

Praktikum z histologie a embryologie

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)

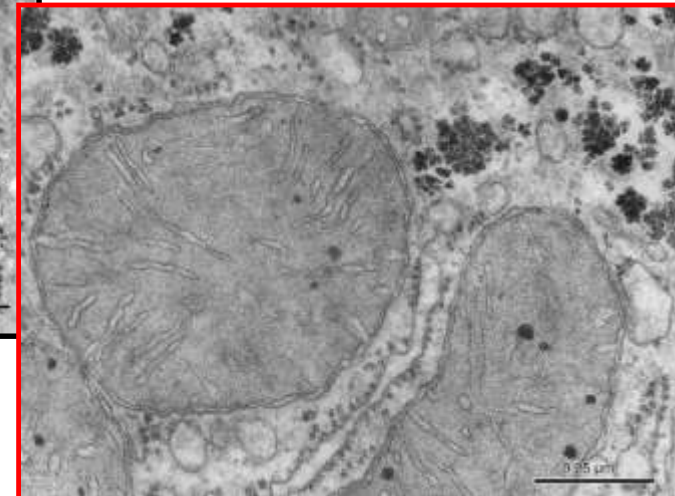
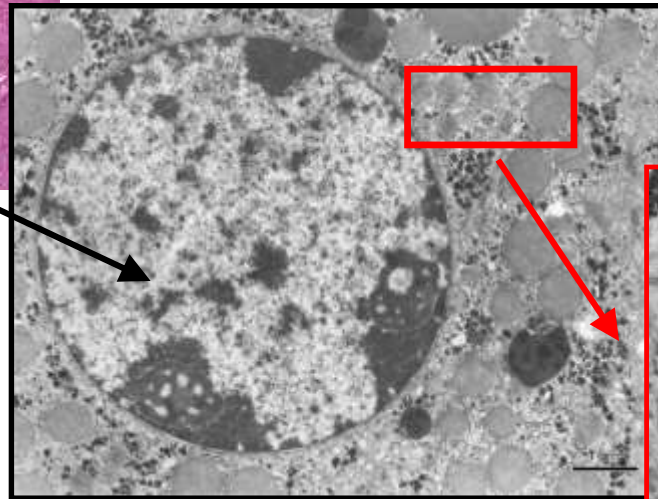
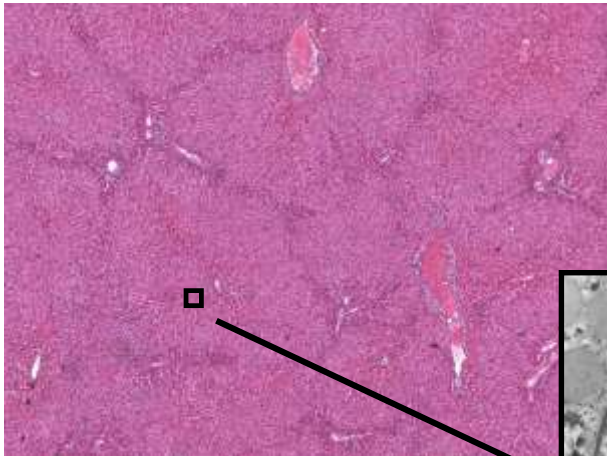
organogeneze (vývoj orgánů v jednotlivých systémech)

- **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 – $\sim 0,1$ mm
- Rozlišovací schopnost SM – $\sim 0,5$ μm
- Rozlišovací schopnost EM – $\sim 1,5$ 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 mm³**, 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.

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

- organická** – ALDEHYDY – formaldehyd (*LM*)
 - 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, 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: ($1 \text{ cm}^3 : 20 - 50 \text{ cm}^3$)

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 mediem, které se mísí s parafinem – benzen nebo 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

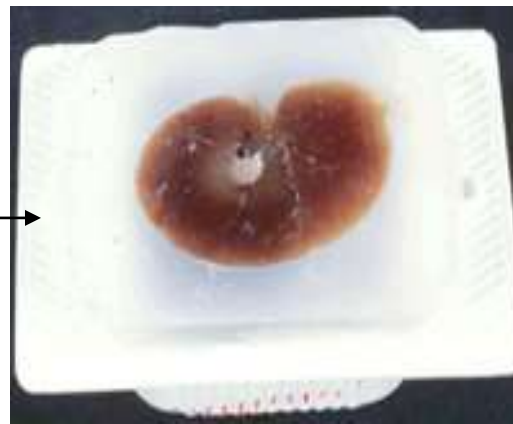
Zalévací komůrky - **papírové**



- **kovové** s orientačními plastovými prstenci

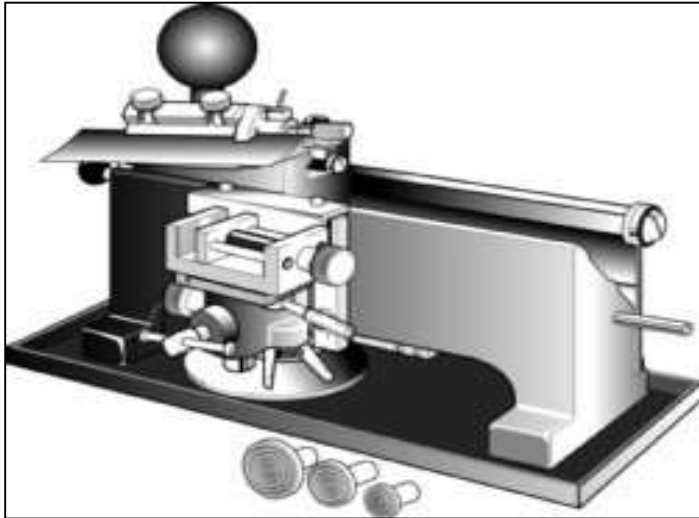


výsledek zalití



KRÁJENÍ

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

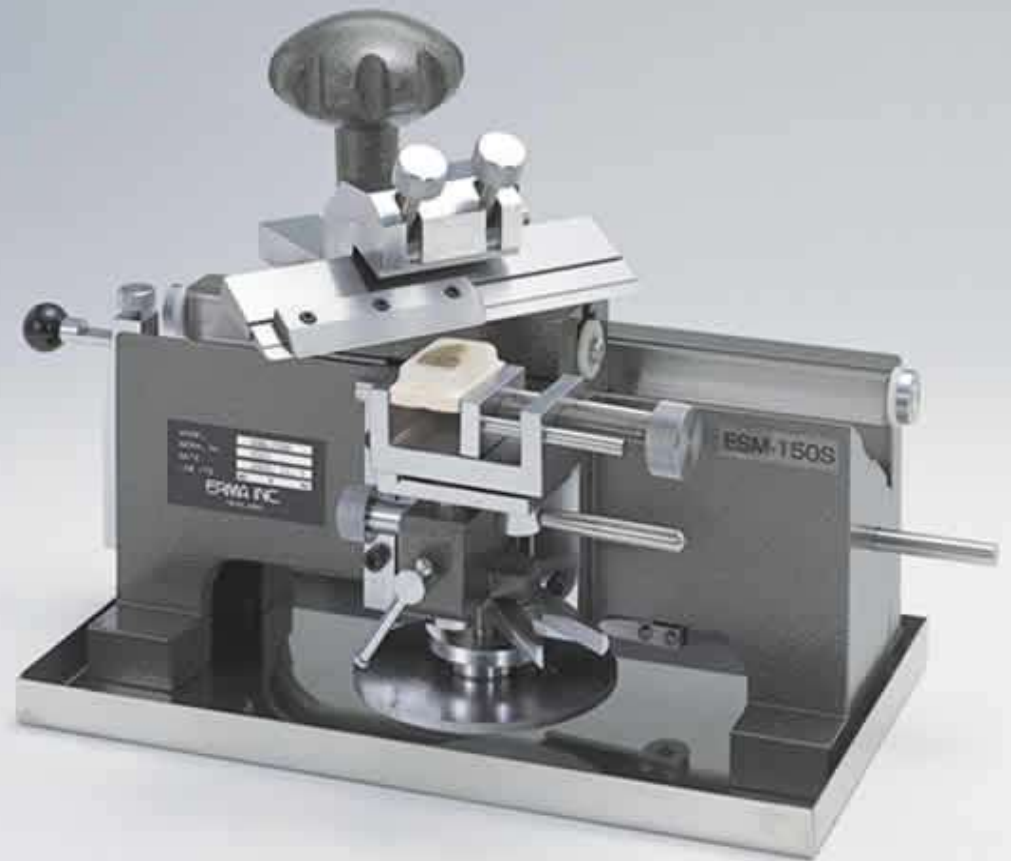


Sáňový mikrotom – blok je upevněný v držáku, nůž nebo břitva se pohybuje horizontálně



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

Sáňový mikrotom

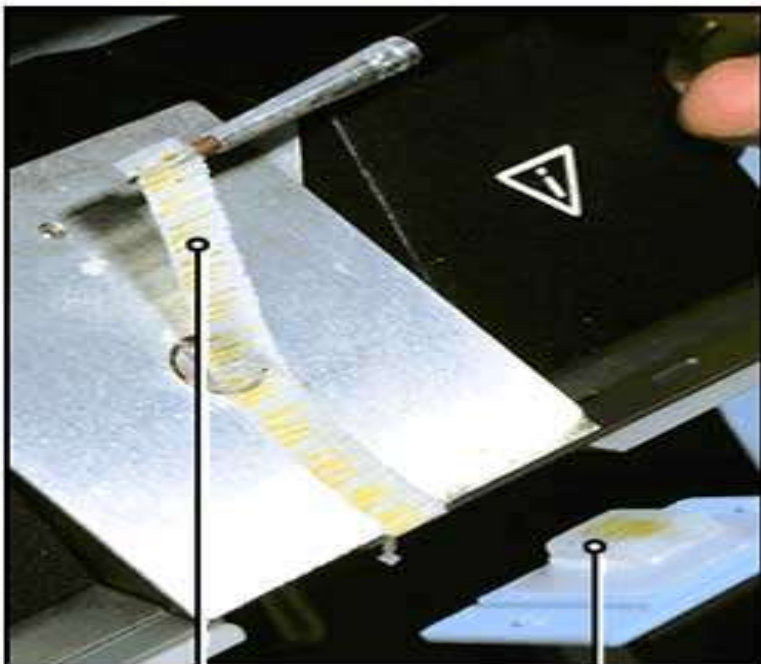


Rotační mikrotom



kryostat

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



páska řezů

parafinový bloček



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).



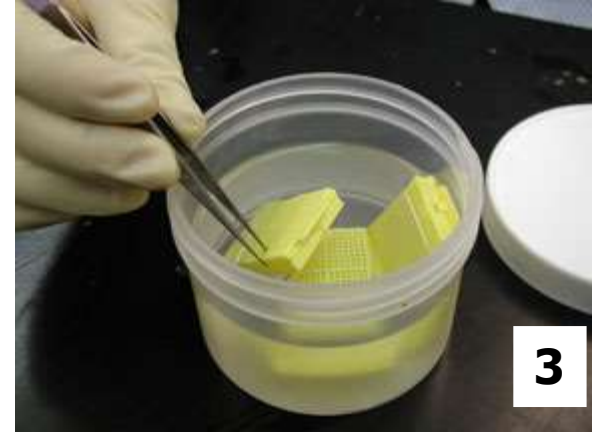
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv.
Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylénem.



1



2



3



4



5



6



7



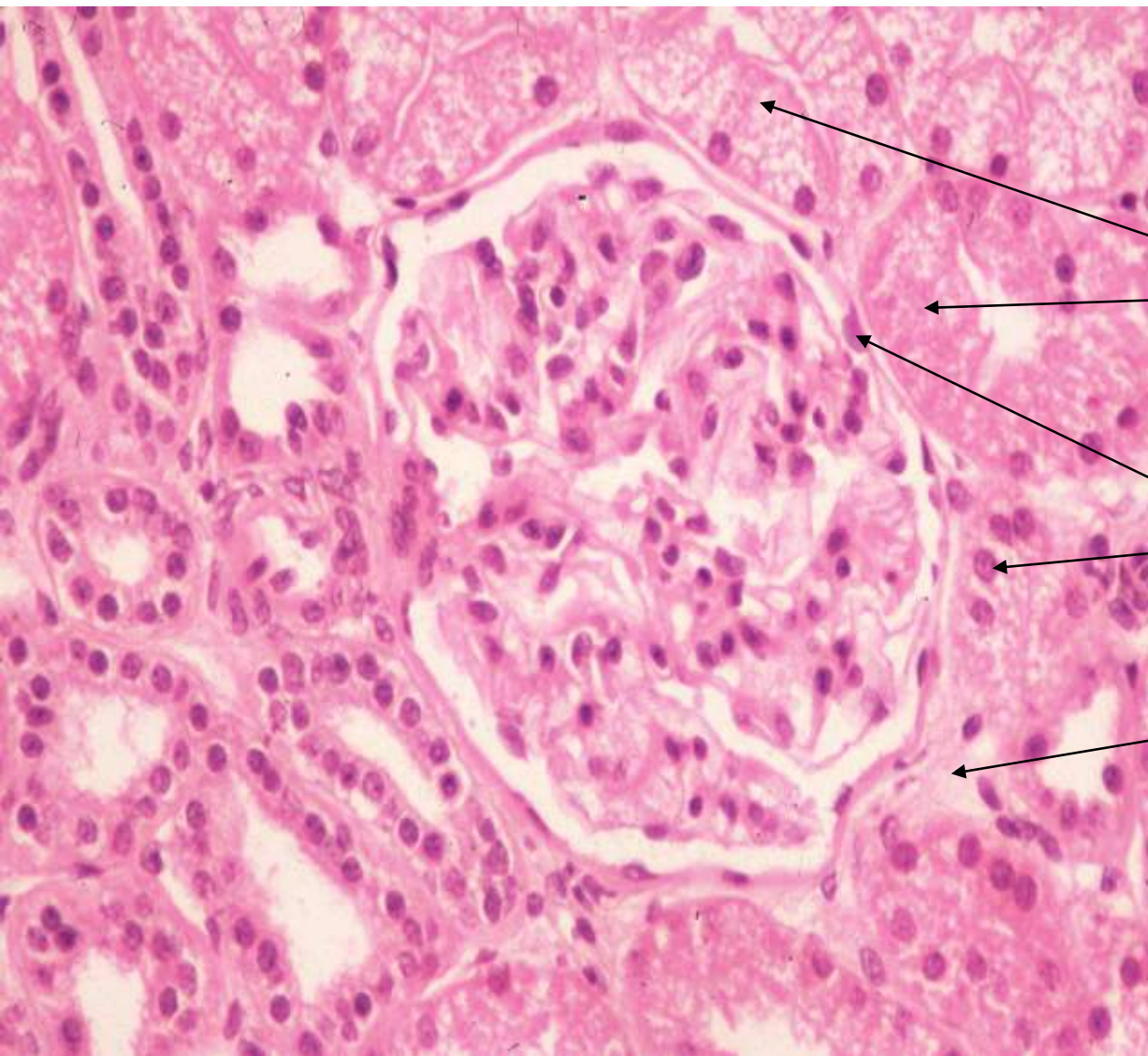
8

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**- buněčné struktury sa barví stejnou barvou, jakou má barvivo (HE)
- **METACHROMAZIE**- buněčné 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)

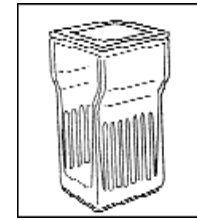
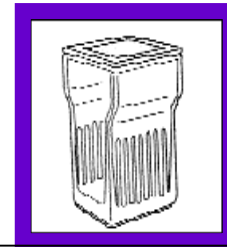
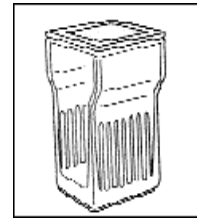
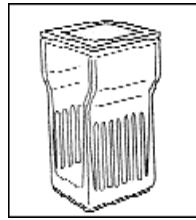
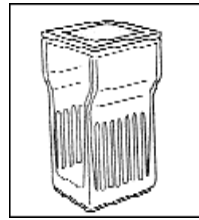
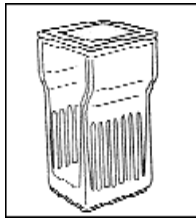
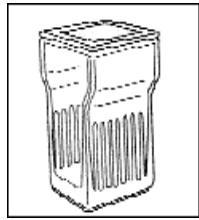
deparafinace

rehydratace

praní

barvení

diferenciace



xylén I

xylén II

100%
etanol

96%
etanol

H₂O

hematoxylin

kyselý
etanol

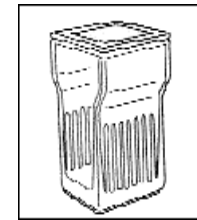
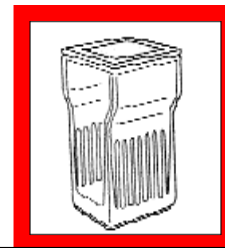
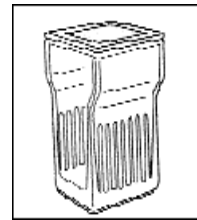
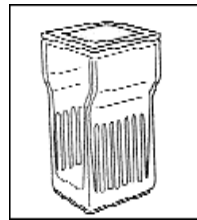
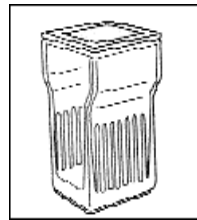
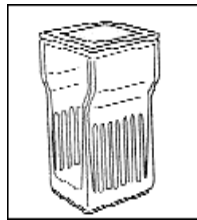
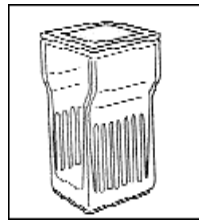
projasnění

dehydratace

praní

barvení

praní



xylén IV

xylén III

100%
etanol

96%
etanol

H₂O

eosin

H₂O

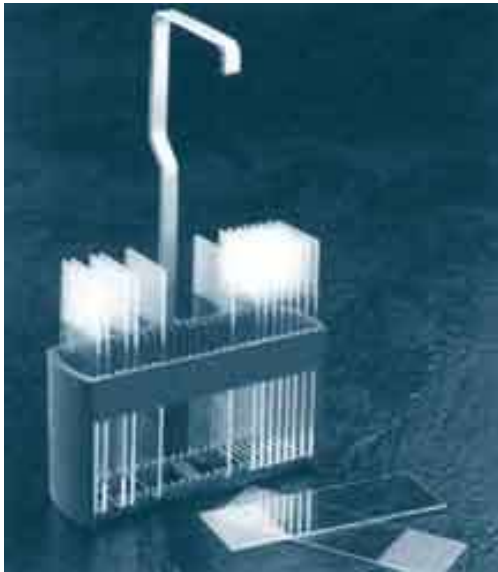
RUTINNÍ BARVENÍ: HEMATOXYLIN EOSIN (HE)



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

≈

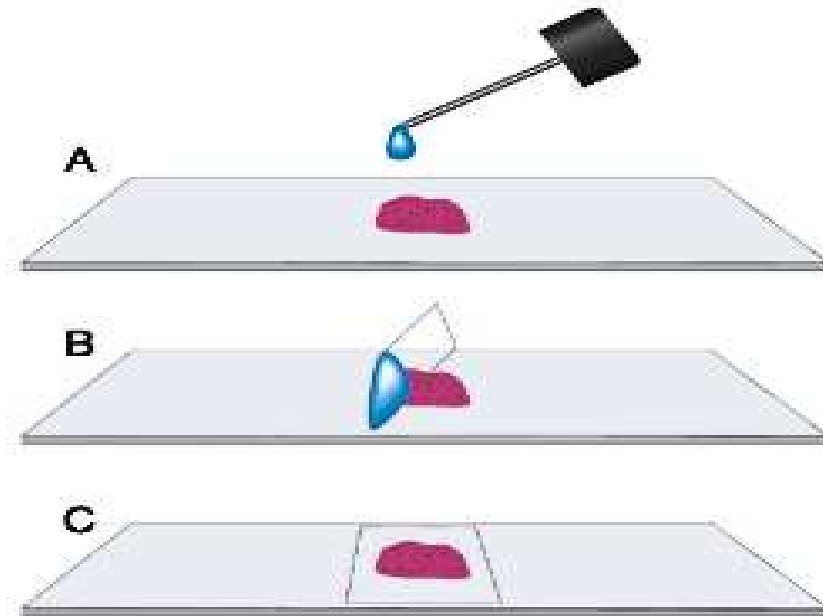
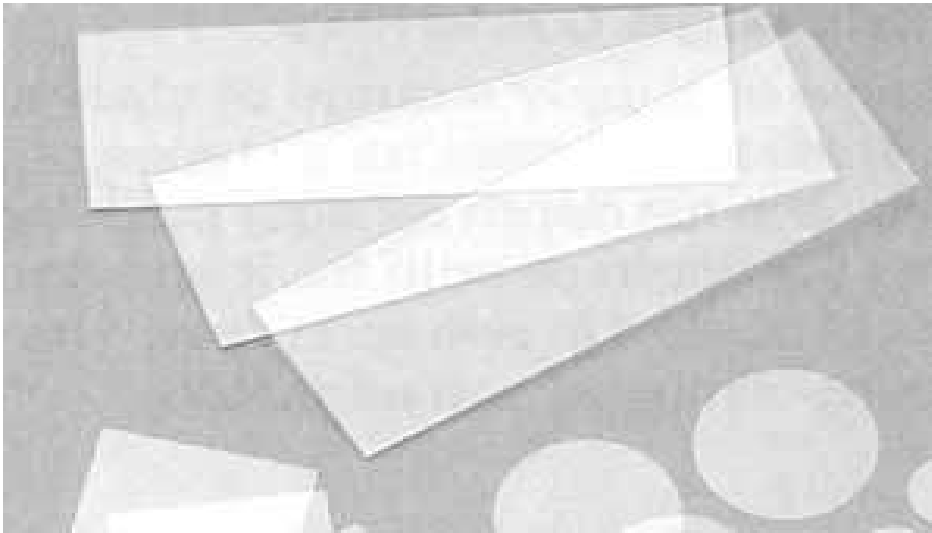


- **Leica ST 4040** Lineární barvicí automat - velkokapacitní barvení vzorků jedním programem (např. H&E až 1000 skel).



MONTOVÁNÍ

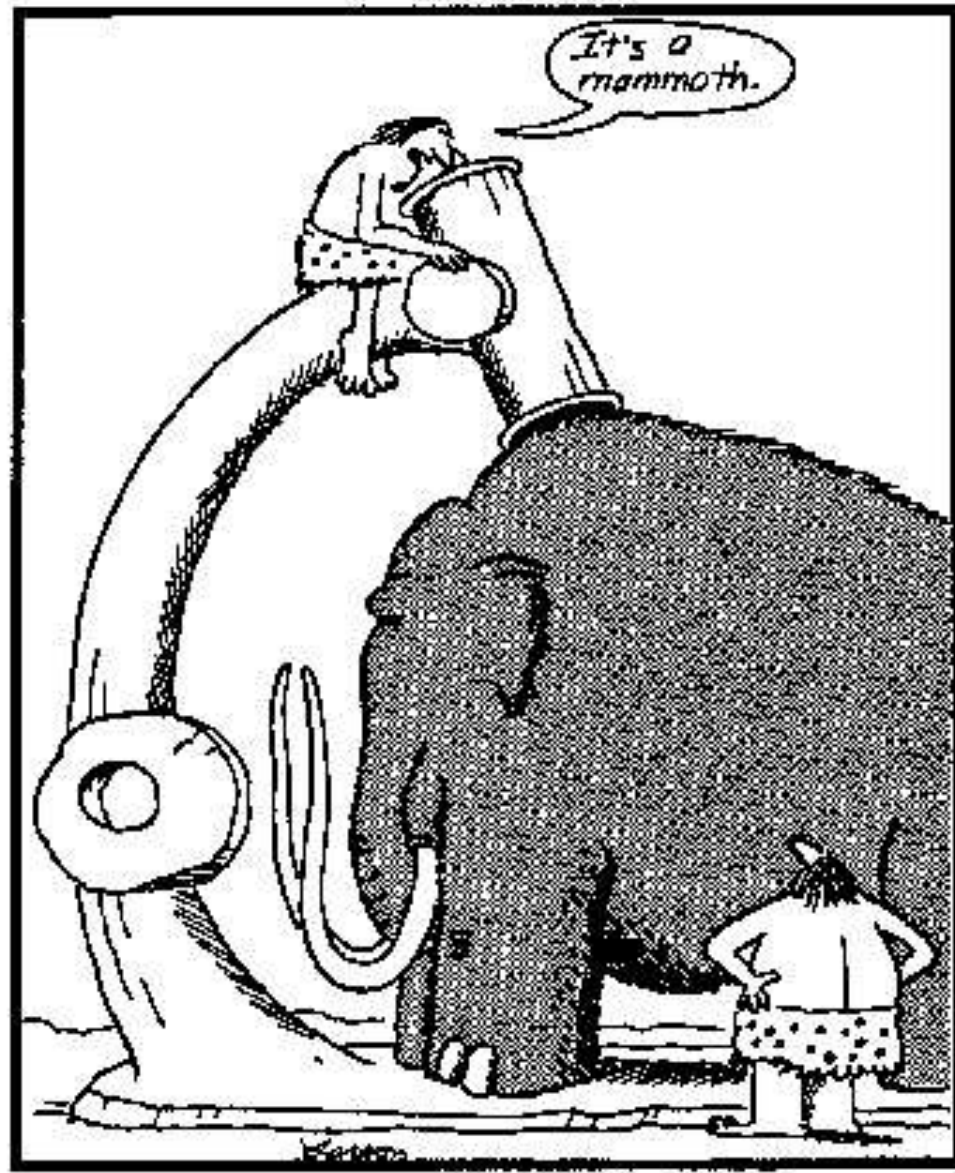
- uzavření preparátu – kapkou montovacího media a krycím sklíčkem ⇒ trvalý preparát



- 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 – AgNO₃ (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*

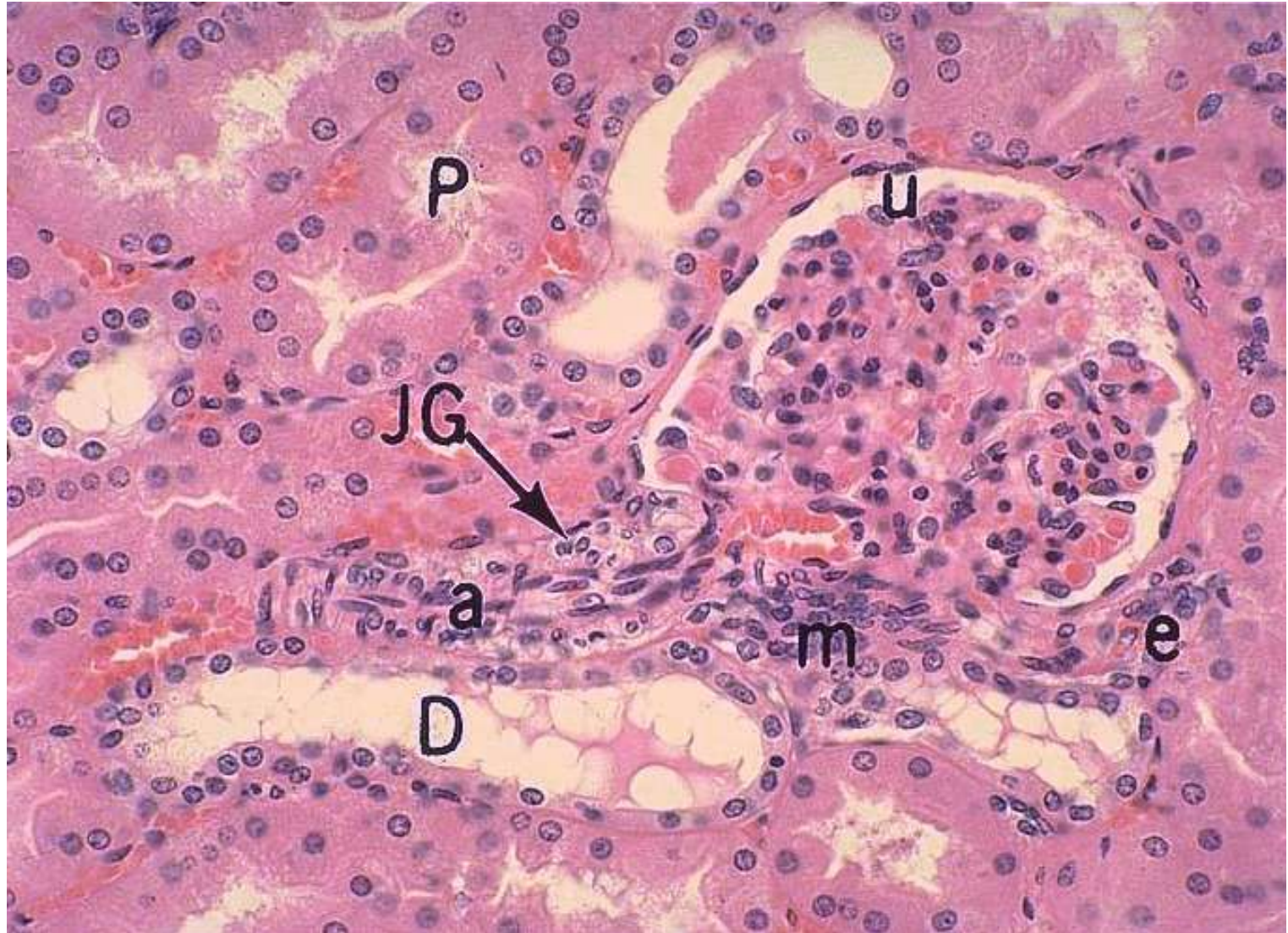
jádra – červená

erytrocyty – oranžové

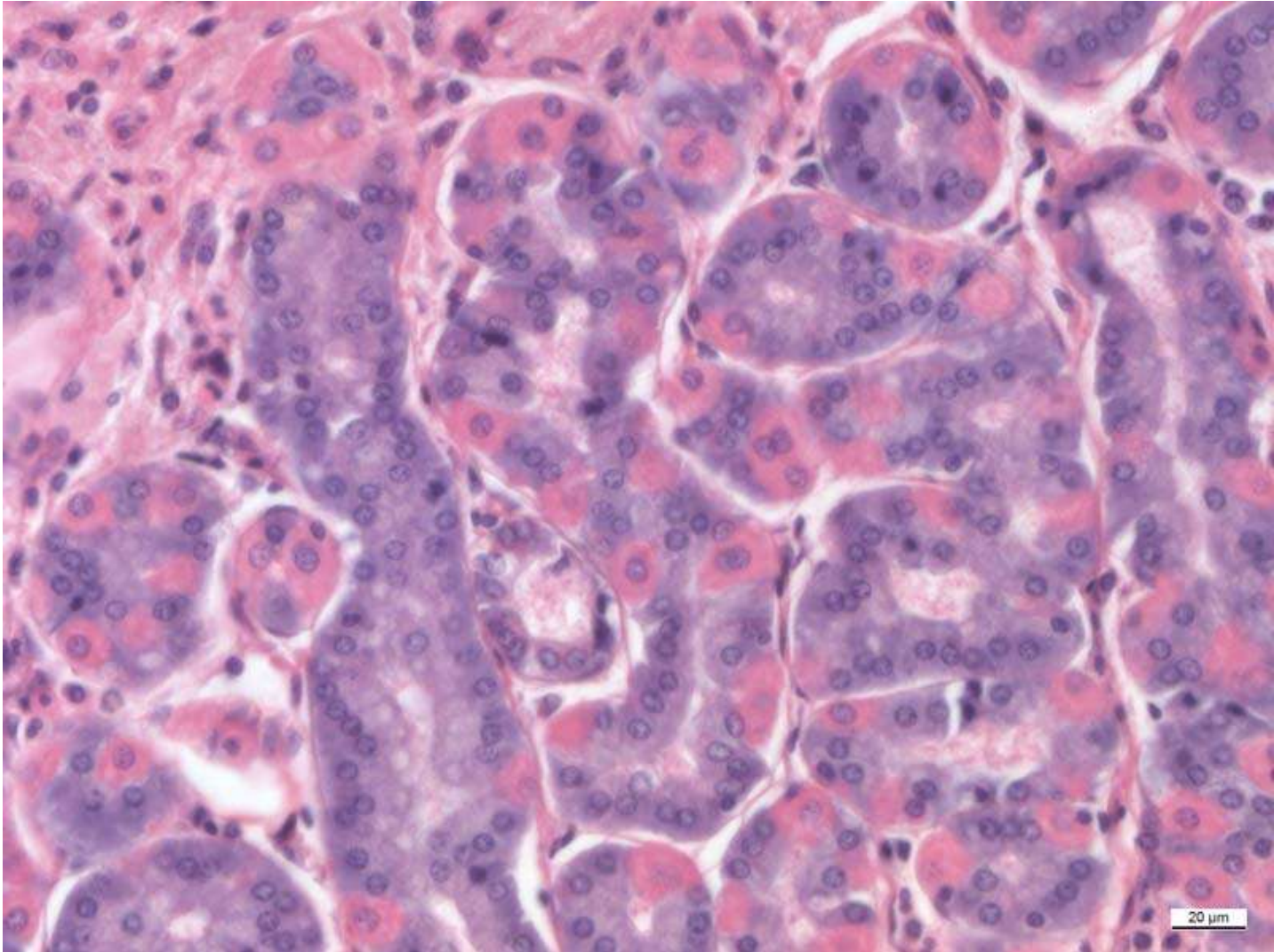
svalová tkáň – červená

kolagenní vlákna – modrá

Hematoxylin a eosin (HE)



basofilní x acidofilní cytoplazma



fundus ventriculi

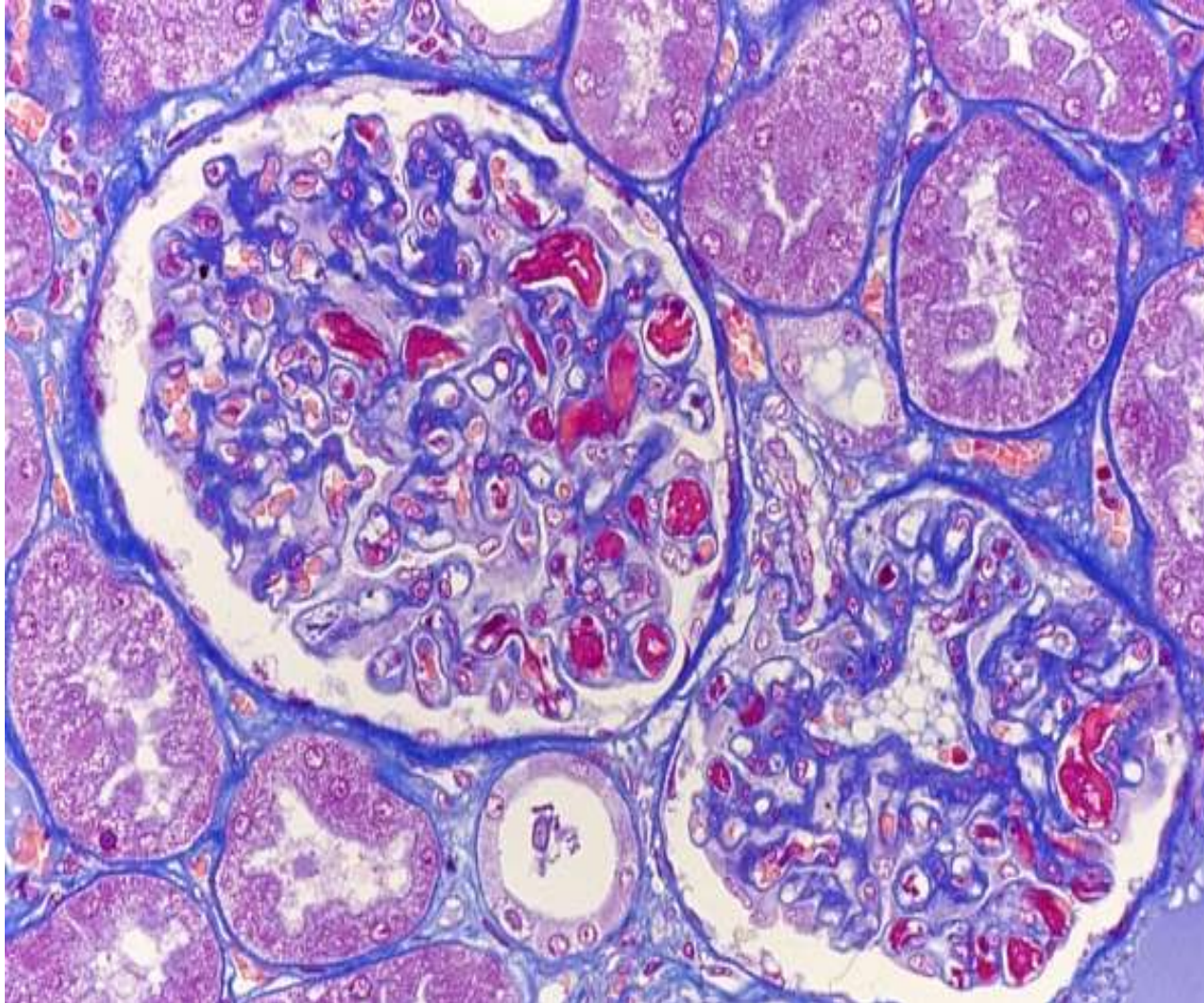
Hematoxylin, eosin a šafrán (HEŠ)



chrupavka

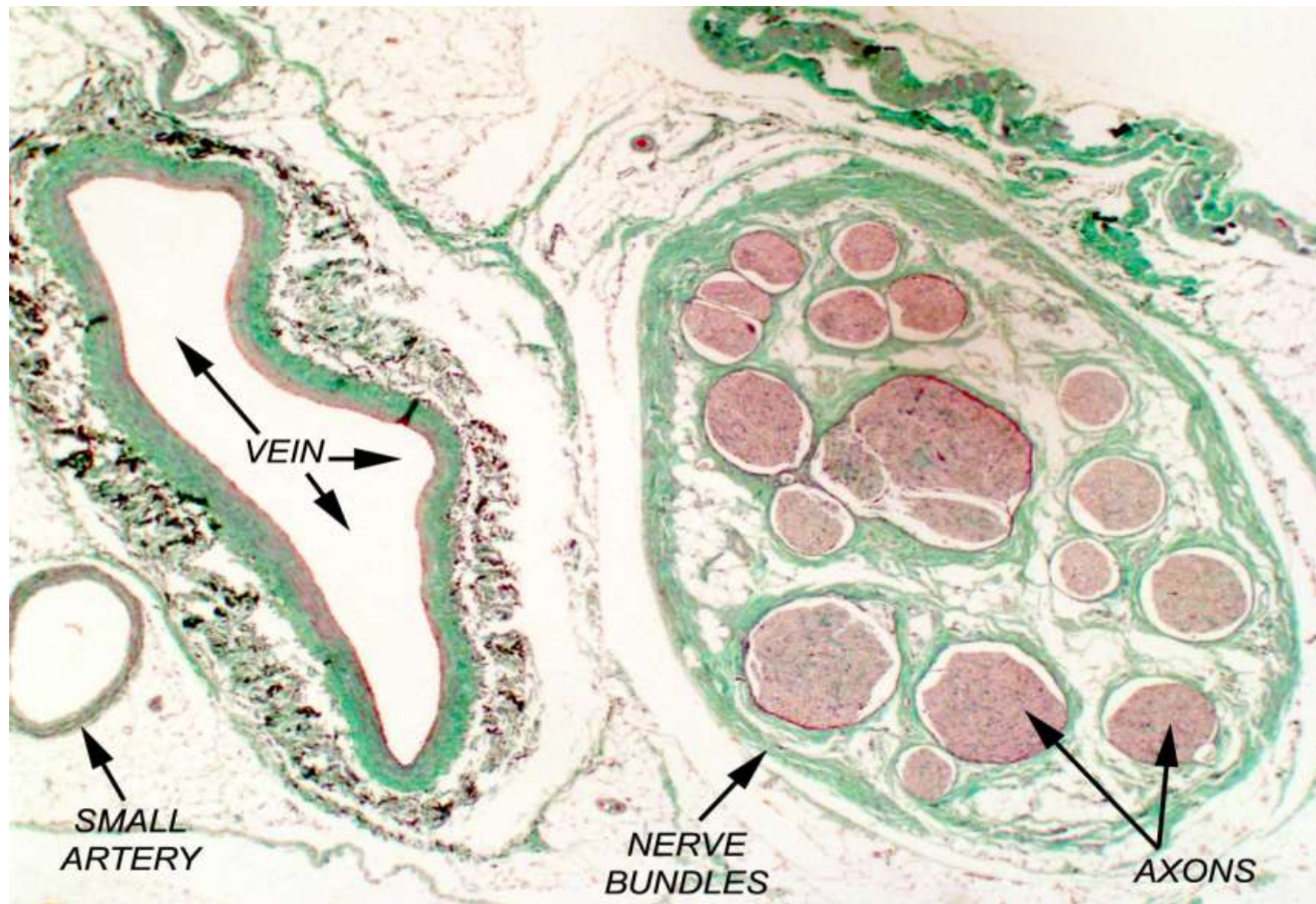
kolagenní vlákna žlutá

Azokarmín a anilin. modř (AZAN)



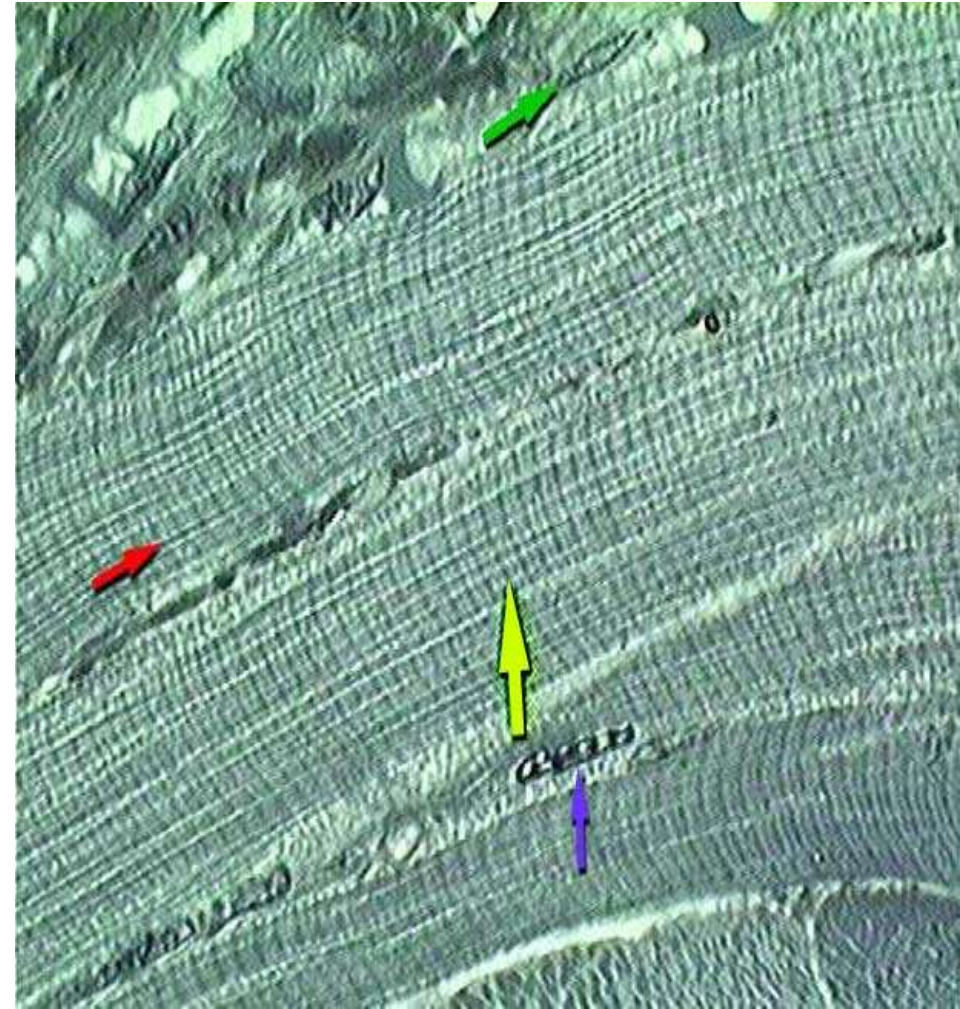
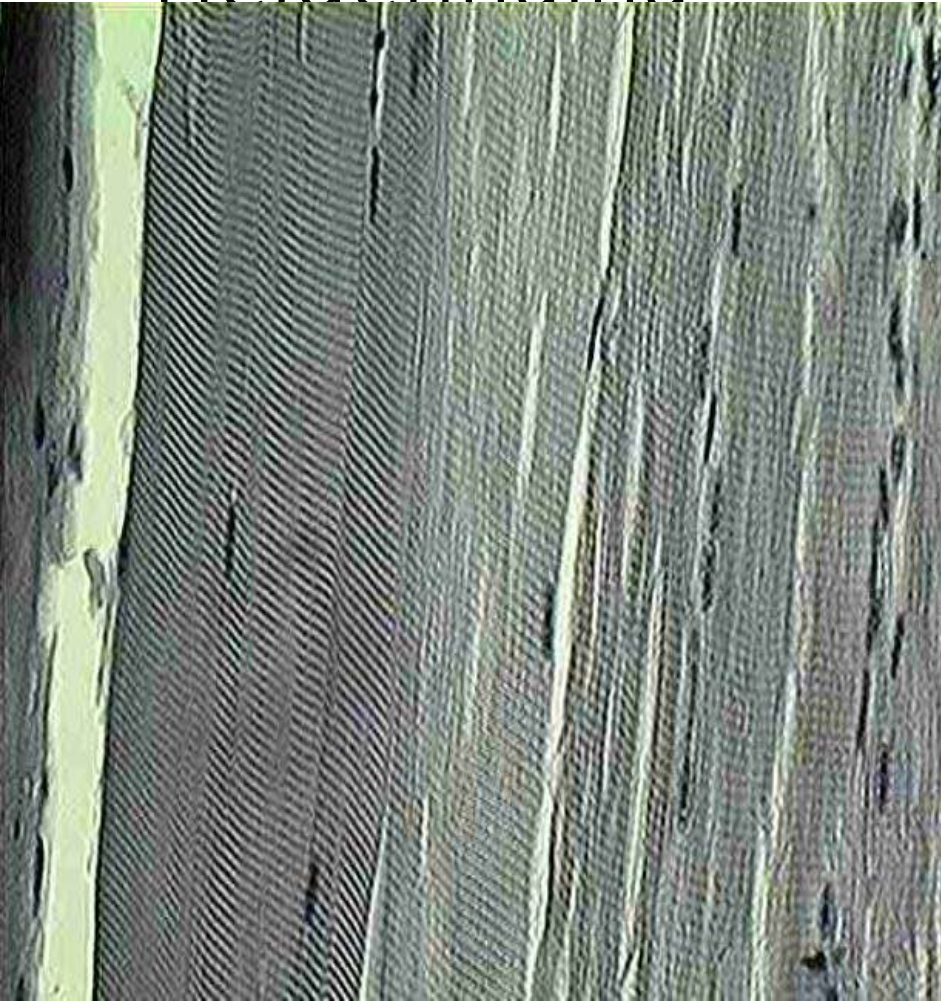
kolagenní vlákna modrá

Zelený trichrom



kolagenní vlákna zelená

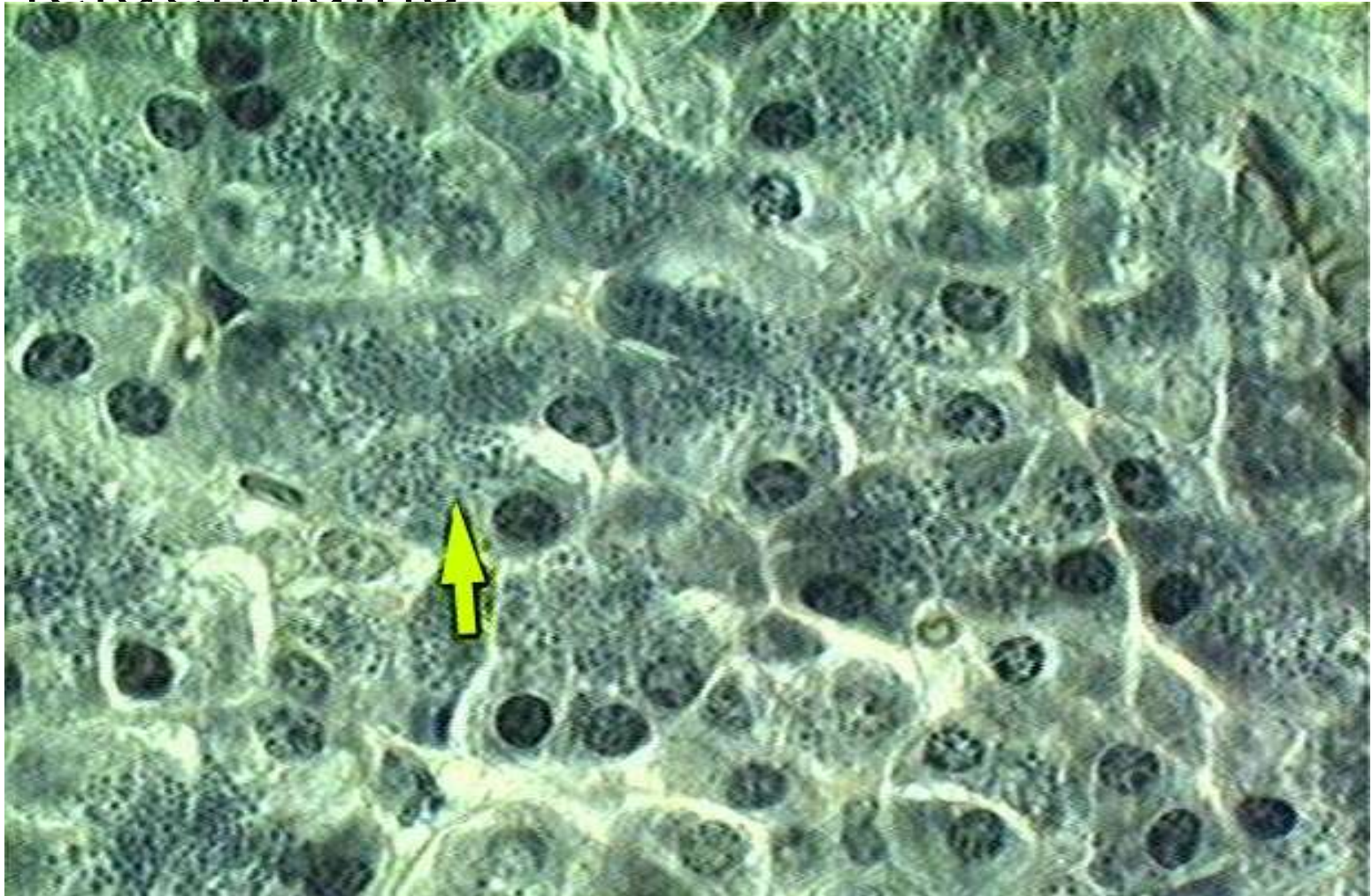
Cytologická barvení – podle Heidenhaina



kosterní svalová tkáň

železitý hematoxylin

Cytologická barvení – podle Heidenhaina

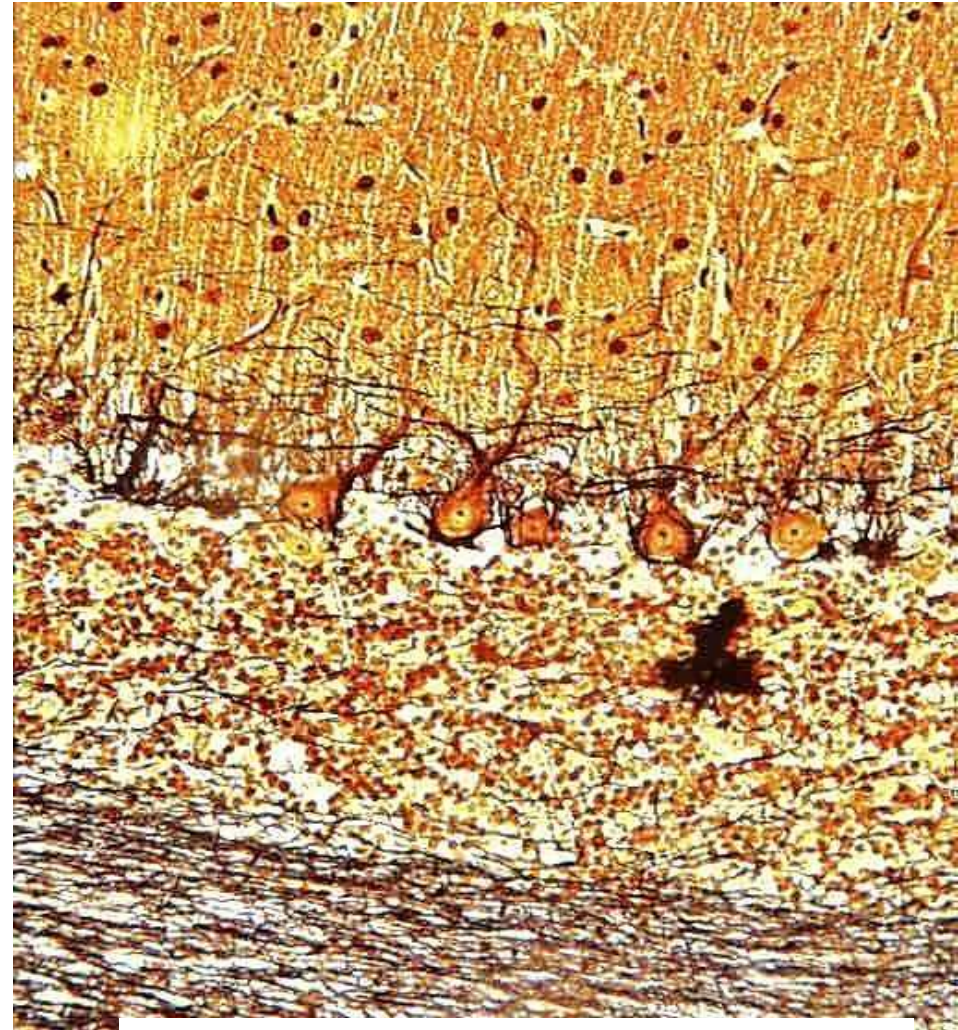


mitochondrie v hepatocytech

Impregnace „stříbrem“



slezina – retikulární vlákna

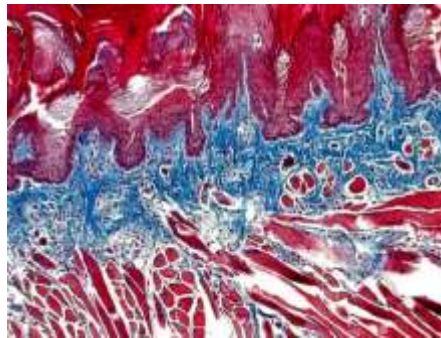
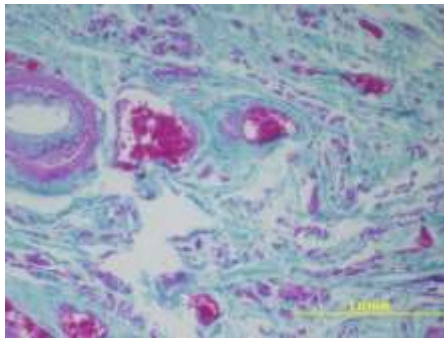


cerebellum – nervová vlákna

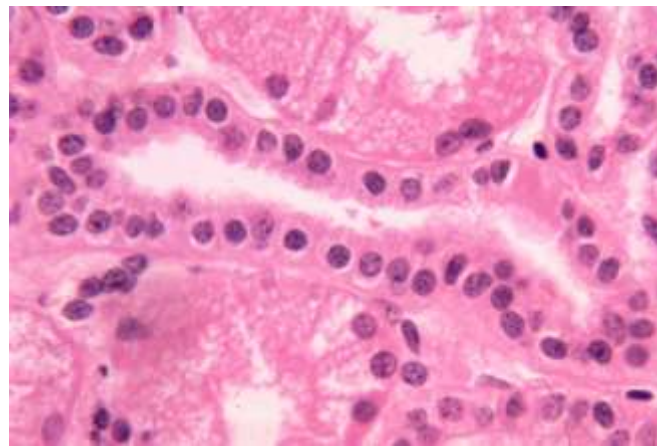
Barvicí metody:

přehledné – HE, AZAN

demonstrují všechny složky tkání

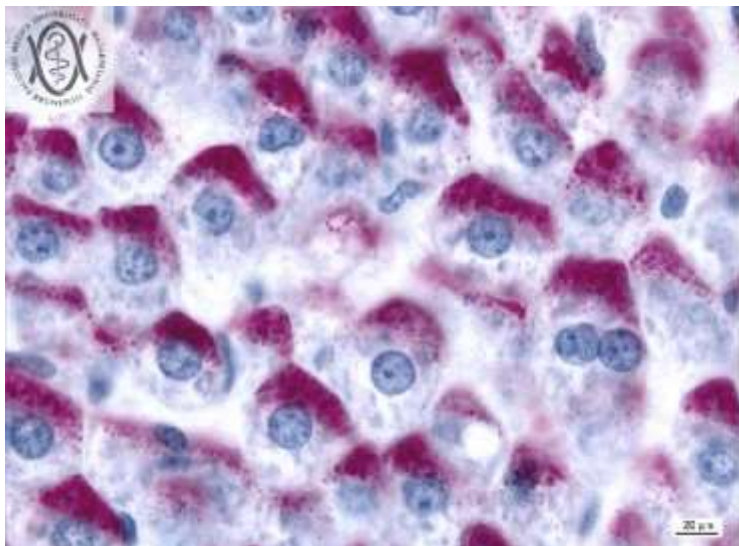


HE – nejpoužívanější barvení

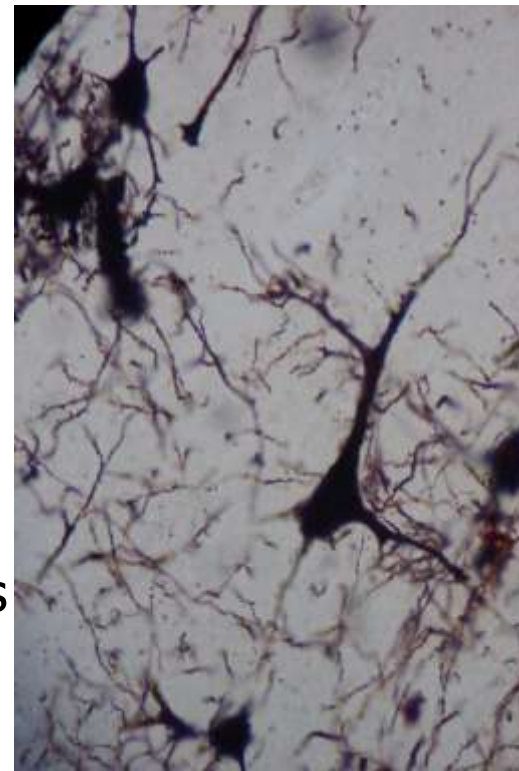


speciální

zdůrazňují určité buněčné nebo tkáňové složky



impregnační
soli Ag, Au nebo Os



Zpracování tvrdých tkání (zub, kost)

- dekalifikace (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

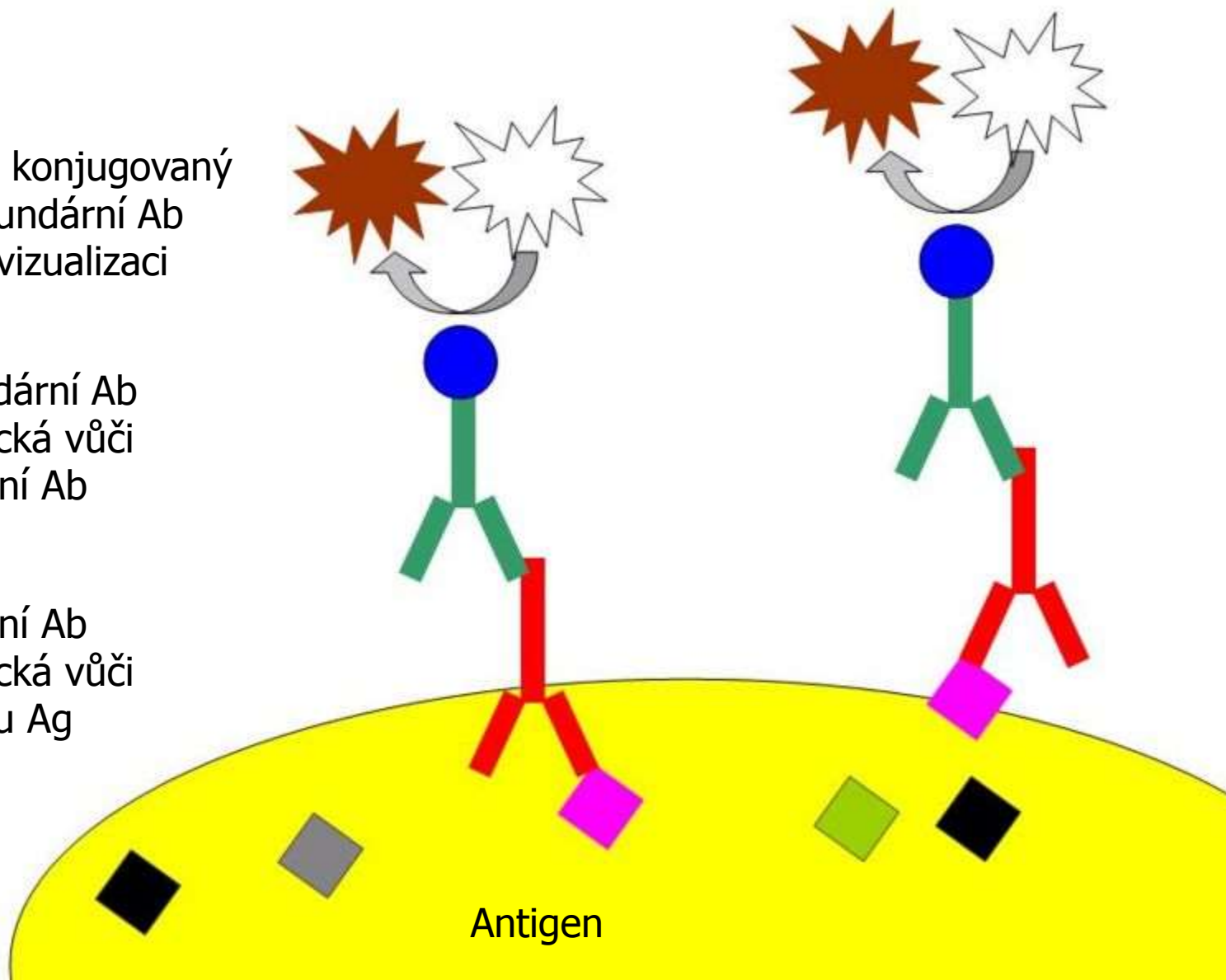
2. enzymy – křenová peroxidáza, AF, acetylcholinesteráza,

3. radioizotopy (I^{125})

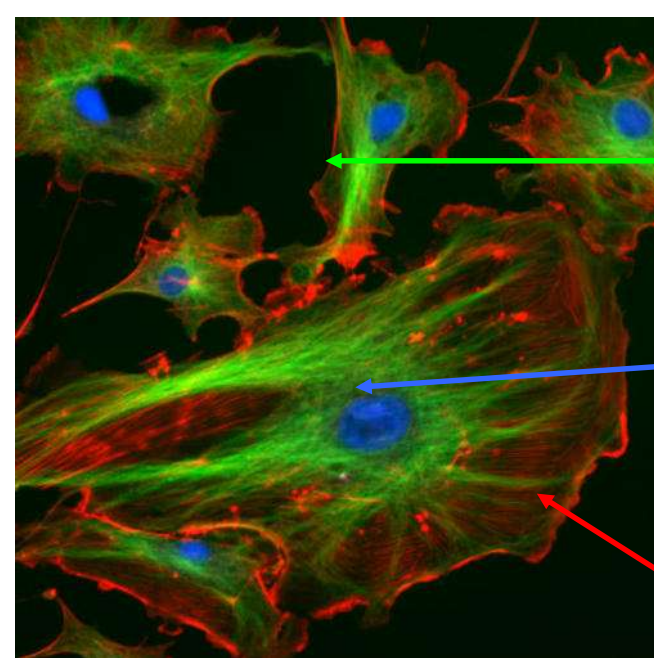
Enzym konjugovaný
se sekundární Ab
zajistí vizualizaci

Sekundární Ab
specifická vůči
primární Ab

Primární Ab
specifická vůči
epitopu Ag



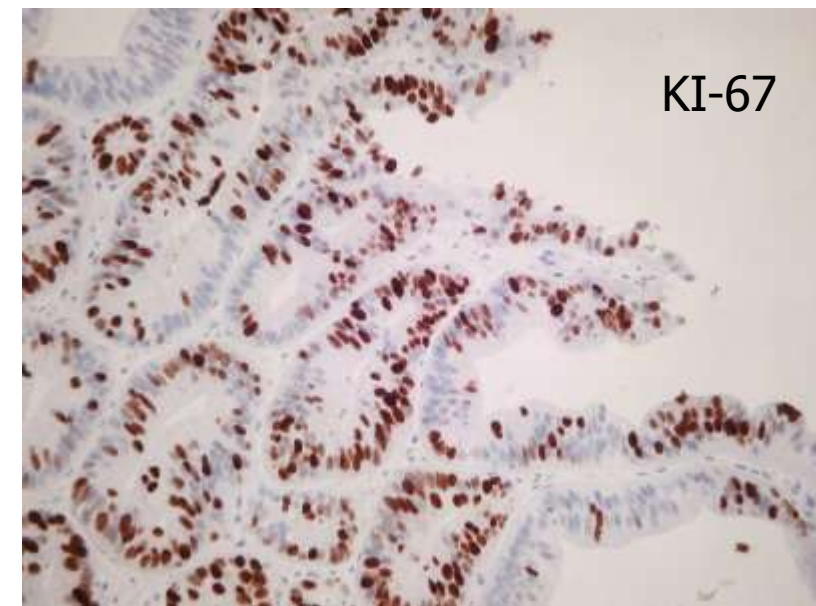
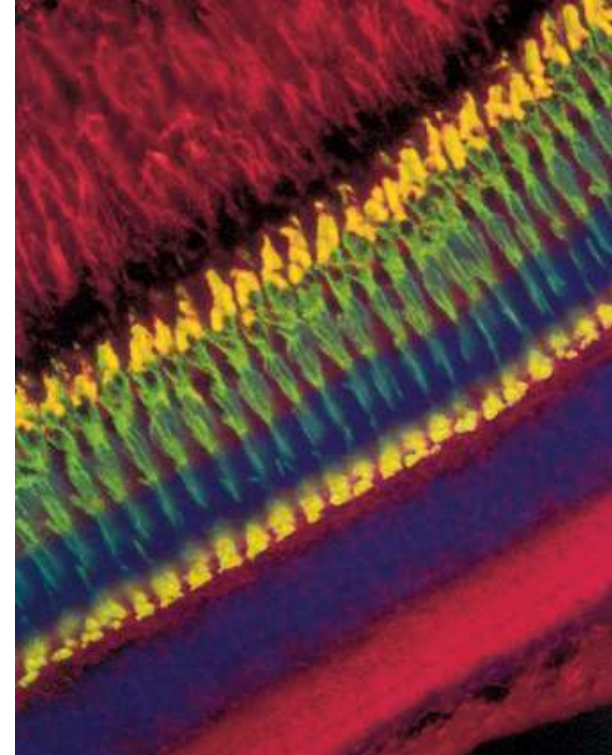
Antigen



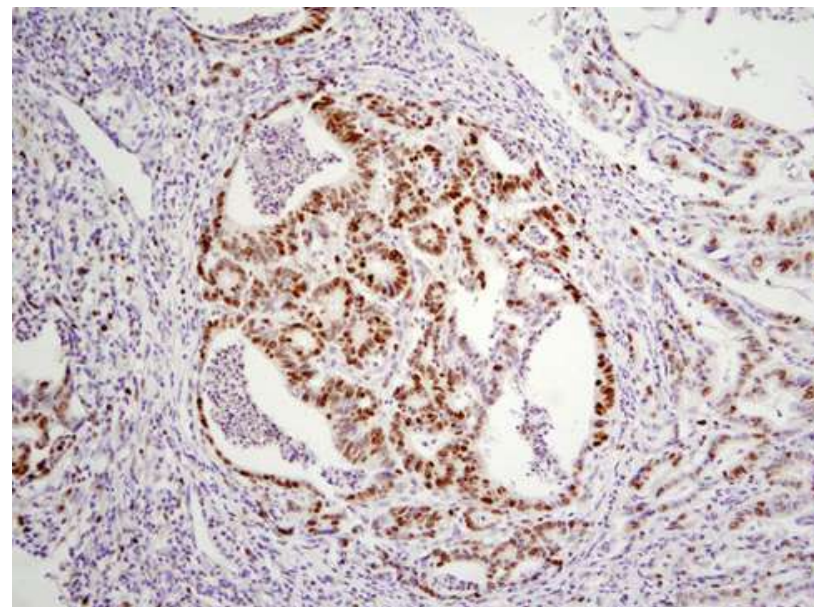
Aktin (cytoskelet)

DAPI (jádno)

Mikrotubuly (cytoskelet)

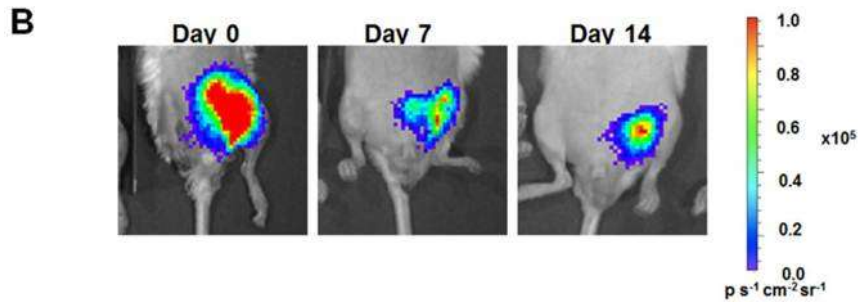
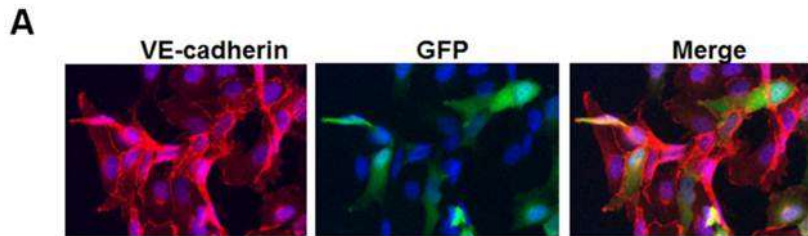


KI-67



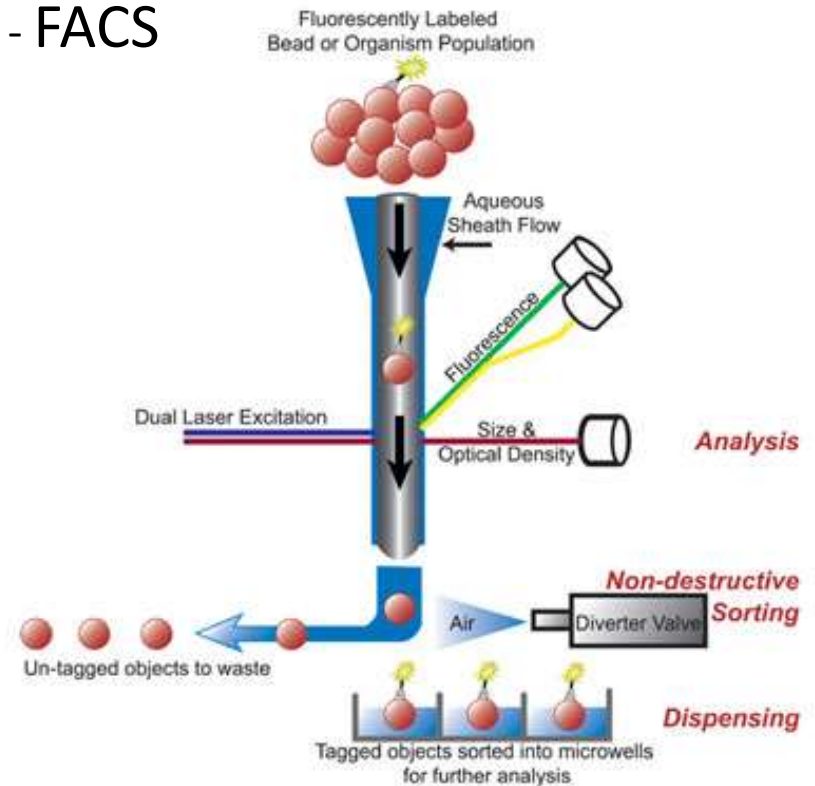
In-vivo/live cell imaging

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

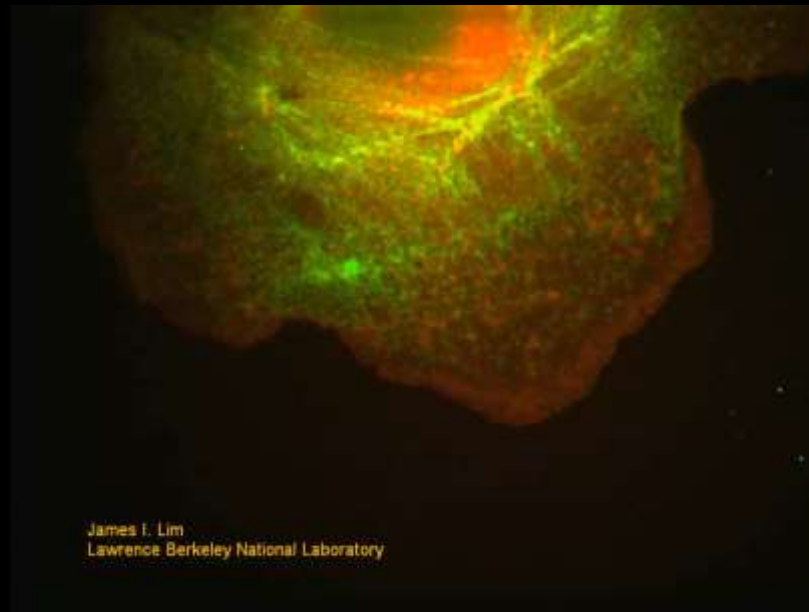
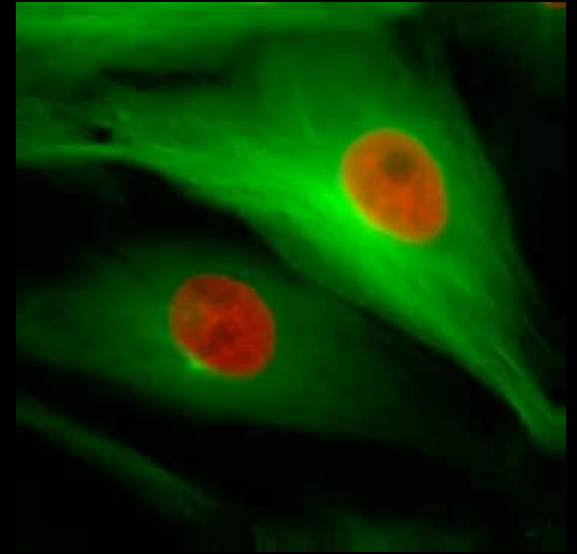
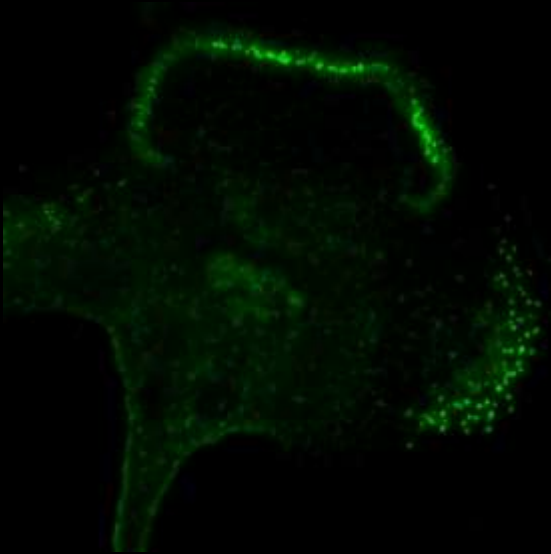


doi:10.7150/thno.3694

- FACS



- Fluorescenčně označené proteiny

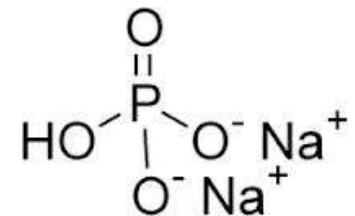
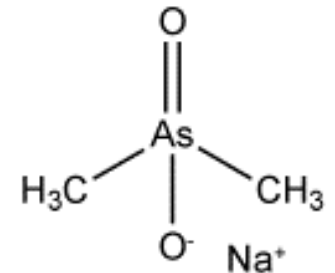


- či buňky a tkáně

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 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:

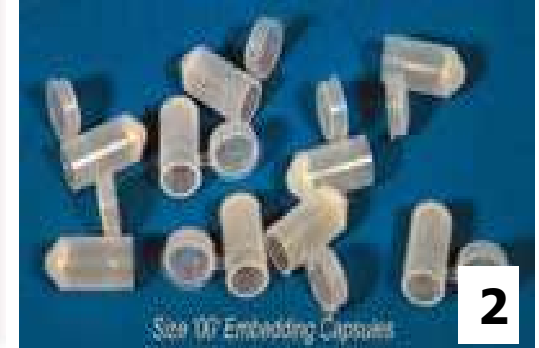
želatinové (1), plastové (2)

nosiče (držáky) kapslí (3)

ploténky s komůrkami
(4, 5)



1



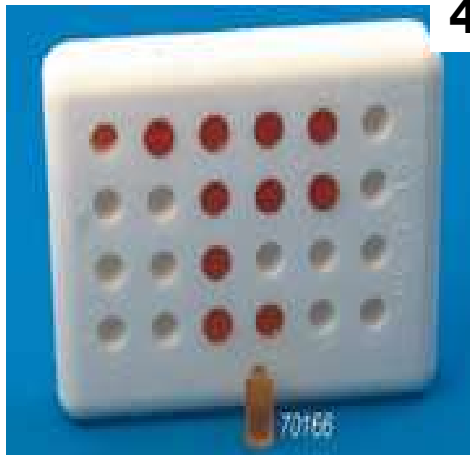
2



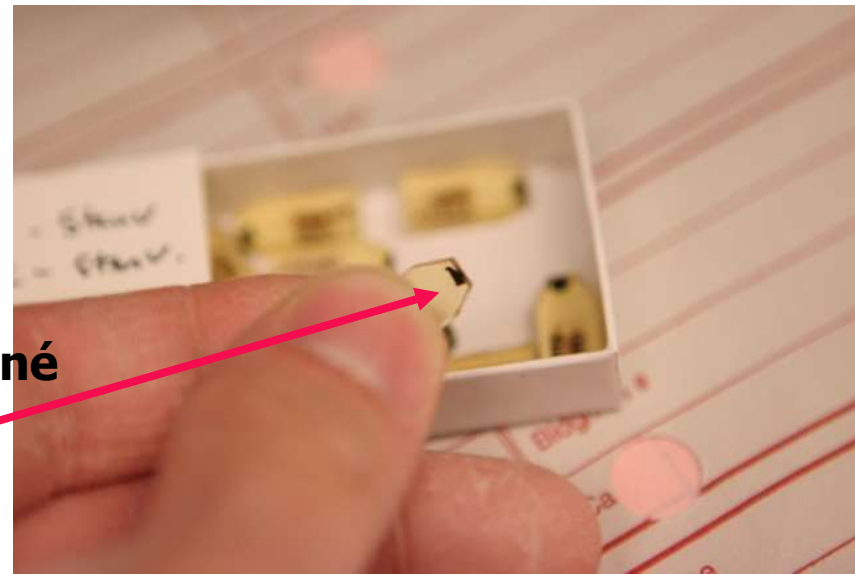
3



4,5



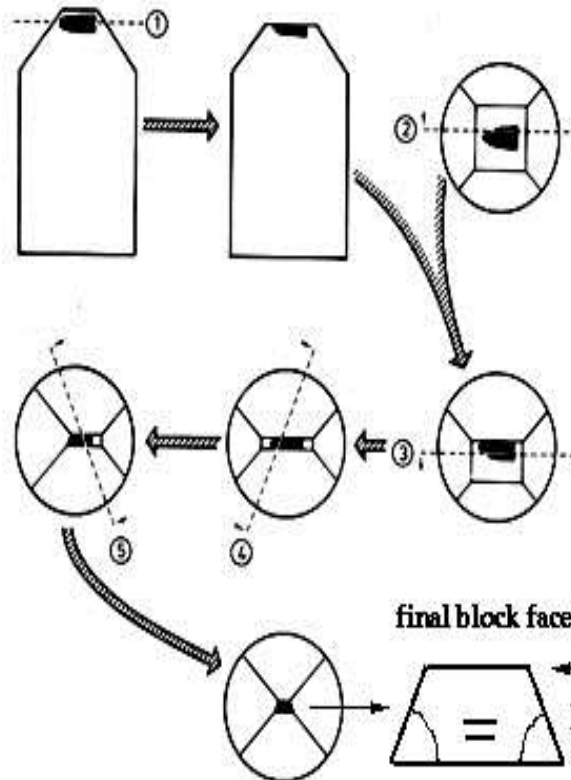
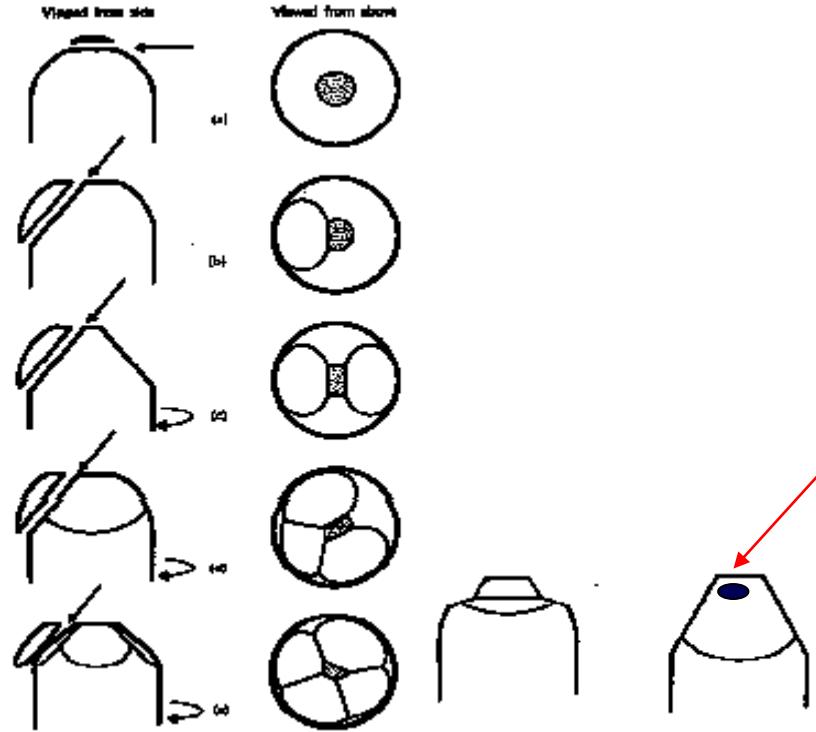
bločky připravené
pro krájení



Úprava pyramid (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)



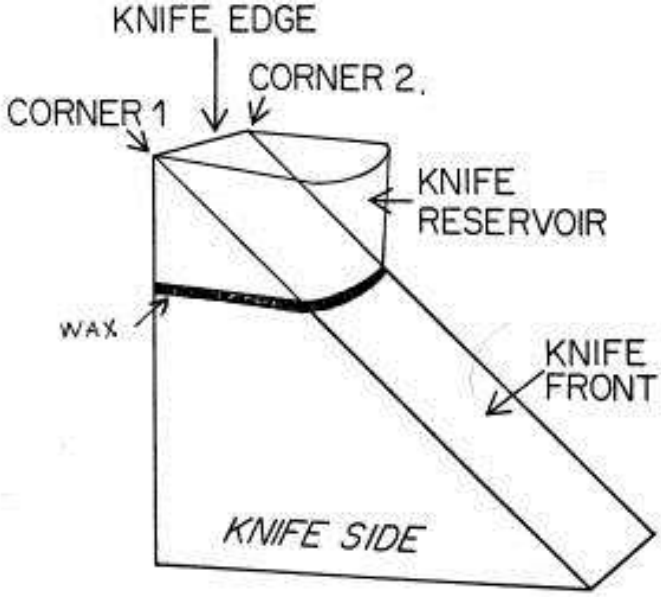
Just Right-Egyptian Pyramid
with top cut off



KRÁJENÍ

- po odstranění přebytku media (trimming) a vytvoření pyramidy se z malé plošky (0.1 mm²) 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)

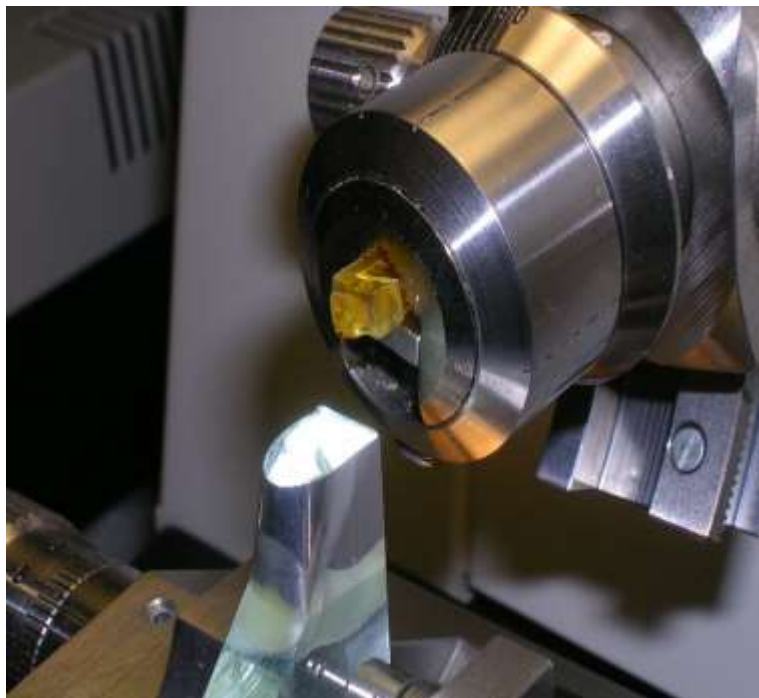




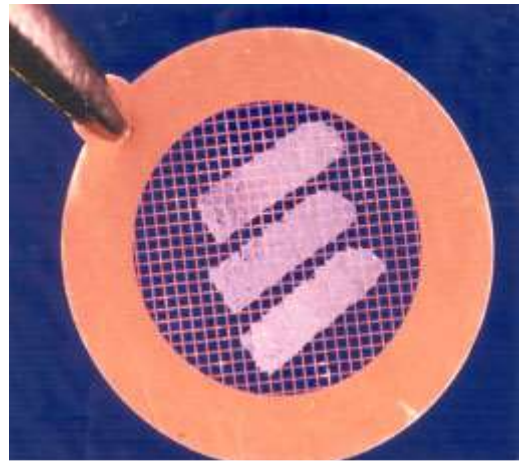
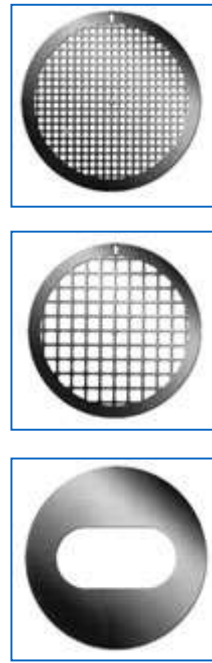
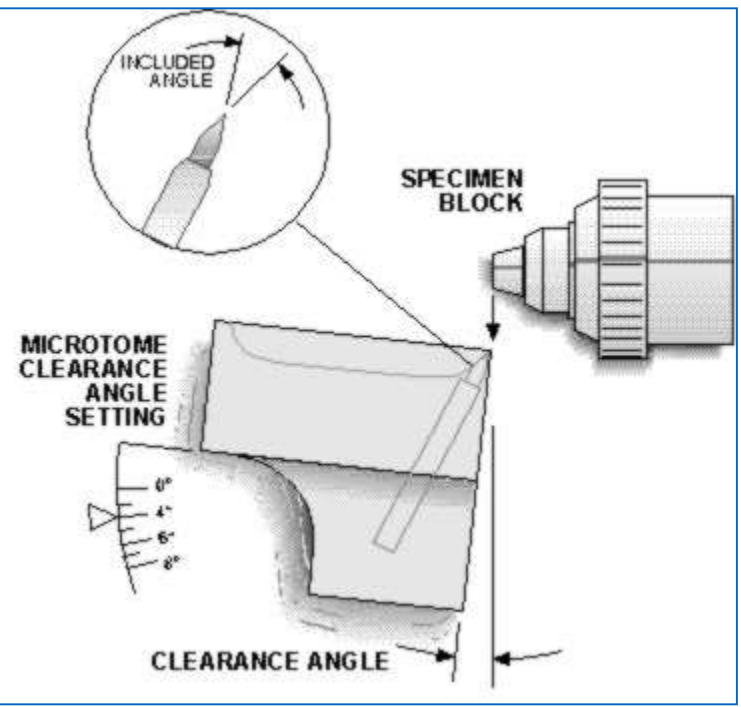
Ultramikrotomové nože:

skleněný

diamantový

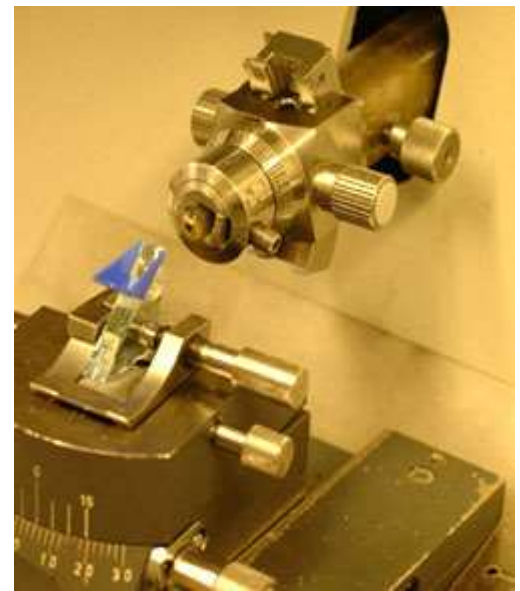
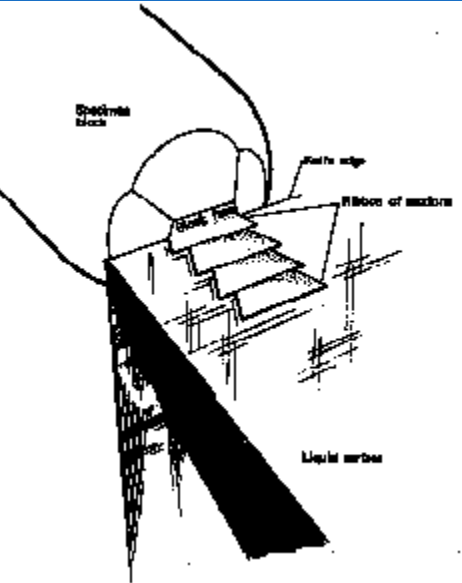
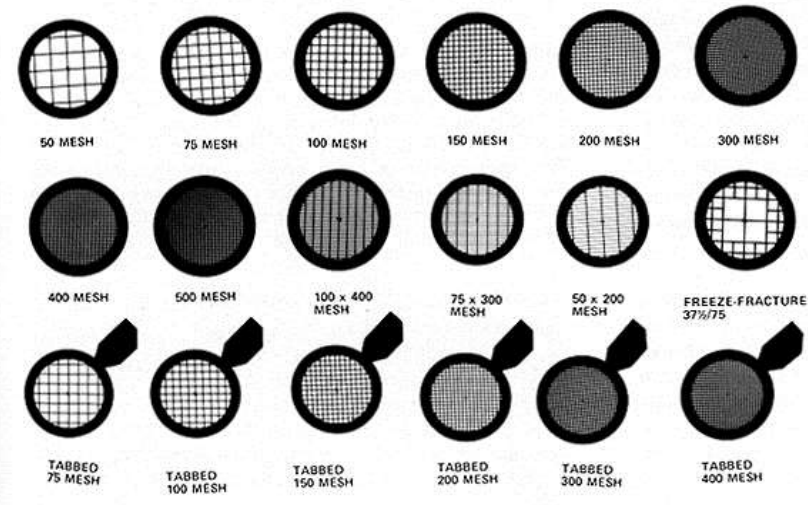


Krájení, nosné sítě



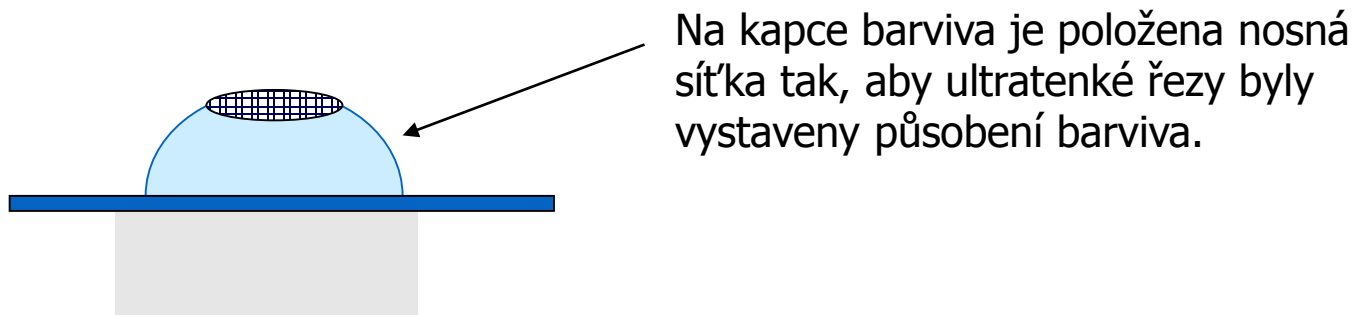
Sítka se 3 páskami řezů

typy sítěk

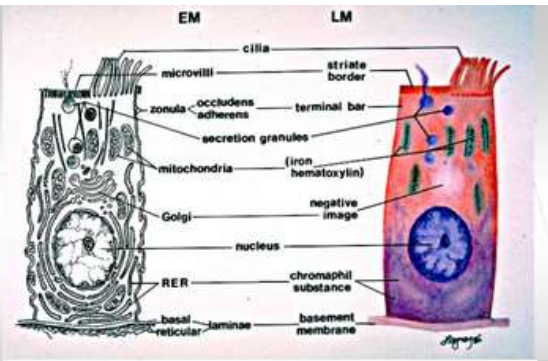


KONTRASTOVÁNÍ

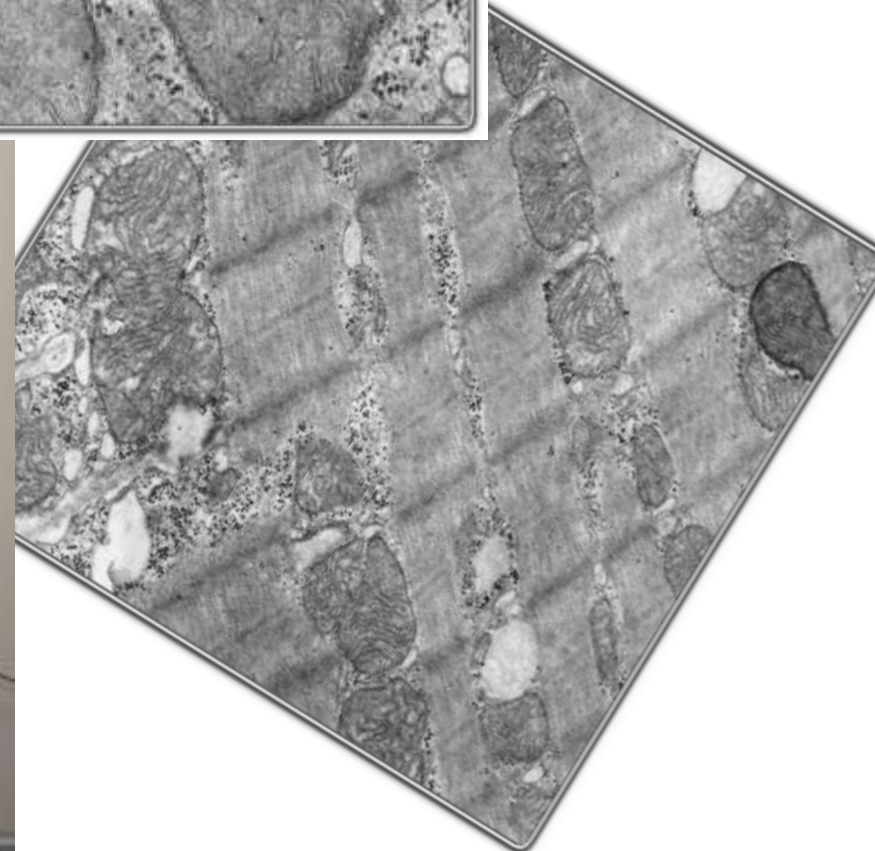
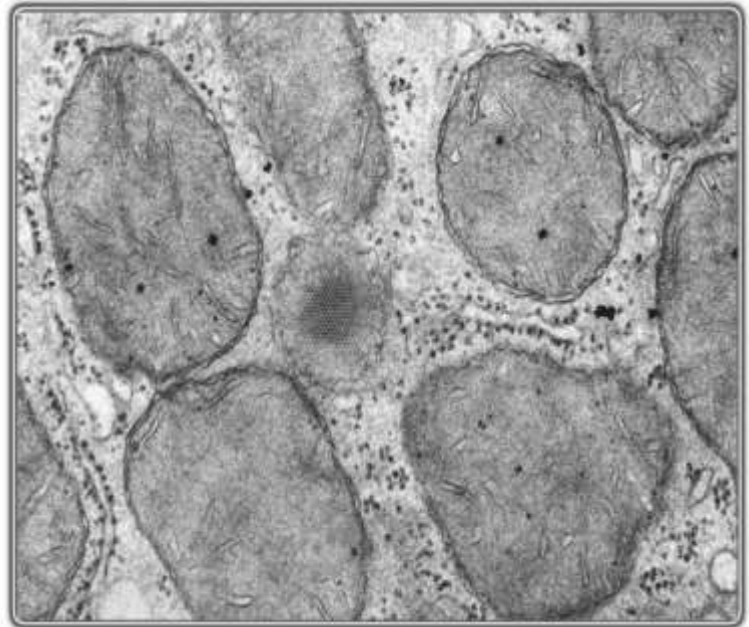
- princip diferenciacie struktur – různý rozptyl svazku elektronů v závislosti denzity struktur ;
„elektronová barviva“ – směsi těžkých kovů:
uranylacetát nebo citrát olovnatý



| 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 |



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



Najdete nás na:

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



DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY

EDUCATION

ABOUT OUR DEPARTMENT



Děkuji za pozornost