

Histologie a embryologie

praktické cvičení

Program 1. praktika

- **obecné informace**

(organizace výuky)

- **histologie a embryologie**

(co je předmětem studia)

- **zpracování tkání**

(laboratorní metody)

- **demonstrace histologických preparátů**

(barvení různými metodami)

Organizace praktik

- Začátek - přesně
- Přezouvání
vstup do mikroskopického sálu pouze v přezůvkách nebo návlecích
- Šatna – odložit svršky a zavazadla (zajistit doklady, cennosti, mobil - ztráty a nálezy – info u dr. Daňkové)
- Mobil – vypnutý nebo v tichém režimu
- mikroskopický sál = laboratoř
– zákaz konzumace jídla a nápojů v šatně a v sále,
– zákaz kouření na celé LF
- BOZP
- Pracovní místo zůstává stálé během semestru! Student je osobně a hmotně odpovědný za poskytnuté pomůcky

- Průběh praktika
 - úvod – výklad + demonstrace
 - vlastní práce
- Samostatná práce studenta – studium preparátů ve světelném mikroskopu a fotografií v atlasu EM; jejich kreslení a popis = **vyhotovení protokolu**; protokol je na konci praktika zkontrolován.
- Student, který zjevně práci odbyl a tedy nebude mít vyučujícím podepsaný protokol, musí dané praktikum nahradit
- Student musí být připraven na dané praktikum
- Rozvrh a sylaby (programy) přednášek a praktických cvičení – viz nástěnka a webové stránky ústavu
- Pomůcky (vlastní)
 - sešit nebo volné papíry – formát A4, bez linek, dle šablony
 - měkká tužka, pastelky
- Přestávka – 10 minut
- Konec praktika – vyhlásí vedoucí cvičení

Protokol č. Jméno:

Datum:..... Ročník: Skupina:

TÉMA:

Seznam preparátů ke studiu:Číslo název (barvení)

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Atlas EM: doporučené obrázky ke studiustr. název elektronogramu

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Pokyny pro vypracování protokolu

1. Student vyhotoví barevné nákresy histologických preparátů (pastelky) nebo černobílé nákresy obrázku z atlasu elektronogramů (obyčejná tužka).
2. Každý nákres musí být opatřen následujícími údaji:
 - název preparátu s uvedením metody barvení (viz Seznam výše), event. název elektronogramu.
 - zvětšení: 10 x 4 / 10 x 10 / 10 x 20 / 10 x 40 (tj. okulár x objektiv) nebo celk. zv.: 40x / 100x / 200x / 400x
 - popis obrázku.

Kontrola protokolu

Praktické cvičení: řádné náhradní datum

.....
podpis učitele

Protokol č. Jméno:

Datum:..... Ročník: Skupina:

Zápočet

- 100% účast v praktických cvičeních
- Zápočtový test na konci semestru: 20 otázek, max. 20 bodů, hodnocení: 12 – 20 bodů = P (prospěl/a), 0 – 11 = N (neprospěl/a)
- V případě neúspěchu je možná jedna oprava (**opravný test**),
- Ústní zkouška ve zkouškovém období (2 otázky, hodnocení A – F),
- Termíny zkoušky: 1 řádný, 2 opravné.

Nahrazování praktik

- výjimečně, po předchozí domluvě se svým vyučujícím
- nahrazování oznámit vedoucímu paralely (tomu, kdo má výklad)
- zapsat se do sešitu (před nebo po výkladu)
- na konci praktika předložit vedoucímu praktika protokol k podpisu

DOPORUČENÁ LITERATURA

<http://www.med.muni.cz/histol/histolc.html>

Skripa – text + atlas

MASARYKOVA UNIVERZITA
Lékařská fakulta

Histologie a mikroskopická anatomie pro bakaláře

Svatopluk Čech, Drahomír Horký



Brno 2011

+

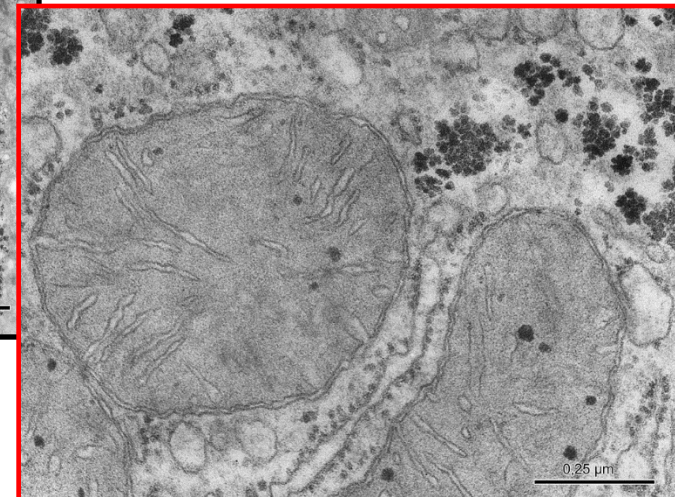
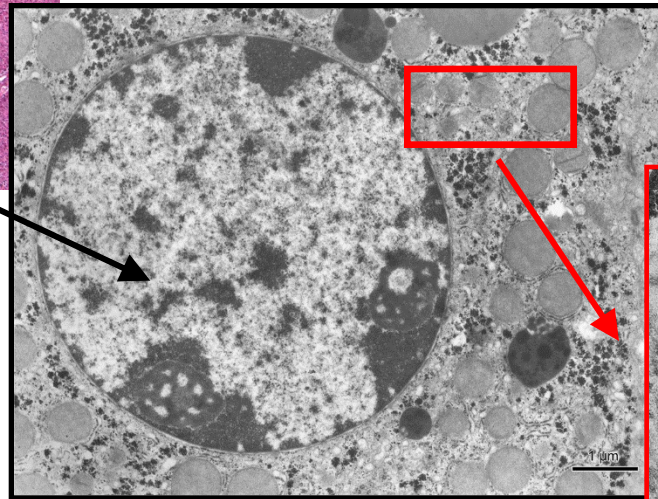
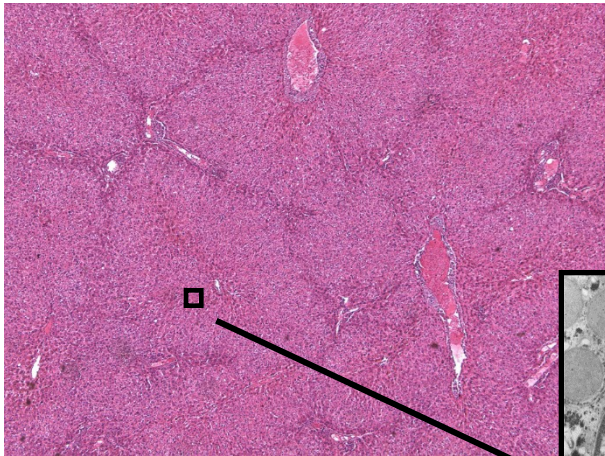
Přednášky
Praktika

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

Histologie

- Rozlišovací schopnost oka – $\sim 0,1 \text{ mm}$
- Rozlišovací schopnost SM – $\sim 0,5 \mu\text{m}$
- Rozlišovací schopnost EM – $\sim 1,5 \text{ nm}$



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 ledvinový 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, paraplást, 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 médiem, které se mísí s parafinem – benzen nebo xylén
- **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.



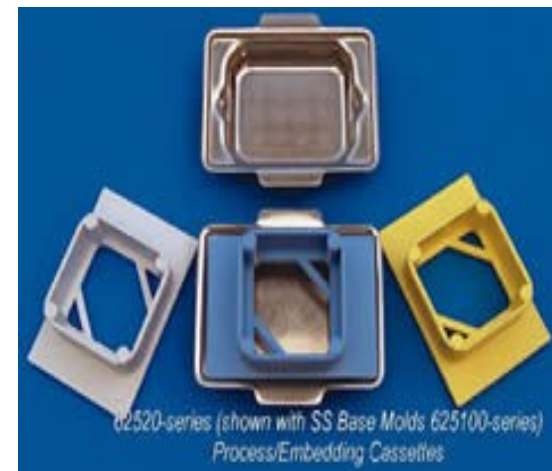
Leica TP 1020

odvodňovací tkáňový automat

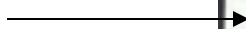
Zalévací komůrky - **papírové**



- **kovové** s orientačními plastovými prstenci

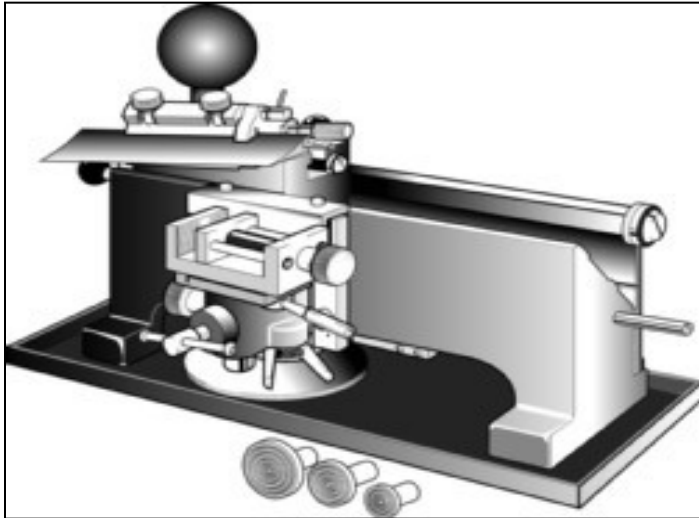


výsledek zalití

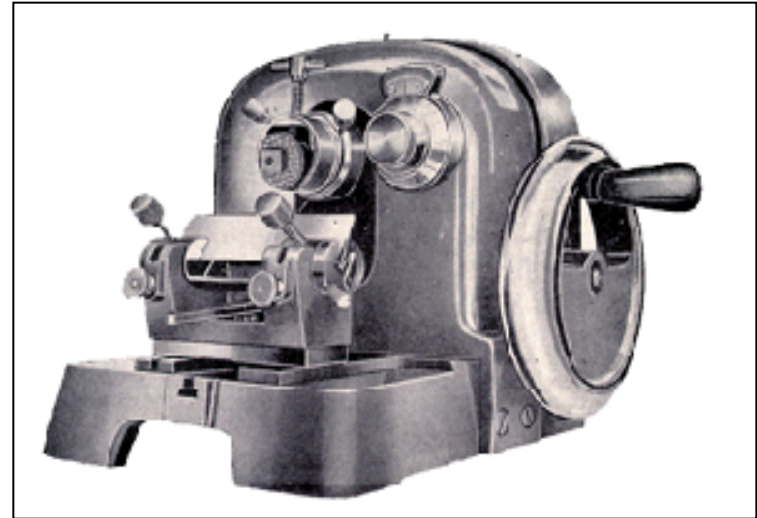


KRÁJENÍ

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

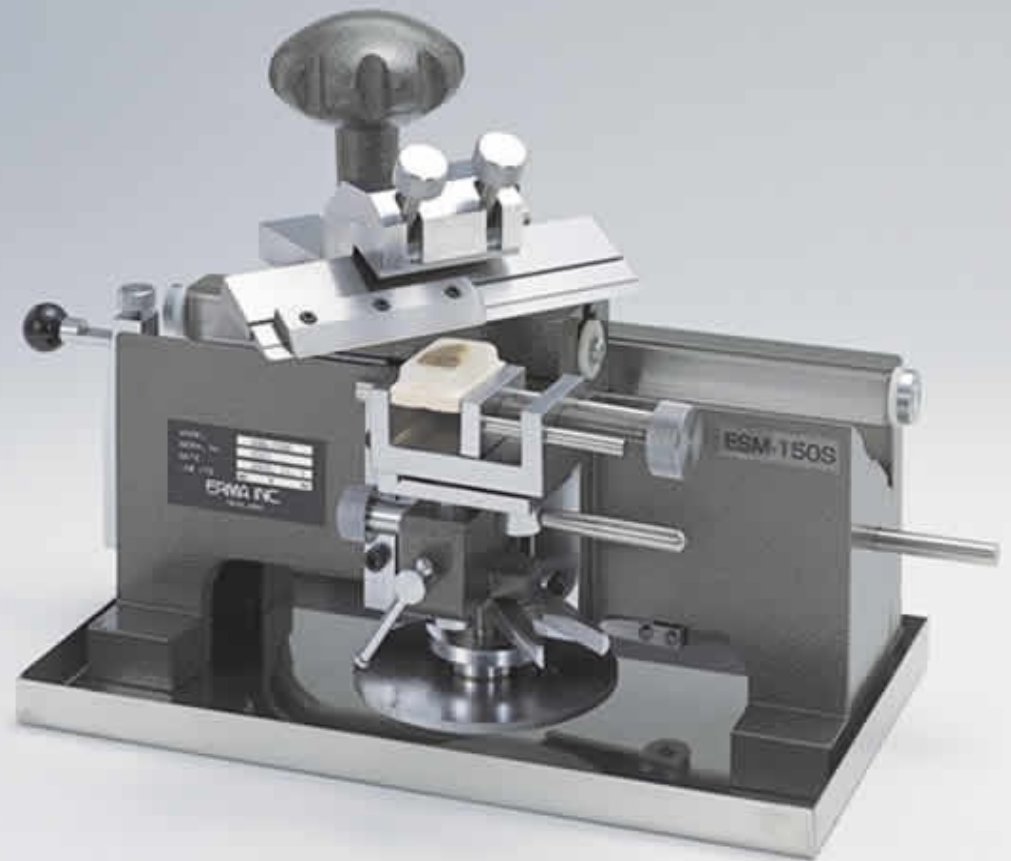


Sáňový mikrotom – blok je upevněný v držáku, nůž nebo břitva se pohybuje horizontálně



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

Sáňový mikrotom



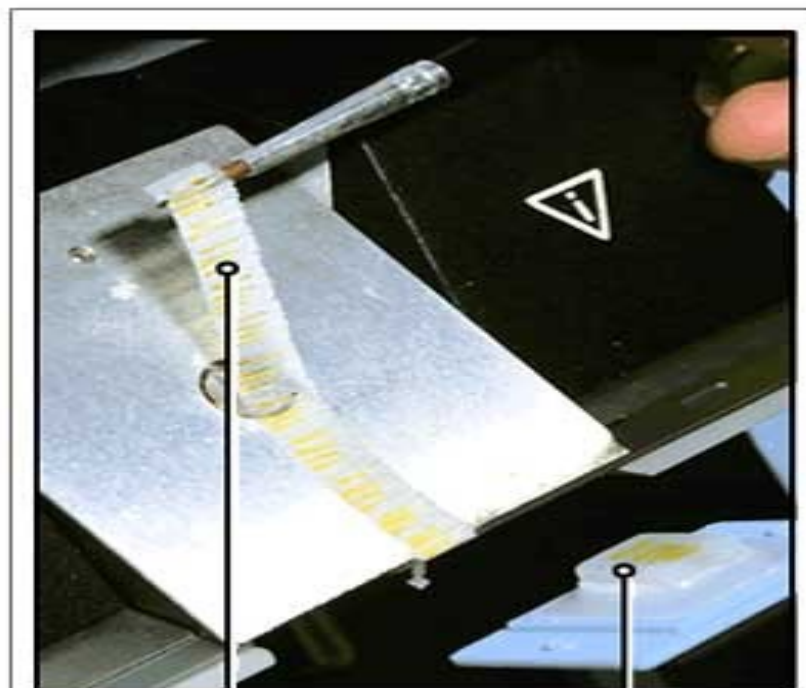
Rotační mikrotom



kryostat

= rotační mikrotom v mrazicím boxu (-60°C);

zmrzlou tkáň lze krájet bez zalévání



páska řezů

parafinový bloček



NAPÍNÁNÍ ŘEZŮ

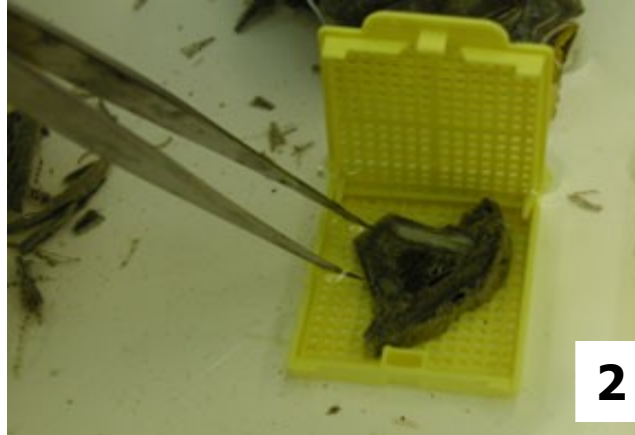
- Napínání:
na hladině teplé vody (45°C) se řezy narovnají a vypnou
- Lepení:
z vody jsou řezy přeneseny na podložní skla s adhezivním filmem (želatina nebo směs glycerin-bílek) a uloženy do termostatu (37° C).



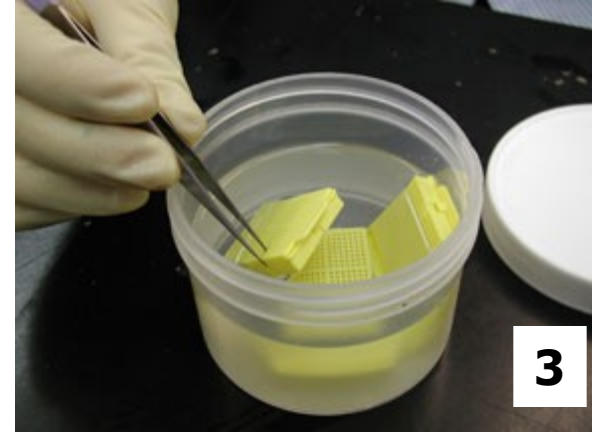
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv.
Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylénem.



1



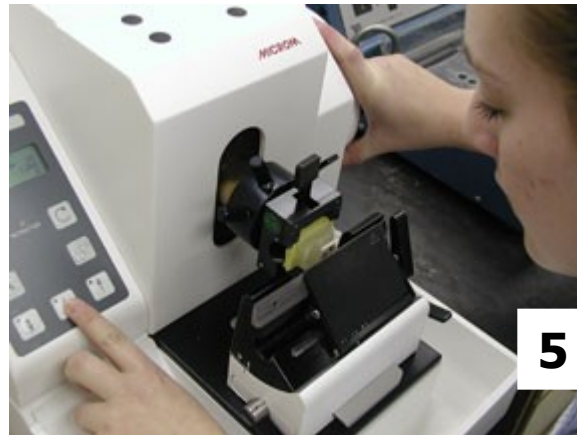
2



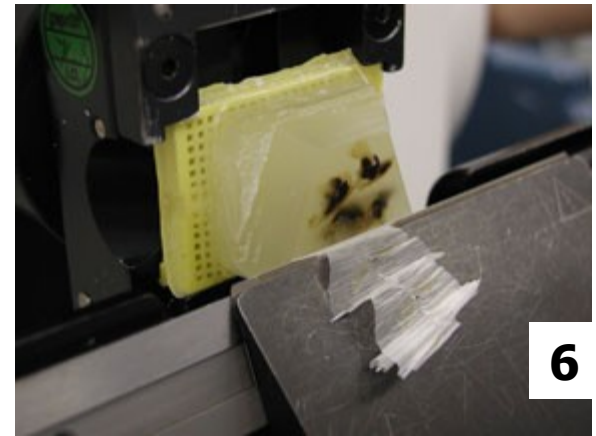
3



4



5



6



7



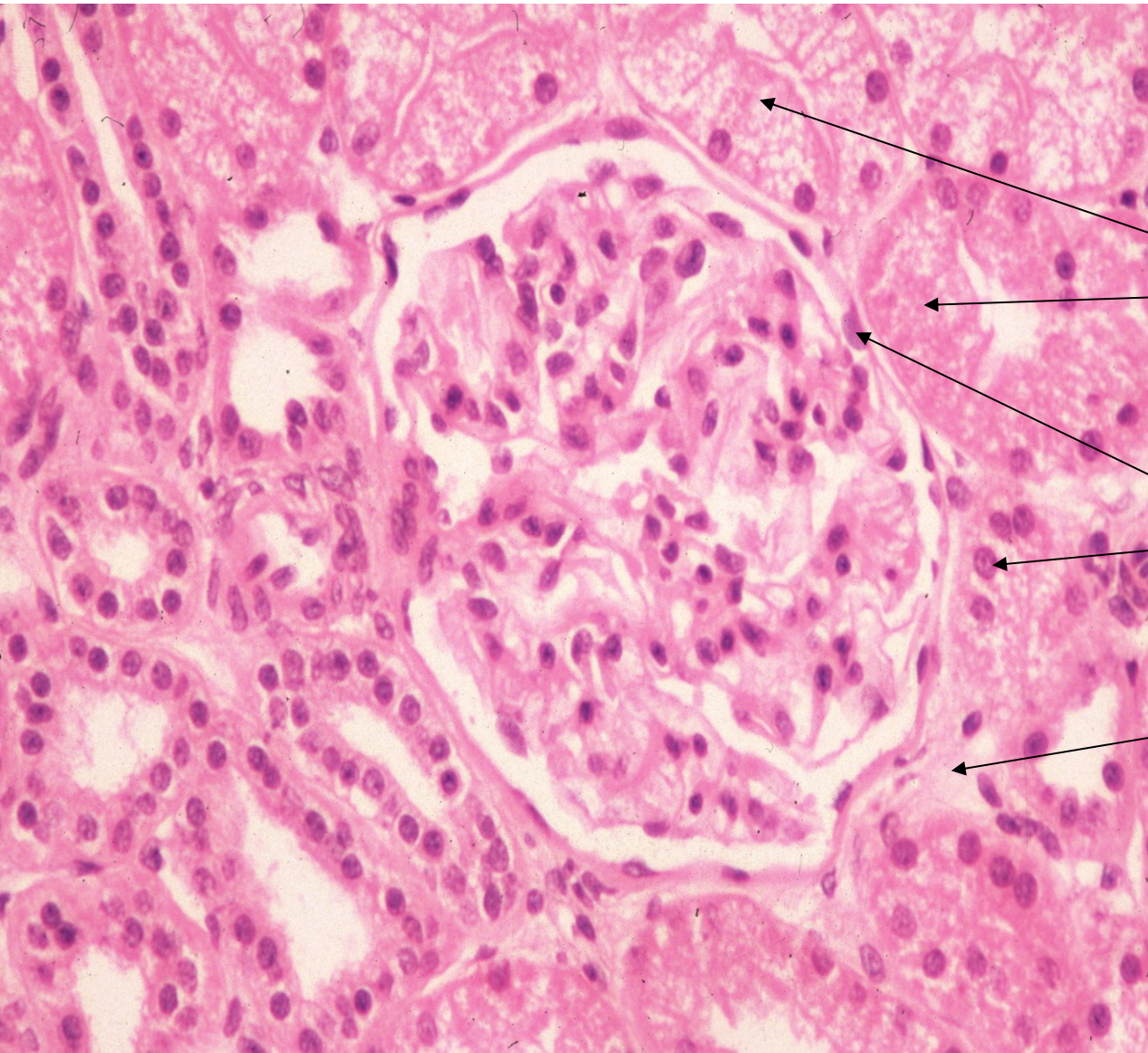
8

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)

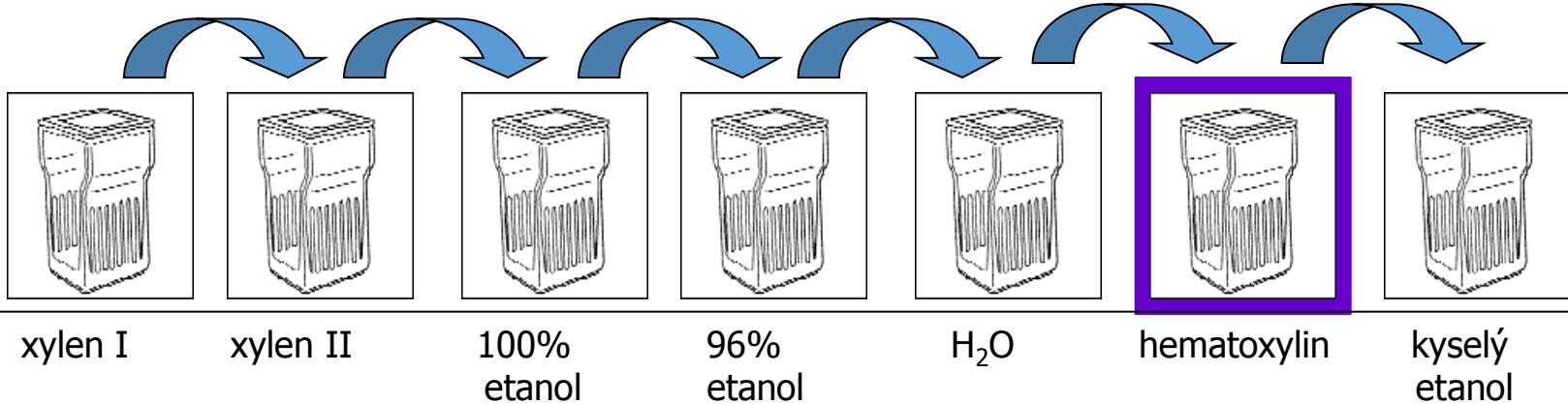
deparafinace

rehydratace

praní

barvení

diferenciace



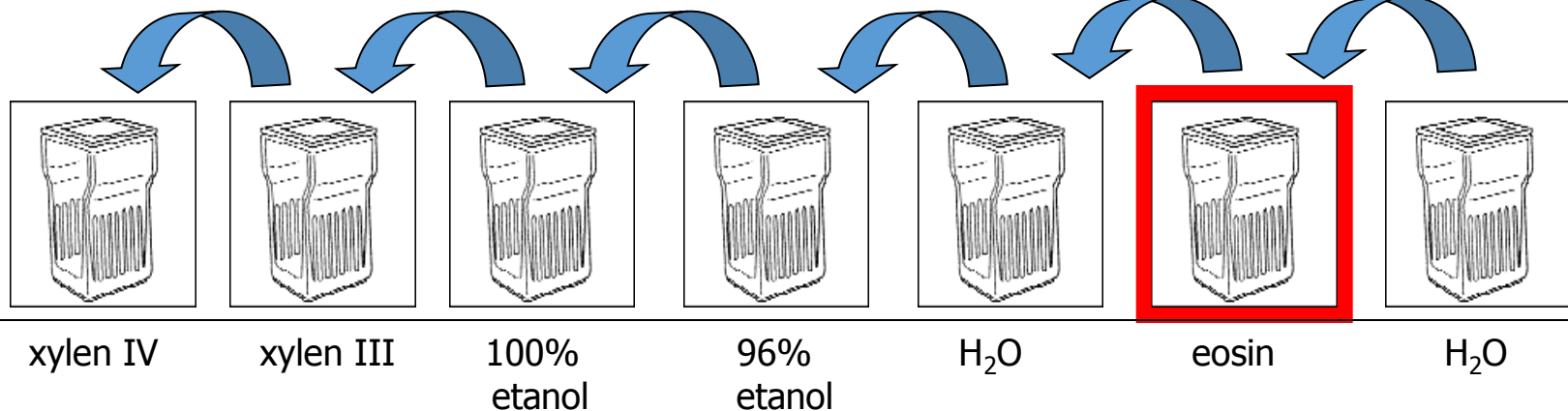
projasnění

dehydratace

praní

barvení

praní



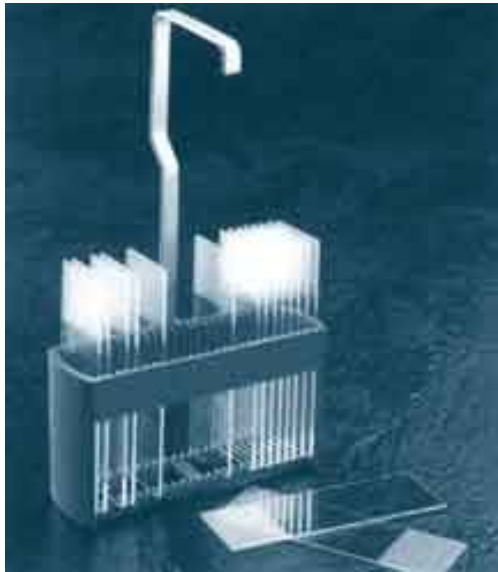
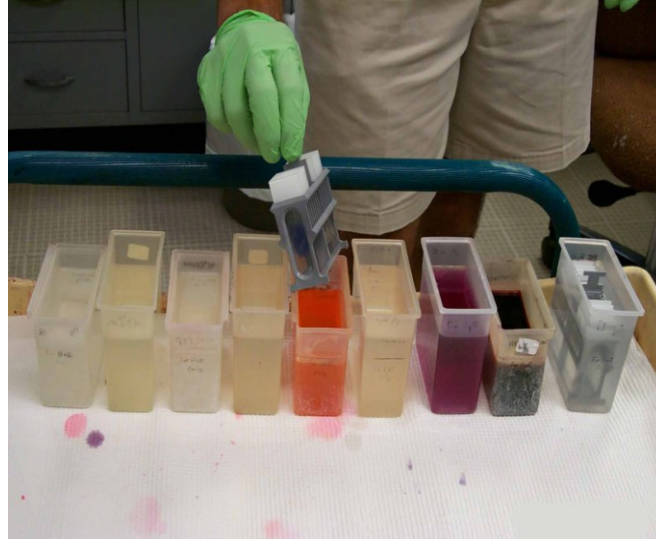
RUTINNÍ BARVENÍ: HEMATOXYLIN EOSIN (HE)

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

≈

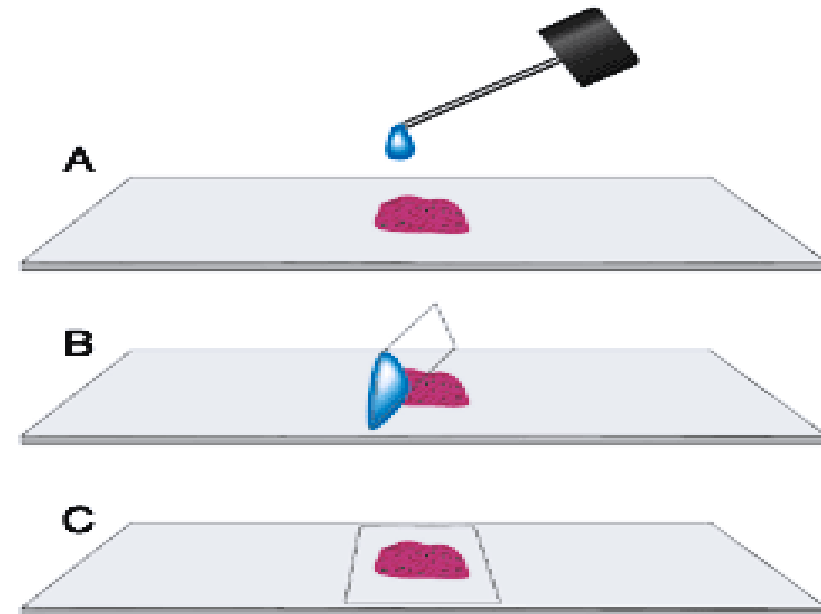
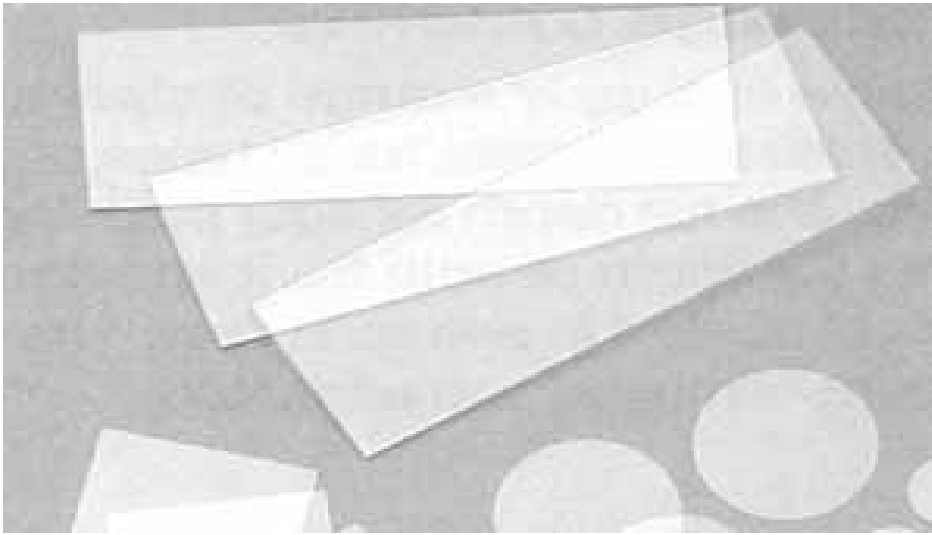


- **Leica ST 4040** Lineární barvicí automat - velkokapacitní barvení vzorků jedním programem (např. H&E až 1000 skel).



MONTOVÁNÍ

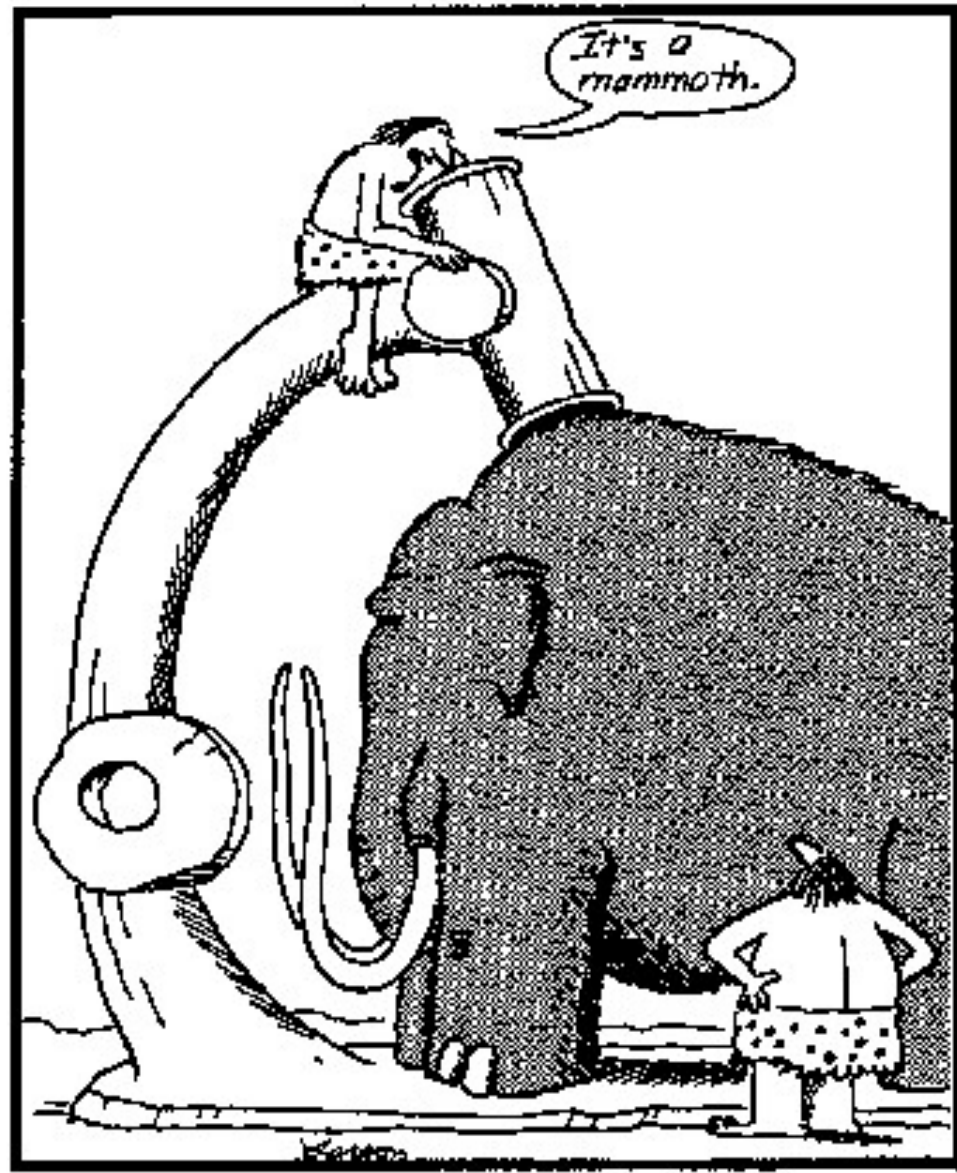
- uzavření preparátu – kapkou montovacího media a krycím sklíčkem \Rightarrow trvalý preparát



- 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*

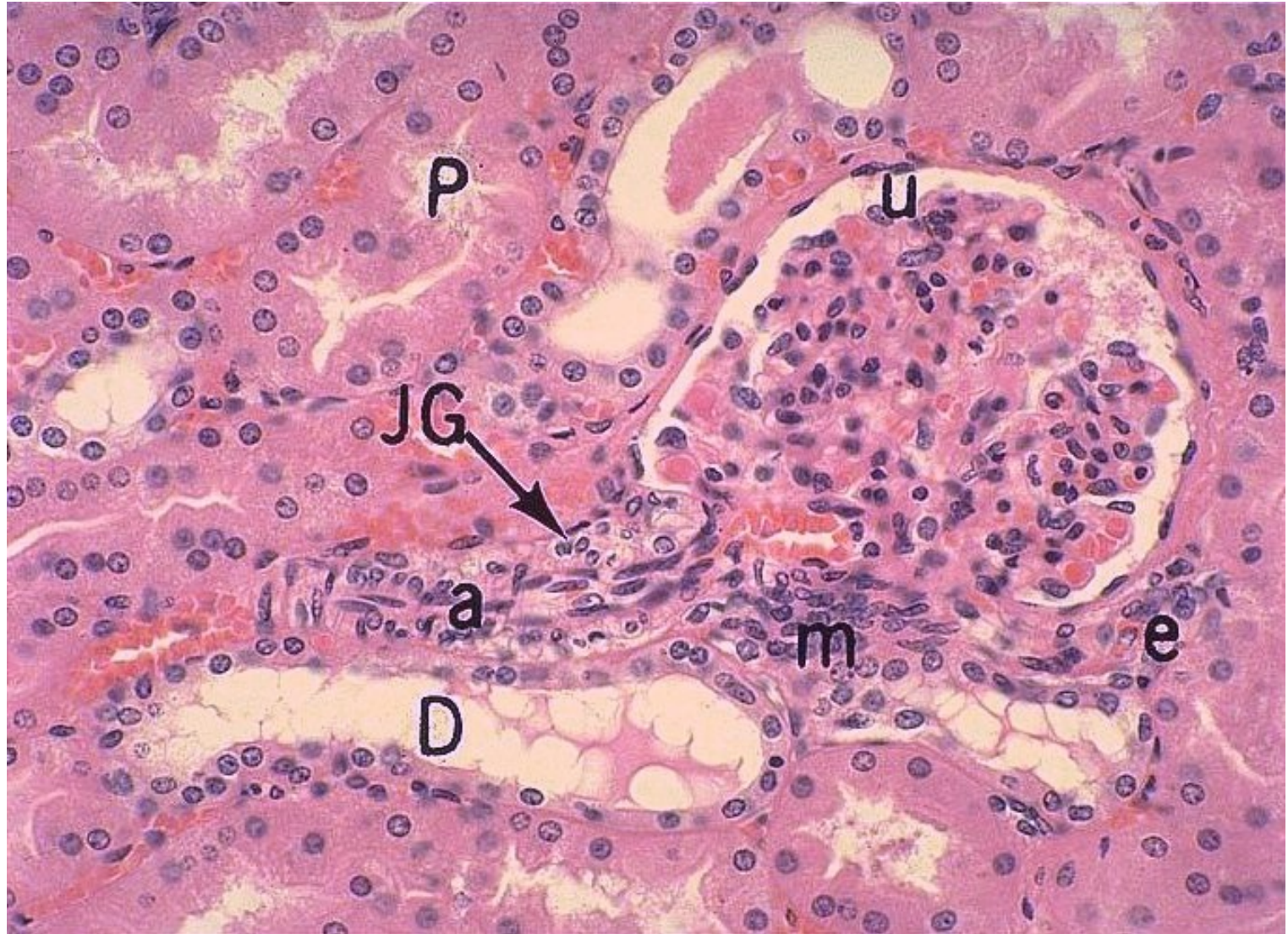
jádra – červená

erytrocyty – oranžové

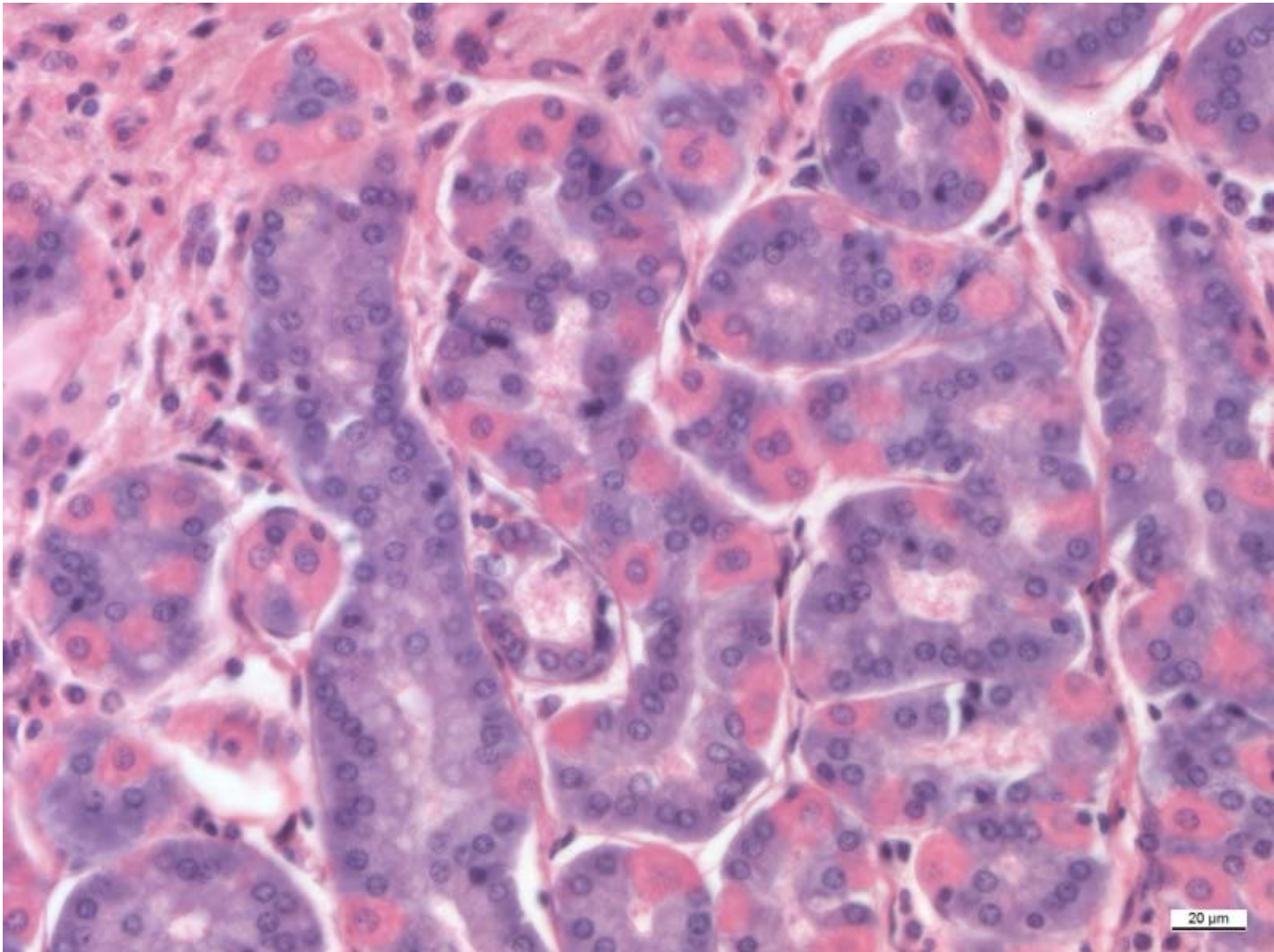
svalová tkáň – červená

kolagenní vlákna – modrá

Hematoxylin a eosin (HE)

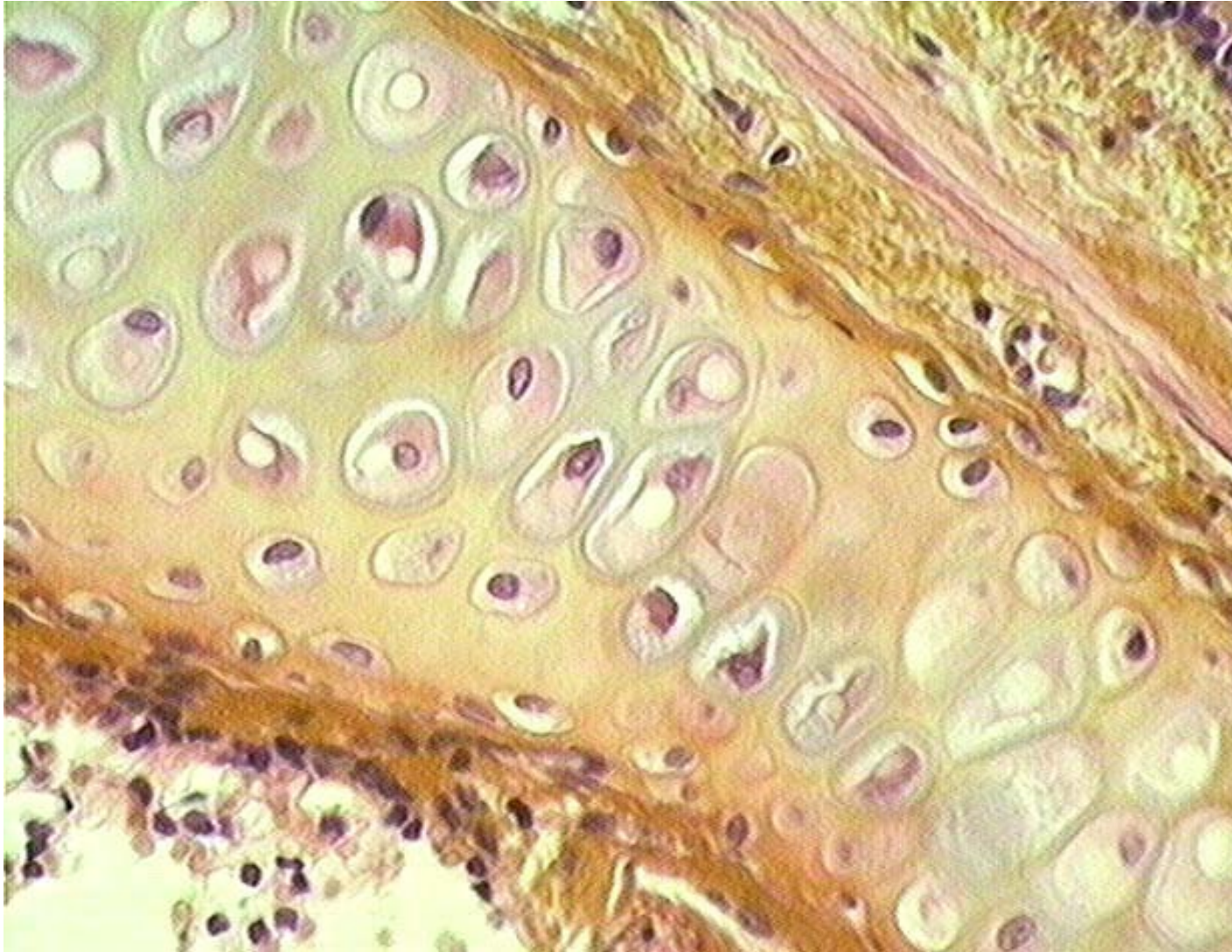


basofilní x acidofilní cytoplazma



fundus ventriculi

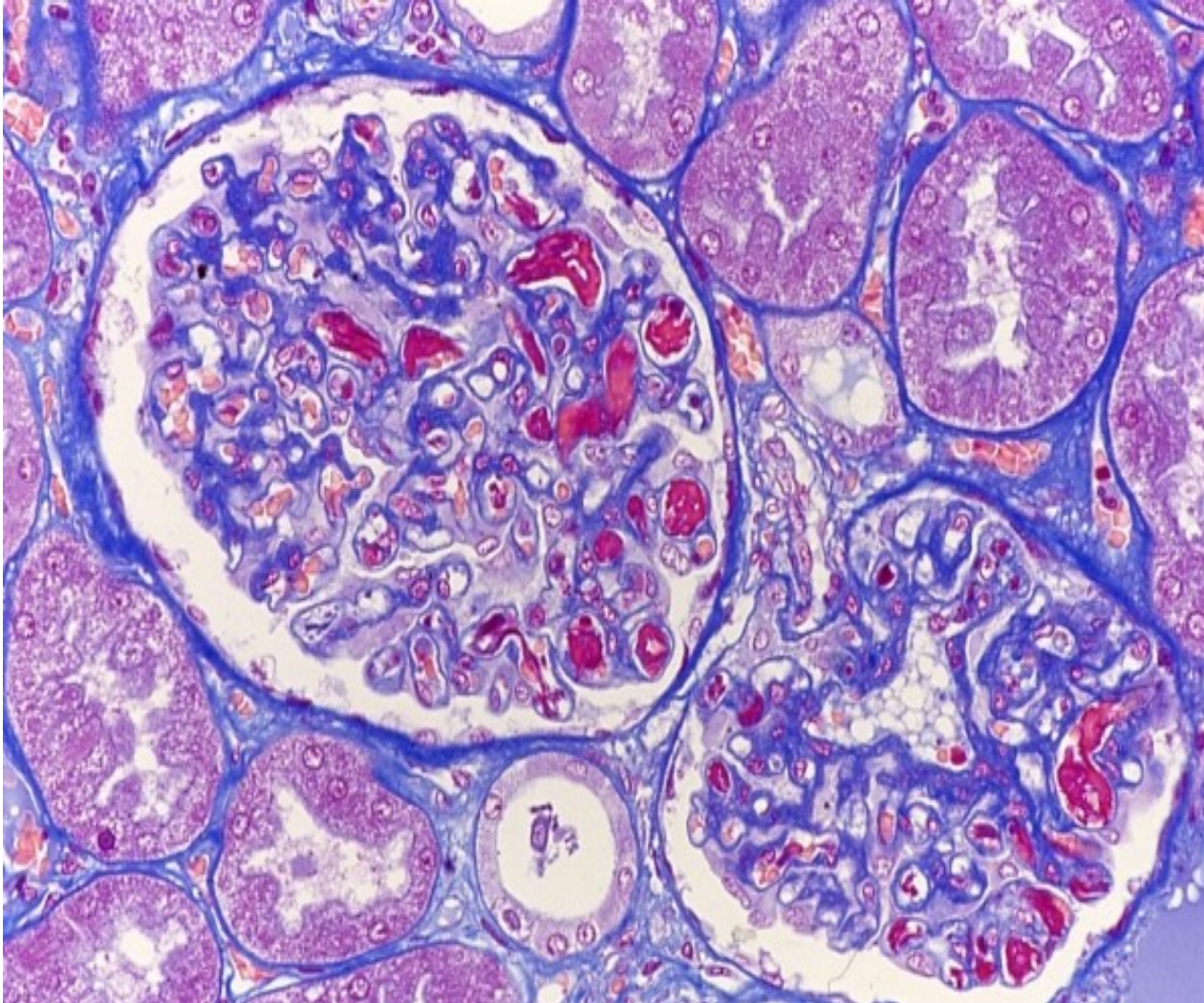
Hematoxylin, eosin a šafrán (HEŠ)



chrupavka

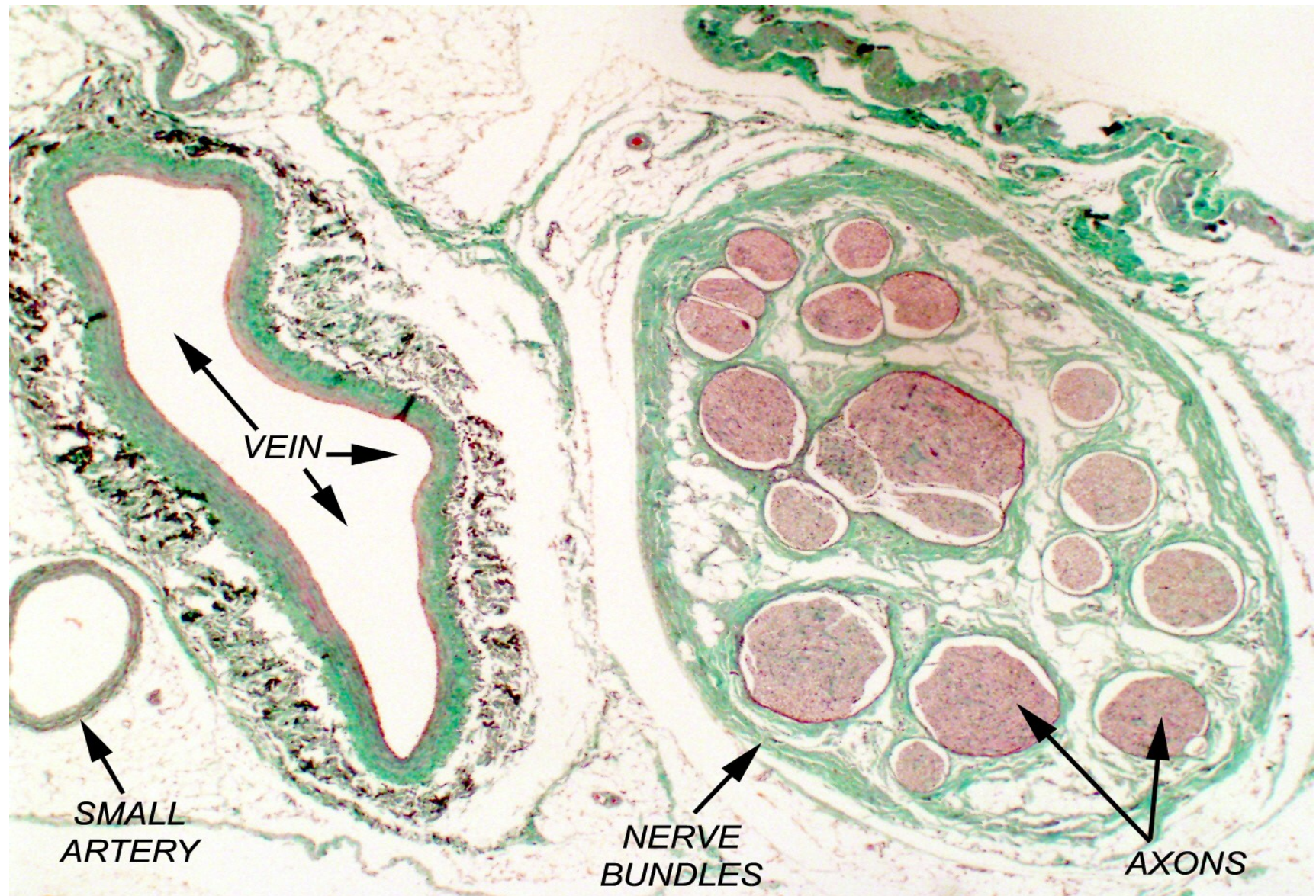
kolagenní vlákna žlutá

Azokarmín a anilin. modř (AZAN)



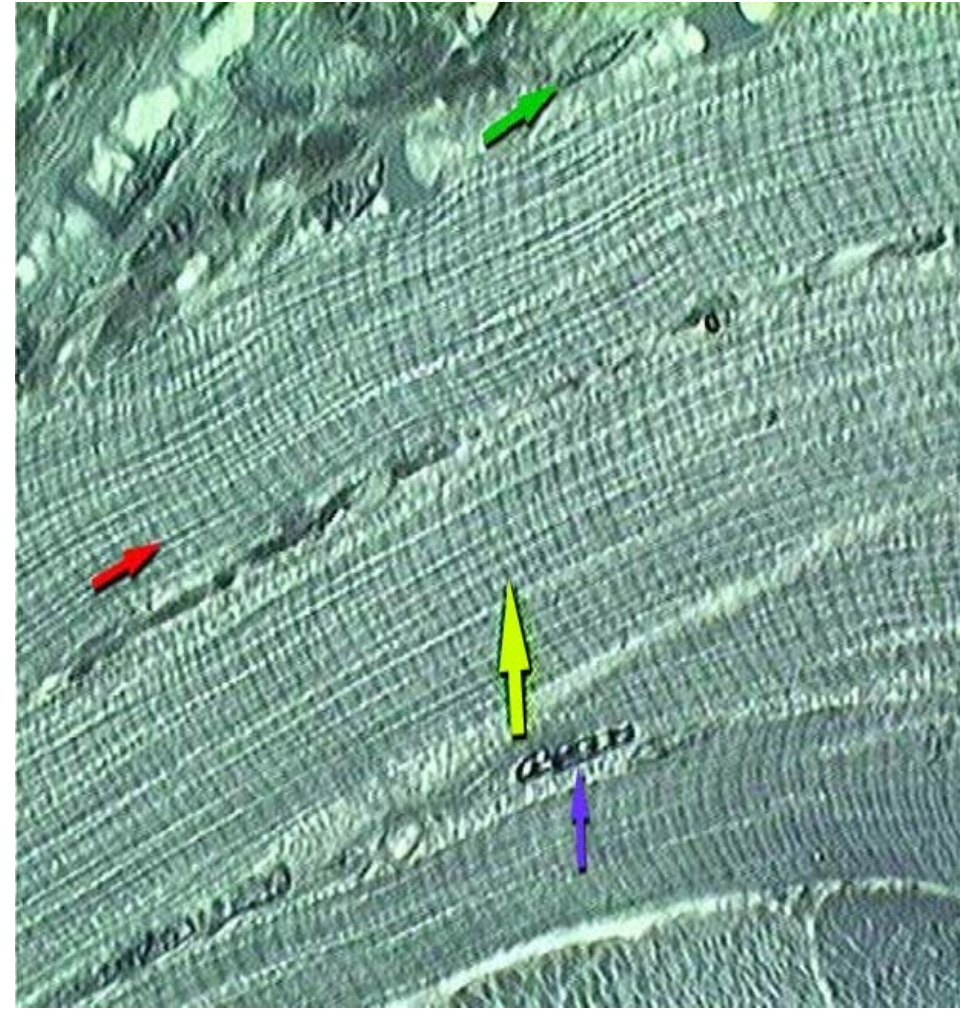
kolagenní vlákna modrá

Zelený trichrom



kolagenní vlákna zelená

Cytologická barvení – podle Heidenhaina



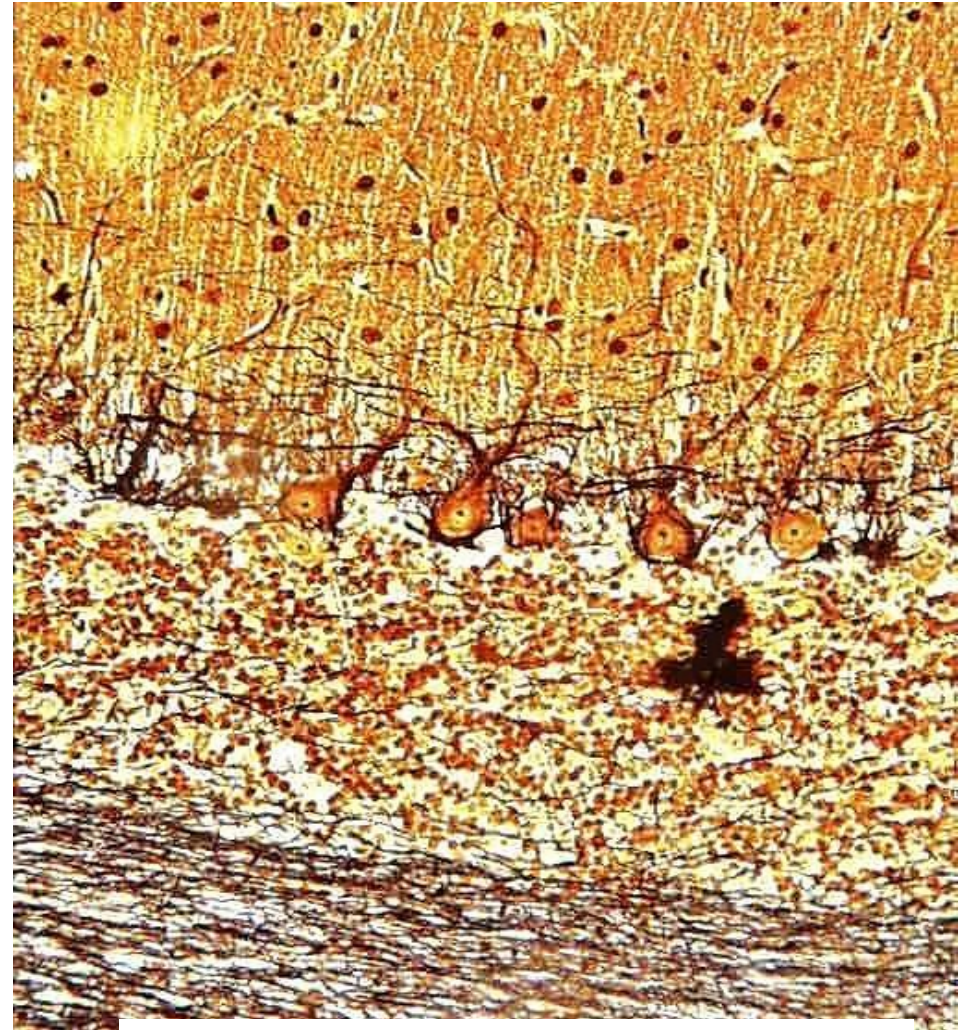
kosterní svalová tkáň

železitý hematoxylin

Impregnace „stříbrem“



slezina – retikulární vlákna



cerebellum – nervová vlákna

Zpracování tvrdých tkání (zub, kost)

- dekalifikace (odvápnění) – 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

Zpracování tkání pro elektronovou mikroskopii (EM)

Požadavky na pracovní podmínky:

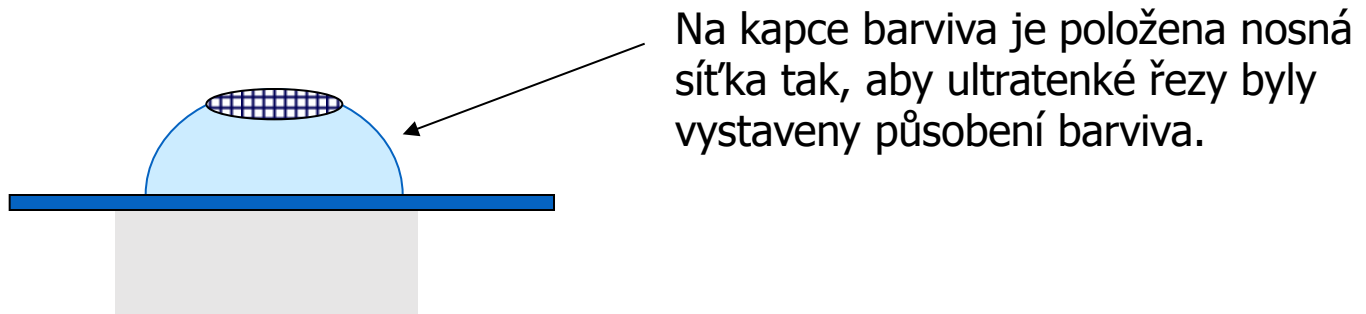
- pH všech roztoků (medií) 7,2 – 7,4 (pufry – kakodylátový nebo fosfátový)
- bezprašnost
- roztoky (media) – šetrné působení na tkáň (minimum artefaktů)

POSTUP

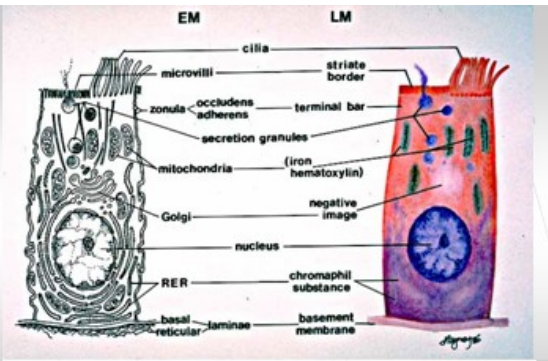
- **ODBĚR** – okamžitá fixace, velikost tkáňového bločku do 1 mm³
- **FIXACE** – glutaraldehyd (vazba aminoskupin) + OsO₄ (vazba lipidů) – dvojitá fixace
- **PRANÍ** – destilovaná voda
- **DEHYDRATAČE** - alkohol
- **ZALÉVÁNÍ** – vzorky se vkládají do želatinových kapslí nebo forem z plastu vyplněných zalévacím médiem (polymerizace – změna skupenství). Používají se epoxidové pryskyřice (Epon, Durcupan, Araldite) – ve vodě nerozpustná media
- **KRÁJENÍ** – ultramikrotom
- **KONTRASTOVÁNÍ** („bavení“)

KONTRASTOVÁNÍ

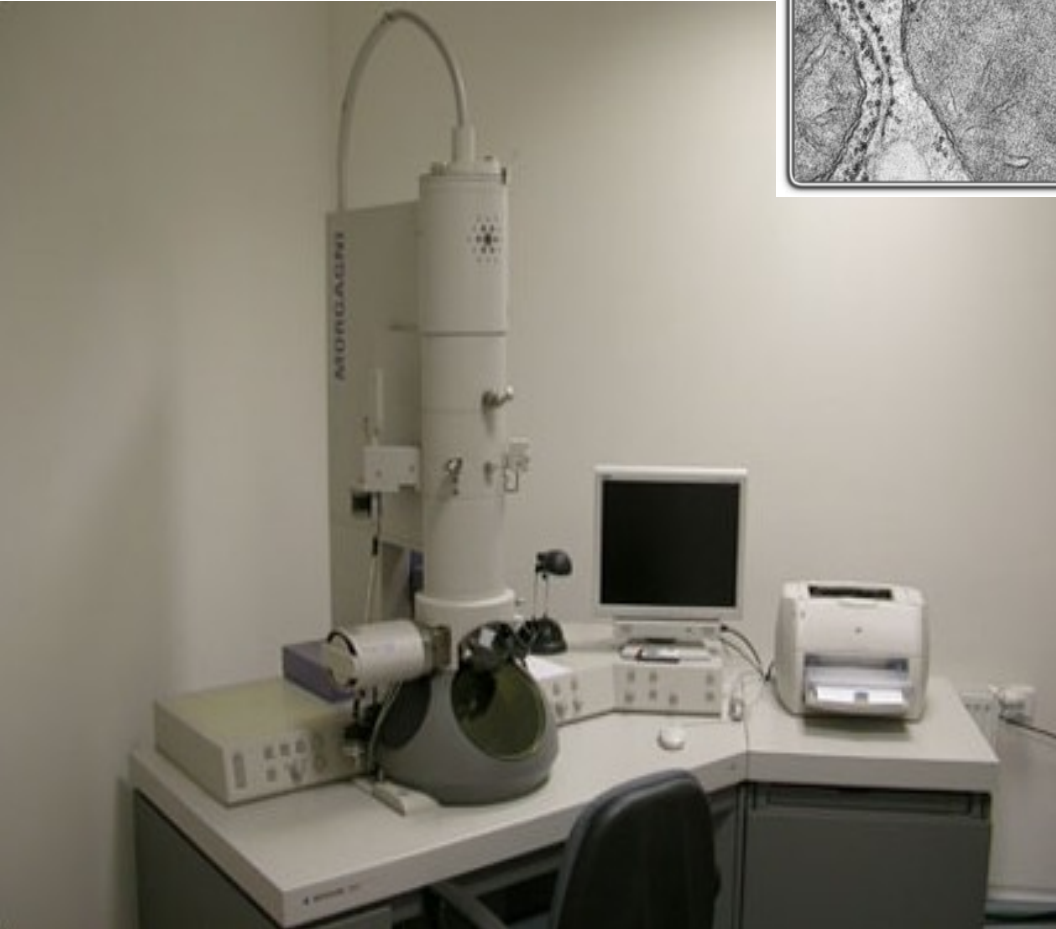
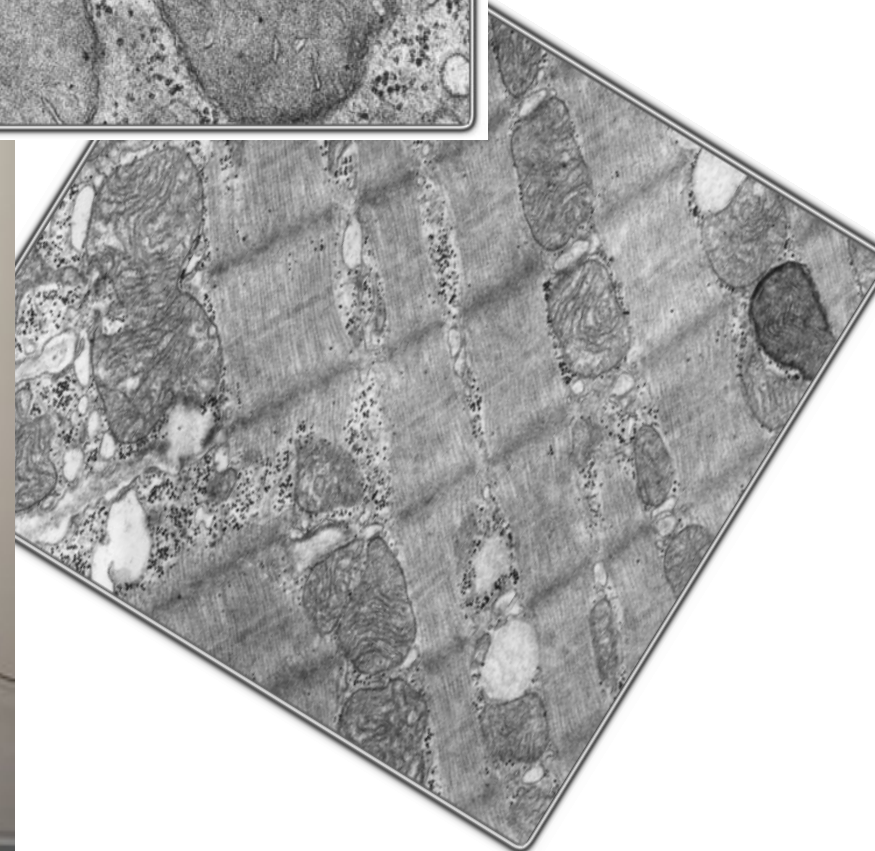
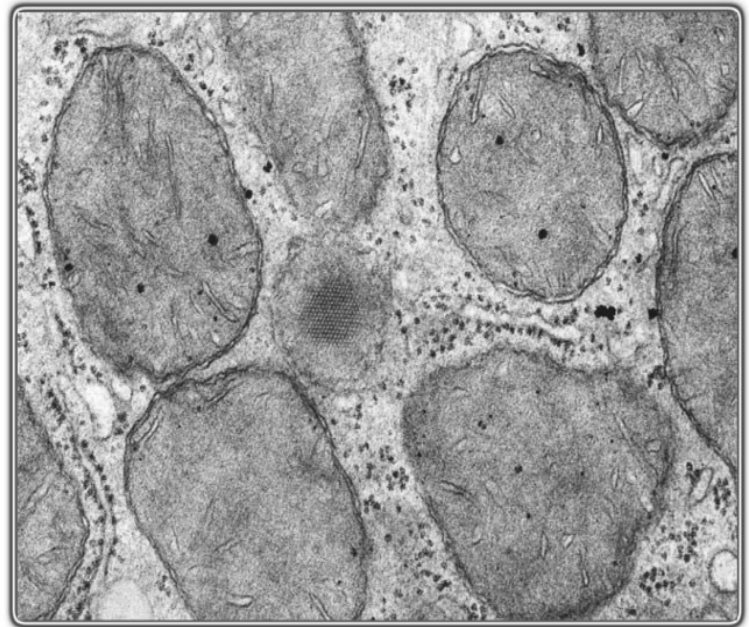
- princip diferenciacie struktur – různý rozptyl svazku elektronů v závislosti denzity struktur ;
„elektronová barviva“ – směsi těžkých kovů:
uranylacetát nebo citrát olovnatý



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



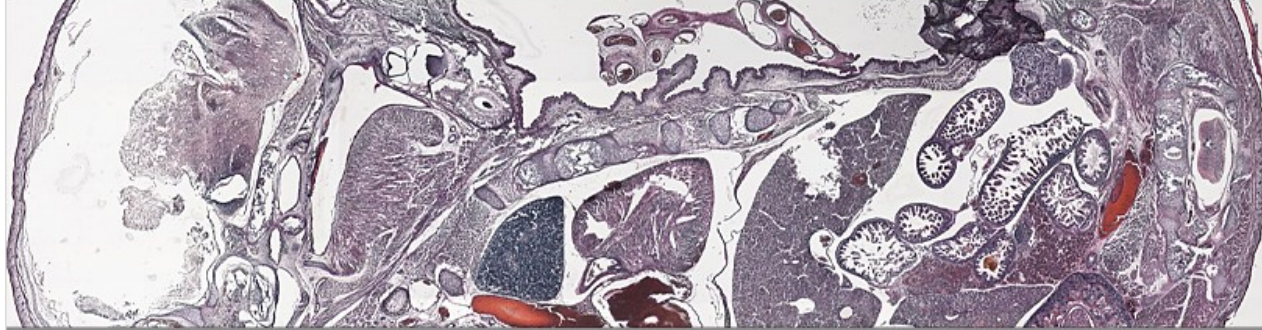
Columnar epithelial cell in electron (EM) and light (LM) microscope





DEPARTMENT OF HISTOLOGY AND EMBRYOLOGY
FACULTY OF MEDICINE - MASARYK UNIVERSITY

Home Research Grants Education Publication People Instrumentation Contact



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