



# Praktikum z histologie a embryologie

- Pondělí 12:00- 14:30
- RNDr. Petr Vaňhara, PhD (12)
- MUDr. Veronika Jurtíková (8)
- MUC. Nikola Kosová (11)

# Program 1. praktika

- **obecné informace**  
(organizace praktik)
- **histologie a embryologie** (co je  
předmětem studia)
- **zpracování tkání – text**  
(laboratorní metody)
- **zpracování tkání – videozáznam**
- **demonstrace histologických preparátů**  
(barvení různými metodami)

# Organizace praktik

- Začátek - **12:00**
- Přezouvání vstup  
do mikroskopického sálu pouze v přezůvkách nebo návlecích
- Šatna – odložit svršky a zavazadla (zajistit doklady, cennosti, mobil - ztráty a nálezy – info 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 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**
- Student musí být připraven na praktikum
- Rozvrh a sylaby (programy) přednášek a praktických cvičení – viz nástěnka a webové stránky ústavu
- Přestávka – 10 minut
- Nahrazování praktik
  - absenci je třeba nahradit v nejbližším praktiku (viz rozvrh):
  - nahrazování oznámit vedoucímu paralely (kdo má výklad)
  - zapsat se do sešitu (před nebo po výkladu)
  - na konci praktika předložit vedoucímu paralely protokol k podpisu

- **Zápočet**

- 100% účast v praktických cvičeních
- získání 180 bodů při zkoušení znalostí (3x během semestru),  
rámcové hodnocení: **100, 60, 25 a 0** bodů – zkouší se i znalost  
tématu aktuálního praktika !

- **Pomůcky (vlastní)**

- sešit nebo volné papíry – formát A4, bez linek
- měkká tužka, pastelky

- **Konec praktika**

**14:30** – vyhlásí vedoucí cvičení

# DOPORUČENÁ LITERATURA

MASARYKOVA UNIVERZITA  
Lékařská fakulta

MASARYKOVA UNIVERZITA  
Lékařská fakulta

MASARYKOVA UNIVERZITA  
Lékařská fakulta

## MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE

Drahomír Horký, Svatopluk Čech



BRNO 2011

## PŘEHLED OBECNÉ HISTOLOGIE

Svatopluk Čech, Drahomír Horký



BRNO 2011

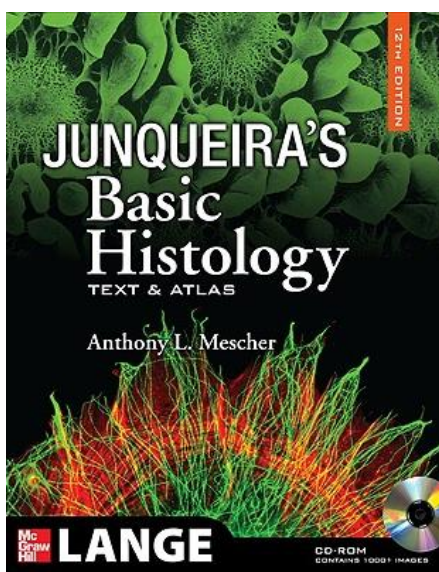
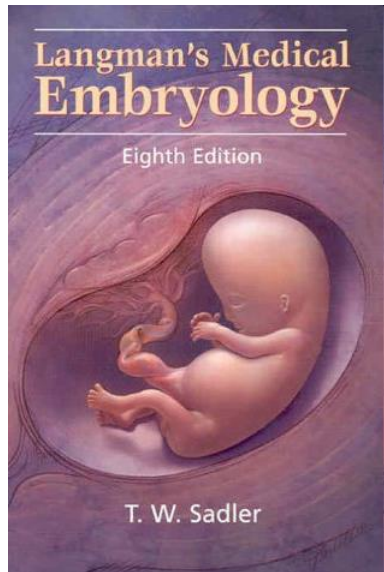
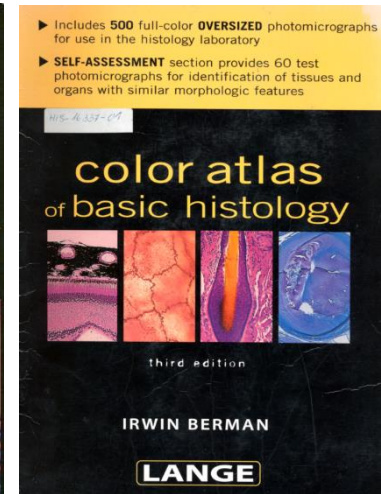
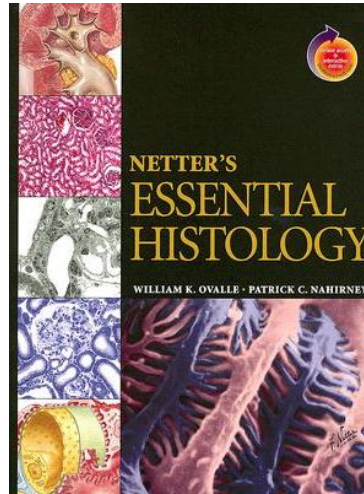
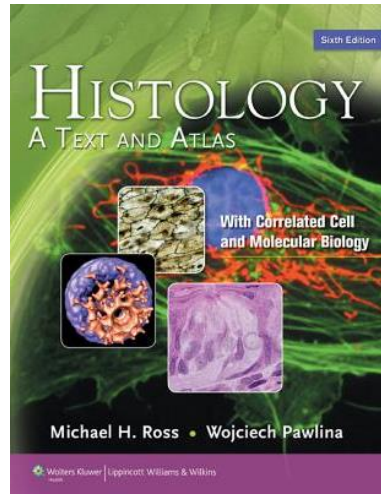
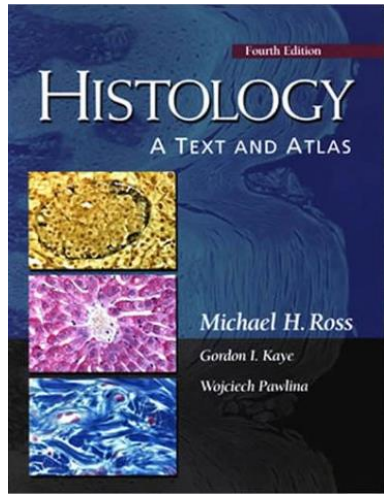
## PŘEHLED EMBRYOLOGIE ČLOVĚKA

Svatopluk Čech, Drahomír Horký, Miroslava Sedláčková



BRNO 2011

# Doporučená literatura



Ústav histologie a embryologie  
LF MU

**Mikroskopická anatomie**  
**Obecná histologie**

...

nebo

<http://www.med.muni.cz/histol/histolc.html>



# 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)
- význam histologických vyšetření v klinické praxi: onkologie a chirurgie, hematologie, patologie a soudní lékařství

# 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)

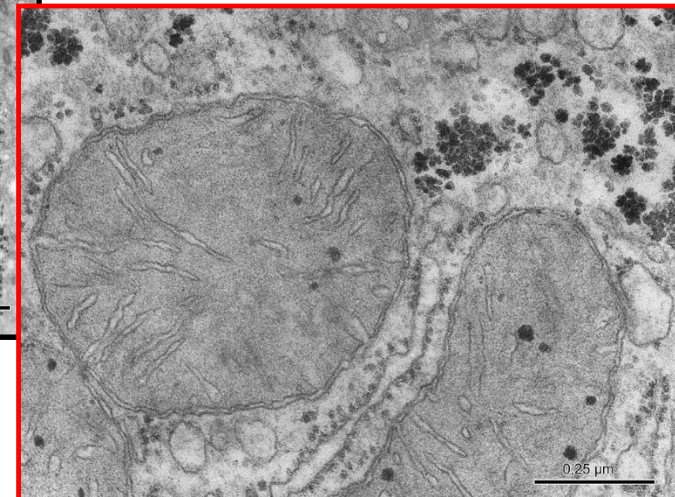
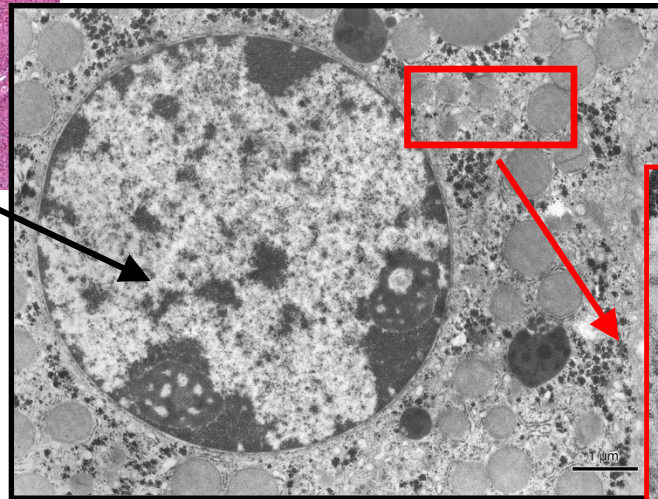
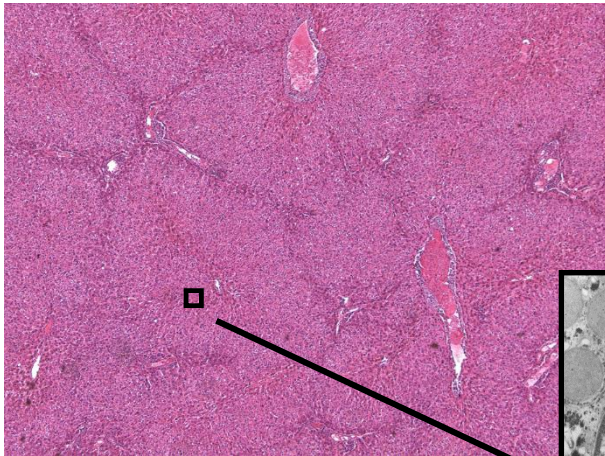
organogeneze (vývoj orgánů v jednotlivých systémech)

- **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).

- význam v klinické praxi: prenatální péče v gynekologii, porodnictví a pediatrickém lékařství, asistovaná reprodukce

# Histologie

- Rozlišovací schopnost oka –  $\sim 0,1 \text{ mm}$
- Rozlišovací schopnost SM –  $\sim 0,5 \text{ }\mu\text{m}$
- Rozlišovací schopnost EM –  $\sim 1,5 \text{ nm}$



# 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 **5 – 10 mm<sup>3</sup>**, fixace následuje bezprostředně!
- označení – 2x + průvodka

# 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.

## Fixace

- **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 (*LM*)

– 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, SUSA ( $\text{HgCl}_2$ ),  
BOUIN (kys. pikrová), CARNOY (alkohol)

Postup: fixace – při pokojové teplotě, 12 – 24 hodin, vzorek musí být přelit 20 – 50násobným množstvím fixačního činidla: ( $1 \text{ cm}^3 : 20 - 50 \text{ cm}^3$ )

# 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 – benzen nebo xylol
- **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

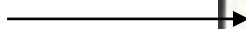
## Zalévací komůrky - **papírové**



- **kovové** s orientačními plastovými prstenci

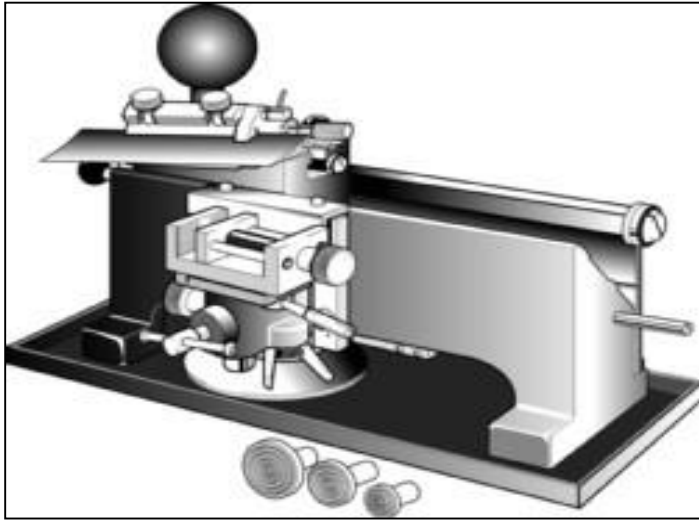


výsledek zalití

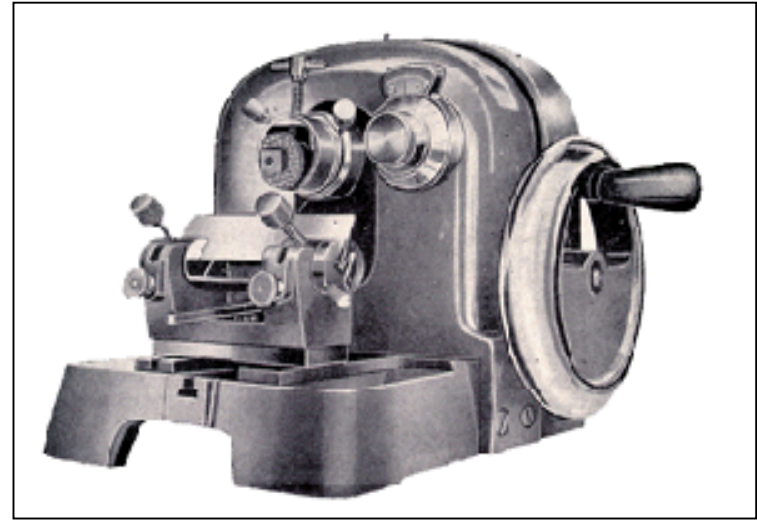


# KRÁJENÍ

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

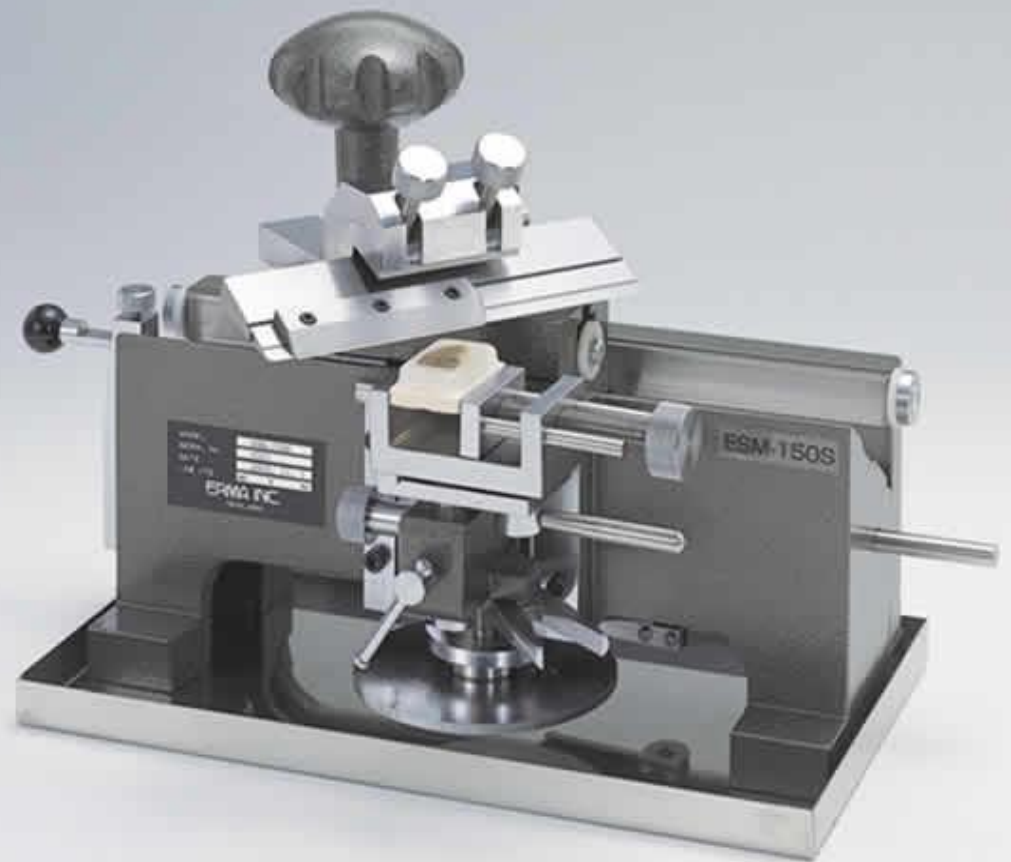


Sáňový mikrotom – blok je upevněný v držáku, nůž nebo břitva se pohybuje horizontálně



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

# Sáňový mikrotom



# Rotační mikrotom

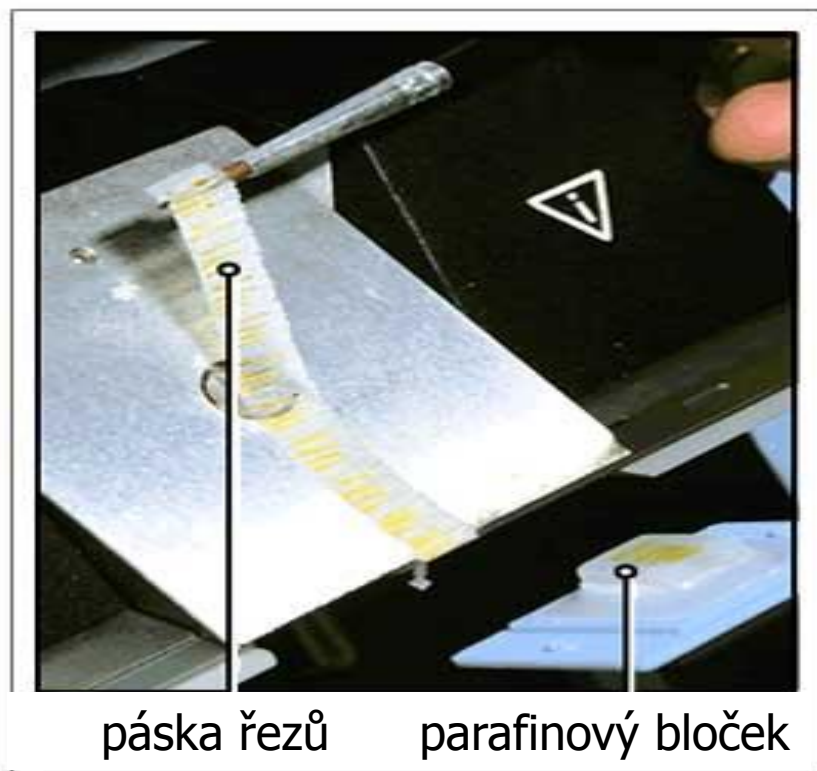




## kryostat

= rotační mikrotom v mrazicím boxu ( $-60^{\circ}\text{C}$ );

zmrzlou tkáň lze krájet bez zalévání



# 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).



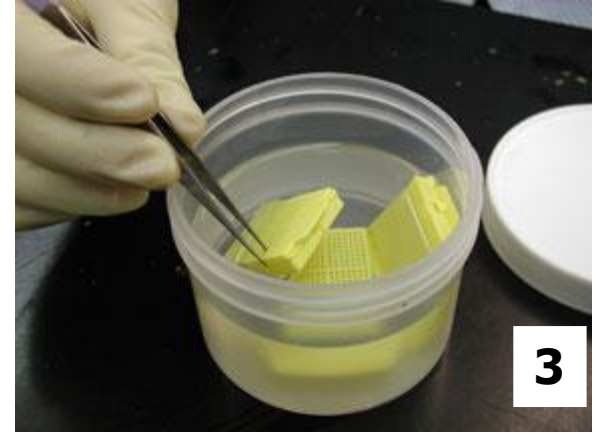
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv.  
Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylénem.



**1**



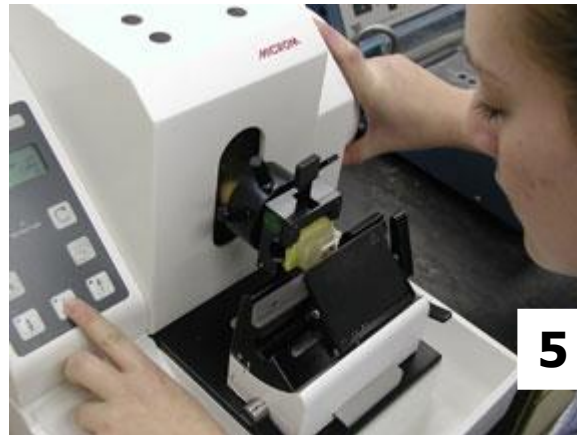
**2**



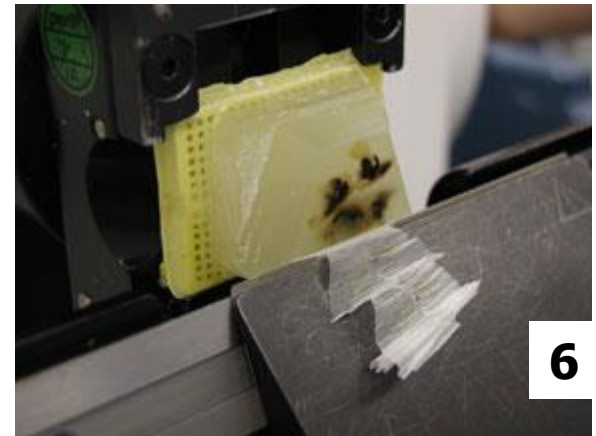
**3**



**4**



**5**



**6**



**7**



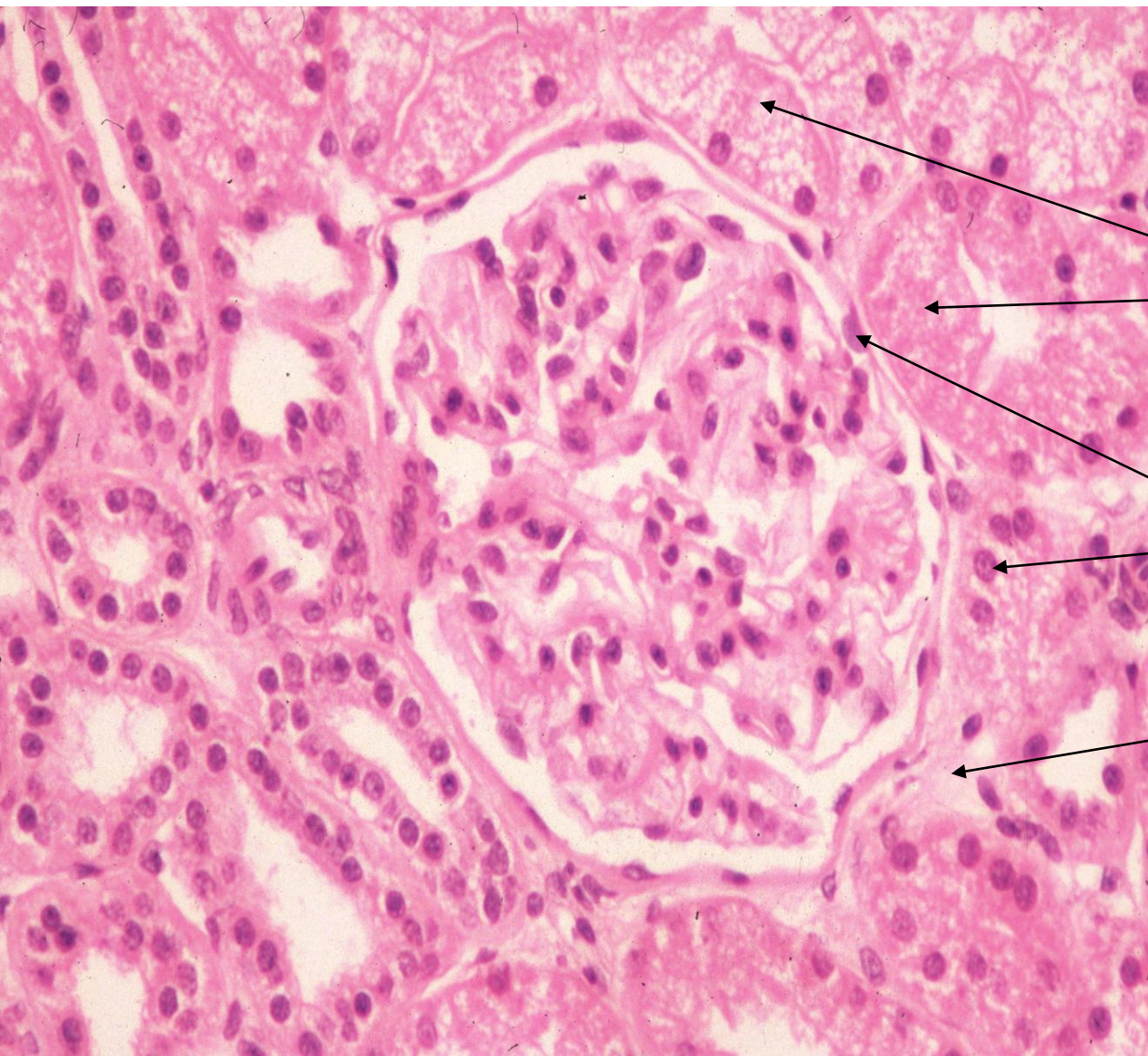
**8**

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

# 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

# Hematoxylin a eosin (HE)



cytoplazma

jádra

kolagenní vazivo

- **ORTOCHROMAZIE**- bunečné struktury sa barví stejnou barvou, jakou má barvivo (HE)
- **METACHROMAZIE**- bunečné struktury sa barví jinou barvou, jakou má barvivo

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

# HEMATOXYLIN – EOSIN (HE)

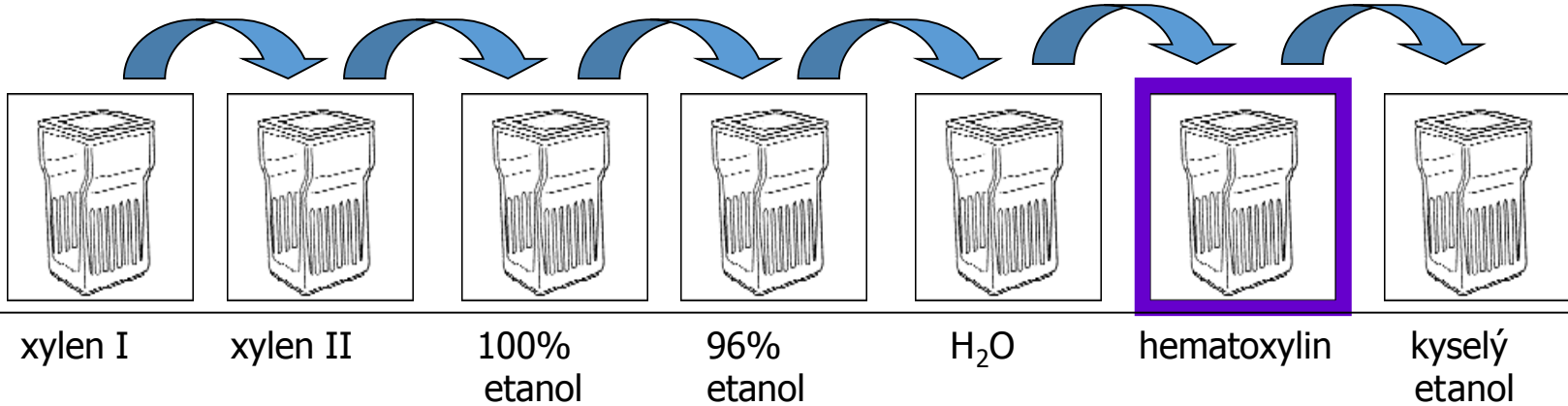
deparafinace

rehydratace

praní

barvení

diferenciace



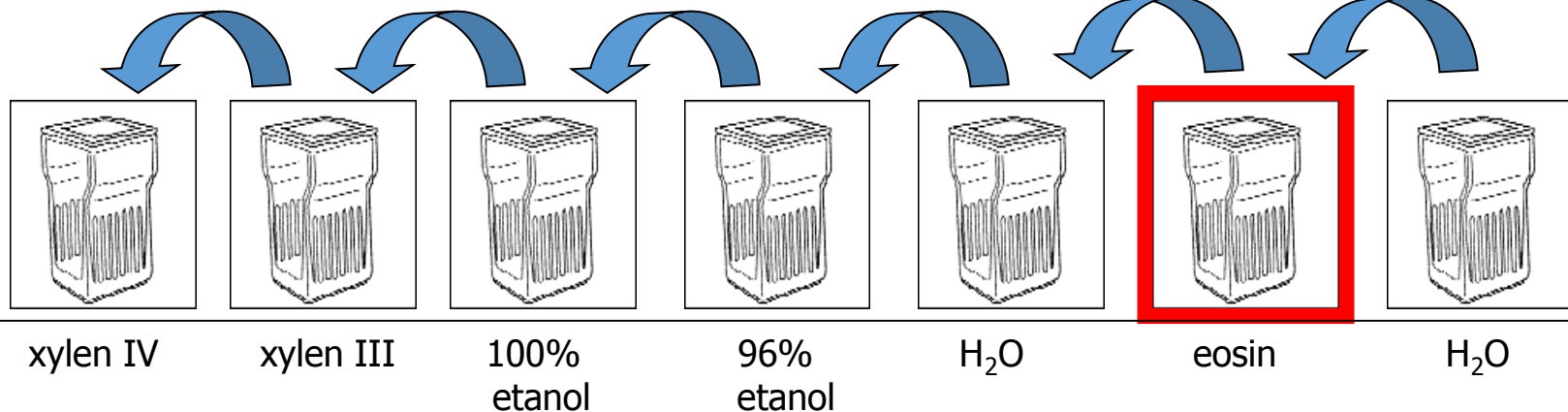
projasnění

dehydratace

praní

barvení

praní



# RUTINNÍ BARVENÍ: HEMATOXYLIN EOSIN (HE)

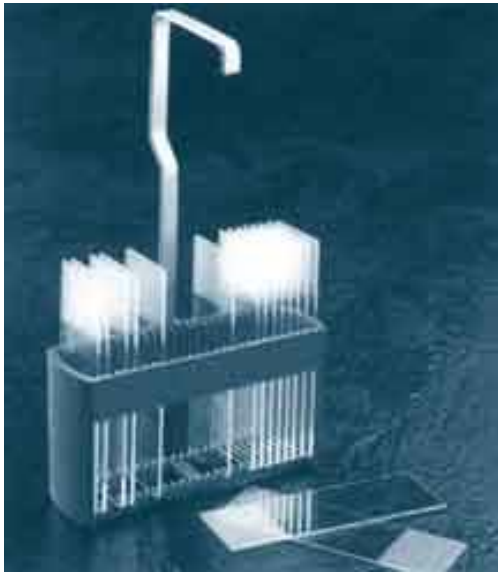
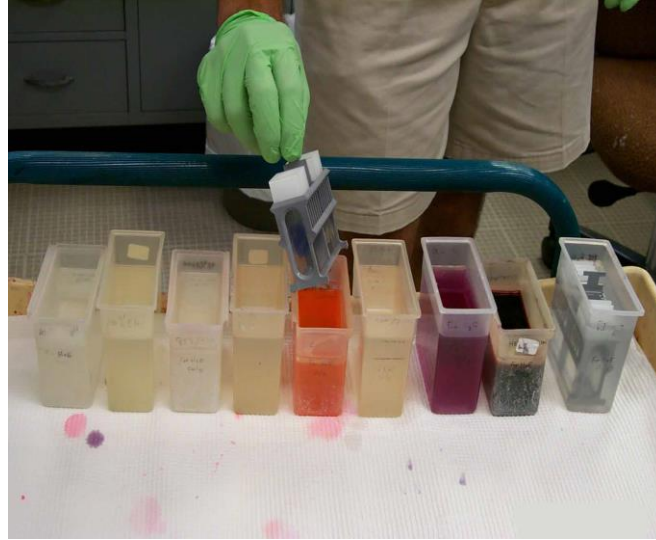
Hematoxylin – zásaditý

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







řada boxů (kyvet) s barvicími médii

≈

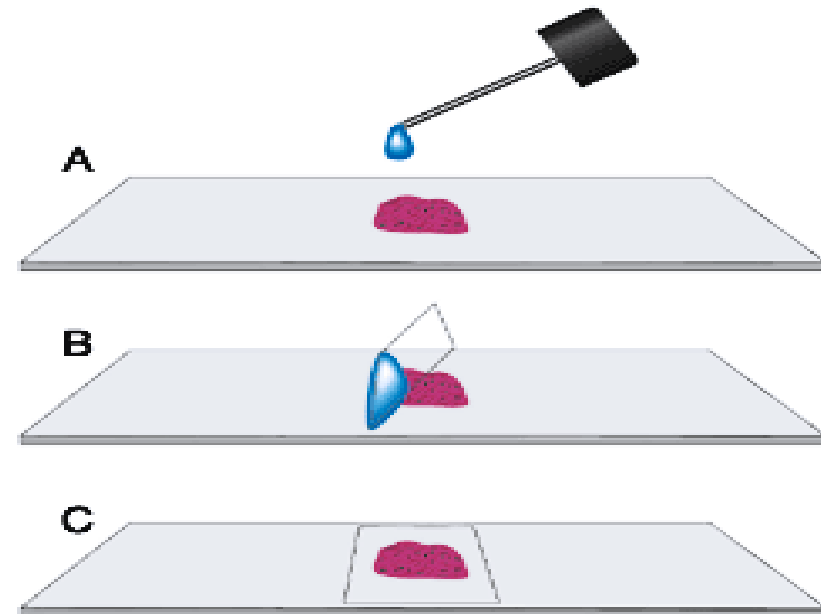
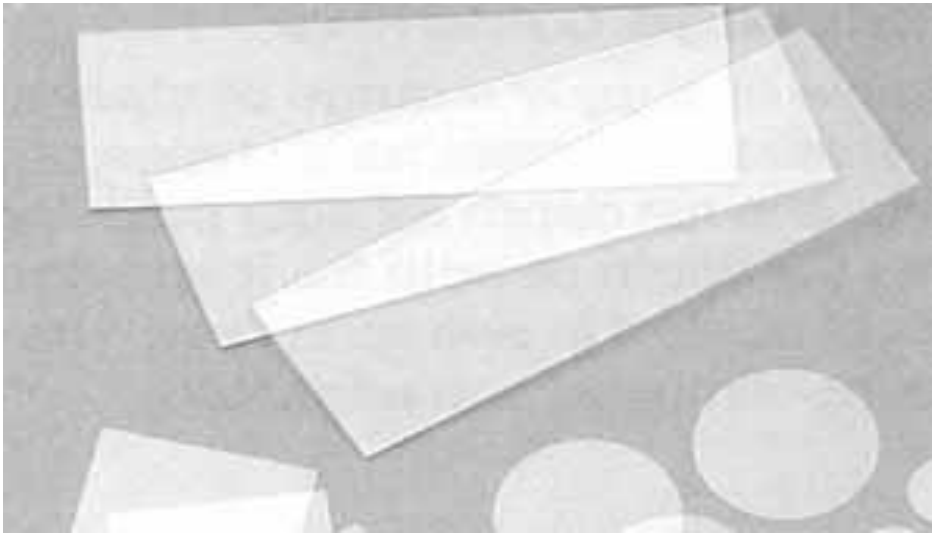


- **Leica ST 4040** Lineární barvicí automat je určen pro velkokapacitní barvení vzorků jedním programem (např. H&E až 1000 skel). Modulární systém poskytuje uživateli vysokou flexibilitu a tím i zefektivnění práce v laboratoři. Při nečinnosti přístroje je možné jednotlivé stanice zakrýt víčky pro zamezení úniku výparů. Během barvicího procesu je uživatel chráněn aktivním odsáváním skrz uhlíkový filtr (lze napojit na centrální odťah v laboratoři ).



# MONTOVÁNÍ

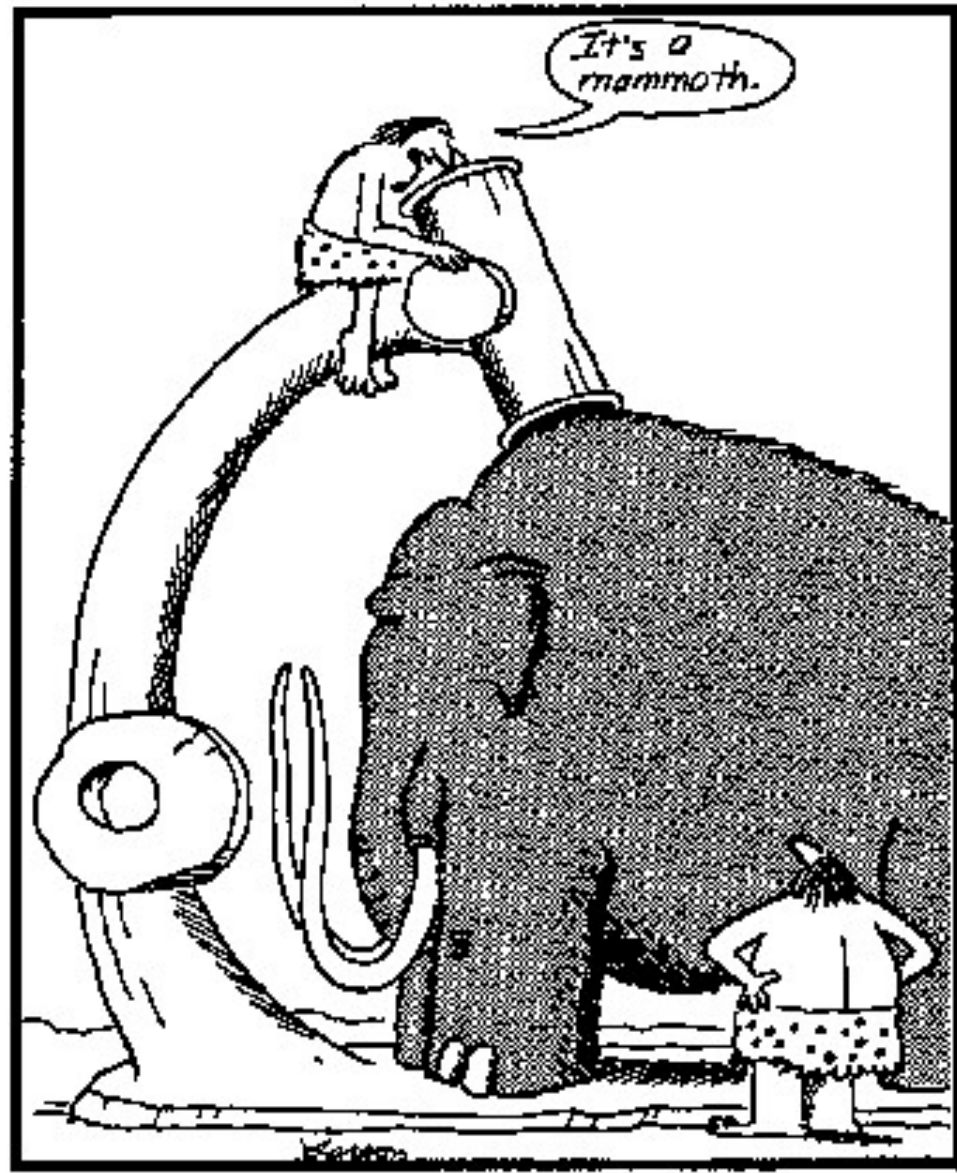
- uzavření preparátu – kapkou montovacího media a krycím sklíčkem  $\Rightarrow$  trvalý preparát



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



**trvalé histologické preparáty ke studiu v SM**



Early microscope

# 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)

# 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

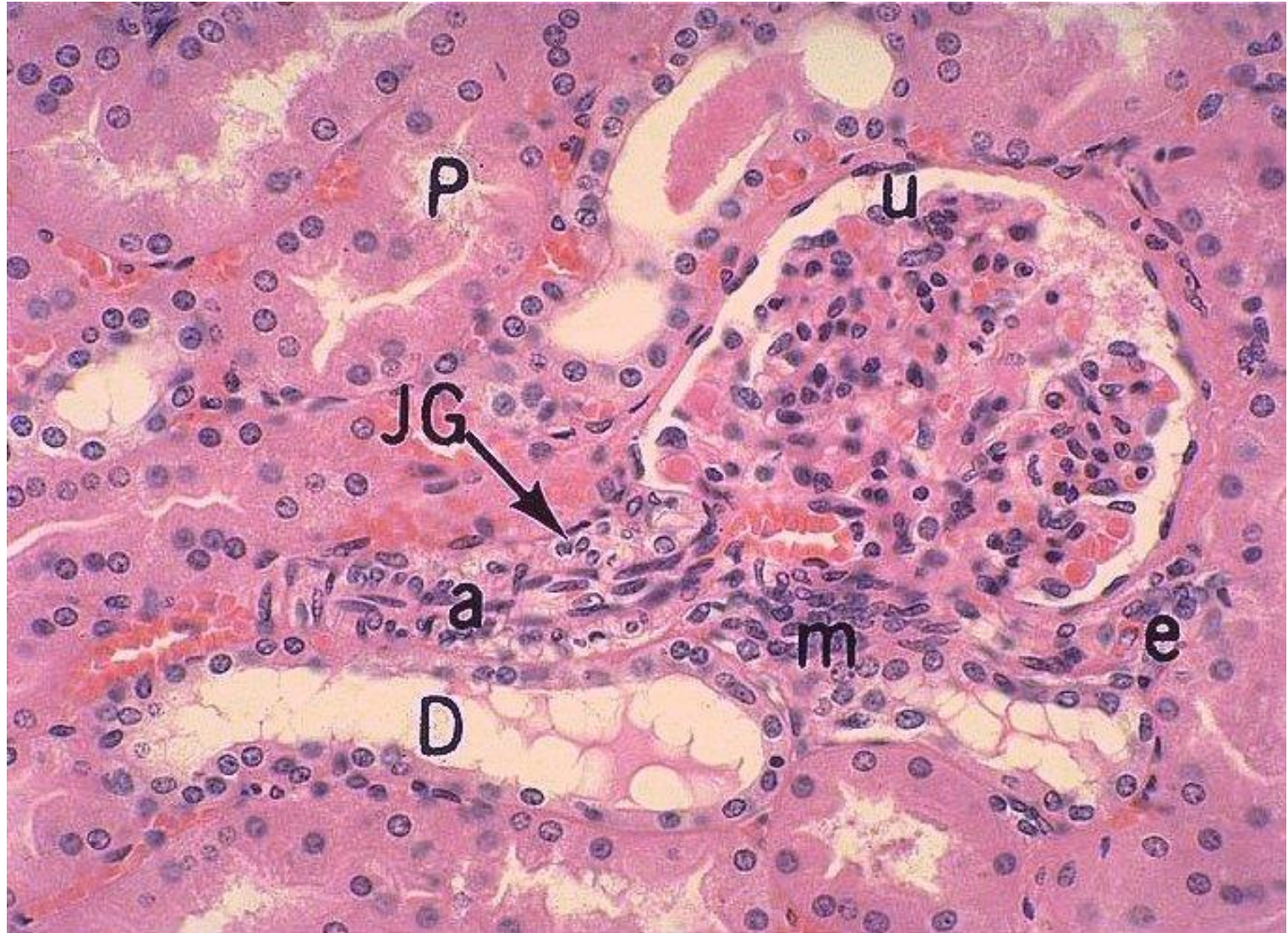
erythrocyty – oranžové

svalová tkáň – červená

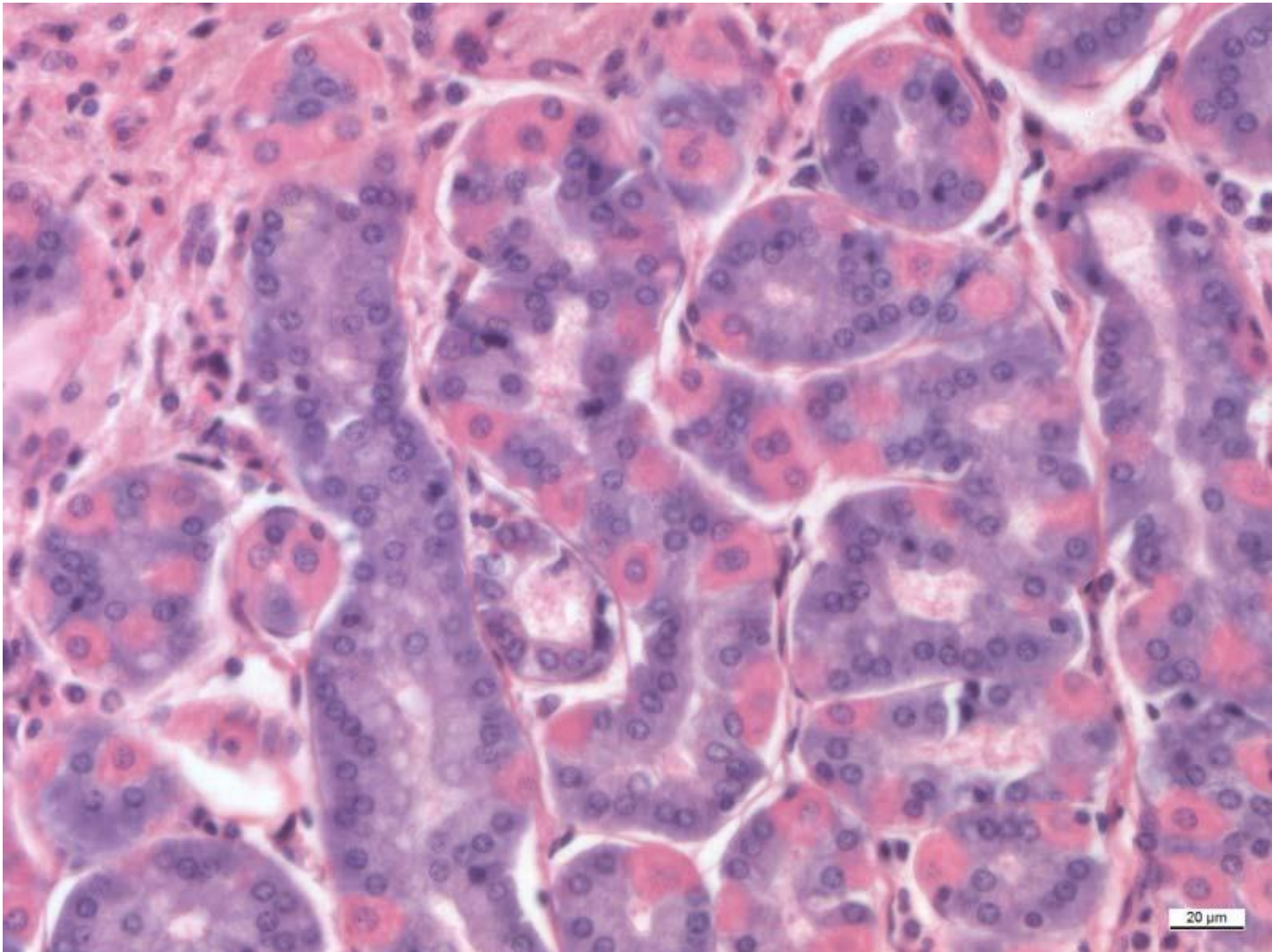
kolagenní vlákna – modrá



# Hematoxylin a eosin (HE)

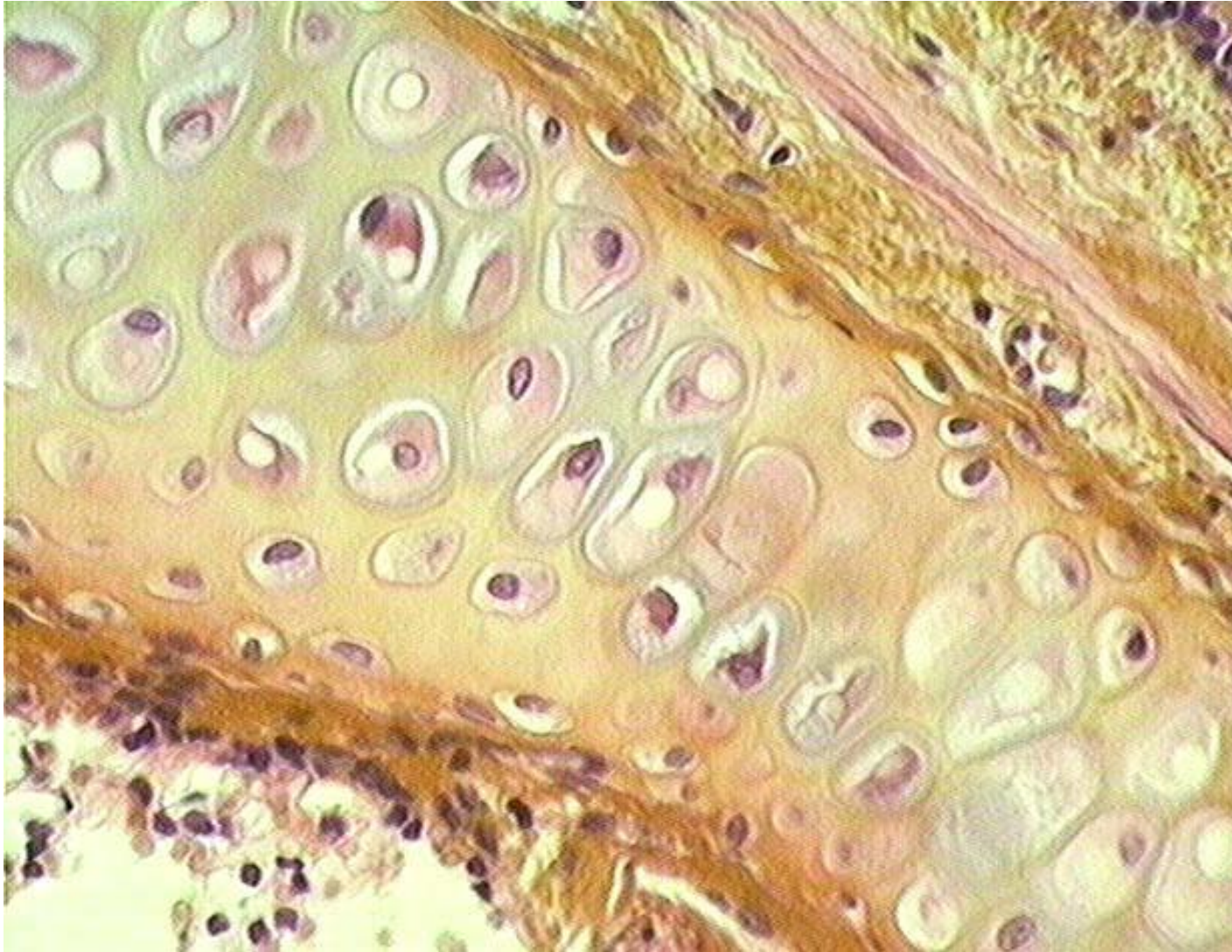


# basofilní x acidofilní cytoplazma



fundus ventriculi

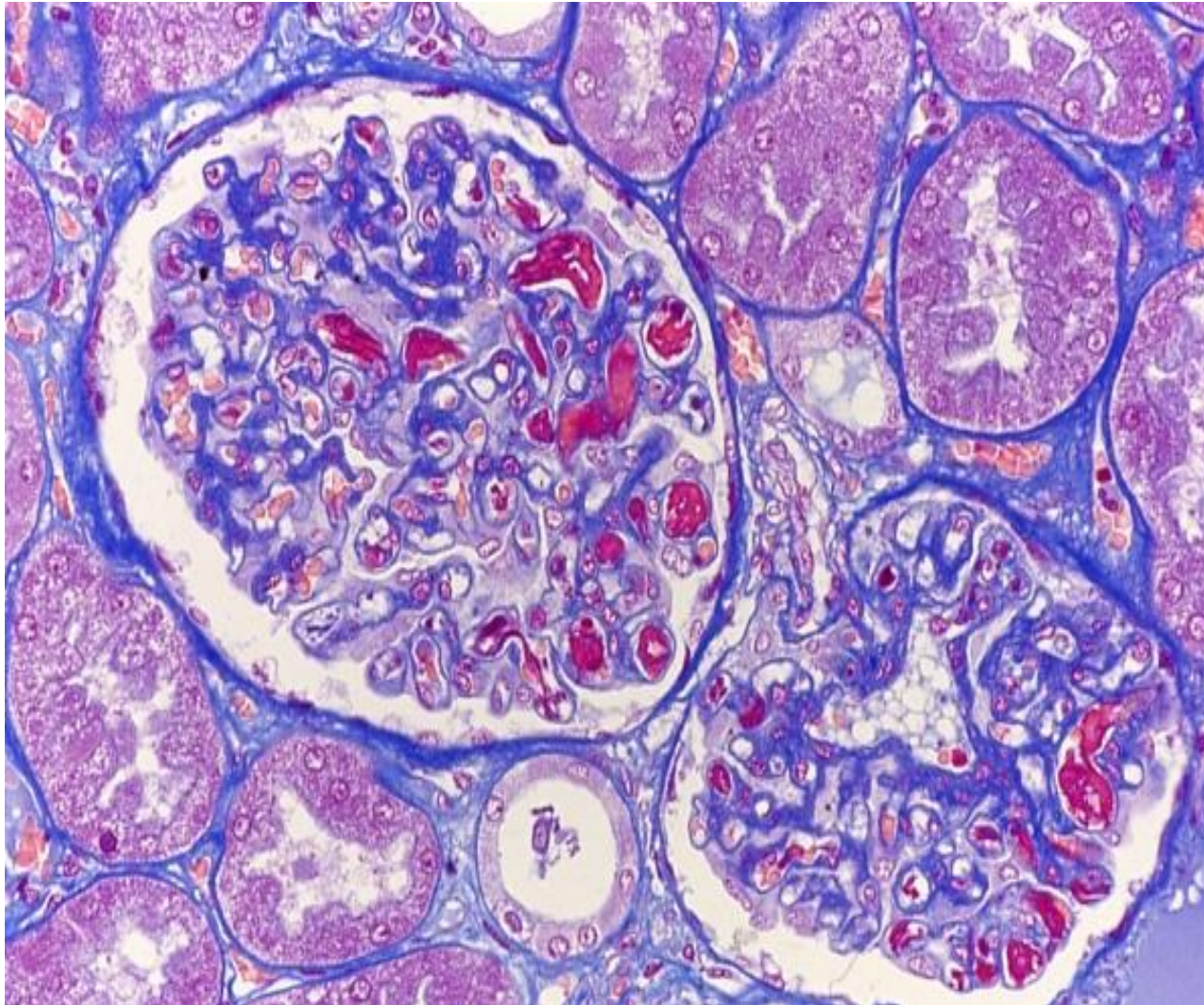
# Hematoxylin, eosin a šafrán (HEŠ)



chrupavka

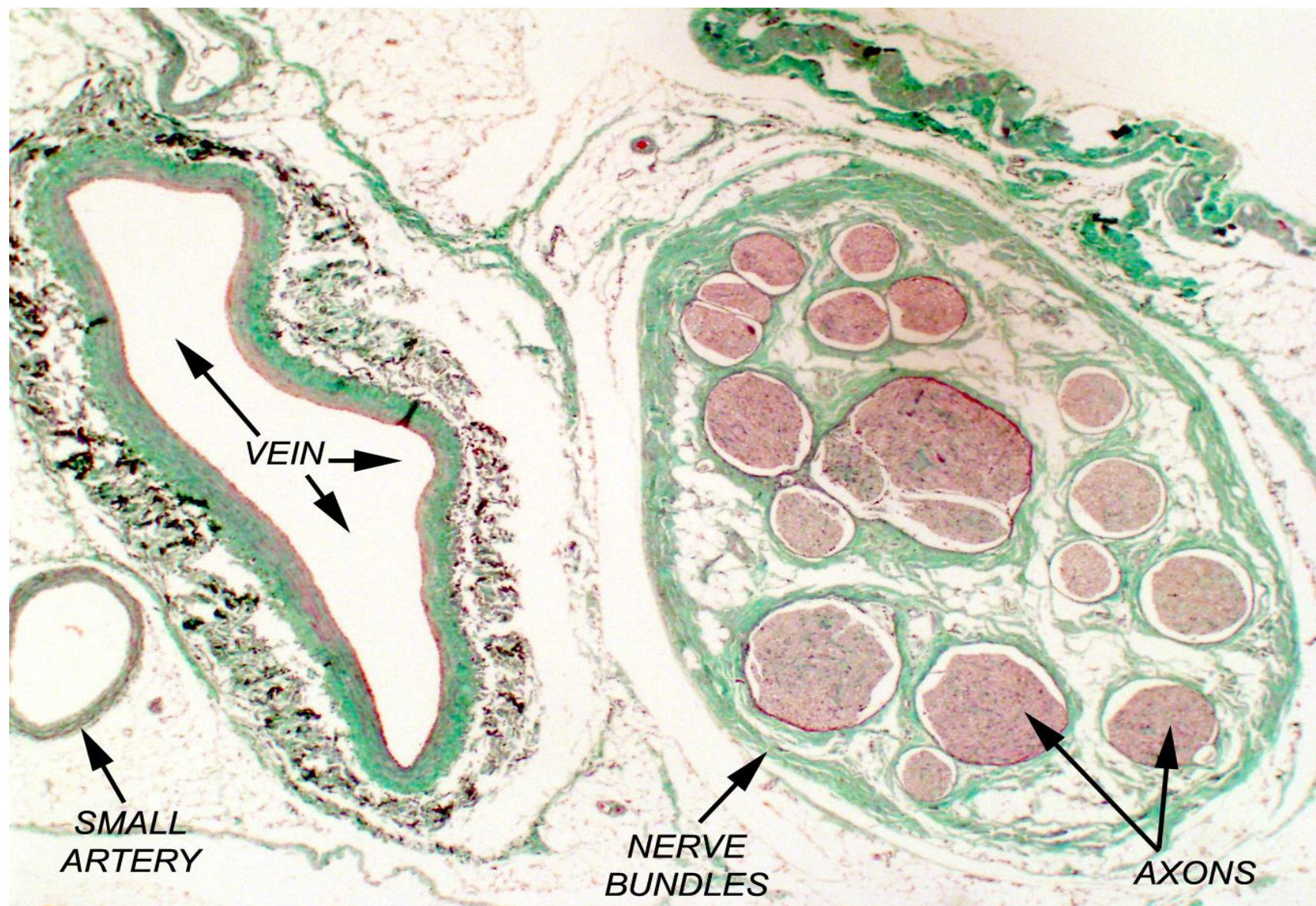
kolagenní vlákna žlutá

# Azokarmín a anilin. modř (AZAN)



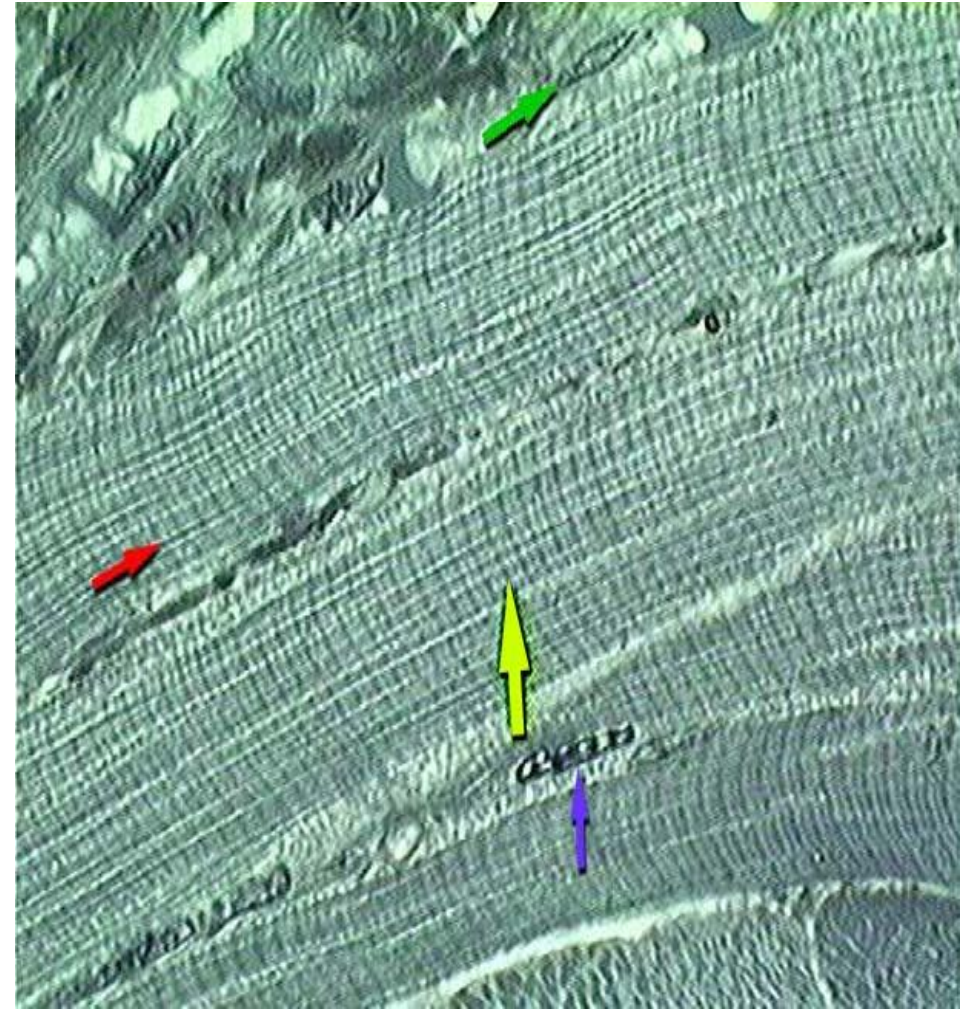
kolagenní vlákna modrá

# Zelený trichrom



kolagenní vlákna zelená

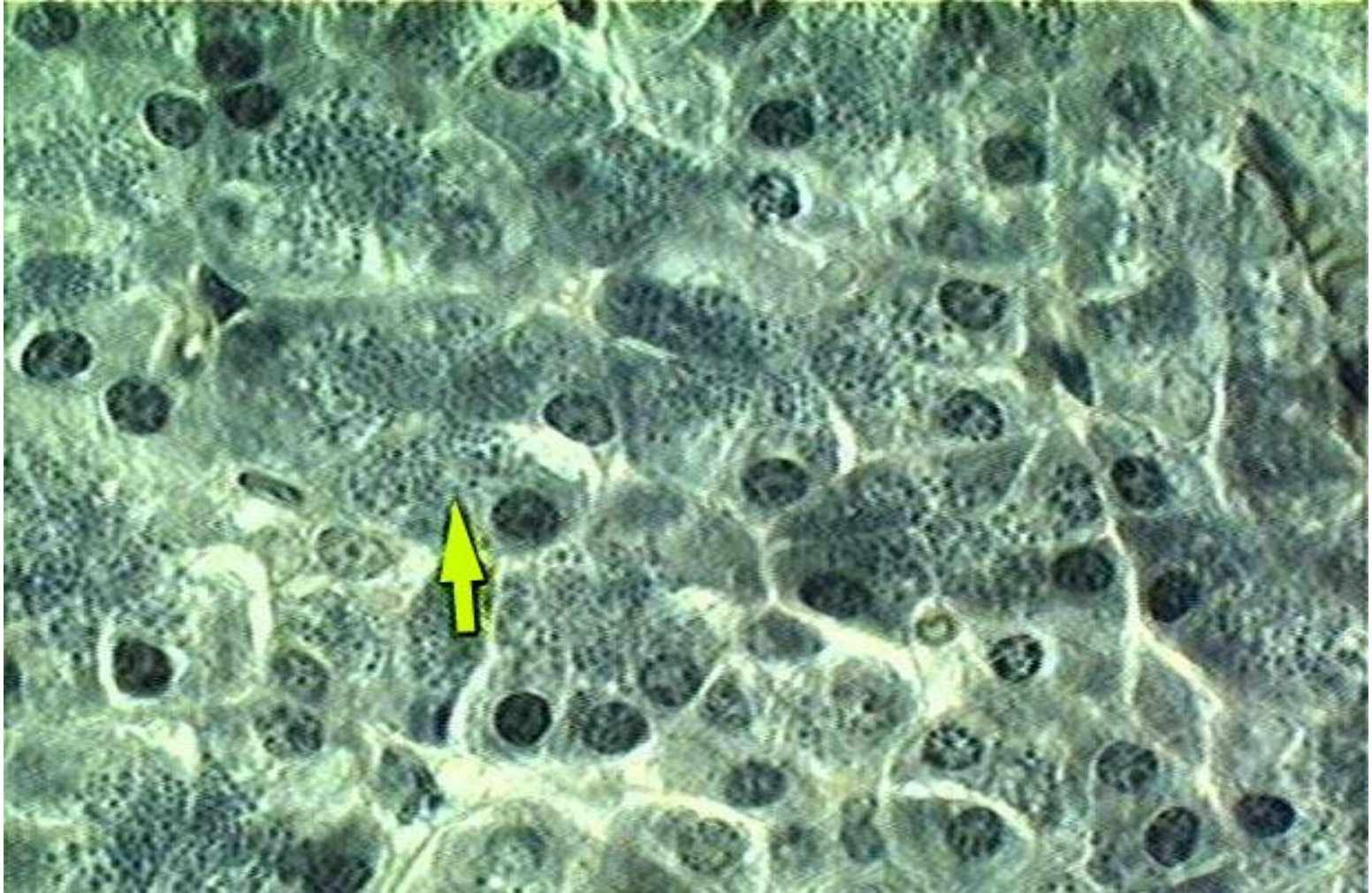
# Cytologická barvení – podle Heidenhaina



**kosterní svalová tkáň**

**železitý hematoxylin**

# Cytologická barvení – podle Heidenhaina

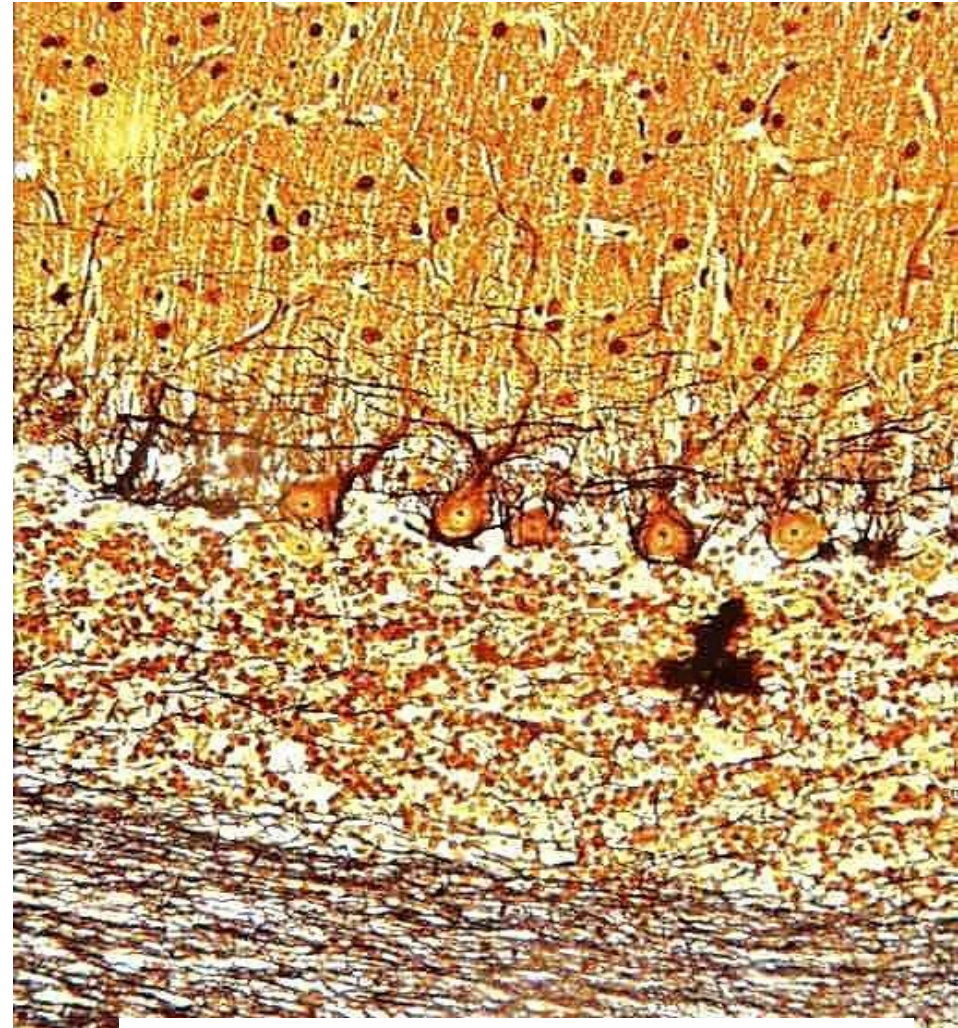


**mitochondrie v hepatocytech**

# Impregnace „stříbrem“



**slezina – retikulární vlákna**



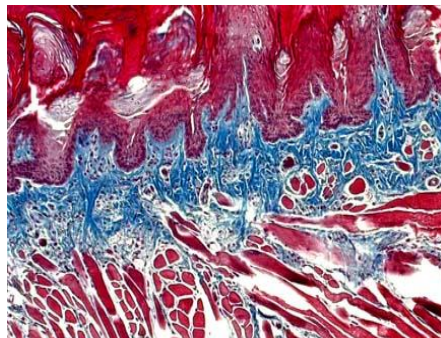
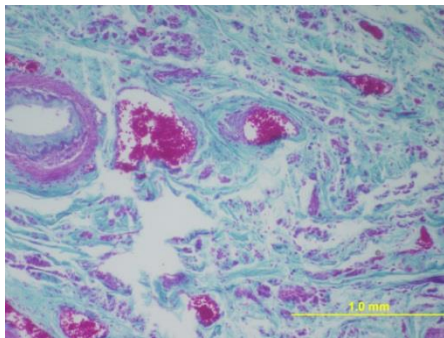
**cerebellum – nervová vlákna**



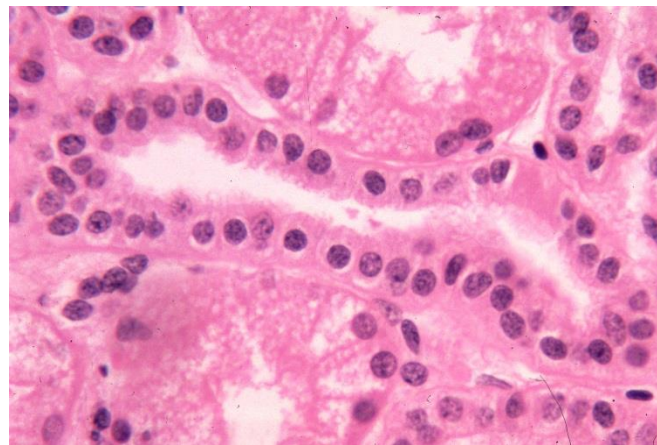
# Barvicí metody:

přehledné – HE, AZAN

demonstrují všechny složky tkání

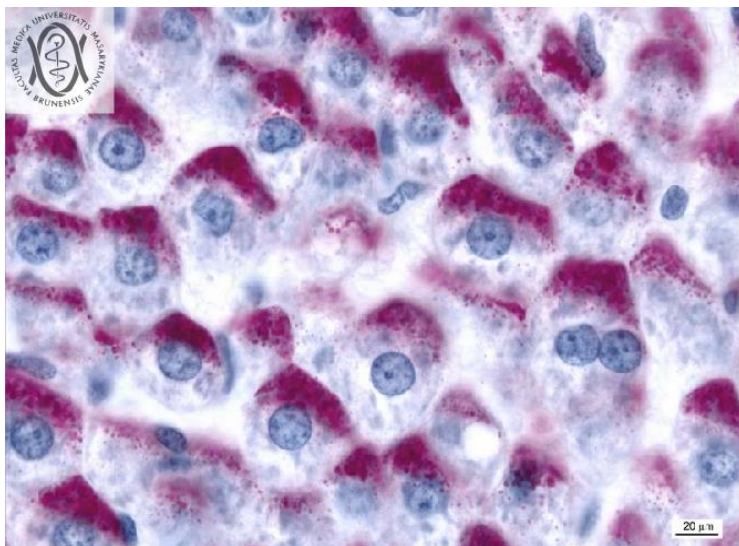


HE – nejpoužívanější barvení

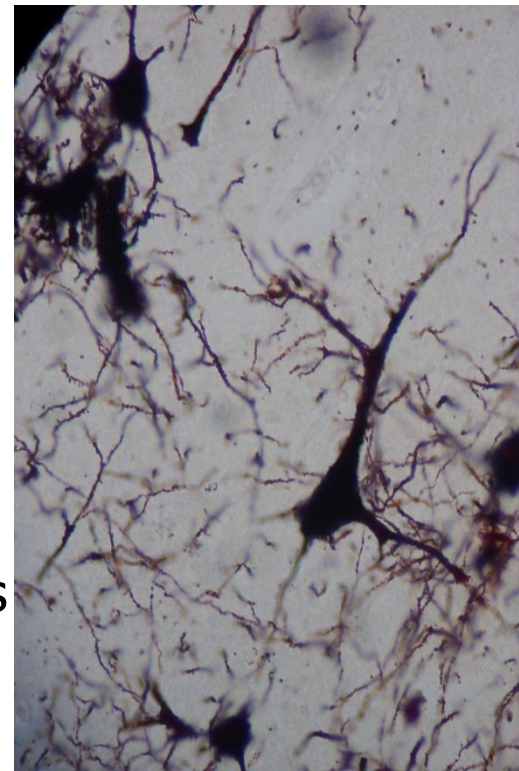


speciální

zdůrazňují určité buněčné nebo tkáňové složky



impregnační  
soli Ag, Au nebo Os



# Zpracování tvrdých tkání (zub, kost)

- dekalifikace (odvápnění) – 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

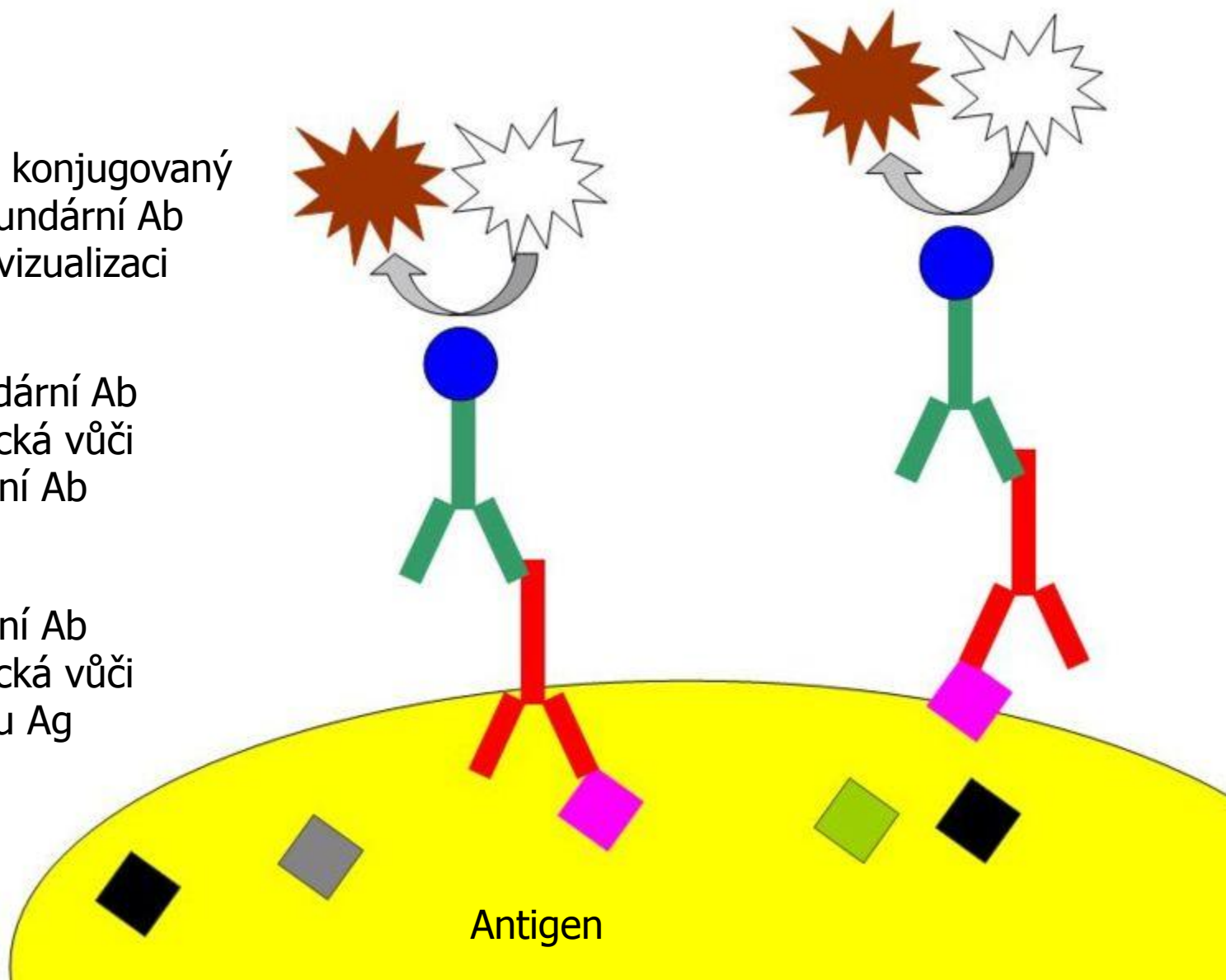
2. enzymy – křenová peroxidáza, AF, acetylcholinesteráza,

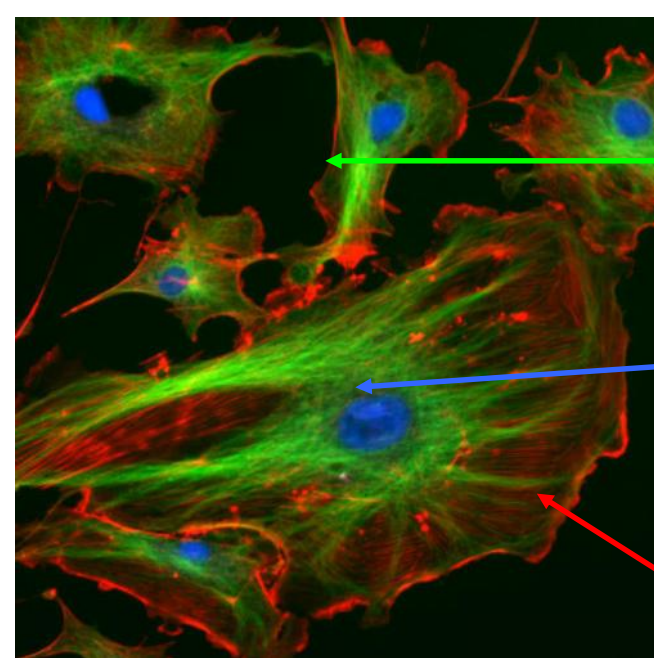
3. radioizotopy ( $I^{125}$ )

Enzym konjugovaný  
se sekundární Ab  
zajistí vizualizaci

Sekundární Ab  
specifická vůči  
primární Ab

Primární Ab  
specifická vůči  
epitopu Ag

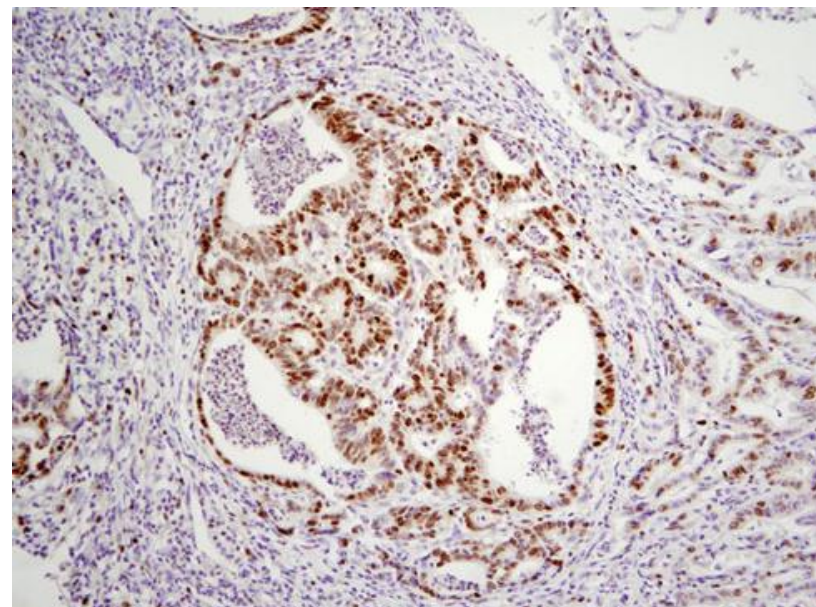
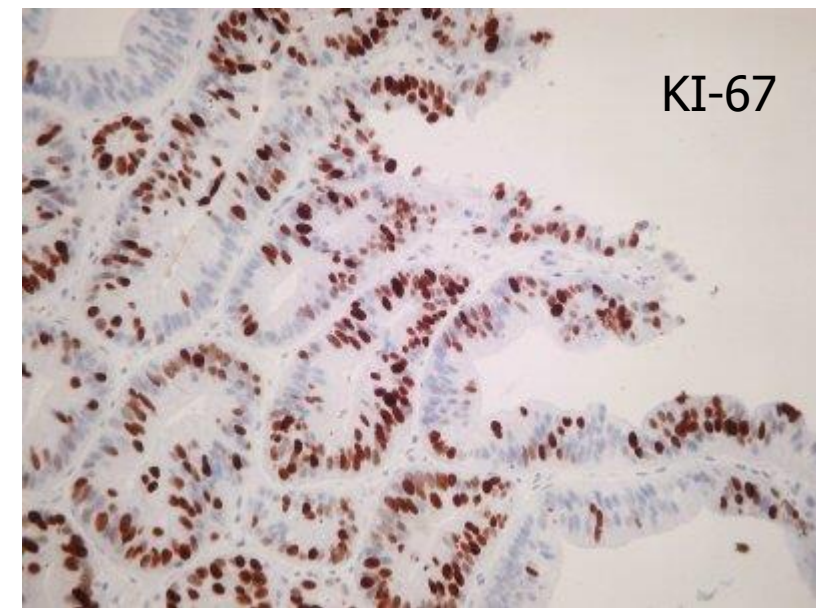
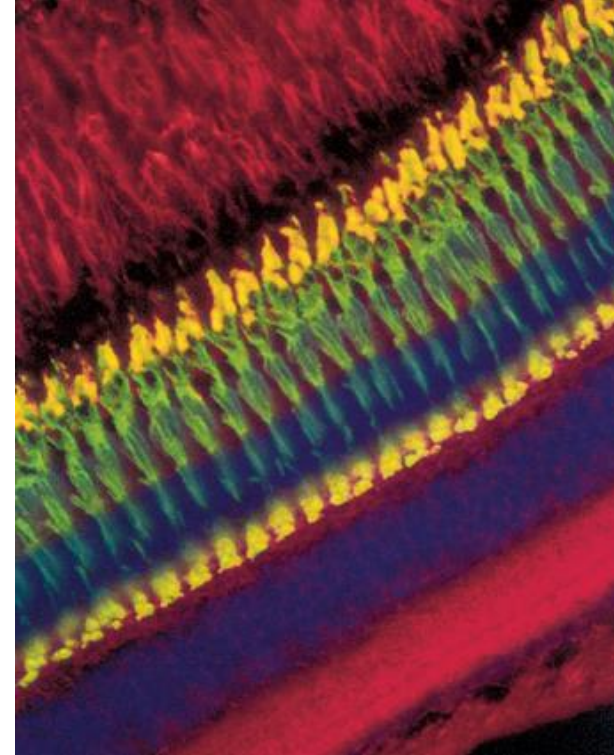




Aktin (cytoskelet)

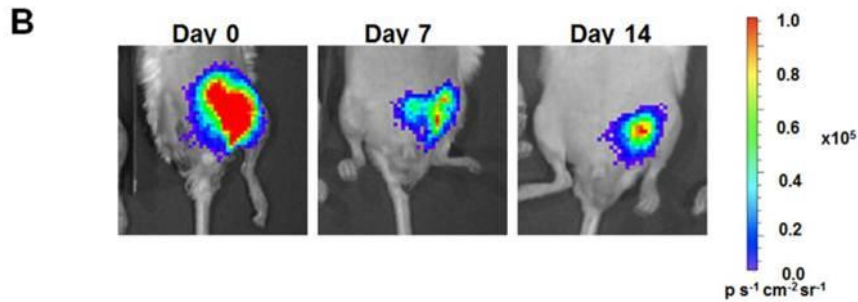
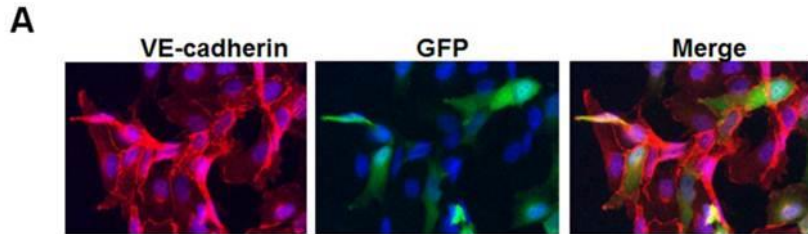
DAPI (jádno)

Mikrotubuly (cytoskelet)



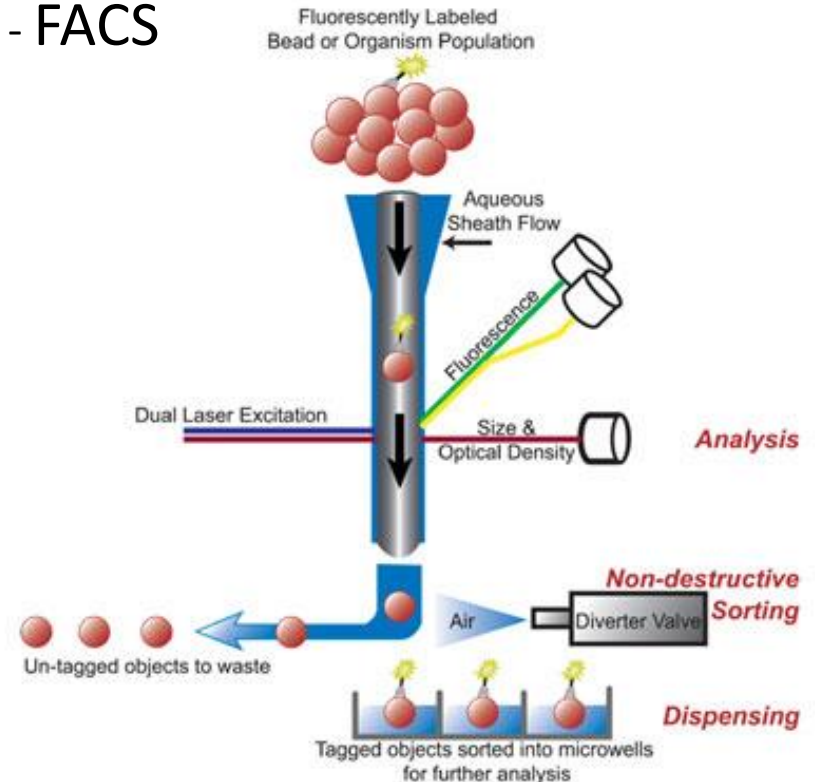
# In-vivo/live cell imaging

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

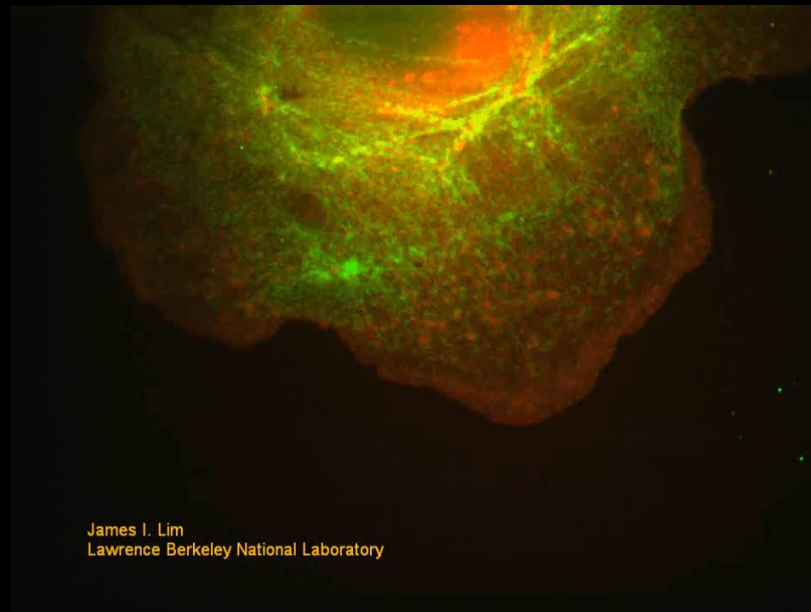
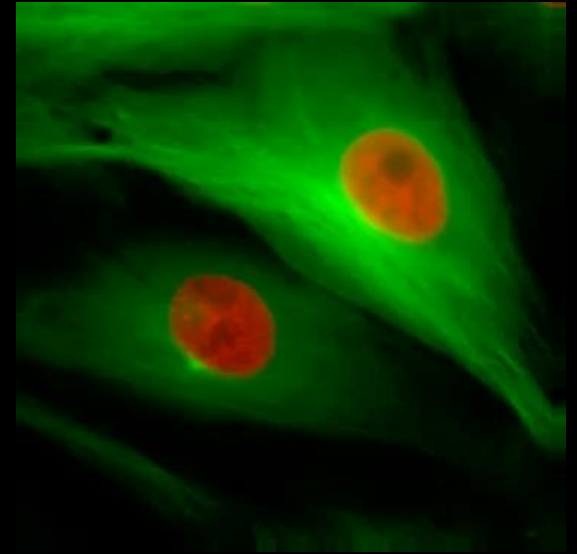
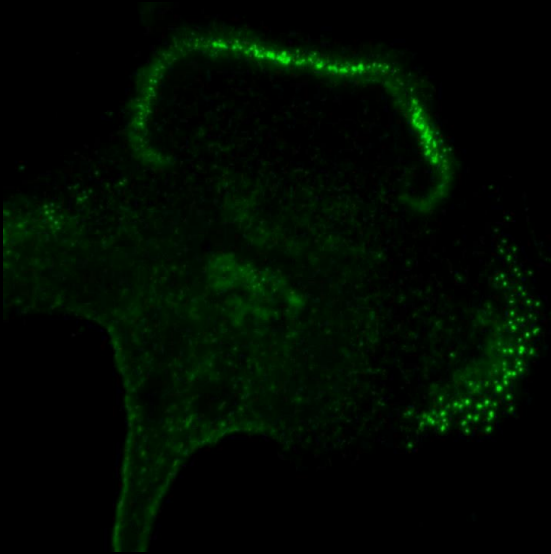


doi:10.7150/thno.3694

- FACS



## - Fluorescenčně označené proteiny



James I. Lim  
Lawrence Berkeley National Laboratory

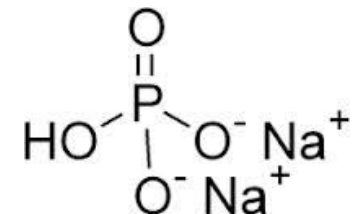
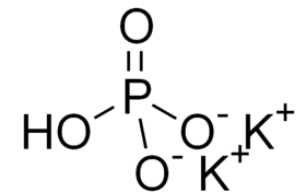
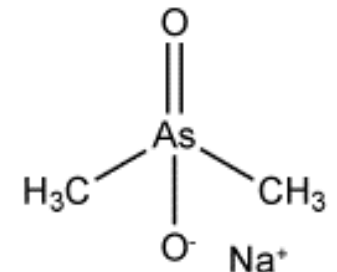
- či buňky a tkáně



# 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 mm<sup>3</sup>
- **FIXACE** – glutaraldehyd (vazba aminoskupin) + OsO<sub>4</sub> (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

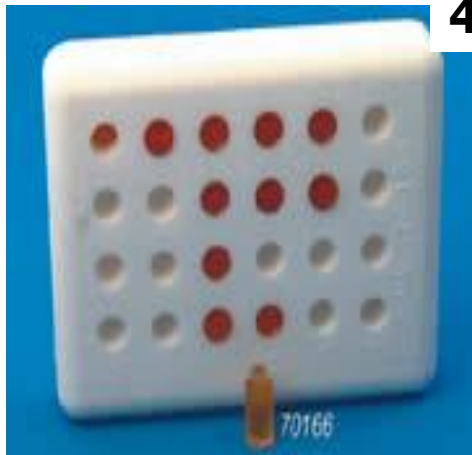
## Zalévací komůrky:



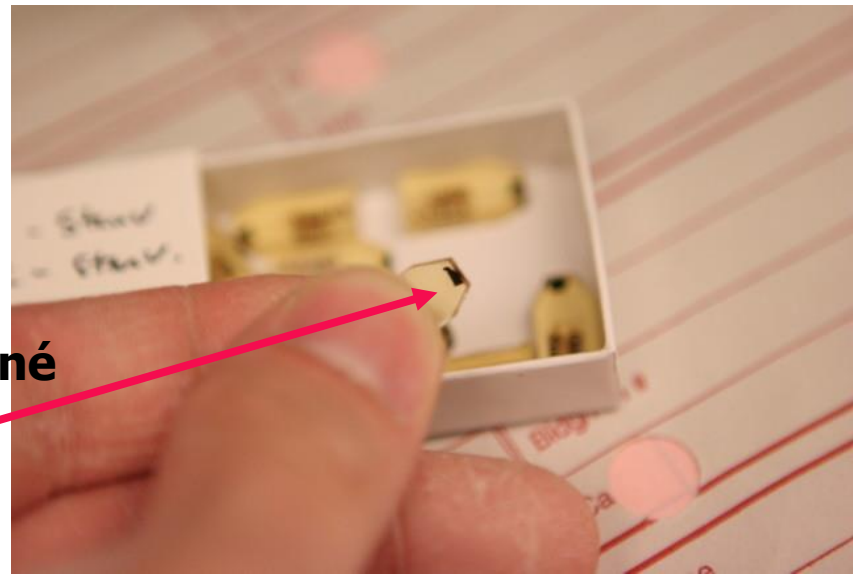
želatinové (1), plastové (2)

nosiče (držáky) kapslí (3)

ploténky s komůrkami  
(4, 5)



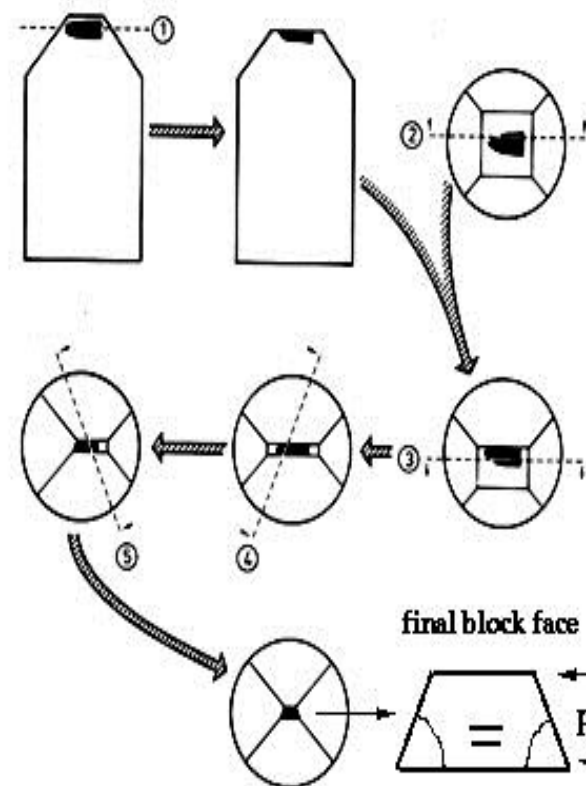
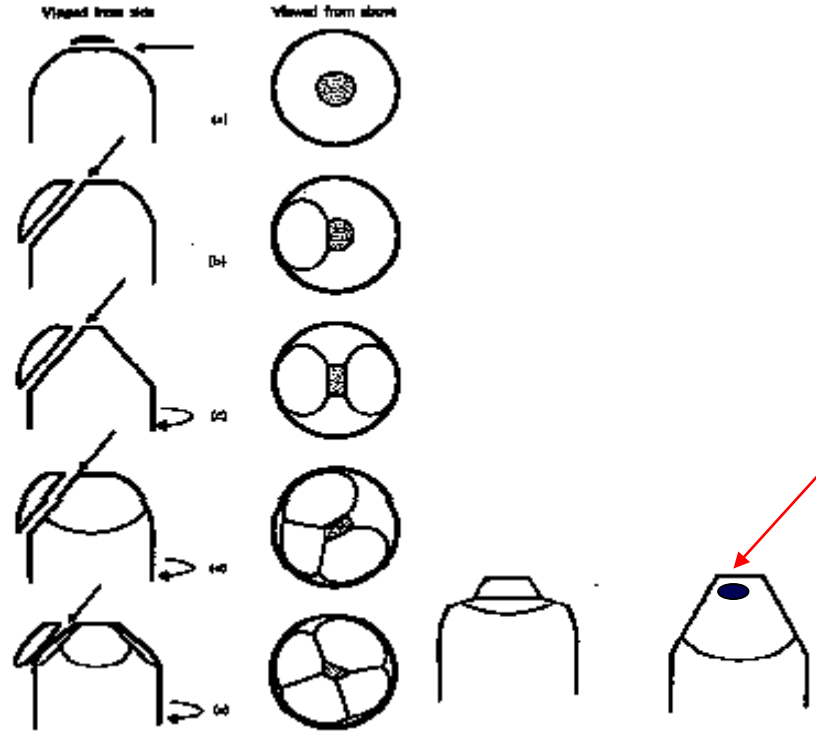
bločky připravené  
pro krájení



# Úprava 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*



Pyramid Side Profile



Too Steep-Trans Am Building (not rigid-vibrations)



Too Flat-Pyramid of the Sun (section size changes rapidly)



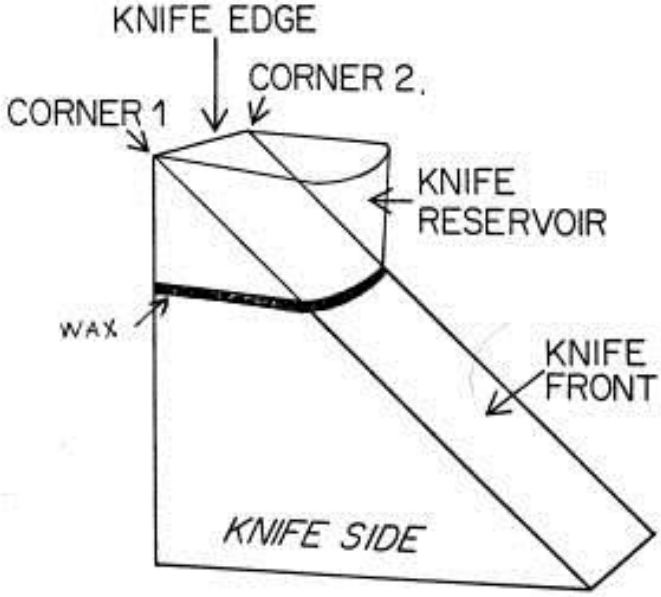
Just Right-Egyptian Pyramid with top cut off



# KRÁJENÍ

- po odstranění přebytku media (trimming) a vytvoření pyramidy se z malé plošky (0.1 mm<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 (Cu)

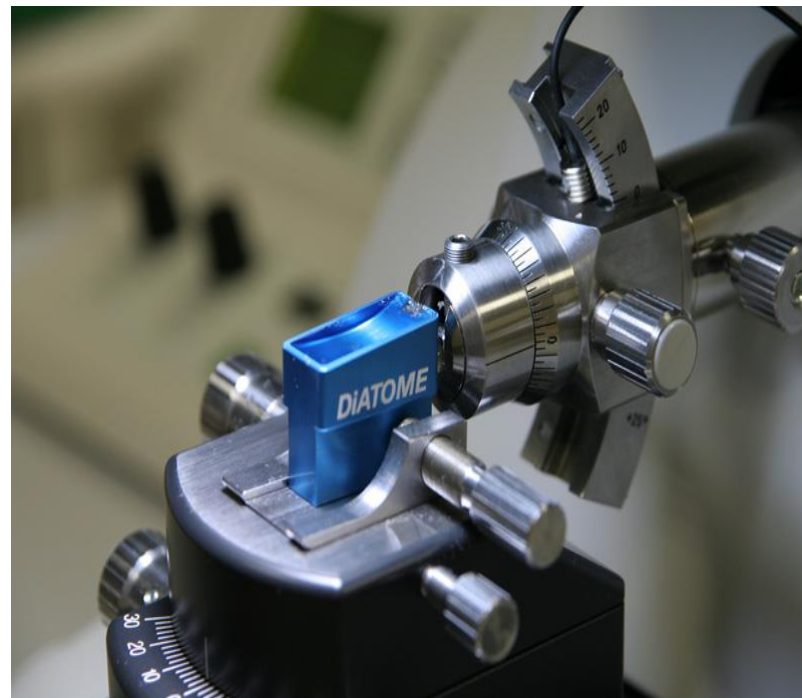
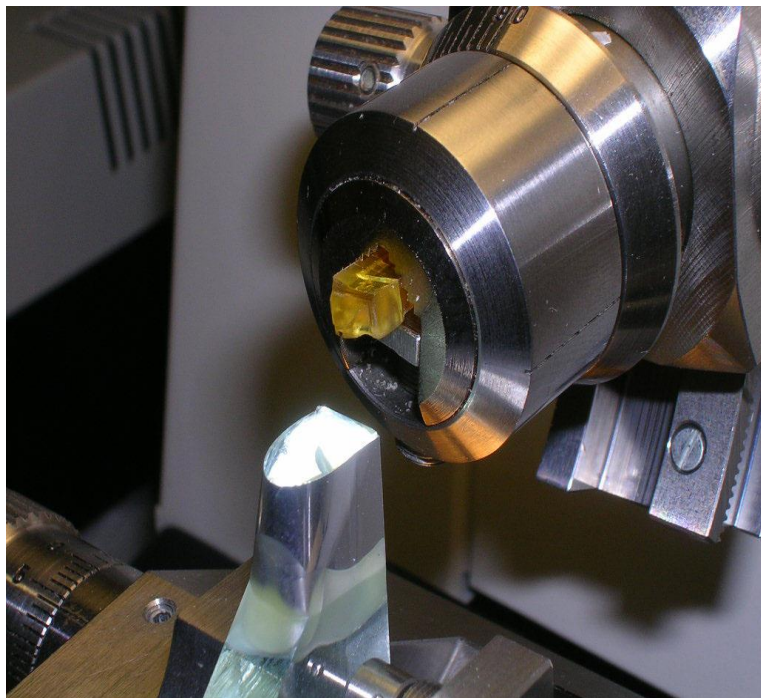




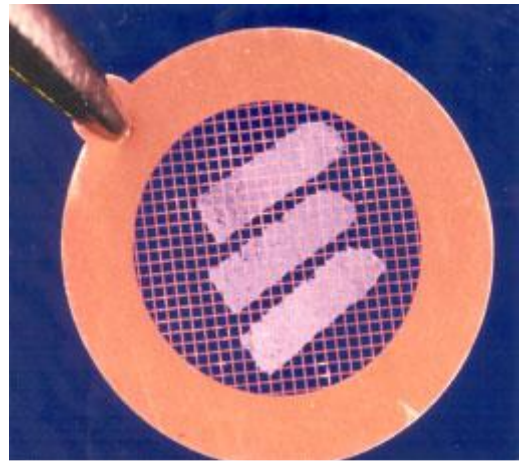
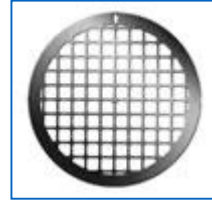
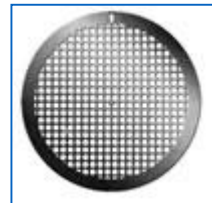
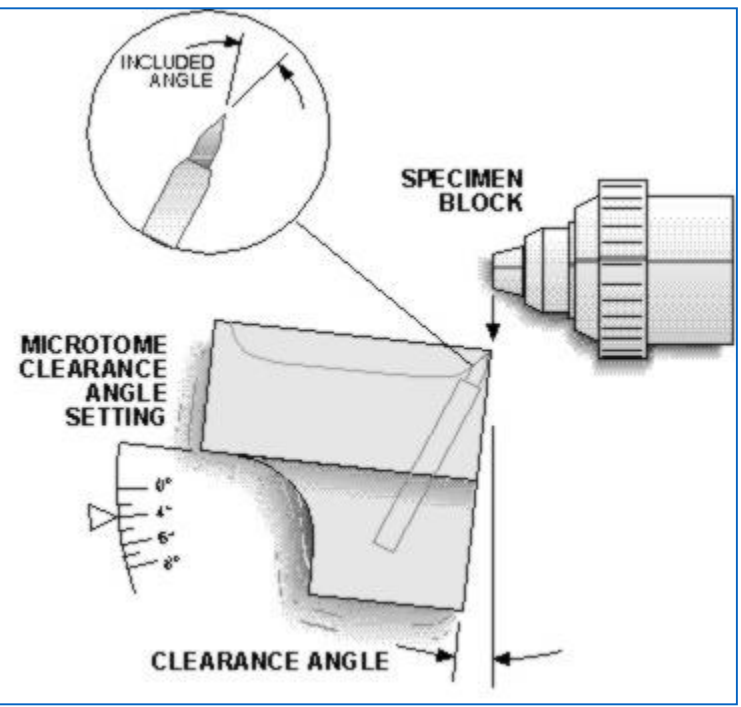
## Ultramikrotomové nože:

skleněný

diamantový

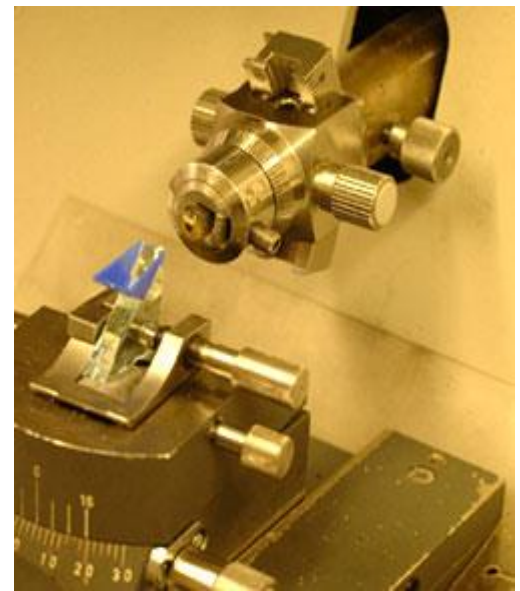
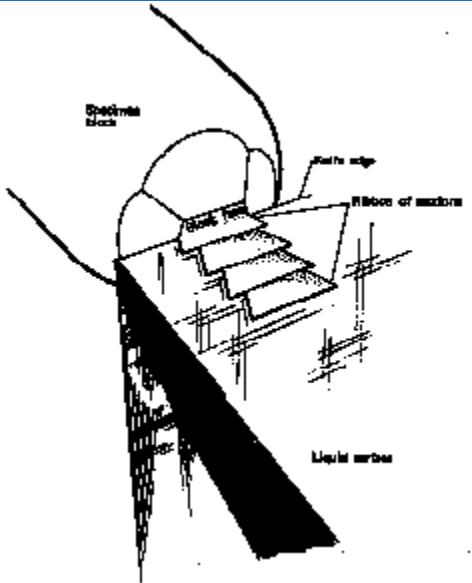
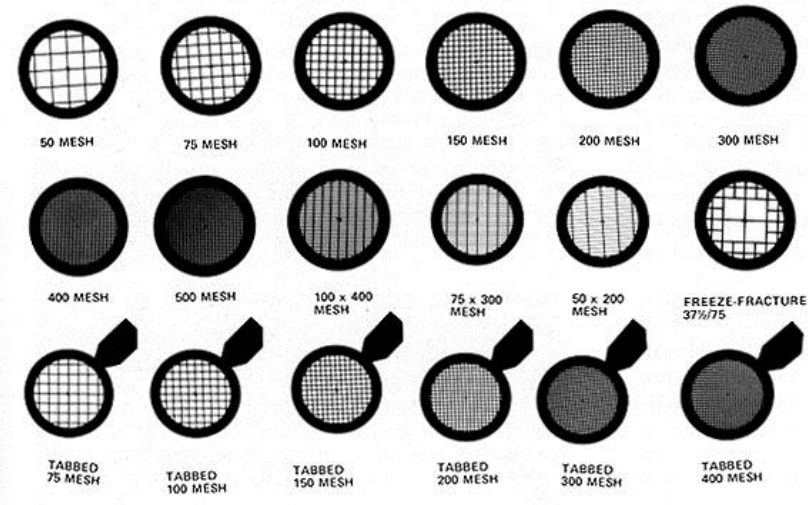


# Krájení, nosné sítě



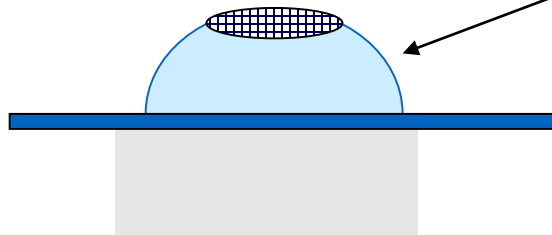
Sítka se 3 páskami řezů

## typy sítěk



# KONTRASTOVÁNÍ

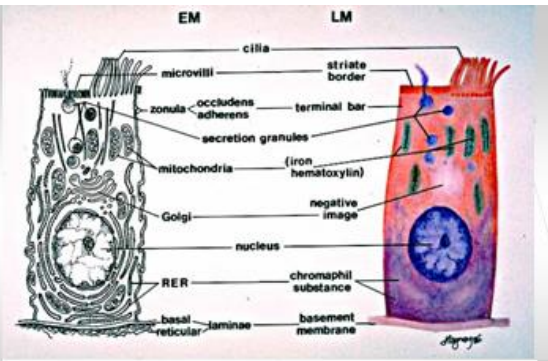
- princip diferenciacie struktur – různý rozptyl svazku elektronů v závislosti denzity struktur ;  
„elektronová barviva“ – směsi těžkých kovů:  
uranylacetát nebo citrát olovnatý



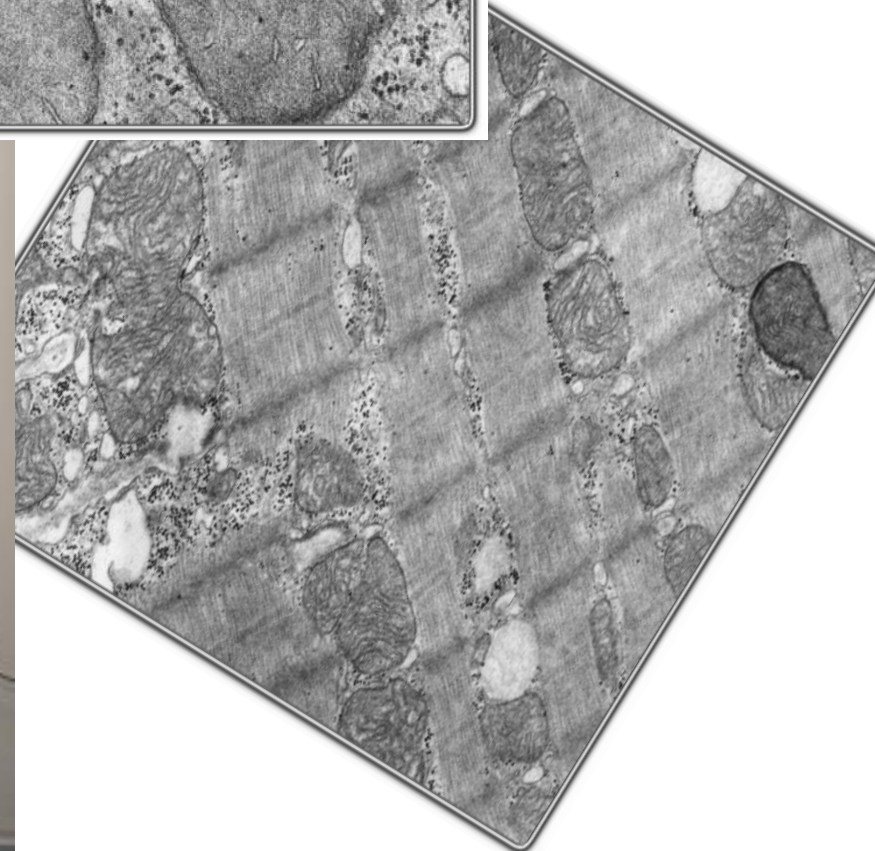
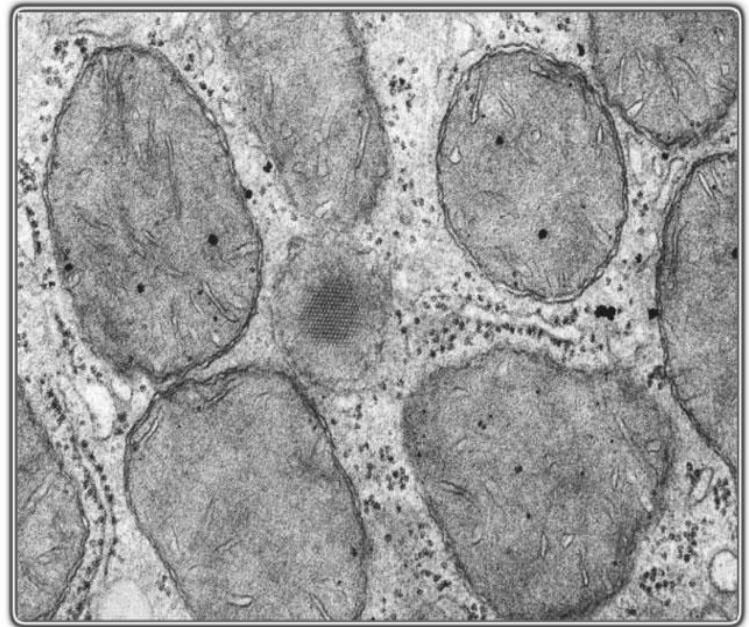
Na kapce barviva je položena nosná síťka tak, aby ultratenké řezy byly vystaveny působení barviva.



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



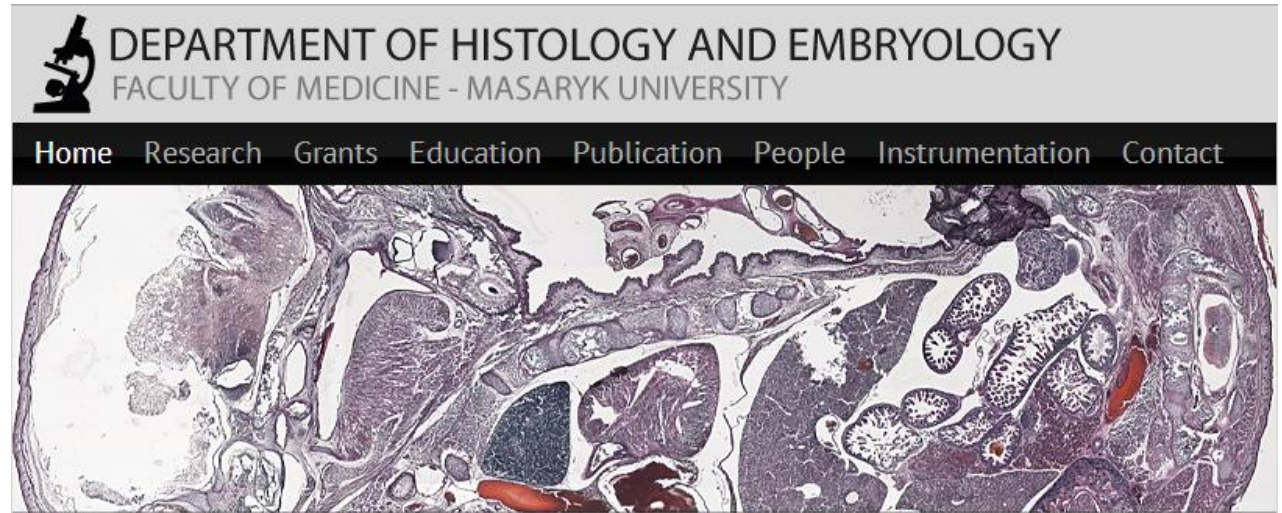
Columnar epithelial cell in electron (EM) and light (LM) microscope





Visit us at:

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



Děkuji za pozornost

Petr Vaňhara, PhD.  
pvanhara@med.muni.cz