

# Histologické techniky

stručný přehled

Iva Dyková

# Histologická / histopatologická vyšetření

## Histologické techniky

Histologická technika – soubor postupů, kterými připravíme tkáň pro mikroskopické vyšetření - obvykle v procházejícím světle

Prohlížíme tenké histologické řezy, které získáme na základě serie postupů, k nimž patří:

- odběr tkáňových vzorků (excize)
- fixace
- odvodnění a prosycení „parafinem“
- příprava řezů
- odparafinování, převedení řezů do vody
- barvení
- odvodnění
- příprava trvalých preparátů (montování)

# Odběr vzorků tkání

Excize / šetrné vyříznutí vzorků z tkání a orgánů (vzorek = excize)

- odběr tkáňových vzorků (excize)
- fixace
- odvodnění a prosycení „parafinem“
- příprava řezů
- barvení
- příprava trvalých preparátů (montování)

Odběr provádíme co nejdříve, bezprostředně po uhynutí / usmrcení, tj., z čerstvého kadaveru

Velikost vzorků – dost velké aby obsahovaly normální i alterovanou tkáň, dost malé aby se rychle a dobře nafixovaly

Opatrný odběr, tkáně jsou křehké, snadno se poškodí např. pinzetou;  
Doba fixace se řídí rychlostí penetrace fixáže do hlubších vrstev vzorku

K rutině histopatologických laboratoří patří uschování tzv. zbytkového materiálu až do stanovení diagnózy

Dodržují se zásady přesné archivace dat o původu odebraných vzorků, archivují se i bločky pod pořadovými čísly s označením roku

# Fixace

- odběr tkáňových vzorků (excize)
- **fixace**
- odvodnění a prosycení „parafinem“
- příprava řezů
- barvení
- příprava trvalých preparátů (montování)

Cílem fixace – zachovat tkáň ve stavu, který se co nejvíce podobá intravitálnímu (konzervace struktur / morfologie i chemického složení) a umožní následné obarvení

Fixáže – chemické látky s následujícími vlastnostmi:  
musí působit rychle, fixovat tkáň dříve než nastoupí post-mortální změny (autolysis),  
(musí pronikat rychle i do hlubších vrstev vzorku),  
měly by zabránit vyplavení rozpustných látek z cytoplasmy buněk, vzniku artefaktů,  
neměly by působit nadměrné smrštění tkání a ztvrdnutí.

Jednoduché fixáže: (10% formol)

„Složité“ – z více komponent (Boiun, Davidson, FAA, atd.)



objem vzorku  
objem fixáže (10x větší)  
tvar fixační nádoby ! (tkáň ztvrdnou)  
označení obyčejnou tužkou !

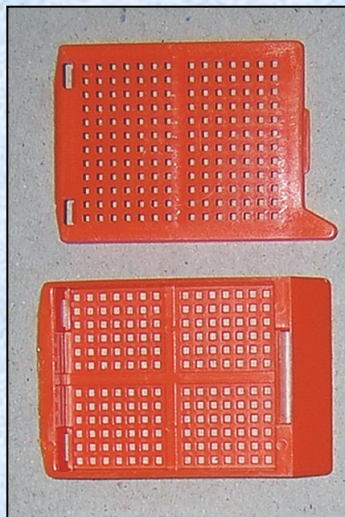
## Odvodnění

- odběr tkáňových vzorků (excize)
- fixace
- **odvodnění a prosycení „parafinem“**
- příprava řezů
- barvení
- příprava trvalých preparátů (montování)

Tkáně obsahují vodu, aby mohly být zpevněny prosycením „parafinem“ musí být odvodněny pomocí tekutin, které vodu pohlcují

Vzestupná řada alkoholů (EtOH) a impregnace organickým rozpustidlem, které rozpouští parafin (xylol, toluen, chloroform atd.)

Technické provedení – individuálně / v kazetách / pomalým postupem / automatikou



## Zalítí vzorků do „parafinu“

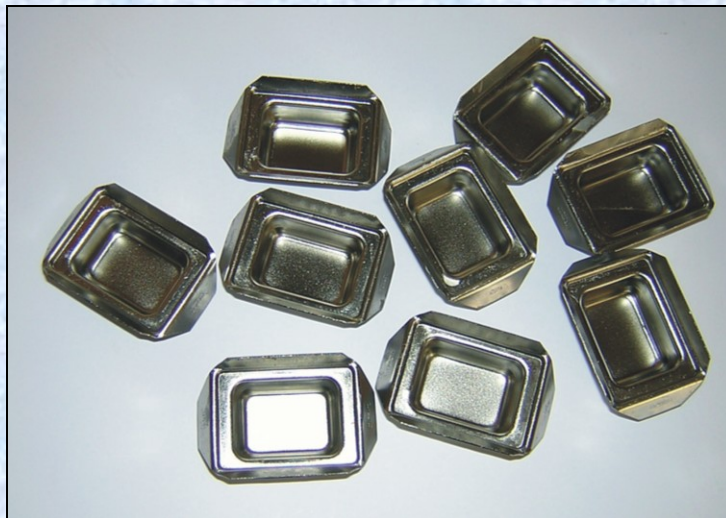
- odběr tkáňových vzorků (excize)
- fixace
- odvodnění a **prosycení „parafinem“**, **bločky**
- příprava řezů
- barvení
- příprava trvalých preparátů (montování)

Prosycení parafinem udržovaným v tekutém stavu v termostatu při teplotě dané bodem tání parafinu (56-58°C) – 3 parafinové lázně, čistý parafin pro bločky

Příprava bloček – různé tvary / typy formiček, historicky skládané krabičky

Po ztuhnutí parafinu – případná úprava bloček – odstranění nadbytku parafinu

Upevnění bločku na podložku sloužící k upevnění do mikrotomu



## Příprava histologických řezů



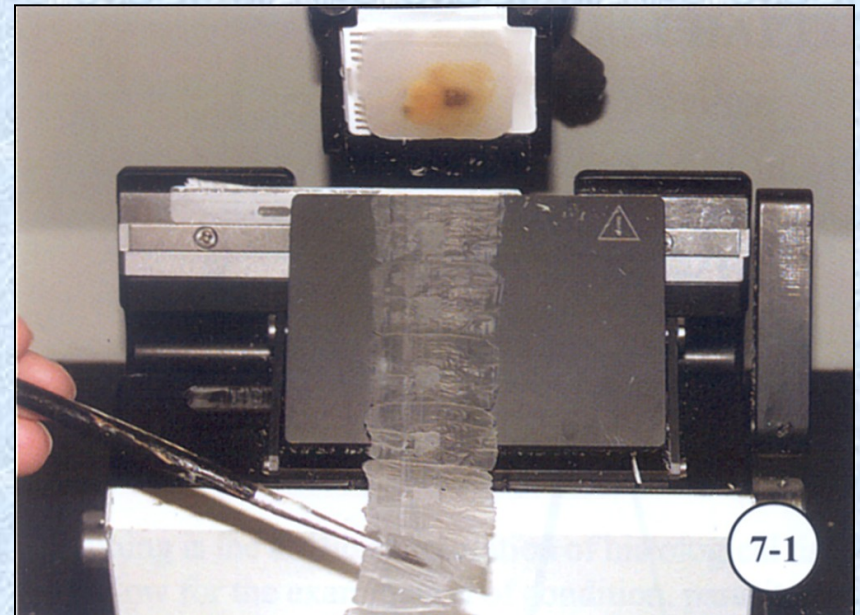
Mikrotomy:

Stabilní poloha bločku, horizontální pohyb nože – sáňkové mikrotomy

Stabilní poloha nože, vertikální pohyb bločku – rotační mikrotom

Úhel nože ve vztahu k bločku

- odběr tkáňových vzorků (excize)
- fixace
- odvodnění, prosycení „parafinem“, bločky
- **příprava řezů**
- barvení
- příprava trvalých preparátů (montování)



Histologické řezy 4-6 mikrometrů



Napínání řezů na vodní hladině, vhodné nastavení teploty vody, adheze na podložní sklo



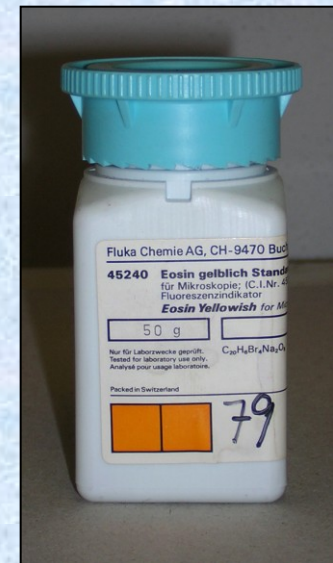
## Barvení histologických řezů

- odběr tkáňových vzorků (excize)
- fixace
- odvodnění a prosycení „parafinem“, bločky
- příprava řezů
- **barvení**
- příprava trvalých preparátů (montování)

Rehydratace řezů – po rozpuštění parafinu organickým rozpustidlem a sestupnou řadou alkoholů

Barvičky / barviva – přírodní (karmín, hematoxylin, orcein, šafrán)  
umělá / syntetická – kyselá - cytoplasmatická (eosin)  
basická - jaderná (metylenová modř)  
neutrální - (červeň šarlachová)

Ortochromatická / metachromatická barviva  
Význam barevného indexu (C. I. No 75290)



Barvicí postupy: přímé

nepřímé (s použitím tzv. mořidel – kamenců = sírany Fe, Cr, Al)

progresivní- (barvivo se nechá působit až do žádaného odstínu)

regresivní – napřed se řez přebarví, pak se diferencuje

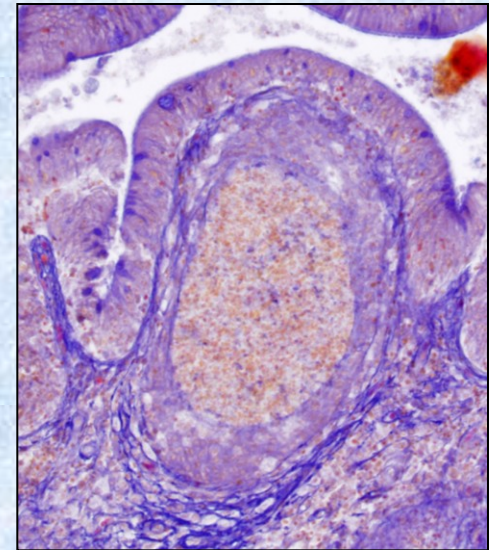
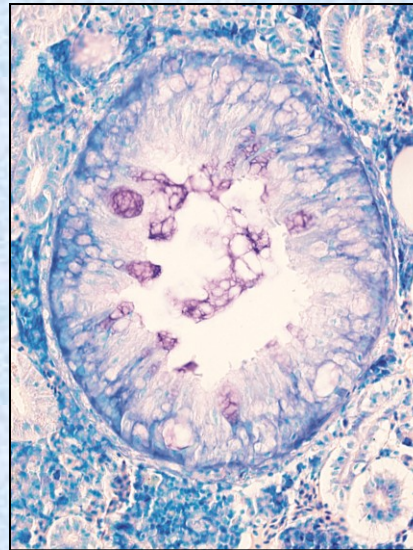
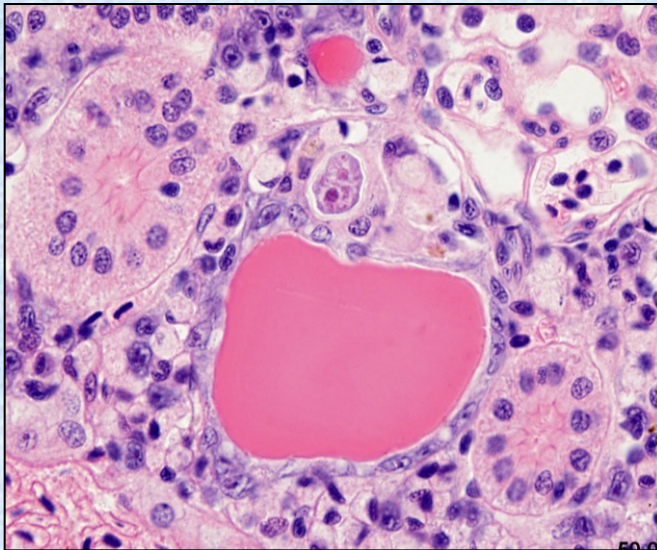
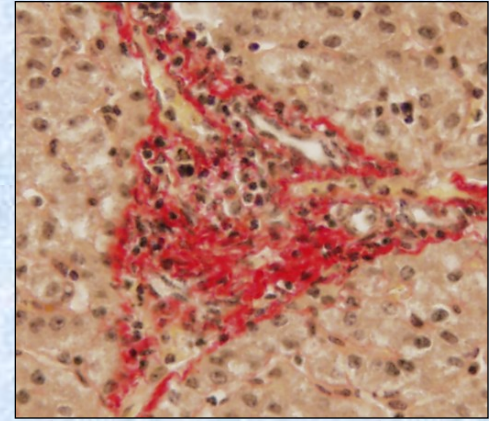
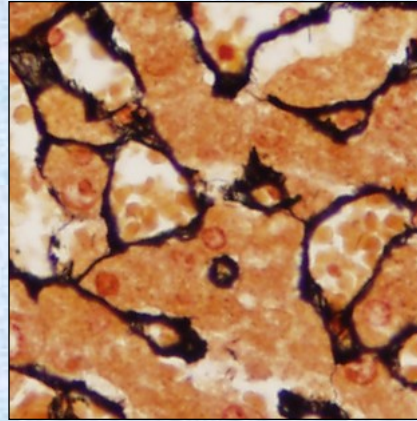
Odvodnění před zamontováním, význam projasňování řezů

Montování do kanadského balzámu ředěného xylolem



## Barvení v histologii

Hematoxylin a eosin (HE)  
Trichrom podle Malloryho  
Van Giesonovo barvení  
Metoda podle Giemsy



Identifikace specifických struktur  
(kolagen, elastická vlákna, sekrety, pigmenty atd.)

Speciální /selektivní barvení	identifikované struktury/ komponenty
Van Gieson	kolagen, hladký sval
Perls	železo
Hall	žluč
Schmorl	melanin
Mucicarmín	muciny
PAS	glykogen, kys. mukopolysacharidy
Bodian	axony
Luxol fast blue	myelin

## Diagnostické postupy v histopatologii

Založeny na mikroskopickém vyšetření

Histopatologické diagnózy versus etiologické diagnózy

Čím je výsledek histopatologického vyšetření limitován:

determinace patogenních agens / etiologie lezí;

souvztažnost jevů, versus „počítačové diagnózy“

