

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 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 % omluvených a nahrazených absencí
- Úspěšně absolvovaný **zápočtový test**
 - Test proběhne v IS formou odpovědníku a bude zahrnovat otázky na probíraná témata. Test bude zpřístupněn posledních 14 dní semestrální výuky. Limit pro splnění testu je 90 %, test je možné libovolně opakovat od jeho otevření po dobu 14 dnů.
- **Kompletní sada protokolů** podepsaných učitelem.
- V případě neúspěchu u zápočtového testu, nebude zápočet udělen.
- 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
- Vyučující může průběžně ověřovat znalosti a poskytovat zpětnou vazbu formou otázek, diskuze nebo libovolného testu. Opakovaná nepřipravenost na praktickou výuku se nepromítá do případného neudělení zápočtu, ale může být zaznamenána a zohledněna v závěrečném hodnocení předmětu.
- Obrázky jsou přístupné v MedAtlasu nebo ve studijních materiálech praktik v ISu

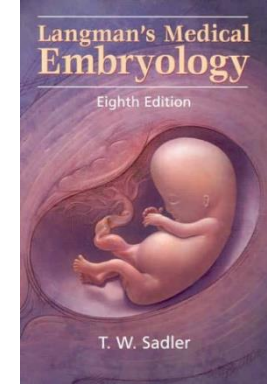
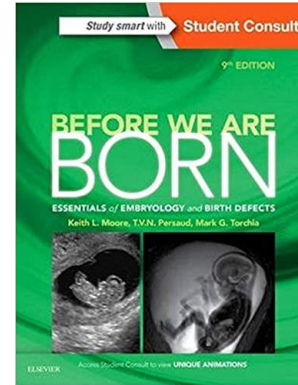
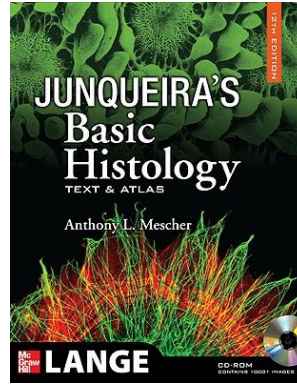
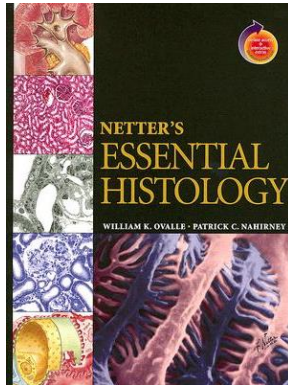
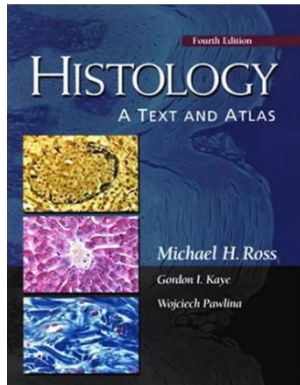
Nahrazování praktik „předem“

- 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

Nahrazování praktik „po“

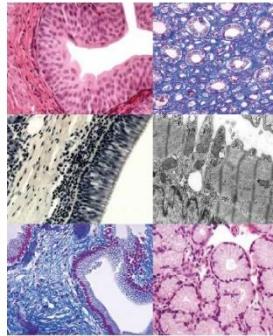
- absence musí být omluvena na studijním odd. a omluvenka zapsaná v IS

Doporučená literatura



Guide to General and Microscopic Anatomy

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



Ústav histologie a embryologie
LF MU

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

Doporučená literatura

MASARYKOVA UNIVERZITA
Lékařská fakulta

MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE

Drahomír Horký, Svatopluk Čech



BRNO 2011

MASARYKOVA UNIVERZITA
Lékařská fakulta

PŘEHLED OBECNÉ HISTOLOGIE

Svatopluk Čech, Drahomír Horký



BRNO 2011

MASARYKOVA UNIVERZITA
Lékařská fakulta

PŘEHLED EMBRYOLOGIE ČLOVĚKA

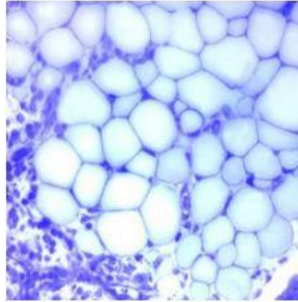
Svatopluk Čech, Drahomír Horký, Miroslava Sedláčková



BRNO 2011

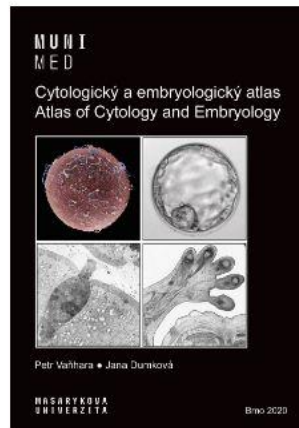
Atlas of Histology

recommended study tool



Atlas of Cytology and Embryology

recommended study tool



<http://www.med.muni.cz/histology/multimedia-and-textbooks/>

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

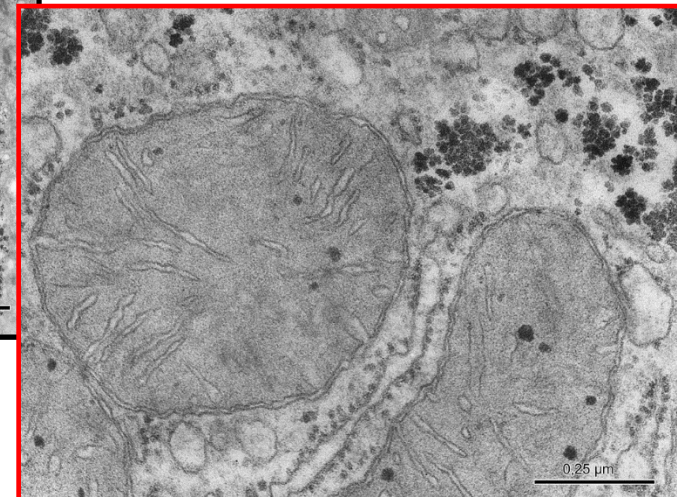
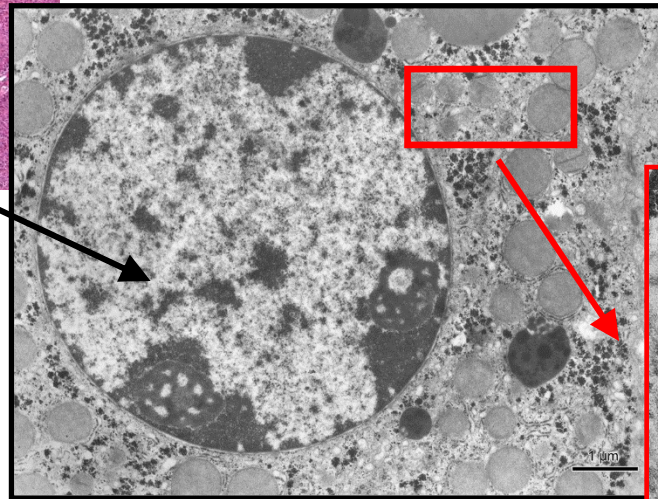
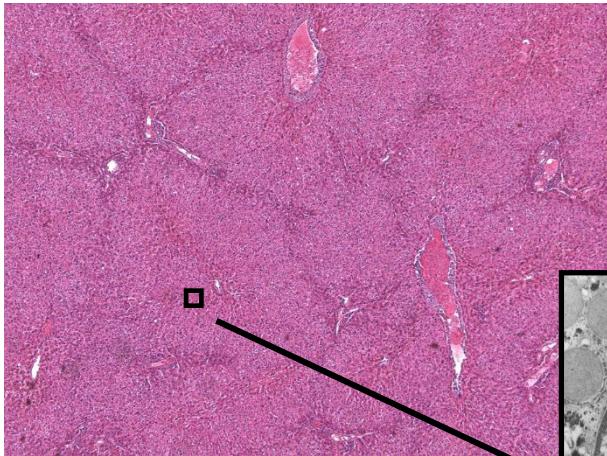
- **speciální embryologie** (od 3. měsíce do porodu – FETUS - plod)

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 – $\sim 0,1 - 0,5$ μm
- 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 ledvinný parenchym, kostní dřev)
 - = kyretáž (např. endometrium)
- **nekropsie** z mrtvého organismu (pitva); laboratorní zvíře
- velikost odebraného vzorku **0,5 – 1 cm³**, 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 (OsO_4)

– SOLI TĚŽKÝCH KOVŮ – HgCl_2

- **směsi:** FLEMMING (OsO_4), ZENKER, HELLY, SUSAN (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 cm³** : 20 – 50 cm³)

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 – 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

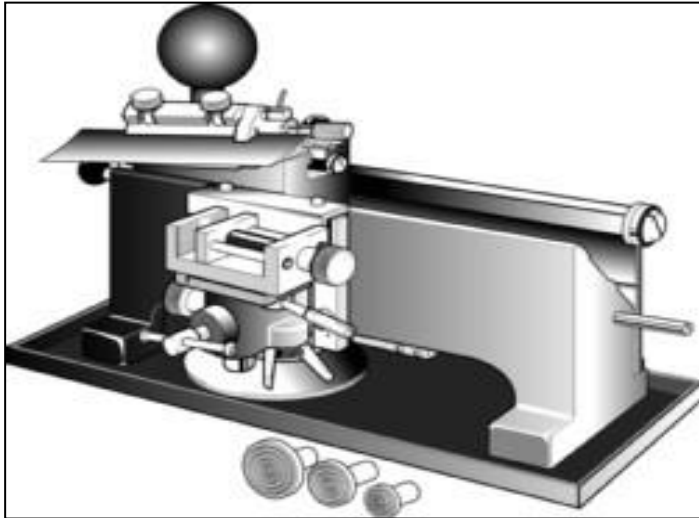


výsledek zalití

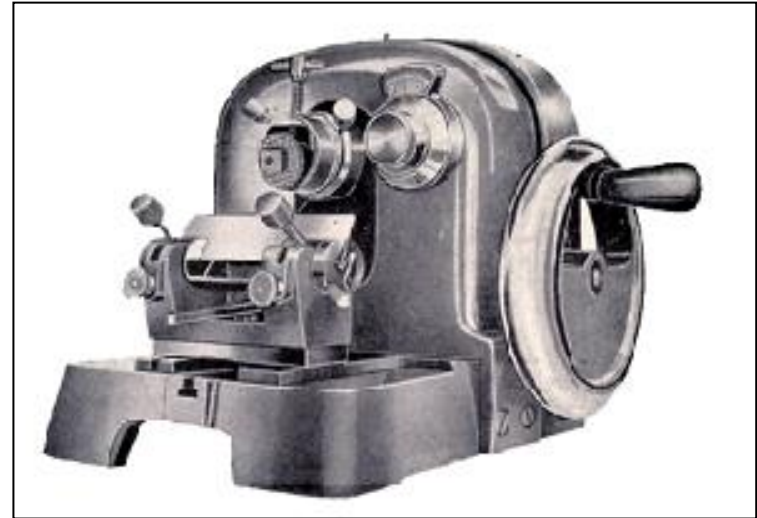


KRÁJENÍ

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

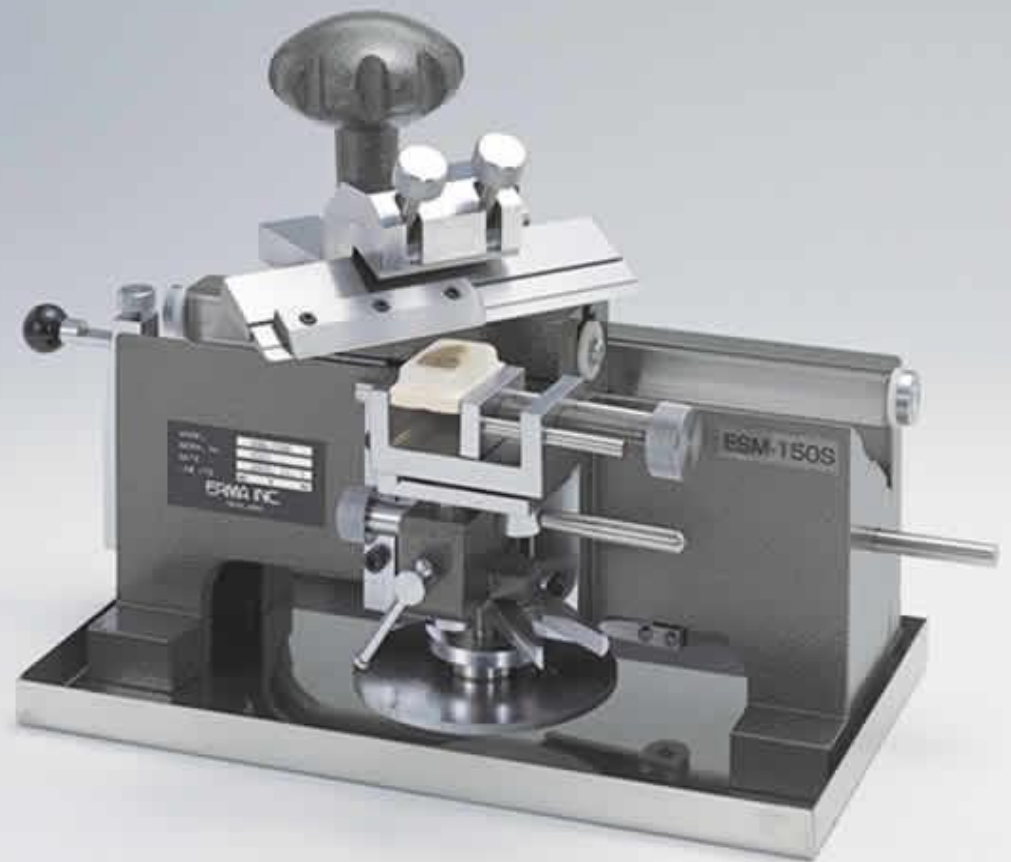


Sáňový mikrotom – blok je upevněný v držáku, nůž nebo břitva se pohybuje horizontálně

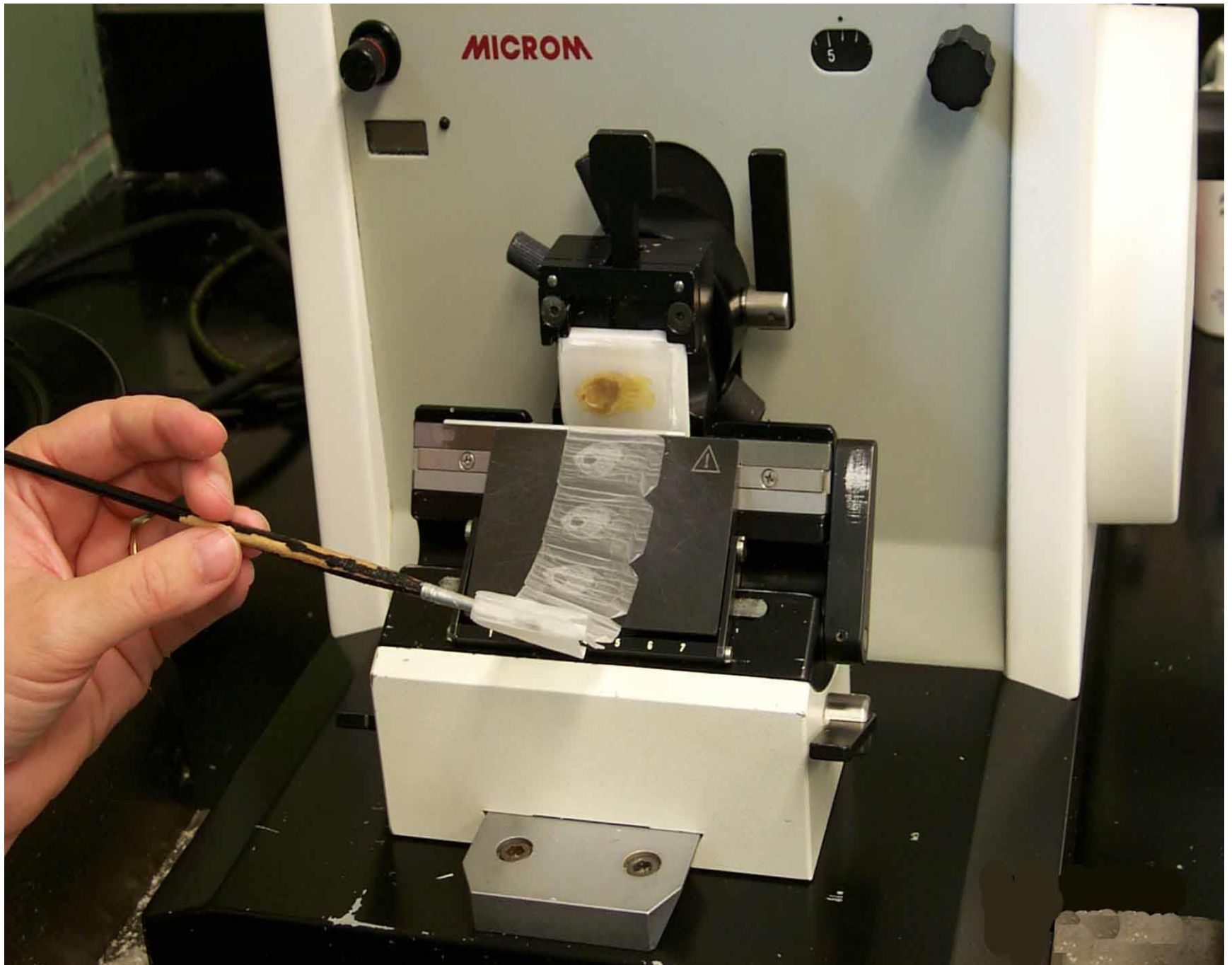


Rotační mikrotom – nůž je fixní, držák s bločkem se pohybuje vertikálně

Sáňový mikrotom



Rotační mikrotom

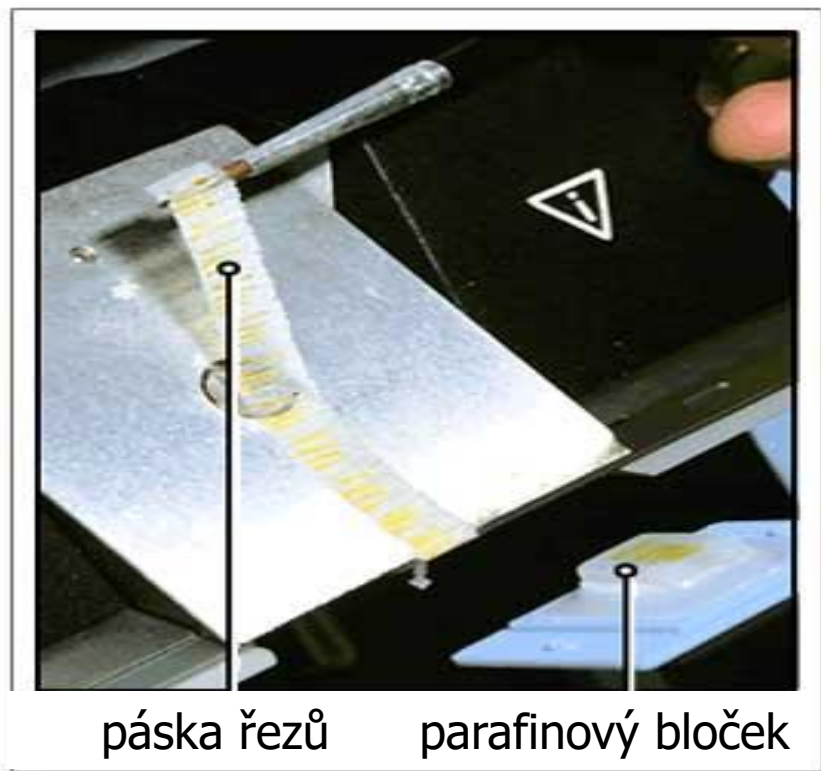




kryostat

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

zmrzlou tkáň lze krájet bez zalévání



páska řezů

parafinový bloček



KRÁJENÍ

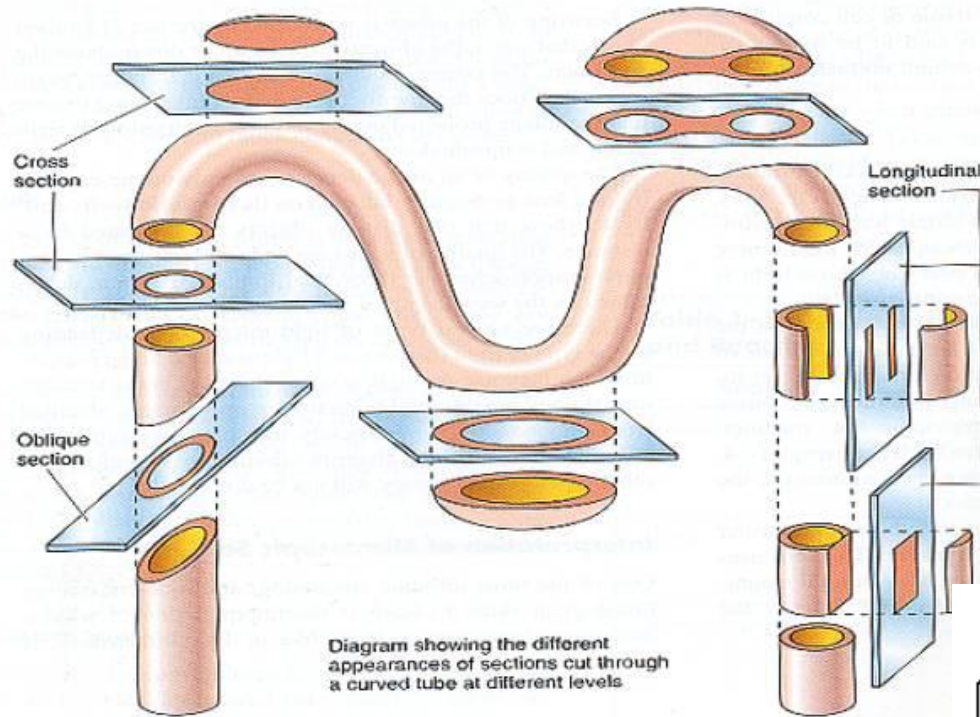
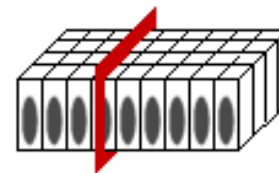


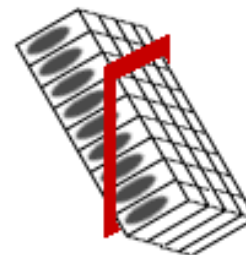
Diagram showing the different appearances of sections cut through a curved tube at different levels.



perpendicular section



simple columnar epithelium



oblique section



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).



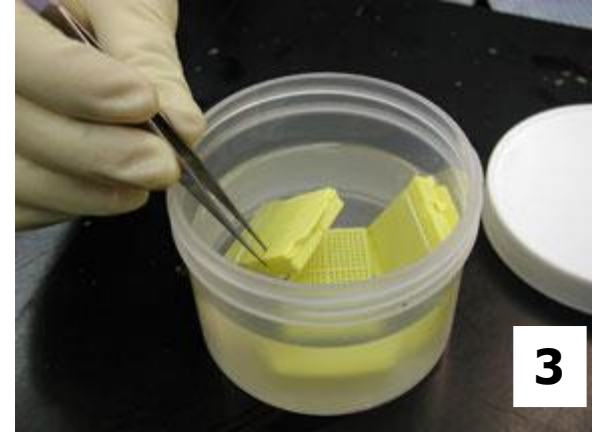
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv.
Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylenem.



1



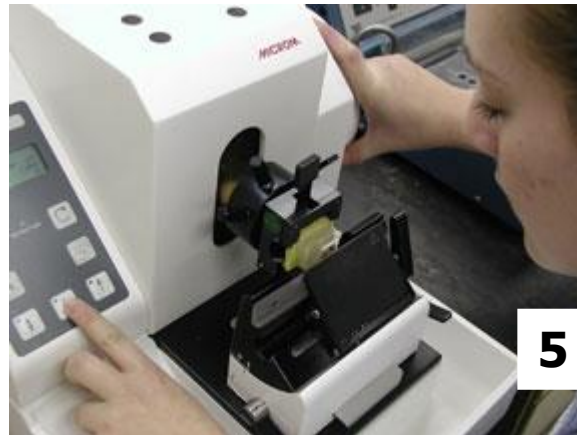
2



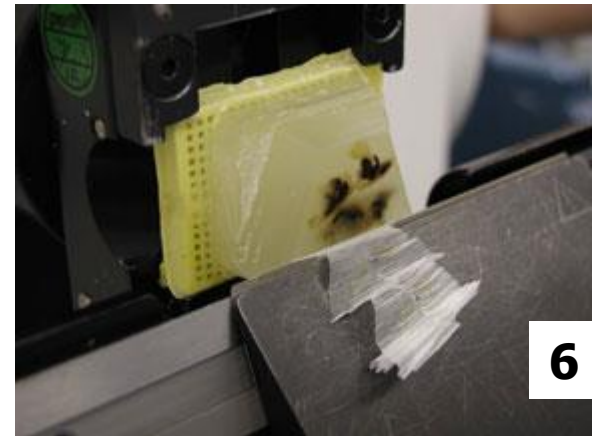
3



4



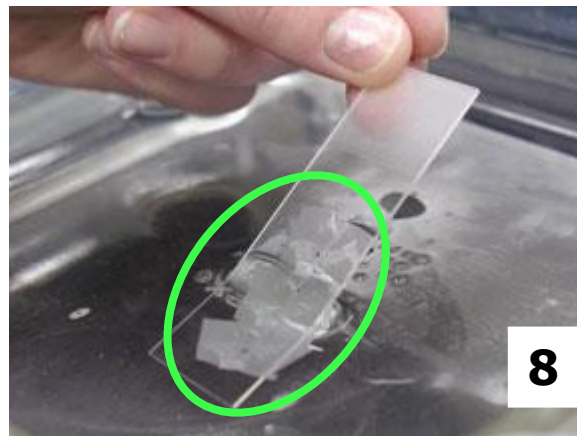
5



6



7



8

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

Napínání na teplé vodě



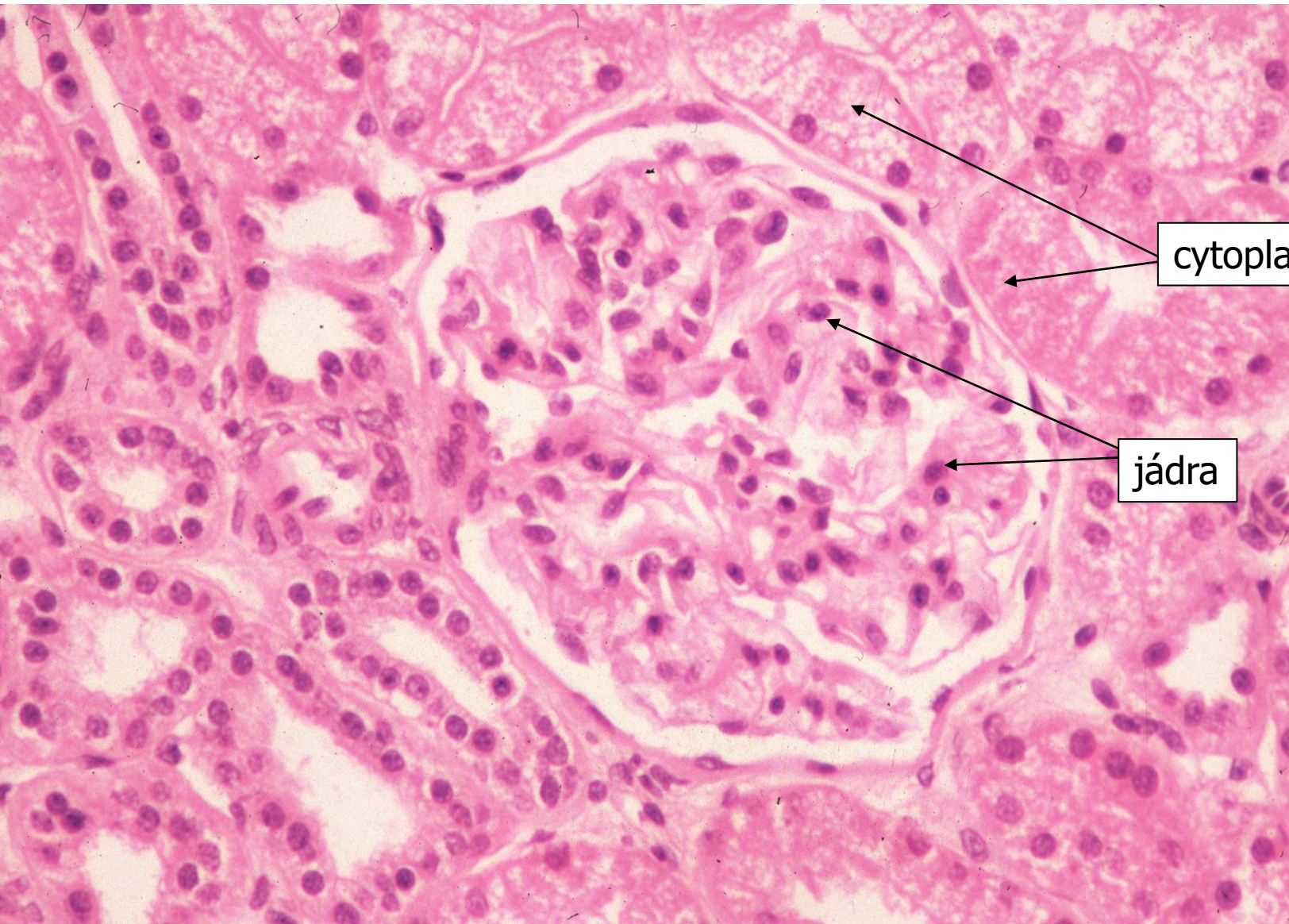
Napínání na teplé podložce



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
 - *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)

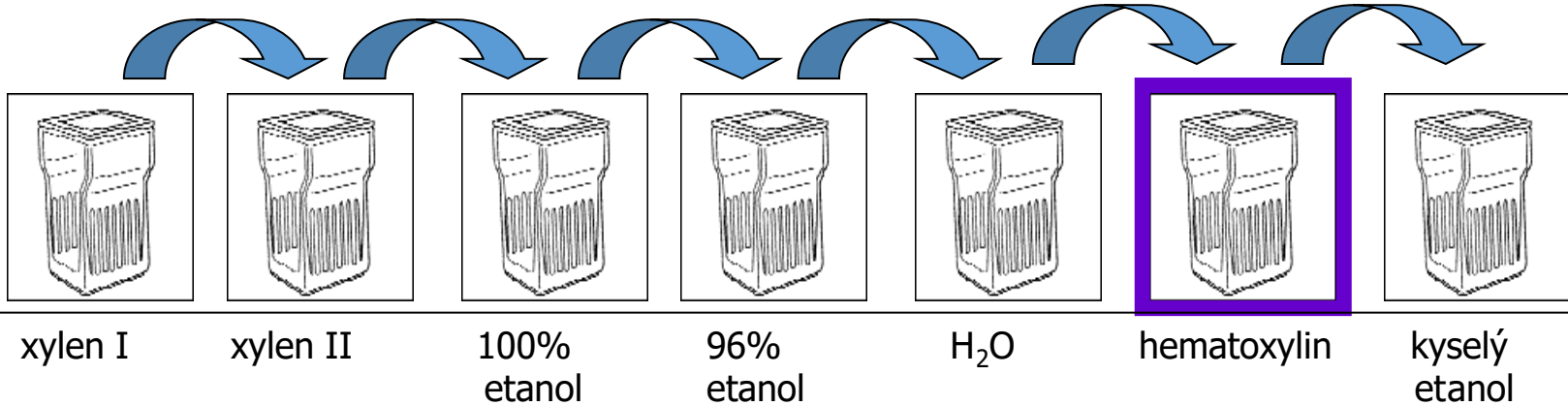
deparafinace

rehydratace

praní

barvení

diferenciace



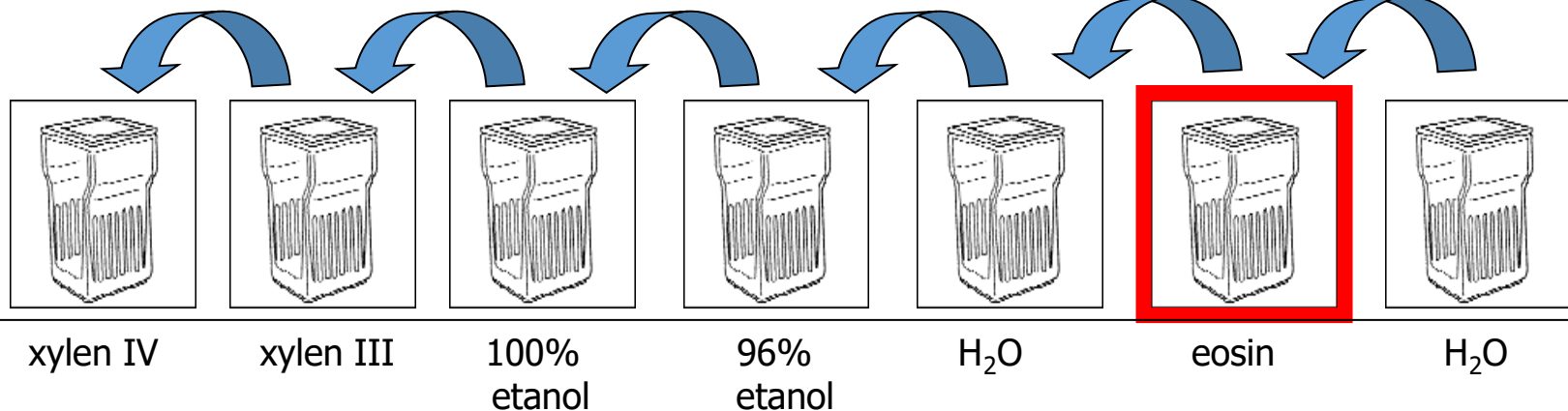
projasnění

dehydratace

praní

barvení

praní



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

erythrocyty – oranžové

svalová tkáň – červená

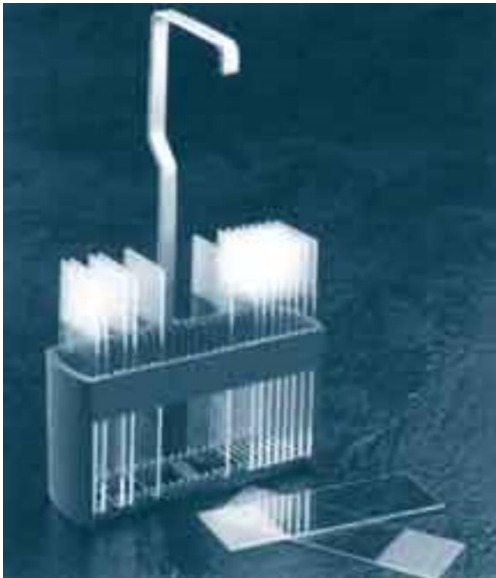
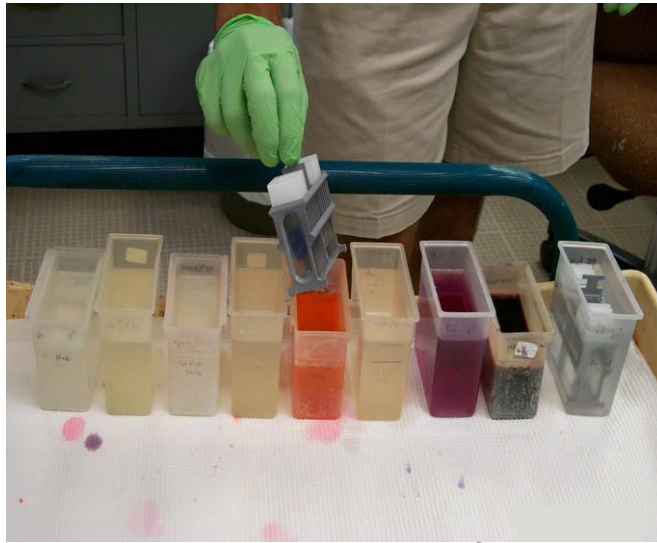
kolagenní vlákna – **modrá**

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





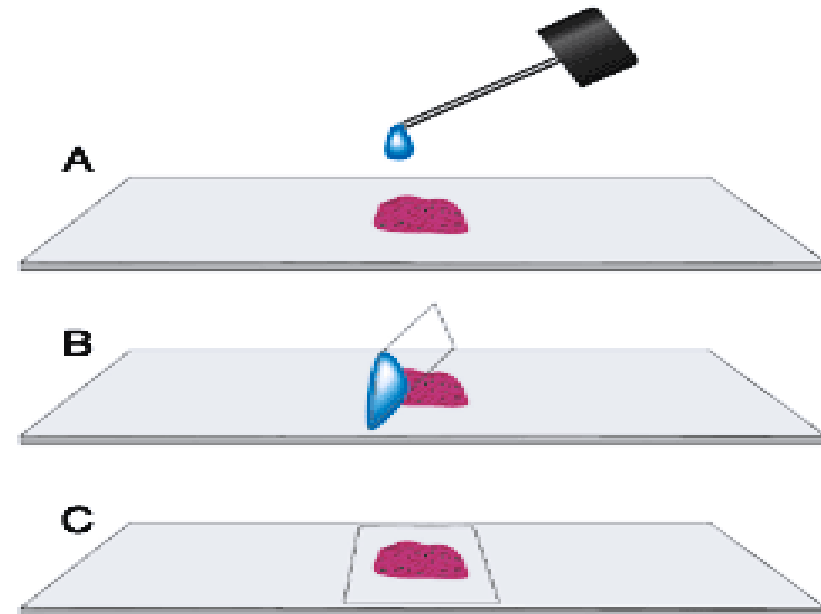
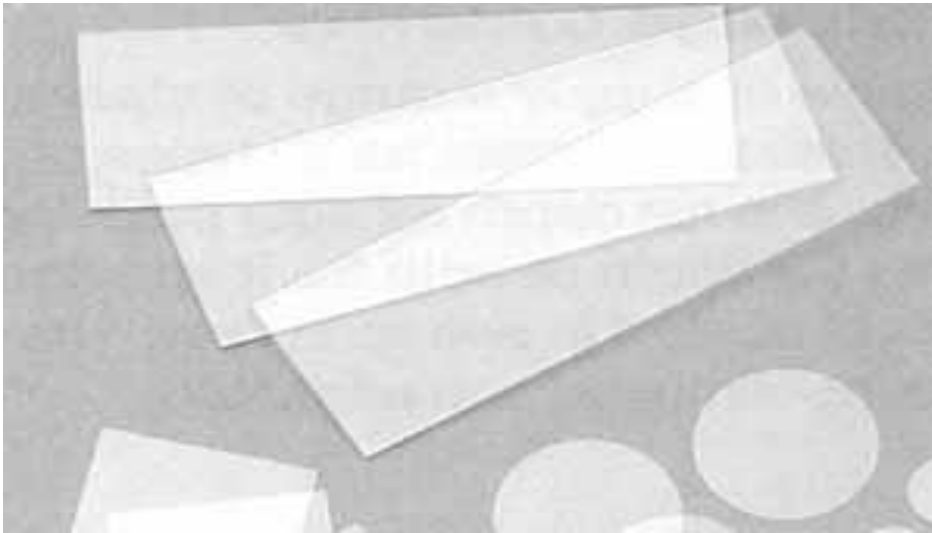
řada boxů (kvet) s barvicími médii

≈



MONTOVÁNÍ

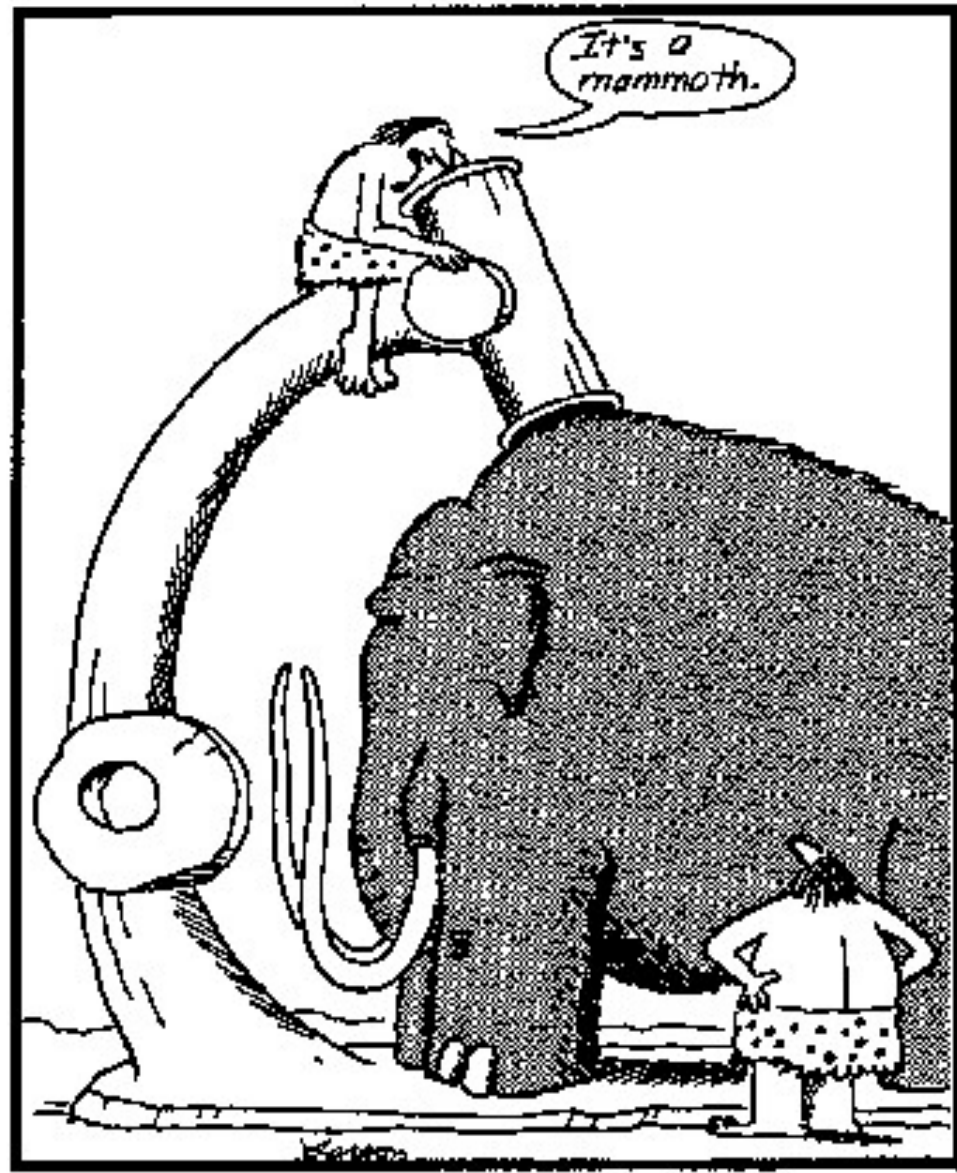
- uzavření preparátu – kapkou montovacího media a krycím sklíčkem \Rightarrow trvalý preparát



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

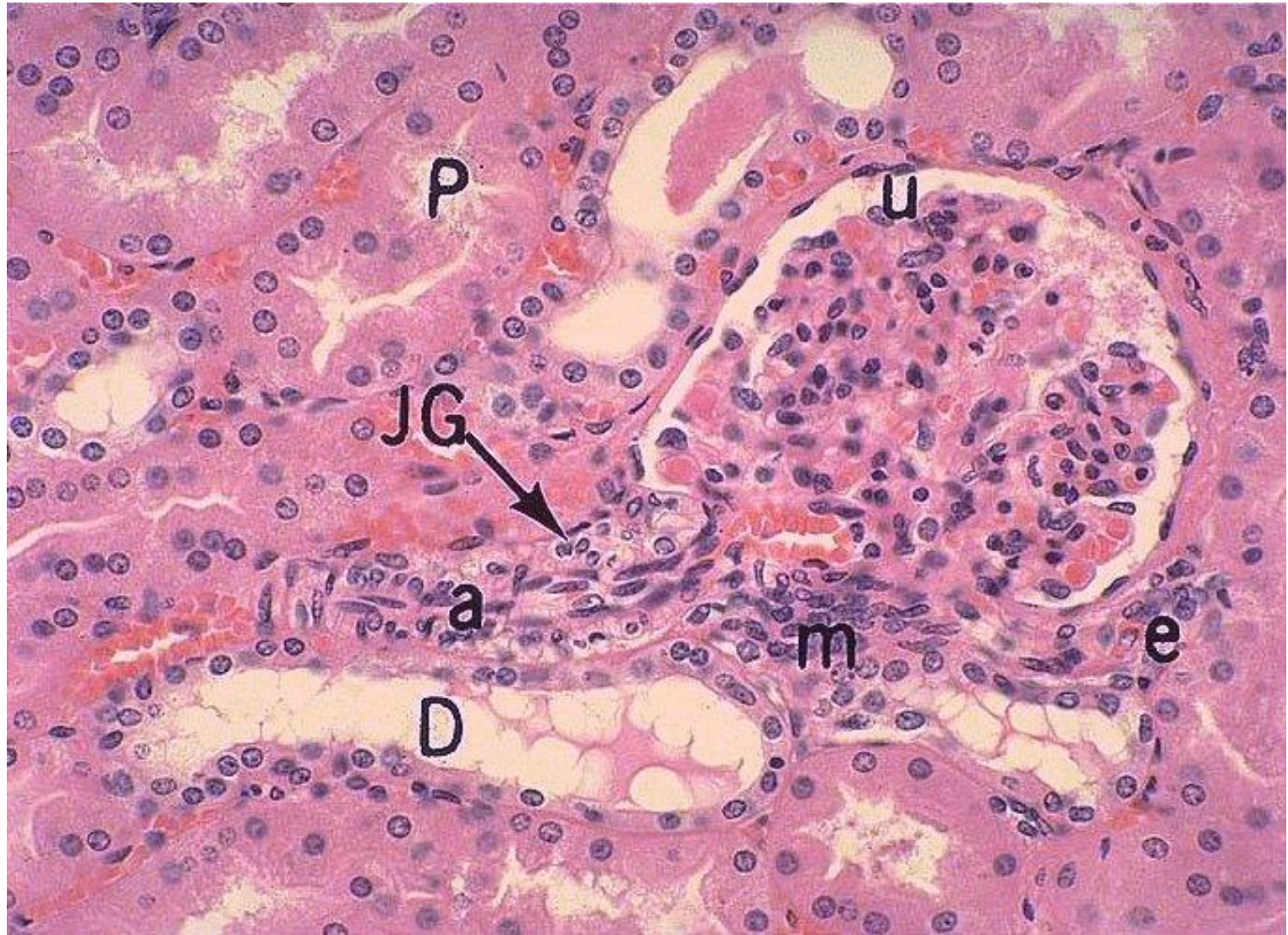


trvalé histologické preparáty ke studiu ve SM

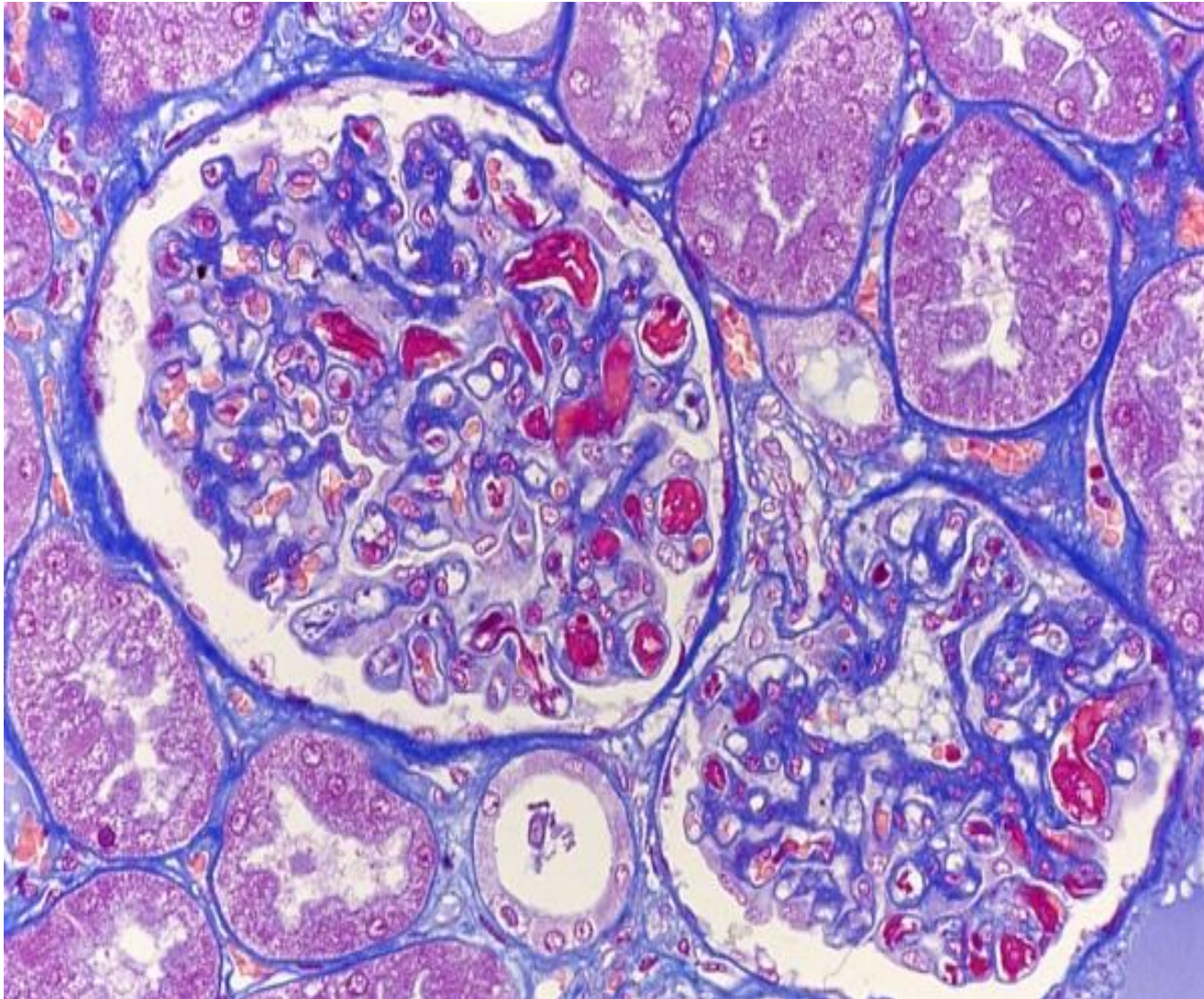


Early microscope

Hematoxylin a eosin (HE)



Azokarmín a anilin. modř (AZAN)

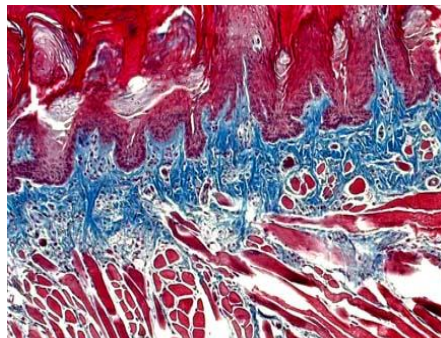
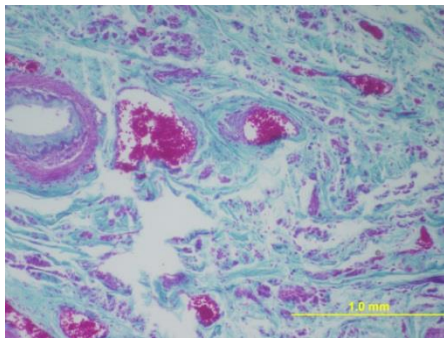


kolagenní vlákna modrá

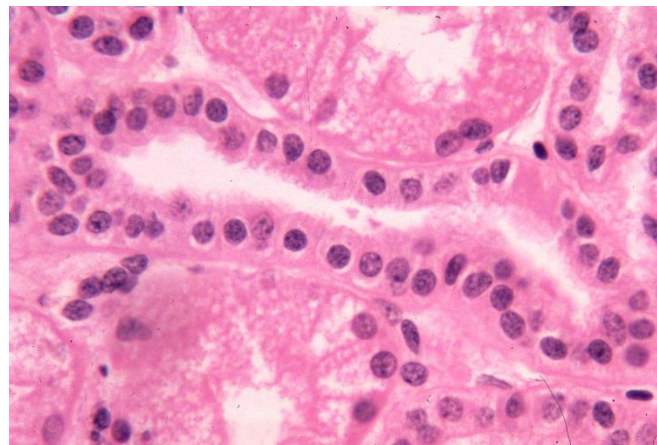
Barvicí metody:

přehledné – HE, AZAN

demonstrují všechny složky tkání

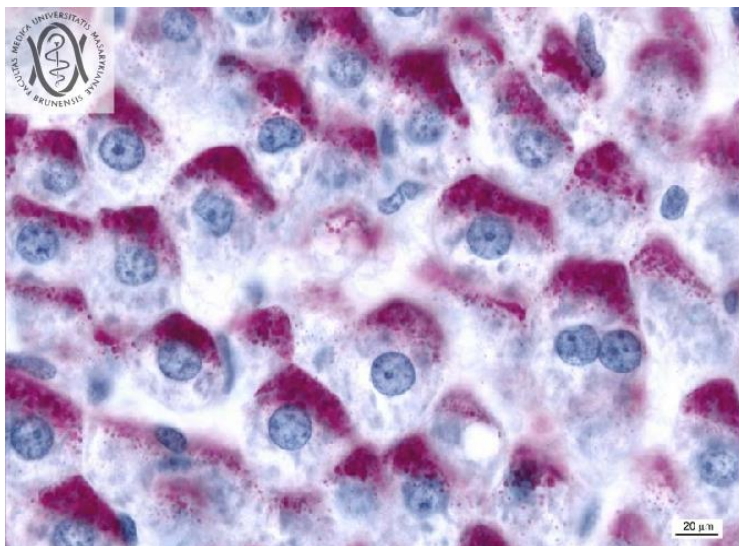


HE – nejpoužívanější barvení

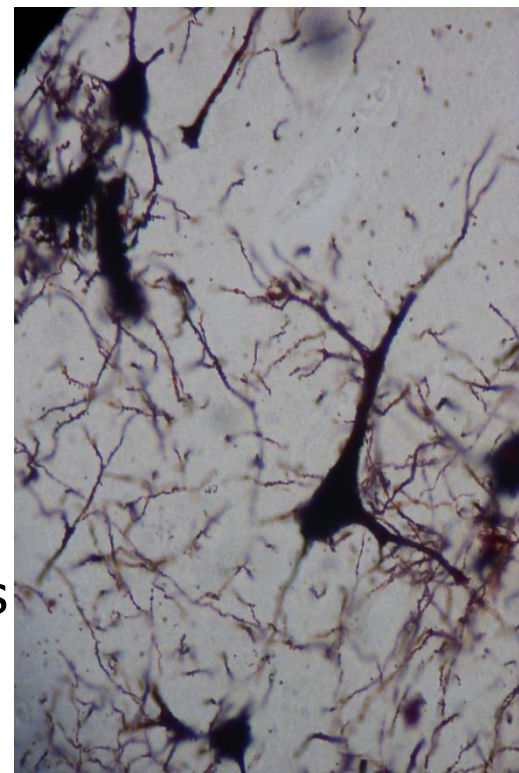


speciální

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 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

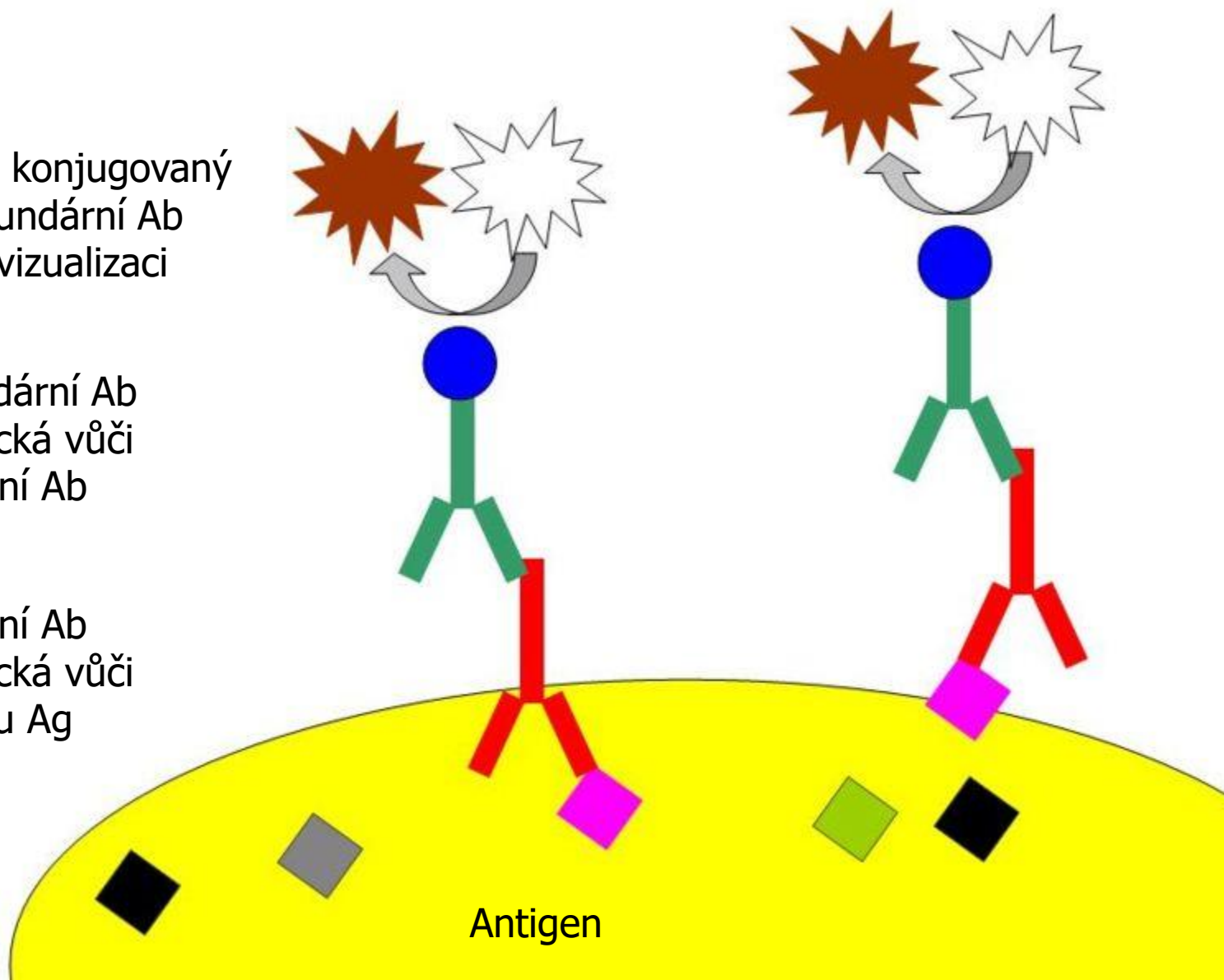
2. enzymy – křenová peroxidáza, AF, acetylcholinesteráza,

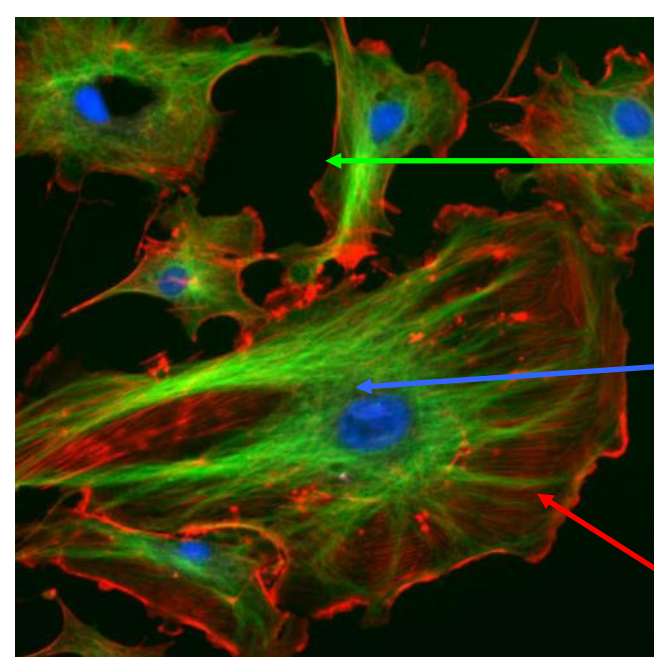
3. radioizotopy (I^{125})

Enzym konjugovaný
se sekundární Ab
zajistí vizualizaci

Sekundární Ab
specifická vůči
primární Ab

Primární Ab
specifická vůči
epitopu Ag

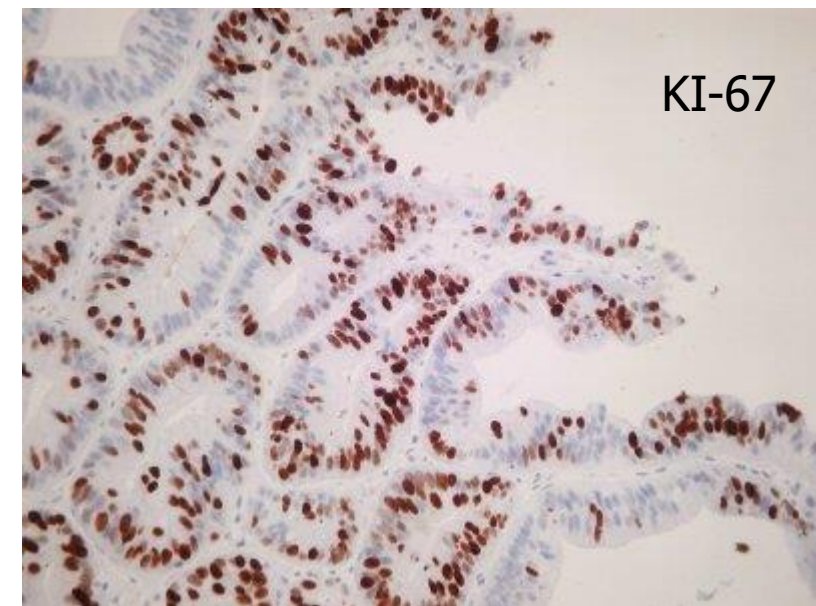
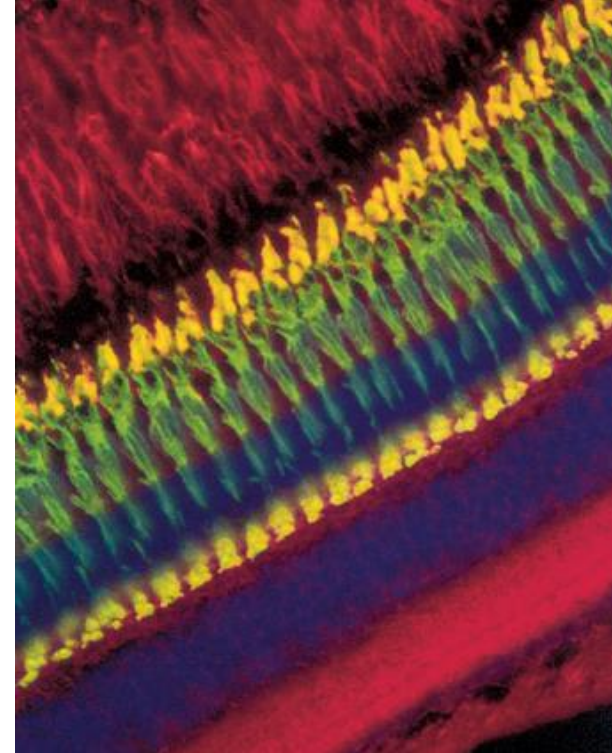




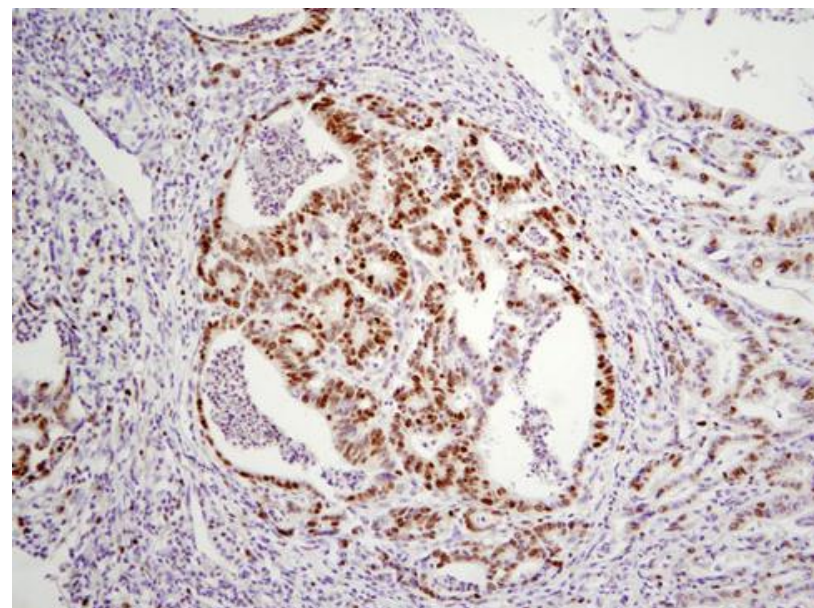
Aktin (cytoskelet)

DAPI (jádno)

Mikrotubuly (cytoskelet)

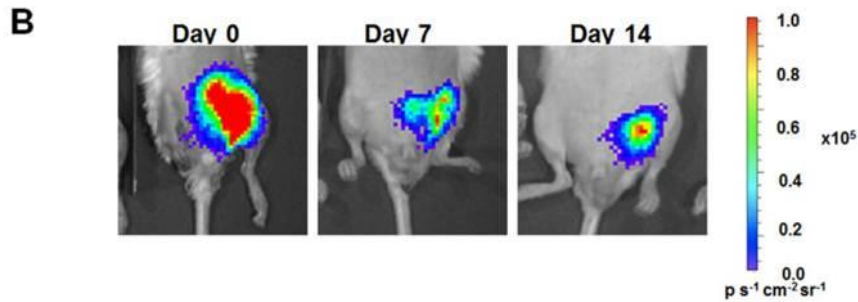
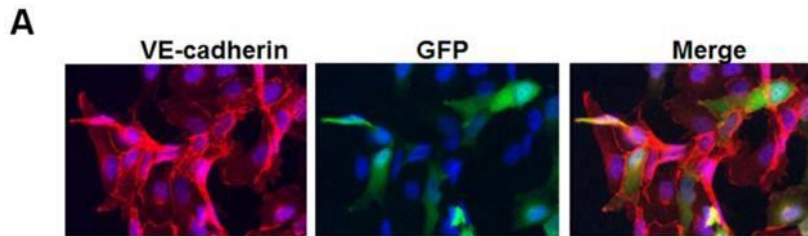


KI-67



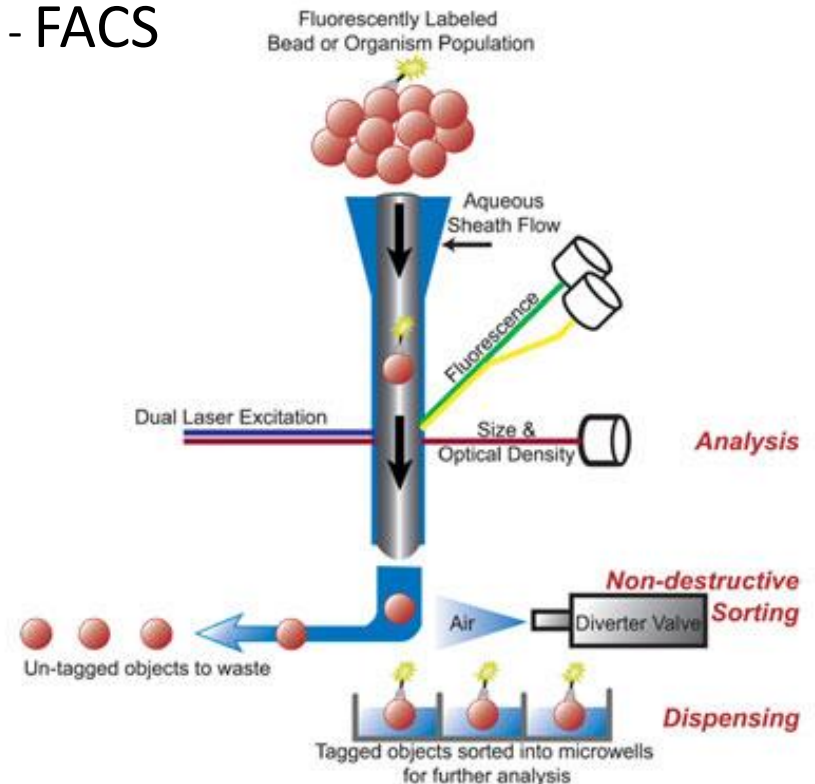
In-vivo/live cell imaging

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

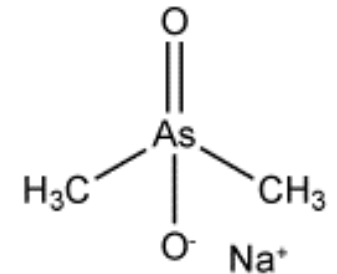


doi:10.7150/thno.3694

- FACS

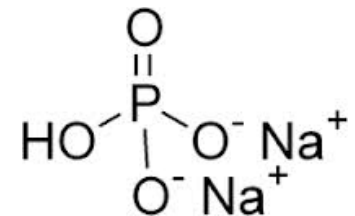
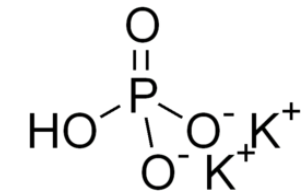


Zpracování tkání pro elektronovou mikroskopii (EM)



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)



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

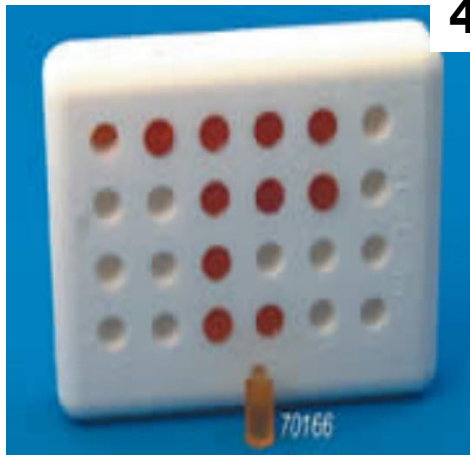
Zalévací komůrky:



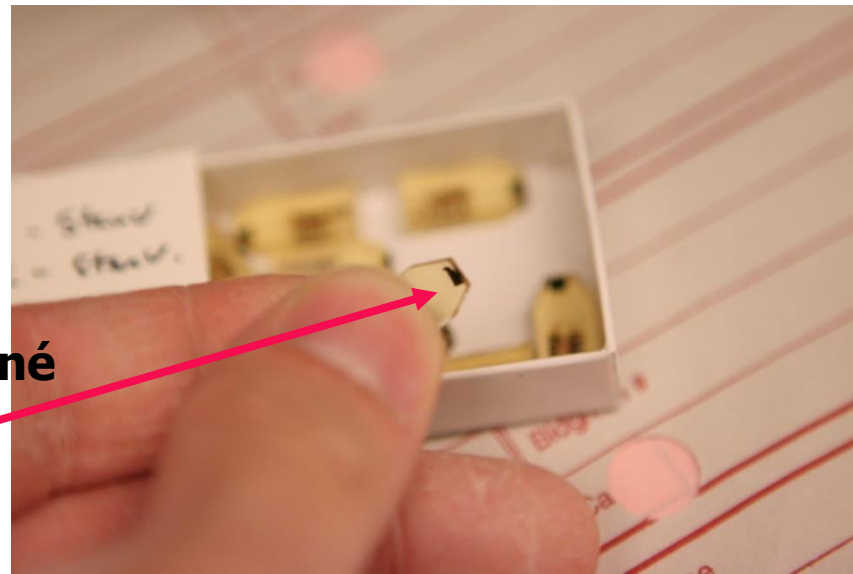
želatinové (1), plastové (2)

nosiče (držáky) kapslí (3)

ploténky s komůrkami
(4, 5)



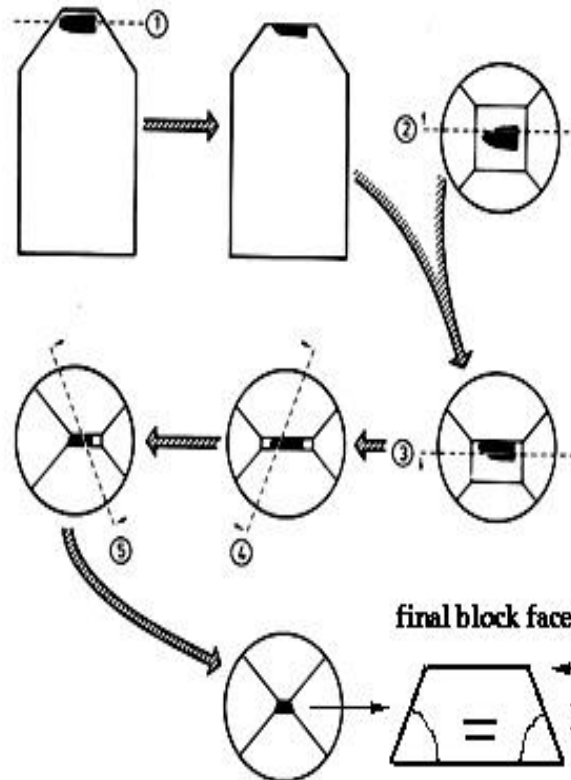
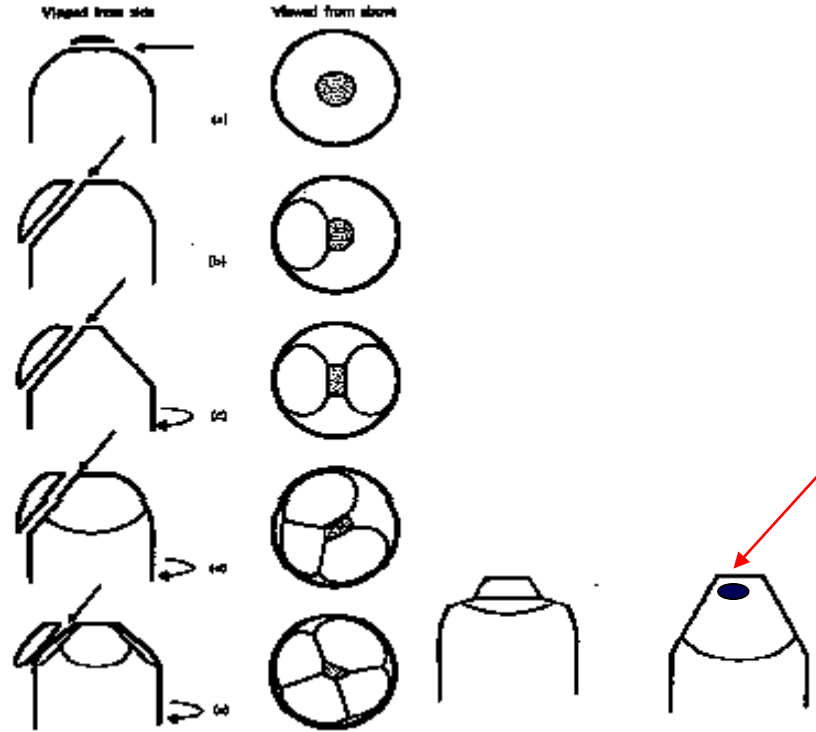
bločky připravené
pro krájení



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)



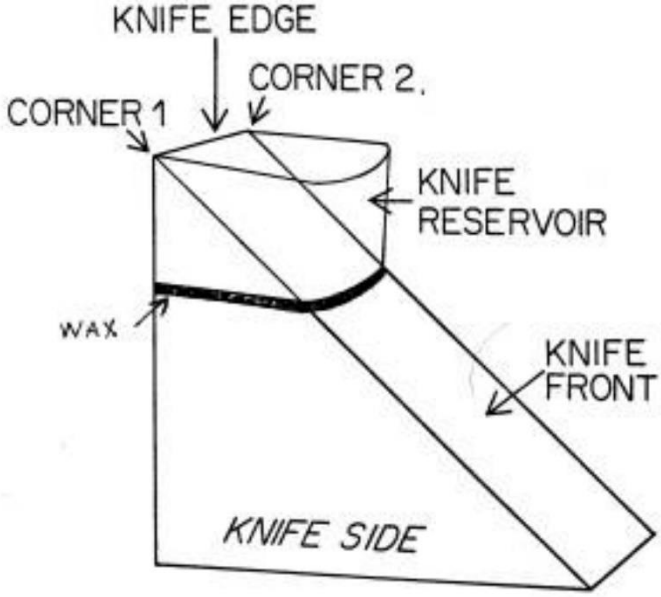
Just Right-Egyptian Pyramid with top cut off



KRÁJENÍ

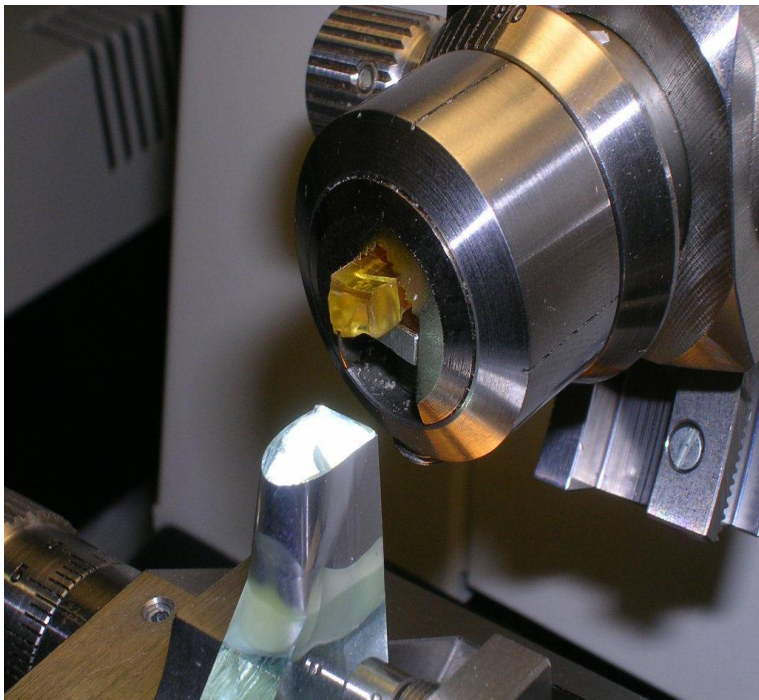
- po odstranění přebytku media (trimming) a vytvoření pyramidy se z malé plošky (0.1 mm^2) krájí jednotlivé ultratenké řezy (70 – 100 nm) - ultramikrotomy
- používají se skleněné nebo diamantové nože s vaničkou – řezy splývají na hladinu vody ve vaničce a odtud jsou přeneseny na sítky (Ni)



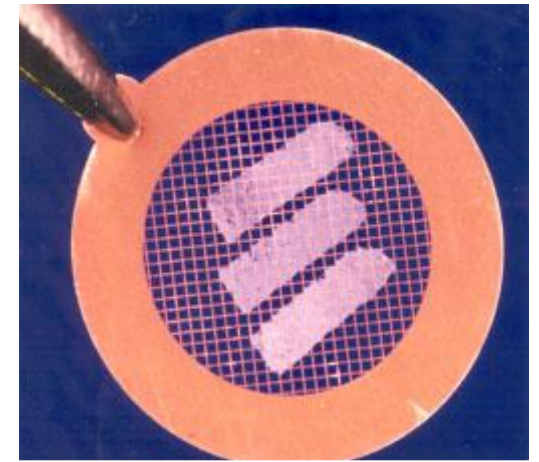
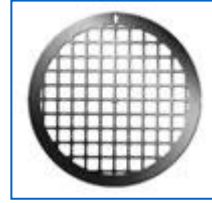
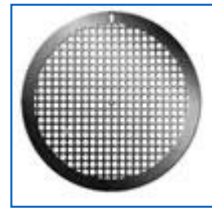
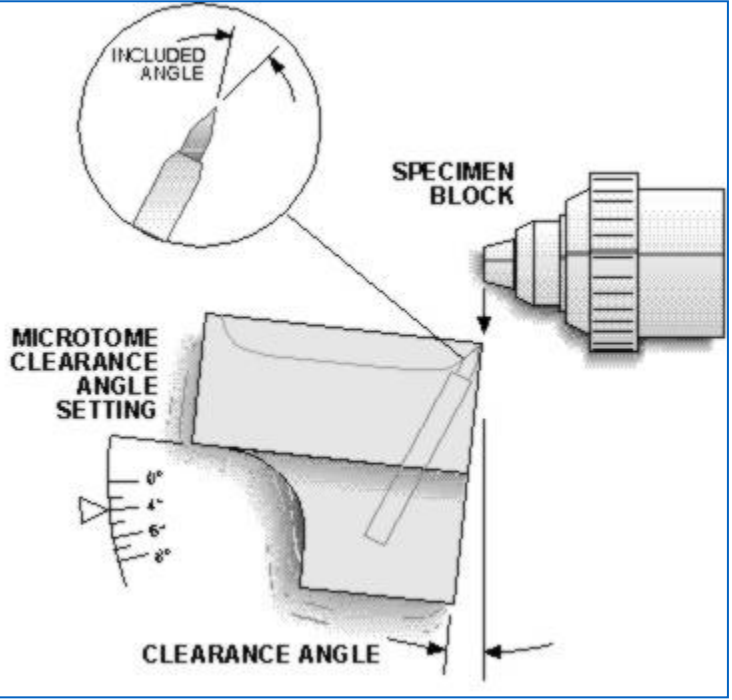


Ultramikrotomové nože:

skleněný
diamantový

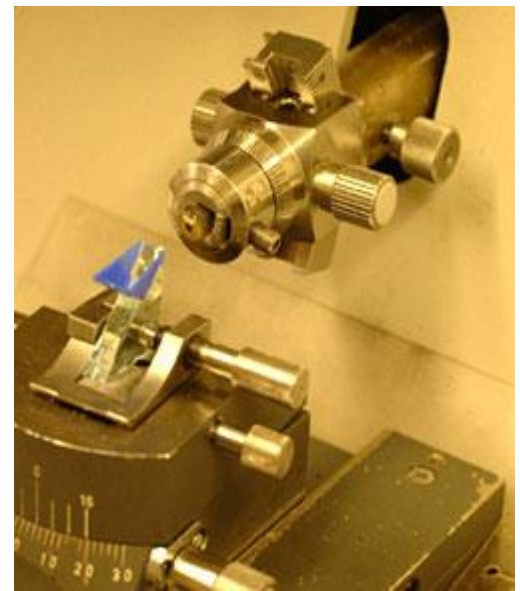
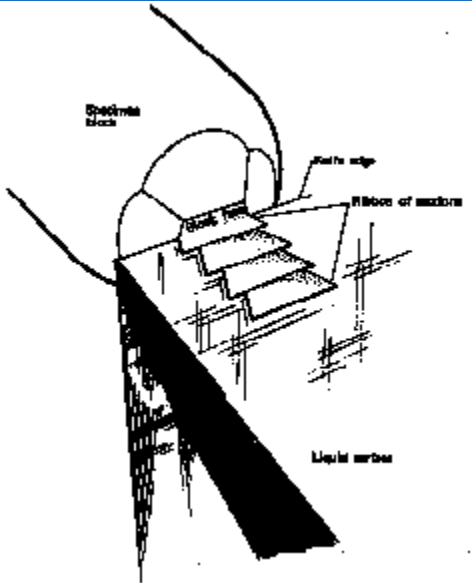
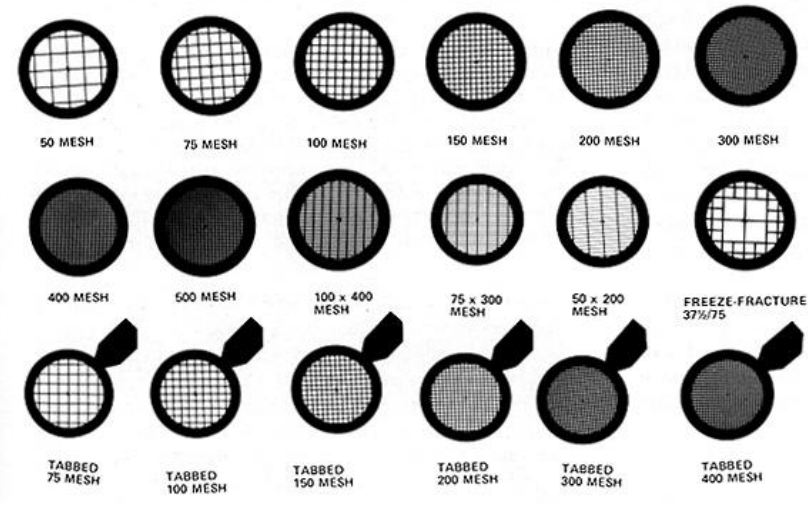


Krájení, nosné síťky



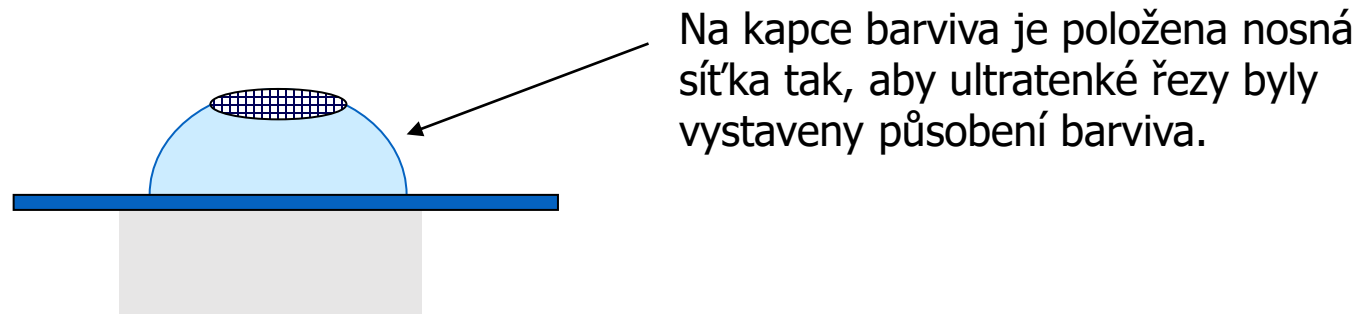
Síťka se 3 páskami řezů

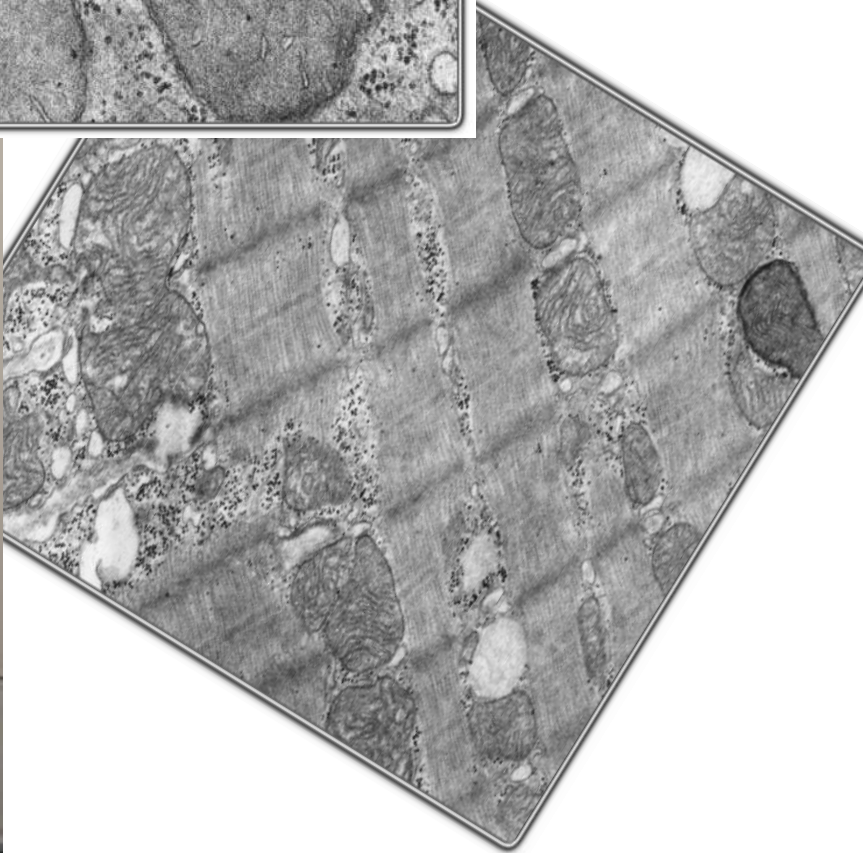
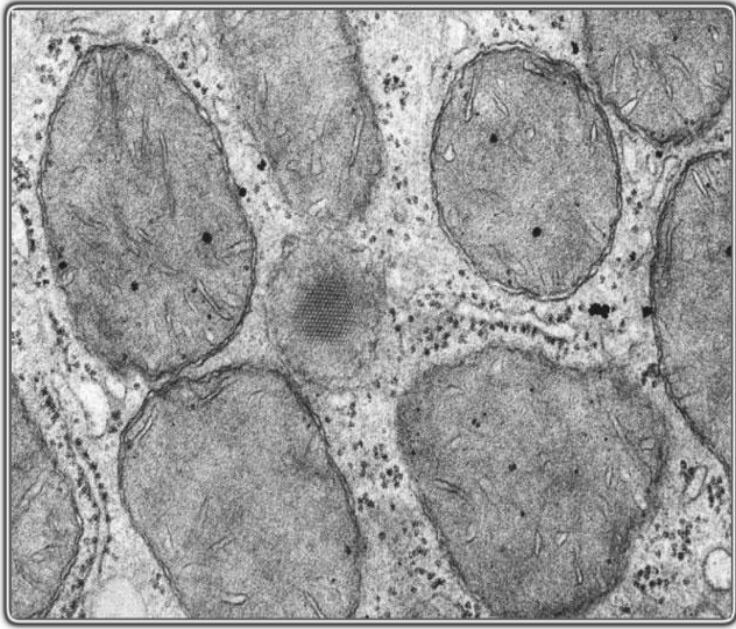
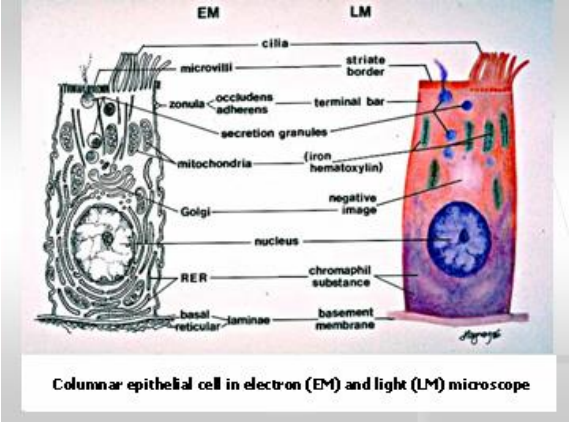
typy sítěk



KONTRASTOVÁNÍ

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





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