

HISTOLOGIE

vědní obor studující strukturu buněk
a tkání mnohobuněčných organismů

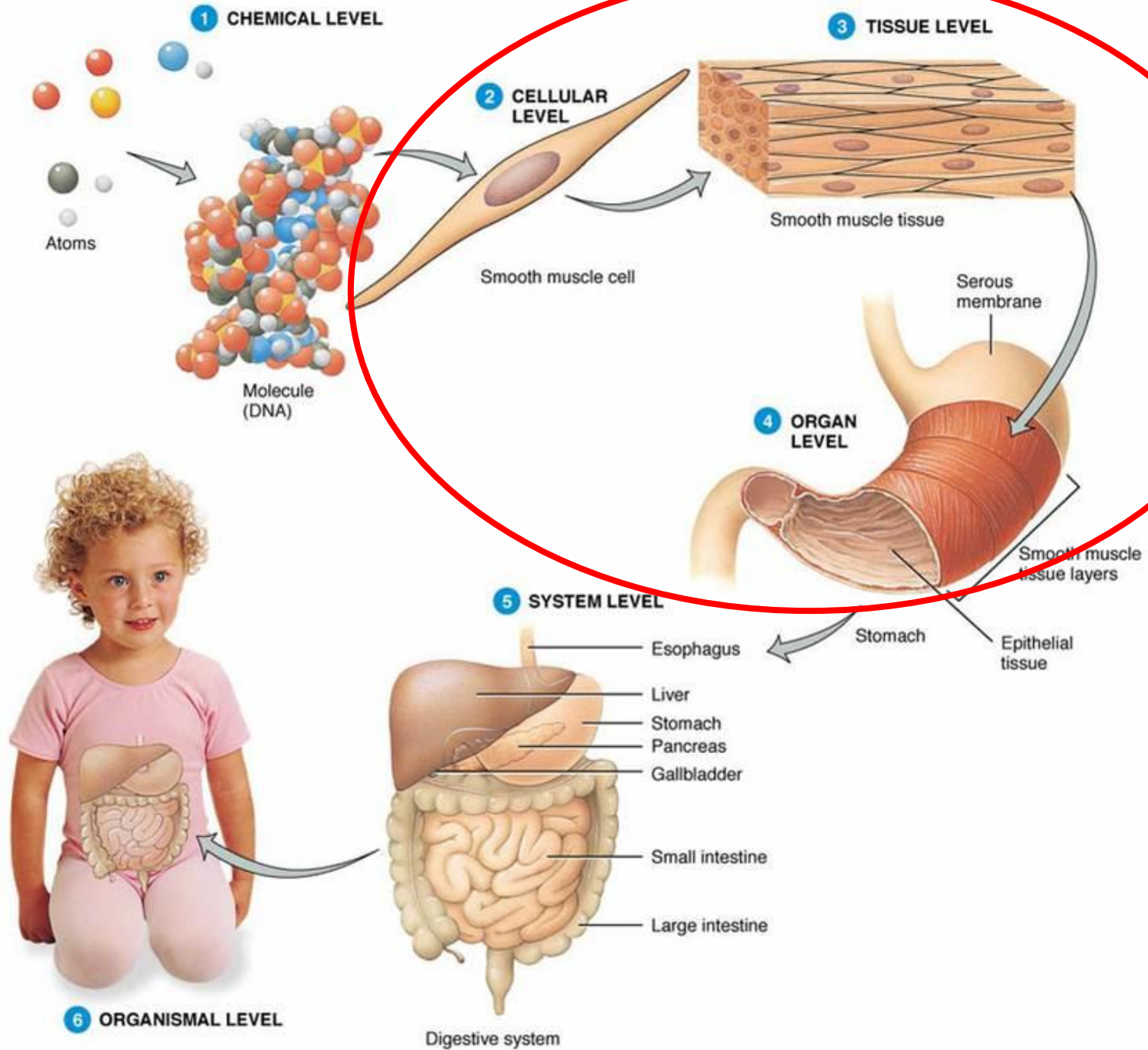
1/ cytologie

2/ vlastní histologie

3/ mikroskopická anatomie

MUDr. Jiří Uhlík, Ph.D.

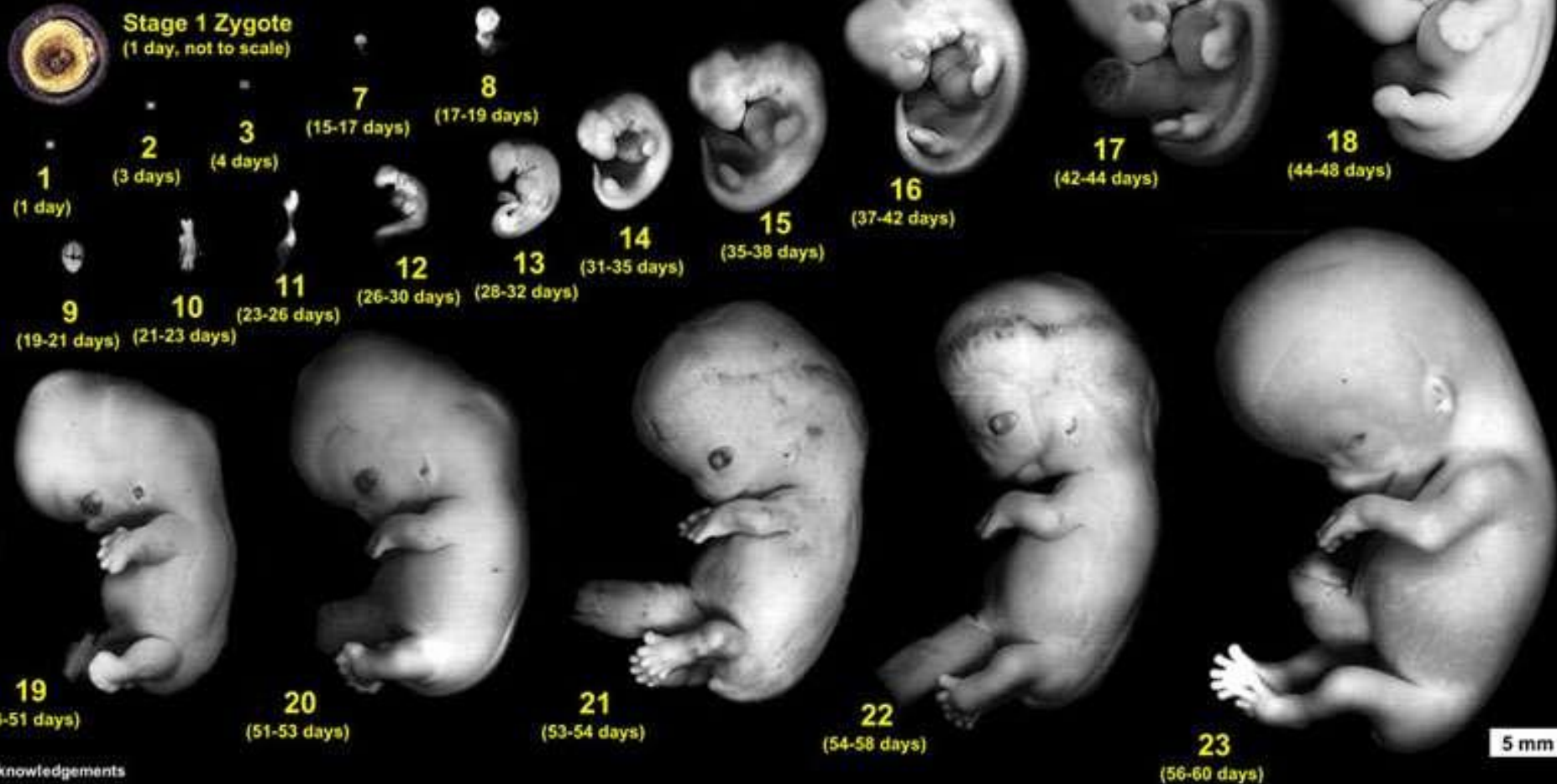
jiri.uhlik@lfmotol.cuni.cz



EMBRYOLOGIE

Carnegie Stages of Human Development

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



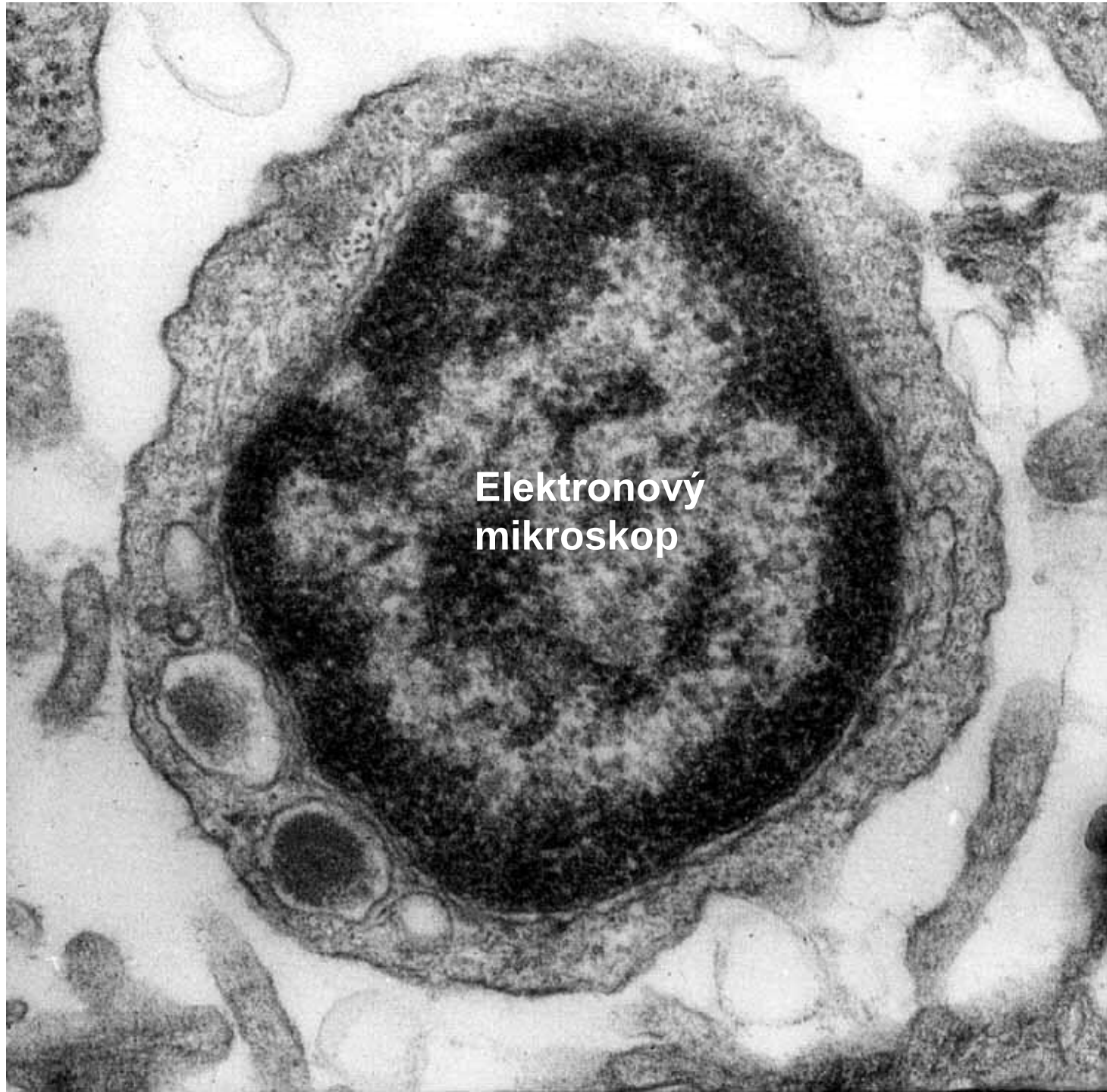
Acknowledgements

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



**Světelný
mikroskop**



**Elektronový
mikroskop**

Největší buňky 150 μm

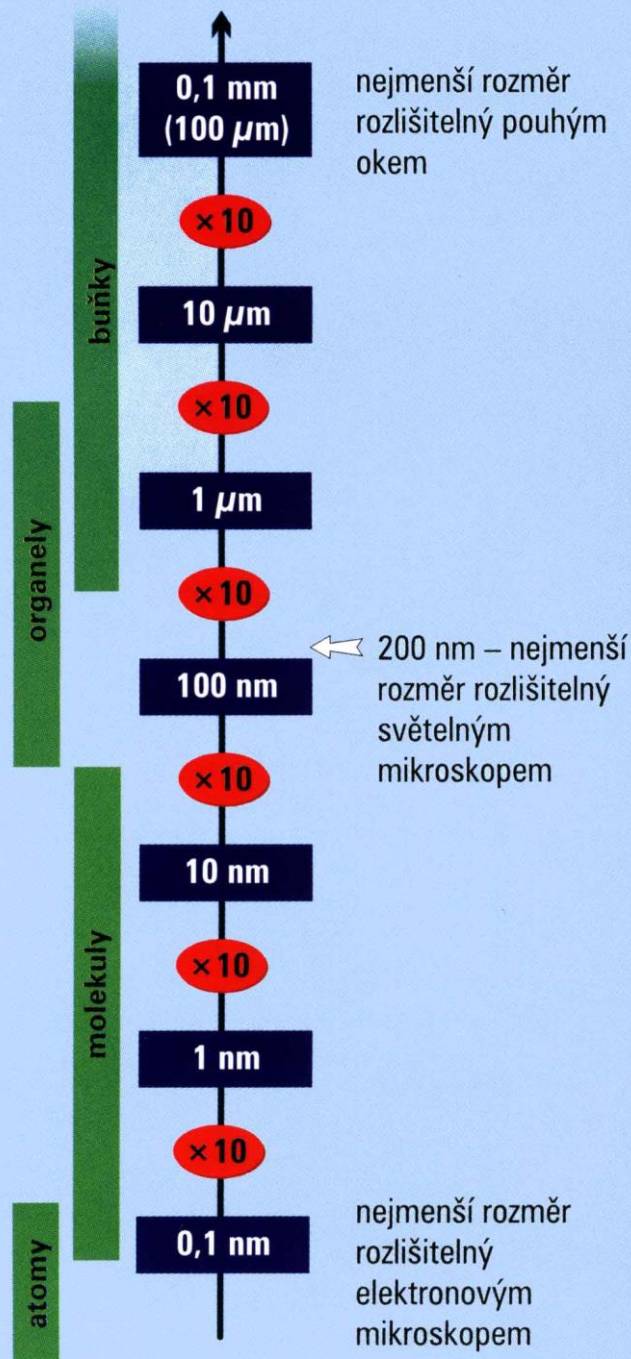
Průměrná velikost buněk 10 – 20 μm

Největší organely 1 – 2 μm

Ribosomy 20x30 nm

Cytoskelet 5 – 24 nm

Membrána 7,5 nm



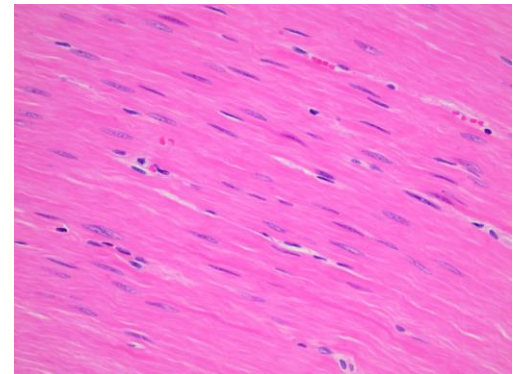
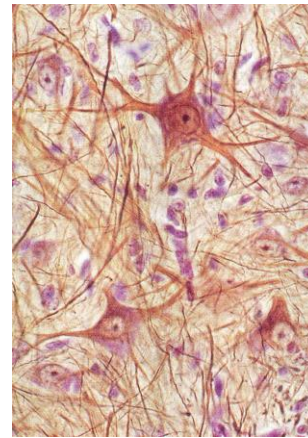
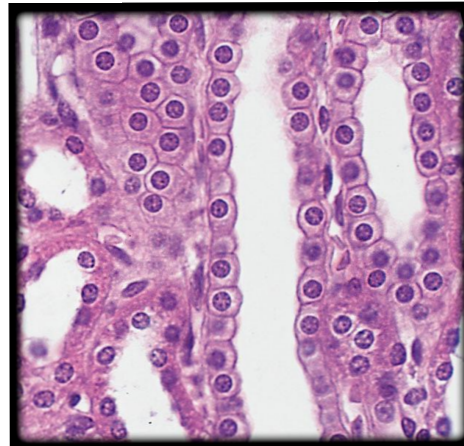
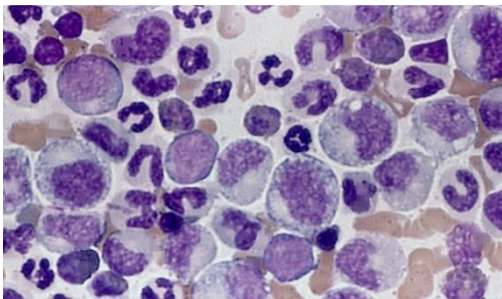
pouhé oko

světelný mikroskop

elektronový mikroskop

BUŇKA

**Základní strukturální a funkční
jednotka živé hmoty**



Počet buněk v lidském těle

30.000.000.000.000

cca 200 typů buněk



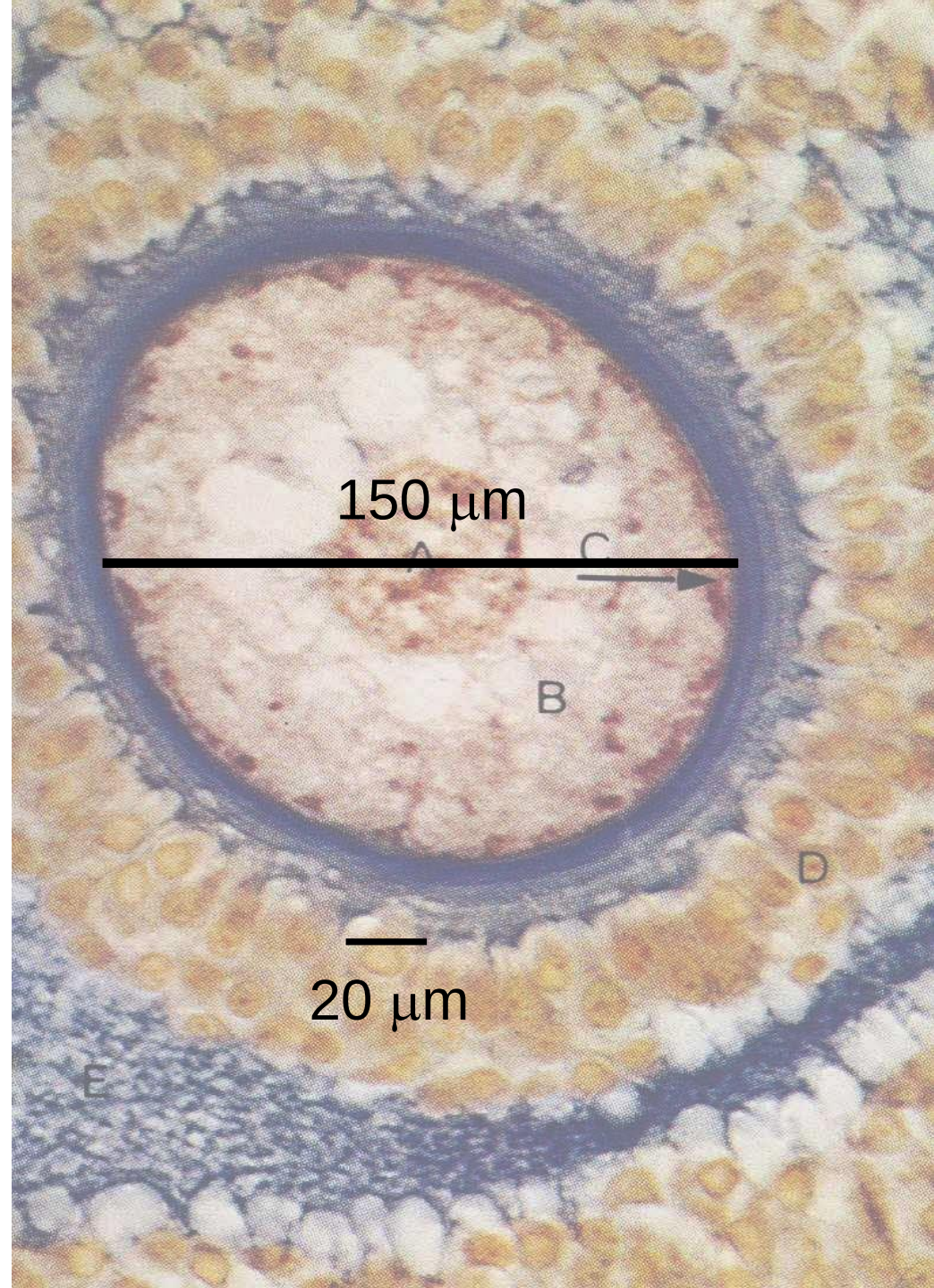
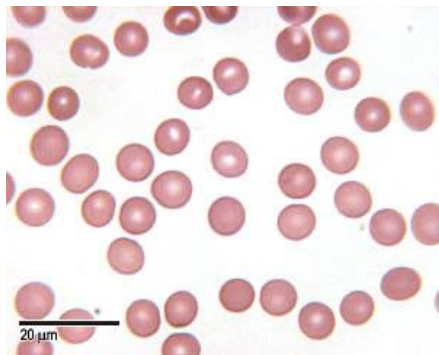
Velikost lidských buněk

průměrná lidská buňka
10-20 μm

největší – oocyt 150 μm

nejmenší – hlavní buňky v
příštítných žlázách nebo malé
granulární neurony v kůře
mozečku
4-5 μm

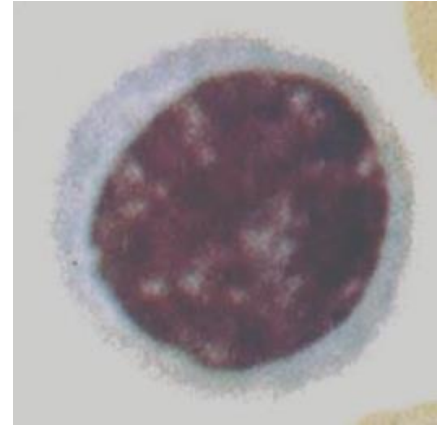
standard
erytrocyt
7,5 μm



SOUČÁSTI EUKARYOTICKÉ BUŇKY

protoplasma = karyoplasma + cytoplasma

karyoplasma = obsah jádra



cytoplasma = matrix (cytosol) + cytoplasmatické struktury

- 1/ organely – membránové**
 - nemembránové**
- 2/ cytoplasmatické inkluse**
- 3/ elementy cytoskeletu**

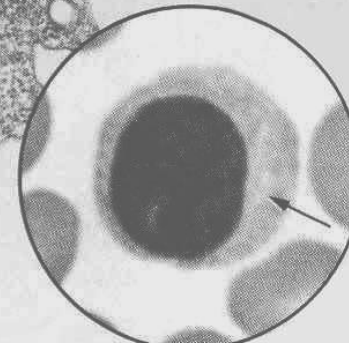
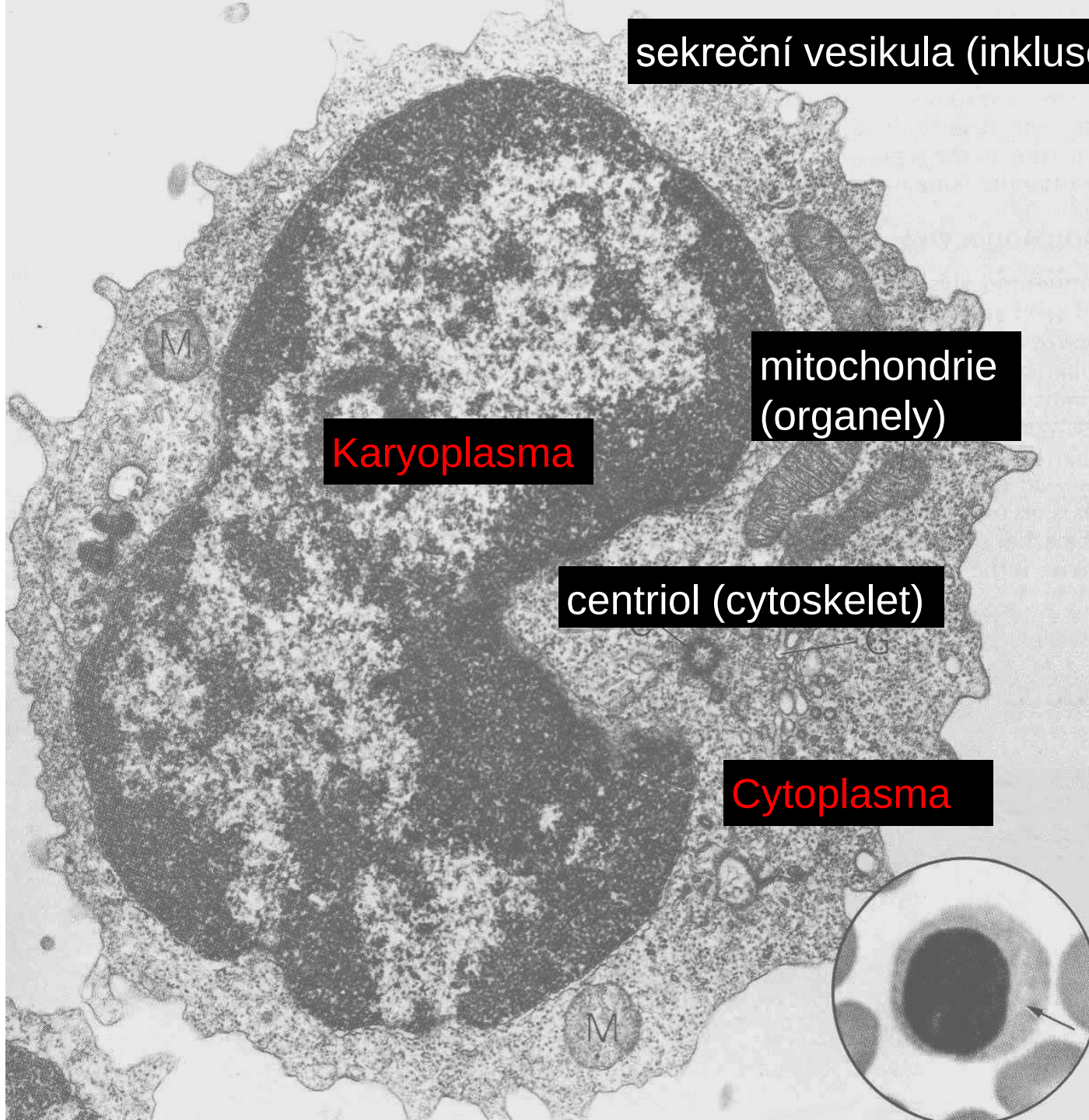
sekreční vesikula (inkluse)

mitochondrie
(organely)

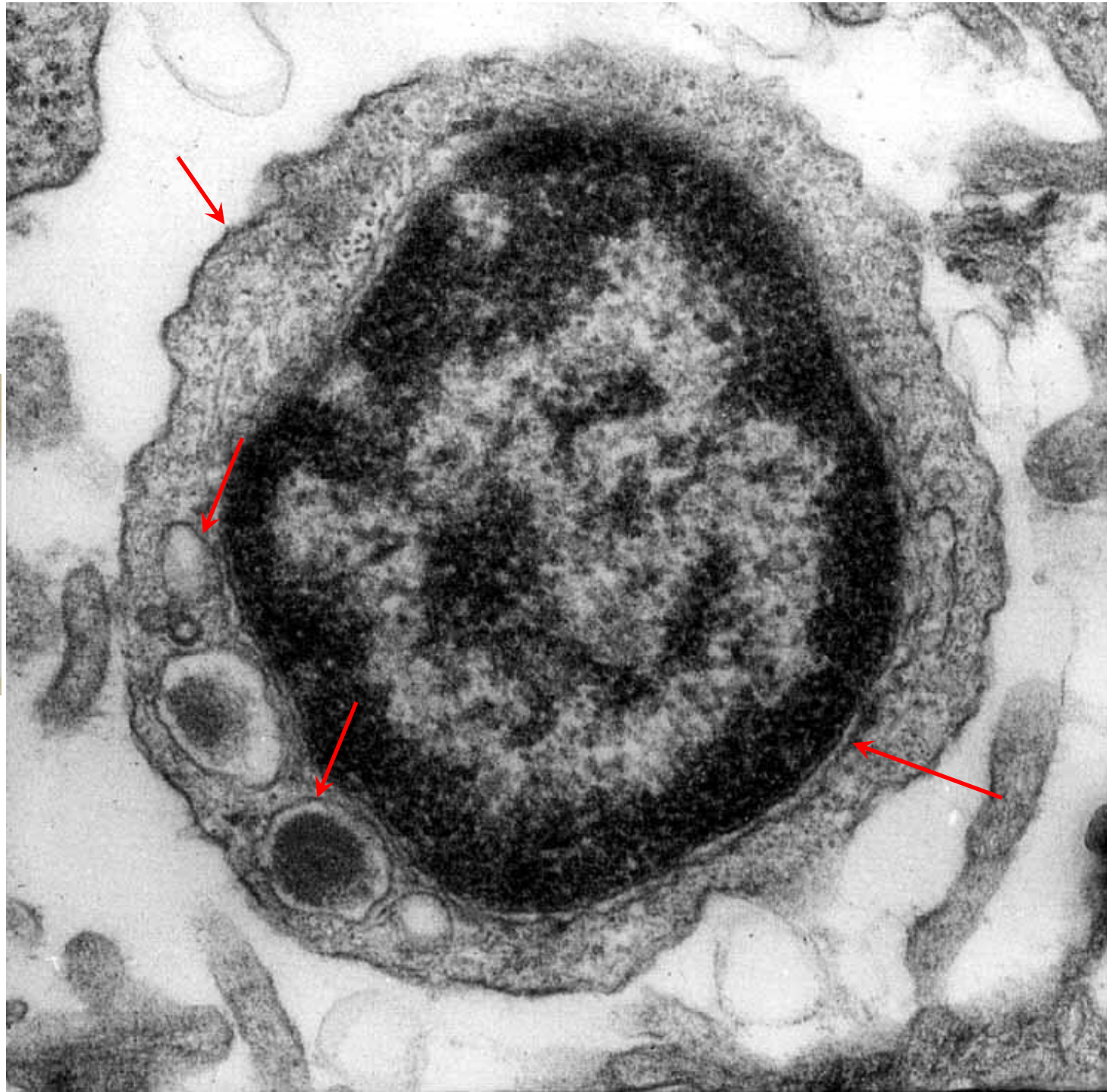
Karyoplasma

centriol (cytoskelet)

Cytoplasma



Membrána



Membránové organely

**vždy a trvale přítomné v buňce
obklopeny membránou
obsahují enzymy pro vlastní potřeby buňky**

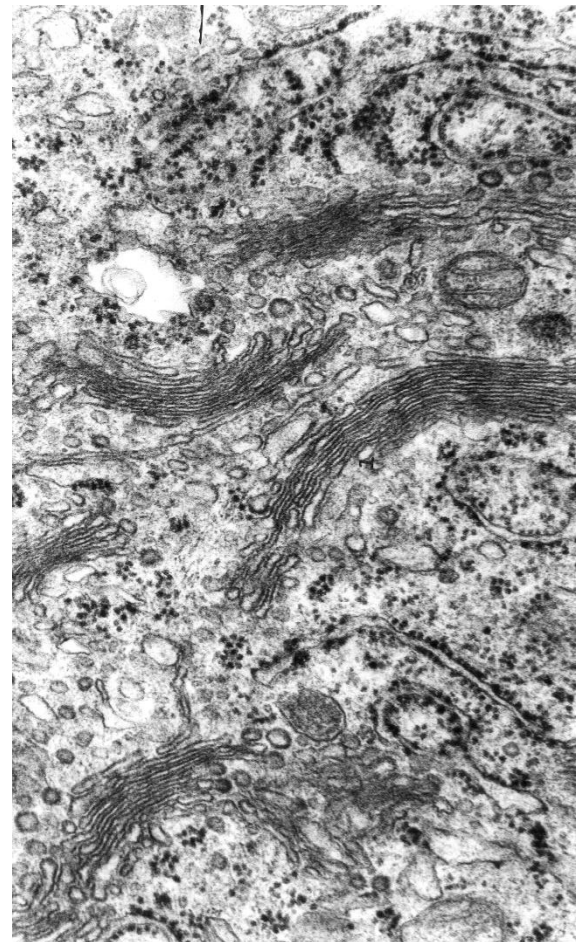
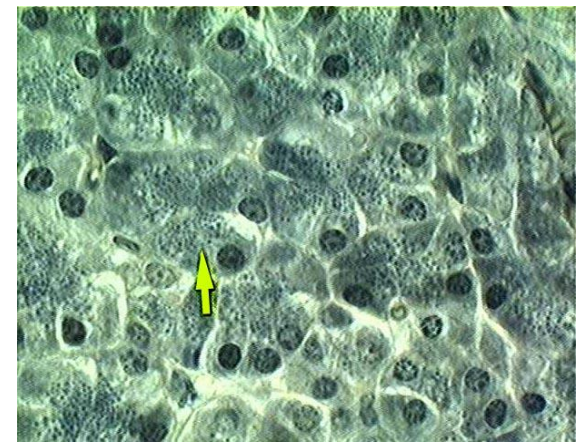
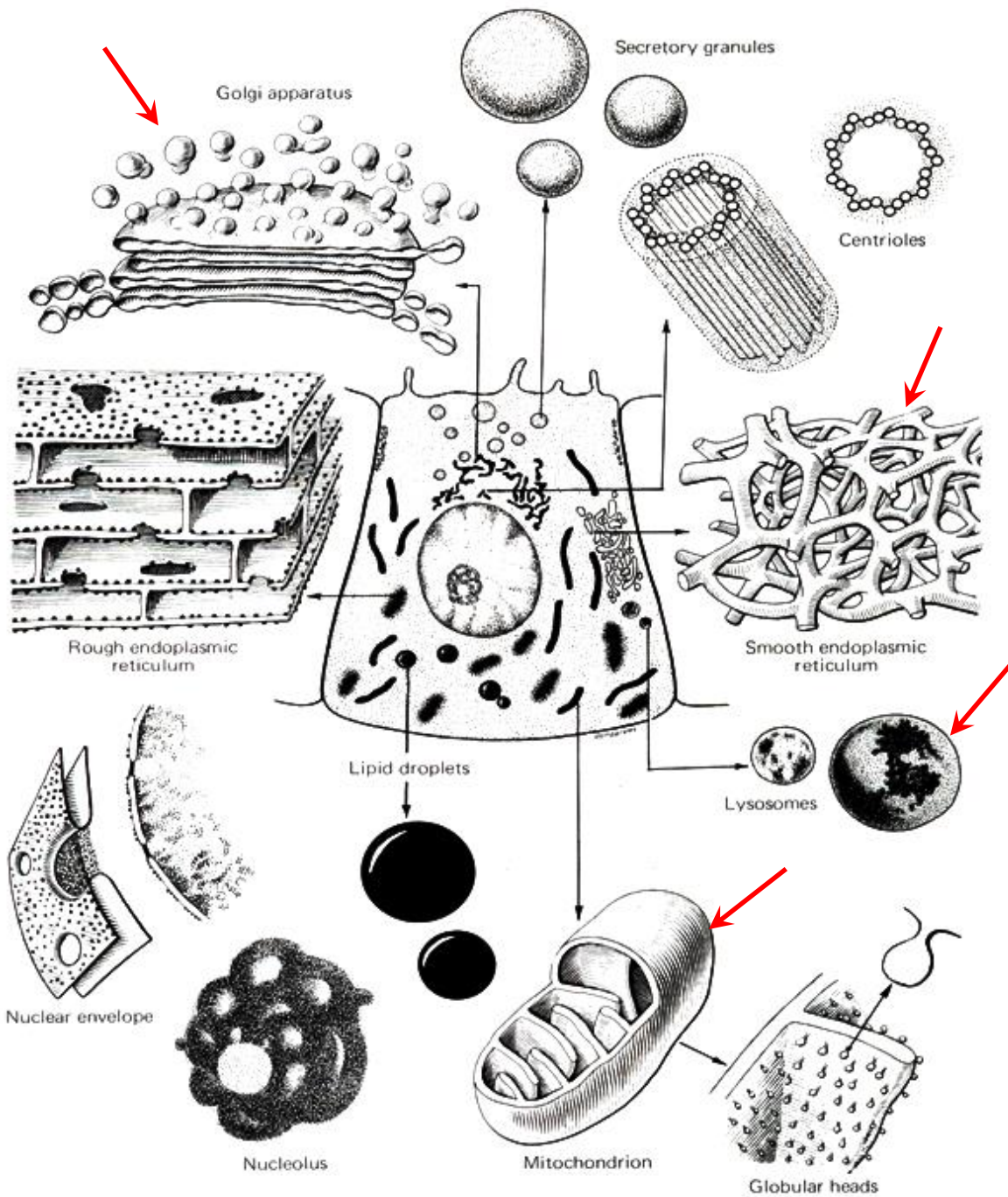
mitochondrie

**endoplasmatické retikulum (hladké a
granulární)**

Golgiho komplex

lysosomy

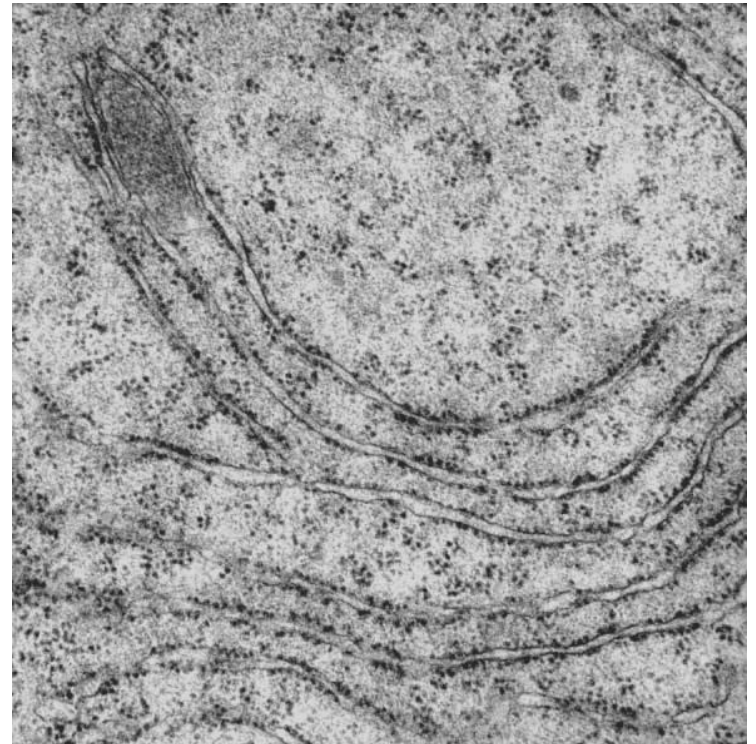
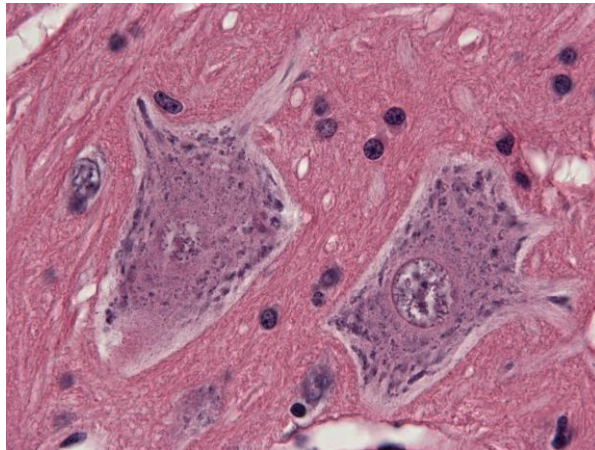
peroxisomy



Nemembránové organely

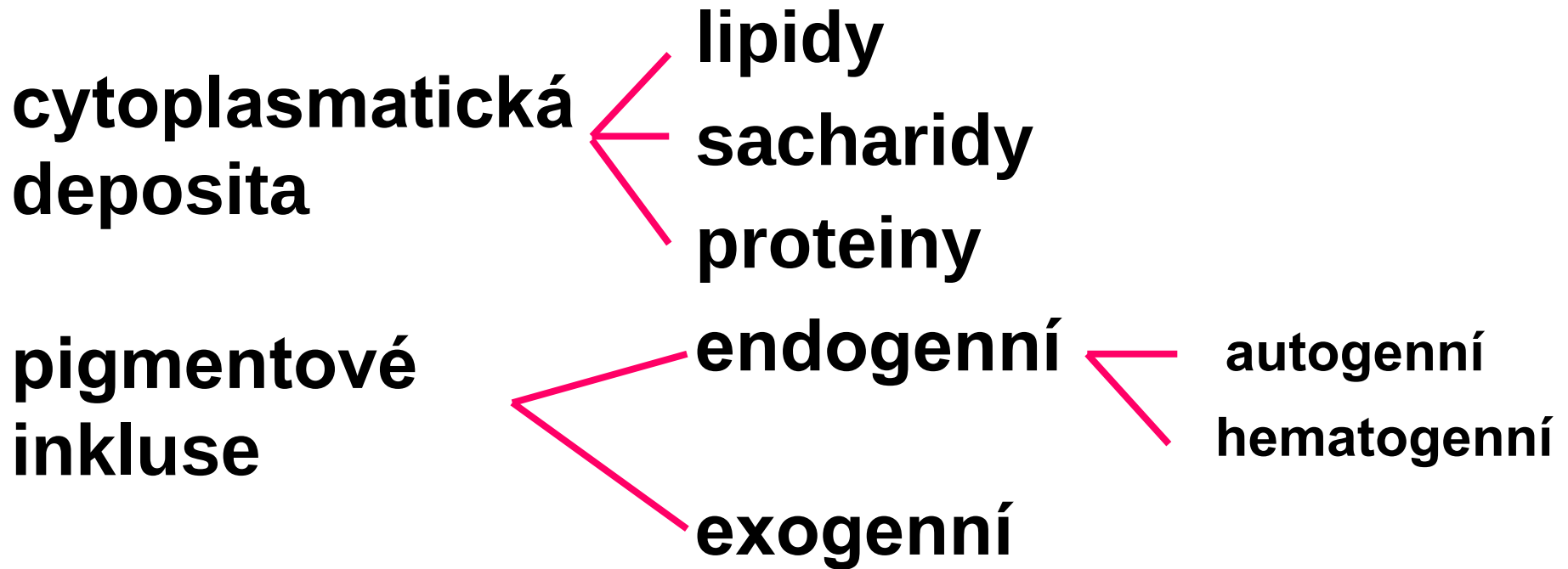
vždy a trvale přítomné v buňce
NEJSOU obklopeny membránou
obsahují enzymy pro vlastní potřeby buňky

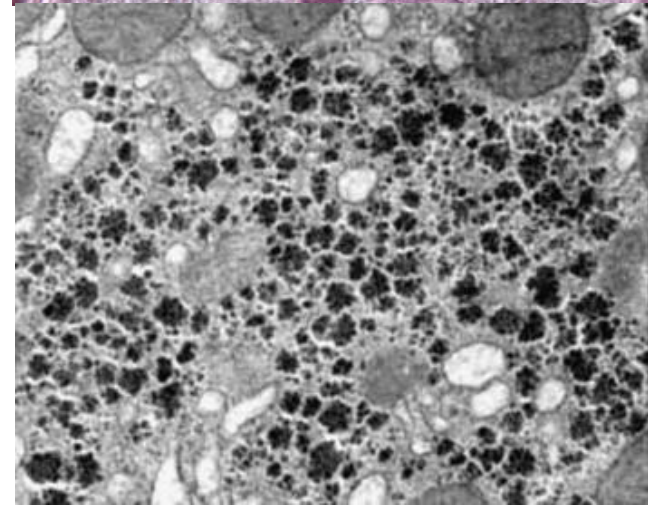
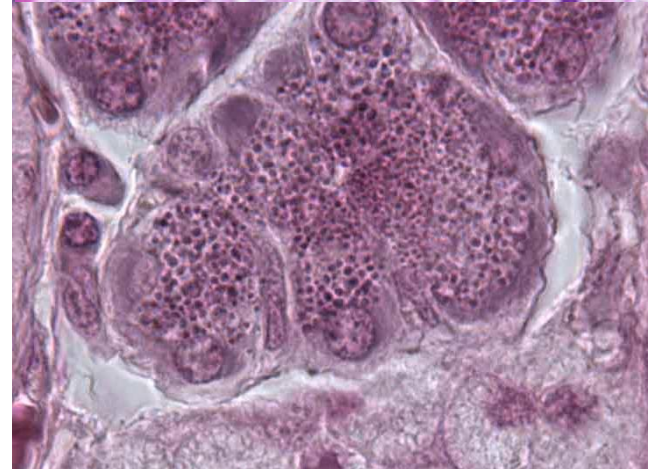
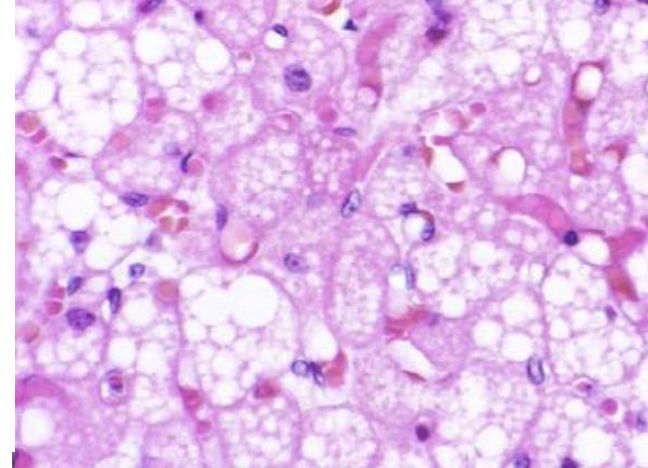
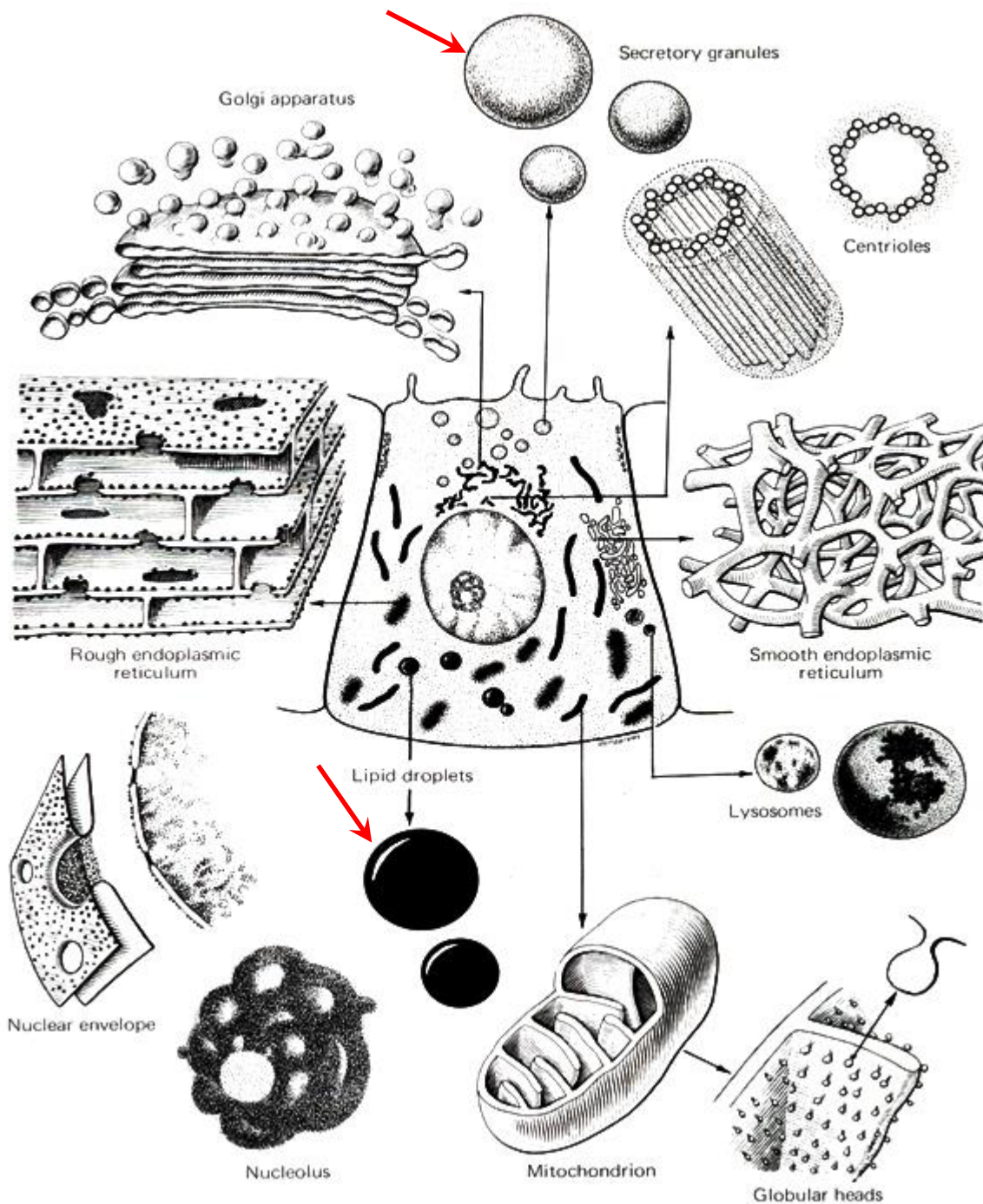
- ribosomy
- proteasomy
- chaperony
- vaults (nanokapsle)



Cytoplasmatické inkluse

nemusí být v buňce vůbec, tvoří se a jsou z buněk vylučovány
mohou, ale nemusí být obklopeny membránou
pokud obsahují enzymy, nejsou tyto zapojeny do metabolismu buňky





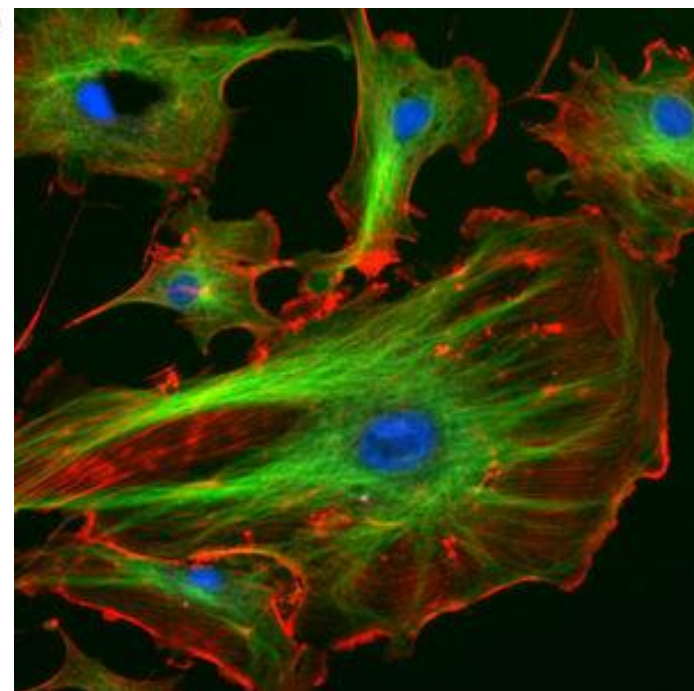
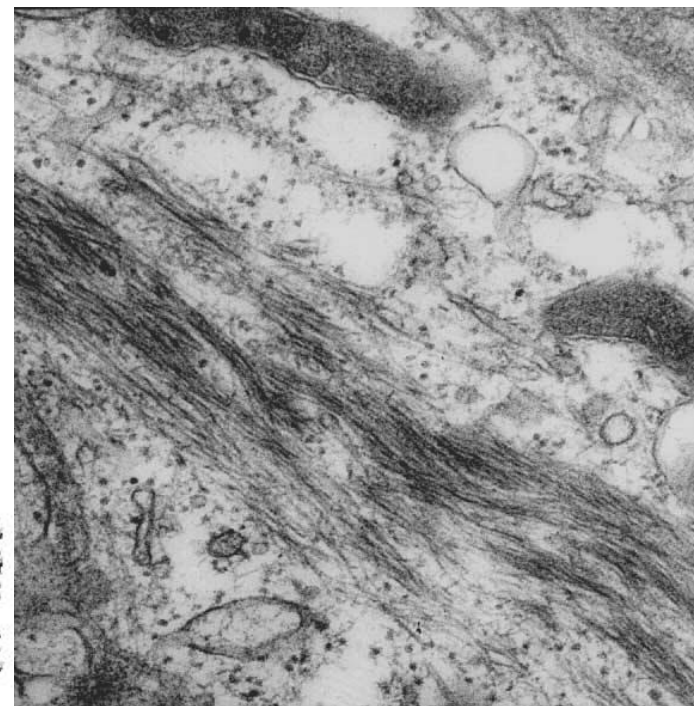
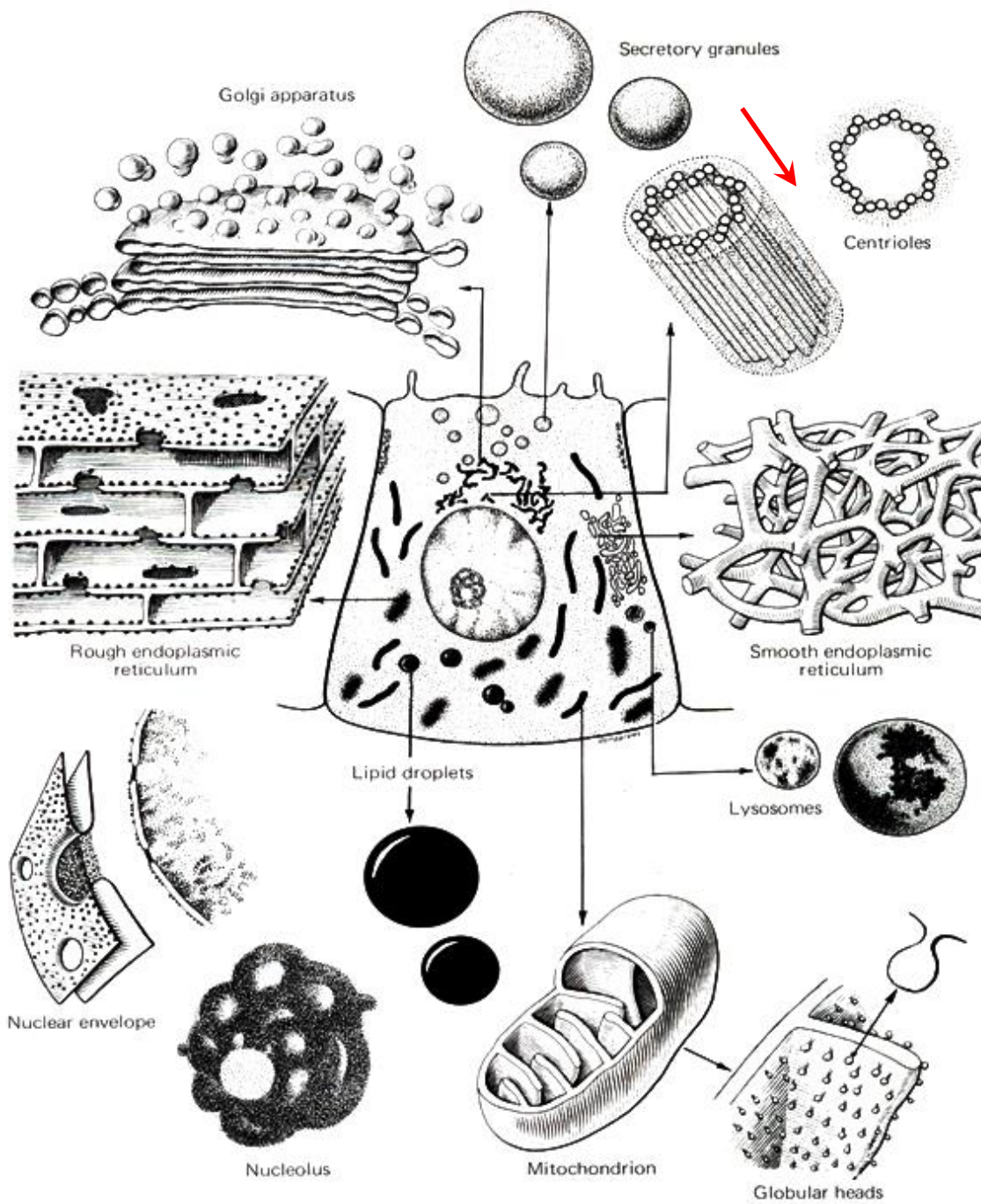
Cytoskelet

řetězce proteinových molekul
NEJSOU obklopené membránou
obvykle velmi labilní a dynamické

mikrofilamenta (5-7 nm)

intermediární filamenta (10-12 nm)

mikrotubuly (24 nm)



ZÁKLADNÍ HISTOLOGICKÉ TECHNIKY

Light microscope



Transmission electron microscope (TEM)



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

ZPŮSOBY FIXACE

» FYZIKÁLNÍ

- rychlé a hluboké ZMRAZENÍ (histochemie, cytochemie)
- lyofilizace
- ZAHŘÁTÍ nebo POVAŘENÍ (mikrobiologie, nebo speciální požadavky)

» CHEMICKÉ

- PÁRY těkavých chemických látek (OsO_4 , aldehydy, alkoholy)
- ROZTOKY chemických látek (aldehydy, kyseliny, soli, alkoholy)
 - způsob IMERSNÍ
 - způsob PERFUSNÍ

CHEMICKÁ FIXACE - FIXAČNÍ ČINIDLA

» ALDEHYDY

- **10% formol** (formalín) = 4% formaldehyd ve vodě (světelná mikroskopie)
- 2-5% glutaraldehyd (elektronová mikroskopie - prefixace)

» KYSELINY

- kyselina osmičelá (elektronová mikroskopie - postfixace, prekontrastování)
- kyselina pikrová (ve směsích – Bouinova tekutina)
- kyselina octová (ve směsích – Bouinova tekutina, SUSa)

» SOLI

- chlorid rtuťnatý - sublimát (ve směsích – SUSa, Zenker)
- dvojchroman draselný (ve směsích – Regaud, Zenker)

» ALKOHOLY

- methylalkohol (krevní nátěry, mikrobiologie)
- ethylalkohol (ve směsích – AAF, Carnoy)



ZALÉVÁNÍ TKÁNÍ DO PARAFINU

- **ODVODNĚNÍ**
 - vzestupná 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 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

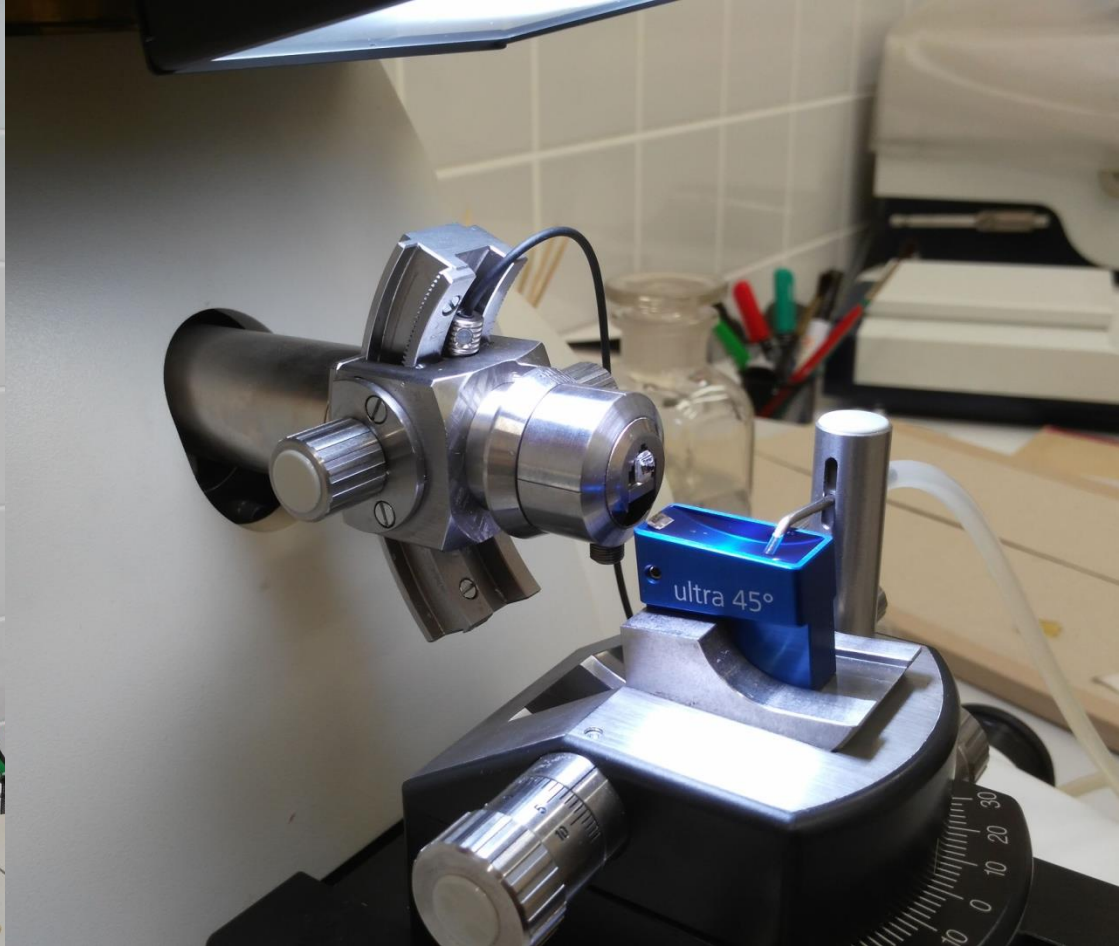


Sáňkový mikrotom

ruční rotační mikrotom







Ultramikrotom

Thank-you for
choosing DiATOME...

DiATOME
CUSTOMER
APPRECIATION

CHECK OUT THE DEALS!



KRYOSTAT – kombinace rotačního mikrotomu a mrazícího boxu

manuální



motorizovaný



oddělené chlazení
- komory
- hlavy
- nože

VYUŽITÍ ZMRAZOVACÍCH TECHNIK

**rychlé peroperační biopsie – hlavně
posouzení přítomnosti malignity
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





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 diferenciací 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 xylene (2 lázně) – vytěsnění alkoholu rozpustidlem montovacího média
- **MONTOVÁNÍ**
 - Solakryl – překrytí řezu krycím sklíčkem

basofilní

světlé (optický prázdne)

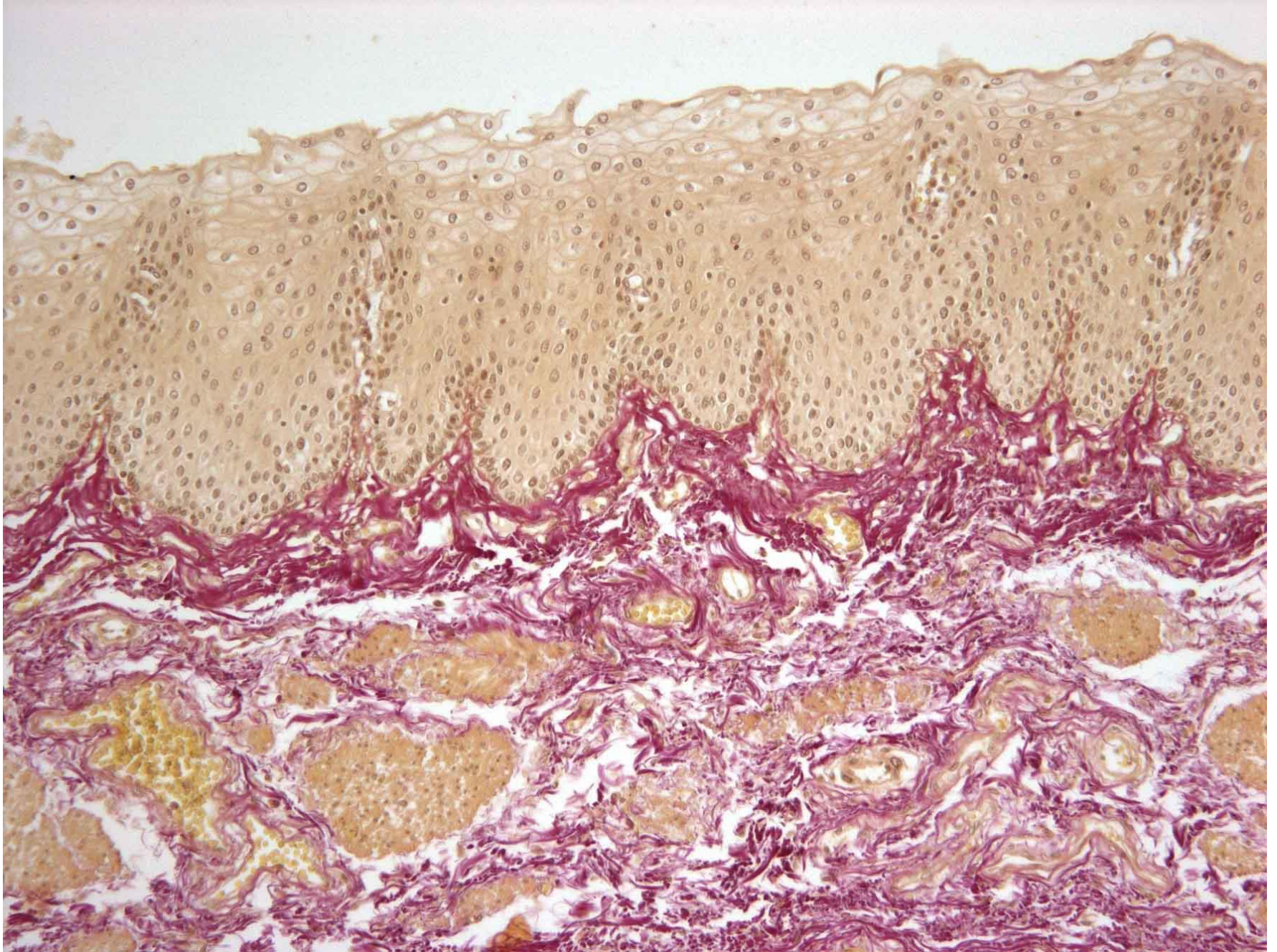
eosinofilní (acidofilní)

20 μm

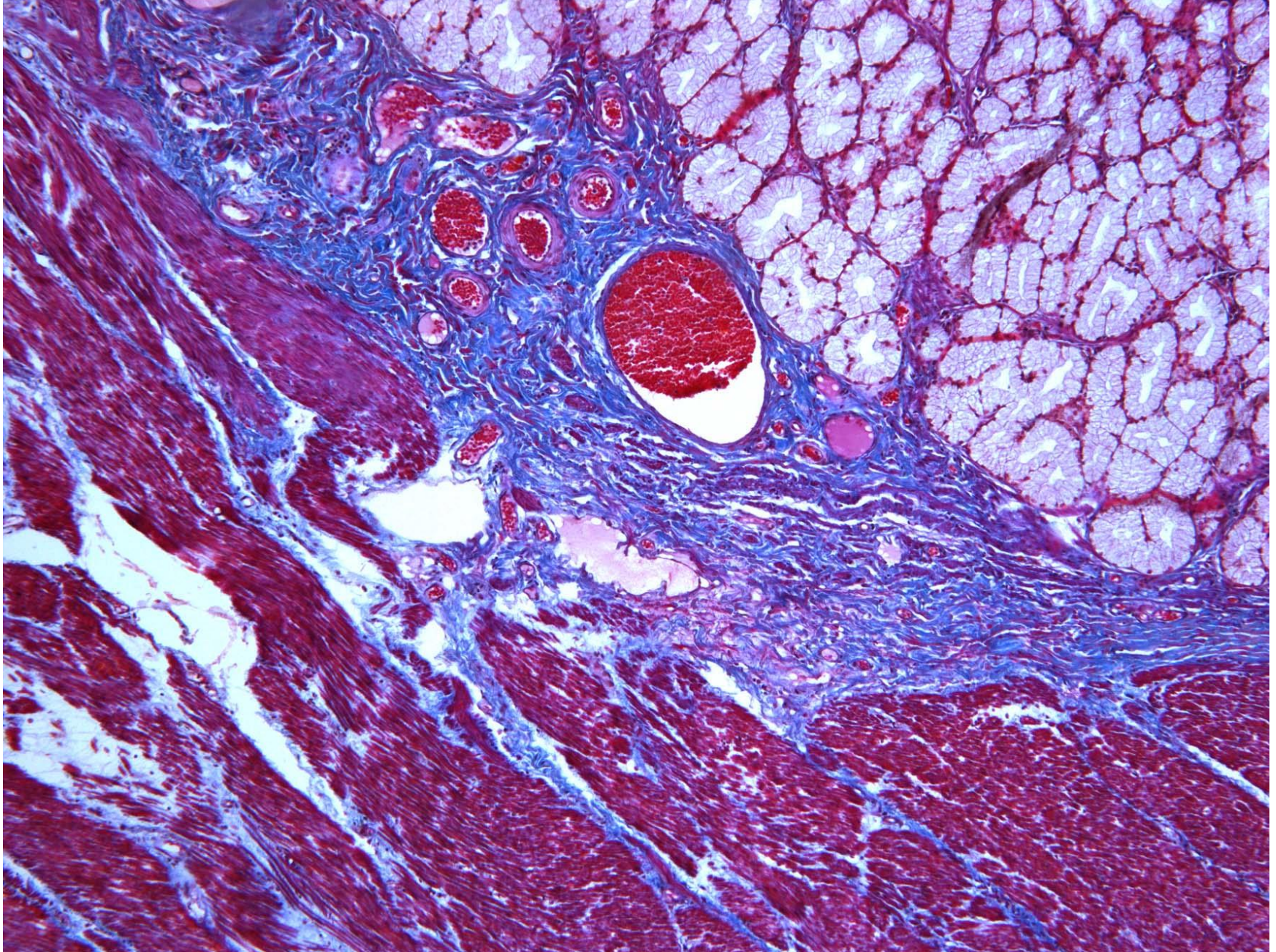


DALŠÍ PŘÍKLADY PŘEHLEDNÝCH BARVENÍ

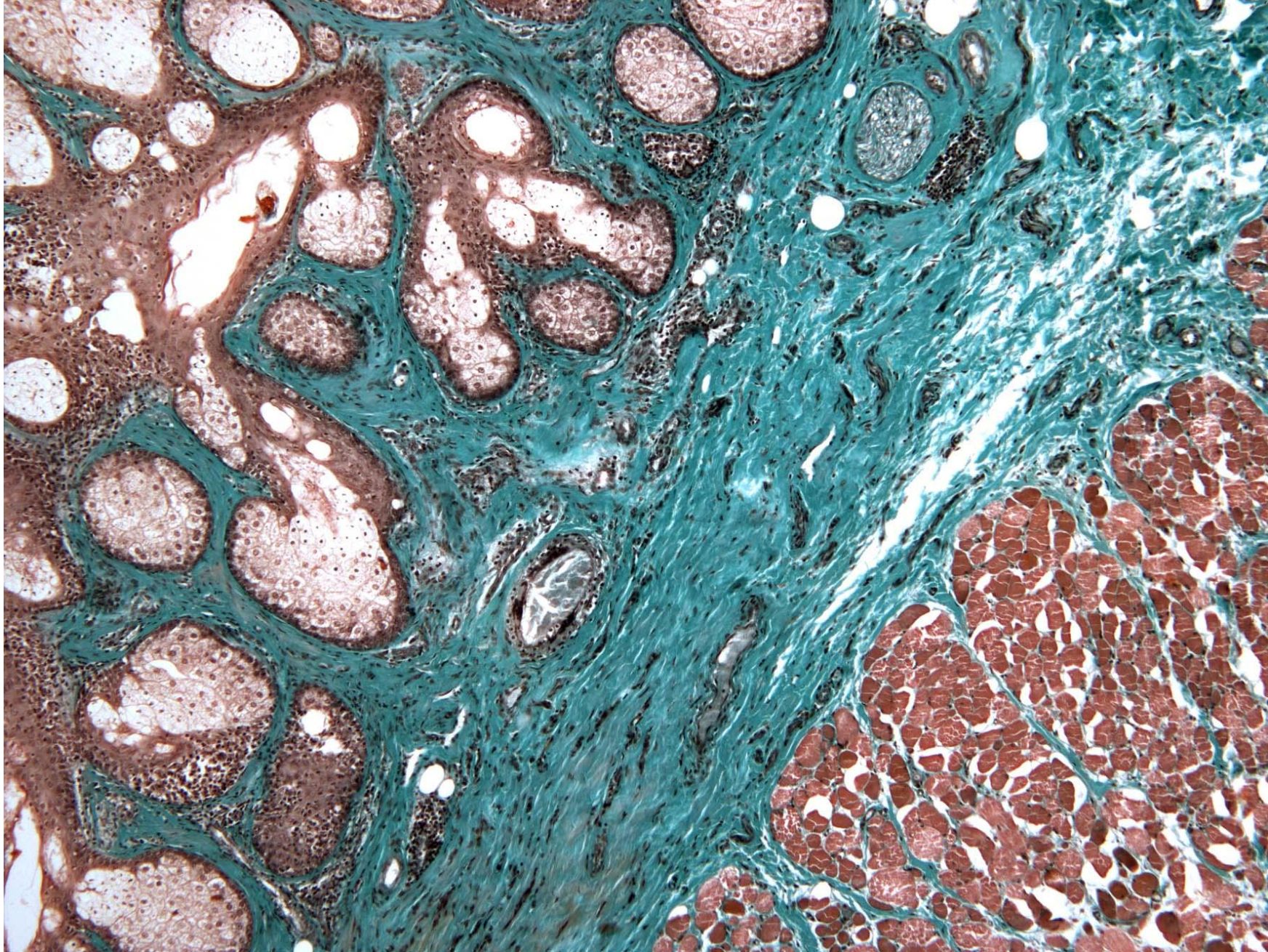
Weigert - van Gieson	železitý hematoxylin + kyselý fuchsin + kyselina pikrová	jádra hnědá, kolagen červený, svalovina žlutá
Massonovy trichromy -žlutý	hematoxylin + erythrosin + šafrán	jádra modrá, kolagen žlutý, svalovina červená
-modrý	železitý hematoxylin + kyselý fuchsin + anilinová modř	jádra hnědá 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



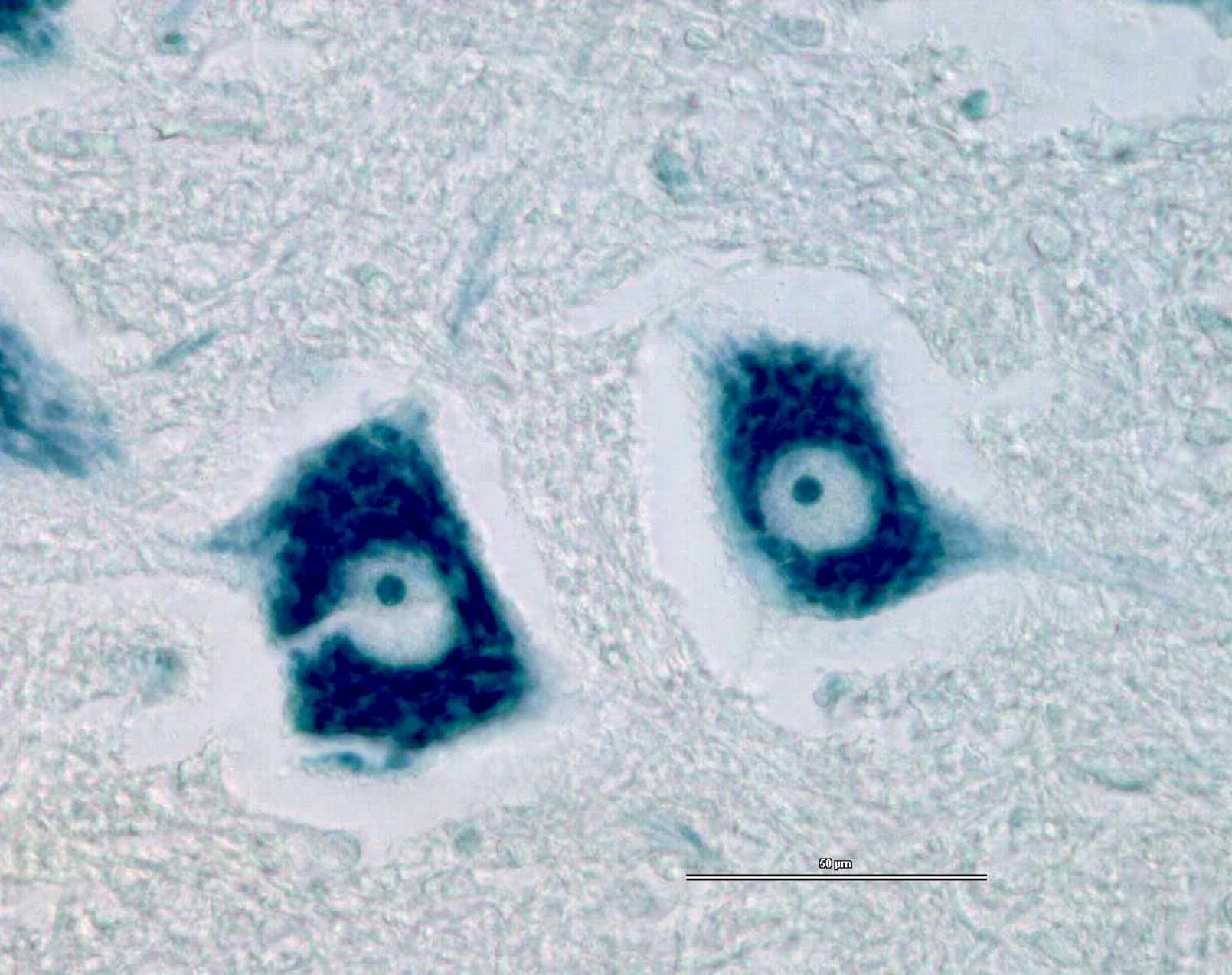
modrý trichrom



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



toluidinová modř

Nisslova substance

PŘÍKLADY SELEKTIVNÍCH BARVENÍ

elastika - orcein, aldehydfuchsin, resorcin-fuchsin

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

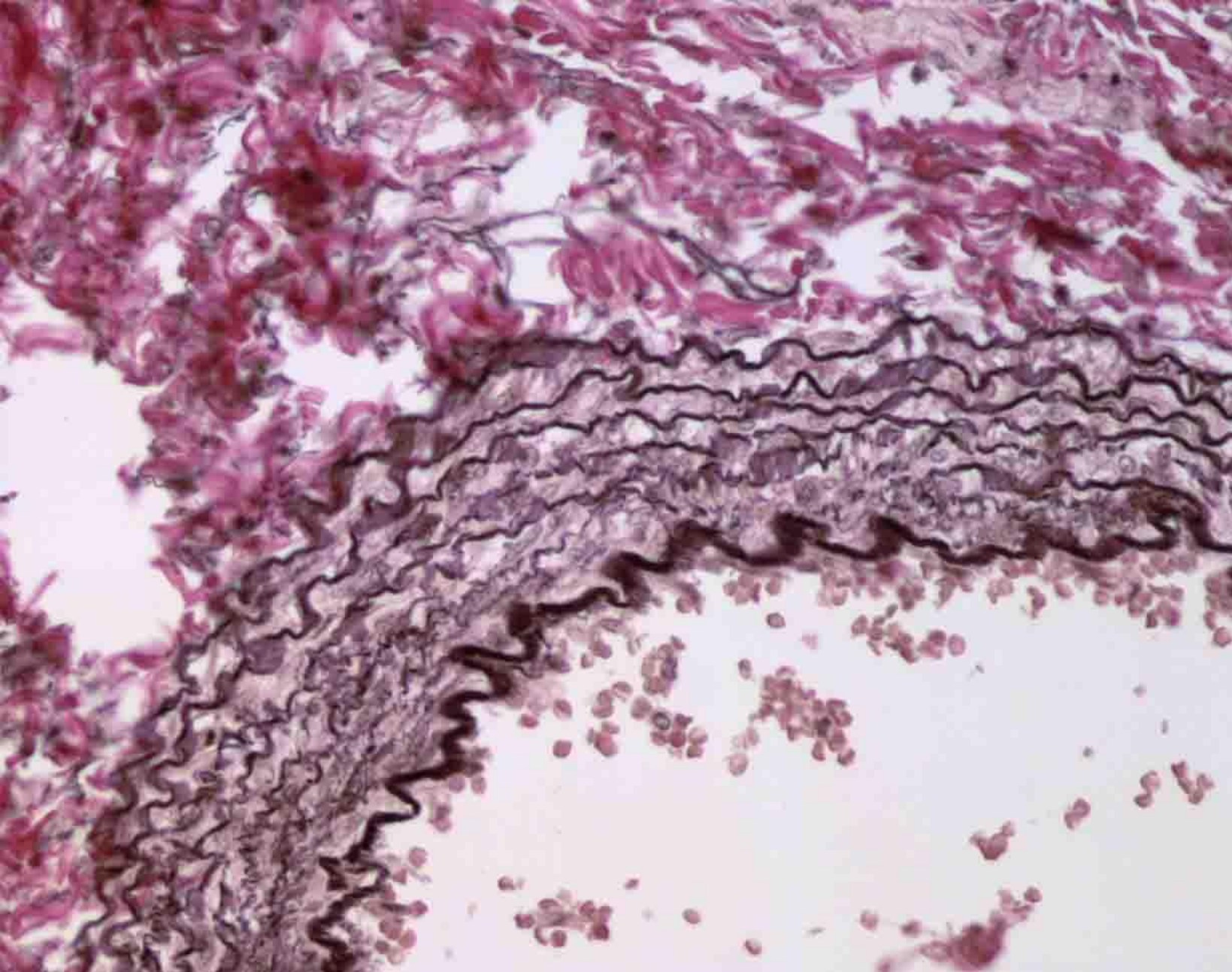
neutrální tuky - olejová červeň O, Sudan černý B, Sudan III, šarlach – je
třeba se vyhnout použití rozpustidel (zmrazené řezy)

myelin (fosfolipidy) - luxolová modř, Spielmeyerův hematoxylin

amyloid - kongo červeň, metylviolet, saturnová červeň

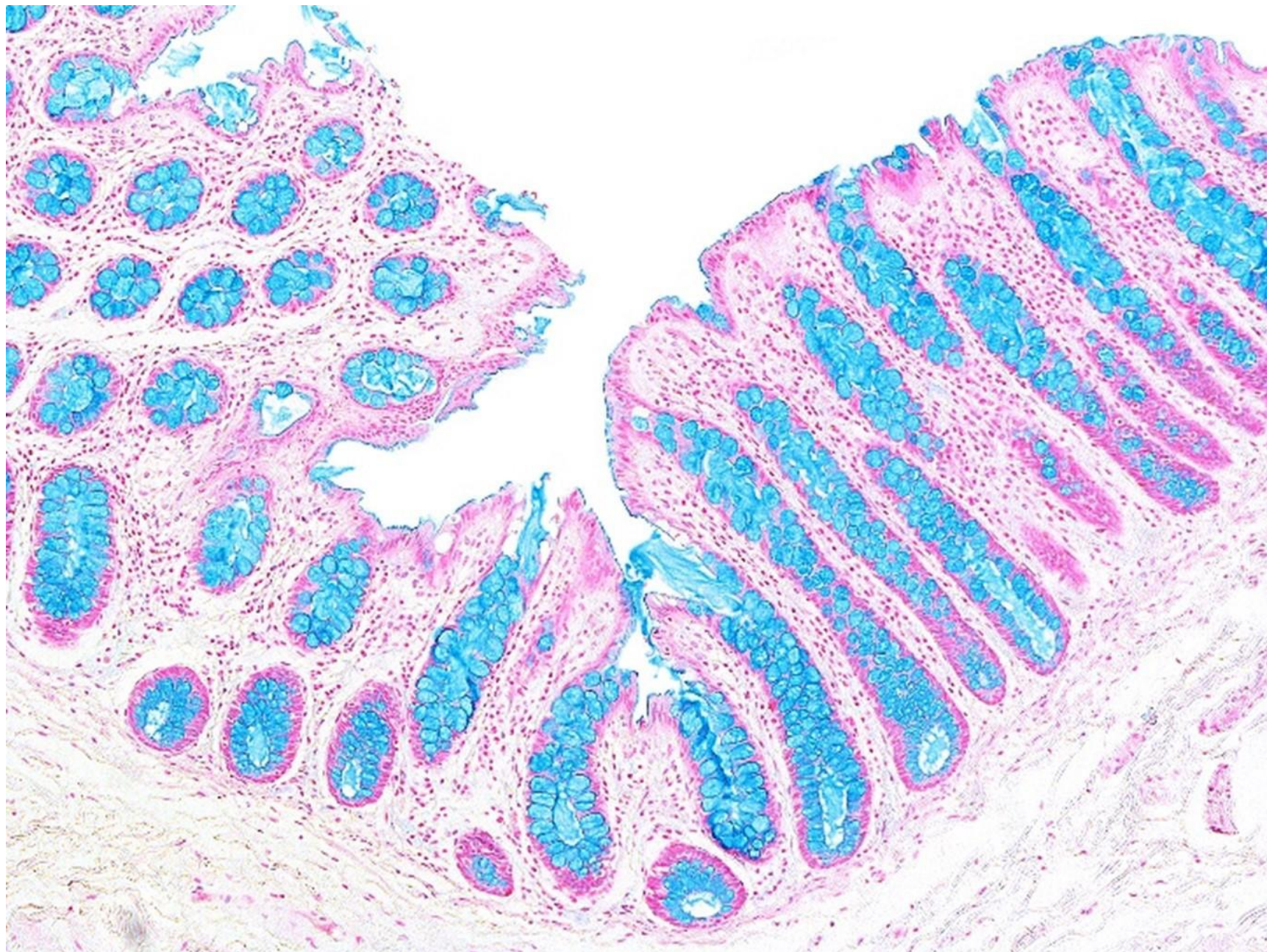
fibrin - Weigertovo barvení

a další ...



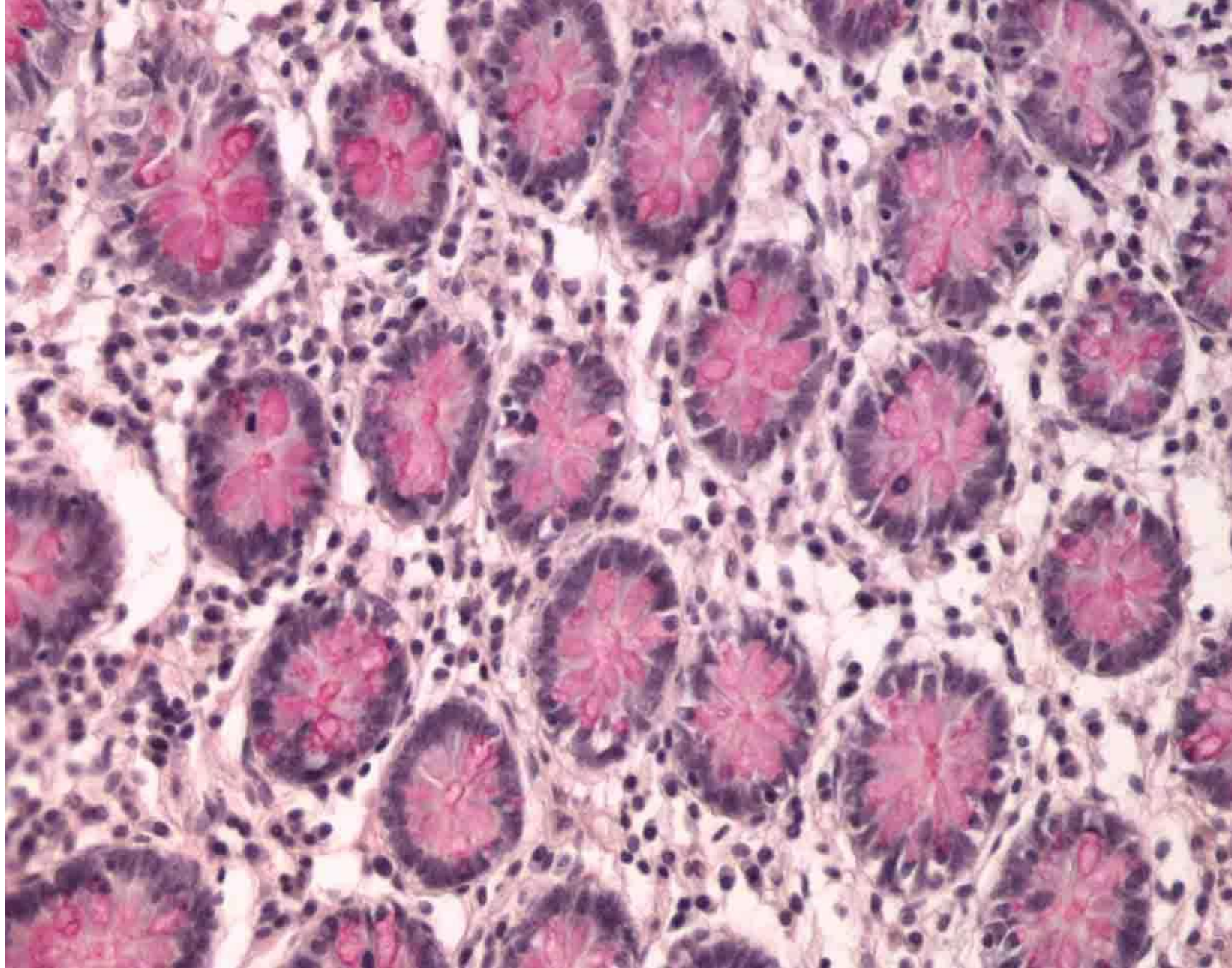
resorcin-fuchsin

elastika



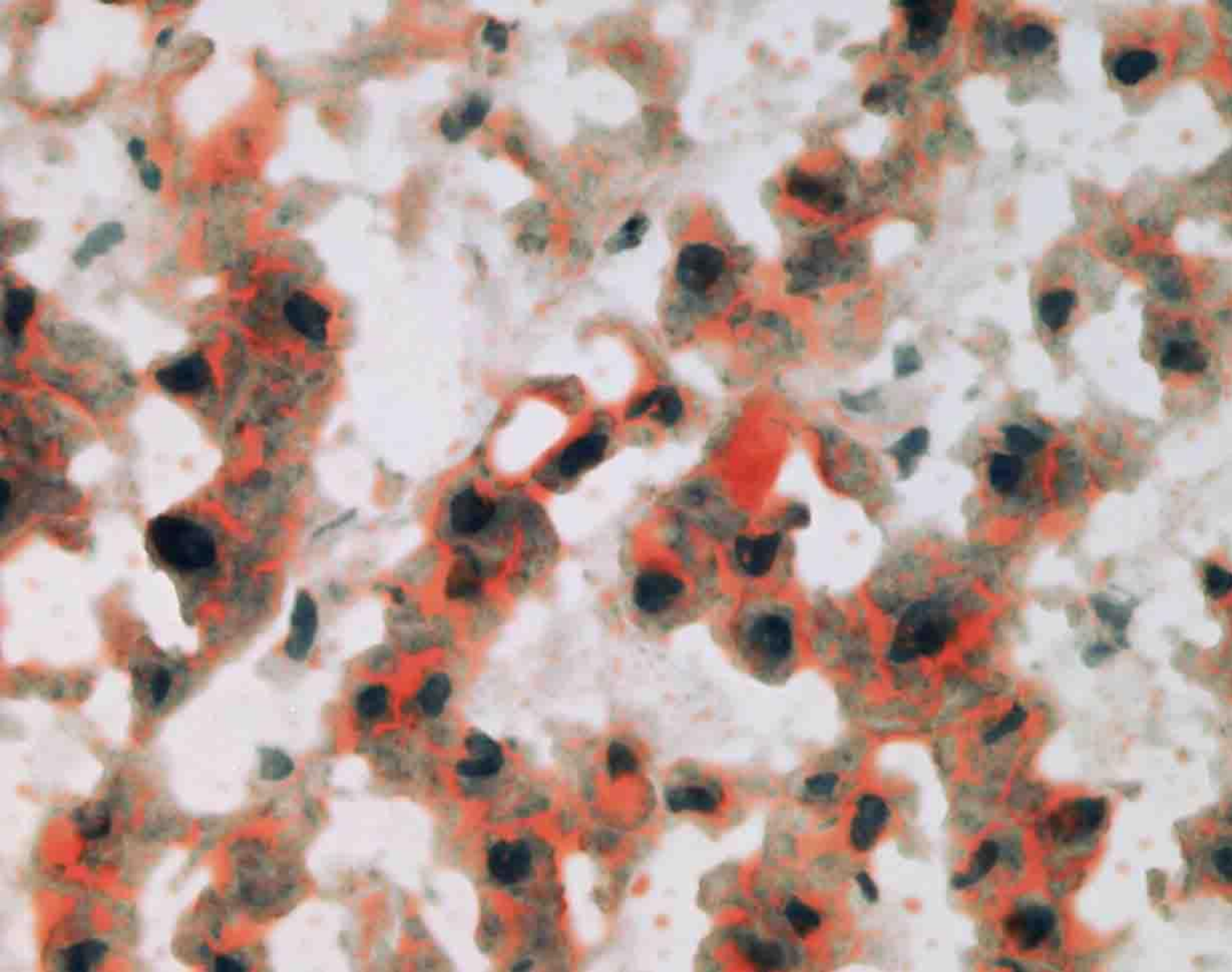
alciánová modř pH 2,5

kysele mukopolysacharidy



mucikarmín

muciny



olejová červeň O

neutrální lipidy

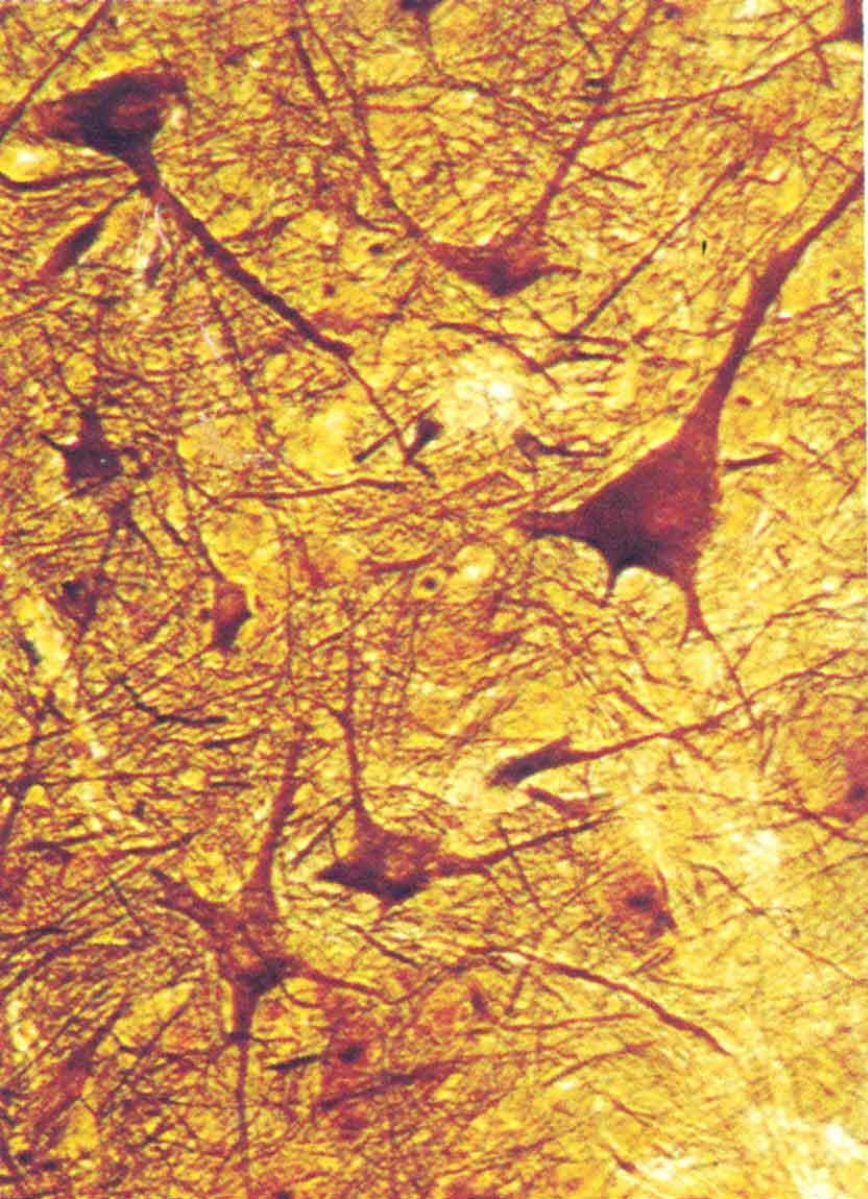
PŘÍKLADY IMPREGNACE

Gömöri, Foot retikulární vlákna

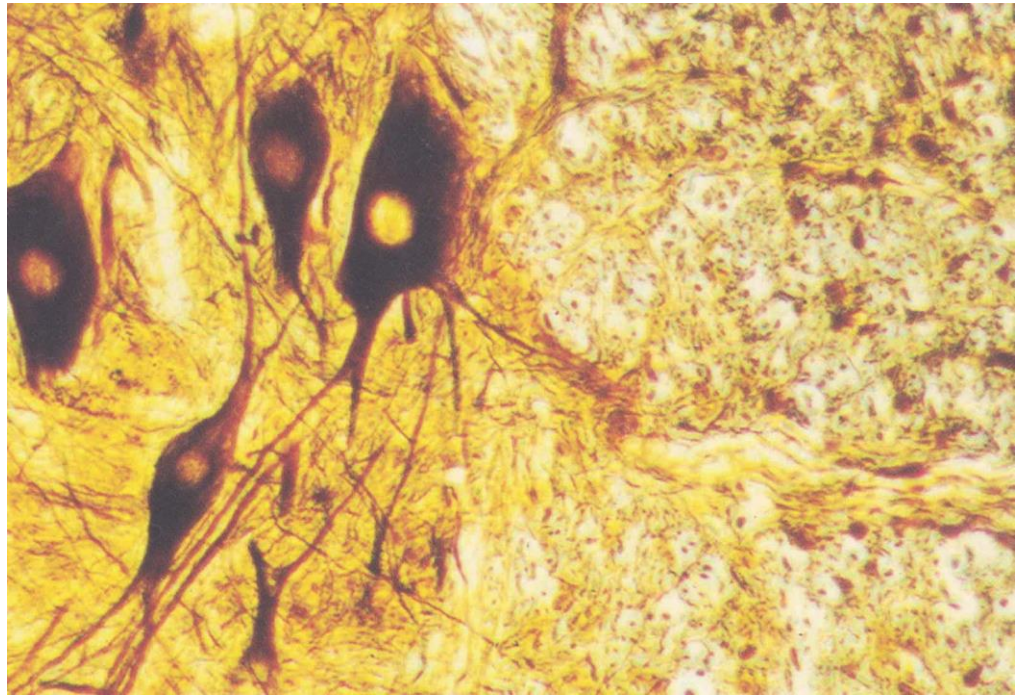
Hortega, Cajal astrocyty
Penfield oligodendrocyty
Bielschowski nervová vlákna

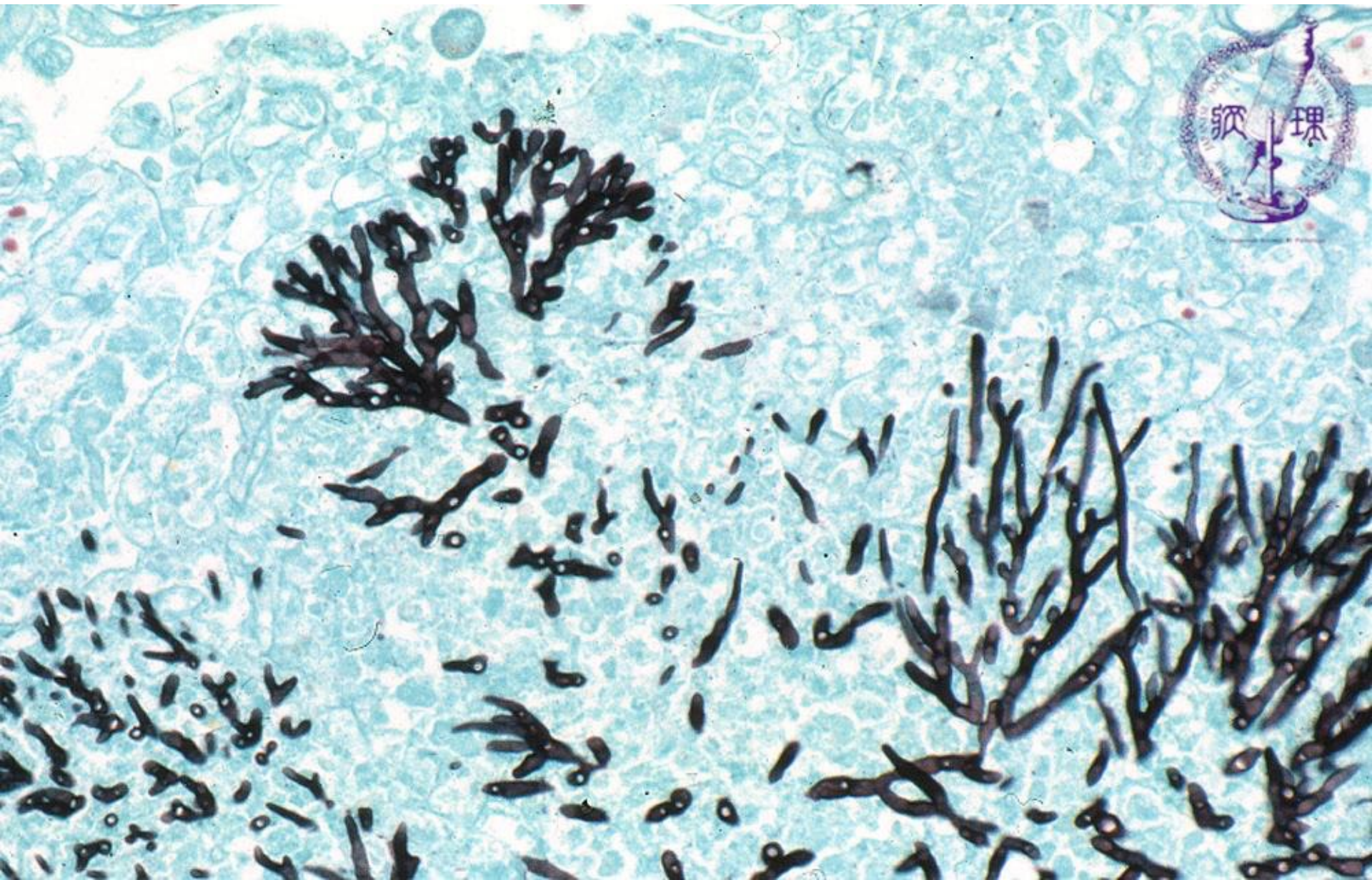
Grimelius buňky DNES

Grocott hyfy plísni



impregnace neuronů





Mykóza (kolonie Aspergila)- Grocott

MONTOVÁNÍ

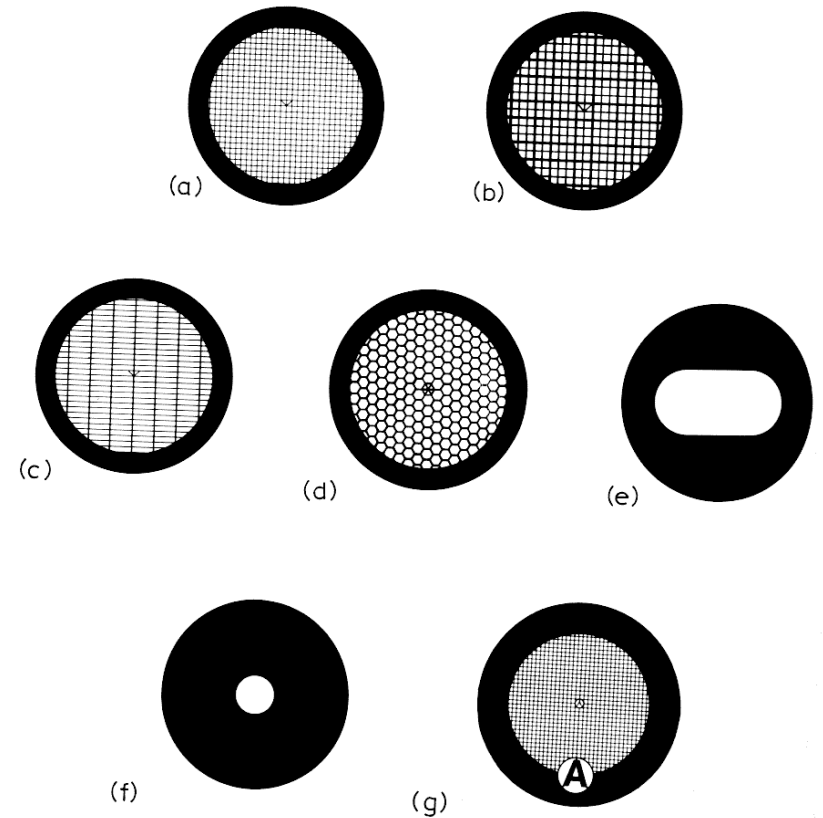
- krycí skla



- montovací média rozpustná v xylenu
 - akrylátové pryskyřice (solakryl BMX)
 - kanadský balzám
- montovací média rozpustná ve vodě
 - glycerol-želatina
 - glycerol



TEM - síťky



- 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



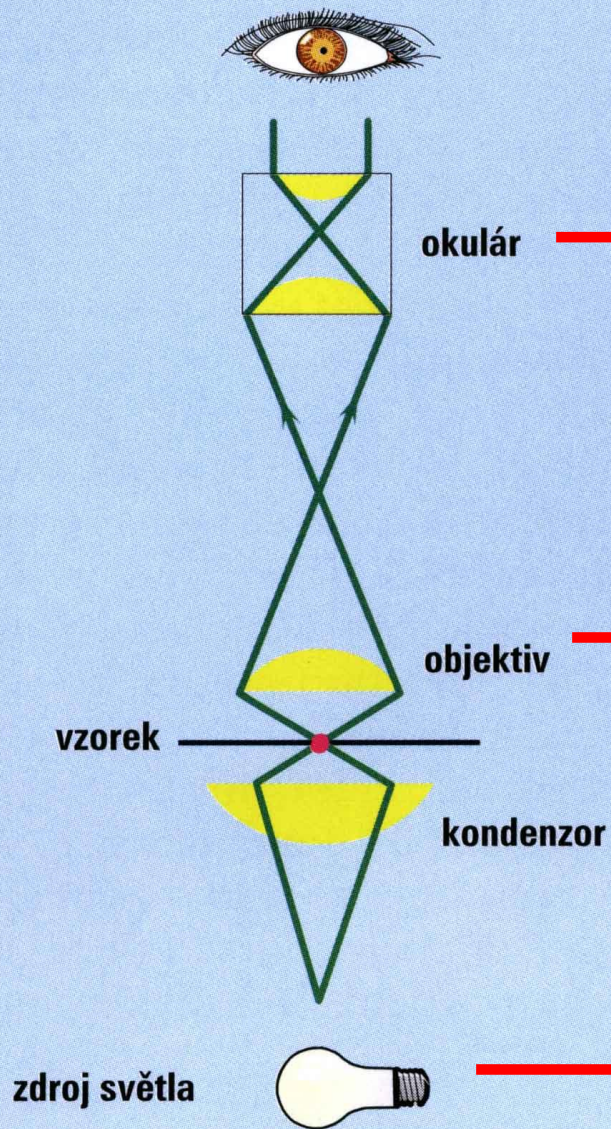


elektronově
densní

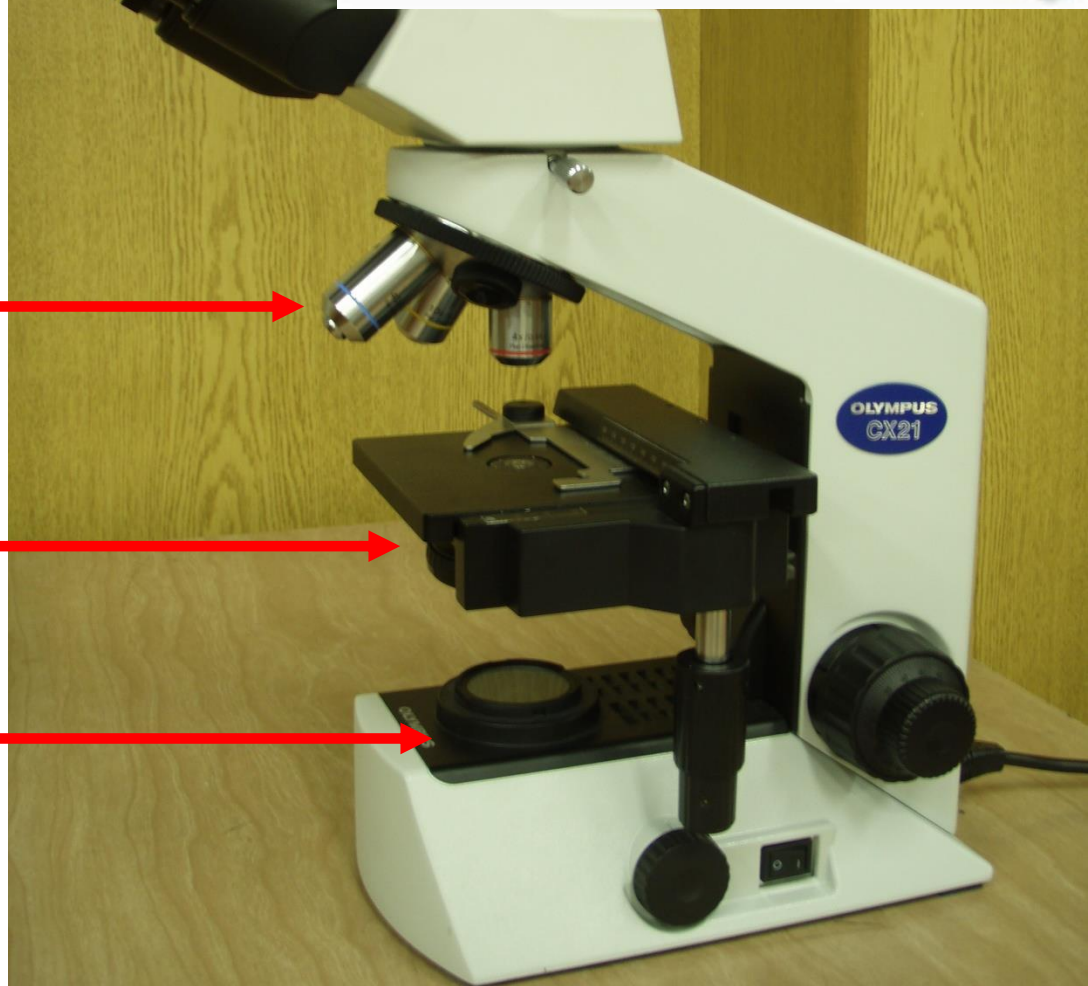
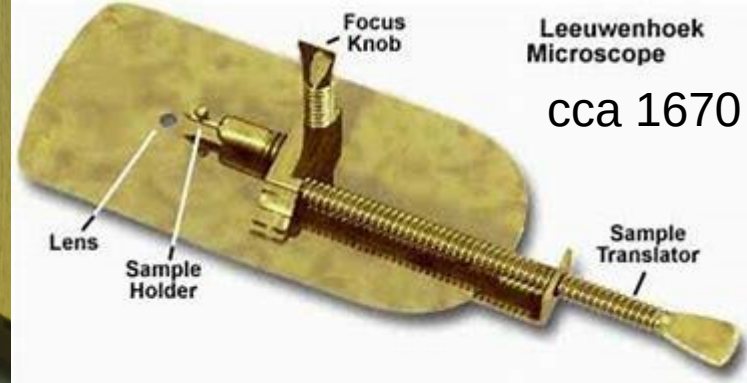
elektronově
lucentní

POZOROVÁNÍ

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



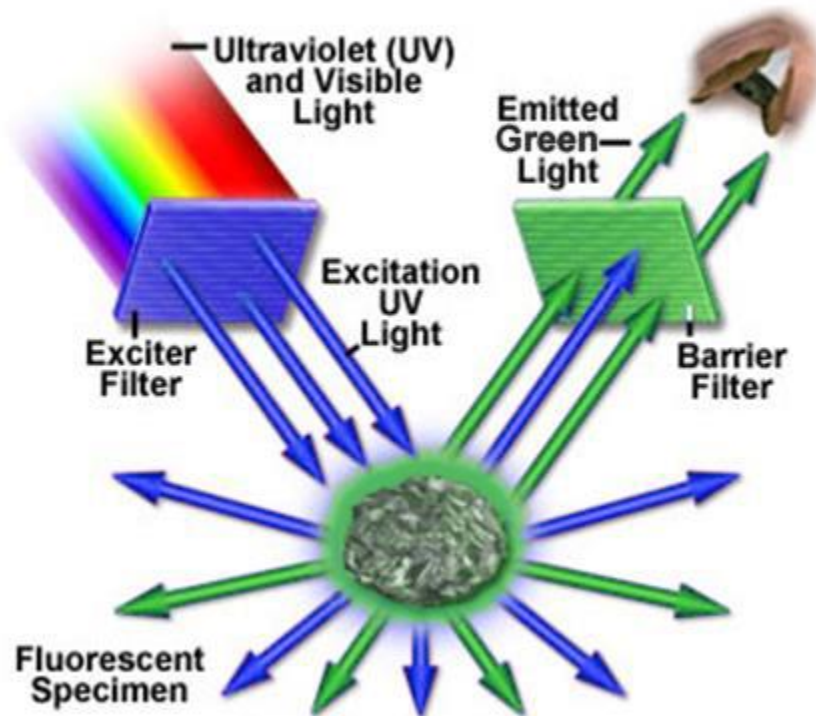
Prozařovací světelný mikroskop

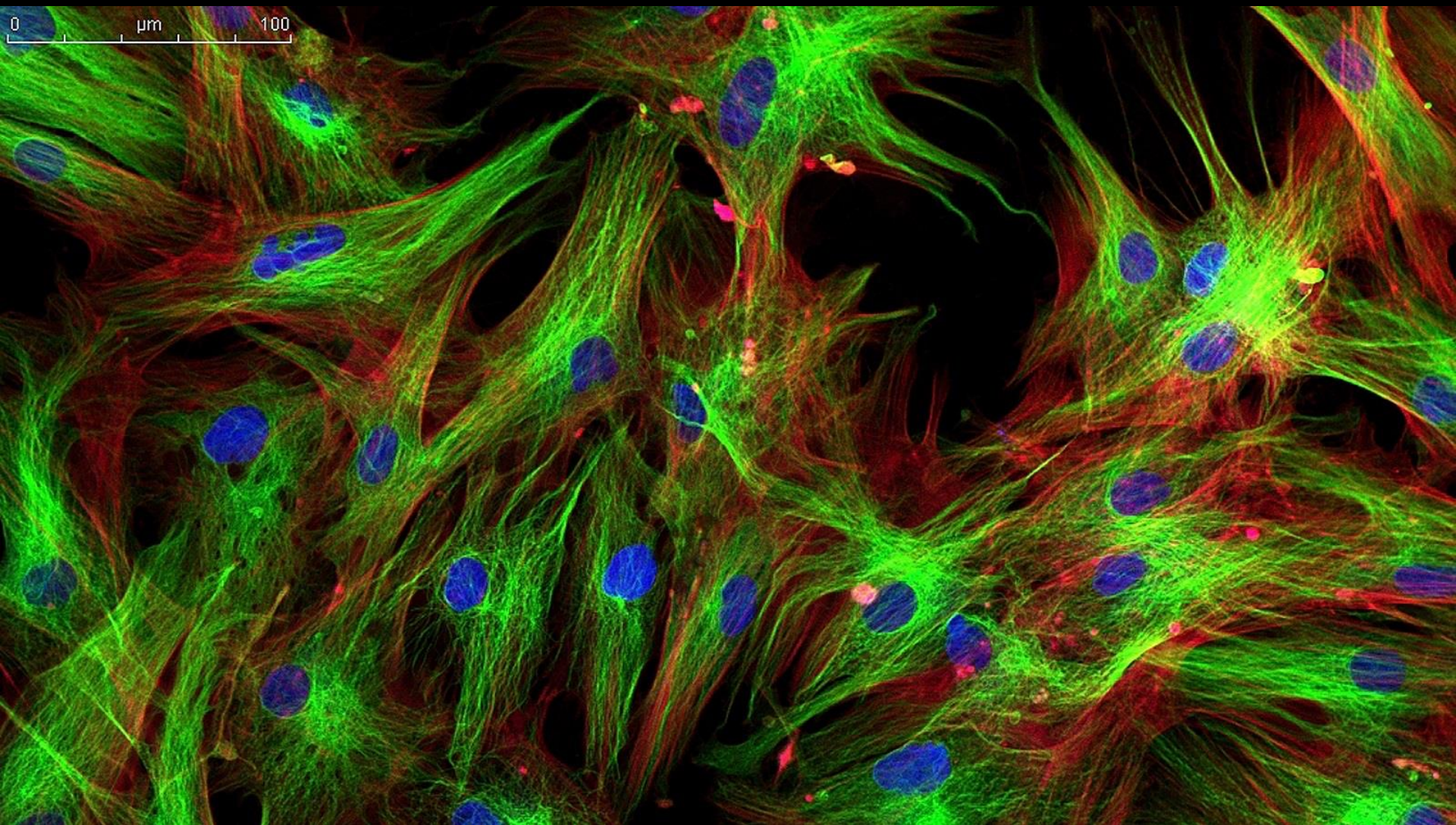


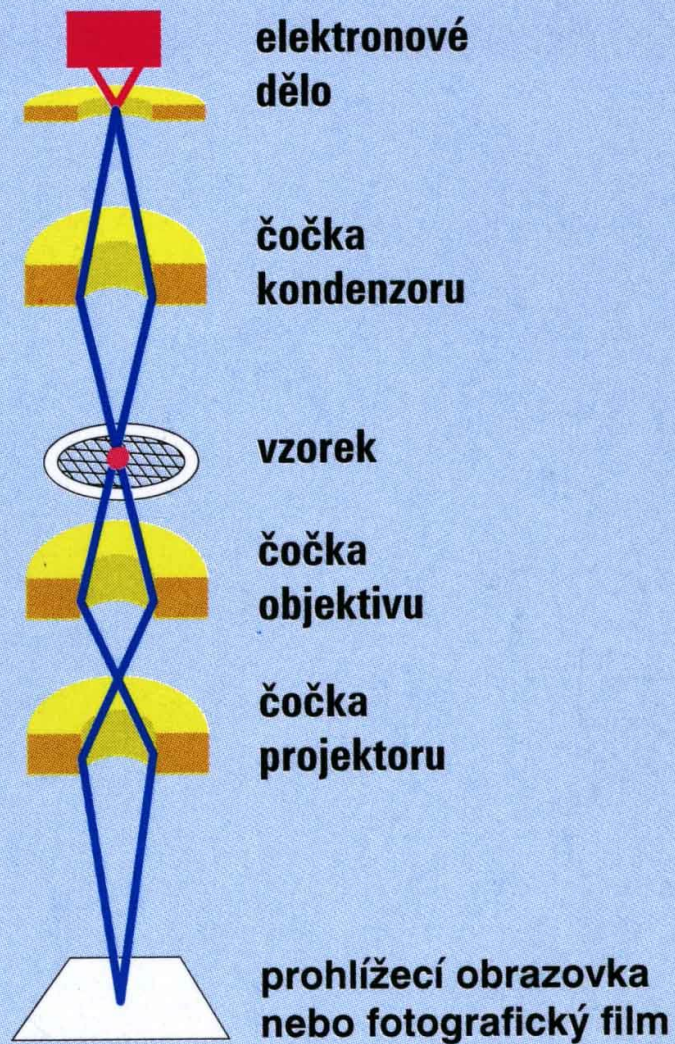
Fluorescenční mikroskopie

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

Principle of Fluorescence

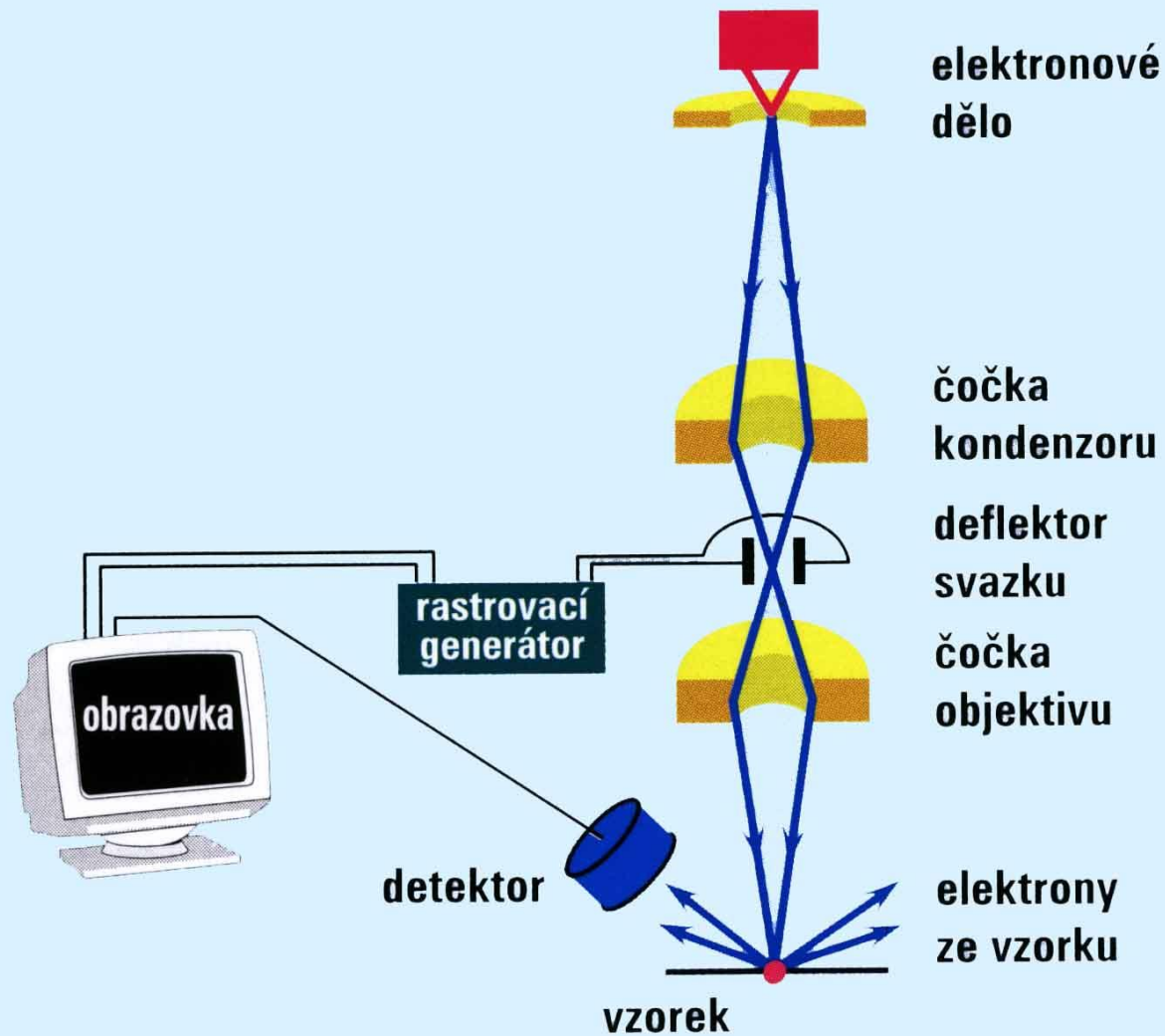






Transmisní (prozařovací) elektronový mikroskop (TEM)

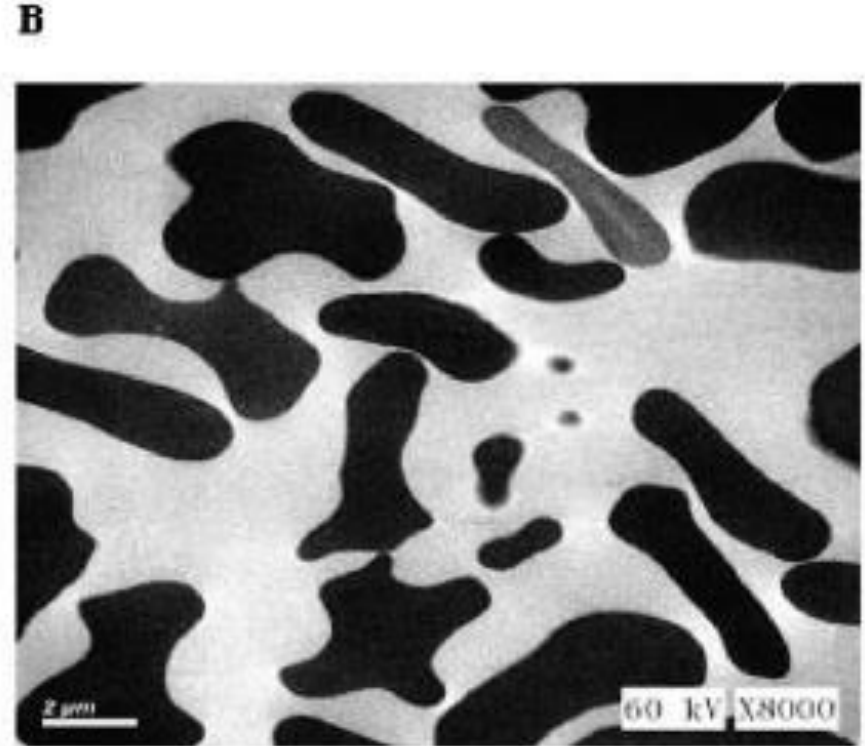
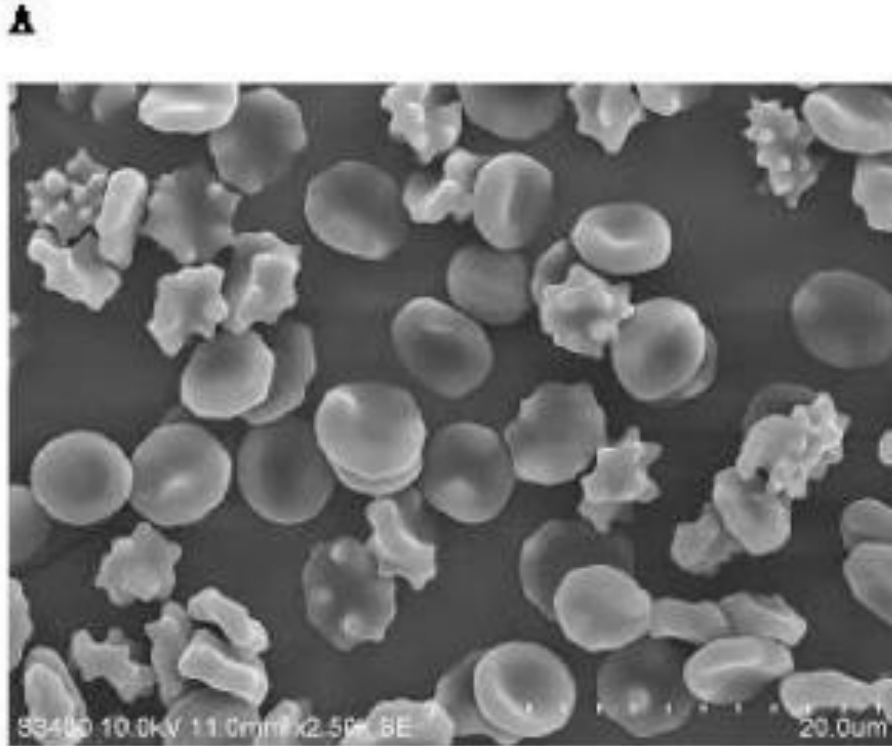




**Rastrující
elektronový mikroskop (SEM)**

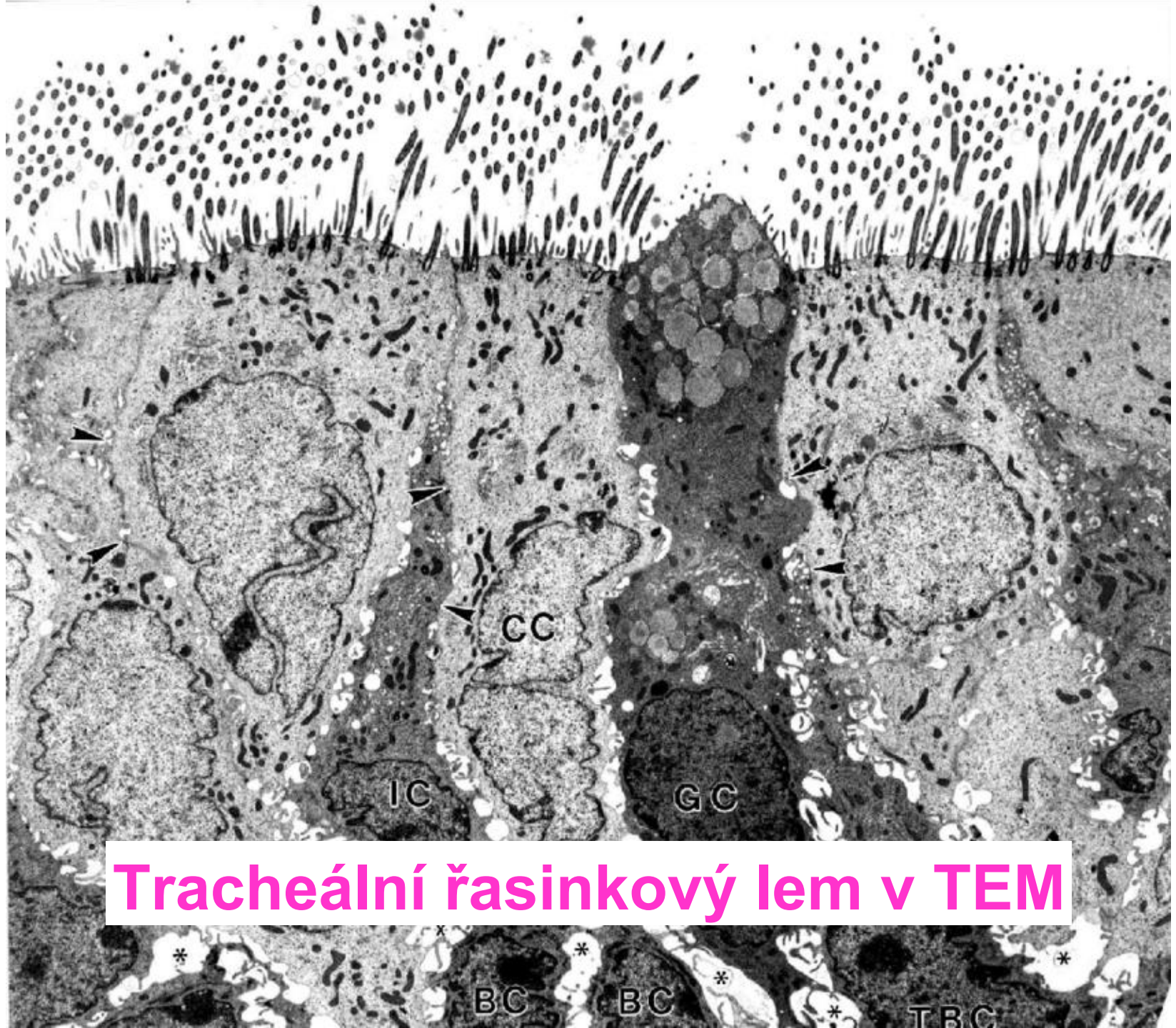
SEM

TEM



Tracheální řasinkový lem v SEM





Tracheální řasinkový lem v TEM

HISTOCHEMIE

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

1/ Konvenční histochemie

detekce - prvků (iontů)

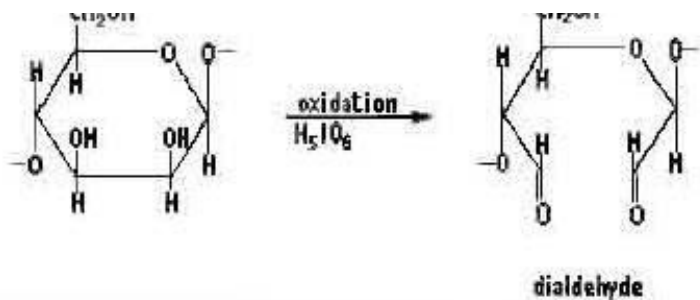
- nukleových kyselin
- lipidů
- sacharidů
- pigmentů
- proteinů (aminokyselin) – dnes neobvyklé,
nahrazeno imunohistochemickými metodami

2/ Katalytická (enzymová) histochemie – detekce enzymů

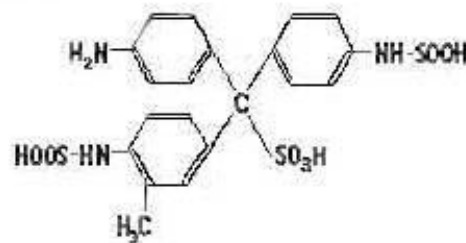
PAS reakce (periodic acid – Schiff)

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

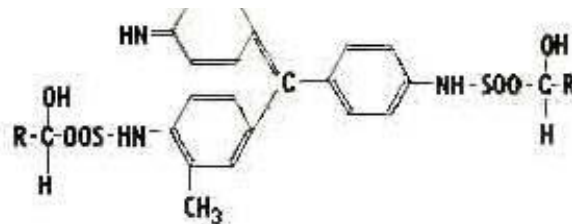
1 oxidace sousedních (vicinálních)
volných glykolových skupin kyselinou
jodistou
(**Malapradeho reakce**)



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

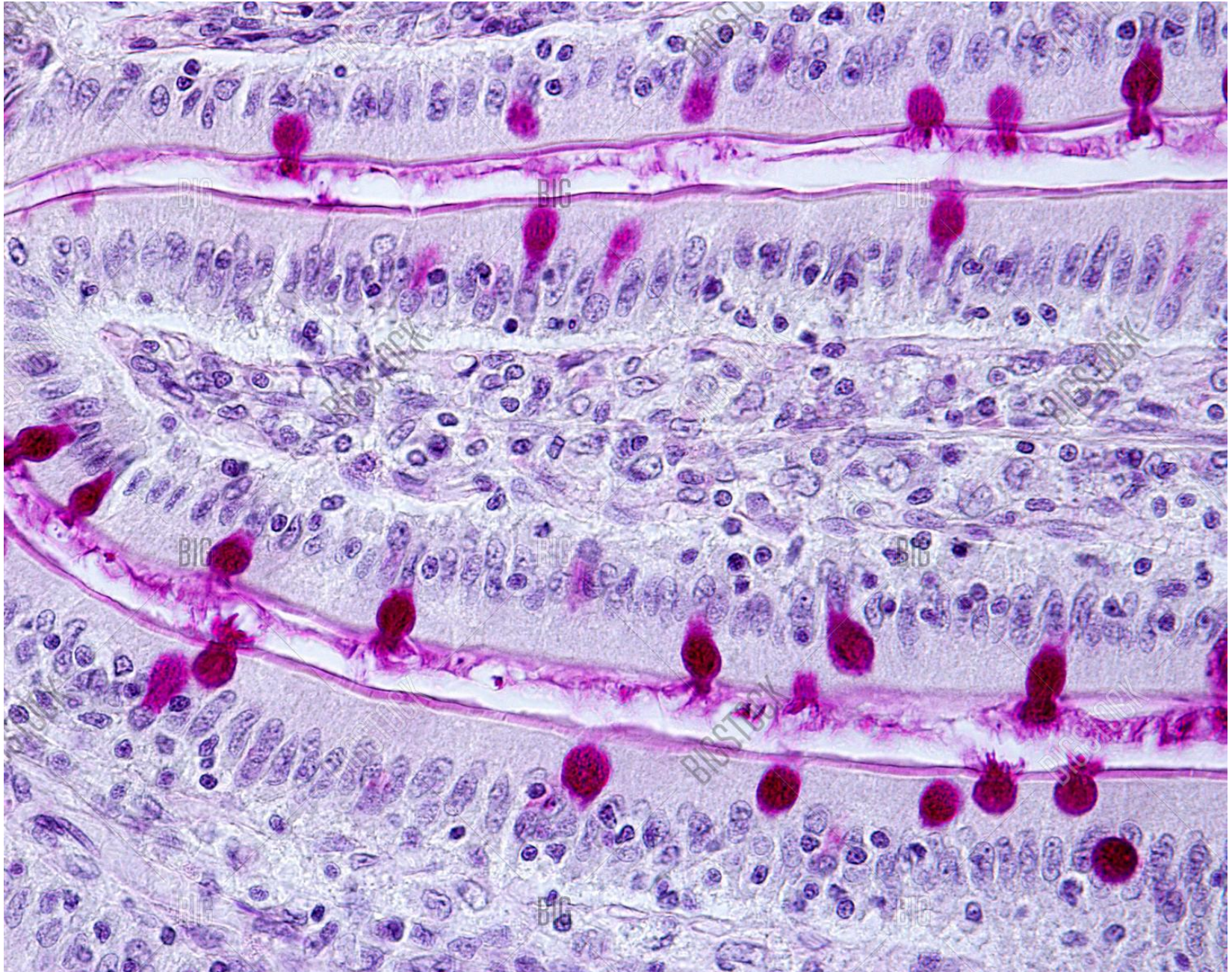


po reakci s aldehydy vzniká nová **červenofialová**
sloučenina



PAS reakce

neutrální muciny



IMUNOHISTOCHEMIE

1/ Vazba protilátky na antigen

2/ Zviditelnění (vizualizace) této vazby

