

# 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 - ..:00 (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 studiu**

str. 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: .....

[www.med.muni.cz/histology](http://www.med.muni.cz/histology)

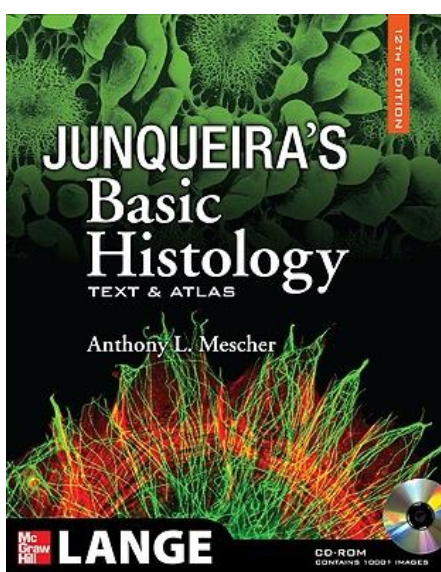
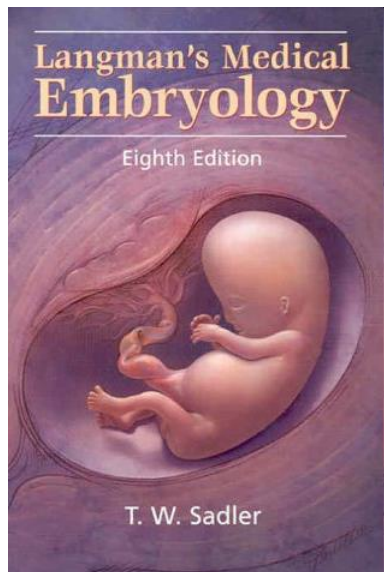
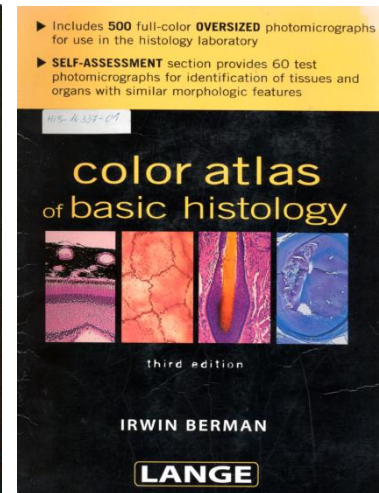
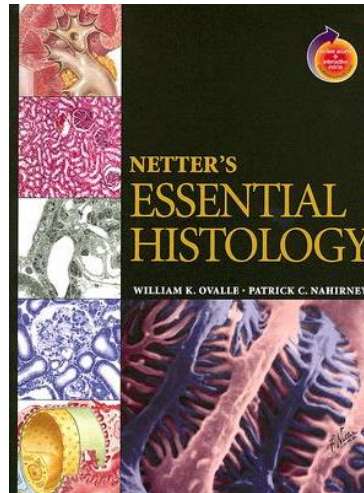
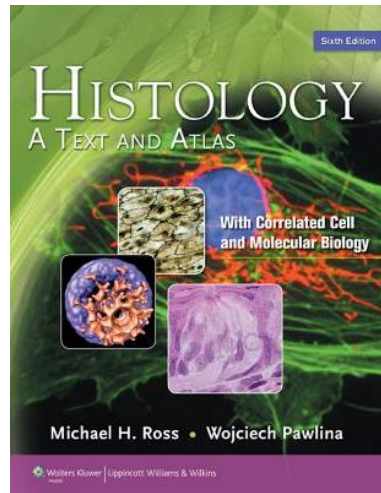
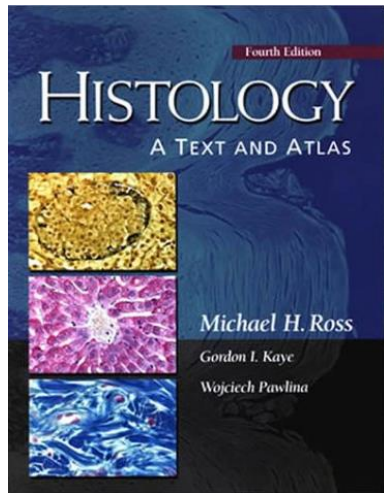
## Zápočet

- 100% účast v praktických cvičeních; max. 30% nahrazených absencí
- Každý student je vyzkoušen **4x** za semestr
- Zkouší se písemně (**test**) zejména znalost základních struktury a jejich odborné (latinské) názvy na základě připravených obrázků
- Pro získání zápočtu je nutné splnit všechny testy
- V případě neúspěchu je možná jedna oprava (**opravný test**), poté následuje ve stejném zkouškovém období opravný **zápočtový test** (dle SZŘ) pokrývající celý semestr
- Obrázky jsou přístupné v MedAtlasu nebo studijních materiálech praktik
- V případě neúspěchu u zápočtového testu, nebude zápočet udělen. Omluvenky z termínu opravného testu pouze cestou IS.

## **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



Ústav histologie a embryologie  
LF MU

**Mikroskopická anatomie**  
**Obecná histologie**

...

nebo

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



DOPOI



FACULTY  
OF MEDICINE

# Guide to General Histology and Microscopic Anatomy

MASARYKOVA UNIVERZITA  
Lékařská fakulta

Petr Vaňhara, Miroslava Sedláčková,  
Irena Lauschová, Svatopluk Čech, Aleš Hampl

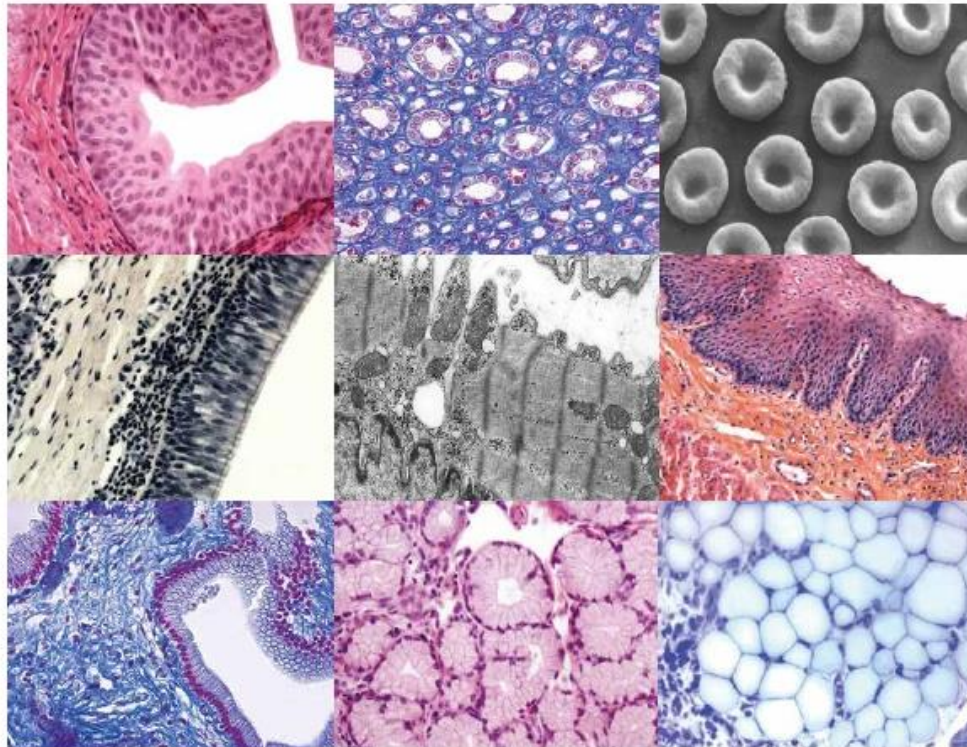
MASARYKOVA UNIVERZITA  
Lékařská fakulta

## MIKROSKOP ANATOM

Drahomír Horký, Svatopluk

## EMBRYOLOGIE DVĚKA

Drahomír Horký, Miroslava Sedláčková



BRNO 2011



BRNO 2011

# 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, gynekologie, 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)

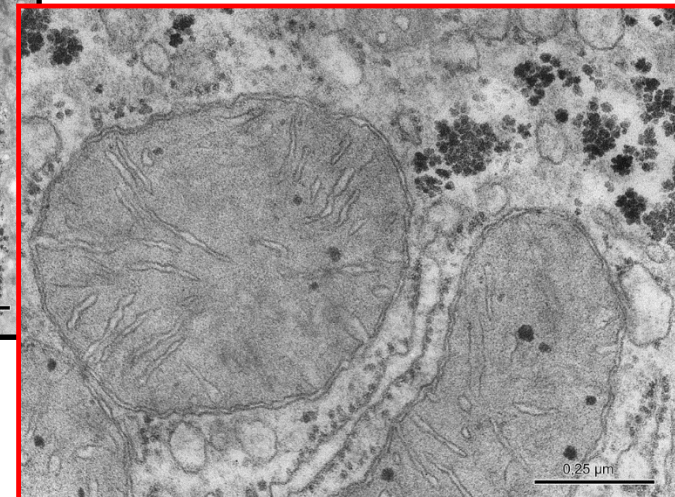
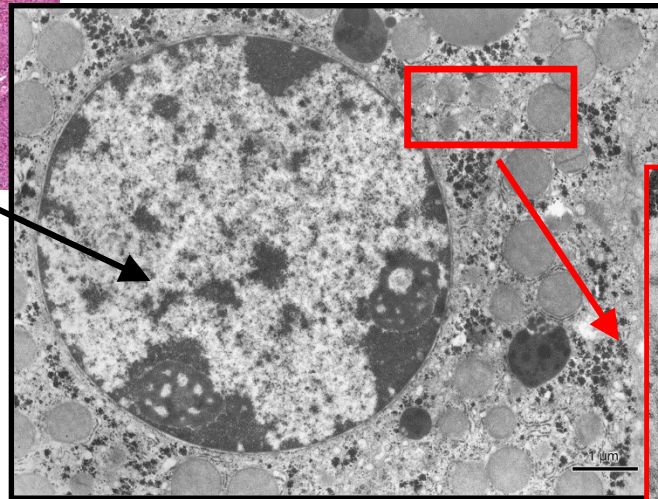
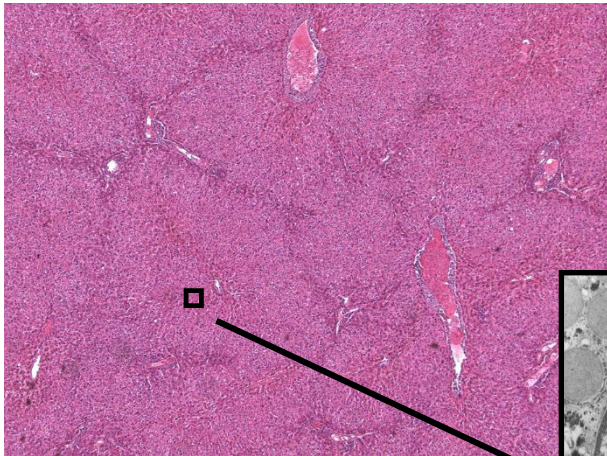
organogeneze (vývoj orgánů v jednotlivých systémech)

- **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 –  $\sim 0,1 \text{ mm}$
- Rozlišovací schopnost SM –  $\sim 0,2\text{-}0,5 \text{ }\mu\text{m}$
- Rozlišovací schopnost EM –  $\sim 1\text{-}2 \text{ nm}$



# 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 mm<sup>3</sup>**, 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, sraštění, 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 ( $\text{OsO}_4$ )
  - SOLI TĚŽKÝCH KOVŮ –  $\text{HgCl}_2$
  
- **směsi:** FLEMMING ( $\text{OsO}_4$ ), ZENKER, HELLY, SUSA ( $\text{HgCl}_2$ ), 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 – 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.



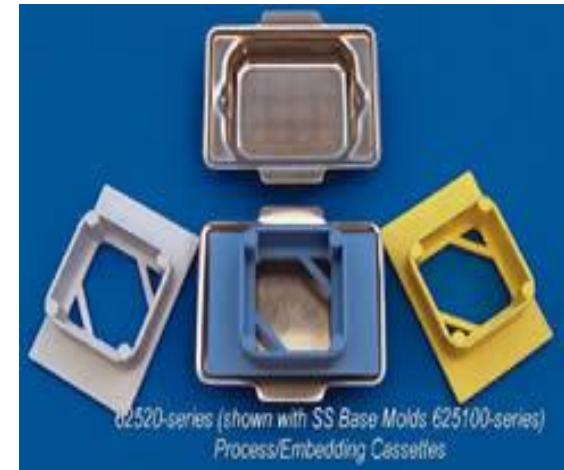
**Leica TP 1020**

odvodňovací tkáňový automat

## Zalévací komůrky - **papírové**



- **kovové** s orientačními plastovými prstenci

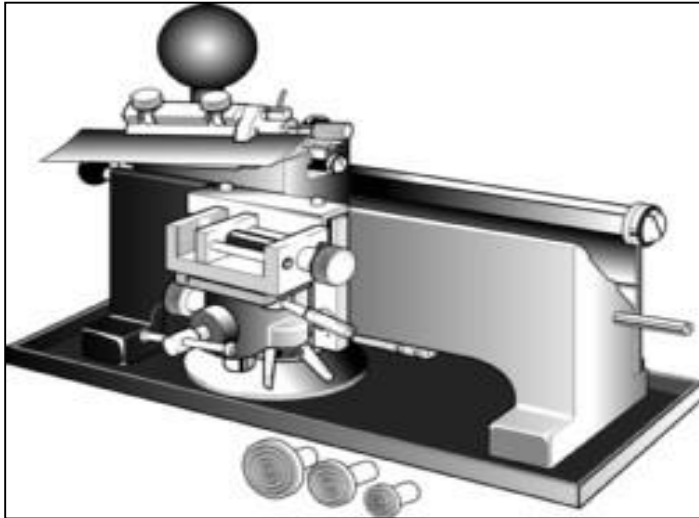


výsledek zalití

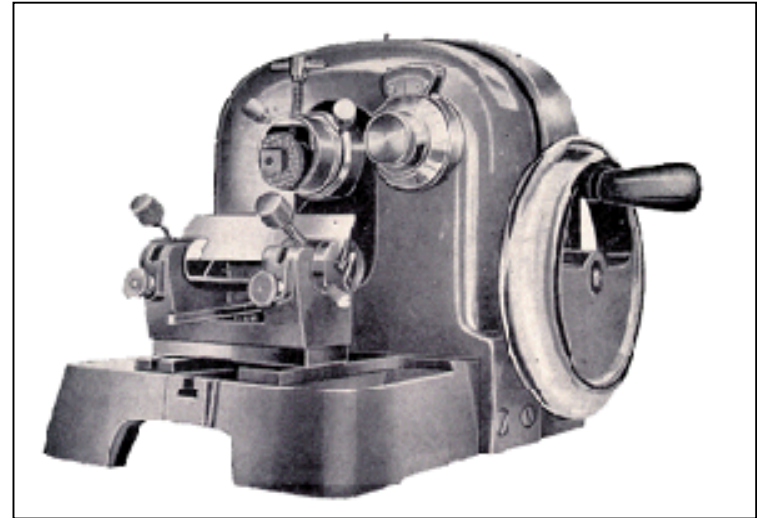


# KRÁJENÍ

- Mikrotom – regulace tloušťky řezů: 5 – 10  $\mu\text{m}$  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

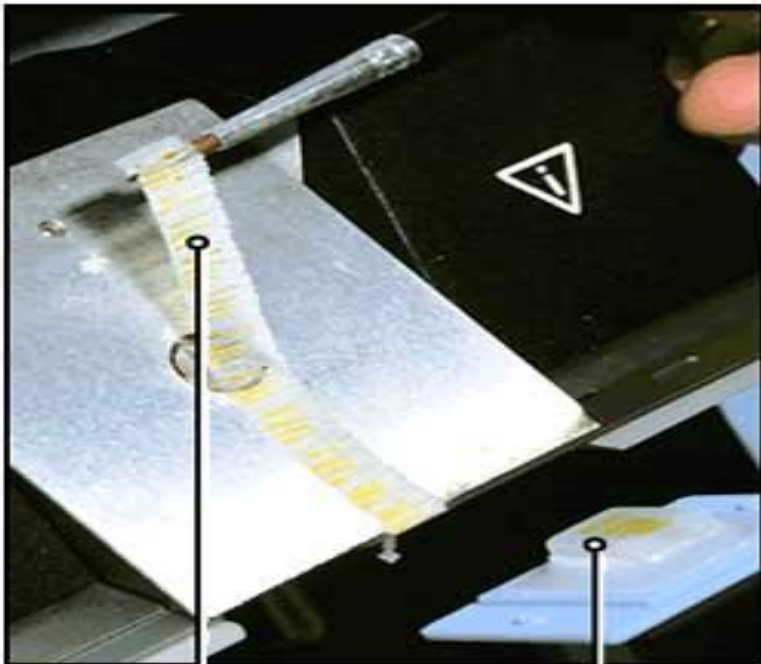


# Rotační mikrotom



## kryostat

= rotační mikrotom v mrazicím boxu ( $-60^{\circ}\text{C}$ );  
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).



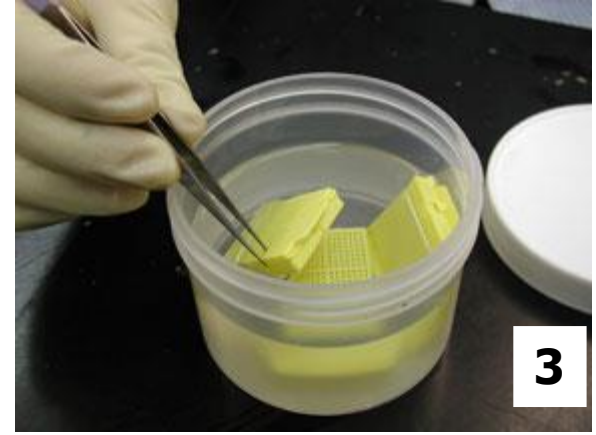
Před barvením se z řezu na skle musí odstranit zalévací medium, které by bránilo průniku barviv.  
Např. parafin – deparafinace rozpustidlem parafinu, obvykle xylénem.



**1**



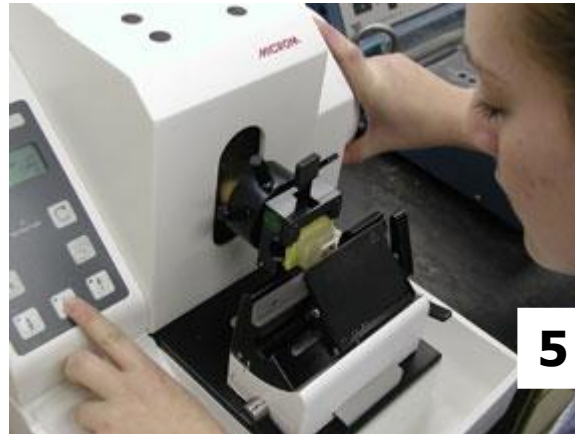
**2**



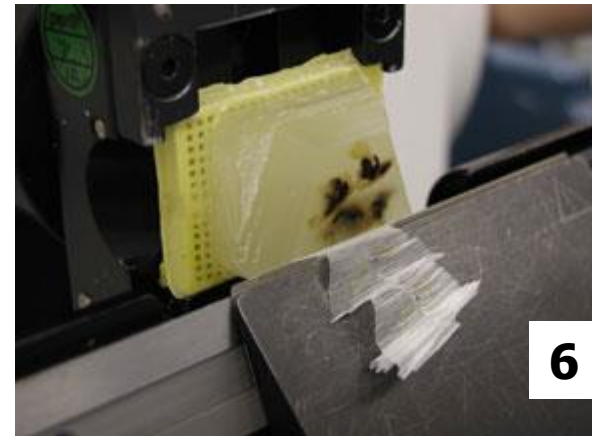
**3**



**4**



**5**



**6**



**7**



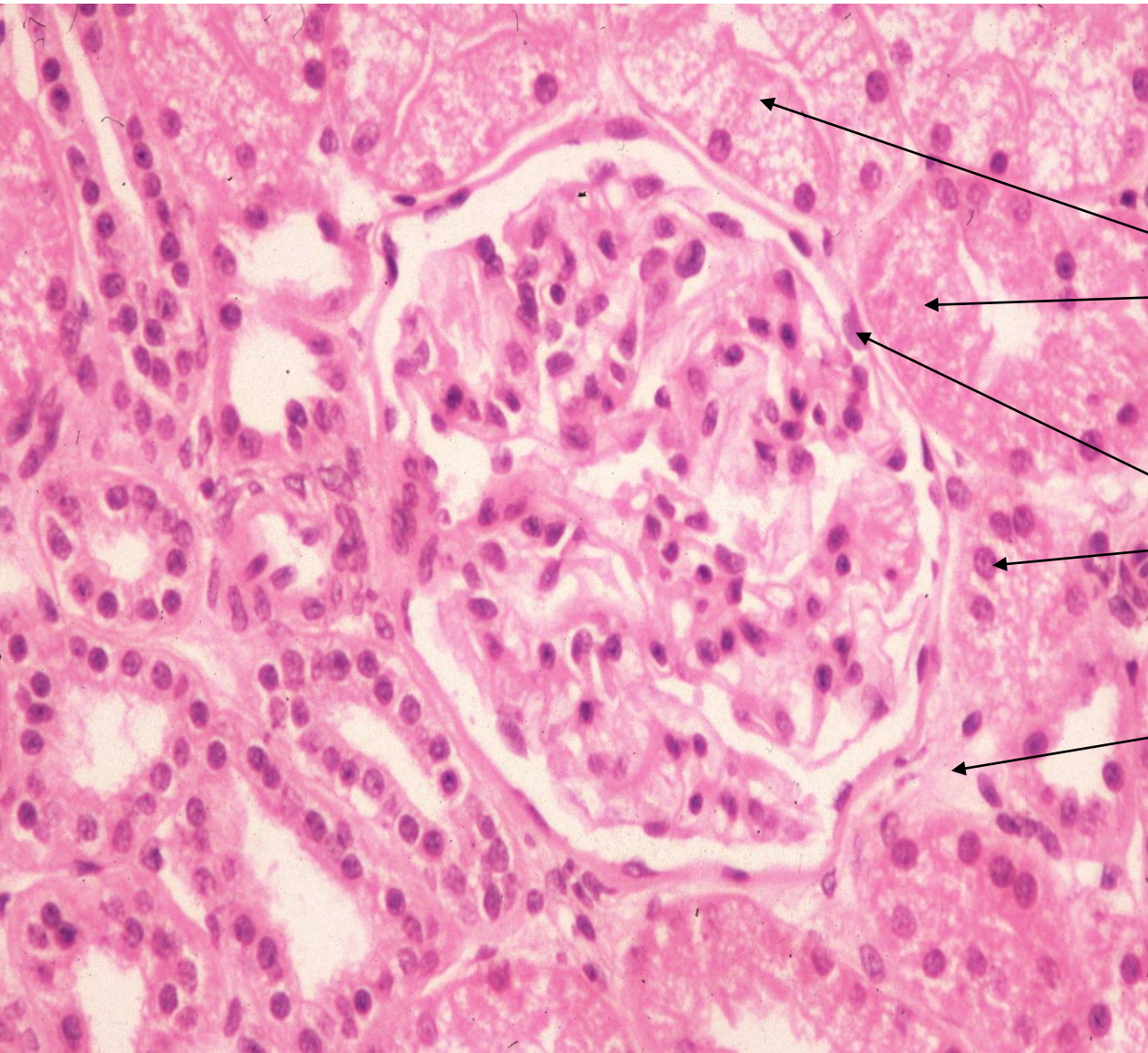
**8**

**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)

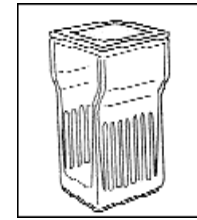
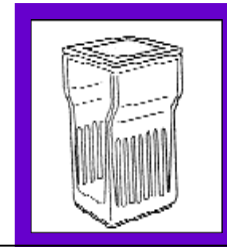
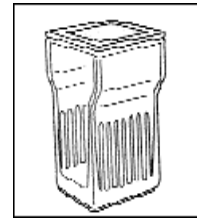
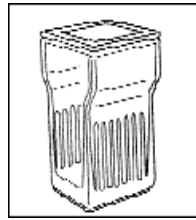
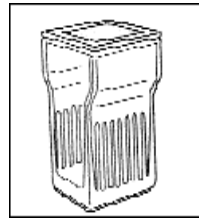
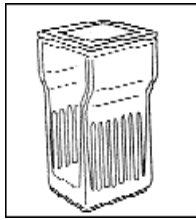
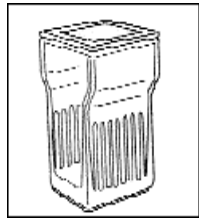
deparafinace

rehydratace

praní

barvení

diferenciace



xylene I

xylene II

100%  
etanol

96%  
etanol

H<sub>2</sub>O

hematoxylin

kyselý  
etanol

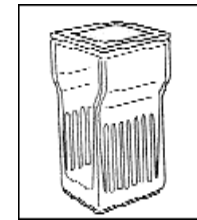
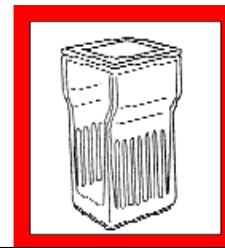
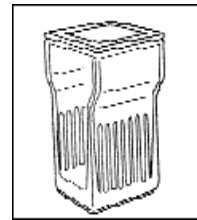
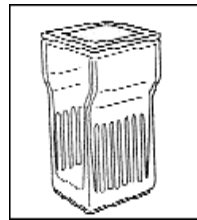
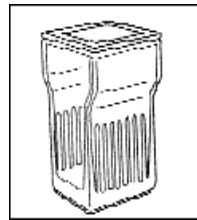
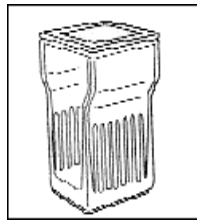
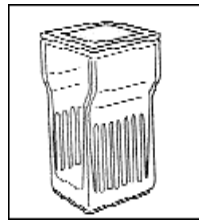
projasnění

dehydratace

praní

barvení

praní



xylene IV

xylene III

100%  
etanol

96%  
etanol

H<sub>2</sub>O

eosin

H<sub>2</sub>O



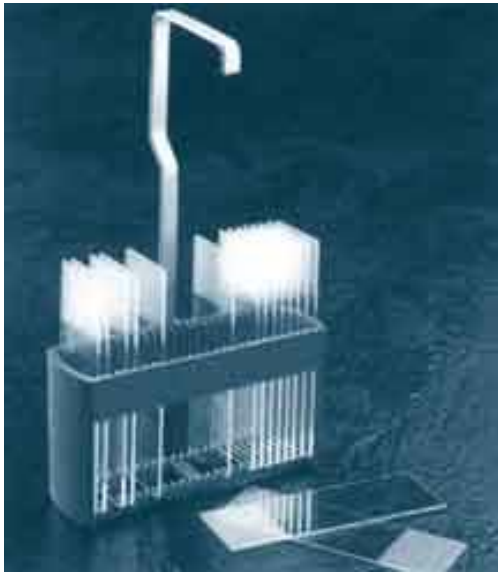
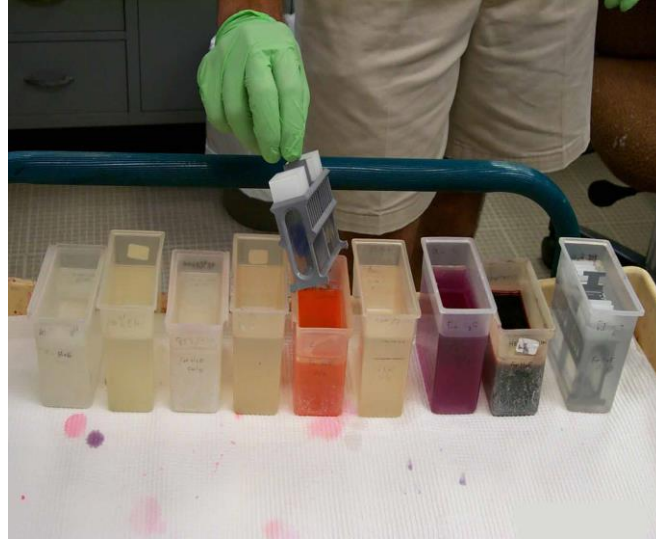
# RUTINNÍ BARVENÍ: HEMATOXYLIN EOSIN (HE)

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 (kvet) s barvicími médii

≈

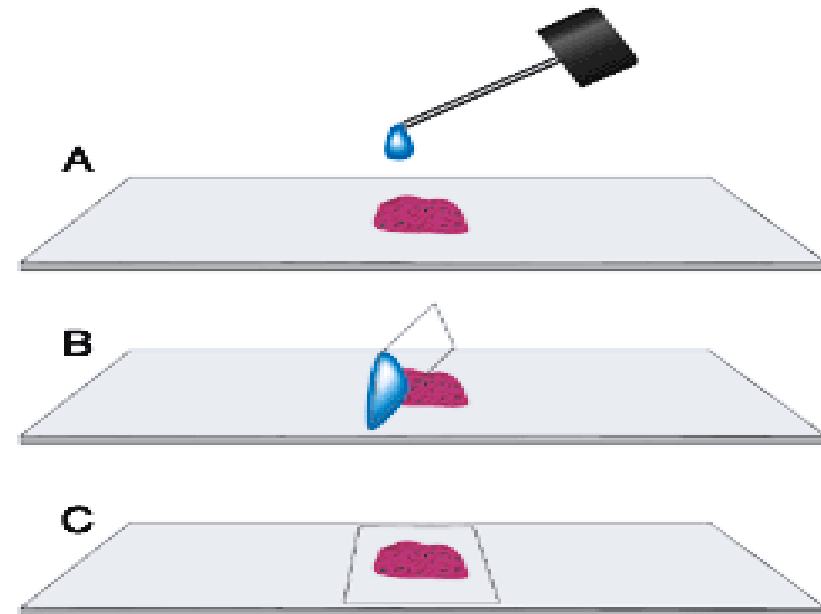
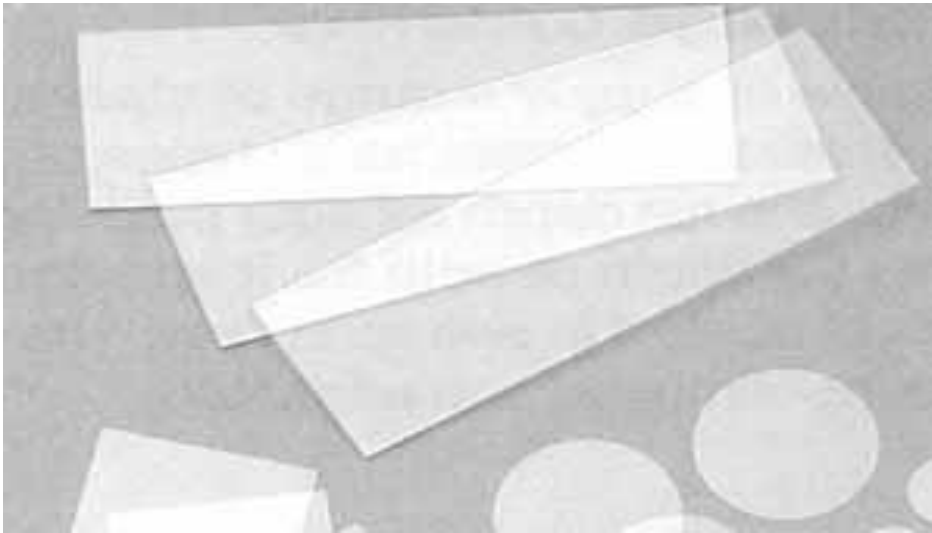


- **Leica ST 4040** Lineární barvicí automat - velkokapacitní barvení vzorků jedním programem (např. H&E až 1000 skel).



# MONTOVÁNÍ

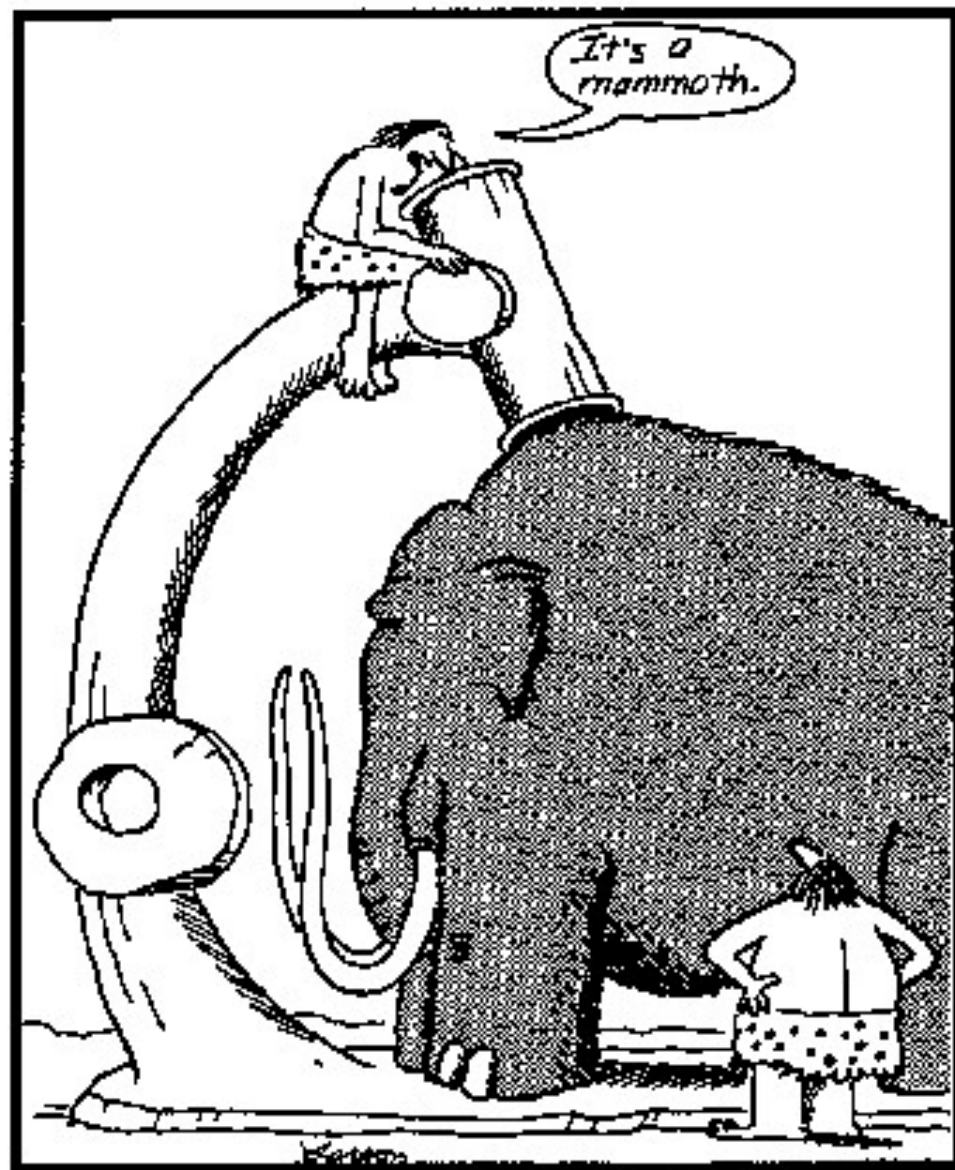
- uzavření preparátu – kapkou montovacího media a krycím sklíčkem  $\Rightarrow$  trvalý preparát



- rozpustná v xylenu – kanadský balzám
- rozpustná ve vodě – glycerin-želatina, arabská guma

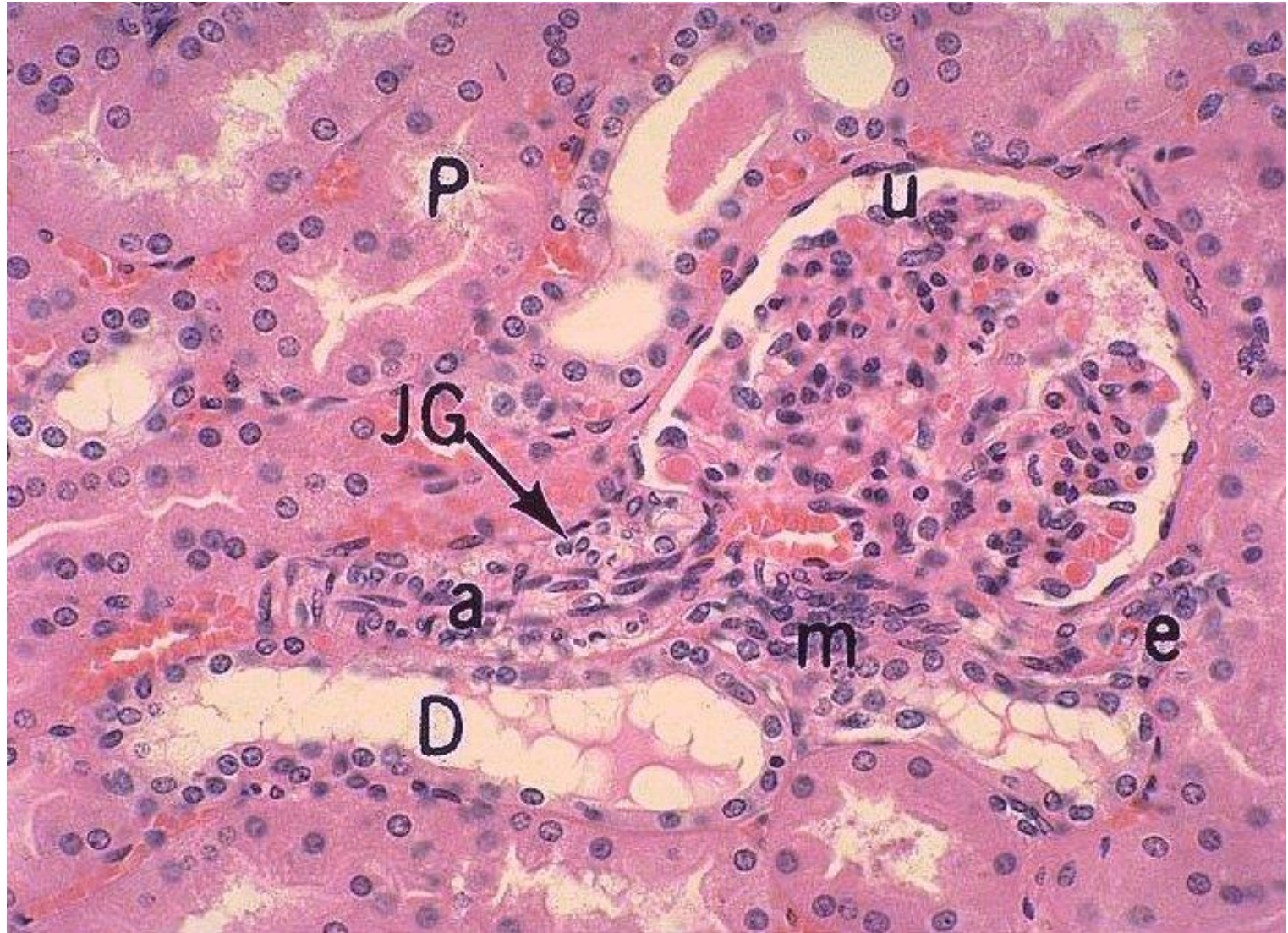


**trvalé histologické preparáty ke studiu v SM**



Early microscope

# Hematoxylin a eosin (HE)





# 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  $\mu\text{m}$ ) 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

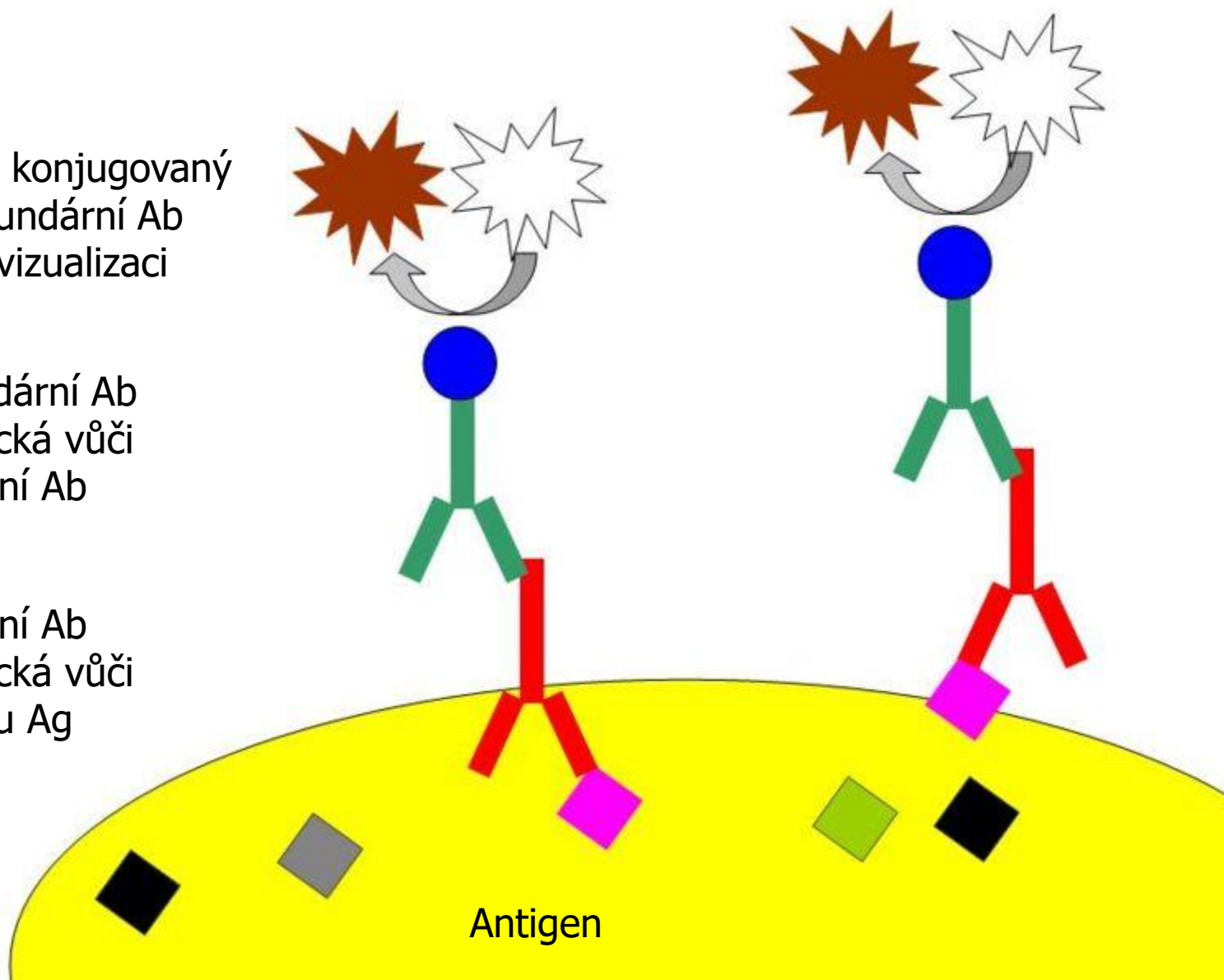
2. enzymy – křenová peroxidáza, AF, acetylcholinesteráza,

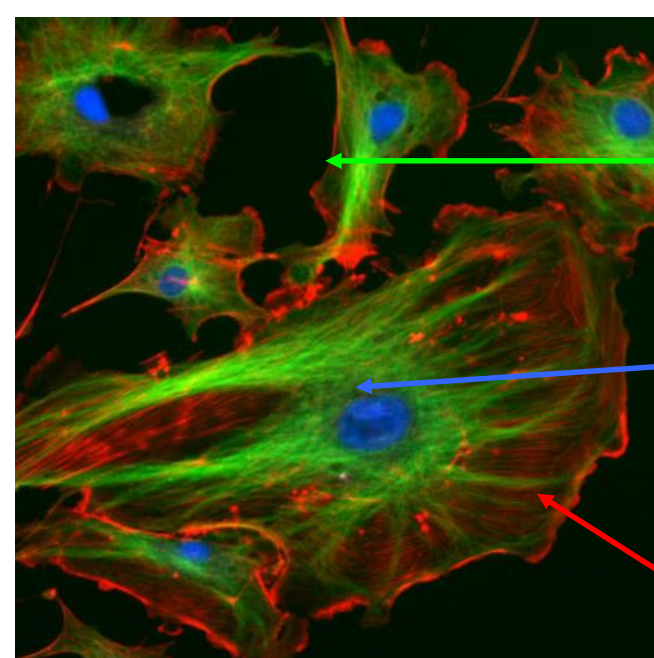
3. radioizotopy ( $I^{125}$ )

Enzym konjugovaný  
se sekundární Ab  
zajistí vizualizaci

Sekundární Ab  
specifická vůči  
primární Ab

Primární Ab  
specifická vůči  
epitopu Ag

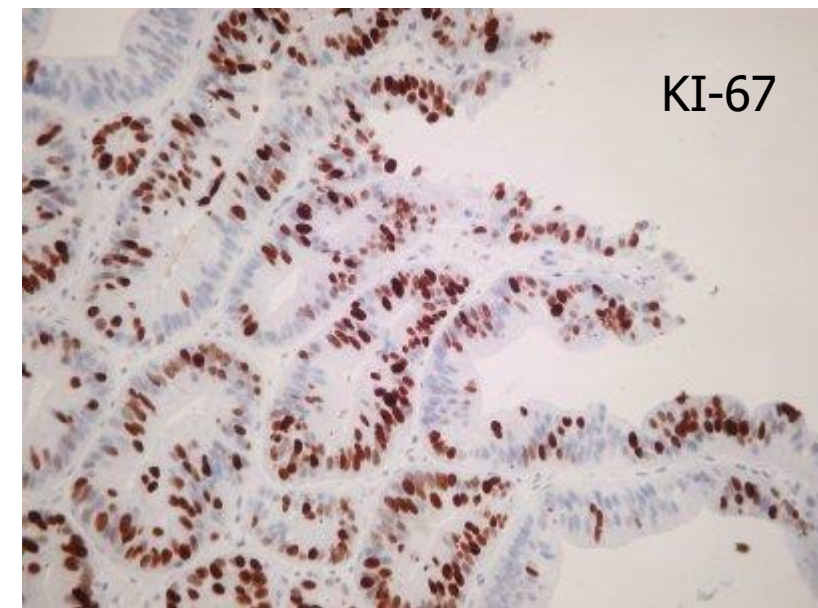
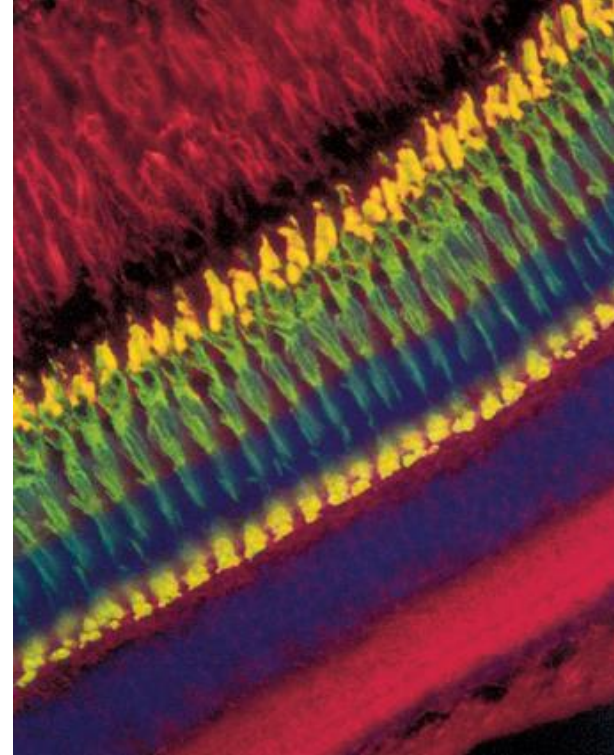




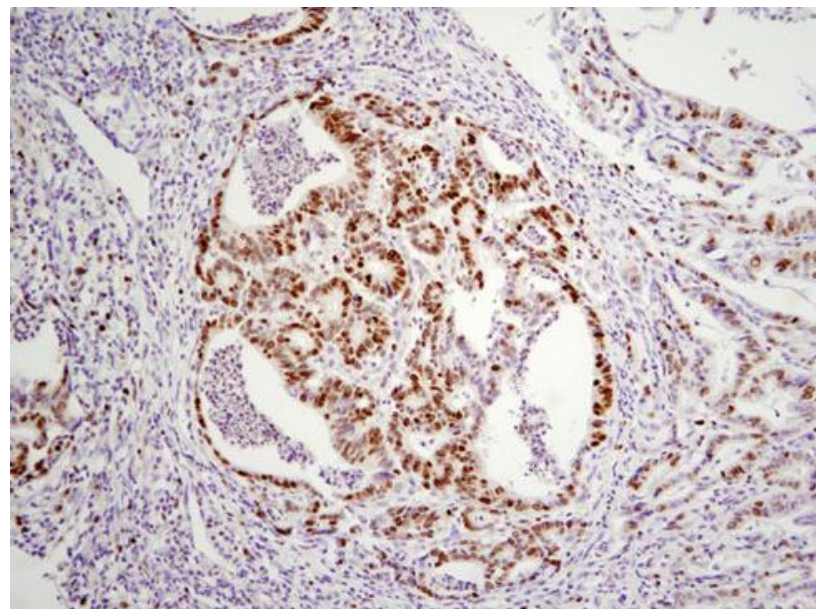
Aktin (cytoskelet)

DAPI (jádno)

Mikrotubuly (cytoskelet)

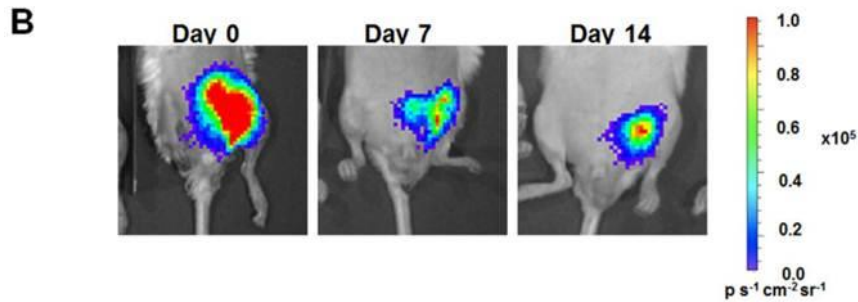
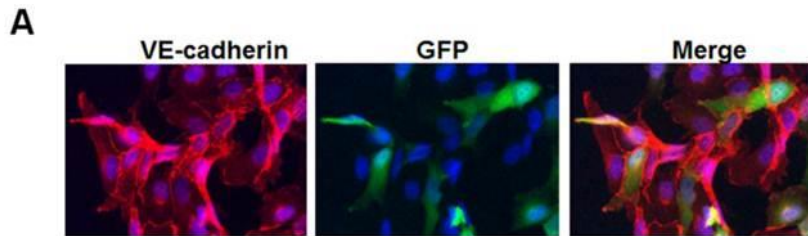


KI-67



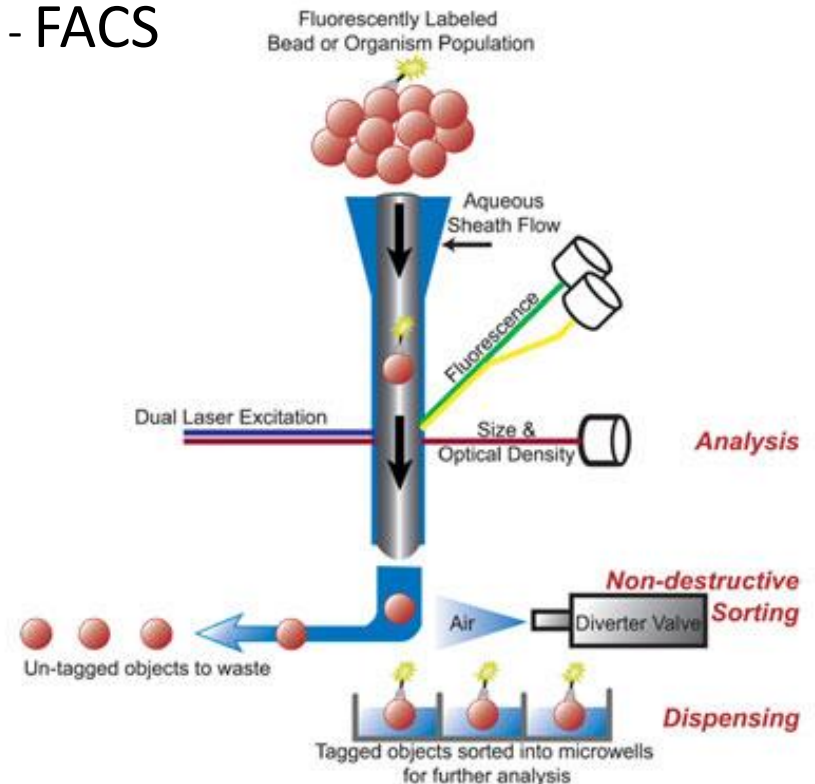
# In-vivo/live cell imaging

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

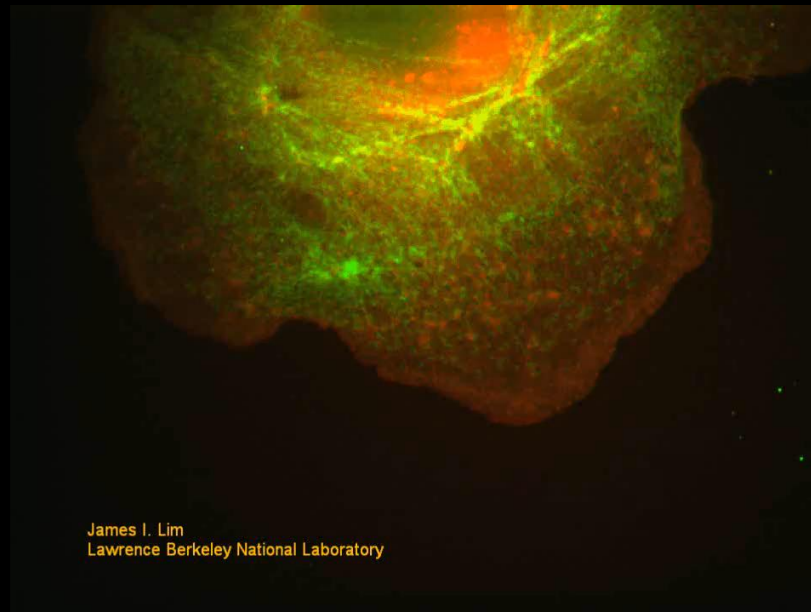
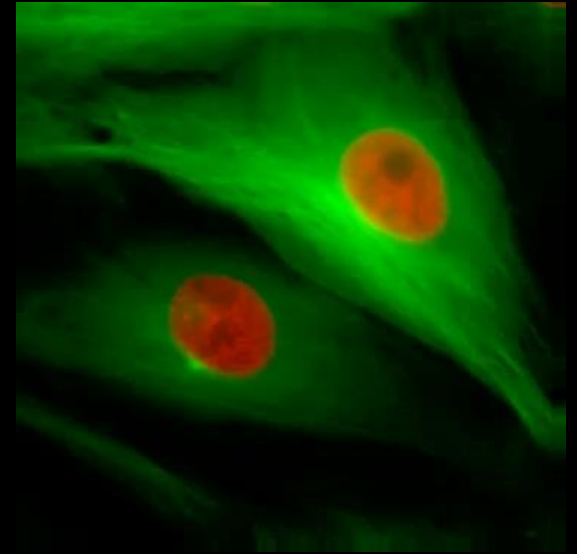
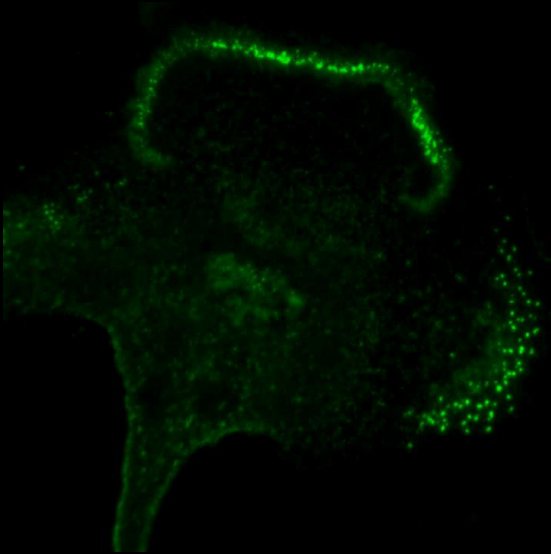


doi:10.7150/thno.3694

- FACS



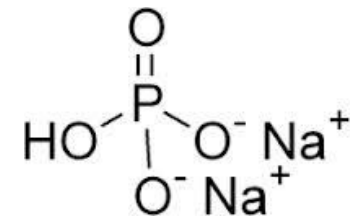
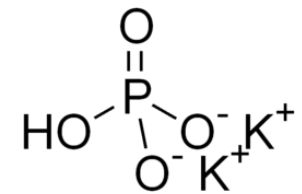
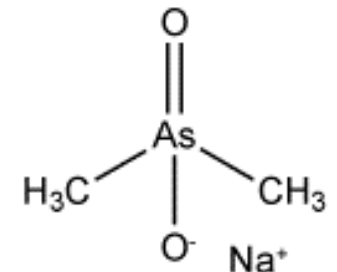
## - Fluorescenčně označené proteiny



# 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 mm<sup>3</sup>
- **FIXACE** – glutaraldehyd (vazba aminoskupin) + OsO<sub>4</sub> (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



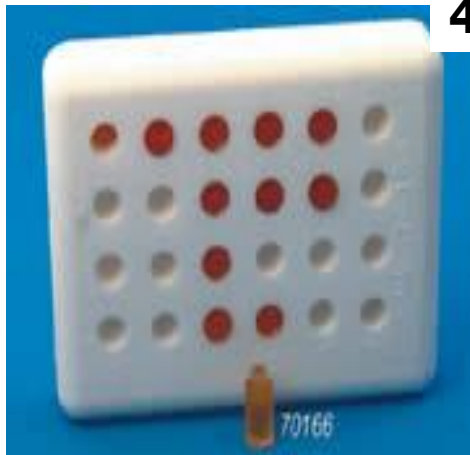
## Zalévací komůrky:



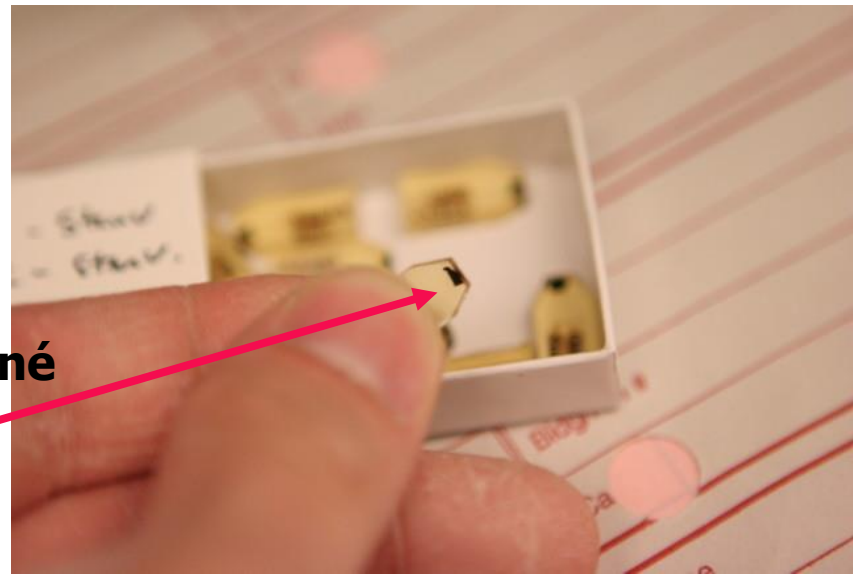
želatinové (1), plastové (2)

nosiče (držáky) kapslí (3)

ploténky s komůrkami  
(4, 5)



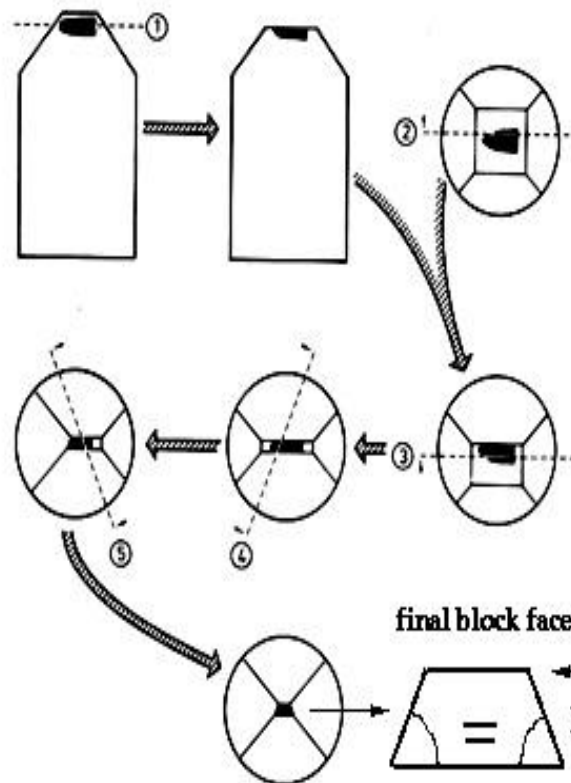
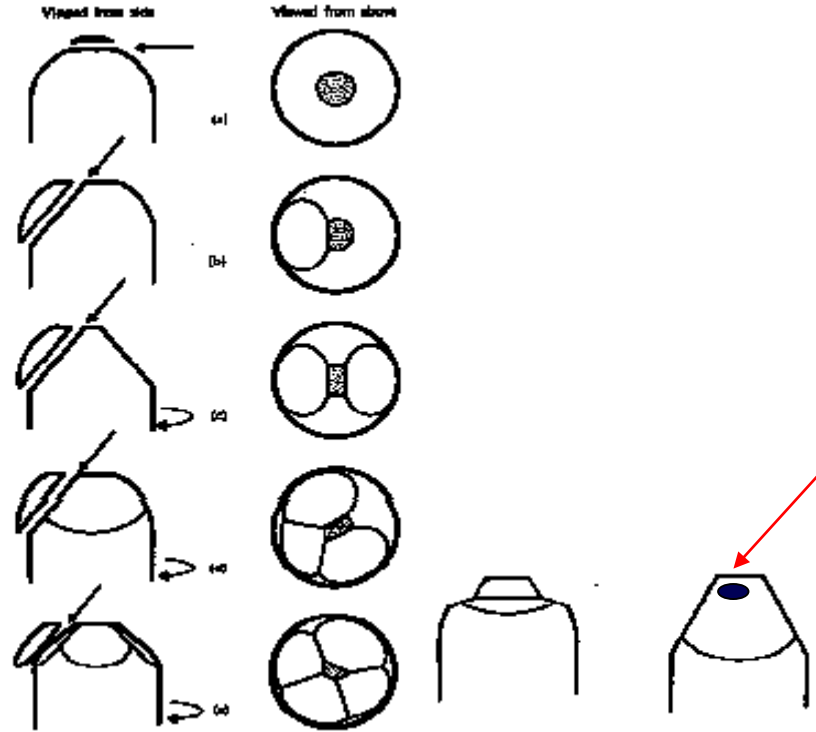
bločky připravené  
pro krájení



# Úprava pyramid (trimování)

Odstranění přebytku tvrdého zalévacího media a zhotovení pyramidy s minimální řeznou plochou (0.1 mm<sup>2</sup>).

*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)

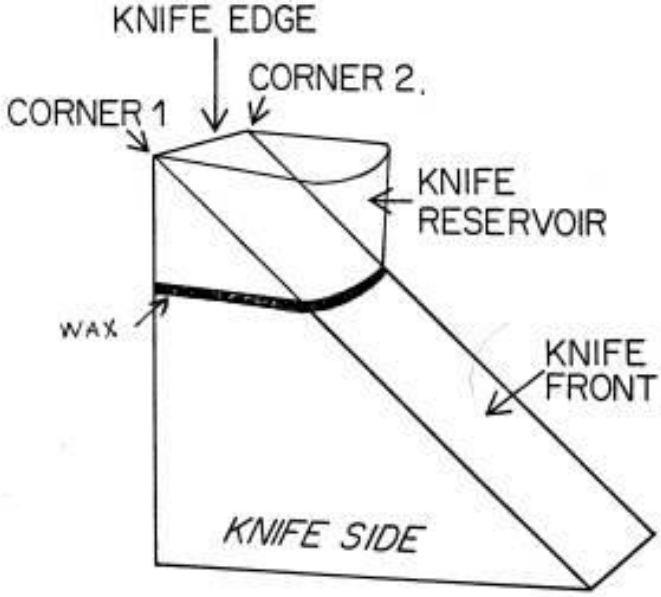


Just Right-Egyptian Pyramid with top cut off

# KRÁJENÍ

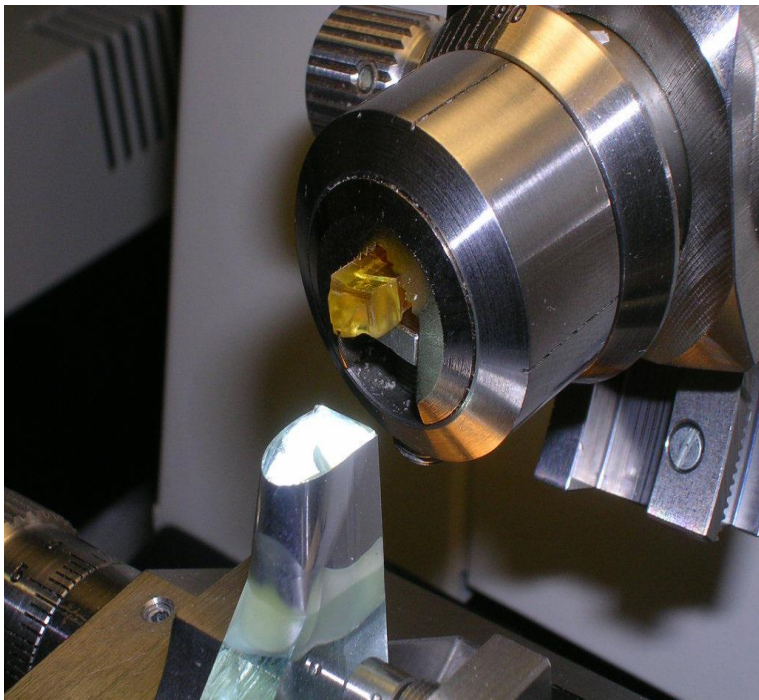
- po odstranění přebytku media (trimming) a vytvoření pyramidy se z malé plošky ( $0.1 \text{ mm}^2$ ) krájí jednotlivé ultratenké řezy (70 – 100 nm) - ultramikrotomy
- používají se skleněné nebo diamantové nože s vaničkou – řezy splývají na hladinu vody ve vaničce a odtud jsou přeneseny na sítky (Ni, Cu)



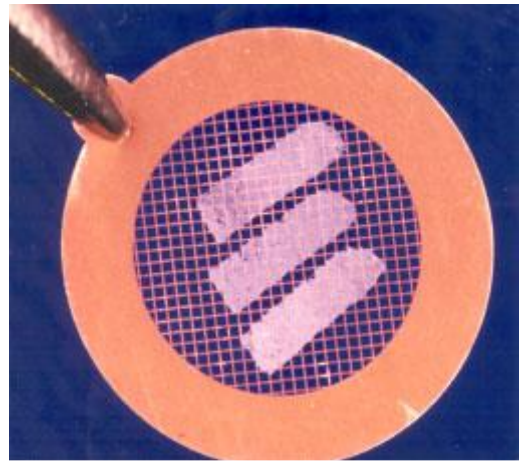
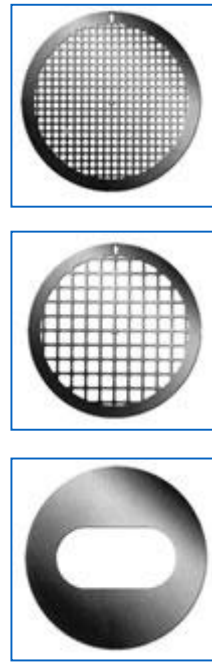
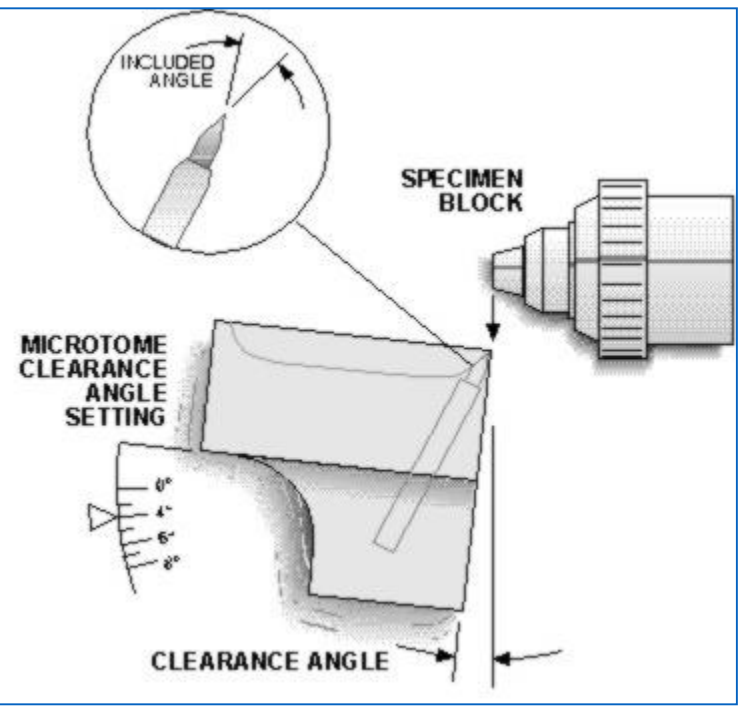


# Ultramikrotomové nože:

skleněný  
diamantový

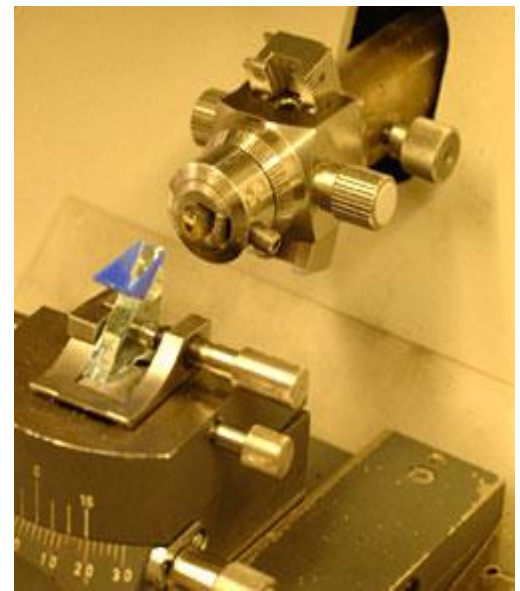
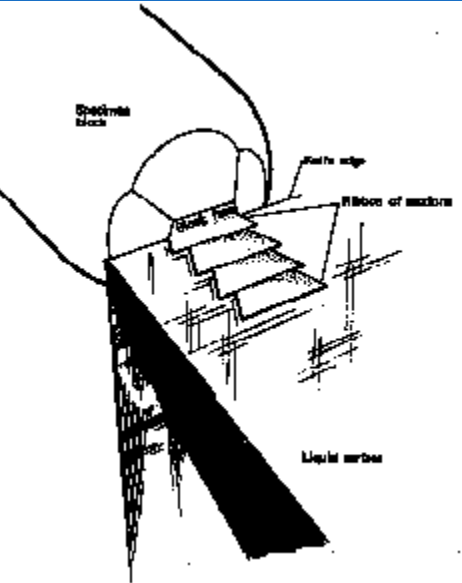
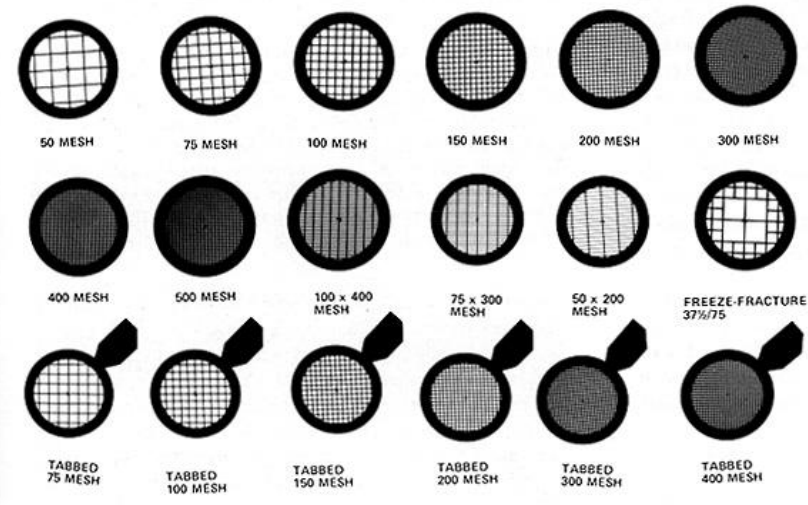


# Krájení, nosné sítě



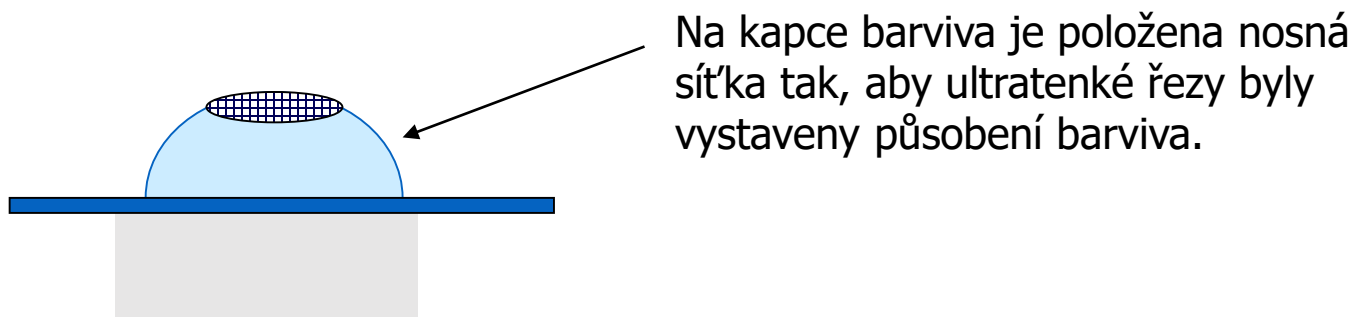
**Sítka se 3 páskami řezů**

## typy sítěk

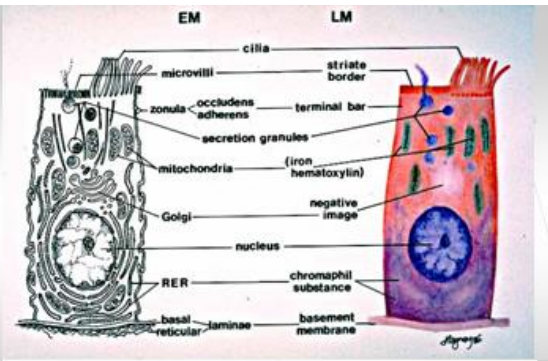


# KONTRASTOVÁNÍ

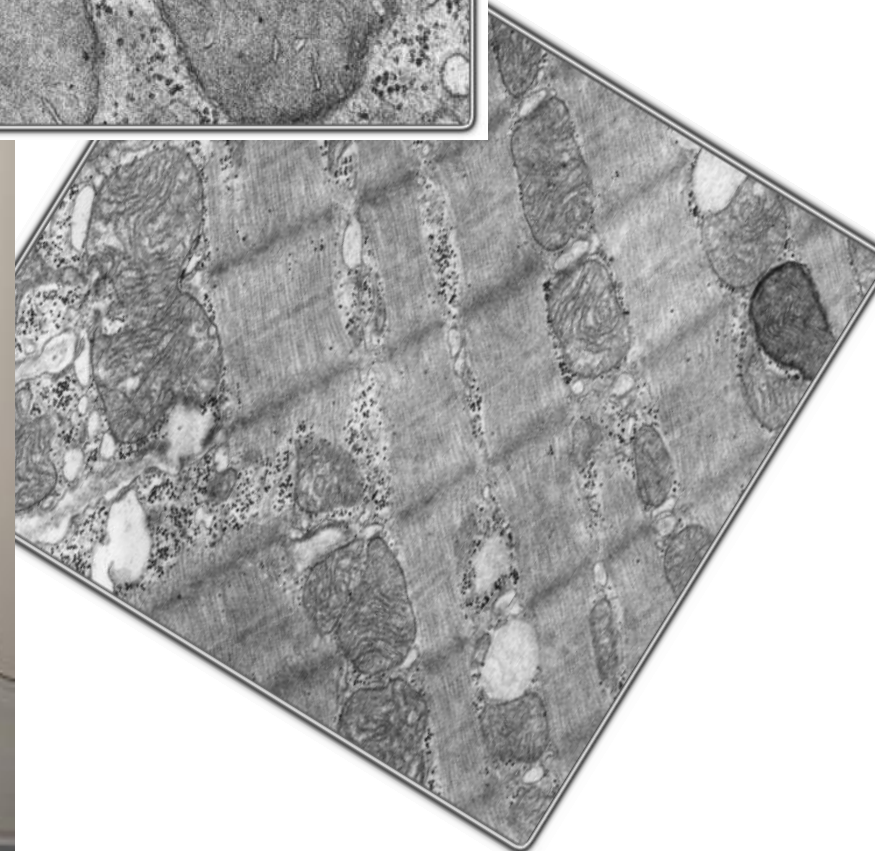
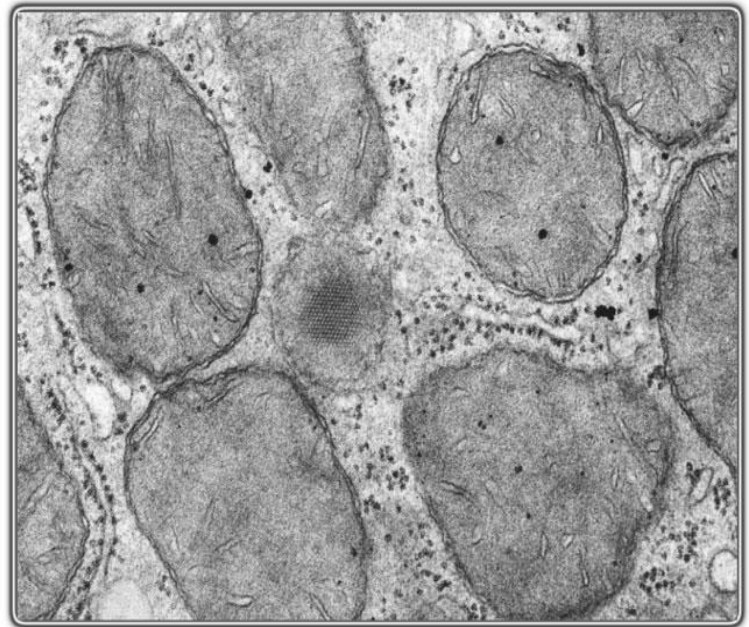
- princip diferenciacie struktur – různý rozptyl svazku elektronů v závislosti denzity struktur ;  
„elektronová barviva“ – směsi těžkých kovů:  
uranylacetát nebo citrát olovnatý



Rozdíly mezi SM a EM		
	<b>SM</b>	<b>EM</b>
Odběr	< 1 cm <sup>3</sup> minuty	< 1 mm <sup>3</sup> 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





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

Děkuji za pozornost

Petr Vaňhara, PhD.  
pvanhara@med.muni.cz