



Osteopreparační techniky



LAMORFA

Laboratoř morfologie
a forezní antropologie

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
U SV. ANNY
V BRNĚ



-
- **očištění**
 - **odkrvení**
 - **kostrování (macerace)**
 - **odmaštění**
 - **bělení**
 - **konečná úprava**

Komparace maceračních technik

- × Hnilobné bakterie
- × Kožojedi
- × Vroucí voda
- × Vodný roztok sody 5 %
- × Vodný roztok 1 % KOH
- × Vodný roztok 0,5 % NaOH
- × Vodný roztok Persilu 35g/5 l
- × Vodný roztok Albinizér / Běloutrofixu 30-40g/l
- × Vodný roztok trypsinu 1 %
- × Vodný roztok amoniaku 1:1

Hrubé očištění



Odkrvení



Macerace 1



Macerace 2



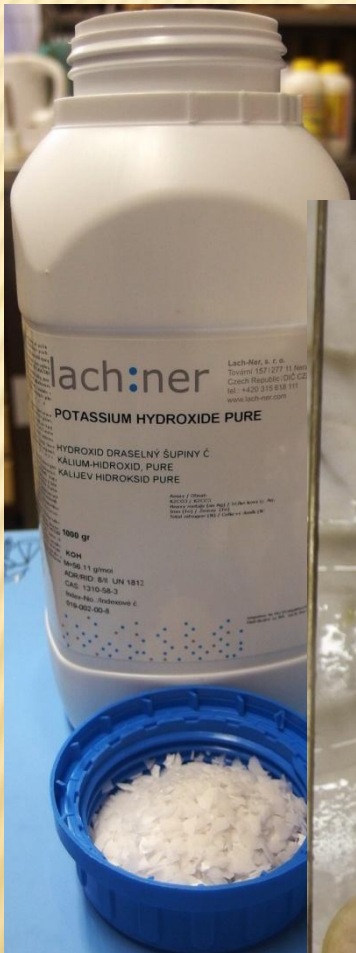
Macerace 3



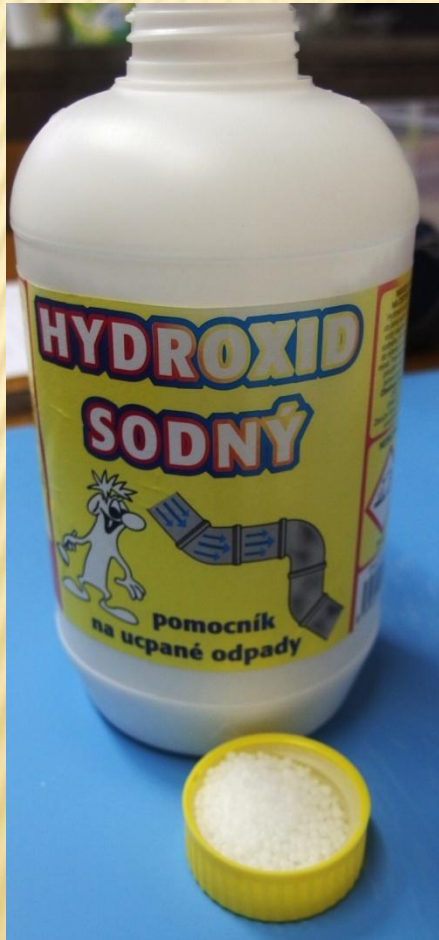
Macerace 4



Macerace 5



Macerace 6



Macerace 7



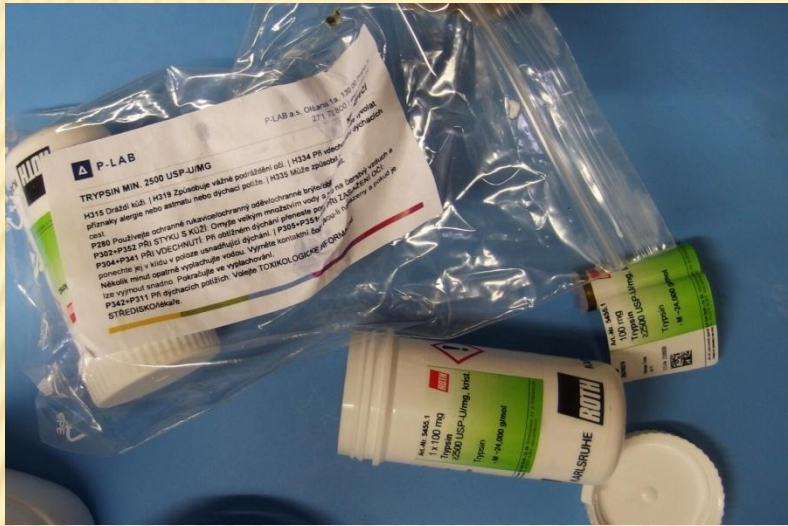
Macerace 8



Macerace 9



Macerace 10



Macerace 11



Odmaštění



-
- **odstranění svalstva (macerace ve vodě)**
 - **odkrvení ve studené vodě**
 - **macerace ve vodě (při teplotě 30°C bez kovu)**
 - **praní ve vodě a sušení**
 - **odmaštění (tetrachlór, trichlórethylen, benzín – větší kosti navrtat)**
 - **bělení 5 - max. 10 % H₂O₂ alkalizovaným NaOH nebo amoniakem**
 - **vyprání tekoucí vodou a sušení**

Preparace varem

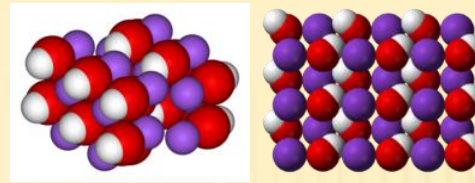
- **odstranění svalstva**
- **odkrvení 1% vodném roztoku NaCl (24-48 hodin) - studenou vodu měnit**
- **vaříme (hodiny) a kontrolujeme se žabkou nebo 0,5% NaOH**
- **vysušíme a bělíme 5 – max. 10% H₂O₂ na tmavém místě 24 hodin**
- **tvrzení namočením do laku, nebo namočením do voda:lepidlo 1:1**
- **přilepení zubů, slepení a úprava chybějících částí**





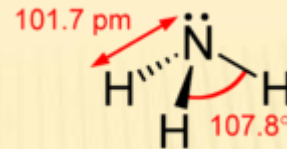
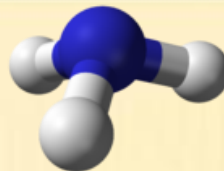


Chemická hydrolýza bílkovin



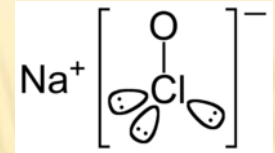
- odstranění svaloviny
- odkrvení v 1% KOH při teplotě 20°C 1 – 5 dní
- vaření v 1 % KOH (NaOH) při teplotě 60 °C, oplach vodou
- proprat a sušit
- odmaštění v krystalické sodě nebo jiném změkčovadle
- bělení do barvy slonové kosti 5 – 10% H₂O₂ alkalizovaným 5ml 25 % amoniaku na 1litr nebo 5ml NaOH na 1litr destilované vody
- **NELZE PROVÁDĚT PO PŘEDCHOZÍ FIXACI FORMOLEM!!!! (1)**

Macerace amoniakem



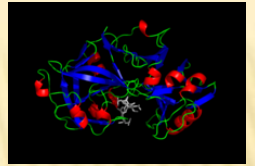
- jeho silná koncentrace hydrolyzuje svalovou tkáň a reaguje s tukem
- 24h máčení kostí v konc. hydroxidu amonném a následně var 1-4 hodiny 1:1 s vodou
- svaly zrosolovají a odpreparují se a opláchnou
- ŠTIPLAVÝ ZÁPACH A MOŽNOST POŠKOZENÍ KOSTÍ!!!! (2)

Preparace antiforminem



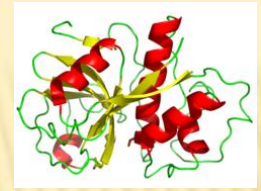
- **antiformin (sodium hypochlorate), rychle hydrolyzuje měkké tkáně**
- **dle Harrise (1959) smícháme roztok 150g sody v 250 ml vody se 100 g chloridu vápenatého v 750 ml vody a mícháme 2-4 hodiny, roztok filtrujeme a přidáme stejné množství 15 % NaOH, konc. roztok antiforminu ředíme na 10 % destilovanou nebo měkkou vodou**
- **dle Kaewela (1928) používáme 5-10 % roztok ze surového antiforminu při teplotě 50-60 °C vkládáme skelet očištěný od měkkých tkání a necháme jej vložený v roztoku 6-12 hodin, oplach horkou vodou a sušení, použití například pro zachování meziobratlových plotének - párou ohřátý preparát)**
- **antiforminový koncentrovaný roztok se skladuje v temnu a chladu (2, 4)**

Preparace pepsinem



- je to proteináza, trávící enzym ze žaludeční sliznice, urychluje 1. st. trávení proteinů, jejich štěpení na nižší složky za přítomnosti HCl
- jedná se o jemný bílý málo hygroskopický prášek
- používá se stejně jako trypsin při odbourávání proteinů při teplotě 40 °C,
- pH 1,5 - 2,5 s pomocí HCl, při teplotě 50-60 °C je již neúčinný
- **SILNÝ ZÁPACH!!!!!! (2)**

Preparace papainem



- **jedná se o proteolytický enzym s účinky jako pepsin, získává se ze sušeného latexu plodů papáje**
- **dle Luthera (1949): odstranění kůže ze zvířete (např. myši) a vyvrhnutí**
- **vaření 10 minut, ochladit na 37°C a vložení objektu do 35°C fyz. roztoku s 1% papainovým práškem přes noc, odstranění vazů a kostí – nesoudržnost**
- **ZÁPACH!!!!!! (3)**

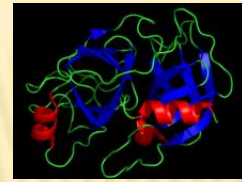
Preparace jemných objektů (malý plod)

- **biologická macerace**
- **macerace v 25-45 % etanolu**
- **odpreparování měkkých tkání**
- **lze použít N_2O_2 3-4 g a 100 ml destilované vody**
- **odstranění zrosolovatělého svalstva (1)**

Preparace chrupavčitých koster

- **macerace 30 % etanolem (trypsinem etc.) a odpreparování**
- **CHRUPAVKY NESMÍ ZASCHNOUT!!!!!!**
- **vyprání ve vodě, odmaštění**
- **převedení vzestupnou alkoholovou řadou 30, 50, 70, 96% až do benzínu**
- **převedení sestupnou alkoholovou řadou do vody**
- **bělení 10 % H₂O₂ a 2 % KOH**
- **trvalé uložení v 70 % etanolu pomocí vzestupné alkoholové řady (1)**

Preparace trypsinem (chrupavky, embryonální kostry)



- enzym z pankreatu - rozpouští lipidy a proteiny
- účinný ve slabě alkalickém prostředí
- dle Rowleye (1925) přidáme na 4 litry 35-40 °C vody 2 plné čajové lžice trypsinu a 1 čajová lžice sirníku sodného, důkladně ve vodě macerované kosti, výměna vody 2-3dny, sbírání pěny, amoniak + var 2-3 hodiny
- modifikace Rowleyovi tekutiny: 1g NH_2S +1g trypsinu a 100 ml fyz. roztoku; koncentrace solného roztoku pro savce 0,9 %, ptáky a plazy 0,75 % a obojživelníky 0,65 % 30 min. v 60 – 70 °C destilované vodě, odpreparování nebo: 50 ml 0,3 % roztoku K_2CO_3 a špičku nože trypsinu nebo chloroformu
- maceraci zastavíme vložením do roztoku formolu
- **SILNÝ ZÁPACH!!!! (2)**



Chrupavčitá kostra novorozence



Další metody kostrování

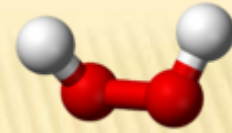
- pomocí brouků kožojedů v tzv. dermestáriu
- jsou známy i pokusy pomocí moučných červů, šatních molů, švábů atd...
- pomocí vodních zvířat (raka skořepatce, pulců, sviněk, cirolany harfordi, říčních raků....)



Metody odmašťování

- ❖ **chemicky studenou cestou**
- ❖ **chemicky teplou cestou**

- **polyetylenglykol – odstranění krve i tuku s katalyzátorem a emulgátorem**
- **dle Klugeho (1973) lze použít prací prostředky**
- **používaly a používají se různé aparáty (benzín, tetrachlór, petrolbenzín, diethyléter, benzín+éter, chlorid uhličitý.....) –TĚKAVÉ PÁRY**
- **sirovodík – snadno hořlavý, vypařuje se již při pokojové teplotě, do nádoby se vloží kosti, nalije se sirovodík a přelije se vodou, odtučnění za 2-3 týdny**
- **xylol 5 – 10 % rozpouští tuky a mastné kyseliny při 60 °C za 12-24 hodin, proprat ve vodě (2)**



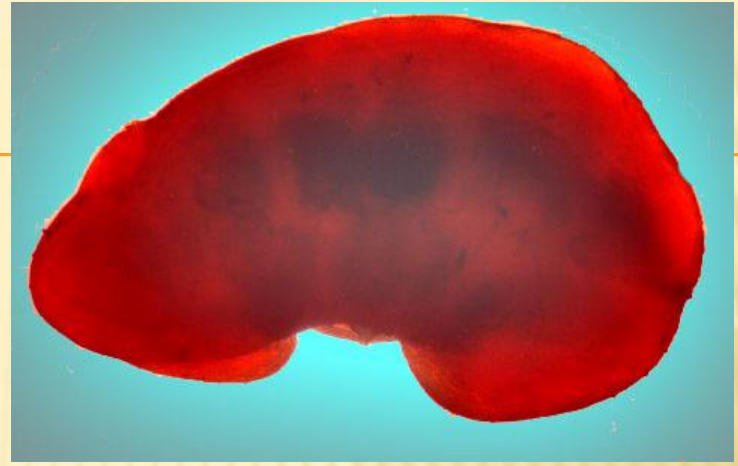
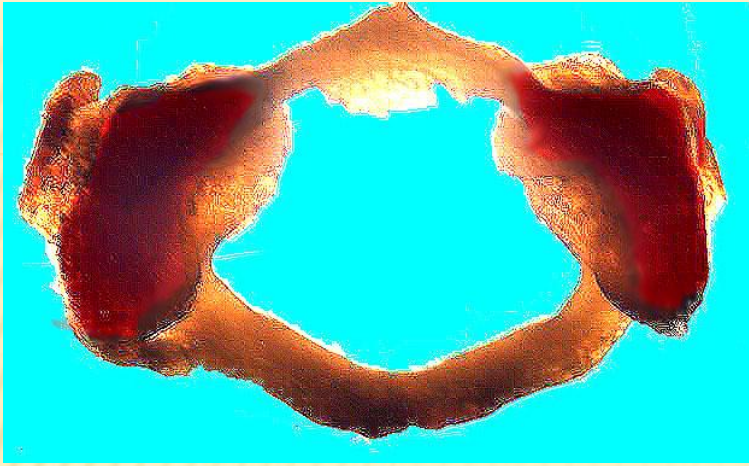
- vytáhnout z alveolů nebo se před bělením zakapou parafínem či voskem, popřípadě se natřou lakem či lepidlem a po bělení se tato látka odstraní (horkou vodou, acetonem atd...)
- uchováváme je v temnu a chladnu
- bělíme v temnu 5 – 10 % peroxidem vodíku, oplach a sušení
- lze bělit H_2O_2 i za zvýšené teploty – odbourávání se urychlí (300ml na 5l vody)
- bělíme v nekovových nádobách (oxidace) dřevěných, smaltových, plast...
- bělení pomocí chlorového vápna 1díl vápna + 4 díly vody a přecedit
- bělení pomocí Javelského louhu (vodný roztok chlornanu draselného): smícháme 1díl vápna + 12dílů vody s 1 dílem potaše a 4 díly vody, slít a vzniklý roztok ředíme 1:1 s vodou (2)

Sestavování koster

- **dříve se používaly drátky a pružinky**
- **dnes i lepené spoje popřípadě silonové nitě**
- **kostry např. novorozenců s vazivovými spoji se uchovávají ve fixační tekutině nebo se vysuší v určité poloze**







Kolčava 2004



DIFERENCIAČNÍ BARVENÍ KOSTNÍ TKÁNĚ S PROJASNĚNÍM PREPARÁTU.

Použitá metoda : Hood, R.C.W.S. a Neil, W.M.

A modification of alizarin red "S" technique for demonstrating bone formation.
Stain Technol., 23, 1948: 209-218.

- Pracovní postup:
- 1) Materiál ponoříme na tři dny do 95% alkoholu.
 - 2) Dále převedeme materiál na tři dny do 2% KOH.
 - 3) 6-12 hodin barvíme vzorek 0,01% alizarinem.
 - 4) Takto zpracovaný vzorek kostní tkáně ponoříme na jeden den do 2% KOH.

Dále uchováváme materiál v termostatu při stálé teplotě 35°C v následujících roztocích:

Roztok č.1 - 1 díl 2% KOH
1 díl 0,2% formaldehyd 2 dny
1 díl glycerin

Roztok č.2 - 1 díl 2% KOH
4 díly glycerin 1 den

Takto zpracovaný materiál přeneseme do teplého glycerinu, kde se preparáty vyčistí.
Preparáty trvale uchováváme v glycerinu s přísádkem zrnka thymolu.

Dekalcifikace

- ✎ **rozpuštění minerálních solí zředěnými kyselinami**
- **dostatečná fixáž**
- **po fixáži praní ve vodě nebo etanolu**
- **rychlost - množstvím, denní výměnou a teplotou 37 °C**
- **odstranění v soli (5 % síran sodný, lithný, draselný)**
- **zásadně neprát ihned po dekalifikaci vodou**
- ❖ **stupeň dekalifikace lze zjistit vbodnutím preparační jehly, nebo chemicky**
- ❖ **dekalifikační tekutiny: Chelaton III, kyselina mravenčí, dusičná, Krutsay...**
- ❖ **Chelaton III: 1-3 týdny, 250g do 1000 ml vody, úprava pH 7,5 pomocí KOH(1)**

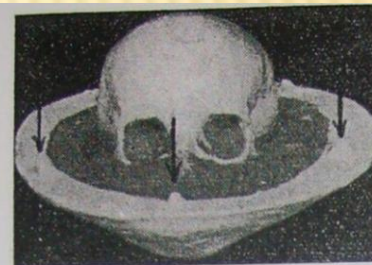
Zpracování neodvápněné tkáně

- **zalití do metylmetakrylátu, řezání mikrotomem K Jung Leica, fixace pufrovaným formolem**
- ❖ **výbrusy: tenké ploténky ze zubu či kosti**
- **zalití do metylmetakrylátu, broušení pomocí brusných past a zalití do kanadského balzámu (1)**

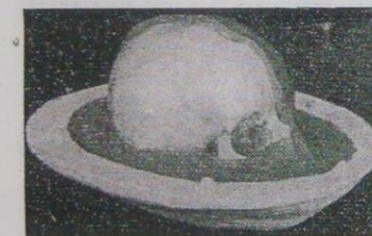
Uchování exhumovaných kostí

- **exhumované kosti se na vzduchu rozpadají, proto se musí konzervovat; nátěrem roztoku celoidinového filmu a napuštěním vysušených kostí**
- ✘ **dle Fettera**
- **50 g kousků rozpustit ve 250 ml acetonu s 250 g octanu amylnatého ke konzervaci se použije roztok ředěný 1:5 ředidlem, složeno ze stejných dílů acetonu a amylacetátu (1)**

- **příprava lebky k odlévání**
- **natřeme model šelakem**
- **rozdělení na dvě poloviny**
- **na několika místech připevnit malé kužely – vzdušníky**
- **nanesení sádry na ½ modelu**
- **navrtání zámků**
- **styčné plochy pláště natřít šelakem a olejem**
- **zhotovení sádrového pláště druhé ½ modelu**

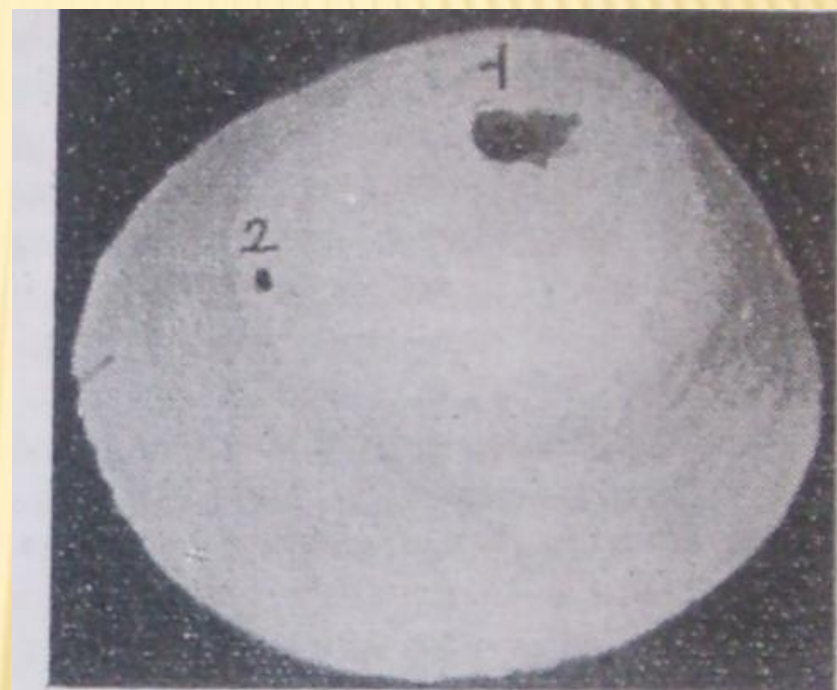


Obr. 2. Šipkou označené včelníky tvoří „zámek“ sádrového pláště pro želatinnou formu (kadlub)



Obr. 3. a 4. Příprava modelu ke zhotovení
Kriminologický sborník

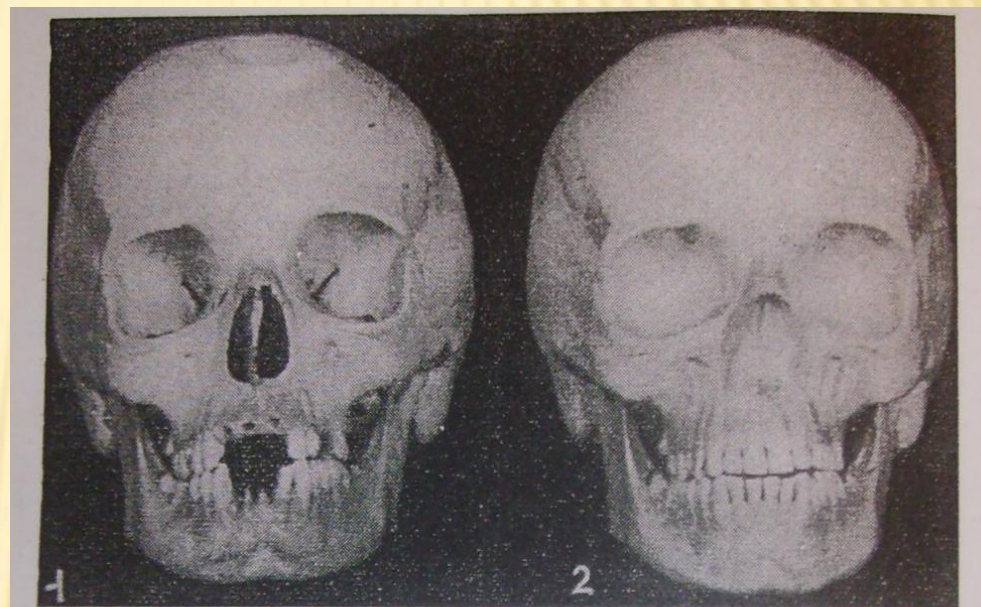
- styčné plochy sádry potřít šelakem
- sejmutý díl pláště potřít šelakem a olejem
- nalívat teplou želatinu mezi model a sádro
- ucpat otvory a nechat schnout
- stejně zhotovíme druhou ½ modelu
- sejmut sádrový plášť a potřít šelakem
- potřít styčné plochy želatiny a sádry kamencem a sterinem
- přiložit plášť a odlít druhou ½ modelu želatinové formy
- želatinovou plochu posypat klouzkem a potřít kamencem



Obr. 5. Horní polovina sádrového pláště; otvor, jímž se želatina vlévá do prostoru mezi modelem a sádrovým pláštěm (č. 1), vzdušník (č. 2)

Zhotovení pozitivu modelu

- **vnitřní plochy formy potřít olejem**
- **do ½ poloviny formy nalít sádro, přiklopit druhou**
- **zasadit díly formy do sebe**
- **otáčet formou**
- **poloviny formy oddělit od sebe**



Obr. 6. Fotografie modelu (č. 1) a odlitku (č. 2) po provedené úpravě

Forma pro odlévání lebky ve třech rovinách



Náhrada lícní kosti



Kolčava 2004

Ukázka úpravy kosti po odběru biologického materiálu



Kolčava 2004



POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Kolčava, Josef, Naděžda Fojtů a Jiří Merlíček. Základy preparačních technik. Brno: Mikadapress, 2004. ISBN 80-7013-403-8.**
- (2) Piechocki, Rudolf. Herstellung von Skelletpreparaten. Makroskopische Praparationstechnik. Liebzig: Akademische Verlags Gesselschaft, 1986. s 202- 220.**
- (3) Luther, P. G. Enzymatic maceration of skeletons. Proc. Linn. Soc. London: 1949. 61:146-147.**
- (4) Kaewel, R. Maceration von Knochenpreparaten mizels Antiformin. Zbl.Path.1928. 41: 385-388.**

