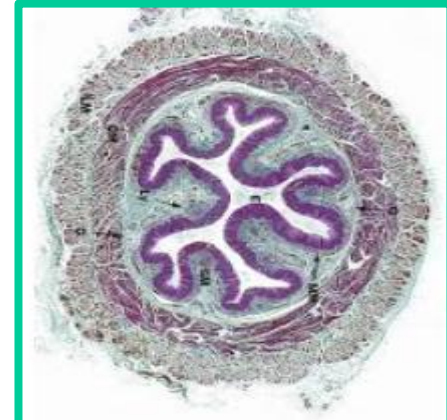
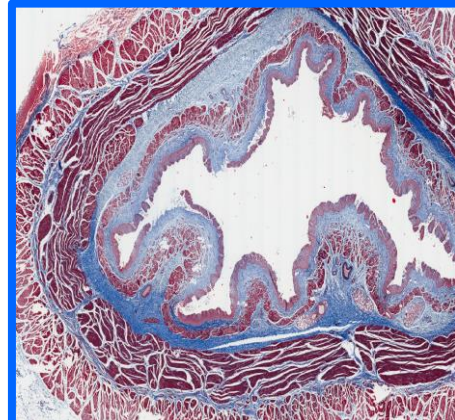
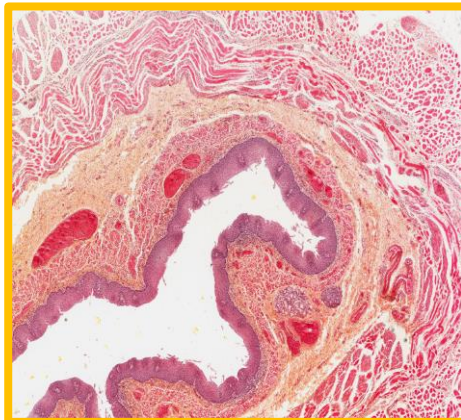


# Základní barvicí metody v histologii

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

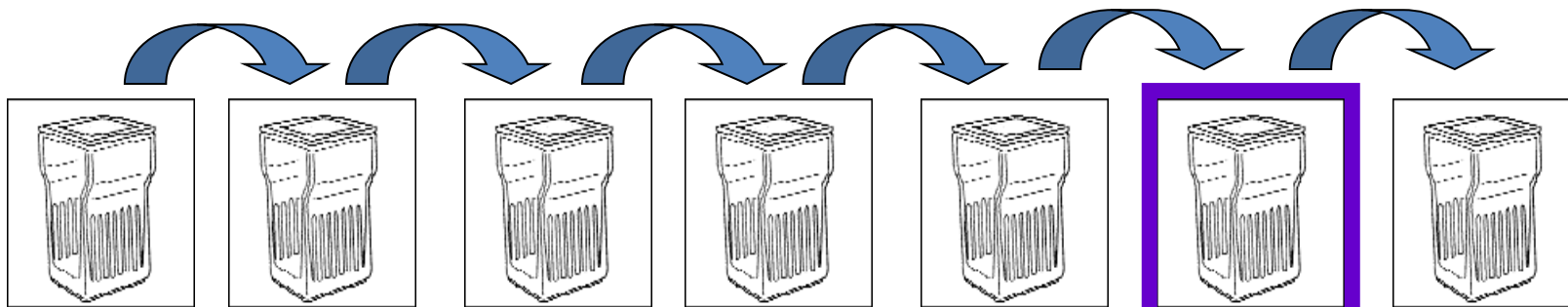
# HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)

deparafinace

rehydratace praní

barvení

diferenciace



xylén I

xylén II

100%  
etanol

96%  
etanol

H<sub>2</sub>O

hematoxylin

kyselý  
etanol

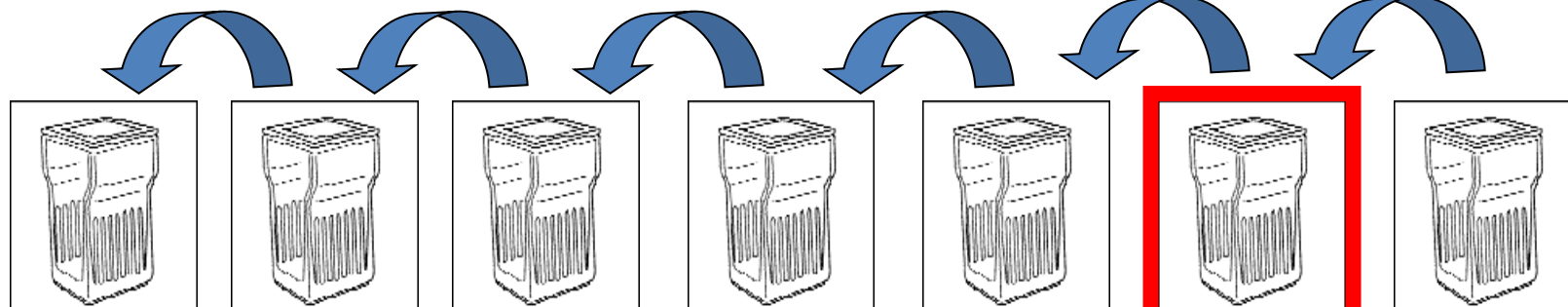
projasnění

dehydratace

praní

barvení

praní



xylén IV

xylén III

100%  
etanol

96%  
etanol

H<sub>2</sub>O

eosin

H<sub>2</sub>O

# 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

# Barvicí automat



řada boxů (kvet) s barvicími médii

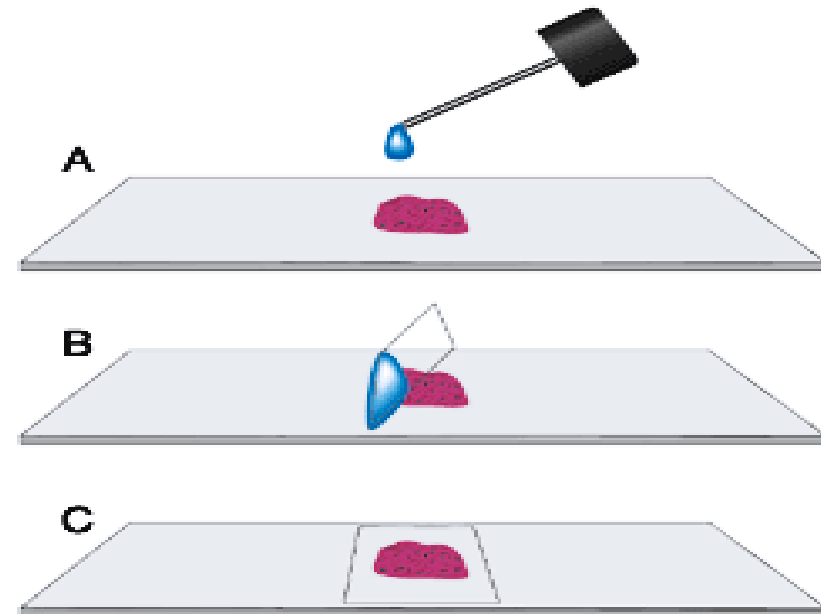
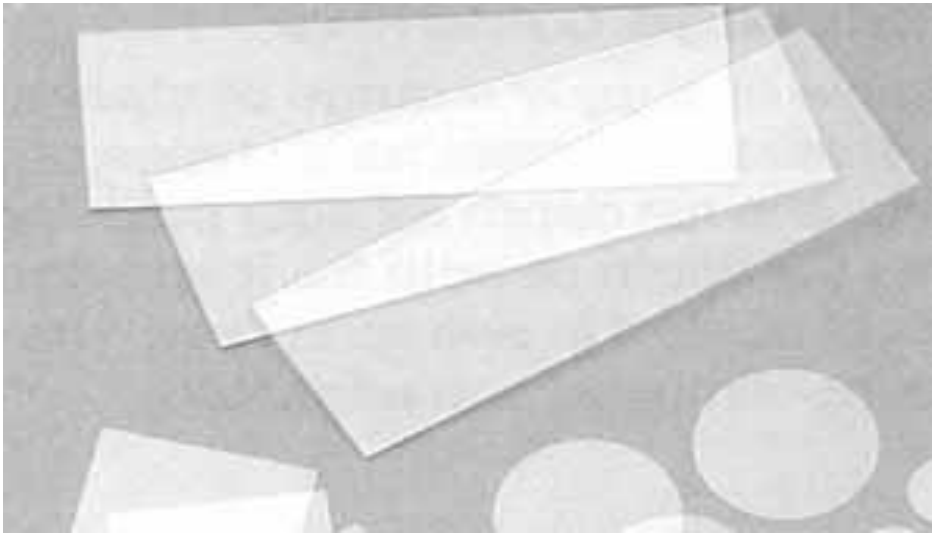


# TYPY BARVENÍ

- 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 – AgNO<sub>3</sub> (nervová nebo retikulární vlákná)

# MONTOVÁNÍ

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

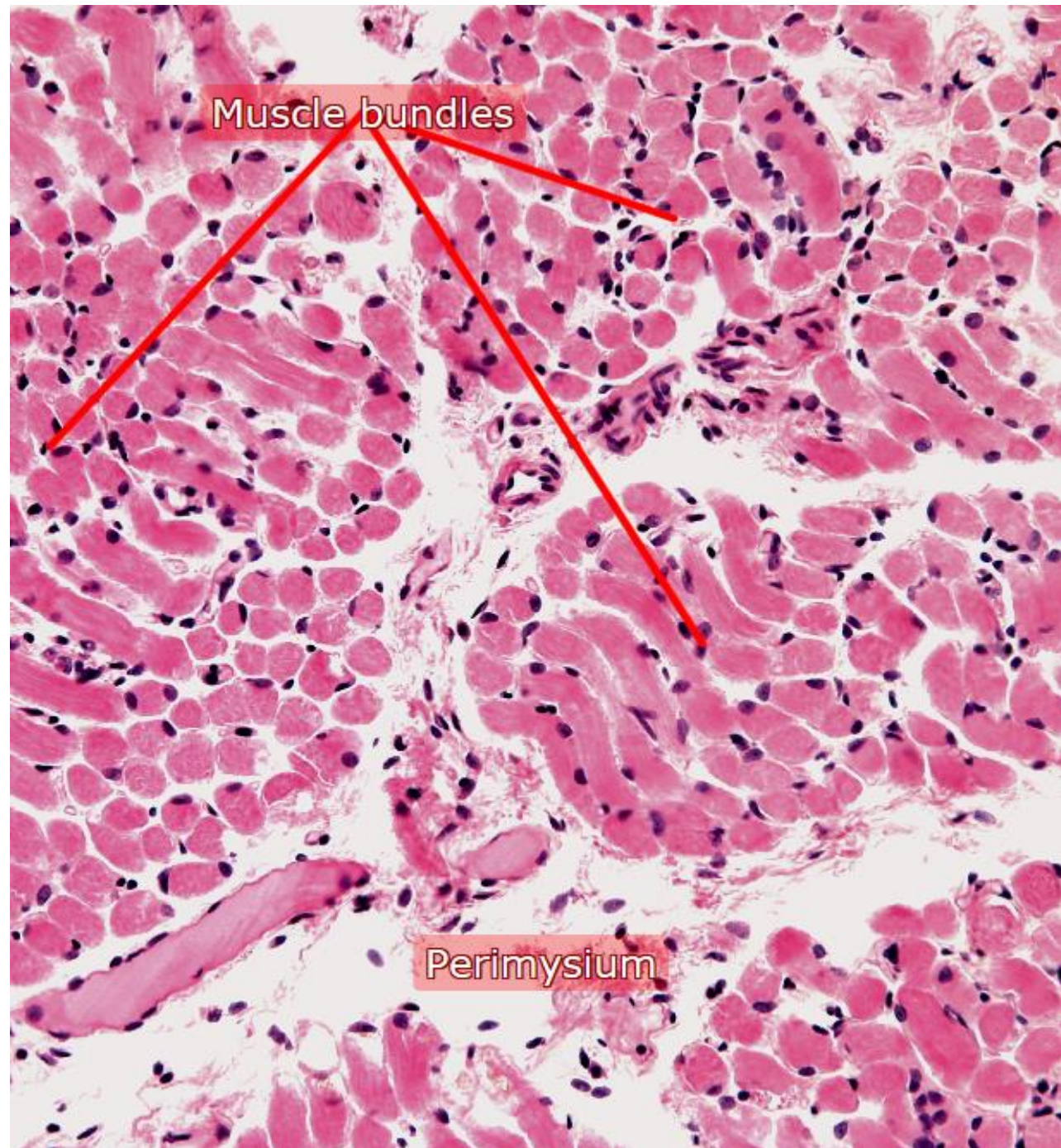


- rozpustná v xylenu – kanadský balzám
- rozpustná ve vodě – glycerin-želatina, arabská guma

# Hematoxylin Eosin (HE)

Výsledek barvení:

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



2 – Apex linguae (HE)



**Hematoxylin**

**Eosin**

**Šafrán**

**(HEŠ)**

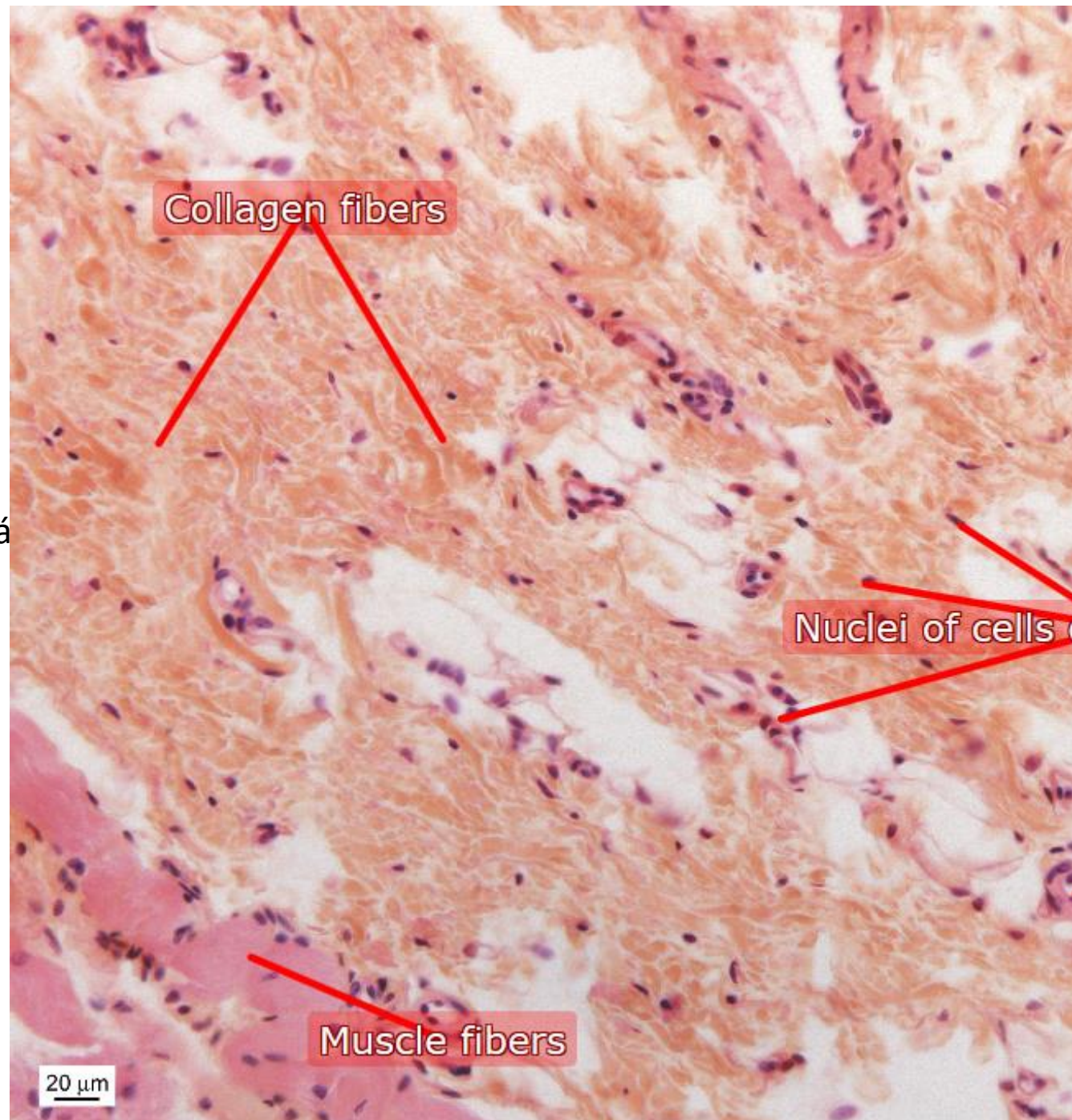
Výsledek barvení:

jádra buněk – modrofialová  
cytoplazma – růžová  
kolagenní vlákna – žlutá



žlutý Massonův trichrom

**11 – Oesophagus (HES)**



**Azokarmin**  
**Aniline blue**  
**Orange G**  
**(AZAN)**

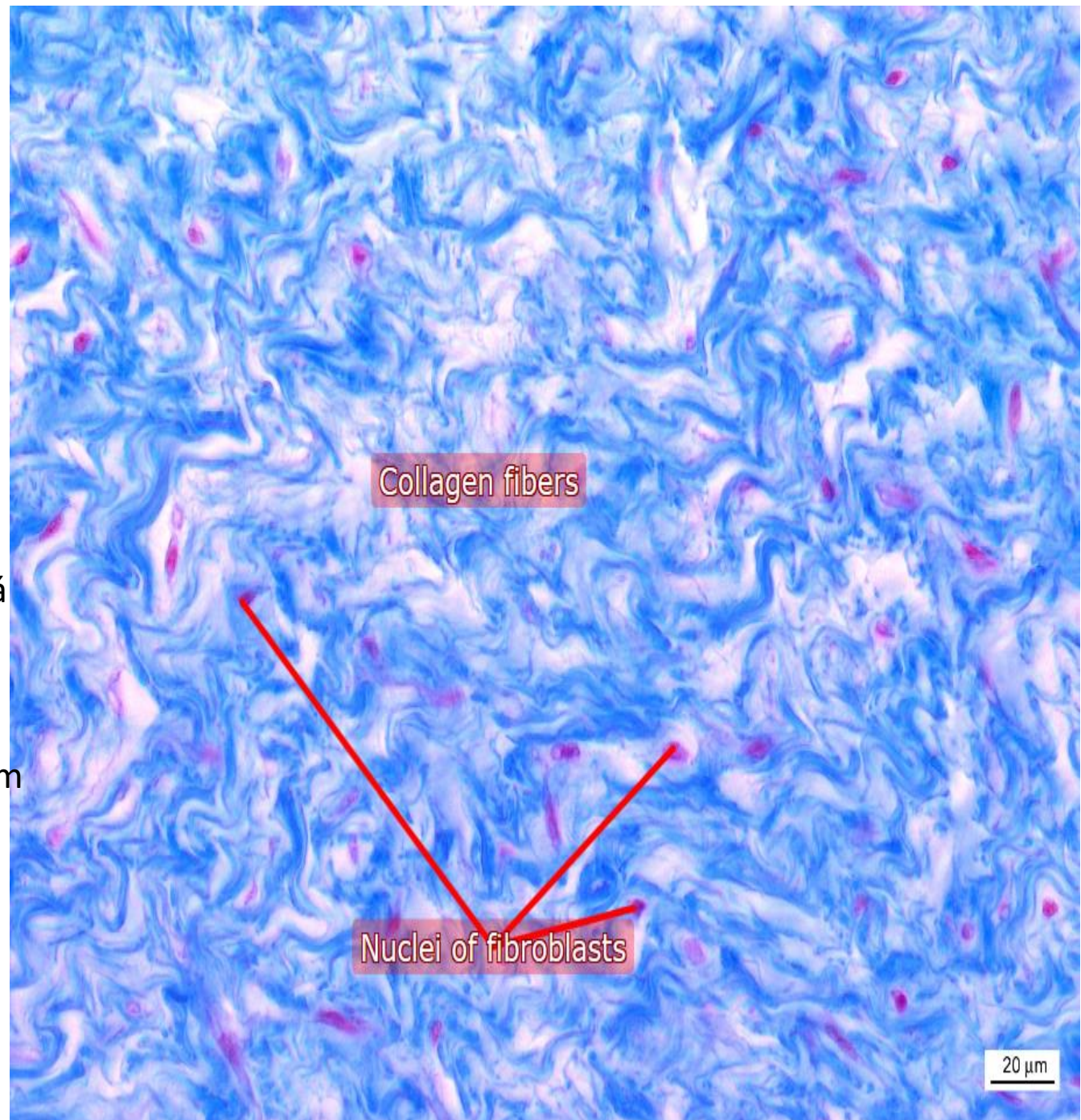
Výsledek barvení:

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



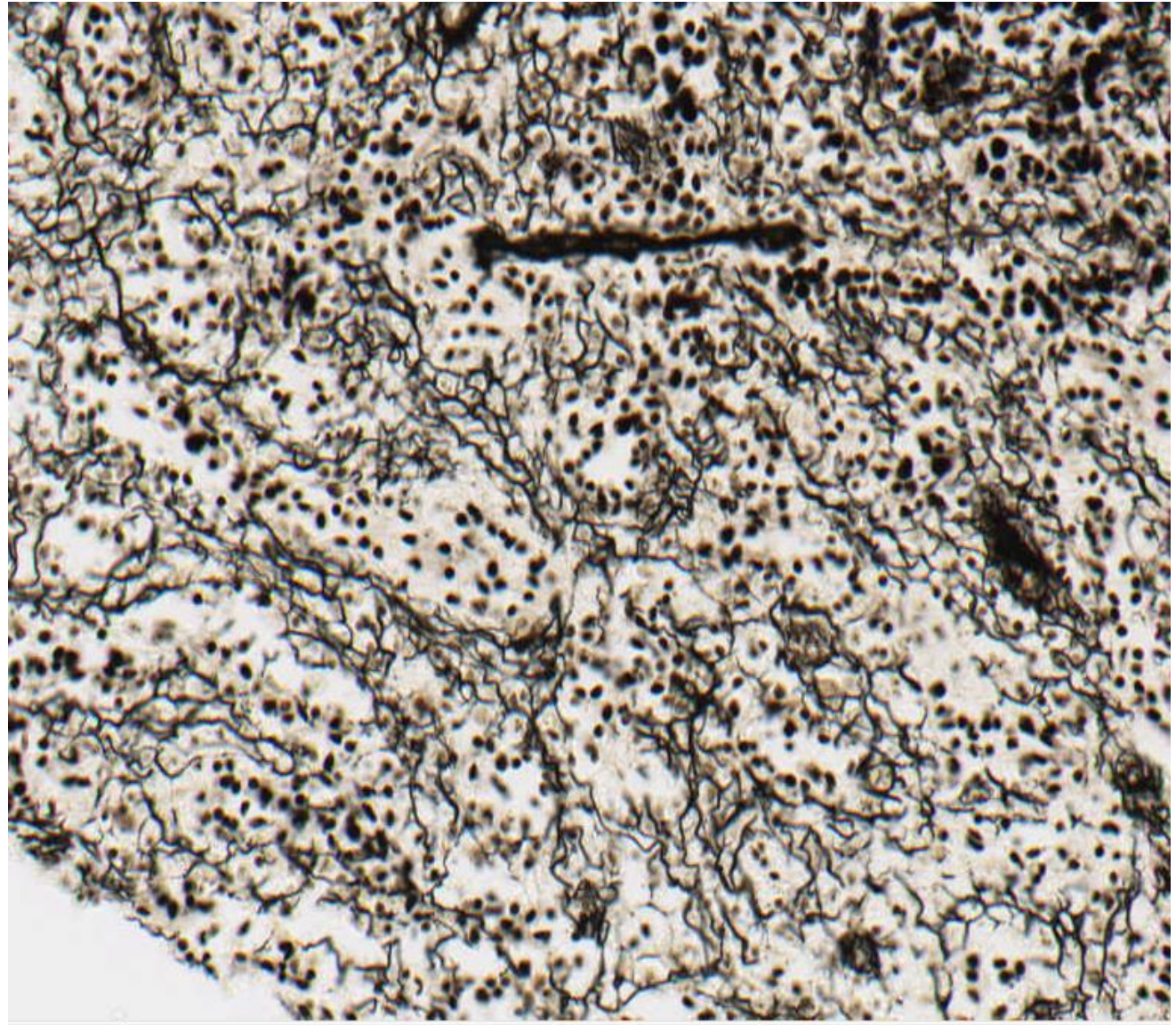
modrý Massonův trichrom

**99 – Pupečník (AZAN)**



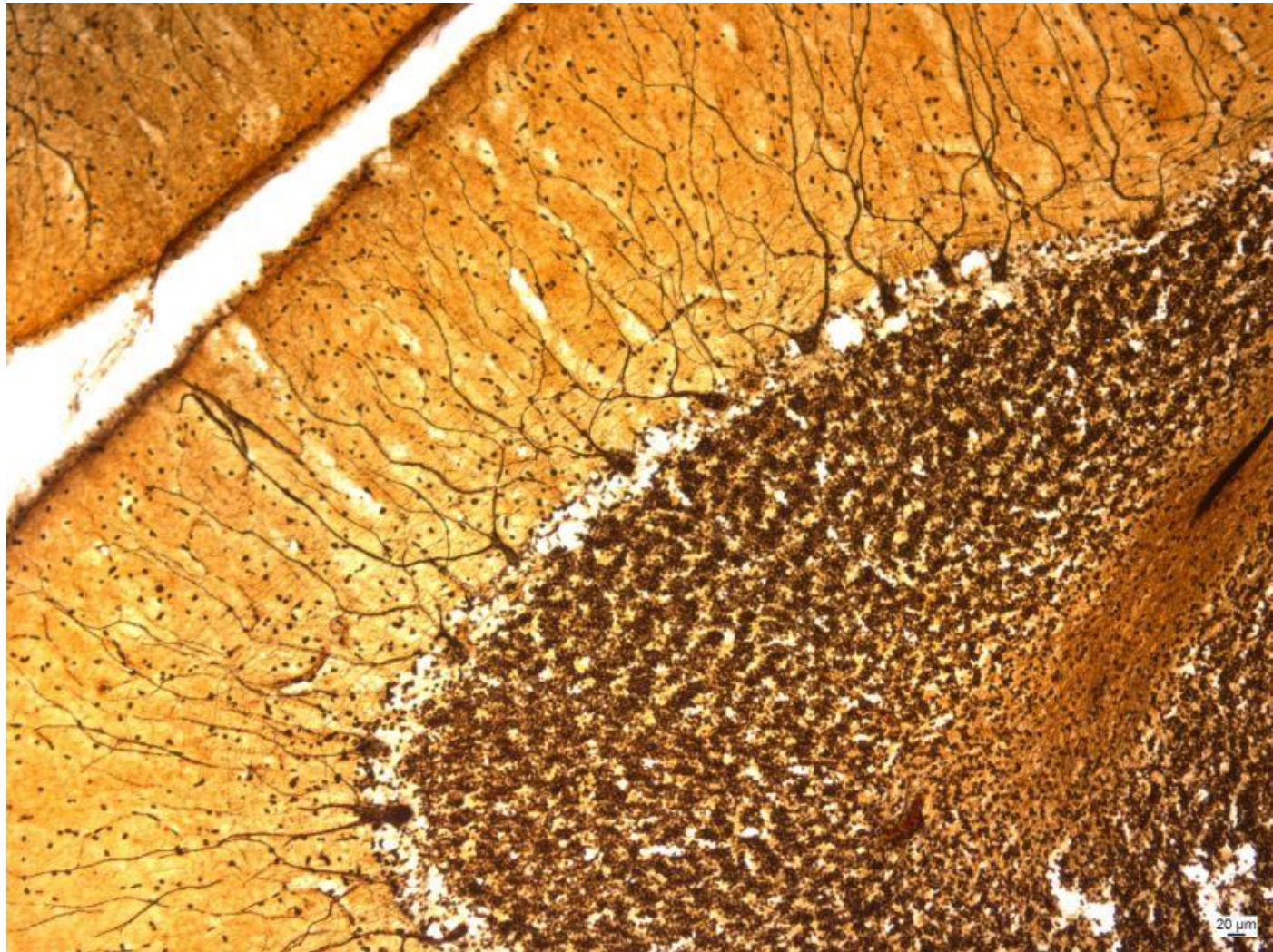
# Impregnace s AgNO<sub>3</sub>

Prep 68 – lien  
Barvení – **impregnace**  
Výsledek – **černá**  
**retikulární vlákna**



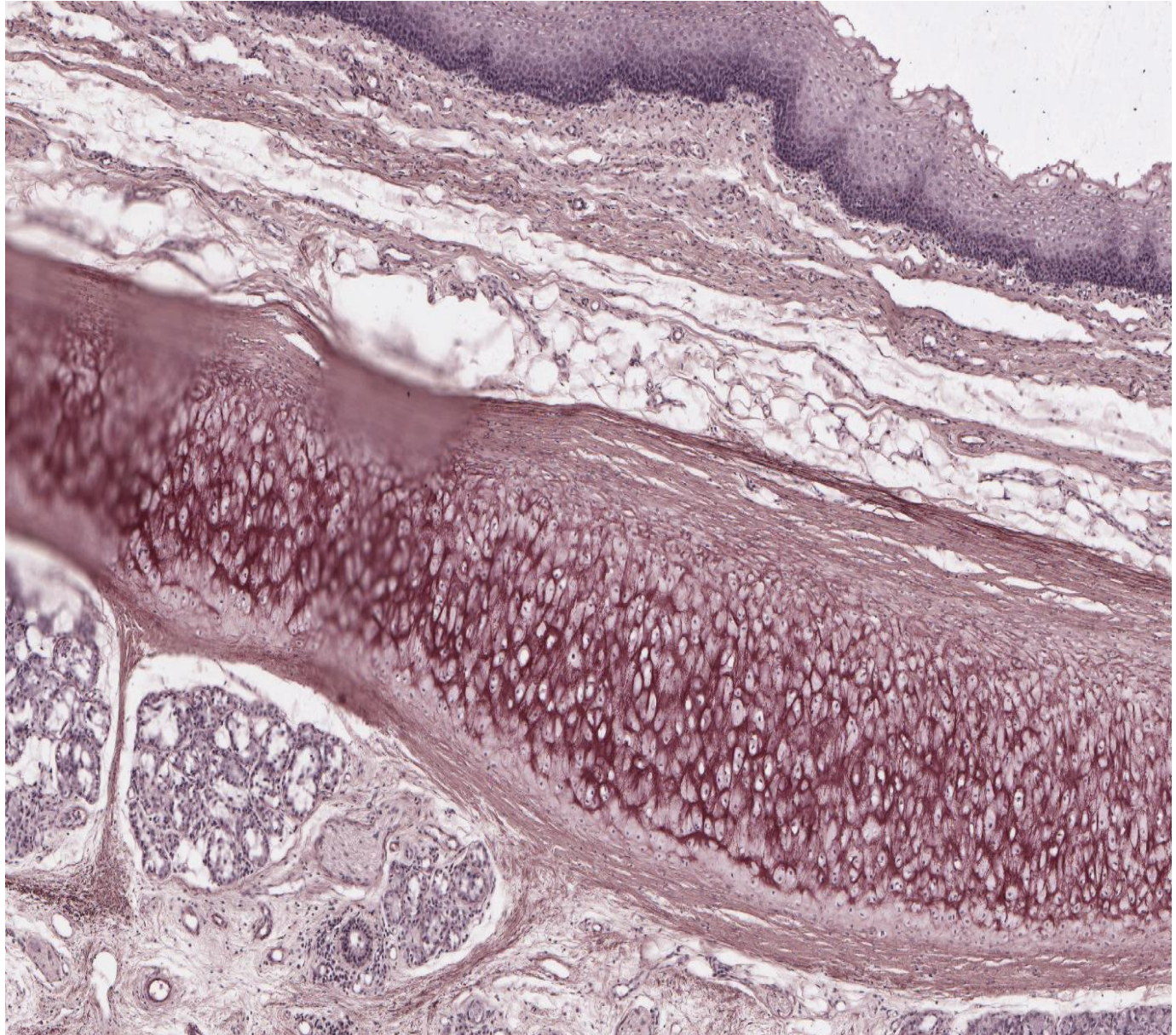
# Impregnace s AgNO<sub>3</sub>

Prep 77 – cerebellum  
Barvení – **impregnace**  
Výsledek – **černá**  
**nervová vlákna**



# Orcein

Prep. 28 – elastická  
chrupavka  
Barvení – **orcein**  
Výsledek – purpurová  
**elastická vlákna**

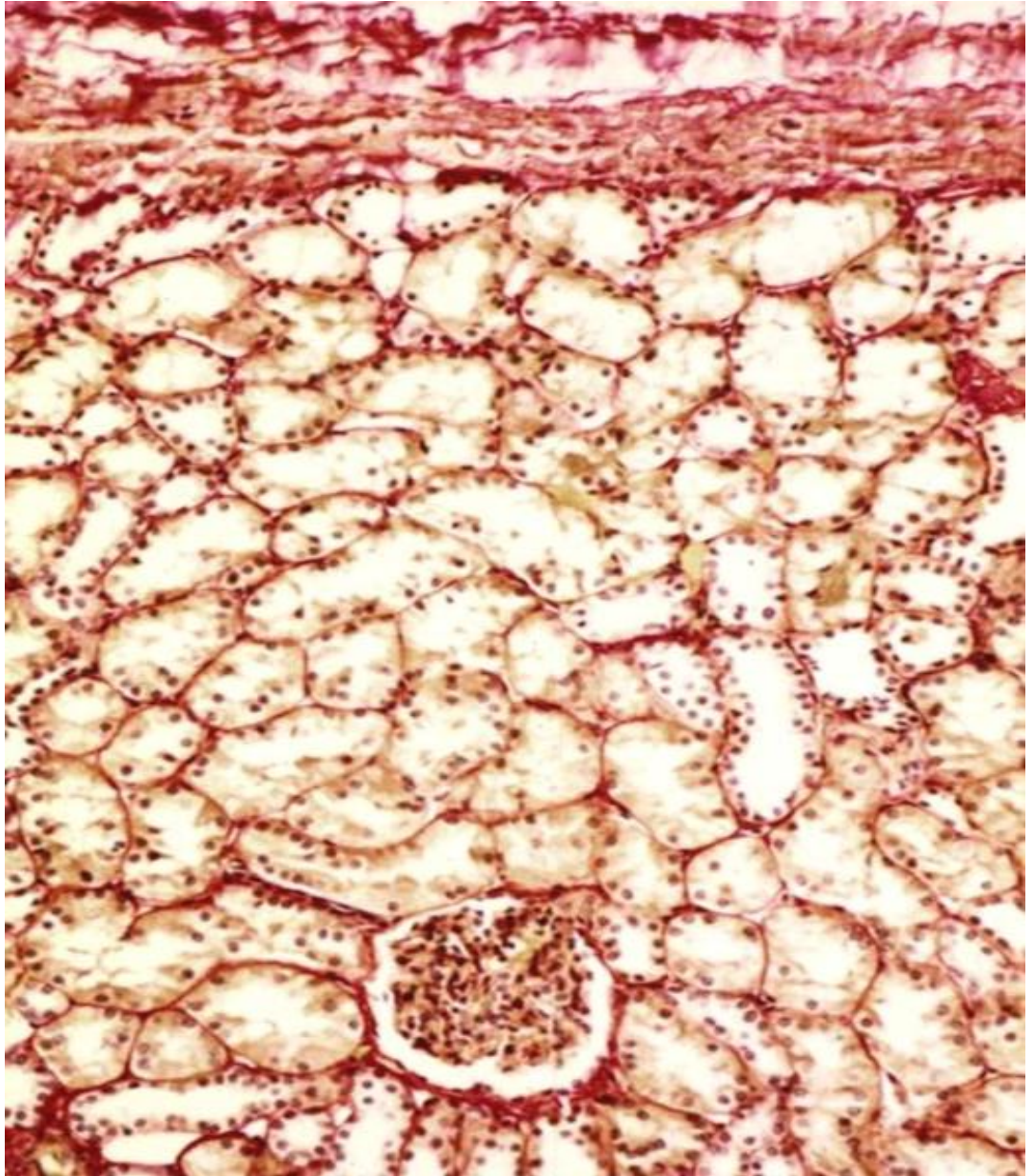


# Weigert-van Giesson

Prep. 31 – kůra ledviny

Barvení – **Weigert-van Giesson**

Výsledek – **třešňově červená  
kolagenní vlákna**

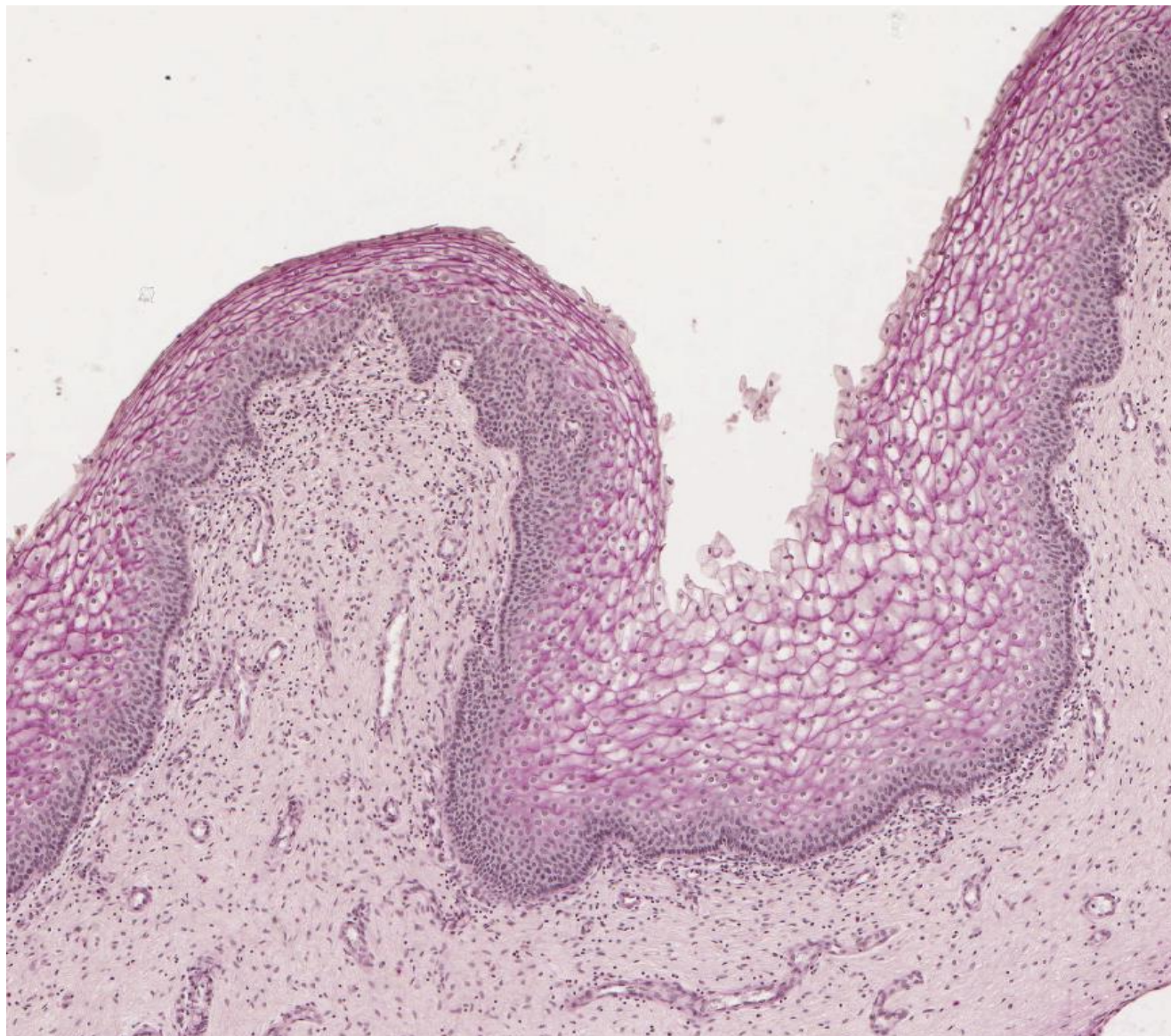


# Bestův karmín

Prep. 49 – vagina -  
glykogen

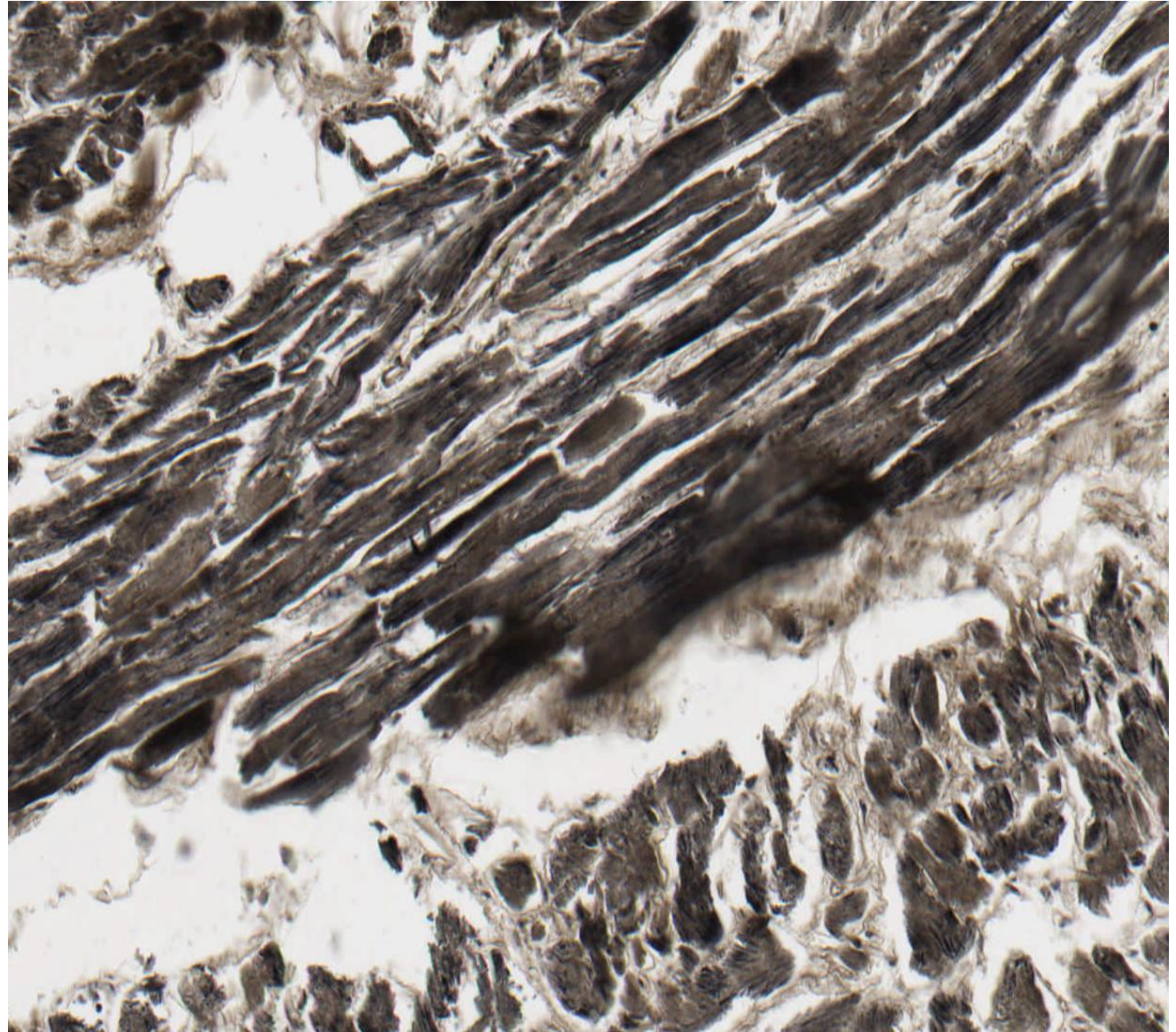
Barvení – **Bestův karmín**

Výsledek – **tmavě  
růžový glykogen**



# Heidenhain

Prep. 65 – myokard  
Barvení – **Heidenhain**  
Výsledek – **černé**  
**kardiomyocyty** (příčné  
žihání)



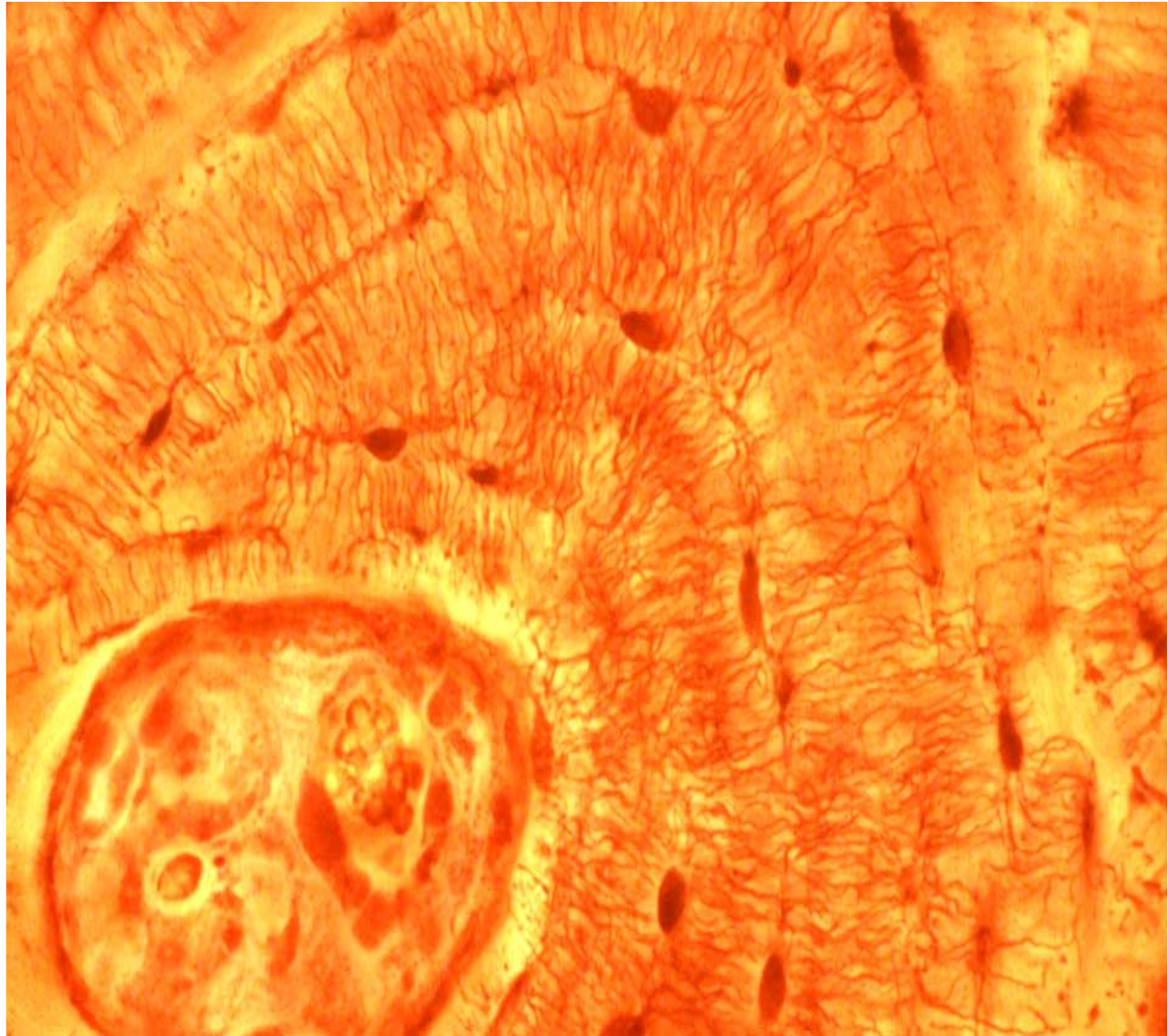


# Schmorl

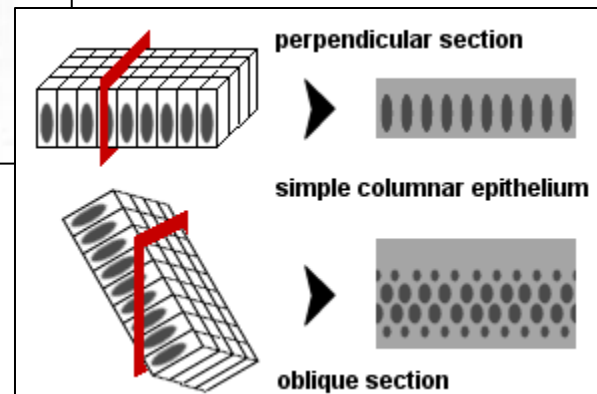
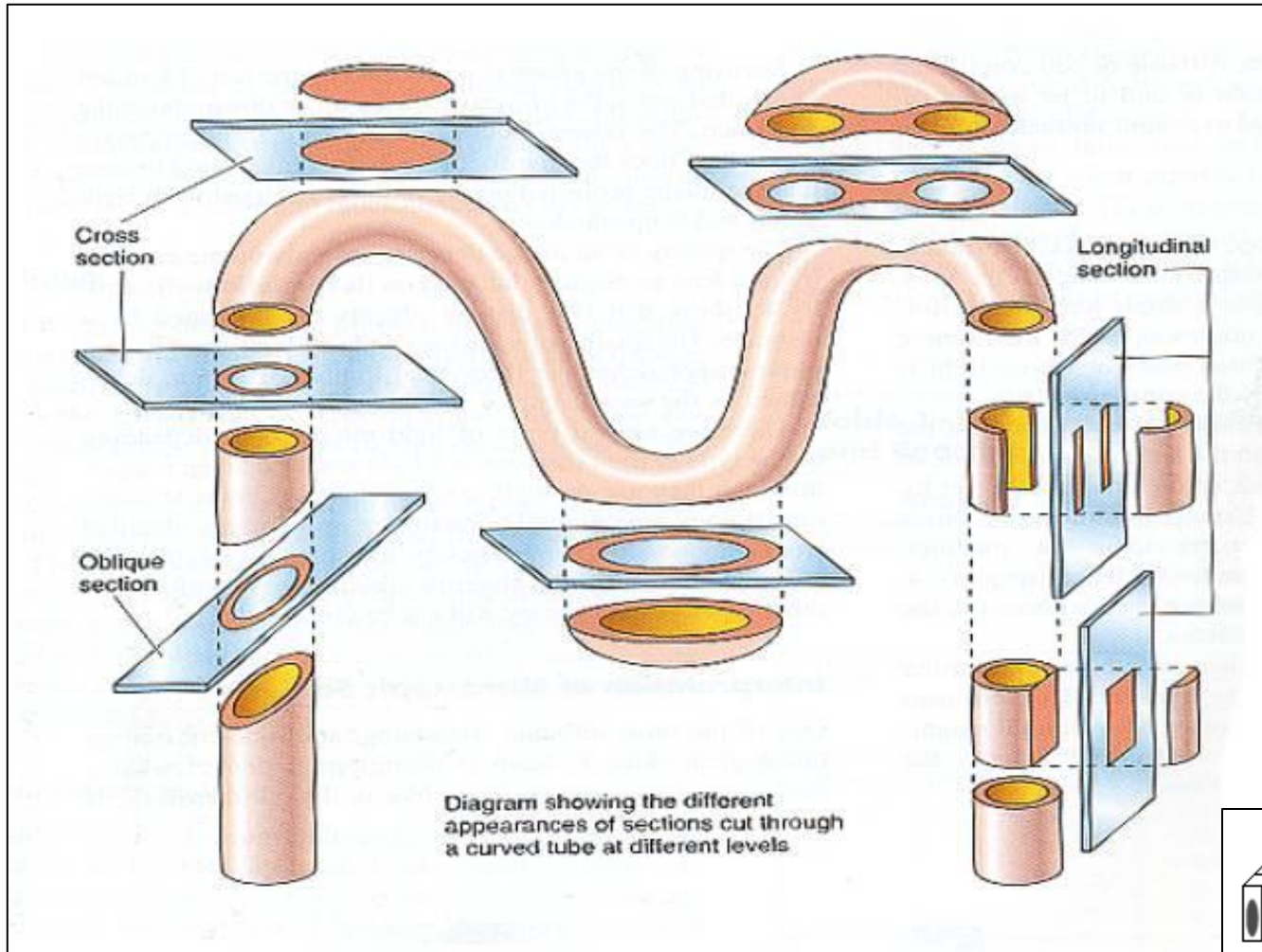
Prep. 95 – kost

Barvení – **Schmorl**

Výsledek – **rezavě hnědá  
kostní tkáň**



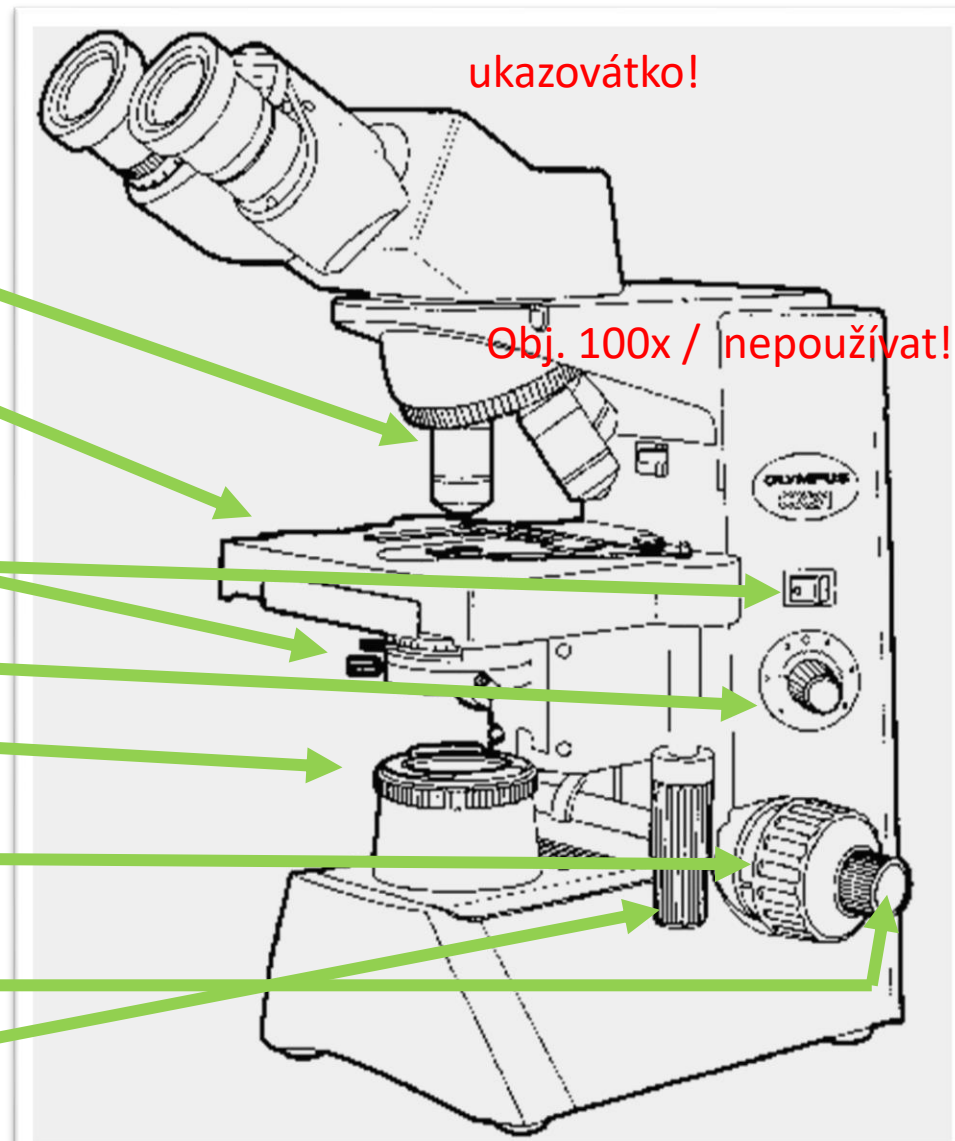
# ZOBRAZENÍ 3D ÚTVARŮ V 2D ROVINĚ ŘEZU



# Světelný mikroskop

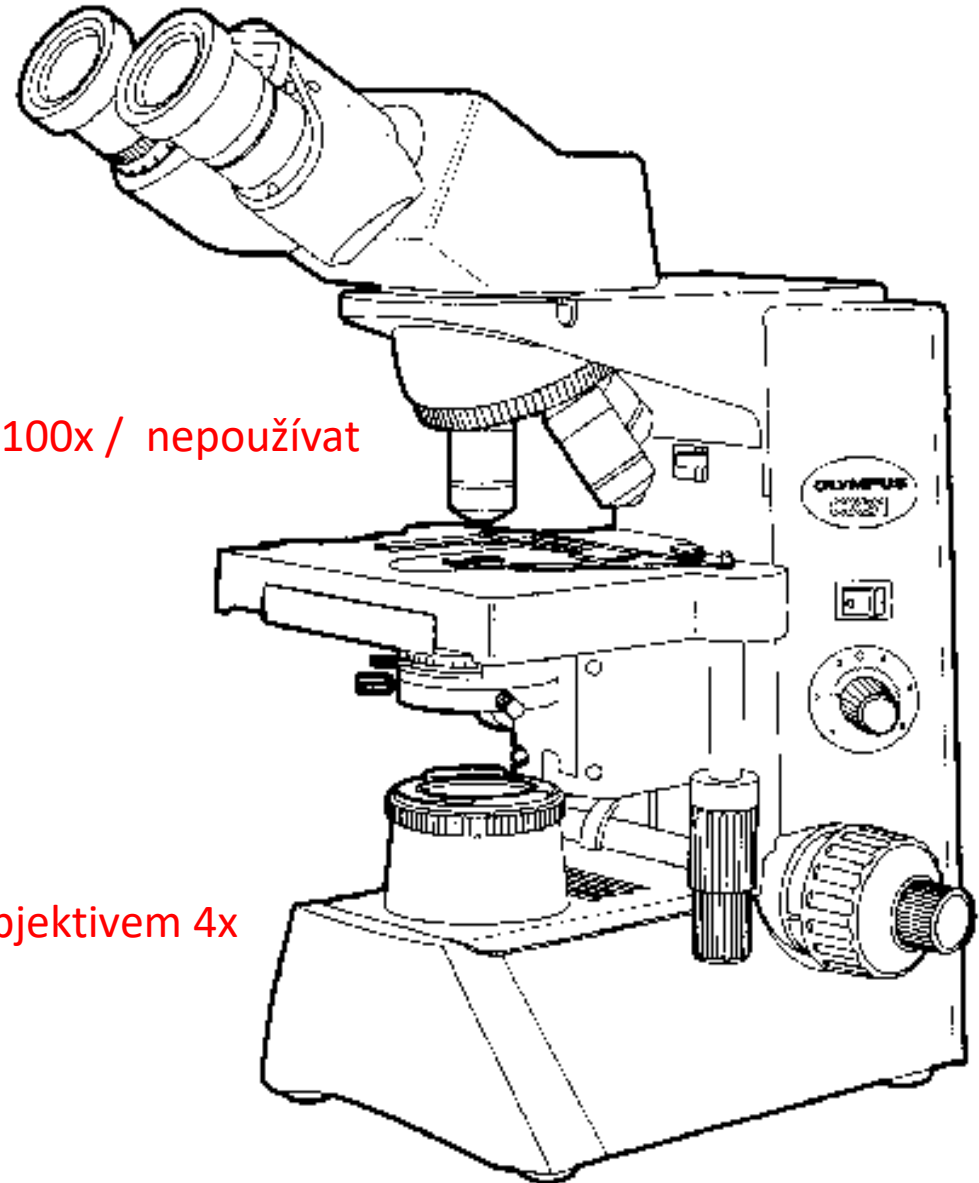
Orientace preparátu krycím sklem nahoru.

- 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 obj. 100x / nepoužívat
- 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.
- Z krabice lze vyjmout vždy pouze jeden preparát!
- Preparát na stolku mikroskopu musí být vždy orientován krycím sklíčkem nahoru, tj. proti čočce objektivu.
- 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.

