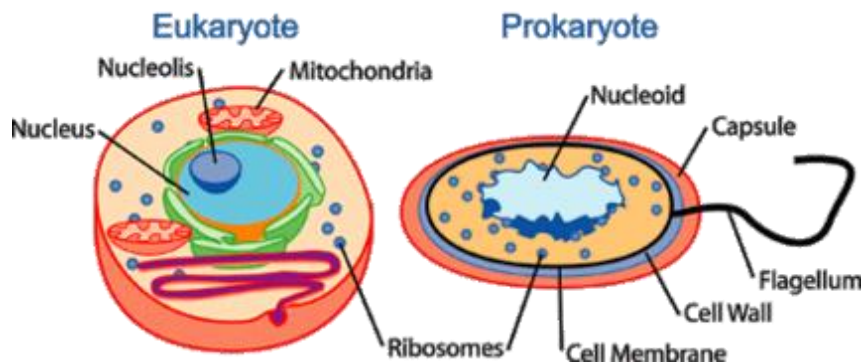


HISTOLOGIE

Histologie je obor zkoumající stavbu, funkci a vývoj buněk, tkání a orgánů.



HISTOLOGICKÉ LABORATOŘE

bioptická

mikroexcizí

neurohistologická

tvrdých tkání

cytologická

elektronové mikroskopie

imunohistologická

histochemická

nekroptická

ZPRACOVÁNÍ BIOPTICKÉHO MATERIÁLU

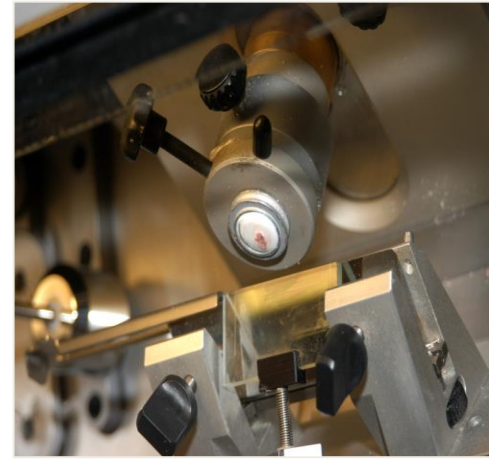
1) Rychlé zpracování tkáně

- peroperačně-nativní materiál
- pomocné metody
- zrychlená metoda- fixovaný materiál
(vakuový autotechnikon, mikrovlnná trouba)-
endomyokardinální biopsie, ledviny, mozek

Peroperační biopsie biopsie na zmrzlo

NATIVNÍ MATERIÁL

- zpracování v Cryo cutu (-24°C)
- rychle zmrazení tkáně (-60°C)
- řezy o tloušťce 4 - 6 μm
- zrychlené barvení HE
- Výsledek se 20 min.- hlásí se na operační sál



Pomocné metody k peroperační biopsii

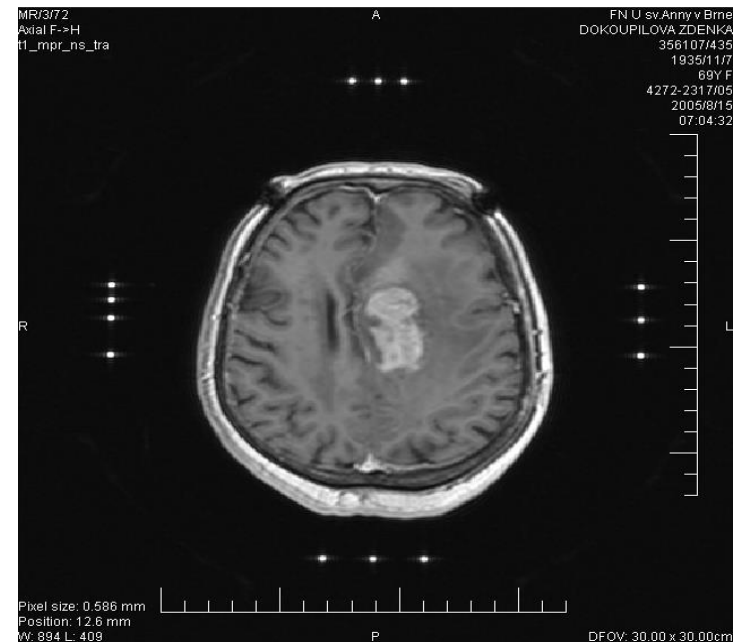
- **Otisk tkáně** - na podložní sklo se otiskne vyšetřovaný tkáňový fragment a pomocí tohoto otisku se na sklo otisknou buňky. Sklo se obarví cytologickým zrychleným barvením hematoxylin eosin, Giemsa. Výtěžnost buněk při otisku je malá.
- **Otěr tkáně** - na podložní sklo se tkáňový fragment otře. Takto vzniklé sklo se následně barví zrychleným cytologickým barvením stejně, jako u otisknu tkáně. Výtěžnost buněk při nátěru je větší, tudíž tento způsob zpracování je lepší vzhledem k přesnější možnosti diagnostiky.
- **Crush** - provádíme, pokud je dostatečné množství vyšetřované tkáně
 - malý kousek tkáně rozdrtíme mezi 2 podložními skly a za pomoci krycího skla vytvoříme 2 nátěry, které obarvíme zrychleným cytologickým barvením hematoxylin eosin a metodou Giemsa. Výtěžnost buněk je velmi dobrá, tento způsob zpracování je vhodný i pro tužší materiál, jako je např. meningeom.

Rychlé zpracování materiálu – zrychlená metoda

FIXOVANÝ MATERIÁL

endomyokardiální biopsie, punkční biopsie ledvin, stereobiopsie-mozek (vzorky odebrané pod CT)

- tkáň fixujeme v 10% neutr. formalínu při 56°C, po dobu 30 minut
- zpracování ve speciálním vakuovém autotechnikonu nebo mikrovlnné troubě. Proces trvá 1-2 hod.(podle nastavení programu)
- parafinový blok
- řezy o tloušťce 3 μm
- barvíme He- barvicím automatu
- výsledek do se hlásí za 3-4 hod.



2) Rutinní zpracování - trvalé

Po odebrání vzorku tkáně dojde k přerušení regulačních vztahů buněk, zásobování kyslíkem a dezorganizaci buněčného metabolismu. Činností vlastních enzymů buňky dochází k **autolýze** (posmrtnému samonatravení) buněk. Vzorek může být znehodnocen i mikroorganismy (hniloba – v laboratoři by k ní nemělo nikdy dojít). Těmto změnám zabráníme **rychlou fixací** vzorku (okamžitě po odběru).

Fixace = denaturace bílkovin (tedy i enzymů) buněk a tkání, prováděna za účelem, aby nedošlo k autolýze.

- Druhy fixace:
1. Fyzikální
 2. Chemická

1. Fyzikální metody fixace

Činnost enzymů je vázána na vodné prostředí, proto ustane, když ovlivníme transportní funkci vody.

Působení velmi nízkých teplot

- *Metoda lyofilizace* – vysoušení vzorku za mrazu, kdy dochází k sublimaci vody ve vakuu (metoda velmi drahá). Využívá se při průkazu aktivity enzymů.
- *Metoda rychlého zmrazení* – pomocí suchého ledu (pevný CO_2) nebo kapalných plynů např. dusíku. Musí probíhat rychle, aby nevznikly krystaly ledu, které by poničily buňky.

Působení vysokých teplot

- *Využití kahanu* – nátěr bakterií na podložním skle se protáhne plamenem kahanu, metoda používaná v mikrobiologii. Dříve se používala tato metoda i v histologii.
- *Vaření*
- *Mikrovlnné záření* – řízený ohřev v mikrovlnné troubě v rozmezí 45–55 °C . Dochází k jemné denaturaci bílkovin, používá se v běžných histopatologických metodách, ale i při rychlém zpracování peroperační biopsie.

MIKROVLNNÁ TROUBA -HISTOS



2. Chemické metody fixace

- Rychlá a šetrná denaturace bílkovin pomocí chemických fixačních prostředků. Takové prostředky jsou například roztoky směsí několika látek tzv. **fixační roztoky** (fixační tekutiny). Fixace obvykle probíhá za pokojové teploty, či při mírném zahřátí (pro usnadnění průniku roztoku do vzorku). Vzorek necháváme ve fixační tekutině na přesně určenou dobu. Při fixaci vzorků užívaných v elektronové mikroskopii (malé rozměry vzorků), jsou fixační časy kratší.

Požadavky na fixační tekutiny:

- Rychlá, ale šetrná fixace (nepoškozuje vzorek, zachovává strukturu buněk a tkání).
- Rychlý průnik do tkáně, musí působit v celém vzorku.
- Musí umožnit další zpracování vzorku.

Fixační tekutiny

- **Formol (formalín)**
- Nejčastěji používaná fixační tekutina. Z chemického hlediska, 100% formol = **40% roztok [formaldehydu](#)** (HCHO). Před použitím formolu, se ředí na 10–25% roztok. Ředíme pramenitou vodou (ideálně z vodovodu), která udržuje roztok formolu v neutrálním stavu. Občas se k ředění využívá také [fyziologický roztok](#), jehož smícháním s formolem získáme tzv. **slaný formol** nebo [pufr](#) zvaný **nárazníkový formol**. Fixace trvá 24 hodin. Nemůže vzorek prefixovat.
- Skladuje se v lahvích z tmavého skla, které je pokryté vrstvou mletého vápence (CaCO_3 , MgCO_3). Na světle totiž formol oxiduje a mění se na kyselinu mravenčí. Tmavé sklo brání oxidaci a mletý vápenec váže vzniklou kyselinu mravenčí.

DALŠÍ FIXAČNÍ TEKUTINY

- **Bakerova tekutina**
- Směs 10% formolu, chloridu vápenatého (CaCl_2) a vody. Vhodná fixační tekutina pro fixaci lipidů a enzymů vázaných na membrány. Fixace trvá 24 hodin.
- **Bouinova tekutina**
- Tekutina žluté barvy. Chemicky to je nasycený roztok kyseliny pikrové (3 díly) smíchaný s formolem (1 díl). Před použitím se na každých 100 ml roztoku přidává 5 ml ledové kyseliny octové. Po fixaci se vzorek dává do 80% ethanolu. Nemůže vzorek prefixovat. Není vhodné jí použít při fixaci krevnatých orgánů či při průkazu lipidů.
- **Bromformol**
- Tekutina obsahující 15% formol a bromid amonný (NH_4Br). Využívá se u impregnačních metod, při průkazu gliových buněk v nervové tkáni.
- **SUSA**
- Fixační tekutina obsahující **SU**blimát, **SA**lt (NaCl), formol, kyselinu octovou, kyselinu trichloroctovou a destilovanou vodu. Po fixaci se přenáší do 90% ethanolu, v kterém se provádí jódování (odstranění sublimátových sraženin). Využití pro cytologii, fixaci kostí, zubů a chrupavek.
- **Zenkerova tekutina**
- Vzniká jako směs sublimátu (chlorid rtuťnatý), dichromanu draselného, síranu sodného, ledové kyseliny octové a destilované vody. **NEOBSAHUJE formol.**^[2] Fixace probíhá 24 hodin. Dále se vzorek 24 hodin vypírá v tekoucí vodě. Takto vypraný vzorek se přenáší do 70% ethanolu a jóduje se.
- **Ethanol**
- Používá se zejména v neurohistologii při *Nisslově metodě*. Tkáň se značně dehydratuje a extrahují se tuky. Dojde ke zvýraznění komplexů granulárního ER v podobě tzv. *Nisslovy substance*. Ta se pak barví například thioninem.

Příjem materiálu



Přikrojení



TKÁŇOVÝ PROCESOR

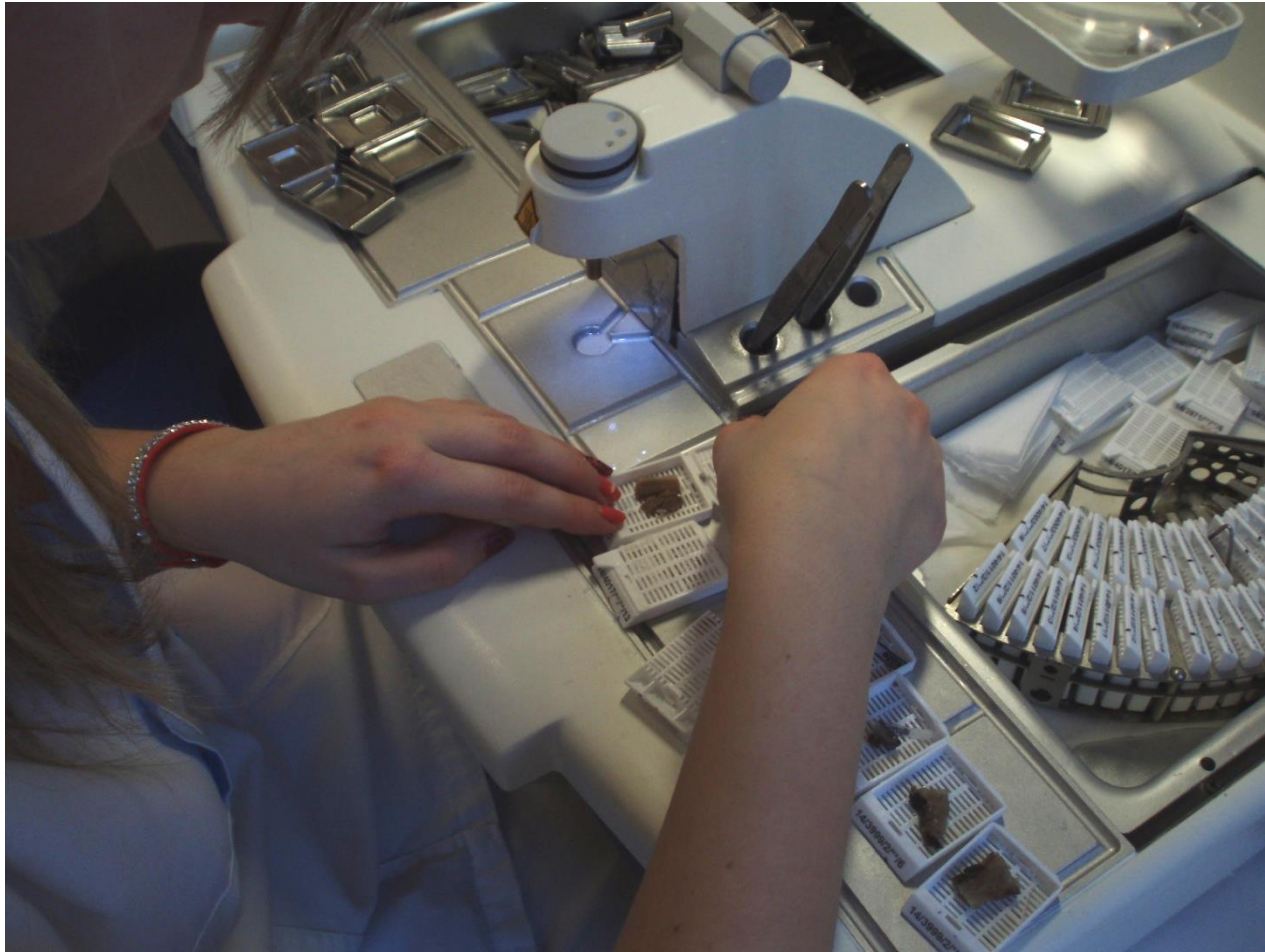
- Odvodnění
- Prosyčení látkou rozpouštějící parafín
- Prosyčení parafínem



Přípravna tkání



Zalévání vzorku do prarafínu









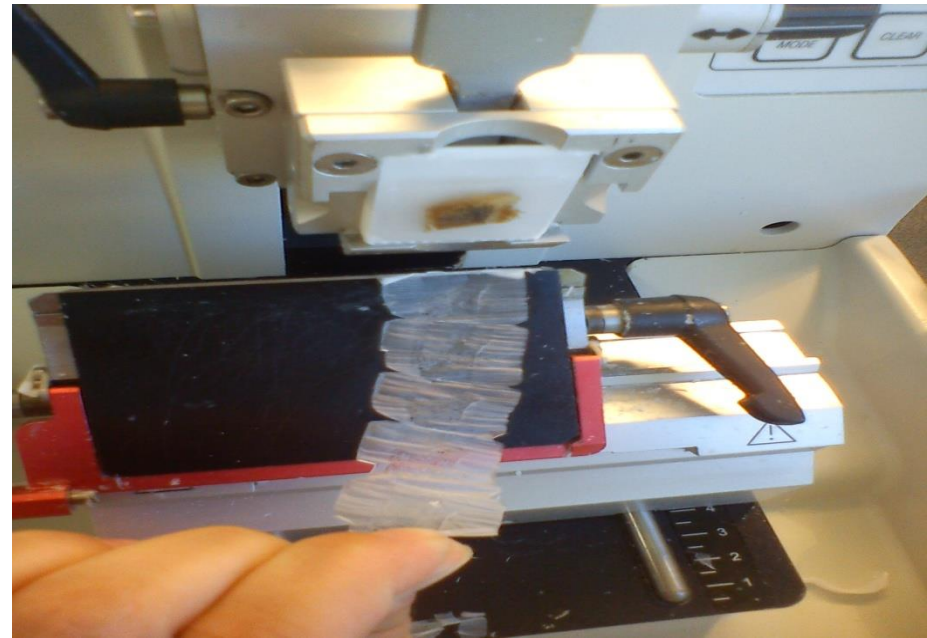
Parafínové bloky



Krájení

Mikrotom může velmi
ovlivnit celkový výsledek

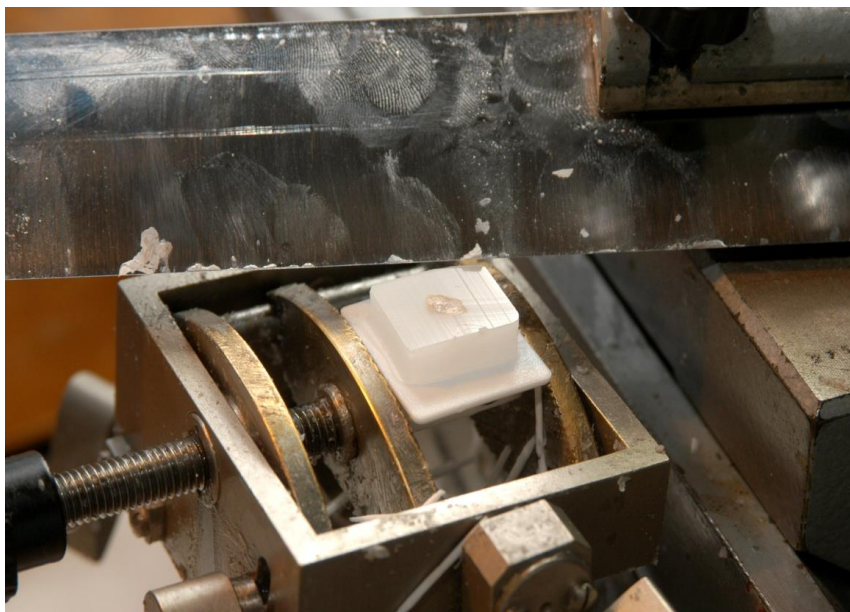
Rotační mikrotom
Leica RM 2255



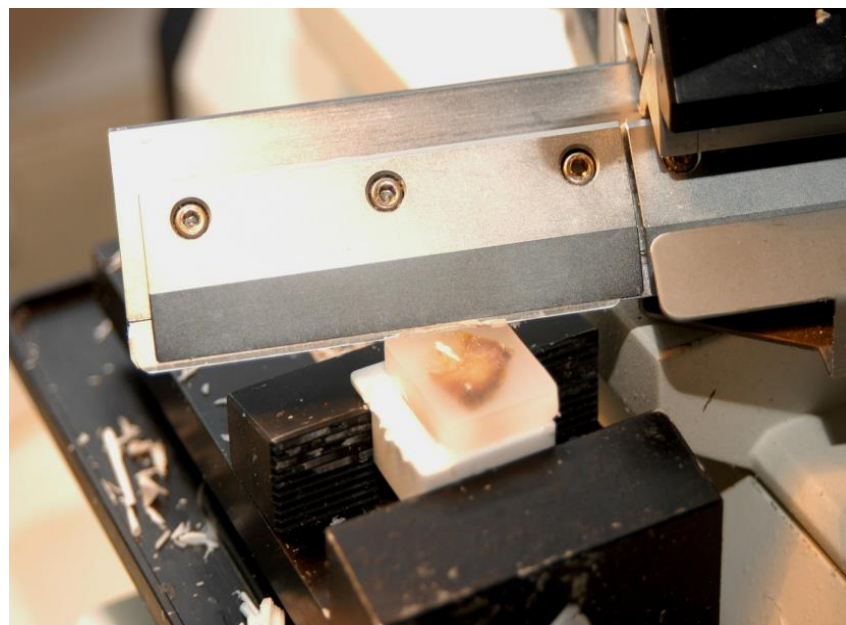
SÁŇKOVÝ MIKROTOM



Klasický nůž



Žiletkový nůž

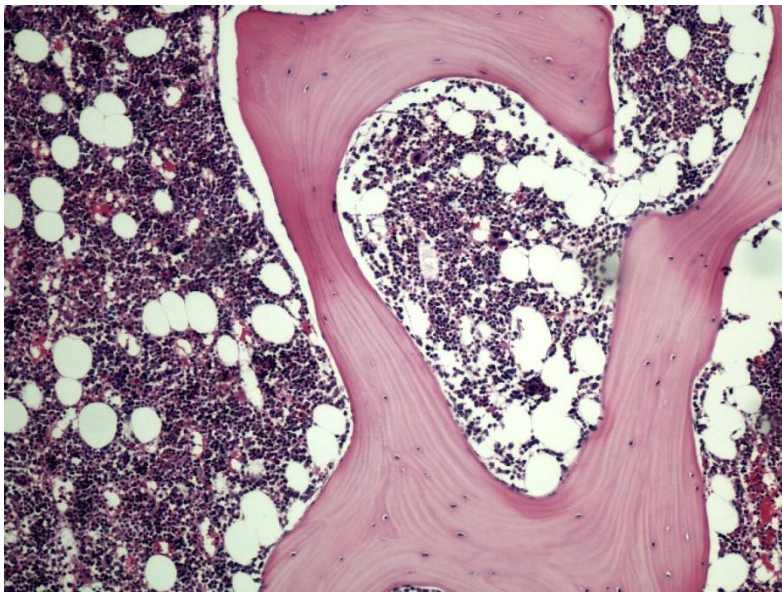


Biopsie



Barvení

Hematoxylin eosin



Barvící automat



Lepení – lepicí automat



Speciální metody

ELASTICKÉ VAZIVO

RETIKULÁRNÍ VAZIVO

POLYSACHARIDY, HLEN

PRŮKAZ GLYKOGENU

TKÁŇOVÉ ELEMENTY

PIGMENTY

ANORGANICKÉ LÁTKY

PRŮKAZ BAKTERIÍ

PRŮKAZ BILIRUBINU

PRŮKAZ FIBRINU

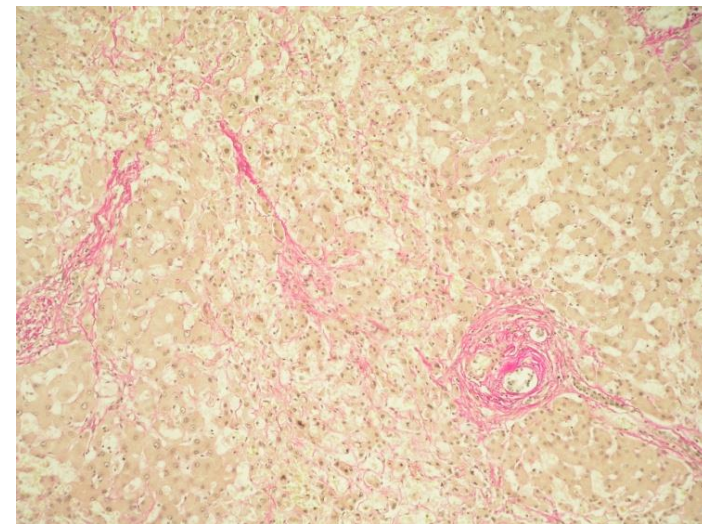
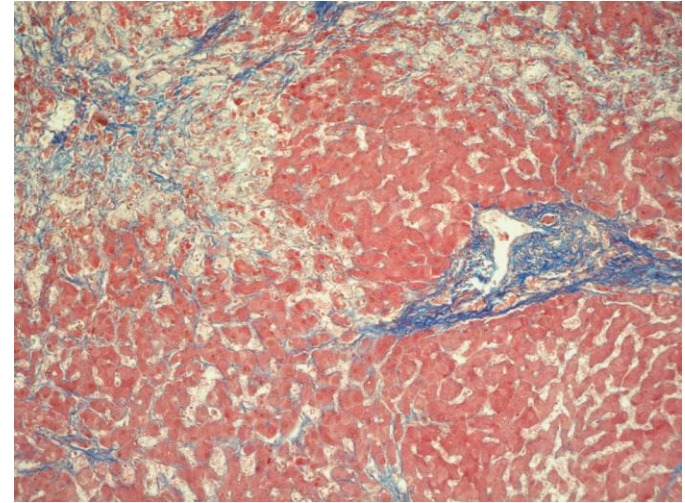
KOLAGENNÍ VAZIVO

TRICHROM MASSONŮV ZELENÝ A
MODRÝ

TRICHROM MASSONŮV ZELENÝ A
MODRÝ (MODIFIKACE PODLE
GOLDNERA)

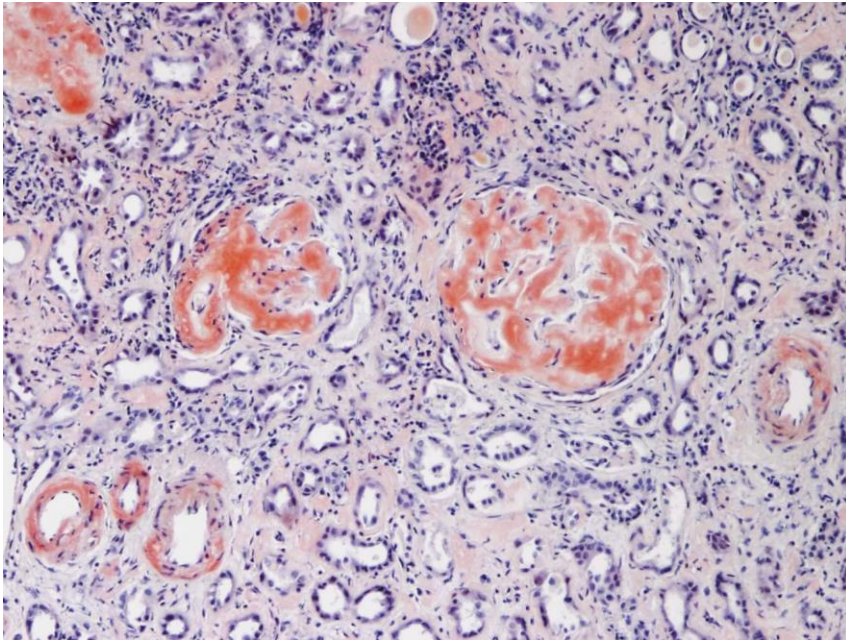
BARVENÍ KOLAGENU PODLE
MALLORYHO

VAN GIESON

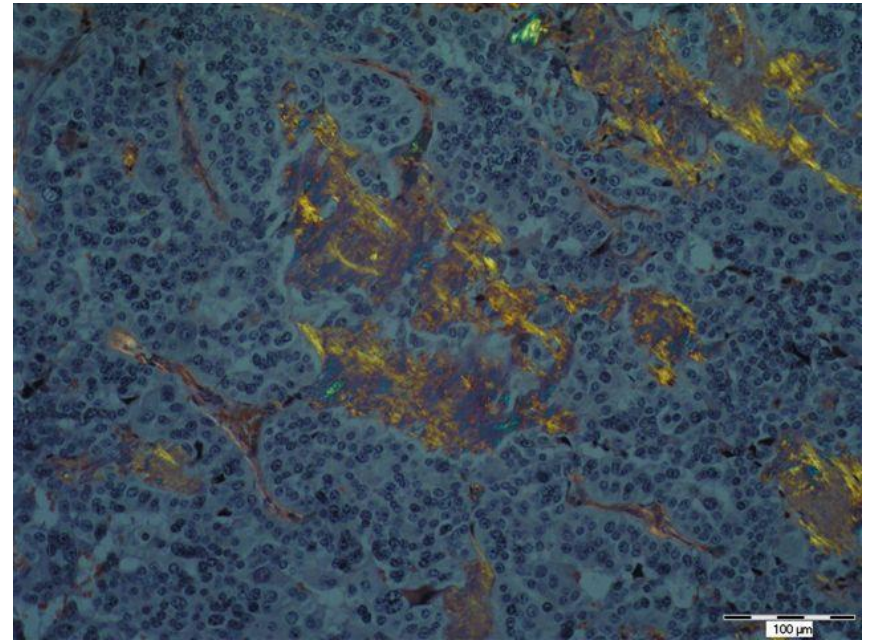


AMYLOID

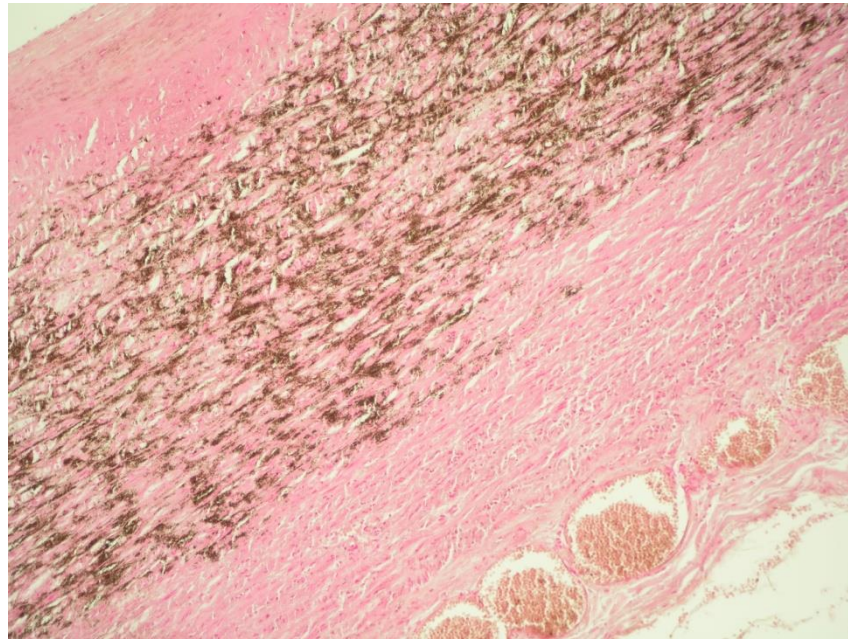
KONGO ČERVENĚ



KONGO ČERVENĚ-POLARIZACE

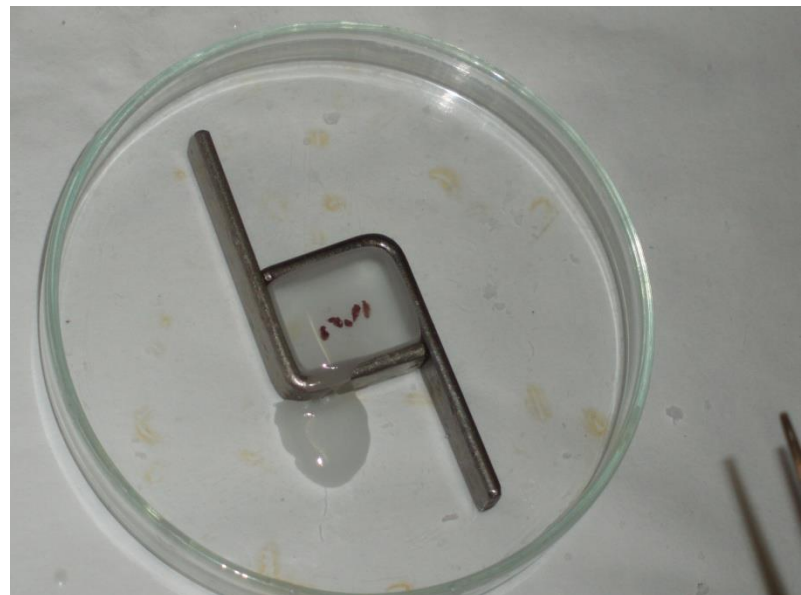


PLÍSNĚ- GROCOTT



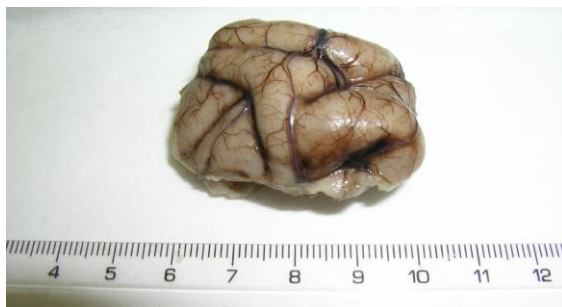
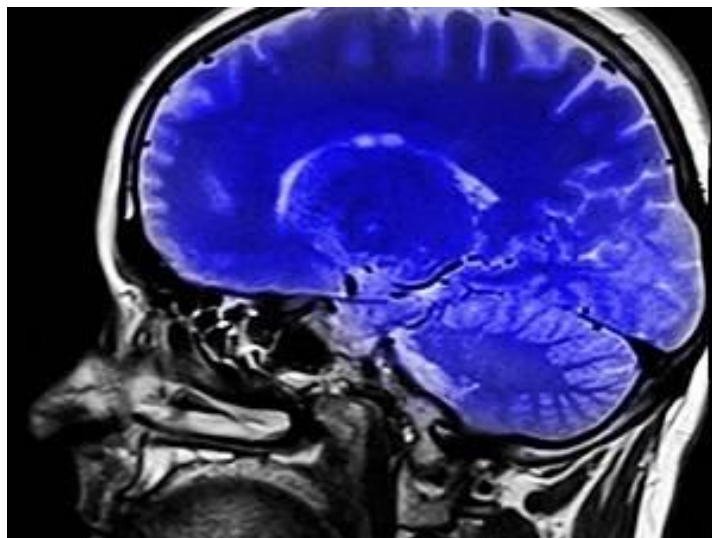
Laboratoř mikroexcizií

- endomyokardiální biopsie
- mikroexcize gastrointestinálního traktu
- punkce z -
jater, prostaty a další



Laboratoř neurohistologická

-mozková tkáň

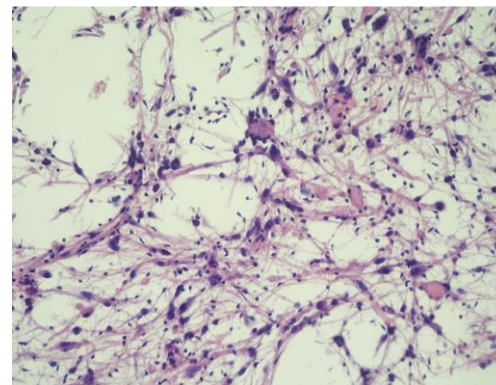


Obrázek 1 Fragment mozkové tkáně

zdroj: I. PAÚ

1) Nenádorové léze

2) Nádory mozku

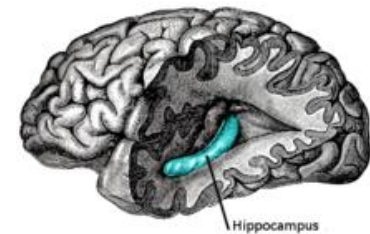


Obrázek 1 Recidivující pilocytární astrocytom, HE, zvětšeno 200x,
zdroj: I. PAŮ

3) Zpracování mozkové tkáně farmakorezistentních epileptiků



Barvení Luxol-kresyl



Obrázek 1 Hippocampus,

zdroj: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Hipokampus>



Obrázek 1 Fragment mozkové tkáně - hippocampus,

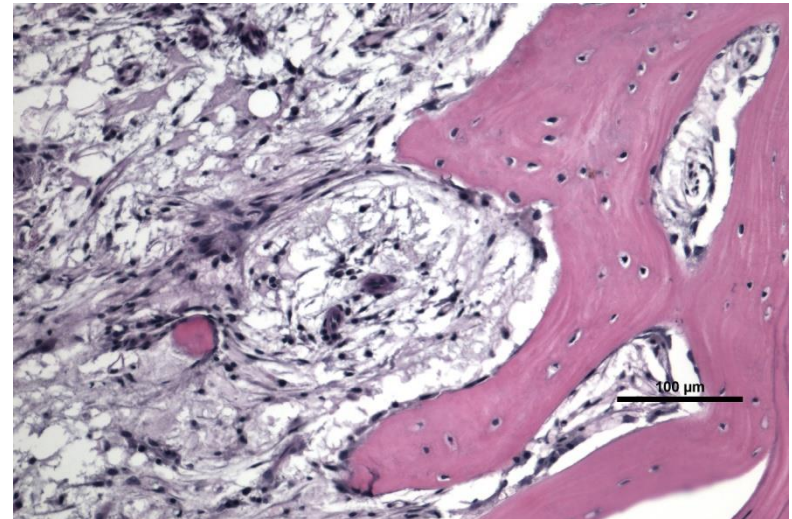
zdroj: I. PAŮ

Laboratoř tvrdých tkání

- kosti
- zuby
- kalcifikované tkáně
- Dekalcifikace

ODVÁPŇENÍ - DEKALCIFIKACE

Spočívá v rozpuštění minerálních solí účinkem zředěných kyselin, které přemění nerozpustné soli v soli rozpustné.



KONVENČNÍ CHONDROSARKOM PRAVÉ PROXIMÁLNÍ TIBIE



Laboratoř cytologická

Princip cytodiagnostiky je posouzení buněk bez tkáňové kontinuity obarvených příslušnou metodikou, která dovoluje jejich morfologické zhodnocení.

EXFOLIATIVNÍ CYTOLOGIE

- hodnotí buňky oddělené z povrchů např .punktáty různých dutin (ascites,pleurální a perikardiální punktáty), punktáty z cyst (mamární, ovariální), cytologie moči, stěry sliznic (bronchiální abraze,abraze žlučových cest), bronchoalveolární laváže, liqor, sputum.

ASPIRAČNÍ CYTOLOGIE

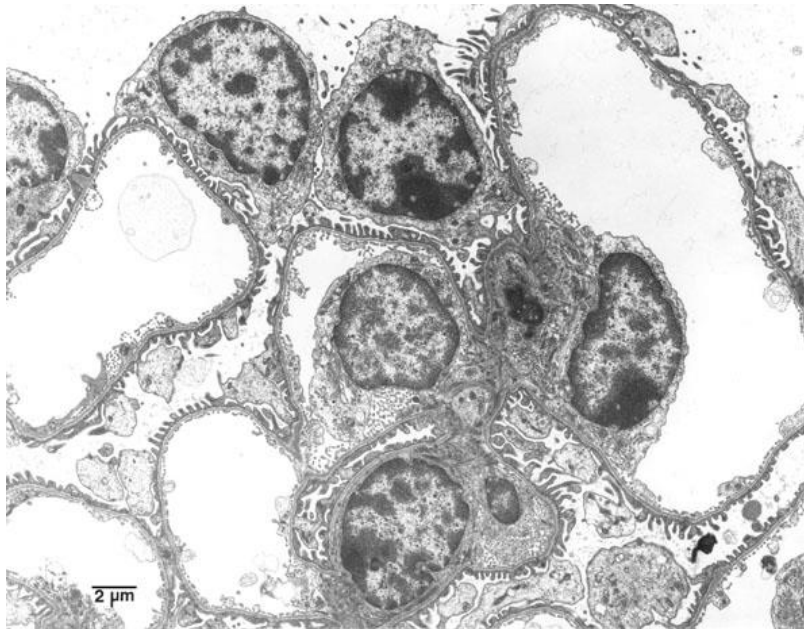
- materiál je získán pomocí tenké jehly (Fine Needle), do které je pod tlakem nasáván materiál z punktovaného orgánu- thyroidální punkce, dále se jedná o pankreatické punkce, punkce nádorů mekkých tkání a některé další punktáty solidních orgánů. Z punktovaného materiálu je zhotoven cytologický nátěr.

Cytologie



Laboratoř elektronové mikroskopie

- punkce ledvin
- nádory měkkých tkání
- nádory mozku
- kožní onemocnění
- vlasatá leukémie



ULTRAMIKROTOM

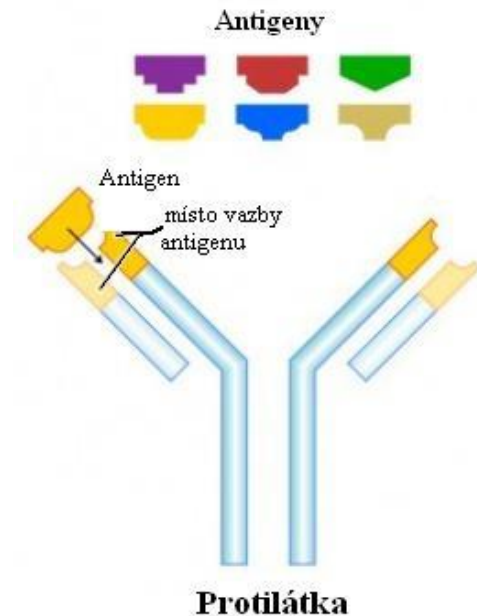
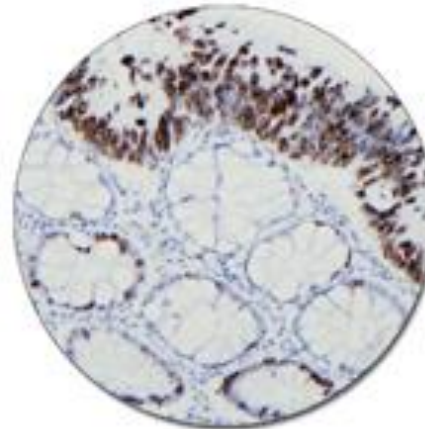
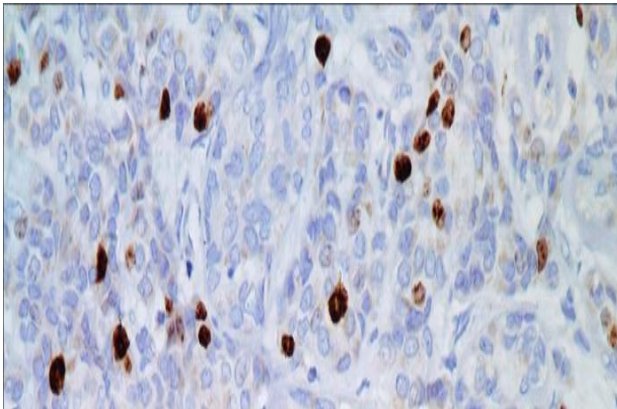


Laboratoř imunohistologická

- **Imunohistochemie**– využívá reakci antigenů a protilátek na bližší poznání struktur a chemických pochodů probíhajících ve tkáních.
- Metody imunohistochemie jsou založeny na principu ELISA - reakcí, tzn. reakcí, kdy samotná reakce antigenů a protilátek musí být v dalších krocích zviditelněná pomocí detekčních systémů.



Ki-67 (jaderná pozitivita)



IHC laboratoř



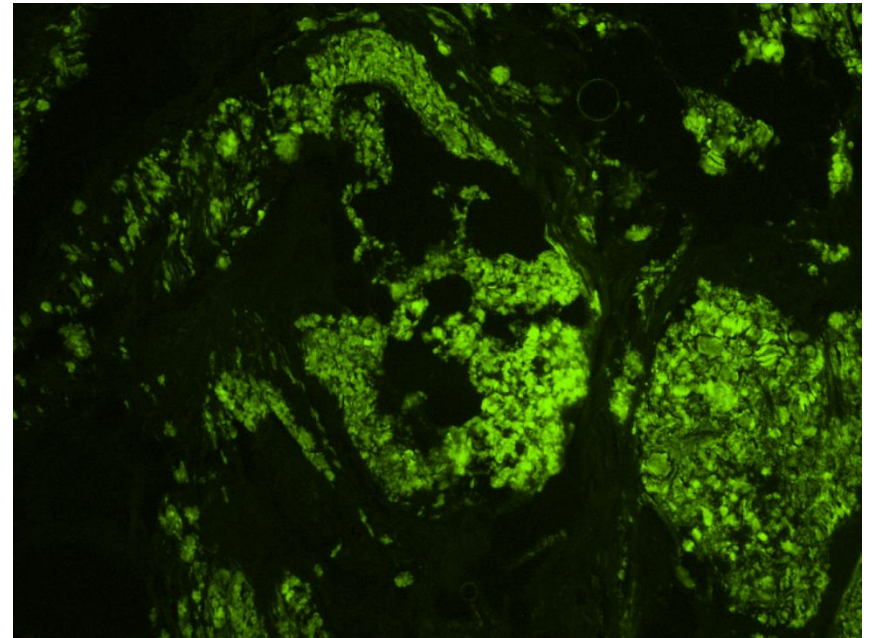
Ventana Ultra/Imunosteiner



Imunofluorescence

Amyloidové hmoty-thioflavin

- specifická reakce
- protilátky s antigenem,
- lokalizace antigenu
- ve tkáních, buňkách,
- stanovení protilátek v séru



Laboratoř histochemická lokalizace enzymů

Pro detekci enzymů s používá nativní tkáň.

Principem metody průkazu enzymů a jejich lokalizace ve tkáni je histochemická reakce tkáňového enzymu s dodaným substrátem za vzniku produktu, který je dále vizualizován. Jedná se tedy o metodu nepřímou.

Prokazujeme např. laktázu, sacharózu a trehalázu ve střevní sliznici. Alkalickou fosfatázu v kartáčovém lemu enterocytů.

Pitevní provoz

- základní onemocnění
- jeho komplikace
- bezprostřední příčina smrti
- Nekroptická laboratoř

