

M U N I
M E D

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)
- **příprava histologických preparátů** (demonstrace)

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 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 interaktivní osnova předmětu

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 nákras 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:

viz Interaktivní osnova předmětu

Zápočet

- **100%** účast v praktických cvičeních
- **Kompletní sada protokolů** podepsaných učitelem
- Úspěšně absolvované průběžné 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
- Vyučující průběžně ověřuje znalosti a poskytuje zpětnou vazbu formou otázek, diskuze nebo testu. Obrázky jsou přístupné v MedAtlasu nebo v **Interaktivních osnovách v ISu** (popř. ve studijních materiálech).

100% účast

- Všechna cvičení musí být nahrazená. Jednu absenci může omluvit vyučující (dle SŘU). Všechny ostatní absence musí být omluveny v IS.
- V případě 4 a více omluvených a nahrazených absencí je možné získat zápočet pouze po úspěšném absolvování semestrálního testu.
- Pokud student v důsledku vlastních absencí, byť omluvených a nahrazených, nepodstoupí minimálně 4 průběžné testy, bude jeho celkové hodnocení „x“ (nedostane zápočet)

Nahrazování praktik

Co udělat předem:

- výjimečně, po předchozí domluvě se svým vyučujícím
- nahrazování oznámit vedoucímu paralely (učitel zapsaný v rozvrhu jako první)
- zapsat se do sešitu (před nebo po výkladu)
- na konci praktika předložit vedoucímu praktika protokol k podpisu

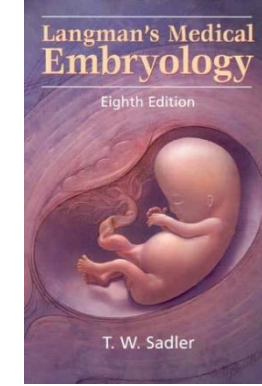
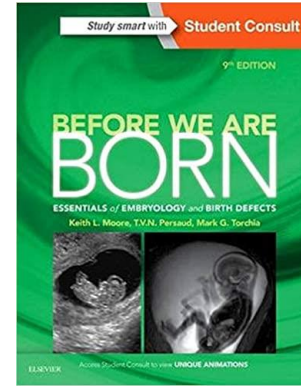
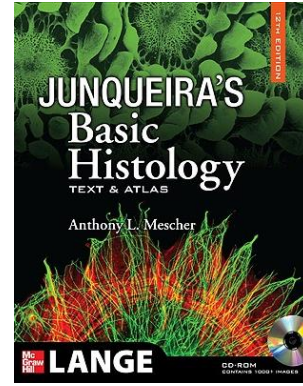
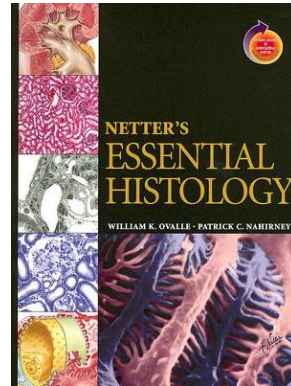
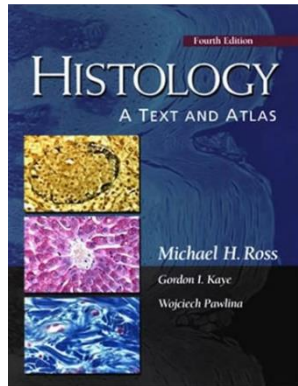
Co udělat poté:

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

Průběžné testování

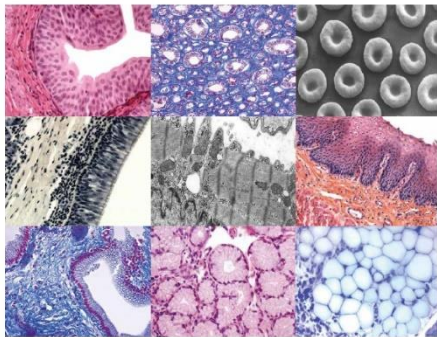
- Každý student je vyzkoušen **4x** za semestr
- Zkouší se písemně (**malý test**) zejména znalost základních struktury a jejich odborné (latinské) názvy na základě připravených obrázků. V případě neúspěchu je možná jedna oprava (**1. opravný test**), pro získání zápočtu je nutné splnit 4/4 nebo 4/5 testů.
- Testy se mohou psát vždy jenom v řádném praktiku, nikoliv v náhradním
- V případě neúspěchu u 2 nebo 3 testů následuje ve stejném zkouškovém období **2. opravný test** (semestrální) pokrývající látku celého semestru
- V případě neúspěchu u 4 testů je student hodnocen „X“
- Obrázky jsou přístupné v MedAtlasu nebo studijních materiálech praktik

Doporučená literatura

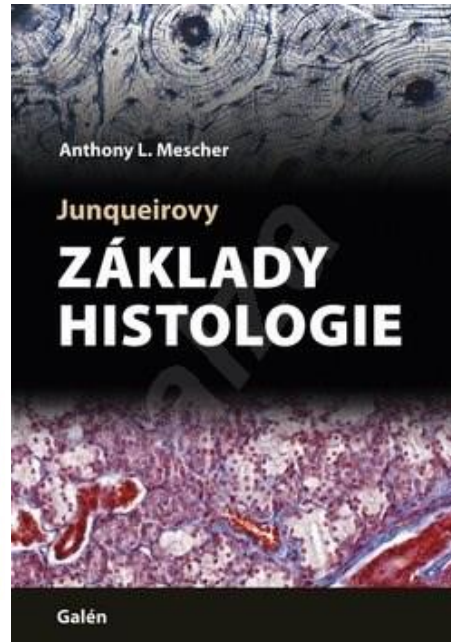


Guide to General Histology and Microscopic Anatomy

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



Masaryk University, Brno 2017

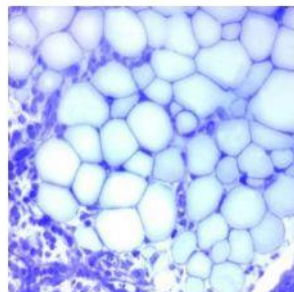


Ústav histologie a
embryologie LF MU

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

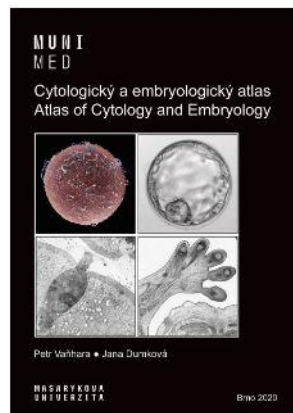
Atlas of Histology

recommended study tool

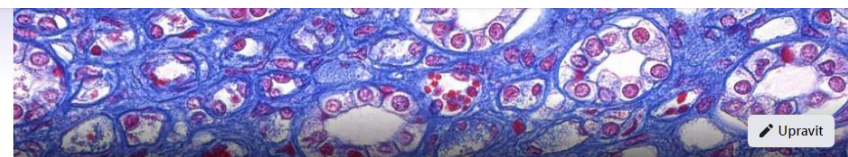


Atlas of Cytology and Embryology

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)

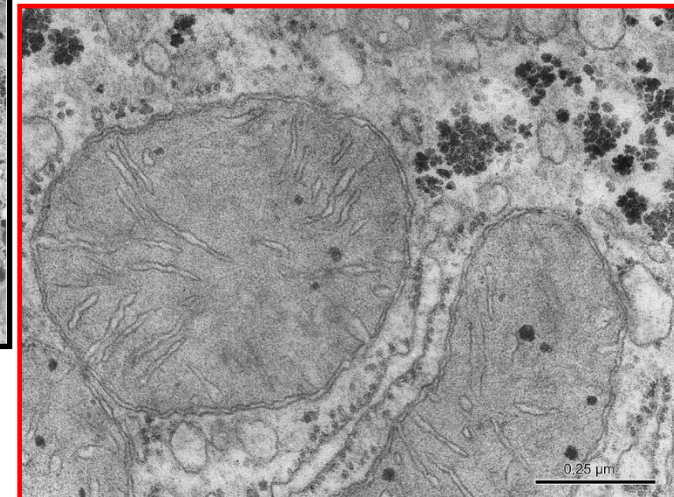
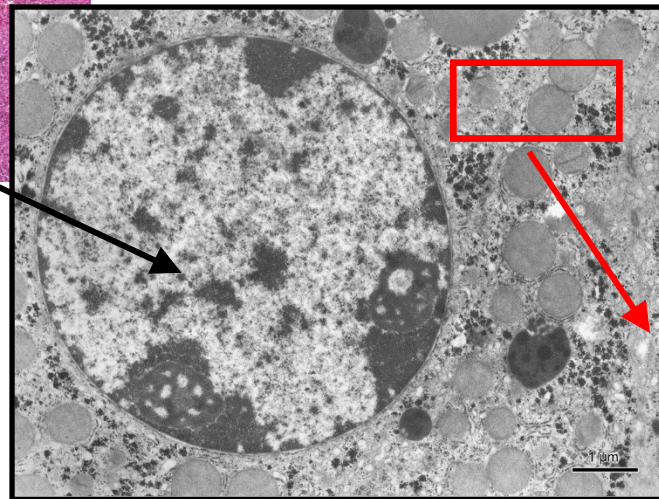
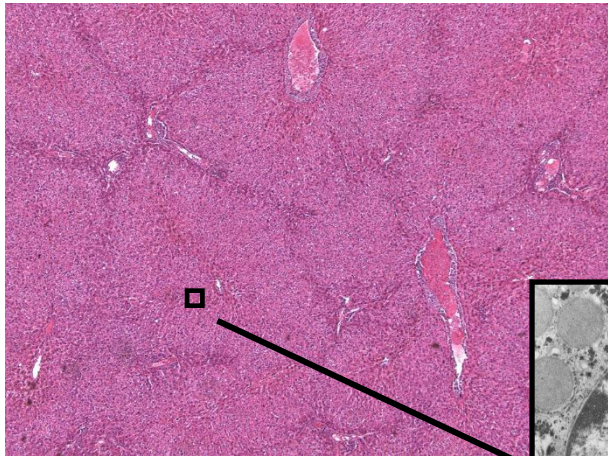
teratologie – defektní vývoj orgánů (příčina, důsledek), vrozené vývojové vady (VVV = malformace = anomálie); metody prenatálního screeningu – ultrasonografie, amniocentéza, genetické vyšetření chromozomálních aberací (diagnostika, prevence a terapie).

Histologie

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

Rozlišovací schopnost SM: $\sim 0,1 - 0,5$ 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 ledvinový parenchym, kostní dřeň)

= 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, změna struktury v důsledku autolýzy a působení bakterií, hypoxie. Fixace má předcházet těmto změnám a stabilizovat strukturu vzorku. Během fixace jsou proteiny konvertovány do inaktivní, denaturované formy.

Požadavky na fixační činidlo:

zachovat strukturu

rychle penetrovat do tkáňového bločku

neovlivňovat výsledek barvení

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

CHEMICKÁ FIXACE

Fixační činidla:

organická – ALDEHYDY – **formaldehyd** (*SM*)

– glutaraldehyd (*EM*)

– ALKOHOL – 96 – 99,4 % (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, SUSA (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 cm^3 : 20 – 50 cm^3)

3. PRANÍ A ZALÉVÁNÍ

odstranění fixačního činidla ze vzorku; výběr vypíracího media závisí na fixaci:
voda nebo **alkohol**

důvod zalévání: „tvrzení“ měkkých tkáňových vzorků krájitelnými médii

Zalévací média

ve vodě rozpustná – želatina, agaróza

ve vodě nerozpustná – parafin, paraplax, 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

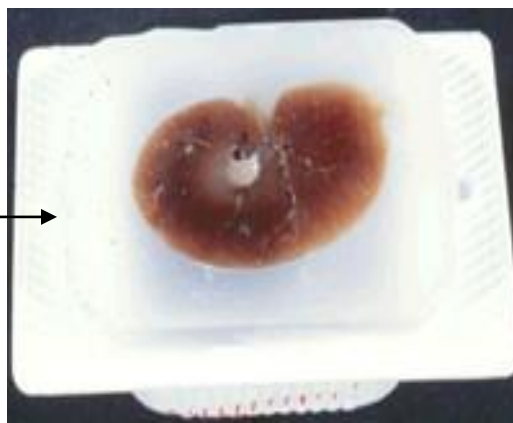


Zalévací komůrky - **papírové**

- **kovové** s orientačními plastovými prstenci

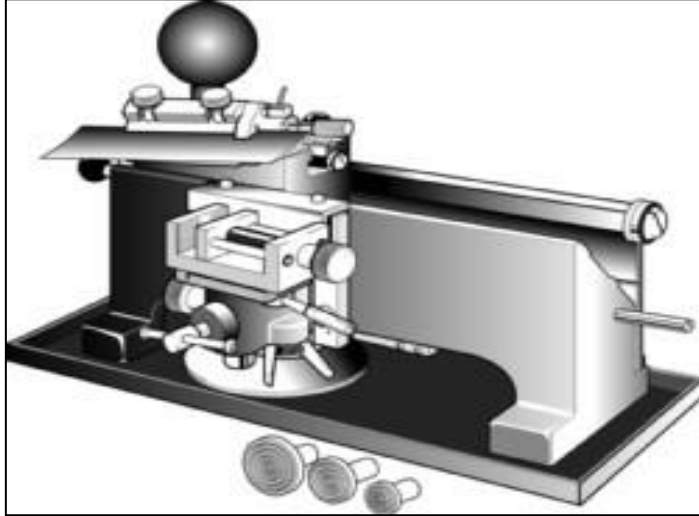


výsledek zalití →

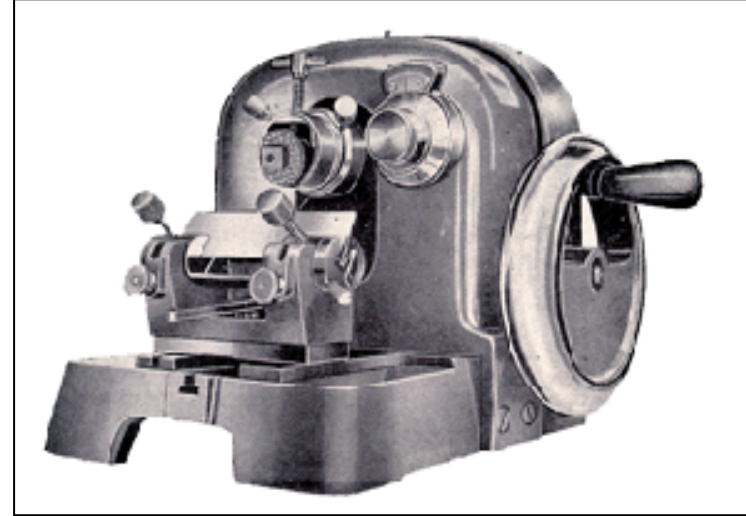


4. KRÁJENÍ

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

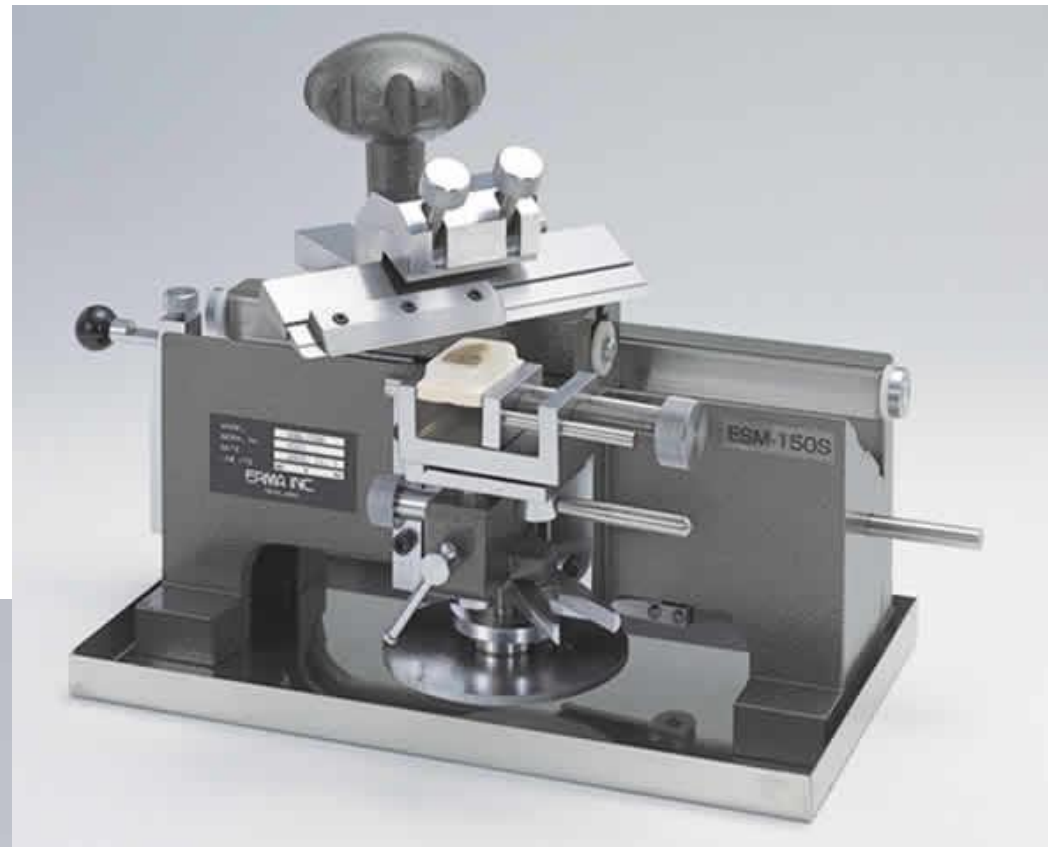


Sáňový mikrotom – blok je upevněný v držáku, nůž nebo břitva se pohybuje horizontálně

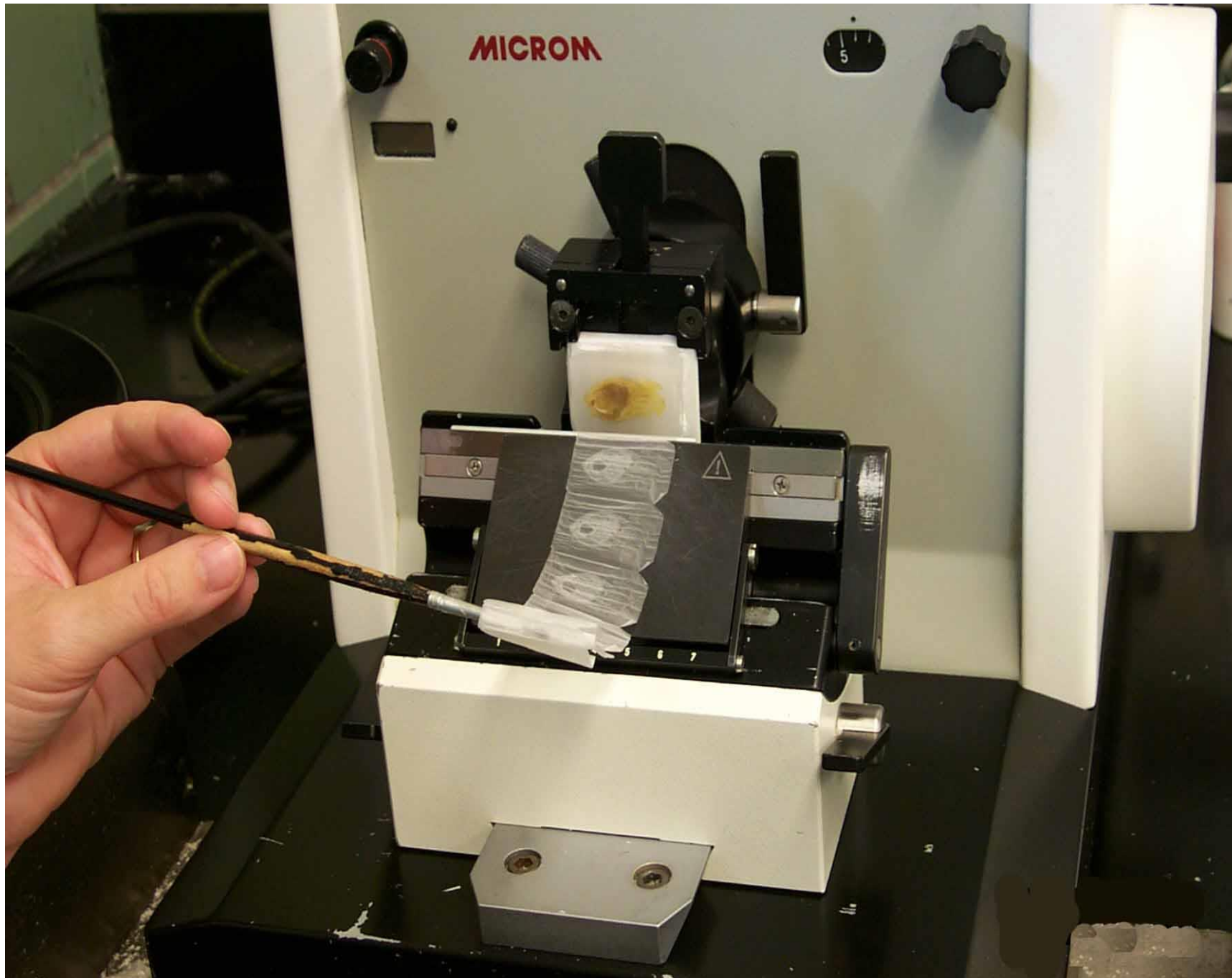


Rotační mikrotom – nůž je fixní, držák s bločkem se pohybuje vertikálně

Sáňový mikrotom



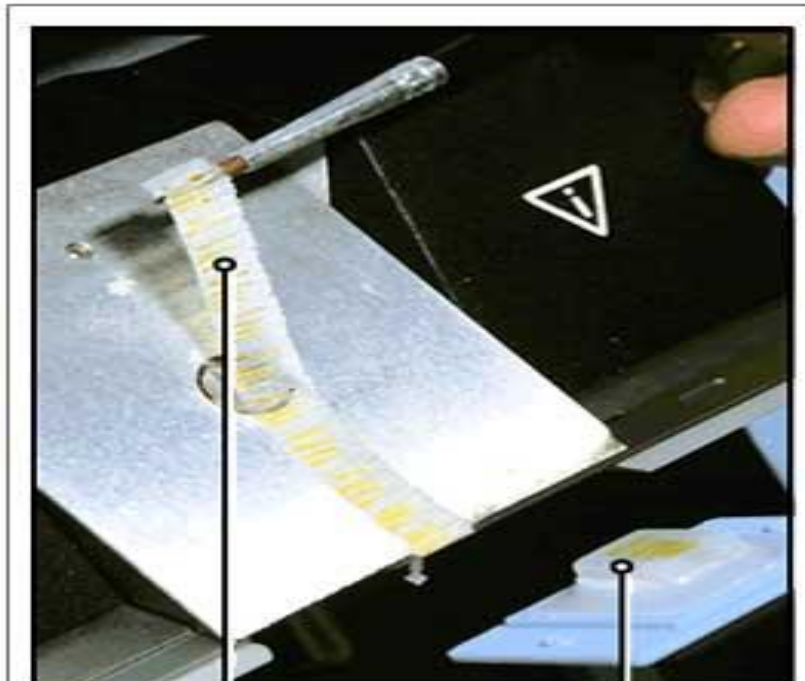
Rotační mikrotom





kryostat

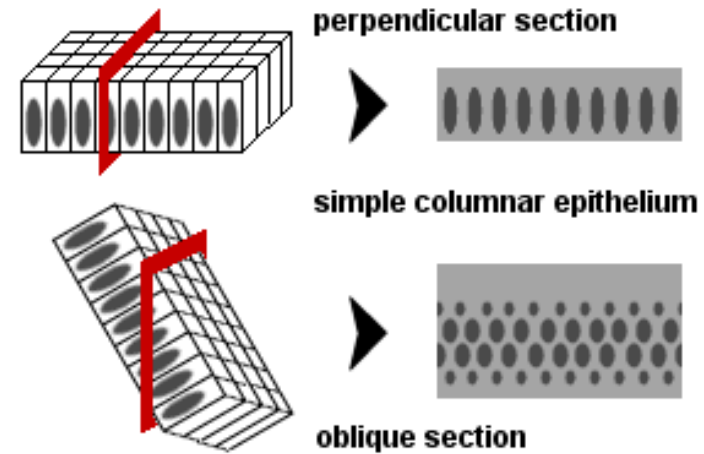
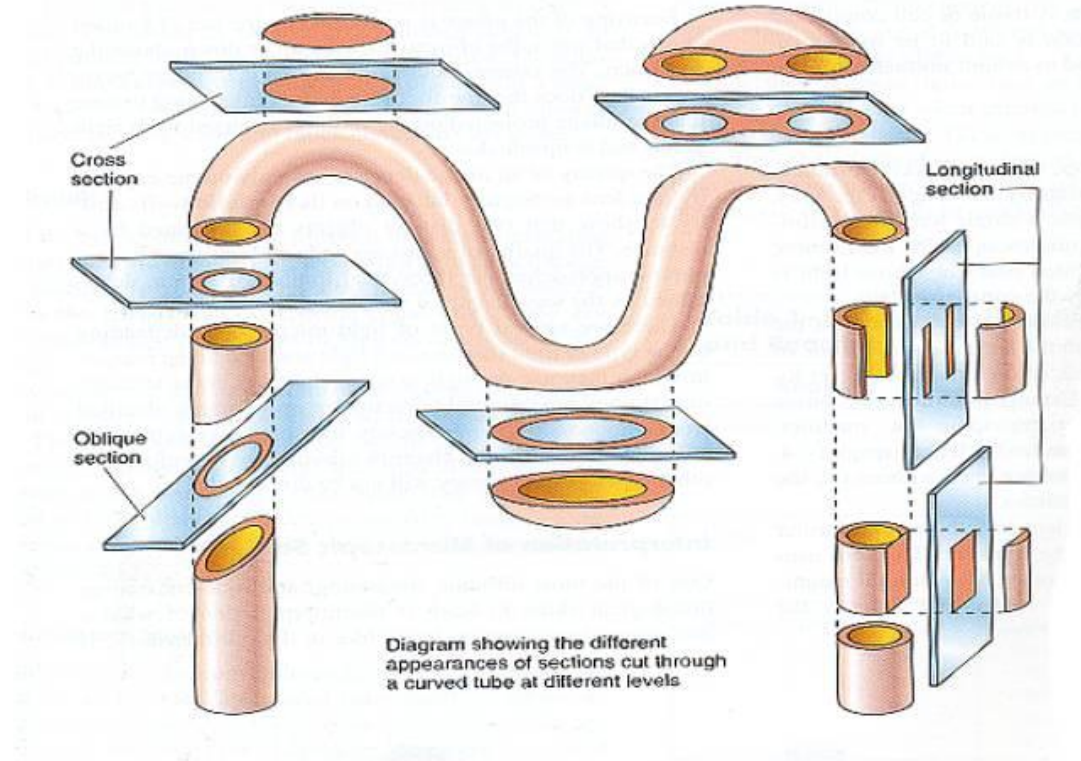
= rotační mikrotom v mrazicím boxu (-60°C);
zmrzlou tkáň lze krájet bez zalévání



páska řezů parafinový bloček



KRÁJENÍ



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).



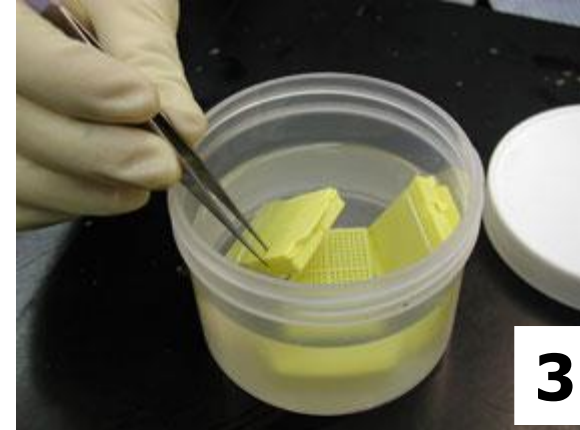
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv. Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylenem.



1



2



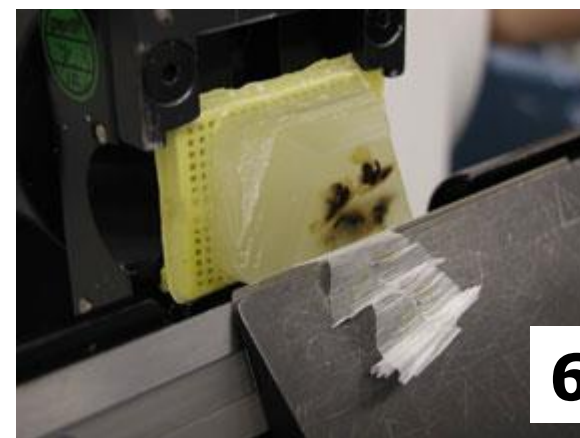
3



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

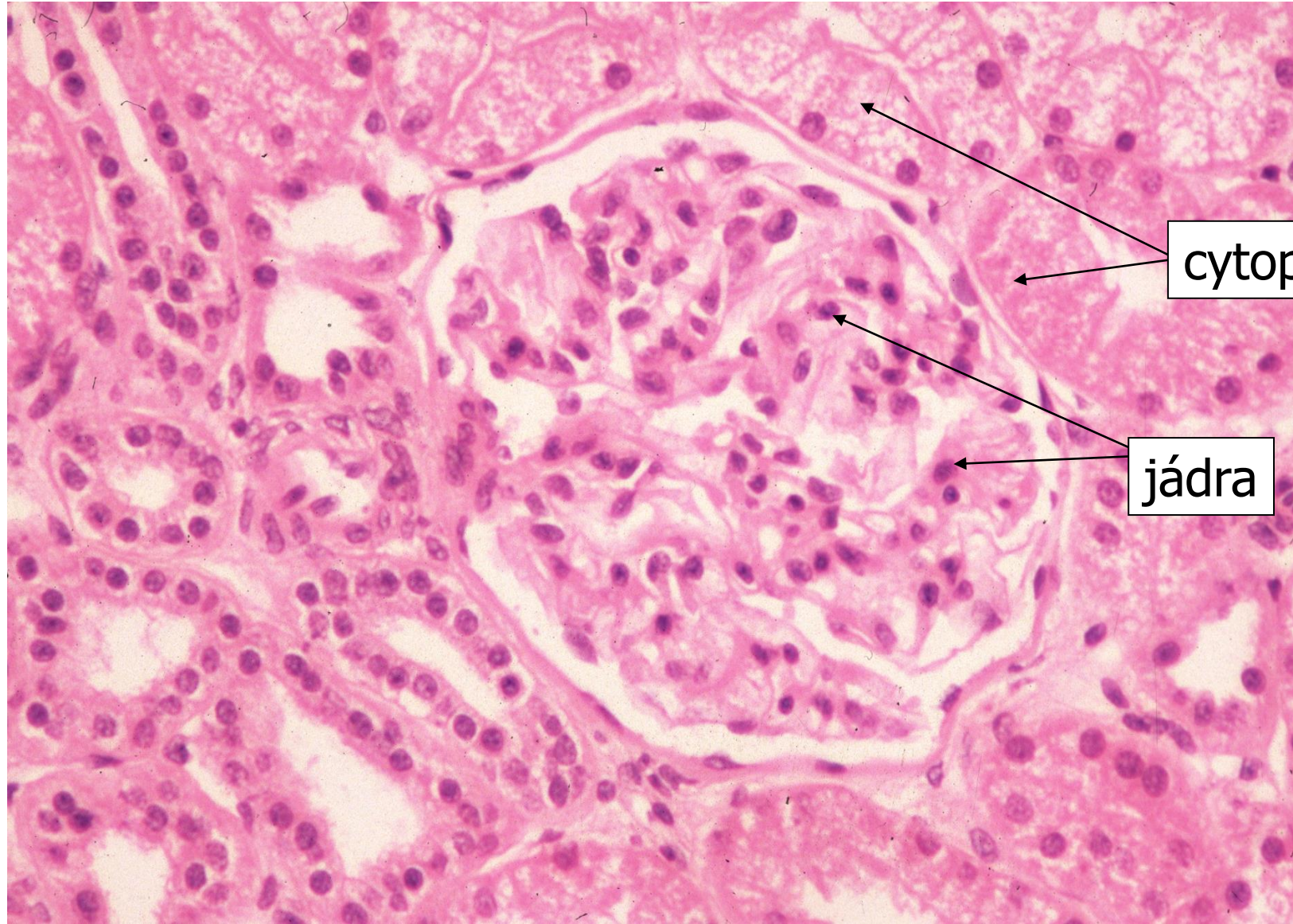
- chromofilní /chromatofilní/ **x** chromofobní
- polychromatofilní – afinita k oběma druhům barviv

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)

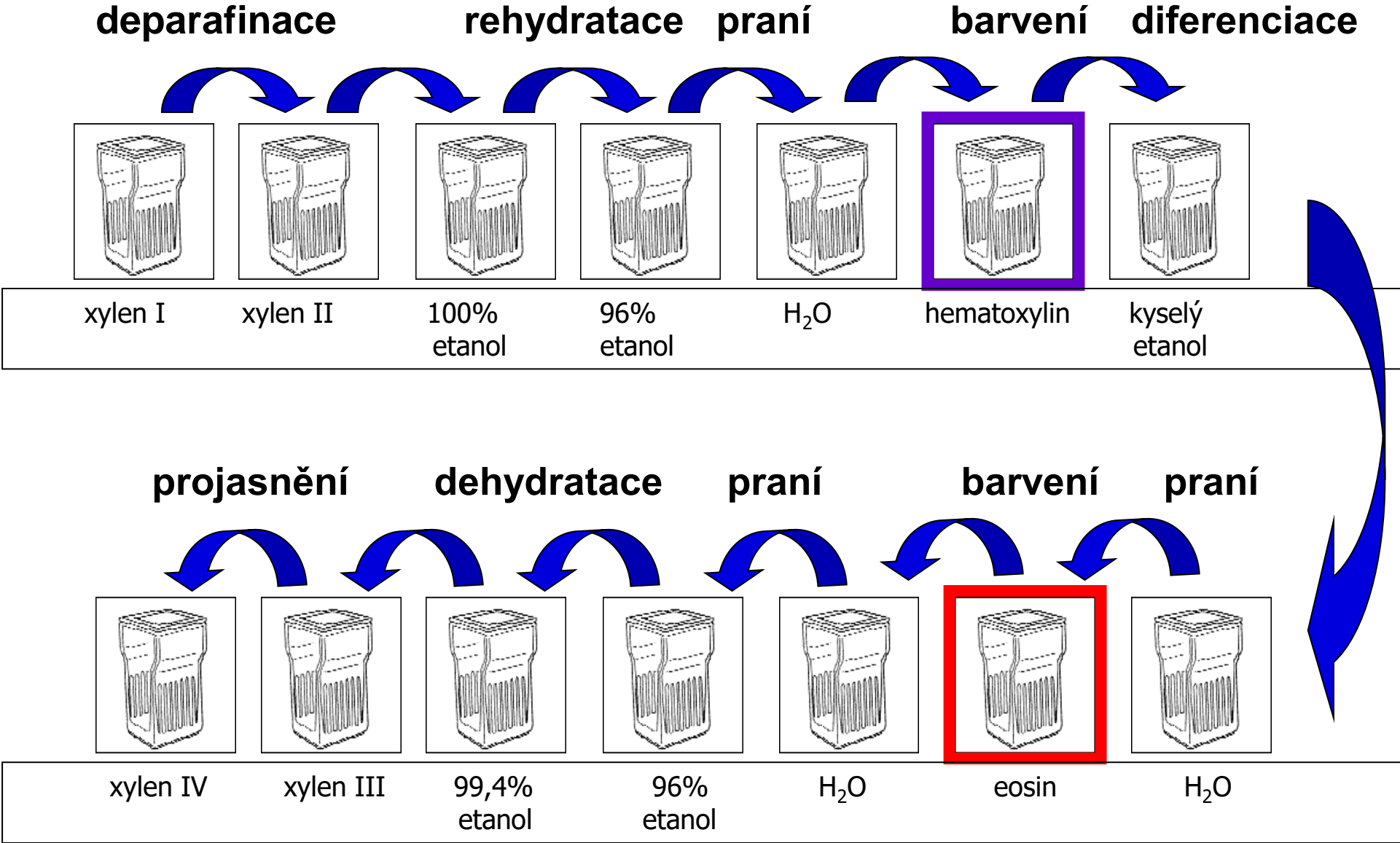
Hematoxylin a eosin (HE)



cytoplazma

jádra

HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)



RUTINNÍ BARVENÍ: HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)

Hematoxylin – zásaditý

Eosin – kyselý

Postup:

Odstranění parafinu xylenem

Rehydratace „sestupnou“ řadou alkoholů (99,4% →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*

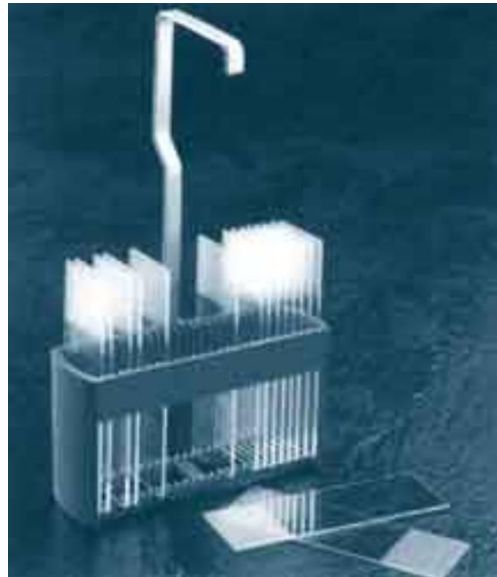
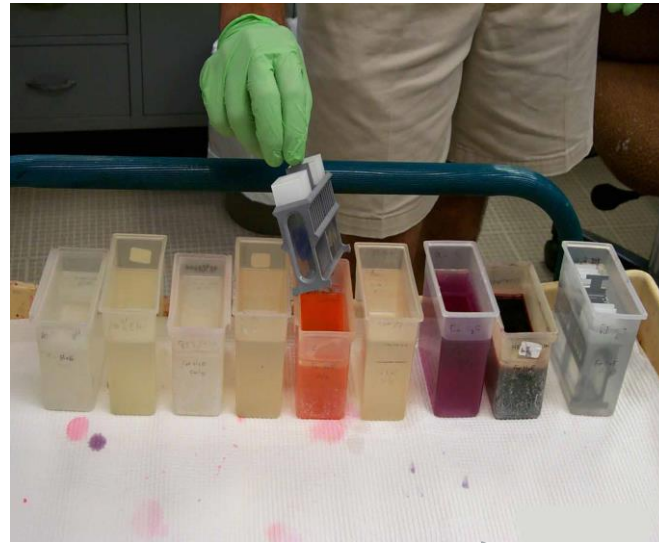
modř – *oranž G*

jádra – červená

erytrocyty – oranžové

svalová tkáň – červená

kolagenní vlákna – **modrá**



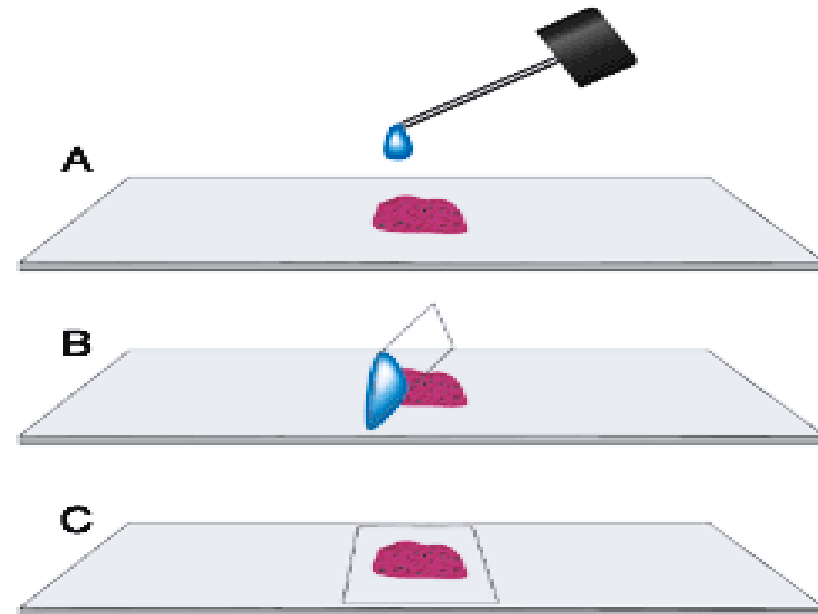
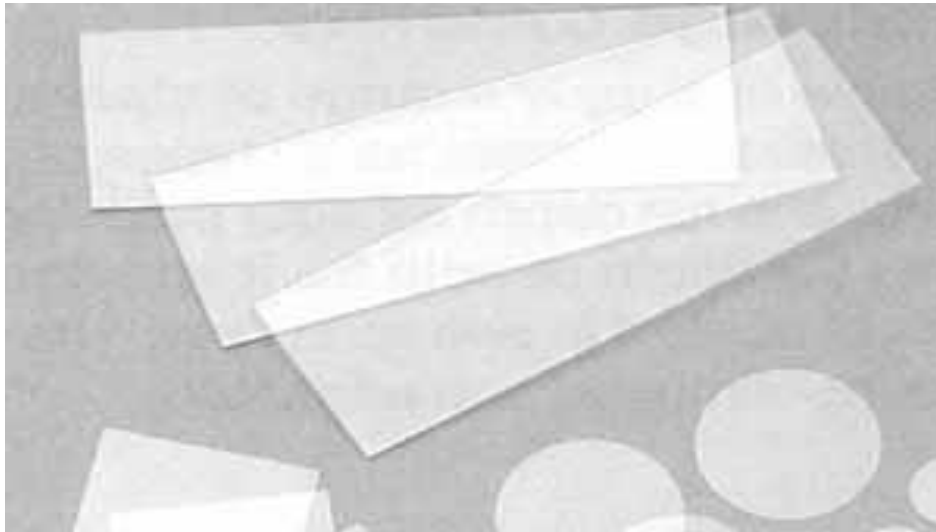


řada boxů (kyvet) s barvicími médii



MONTOVÁNÍ

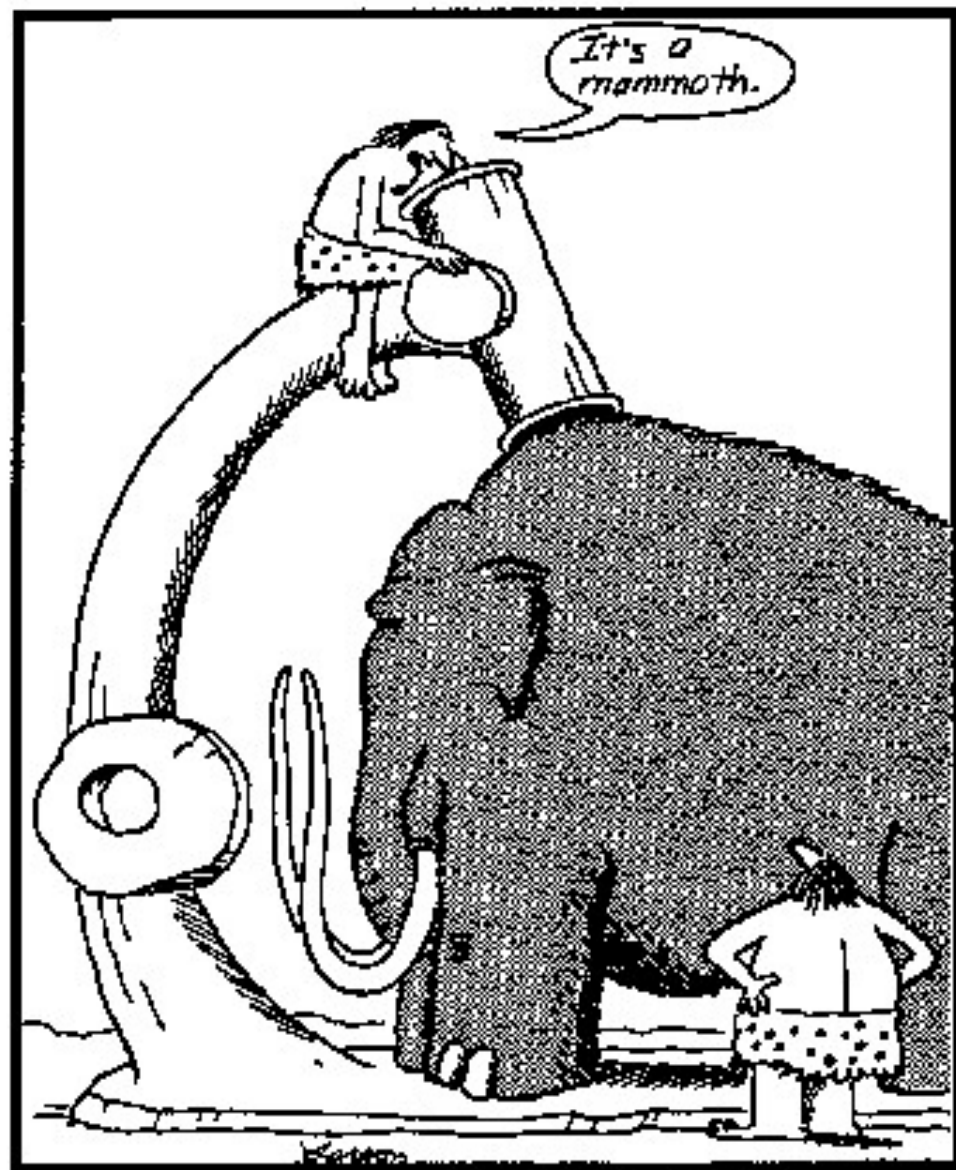
uzavření preparátu – kapkou montovacího media a krycím sklíčkem ⇒ trvalý preparát



Montovací média
rozpuštná v xylenu – kanadský balzám
rozpuštná ve vodě – glycerin-želatina, arabská guma

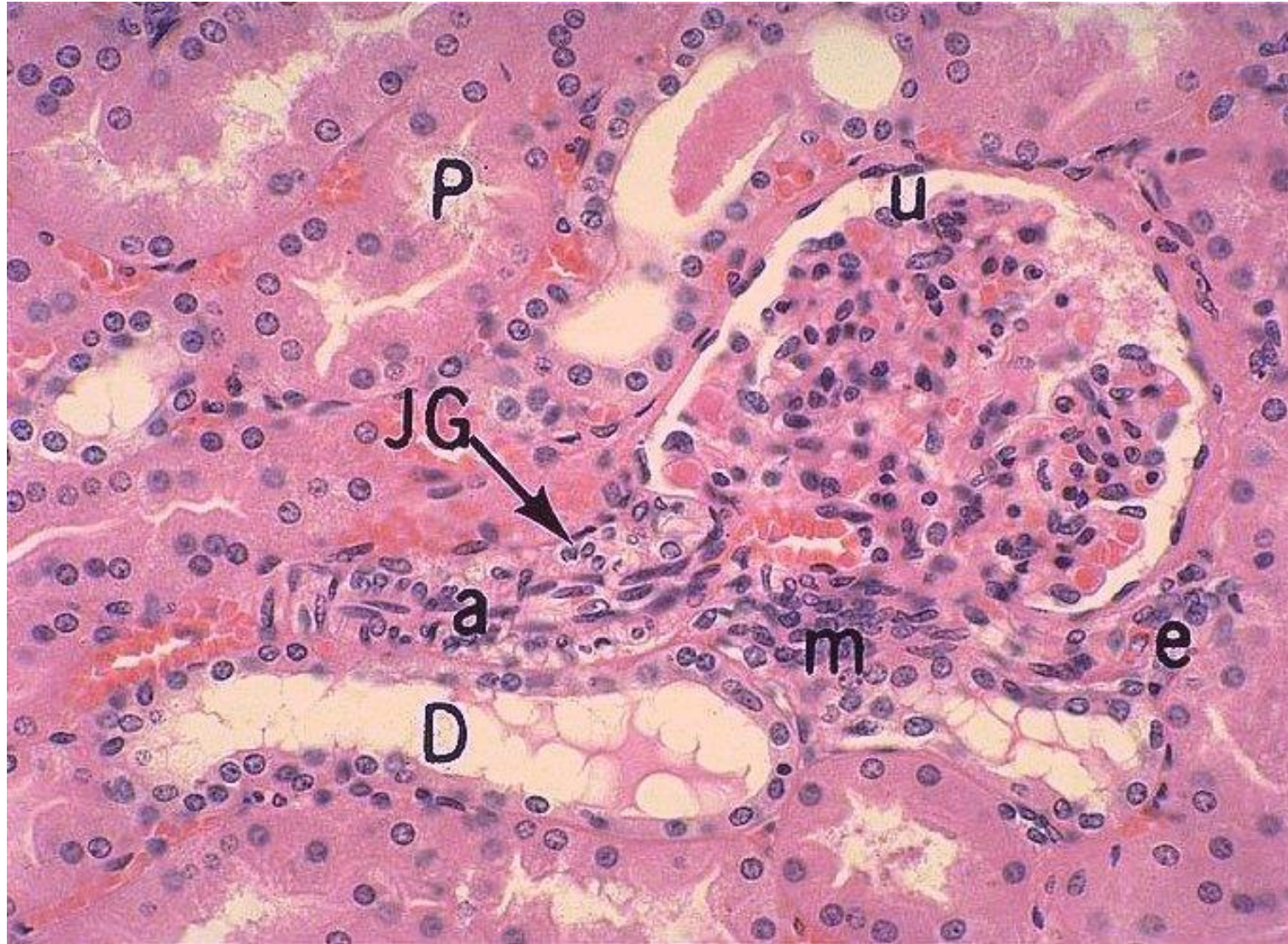


trvalé histologické preparáty ke studiu ve SM

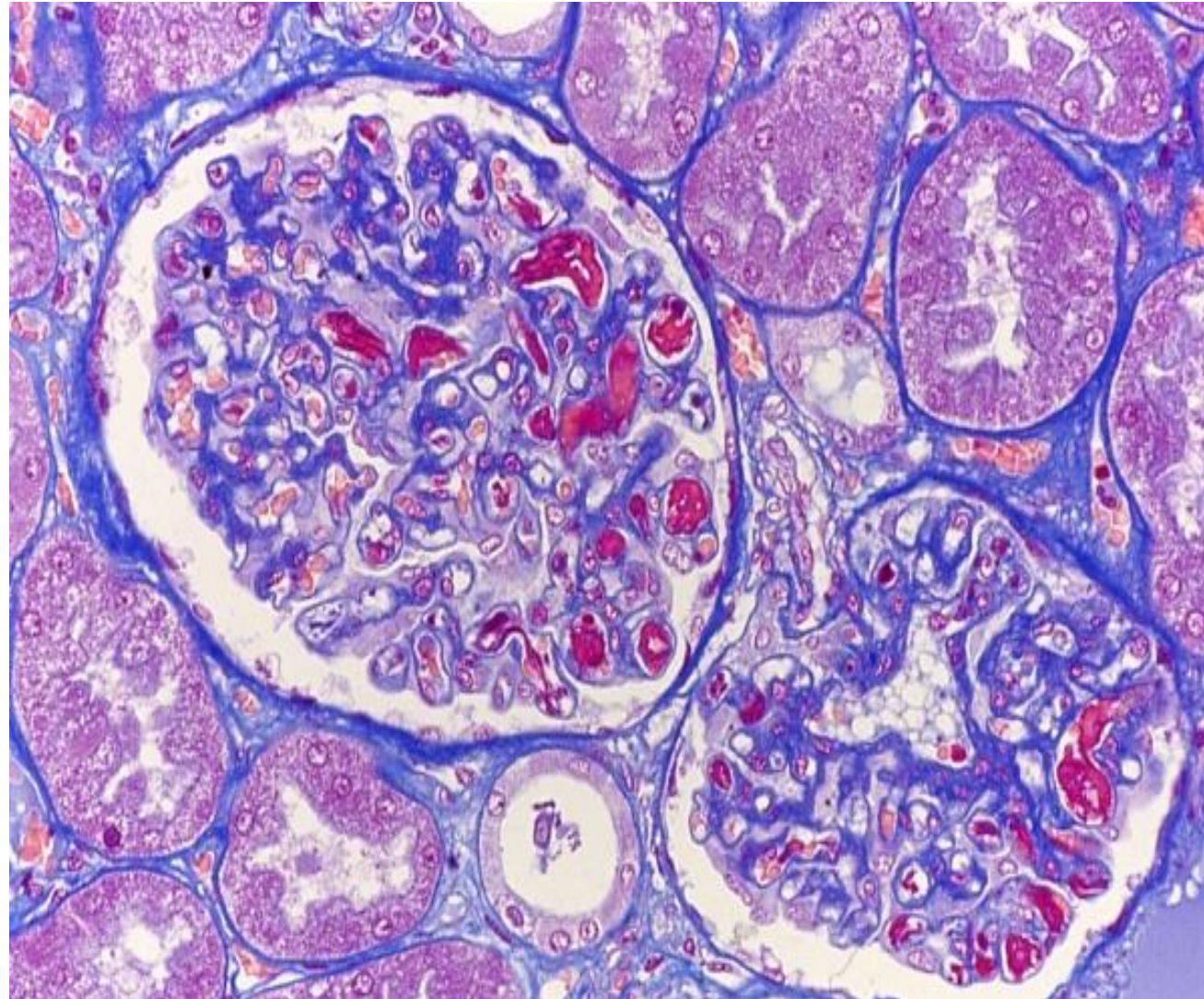


Early microscope

Hematoxylin a eosin (HE)



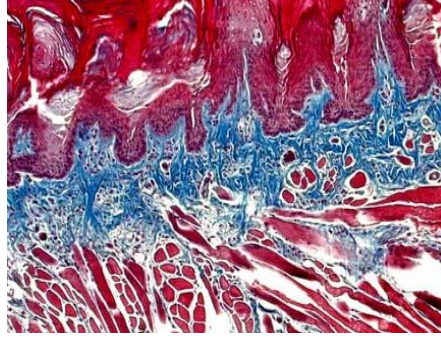
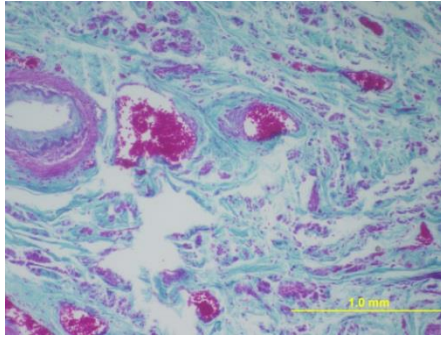
Azokarmín a anilin. modř (AZAN)



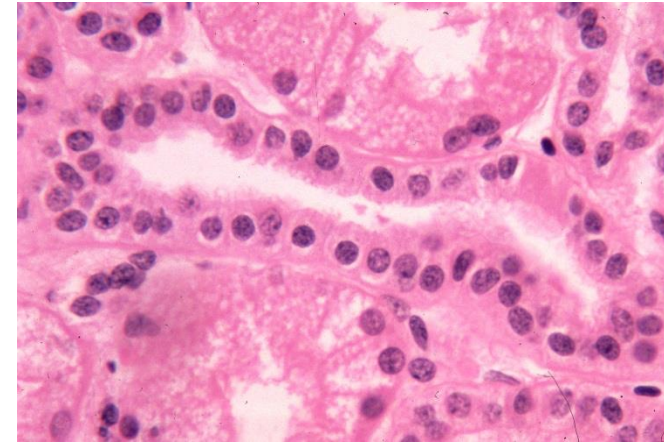
Barvicí metody:

přehledné – HE, AZAN

demonstrují všechny složky tkání

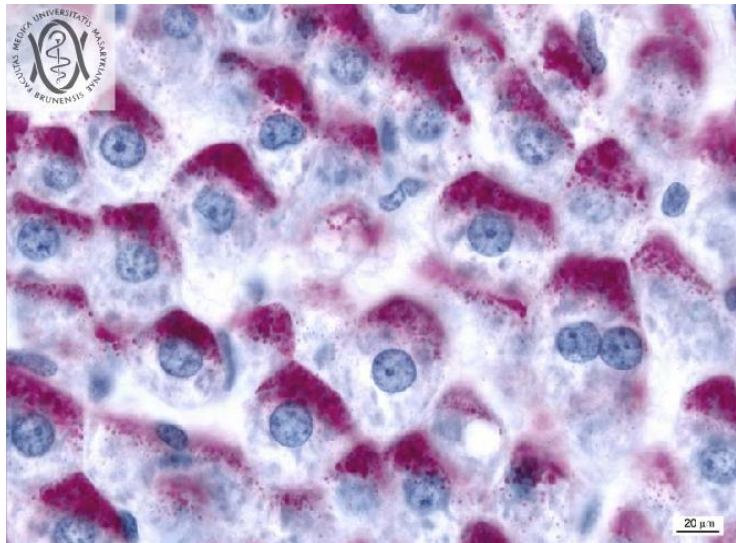


HE – nejpoužívanější barvení

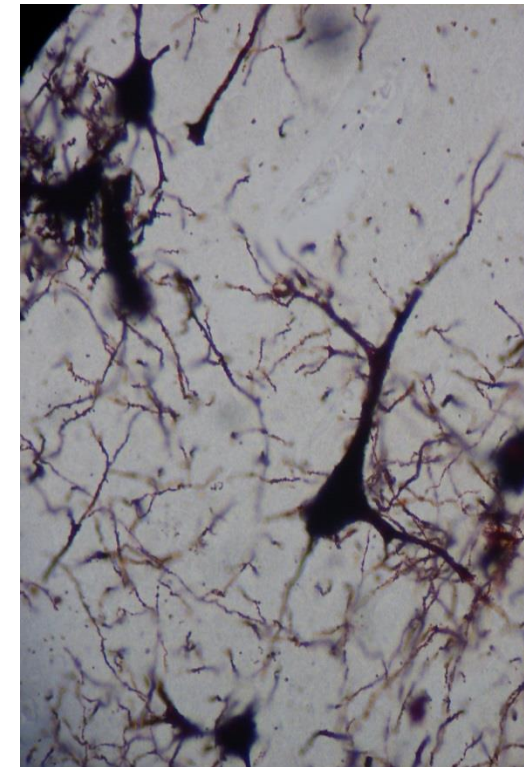


speciální

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 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)

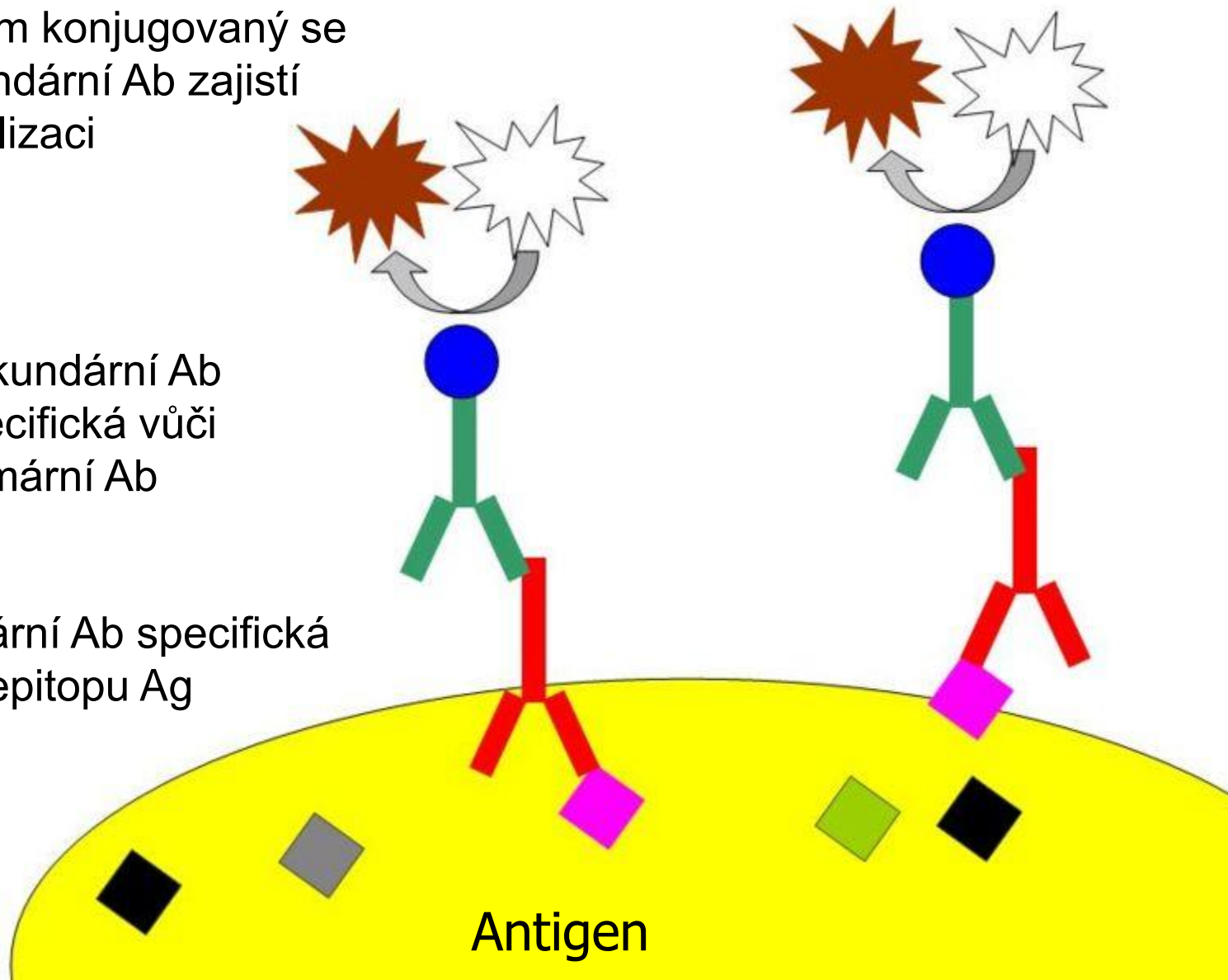
* - marker

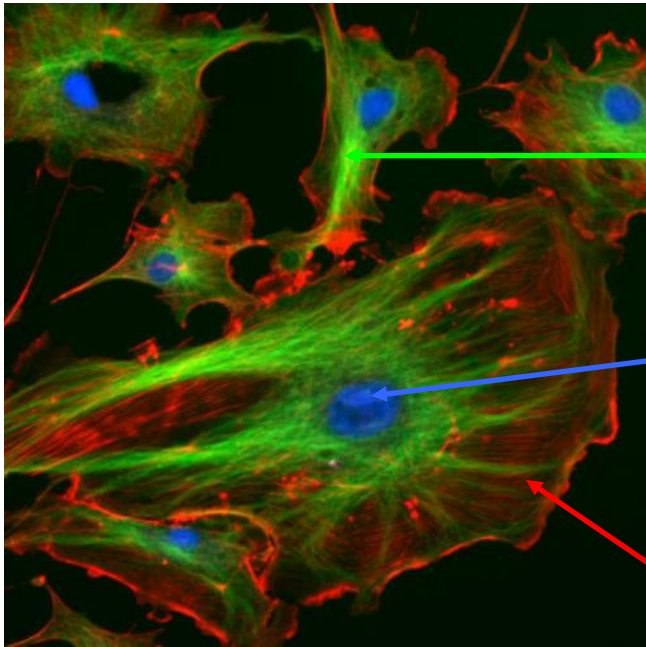
1. fluorochromy – rhodamin, Texas red, FITC
2. enzymy – křenová peroxidáza, AF, acetylcholinesteráza,
3. radioizotopy (I^{125})

Enzym konjugovaný se sekundární Ab zajistí vizualizaci

Sekundární Ab specifická vůči primární Ab

Primární Ab specifická vůči epitopu Ag

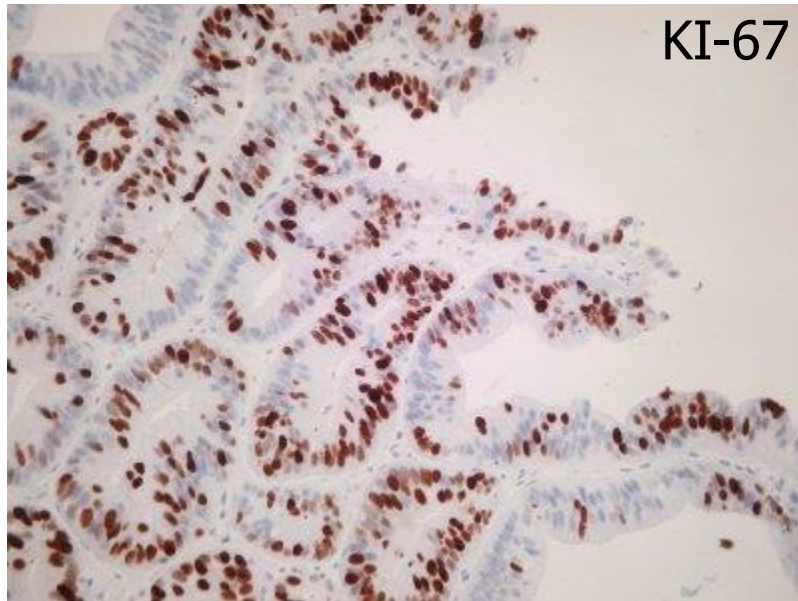
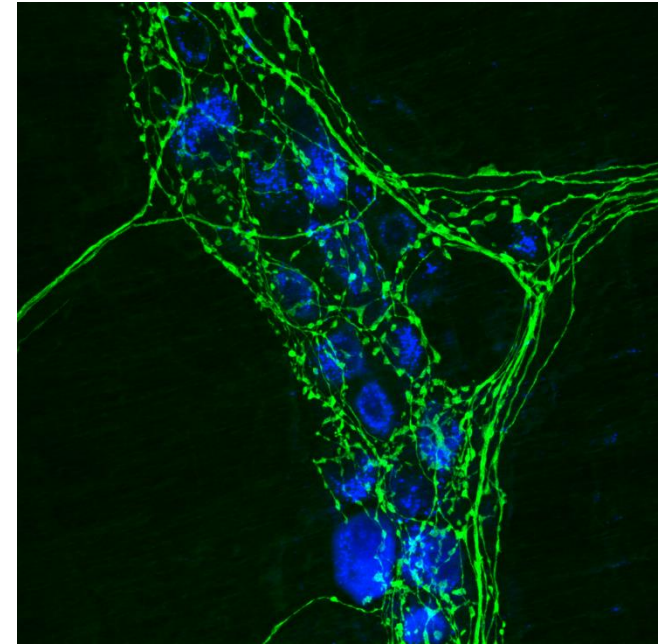




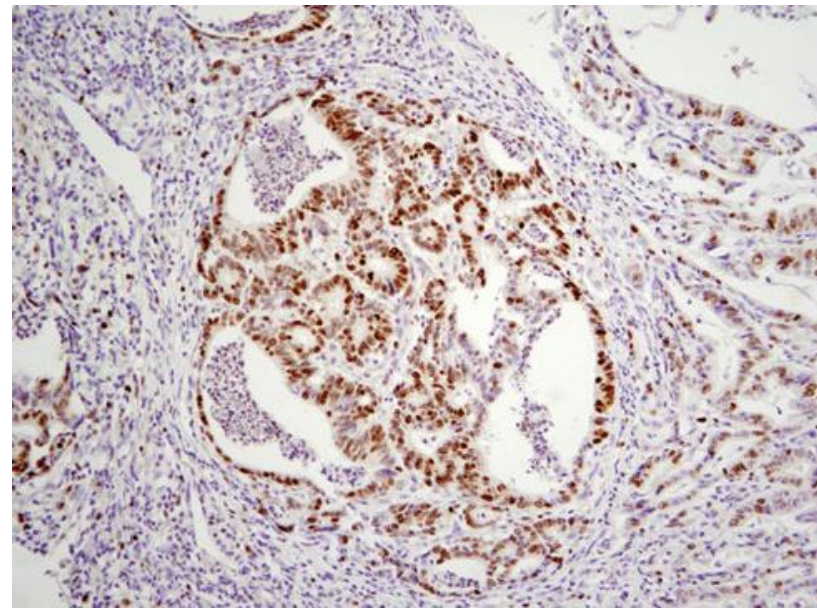
Aktin (cytoskelet)

DAPI (jádno)

Mikrotubuly (cytoskelet)



KI-67

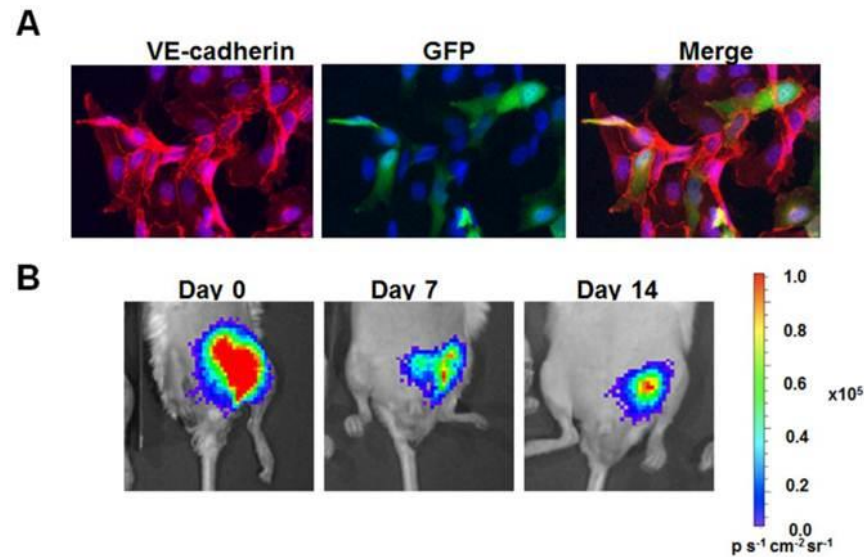


In-vivo/live cell imaging

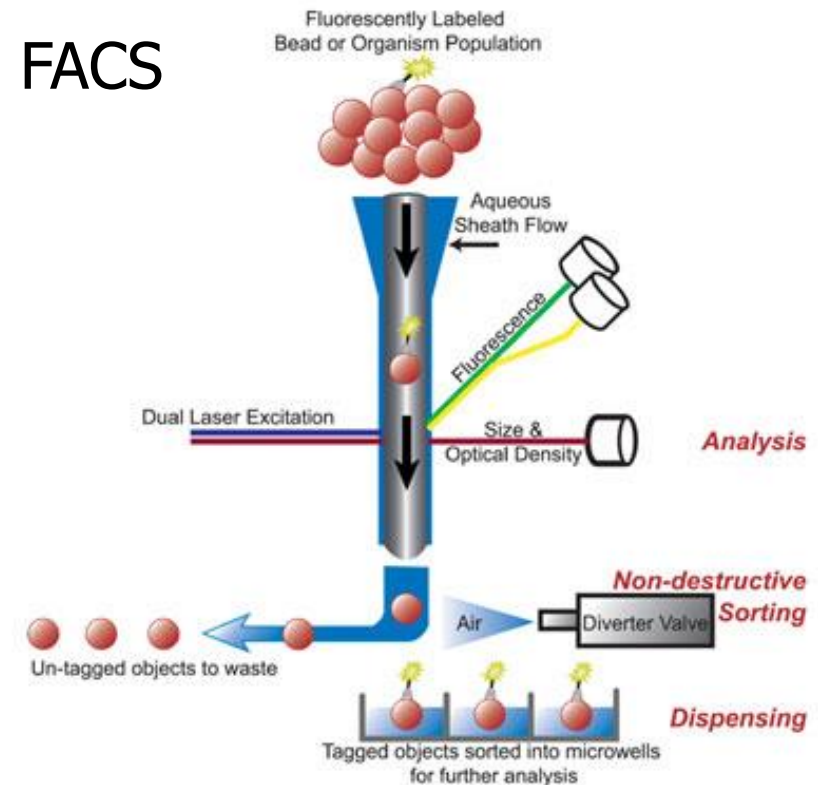
- US, MRI, PET...
- Buňky s fluorescenčním reportérem



- FACS



doi:10.7150/thno.3694

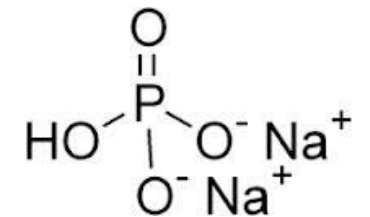
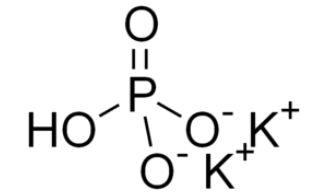
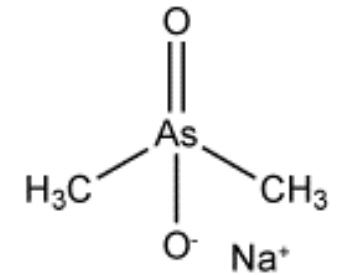


ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ PRO ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII (EM)



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 mm³

FIXACE – glutaraldehyd (vazba aminoskupin) + OsO₄ (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:

želatinové (1), plastové (2)

nosiče (držáky) kapslí (3)

ploténky s komůrkami (4, 5)



1



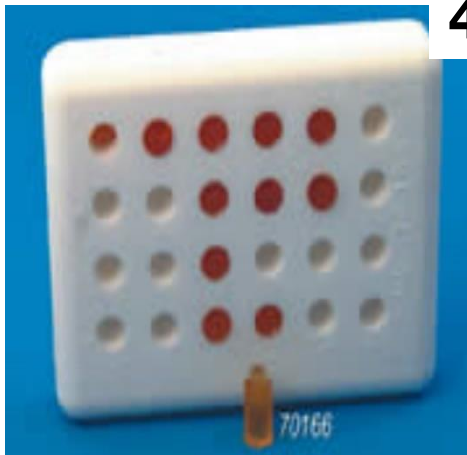
2



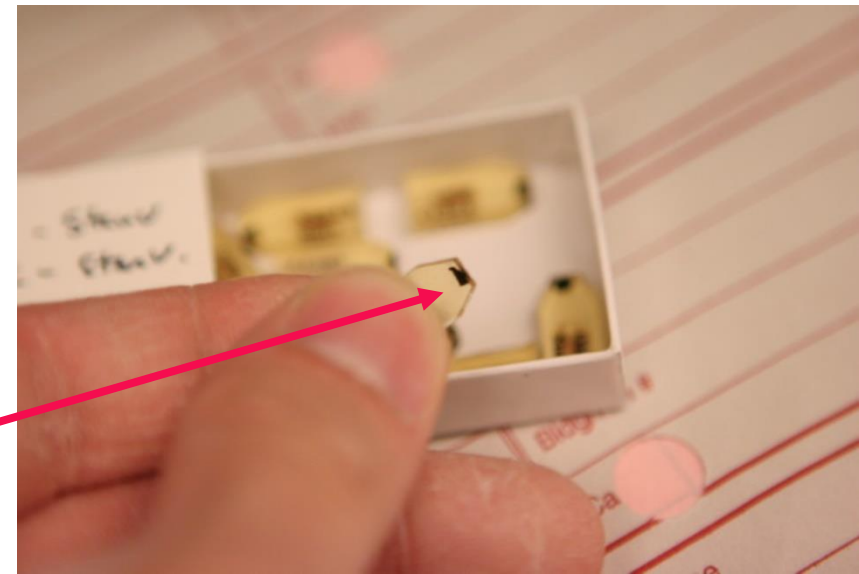
3



4,5



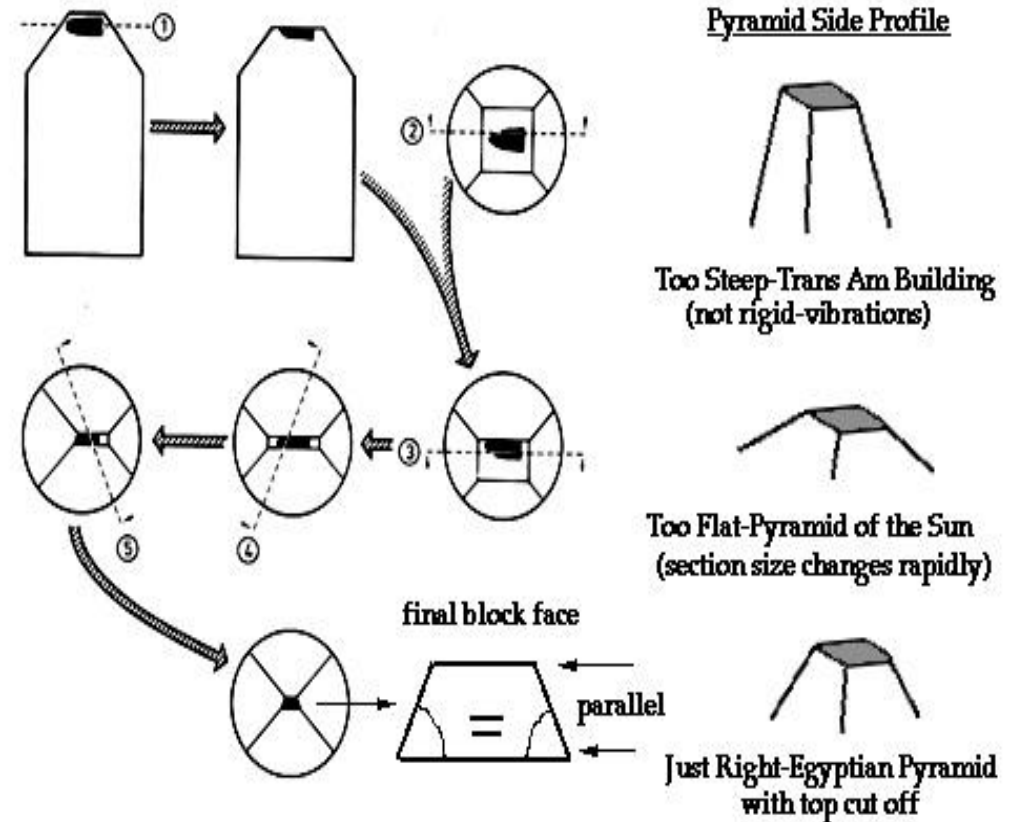
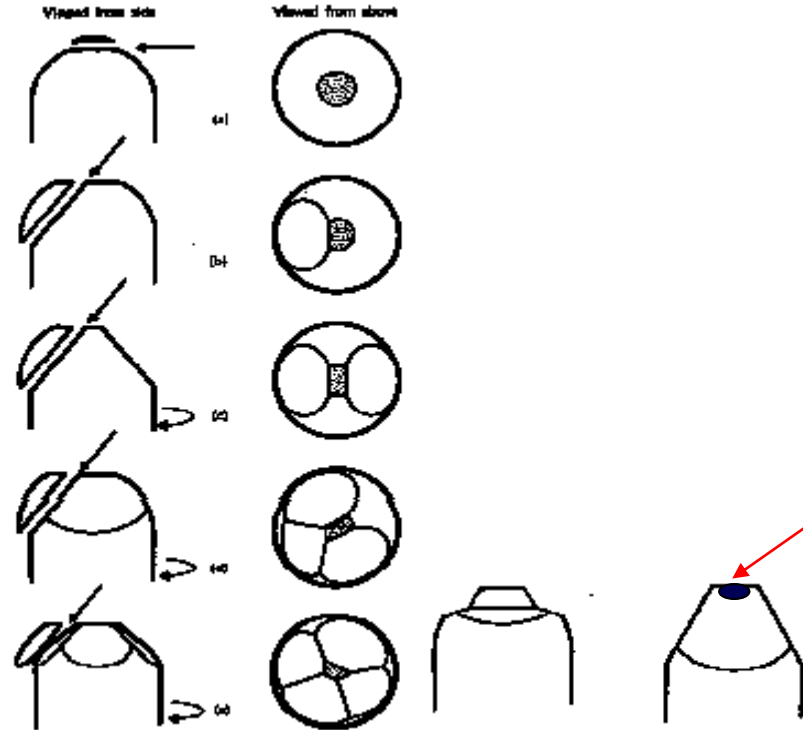
bločky připravené pro krájení



Úprava pyramid (trimování)

Odstranění přebytku tvrdého zalévacího media a zhotovení pyramid s minimální řeznou plochou (0.1 mm²).

Minimum tkáně (černý shluk) ve vrcholu pyramidy



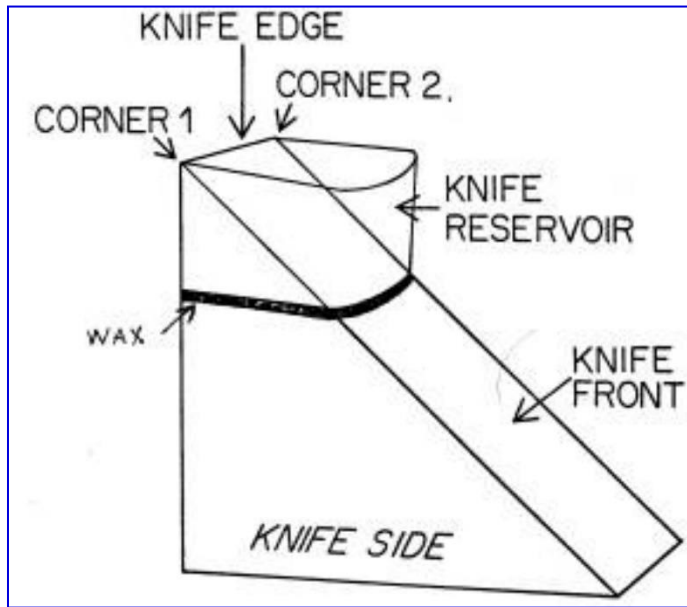
KRÁJENÍ

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)

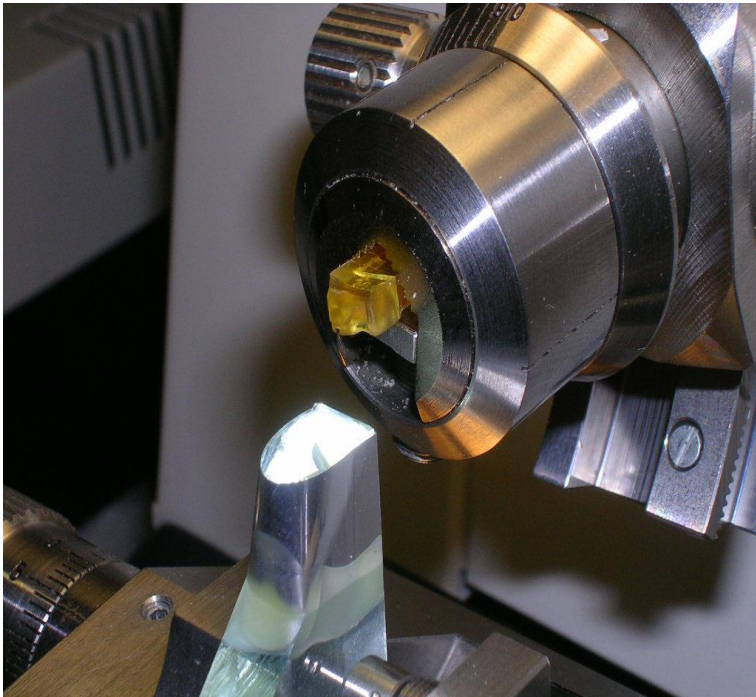




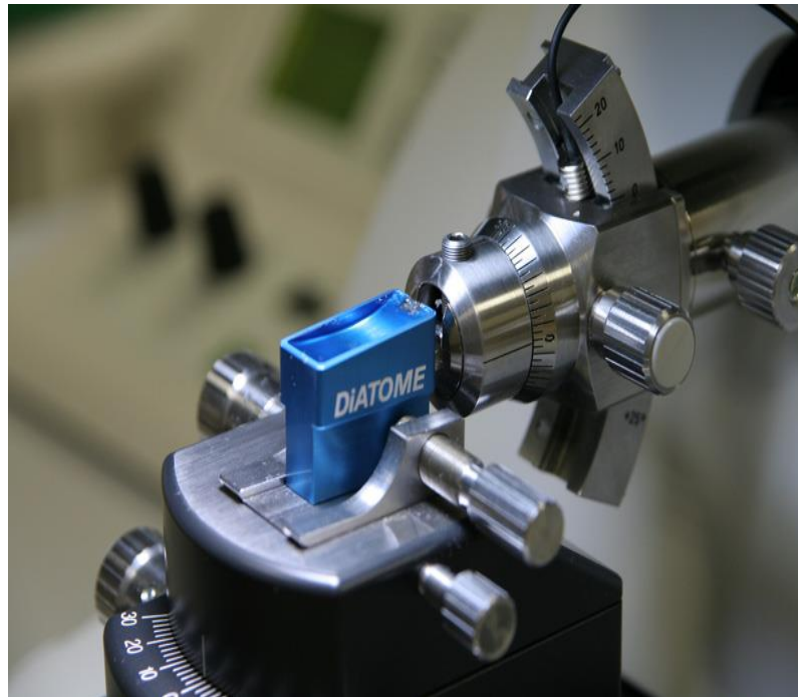
Ultramikrotomové nože:



skleněný

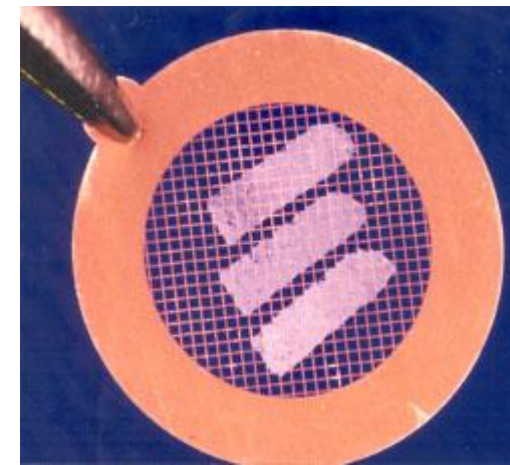
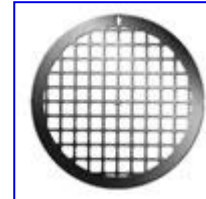
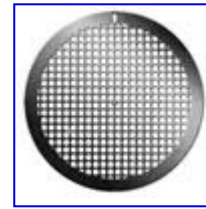
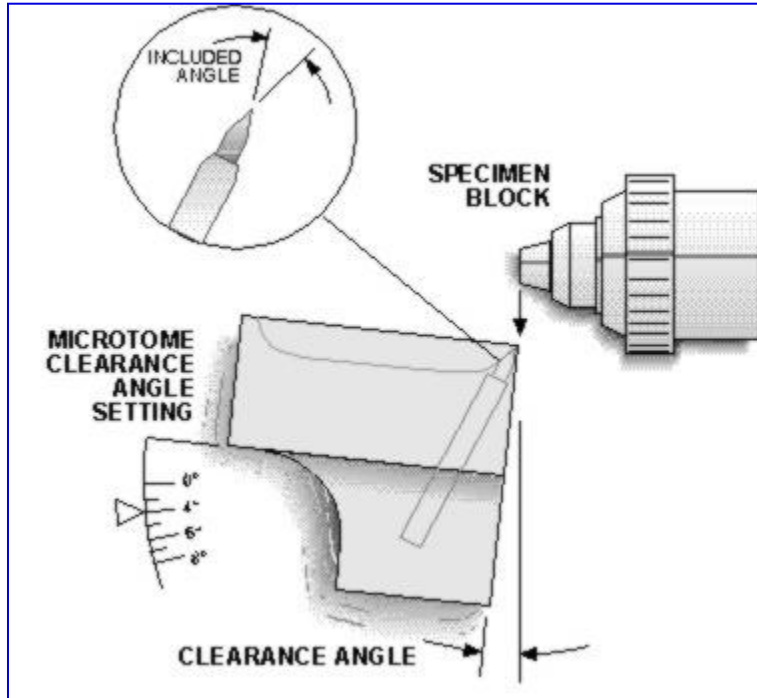


diamantový



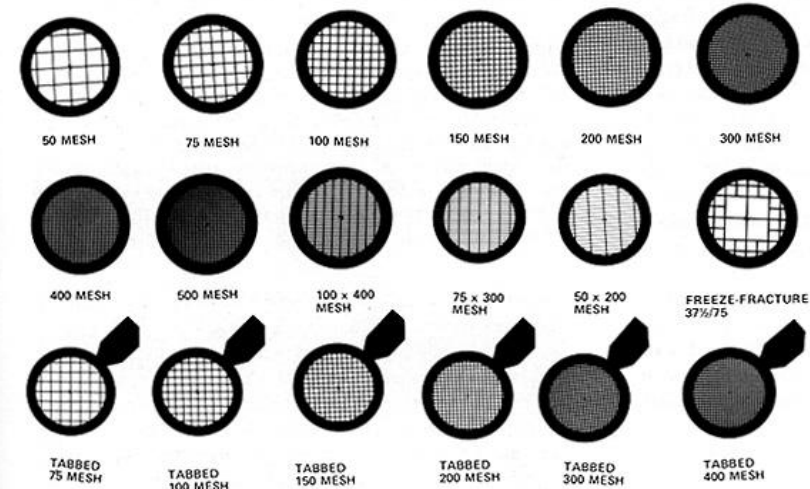
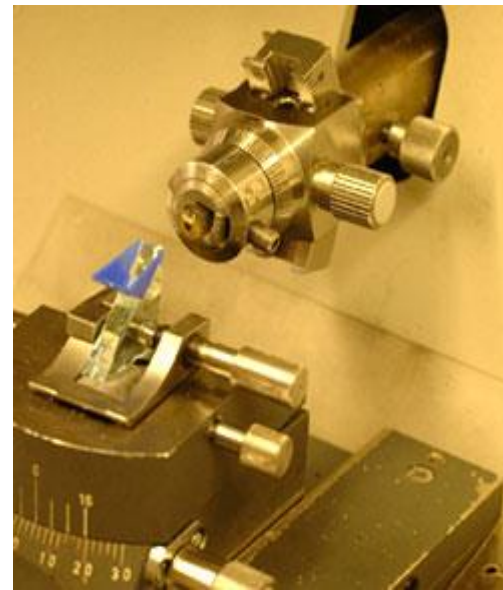
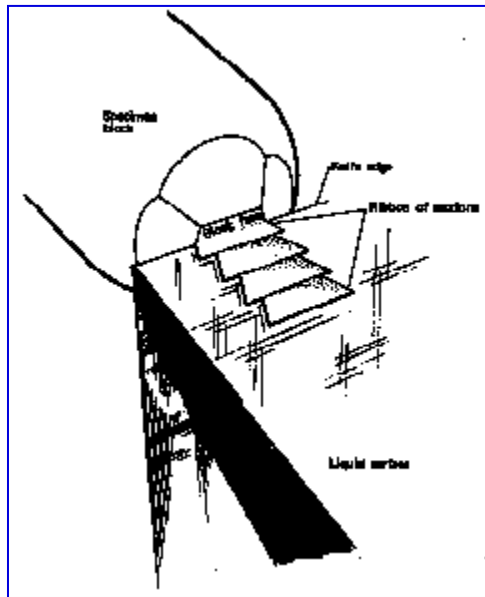
**MUNI
MED**

Krájení, nosné sítě



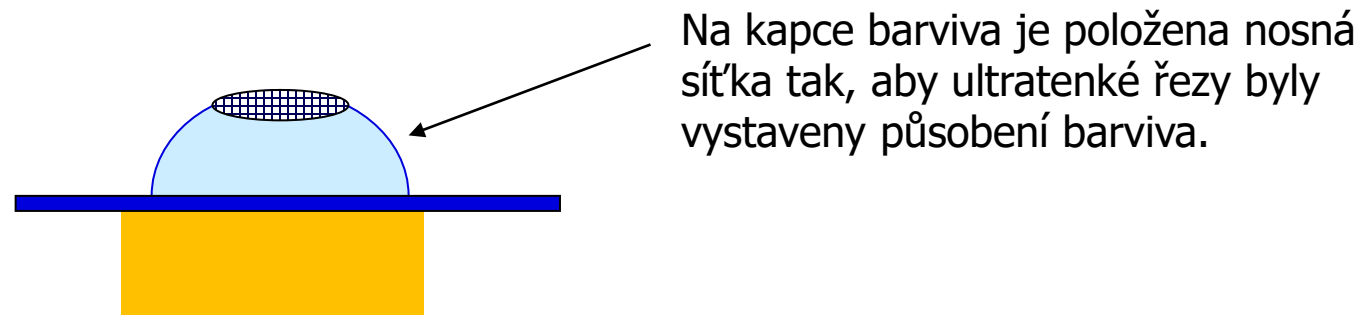
Sítka se 3 páskami řezů

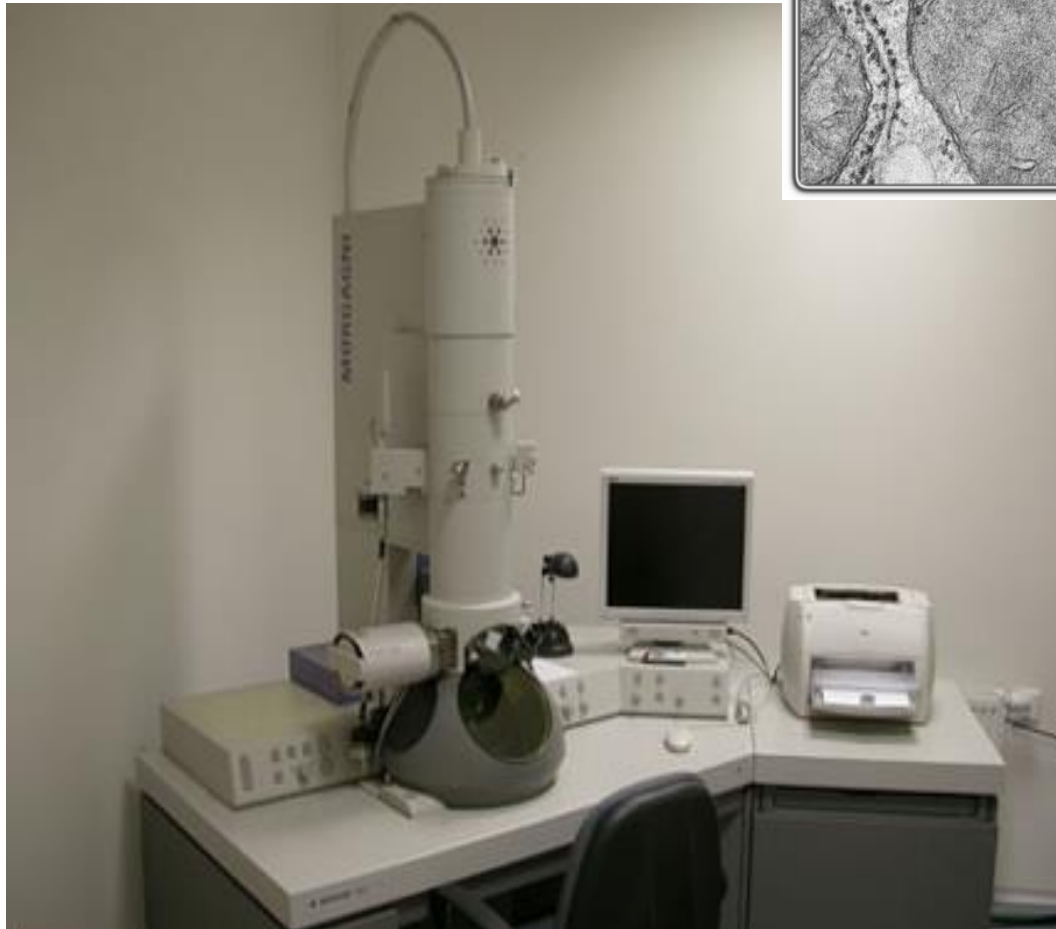
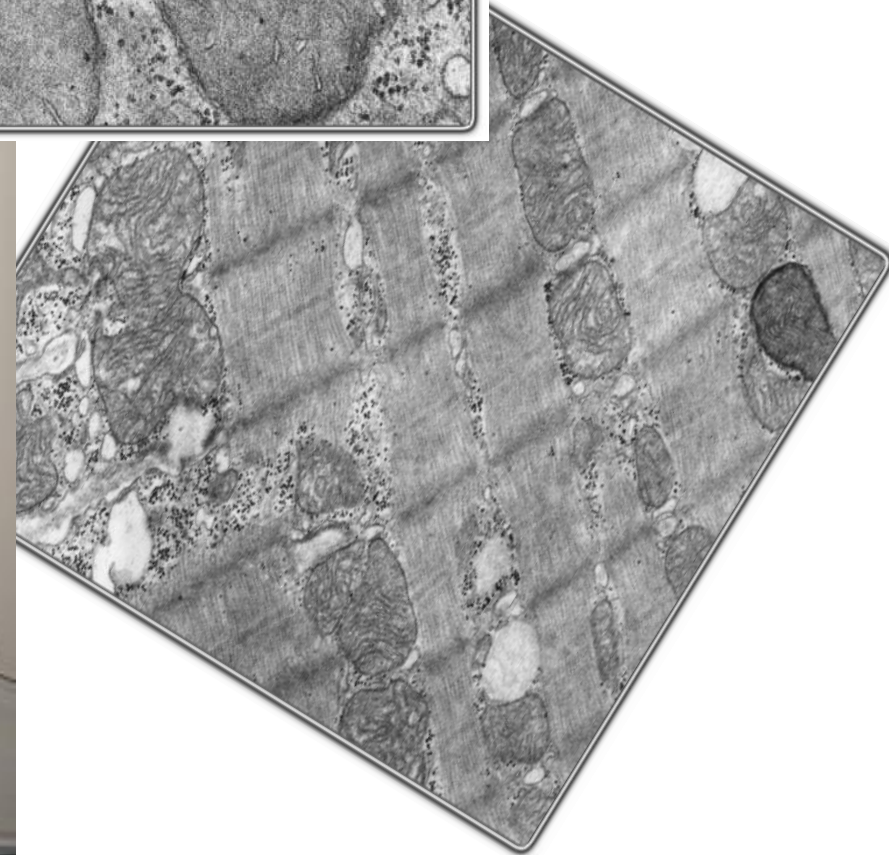
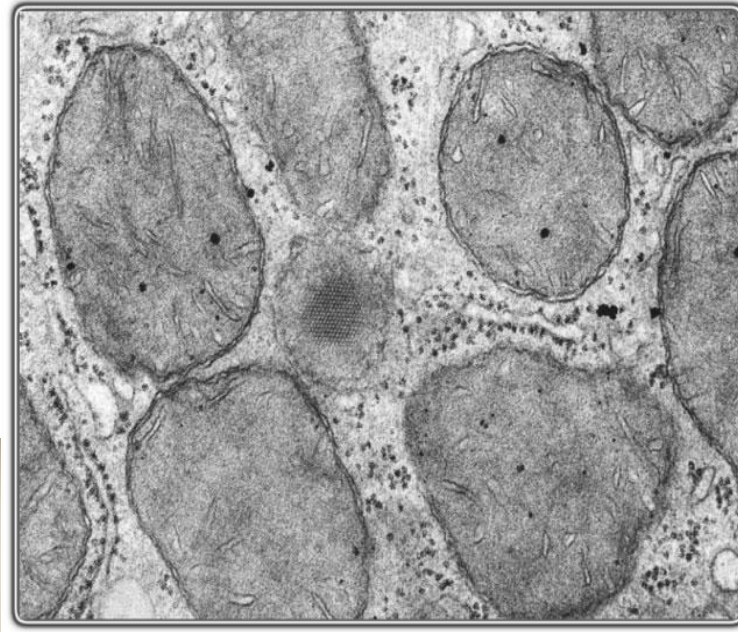
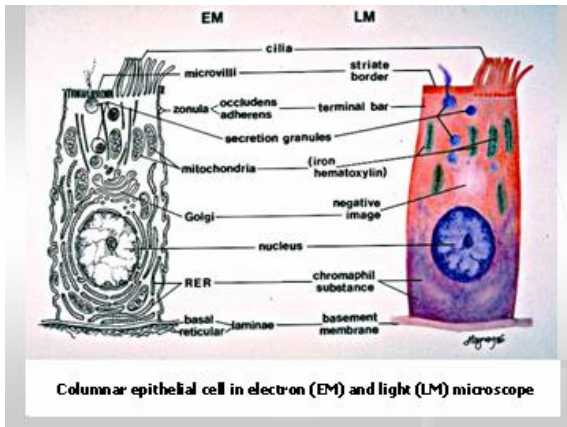
typy sítěk



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		
	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

M U N I
M E D

Otázky?