

**MUNI**  
**MED**

# **HISTOLOGIE A EMBRYOLOGIE I**

# 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)

# Organizace praktik

Začátek - přesně

Přezouvání

– vstup do mikroskopického sálu pouze v přezůvkách (ne v návlecích)

Šatna

Odložit svršky a zavazadla - zajistit doklady, cennosti, mobil

Ztráty a nálezy – informace u dr. Daňkové

Mobil – vypnutý nebo v tichém režimu

Mikroskopický sál = laboratoř

Zákaz konzumace jídla a nápojů v sále,

Zákaz kouření na celé LF

BOZP

Pracovní místo zůstává stále 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: .....

<https://histology.med.muni.cz/>

## Zápočet

- 100% účast v praktických cvičeních; max. 30 % omluvených a nahrazených absencí
- Každý student je vyzkoušen **4x** za semestr
- Zkouší se **písemně (malý test)** zejména znalost základních struktur, jejich odborné (latinské) názvy na základě připravených obrázků. Otázky se budou týkat i znalostí z vývoje k danému systému. V případě neúspěchu je možná jedna oprava (**1. opravný test**), pro získání zápočtu je nutné splnit všechny testy (4/4 nebo 4/5).
- Testy se mohou psát vždy jenom v řádném praktiku, nikoli v náhradním
- V případě hodnocení 2 testů – N, N následuje ve stejném zkouškovém období **2. opravný test** pokrývající celý semestr.
- Obrázky jsou přístupné v MedAtlasu nebo ve studijních materiálech praktik. Informace o předmětech a rozvrhu budou především v ISu.

# Zápočet

- **100%** účast v praktických cvičeních
  - **Kompletní sada protokolů** podepsaných učitelem
  - Splněné dílčí testy
- 
- Během řádné semestrální výuky se studenti obracejí na **vyučujícího své seminární skupiny**. Jméno vyučujícího je uvedeno v rozvrhu, kontakt v IS. Pro neadresné dotazy je možné využít adresu: [histology@med.muni.cz](mailto:histology@med.muni.cz)
  - Vyučující může průběžně ověřovat znalosti a poskytovat zpětnou vazbu formou otázek, diskuze nebo libovolného testu. Obrázky jsou přístupné v MedAtlasu nebo v **Interaktivních osnovách v ISu** (popř. ve studijních materiálech).

## Nahrazování praktik

### Co udělat předem:

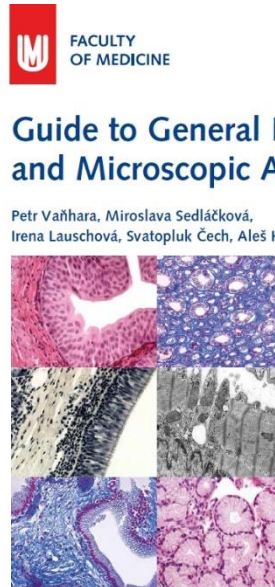
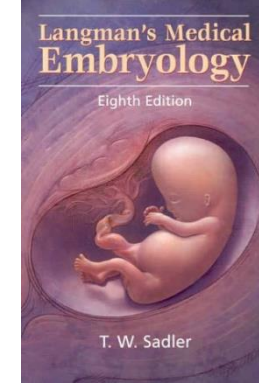
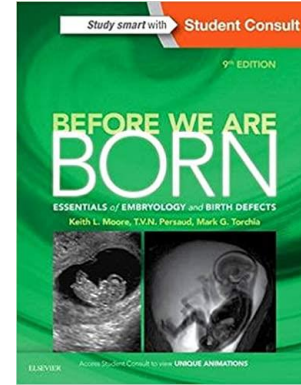
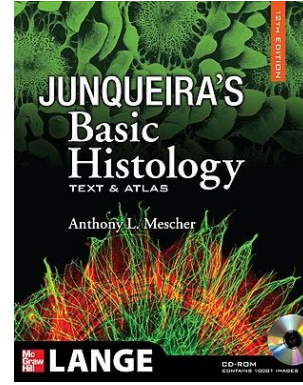
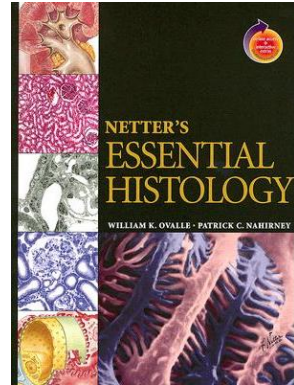
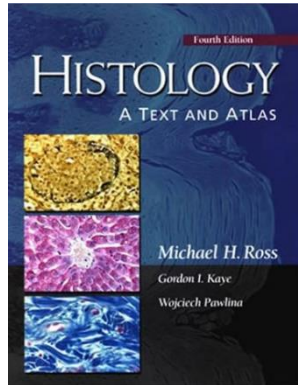
- výjimečně, po předchozí domluvě se svým vyučujícím
- nahrazování oznámit vedoucímu paralely (tomu, kdo má výklad)
- zapsat se do sešitu (před nebo po výkladu)
- na konci praktika předložit vedoucímu praktika protokol k podpisu

### Co udělat poté:

- absence musí být omluvena na studijním odd. a omluvenka zapsaná v IS



# Doporučená literatura



Masaryk University, Brno 2017

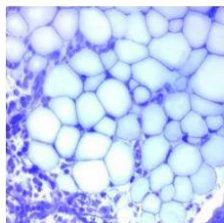


Ústav histologie a  
embryologie LF MU

<https://histology.med.muni.cz/>

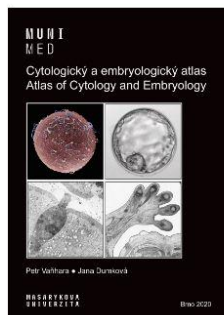
## Atlas of Histology

recommended study tool

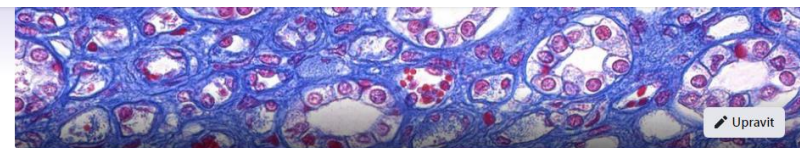


## Atlas of Cytology and Embryology

recommended study tool



## HistoKlub na Facebooku



### HistoClub MED MUNI Consultations

Soukromá skupina · 166 členů



+ Pozvat

Informace Diskuze Místnosti Členové Události Multimédia

🔍 ...

Co se vám honí hlavou, Petr?

📍 Místnost 📷 Fotka/video 👤 Označujte lidi

**Informace**

- 🔒 **Soukromá**  
Jen členové můžou zobrazit členy skupiny a jejich příspěvky
- 👁️ **Viditelná**  
Skupinu může najít kdokoli.
- 👤 **Obecné skupina**

Nová aktivita ▾

**Jana Dumková** · 14. prosince 2020 🌐

Do you know where the snowman is? 😊

# 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)

# 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)

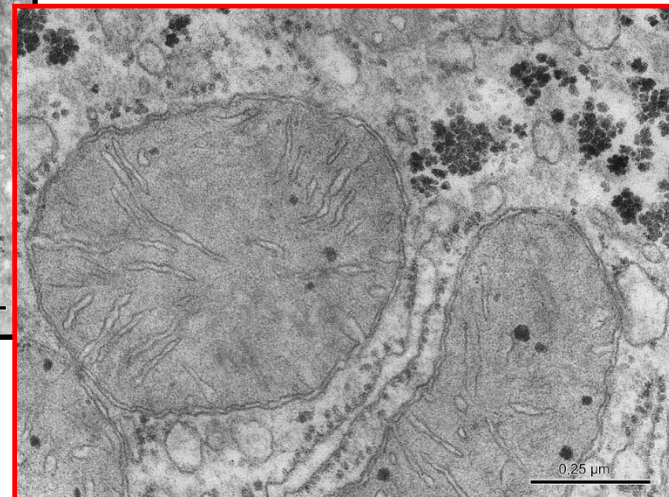
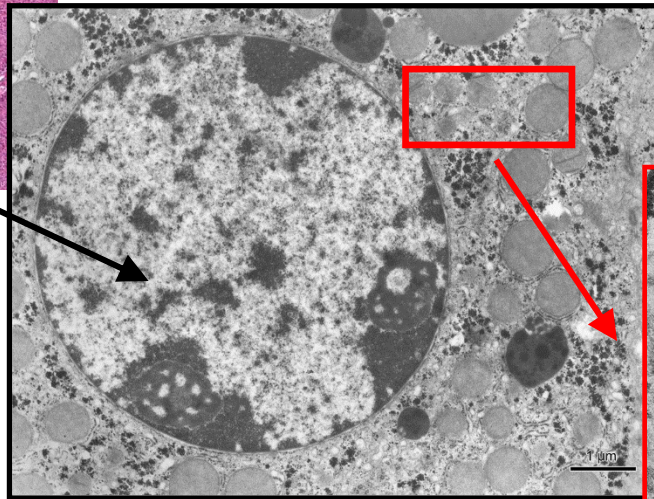
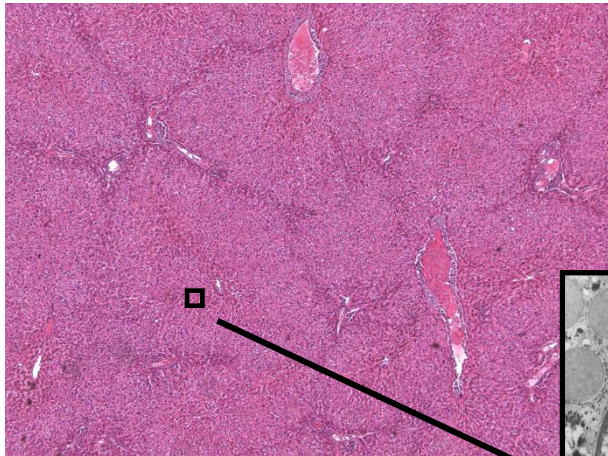
**teratologie** – defektní vývoj orgánů (příčina, důsledek), vrozené vývojové vady (VVV = malformace = anomálie); metody prenatálního screeningu – ultrasonografie, amniocentéza, genetické vyšetření chromozomálních aberací (diagnostika, prevence a terapie).

# Histologie

Rozlišovací schopnost oka:  $\sim 0,1$  mm

Rozlišovací schopnost SM:  $\sim 0,1 - 0,5$   $\mu\text{m}$

Rozlišovací schopnost EM:  $\sim 0,1 - 1$  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 dřeň)

= kyretáž (např. endometrium)

**nekropsie** z mrtvého organismu (pitva); laboratorní zvíře

velikost odebraného vzorku **0,5 – 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 předcházet těmto změnám a stabilizovat strukturu vzorku. Během fixace jsou proteiny konvertovány do inaktivní, denaturované formy.

Druhy:

– **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 (*SM*)
  - glutaraldehyd (*EM*)
  - ALKOHOL – 96 – 100 % (absolutní etanol)
  - ORGANICKÉ kyseliny – led. octová, pikrová, trichloroctová
- **anorganická** – ANORGANICKÉ kys. – chromová, osmium tetraoxid ( $\text{OsO}_4$ )
  - SOLI TĚŽKÝCH KOVŮ –  $\text{HgCl}_2$
- **směsi:** FLEMMING ( $\text{OsO}_4$ ), ZENKER, HELLY, SUSAN (  $\text{HgCl}_2$  ), 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  $\text{cm}^3$ )

### 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) v zestupnou řadou etanolu (50%, 70%, 90%, 96% každá lázeň alkoholu 2 – 6 hodin)

**projasnění** – vytěsnění alkoholu médiem, které se mísí s parafinem – 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

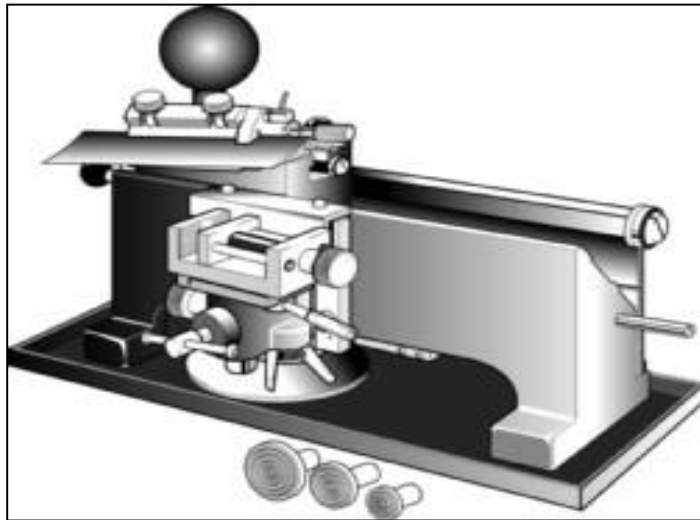


výsledek zalití →

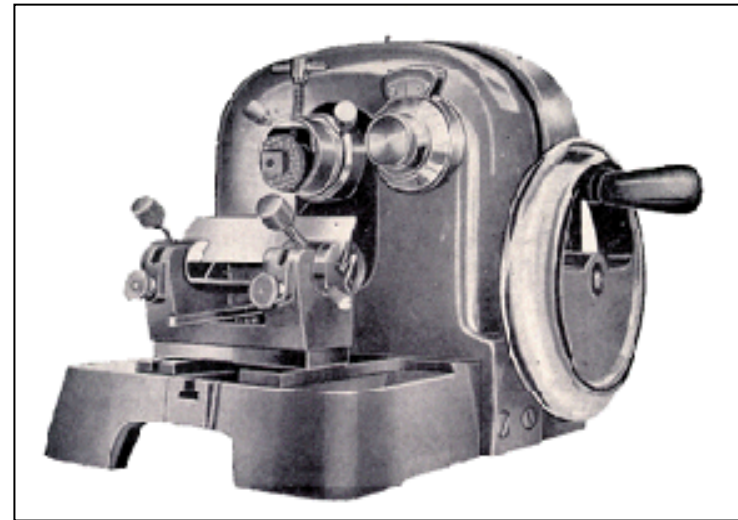


# 4. KRÁJENÍ

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



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



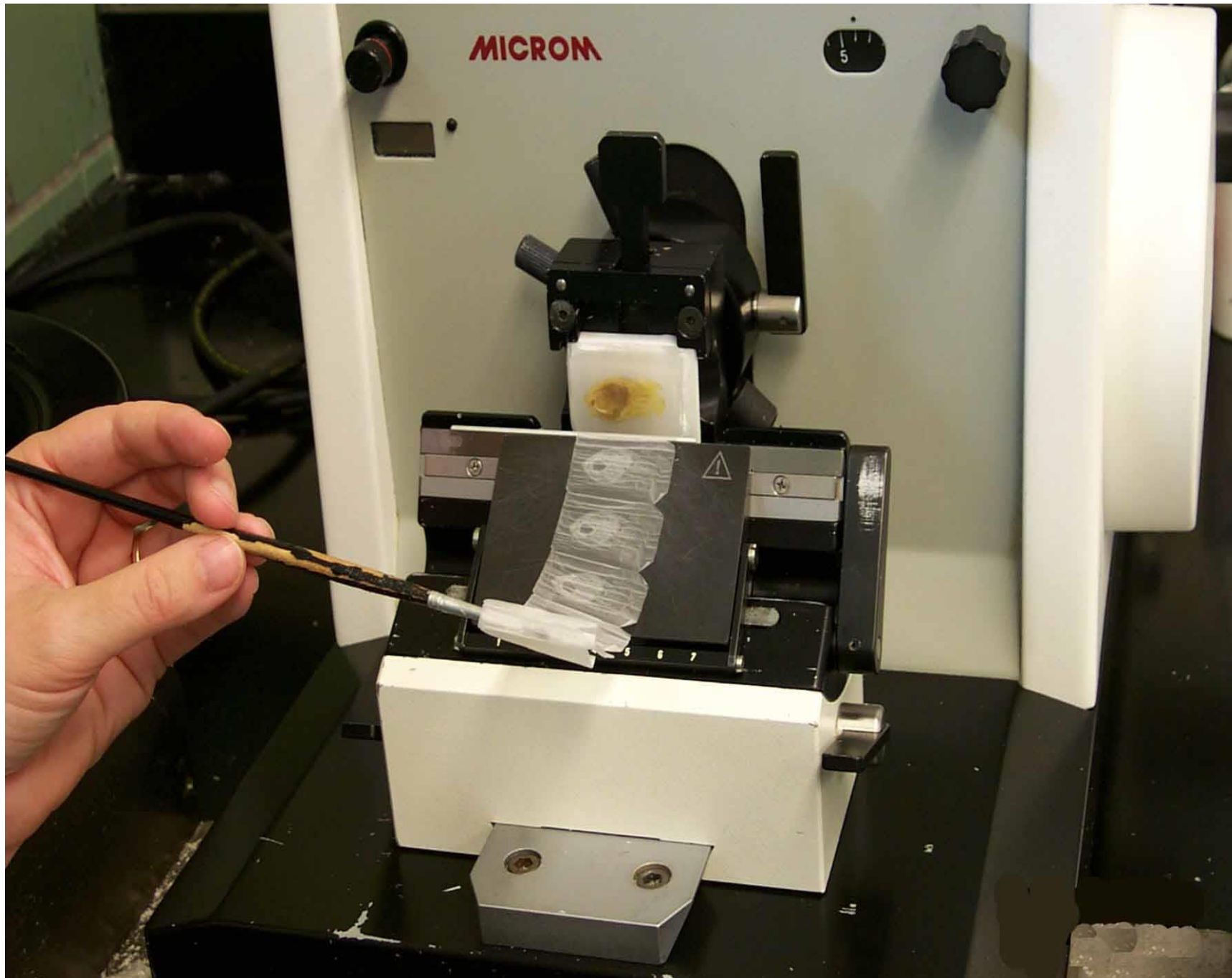
Rotační mikrotom – nůž  
je fixní,  
držák s bločkem se  
pohybuje vertikálně



# Sáňový mikrotom



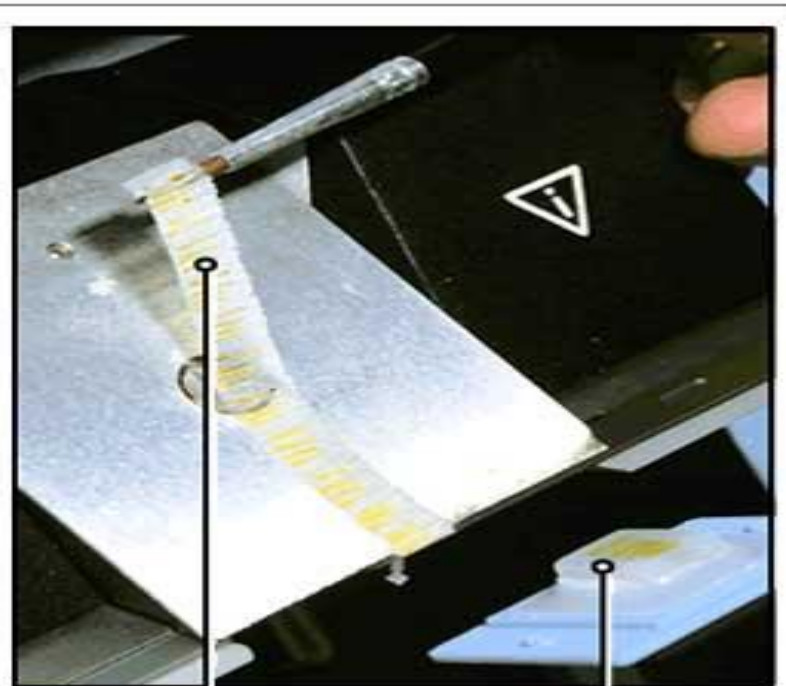
# Rotační mikrotom





## kryostat

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



páska řezů

parafinový bloček



# KRÁJENÍ

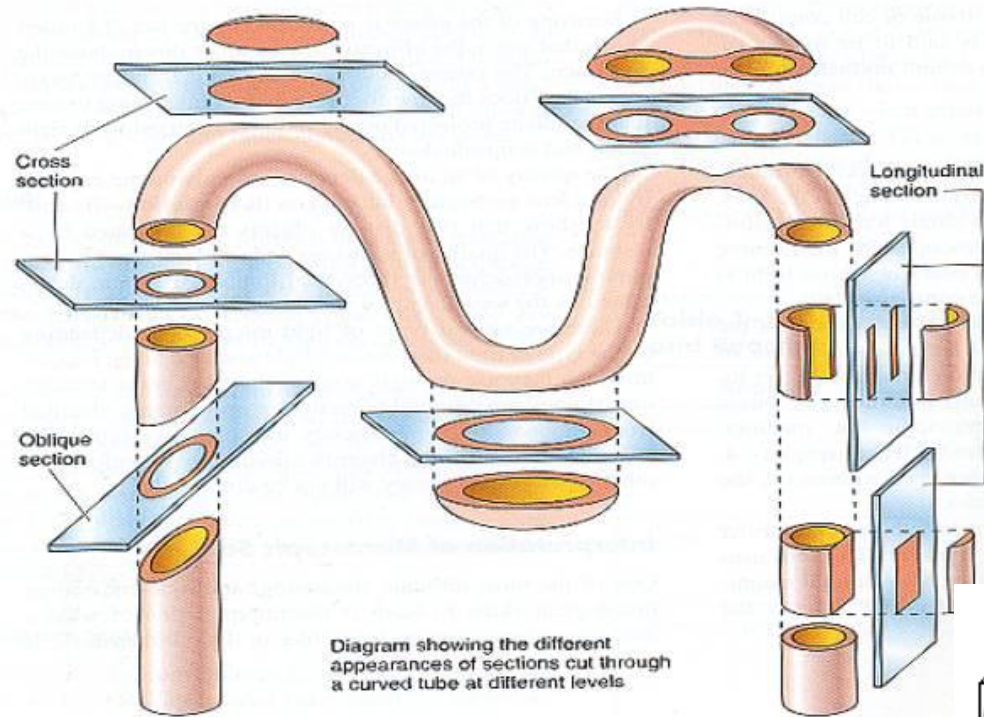
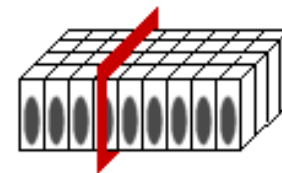


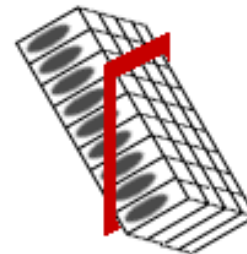
Diagram showing the different appearances of sections cut through a curved tube at different levels.



perpendicular section



simple columnar epithelium



oblique section



# 5. NAPÍNÁNÍ ŘEZŮ

Napínání:

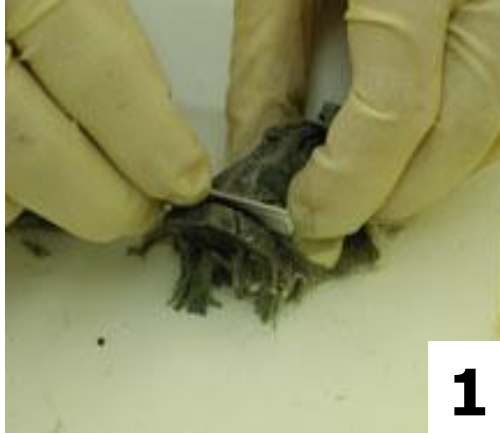
na hladině teplé vody (45°C) se řezy narovnají a vypnou

Lepení:

z vody jsou řezy přeneseny na podložní skla s adhezivním filmem (želatina nebo směs glycerin-bílek) a uloženy do termostatu (37° C).



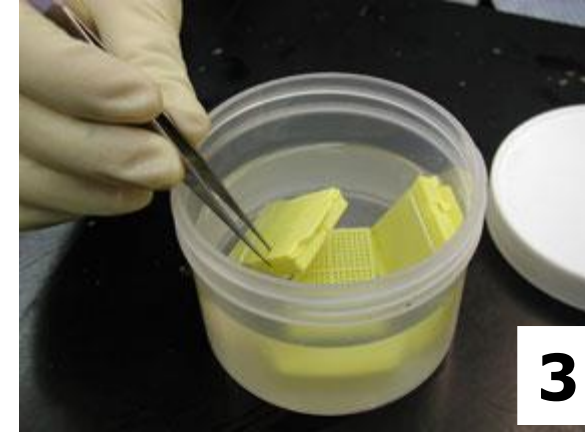
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv. Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylenem.



**1**



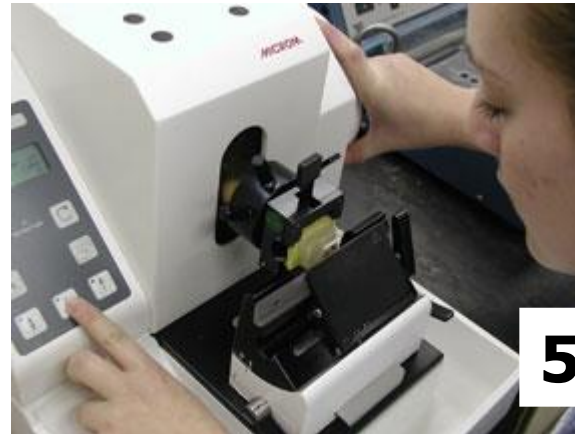
**2**



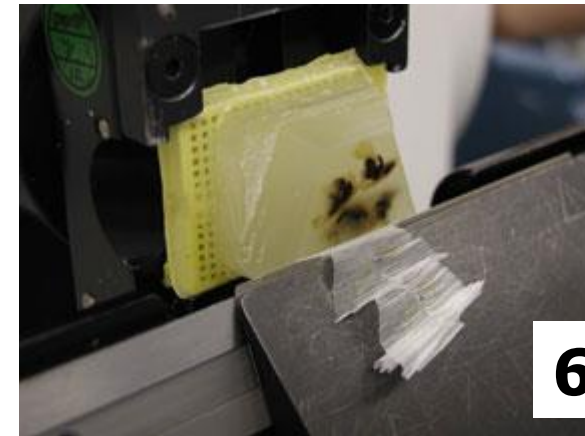
**3**



**4**



**5**



**6**



**7**



**8**

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

## Napínání na teplé vodě



## Napínání na teplé podložce



# 6. 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 (DNA 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

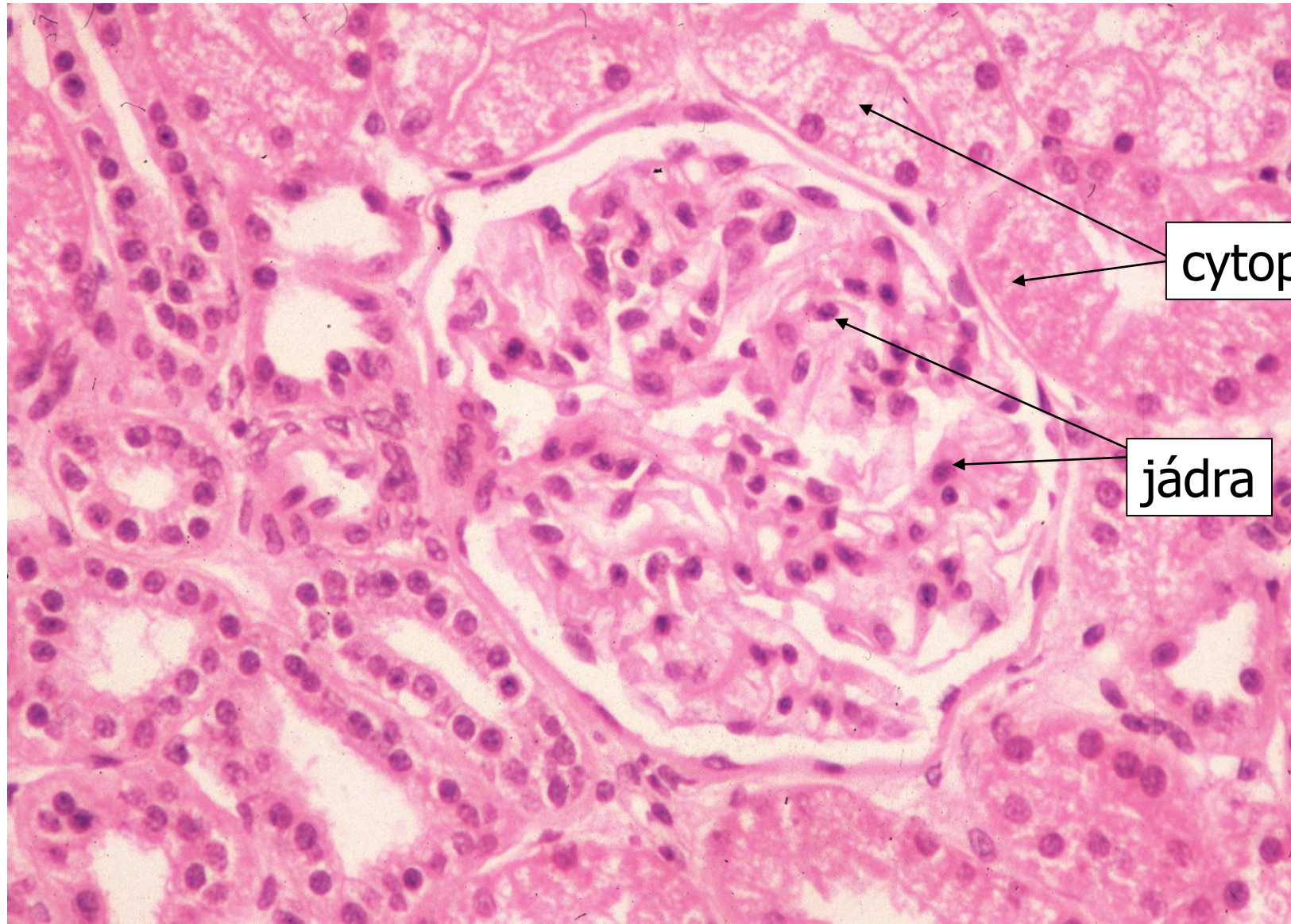
*ORTOCHROMAZIE* - buněčné struktury se barví stejnou barvou, jakou má barvivo (HE)

*METACHROMAZIE* - buněčné struktury se barví jinou barvou, jakou má barvivo

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



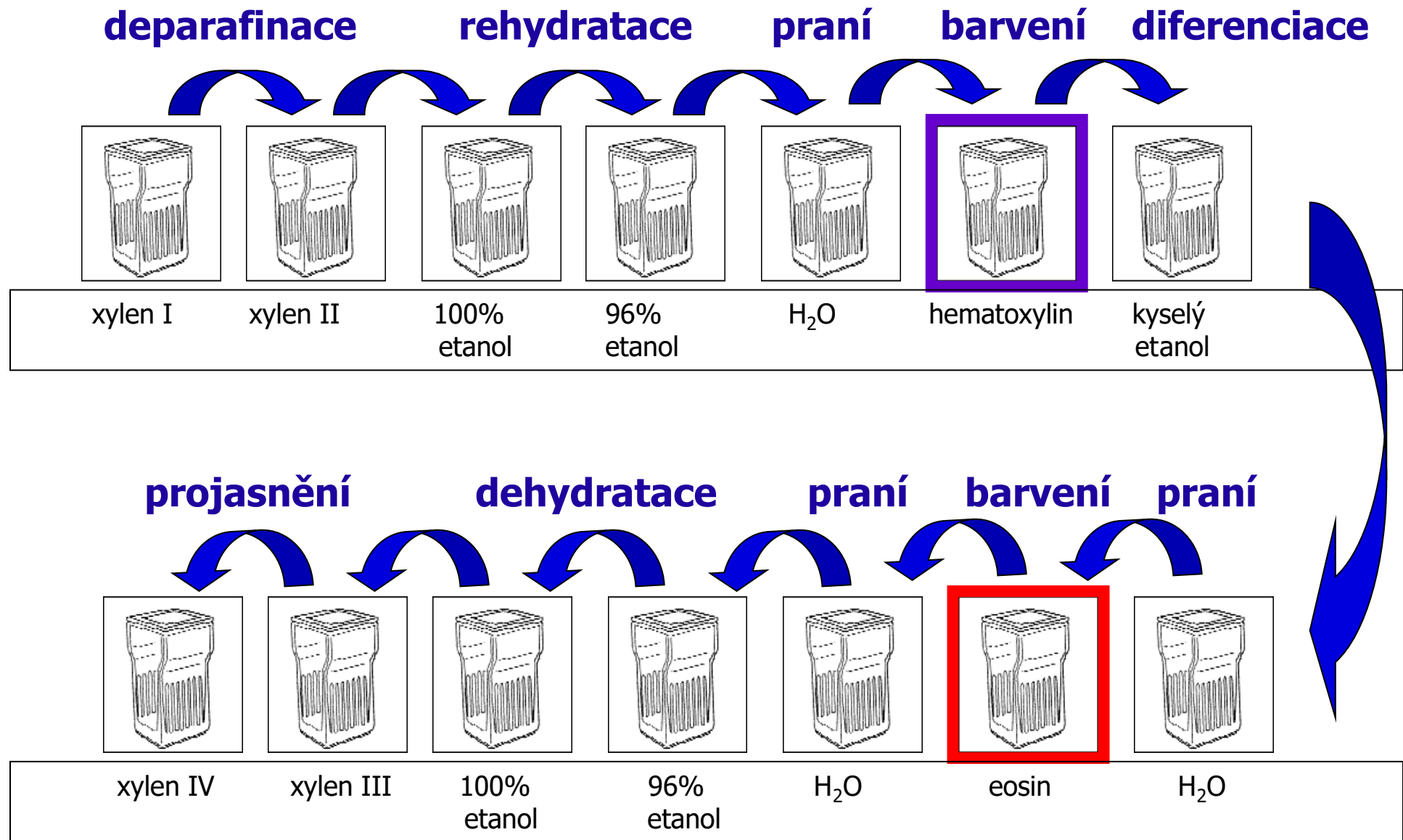
# Hematoxylin a eosin (HE)



cytoplazma

jádra

# 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



# 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**

# Výsledky barvení:

**HE** = *Hematoxylin* – *Eosin*

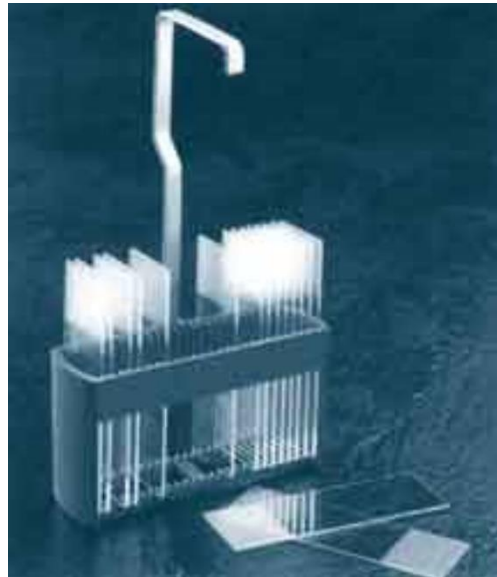
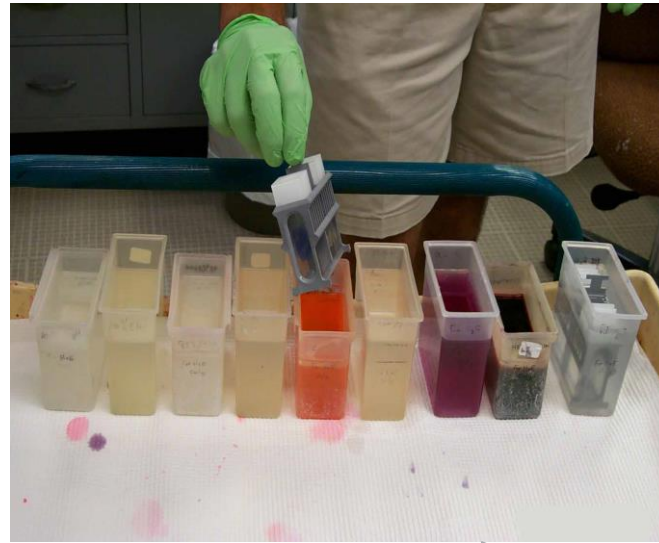
jádra – bright clear blue or dark violet  
cytoplasm and collagen fibers – pink  
muscle tissue – red

**HES** = *Hematoxyline* – *Eosin* – *Safron*

connective tissue – yellow

**AZAN** = *AZocarmin* – *ANiline blue* – *orange G*

nuclei – red  
erythrocytes – orange  
muscle – red  
collagen fibers – blue





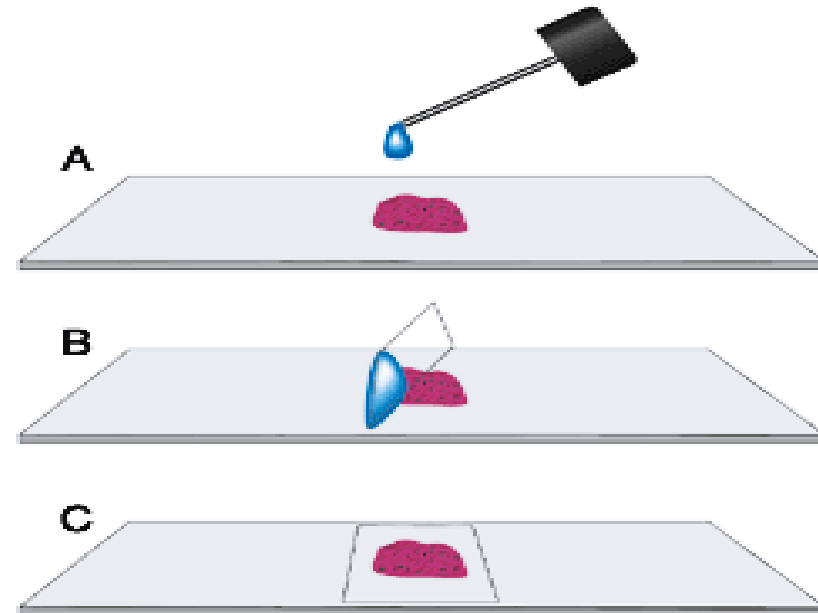
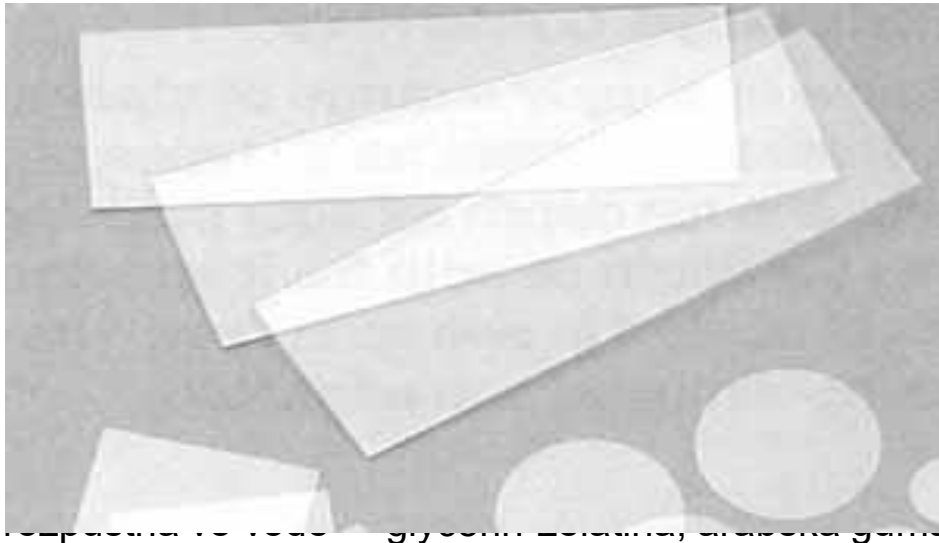
řada boxů (kyvet) s  
barvicími médii

≈



# MONTOVÁNÍ

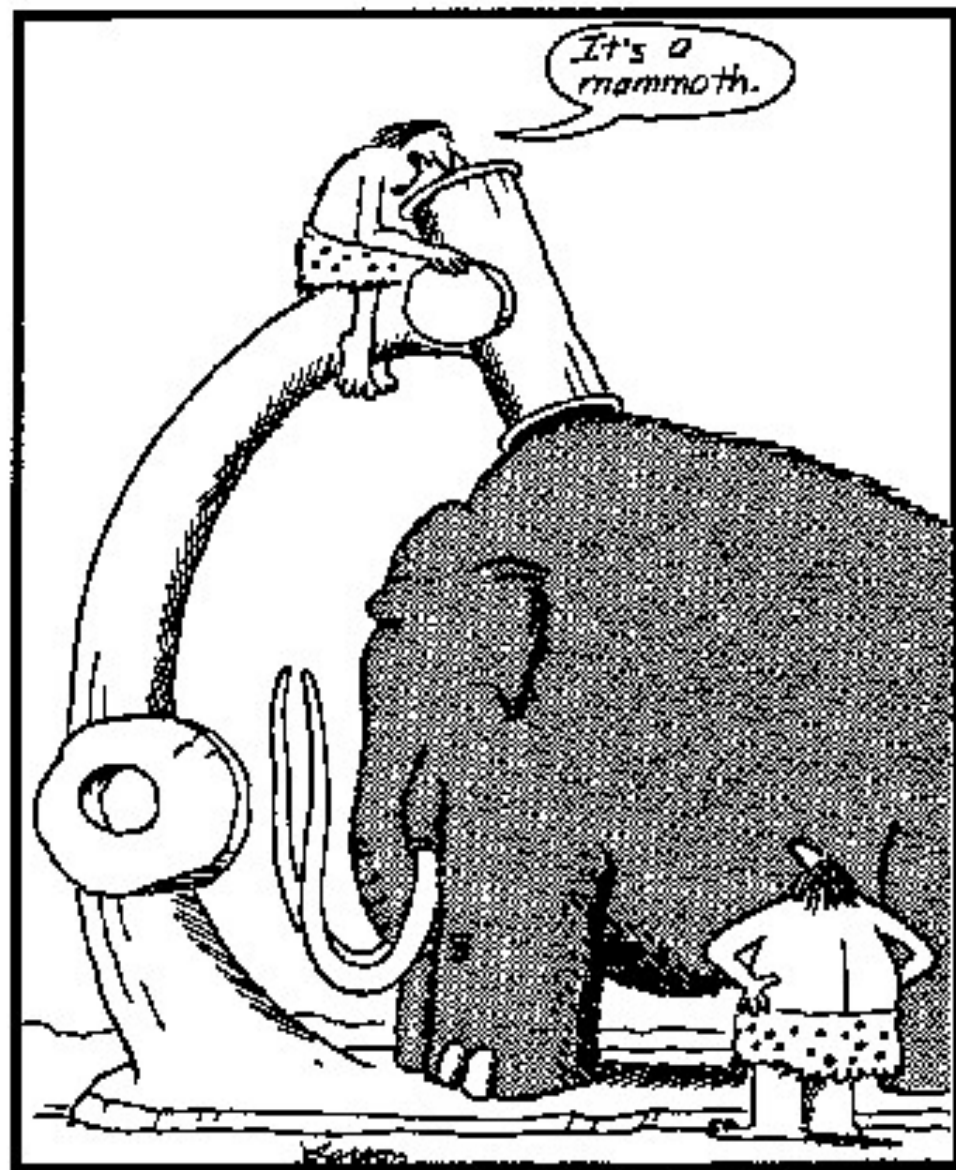
uzavření preparátu – kapkou montovacího media a krycím sklíčkem ⇒ trvalý preparát





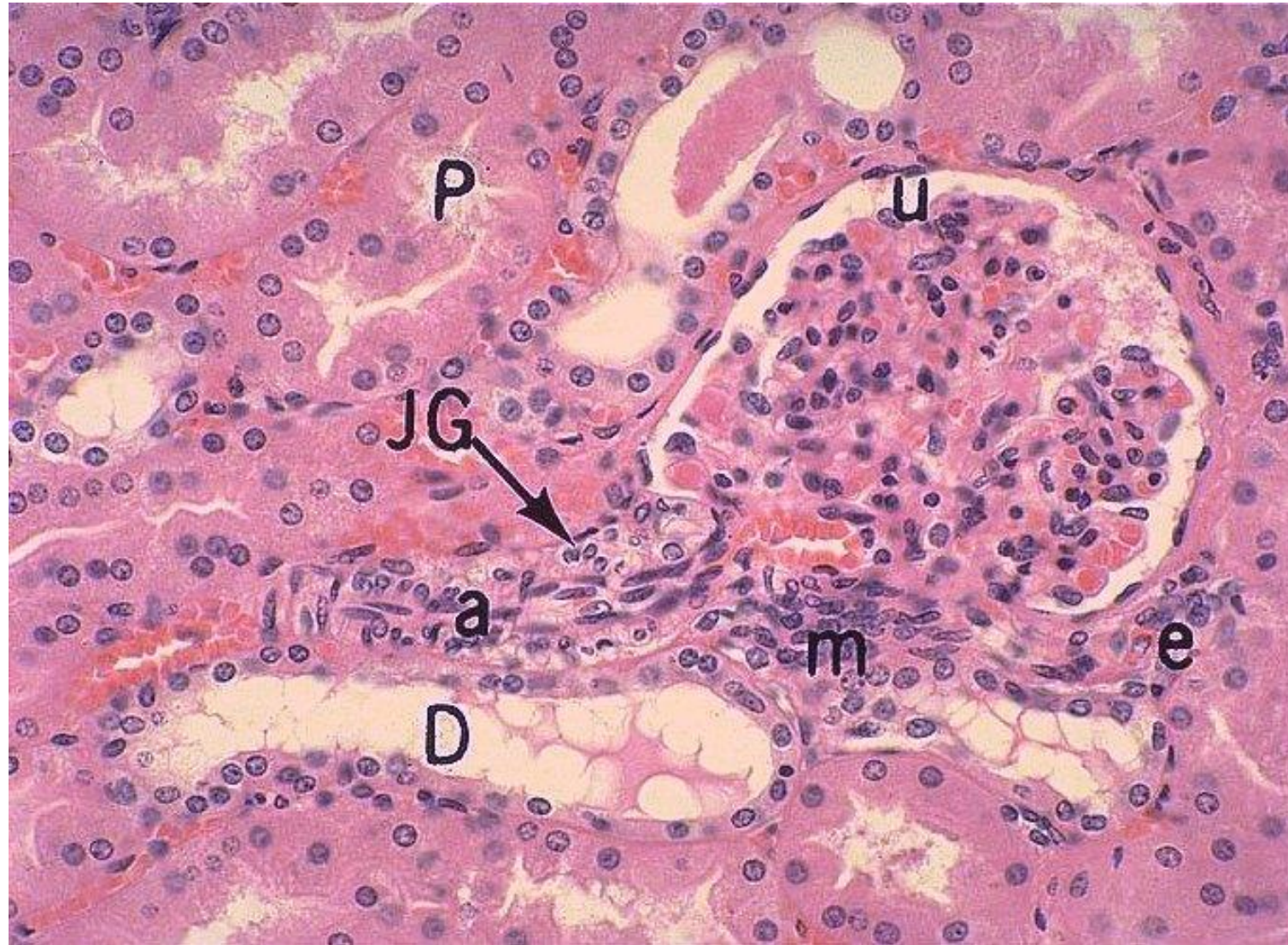


**trvalé histologické preparáty ke studiu ve SM**

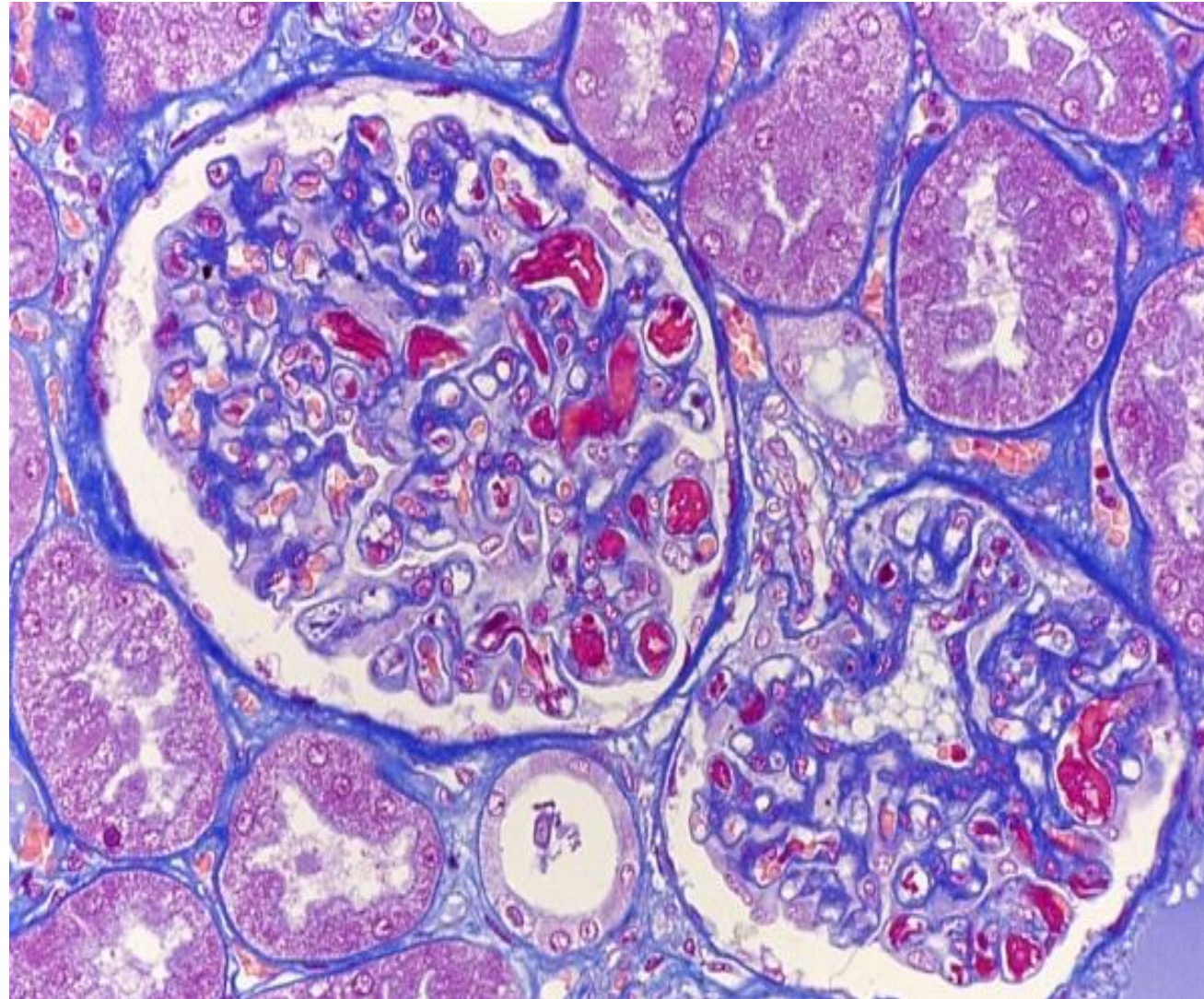


Early microscope

# Hematoxylin a eosin (HE)



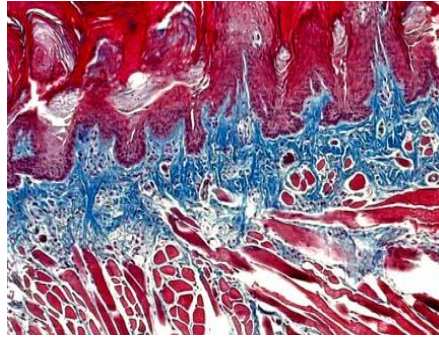
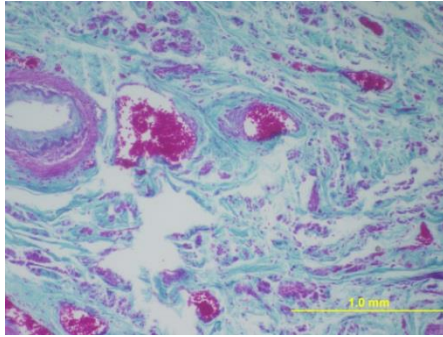
# Azokarmín a anilin. modř (AZAN)



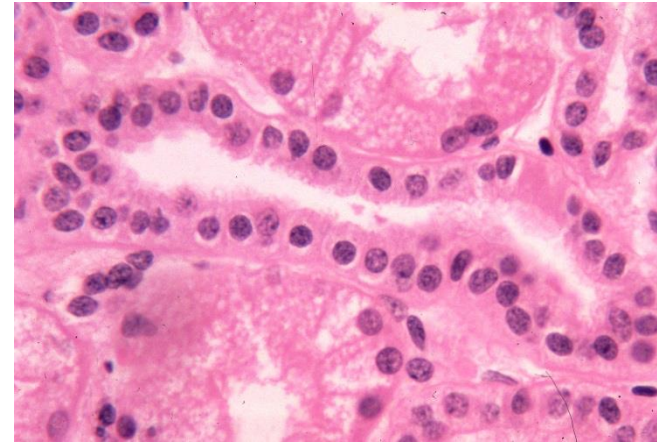
## **Barvicí metody:**

přehledné – HE, AZAN

demonstrují všechny složky tkání

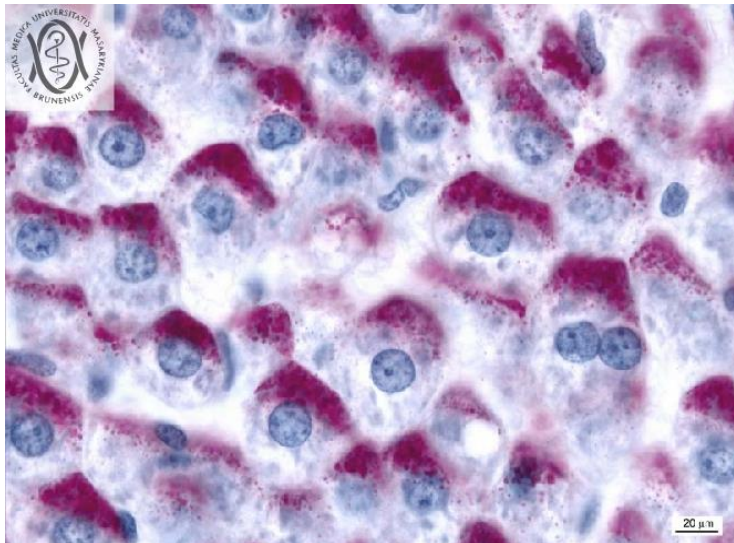


HE – nejpoužívanější barvení

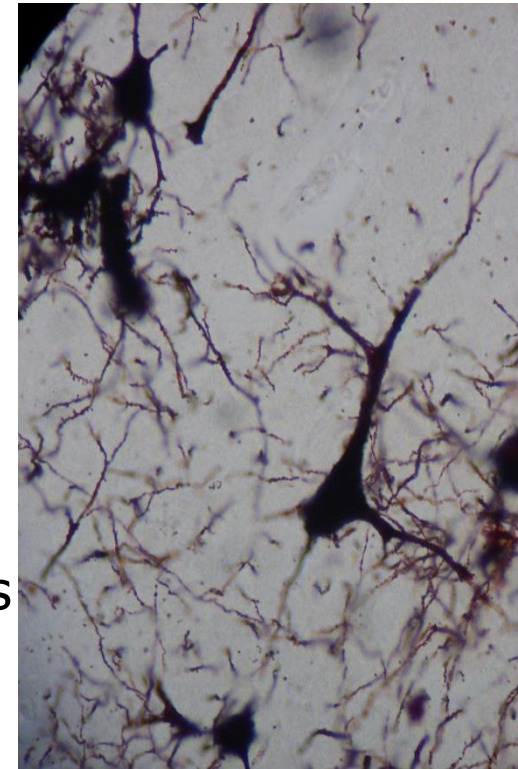


speciální

zdůrazňují určité buněčné nebo tkáňové složky



impregnační  
soli Ag, Au nebo Os



# 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  $\mu\text{m}$ ) 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)

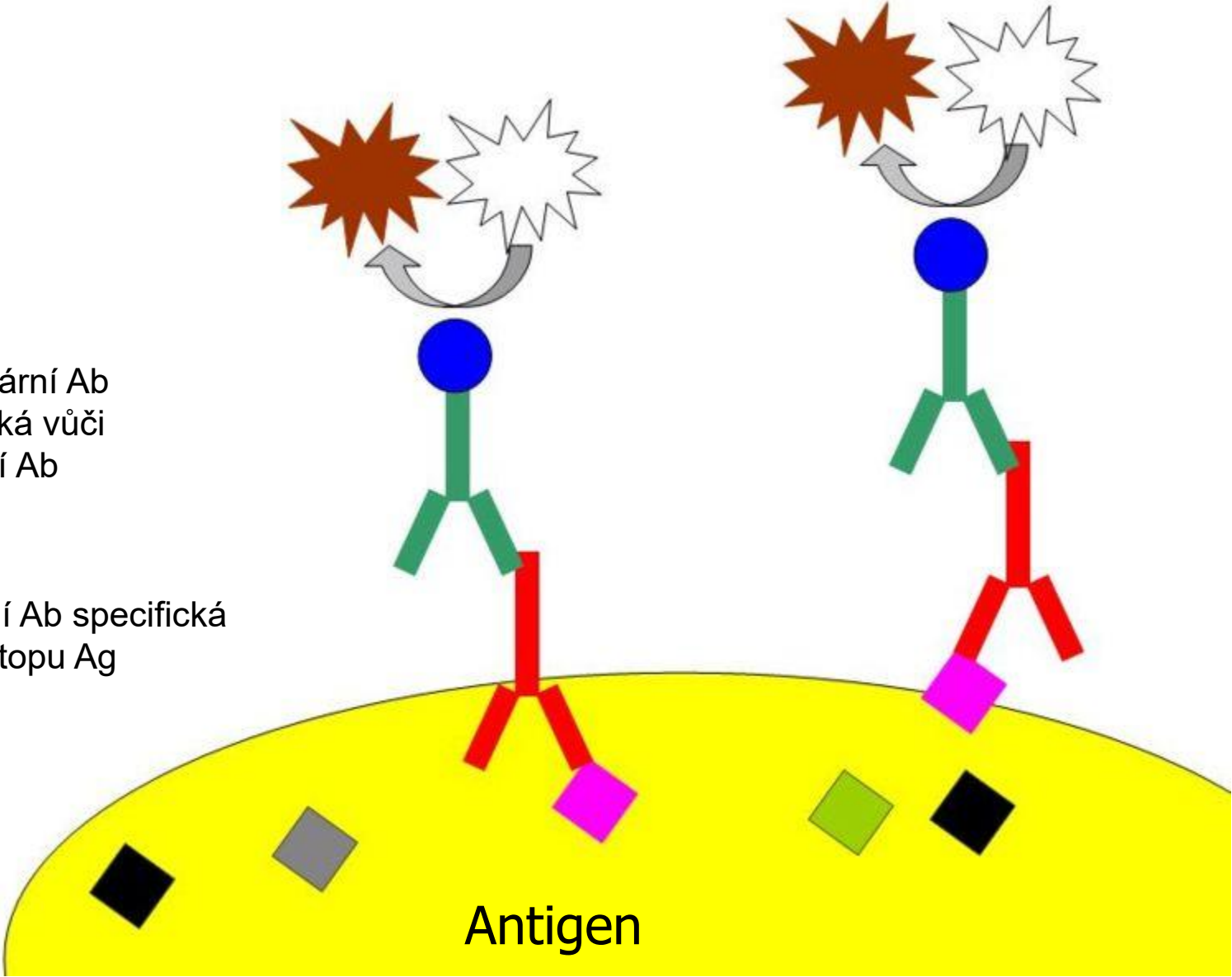
\* - marker

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

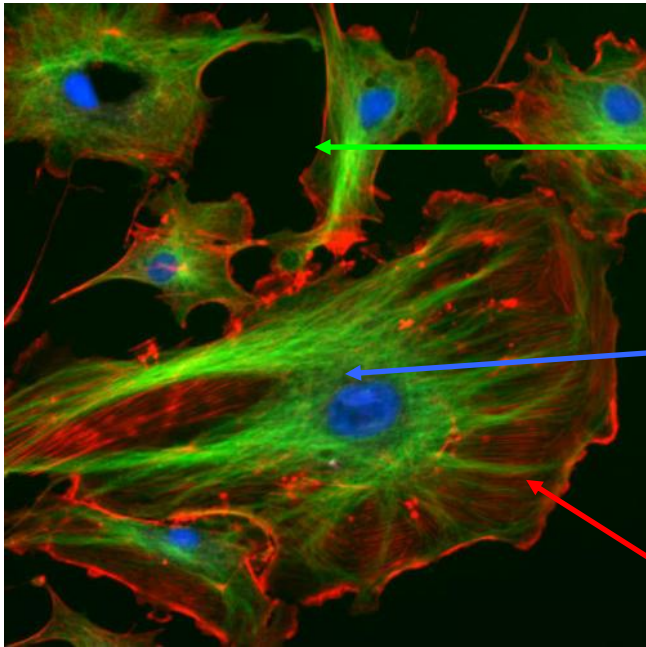
Enzym konjugovaný  
se sekundární Ab  
zajistí vizualizaci

Sekundární Ab  
specifická vůči  
primární Ab

Primární Ab specifická  
vůči epitopu Ag



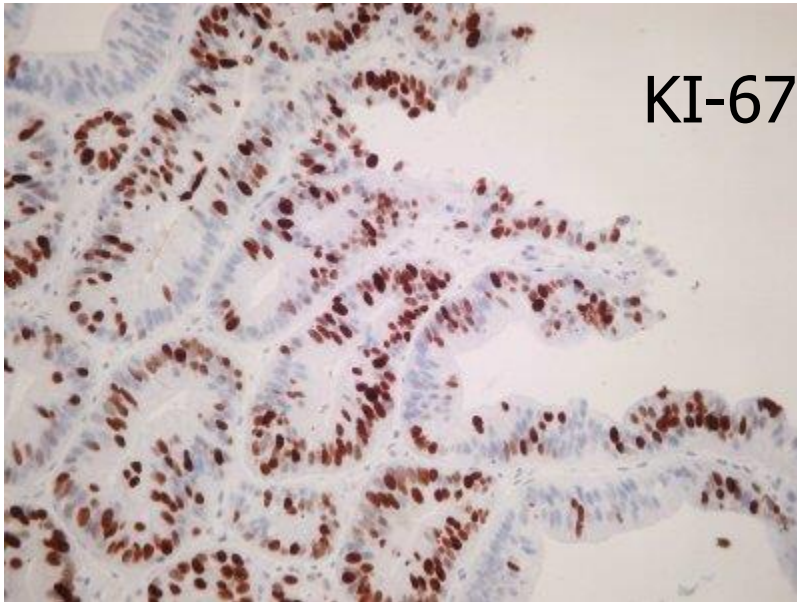
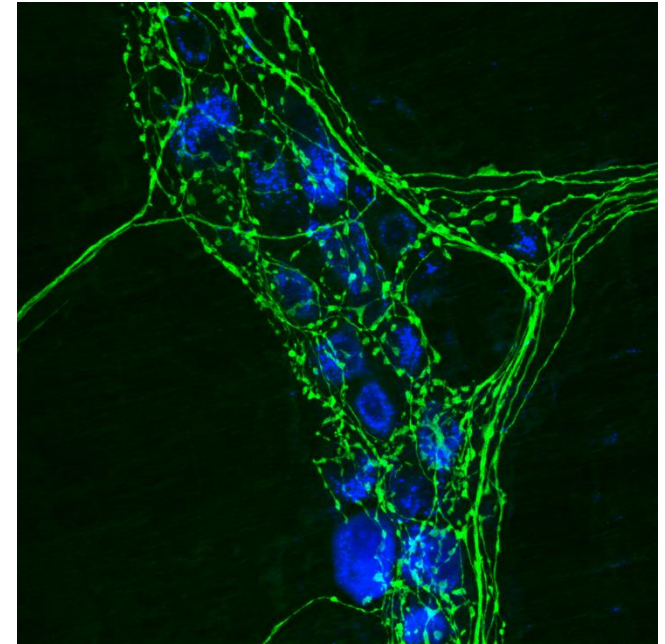




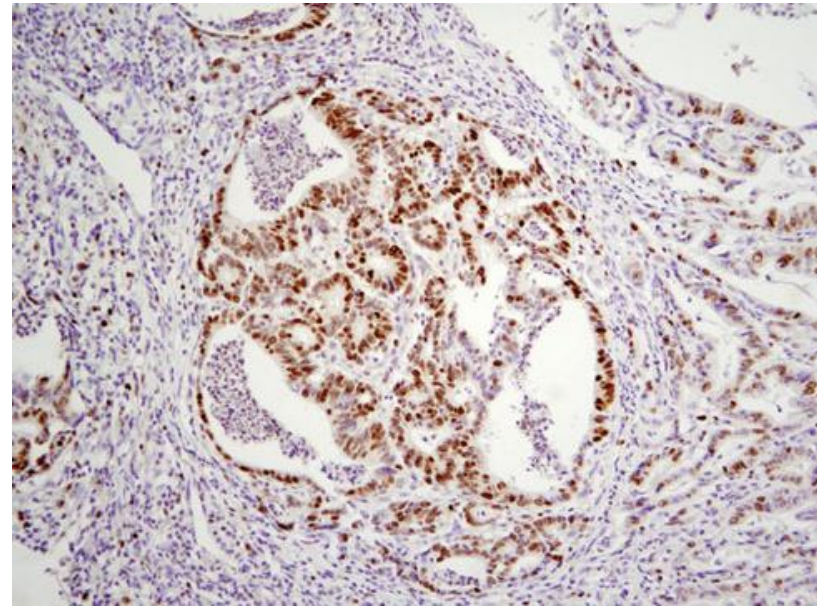
Aktin  
(cytoskelet)

DAPI (jádno)

Mikrotubuly (cytoskelet)

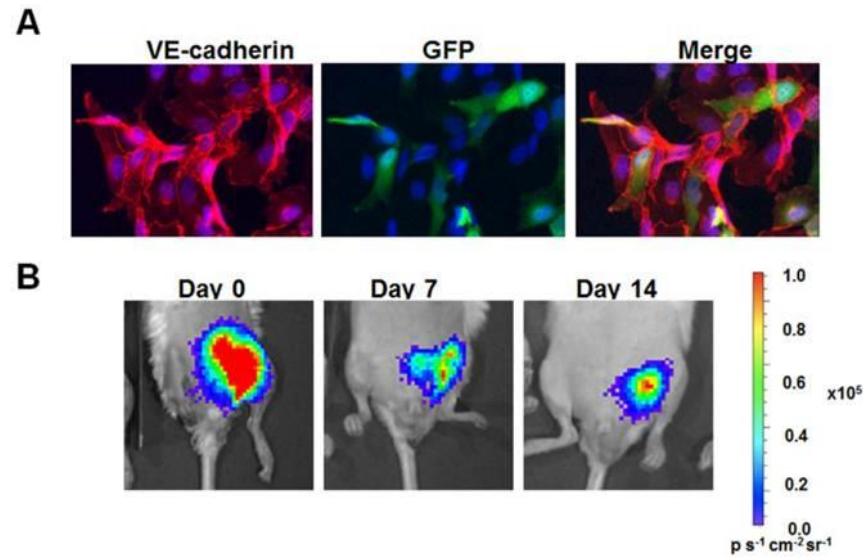


KI-67



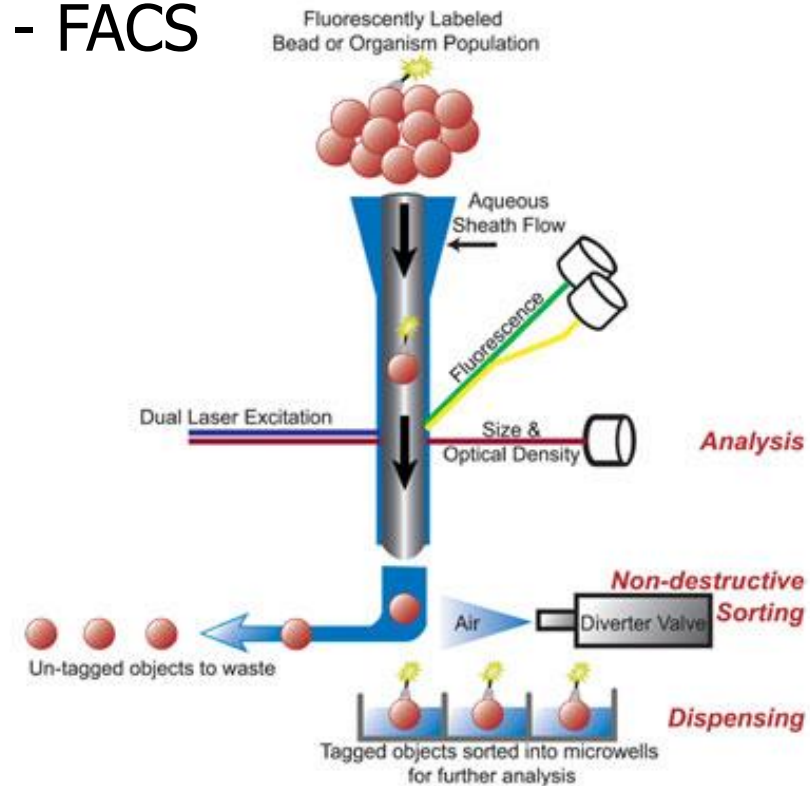
# In-vivo/live cell imaging

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



doi:10.7150/thno.3694

- FACS

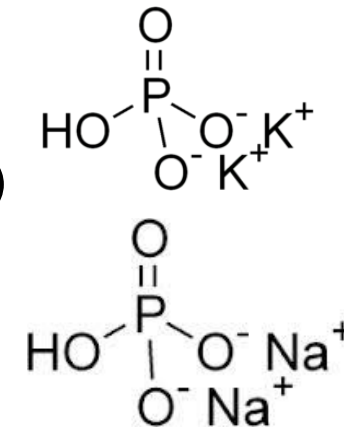
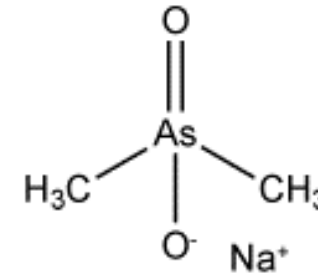


# ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ PRO ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII (EM)



Požadavky na pracovní podmínky:

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

**DEHYDRATACE** - 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)**



**3**

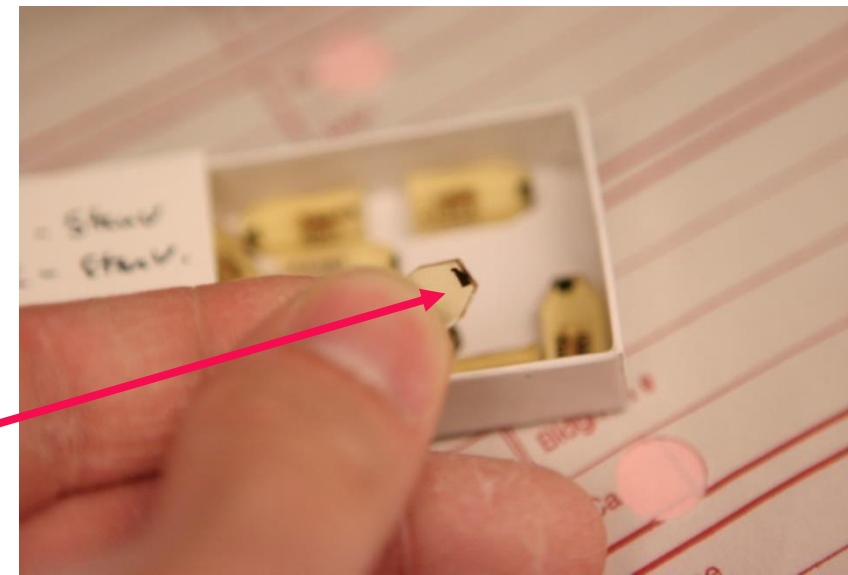
**ploténky s  
komůrkami  
(4, 5)**

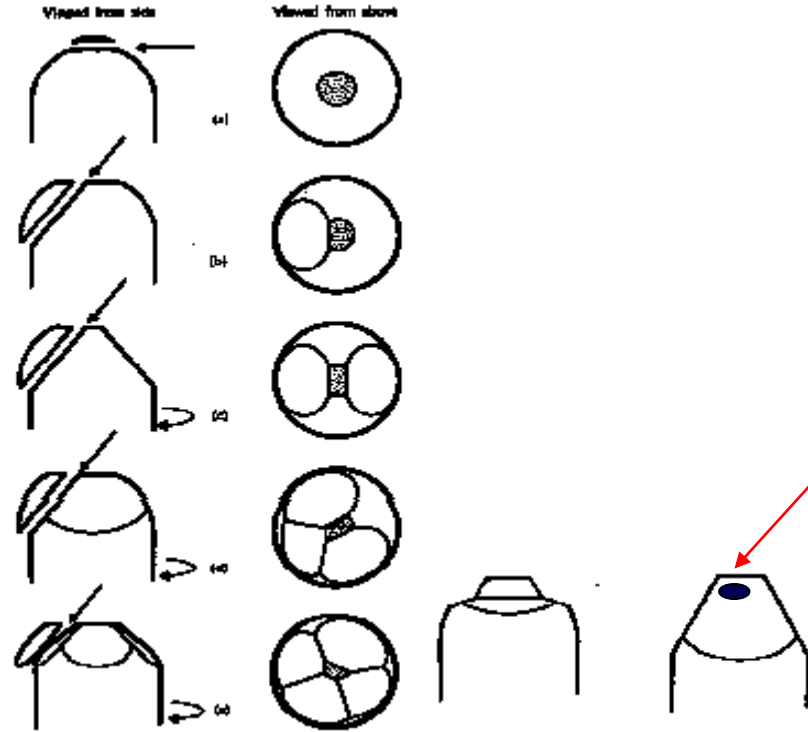


**4,  
5**



**bločky  
připravené  
pro krájení**

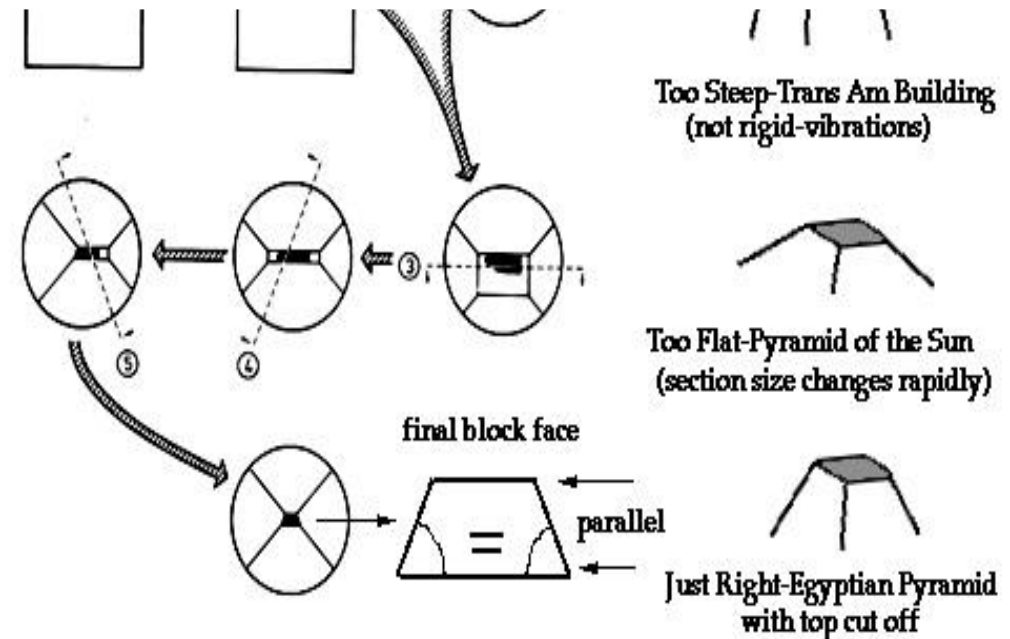




# Úprava pyramid (trimování)

Odstranění přebytku tvrdého zalévacího media a zhotovení pyramidy s minimální řeznou plochou (0.1 mm<sup>2</sup>).

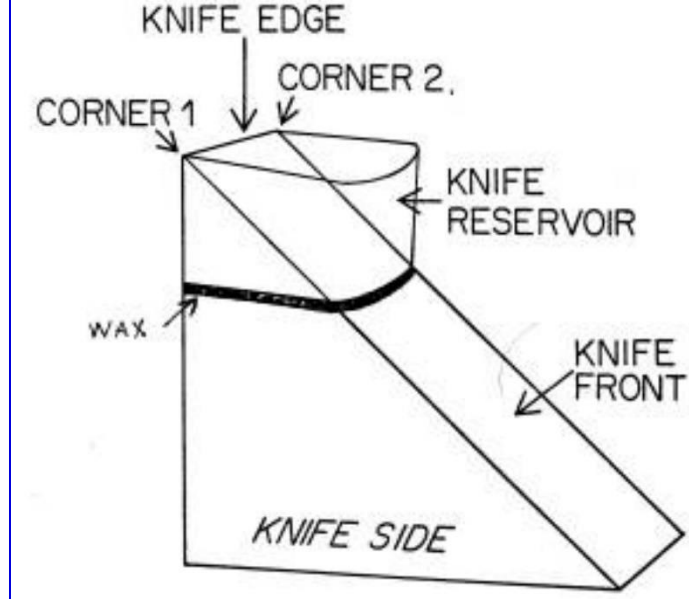
*Minimum tkáně (černý shluk) ve vrcholu pyramidy*



# KRÁJENÍ

po odstranění přebytku media (trimming) a vytvoření pyramidy se z malé plošky (0.1 mm<sup>2</sup>) 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 (Ni)

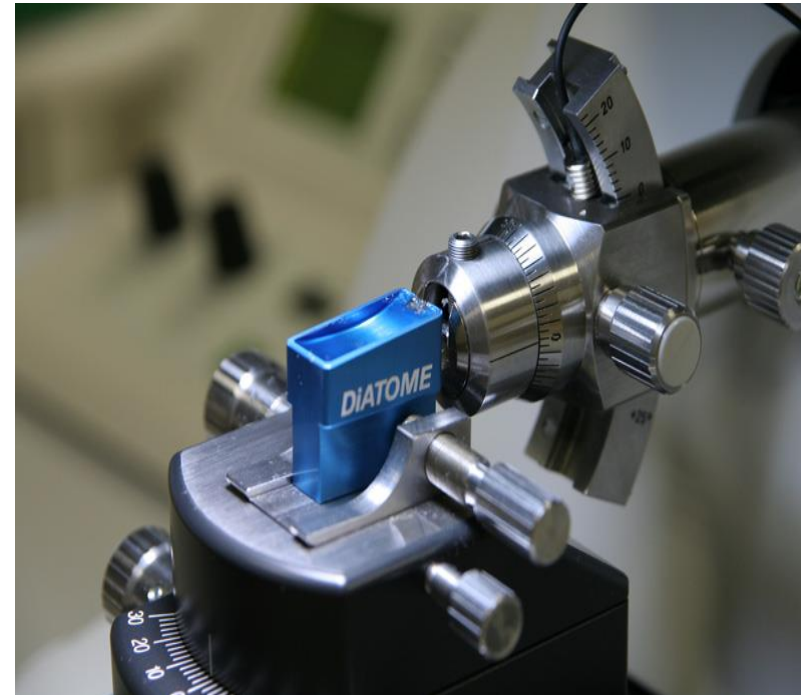
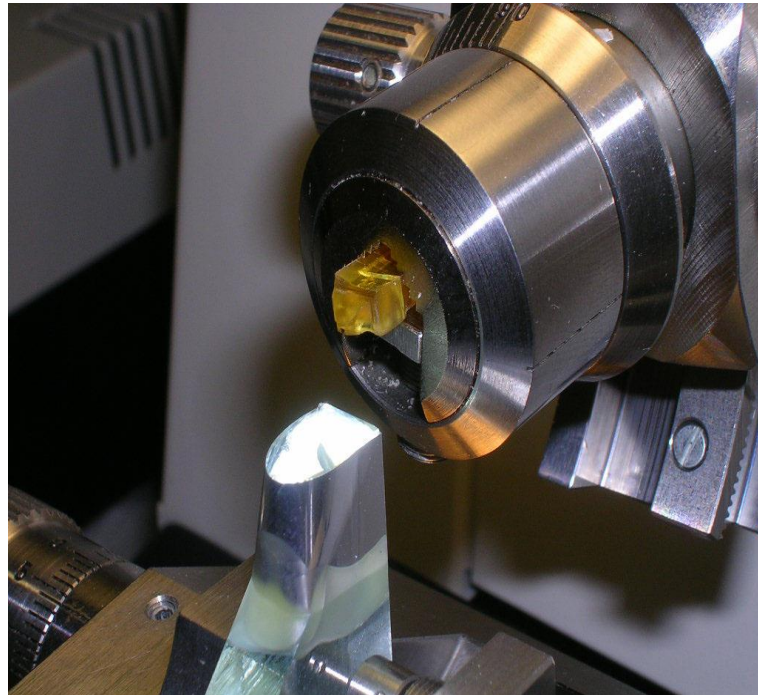




# Ultramikrotom ové nože:

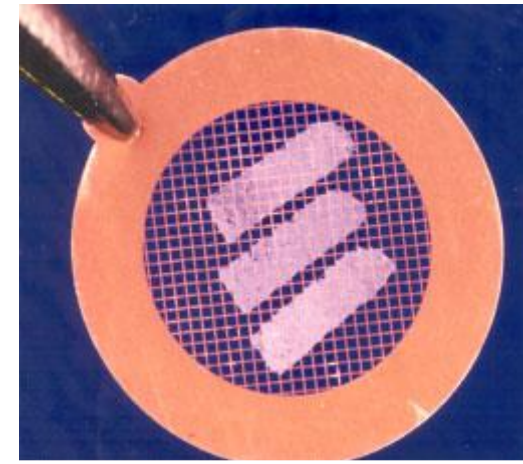
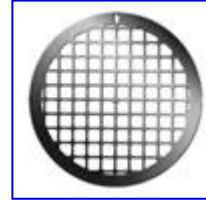
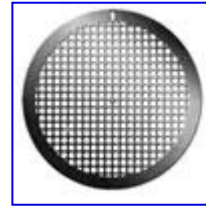
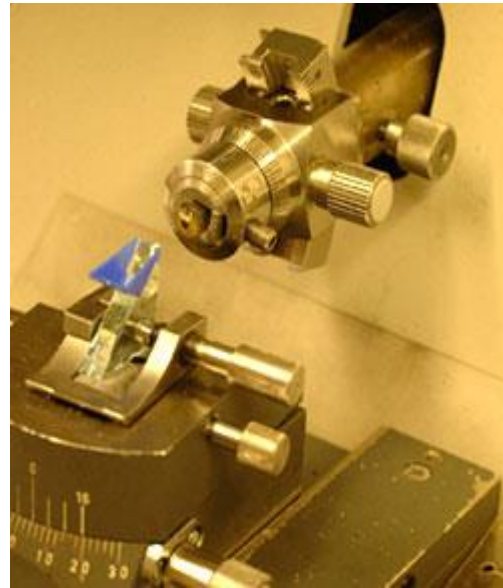
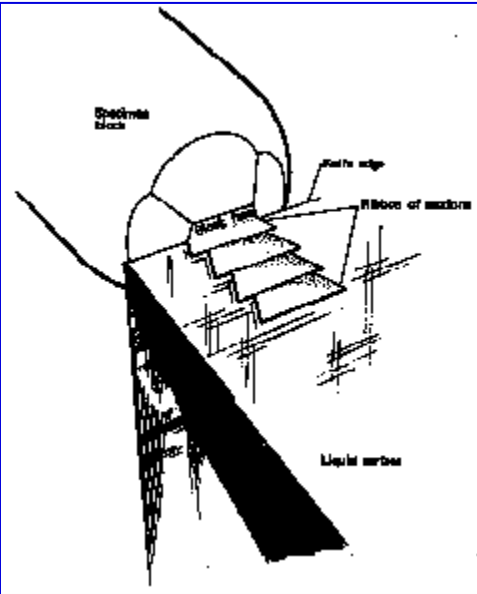
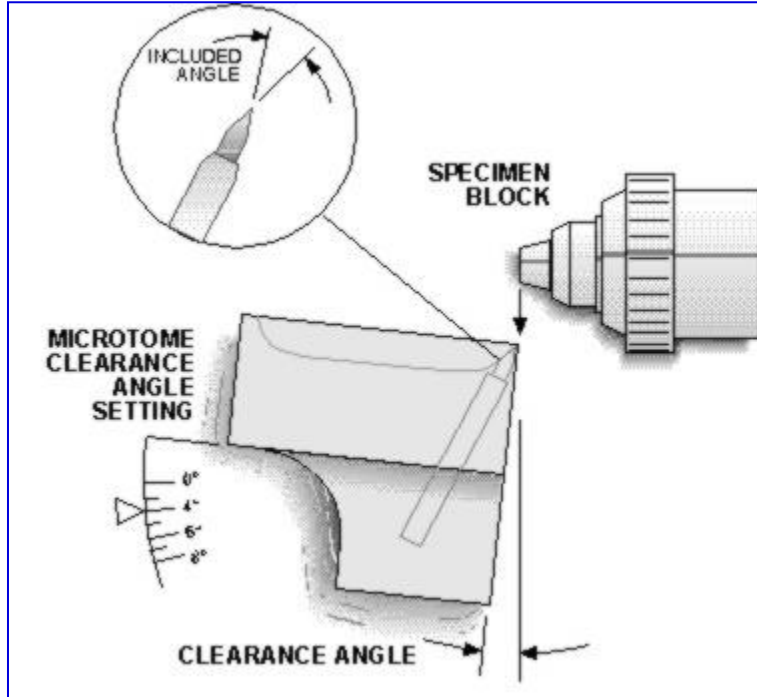
skleněný

diamantový





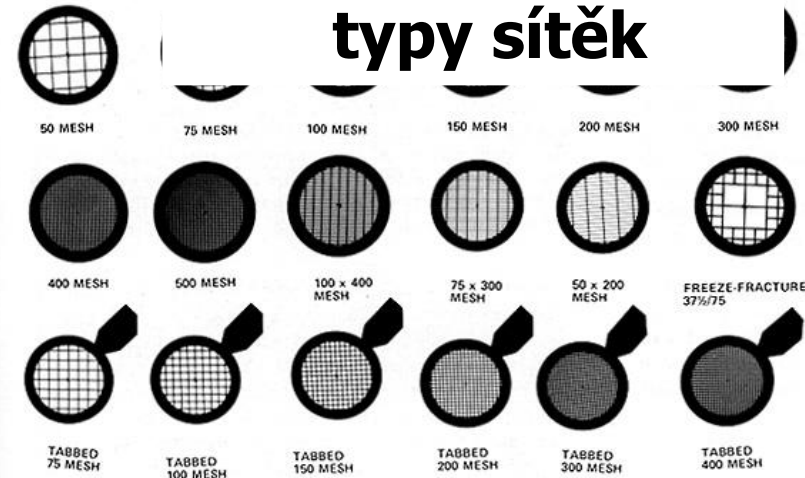
# Krájení, nosné síťky



## Síťka se 3 páskami řezů

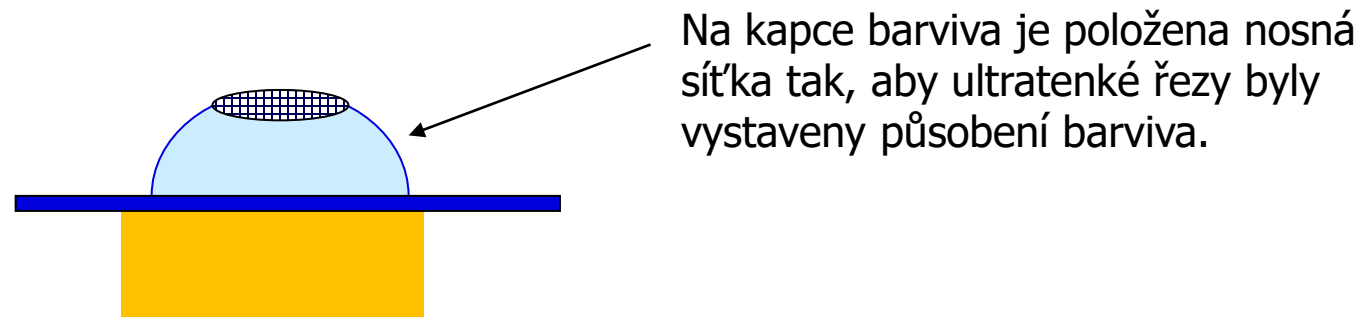


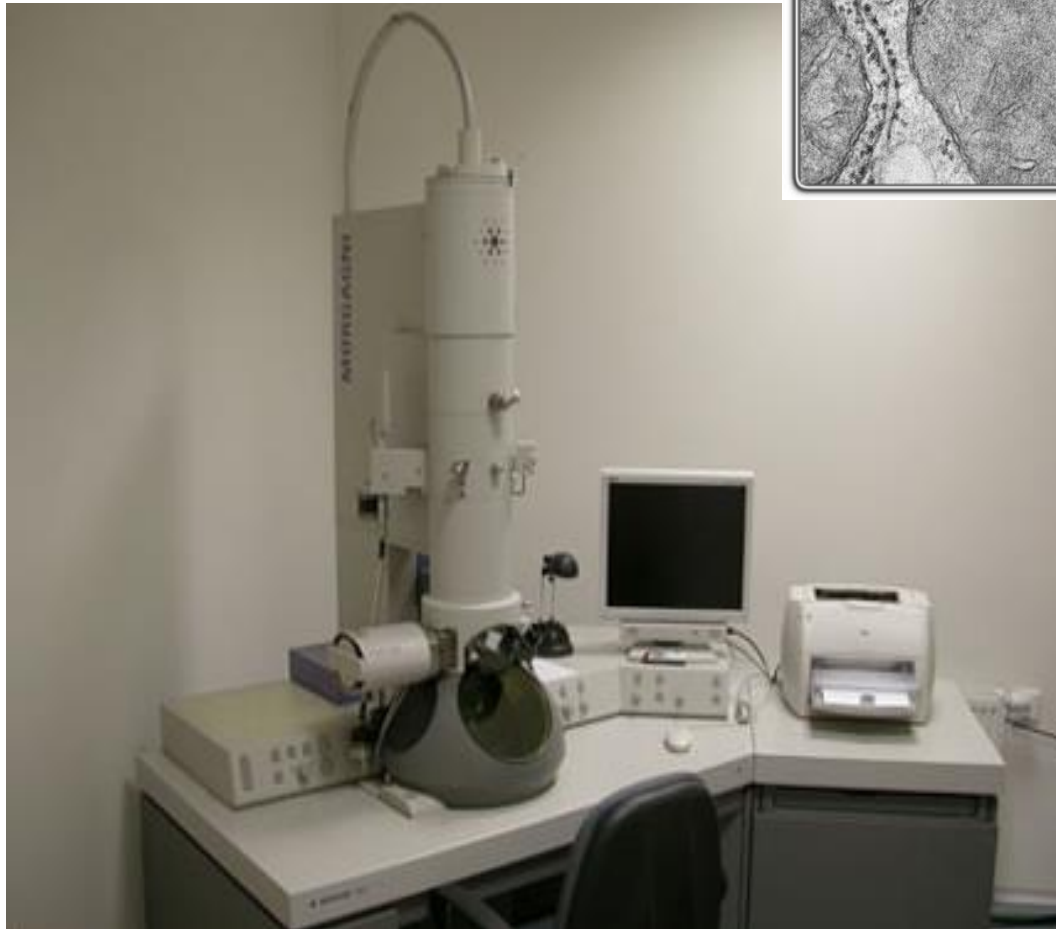
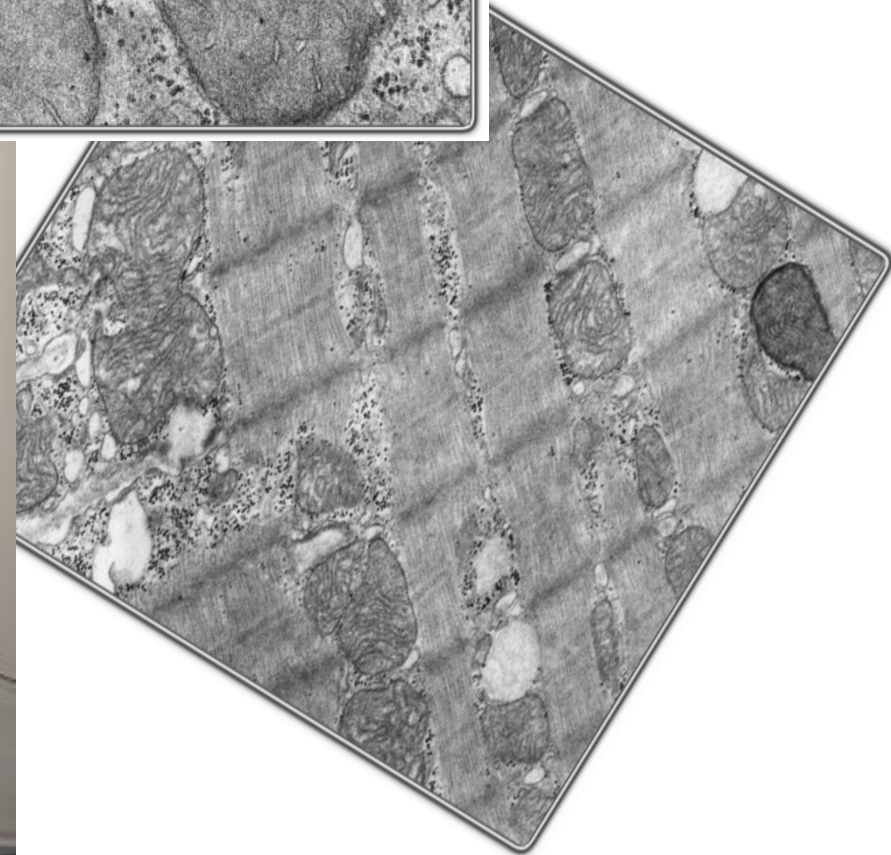
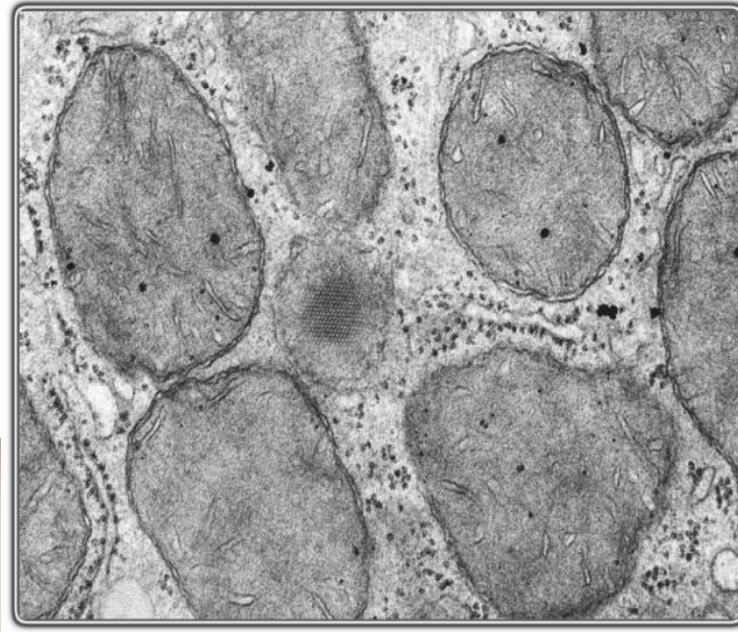
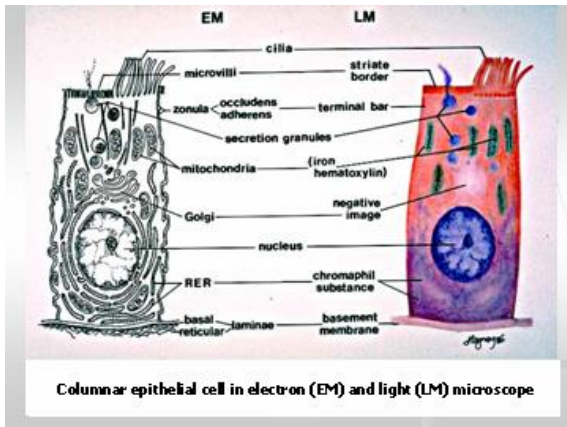
## typy sítěk



# KONTRASTOVÁNÍ

princip diferenciacce struktur – různý rozptyl svazku elektronů  
v závislosti denzité 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

**M U N I**  
**M E D**

**Otázky?**