

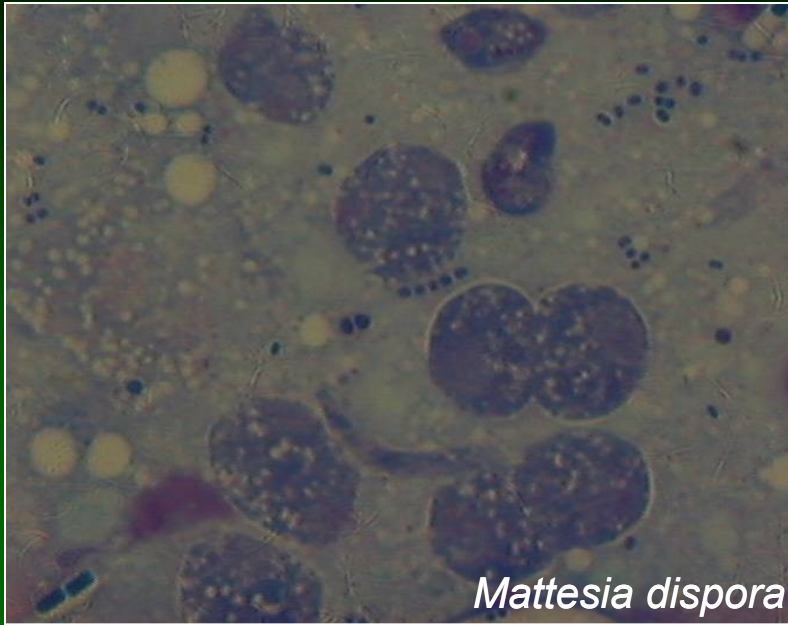
Histologické
a
(imuno)histochemické
metody

- ❖ histologie je nauka o mikroskopické skladbě organismu
- ❖ zkoumá skladbu těla živočišného i rostlinného, důležitá v humánní medicíně
- ❖ histologický preparát zhotovený různými histologickými technikami
- ❖ tenké řezy
- ❖ mikrotom
- ❖ barvení
- ❖ nejběžnější formou histologického preparátu je tenký řez určitým organismem, orgánem, tkání, obarvený některou z metod histologické techniky a uložený mezi podložním a krycím sklíčkem

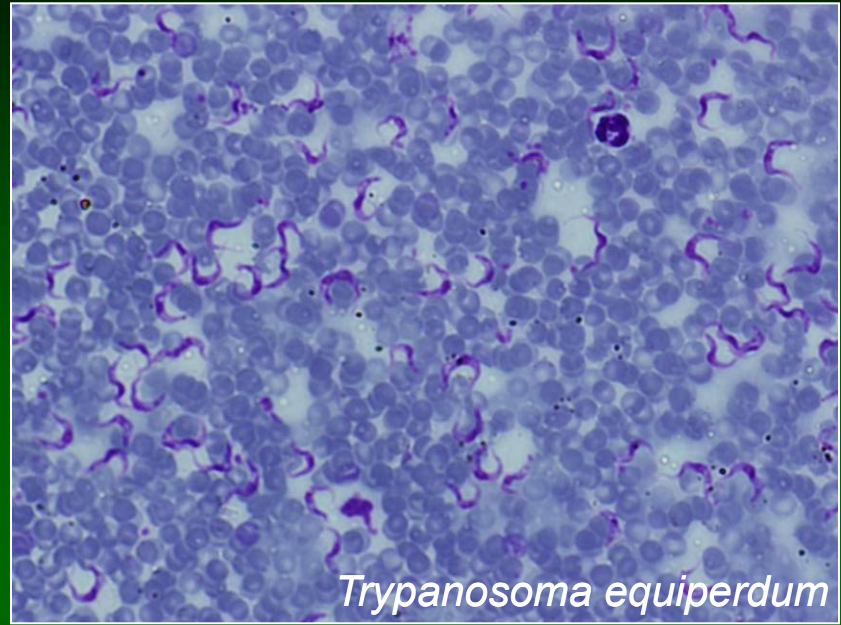
Rozdělení

- ❖ Cytologie – nauka o skladbě buňky
- ❖ Histologie – v užším slova smyslu, nauka o skladbě tkání
- ❖ Mikroskopická anatomie – nauka o mikroskopické skladbě orgánů

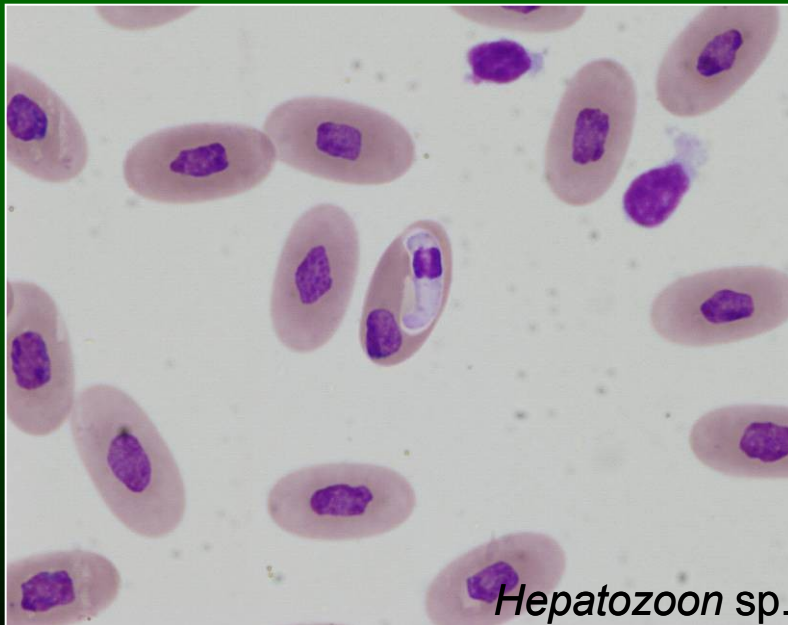
Cytologický preparát



Mattesia dispersa



Trypanosoma equiperdum



Hepatozoon sp.

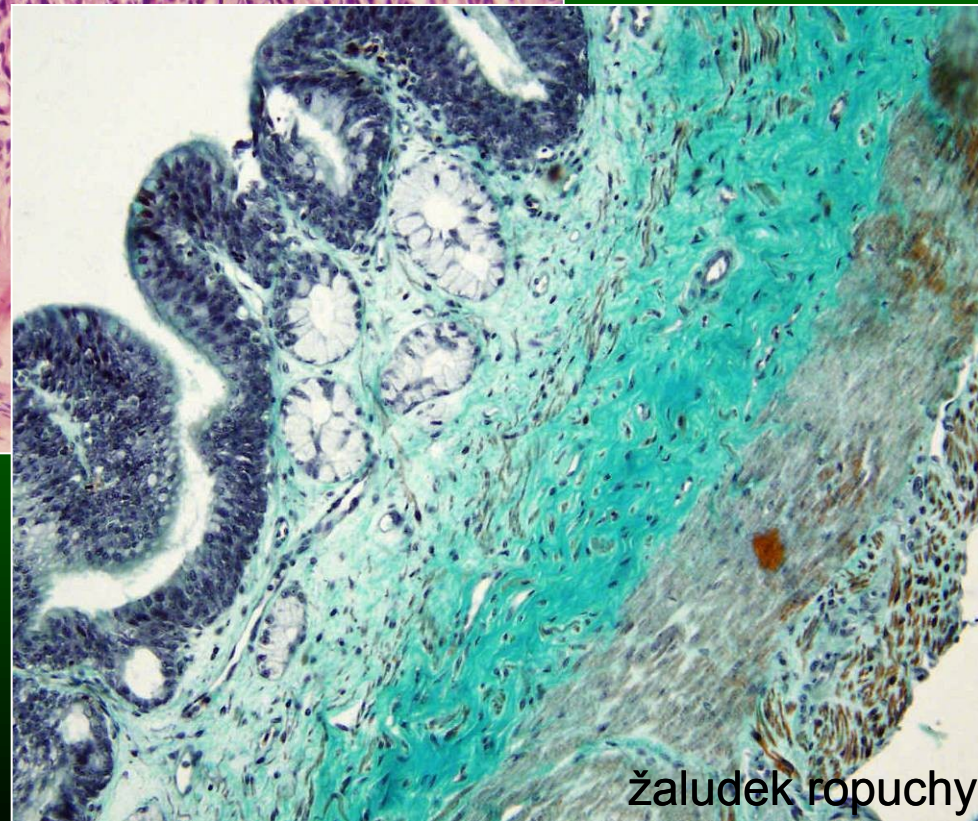


Leidyana ephestiae

Cryptosporidium fragile v žaludku ropuchy



Histologický preparát



žaludek ropuchy

Zpracování tkání - histologie

- Odběr
- Fixace
- Krájení
 - ✓ tkáně prosycené parafínem nebo pryskyřicí
 - ✓ zmrzlé tkáně
- Barvení

Odběr

❖ Biopsie

- ✓ Punkce
- ✓ Excize
- ✓ Kyretáž
- ✓ Peroperační biopsie

❖ Nekropsie

❖ Postup:

- ✓ Oddělení vzorku - velikost tkáňového bločku max. 1cm²
- ✓ Opláchnutí ve fyziologickém roztoku
- ✓ Vložení do fixační tekutiny - ihned po odběru !!!
- ✓ Označení vzorku

Fixace

- ❖ rychlá a šetrná denaturace bílkovin bránící autolýze tkání
- ❖ **podmínky fixace**
 - ✓ rychlost - odběr, průnik, velikost vzorku (1cm², 1mm²)
 - ✓ zachování struktury
 - ✓ barvitelnost
- ❖ **fixace fyzikální**
- ❖ **fixace chemická**

Fixační tekutiny

- ❖ formaldehyd (4% formaldehyd, neutrální nebo pufovaný)
- ❖ Bouinova (formaldehyd + k. pikrová)
- ❖ Zenkerova (dvojchroman draselný, sublimát, formaldehyd)
- ❖ metacarn (formaldehyd, metanol, voda)
- ❖ Davidson (glycerol, formaldehyd, etanol, voda)
- ❖ AFA (ethanol, formaldehyd, kyselina octová ledová)
- ❖ oxid osmičelý, glutaraldehyd

Parafínové řezy

- ✓ Odvodnění - vzestupná etanolová řada
- ✓ Projasnění - xylen
- ✓ Prosycení parafínem
- ✓ Zalití do parafínu
- ✓ Krájení na mikrotomu (tloušťka řezu 4-10 μ m)
 - Rotační x sáňkový mikrotom
- ✓ Napínání a lepení řezů na podložní skla

Prosycení parafinem



Výhody a nevýhody parafinových řezů

- Poměrně tenké řezy, které lze barvit téměř všemi metodami
- Uchovávání nakrájených řezů na sklíčku a zbytku zalité tkáně v parafinovém bloku neomezenou dobu
- možnost kdykoliv nakrájet další řezy a doplnit barvení
- Alkoholová řada i zalití do parafinu ničí enzymy a způsobuje vyluhování tuků
- Odvodňováním může dojít ke smrštění tkáně a vzniku artefaktů

Rotační mikrotom



Barvení parafínových řezů HE

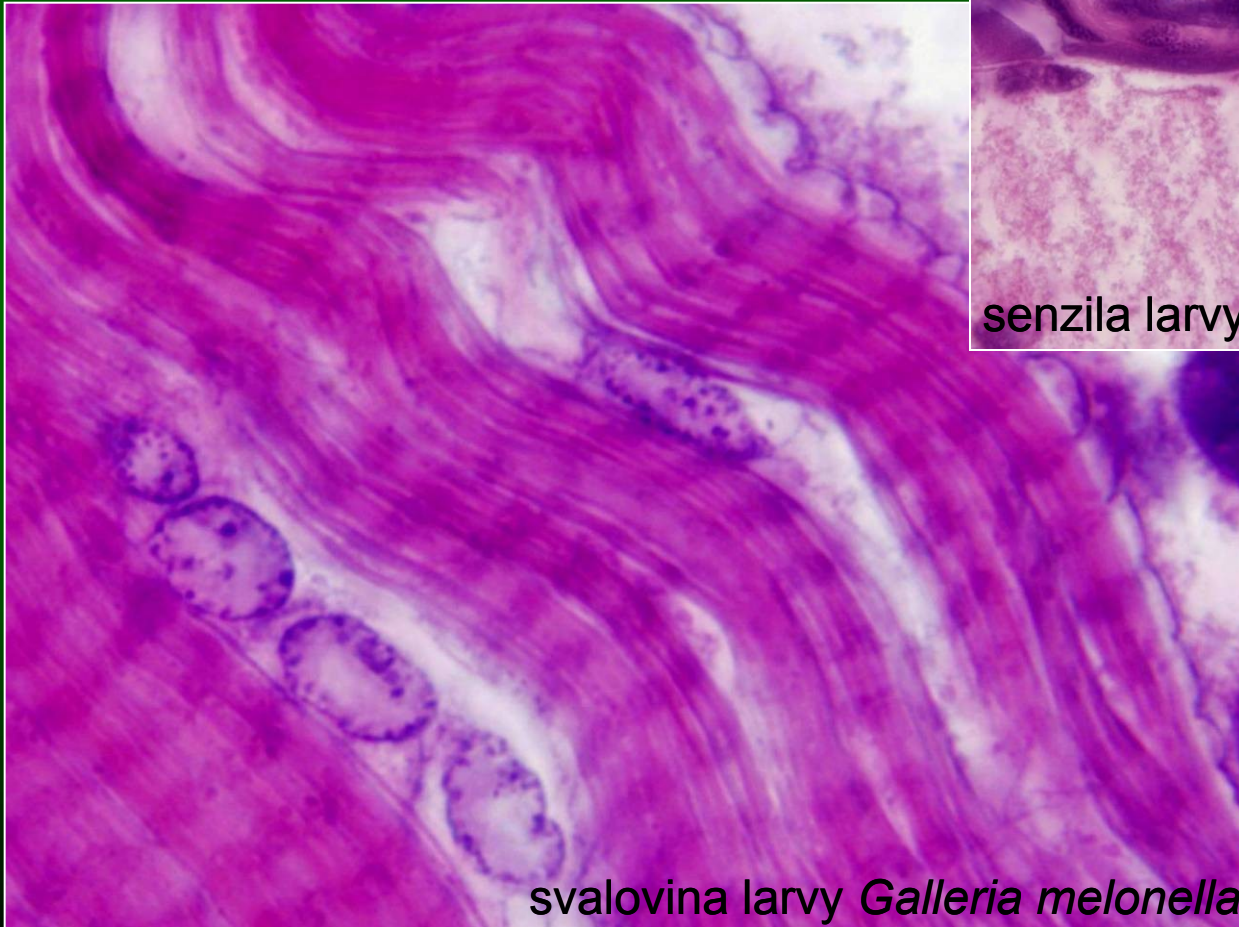
- ✓ Odparafinování – xylen I, xylen II, 100% alk., 96% alk., 70% alk., voda
- ✓ Barvení hematoxylinem
- ✓ Praní v tekoucí vodě do zfialovění
- ✓ Barvení eosinem
- ✓ Oplach ve vodě –odstranění přebytečného barviva
- ✓ Odvodnění vzestupnou alkoholovou řadou
- ✓ Projasnění
- ✓ Montování do kanadského balzámu nebo Damary

Hematoxylin-eosin

Při barvení HE jsou jádra buněk modrá hematoxylinem a cytoplazma růžová eozinem

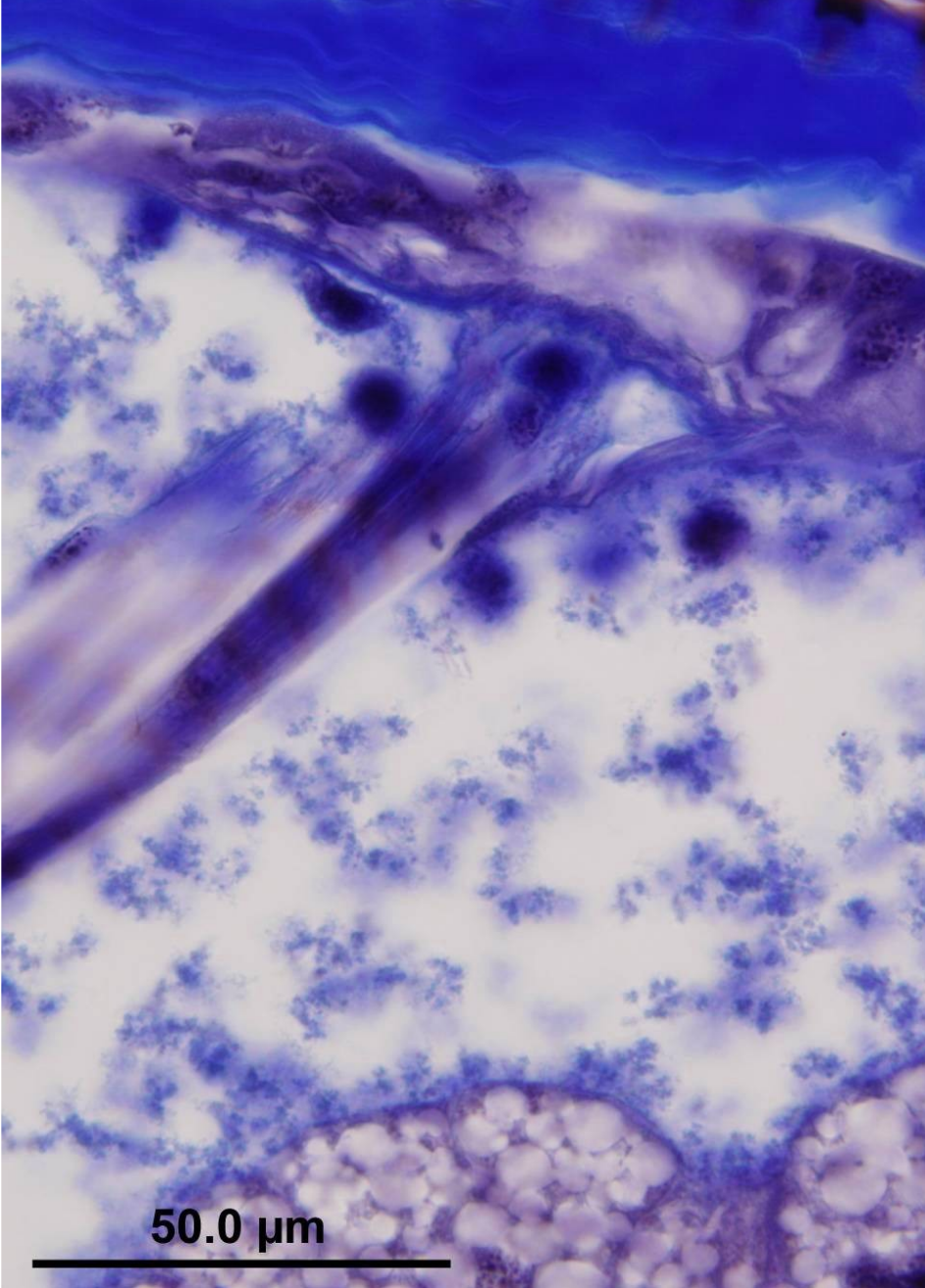


senzila larvy *Galleria melonella*



svalovina larvy *Galleria melonella*

tegument a svalovina larvy *G. melonella*



Massonův trichrom Modrý

Kolagenní vlákna ve tkáni modrá



tegument larvy *G. melonella*

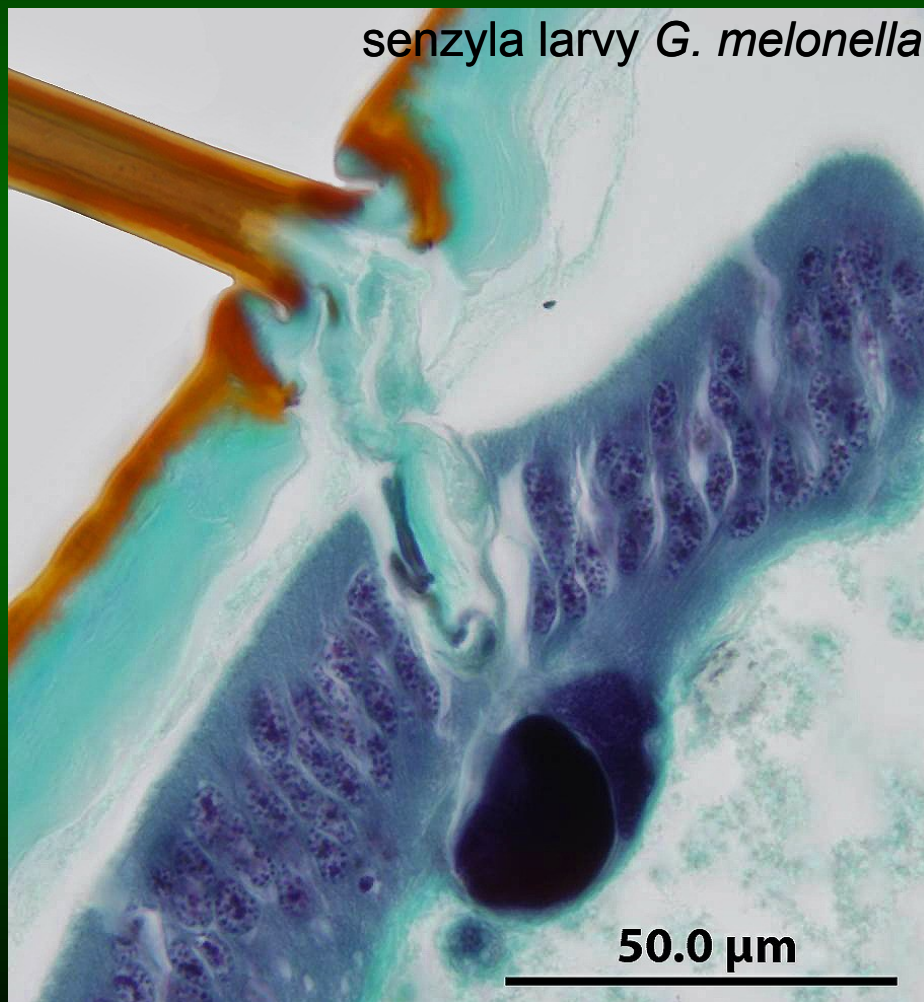
Massonův trichrom

Zelený

Kolagenní vlákna zelená

Elastická vlákna fialová

senzyla larvy *G. melonella*



svalovina larvy *G. melonella*



Hematoxylin jádra modrá - **Bestův karmin** glykogen purpurově červený



Gregarina garnhami v caecu sarančete

Polotennké řezy

- Zalévání do pryskyřice (Spurr – podle autora)
- Fixace glutaraldehydem nebo osmiem
- Odvodnění alkoholová řada + aceton
- Pryskyřice polymeruje při 60°C
- Krájení na tzv. polotennké řezy (500nm – 2 µm)
- Barvení - toluidinová modř
- Nepřikrývají se krycím sklem
- Po kontrole na světelném mikroskopu se ze vzorku vybere místo, které je zajímavé a ze kterého se budou krájet ultratenké řezy pro transmisní elektronovou mikroskopii



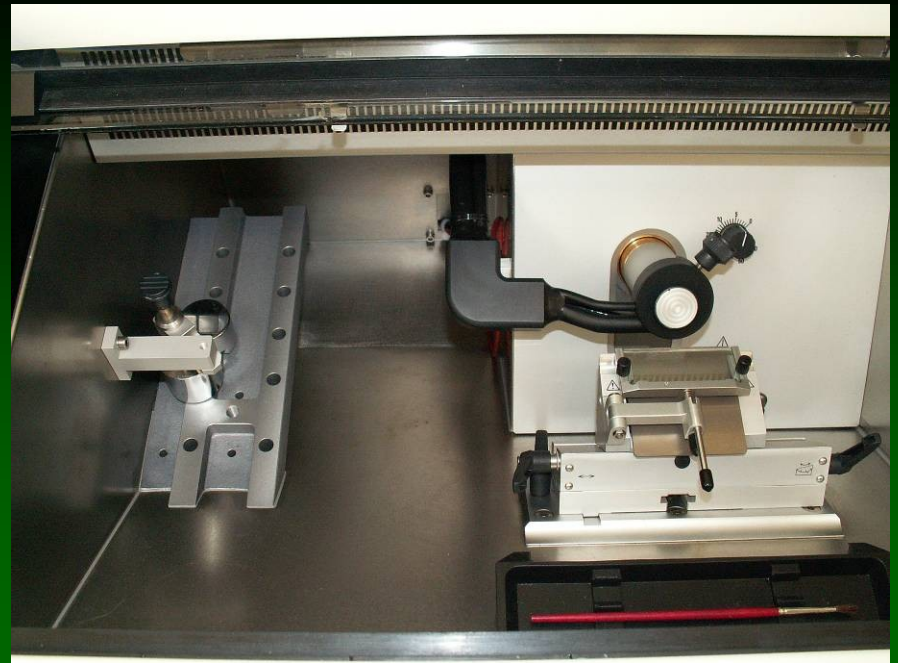
Řez hlavou *Eudiplozoon nipponicum*

Krájení zmrazených tkání

❖ Zmrazovací mikrotom, kryostat

❖ Použití:

- ✓ Imunohistochemie
- ✓ Barvení tuků
- ✓ Průkaz enzymů
- ✓ Peroperační biopsie



Výhody a nevýhody zmrazených řezů

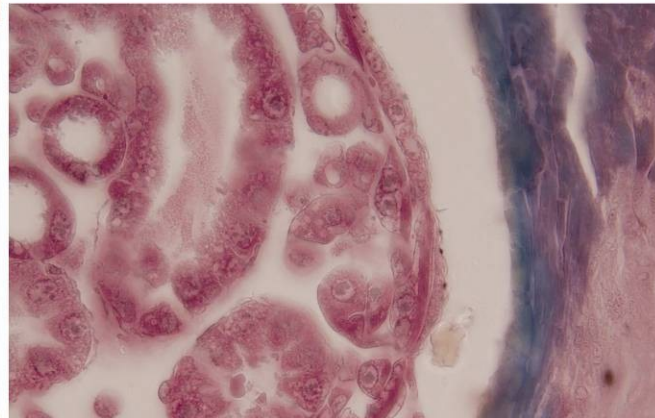
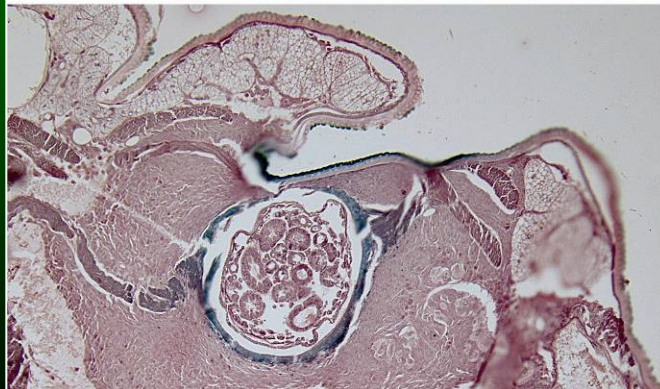
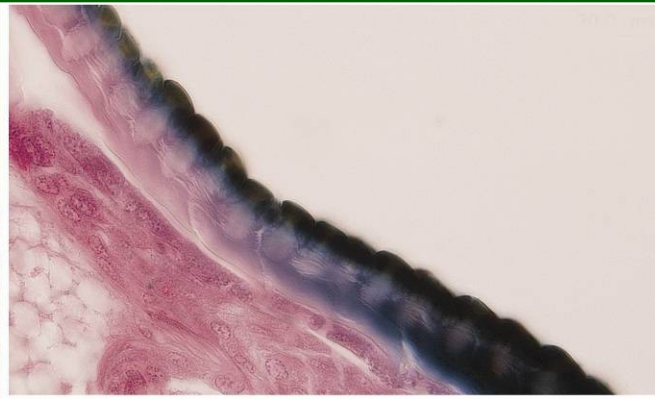
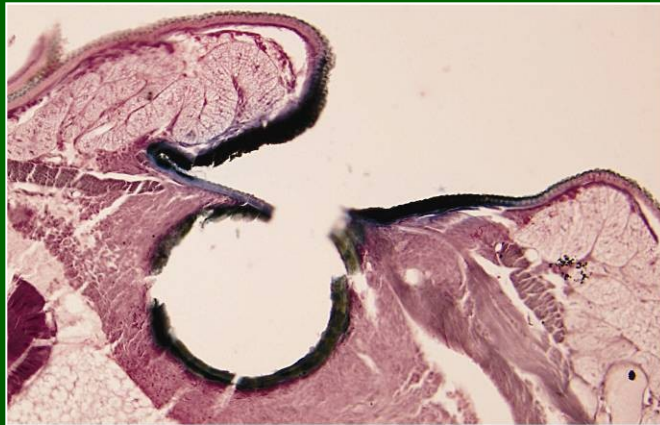
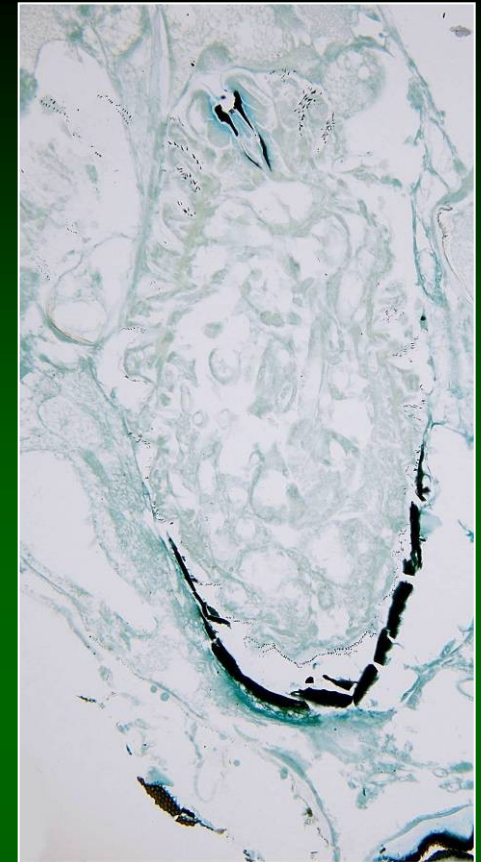
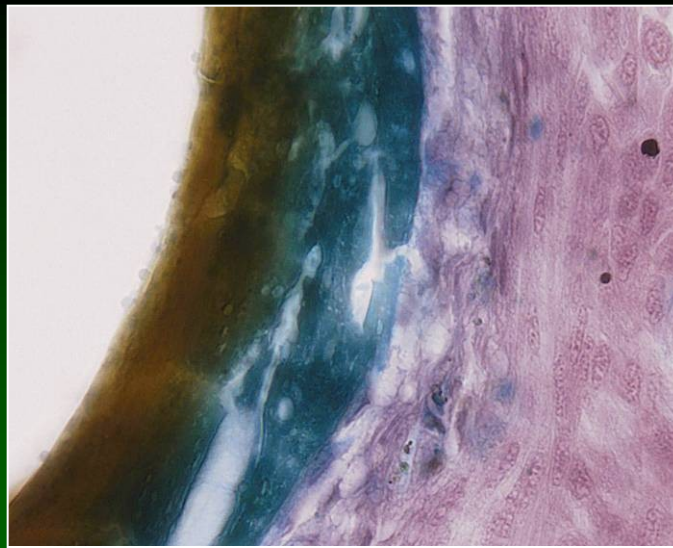
- Rychlé zhotovení
- Uchování enzymů a tuků pro jejich průkaz (histochemie)

- Řezy jsou hodně silné
- Nelze uchovávat nezpracované tkáně k dalšímu dokrájení

Průkaz melaninu

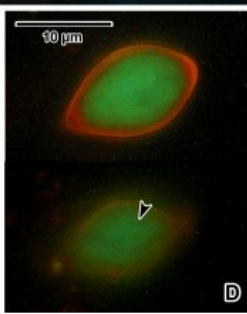
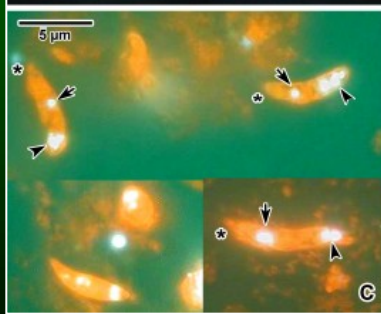
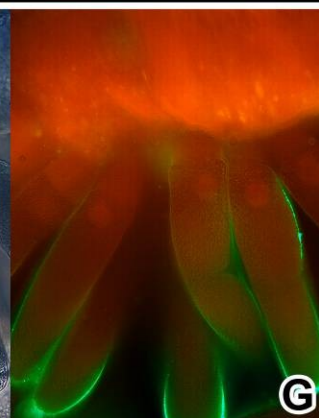
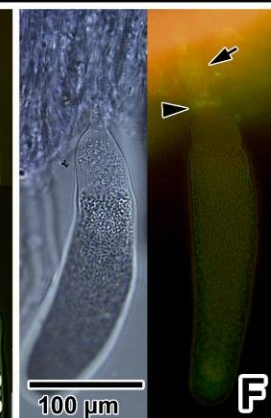
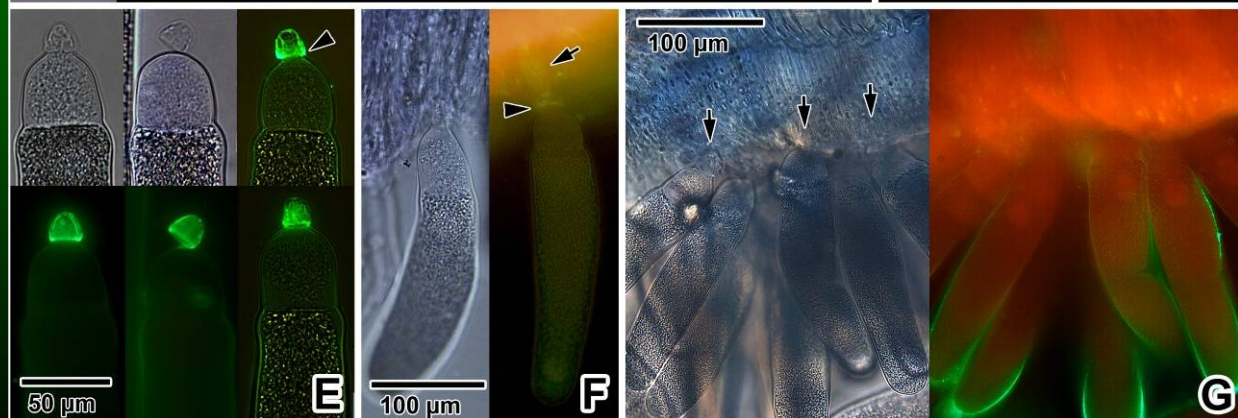
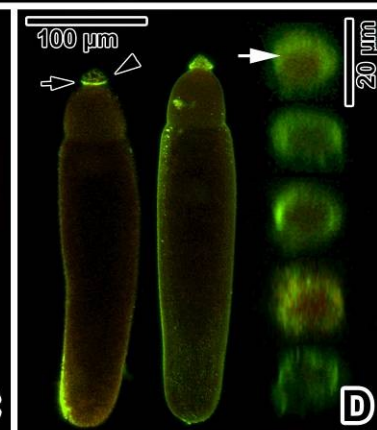
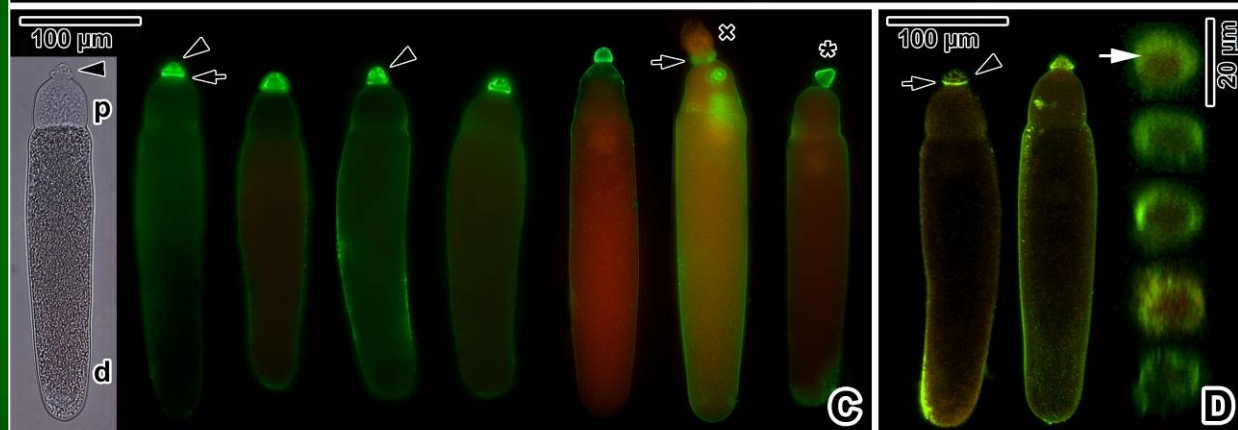
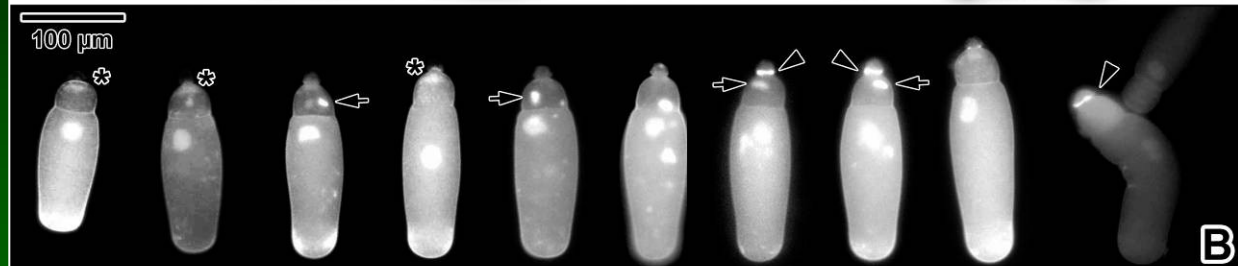
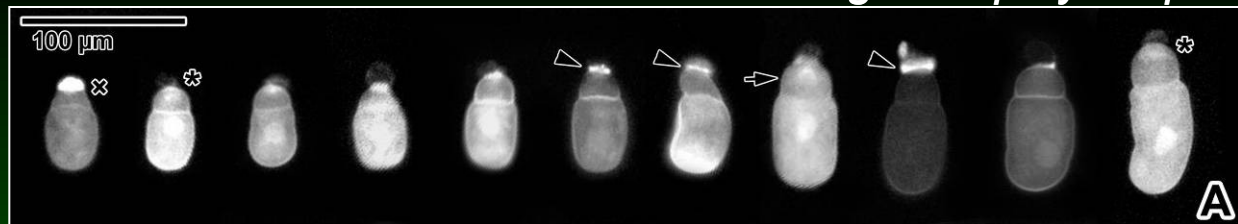
(pigment ve vnější kostře hmyzu)
(Lillie's ferric-ferricyanide melanin staining method with or without acetocarmine counterstain)

larva *G. melonella*
parazitovaná kuklicí



Značení a fluorescenční mikroskopie

Gregarina polymorpha



Mattesia dispersa