

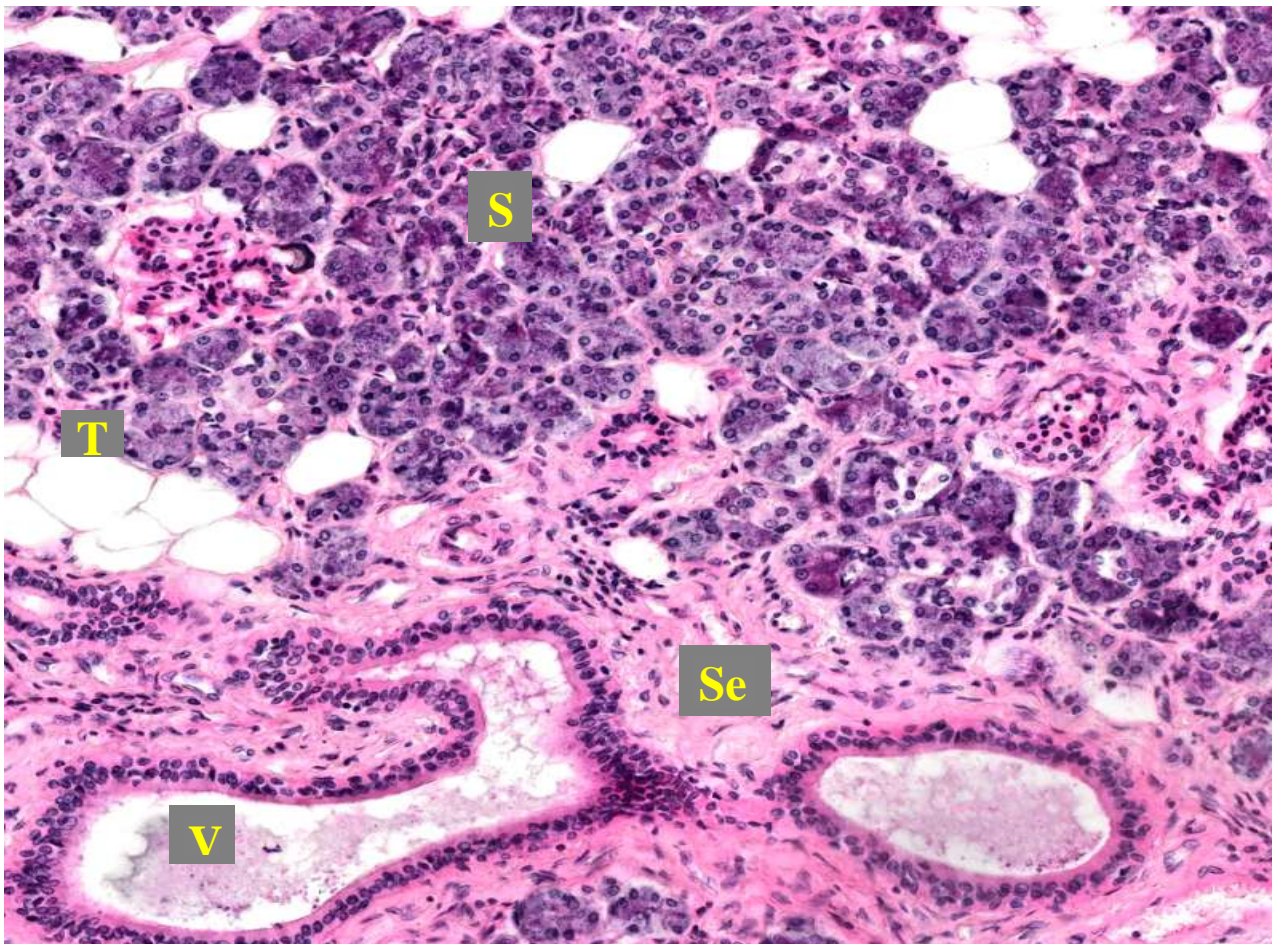
Úvod do histologické techniky

Světelná mikroskopie (SM) je základní metodou pozorování ve všech oborech, jejichž předmětem studia je obecná stavba buněk, tkání a mikroorganismů. V přirozeném stavu jsou tkáně a orgány obvykle příliš hmotné na to, aby mohly být prosvíceny. Aby bylo možné studovat různé tkáně a využít současné rozlišovací schopnosti světelných mikroskopů, byly vyvinuty takové histologické techniky, které nám umožní zhotovit tenké průsvitné preparáty. Jen ve výjimečných případech, kdy tkáň je sama o sobě dostatečně tenká nebo transparentní, můžeme bez předběžné přípravy podrobit daný vzorek mikroskopickému studiu. SM umožňuje studium objektů v živém stavu za různých fyziologických a experimentálních podmínek. Ovšem většina vzorků tkání určených pro histologické vyšetření vyžaduje přípravu tzv. **trvalého preparátu**. Zde je podmínkou tkáň nejprve šetrně a rychle usmrtit procesem tzv. **fixace**. Abychom předešli natrávení tkání vlastními enzymy (autolýze) a zachovali její strukturu a barvitelnost, musí být tkáň, co nejdříve po vyjmutí z těla, umístěna do fixačního činidla (fixativa). K dispozici je celá řada fixačních prostředků, přičemž některé látky je možno použít samostatně, jiné se kombinují do směsí, v nichž se navzájem doplňují různé fixační vlastnosti několika látek. V praxi nejpoužívanější látkou je aldehyd kyseliny mravenčí – formaldehyd. Optimální délka fixace je 24 – 48 hodin. Aby bylo možné zhotovit tenké řezy, je třeba tkáň po fixaci **prosytit** a **zalít do zalévacího media**, které ji dodá pevnou konzistenci. Tím se vytvoří homogenní tkáňový bloček vhodný ke krájení. Nejčastějším zalévacím médiem pro SM je parafin. Nemísí se však s vodou, proto je důležité tkáň nejprve **odvodit** (vzestupnou řadou koncentrací etanolu 70 – 100%). Poté alkohol ve tkáni nahradíme rozpouštědlem (xylenem), které se mísí se zalévacím médiem. Tkáň se po prosycení rozpouštědlem stává transparentní. Proto se tento krok označuje jako **projasnění**. Parafinové bločky **krájíme** ocelovými noži mikrotomů. **Mikrotomy** jsou přístroje, umožňující zhotovení řezů různé tloušťky řádově v mikrometrech. Pro studijní účely a účely rutinní diagnostiky se používají řezy kolem 10 μm . Po skrojení se řez přenesse na podložní sklo. Pro zvýraznění a odlišení struktur ve tkáních je důležité řezy **obarvit**. Většina barviv pro histologické studium se chová jako sloučeniny kyselé a zásadité povahy. Struktury, které se barví bazickými barvivy (hematoxylin), nazýváme bazofilní (buněčné jádro, ribozomy). Struktury, které vykazují afinitu ke kyselým složkám barvicí směsi (eozin), označujeme acidofilní, eosinofilní (cytoplazma, myofibrily). Nejčastější

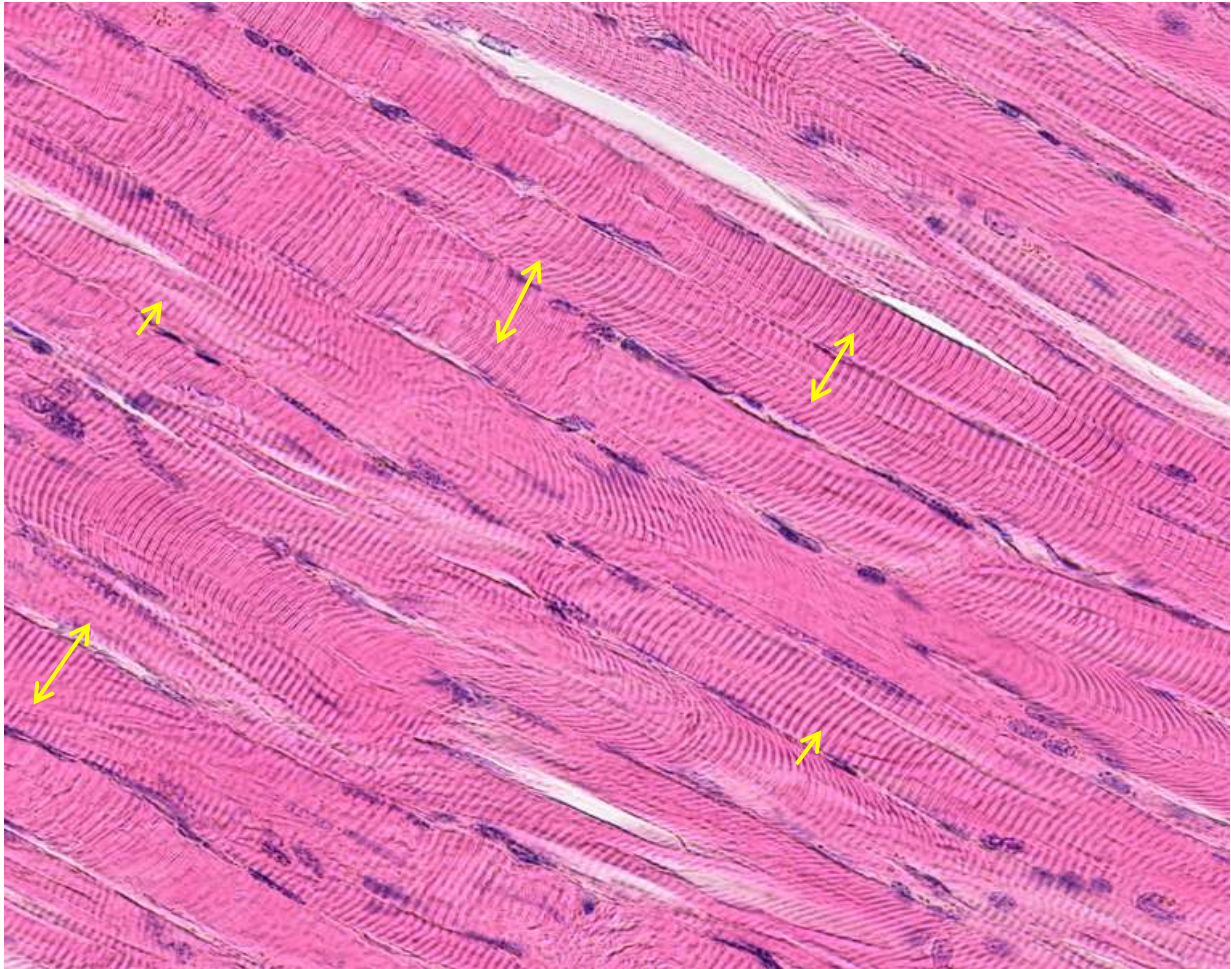


Obr. 1

v praxi používanou směsí barviv je hematoxylin eosin (H+E). Obarvený preparát se následně uzavře. Jedná se o tzv. **montování**. Účelem je zabránit znehodnocení obarveného preparátu vyschnutím, mechanickým poškozením, vyblednutím. Řez se zakápně montovacím médiem (o stejném indexu lomu jako podložní a krycí sklo) a přikryje krycím sklem. Tím je vytvořen trvalý preparát, který můžeme opakovaně prohlédnout v mikroskopu. Příprava takovýchto parafinových obarvených řezů (včetně fixace) trvá i několik dnů. Pro účely rychlé diagnostiky (peroperační biopsie), kdy během cca 10 minut je zhotoven preparát a stanovena diagnóza, se používá tzv. **zmrazovací technika**. Zmrazení tkáně umožní zjednodušit celý předešlý postup, protože ze zmrzlého tkáňového bločku je možné nakrájet a obarvit řezy bez předchozího zalití.



Obr. 2: Příušní žláza, S - sekreční úseky žlázy (bazofilní), V - žlázové vývody ve vazivovém septu (Se), T - tukové buňky, barveno hematoxylinem – eosinem (OlyVia).



Obr. 3: Vlákna příčně pruhovaného svalu kosterního (eosinofilní ↔), jádra svalových vláken (bazofilní →), barveno hematoxylinem – eosinem. (OlyVia)

Zdroje:

Malínský J., Lichnovský V., Michalíkova Z. Přehled histologie člověka v obrazech. I. díl. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc 2007, 153 s. ISBN 978-80-244-1769-1

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Základy histologie. 1. české vydání. Přeložil prof. MUDr. Richard Jelínek, DrSc., H&H nakladatelství, Praha 1997

Jelínek R et al. Histologie a embryologie. <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>

Obr. 1: Vlastní fotografie