

Histologická technika 2

Mudr. Richard Becke

Fyzikální metody fixace

- Vysoké teploty : varem, suché teplo
- méně často využívané v histologii

- Nízké teploty : často využívané ,především
- v histochemii./ průkaz enzymů, lipidů /

- Zmrazovací metody / freezing methods /
- Tzn. rychle zmrazit kousek odebrané tkáně
- za velmi nízkých teplot

Zmrazovací metody

- V **histochemii** výborné pro průkaz enzymů a lipidů (histochemie prokazuje chemické látky v buňkách).
- Tekutý dusík, CO₂, isopentan, heptan – látky
- rychle zmrazí kousek
- odebrané tkáně
- **Cryotechnika**
 - / přístroj : cryocut /
 - Výhoda: rychlost výsledků
 - Možnost využít
 - v průběhu operace
 - Tzv. peroperační
 - biopsie



Chemické metody = **Fixační tekutiny**

- **Formol**
- **Bróm formol**
- **Bakerova tekutina**
- **Bouinova tekutina**

- **Tekutiny se sublimátem:**
- **Susa**
- **Zenkerova tekutina**
- **/ jodování /**
- **100 % ethanol**
- **Aceton**

Formol : je nejvíce používaný

- Je 40 % roztok formaldehydu v vodě,
- to je 100 % formol.
- Nutno naředit **na 10 % roztok** / tedy 4%
- roztok formaldehydu /.
- Kys. mravenčí / HCOOH / vzniká na světle, proto :
- Láhev z tmavého skla a neutralizovat :
- **CaCO₃ – 10% neutrální formol**

- **Doba fixace : 24 – 48 hodin**

Bakerova tekutina

- Složení:
- 10 % formol
- CaCl_2
- Voda
- Výborná fixační tekutina pro průkaz lipidů

3/ Kombinace Fyz. a Chemických metod.

- Znamená podchladiť si fixační tekutinu.
- Např. Aceton : je lepší fixační tekutinou
- podchlazený na 0 – 4 st.Celsia.
- Další fixační tekutiny – viz tabule - rotunda

Zalévání tkání

- Proč se tkáň musí zalít ?? Za účelem
- zkrojení tkáně na tenké řezy.
- Nejpoužívanější médium je parafín

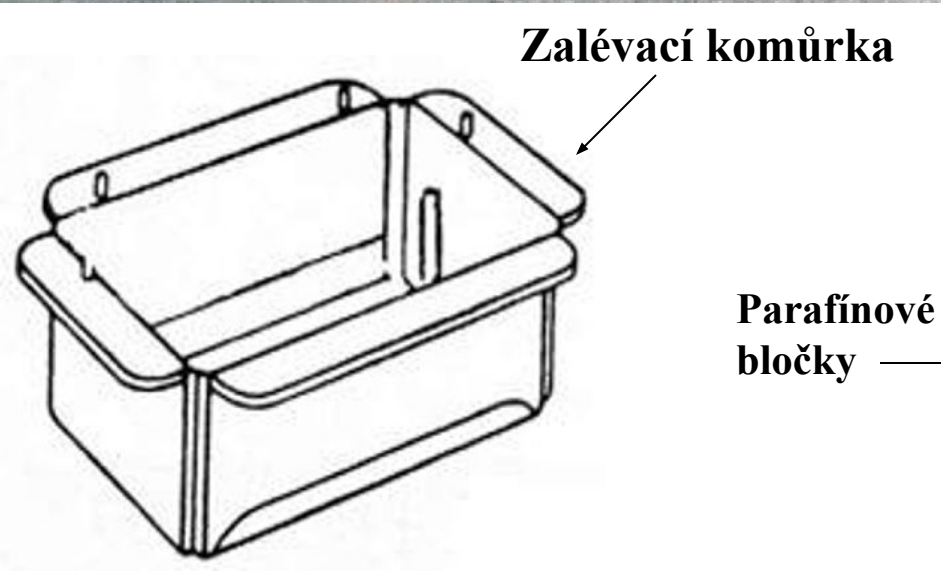
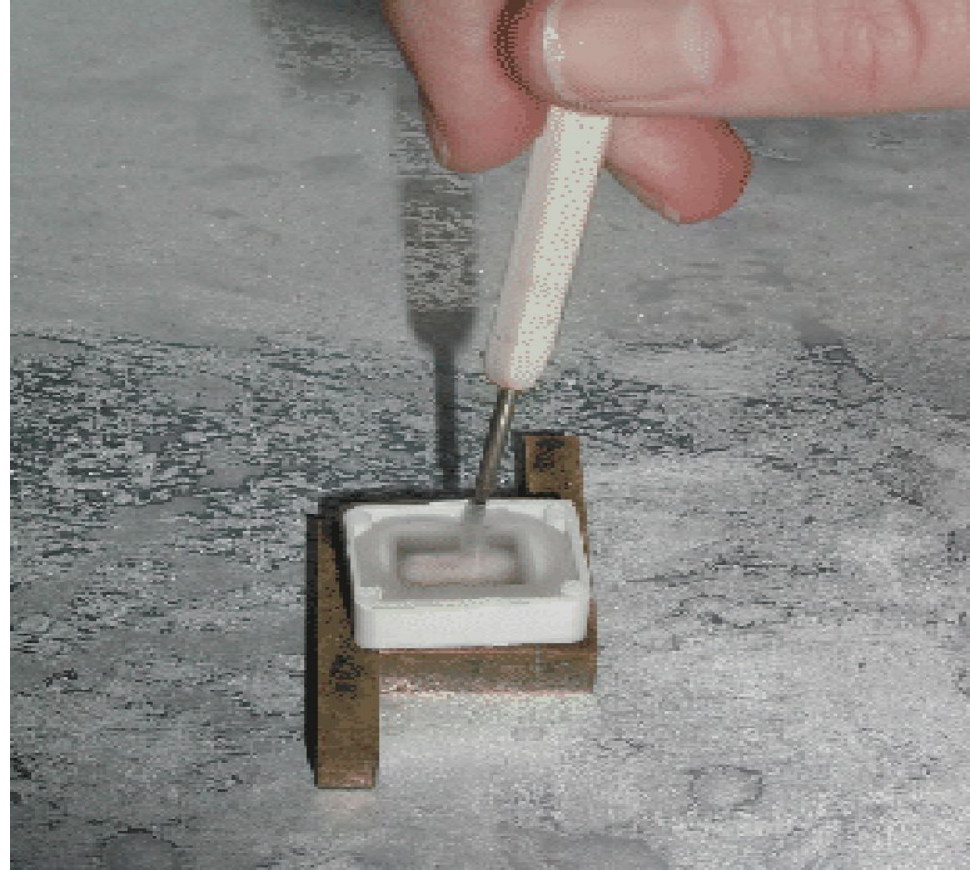
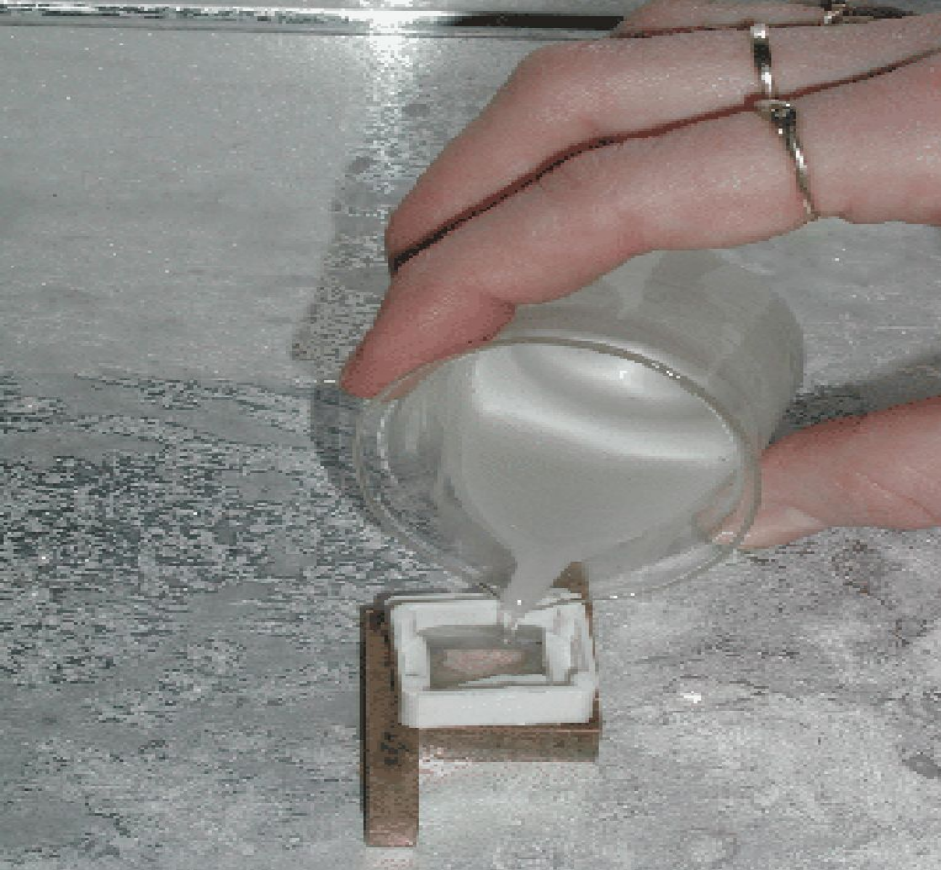
- 1/ Odvodnění
- 2/ Prosycení intermediem
- 3/ Prosycení parafínem
- 4/ Vlastní zalití

Odvodnění a Intermedium

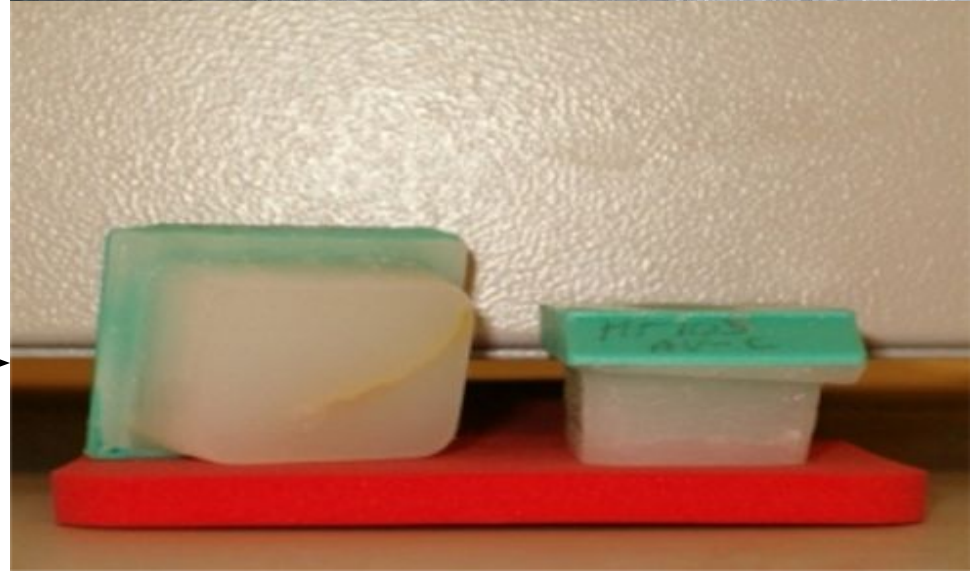
- Odvodnění se provede
- vzestupnou řadou
- alkoholů./30%,50%,70%,
- 80%,96%/
- Nahradit vodu v tkáních postupně až
- 100 % ethanolem.
- Parafín je s vodou
- nesmíselné medium.
- Intermedium je látka
- smíselná s 100% alkoholem a zároveň se v ní rozpouští parafín.
- Benzen,xylene,toluen.
- Metylsalicylát,metylbenzoát.
- Např. 3 lázně benzenu
- po 15 minutách

Prosycení parafínem, **Zalití**

- Teplota u parafínu:
- **56 – 58 st.Celsia.**
- 3 lázně zkvalitněného
- parafínu./+ včelí vosk /
- Postupně se do tkáně
- dostává parafín.
- **Zalévací komůrka**
- Teplota 56 – 58 st.C.
- Přenést tkáň do parafínu.
- Tvrzení / ochlazení / parafínu.
- Přitmelí se na dřevěný nosič
- **Výsledek : parafínový**
- **bloček .**



Parafínové
bločky →



Další zalévací medium

- **Celoidin** / nitrát celulózy rozpustný v alkohol éteru – princip – odpaří se /.
- Dobré zalévací medium pro tzv . tvrdé tkáně / **chrupavka, kost, zub** /.
- Výhoda : zalévá se při pokojové teplotě
- Nevýhoda : zalévání trvá dlouho – několik týdnů.
- **Zalévací média rozpustná ve vodě** : želatina, vosky rozpustné ve vodě, umělé pryskyřice / glycolmetakrylát /, celodal / derivát močoviny /

Krájení řezů

- Mikrotom – přístroj k krájení řezů
- 2 základní typy: sáňkový mikrotom
- rotační mikrotom
- Výsledek : ukrojený tenký řez / 5 – 10 um / z parafínového bločku a přenesený a přilepený na podložní sklo
- / směsí glycerol – bílek, poly – L - lysine /

Přístroje pro zpracování histologického materiálu



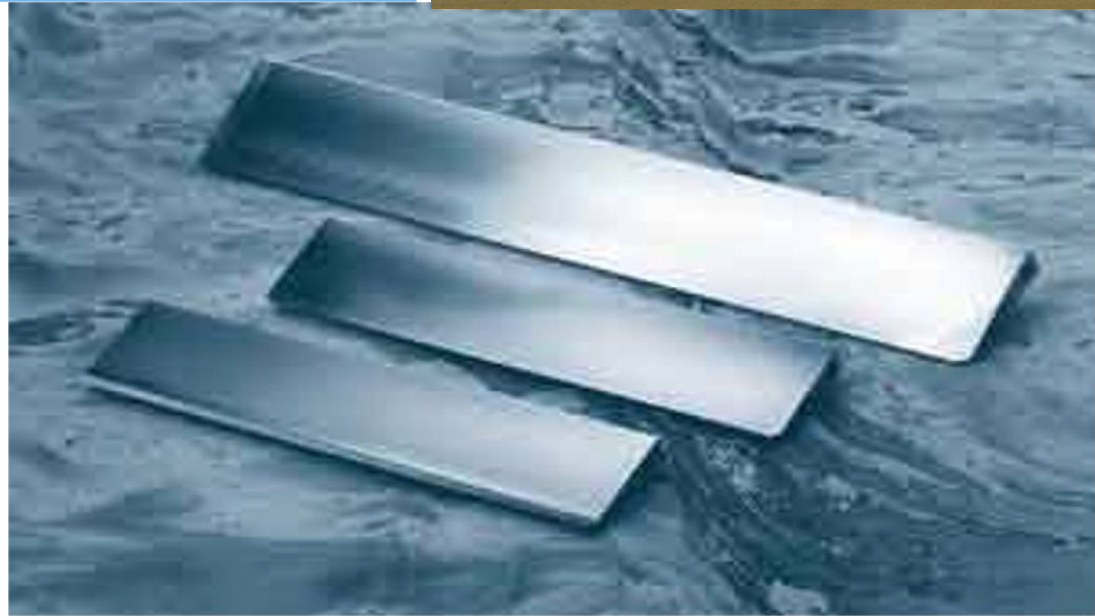
Odvodňovací automat
(autotechnikon)



Rotační
Mikrotom



Rotační mikrotom



Mikrotomové nože

Přilepení a napnutí parafinových řezů



Elektricky vyhřívaná ploténka

Barvení řezů

Barvivá : přírodní ,syntetická

Basická barviva :

- Hematoxylin
- Toluidinová modř
- Thionin
- Methylenová violet'
- Basický fuchsin
- Methylénová modř

• Kyselá barviva:

- Eosin
- Anilínová modř
- Světlá zeleň
- Oranž G
- Šafrán
- Pikrofuchsin

BARVENÍ

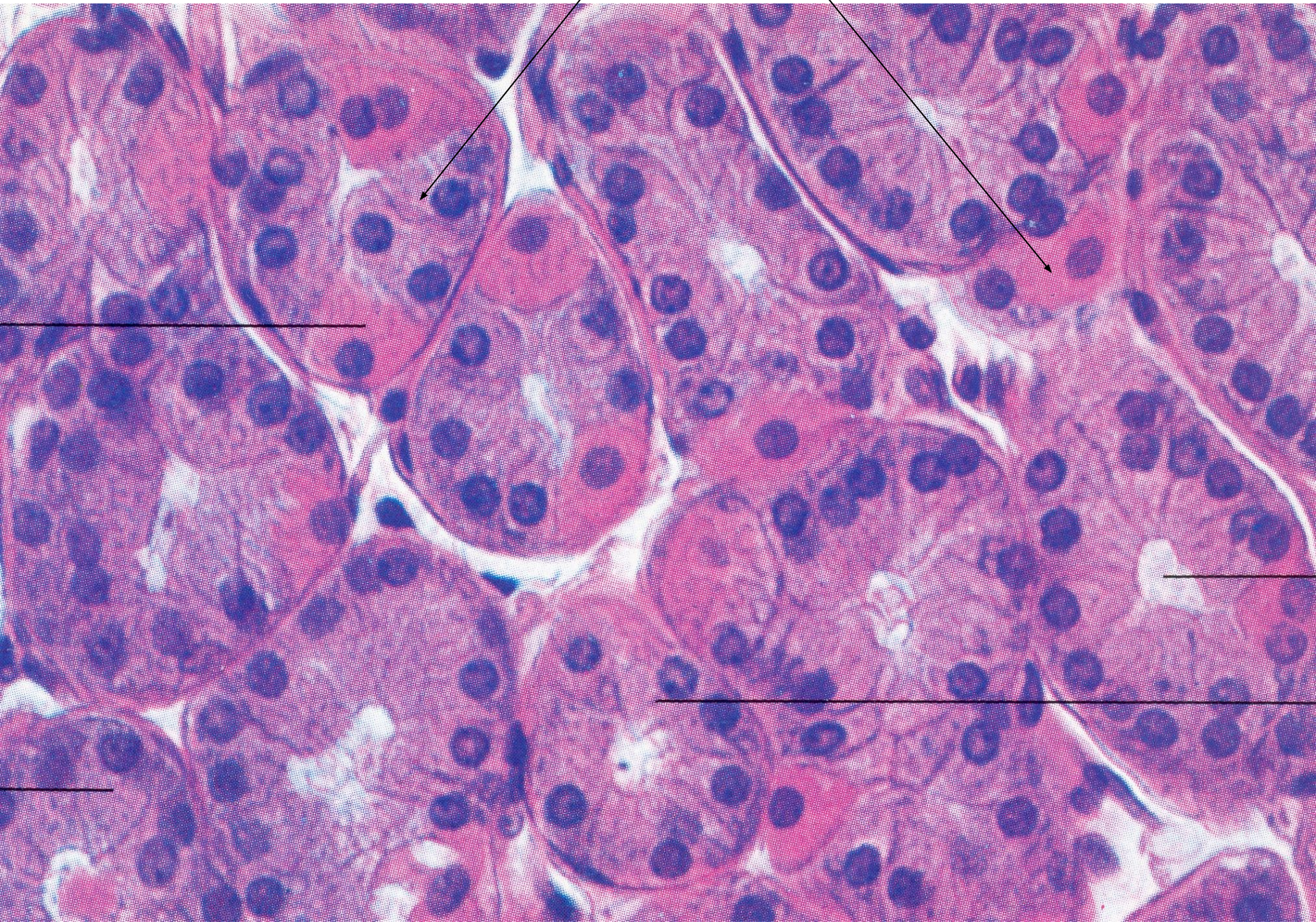
BASICKÁ (kationtová) — kladný náboj na barevné části, reagují s aniontovými skupinami struktur buněk a tkání
metylenová modř, toluidinová modř, thionin, (hematoxylin)
BASOFILIE, **BASOFILNÍ STRUKTURA**

KYSELÁ, ACIDICKÁ (aniontová) - záporný náboj na barevné části barviva, reagují s kationtovými skupinami struktur
eosin, světlá zeleň, anilinová modř, pikrofuchsin, oranž G
ACIDOFILIE, EOSINOFILIE, OXYFILIE,
EOSINOFILNÍ STRUKTURA

Struktury, cytoplasma v buňkách

- 1/ basofilní / jádro/, ribosomy, GER: podmiňují basofilii cytoplasmy
- 2/ eosinofilní / lysozomy, mitochondrie :
 - podmiňují eosinofilii cytoplasmy
- 3/ neutrofilní / granula – leukocyty /

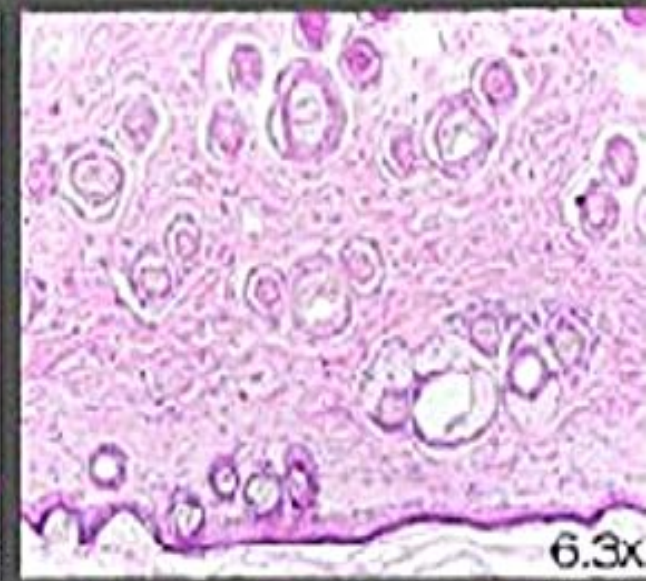
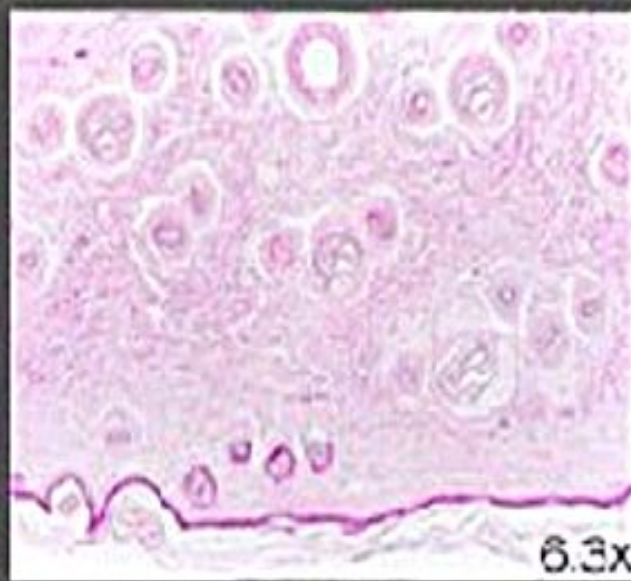
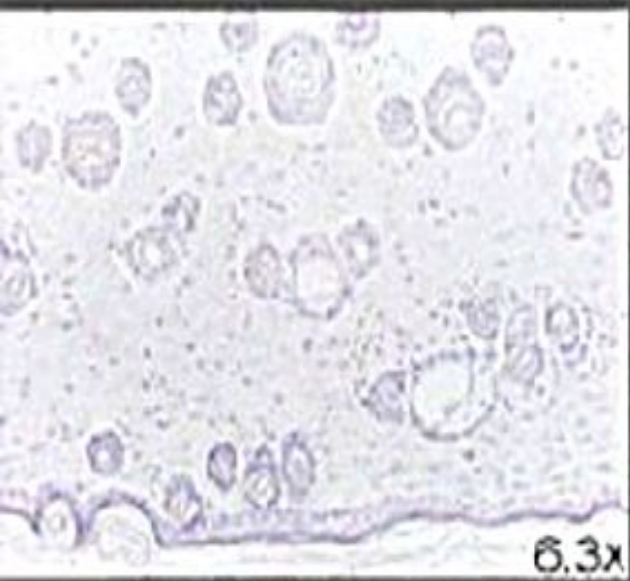
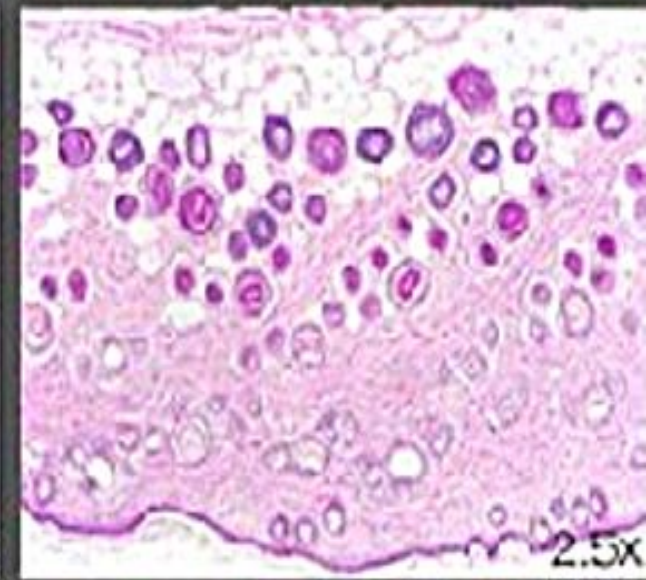
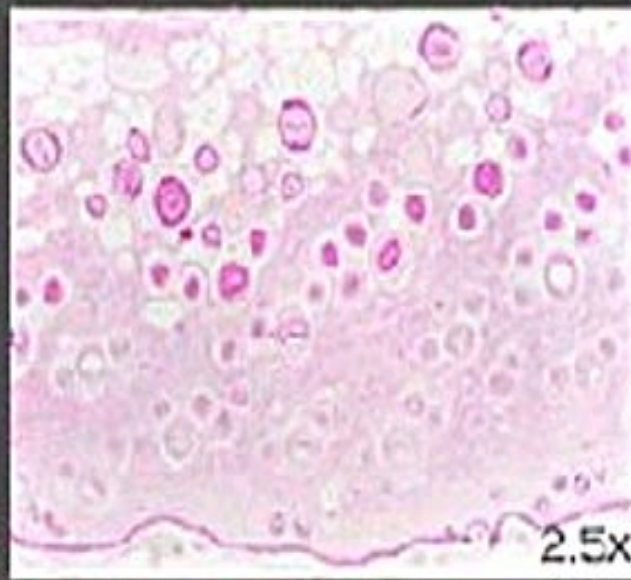
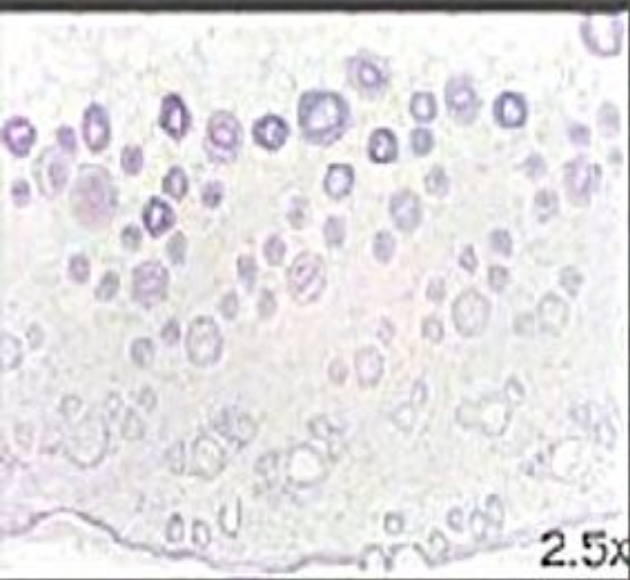
Basofilní cytoplasma , eosinofilní cytoplasma



Metoda Hematoxylin - Eosin

**Tato přehledná barvicí metoda
patří mezi nejpoužívanější
Viz – tabule v rotundě**

Barvení hematoxylinem - eosinem



Hematoxylin

Eosin














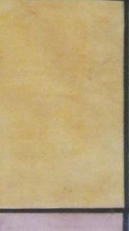










Hematoxylin & Eosin

Přehledné barvicí metody

- 1/ Hematoxylin – eosin
- 2/ žlutý trichróm
- 3/ zelený trichróm
- 4/ modrý trichróm
- 5/ metoda AZAN
- 6/ metoda van Gieson
- Viz obrazová tabule v rotundě

ZÁKLADNÍ METODY BARVENÍ A JEJICH VÝSLEDKY

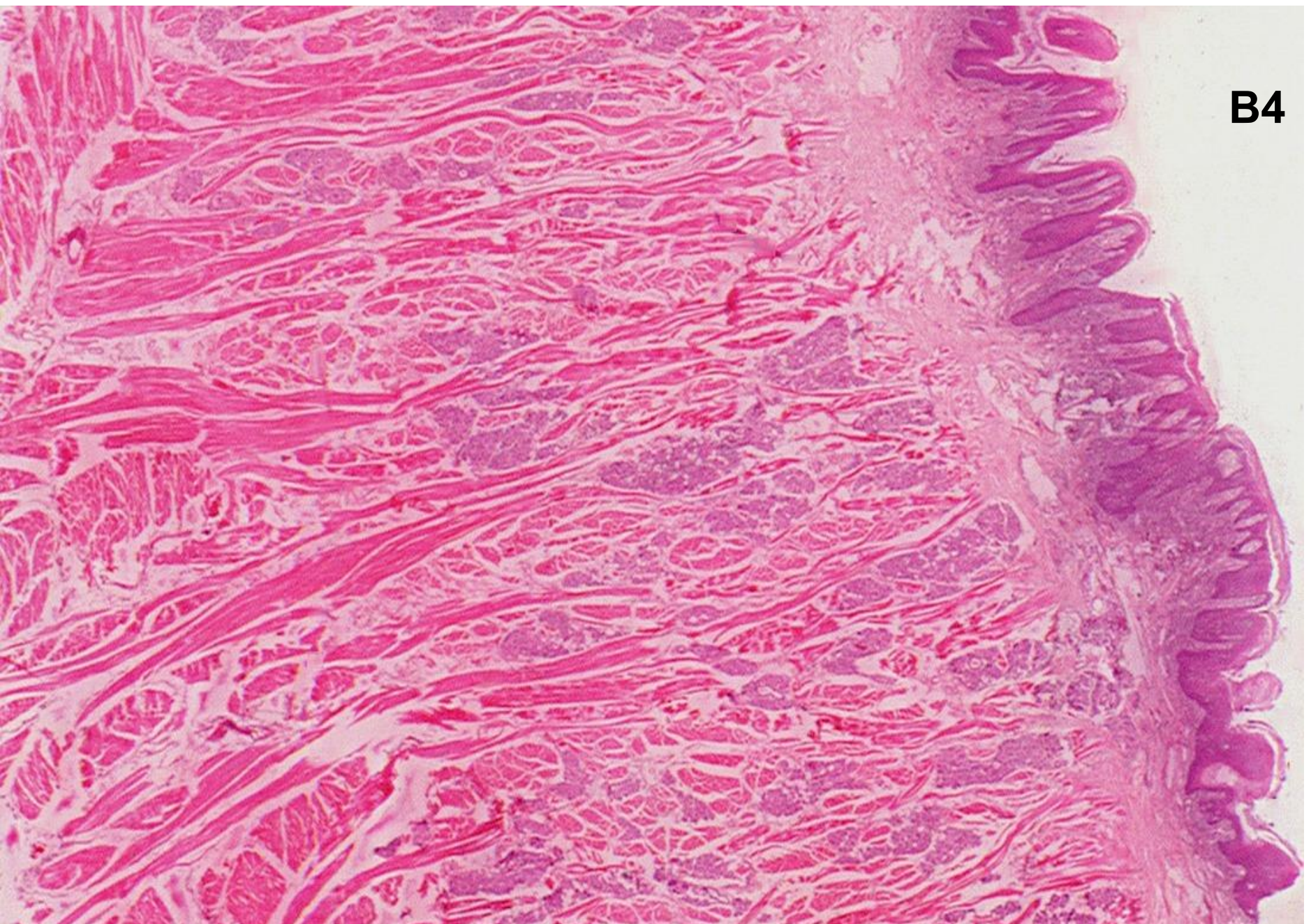
· JÁDRA · CYTOPLASMA · VAZIVO · SVALSTVO · ERYTROCITY ·

<p>Hematoxylin eosin</p>						
<p>Žlutý trichrom (Masson) Hematoxylin-eosin- -šafrán</p>						
<p>Modrý trichrom (Masson) Hematoxylin-k.fuchsin- -ponceau-anilínová modř</p>						
<p>Zelený tri- chrom (Masson) Hematoxylin-k.fuchsin ponceau-světlá zeleň- -oranž G</p>						
<p>Azan (Heidenhain) Azokarmín-oranž G- -anilínová modř</p>						
<p>Weigert- -van Gieson žel. hematoxylin W. pikrofuchsin</p>						

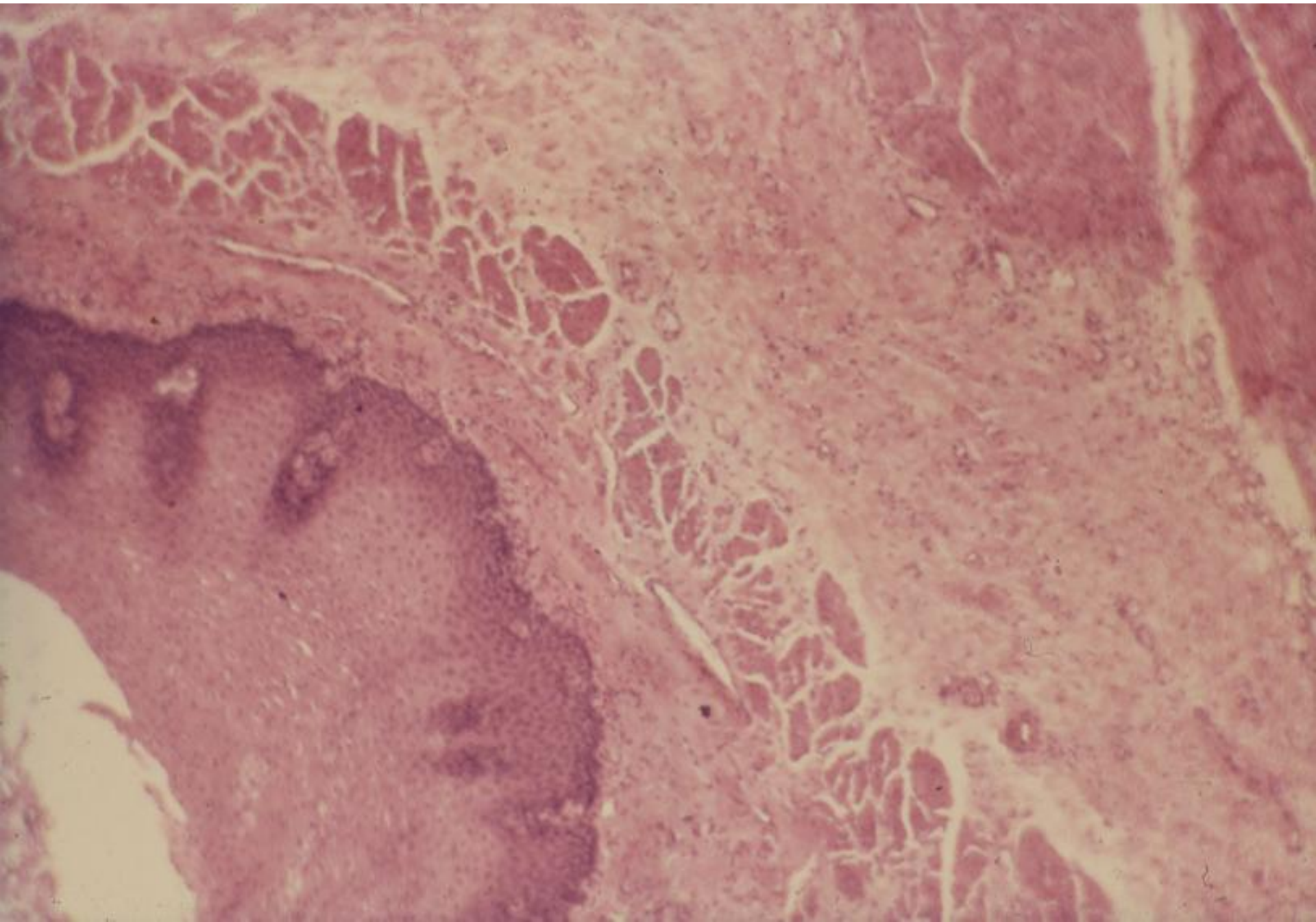
Montování řezů

- Je ve skutečnosti přilepení krycího sklíčka na obarvený řez.
- **Montovací média nerozpustná ve vodě**
- /např. kanadský balsám, Entalan, Solakryl/
- **Montovací média rozpustná ve vodě**/např. Apáthyho sirup/
- 2 důležité požadavky na mont. médium:
- průhlednost, a **index lomu jako sklo/ 1,5 /**

Jazyk, HE (kolagenní vazivo růžové, svaly červené)



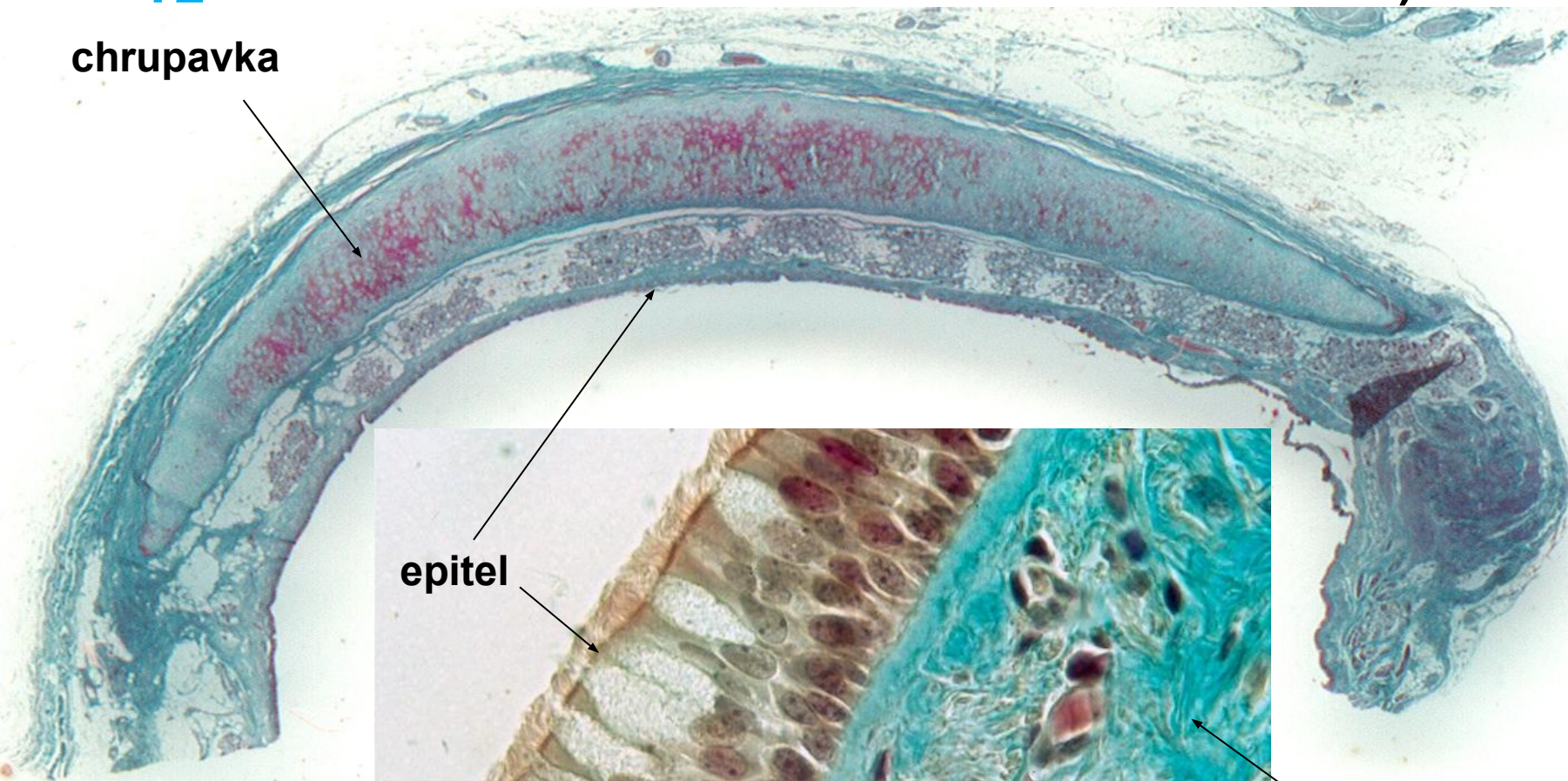
B4



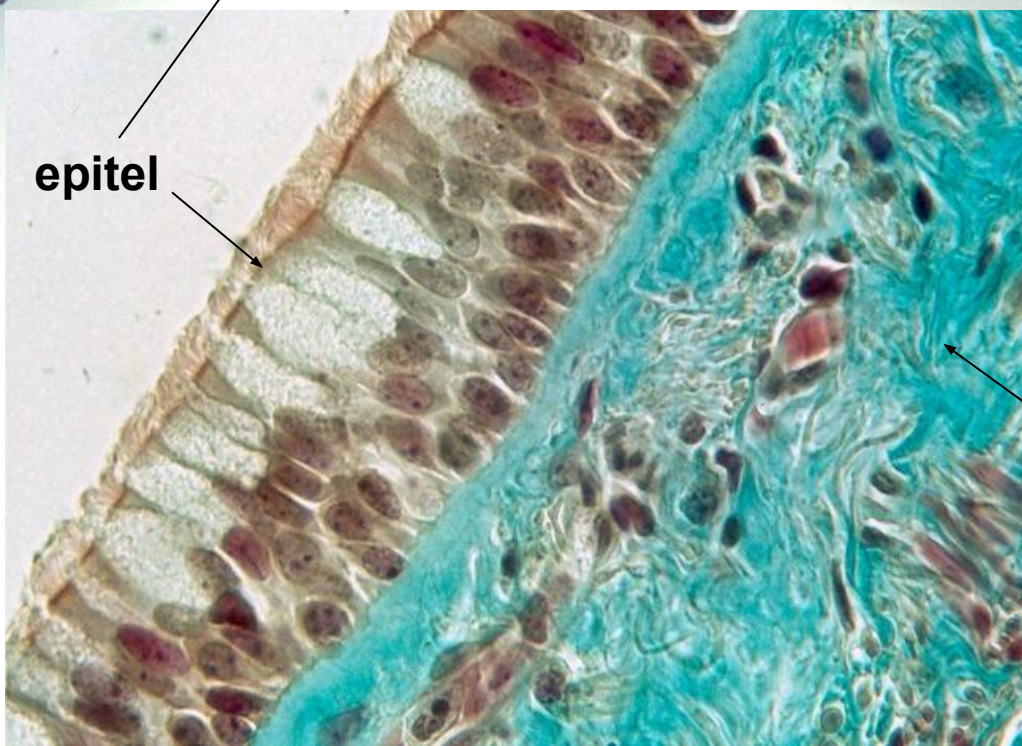
TRACHEA, zelený trichrom (světlá zeleň – kolagenní vlákna)

T2

chrupavka

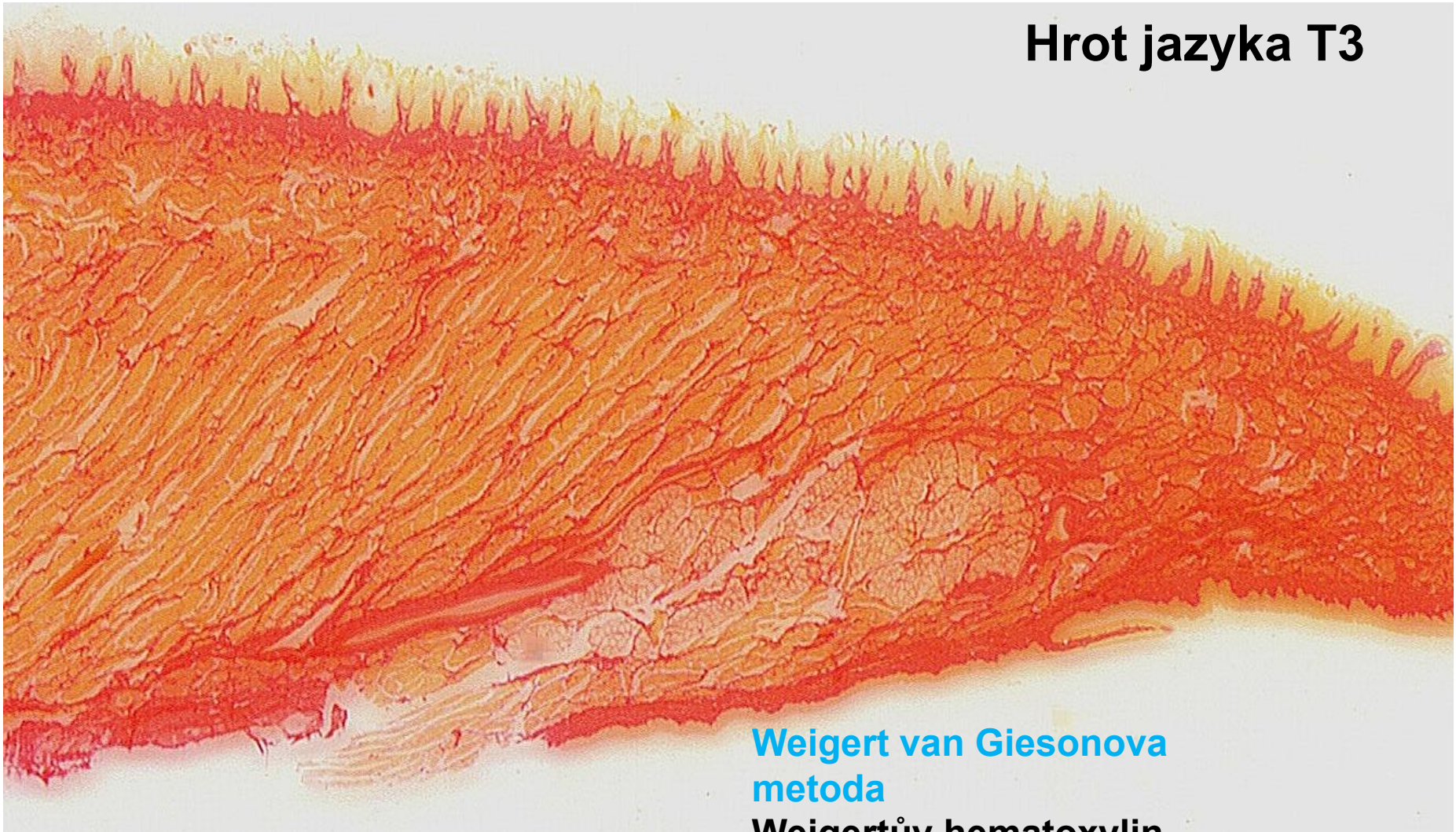


epitel



vazivo

Hrot jazyka T3



**Weigert van Giesonova
metoda**

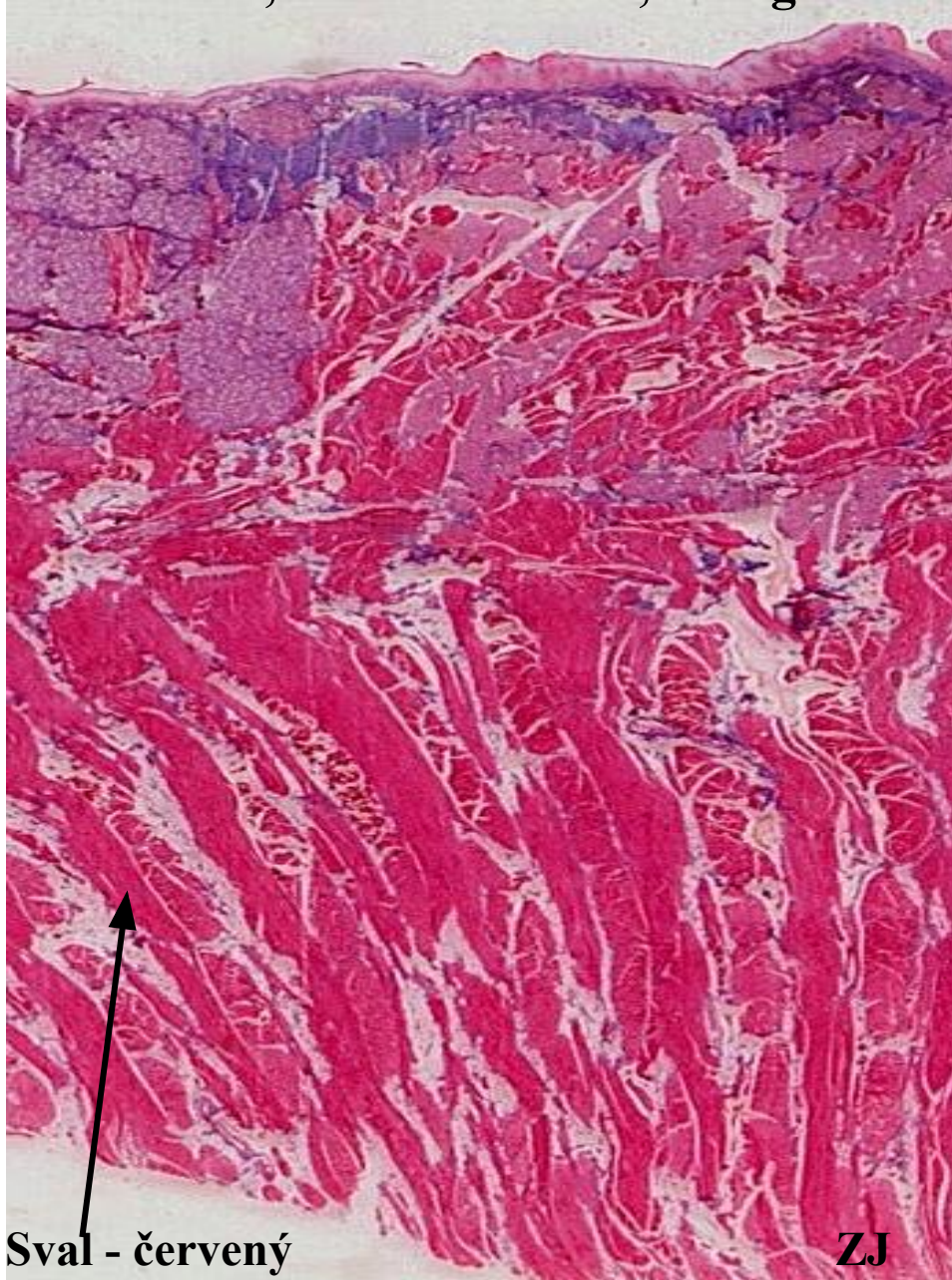
**Weigertův hematoxylin
pikrofuchsin**

Jádra – hnědá

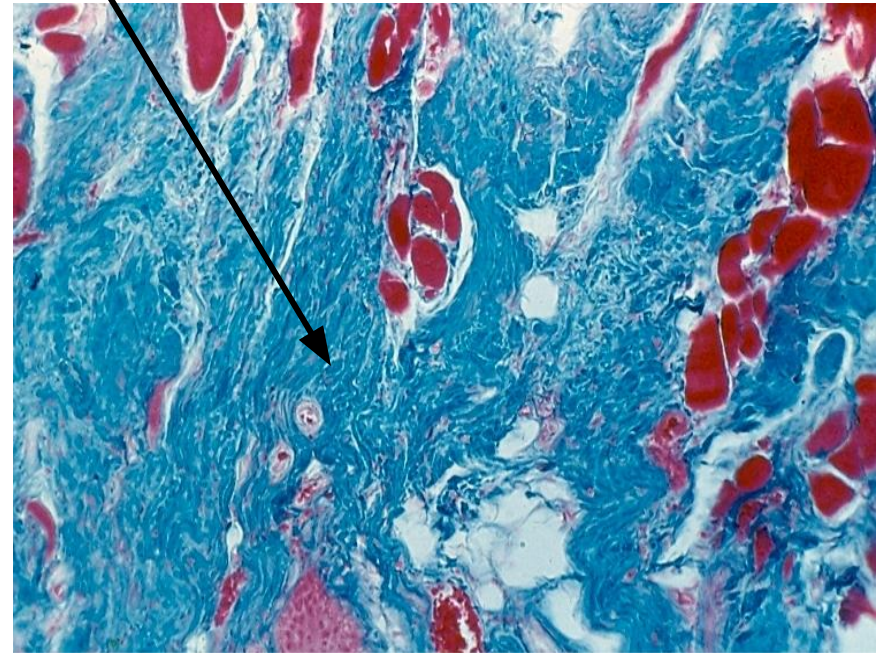
Kolagenní vlákna - červená

**Cytoplasma, svaly a erytro-
cyty se barví žlutě**

AZAN
azocarmine, anilínová modř, orange G



Kolagenní vlákna - modrá



Jádra - červená

Photomicrographs: Collection of ÚHIEM

