mikroskopem

Preparáty :

2 – Apex linguae (HE)

11 – Oesophagus (HEŠ)

99 – Pupečník (AZAN)

76 – Cortex cerebri (impregnace)

49 – Vagina – glykogen (Bestův karmín)