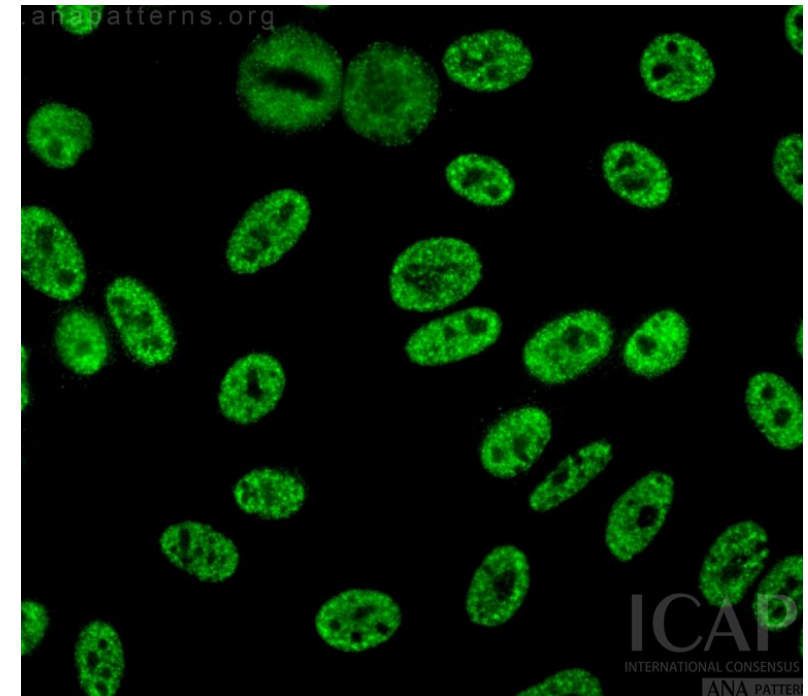




# Imunofluorescence

diagnostika autoimunitních onemocnění

Peter Slanina (peter.slanina@fnusa.cz)  
Ústav klinické imunologie a alergologie  
FN u sv. Anny a Lékařská fakulta MU



# Serologické metody

## 1. Klasické serologické metody

- Aglutinace (přímá / nepřímá)
- Precipitace (v kapalině, v gelu)

## 2. **Imunochemické metody s následnou detekcí**

- **Imunofluorescence (přímá / nepřímá)**
- Imunoanalýza (EIA-ELISA, RIA, FIA, LIA)
- Immunoblot, imunodot

## 3. Metody založené na efektorovém účinku protilátek (využívané v klinické mikrobiologii)

- Komplement fixační reakce
- Inhibiční a neutralizační testy

# Fluorescence

- Luminiscence

Jev, při kterém látka emituje záření po absorpci energie - excitačního záření (Fotoluminiscence) nebo při chemické reakci (Chemiluminiscence)



Zdroj:  
[www.chemiaasvetlo.sk/teoria/chemiluminiscencia/](http://www.chemiaasvetlo.sk/teoria/chemiluminiscencia/)



Zdroj: [www.infobiologia.net/2017/01/bioluminiscencia-animales-bacterias.html](http://www.infobiologia.net/2017/01/bioluminiscencia-animales-bacterias.html)

## Fotoluminiscence

### Fluorescence

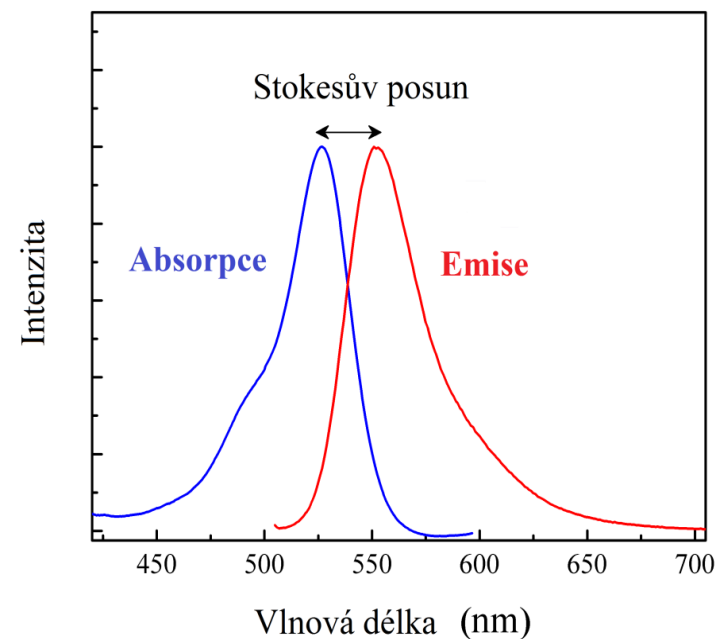
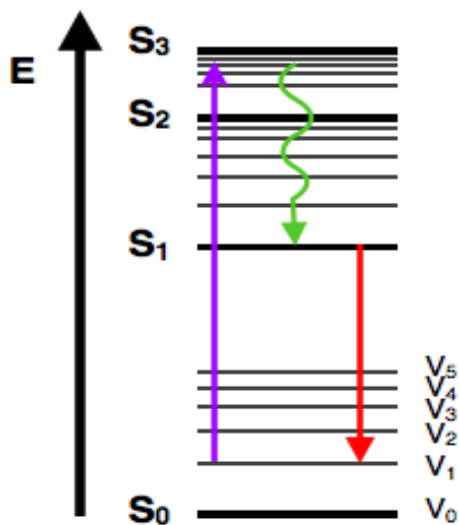
emise záření krátce po excitaci ( $10^{-8}$  až  $10^{-5}$  s)

### Fosforescence

emise záření trvá delší dobu ( $10^{-2}$  s až dni)

# Fluorescence

- Látka po absorpci excitačního záření uvolňuje emisní záření o delší vlnové délce (nižší energii) – tento jev se nazývá **Stokesův posun**
- Při návratu elektronů do základní hladiny se část energie **transformuje** do jiných, nefluorescenčních procesů (uvolnění tepla, rezonanční přenos energie na okolní molekuly...)



# Imunofluorescence (IF)

využití fluorochromem značených protilátek

## ➤ Přímá IF

Slouží k detekci **antigenů** – vazba konjugátu přímo na antigen

**Využití:**

histologie – prokázání antigenu ve tkáni

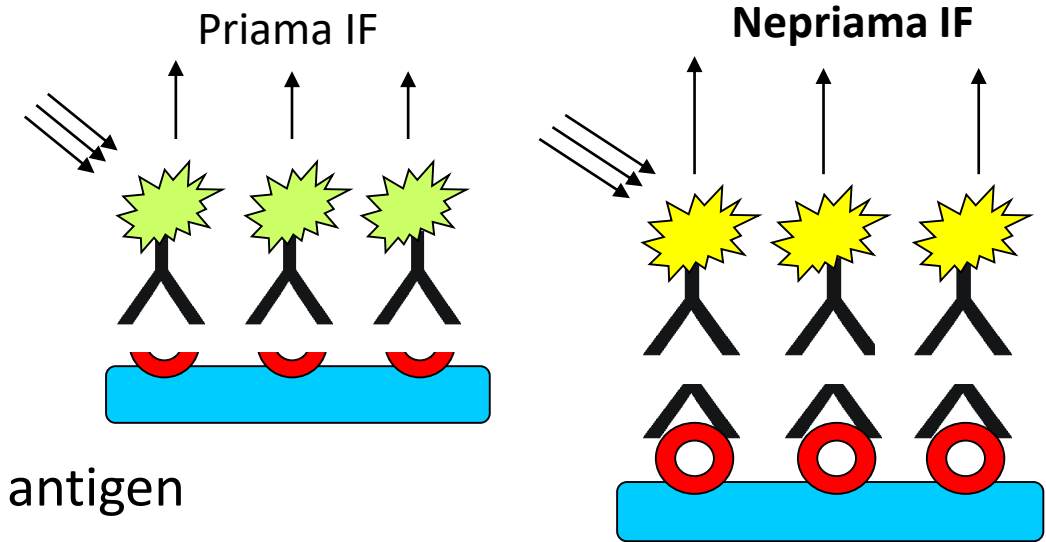
mikrobiologie – rychlá detekce patogenů v biologickém materiálu

## ➤ Nepřímá IF

Používá se k detekci **protilátek** v séru → vazba protilátek a konjugátu v 2 krocích:

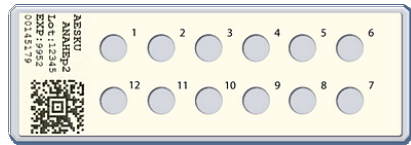
1. Na sklíčko se substrátem se nanese vyšetřovaný materiál (sérum), pokud jsou v něm přítomné hledané protilátky, naváží se na antigenní substrát na sklíčku
2. Nanese se konjugát, který se váže na protilátku příslušné izotypové třídy (IgG/IgA)

**Využití:** důkaz specifických protilátek, nejčastěji autoprotiátek



# Základní princip imunofluorescence (IF) – detekce autoantilátěk

1. Na sklíčko se substrátem (který obsahuje cílové antigeny) se aplikuje naředěné sérum pacienta (1:80 základní ředění) + vzorky pozitivní a negativní kontroly



2. Inkubace  
30 min v temnu

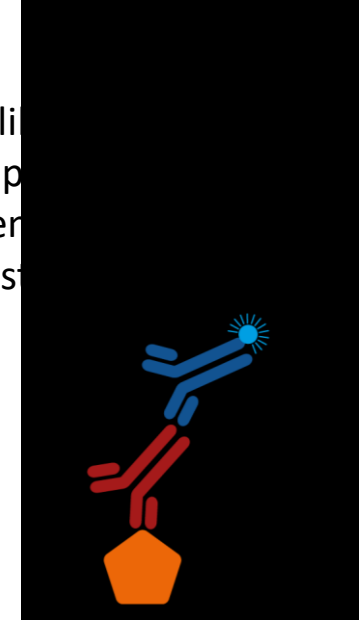
2. Pokud autoantitělům na sklíčku je přítomen cílový antigen (řez tkáně)



3. Promytí skel v PBS+TWEEN – 5 min



4. Aplikace fluorescenčně značených sekundárních antitěl (FITC) – nejčastěji

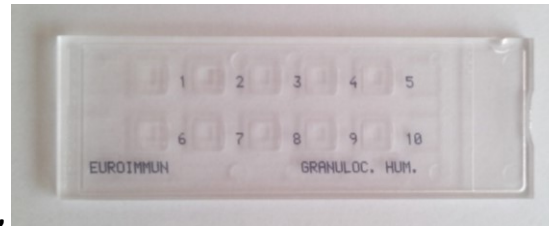


5. Inkubace 30 min v temnu



6. Promytí skel v PBS+TWEEN – 5 min

7. Otření hrany skla od přebytečného PBS+TWEEN, na jednotlivé pozice aplikace 1 kapky (cca 10ul) montovacího média - glycerinu



8. Usazení krycího skla, kontrola správného usazení, nutno se vyvarovat bublinám

9. Skla jsou připravena k odečtení na mikroskopu



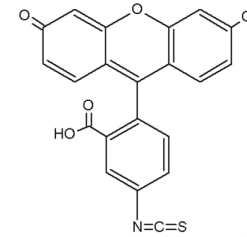
# Imunofluorescence



## Antigenní substráty používané při nepřímé IF

- **Buňky HEp2** (Human Epithelial) – detekce **ANA** (anti-nukleární protilátky)
  - odvozené z linie HeLa (karcinom děložního čípku)
  - rychle se dělící buňky, v mitóze pozorovatelná **chromatinová destička** – důležitý znak pro odlišení jednotlivých typů ANA
- **Neutrofilní granulocyty** – detekce **ANCA** (autoprotilátek proti cytoplasmě neutrofilů)
- **Crithidia luciliae** – prvok, detekce protilátek proti **dsDNA**
- **Opičí jícen** – detekce **EMA** (protilátky proti endomysiu)
- **LKS** (liver, kidney, stomach) – detekce **AMA** (anti-mitochondriální Ab), **ASMA** (Ab proti hladkému svaly), **GPC** (gastic parietal cells), **RET** (Ab proti retikulínu) ...
  - kombinace 3 krysích tkání

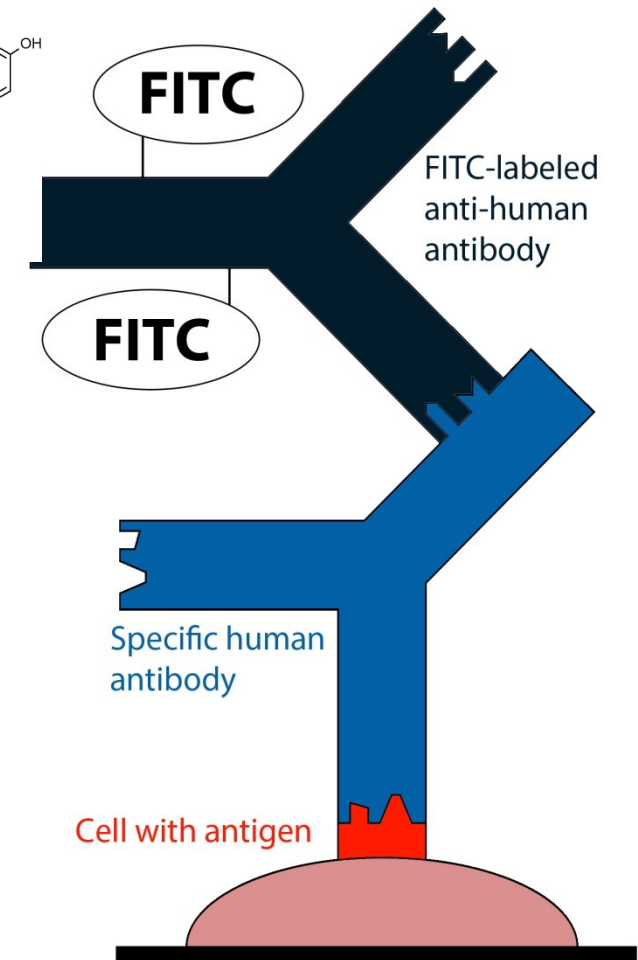
# Konjugát



- Protilátka s navázaným fluorescenčním barvivem (fluorochromem)
- Nejčastěji používaný fluorochrom je **FITC** (fluoresceinizothiokyanát)

excitační/emisní vlnová délka 495/520 nm (zelené světlo)

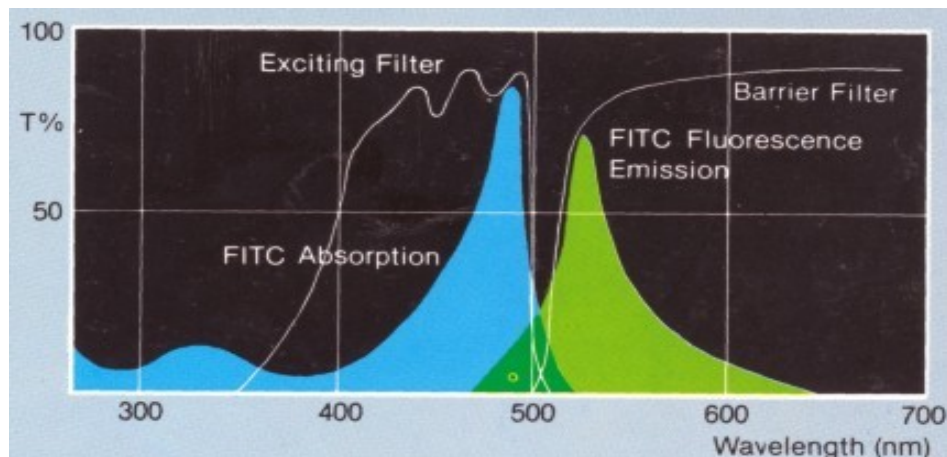
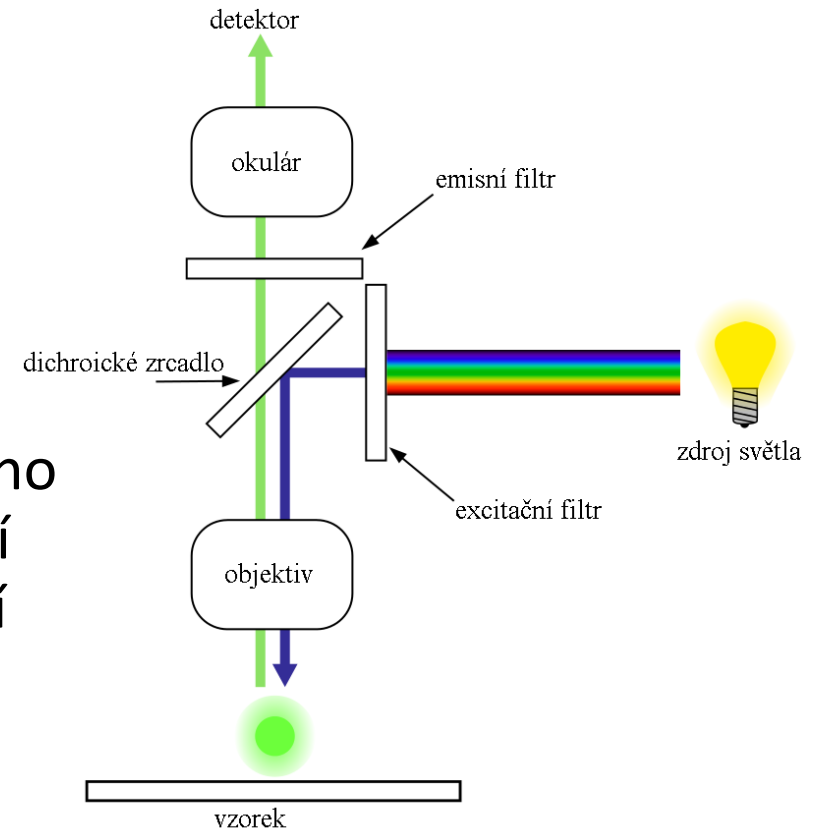
- Konjugát se specificky váže jen na imunoglobuliny určité izotypové třídy (**IgG/IgA**) – výběrem konjugátu stanovíme protilátky jen této třídy
- Pro některé autoimunitní onemocnění má klinický význam výskyt autoprotílátek v určité izotypové třídě (např. celiakie – IgA)





# Fluorescenční mikroskop

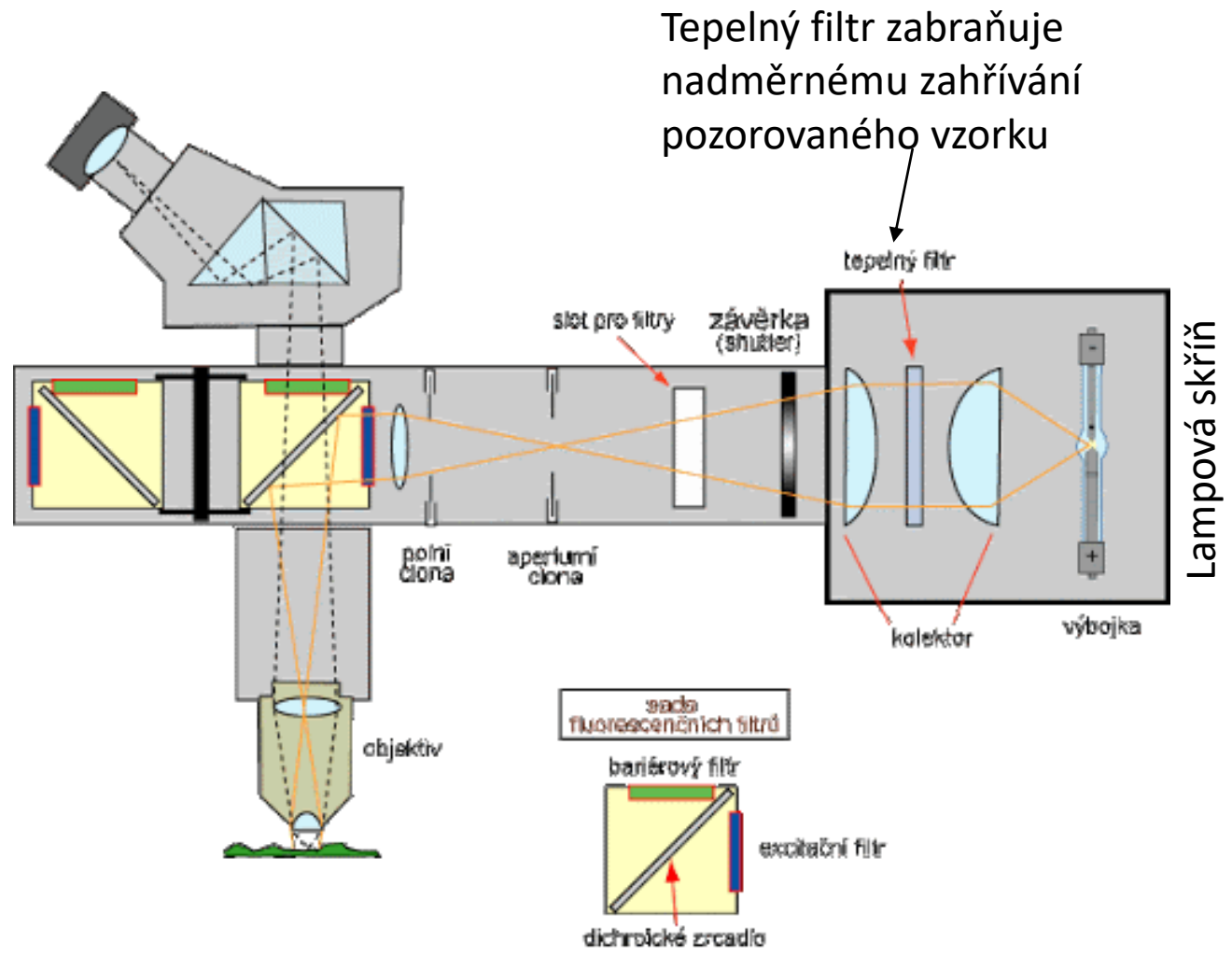
- Zdroj světla – rtuťová výbojka, **LED dioda**
- Excitační filtr – propouští pouze část spektra potřebného pro excitaci fluorochromu a zabraňuje přechodu záření v oblasti emisní vlnové délky, která by vytvářela pozadí
- Emisní (bariérový) filtr – propouští pouze emisní část spektra a zabraňuje průchodu excitačního záření



- **Binokulár/trinokulár**
- Jednoduché polarizované světlo  
Brightfield, Darkfield, **Fluorescencia**

Součástí moderních fluorescenčních mikroskopů je také počítač s monitorem

# Schéma fluorescenčního mikroskopu



# Laboratorní postup při podezření na autoimunitní onemocnění

- Celý proces začíná v ordinaci lékaře
  - Ordinuje vyšetření na autoprottilátky – na základě kliniky+anamnézy (může určit, zda vyšetření požaduje imunofluorescenčně nebo ELISOU/imunoblotem)
- Do laboratoře přichází krev pacienta se žádankou
- Příjem – příprava séra centrifugací srážlivé krve
- Zamražení sér
- V okamžiku, kdy laboratoř nasbírá dostatečný počet vzorků od pacientů pro konkrétní vyšetření → následuje zahájení vlastního vyšetření

Pozn. Proč čekáme na dostatečný počet vzorků? Napravo je ukázka klasického sklíčka s připraveným substrátem od výrobce – zde na 8 vzorků. Sklo je nutné zpracovat plně obsazené, jinak by vyšetření bylo značně finančně nevýhodné. Při zpracování skla pouze s jednou využitou jamkou bychom o zbylých 7 přišli.



Imunologické vyšetření		
Ústav klinické imunologie a alergologie Oddělení laboratorní imunologie Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Pekařská 53, 656 91 BRNO tel.: 543 183 130, fax: 543 183 143, www.fnusa.cz		
<b>Autoprottilátky proti:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>B2-GP1</li> <li>centromera</li> <li>citruinované proteiny (CCP)</li> <li>ds-DNA</li> <li>endomysium (EMA)</li> <li>ENA (screening)</li> <li>SS-A(Ro)</li> <li>SS-B(La)</li> <li>Sci-70</li> <li>Sm/RNP</li> <li>Jo-1</li> <li>fosfolipidy (AFL IgG, IgM)</li> <li>GAD, IA-2</li> <li>GBM</li> <li>GPC</li> <li>histony</li> <li>kardiolipin (ACLA IgG, IgM)</li> <li>kardiolipin (ACLA IgA)</li> <li>LC-1</li> <li>LKM-1</li> <li>mitochondrie (AMA)</li> <li>mutovaný citruinovaný vimentin (MCV)</li> <li>PLA2 receptor (APLAR)</li> <li>nukleosomy</li> <li>retikulin (IgG, IgA)</li> <li>SLA</li> <li>štítná žláza (TG, TPO)</li> <li>tkáňová transglutamináza (TTG)</li> <li>U1 RNP</li> <li>prottilátky proti IgA</li> </ul>	<b>Autoprottilátky:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>ANA (IF)</li> <li>ANA (BLOT)</li> <li>ANCA</li> <li>ASMA</li> <li>RF</li> <li>RF (IgG, IgA, IgM)</li> </ul>	<b>Imunoglobuliny</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>IgD</li> <li>podtřídy IgA (IgA1-IgA2)</li> <li>podtřídy IgG (IgG1-IgG4)</li> <li>* kryoglobulin</li> </ul>
	<b>Buněčné testy</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>základní buněčné vyšetření (CD3+, CD4+, CD8+, CD19+, CD16+56+)</li> <li>další CD znaky</li> <li>HLA B27</li> <li>proliferační testy</li> <li>bronchoalveolární laváž-BAL CD3+ CD4+ CD8+</li> </ul>	<b>Komplementový systém</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>klasická cesta aktivace</li> <li>alternativní cesta aktivace</li> <li>C1 inhibitor kvantitativně</li> <li>C1 inhibitor funkční test</li> <li>C1q</li> <li>C2</li> <li>C3</li> <li>C4</li> <li>C5</li> <li>MBL</li> </ul>
	<b>Fagocytární testy</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>burst test</li> <li>stanovení přítomnosti myeloperoxidázy</li> </ul>	<b>Proteiny akutní fáze</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>CRP</li> <li>alfa-1-antitrypsin</li> <li>alfa-2-makroglobulin</li> <li>ceruloplasmin</li> <li>orosomukoid</li> <li>prealbumin</li> <li>transferin</li> </ul>
	<b>Cirkul. imunokomplexy</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>CIK PEG</li> <li>CIK C1q</li> </ul>	<b>Imunoglobuliny</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>IgG</li> <li>IgA</li> <li>IgM</li> <li>IgE</li> </ul>

# Vlastní zpracování vzorku na IF – 2 různé přístupy

Princip zpracování – viz. Slide č. 6

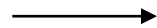
## 1. Zpracování manuálně

- Manuální zpracování provádí zdravotní laborantka
- Výhody:
  - Rychlejší zpracování v porovnání s automatickou metodou
- Nevýhody:
  - Možnost vzniku lidských chyb, např. záměna vzorku, vznik artefaktů nedodržením návodu



## 2. Zpracování automaticky – přístroj HELMED

- V současné době se vzhledem k narůstajícímu množství vzorků a snaze eliminovat lidskou chybu upřednostňuje automatické zpracování IF
- Výhody:
  - Eliminace lidských chyb
  - Redukce manuální práce
- Nevýhody:
  - Delší zpracování v porovnání s manuální metodou
  - Přístroj je náročnější na údržbu a zacházení



# ANA protilátky

## anti-nuclear antibodies

- Jedná se o obsáhlou skupinu autoprotilátek, které jsou zaměřeny vůči různým **jaderným strukturám** (např. centromera, mitotický aparát, DNA, histony..)
- Výskyt u systémových autoimunitních onemocnění
- Jedná o **nejčastěji stanovované** autoprotilátky pomocí IF → odečítá se 5-10 skel/den
- Substrátem pro stanovení ANA protilátek jsou **Hep-2 buňky**
- Podskupinou ANA jsou ENA protilátky – proti extrahovatelným nukleárním antigenům (jedná se o takové antigeny jádra buněk, které mají vyšší Mr a lze je extrahovat → např. SSA, SSB, Jo-1, Scl-70...)
- ENA protilátky – stanovují se ELISOU/ImunoBlotem

# ANA (Anti Nuclear Antibodies)



- Výskyt při různých **systemových autoimunitních onemocněních** (systemový lupus erytematodes, Sjögrenův syndrom, revmatoidní artritida, ...)



**Fluorescenční obraz** v mikroskopu může vypadat stejně nebo podobně u různých protilátek – pokud vidíme určitý obraz, **nevíme ještě, o jakou autoprotlátku se jedná** (na jaký antigen se váže), k jejímu bližšímu určení mohou pomoci jiné metody (ELISA, ImunoBlot)

# ANA protilátky – ředění vzorků

- Stanovení ANA protilátek – sérum pacienta se vždy ředí v základu 1:80



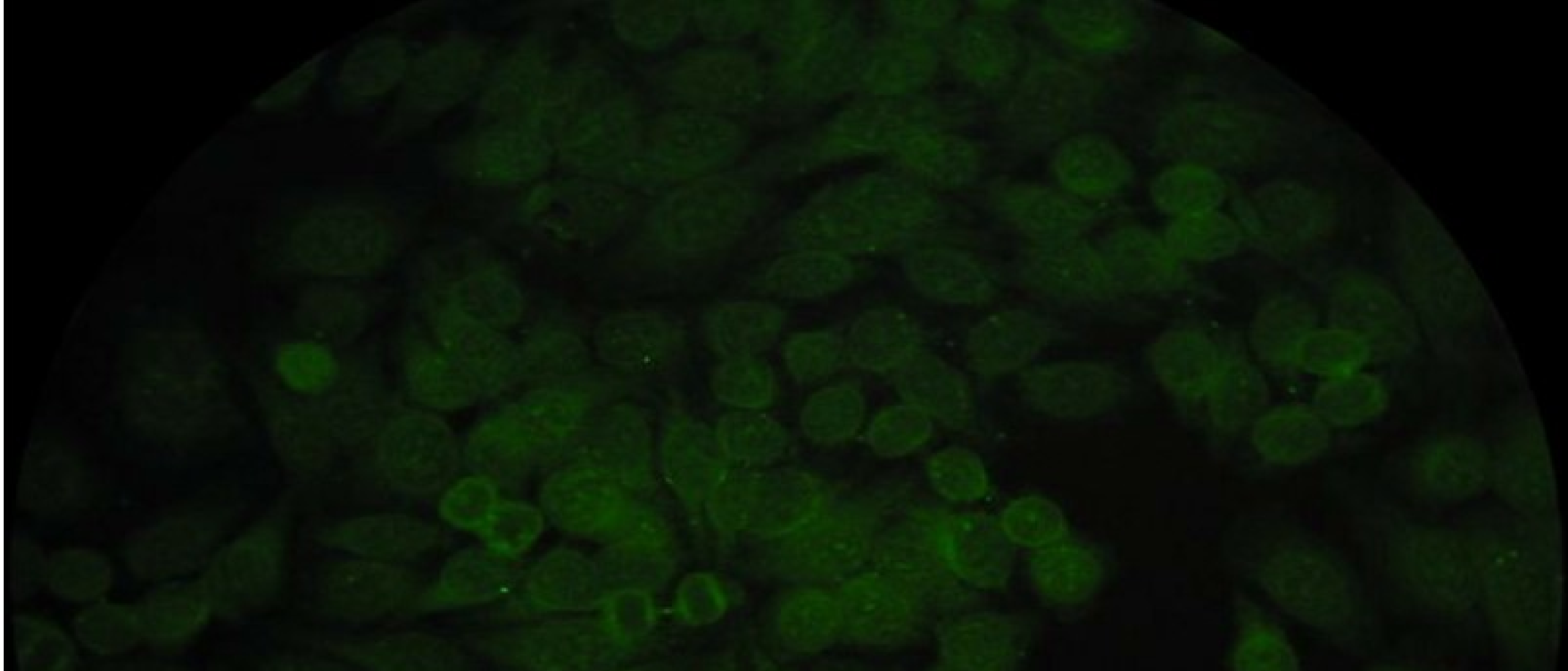
První čtení - odečtení IF při ředění 1:80



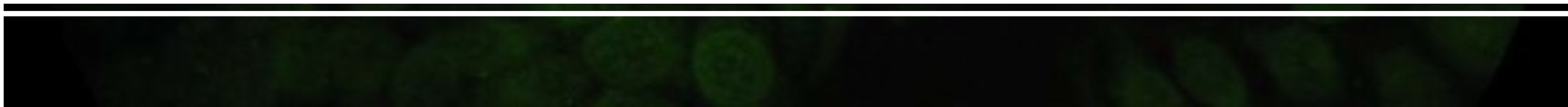
Pokud je vzorek pozitivní, odečítající VŠ indikuje vyšetření opakovat druhý den s vyšším ředěním (1:160, 1:320, 1:640, 1:1280) – ředění záleží na intenzitě fluorescence daného vzorku a vyžaduje zkušenosti odečítajícího



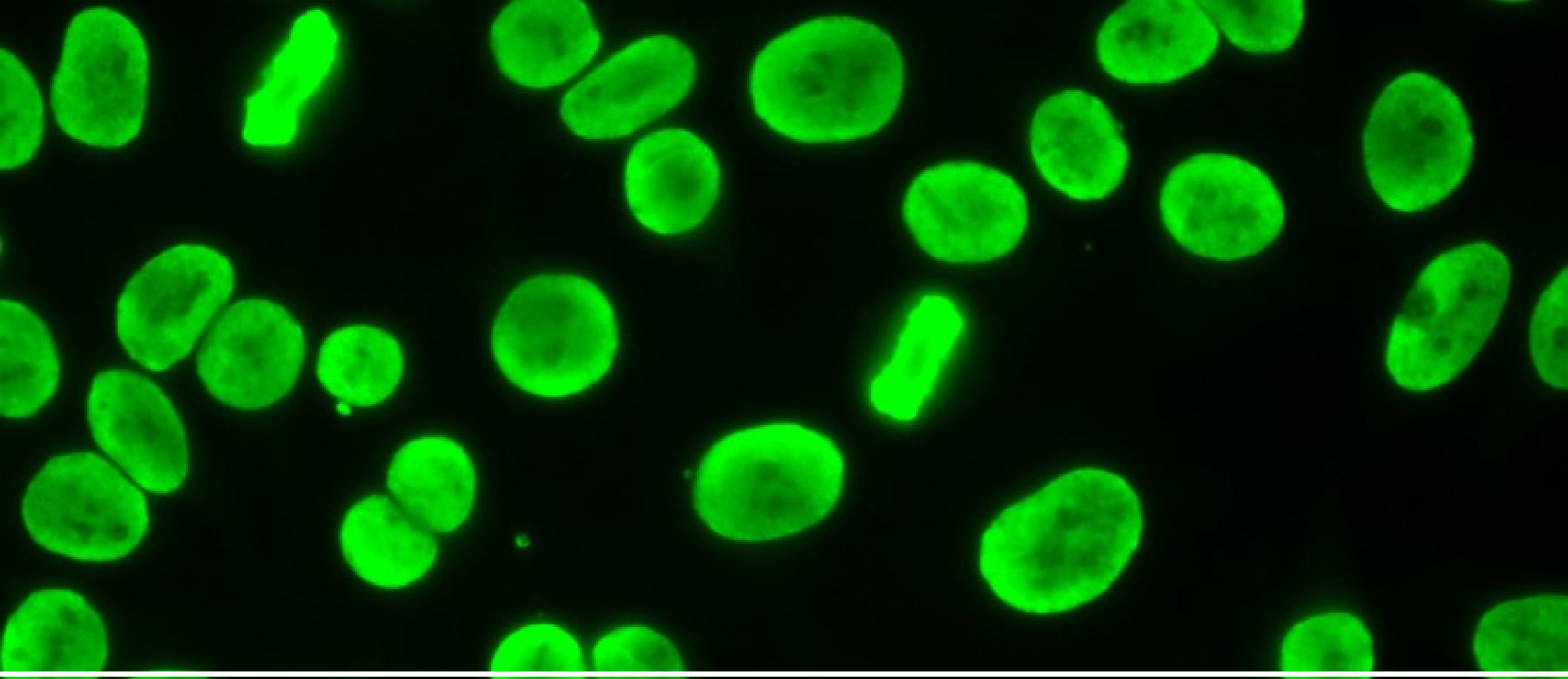
Po zpracování skel s vyšším ředěním následuje druhé čtení. Pokud je vzorek pozitivní i při ředění 1:1280 → výsledek se vydává jako „vyšší než 1280“



Hep2 buňky – negativní obraz







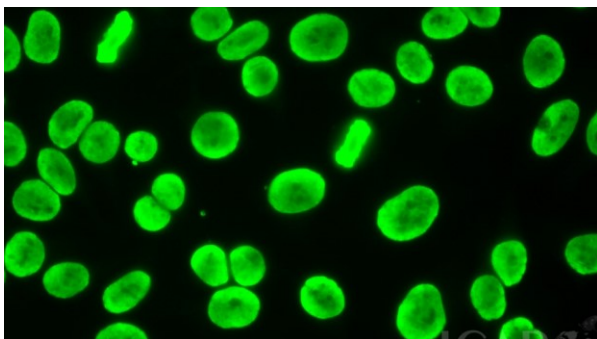
## ANA – typ homogenní

diagnóza: **SLE**, léky indukovaný lupus, juvenilní idiopatická **artritida** (antigeny: dsDNA, chromatin, nukleosomy, histony)

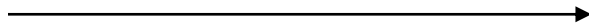
# ANA – homogenní typ fluorescence

- U homogenního typu fluorescence svítí celé jádro Hep-2 buněk
- Nelze rozlišit, zda jsou přítomné autoprotiátky namířeny vůči dsDNA nebo proteinům asociovaným s DNA (histony apod.)
- Proto si laboratoř může v některých případech sama doordinovat další vyšetření → znovu provede IF takto pozitivních vzorků, ale s jiným substrátem – prvok *Crithidia luciliae*
- Pokud v prvokovi svítí pouze kinetoplast a jádro → jedná se o autoprotiátky proti dsDNA → typické pro **SLE** (systémový lupus erythematosus)

1. ANA protiátky – homogenní typ fluorescence




2. Sérum pacienta aplikováno na substrát *Crithidium luciliae*



3. Pokud je pozitivní kinetoplast a jádro → jedná se o protiátky proti dsDNA

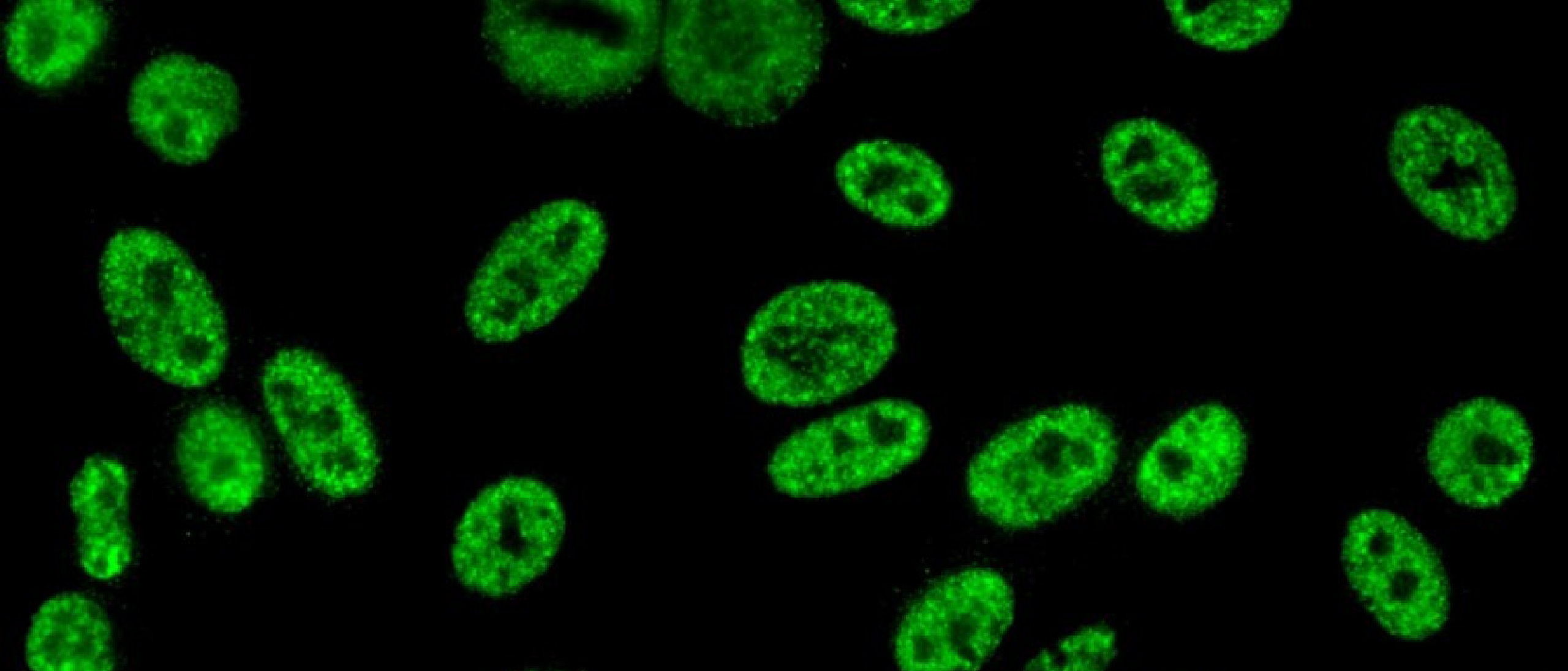


A fluorescence microscopy image showing several Crithidia luciliae cells. The cells are stained with a green fluorescent dye that highlights the dsDNA in the kinetoplast. The cells are scattered across the field of view, with some showing multiple kinetoplasts. The background is dark, making the green fluorescence stand out.

<dsDNA in the kinetoplast  
positively stained

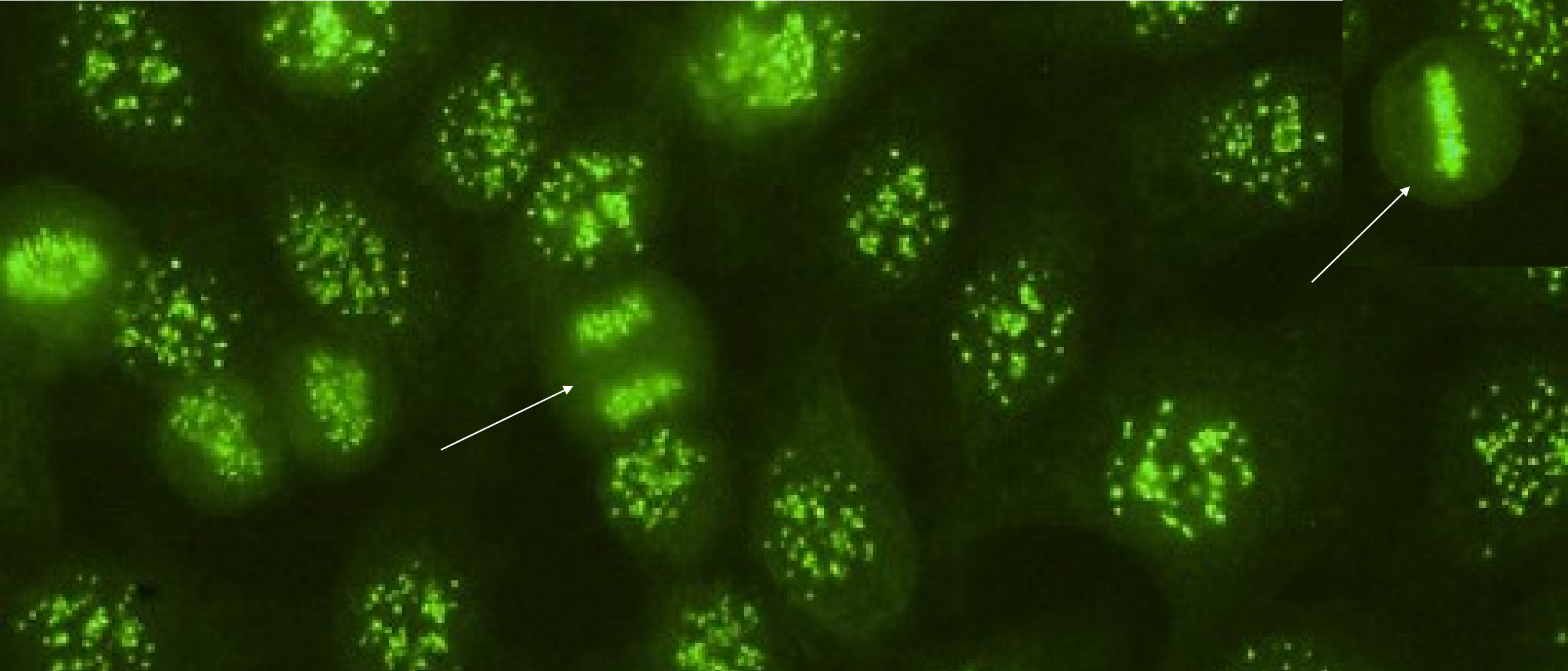
<Crithida luciliae

Prvok Crithidia luciliae – antigen je dsDNA



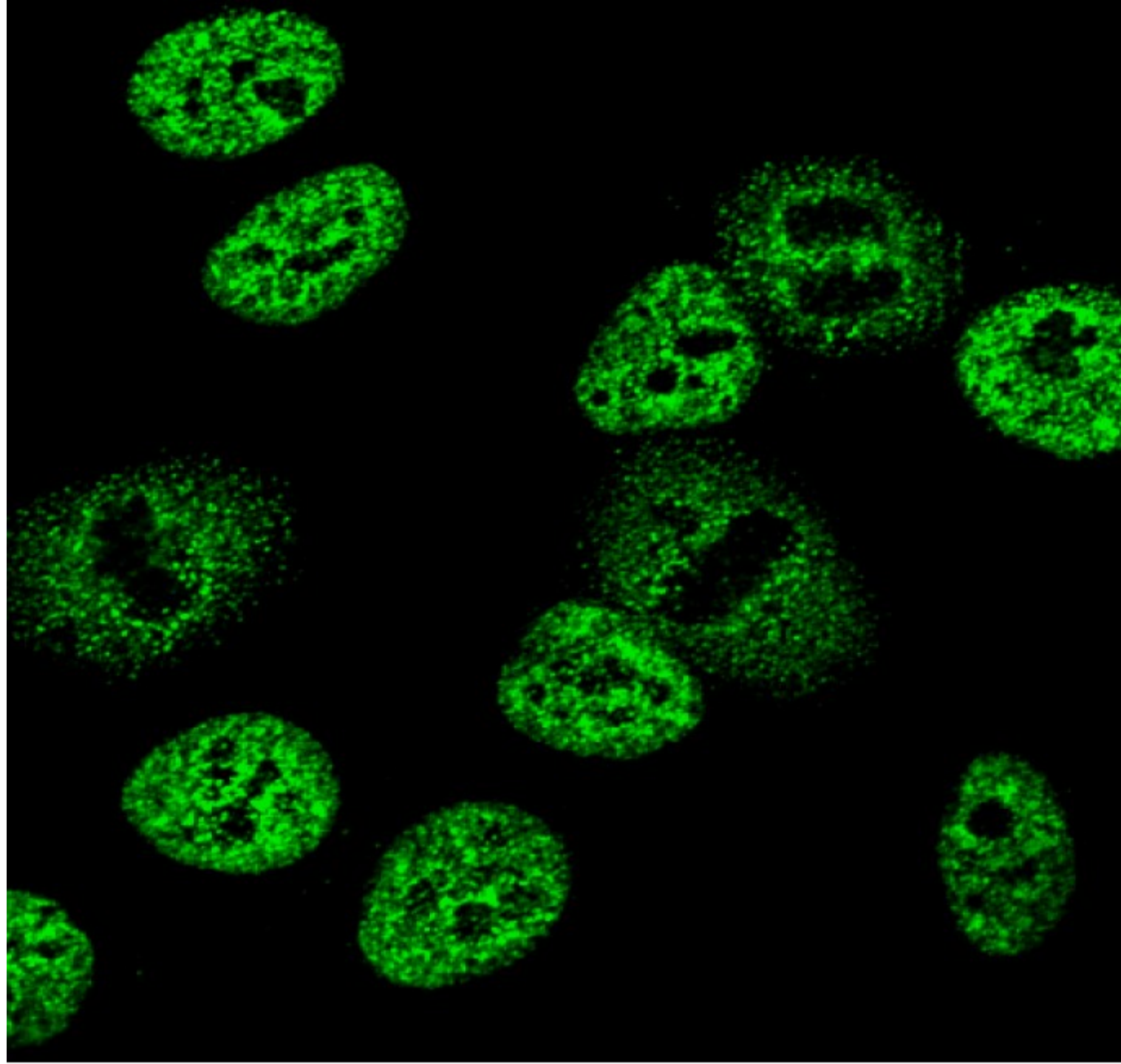
ANA – typ zrnitý (antigeny: ribonukleoproteiny ENA – Sm, SSA, SSB, U1-RNP)

diagnóza: smíšené onemocnění pojiva, Sjogrenův sy.



ANA – typ centromerický  
diagnózy: CREST syndrom, systémová sklerodermie

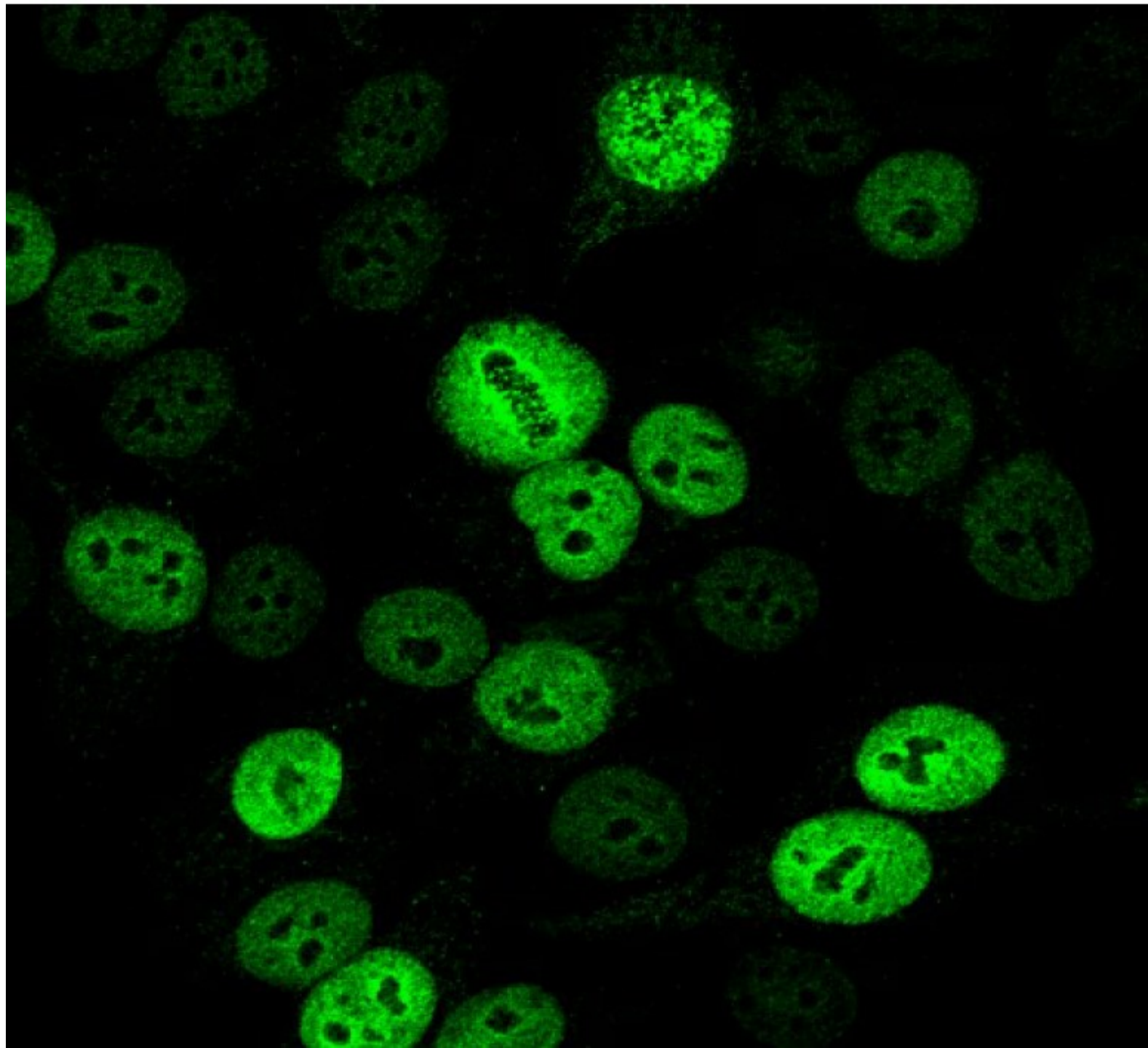
ANA typ granulární



# PCNA

proliferating cell nuclear antigen

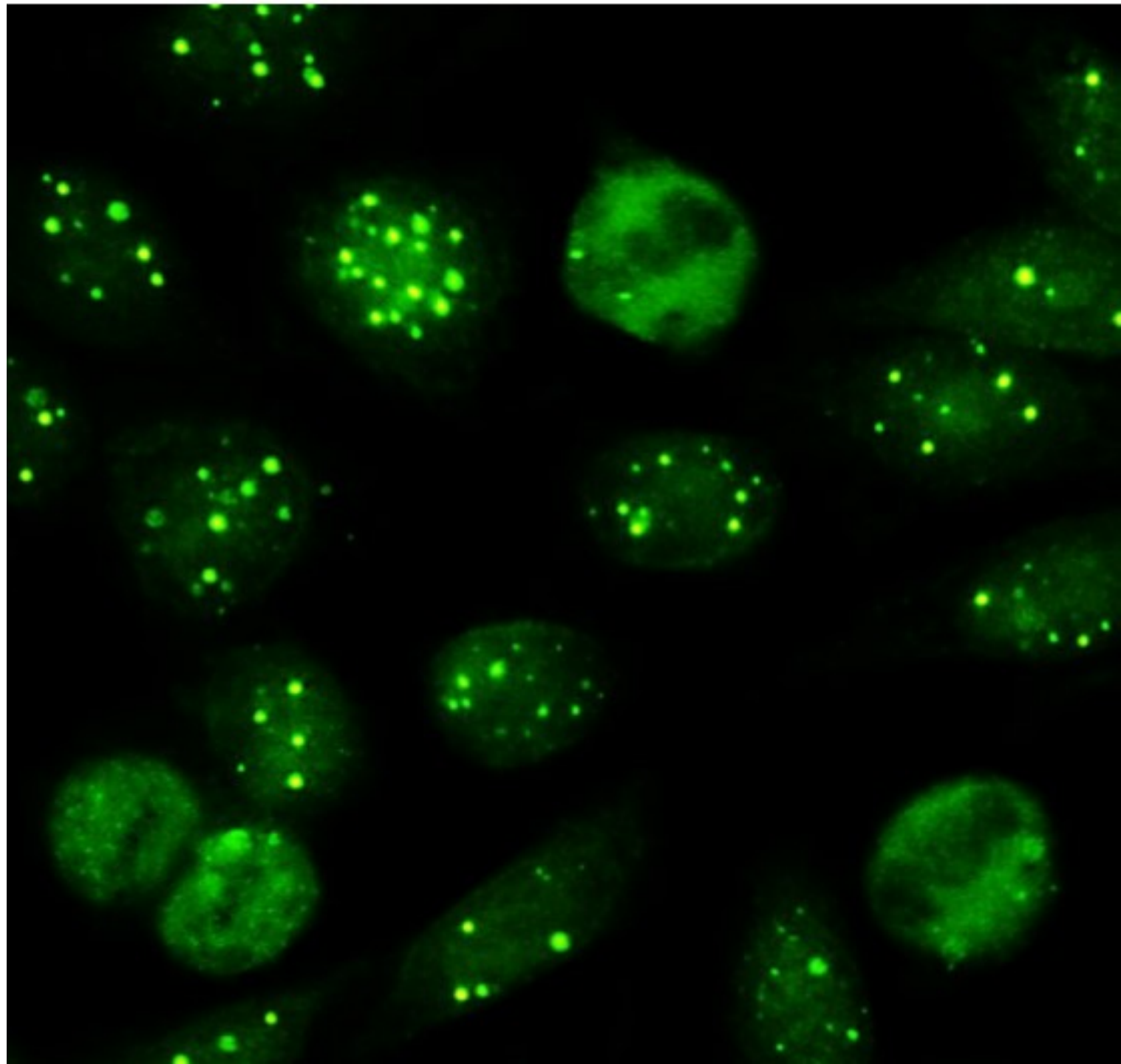
- Klinická asociace: SLE – 3%
- Dělicí se buňky v S fázi pozitivní
- Klidové buňky v G0 fázi negativní



# ANA

## četné jaderné tečky

- Antigeny: protein Sp100, Gp210
- Klinická asociace: primární biliární cirhóza
- Pacienti s tímto onemocněním negativní na AMA → svědčí pro horší prognózu onemocnění

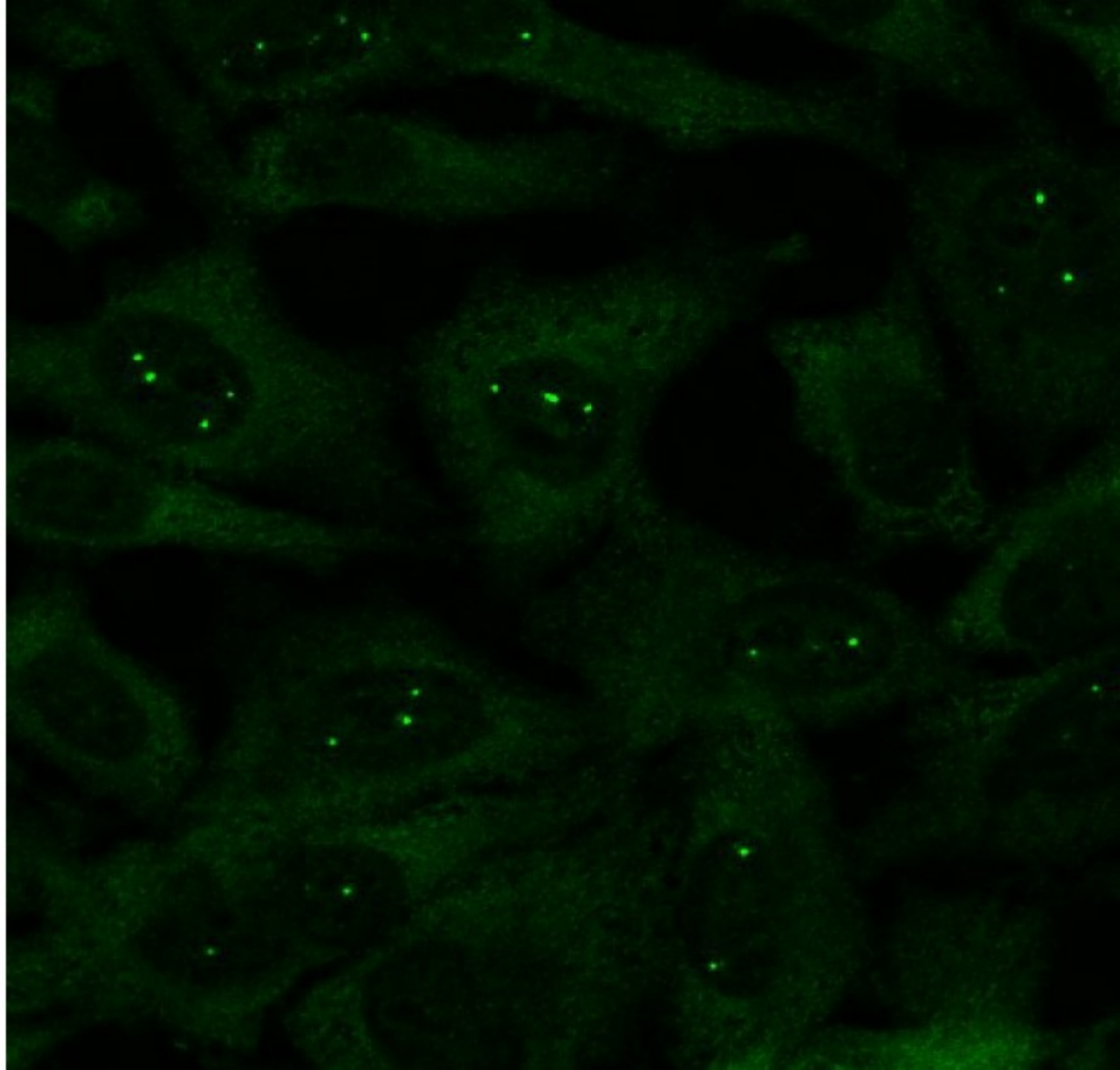


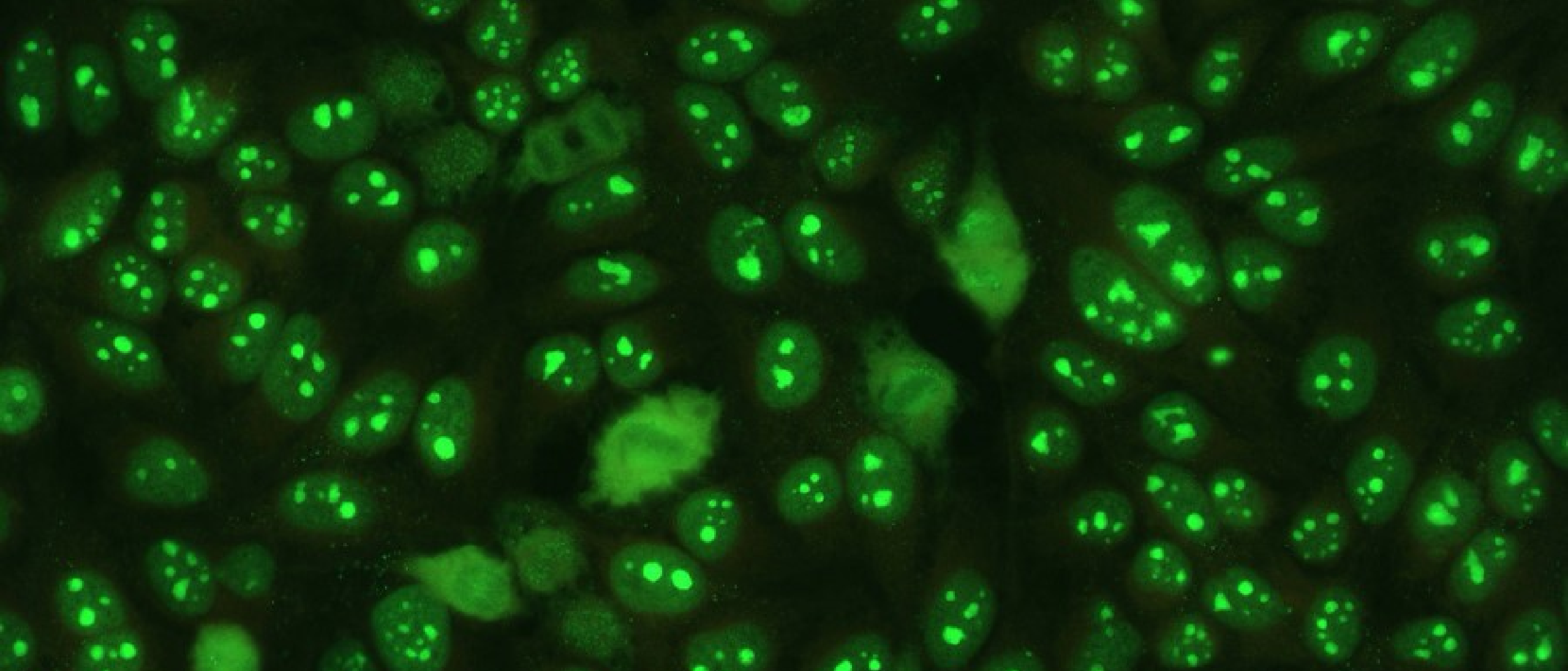


# ANA

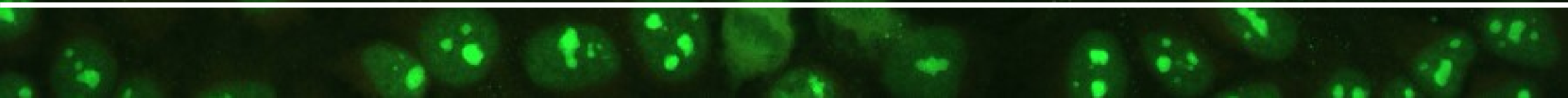
ojedinělé jaderné  
tečky

- Antigen: coilin p-80
- Klinická asociace: autoimunitní a virová onemocnění jater





ANA – typ nukleolární (jadéřkový)  
diagnóza: systémová sklerodermie

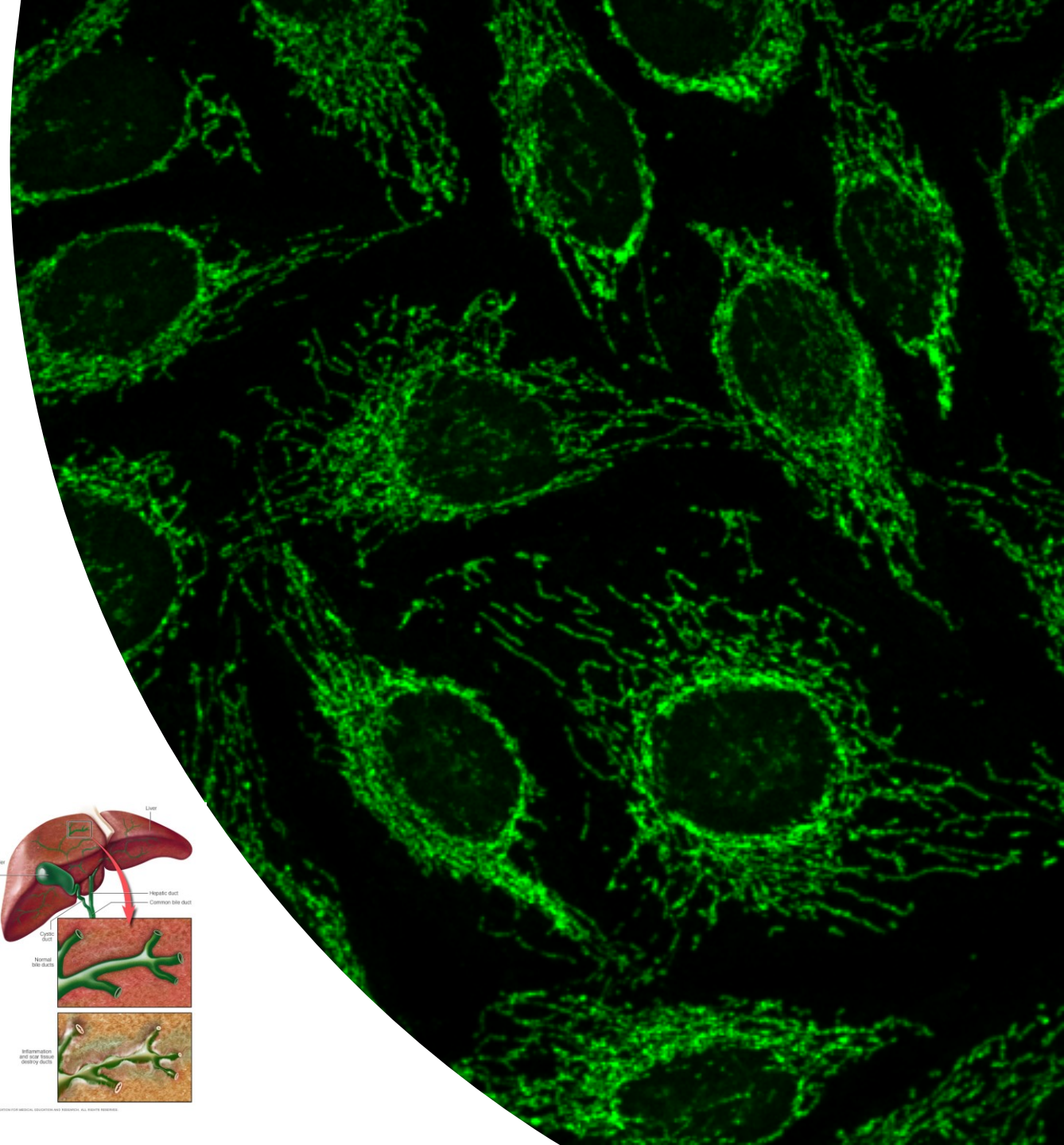
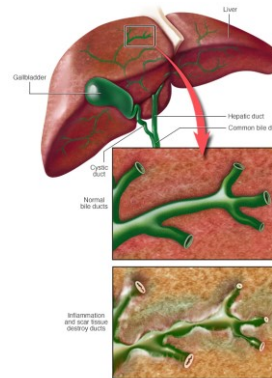


Hep-2 buňky - kromě fluorescence v jádře lze sledovat i fluorescenci v cytoplasmě

---

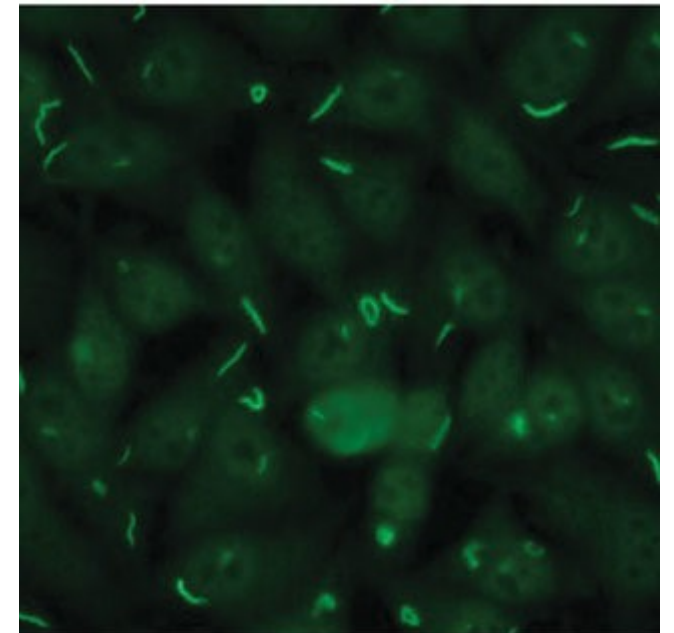
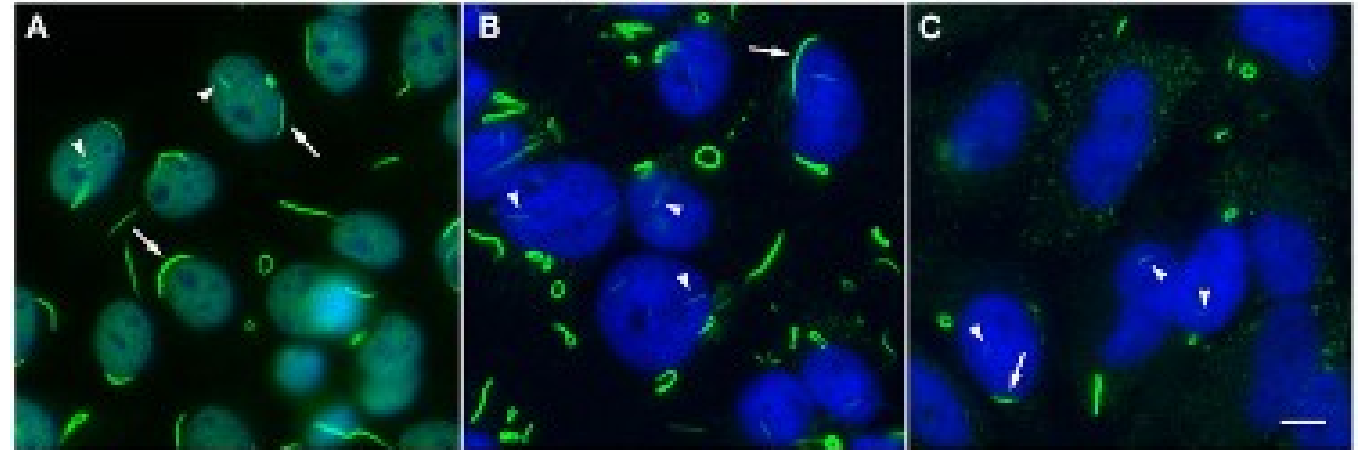
V cytoplasmě HEp2 buněk je možné pozorovat i další typy fluorescence – např. **mitochondriální – AMA** (anti-mitochondrial antibodies) – výskyt u onemocnění **primární biliární cirhóza**

Ale hlavním substrátem pro diagnostiku primární biliární cirhózy je **LKS** (liver, kidney, stomach)!



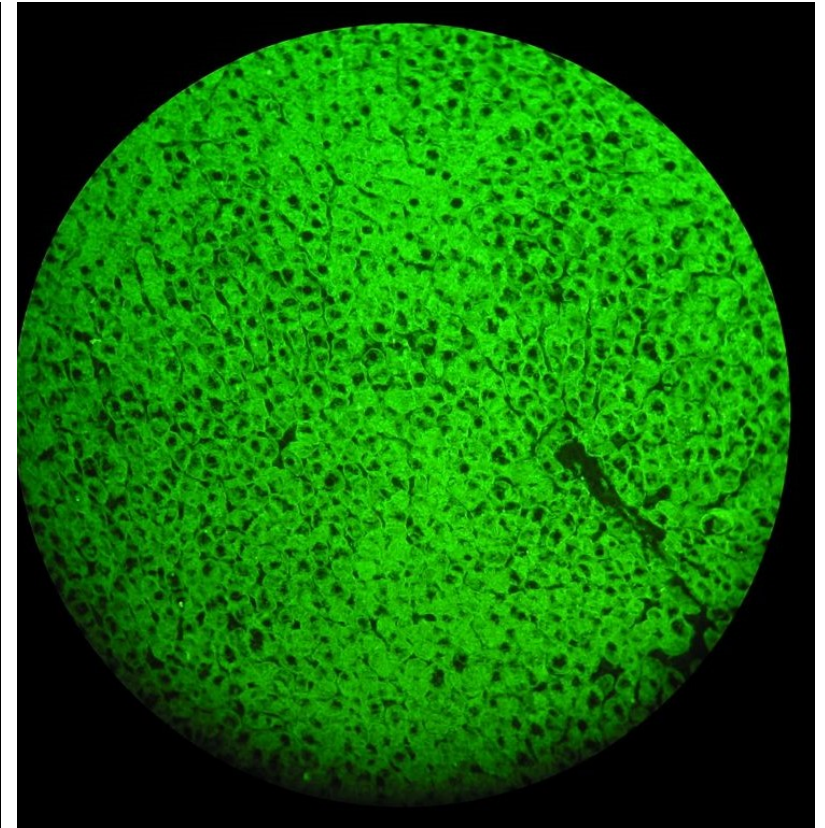
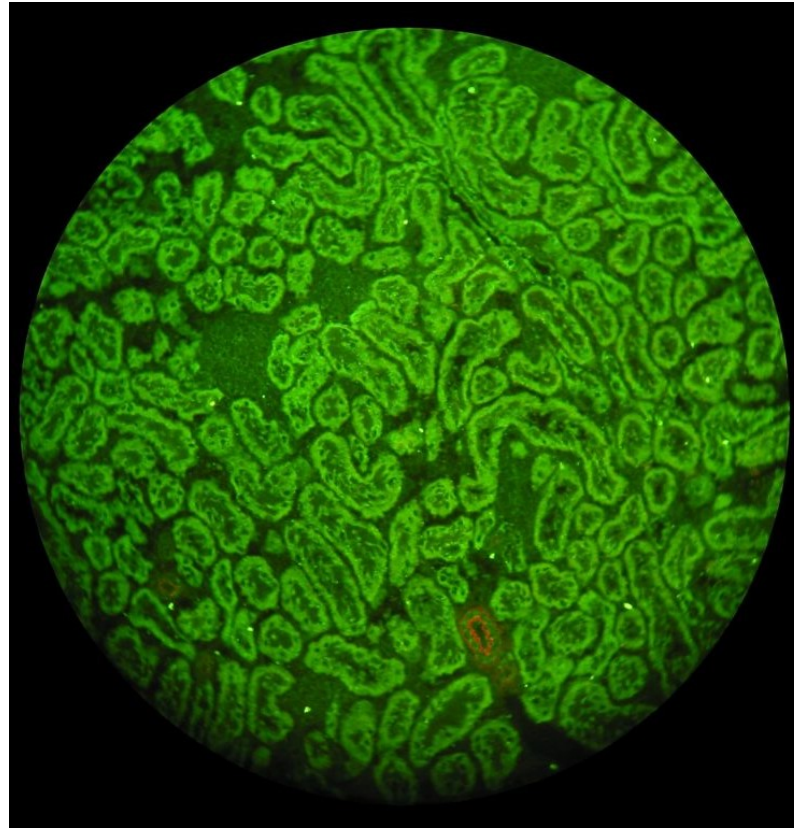
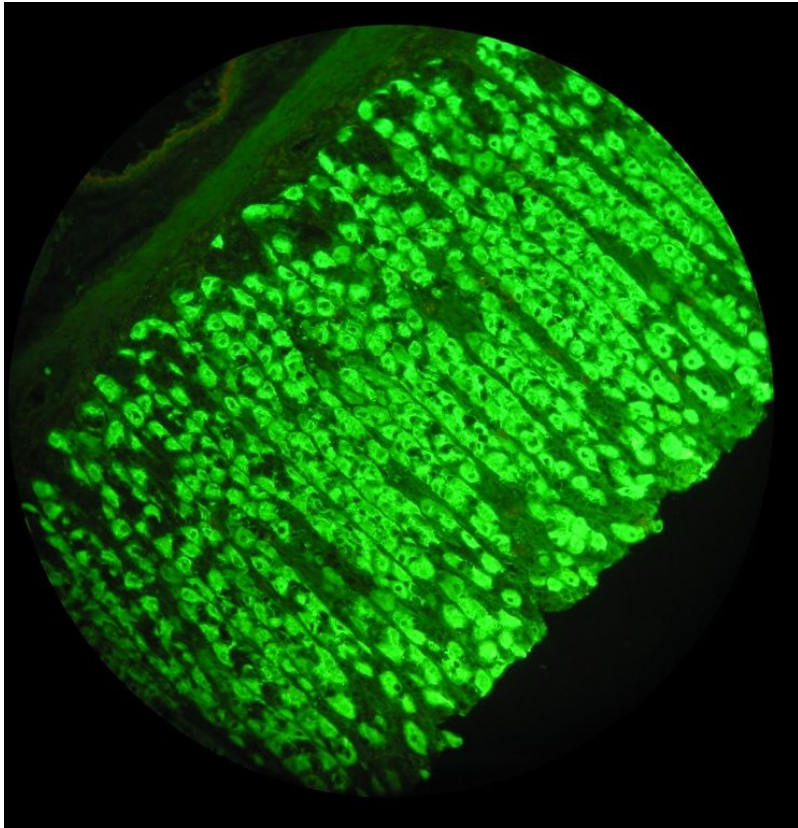
# Nejaderné obrázky IF

- Obraz tyčinek a kroužků „rods and rings“
- „Lochmanovi červi“
- Asociace: u pacientů po terapii interferonem a ribavirinem při hepatitidě C
- Antigen: neznámý



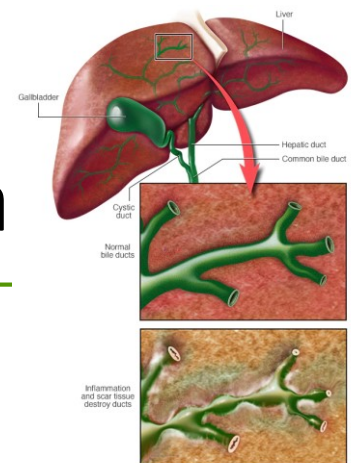
# Substrát LKS

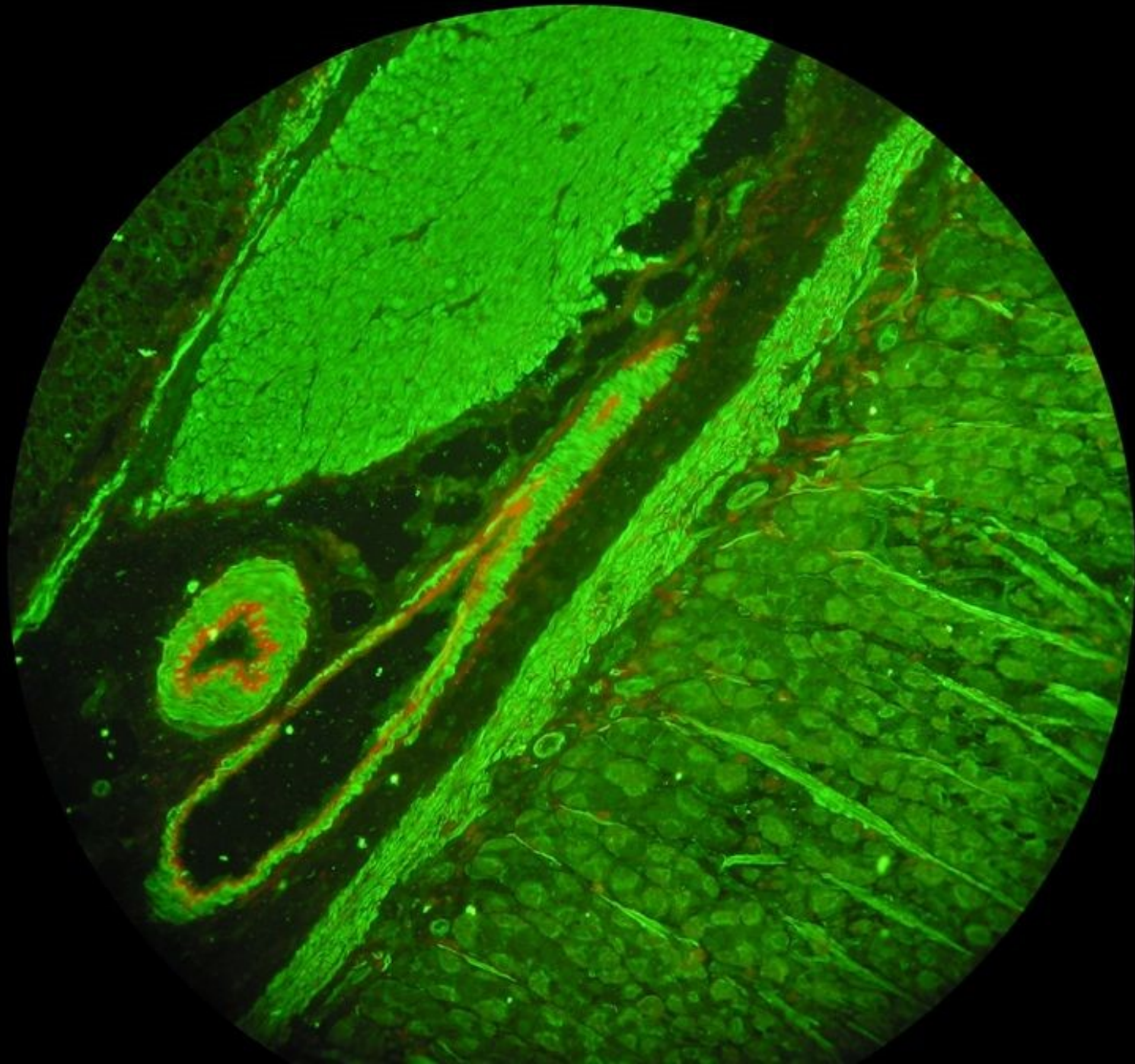
- Kombinace 3 krysích tkání
  - játra (Liver)
  - ledviny (Kidney)
  - žaludek (Stomach)
- Pozorujeme protilátky:
  - AMA (antimitochondriální) – primární biliární cirhóza
  - ASMA (proti hladkému svalu) – autoimunitní hepatitidy
  - GPC (proti parietálním buňkám žaludku) – prim. perniciózní anémie
  - RET (proti retikulinu) – celiakie (kontrola dodržování diety), mohou být pozitivní i u Crohnovy choroby



## AMA (antimitochondriální Ab) – křysí žaludek, ledviny, játra

Mitochondrie jsou orgány obsažené v buňkách všech tkání – proto při přítomnosti AMA protilátek bude viditelná pozitivita ve všech třech typech tkání.





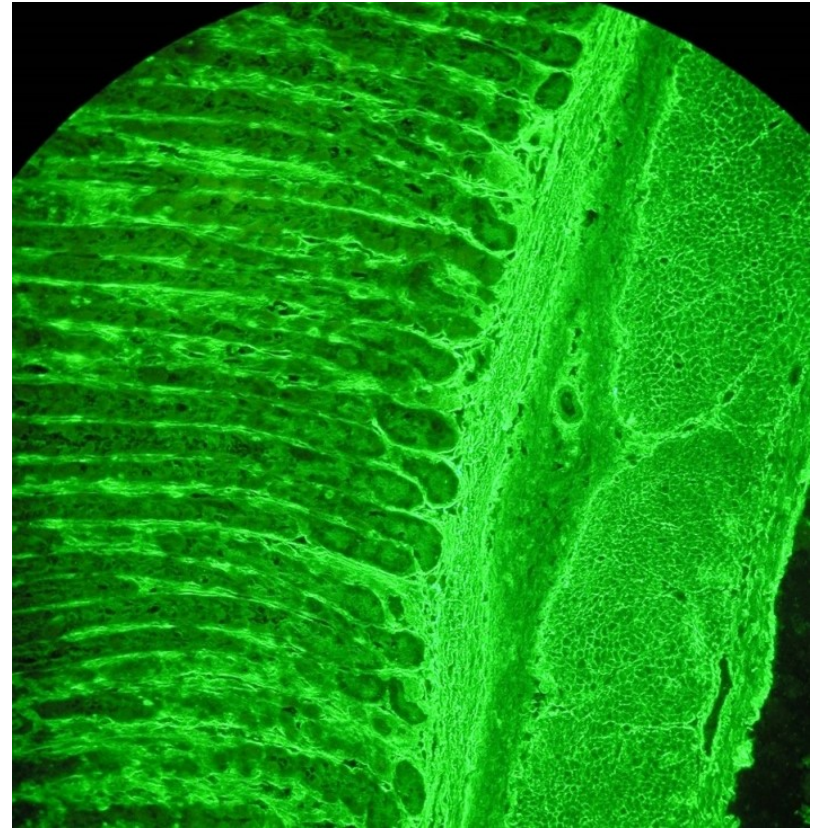
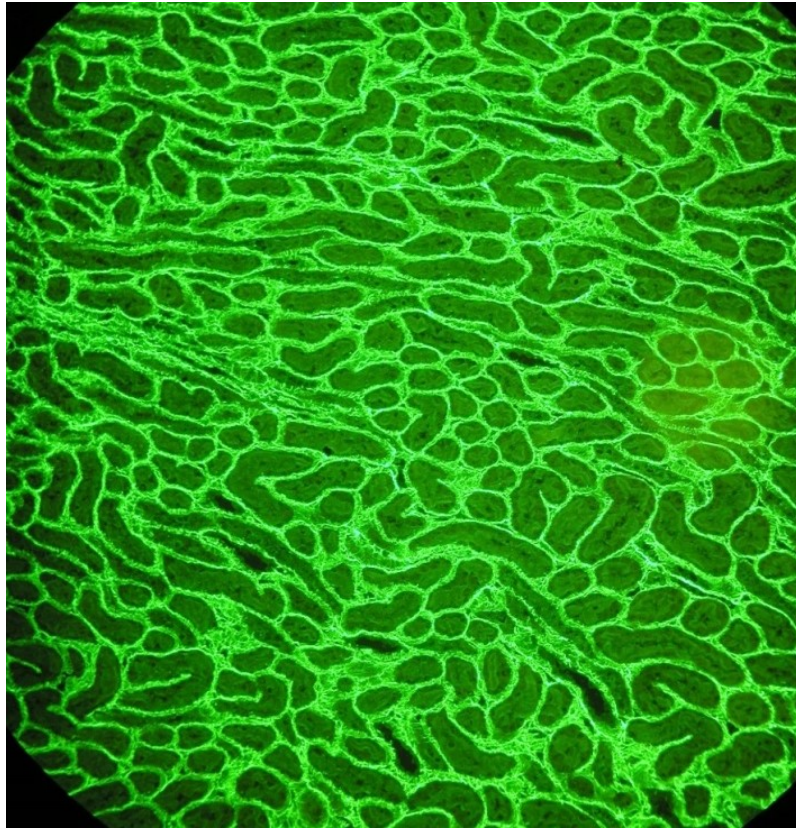
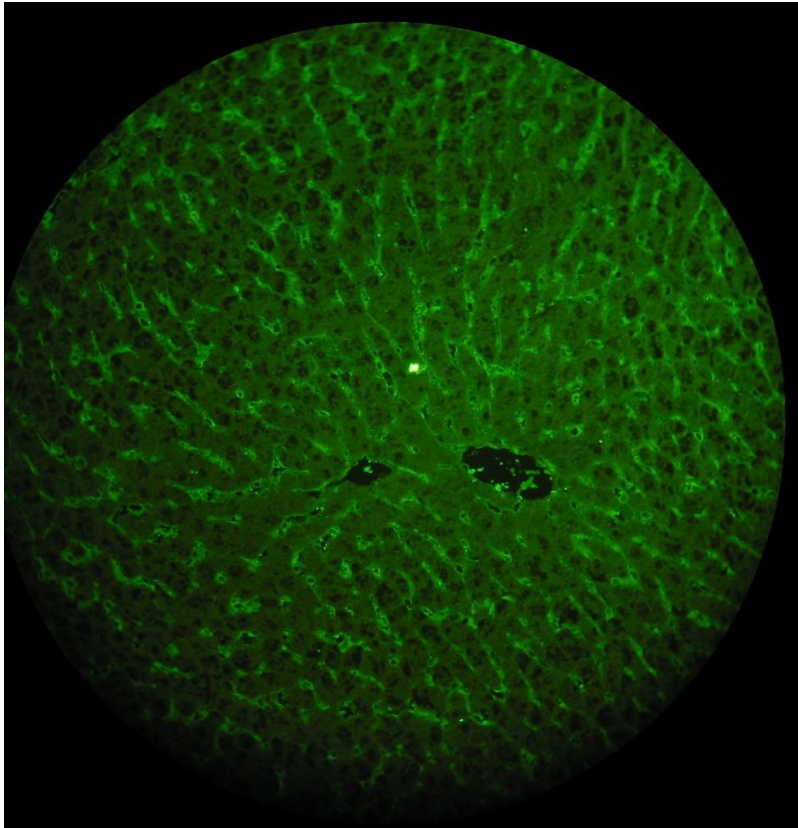
# ASMA

(proti hladkému svalu)

– krysí žaludek

Při pozitivě ASMA svítí pouze struktury obsahující hladkou svalovinu, např.

- Cévy
- Stěna žaludku



## RET (proti retikulinu) – krysí žaludek, ledviny, játra

---

Retikulin je mezibuněčnou složkou mezenchymální tkáně se značným množstvím antigenních determinant, protilátky jsou většinou ve třídě IgG, eventuálně IgA.



# GPC = anti-Gastric Parietal Cell antibodies

## Protilátky proti parietálním buňkám žaludku

- Výskyt u **perniciózní anemie**

- Přítomnost protilátek proti **parietálním buňkám žaludku**

(mohou se tvořit i autoprottilátky proti **vnitřnímu faktoru**, který parietální buňky produkují a který je nezbytný pro transport vitamínu B12 přes střevní sliznici, popř autoprottilátky, které blokují komplex vnitřní faktor+vitamin B12)

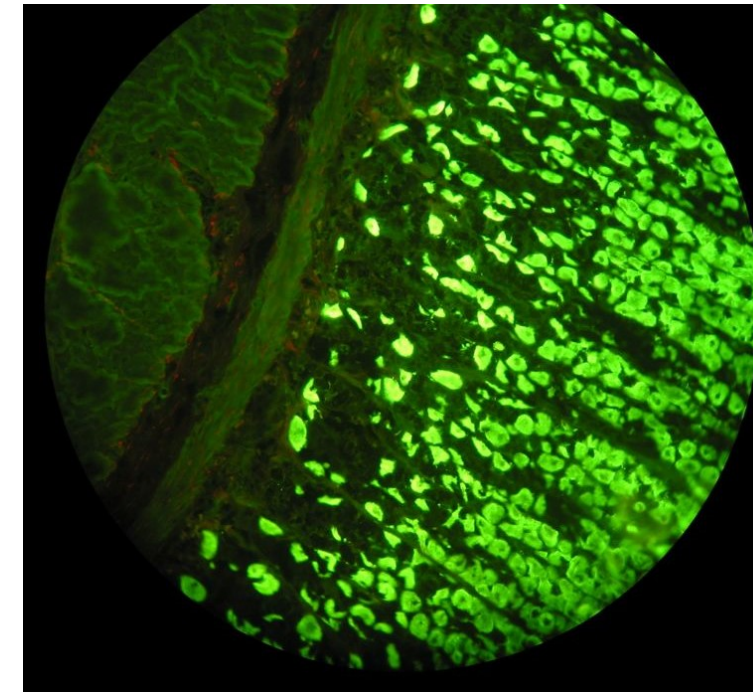
- Důsledek:

- Nedostatek vitamínu B12 (=kobalamin), který je nutný pro syntézu DNA
    - Rozvíjí se megaloblastová anemie (viz. učebnice hematologie)
    - Klinické příznaky
      - Typické postižení jazyka – „Vyhlazený“ jazyk
      - Subikterus
      - Symetrické parestezie končetin
      - Nechutenství, průjemy

- Perniciózní anemie bývá spojena s atrofickou gastritidou, častějším vývojem rakoviny žaludku a taktéž kolorektálního karcinomu

- Léčba – suplementace chybějících vitaminů – B12+kyselina listová

Substrát – krysí žaludek



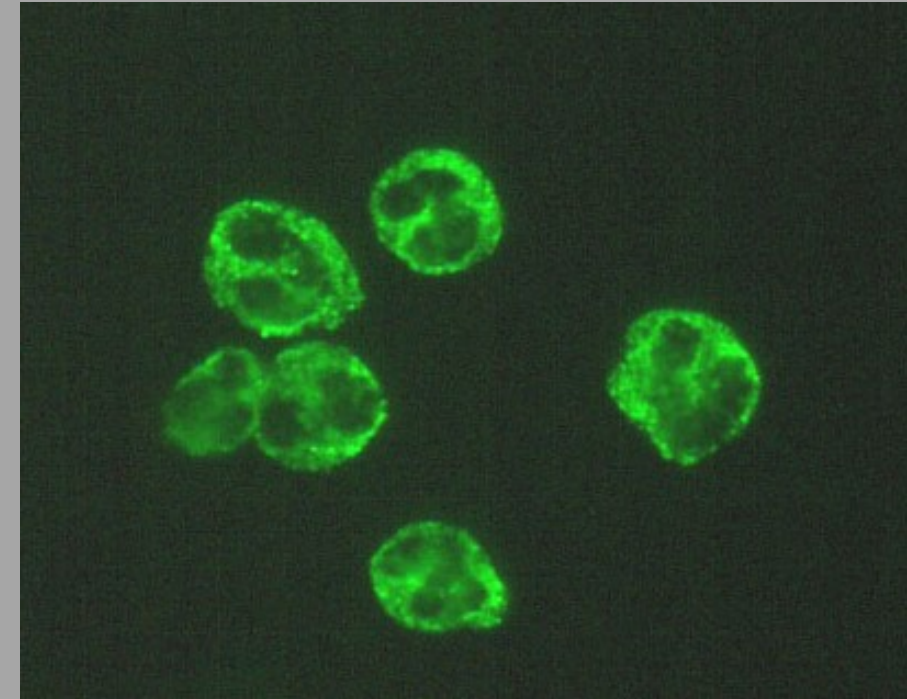
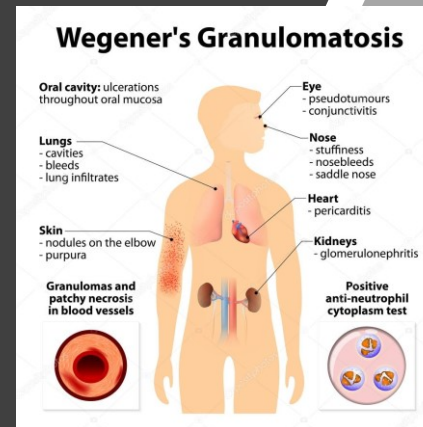
# ANCA (protilátky proti cytoplazmě neutrofilů)

- Skupina protilátek proti některým vnitřním cytoplazmatickým strukturám neutrofilů  
(**myeloperoxidáza, proteináza 3**, elastáza, laktoferin...)
- Vyskytují se obecně u **autoimunitních vaskulitid**
- Existuje několik typů positivity ANCA imunofluorescence (IF):
  - **pANCA** – perinukleární IF → antigenem je myeloperoxidáza (MPO) – **progresivní sklerotizující cholangitida, polyarteritidy**
  - **cANCA** – cytoplazmatická IF → antigenem je proteináza 3 (PR3) – **Wegenerova granulomatóza!**
  - **aANCA** – atypická IF – různé antigeny (elastáza, lysozym...) - má vazbu na ulcerózní kolitidu
- Substrát pro IF: ethanolem fixované neutrofilní granulocyty
- Kromě IF se pANCA a cANCA stanovují také ELISOU!

# ANCA (protilátky proti cytoplasmě neutrofilů)

pANCA – perinukleární – antigenem je MPO (myeloperoxidáza)

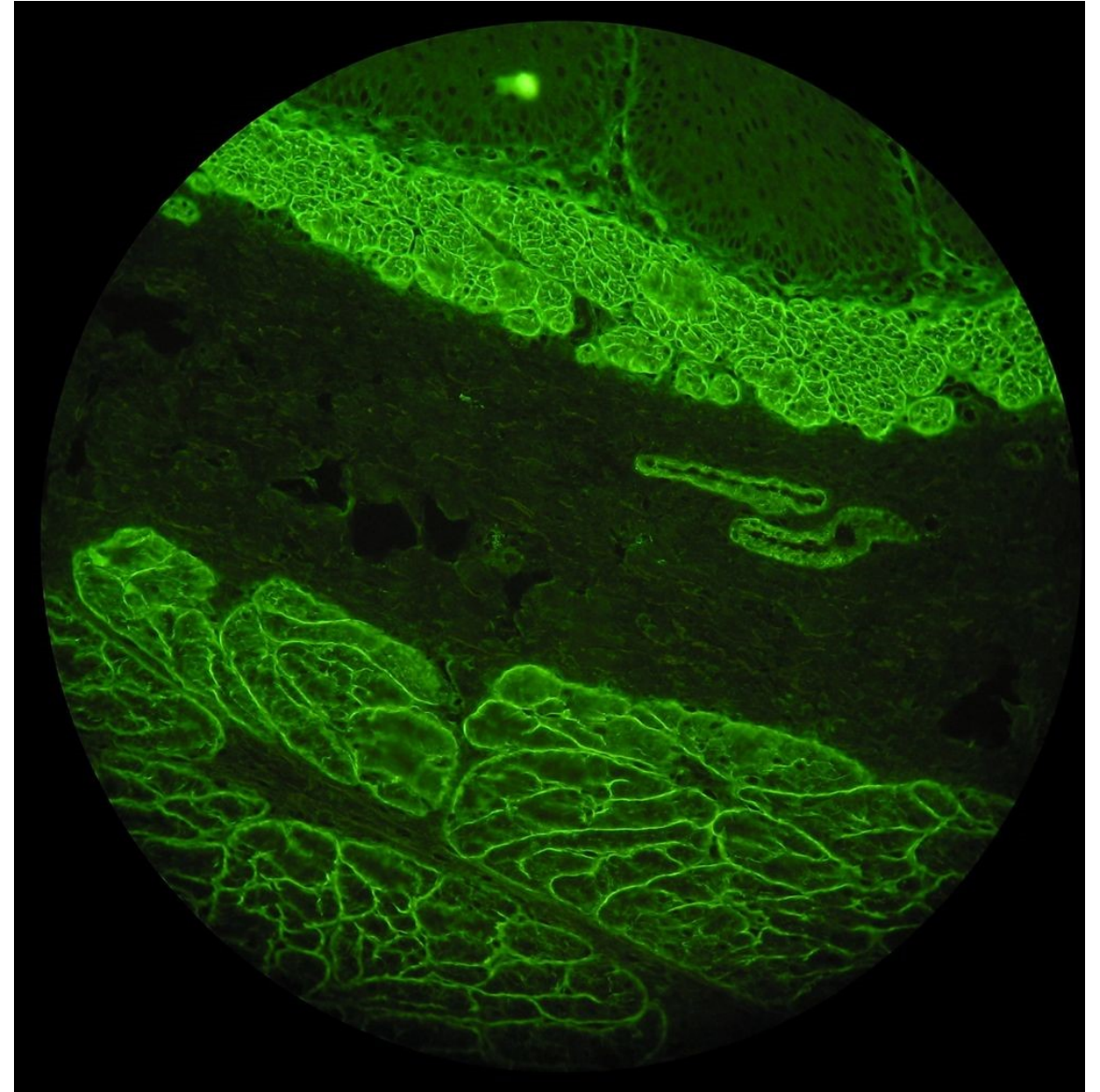
Atypická ANCA – různé antigeny (elastáza, lysozym, katepsin)



cANCA – cytoplasmatická – antigenem je PR3 (proteináza 3) – typická pro Wegenerovu granulomatózu s polyangitidou  
pozitivní = vážná diagnóza = okamžite hlásit

# EMA (protilátky proti endomysiu)

- Na řezu opičího jícnu
- Ag je TTG (tkáňová transglutamináza) (též lze stanovit ELISOU)
- Výskyt u *celiakie* (hlavně IgA)



# Diagnostika celiakie

- 1) Stanovení celkového IgA
- 2) Nepřímá imunofluorescence – EMA – protilátky proti endomysiu → jedná se o nespecifické vyšetření – odhalí autoprotiátky proti určité tkáňové struktuře – zde endomysium
- 3) Zda se jedná konkrétně o protilátky proti tkáňové transglutamináze – anti-TTG (třída IgA, popř. IgG u nemocných s IgA deficitem) – ELISA

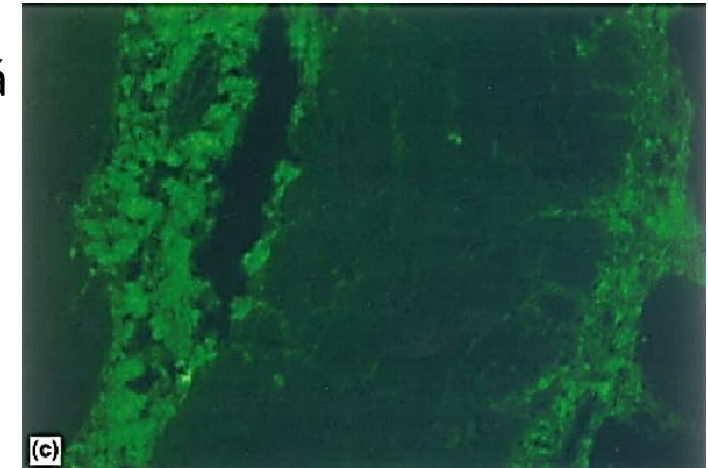
Imunologická laboratoř provádí pouze screening celiakie



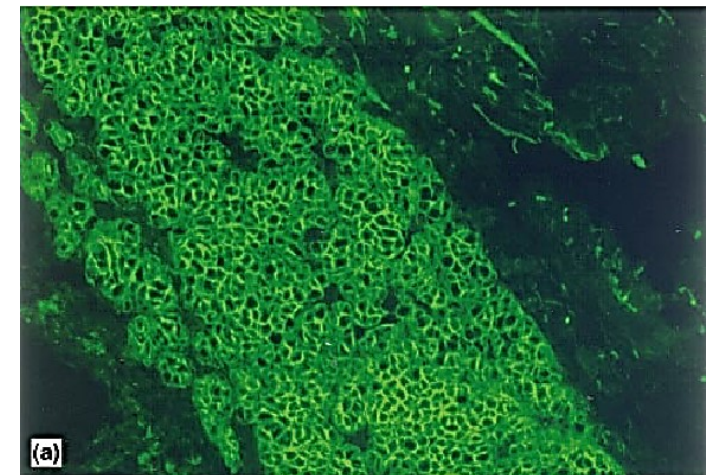
4) Definitivní potvrzení celiakie: gastroenterolog

- Enterobiopsie – odběr vzorků tkáně tenkého střeva na histologii →
  - Histologie - atrofie klků tenkého střeva
  - Histochemie - deficit enzymů kartáčového lemu enterocytů
  - **Změny na sliznici pouze u aktivní a tiché formy celiakie**
  - **Latentní forma** celiakie má pozitivní sérologii avšak normální architekturu sliznice!

Negativní obraz



Pozitivní obraz



# Zvláštní postavení – ASCA protilátky

- Nejedná se o autoprotiátky (nejsou namířeny proti strukturám těla vlastním)
- Jedná o protilátky proti kvasince *Saccharomyces cerevisiae*
- Stanovení **ASCA** slouží k diferenciální diagnostice nespecifických střevních zánětů
  - **Crohnova choroba – ASCA pozitivní až v 81% případů** (+ pANCA pouze 18%)
  - Ulcerózní kolitida – ASCA pozitivní jen v 22% případů (+ pANCA až 70%)
- ASCA protilátky se stanovují ELISOU, ne imunofluorescencí!

# Imunofluorescence

- Zlatý standard
- Na prvním místě– každá imunologická laboratoř by měla poskytovat stanovení autoprotilátek IF metodou
- Kombinace s **ELISA + ImunoBlot**
- Interpretace výsledků:
  - záleží na typu IF
  - pozitivní/negativní nebo titr Ab
  - **Pozor** – hladiny autoprotilátek narůstají s **věkem** (zvýšené hladiny tedy nemusejí nutně znamenat autoimunitní onemocnění)
  - Avšak u dětí jsou zvýšené hladiny patologické vždy

# Protokol imunofluorescence

- 2 obrázky imunofluorescencí – popsat:
  - O jaký substrát se jedná, jaké skupiny autoprotilátek na něm lze stanovit
  - Jaká struktura na preparátu svítí
  - O jakou autoprotilátku by se mohlo jednat
  - U jakého (jakých) onemocnění ji nacházíme
  - Vybrat nejčastější onemocnění, se kterým je daná autoprotilátka asociována a stručně popsat
    - Klinika
    - Jaké další laboratorní vyšetření byste u pacienta s tímto onemocněním provedli (není nutné se vázat jen na imunologická vyšetření)

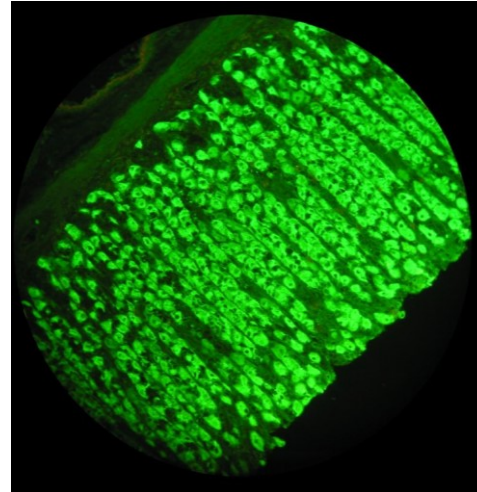
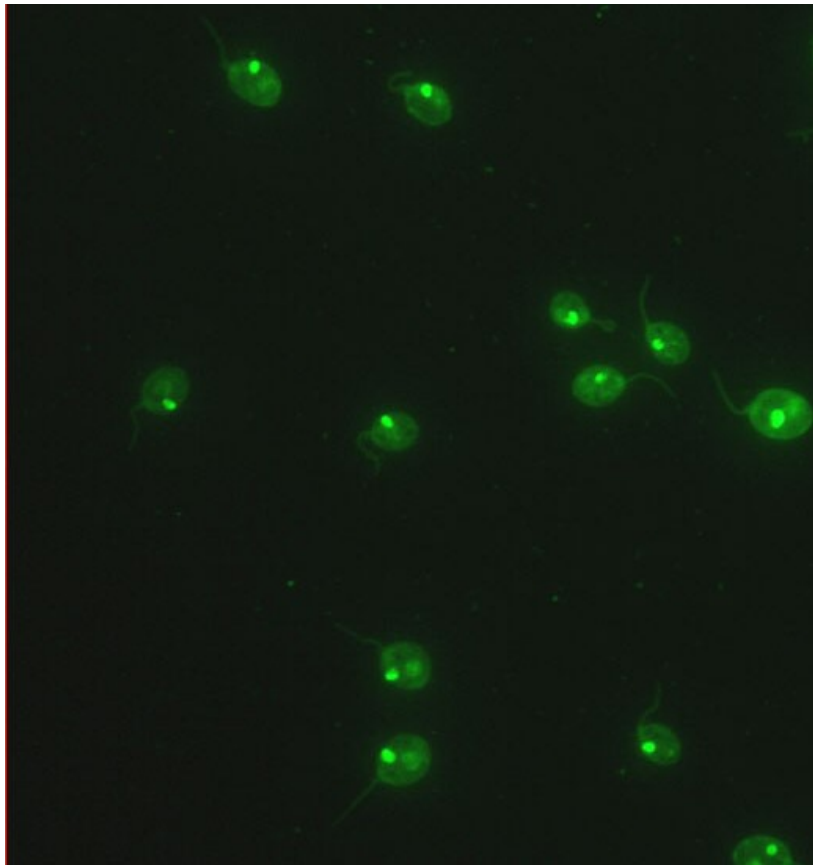


# Společné otázky všem skupinám

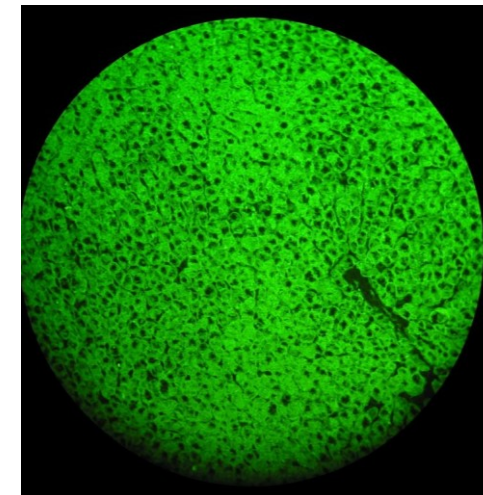
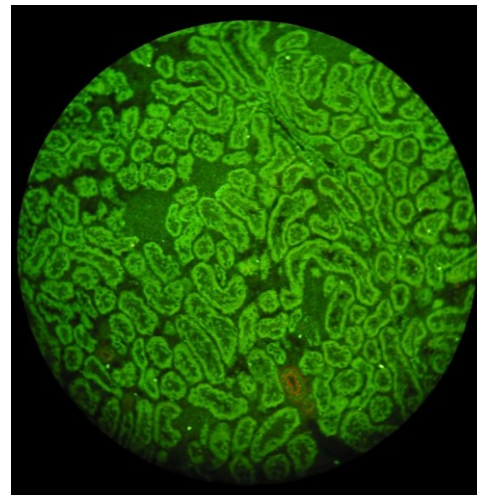
- Pokud je imunofluorescence pozitivní, stačí pro uzavření diagnózy pouze toto vyšetření?
- Pokud ne, jaká další vyšetření by byla potřeba? Bere se ohled na klinické příznaky?
- Hraje roli u stanovení autoprotilátek věk? Pokud ano jak?

# Skupina 1 a 5

Obrázek A1

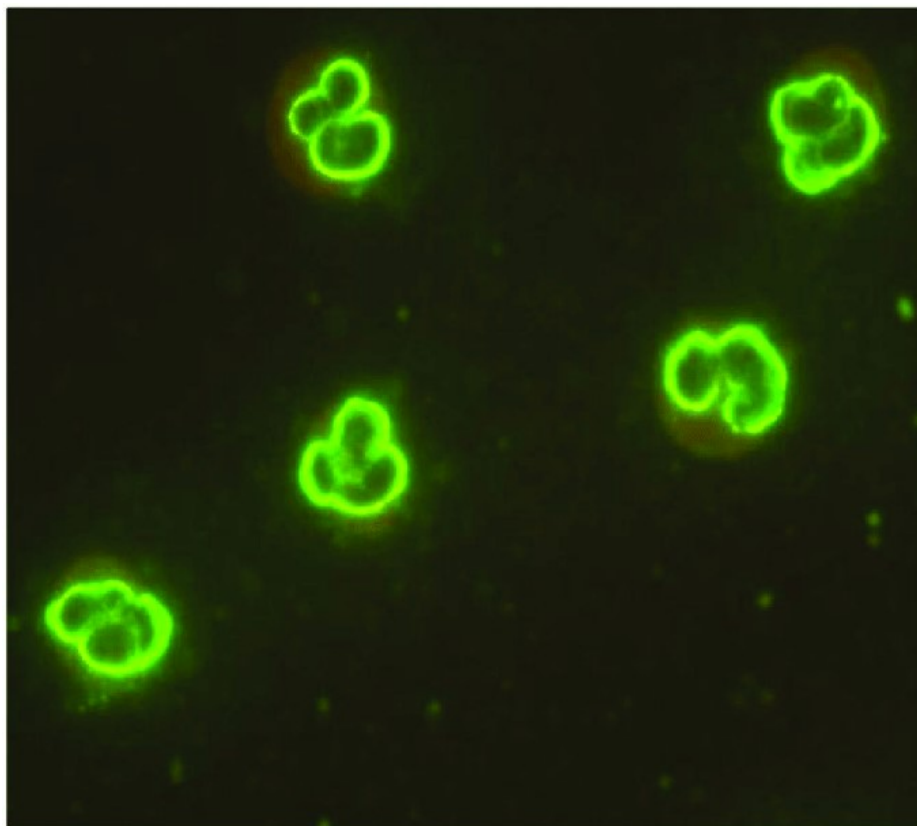


Obrázek A2:  
kombinace 3 tkání  
(jakých?), pozitivitu  
vidíme ve všech třech

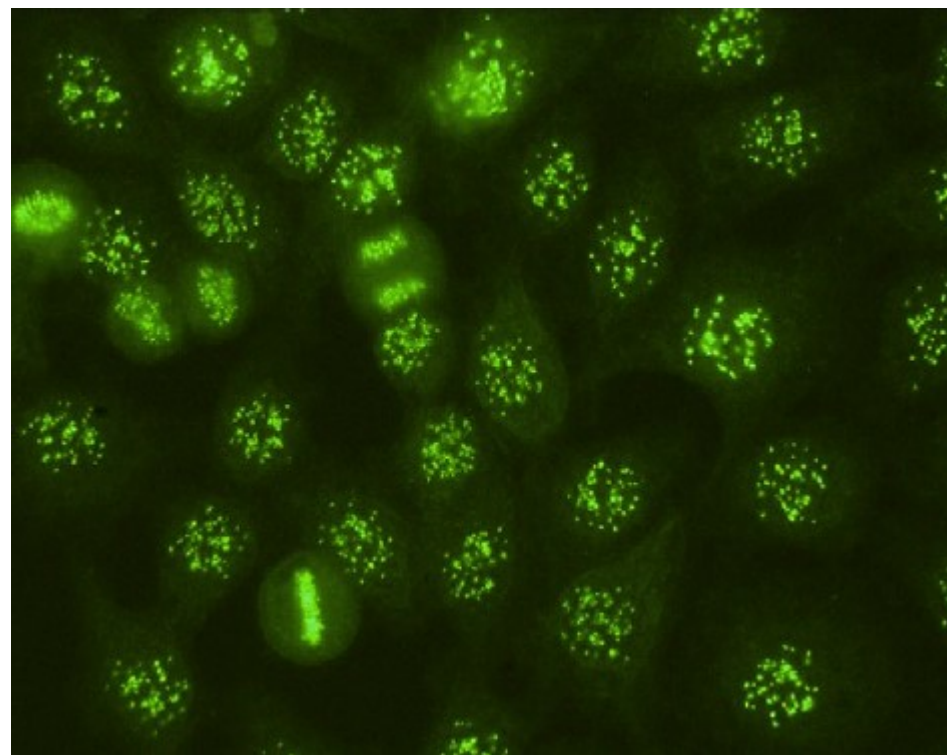


# Skupina 2 a 6

Obrázek A2

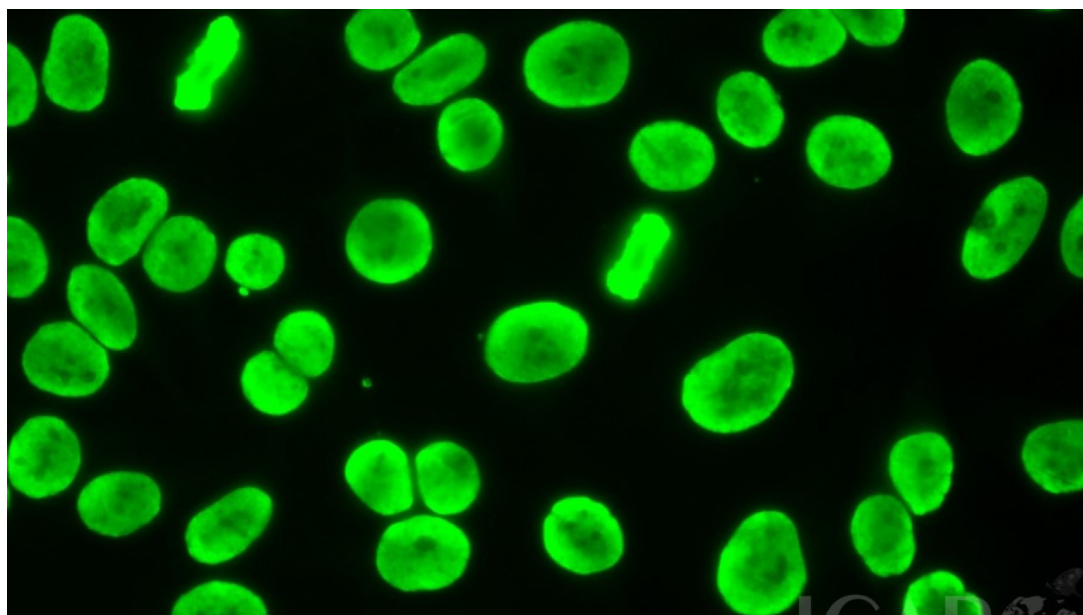


Obrázek 2B

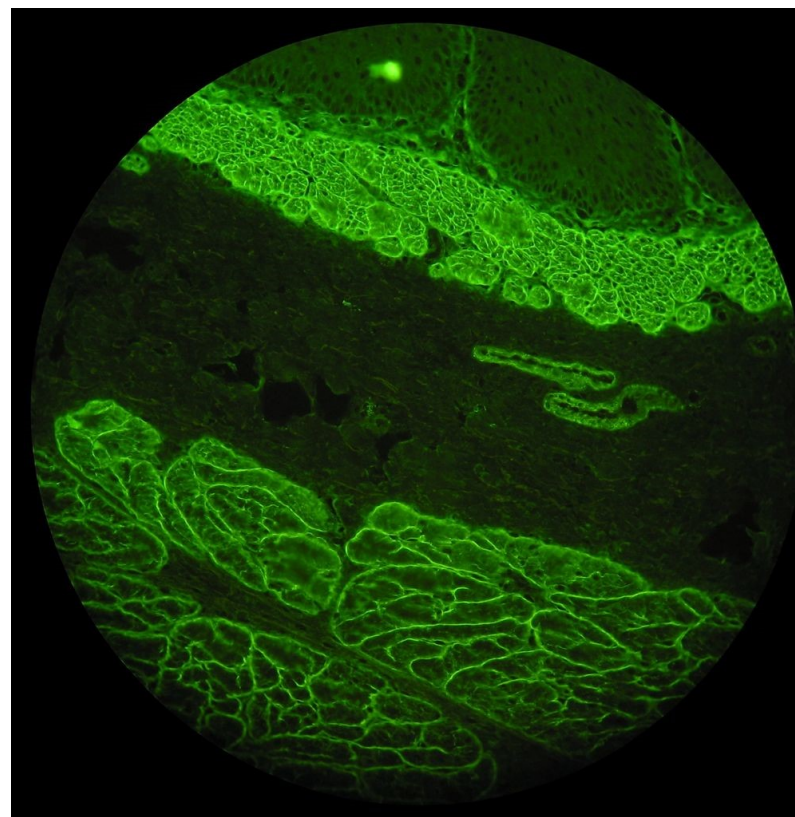


# Skupina 3 a 7

Obrázek 3A

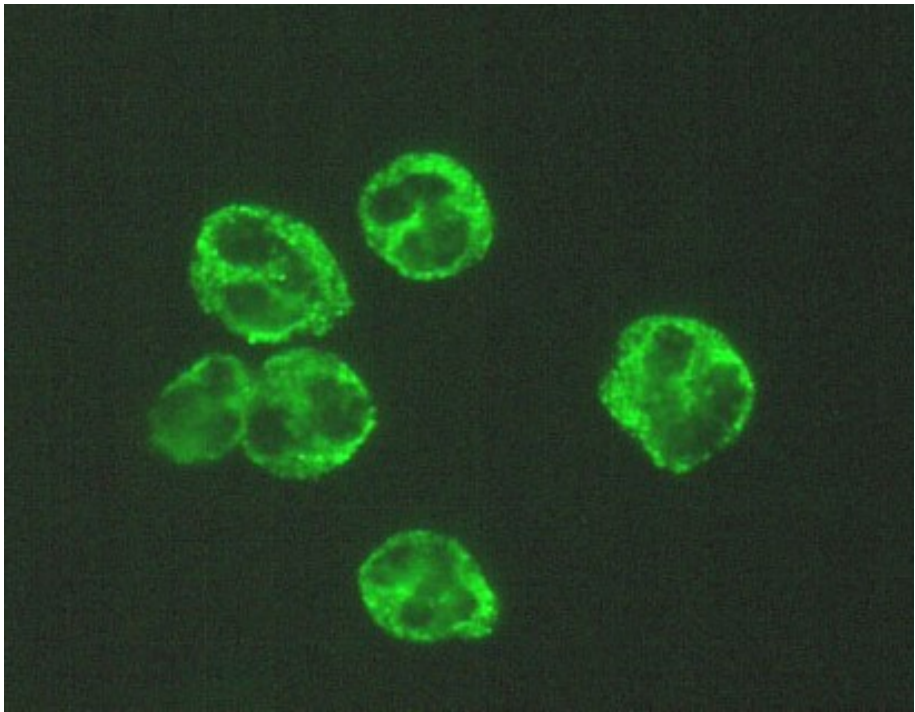


Obrázek 3B: opičí jícen



# Skupina 4 a 8

Obrázek 4A



Obrázek 4B

Stěna  
žaludku

Stěna  
arterie a  
vény

