

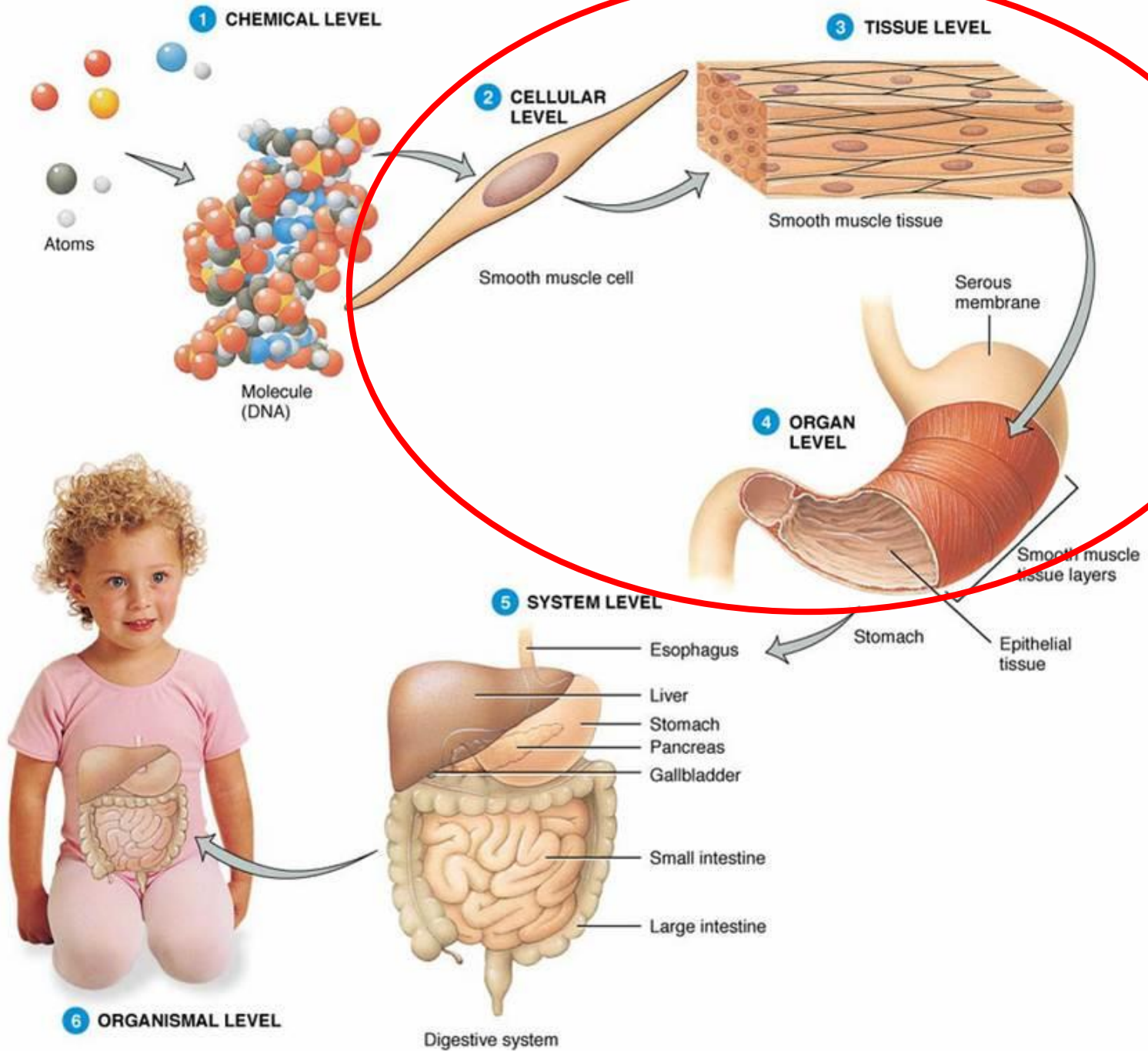
HISTOLOGIE

vědní obor studující strukturu buněk
a tkání mnohobuněčných
organismů

1/ cytologie

2/ vlastní histologie

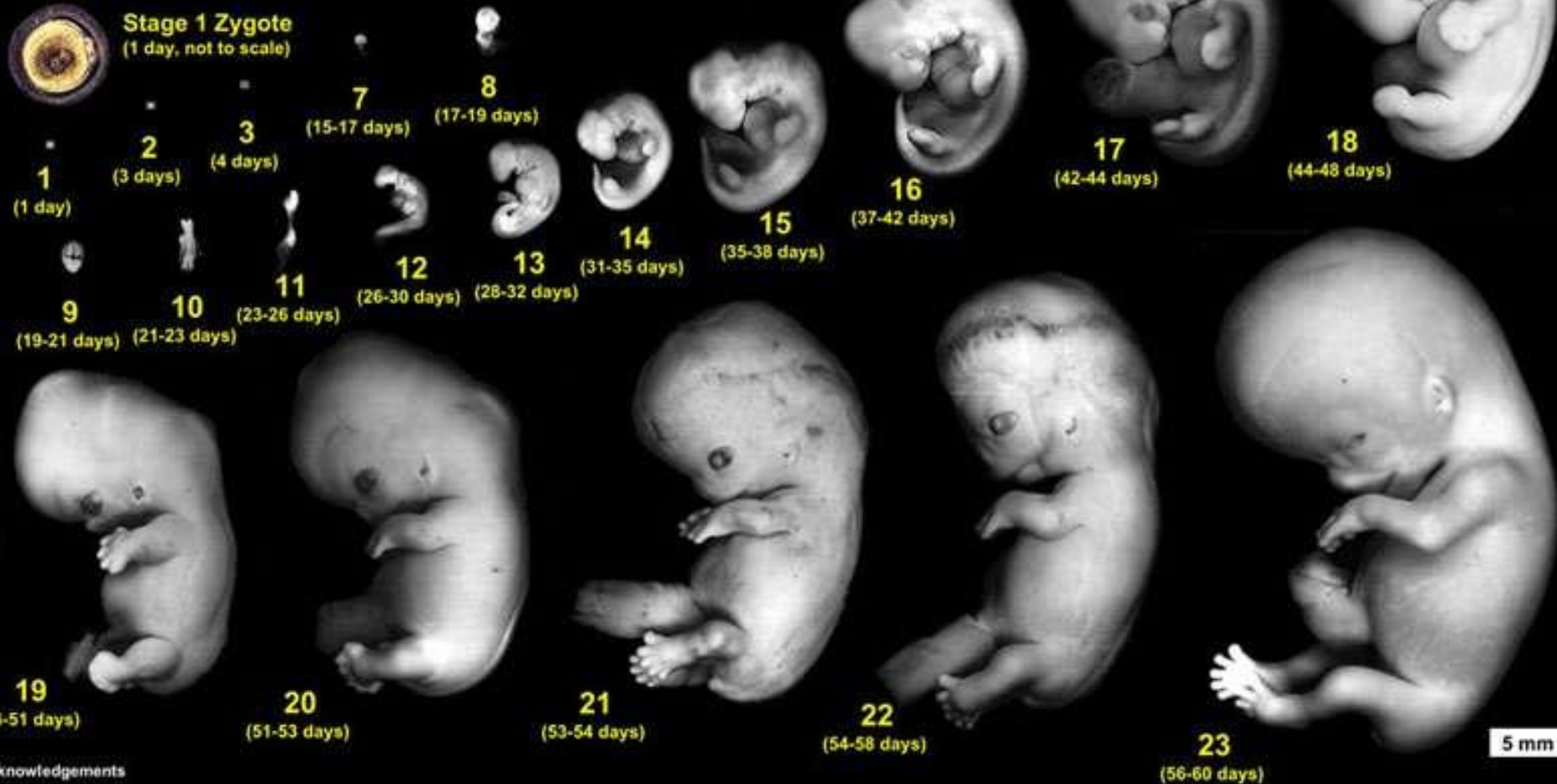
3/ mikroskopická anatomie



EMBRYOLOGIE

Carnegie Stages of Human Development

Dr Mark Hill, Cell Biology Lab, School of Medical Sciences (Anatomy), UNSW



Acknowledgements

Special thanks to Dr S. J. DiMarzo and Prof. Kohel Shiota for allowing reproduction of their research images and material from the Kyoto Collection and Ms B. Hill for image preparation.

© M.A. Hill, 2004

Největší buňky 150 μm

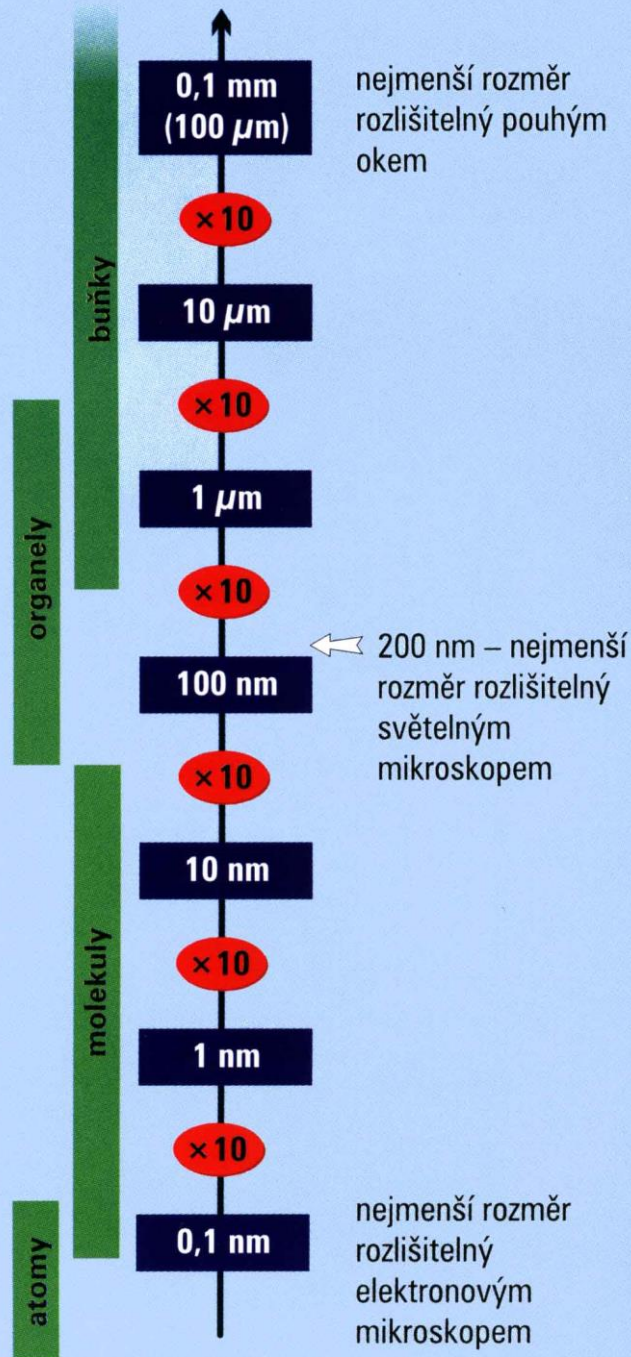
Průměrná velikost buněk 10 – 20 μm

Největší organely 1 – 2 μm

Ribosomy 20x30 nm

Cytoskelet 5 – 24 nm

Membrána 7,5 nm



pouhé oko

světelný mikroskop

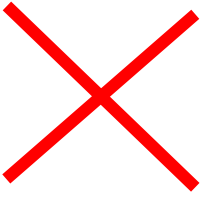
elektronový mikroskop

Světelný mikroskop

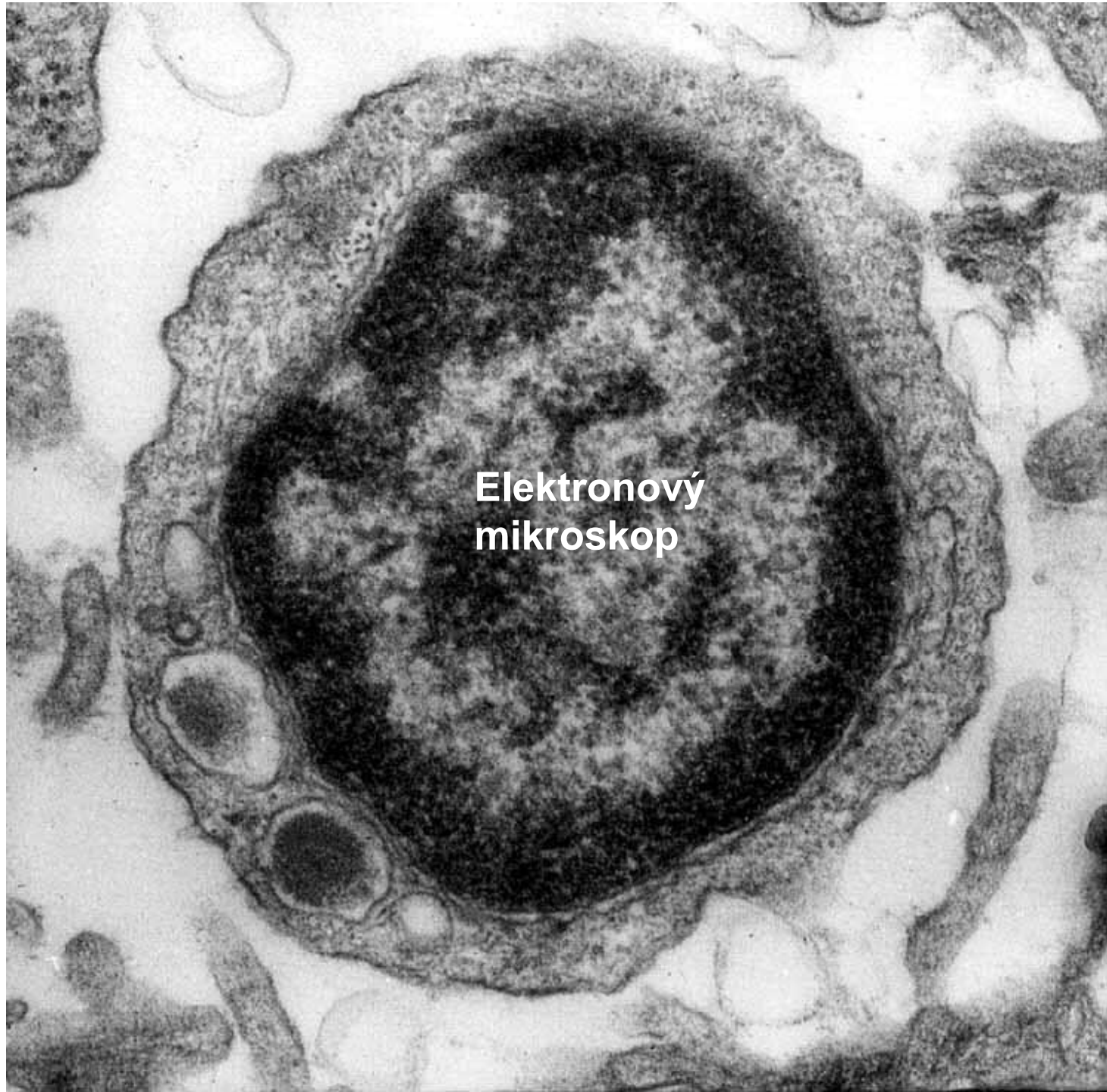
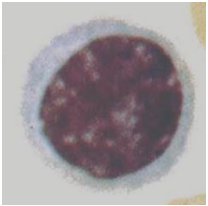


Transmisní elektronový mikroskop (TEM)





**Světelný
mikroskop**



**Elektronový
mikroskop**

ZÁKLADNÍ HISTOLOGICKÉ TECHNIKY

SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE

- Odběr vzorku
- Fixace
- Odvodnění
- Projasnění
- Zalévání
- Krájení
- **Barvení**
- Montování
- Pozorování

ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

- Odběr vzorku
- Fixace
- Odvodnění
- Projasnění
- Zalévání
- Krájení
- **Kontrastování**
- Pozorování

FIXACE TKÁNĚ

- uměle navozená zástava všech životních pochodů v odebraném vzorku tkáně
- koagulace tkáňových bílkovin pomocí chemických látek nebo fyzikálních vlivů

ZALÉVÁNÍ TKÁNÍ DO PARAFINU

- **ODVODNĚNÍ**

- vzesupná řada alkoholu = 70 - 96% alkohol – postupné vytěsnění vody alkoholem
- absolutní (100%) alkohol (dokončení odvodňování)

- **PROJASŇOVÁNÍ**

- cedrový olej, xylen – vytěsnění absolutního alkoholu z tkáně rozpustidlem parafinu

- **PROSYCENÍ PARAFINEM**

- parafin při 56 - 58°C – tři lázně – postupné vytěsnění projasňovacího média rozpuštěným parafinem

- **ZALITÍ**

- převrstvení prosyceného vzorku rozpuštěným parafinem



tkáňový automat



zalévací linka s chladicí deskou

ZALÉVÁNÍ TKÁNÍ DO CELOIDINU

(nitrát celulózy)

- **ODVODNĚNÍ**
 - 70 - 96% alkohol – postupné vytěsnění vody alkoholem
 - absolutní (100%) alkohol (dokončení odvodňování)
- **PROJASŇOVÁNÍ**
 - etanoléter (1:1)
- **PROSYCENÍ CELOIDINEM**
 - vzestupná řada
- **ZALITÍ**
 - převrstvení prosyceného vzorku 10% celoidinem
- **TVRZENÍ**
 - odpařování etanoléteru (50% úbytek objemu)
 - etanol

ZALÉVÁNÍ TKÁNÍ DO VODOROZPUSTNÝCH MÉDIÍ

ŽELATINA

- **PROSYCOVÁNÍ** za tepla (37°C)
- **TVRZENÍ** formolem

CELODAL (polymer močoviny a formolu)

- **PROSYCOVÁNÍ** vzestupnými koncentracemi
- **TVRZENÍ** za tepla, HCl

ZALÉVÁNÍ DO PRYSKYŘIC

- Odvodnění
 - vzestupná řada alkoholu = 50 - 96% alkohol – postupné vytěsnění vody alkoholem
 - alkohol může být ředěný 1% uranylacetátem (prekontrastování)
 - absolutní (100%) alkohol (dokončení odvodňování)
- Projasňování (pokud je nutné, např. u epoxidových pryskyřic)
 - propylenoxid - vytěsnění absolutního alkoholu z tkáně rozpustidlem pryskyřice
- Prosycení zalévacím médiem
 - vytěsnění projasňovacího média tekutou pryskyřicí
- Zalévání pryskyřicí do želatinových kapslí
- Polymerizace – vytvrzení
 - teplo (60°C) – většina pryskyřic
 - UV světlo při pokojové teplotě nebo v mrazáku – některé akrylátové pryskyřice

Tkáňový procesor na zalévání do pryskyřic



KRÁJENÍ

- **MIKROTOM**

- sáňkový nebo rotační
- ocelové nože nebo žiletky
- na parafínové (celoidinové, celodalové, želatinové) bločky

- **ULTRAMIKROTOM**

- skleněné nebo diamantové nože
- na pryskyřičné bločky

- **KRYOSTAT A ZMRAZOVACÍ MIKROTOM**

- ocelové nože nebo žiletky
- na zmrazené vzorky



Sáňkový mikrotom

ruční rotační mikrotom





Ultramikrotom

KRYOSTAT – kombinace rotačního mikrotomu a mrazícího boxu

manuální



motorizovaný



ZMRAZOVACÍ MIKROTOM – kombinace sáňkového nebo rotačního mikrotomu a chladícího zařízení

zmrazování expanzí CO₂

zmrazování elektrotepelným článkem

zmrazování principem kompresorové mrazničky



VYUŽITÍ ZMRAZOVACÍCH TECHNIK

rychlé peroperační biopsie – hlavně posouzení nádorů
barvení na tuk
histochemie lipidů
enzymová histochemie
imunohistochemie – citlivější antigeny
některé fluorescenční metody
některé impregnační metody



BARVENÍ

interakce mezi barvivem a určitou složkou tkáně

- **1/ přehledné (synoptické) barvení – obarví se všechny složky preparátu, založeno na afinitě kyselin a zásad**
 - Zásaditá (basická) barviva – **hematoxylin** (různé druhy), **thionin**, **azokarmín**, **toluidinová modř**, **jádrová červeň**, **methylová zeleň**,.....
 - Kyselá barviva – **eosin**, **erythrosin**, **světlá zeleň**, **kyselý fuchsin**, **oranž G**, **anilinová modř**, **kyselina pikrová**,.....
- **2/ speciální barvení - zvýraznění hledaných struktur barvivem se specifickou afinitou**

Základní postup barvení parafínových řezů

odparafinování řezu

zavodnění (rehydratace) řezu

vlastní barvení

odvodnění (dehydratace) řezu

projasnění před montováním



EOSIN

ALKOHOL

ALKALIN

KARBOXYLEN

XYLEN

XYLEN

100% ALKOHOL + CHLOROFORM

CHLOROFORM

ZHOTOVENÍ TRVALÉHO HISTOLOGICKÉHO PREPARÁTU BARVENÉHO METODOU HEMATOXYLIN A EOSIN (H&E)

- **ODPARAFINOVÁNÍ A ZAVODNĚNÍ ŘEZU**
 - xylen (2 lázně) – rozpuštění parafinu
 - 100% alkohol – vymytí rozpuštěného parafinu i rozpustidla
 - 96% - 70% alkohol – pomalé zavodnění
 - voda – vymytí alkoholu
- **BARVENÍ**
 - **hematoxylin (basické barvivo)** - barvení **kyselých (basofilních)** součástí tkáně (**jádra, ribosomy**)
 - praní a diferenciacce jader (voda, kyselý alkohol, uhličitán lithný)
 - **eosin (kyselé barvivo)** - barvení **basických (zásaditých, acidofilních, eosinofilních)** součástí tkáně (**proteiny**)
 - praní (voda)
- **ODVODNĚNÍ**
 - 70% - 100% alkohol – postupné vytěsnění vody
- **PROJASNĚNÍ**
 - karboxylen a xylen (2 lázně) – vytěsnění alkoholu rozpustidlem montovacího média
- **MONTOVÁNÍ**
 - Solakryl – překrytí řezu krycím sklíčkem

basofilní

světlé (optický prázdne)

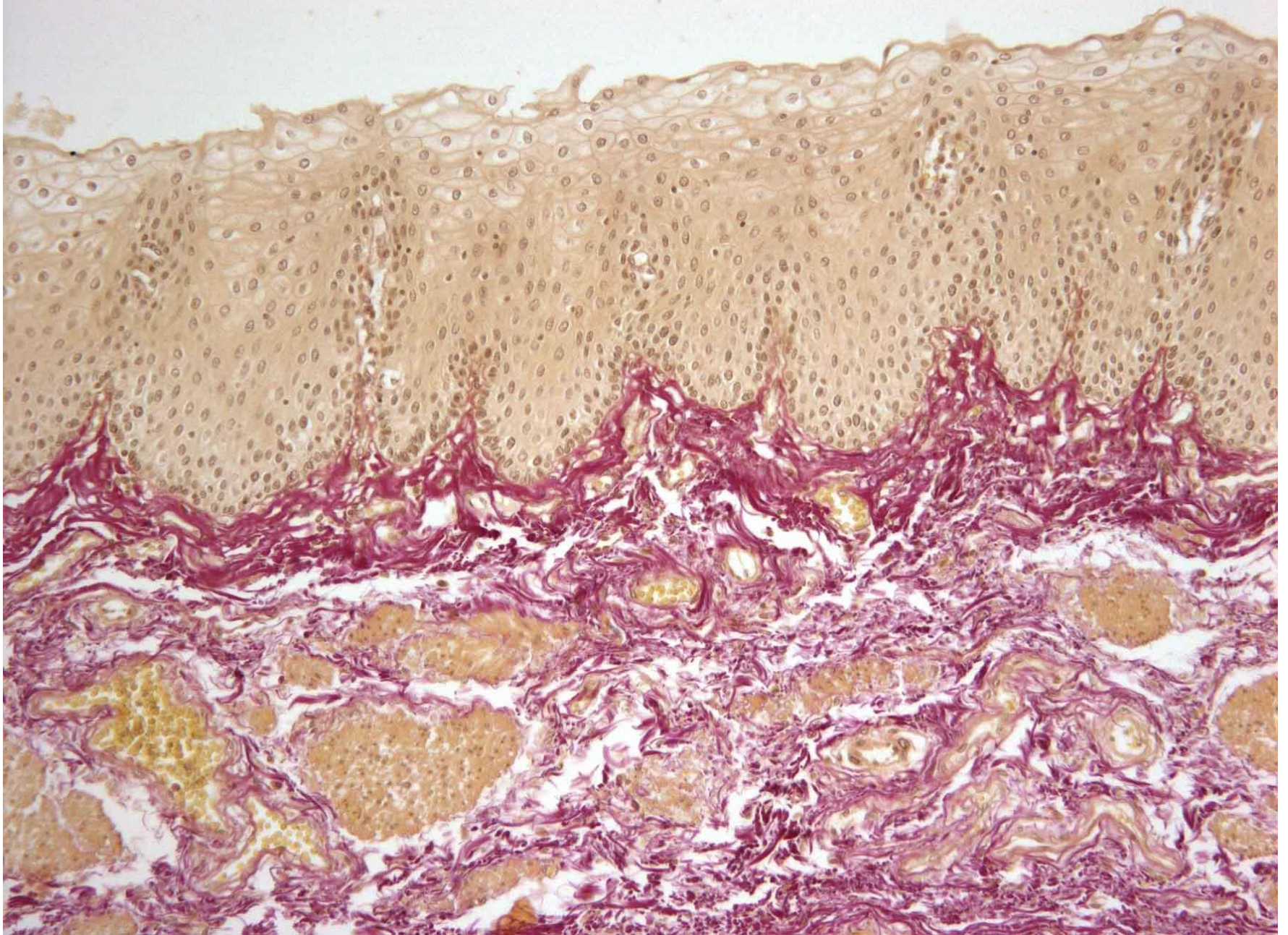
eosinofilní (acidofilní)

20 μm

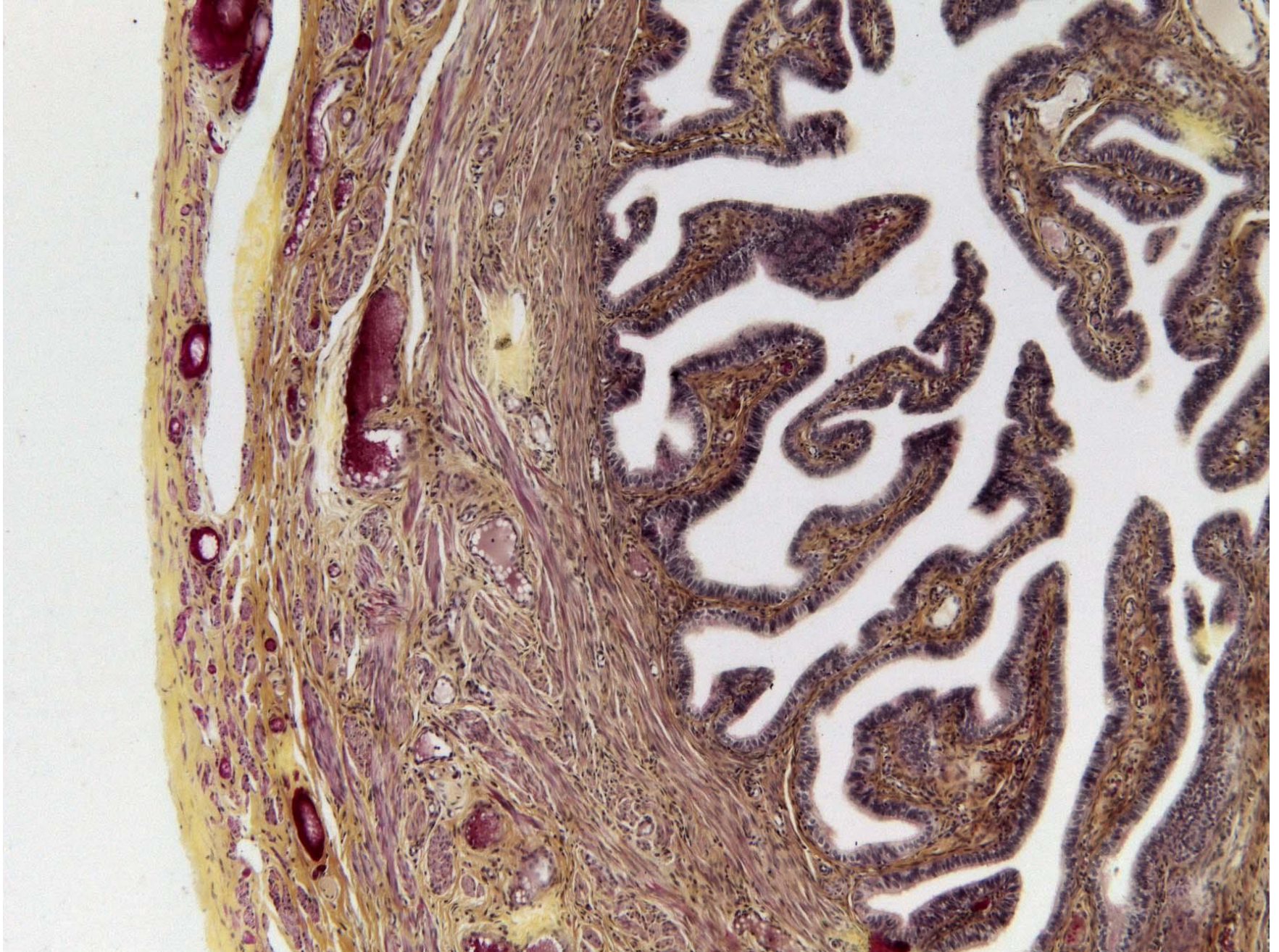


DALŠÍ PŘÍKLADY PŘEHLEDNÝCH BARVENÍ

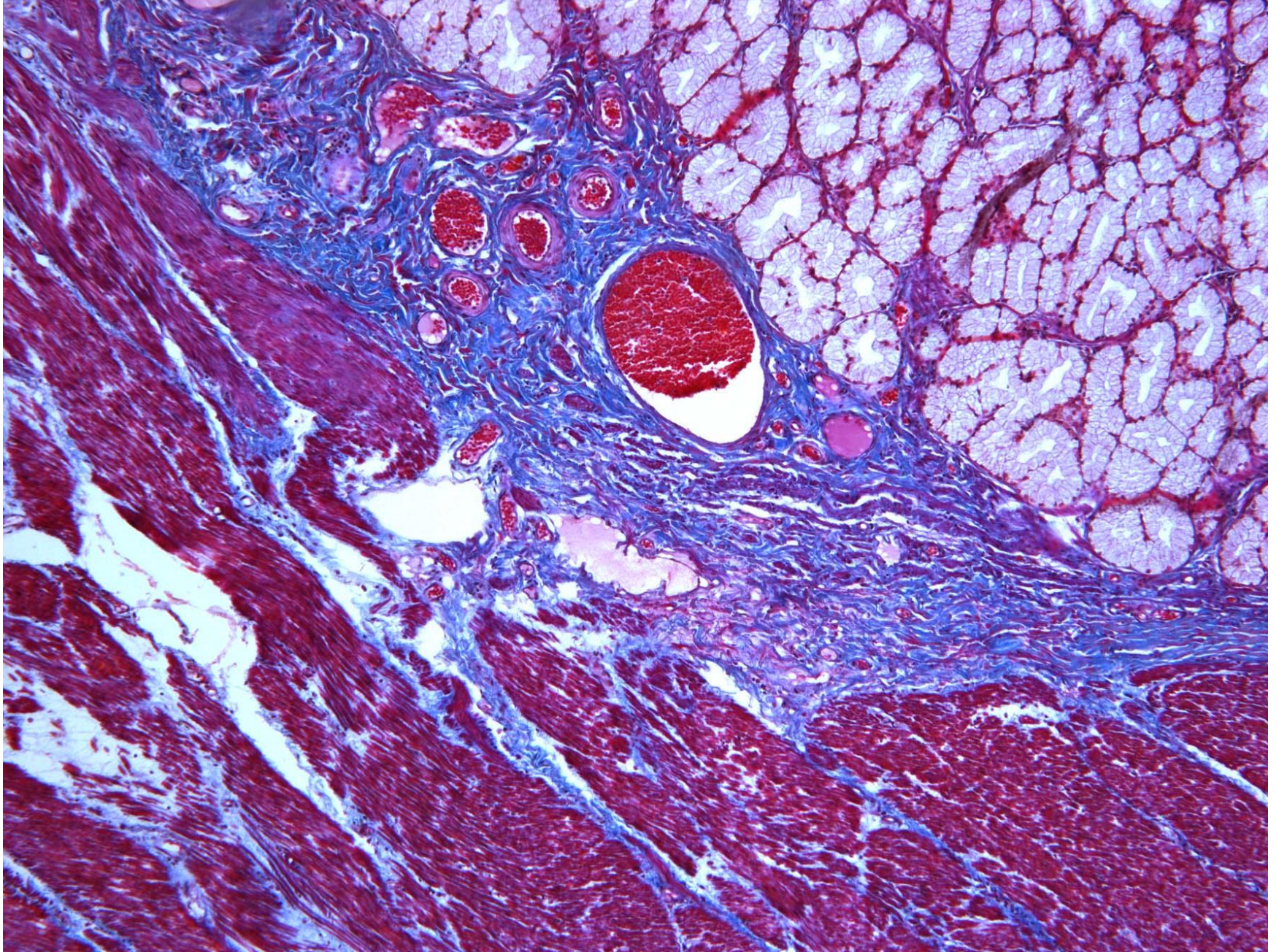
Weigert - van Gieson	železitý hematoxylin + kyselý fuchsin + kyselina pikrová	jádra hnědá , kolagen červený , svalovina žlutá
Massonovy trichromy -žlutý	hematoxylin + erythrosin + šafrán	jádra modrá , kolagen žlutý , svalovina červená
-modrý	železitý hematoxylin + kyselý fuchsin + anilinová modř	jádra hnědá až černá, kolagen modrý , svalovina červená
-zelený	železitý hematoxylin + kyselý fuchsin + oranž G + světlá zeleň	jádra hnědá až černá, kolagen zelený , svalovina červená
AZAN	azokarmín + anilinová modř + oranž G	jádra červená , kolagen modrý , svalovina červená



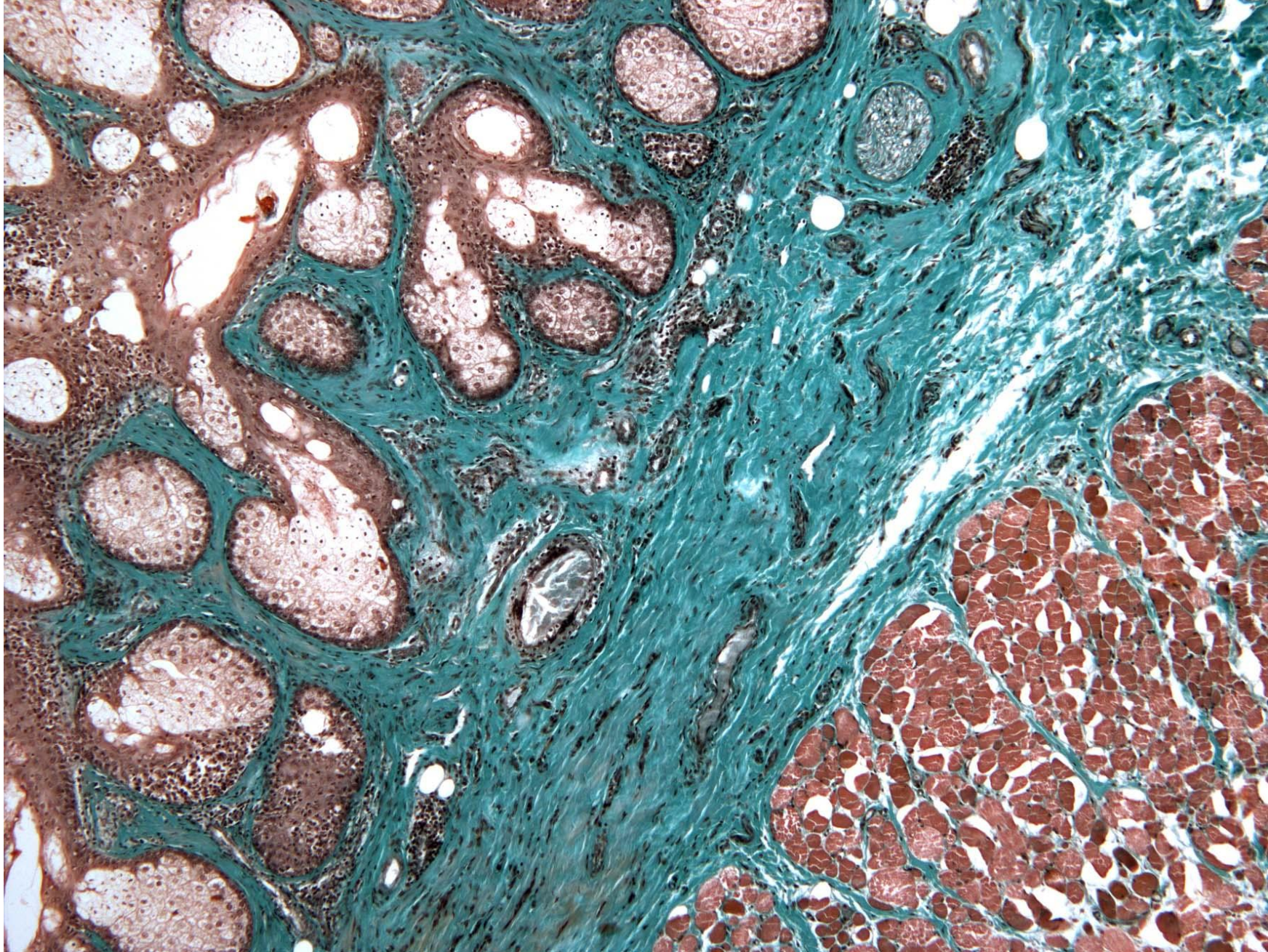
Weigert - van Gieson



žlutý trichrom



modrý trichrom



zelený trichrom

SPECIÁLNÍ BARVENÍ

- zvýraznění hledaných struktur **barvivem** se specifickou afinitou
- nedochází při něm k barevné chemické reakci (barvivo nemění svou původní barvu)
- **cytologická barvení** – barvení vybraných intracelulárních součástí
- **selektivní barvení** – barvení vybraných struktur nebo látek bez ohledu na lokalizaci
- **impregnační metody** – redukce kovu (Ag, Au, Os) na vybraných strukturách

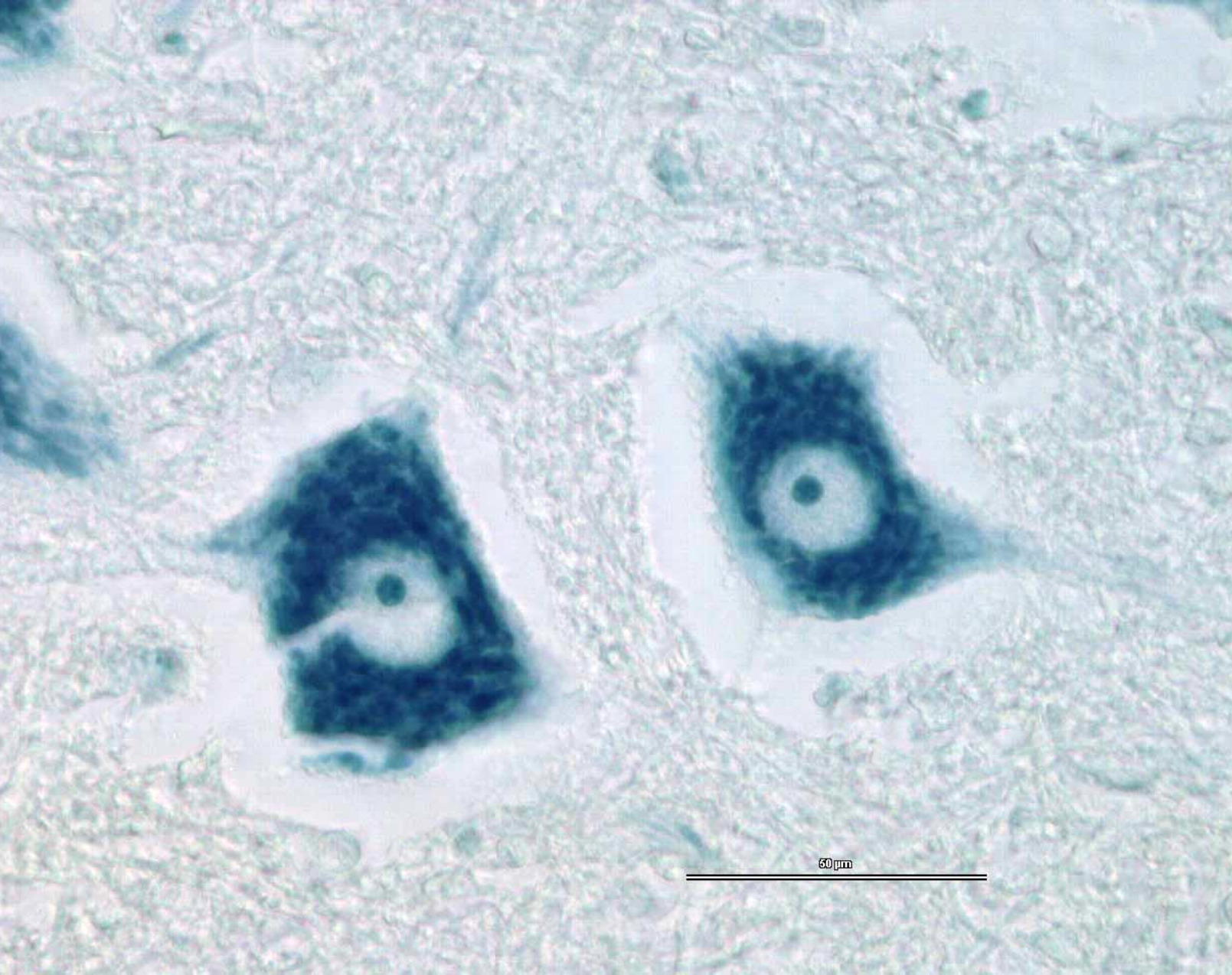
PŘÍKLADY CYTOLOGICKÝCH BARVENÍ

- Heidenhainovo barvení (hematoxylin) - mitochondrie, myofibrily
- jádrová barvení - kontrast jader (hematoxylin, jádrová červeň, metylenová zeleň)
- barvení Nisslovy substance - kresylová violet', toluidinová modř
- nátěrová barvení - Pappenheim, Papanicolau
- bakteriologická barvení - Gram, Ziehl-Neelsen



Heidenhainovo barvení (hematoxylin)

myofibrily



toluidinová modř

Nisslova substance

PŘÍKLADY SELEKTIVNÍCH BARVENÍ

elastika - orcein, aldehydfuchsin, resorcin-fuchsin

hlen, glykogen, glykosaminoglykany (GAG) - alciánová modř, mucikarmín, Bestův karmín

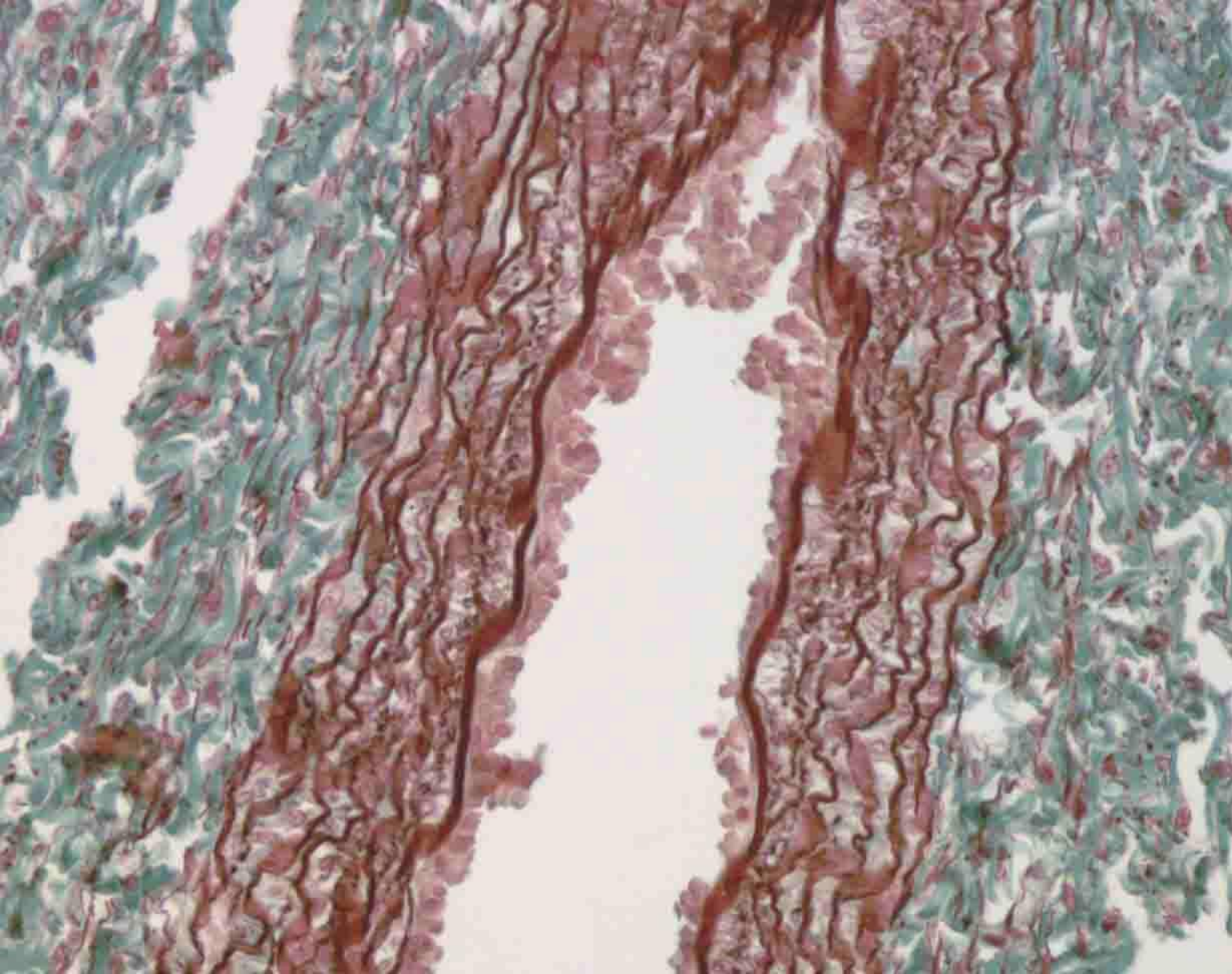
neutrální tuky - olejová červeň O, Sudan černý B, Sudan III, šarlach – je třeba se vyhnout použití rozpustidel (zmrazené řezy)

myelin (fosfolipidy) - luxolová modř, Spielmeyerův hematoxylin

amyloid - kongo červeň, metylviolet', saturnová červeň

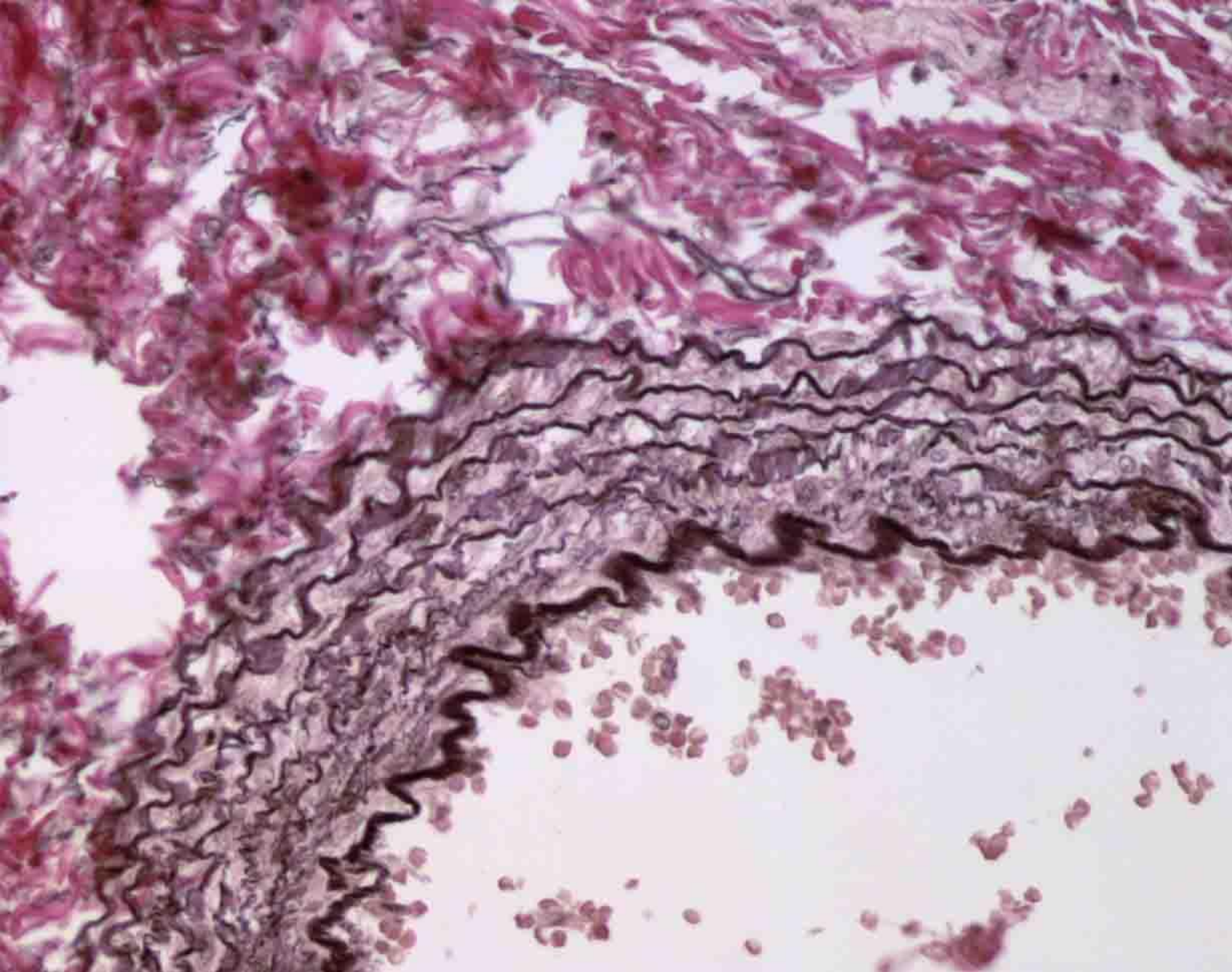
fibrin - Weigertovo barvení

a další ...



orcein

elastika



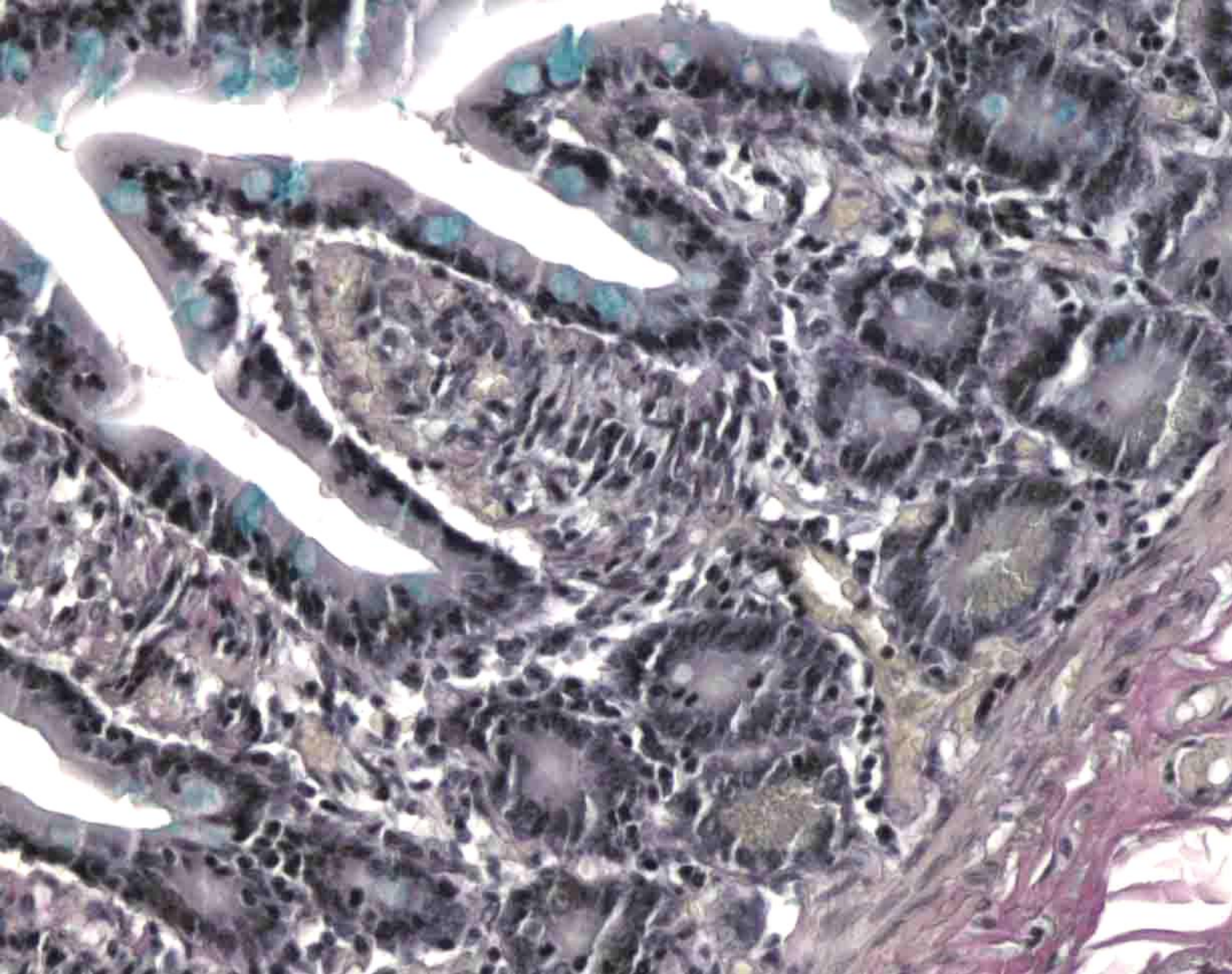
resorcin-fuchsin

elastika



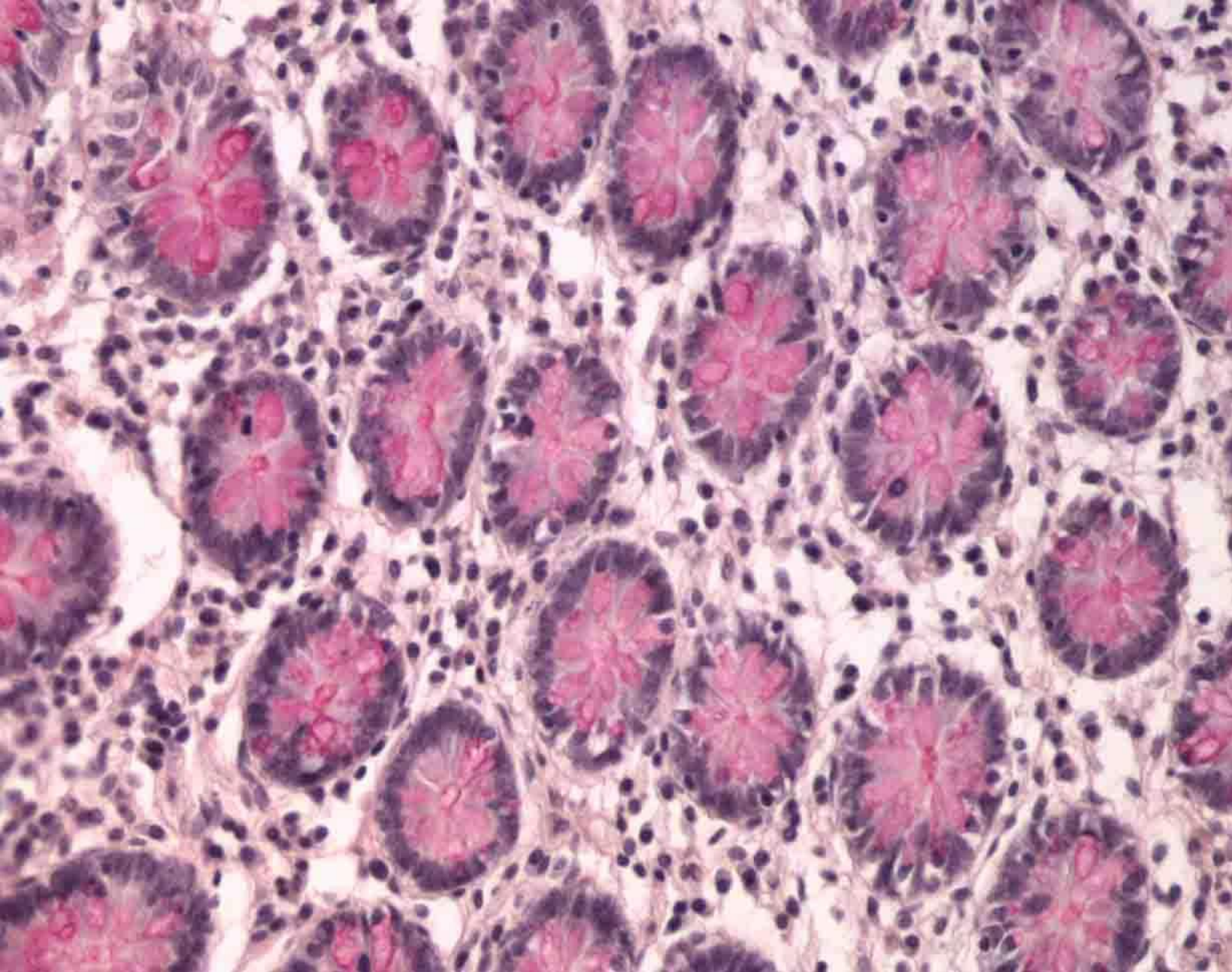
aldehydfuchsin

elastika



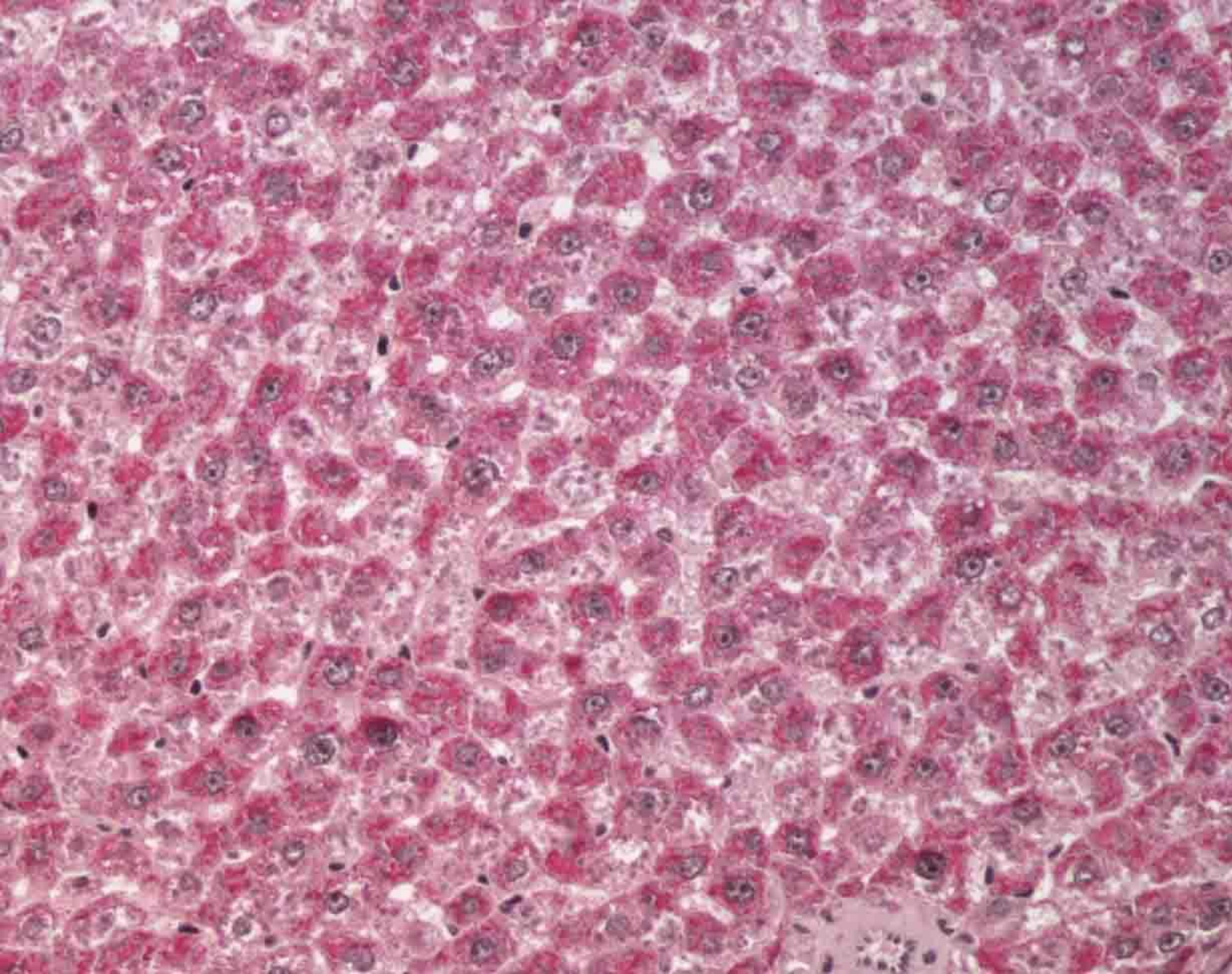
alciánová modř pH 2,5

kysele mukopolysacharidy



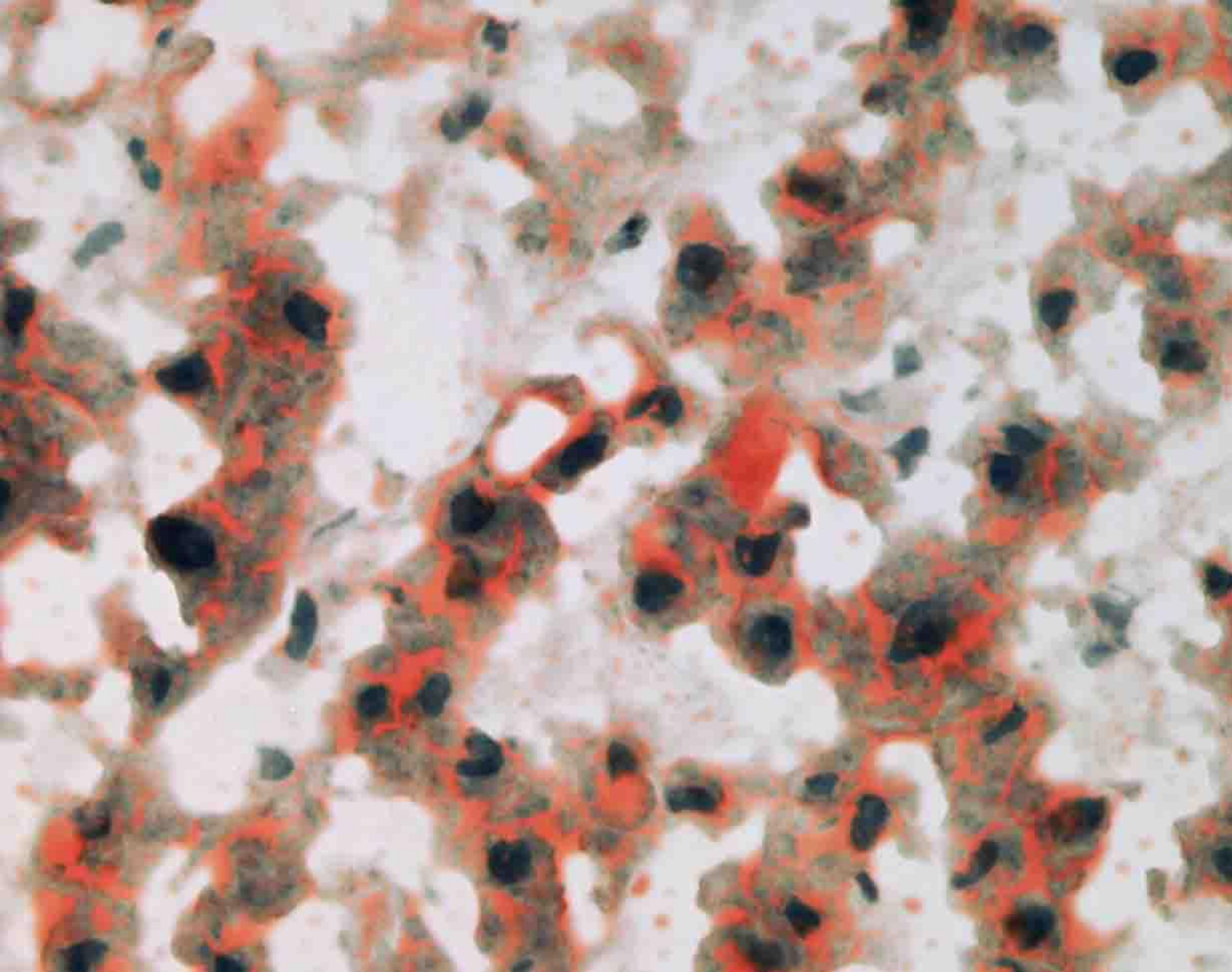
mucikarmín

muciny



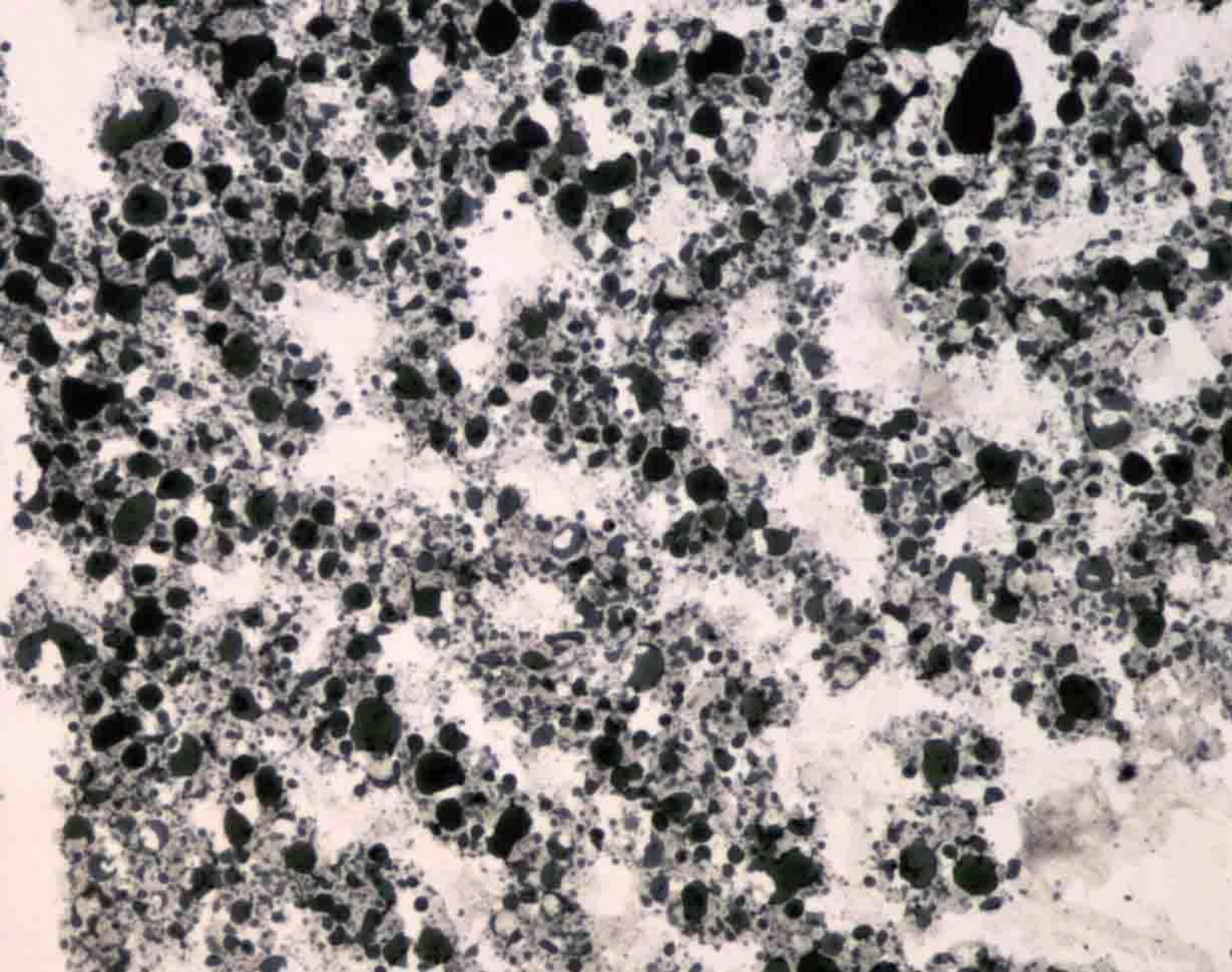
Bestúv karmín

glykogen



olejová červeň O

neutrální lipidy



Sudan černý B

neutrální lipidy

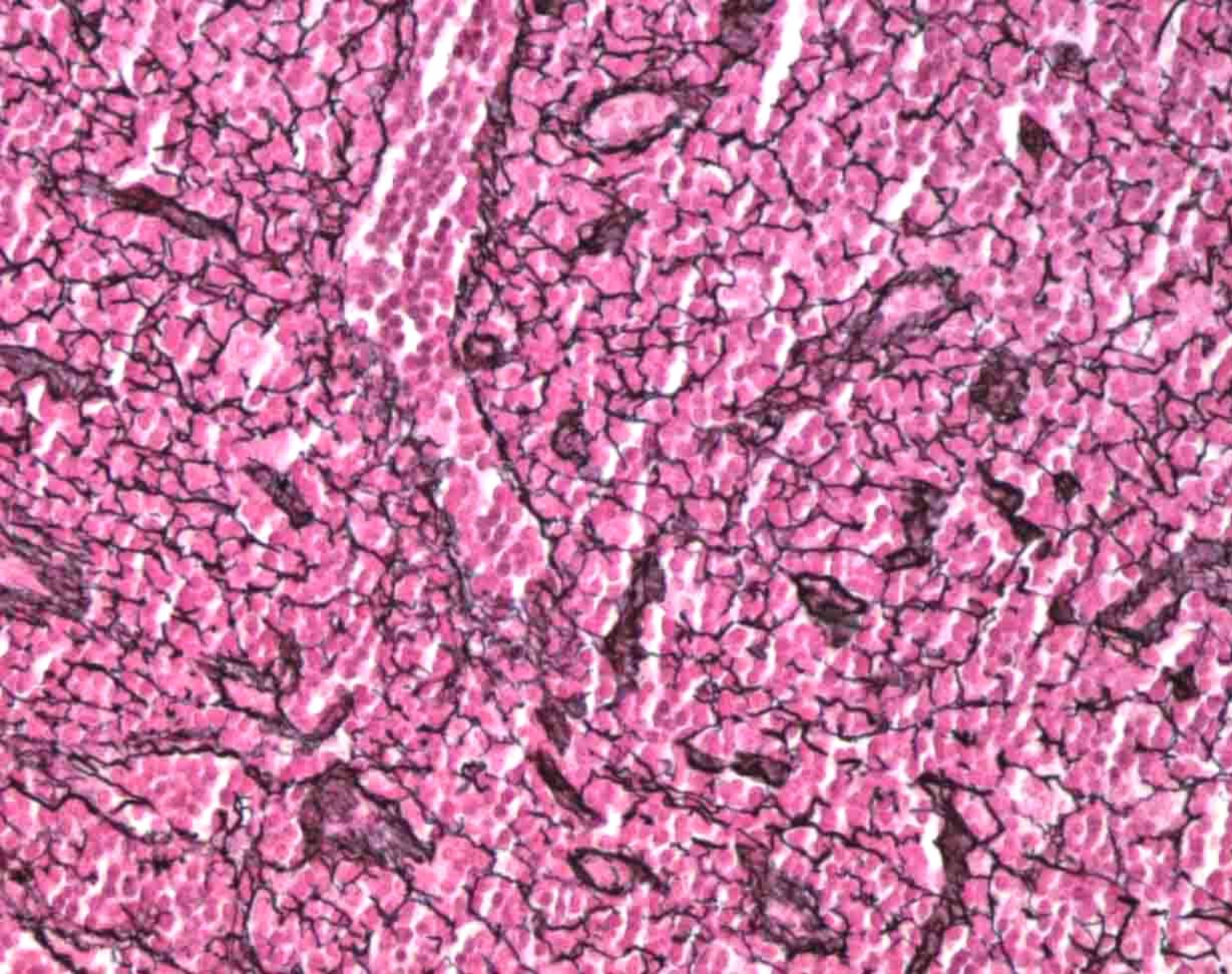
PŘÍKLADY IMPREGNACE

Gömöri, Foot retikulární vlákna

Hortega, Cajal astrocyty
Penfield oligodendrocyty
Bielschowski nervová vlákna

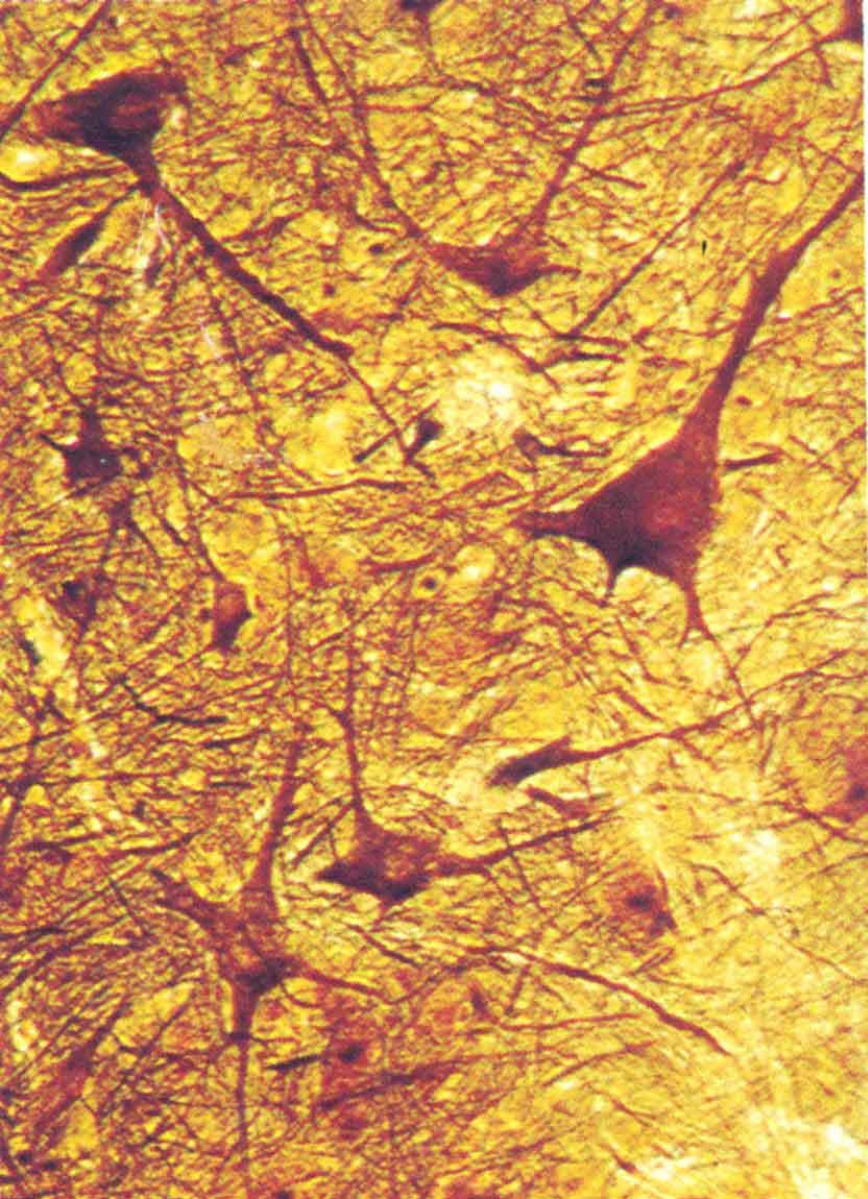
Grimelius buňky DNES

Grocott hyfy plísni

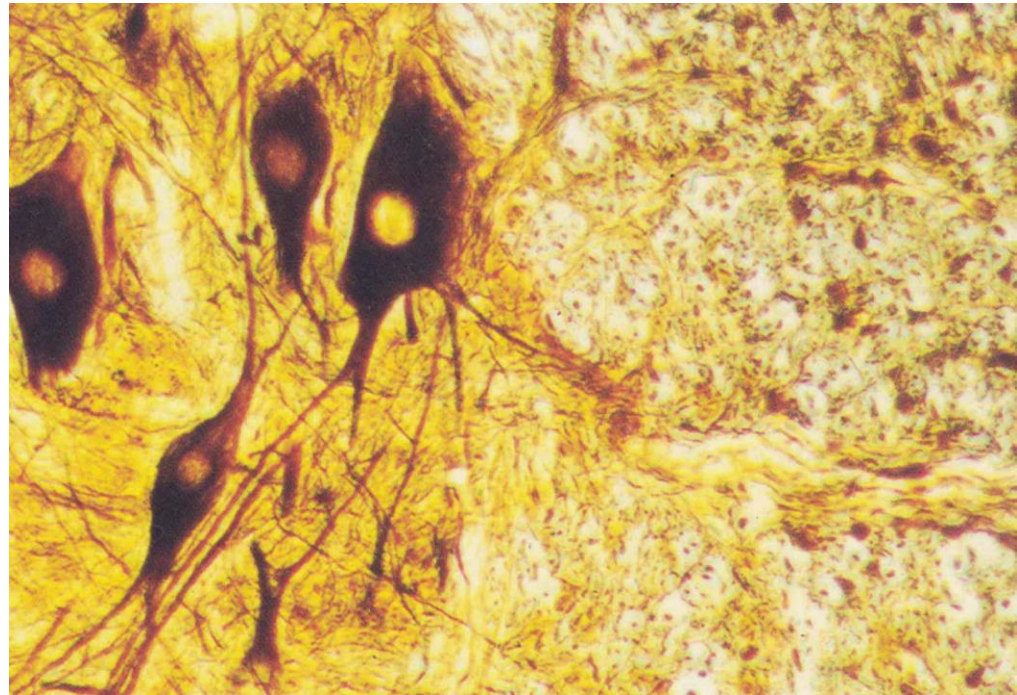


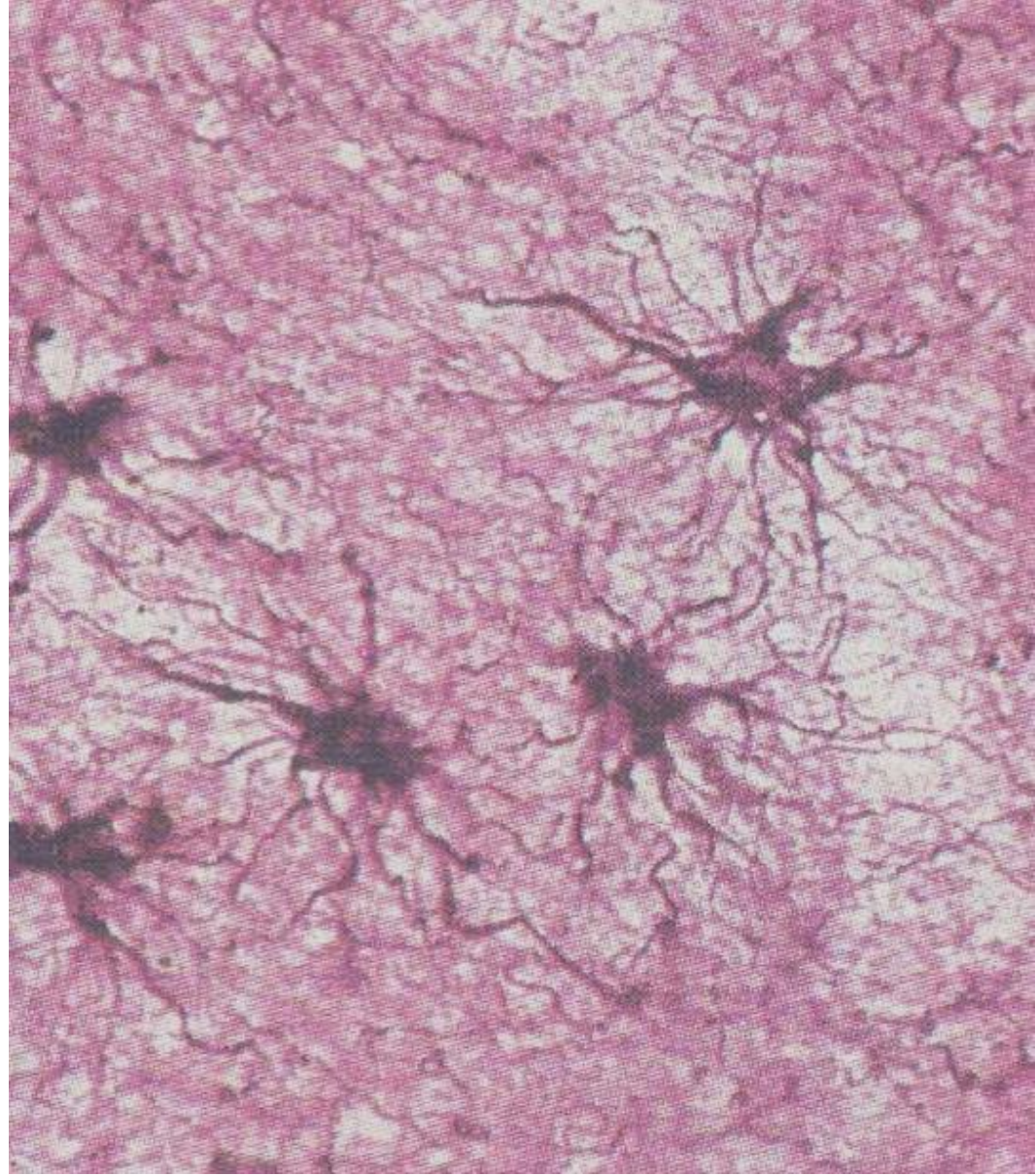
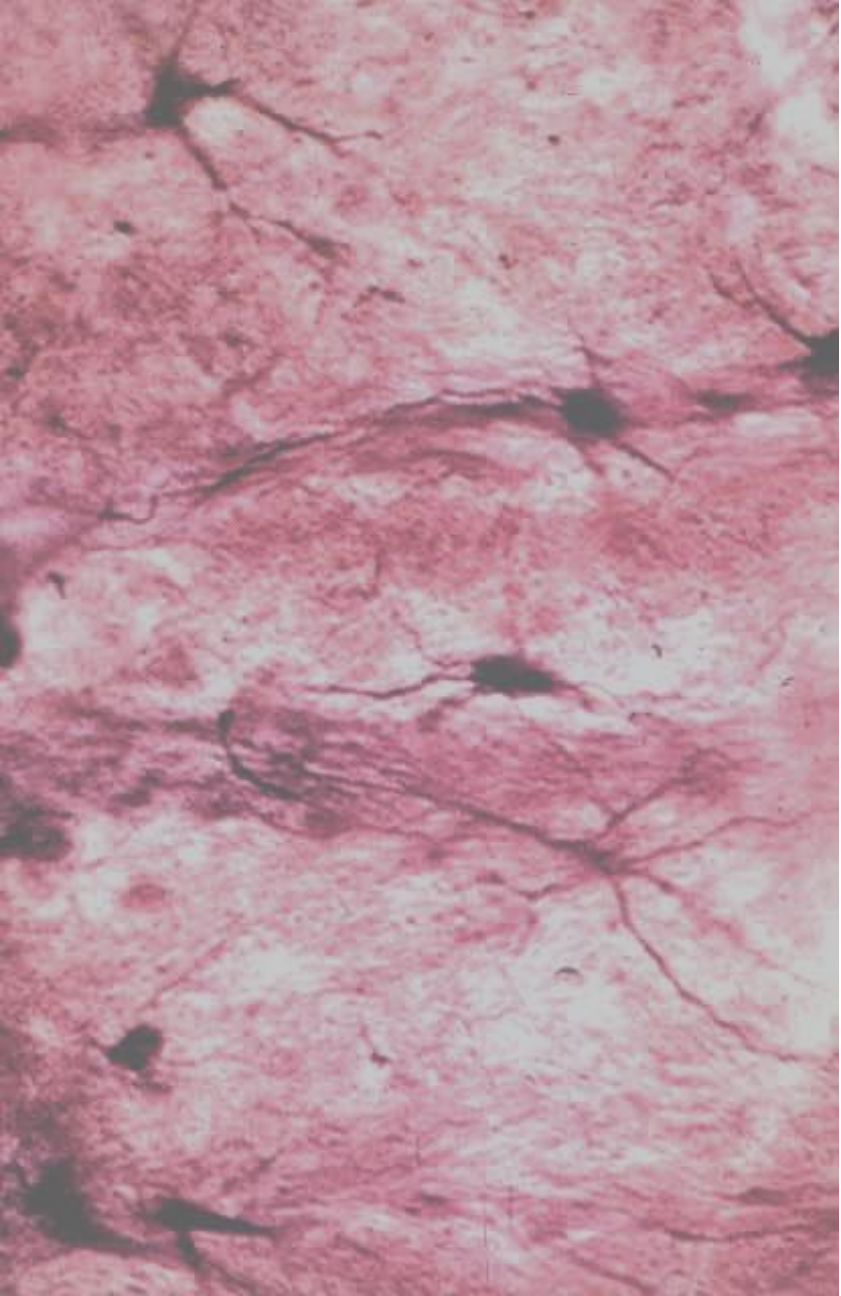
impregnace podle Gömöriho

vlákna kolagenu III



impregnace neuronů





impregnace astrocytů

MONTOVÁNÍ

- krycí skla



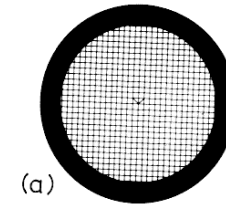
- montovací média rozpustná v xylenu

- akrylátové pryskyřice (solakryl BMX)
- kanadský balzám

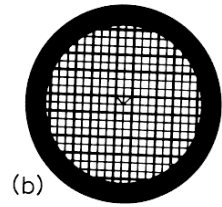
- montovací média rozpustná ve vodě

- glycerol-želatina
- glycerol

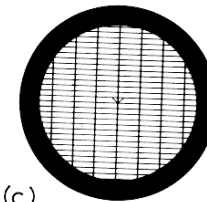
TEM - sít'ky



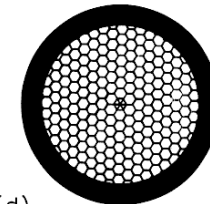
(a)



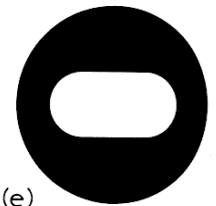
(b)



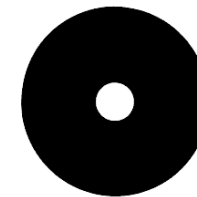
(c)



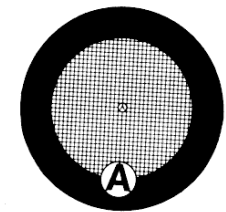
(d)



(e)



(f)



(g)

- potažení podložní folií (Formvar – polyvinyl formaldehyd)
- napaření uhlíkového filmu na folii

KONTRASTOVÁNÍ ŘEZŮ PRO TEM

- vazba atomů těžkých kovů na struktury pozorovaného objektu
- provádí se pokládáním sítěk na kapky roztoků solí příslušných kovů
- nejčastější soli:
 - octan uranylu (uranylacetát)
 - citronan olovnatý



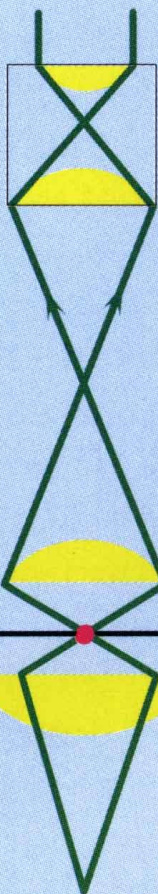


elektronově
densní

elektronově
lucentní

POZOROVÁNÍ

- Přímé pozorování
- Fotografování
- Morfometrie
- Stereologie
- 3D rekonstrukce
- Obrazová analýza



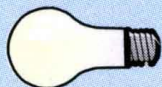
okulár

objektiv

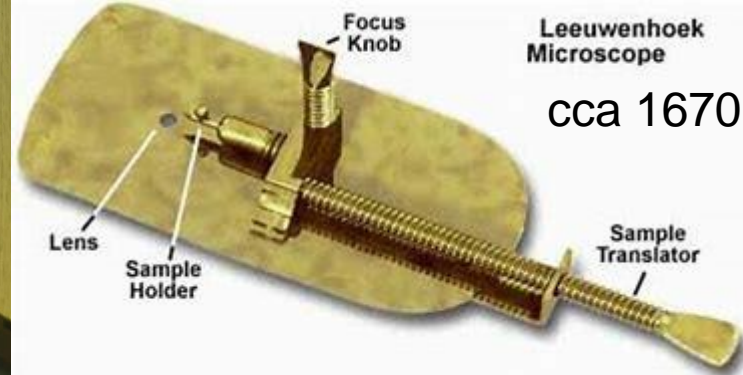
vzorek

kondenzor

zdroj světla

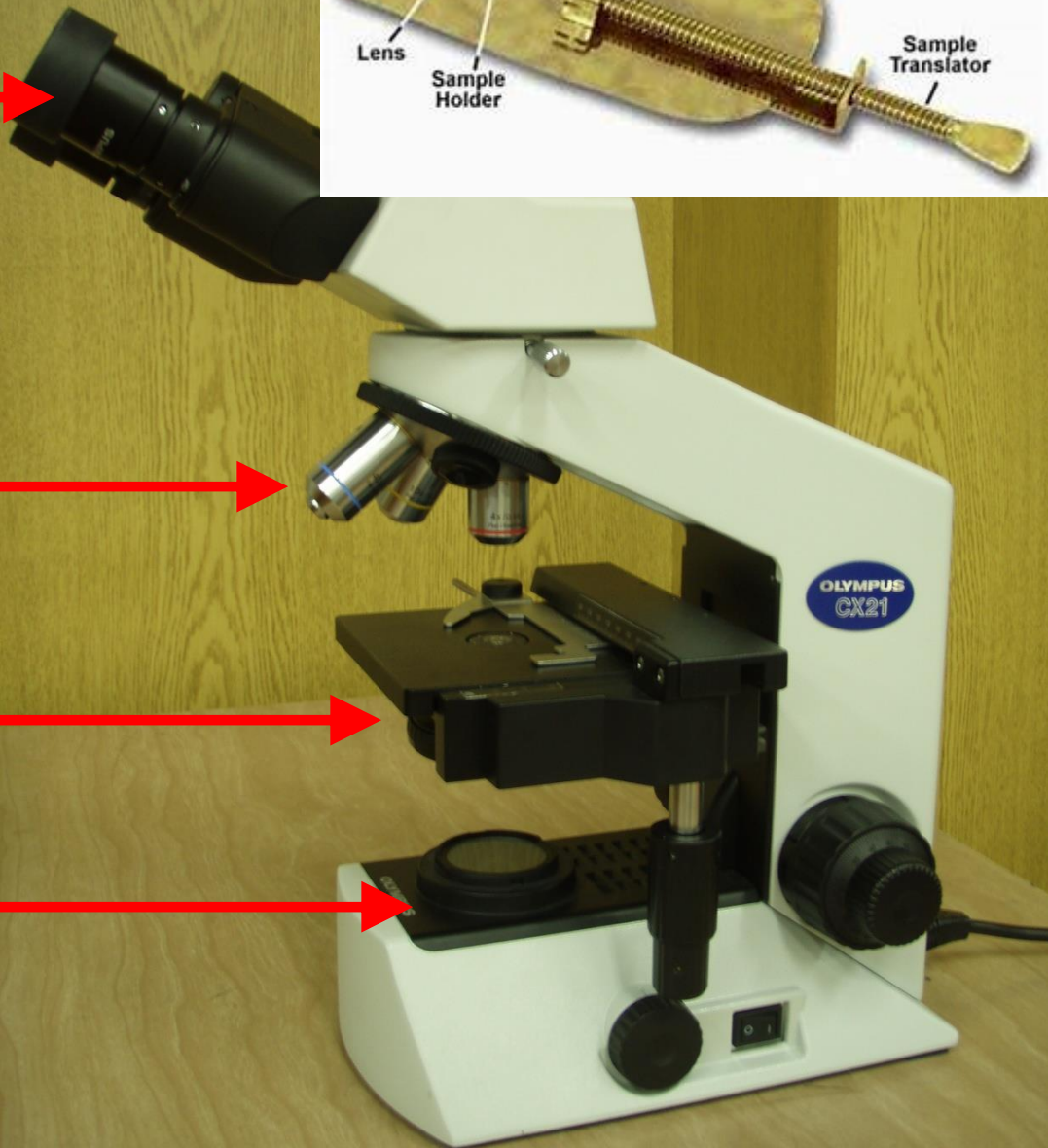


Prozařovací světelný mikroskop



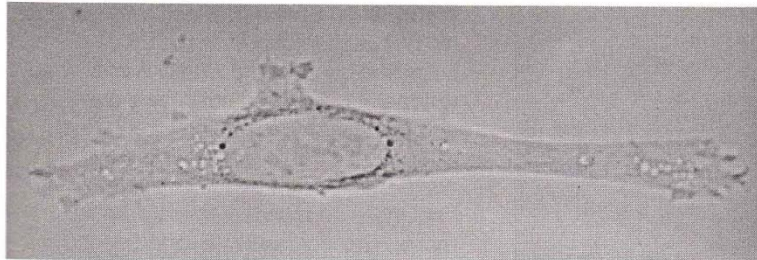
Leeuwenhoek
Microscope

cca 1670

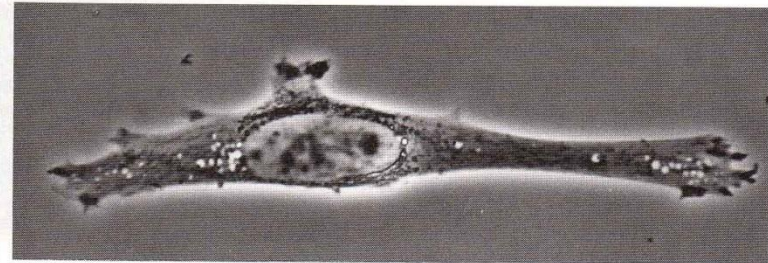


Techniky pro zlepšení kontrastu

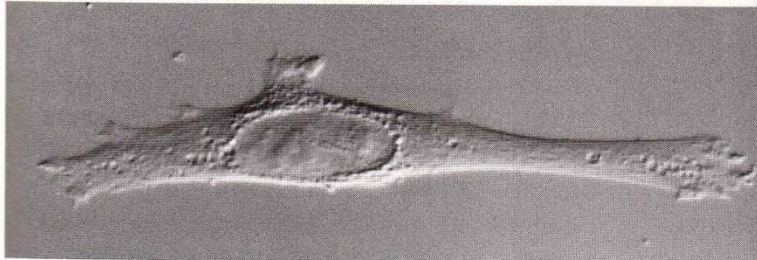
- **Pozorování v zástinu (dark-field)** – šikmé osvětlení, světlý obraz v temném poli
- **Polarizované světlo** – dva polarizační filtry, zobrazení dvojlomných struktur (září v temném poli)
- **Fázový kontrast** – proměňuje fázové změny vlnění na změny intenzity světla, kontrastní obrazy nebarvených, průhledných objektů (buněčných kultur, živých buněk)
- **Diferenciální interferenční kontrast (Nomarski)** – modifikace předcházející metody, pseudo 3D obraz



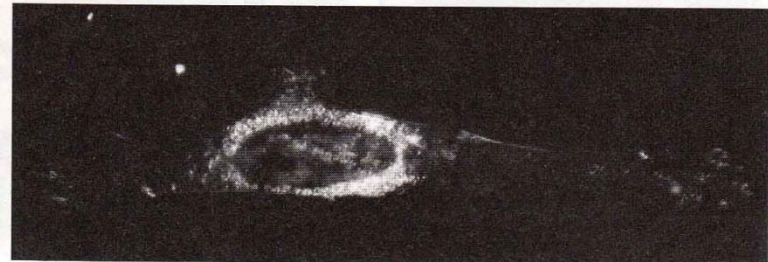
Bright-field



Phase-contrast



Differential-interference-contrast



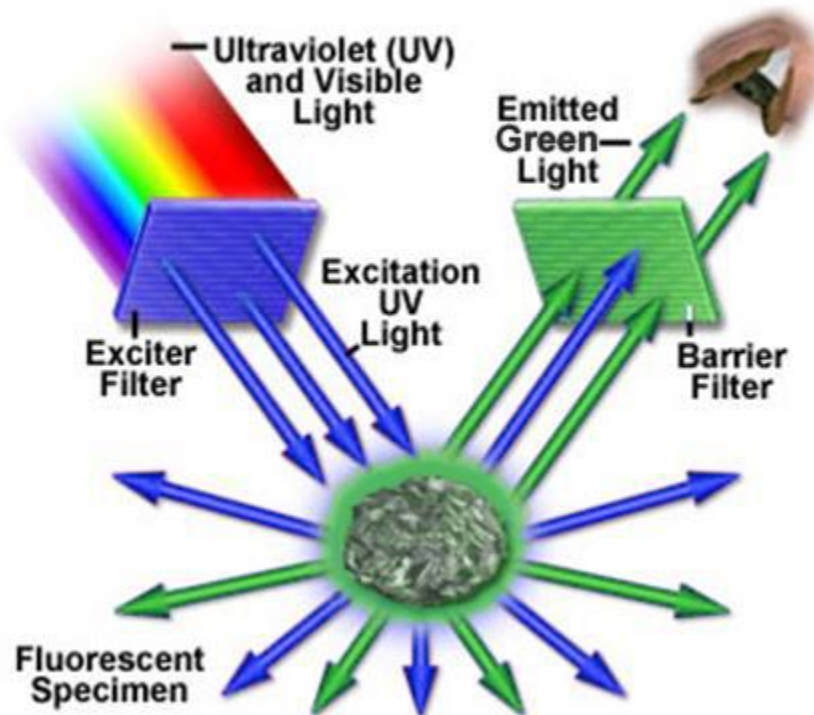
Dark-field

50 μm

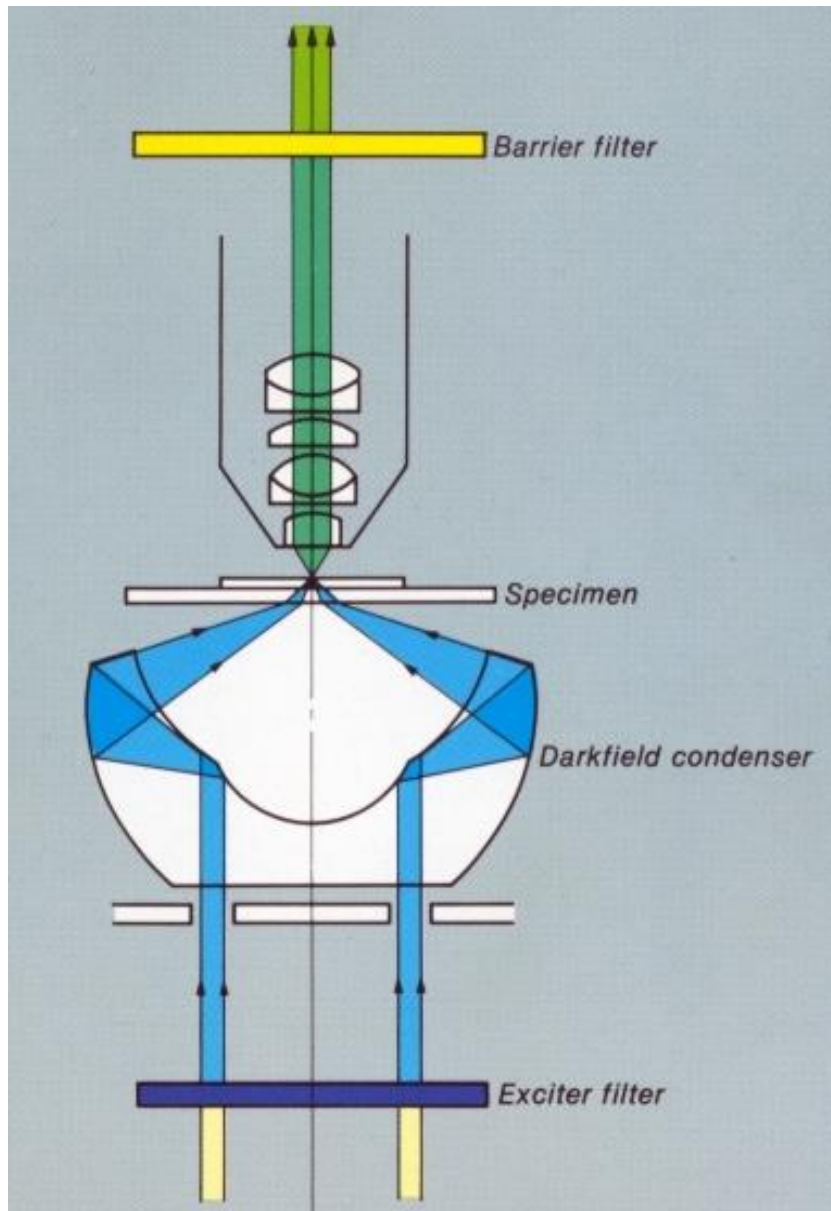
Fluorescenční mikroskopie

- **Fluorescence** – schopnost určitých látek (fluorochromů) reagovat na absorpci excitačního světla emisí světla o větší vlnové délce

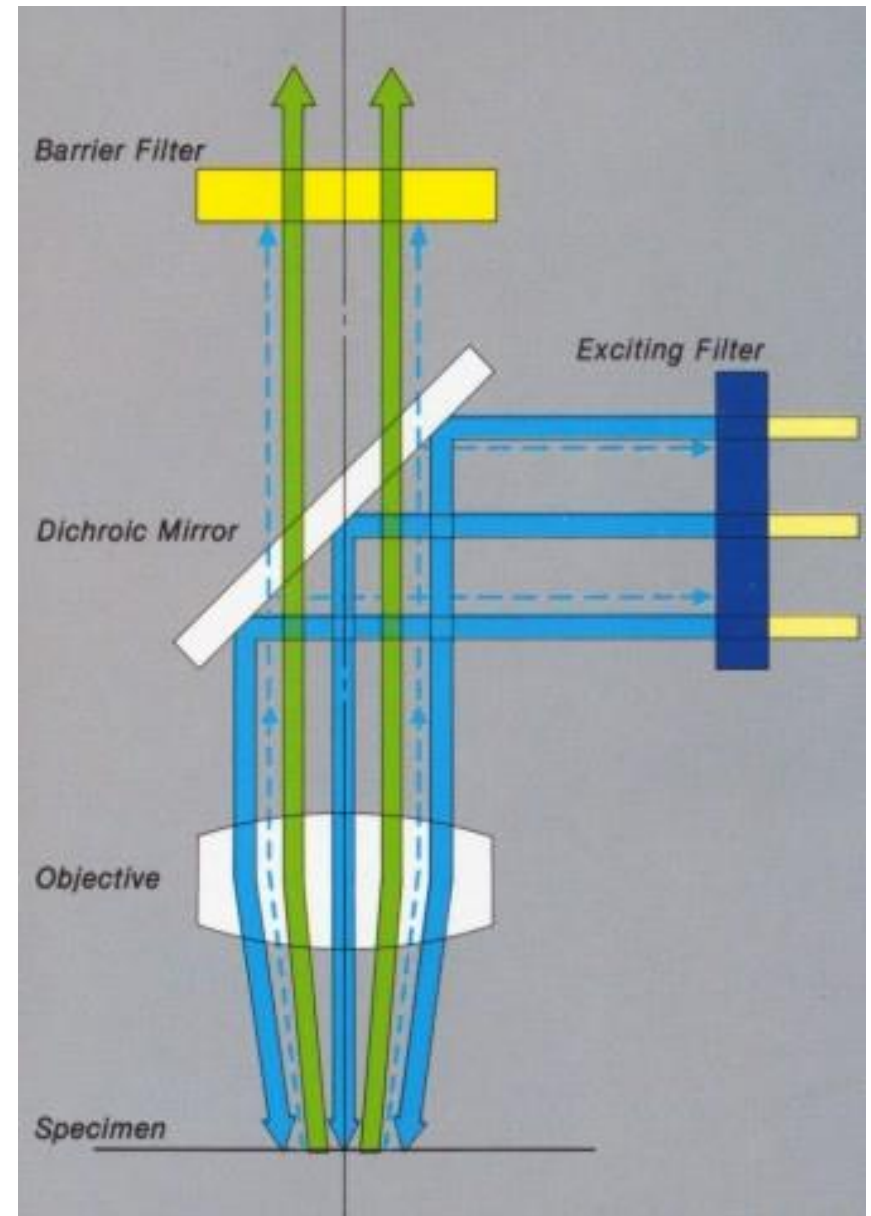
Principle of Fluorescence



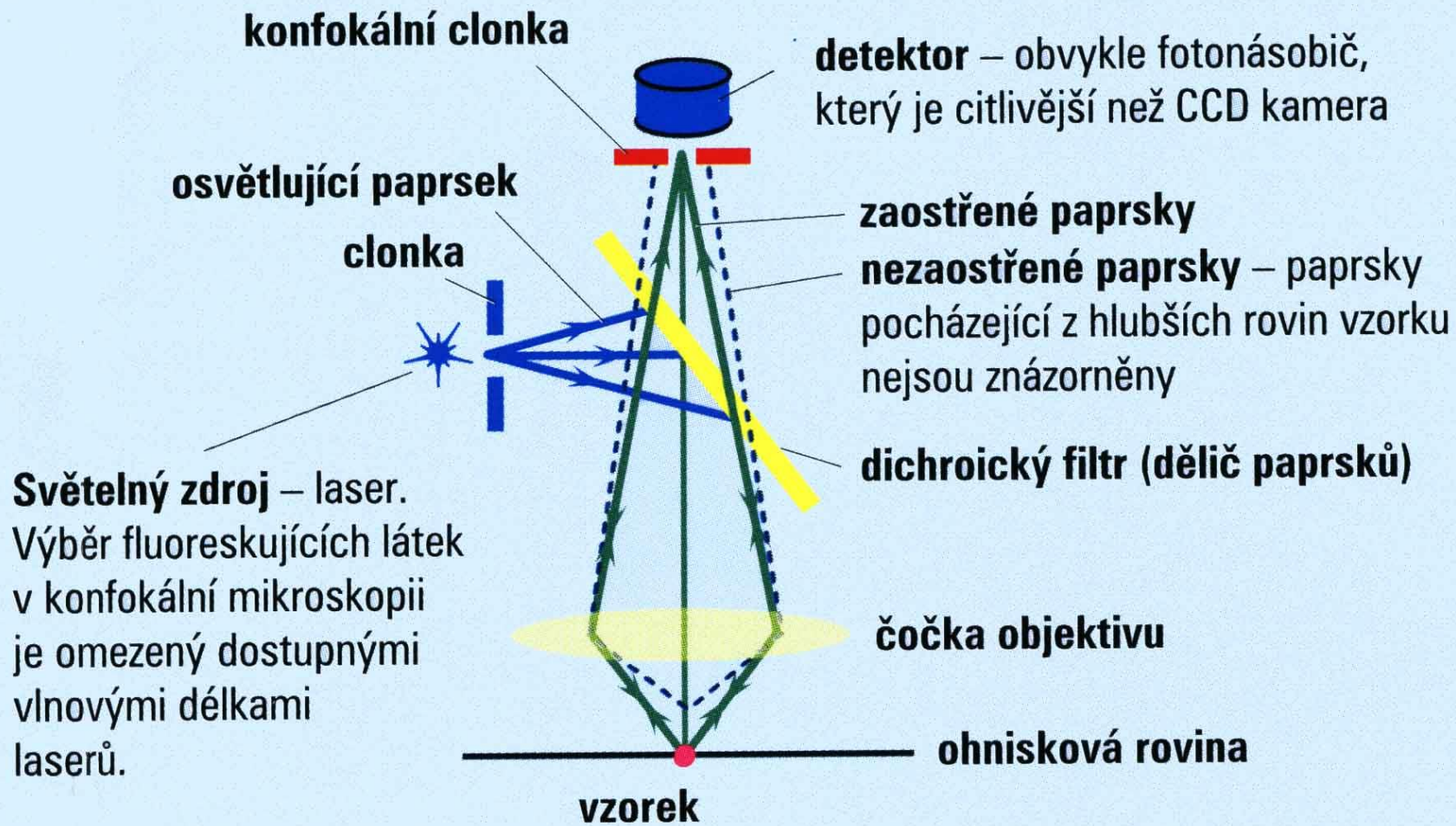
Typy fluorescenčních mikroskopů



Transmisní fluor. m.



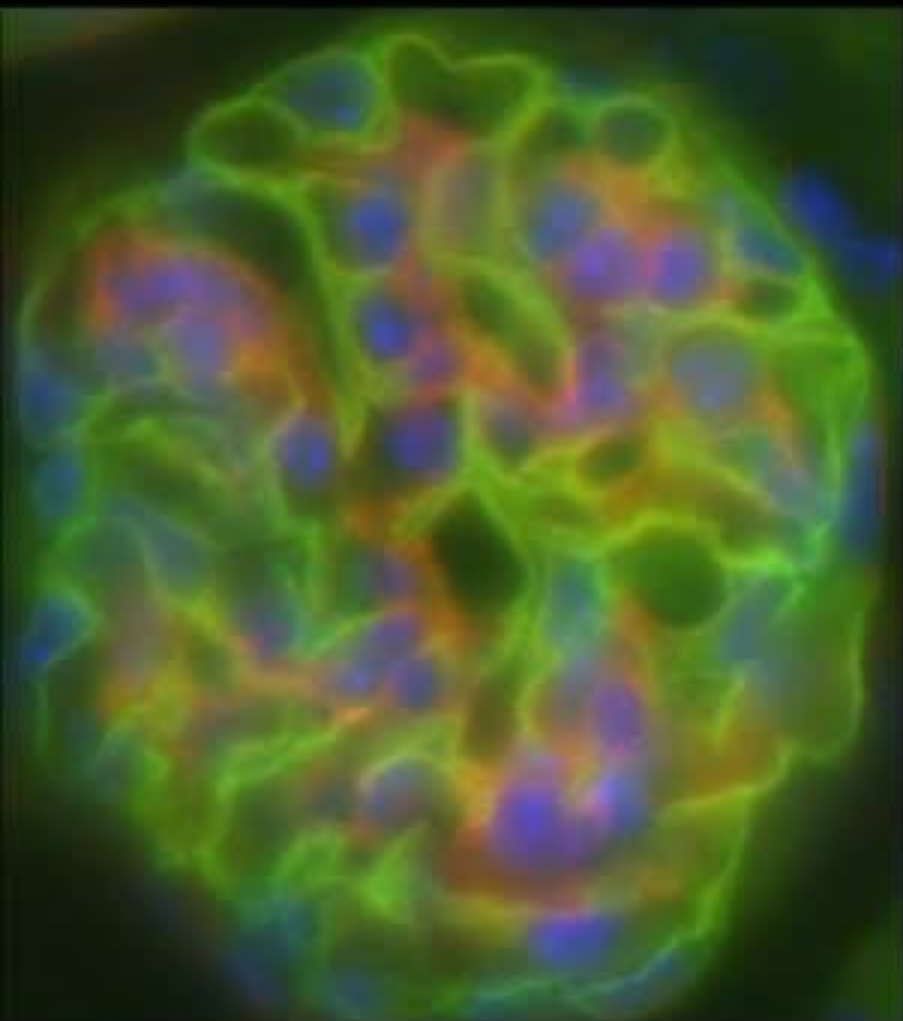
Epifluorescenční m.



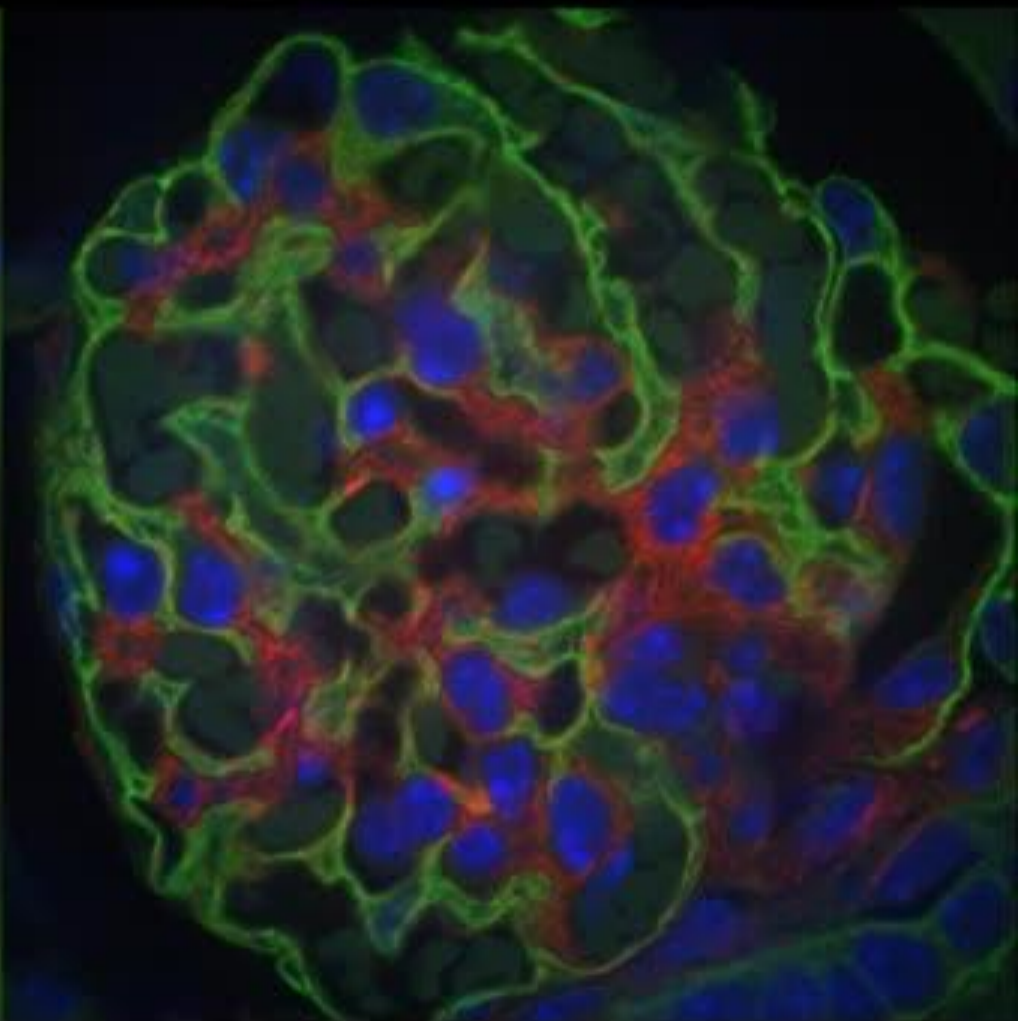
Rastrující konfokální mikroskop

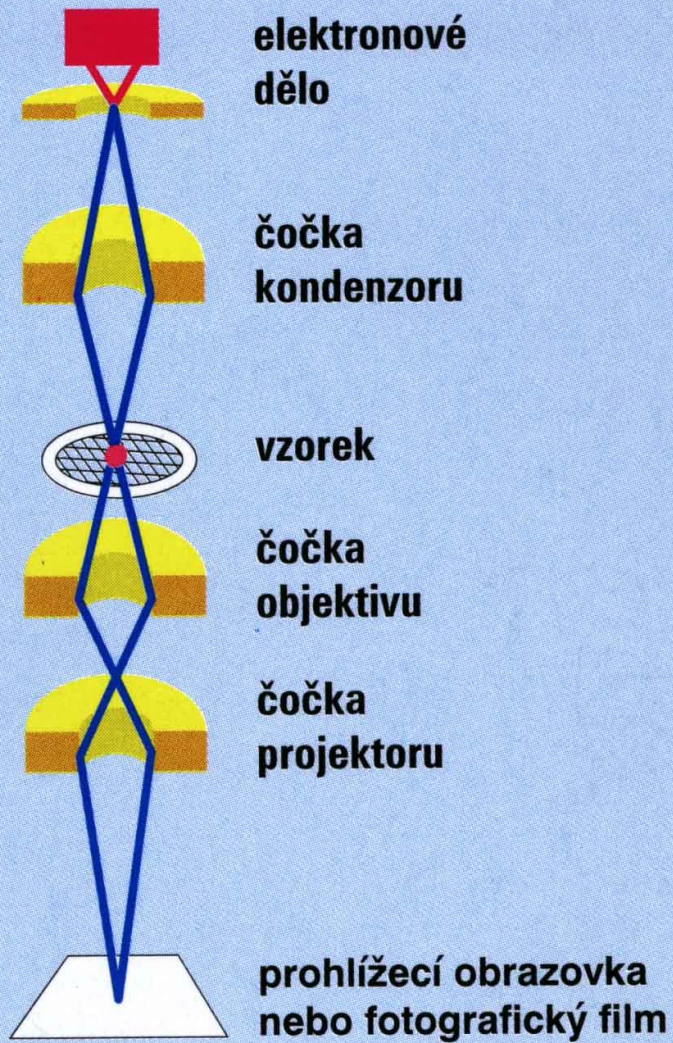
Minsky 1957
Petráň a Hadravský† 1966

Standardní fluorescenční
mikroskop

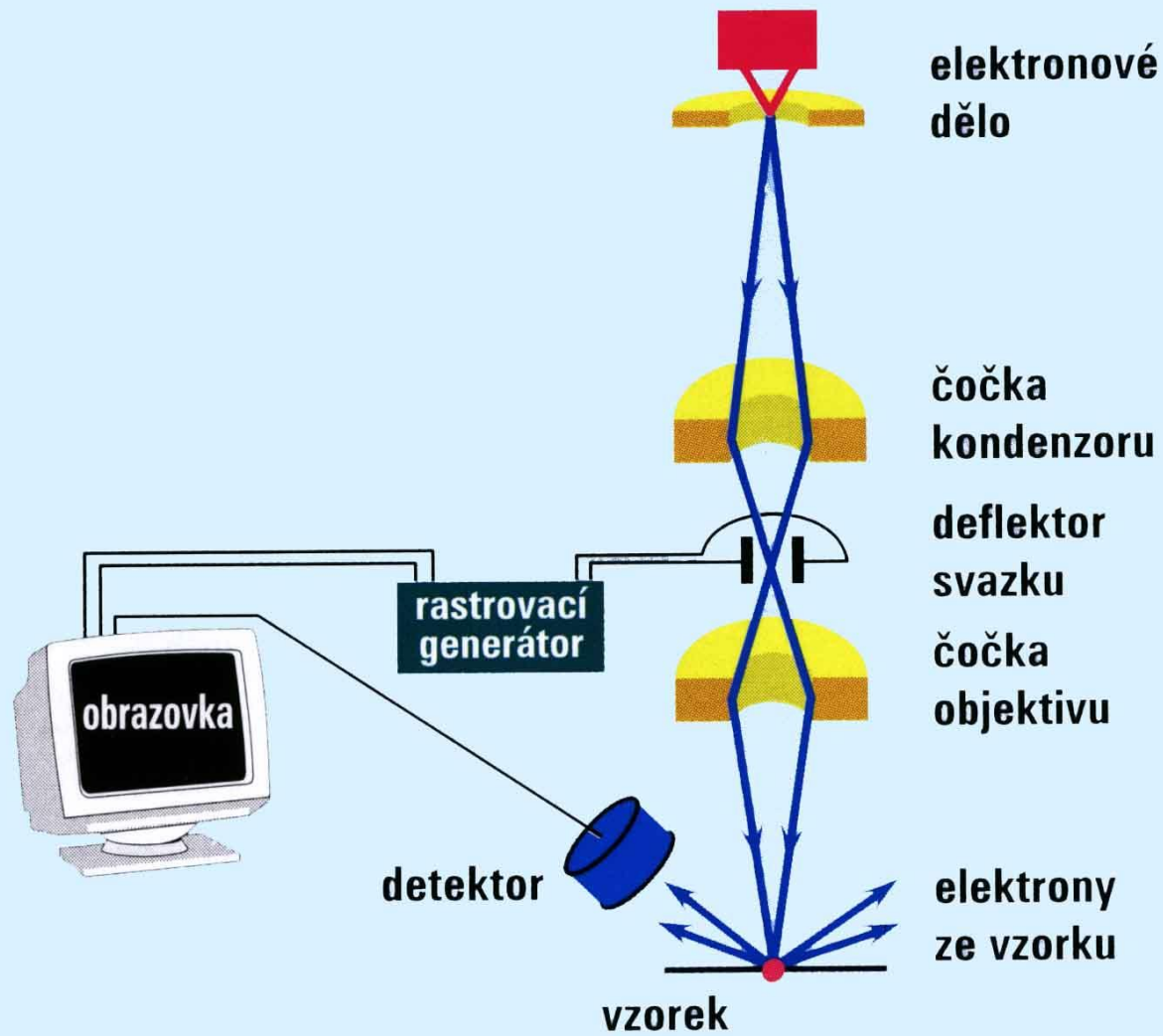


Laserový rastrující konfokální
mikroskop





**Transmisní (prozařovací)
elektronový mikroskop (TEM)**



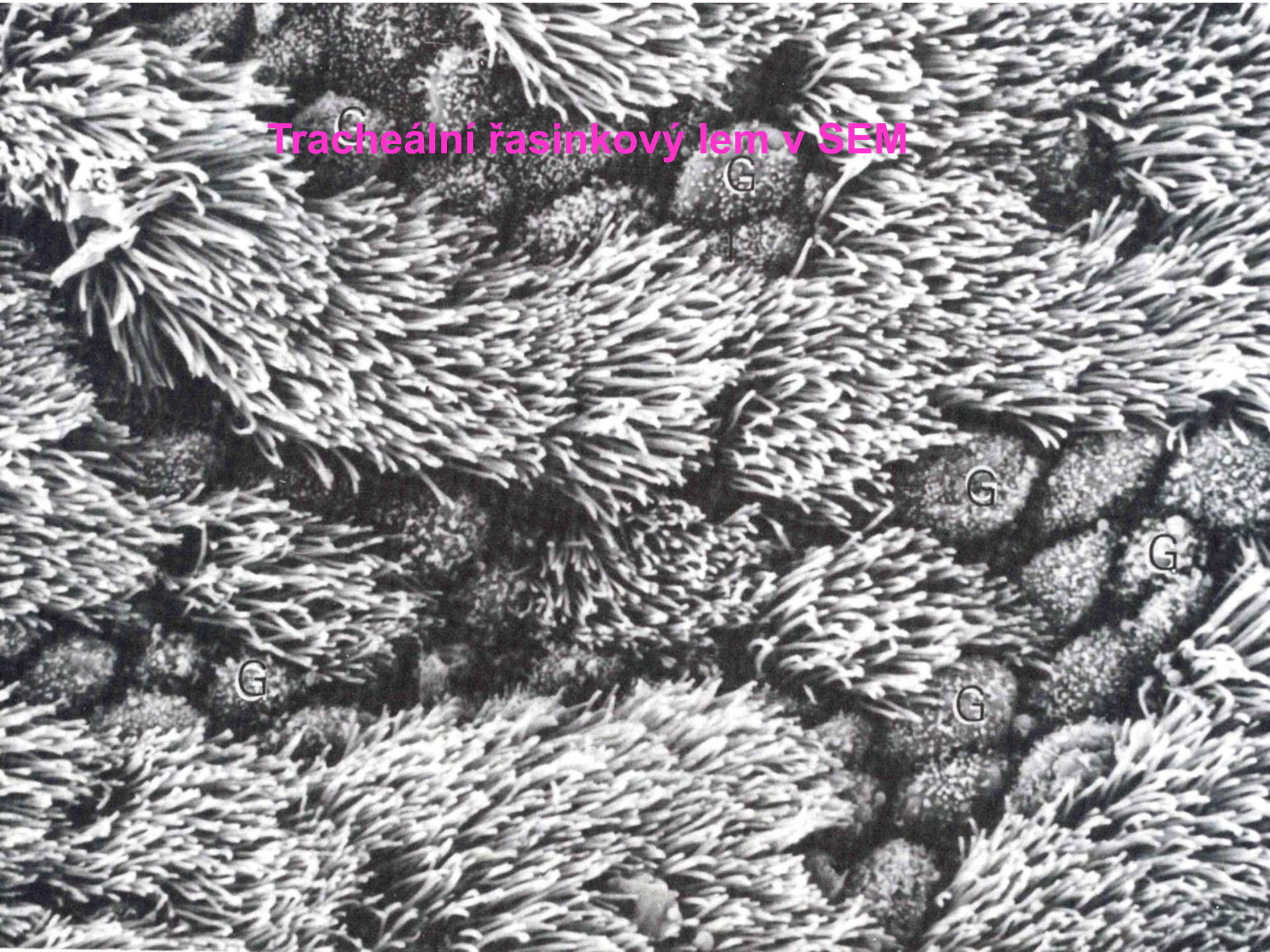
Rastrující elektronový mikroskop (SEM)



Zpracování vzorku pro SEM

- odběr
- fixace - chemická
- odvodnění (nejčastěji vzestupná řada acetonu)
- vysušení metodou kritického bodu (Critical Point Drying) – odvodňovací médium se nahradí nejčastěji tekutým CO₂, který se za zvýšeného tlaku odpaří
- nalepení vzorku na podložku (nejčastěji Al)
- pokovení (nastínování) povrchu (nejčastěji Au, Pt)

Tracheální řasinkový lem v SEM



HISTOCHEMIE

Vznik barevného reakčního produktu *in situ*
s původně **nebarevnou** reagensí

1/ Konvenční histochemie

detekce - prvků (iontů)

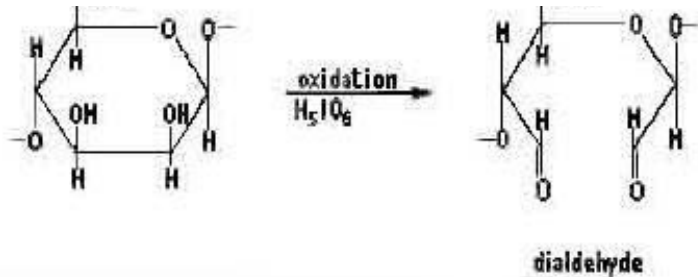
- nukleových kyselin
- lipidů
- sacharidů
- pigmentů
- proteinů (aminokyselin) – dnes neobvyklé,
nahrazeno imunohistochemickými metodami

2/ Katalytická (enzymová) histochemie – detekce enzymů

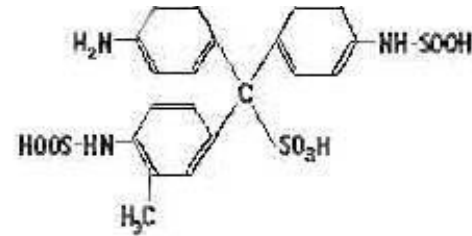
PAS reakce (periodic acid – Schiff)

neúplně specifická oxidativní metoda pro průkaz **složených cukrů** v buňkách a tkáních

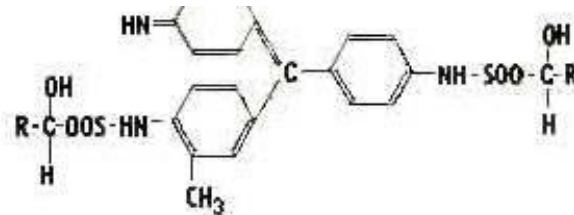
1 oxidace sousedních (vicinálních) volných glykolových skupin kyselinou jodistou (**Malapradeho reakce**)

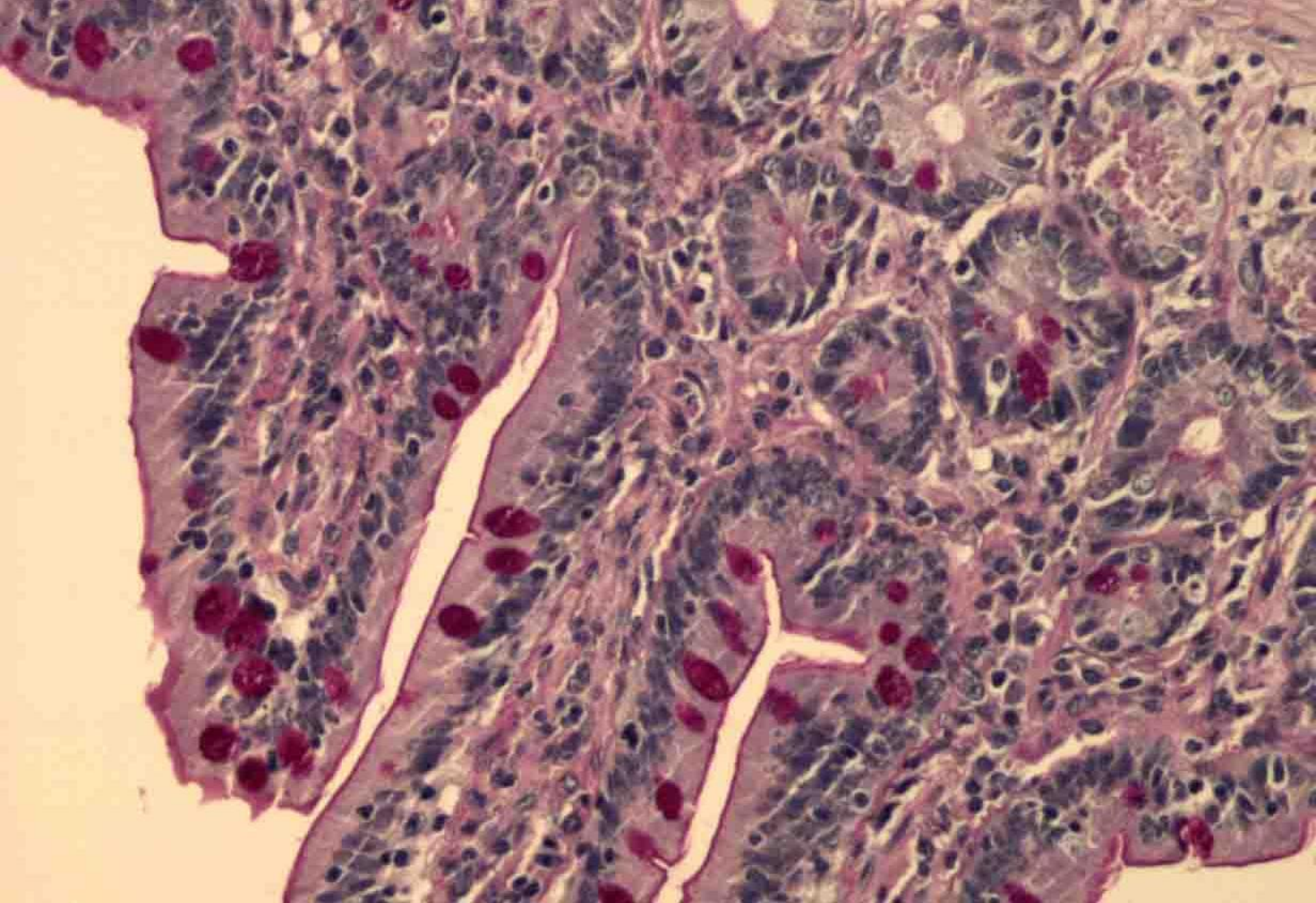


2 průkaz přítomnosti nově vzniklých aldehydových skupin Schiffovým činidlem **Schiffovo činidlo** – leukoforma bazického fuchsínu (bezbarvá)



po reakci s aldehydy vzniká nová **červenofialová** sloučenina





PAS reakce

neutrální muciny

IMUNOHISTOCHEMIE

hledáme **lokalizaci určité látky** v buňce nebo v mezibuněčné hmotě

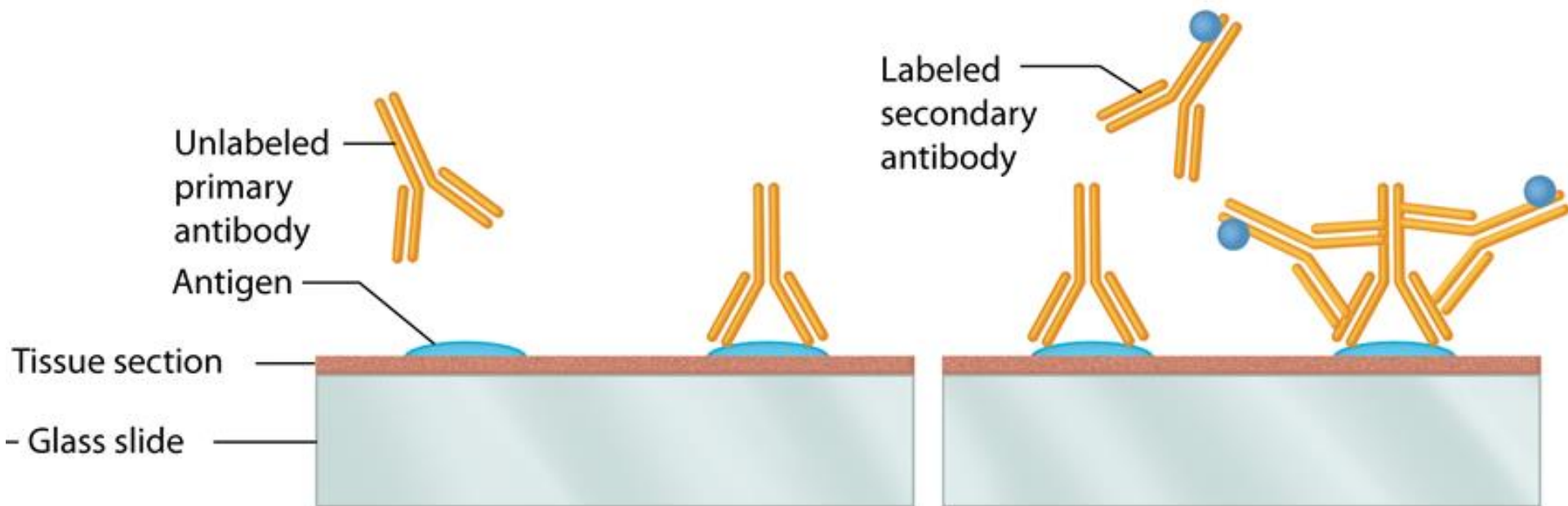
součástí molekuly hledané látky musí být nejméně jedna antigenní determinanta (**epitop**), hledaná látka se pak nazývá **antigen**

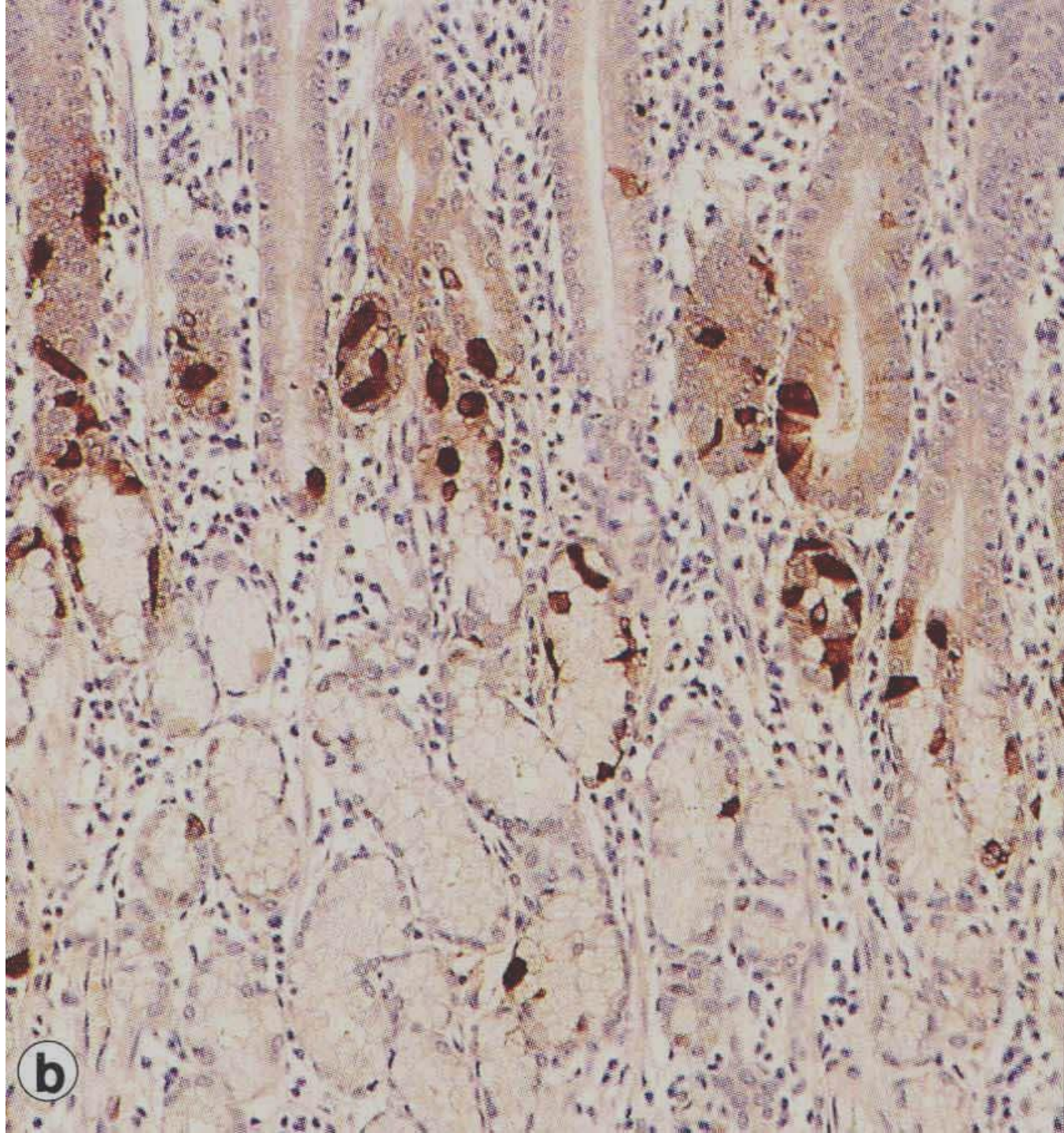
epitopem je specifický řetězec aminokyselin nebo monosacharidů, hledanou látkou tedy může být **protein, glykoprotein, polysacharid, lipoprotein** nebo glykolipid

na epitop se specificky váže uměle připravená **protilátka** (imunoglobulin)

1/ Vazba protilátky na antigen

2/ Zviditelnění (vizualizace) této vazby





b