

Jihočeská univerzita České Budějovice
Zdravotně sociální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jihočeská univerzita České Budějovice
Zdravotně sociální fakulta

Tvorba histologických preparátů

Bakalářská práce

Veronika Janů

Vedoucí práce: Mgr.Pavol Szabo

Abstrakt:

Tato práce se zabývá technologií tvorby histologických preparátů a jejich vyhodnocováním. Na 40 stranách popisuje podrobně tvorbu histologických preparátů, které jsou rozděleny podle jednotlivých druhů tkání a způsobu jejich barvení. Celkem bylo zpracováno 30 preparátů lidských tkání konkrétně játra, tenké střevo, tlusté střevo, ledvina, plíce, srdce, slezina, lymfatická uzlina, mozek, mozeček, nadledvina, kůže. Všechny tkáně jsou obarveny stejným barvením Hematoxylin-eosin spolu s dalšími specifickými barvenými pro danou tkáň, jako je například barvení kolagenních vláken, barvení železa, barvení elastických vláken, barvení polysacharidů, impregnace retikulárních vláken a další. Všechny preparáty byly elektronicky zpracovány a jsou uvedeny v grafické podobě v příloze této práce a podrobně popsány a zhodnoceny v kapitole výsledky. Při popisování byl hodnocen zejména vztah tkáně k použitým druhům barvení.

Abstract:

This thesis deals with the preparation of histological sections and their evaluation. It describes in detail the preparation of histological sections, which are divided by the type of tissue and the method of staining. In total, 30 sections were processed; they were human tissues, including liver, small intestine, colon, kidney, lung, heart, brain and skin. All the tissues were stained with hematoxylin-eosine along with other specific staining methods for the given type of tissue, such as staining of collagen fibres, staining of iron, staining of elastic fibres, staining of polysaccharides, impregnation of reticular fibres and more. The sections were processed electronically and they are presented in a graphical form in the annex to the thesis. The chapter with the results contains their detailed description and evaluation based on the staining method used on each of the histological sections.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Tvorba histologických preparátů“ vypracovala samostatně a použila jsem jen pramenů, které cituji v přiložené bibliografii.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezměněné podobě, fakultou elektronickou cestou, ve veřejně přístupné části databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích, na jejích internetových stránkách.

Souhlasím s použitím práce k vědeckým účelům.

V Českých Budějovicích

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce panu magistru Szabovi za ochotu a pomoc při vedení mé práce. Dále pak děkuji panu primáři Pelikánovi za odbornou pomoc při fotografování a popisování preparátů a také celému oddělení patologie Jindřichův Hradec zejména vedoucí laborantce paní Simonidesové, která mi po celou dobu zpracovávání preparátů ochotně pomáhala.

Úvod	8
1 Současný stav problematiky	9
1.1 Histologické laboratoře a jejich rozdělení	9
1.2 Využití moderních technologií pro přípravu vzorků	9
1.3 Historie	10
1.4 Kvalitativní zpracování preparátu	10
1.5 Kvantitativní zpracování preparátu	10
2 Cíl práce	11
3 Metodika	12
3.1 Způsob odběru materiálu	12
3.2 Fixace tkáně	13
3.2.1 Pojem a účel fixace	13
3.2.2 Fixační prostředky	13
3.2.3 Metodika fixace	13
3.3 Zalévání do parafínu	14
3.4 Krájení tkáňových bločků	16
3.4.1 Metodika krájení tkáňových bločků	17
3.5 Odparafinování preparátů	18
3.6 Barvení	18
3.6.1 Hematoxylin – Eosin	19
3.6.2 Van Gieson	20
3.6.3 PAS reakce	21
3.6.4 Barvení alcianovou modří - ALC	22
3.6.5 Barvení hlenu	23
3.6.6 Barvení pro průkaz kolagenního vaziva	23
3.6.7 Barvení Weigertovým Resorcin fuchsinem	24
3.6.8 Průkaz železa	25
3.6.9 Průkaz retikulárních vláken	26
3.6.10 Barvení pro průkaz acidorezistentních bakterií	27
3.7 Montování	28
3.7.1 Postup při montování preparátů	28

4	Výsledky.....	29
4.1	Popis jednotlivých preparátů.....	29
4.1.1	Játra	29
4.1.2	Tenké střevo	29
4.1.3	Tlusté střevo	29
4.1.4	Ledvina.....	30
4.1.5	Plíce.....	30
4.1.6	Srdce.....	30
4.1.7	Slezina	31
4.1.8	Lymfatická uzlina.....	31
4.1.9	Mozek.....	31
4.1.10	Mozeček	32
4.1.11	Nadledvina	32
4.1.12	Kůže	32
4.2	Možné chyby při zpracování preparátů.....	33
4.2.1	Chyby při fixaci.....	33
4.2.2	Chyby při zalévání	33
4.2.3	Chyby při krájení.....	34
4.2.4	Chyby při barvení.....	34
4.2.5	Chyby při montování.....	34
5	Diskuze a závěr	36
	Vysvětlení pojmů	38
	Seznam literatury.....	40
	Klíčová slova.....	43
	Přílohy	44

Úvod

Tvorba histologických preparátů je úzce spjata se samotnou histologií, nauce o mikroskopické skladbě organismu. Rozvoj histologie se pojí s vynálezem mikroskopu, který byl vynalezen mezi 16.-17. stoletím Hansem Janssenem. Postupné poznávání mikroskopické stavby organismů bylo vázáno nejen na stálé zdokonalování mikroskopu, ale i na rozvoj histologické techniky.

Histologické preparáty jsou v dnešní době jedním ze základních zdrojů informací nejen pro lékaře, ale i pro vědecké pracovníky. Smyslem histologických preparátů je prozkoumat odebranou tkáň a určit podle charakteristických změn povahu onemocnění. Mikroskopické vyšetření zobrazuje strukturu tkáně a buňky, které ji tvoří. Dokáže odhalit změny vyvolané zánětem a abnormální typy buněk v nádorech. Tehdy je z preparátu dokonce možné vyčíst závažnost a prognózu onemocnění.

Pro výrobu histologických preparátů se používají různé techniky. Nejzákladnější z nich je metoda barvení, kterou se budu podrobně zabývat v této práci.

Téma této práce jsem si zvolila proto, že jsem přesvědčena, že se tímto tématem v současnosti nezabývá dostatečný počet publikací, případně jsou tyto publikace zastaralé. Existuje sice značné množství histologických atlasů, ty jsou však pro potřeby výuky laborantů naprosto nevhodné, protože jejich primárním účelem je ve většině případů výuka lékařů. Pro zdravotní laboranty, jsou tedy tyto knihy zbytečně rozsáhlé a jejich součástí není popis histologické techniky a její vztah k zobrazovaným preparátům.

1 Současný stav problematiky

Histologické preparáty jsou mikroskopické preparáty, které slouží ke studiu tkání a jejich patologických změn. V optickém mikroskopu je preparát pozorován nejčastěji metodou procházejícího světla. To vyžaduje, aby byl pozorovaný předmět především dostatečně tenký a průsvitný. Výroba takového preparátu není jednoduchá, vyžaduje přesné dodržení metodiky, kterou podrobně popisují v rámci této práce.

1.1 Histologické laboratoře a jejich rozdělení

Histologické preparáty vyrábí laborant v histologické laboratoři. Taková laboratoř je ze zákona rozdělena na dvě části:

- **Bioptická**
- **Nekroptická**

Část laboratoře, kterou nazýváme **bioptickou** zpracovává vzorky získané od živých pacientů při operacích. Druhá – **nekroptická** část je místo, kde se zpracovávají vzorky získané při pitvě. Naprosto oddělenou částí provozu může být ještě soudní patologie, kde se zkoumají materiály související s trestnou činností. Tento specifický provoz podléhá zvláštním normám § 115 trestního řádu zákona č.20/1966 sb.. Histologické preparáty vytváří zdravotní laborant a po zpracování je předává lékaři. Ten následně preparát využije ke stanovení správné diagnózy. (*Junquiera et. al.,1997; Čech a Horký, 2005*)

1.2 Využití moderních technologií pro přípravu vzorků

V posledních deseti letech se začíná rozvíjet i digitální mikroskopie, která dovoluje lékařům využít přístupnost a všestrannost počítače a internetu. Digitální mikroskopie v praxi znamená, že preparát je převeden skenováním do počítače a umístěn na internet, kam mají přístup i ostatní lékaři. Ti potom mohou společně diskutovat nad preparáty a vyměňovat si své zkušenosti.

Do budoucna by se měla digitální mikroskopie začlenit například i do cytologie, hematologie a mikrobiologie. (*Koch et al., 2009*)

Neskenováním vzorků a jejich umístěním na internet je možné využívat tyto obrázky pro výuku kdekoliv a kdykoliv. (*Pinder et al., 2009*)

1.3 Historie

Jak je již zmíněno v úvodu klíčovým faktorem pro rozvoj histologie byl vynález mikroskopu, přístroje, který umožňuje pozorovat podrobnou stavbu organismu. S jeho postupným zdokonalováním až do dnešní doby a vývojem elektronového mikroskopu, bylo možné zdokonalovat histologické techniky (*Knoz a Opravilová, 1992*). Z počátku byly tyto metody velmi prosté. Histologický preparát byl například připravován roztrháním malého kousku živočišné tkáně pomocí jehel, nebo rozmělněním mezi dvěma sklíčky. Později se přistoupilo ke zhotovování tenkých řezů z požadovaných tkání. K tomuto účelu byl zkonstruován přístroj zvaný mikrotom, který umožňuje krájení na řezy o tloušťce v řádech mikrometrů. Následně se začalo stále častěji používat metodiky barvení histologických řezů různými barvami a v pozdější době i jejich kombinacemi. Dnes je tedy nejběžnější formou histologického preparátu tenký řez určitým orgánem obarvený některou z metod histologické techniky a zamontovaný mezi podložní a krycí sklíčko (*Vacek, 1996; Junquiera et. al., 1997*).

1.4 Kvalitativní zpracování preparátu

Kvalitativní zpracování histologických preparátů je zaměřeno na to, co v jednotlivých vzorcích lze prokázat pomocí různých barvení. Například : ve tkáni kde je podezření na krvácení, lze použít barvení pro průkaz železa. Železo se pomocí speciálního barvení na železo barví modře. Po obarvení vzorku tedy lze říci, zda trojmocné železo obsahuje či nikoli a tím pádem zda došlo ke krvácení nebo ne. Další běžnou praxí je například barvení řezů z trávicího ústrojí na hlen, pro jeho lepší znázornění a přehlednost celého preparátu.

Kvalitativnímu zpracování vzorku se podrobně věnuji v kapitole 3 této práce.

1.5 Kvantitativní zpracování preparátu

Histologické preparáty je možné zpracovávat i kvantitativně. Vývoj kvantitativních metod v mikroskopických oborech se z velké části kryje s vývojem stereologie. Jde v podstatě o kvantitativní hodnocení trojrozměrných objektů na základě studia jejich dvojrozměrných řezů či výbrusů. Přestože záběr moderní stereologie je v současnosti širší, nepoužívá se dnes v běžných histologických laboratořích a zůstává i nadále výsadou výzkumných pracovišť. (*Tonar, 2008*)

Tato práce se však bude nadále zabývat pouze kvalitativním zpracováním preparátů.

2 Cíl práce

Cílem této práce je vytvořit sbírku histologických preparátů lidských tkání. A preparáty obarvit tak, aby na každém z nich vyniklo to co je pro danou tkáň specifické. To bude provedeno pomocí k tomu určených speciálních barvení. Tato sbírka bude sloužit pro vzdělávání zdravotních laborantů a pro zaškolení nových pracovníků v histologické laboratoři. Často se totiž stává, že laborant sice ví s jakou tkání pracuje ale v mikroskopu ji nedokáže blíže popsat.

1. Vytvořit sbírku histologických preparátů z tkání se kterými se laborant nejčastěji setkává v laboratoři. Bude použit materiál biotický i nekroptický podle povahy tkáně.
2. Vytvořené preparáty budou vyfoceny pomocí speciálního mikroskopu Leica DM 750 s integrovanou kamerou Leica IC 50HD a převedeny tak do digitální podoby. Na preparátech bude srozumitelně popsána struktura tkáně ve vztahu k danému barvení, aby tato sbírka mohla sloužit k výuce zdravotních laborantů.

3 Metodika

3.1 Způsob odběru materiálu

Odběr materiálu provádí lékař na příslušném oddělení v nemocnici.

- **Excize**
Vyříznutá tkáň, může se jednat o pihu, kožní tumorek.
- **Punkce**
Souvislý váleček tkáně, nejčastěji z prsu nebo prostaty.
- **Kyretáž**
Materiál seškrabaný kyretáží lžičkou
- **Odběr celých orgánů nebo jejich částí**

Po té, co lékař odebere tkáň musí ji ihned uložit do sterilní nádoby viz obr.1 s dostatečným množstvím fixační tekutiny a odeslat na histologické oddělení.



Obr. 1: sterilní nádoby na odebraný materiál

(zdroj: autor)

3.2 Fixace tkáně

3.2.1 Pojem a účel fixace

Fixace je rychlé vysrážení bílkovin, neboli denaturace, za pomoci fixačních prostředků. Fixace má zabránit samovolnému rozkladu tkáně tzv. **autolýze**. K autolýze dochází působením enzymů a vede k úplnému rozkladu buněk a tkání. Fixace musí být nejen rychlá, ale zároveň i šetrná, aby nedošlo k poškození struktury tkáně. Při fixaci však vždy dochází ke změnám struktury oproti struktuře jakou měla tkáň za živa. Aby tyto změny byly co nejnižší je za potřeby používat co nejkvalitnější fixační prostředky. (Vacek, 1996)

3.2.2 Fixační prostředky

- **Fyzikální** – v histologii se v podstatě nevyužívají. **Fixace suchým teplem** - využívá se téměř výhradně v mikrobiologii k fixaci nátěrů. **Fixace varem** – malé kousky tkáně se vaří v roztoku 40% formolu. Tato fixace je však velmi nedokonalá a vede k významnému porušení struktur tkáně. Proto je v histologických laboratořích používána jen výjimečně ve speciálních případech.
- **Chemická** - je založena na použití různých fixačních tekutin, nebo jejich par.

Fixační tekutiny s formaldehydem	Fixační tekutiny s kyselinou pikrovou	Další málo používané fixační tekutiny
10 – 20% FORMOL	Bouinova tekutina	Susa
Backerova tekutina	Tekutina se sublimátem	Zenkerova tekutina
Neutrální formol		Ethanol
Bromformol		Oxid osmičelý
Rothova tekutina		Hellyho tekutina
Slaný formol		

Tab. 1: přehled fixačních tekutin

3.2.3 Metodika fixace

Fixace tkáně se provádí tak, že vyříznutý kousek tkáně tzv. **tkáňový bloček**, se vloží do fixační tekutiny. Fixace tkáňového bločku se řídí několika pravidly :

- a) tkáňový bloček musí být dán do fixační tekutiny co nejdříve po odběru.

- b) tkáňový bloček nesmí být příliš velký, tloušťka by neměla přesáhnout 1 cm. Pokud by byl bloček příliš velký došlo by k fixaci jen horních vrstev a uvnitř by došlo k autolýze buněk. Pokud je potřeba fixovat celý orgán nebo velký kus tkáně, vstříkuje se fixační tekutina přímo do cév.
- c) fixační tekutiny musí být dostatek, nejméně 20x až 50x více než je objem tkáňového bločku
- d) fixační tekutina musí mít ze všech stran dostatečný přístup. Proto tkáňový bloček nesmí nikdy ležet na dně nádoby, je podložen vatou nebo filtračním papírem
- e) doba fixace je různá podle druhu tekutiny a velikosti tkáňového bločku

(Čech a Horký, 2005; Maňáková a Seichterová, 2002)

3.3 Zalévání do parafínu

Princip zalévání spočívá v prosycení odvodněné tkáně rozehrátým parafínem při teplotě 56-58°C. Parafín vyplní všechny mikroskopické štěrbinčky v tkáni, tak že se po ztuhnutí parafínu dá tkáň nakrájet na velice tenké řezy. Nejběžnější zalévacím médiem je tedy parafín, ale lze použít i jiná média jako je například Celoidin. U těchto médií je pak odlišný způsob zpracování vzorku. (Vacek, 1996)

Odvodňování

Před vlastním zalitím do parafínu se musí tkáň nejprve odvodnit. Tento úkon je prováděn v přístroji zvaném Autotechnikon obrázky 2 a 3. Aby se v autotechnikonu vzorky mezi sebou nepomíchaly, dávají se do děrovaných nerezových krabiček spolu s papírkem s identifikačním číslem pacienta. Kroky probíhající v autotechnikonu:

- I. Dofixování tkáně v roztoku Formolu obvykle dvě hodiny.
- II. Odvodnění tkáně alkoholem o vzestupné koncentraci:
 - a. 70% - 1 hod
 - b. 80% - 1hod
 - c. 96% - čtyři lázně po 1 hodině

Prosycení tkáně xylenem

Tento krok také probíhá v autotechnikonu.

- d. dvě lázně Xylenu po jedné hodině
- e. první parafínu jednu hodinu
- f. druhý parafínu tři hodiny

Oba tyto kroky je potřeba udělat důkladně, protože alkohol se s parafínem nemísí. Kdyby tedy došlo k zanedbání některého kroku, tkáň by byla špatně prosycená parafínem a nešla by nakrájet. Doba odvodnění tkáně závisí na velikosti tkáně, na její struktuře, popřípadě použití vakua které proces urychluje. Důležitá je také pravidelná výměna lázni. (Jirkovská, 2006; Vacek, 1996)



Obr. 2: autotechnikon
(zdroj: autor)



Obr. 3: detail lázni v autotechnikonu
(zdroj: autor)

Vlastní zalití tkáňového bločku

Po zpracování tkáně autotechnikonem se pak postup tvorby preparátu dostává k samotnému zalití tkáně do zkvalitněného parafínu. Dříve se parafín zkvalitňoval přidáním včelího vosku a přepalováním v digestoři. Dnes se však vyrábí komerčně a je do laboratoří dodáván již zkvalitněný.

Při vlastním zalévání je velmi důležitá orientace tkáně v budoucím bločku obr. 7. Tkáňový bloček vznikne vložením tkáně, zpracované v autotechnikonu, do formičky vyrobené pomocí dvou nerezových skobiček jak je vidět na obr. 4, a zalitím zkvalitněným parafínem. Ještě než parafín ztuhne přidá se na vrch plastová krabička obr. 5, s číslem vzorku které se shoduje s číslem na průvodce, která přišla s materiálem. Pro další kontrolu se navrch přidává i papírek s číslem se kterým byla tkáň zpracována v autotechnikonu obr. 6. (Čech a Horký, 2005; Vacek, 1996)



Obr. 4: formička ze dvou skobiček
(zdroj: autor)



Obr. 5: plastová krabička
(zdroj: autor)



Obr. 6: tkáňový bloček s identifikačním číslem
(zdroj: autor)



Obr. 7: tkáňový bloček druhá strana
(zdroj: autor)

3.4 Krájení tkáňových bločků

Ke krájení tkáňových bločků slouží přístroj zvaný mikrotom obr.8. Dokáže krájet řezy silné v řádech mikrometrů. V laboratořích se nejčastěji používá síla řezu maximálně 5 μ , aby byl preparát dobře prosvícen mikroskopem a struktury byly dobře čitelné. Mikrotomy se dají rozdělit do několika skupin, podle toho, jak jsou konstruovány. Nejběžnějším typem je mikrotom sáňkový. Hlavním znakem tohoto mikrotomu je, že vzorek je pevně uchycen svorkou obr.9 a proti němu se pohybuje velmi ostrý nůž obr.10. Sklon nože i bločku přitom lze nastavovat podle potřeby, aby byl výsledný řez, co nejkvalitnější. Dalším typem je mikrotom rotační, kde je naopak pevně uchycen nůž a proti němu rotuje tkáňový bloček. Speciálním typem tohoto mikrotomu je pak kryostat, kdy je rotační mikrotom umístěn v chladicí komoře při teplotě -10 až -20°C. Tento typ slouží ke krájení nativních preparátů při rychlé peroperační biopsii. (Maňáková a Seichertová, 2002; Jirkovská, 2006)



Obr. 8: sáňkový mikrotom
(zdroj: autor)



Obr. 9: držák bločků
(zdroj: autor)



Obr. 10: nůž mikrotomu s krytem
(zdroj: autor)

3.4.1 Metodika krájení tkáňových bločků

Zalitý tkáňový bloček se upevní do svorky mikrotomu a proti němu se posadí nůž popřípadě žiletka, podle typu mikrotomu, tak aby ostří bylo rovnoběžné s přední hranou bločku. Nůž musí s bločkem svírat úhel menší než 10° . Bloček se ze začátku zkrajuje silnými řezy dokud se nenarazí na tkáň, potom se mikrotom nastaví na sílu řezu $5\ \mu$ a krájí potřebné množství řezů. Pokud je vše správně nastaveno řezy se spojují do souvislých pásků.

Po té, co jsou řezy ukrojeny na mikrotomu je potřeba je pomocí štětečku přenést na vodní lázeň. Taková lázeň má obvykle 20°C a slouží k vypnutí řezů předtím, než se natahují na sklíčko. Lázeň nesmí být příliš horká, jinak by došlo k rozpuštění parafínu a znehodnocení řezů. Je nutné neustále dbát na označování podložních sklíček stejným číslem jako má bloček. Důležité také je po každém bločku z lázně odstranit všechny zbytky vosku a nepovedených řezů.

Po natažení řezu na sklíčko se preparát musí vysušit filtračním papírem, popsat odpovídajícím číslem vzorku a umístit do stojánu obr. 11.



Obr. 11: stojánek na preparáty
(zdroj: autor)

3.5 Odparafinování preparátů

Po nakrájení a natažení řezů na sklíčka je potřeba je tzv. **odparafinovat**. To proto, že k barvení preparátů jsou používány většinou vodné roztoky barviv, které by se kvůli parafinu nedostaly do řezu.

Prvním krokem odparafinování je vložení sklíček s řezy ve stojáncích na 45 min do termostatu při 60°C. Dále následuje několik lázní:

- Xylen – do něj vložíme řezy na 20 minut. Zde dojde k samotnému odparafinování.
- 96% alkohol
- 80% alkohol
- 70% alkohol
- Voda

Do alkoholů a vody jsou preparáty vkládány vždy na 5 minut. Tyto lázně již neslouží k odparafinování, ale k zavodnění tkáně. Po vyjmutí z vody můžeme preparáty libovolně barvit.

3.6 Barvení

Histologické řezy je po nakrájení nutné obarvit příslušným barvením, aby došlo ke zviditelnění jednotlivých složek tkáně a dali se prohlížet v klasickém mikroskopu. Neobarvené řezy lze také prohlížet, ale jen ve speciálních mikroskopech s fázovým kontrastem.

.Při barvení je využíváno toho, že různé součásti tkání jsou různě afinitní k různým barvivům. Výsledkem toho je, že jednotlivé části tkání jsou barevně odlišené. (*Jirkovská, 2006*)

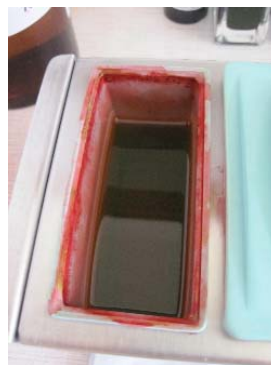
V histologii se dělí barviva na bazická a kyselá. Bazická barviva barví intenzivně hlavně jádro, proto se jim může říkat i barviva jádrová. Barviva kyselá naopak barví především cytoplazmu buněk. Histologických barvicích metod je hodně, ale v podstatě se jedná vždy o kombinaci jednoho bazického barviva, s jedním nebo více kyselými barvivami (*Vacek, 1996*).

Nejpoužívanějším bazickým barvivem je hematoxylin obr.12 a nejpoužívanějším kyselým barvivem je eosin obr.13. Pokud jsou tedy zkombinovány dohromady tato dvě základní barviva vznikne tak nejzákladnější a nejpoužívanější histologické barvení **Hematoxylin - Eosin (HE)**.

Tkáně lze barvit různými způsoby, a to buď po fixaci tkáně viz bod 3.2.3. této práce, nebo za živa. Takovému barvení se říká vitální. Vitální barvení znamená, že je barvicí roztok vstříkován pokusnému zvířeti pod kůži za živa. Supravitální barvení je stav kdy barvíme čerstvé neofixované kousky tkáně odebrané po smrti. (Dvořák, 1978; Jirkovská 2006)



Obr. 12: Weigertův železitý hematoxylin
(zdroj: autor)



Obr. 13: eosin
(zdroj: autor)

Nyní budou následovat podrobně rozepsané postupy barvení, podle kterých bylo postupováno při vypracování této práce.

Všechny postupy barvení jsou prováděny podle platného standardu: Standardní pracovní postup - Znázornění buněčných a tkáňových struktur v histologických řezech. Vydáno Nemocnicí Jindřichův Hradec 1. 6. 2008.

3.6.1 Hematoxylin – Eosin

Podrobněji v bodě 3.6. této práce

Proto, že je toto barvení naprosto nejpoužívanější mívají často oddělení speciální barvicí linku, která preparáty barví automaticky. Na oddělení histologie v nemocnici Jindřichův Hradec však zatím vše ještě barví ručně v předem připravené řadě potřebných roztoků, ve kterých jsou přenášeny stojánky s preparáty obr. 11. Tato řada je vyměňována na konci každého týdne.

Používají se odparafinované a zavodněné řezy.

Postup :

1. 5-8 min – roztok Weigertův železitý hematoxylin
2. Oplach vodou
3. diferenciací kyselým alkoholem

4. Oplach vodou do zmodrání řezů
5. 5 min roztok Eosinu
6. oplach ve třech lázních 96% alkoholu
7. 5 min karbolxylen – odvodnění
8. 5 min xylen – projasnění
9. montování do média – NEmísícího se vodou

Barva	Tkáň
Modrá	Jádra buněk, chrupavka
Šedá	Epitel
Oranžová	Erythrocyty
Červená	Kolagenní vazivo, svalovina
Růžová	Ostatní tkáň

Tab.2: výsledek barvení hematoxylin – eosin

3.6.2 Van Gieson

Tato metoda je modifikací předchozí metody barvení **hematoxylin – eosin**. Považuje se také za základní barvení

Používají se odparafinované a zavodněné řezy.

Postup :

1. 5-7 min Weigertův železitý hematoxylin
2. oplach vodou
3. diferenciací kyselým alkoholem
4. oplach vodou do zmodrání řezů
5. 3 min – roztok Van Gieson
6. oplach ve třech lázních 96% alkoholu
7. 5 min - karbolxylen
8. 5 min – xylen
9. montování do média – nemísícího se s vodou

Barva	Tkáň
Sytě hnědá	Jádra buněk
Třešňově červená	Kolagenní vazivo
Žlutá	Svalovina

Tab. 3: výsledek barvení **Van Gieson**

3.6.3 PAS reakce

Rozdělení polysacharidů

- Polysacharidy mohou mít podobu tzv. homopolysacharidů, to znamená, že jsou složeny pouze se sacharidů - mezi homopolysacharidy je nejvýznamnější glykogen, který se vyskytuje v cytoplasmě jaterních buněk a v srdečním svalu.
- Nebo mohou být složeny ze sacharidu a látky jiné povahy. Podle toho je pak rozdělujeme na mukopolysacharidy, mukoproteiny a glykoproteidy a na glykolipidy. **Mukopolysacharidy** se ještě dále dělí na neutrální a kyselé, přičemž neutrální se vyskytují hlavně v žaludečním hlenu a kyselé jsou součástí sekretů žlázek zažívací trubice. **Mukoproteiny a glykoproteiny** se vyskytují v hlenu některých slinných žláz a v retikulárních vláknech. **Glykolipidy** se hojně vyskytují hlavně v mozkové tkáni. (*Vacek, 1996; Dvořák, 1978*)

PAS reakce slouží k průkazu neutrálních polysacharidů. Podstatou této reakce je oxidace polysacharidů při které vznikají aldehydy, které reagují se Schiffovým reagens fialově-červeným zbarvením. Pro toto barvení se používají odparafinované a zavodněné řezy.

Postup:

1. 5 min – 1% kyselina jodistá – oxidace
2. 15 min – oplach pod tekoucí vodou
3. 15 min – Schiffovo reagens
4. 15 min – oplach pod tekoucí vodou
5. 3 min – hematoxylin
6. oplach vodou
7. diferenciací kyselým alkoholem
8. oplach vodou

9. oplach ve třech lázních 96% alkoholu
10. 5 min – karbolxylen
11. 5 min – xylen
12. montování do média nemísícího se s vodou

Barva	Tkáň
Purpurově červená	PAS pozitivní složky
Modrá	Jádra buněk

Tab. 5: barevný výsledek PAS reakce

3.6.4 Barvení alciánovou modří - ALC

Toto barvení slouží k průkazu kyselých mukopolysacharidů, které jak se zmiňují v předchozím bodě, jsou součástí hlenovitých sekretů žlázek zažívací trubice. Používají se odparafinované a zavodněné řezy.

Postup:

1. 5-7 min – Hematoxylin
2. oplach vodou
3. diferenciací kyselým alkoholem
4. oplach vodou do zmodrání řezů
5. 5 min – roztok Pikro-ponceau S
6. oplach vodou
7. oplach ve třech lázních 96% alkoholu
8. 5 min – karbolxylen
9. 5 min – xylen
10. montování do média nemísícího se s vodou

Barva	Tkáň
Modrozelená	Kyselé mukopolysacharidy, hlen
Modrá	Jádra buněk
Červená	Kolagenní vazivo

Tab. 6: barevný výsledek barvení alciánovou modří

3.6.5 Barvení hlenu

Hlen a hlenovité látky mají charakter polysacharidů a lze je obarvit mucikarmínem. Tato metoda však není příliš specifická, protože se podle ní nedá určit druh hlenu. Je také poměrně zastaralá a do své práce jsem ji zařadila jen pro porovnání k ALC a PAS reakci.

Pracuje se odparafinovanými a zavodněnými řezy.

Postup:

1. 5 min – Weigertův železitý hematoxylin
2. oplach vodou
3. diferenciací kyselým alkoholem
4. oplach vodou do zmodrání jader
5. 20 min – mucikarmín
6. oplach ve třech lázních 96% alkoholu
7. 5 min – karbolxylen
8. 5 min – xylen
9. montování do média nemísícího se s vodou

Barva	Tkáň
Modrá	Jádra buněk
Červená	Hlen

Tab. 7: výsledek barvení na hlen

3.6.6 Barvení pro průkaz kolagenního vaziva

- Kolagenní vazivo je typ pojivové tkáně a v lidském těle je nejrozšířenějším druhem vaziva. Je složeno z vazivových vláken, vazivových buněk a rosolovité mezibuněčné hmoty. Kolagenní vazivo se vyskytuje zejména ve šlachách, svalových úponech a vytváří obaly orgánů.

Obecně se kolagenní vazivo barví všemi kyselými barvivy. Proto jsou pro průkaz kolagenního vaziva vhodná všechna přehledná barvení zejména **Van Gieson**, o se kterém podrobně zmiňuji v bodě 3.6.2. této práce a **Massonovy trichromy** o, kterých budu psát nyní.

Masonovy trichromy se rozdělují na žlutý trichrom – barveno šafránem, modrý trichrom – barveno anilínovou modří a zelený trichrom – barveno světlou zelení. Při vypracování této práce byl použit modrý trichrom. Používají se odparafinované, zavodněné řezy.

Postup barvení Massonův modrý trichrom:

1. 5 min – hematoxylin
2. oplach vodou
3. diferenciací kyselým alkoholem
4. oplach vodou do zmodrání řezů
5. 5 min – Ponceau kyselý fuchsin
6. oplach destilovanou vodou
7. 15 min – oranž G
8. oplach destilovanou vodou
9. 3 min – anilínová modř
10. oplach destilovanou vodou
11. oplach ve třech lázních 96% alkoholu
12. 5 min – karbolxylen
13. 5 min – xylen
14. montování do média nemísícího se s vodou

Barva	Tkáň
Modročerná	Jádra buněk
Modrá	Kolagenní vazivo
Červená	Svalovina
Oranžová	Erytrocyty

Tab. 8: výsledek barvení modrým Massonovým trichromem

3.6.7 Barvení Weigertovým Resorcin fuchsinem

Toto barvení se využívá k přehlednému znázornění elastických vláken a blanek. Elastická vlákna jsou velmi ohebná, větví se a vytvářejí složitou prostorovou síť.

Používají se odparafinované a zavodněné řezy.

Postup:

1. 30 min – roztok Resorcin fuchsinu
2. oplach přebytečného barviva vodovodní vodou
3. 5 min – Weigertův hematoxylin
4. oplach vodou
5. diferenciacie kyselým alkoholem
6. oplach vodou do zmodrání jader
7. 5 min – pikrofuchsin
8. oplach ve třech lázních 96% alkoholu
9. 5 min – karbolxylen
10. 5 min – xylen
11. montování do média nemísícího se s vodou

Barva	Tkáň
Modrá	Jádra buněk
Černá	Elastická vlákna
Červená	Kolagenní vazivo, svalovina
Růžová	Ostatní tkáň

Tab. 9: výsledek barvení pro průkaz elastických vláken**3.6.8 Průkaz železa**

Principem této metody je, že chemickým působením reagenčního roztoku dojde k oxidaci dvojmocného železa, vázaného ve tkáni, na trojmocné které se ve výsledném preparátu znázorní modře. Používají se odparafinované a zavodněné řezy destilovanou vodou.

Postup:

1. 20 min – roztok 24 ml 2% ferrokyanidu draselného + 15 kapek kyseliny chlorovodíkové
2. oplach destilovanou vodou
3. 5 min – jádrová červeň
4. oplach destilovanou vodou
5. oplach ve třech lázních 96% alkoholu
6. 5 min – karbolxylen

7. 5 min – xylen
8. montování do média nemísícího se s vodou

Barva	Tkáň
Červená	Jádra buněk
Modrá	Železo

Tab. 10: výsledek barvení pro průkaz železa

3.6.9 Průkaz retikulárních vláken

Pro průkaz retikulárních vláken se používá metoda impregnace. Základní podmínkou pro úspěšné provedení je naprostá čistota použitého laboratorního skla, chemikálií a destilované vody. Retikulární vlákna se impregnují zejména dle Gömoriho. K impregnaci se používají odparafinované a zavodněné řezy v destilované vodě.

Postup:

1. 3-5 min - oxidace v 0,5% roztoku manganistanu draselného
2. oplach řezů ve vodě
3. 2 min – bělení ve 2% roztoku pyrosiřičitanu draselného
4. 10 min – vodovodní voda
5. oplach v destilované vodě
6. 1 min – 2% roztok kamence železitého
7. 5 min – vodovodní voda
8. 5 min – oplach v destilované vodě, která se několikrát vymění
9. 1 min – amoniakální roztok stříbra
10. oplach destilovanou vodou
11. 5 min – 10% neutrální formol
12. 7-8 min – 1% roztok chloridu zlatitého
13. oplach destilovanou vodou
14. 1 min – 1% roztok thiosíranu sodného
15. 5 min – tekoucí vodovodní voda
16. 5 min – jádrová červeň
17. oplach destilovanou vodou

18. oplach ve třech lázních 96% alkoholu
19. 5 min – karbolxylen
20. 5 min – xylen
21. montování do média nemísícího se s vodou

Barva	Tkáň
Černá	Retikulární vlákna
Šedohnědá	Kolagenní vlákna
Červená	Jádra buněk

Tab. 11: výsledek impregnace retikulárních vláken

3.6.10 Barvení pro průkaz acidorezistentních bakterií

Buněčná stěna acidorezistentních bakterií obsahuje lipidické látky a proto je nelze barvit klasickými barvicími metodami pro průkaz bakterií. Nejdůležitější acidorezistentní bakterií je *Mycobacterium tuberculosis*, původce tuberkulózy, kterému se někdy zastarale říká Bacil Kochův. Proto se někdy ve starší literatuře lze setkat se zastaralým názvem barvení na BK. K barvení se používají odparafinované a zavodněné řezy.

Postup:

1. řezy umístíme do skleněné kyvety s přefiltrovaným karbolfuchsinem a dáme na 1 hodinu do termostatu při 56°C
2. po vyjmutí kyvety z termostatu necháme ještě barvit 20 min při pokojové teplotě
3. oplach pod tekoucí vodou dokud stéká barva
4. diferenciací kyselým alkoholem
5. oplach vodou
6. 10 – 20 sec – 0,5% roztok světlá zeleň
7. oplach pod tekoucí vodou
8. oplach v 96% alkoholu
9. oplach v absolutním alkoholu
10. oplach xylenem
11. montování do média nemísícího se s vodou nebo do kanadského balzámu

Barva	Tkáň
Jasně červená	Acidorezistentní bakterie
Světle zelená	Okolní tkáň

Tab. 12: Výsledek barvení acidorezistentních bakterií

3.7 Montování

Všechny preparáty je nutné ihned po obarvení zamontovat do média a přikrýt krycím sklíčkem. Bez toho nelze preparáty pod mikroskopem vůbec prohlížet. Je to důležité i pro budoucí uchování vzorku (*Jirkovská, 2006*). Na histologických odděleních se preparáty archivují ještě 5 let po jejich vytvoření. Vzorek po celou tuto dobu nesmí vyschnout jinak by byl znehodnocen a nedal by se v budoucnu použít. Pro tento případ se proto na histologických odděleních skladují i tkáňové bločky a to po dobu deseti let.

3.7.1 Postup při montování preparátů

Po obarvení je preparát ponechán v poslední lázni nejčastěji xylenu, dokud preparát není zamontován.

Preparát se vyndá z lázně a doprostřed řezu se nanese trochu montovacího činidla, po té se přiloží krycí sklíčko odpovídající velikosti, tak aby nevznikly bubliny. Používají se základní dva druhy montovacích médií a to buď nemísitelná s vodou nebo mísitelná s vodou, podle toho jaké používáme barvení. Každá laboratoř používá jiná media. V této práci bylo použito jako médium nemísící se s vodou Biomount, který je do laboratoře dodáván komerční firmou. A jako médium mísící se s vodou Glycerin, který si nechává laboratoř míchat v nemocniční lékárně. (*Maňáková a Seichertová, 2002*)

4 Výsledky

Na základě výše popsané metodiky vznikly preparáty, které budou nyní popsány jak z hlediska jejich histologické stavby tak i z hlediska jejich vztahu k různým barvením.

Celkem bylo zpracováno 30 preparátů, které jsou rozděleny do 12 skupin podle druhu tkáně.

4.1 Popis jednotlivých preparátů

4.1.1 Játra

Na preparátu z jater je při pozorování nejvýraznější centrální žíla jak je vidět na obr. 14 (příloha str. 1) a portobiliární prostor, který je lépe viditelný na obr.15 (příloha str. 1), protože bylo použito barvení které zdůrazňuje především kolagenní vazivo. Kolagenní vazivo je také dobře viditelné v cévní stěně, kde se fyziologicky vyskytuje (*Martínek a Vacek, 2008*). Na obr.16 (příloha str. 2) je použito barvení pro průkaz železa, a jak je viditelné tato játra železo obsahují. Železo se v játrech fyziologicky nevyskytuje, může značit například to že játra pochází od kuřáka nebo alkoholika. Na obr.16 (příloha str. 2) jsou také jasně viditelné černé tečky, ty se jsou způsobeny kyselým formolem ve kterém byla játra fixována. Toto je častý jev u nekroptického materiálu. (*Brychtová a Hlobilová, 2008*)

4.1.2 Tenké střevo

Tenké střevo na rozdíl od tlustého má klky a až na nich krypty, které ovšem nejsou tak hluboké jako u tlustého střeva. Pod kryptami se nachází vrstva zvaná submukóza obr. 17 (příloha str.2), která spojuje sliznici střeva se svalovou stěnou. Je tvořena převážně kolagenním vazivem. Svalová vrstva je tvořena hladkou svalovinou a je zodpovědná za peristaltiku (*Vacek, 1996*). Jak je vidět na obr.17 (příloha str. 2) tenké střevo velice rychle podléhá autolytickým změnám, protože obsahuje mnoho trávicích enzymů. Tento vzorek pochází z nekropsie a proto je jeho struktura již značně poškozená.

4.1.3 Tlusté střevo

Tlusté střevo je mikroskopicky velmi podobné ostatním částem zažívací trubice. Od tenkého střeva se však liší tím, že nemá klky, jen hluboké Lieberkühnovy krypty což je patrné na obrázcích 18, 19 (příloha str. 3), 20, 21 (příloha str. 4). Na povrchu Lieberkühnových krypt jsou četné pohárkové buňky nejlépe viditelné na obr.18 (příloha str. 3). Pro tlusté střevo je

charakteristická tvorba hleny, která je dobře rozpoznatelná zejména na obrázcích 19 (příloha str. 3) a 20 (příloha str. 4), kdy na obr. 19 je hlen obarven modrofialově a na obr. 20 tyrkysově modře. Méně rozpoznatelný hlen je na obr. 21 (příloha str. 4), který je obarven mucikarmínem, toto barvení, jak je vidět na obrázku, není příliš specifické a proto se již v histologických laboratořích nevyužívá. (*Vacek, 1996; Martínek a Vacek, 2008*)

4.1.4 Ledvina

Základní funkční jednotkou ledvin je nefron, který je tvořen glomerulem obaleným Bowmanovým váčkem, proximálním tubulem, Henleovou kličkou a distálním tubulem. Pro preparáty z kůry ledvin jsou hlavním znakem glomeruly, ty jsou dobře patné jak na obr. 22 (příloha str. 5) tak i na obr. 23 (příloha str. 5). Na obr. 23 (příloha str. 5) je také dobře viditelné že kůra ledviny je tvořena převážně kolagenním vazivem, to se modrým trichromem barví modře. Obal Glomerulu je tvořen Bowmanovým váčkem, který je výhradně z kolagenního vaziva. (*Vacek, 1996*)

4.1.5 Plíce

Plíce jsou v mikroskopu rozeznatelné od ostatní tkáně celkem snadno. Díky přítomnosti plicních sklípků vypadá tkáň jako děravá. Na Obr. 25 (příloha str. 6) , který je obarven na elastiku, jsou černě obarvená elastická vlákna, která vytváří podpůrnou síť pro vlastní plicní tkáň. Na obr. 26 (příloha str. 7) je pak patné železo současně s antrakotickým pigmentem, což může značit že zemřelý byl kuřák, nebo žil ve velmi znečištěném ovzduší (*Brychtová a Hlobilová, 2008*). Vzhledem k tomu, že vzorek plic pochází z nekropsie je preparát mírně zdeformovaný a liší se od fyziologicky vypadajících plic.

Na obr. 27 (příloha str. 7) jsou vidět acidorezistentní tyčky, v tomto případě mycobacterium tuberculosis, které se barví růžově. Materiál pochází z pozitivní kontroly pro barvení acidorezistentních bakterií. Plicní tkáň napadená TBC je charakteristická přítomností miliárních uzlíků obr. 28 (příloha str. 8). (*Martínek a Vacek, 2008*)

4.1.6 Srdce

Srdeční stěna je složená ze srdeční svaloviny neboli Myokardu, Epikardu a Endokardu.

Srdeční svalovina v sobě spojuje vlastnosti svaloviny hladké a kosterní. Základní funkční jednotkou myokardu je jednojaderná svalová buňka kardiomyocyt, které jsou vidět na obr. 29 (příloha str. 8). Kardiomyocyty ve své cytoplazmě obsahují aktin-myosinové myofibrily které

jsou schopné stahu. Tyto buňky tvoří trojrozměrnou síť, navzájem pospojovanou tzv. interkalárními disky. (*Eroschenko a Di Fiore, 2005*)

4.1.7 Slezina

Slezina je složená z bílé a červené pulpy a na povrchu jí chrání vazivové pouzdro. Bílá pulpa tvoří obal pro drobné artérie jak je vidět na obr. 30 (příloha str. 9). V bílé pulpě jsou také uloženy primární folikuly, ve kterých vznikají lymfocyty. Červená pulpa je tvořená trámcí z retikulární tkáně obr. 32 (příloha str. 10), které se označují jako Billrothovy provazce, a je hustě vyplněna červenými i bílými krvinkami. Slezina je také orgánem kde zanikají červené krvinky, proto jak je vidět na obr. 31 (příloha str. 9), obsahuje slezina hodně železa (modrá barva). Tyto přestárlé erythrocyty jsou pak po rozpadu fagocytovány buňkami retikula. (*Vacek, 1996; Young et. al., 2006*)

4.1.8 Lymfatická uzlina

Lymfatické uzliny jsou uloženy v průběhu lymfatických cév. Jsou složené z vaziva, lymfatické tkáně a lymfatických cest viz obr. 33 (příloha str. 10). Kůra se skládá z četných lymfatických folikulů, které mají obvykle světlejší střed a tmavší okraj jak je dobře zřetelné na obr. 34 (příloha str. 11). Ve středu folikulu se nacházejí hlavně lymfoblasty a plazmocyty, na okraji jsou pak hustě nakupeny dozrávající a zralé lymfocyty. Lymfoblasty jsou buňky s velkým množstvím cytoplazmy a velkým světlým jádrem a vyvíjejí se z nich lymfocyty. Lymfa je tekutina, která volně protéká lymfatickou uzlinou, odnáší sebou zralé lymfocyty a přináší různé cizorodé částičky např. bakterie, které se v uzlině zachytí a fagocytují. (*Dvořák, 1978; Eroschenko a Di Fiore, 2005*)

4.1.9 Mozek

V lidském mozku je uložena bílá hmota uvnitř a šedá hmota na povrchu jako tzv. kůra jak je znázorněno na obr. 35 (příloha str. 11) a obr. 36 (příloha str. 12). Histologická stavba kůry mozku je velmi složitá a odpovídá její důležité funkci. Běžným histologickými barvením se dá v mozku sledovat hlavně tvar, velikost a hustota buněk v různých vrstvách (*Martínek a Vacek, 2008*). Jak již bylo řečeno stavba mozkové kůry je nejen složitá ale také velmi odlišná v různých částech, a proto její správné přečtení vyžaduje roky praxe.

4.1.10 Mozeček

U řezu mozečku jsou snadno rozpoznatelné její tři vrstvy – molekulární, granulární a bílá hmota viz obr. 37 (příloha str. 12), v hloubce bílé hmoty jsou pak ještě uložena jádra, která jsou tvořena z hmoty šedé, ty však na obrázku vidět nejsou. Dřeň mozečku se směrem k povrchu stromečkovitě větví. Jak je vidět na obr. 37 (příloha str. 12), vrstva molekulární je na rozdíl od granulární velice chudá na buňky, je složena hlavně z nervových vláken. Mezi vrstvou molekulární a granulární je pak uložena jedna řada Purkyňových buněk viz obr. 38 (příloha str. 13), které se složitě větví do molekulární vrstvy. Od jejich základny pak vystupuje neurit, který vede bílou hmotou až k hluboko uloženým jádrům (*Young et. al., 2006*). Funkcí mozečku je koordinace pohybů a udržování rovnováhy. (*Dvořák, 1978*)

4.1.11 Nadledvina

Nadledviny jsou žlázy s vnitřní sekrecí uložené na horních pólech ledvin.

Jak je vidět na obr. 39 (příloha str. 13), nadledvina nemá s ledvinou z histologického hlediska mnoho společného. Nadledvina je složena ze dvou částí, které se liší histologickou stavbou i funkcí, a to z kůry a dřeně.

V kůře dřeně lze ještě rozlišit tři další zóny viz obr. 39 (příloha str. 13). Zóna glomerulosa je složena z trámečků, které se stáčejí tak, že připomínají klubíčko. Zóna fasciculata je složena z více či méně rovných trámečků. Zóna reticularis se skládá z trámečků, které jsou navzájem síťovitě propojené což je znázorněno na obr. 40 (příloha str. 14), kde je vidět jak jsou retikulární vlákna rozvětvená a obkružují buňky (*Martínek a Vacek, 2008*).

Dřeň je složena ze síťovitě uspořádaných epitelových trámčů. Buňky dřeně obsahují mnohem více granul, než buňky kůry viz obr. 41 (příloha str. 14). Tyto granula obsahují hlavně adrenalin. (*Eroschenko a Di Fiore, 2005*)

4.1.12 Kůže

Pokožka je tvořena vrstevnatým dlaždicovým epitelem, jehož vrchní vrstva je zrohovatělá. Pod ní je vrstva zárodečná, která obsahuje velké množství buněk, které slouží k tomu aby se kůže mohla neustále obnovovat. Nejhlubší vrstvou je škára, která je tvořena kolagenním vazivem a vybíhá proti kůži v podobě kuželovitých výběžků tzv. papil (*Vacek, 1996*). Tyto tři vrstvy jsou vyobrazené na obr. 42 (příloha str. 15). Na obr. 43 (příloha str. 15) je pak vlasový folikul se zárodkem vlasu a u něj mazová žláзка. Mazové žláзки se nacházejí ve škáře po celém těle, kromě dlaní a chodidel a většinou jsou vázány na vlasové folikuly. Kožní maz

slouží k ochraně kůže před působením potu a vody a zabraňuje vysychání kůže. (*Young et. al., 2005; Vacek, 1996*)

4.2 Možné chyby při zpracování preparátů

Pro pochopení procesu tvorby histologických preparátů je nezbytné popsat možné chyby, které mohou vzniknout při výrobě preparátů a tím mohou mít fatální vliv na celkový výsledek práce. Proces výroby jednotlivých preparátů je natolik dlouhý a specifický, že téměř při každém jednotlivém kroku může být do procesu zanesena chyba, přičemž její následek je často patrný až při koncovém vyhodnocení kvality preparátu v mikroskopu.

Chyby mohou být obecně buď náhodné nebo systematické, což představuje například nedodržení předepsaných časů prováděných úkonů. Další zvláštní skupinou chyb jsou chyby hrubé, které by se neměly vůbec vyskytnout a jsou způsobené nejčastěji selháním lidského faktoru. Mezi tyto chyby můžeme například zařadit záměnu preparátů, ztrátu nebo znehodnocení výchozí tkáně, kterou často nelze znovu získat.

4.2.1 Chyby při fixaci

Pokud je odebraná tkáň vložená do fixačního roztoku příliš pozdě, například až po několika hodinách, dojde k autolytickým změnám a tkáň je znehodnocena pro jakékoli vyšetření. Tkáňový bloček vkládaný do fixačního roztoku také nesmí být příliš velký, pokud by byl, tekutina by nemohla proniknout do středu bločku a opět by došlo k autolytickým změnám, které vzorek znehodnocují. Další chybou při fixaci bývá ponechat tkáňový bloček na dně nádoby s roztokem. Protože fixační tekutina se pak nedostane do míst, kde se tkáň dotýká dna nádoby. Proto je tkáň podkládána vatou nebo složeným filtračním papírem.

4.2.2 Chyby při zalévání

Všechny kroky mezi fixací a vlastním zalitím bločku jsou prováděny v autotechnikonu, přičemž v podstatě nelze udělat nějakou závažnou chybu. Přístroj je naprogramován výrobcem podle potřeb laboratoře a pokud je potřeba nějakých změn všichni laboranti obvykle prochází školením. Jedinou možnou chybou je opomenutí výměny některé z lázní v autotechnikonu, ale to je přístroj sám schopen ohlásit a bez výměny lázně ho nelze spustit. Vlastní zalévání tkáňového bločku se dnes provádí pomocí zkvalitněného parafínu, díky kterému v podstatě nedochází k možnosti vzniku dalších chyb.

4.2.3 Chyby při krájení

Při krájení hraje velkou roli i teplota v místnosti, pokud je příliš teplo, řezy se lepí na nůž a trhají, v takovém případě pomůže jen kostka ledu, která se na chvíli položí na bloček. Dalším důležitým faktorem je i ostří nože, pokud je tupý řezy se stlačují ve varhánky a je nemožné je natáhnout, pokud má nůž byť mikroskopické zuby na řezech se objevují rovnoběžné rýhy se směrem řezu. V takovém případě je nutné nůž nabrousit a nebo v případě žiletky ji vyměnit za novou. Pokud se řezy při krájení kroutí pravděpodobně je špatně nastavená síla řezu, stačí tedy nastavit mikrotom na obvyklých 5 μ . Po nakrájení a natažení řezů je pak nesmíme zapomenout dát na 45 min do termostatu při 60°C, při tomto procesu dojde k pevnému přilnutí řezů ke sklíčku a odkapání přebytečného parafínu.

4.2.4 Chyby při barvení

Před samotným barvením je nejprve nutné řezy odparafinovat pomocí xylenu, do kterého vložíme řezy na 10-20 min. Odparafinovaný řez je pak nutné zavodnit, aby mohlo dojít k samotnému barvení, k tomu slouží řada čtyř alkoholů se sestupnou koncentrací a poslední lázeň s vodou. To proto, že k barvení preparátů se používají většinou vodné roztoky barviv, které by se kvůli parafínu nedostaly do řezu. U těchto kroků je opravdu důležité dodržet časy, protože pokud by došlo k nedostatečnému odparafinování nebo zavodnění řez by nešel obarvit a byl by tak naprosto znehodnocen.

Při samotném barvení je pak opět nejdůležitější dodržovat časy, aby byl výsledek v mikroskopu dobře čitelný. Nejnáročnější na tvorbu jsou různé metody impregnace, kdy je nutné mít naprosto čisté laboratorní sklo i roztoky a striktně dodržovat časy, kdy se často jedná i o vteřiny. Impregnační metody bývají obvykle časově náročné a pokud již na začátku dojde k drobné odchylce, zjistíme chybu častokrát až na konci a celá zdlouhavá práce tak byla zbytečná.

Po obarvení preparátu nesmíme zapomenout ho odvodnit, jinak by nešlo preparát zamontovat, pro montování se totiž obvykle používá médií nemísících se s vodou.

4.2.5 Chyby při montování

Základní chybou při montování může být hlavně použití nesprávného montovacího média, to se však dá poznat na první pohled. Sklíčko na preparátu nedrží a vytváří se pod ním jakoby mastné skvrny. V takovém případě preparát znovu ponoříme do xylenu a použijeme správné médium. Další chybou je vznik bublinek pod krycím sklíčkem. Tato chyba se však také nechá

poměrně snadno odstranit a to mírným zatlačením na okraj krycího sklíčka a rozehnáním bublinek ven. K větší tvorbě bublinek může docházet zejména když je příliš husté montovací médium, v takovém případě do něj stačí nakapat pár kapek xylenu.

5 Diskuze a závěr

Vzhledem k tomu, že na počátku práce nebyly stanoveny žádné hypotézy, je tato práce zaměřená spíše rešeršně. Z toho důvodu považuji za vhodné, spojit body diskuse a závěr dohromady.

Všechny laboratorní metody použité pro tvorbu histologických preparátů v rámci této práce se běžně využívají v praxi. Za jedinou výjimku bychom mohli označit metodu barvení hlenu mucikarmínem. Tato metoda není příliš specifická, protože se podle ní nedá určit druh hlenu a proto se již v dnešní době nepoužívá. Její zařazení v této práci má však svůj smysl, aby bylo možné porovnat její výsledky s metodami novějšími a to metodou PAS reakce a barvení alciánovou modří.

Všechny ukázkové preparáty popsané v této práci byly, s výjimkou zpracování tkáně v autotechnikonu, vytvořeny ručně. To jsou postupy, které se ještě dnes stále používají zejména v menších laboratorních provozech. Ve větších laboratořích a nových nemocnicích je dnes již běžnou praxí používání zalévacích a barvicích linek. Nicméně i v dnešní době a v těchto velkých a moderních laboratořích je nenahraditelná manuální práce laboranta, zejména při tvorbě některých netypických preparátů pro jejichž získání je nutné používat specializované techniky. Nejdůležitější prací laboratorní technika v histologické laboratoři tak i nadále zůstává především krájení tkáňových bločků na které dodnes neexistuje žádný plně automatický přístroj.

Z výše uvedeného vyplývá, že poznatky, shrnuté v této práci jsou aktuální a užitečné nejen pro pracovníky malých laboratorních provozů, ale i pro laboranty, pracující ve velkých a moderních laboratořích.

Je nutné uvést, že v rámci této práce nejsou, z níže uvedených důvodů, všechny druhy tkání a jim odpovídající druhy barvení. Některé typy vyšetření se v histologických laboratořích provádějí pouze výjimečně (jednou nebo dvakrát za rok) a nebylo proto možné tyto preparáty získat. Jedná se například o ne příliš časté vyšetření pro prokázání tuků v tkáni nebo zpracování tvrdých tkání. To jsou například kosti a zuby, které jsou zpracovávány metodou výbrusů. Pokud by měly být tyto specifické preparáty v této práci všechny obsaženy, musela by celá práce mít daleko větší rozsah, který by velmi přesahoval běžnou délku bakalářské práce. Z tohoto důvodu také tato práce neobsahuje histochemické a imunologické metody,

které se sice dnes v histologických laboratořích již běžně využívají, ale jsou velmi drahé, jejich tvorba vyžaduje další speciální postupy a do této práce by se již jejich popisy nevešly.

Součástí práce je i seznam možných chyb, kterých se mohou pracovníci laboratoří dopustit. Tento seznam je podrobně rozepsán v kapitole 4.2 Možné chyby při zpracování preparátů a měl by sloužit laborantům jako návod pro včasné odhalení možných chyb a jejich případnou kompenzaci.

Hlavními cíli této práce bylo vytvoření ucelené sbírky histologických preparátů pro studijní a výukové účely a jejich následná digitalizace, důkladný popis a zhodnocení. Jsem přesvědčena, že oba zadané cíle jsem splnila a výsledky této práce mohou posloužit k dalšímu vzdělávání mých kolegů a zaškolování nových laboratorních pracovníků v histologických laboratořích.

Vysvětlení pojmů

Absolutní alkohol – je bezvodý 100% alkohol. Který se připravuje tak, že k 96% alkoholu přidáme modrou skalici, která z alkoholu pohltí přebytečnou vodu. V láhvi je usazená na dně, takže nijak nekontaminuje alkohol.

Autotechnikon – přístroj ve kterém dochází k odvodnění a prosycení tkáně parafinem.

Biomount – montovací médium nemísící se s vodou, které je komerčně dodávané do laboratoří. Je to čirá vazká hořlavá tekutina, která dráždí kůži a sliznici. Při manipulaci je nutné použít ochranný oděv a rukavice.

Celoidin – nitrát celulózy, který se používá k zalévání velmi hutných tkání jako jsou například kosti a zuby

Diferenciace – krok při kterém se odbarví přebytečně nabarvená tkáň. Při barvení za použití Weigertova železitého hematoxylinu se obarví více tkáně než je zapotřebí, proto použijeme kyselý alkohol, který tuto přebytečně nabarvenou tkáň zase odbarví a nechá nebarvená jen jádra.

Formol – je 40% roztok formaldehydu ve vodě, je jednou z nejvíce používaných fixačních tekutin. Je to bezbarvá kapalina dráždivého zápachu, silně dráždící sliznice.

Kanadský balzám – přírodní pryskyřice z kanadské jedle, která slouží jako montovací médium. Má lehce nažloutlou barvu a specifické pryskyřicové aroma.

Karbolxylen – pokud umístíme krystalický fenol do termostatu při 56°C tak zkapalní. A po smísení s xylenem v poměru 1:7 vznikne karbolxylen.

Kyselý alkohol – každá laboratoř ho připravuje mírně odlišně podle použitého hematoxylinu. Nejběžnější je příprava, kdy se k 1000 ml 70% alkoholu přidá 25 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové.

Masonovy trichromy – název pro tři barvení, která se od sebe liší pouze použitou barvou – zelená - světlá zeleň , žlutá - šafrán, modrá – anilinová modř.

Mikrotom – přístroj, který slouží ke krájení velmi tenkých řezů, které se pak používají pro histologická vyšetření

Peroperační biopsie – je rychlá biopsie, kdy chirurg na sále odebere pacientovi kousek tkáně a pošle ho na histologické vyšetření zatím co je pacient v narkóze. Podle výsledku biopsie se pak chirurg rozhodne o dalším postupu operace. Toto vyšetření musí být hotové do 20 min.

Stereologie – Věda zabývající se statistickým odvozováním geometrických vlastností zkoumaných struktur pomocí testovacích sond, které se zavedou do vzorku.

Xylen – směs tří izomerů dimethylbenzenu, používá se jako rozpouštědlo. Je silně hořlavý.

Seznam literatury

1. BRYCHTOVÁ, S; HLOBILOVÁ, A. Histopatologický atlas. Praha : Grada, 2008. 112 s. ISBN 978-80-247-1650-3.
2. ČECH, S; HORKÝ, D. Přehled obecné histologie. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 140s. ISBN 80-210-3854-3.
3. ČECH, S; HORKÝ, D; SEDLÁČKOVÁ, M; ŠŤASTNÁ, J; Histologická praktika a metody vyšetřování tkání a orgánů. 1. vydání Brno: Masarykova univerzita 1998. 162s. ISBN 80-210-1774-0.
4. DEMICHELIS, F.; BARBARESCHI, M.; DALLA PALMA, P.; FORTI, S. The virtual case: a new method to completely digitize cytological and histological slide. Virchows Archiv. 2001, 441, s. 159–164.
5. DVOŘÁK, K. Obecná a speciální histologie. Brno : ústav pro další vzdělávání středních zdravotnických pracovníků, 1978. 203 s.
6. EROSCHENKO, V.P.; DI FIORE, M.S. Di Fiore's atlas of histology with functional correlations. New York : Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 448 s. ISBN 07-817-502-10.
7. JIRKOVSKÁ, M. Histologická technika : pro studenty lékařství a zdravotnické techniky. Semily : Galén, 2006. 80 s. ISBN 80-7262-263-4
8. JUNQUIERA, L.C.; CARNEIRO, J.; KELLEY, R.O. Základy histologie : 1. vydání. Jinočany : HH, 1997. 502 s. ISBN 80-85757-37-7.
9. KNOZ, J; OPRAVILOVÁ, V. Základy mikroskopické techniky. 1. vydání Brno: Masarykova univerzita 1992. 195s. ISBN 80-210-0473-8.

10. KOCH, L.; LAMPROS, J.; DELONG, L.; CHEN, S.; WOOSLEY, J.; HOOD, A.
Randomized comparison of virtual microscopy and traditional glass microscopy in diagnostic accuracy among dermatology and pathology residents. *Human pathology*. 2009, 40, s. 662-667.
11. MAŇÁKOVÁ, E; SEICHERTOVÁ, A. *Metody v histologii*. Praha : Karolinum, 2002. 54 s. ISBN 80-0230-X.
12. MARTÍNEK, J; VACEK, Z. *Histologický atlas*. Praha : Grada, 2008. 136 s. ISBN 978-80-247-2393-8.
13. PINDER, K.; FORD, J.; OVALLE, W. A new paradigm for teaching histology in Canada's first distributed medical school . *Journal of Histotechnology*. 2009, 1, s. 107-113.
14. SLAVÍKOVÁ, J; ŠEVČÍKOVÁ, J. *Speciální barvicí a impregnační metody*. Brno : Institut pro další vzdělávání zdravotnických pracovníků, 1991. 46 s.
15. TONAR, Z. *Atlas kvantitativní histologie* [online]. Plzeň : Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni, 2008 [cit. 2011-04-11]. Dostupné z WWW: <http://ellipse.sk/Doc/atlas_kvantit_histologie_lowres.pdf>.
16. VACEK, Z. *Histologie a histologická technika 1. Díl - Histologie*. Brno : Institut pro další vzdělávání, 1996. 332 s. ISBN 80-7013-201-9
17. VACEK, Z. *Histologie a histologická technika 2. Díl - Histologická technika*. Brno : Institut pro další vzdělávání, 1996. 184 s. ISBN 80-7013-202-7
18. YOUNG, B; LOWE, J.S; STEWENS, A. *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas*. Churchill Livingstone : Elsevier, 2006. 448 s. ISBN 08-089-233-15.

19. Standardní pracovní postup. Znázornění buněčných a tkáňových struktur v histologických řezech. Jindřichův Hradec : Nemocnice Jindřichův Hradec, 1.6.2008. 25 s.

Klíčová slova

Histologie - Histology

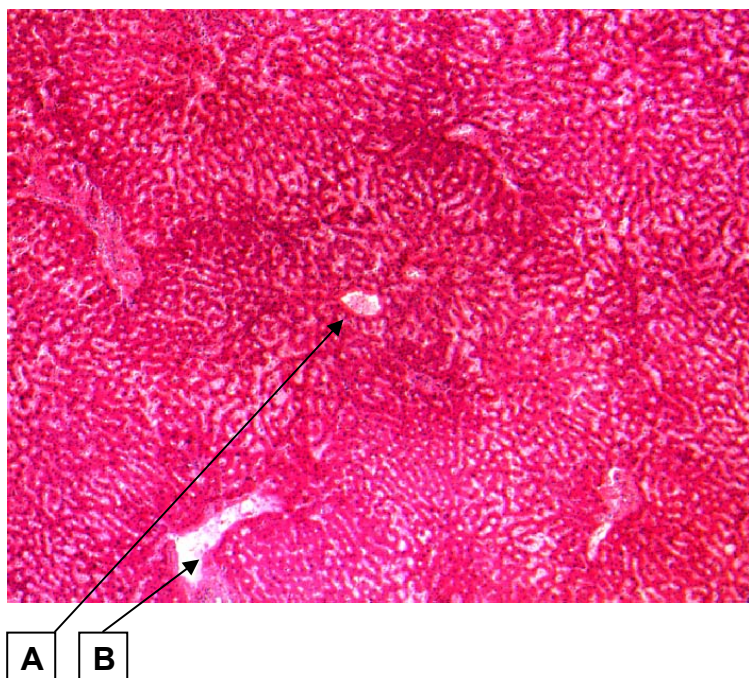
Mikroskopické preparáty - Microscopical preparation

Barvení - Staining

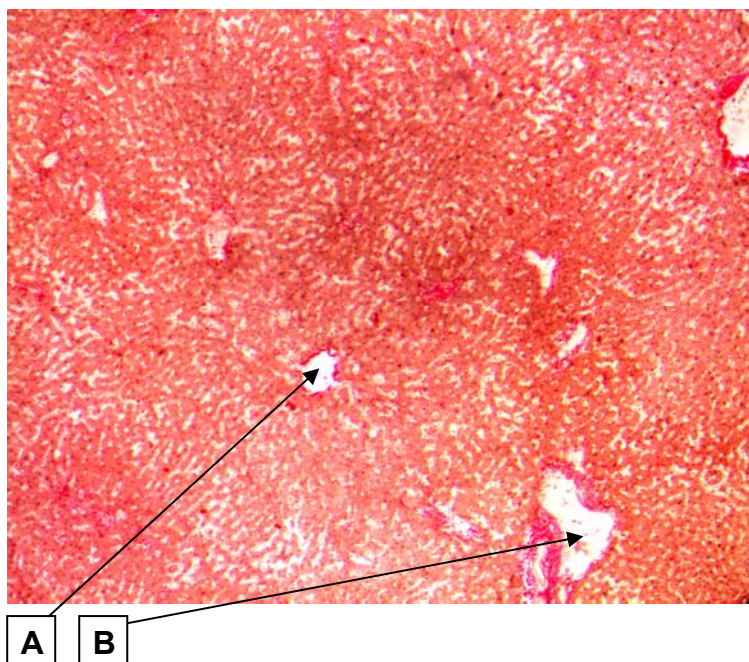
Mikroskopická technika - Microscopic technic

Histologická technika - Histological technic

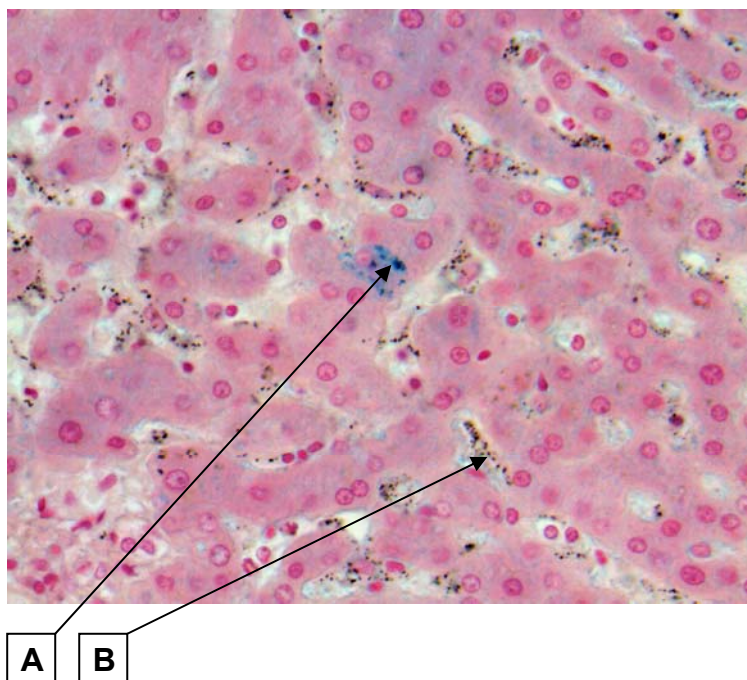
Přílohy



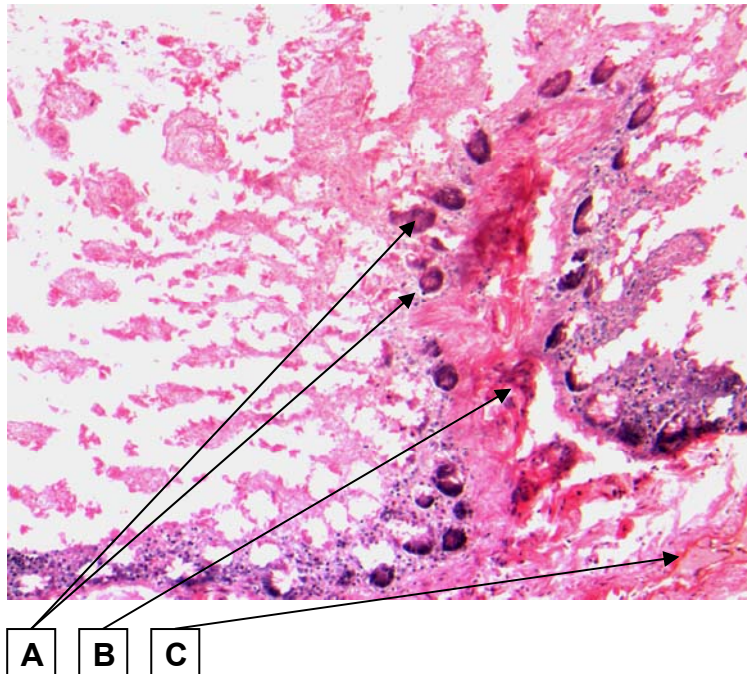
Obr. 14: Játra (Hematoxylin-eosin 5x); A= centrální žíla; B= portobiliární prostor
(zdroj: autor)



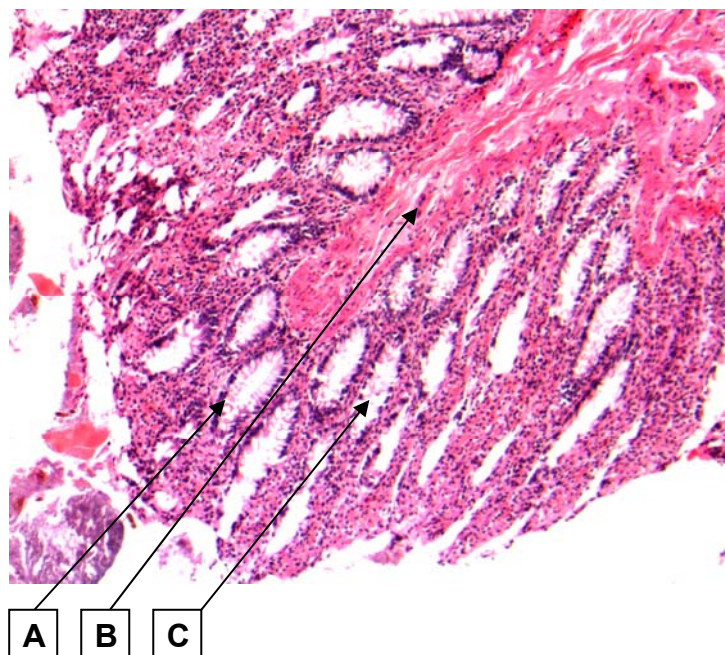
Obr. 15: Játra (Van Gieson 5x); A=centrální žíla; B=portobiliární prostor
(zdroj: autor)



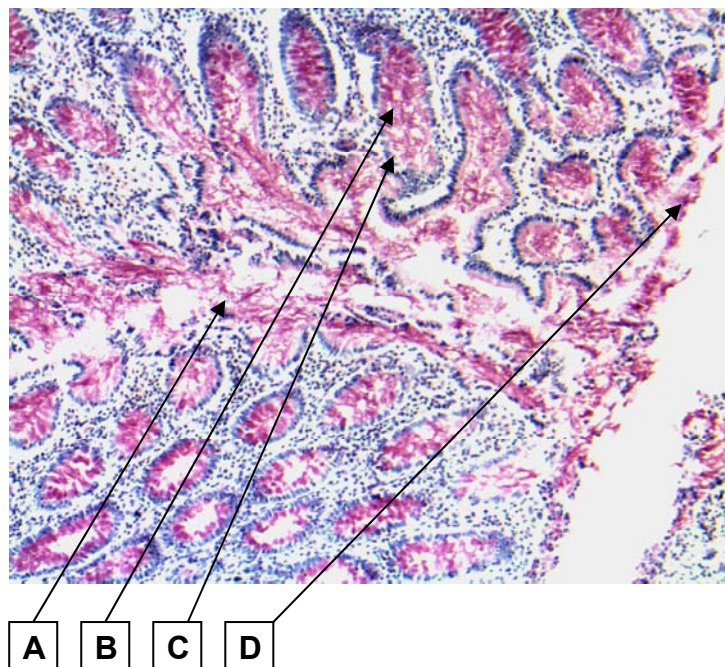
Obr. 16: Játra (Barvení na železo 40x); A=modře obarvené železo; B=formulový pigment
(zdroj: autor)



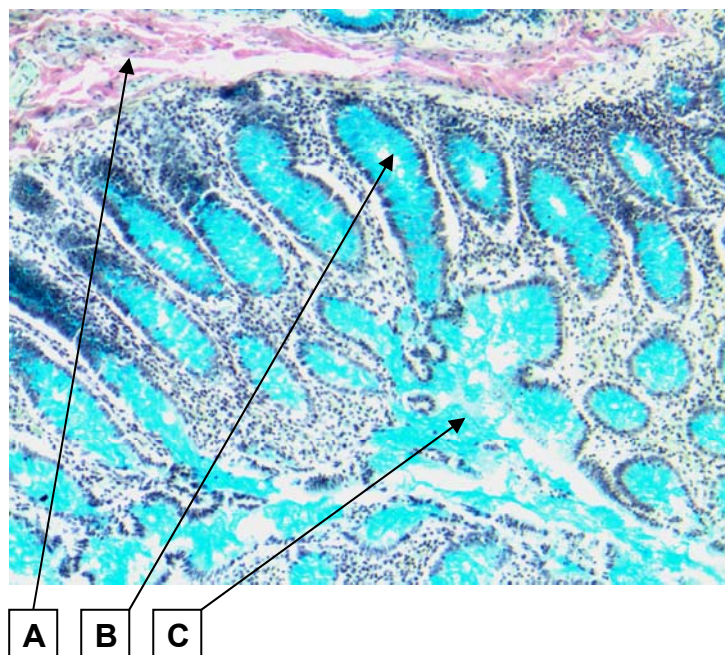
Obr. 17: Tenké střevo (Hematoxylin-eosin 10x); A=zbytky krypt; B=submukóza;
C=muskuláris
(zdroj: autor)



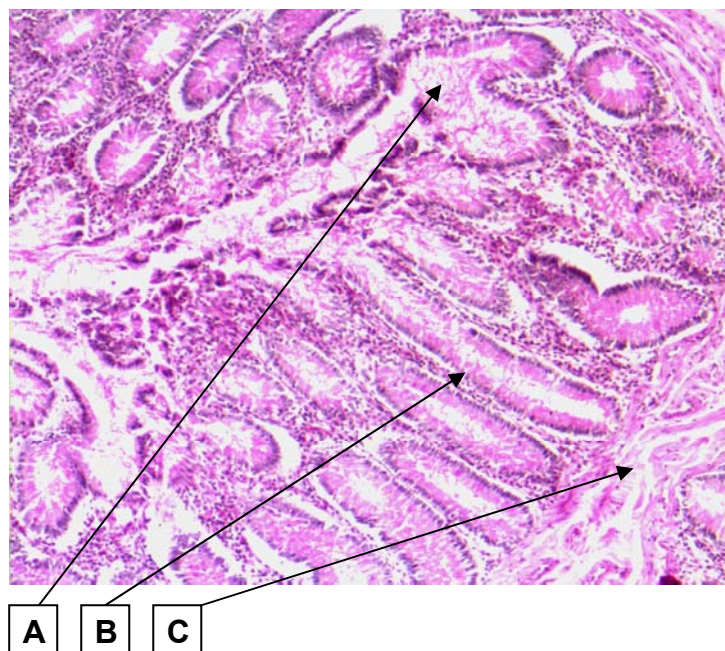
Obr. 18: Tlusté střevo (Hematoxylin-eosin 10x); A=pohárkové buňky; B=podslizniční vazivo
C=Lieberkühnova krypta
(zdroj: autor)



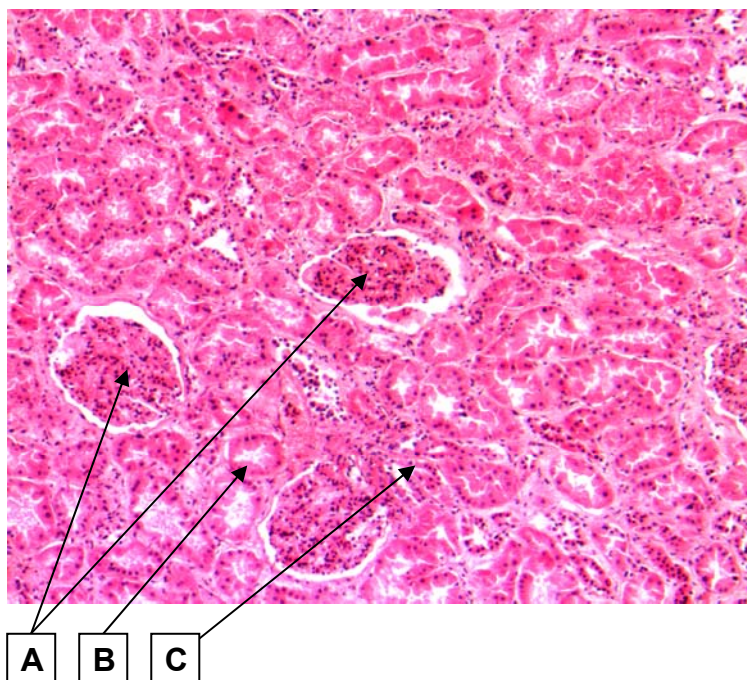
Obr. 19: Tlusté střevo (PAS reakce 10x); A=hlen; B=Lieberkühnova krypta; C=pohárkové
buňky s hlenem; D=povrchový epitel s hlenem
(zdroj: autor)



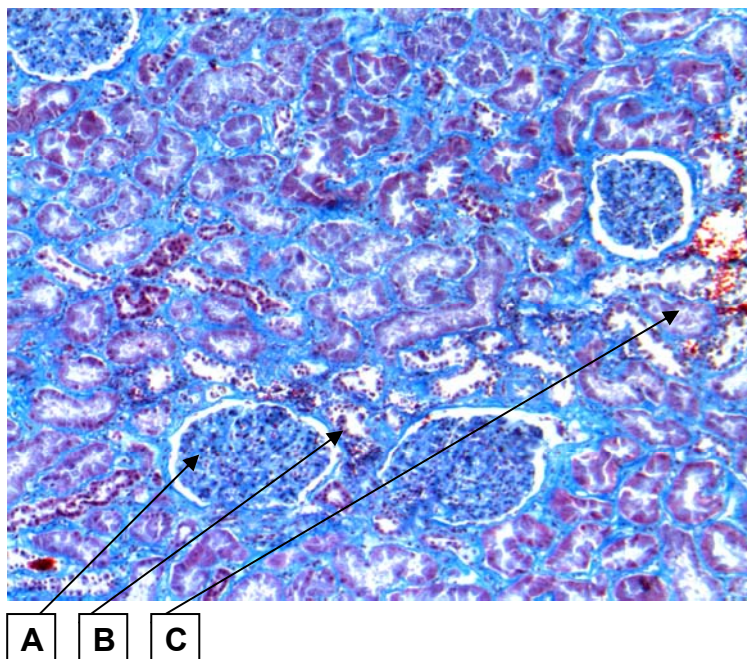
Obr. 20: Tlusté střevo (Alciánová modř 10x); A=podslizniční vazivo; B= Lieberkühnova krypta s pohárkovými buňkami; C=kyselé mukopolysacharidy
(zdroj: autor)



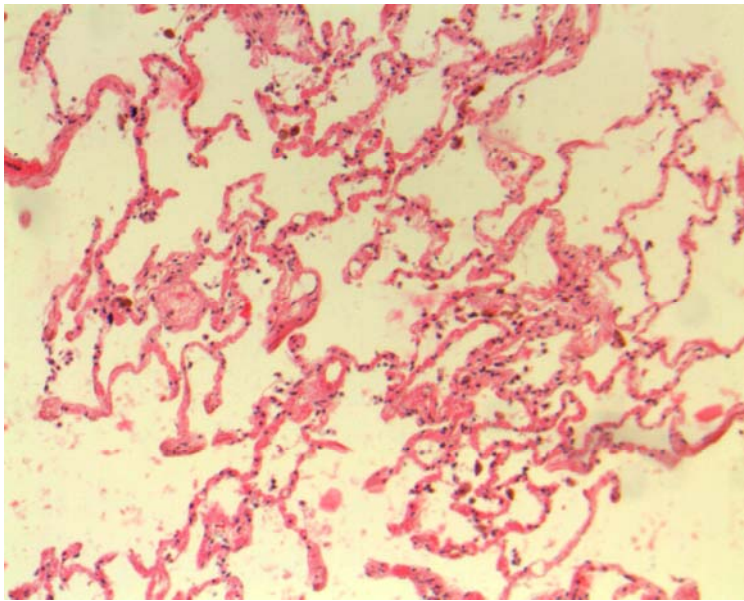
Obr. 21: Tlusté střevo (barvení na hlen 10x); A=hlen; B=Lieberkühnova krypta s pohárkovými buňkami; C=podslizniční vazivo
(zdroj: autor)



Obr. 22: Kůra ledviny (Hematoxyli-eosin 10x); A=glomeruly; B= distální tubulus;
C= proximální tubulus
(zdroj: autor)

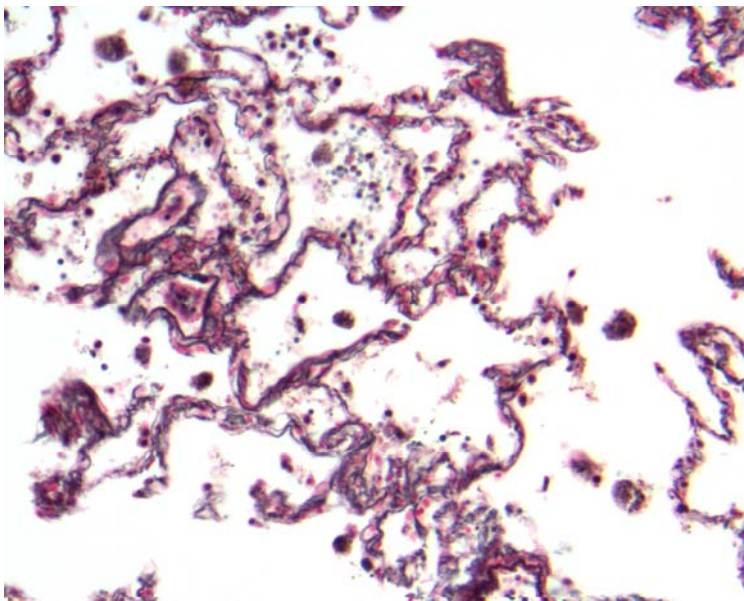


Obr. 23: Kůra ledviny (Modrý Massonův trichrom 10x); A=glomerulus; B=proximální tubulus; C= distální tubulus
(zdroj: autor)



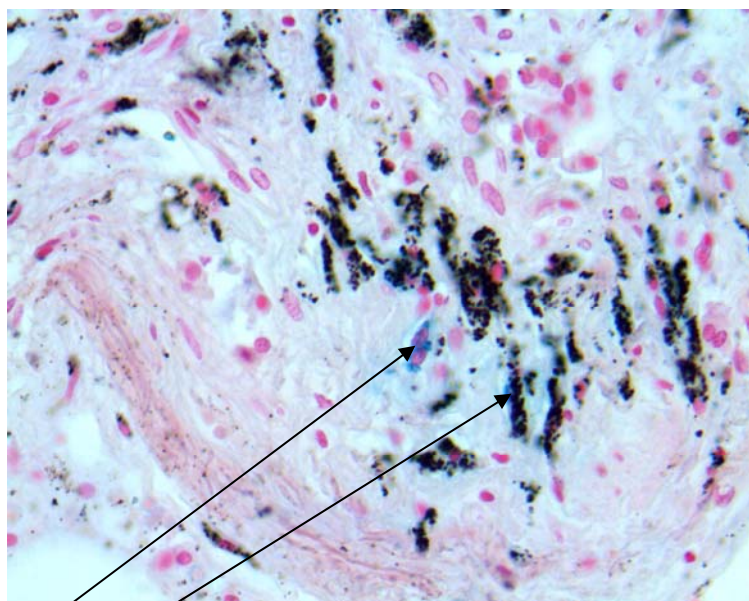
Obr. 24: Plíce (Hematoxylin-eosin 10x)

(zdroj: autor)



Obr. 25: Plíce (Weigertův resorcin fuchsin - elastika 20x)

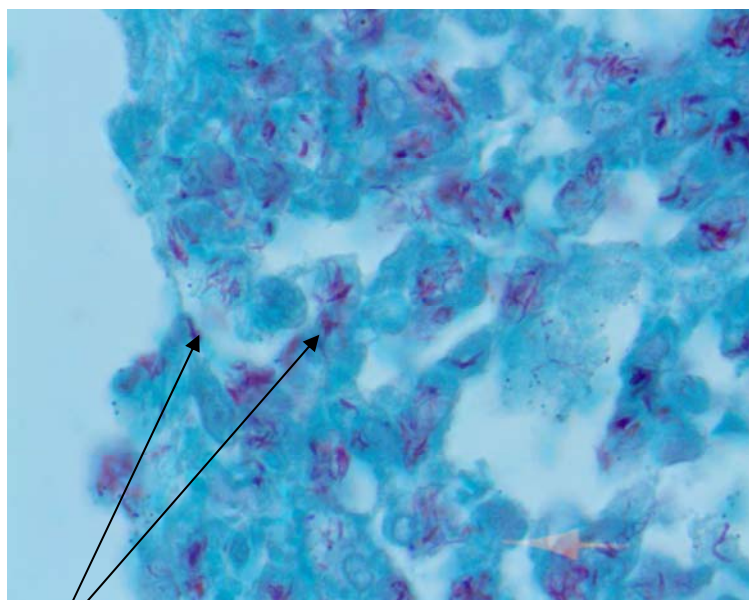
(zdroj: autor)



A **B**

Obr. 26: Plíce (Barvení na železo 50x); **A**=makrofág požírající železo; **B**=antrakotický pigment

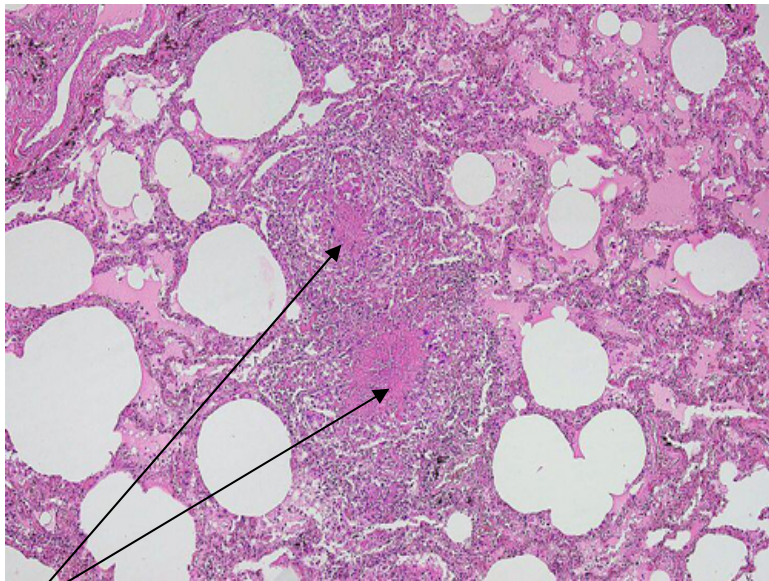
(zdroj: autor)



A

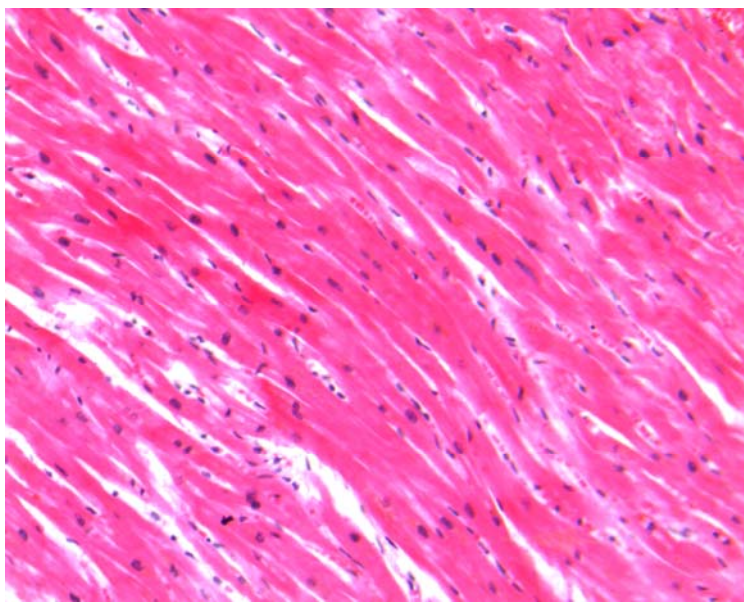
Obr. 27: Plíce napadená tuberkulózou (barvení pro průkaz acidorezistentních bakterií 100x);
A= mycobacterium tuberculosis

(zdroj: autor)

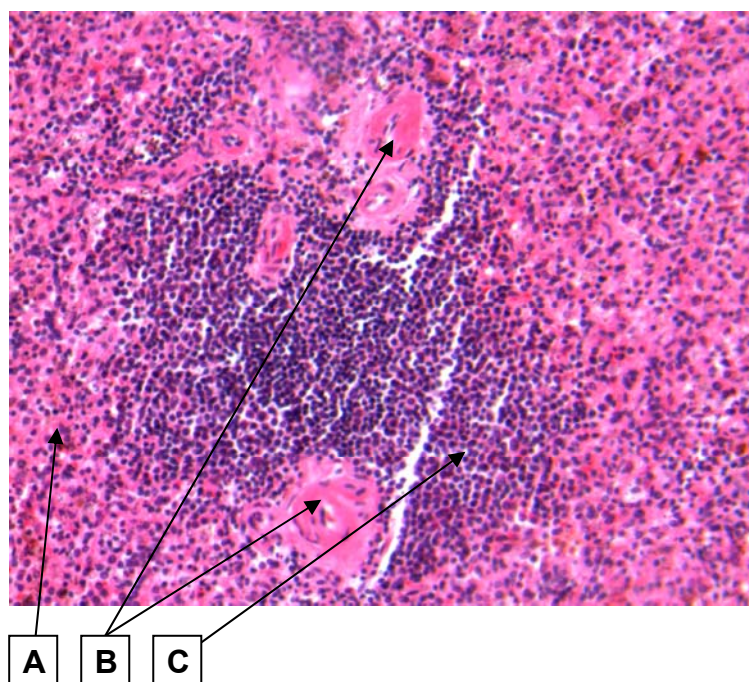


A

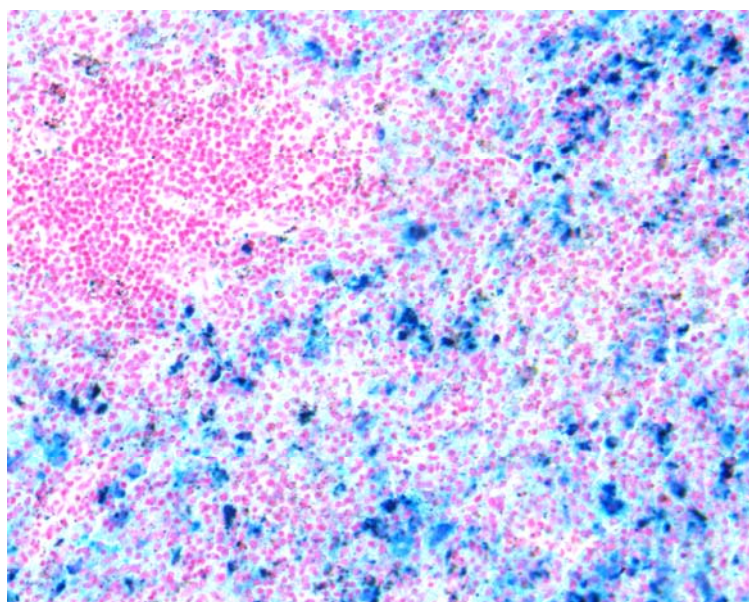
Obr. 28: Plíce miliární tuberkulóza (Hematoxylin-eosin 5x); A=miliární uzlíky
(zdroj: autor)



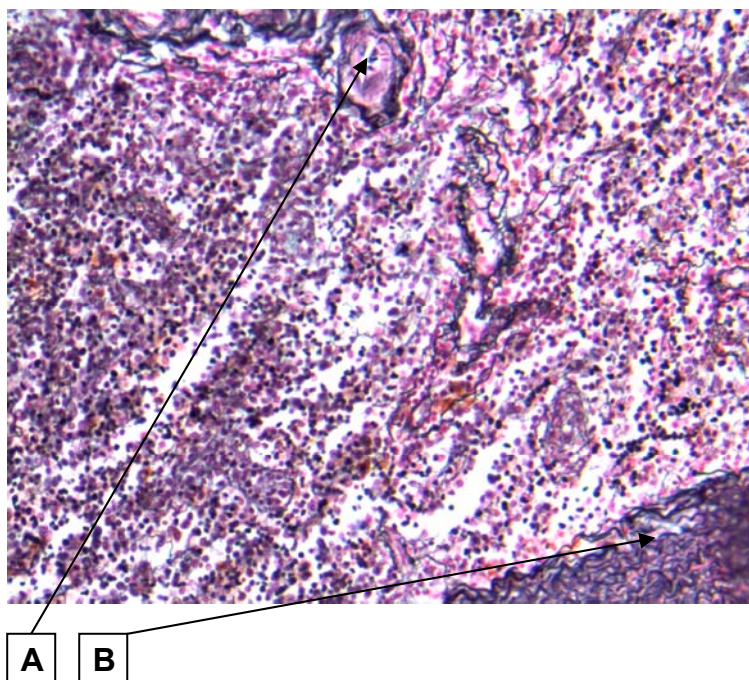
Obr. 29: Srdeční svalovina (Hematoxylin-eosin 20x)
(zdroj: autor)



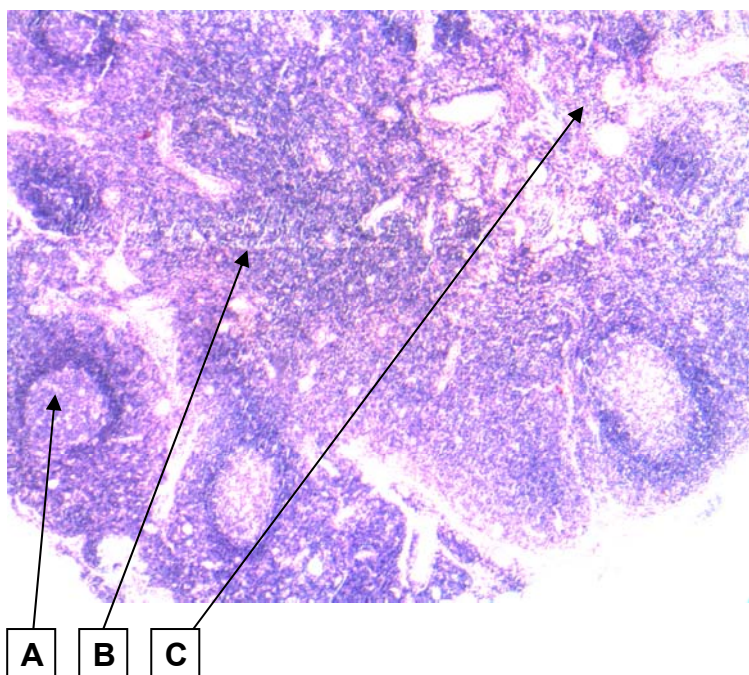
Obr. 30: Řez slezinou (Hematoxylin-eosin 20x); A=červená pulpa; B=arterioly; C=bílá pulpa
(zdroj: autor)



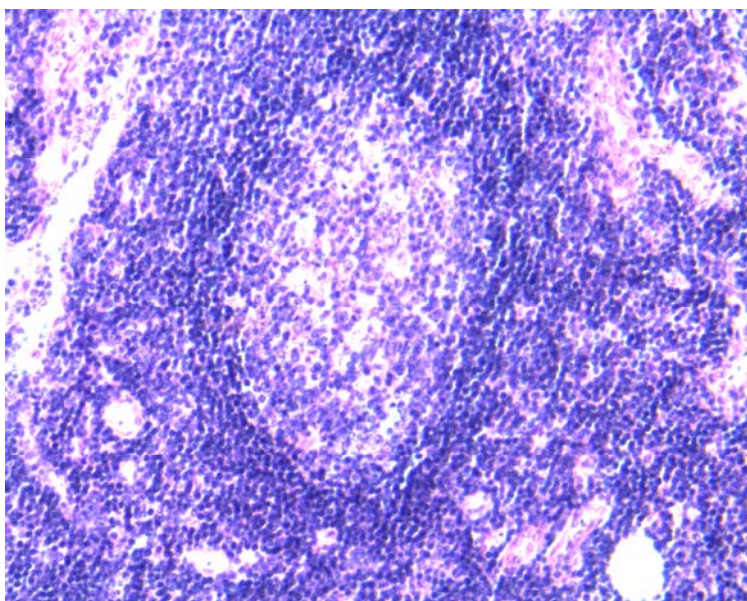
Obr. 31: Řez slezinou (barvení na železo 20x)
(zdroj: autor)



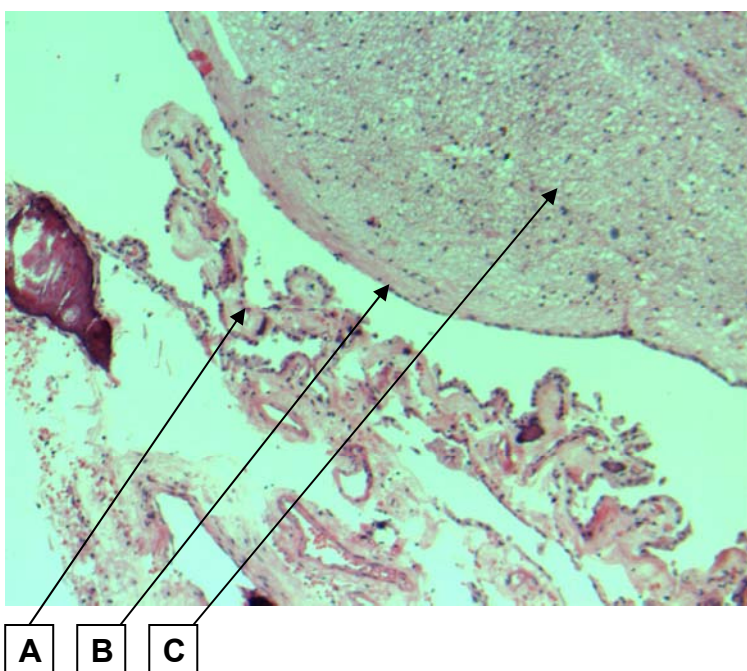
Obr. 32: Řez slezinou (Göméri 20x); A=splav; B=trámce
(zdroj: autor)



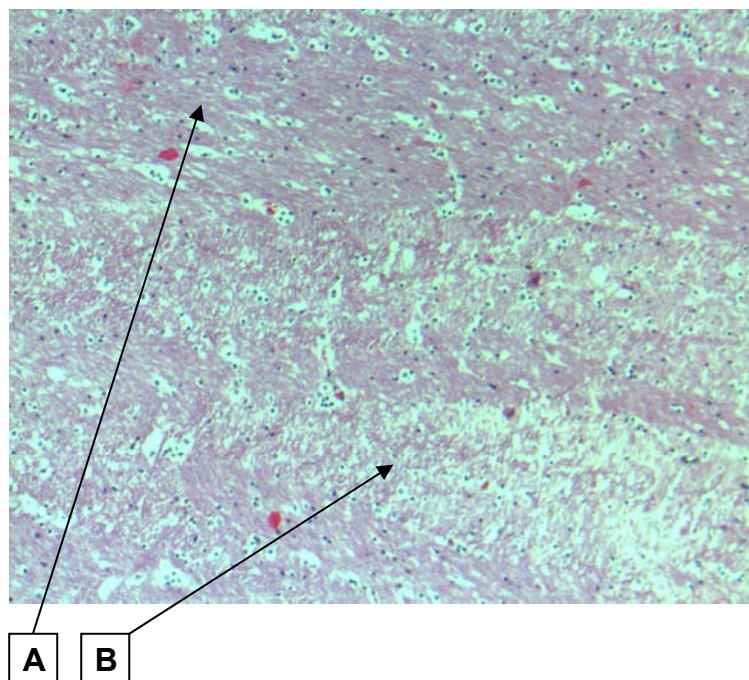
Obr. 33: Lymfatická uzlina (Hematoxylin-eosin 10x); A=lymfatický folikul v kůře uzliny;
B=sřeň uzliny; C=hilus s odvodnými lymfatickými cévami
(zdroj: autor)



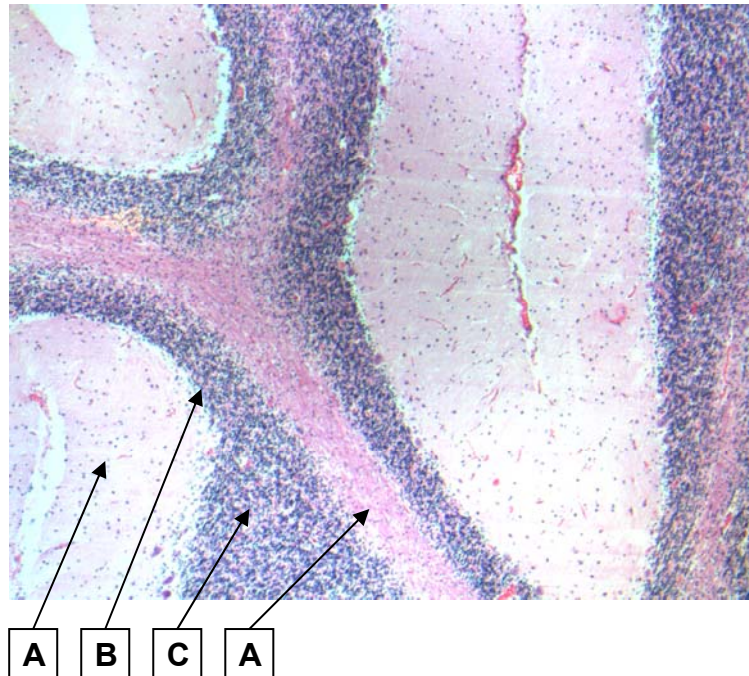
Obr. 34: detail lymfatického folikulu uzliny (Hematoxylin-eosin 20x)
(zdroj: autor)



Obr. 35: Řez mozkiem (Hematoxylin-eosin 10x); A=plexus choroideus; B=efendim; C=šedá hmota
(zdroj: autor)



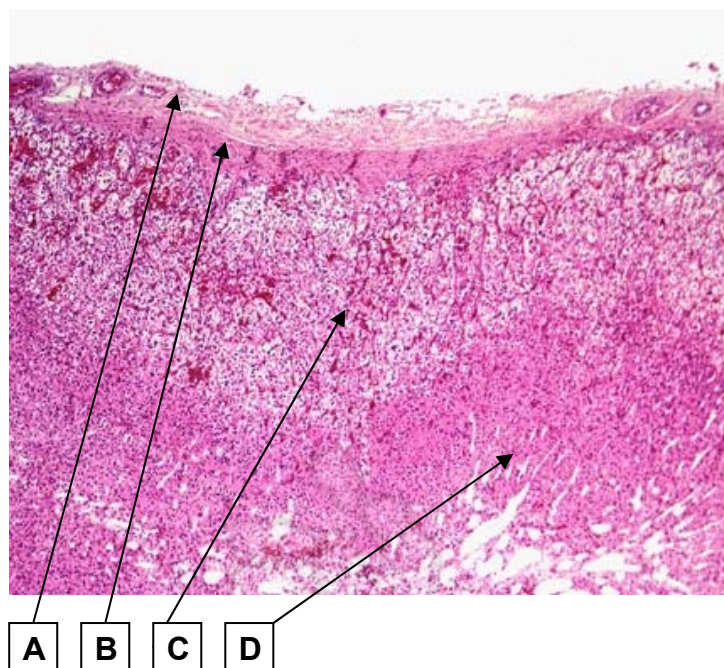
Obr. 36: Řez mozkem (Hematoxylin-eosin 20x); A=bílá hmota; B=šedá hmota
(zdroj: autor)



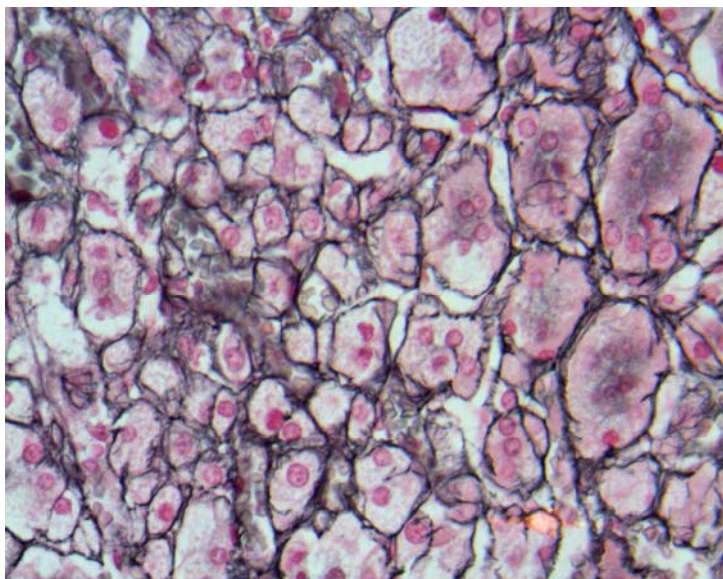
Obr. 37: Mozeček (Hematoxylin-eosin 5x); A=vrstva molekulární; B=vrstva turkyňových buněk; C=vrstva granulární; D=bílá hmota
(zdroj: autor)



Obr. 38: Mozeček (Hematoxylin-eosin 50x); A=vrstva molekulární; B=vrstva granulární; C=dendrit; D=purkyňova buňka; E=neurit
(zdroj: autor)

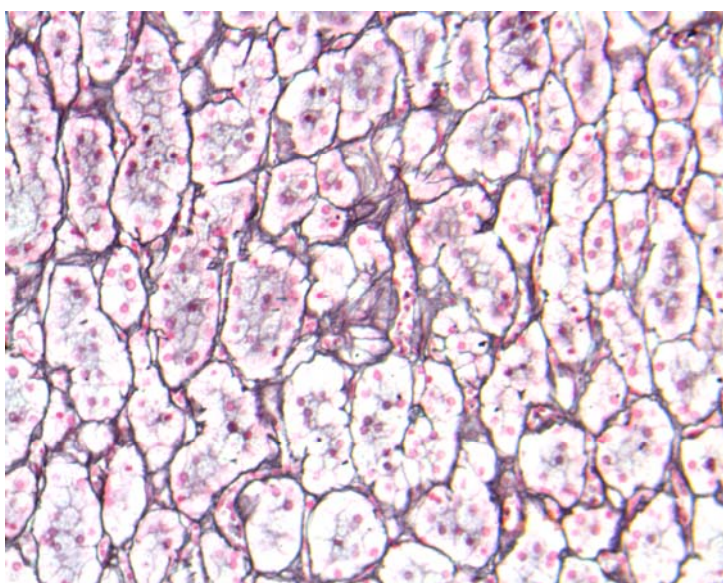


Obr. 39: Nadledvina (Hematoxylin-eosin 5x); A=zóna glomerulosa; B=zóna fasciculata; C=zóna reticularis; D=dřeň
(zdroj: autor)



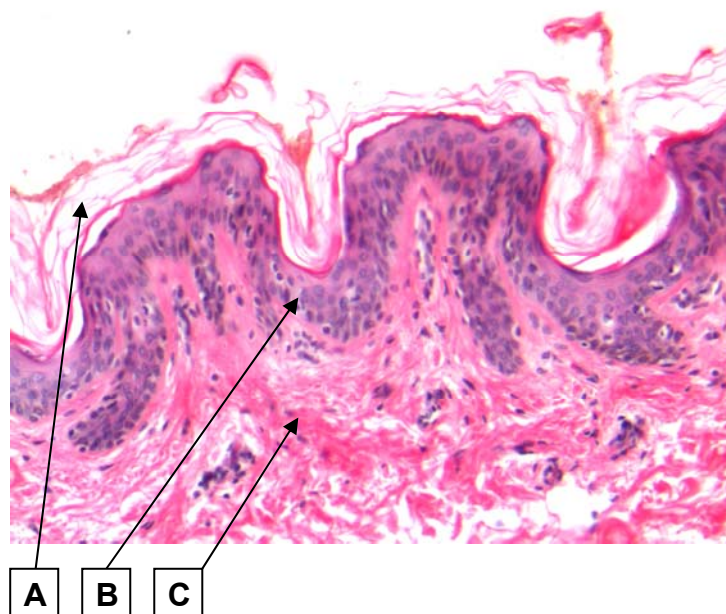
Obr. 40: Kůra nadledviny (Gömeri 20x)

(zdroj: autor)

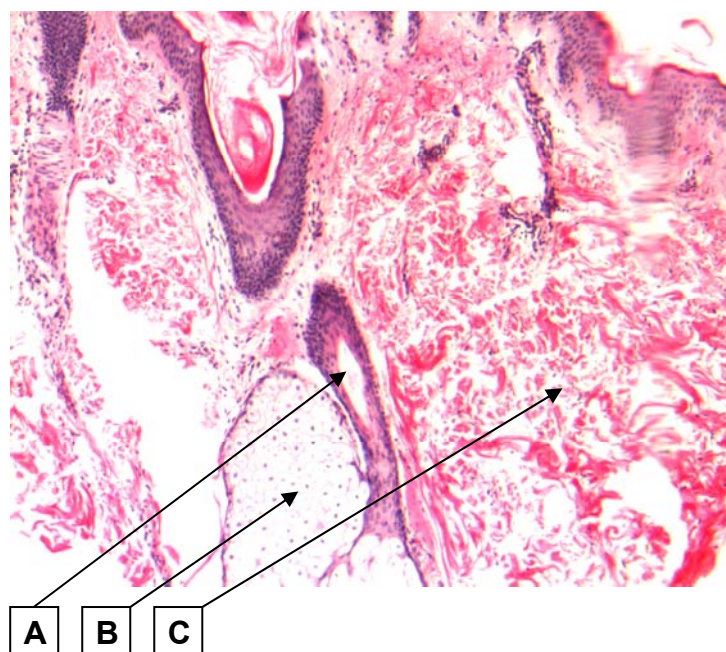


Obr. 41: Dřeň nadledviny (Gömeri 20x)

(zdroj: autor)



Obr.42: Kůže (Hematoxylin-eosin 10x); A= vrstva rohová; B=vrstva zárodečná; C=škára
(zdroj: autor)



Obr.43: Kůže (Hematoxylin-eosin 10x); A=vlasový folikul; B=mazová žláзка, C=škára
(zdroj: autor)