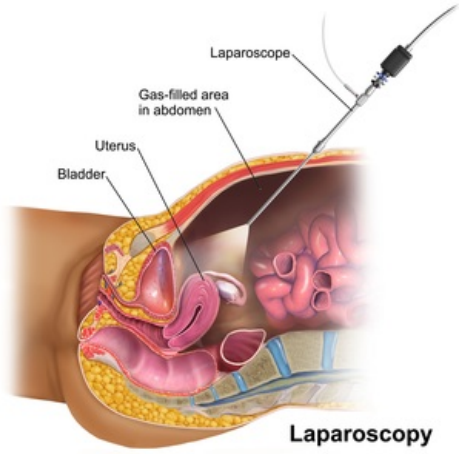
Zhotovení histologického preparátu

Histologický preparát zhotovujeme a zpracováváme histologickou technikou, abychom mohli prozkoumat mikroskopické struktury tkání, stanovit diagnózu a vyloučit případné patologie. Pro další práci s histologickými vzorky je nezbytně nutné je zafixovat, zalít, nakrájet, obarvit a zamontovat do sklíčka.

Fixace

Po odebrání tkáně pro histologické vyšetření se musí vzorek rychle fixovat, tedy konzervovat proti autolýze (působení vlastních enzymů, které může například znemožnit barvitelnost vzorku). Ošetření vzorku spočívá v ponoření tkáně do stabilizačního (fixačního) činidla neboli fixativu, která vyvolávají jemnou a šetrnou denaturaci enzymových proteinů.



Odběr histologického materiálu (laparoskopicky)

Fixací se předchází znehodnocení vzorku. Pro úspěšnou fixaci existují tři hlavní požadavky: šetrnost (dobré uchování struktury buněk a tkání), rychlost pronikání vzorkem a umožnění jeho dalšího zpracování. Fixační činidla mají samozřejmě své výhody a nevýhody. Některá šetrně denaturují proteiny, jiná naopak způsobují jejich shlukování. Proto byly vyvinuty fixační směsi, které mají co nejvýhodnější vlastnosti.

- *Bakerova tekutina* – obsahuje 10% formaldehyd, chlorid vápenatý a vodu. Nerozpouští tuky, proto je vhodná pro průkaz lipidů.
- *Bouinova tekutina* – obsahuje kyselinu pikrovou, formaldehyd, kyselinu octovou a vodu. Je vhodná pro průkaz polysacharidů, naopak se nehodí pro průkaz lipidů a proteinů.
- *Zenkerova tekutina* – chlorid rtuťnatý, dichroman draselný, síran draselný, kyselina octová a voda. Tvoří výjimku mezi fixačními tekutinami, poněvadž **neobsahuje formaldehyd.**

Dalším často používaným fixačním činidlem je **formaldehyd**, obvykle ve vodném roztoku o koncentraci kolem 4 % (40% vodný roztok formaldehydu se tradičně označuje jako „formol“). Používá se pro svou šetrnost a nízkou cenu.

V elektronové mikroskopii se používá oxid osmičelý, především kvůli zvýšení kontrastu struktur a jeho šetrným vlastnostem (proniká velmi pomalu do tkáně).

Fixace může být nejen chemická, ale i fyzikální – např. rychlé zmrazení tkáně, metoda freezing-drying, nebo mikrovlnné záření.

Zalévání tkání

Fixované vzorky je nutno nakrájet na tenké řezy. Aby bylo možno tkáň na mikrotomu nakrájet, musí být zakomponována do zalévacího média.


Vkládání vzorku tkáně do zalévacího automatu

Nejběžnějším médiem je **parafín**. Nehodí se pro tvrdé tkáně, např. pro zuby. Při zalévání pro účely elektronové mikroskopie se tkáně prosycují umělými pryskyřicemi.

Před zaléváním se vzorky odvodňují a projasňují. Odstranění vody se provádí **alkoholovými lázněmi vzestupné koncentrace**. Začíná se obvykle 70% a končí se 100% ethanolem, nicméně počáteční koncentraci volíme podle obsahu vody v tkáni. Poté se lázně nahradí rozpouštědlem, které se mísí se zalévacím médiem (pro zalévání do parafínu se používají benzen, xylen, toluen). Této fázi už říkáme projasňovaní, při ní se tkáň prosycená rozpouštědlem zprůsvitní.

Projasněná tkáň se přenese do parafínu roztaveného při hraniční teplotě 52 – 60 °C [1], kdy je parafín ještě tekutý a tkáň není poškozena. Rozpouštědlo se z tkáně odstraní třemi lázněmi a následně je nahrazeno parafínem. Poté již následuje vlastní zalití do zkvalitněného parafínu a tuhnutí (obvykle při pokojové teplotě).

Krájení řezů

Ztuhlý tkáňový bloček se přikrojením (trimováním) zbaví přebytku zalévacího média. Aby bylo možno vzorek správně zkoumat pod mikroskopem, je důležité nakrájet jej na velmi tenké řezy. Tkáně se krájí na tzv. mikrotomech (sáňkových nebo rotačních). Vzorky určené pro histochemické metody (často zalité do želatiny) se krájí na kryostatu (zmrazovacím mikrotomu). Vzorky určené pro elektronovou mikroskopii jsou krájeny na ultramikrotomech.

Řezy se krájí na nastavitelnou tloušťku – 1–10 μm (ideálně kolem 6–8 μm). Ultramikrotomy krájí kolem 0,02–0,1 μm. [2]

Řezy se poté přenesou na teplou vodní hladinu, kde se tzv. napnou a poté se přenesou na podložní sklíčko. Sklíčka s řezy se dají do termostatu, aby se zbavila vody.

Barvení řezů



Elektrický mikrotom

🔎 *Podrobnější informace naleznete na stránce Barvení ve světelné mikroskopii.*

Většina histologických struktur bývá bezbarvá, abychom mohli rozpoznávat jednotlivé tkáňové útvary, preparáty se obvykle musí obarvit.

Připravené řezy se prosycují nejčastěji parafínem, který je s vodou nemísitelný. Používaná barviva se obvykle rozpouští ve vodě nebo v alkoholu, proto je nutné tkáň parafínu zbavit. Tzv. deparafinace se provádí v xylenu, po kterém následuje **sestupná řada alkoholů** (tzv. zavodnění) se sestupnými koncentracemi (96 %, 80 %, 70 %). Po této proceduře je vzorek připravený k barvení.

Většina histologických barviv se chová jako kyselé nebo zásadité látky. Podle chemické afinity dělíme struktury na basofilní a acidofilní. Basofilní struktury (kyseliny) se barví bazickými barvivy - např. hematoxylinem. Typicky se jedná např. o jádro s DNA. Acidofilní struktury (zásady) se barví kyselými barvivy - např. eosinem - proto se někdy užívá také termín eosinofilní. Typicky acidofilní je cytoplazma.

BARVICÍ METODA	JÁDRO	CYTO PLAZ.	VAZ.	SVALY	ERYT ROC YTY	BARVIVA
H-E						
ŽLUTÝ TRICHOM						šafrán
MODRÝ TRICHOM						hematoxylin, anilínová modř, kyselý fuchsin
ZELENÝ TRICHOM						hematoxylin, kyselý fuchsin, světlá zeleň, oranž G
AZAN (HEIDENHAIN)						azokarmín, oranž G, anilínová modř
WEIGERT VAN GIESON						železitý hematoxylin, pikrofuchsin

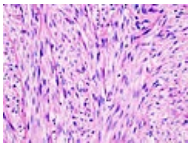
Barvicí metody

Nejčastěji používaná barvicí směs je:

- **hematoxylin** a **eosin** (HE) – hematoxylin barví modro-fialově, eosin růžovo-červeně. Jedná se o **přehledné barvení**.

Dále se používají **speciální barvení**, např.:

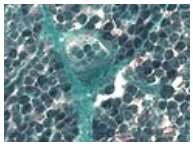
- **Massonovy trichromy** – žlutý, modrý a zelený, odliší kolagenní vazivo a sval;
- **alciánová modř** – zvýrazní glykosaminoglykany;
- **impregnace stříbrem** – barvení retikulárních vláken, neuronů a axonů, glií.



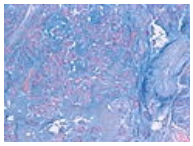
HE



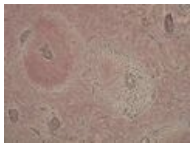
Massonův modrý trichrom



Massonův zelený trichrom



Alciánová modř



Impregnace stříbrem

Montování řezů

Poslední fází přípravy preparátu je přilepení krycího sklíčka. Před přilepením sklíčka se na tento řez kápne montovací médium, dříve často používaný kanadský balzám, dnes umělé epoxidové pryskyřice (nerozpustné ve vodě). V případě, že nelze preparát montovat médiem s organickým rozpouštědlem, využívá se médium na vodné bázi (např. glycerin).

Preparáty určené k elektronové mikroskopii se volně pokládají na kovové síťky (elektrony nemohou pronikat sklem).

Odkazy

Související články

- Odběr materiálu pro histologické vyšetření
- Zhotovení, barvení a vyhodnocení krevního nátěru
- Zpracování vzorků pro histologické vyšetření
- Biopsie
- Barvicí metody (1. LF UK)

Procvičování preparátů:

- Procvičování:Histologické barvení

Reference

1. MESCHER, Anthony. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Fourteenth Edition.* - vydání. McGraw-Hill Education, 2015. 1136 s. ISBN 9780071842709.
2. JUNQUIERA, L. Carlos, José CARNEIRO a Robert O KELLEY, et al. *Základy histologie.* 1. vydání. Jinočany : H & H, 1997. 502 s. ISBN 80-85787-37-7.

Použitá literatura

- JUNQUIERA, L. Carlos, José CARNEIRO a Robert O KELLEY, et al. *Základy histologie.* 1. vydání. Jinočany : H & H, 1997. 502 s. ISBN 80-85787-37-7.

- JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika.* 1. vydání. 2006. ISBN 80-7262-263-4.

- MESCHER, Anthony. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Fourteenth Edition.* - vydání. McGraw-Hill Education, 2015. 1136 s. ISBN 9780071842709.



Sada histologických preparátů