

# HISTOLOGIE

vědní obor studující strukturu buněk  
a tkání mnohobuněčných organismů

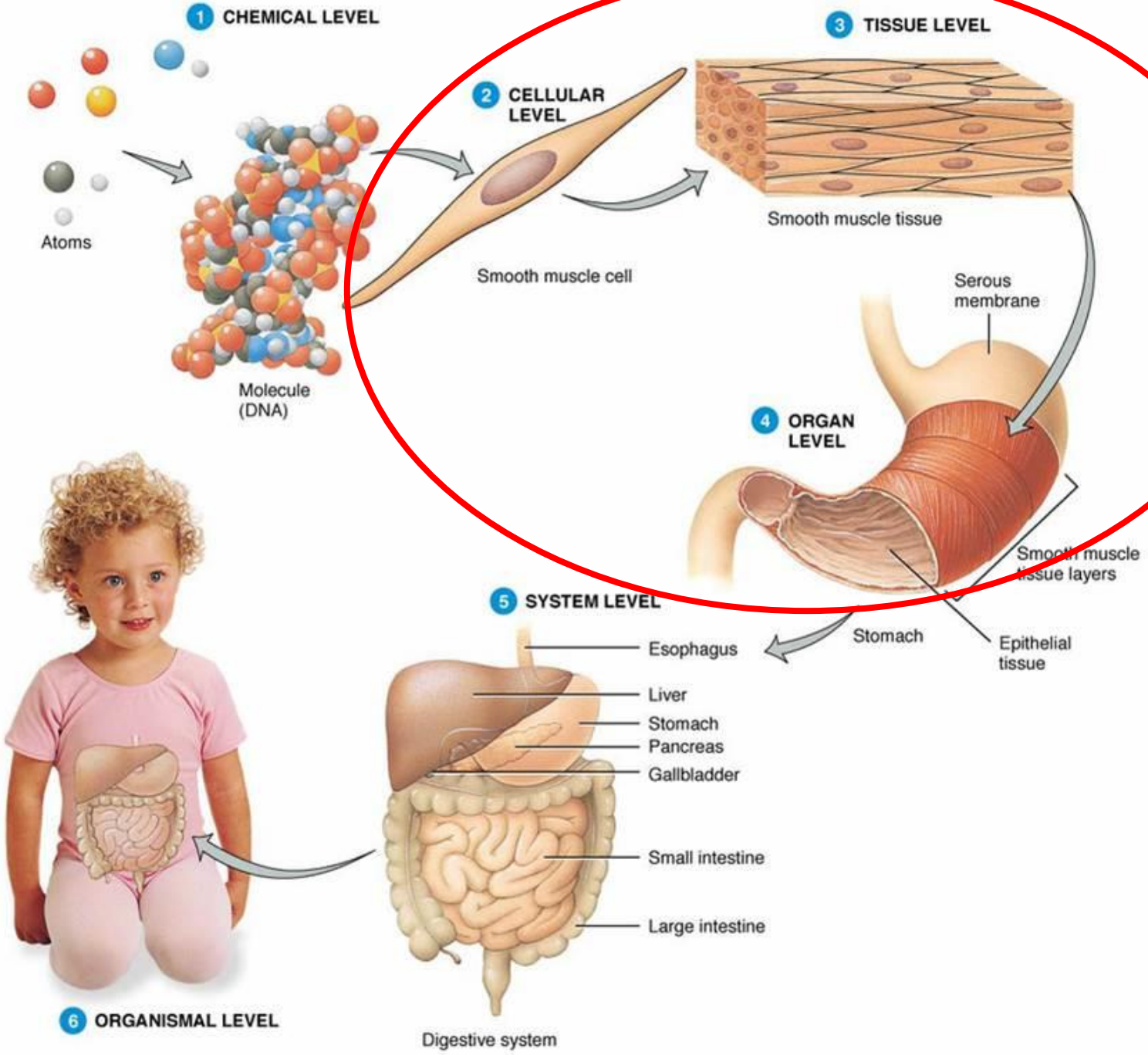
1/ cytologie

2/ vlastní histologie

3/ mikroskopická anatomie

MUDr. Andrea Felšöová

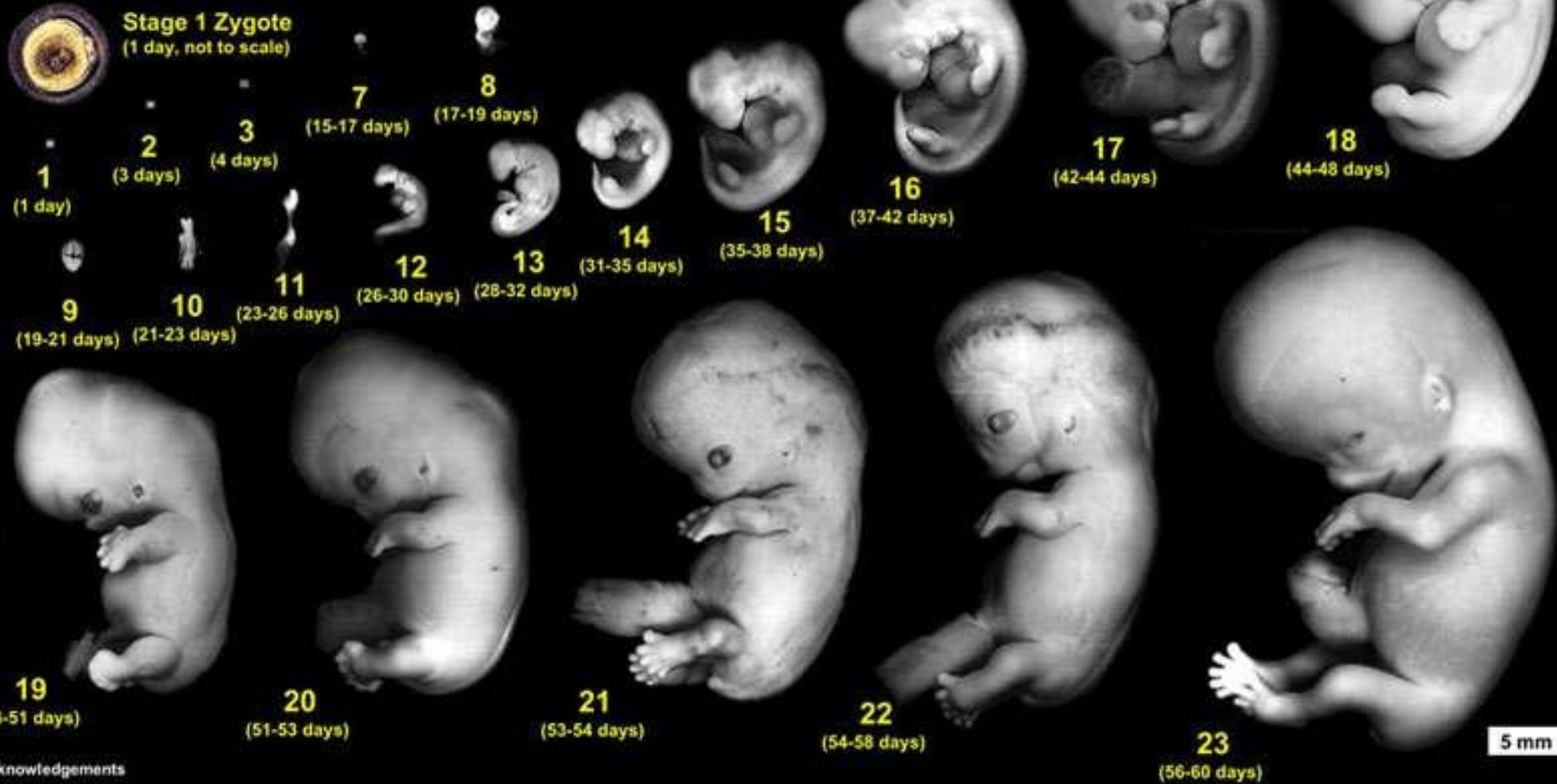
[andrea.felsoova@lfmotol.cuni.cz](mailto:andrea.felsoova@lfmotol.cuni.cz)



# 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

Největší buňky 150  $\mu\text{m}$

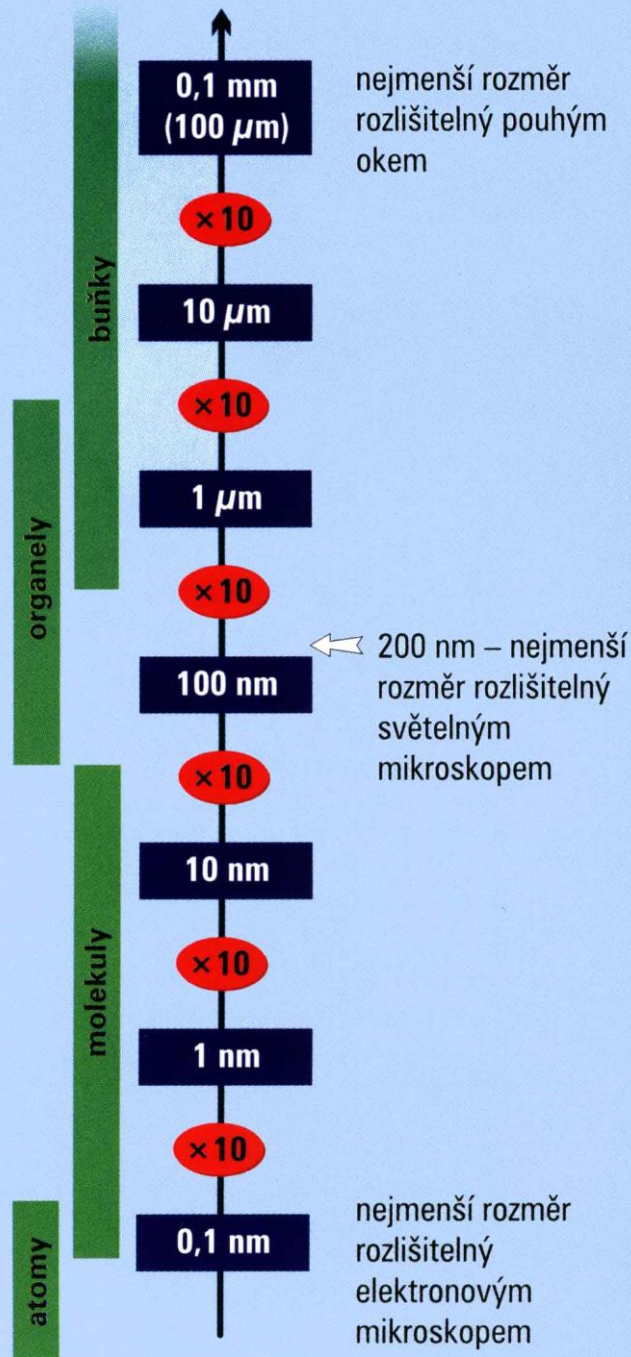
Průměrná velikost buněk 10 – 20  $\mu\text{m}$

Největší organely 1 – 2  $\mu\text{m}$

Ribosomy 20x30 nm

Cytoskelet 5 – 24 nm

Membrána 7,5 nm



**pouhé oko**

**světelný mikroskop**

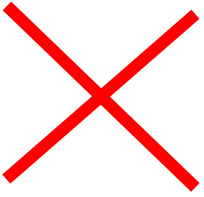
**elektronový mikroskop**

# Světelný mikroskop

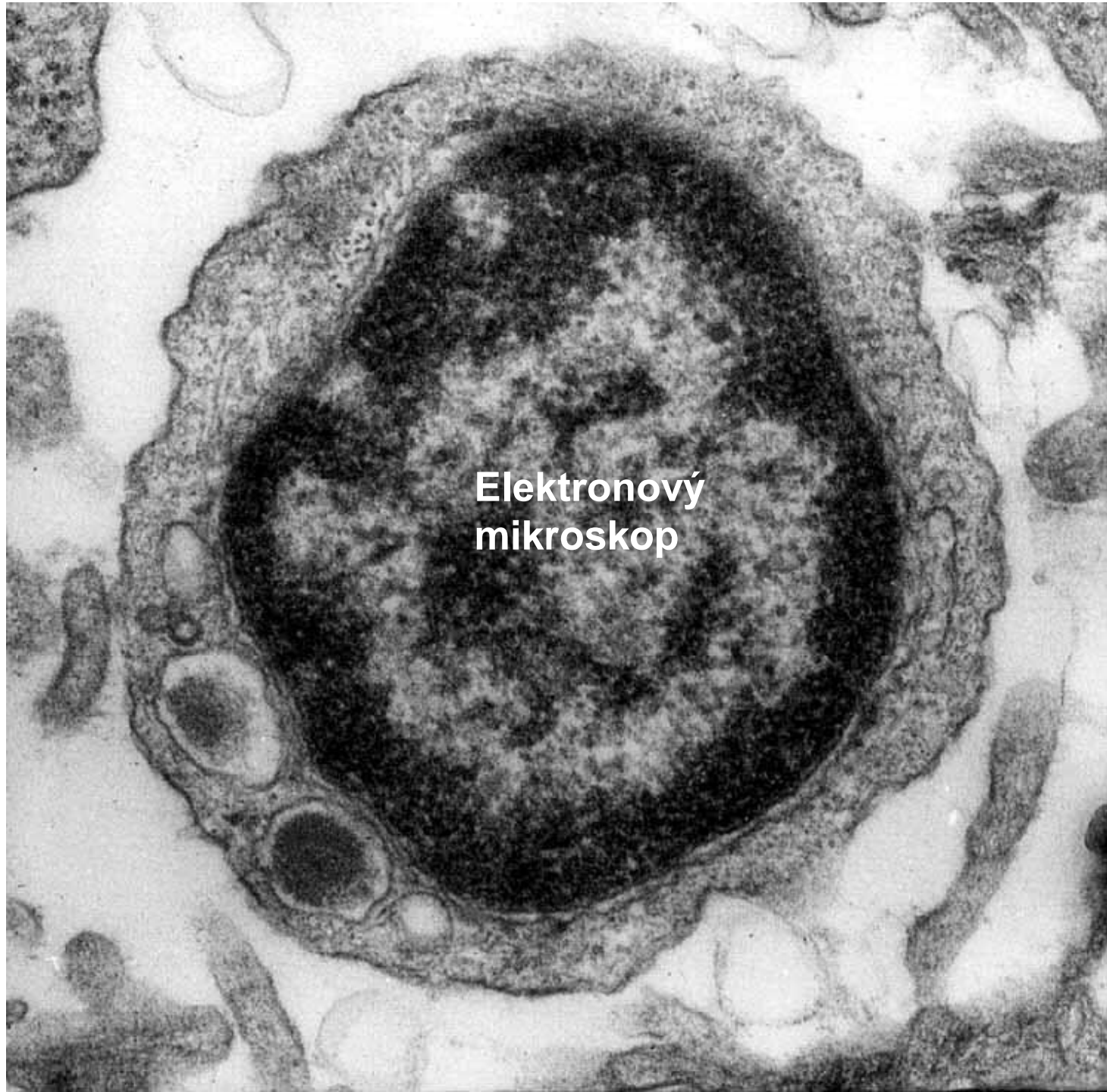
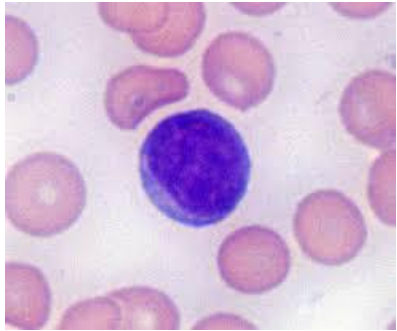


# Transmisní elektronový mikroskop (TEM)





**Světelný  
mikroskop**



**Elektronový  
mikroskop**

# **ZÁKLADNÍ HISTOLOGICKÉ TECHNIKY**



## SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE

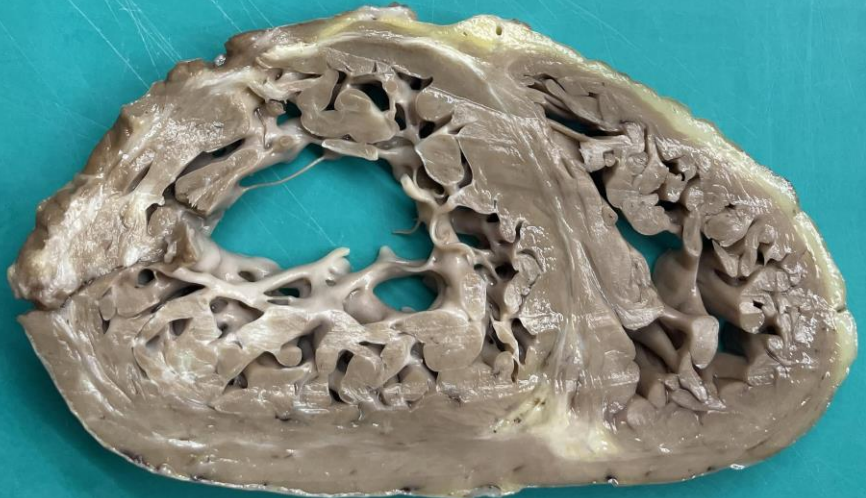
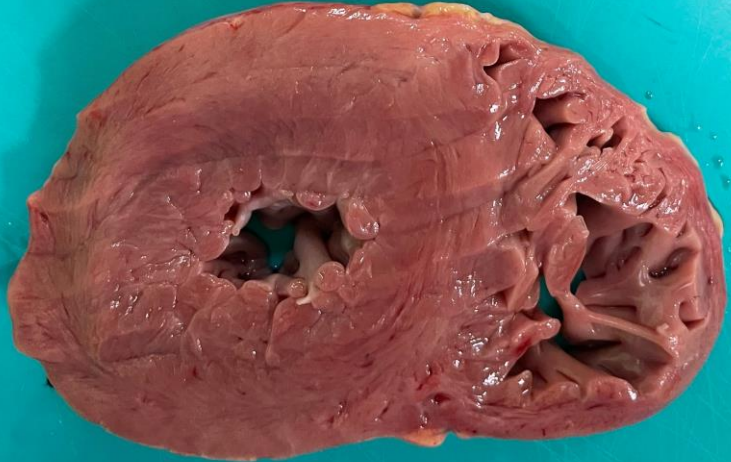
- Odběr vzorku
- Fixace
- Odvodnění
- Projasnění
- Zalévání
- Krájení
- **Barvení**
- Montování
- Pozorování

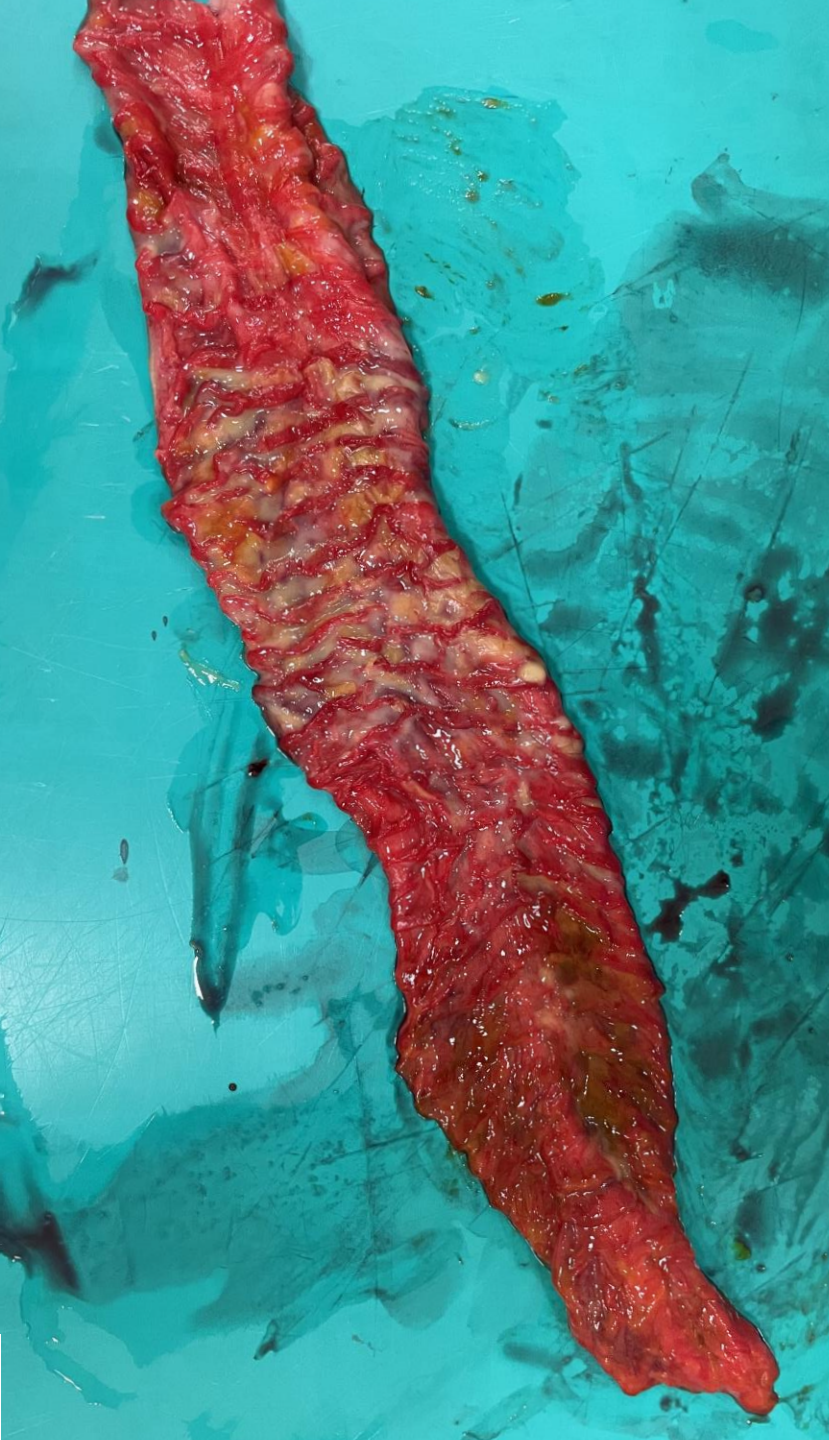
## ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

- 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
- formol





# 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**



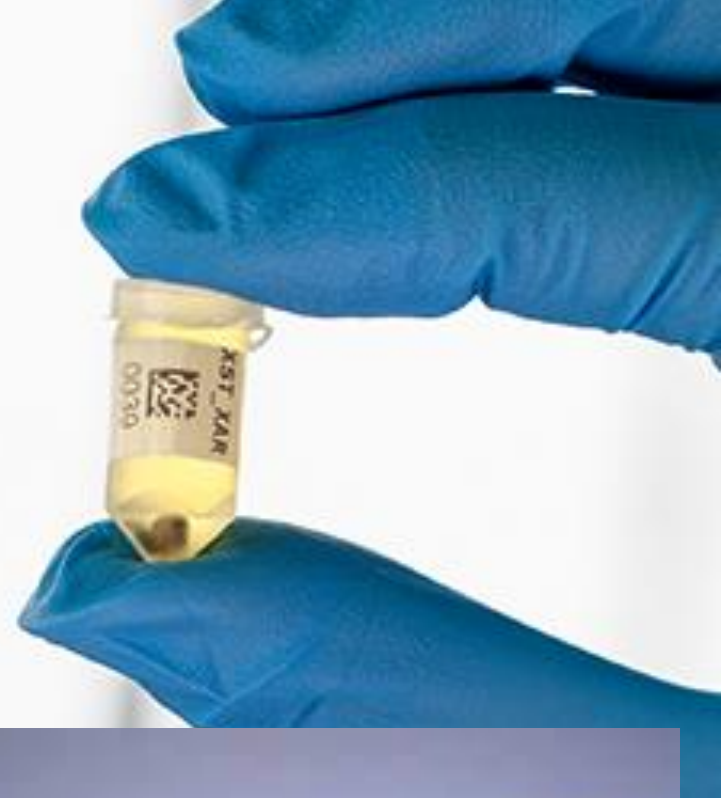


# ZALÉVÁNÍ DO PRYSKYŘIC

- 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

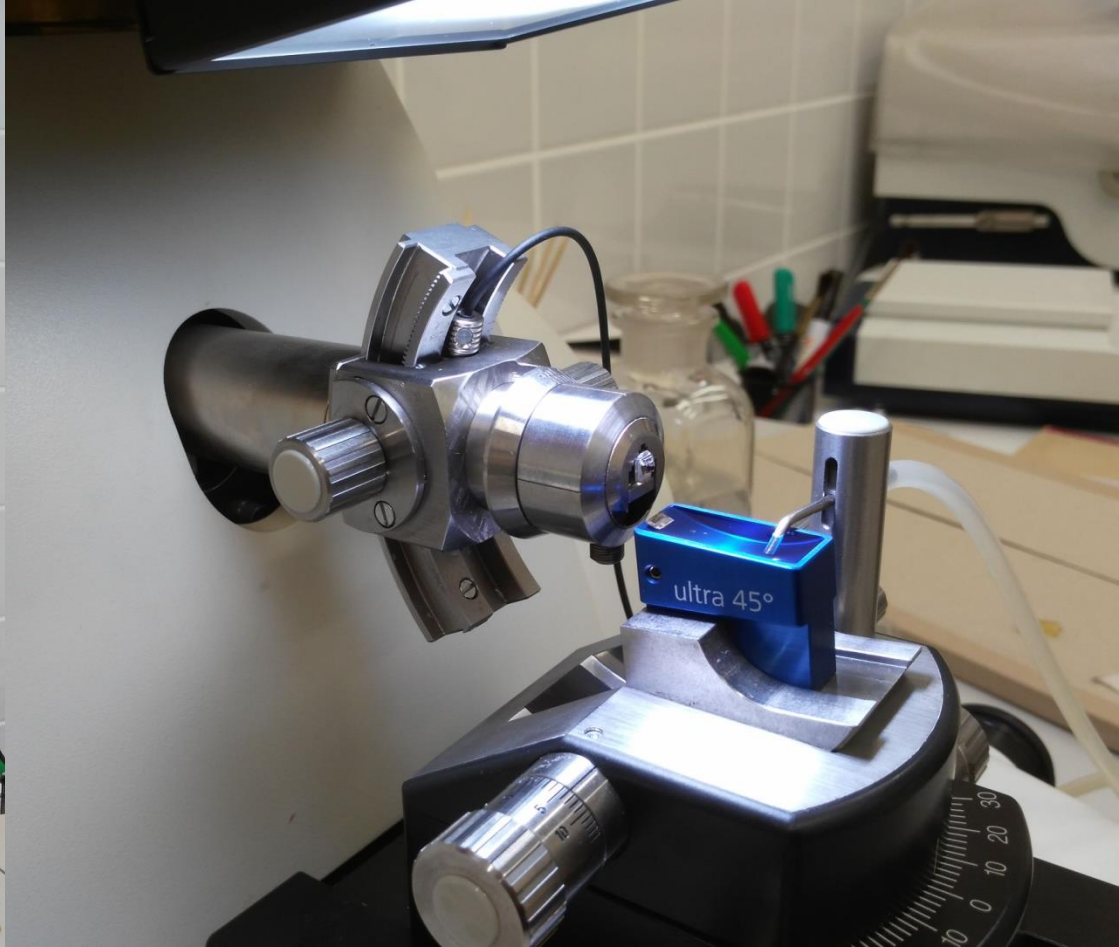


**Sáňkový mikrotom**

# 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



# 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





EOSIN

ALKOHOL

ALKAL

KARBOXYLEN

XYLEN

XYLEN

100% ALKOHOL + CHLOROFORM

CHLOROFORM

# 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 diferenciacce 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 xylen (2 lázně) – vytěsnění alkoholu rozpustidlem montovacího média
- **MONTOVÁNÍ**
  - Solakryl – překrytí řezu krycím sklíčkem

**basofilní**

**světlé (optický prázdné)**

**eosinofilní (acidofilní)**

20  $\mu\text{m}$

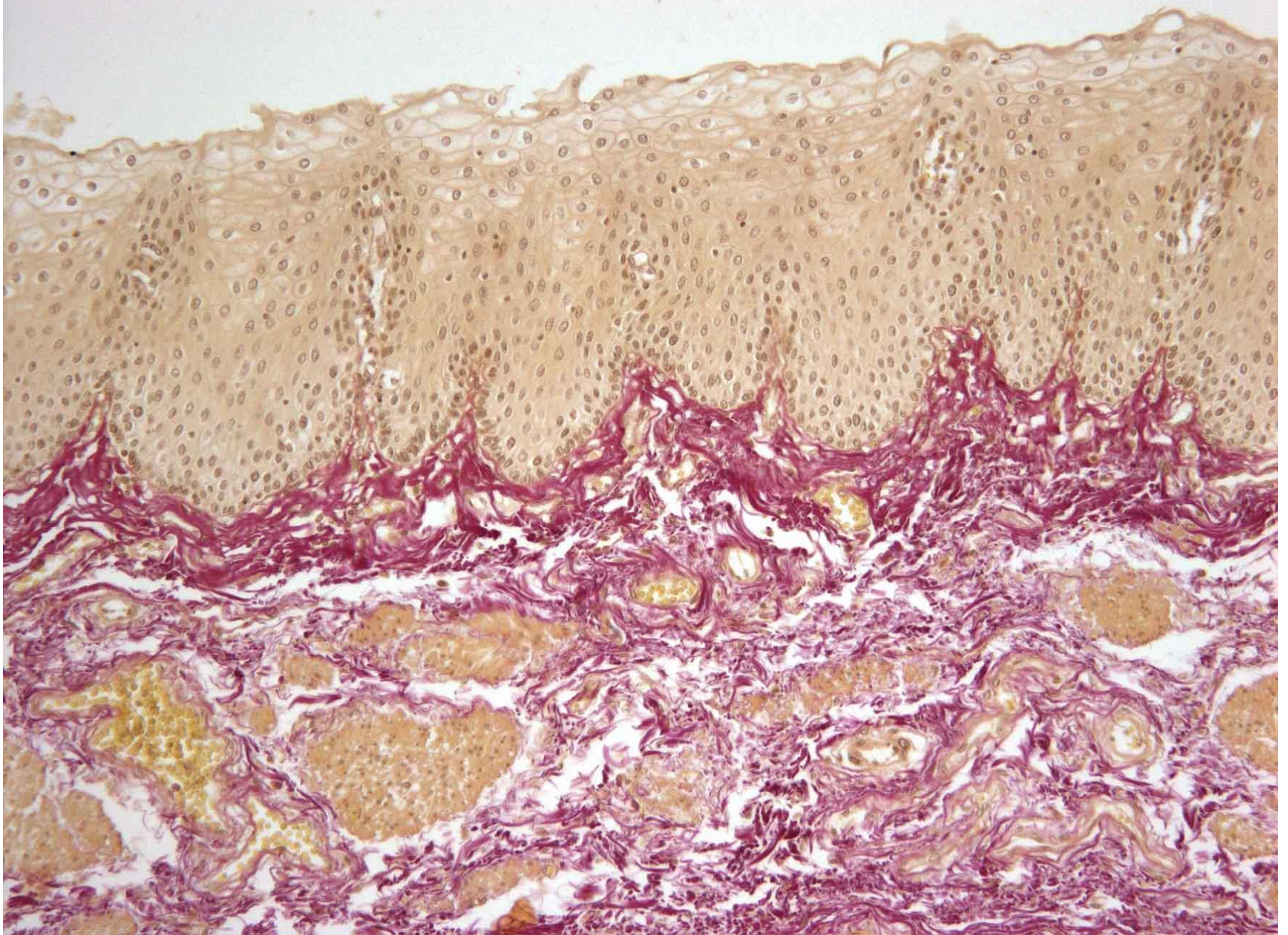
---



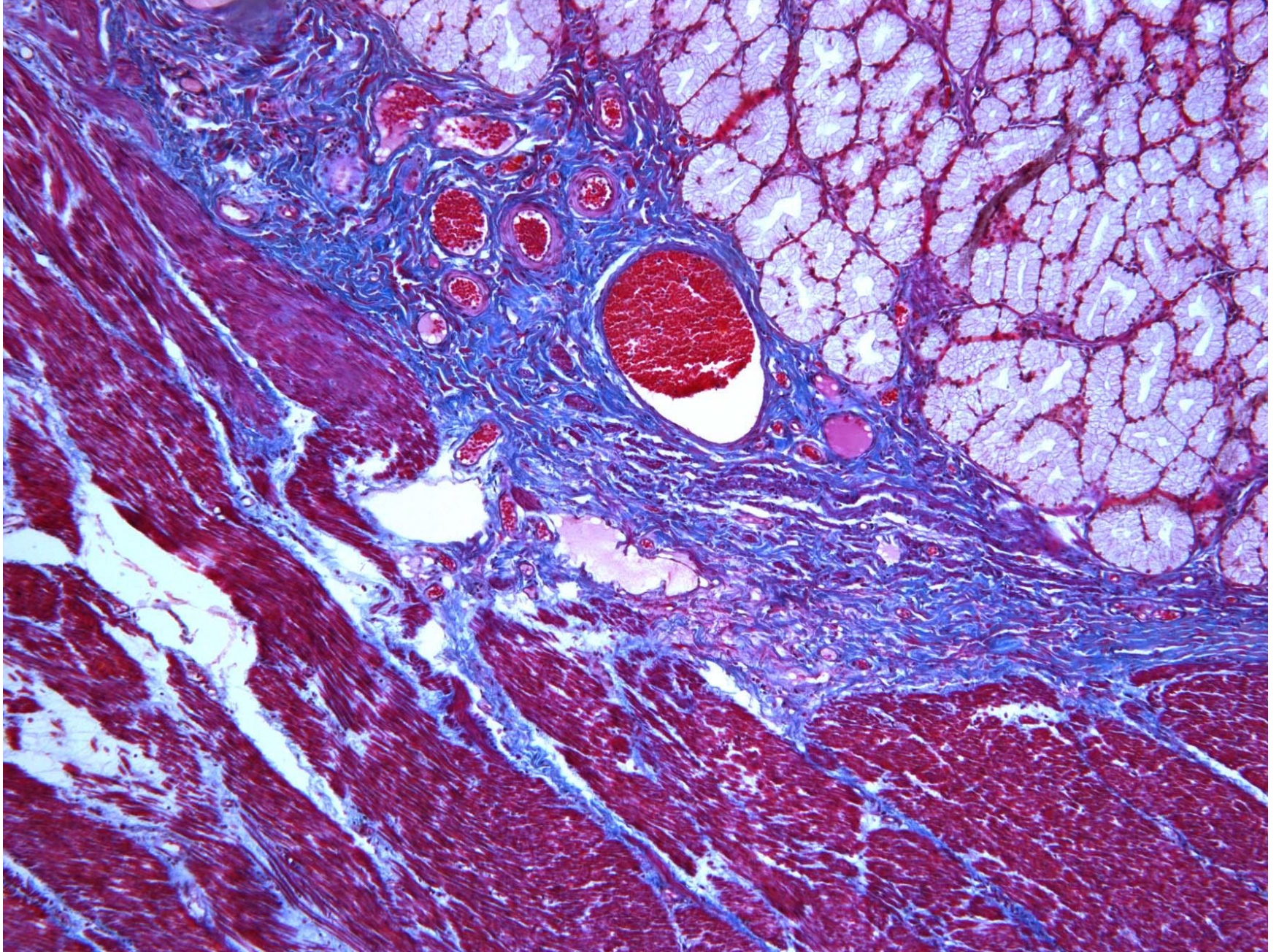
# DALŠÍ PŘÍKLADY PŘEHLEDNÝCH BARVENÍ

Weigert - van Gieson	železitý hematoxylin + kyselý fuchsin + kyselina pikrová	jádra <b>hnědá</b> , kolagen <b>červený</b> , svalovina <b>žlutá</b>
Massonovy trichromy -žlutý	hematoxylin + erythrosin + šafrán	jádra <b>modrá</b> , kolagen <b>žlutý</b> , svalovina <b>červená</b>
-modrý	železitý hematoxylin + kyselý fuchsin + anilinová modř	jádra <b>hnědá</b> až černá, kolagen <b>modrý</b> , svalovina <b>červená</b>
-zelený	železitý hematoxylin + kyselý fuchsin + oranž G + světlá zeleň	jádra <b>hnědá</b> až černá, kolagen <b>zelený</b> , svalovina <b>červená</b>
AZAN	azokarmín + anilinová modř + oranž G	jádra <b>červená</b> , kolagen <b>modrý</b> , svalovina <b>červená</b>

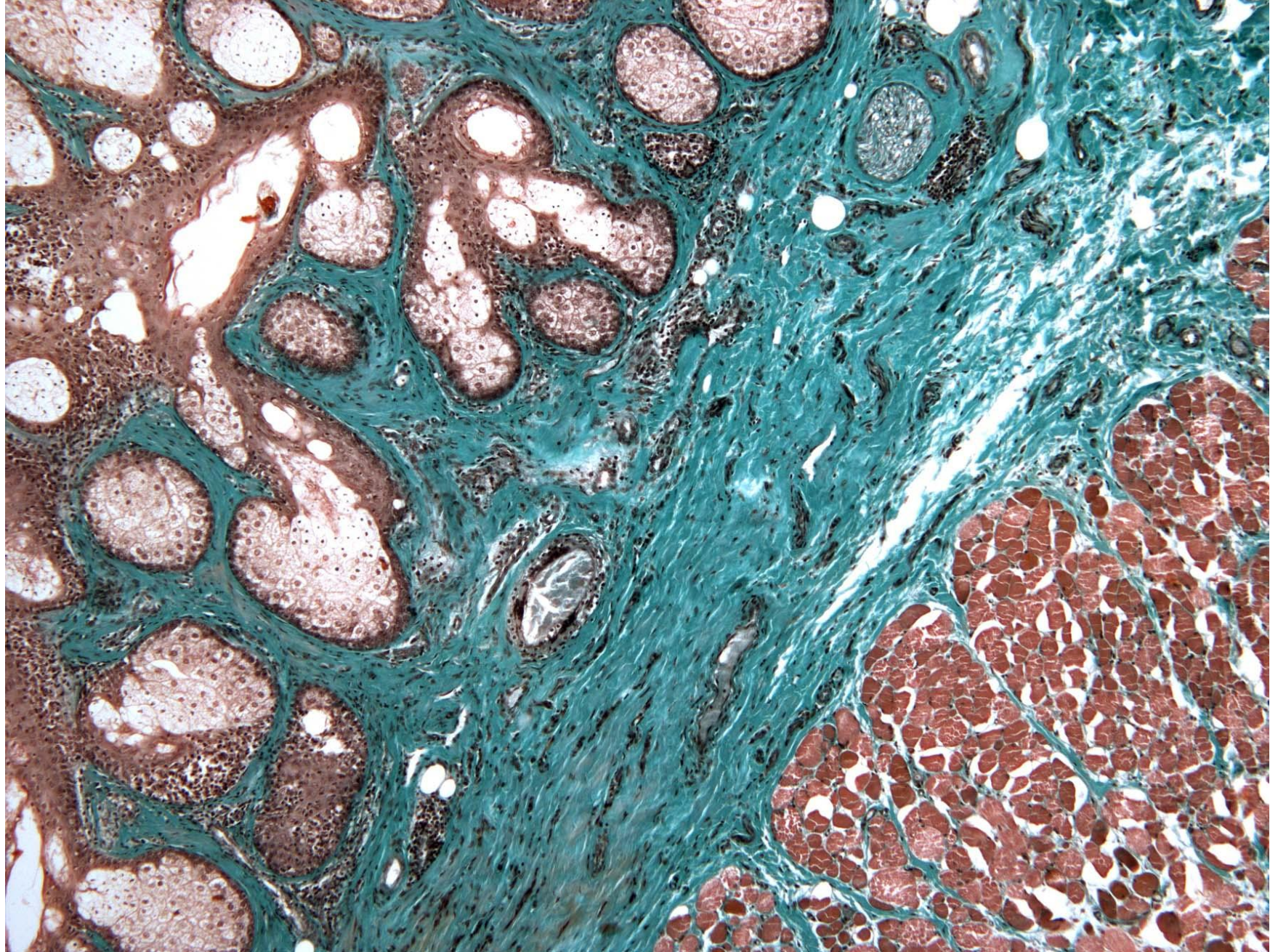




**Weigert - van Gieson**



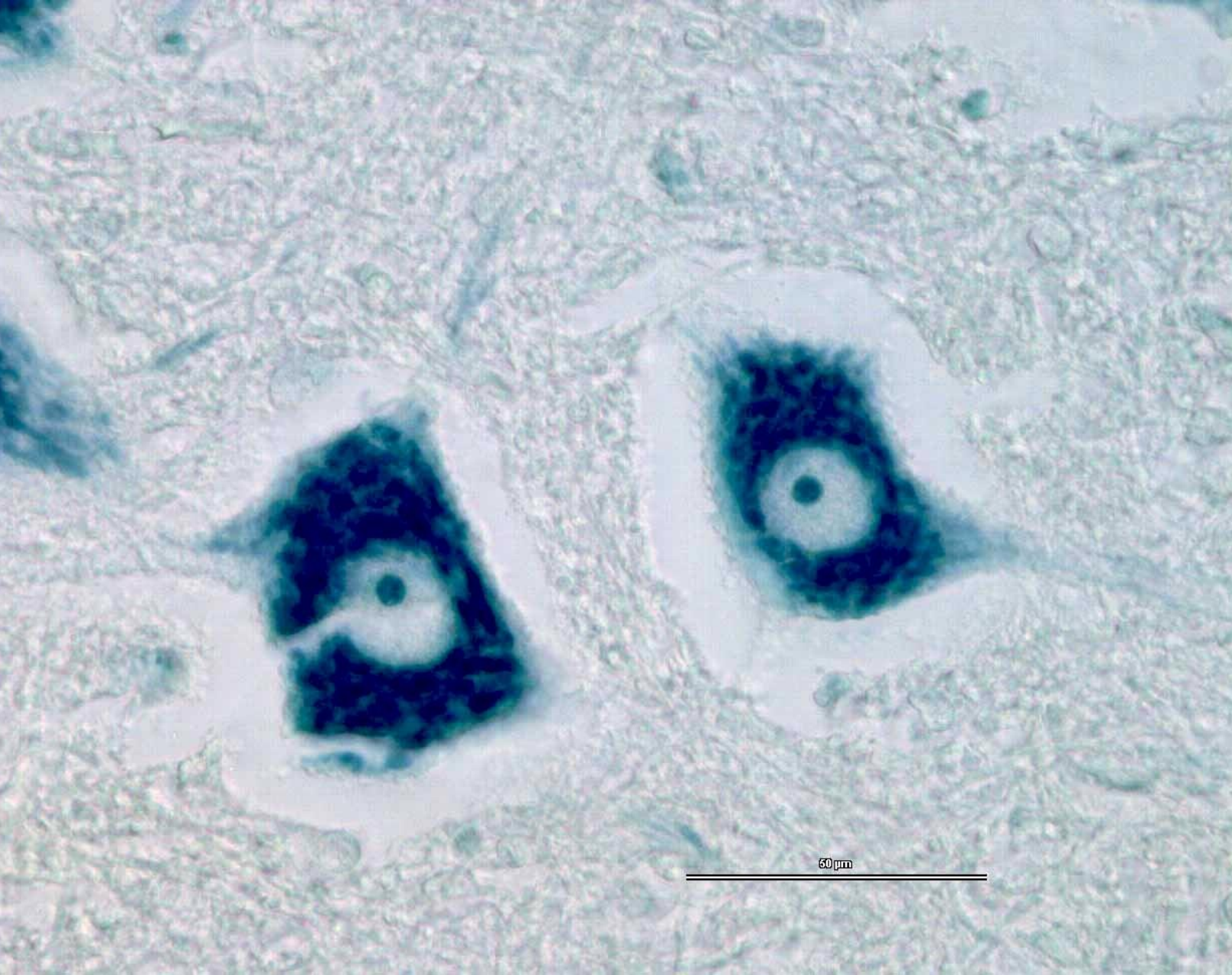
**modrý trichrom**



**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

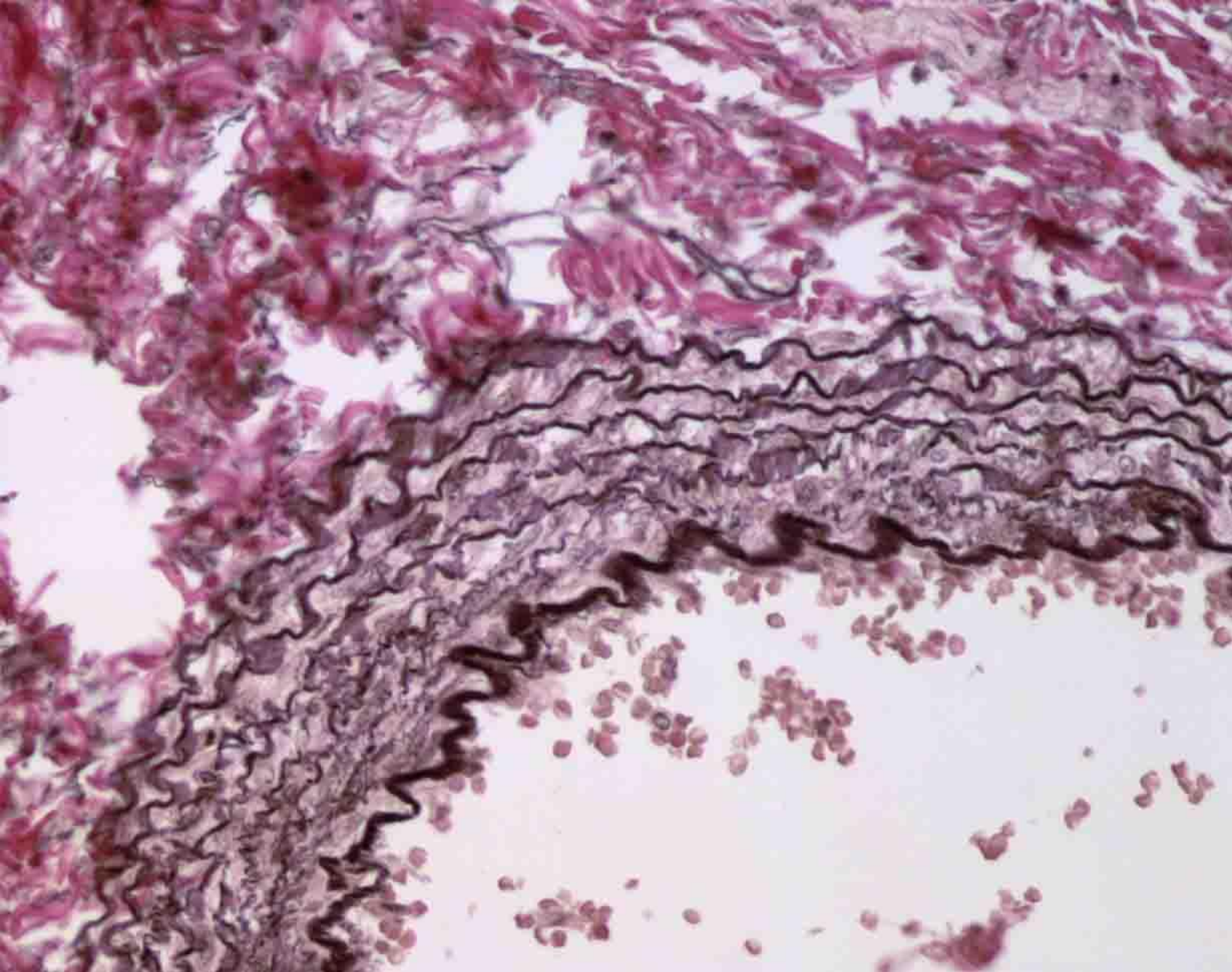
neutrální tuky - olejová červeň O, Sudan černý B, Sudan III, šarlach – je  
třeba se vyhnout použití rozpustidel (zmrazené řezy)

myelin (fosfolipidy) - luxolová modř, Spielmeyerův hematoxylin

amyloid - kongo červeň, metylviolet', saturnová červeň

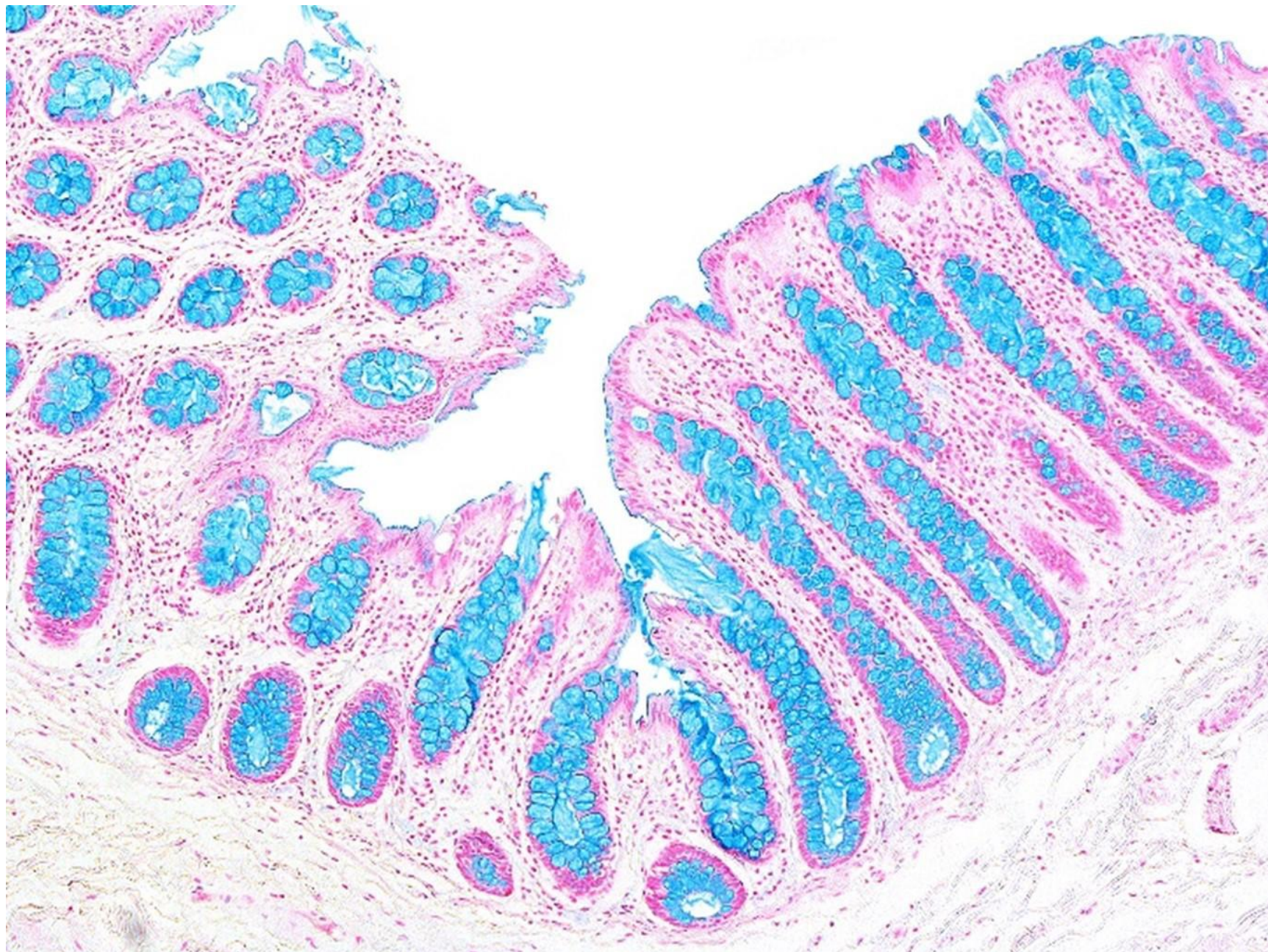
fibrin - Weigertovo barvení

a další ...



**resorcin-fuchsin**

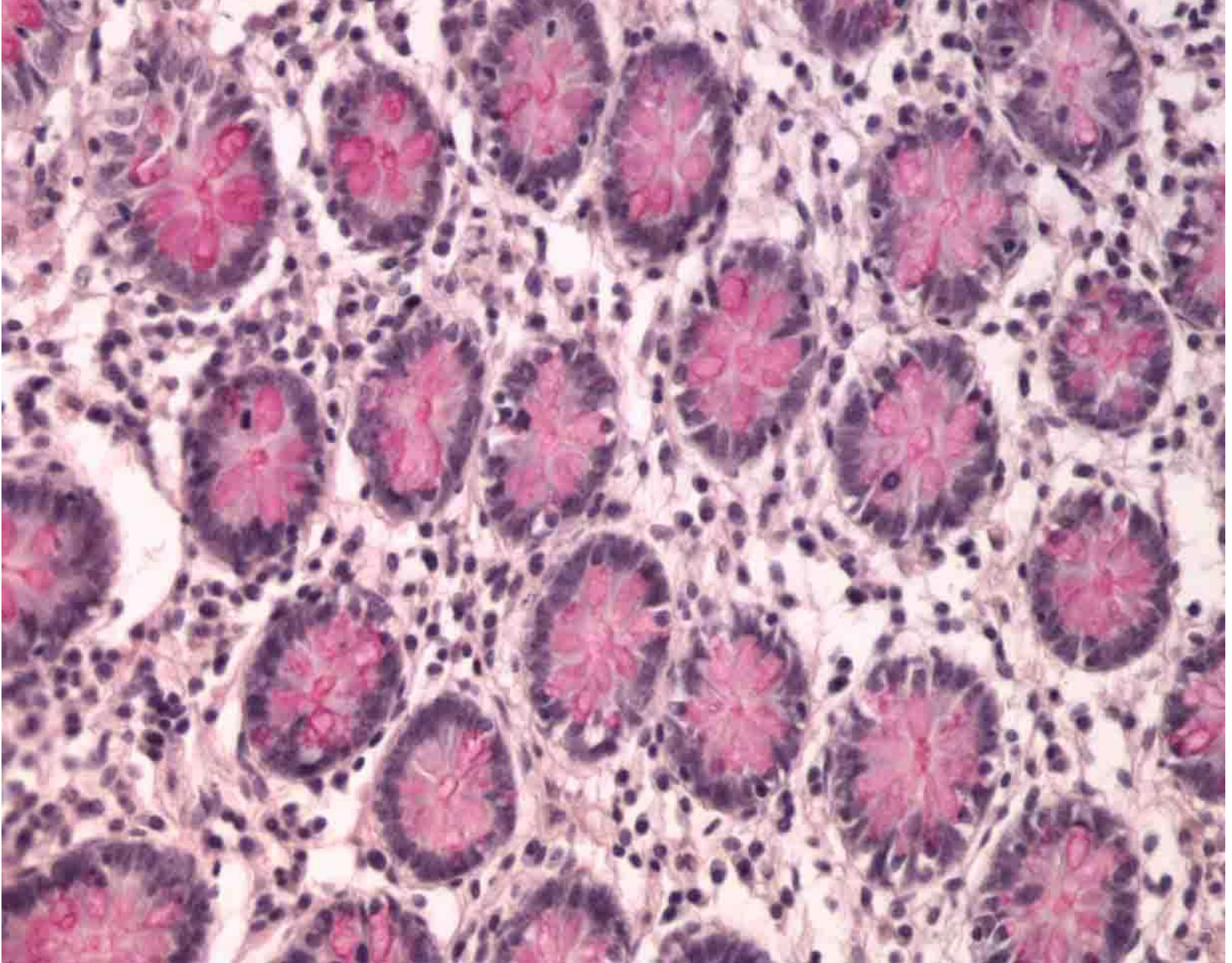
**elastika**



**alciánová modř pH 2,5**

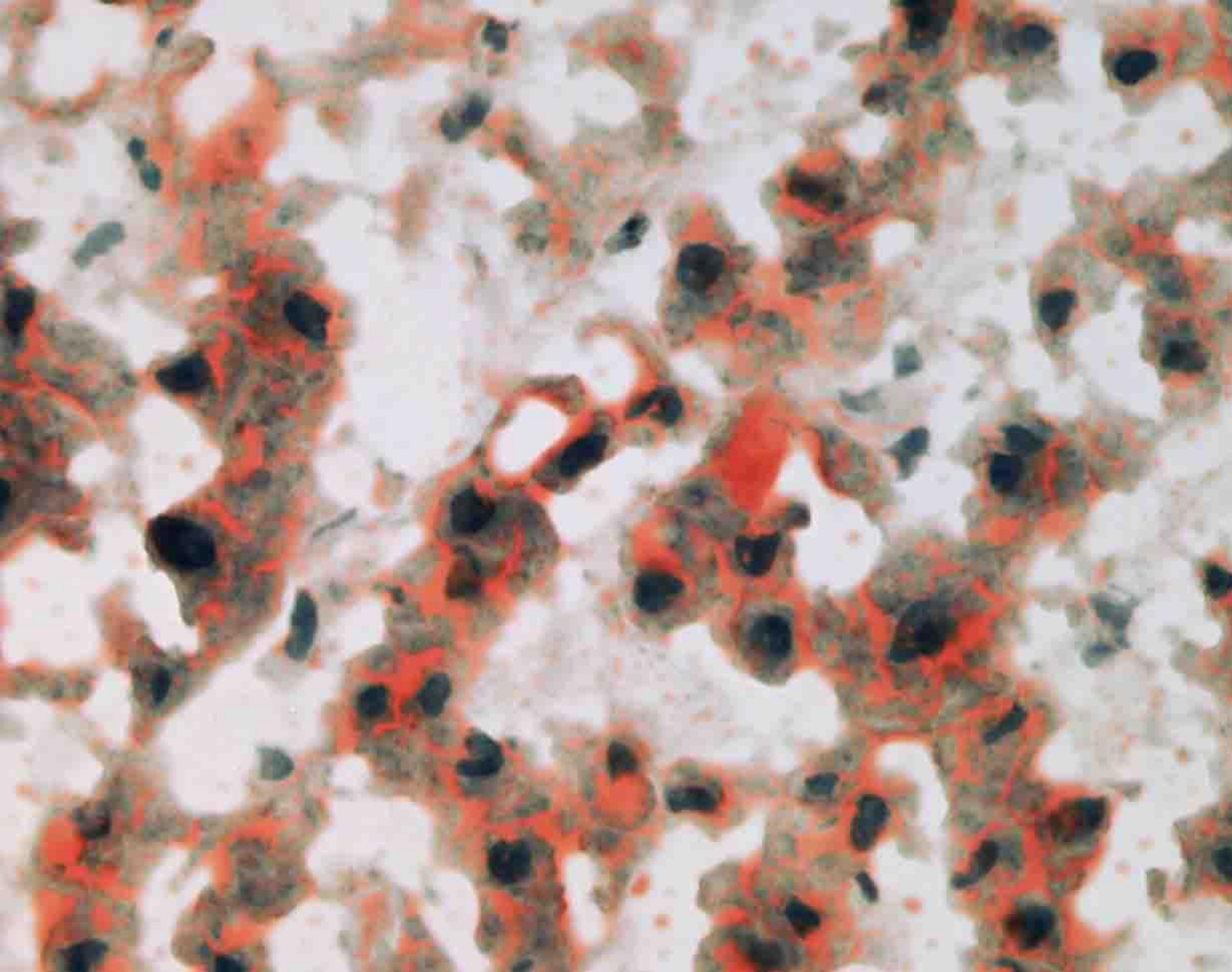
**kysele mukopolysacharidy**





**mucikarmín**

**muciny**



**olejová červeň O**

**neutrální lipidy**

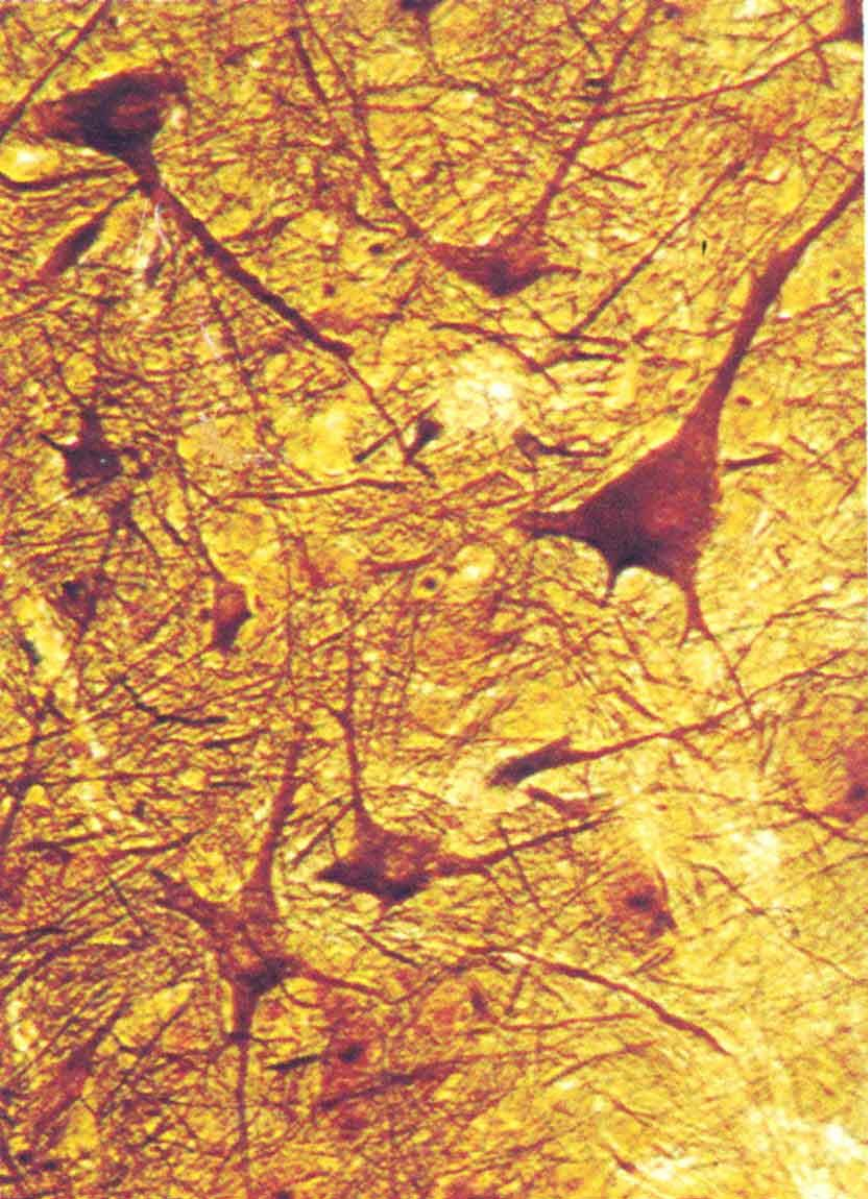
# PŘÍKLADY IMPREGNACE

Gömöri, Foot      retikulární vlákna

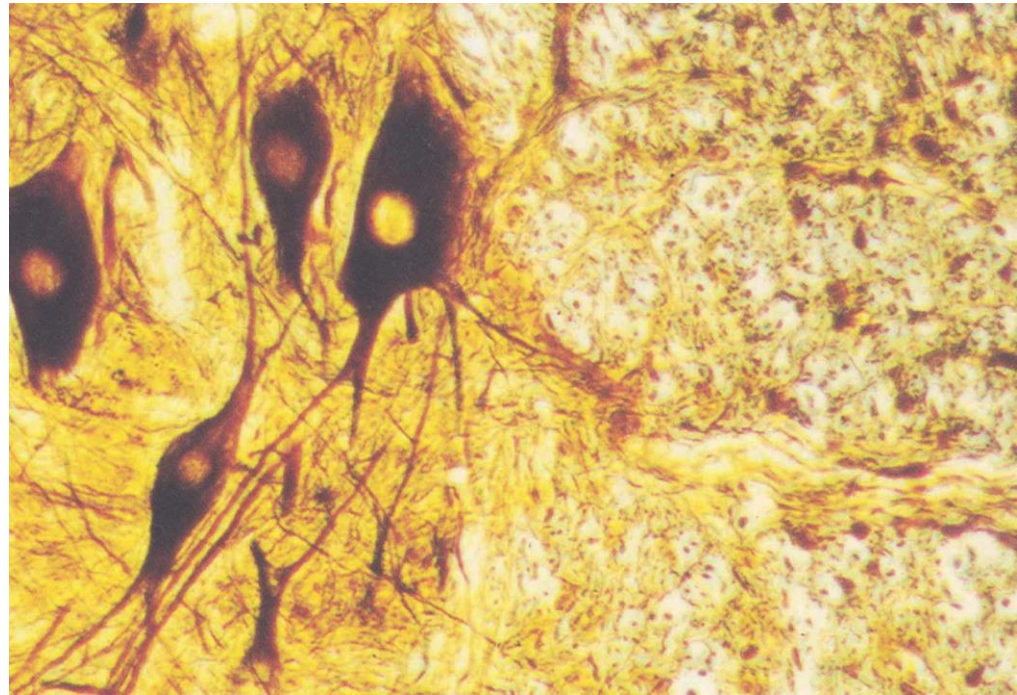
Hortega, Cajal      astrocyty  
Penfield      oligodendrocyty  
Bielschowski      nervová vlákna

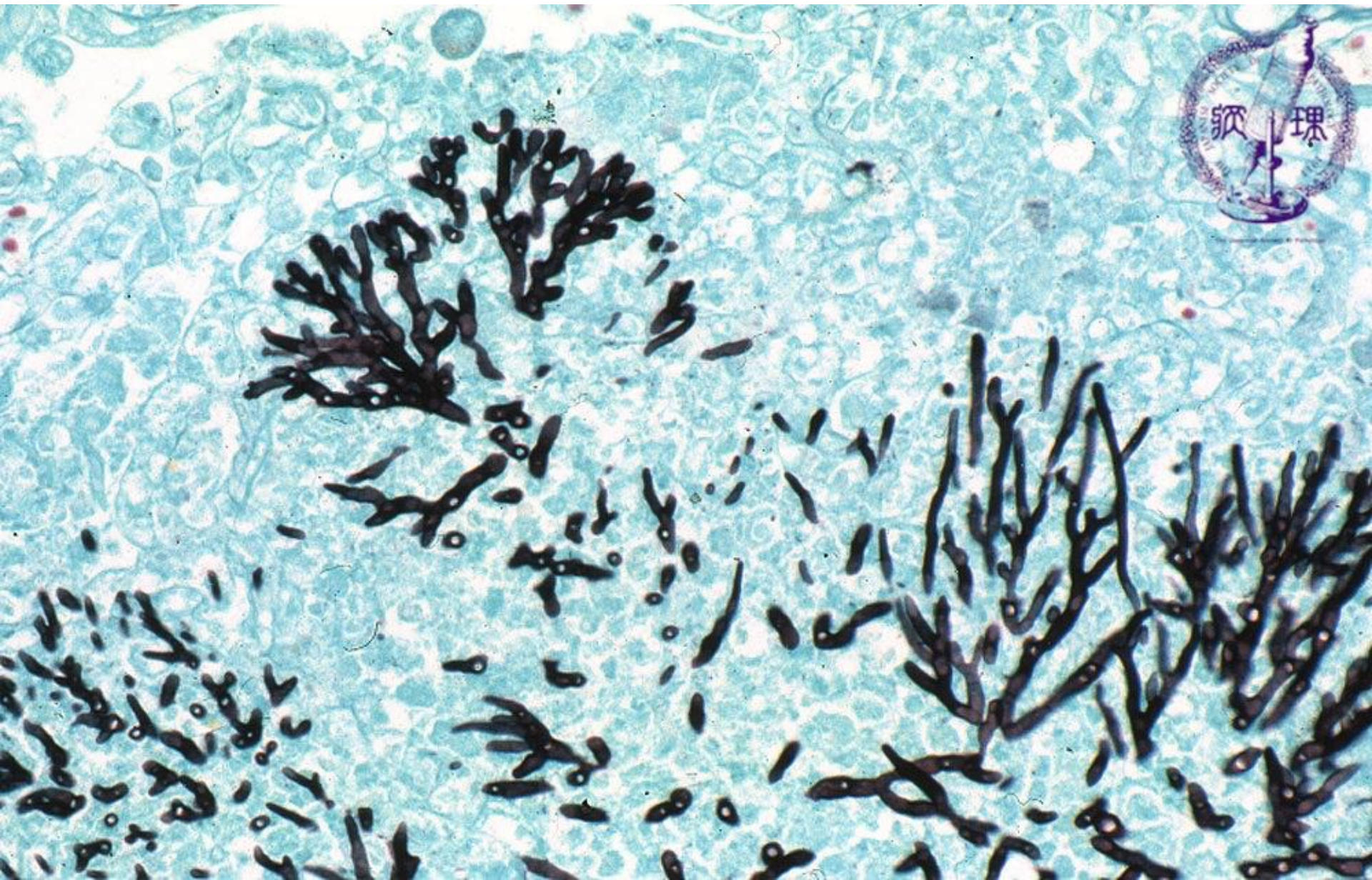
Grimelius      buňky DNES

Grocott      hyfy plísni



**impregnace neuronů**

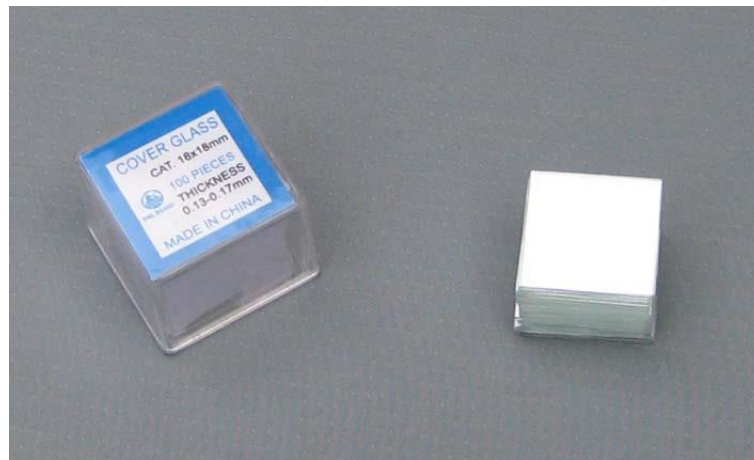




Mykóza (kolonie Aspergila)- Grocott

# MONTOVÁNÍ

- krycí skla



- montovací média rozpustná v xylenu

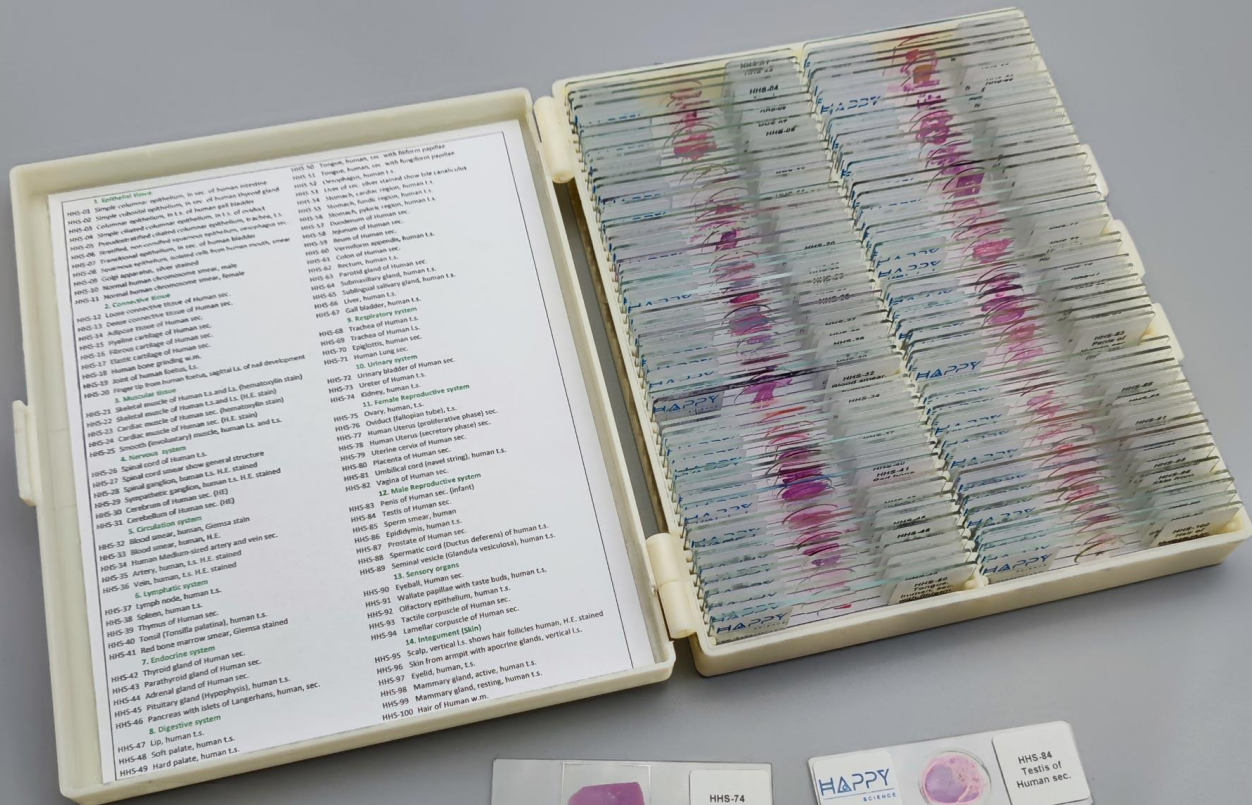
- akrylátové pryskyřice (solakryl BMX)

- kanadský balzám

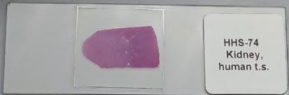
- montovací média rozpustná ve vodě

- glycerol-želatina

- glycerol



- 1. Epithelial tissue
- HHS-01 Simple cuboidal epithelium, in sec. of human intestine
- HHS-02 Simple cuboidal epithelium, in sec. of human gut bladder
- HHS-03 Columnar epithelium, in L.S. of human gut bladder
- HHS-04 Simple stained columnar epithelium, in sec. of human gut bladder
- HHS-05 Pseudostratified columnar epithelium, trachea, H.E.
- HHS-06 Squamous epithelium, in sec. of human bladder
- HHS-07 Transitional epithelium, stained with iron human stomach, smear
- HHS-08 Squamous epithelium, stained with iron human stomach, male
- HHS-09 Ciliated epithelium, stained with iron human stomach, female
- HHS-10 Normal human chromosome smear, female
- HHS-11 Normal human chromosome smear, male
- 2. Connective tissue
- HHS-12 Loose connective tissue of human sec.
- HHS-13 Dense connective tissue of human sec.
- HHS-14 Adipose tissue of human sec.
- HHS-15 Hyaline cartilage of human sec.
- HHS-16 Fibrous cartilage of human sec.
- HHS-17 Elastic cartilage of human sec.
- HHS-18 Human bone grinding w.m.
- HHS-19 Head of human tooth, L.S.
- HHS-20 Head of human tooth, sagittal L.S. of nail development
- HHS-21 Finger tip from human tooth, sagittal L.S. of nail development
- 3. Muscular tissue
- HHS-22 Skeletal muscle of human L.S. and L.S. (hematoxylin stain)
- HHS-23 Skeletal muscle of human sec. (hematoxylin stain)
- HHS-24 Cardiac muscle of human sec. (H.E. stain)
- HHS-25 Smooth (visceral) muscle, human L.S. and L.S.
- 4. Nervous system
- HHS-26 Spinal cord of human L.S.
- HHS-27 Spinal cord smear show general structure
- HHS-28 Spinal ganglion, human L.S. H.E. stained
- HHS-29 Sympathetic ganglion, human L.S. H.E. stained
- HHS-30 Cerebrum of human sec. (H.E.)
- HHS-31 Cerebellum of human sec. (H.E.)
- 5. Circulation system
- HHS-32 Blood smear, human, Giemsa stain
- HHS-33 Blood smear, human, H.E.
- HHS-34 Human medium-sized artery and vein sec.
- HHS-35 Artery, human, L.S. H.E. stained
- HHS-36 Vein, human, L.S. H.E. stained
- 6. Lymphatic system
- HHS-37 Lymph node, human L.S.
- HHS-38 Spleen, human L.S.
- HHS-39 Thymus of human sec.
- HHS-40 Tonsil (Tonsilla palatinalis), human L.S.
- HHS-41 Red bone marrow smear, Giemsa stained
- HHS-42 Red bone marrow smear, Giemsa stained
- 7. Endocrine system
- HHS-43 Thyroid gland of human sec.
- HHS-44 Adrenal gland of human sec.
- HHS-45 Pituitary gland (Hypophysis), human L.S.
- HHS-46 Pancreas with islets of Langerhans, human, sec.
- 8. Digestive system
- HHS-47 Lip, human L.S.
- HHS-48 Soft palate, human L.S.
- HHS-49 Hard palate, human L.S.
- HHS-50 Tongue, human, sec. with reflex capsule
- HHS-51 Tongue, human, sec. with reflex capsule
- HHS-52 Larynx, human, sec. with reflex capsule
- HHS-53 Liver of sec. show stained show bile canaliculi
- HHS-54 Stomach, cardiac region, human L.S.
- HHS-55 Stomach, pyloric region, human L.S.
- HHS-56 Duodenum of human sec.
- HHS-57 Duodenum of human sec.
- HHS-58 Jejunum of human sec.
- HHS-59 Ileum of human sec.
- HHS-60 Cecum of human sec.
- HHS-61 Sigmoid, human L.S.
- HHS-62 Parotid gland, human L.S.
- HHS-63 Submandibular gland, human L.S.
- HHS-64 Sublingual gland, human L.S.
- HHS-65 Liver, human L.S.
- HHS-66 Gall bladder, human L.S.
- 9. Respiratory system
- HHS-67 Trachea of human L.S.
- HHS-68 Trachea of human L.S.
- HHS-69 Trachea of human L.S.
- HHS-70 Epiglottis, human sec.
- HHS-71 Human Lung sec.
- 10. Urinary system
- HHS-72 Urinary bladder of human sec.
- HHS-73 Ureter of human L.S.
- HHS-74 Kidney, human L.S.
- 11. Female Reproductive system
- HHS-75 Ovary, human, L.S.
- HHS-76 Oviduct (Fallopian tube), L.S.
- HHS-77 Human Uterus (proliferative phase) sec.
- HHS-78 Human Uterus (secretory phase) sec.
- HHS-79 Uterine cervix of human sec.
- HHS-80 Vagina of human L.S.
- HHS-81 Uterine cervix of human L.S.
- HHS-82 Vagina of human sec. (vulva)
- 12. Male Reproductive system
- HHS-83 Penis of human sec.
- HHS-84 Testis of human sec.
- HHS-85 Sperm, human, human
- HHS-86 Epididymis, human L.S.
- HHS-87 Prostate of human sec.
- HHS-88 Spermatic cord (ductus deferens) of human L.S.
- HHS-89 Seminal vesicle (Epididymis vesiculosus), human L.S.
- 13. Sensory organs
- HHS-90 Eyeball, human sec.
- HHS-91 Wallate papillae with taste buds, human L.S.
- HHS-92 Olfactory epithelium, human L.S.
- HHS-93 Tactile corpuscle of human sec.
- HHS-94 Lamellar corpuscle of human sec.
- 14. Integument (skin)
- HHS-95 Scala, vertical L.S. shows hair follicles human, H.E. stained
- HHS-96 Skin from armpit with apocrine glands, vertical L.S.
- HHS-97 Eyelid, human L.S.
- HHS-98 Mammary gland, active, human L.S.
- HHS-99 Mammary gland, resting, human L.S.
- HHS-100 Hair of human w.m.



HHS-74  
Kidney,  
human L.S.



HHS-84  
Testis of  
Human sec.

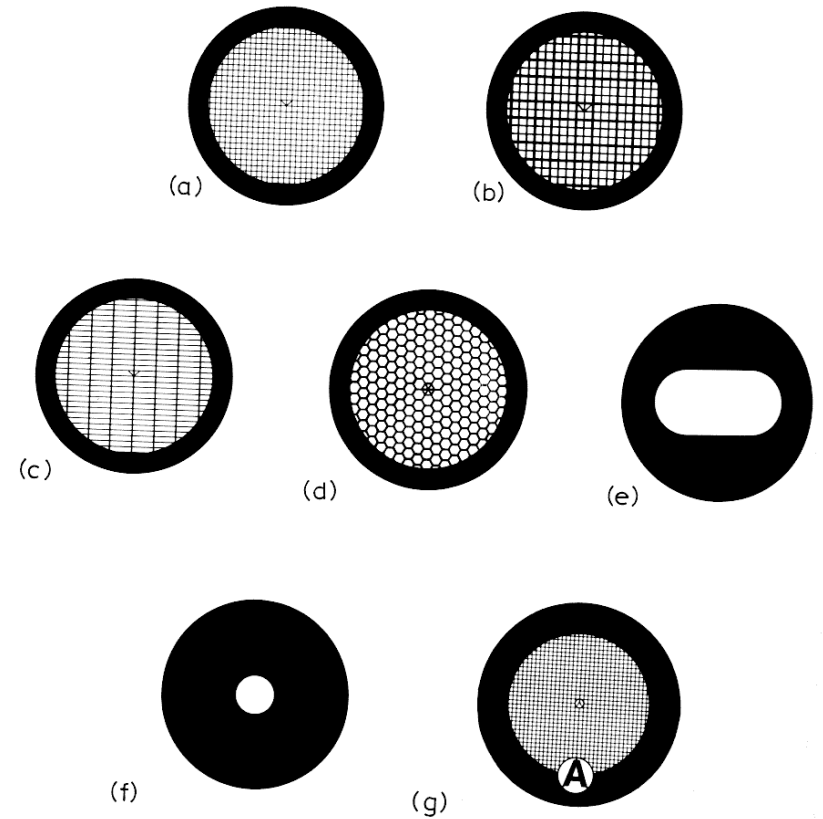


HHS-33  
Blood smear,  
human, H.E.



HHS-57  
Duodenum of  
Human sec.

# 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



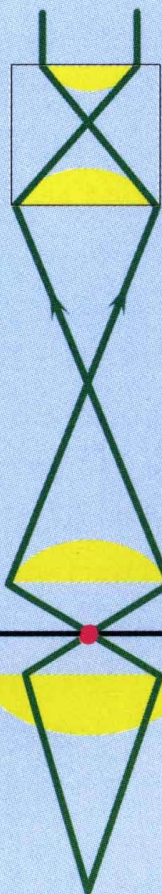


elektronově  
densní

elektronově  
lucentní

# POZOROVÁNÍ

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



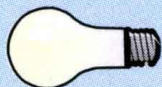
okulár

objektiv

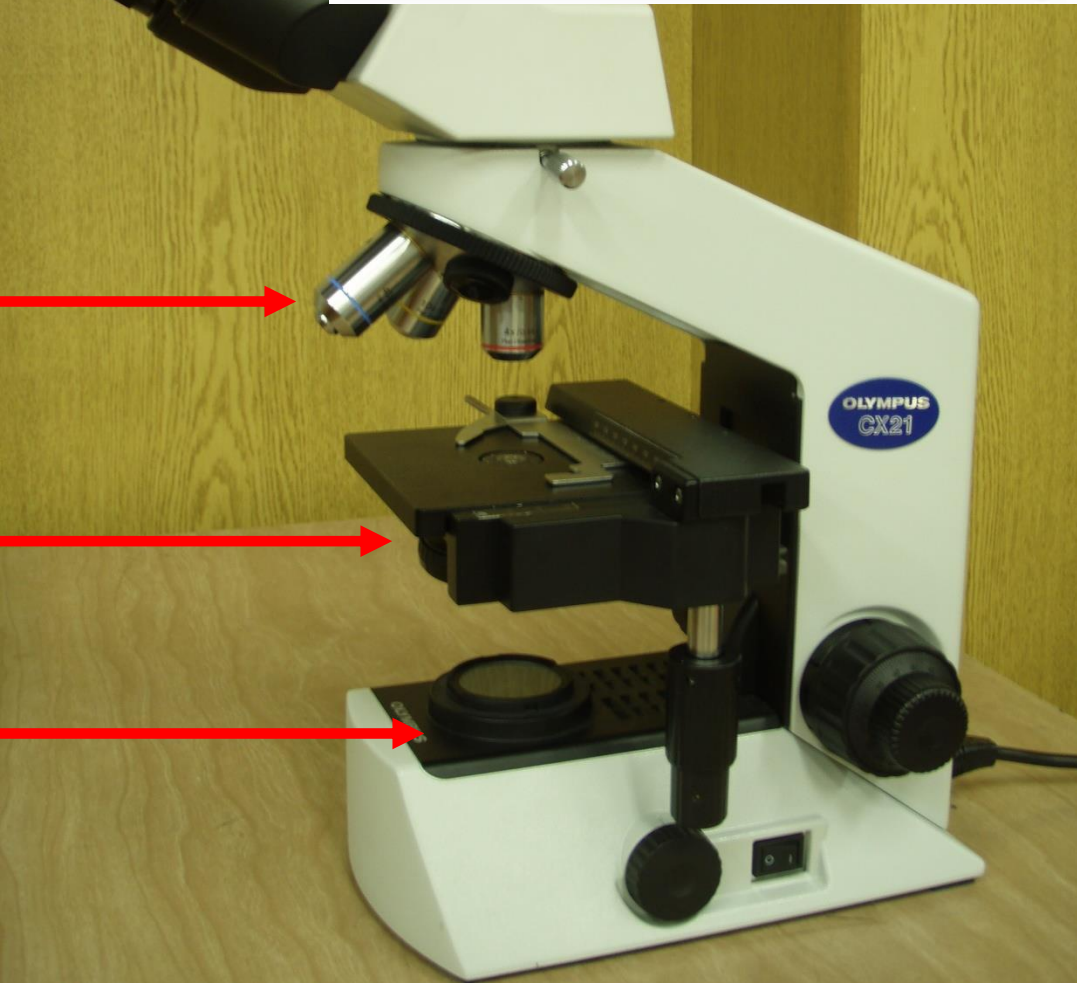
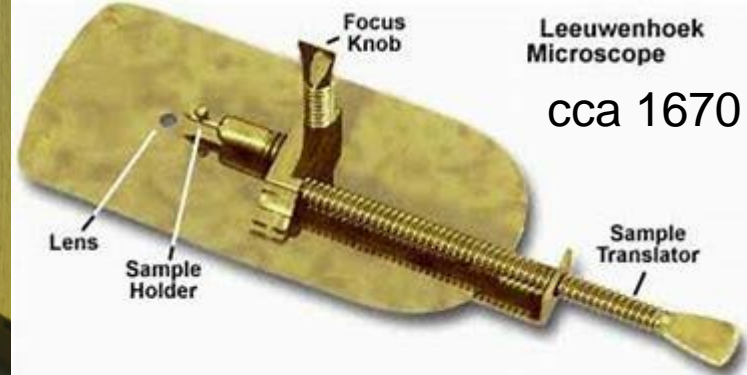
vzorek

kondenzor

zdroj světla



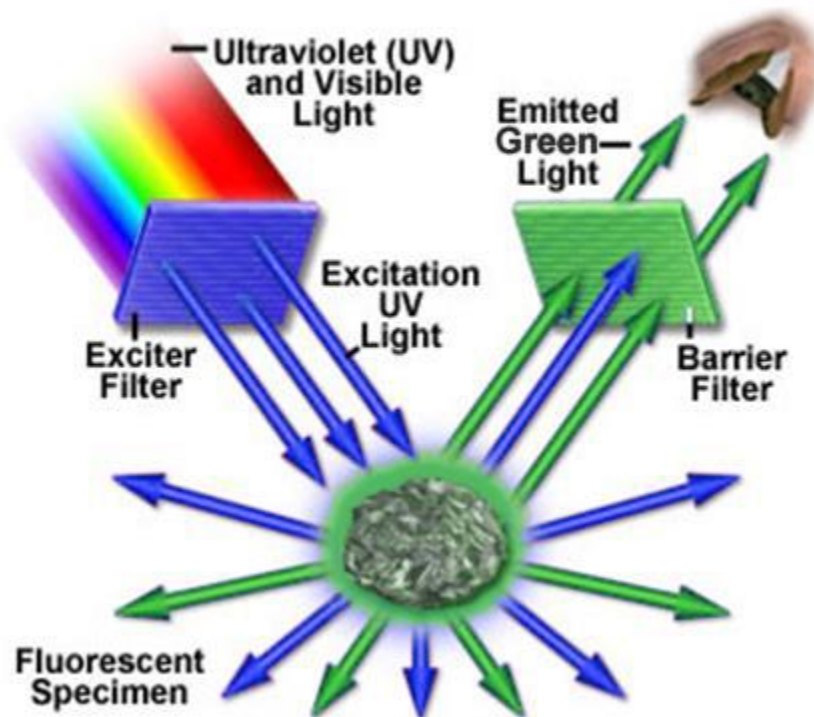
## Prozařovací světelný mikroskop

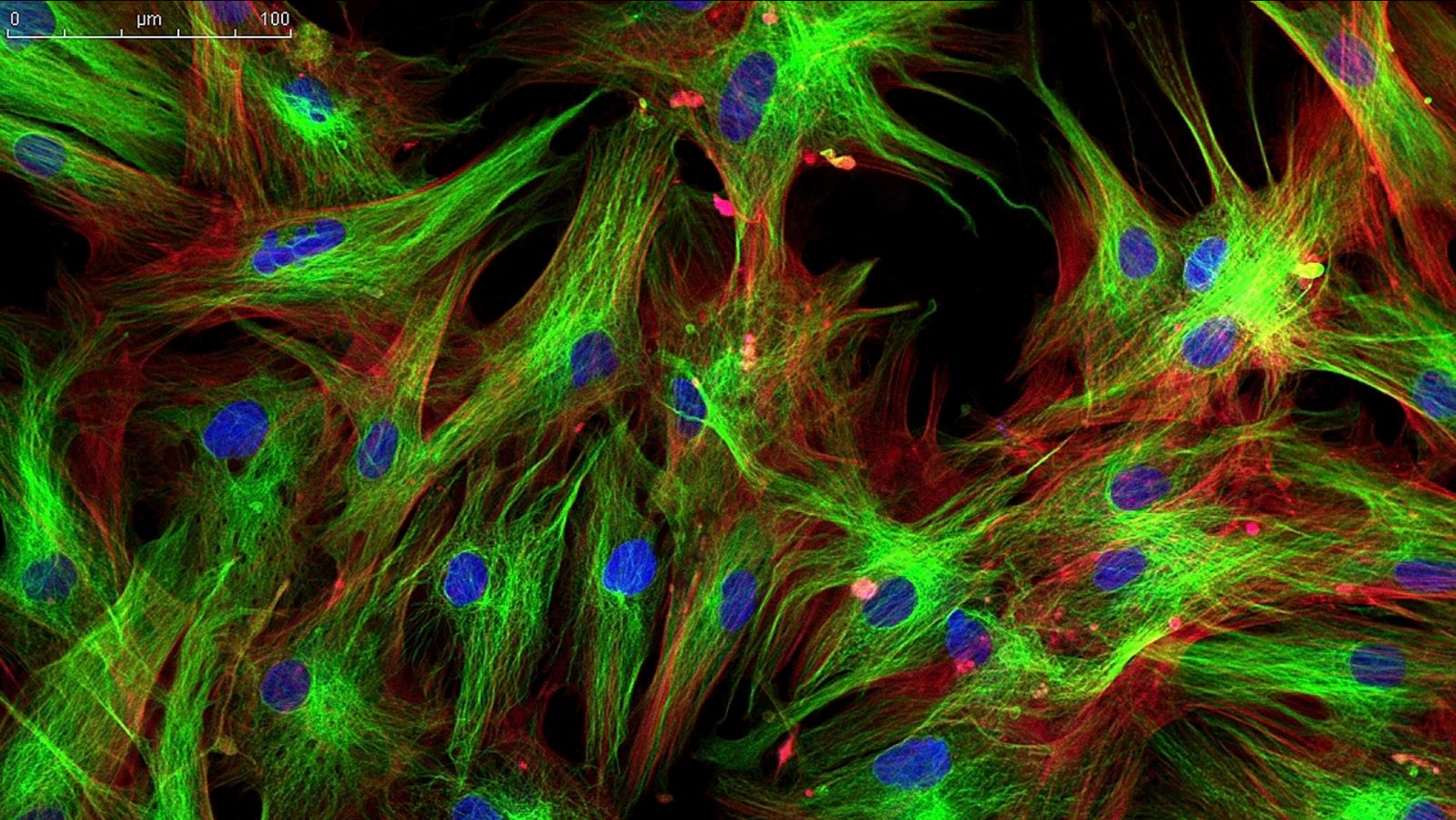


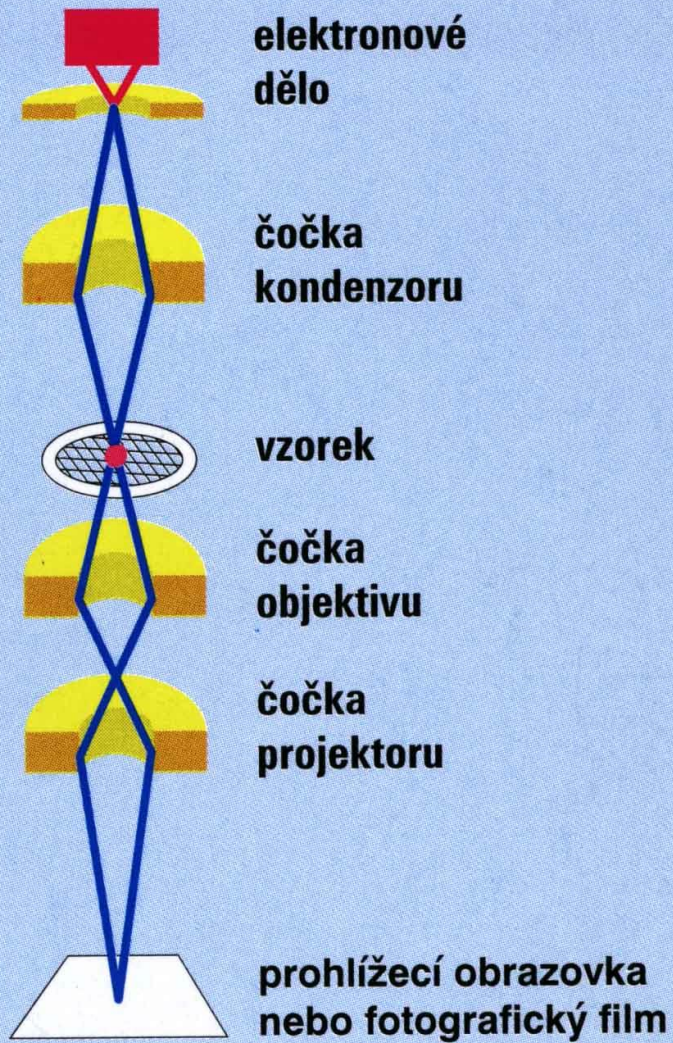
# Fluorescenční mikroskopie

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

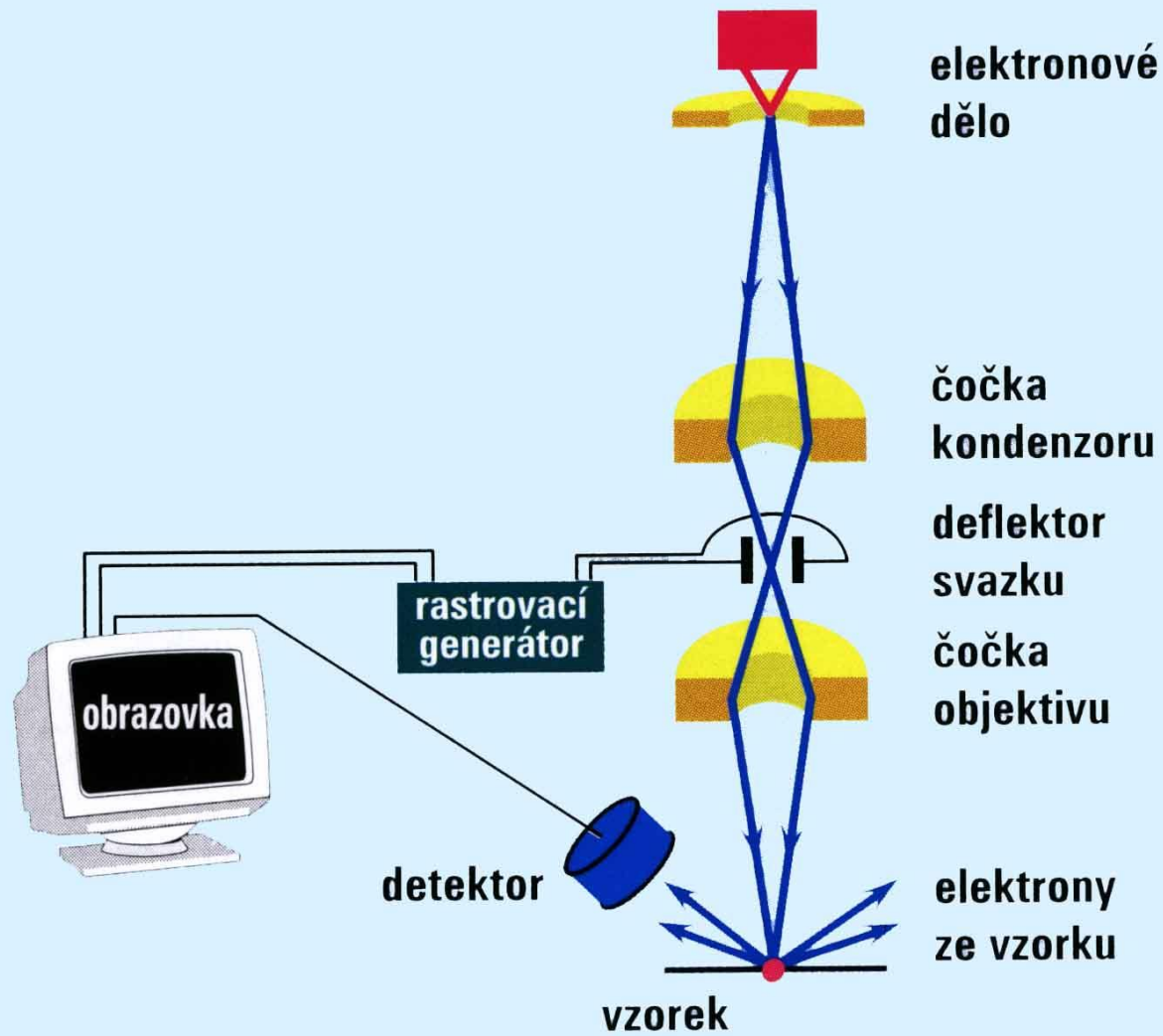
## Principle of Fluorescence







**Transmisní (prozařovací)  
elektronový mikroskop (TEM)**

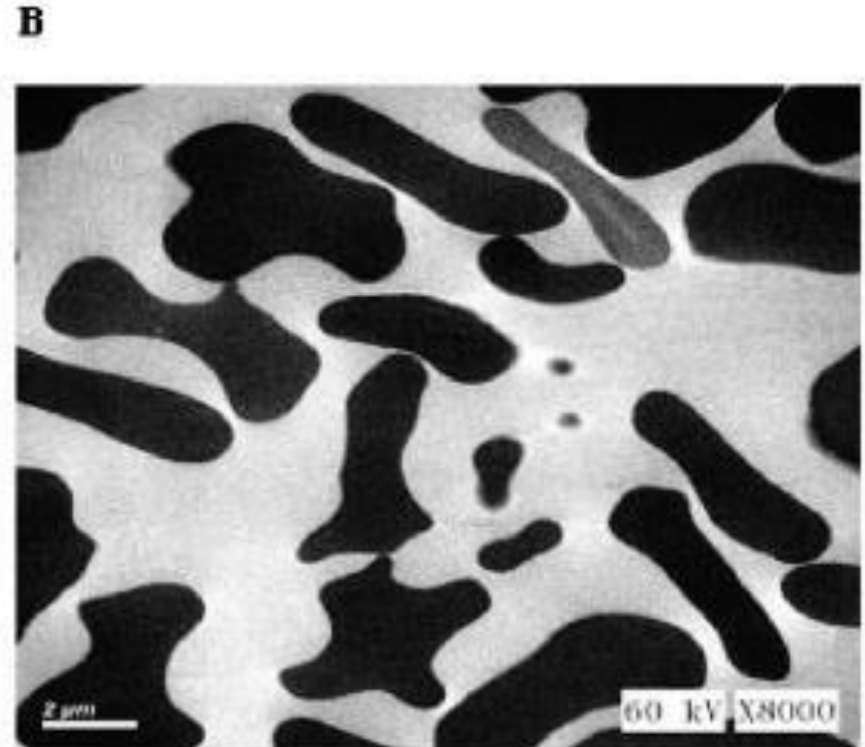
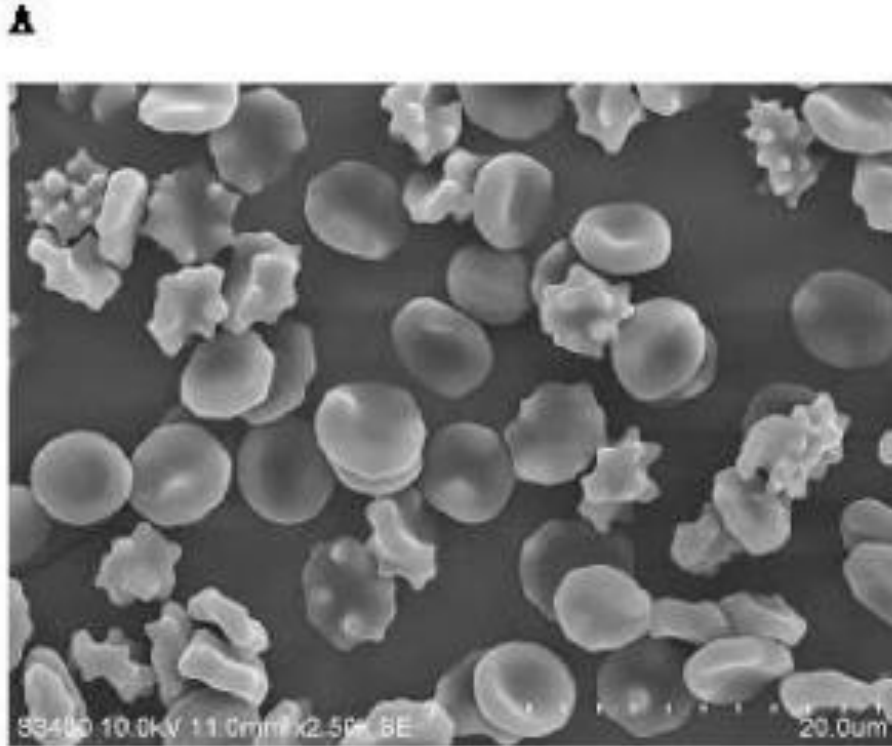


## **Rastrující elektronový mikroskop (SEM)**



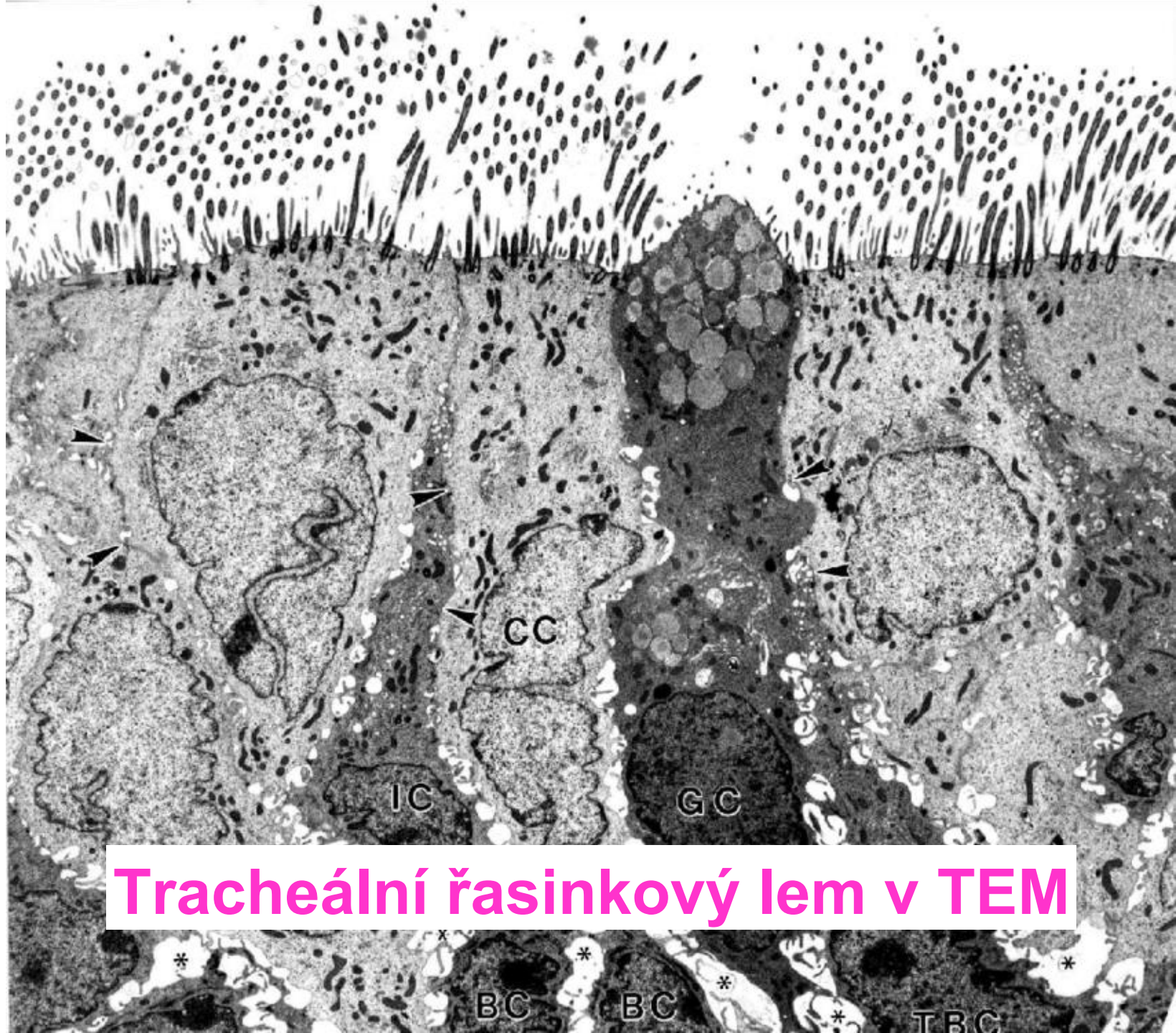
# SEM

# 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)

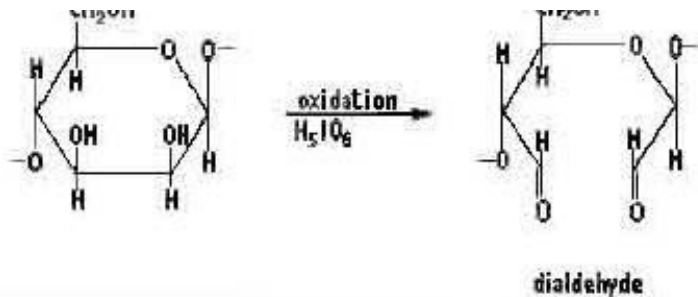
- nukleových kyselin
- lipidů
- sacharidů
- pigmentů
- proteinů (aminokyselin) – dnes neobvyklé,  
nahrazeno imunohistochemickými metodami

## 2/ Katalytická (enzymová) histochemie – detekce enzymů

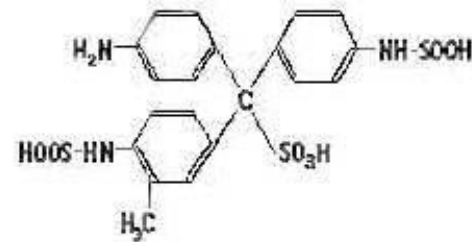
# PAS reakce (periodic acid – Schiff)

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

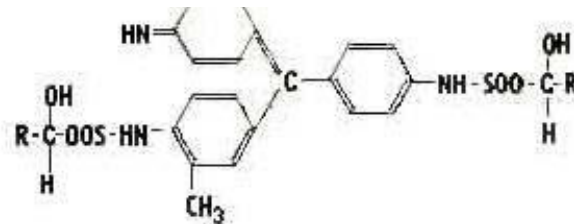
**1** oxidace sousedních (vicinálních) volných glykolových skupin kyselinou jodistou  
(**Malapradeho reakce**)



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

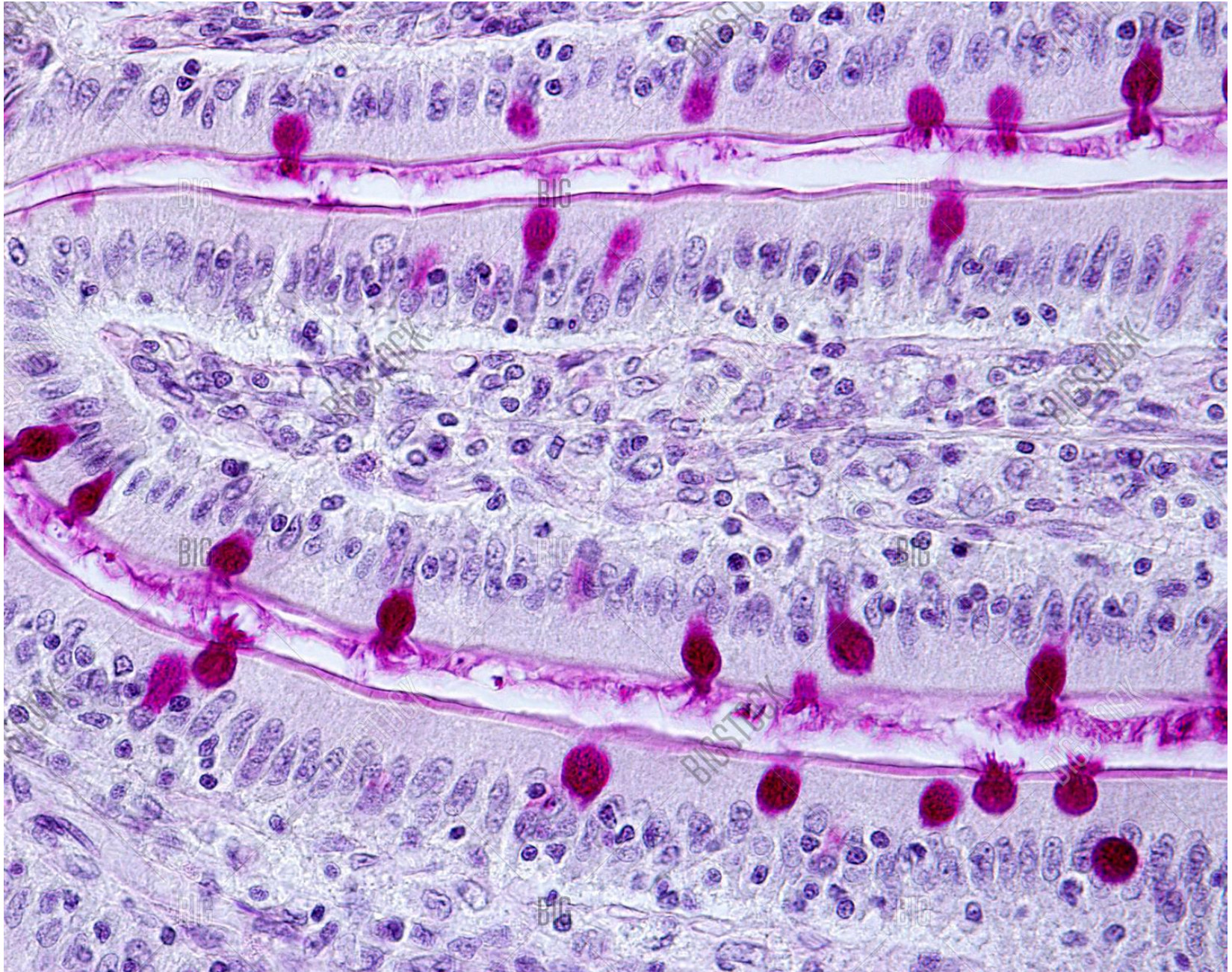


po reakci s aldehydy vzniká nová **červenofialová** sloučenina



**PAS reakce**

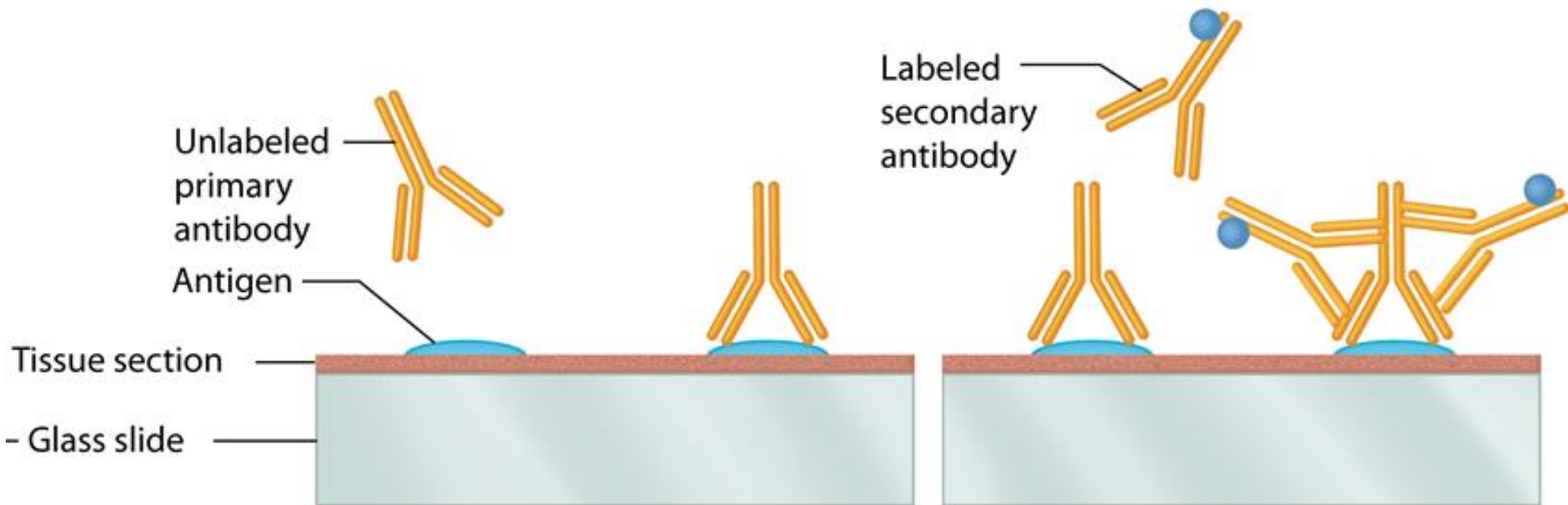
**neutrální muciny**

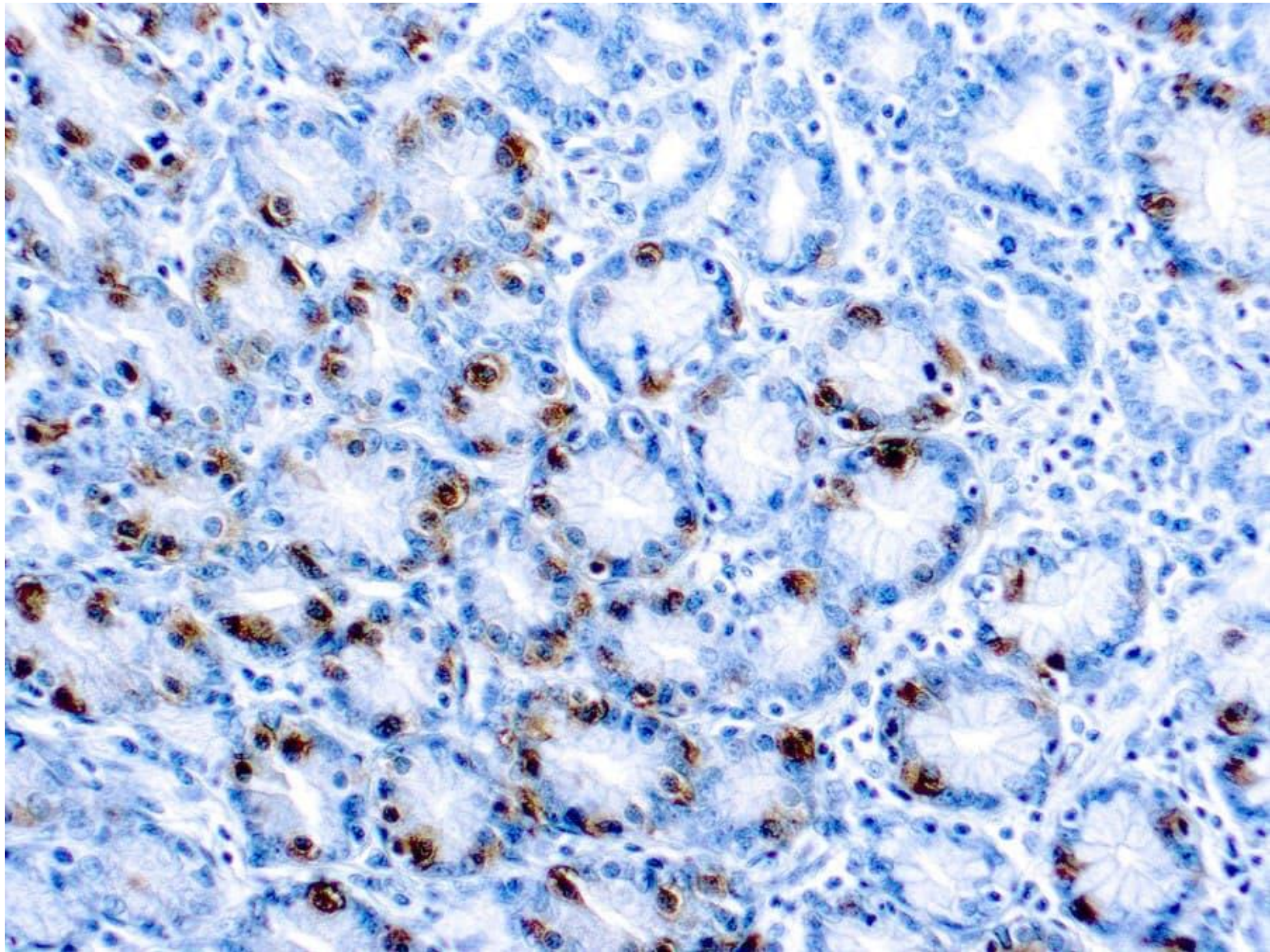


# IMUNOHISTOCHEMIE

## 1/ Vazba protilátky na antigen

## 2/ Zviditelnění (vizualizace) této vazby







**Buňka = základní strukturální a funkční jednotka živé hmoty.**

**Protoplasma ohraničená buněčnou membránou.**

**prokaryotické buňky (bakterie, sinice, archea)**

**protoplasma není dále rozdělena**

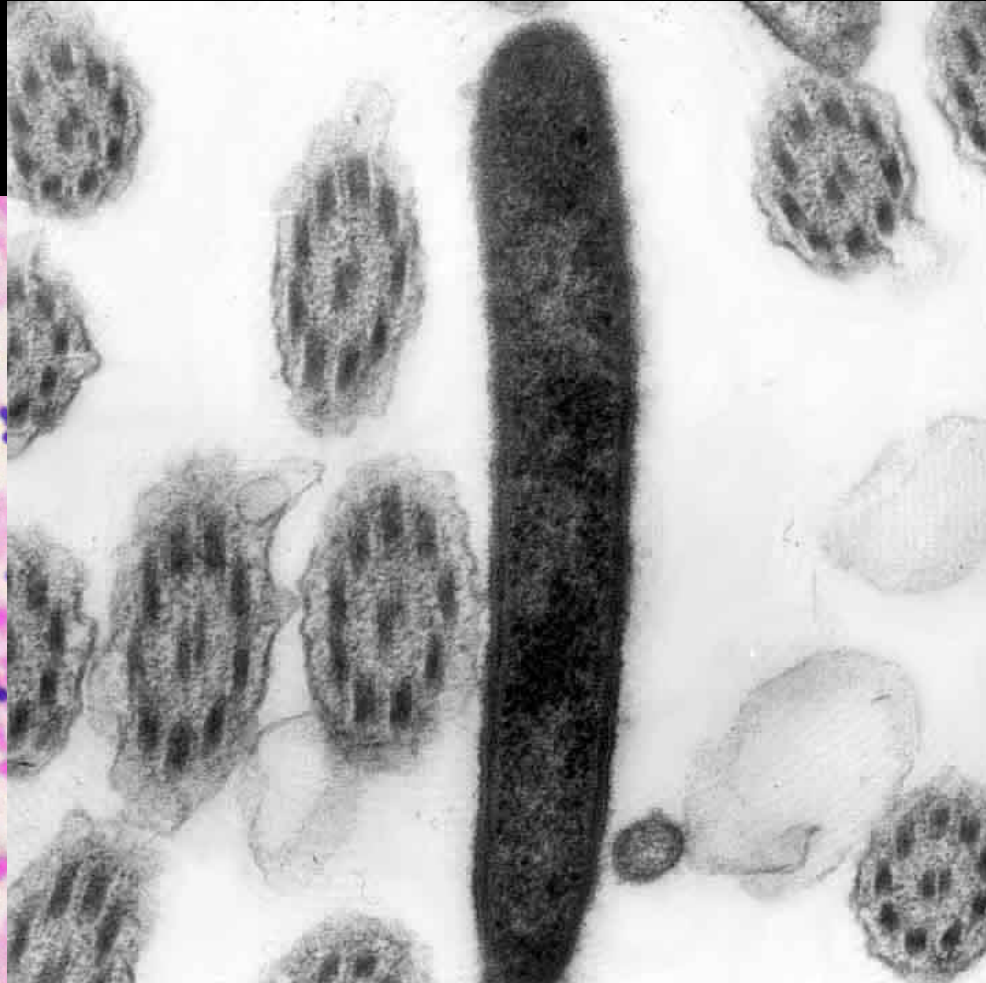
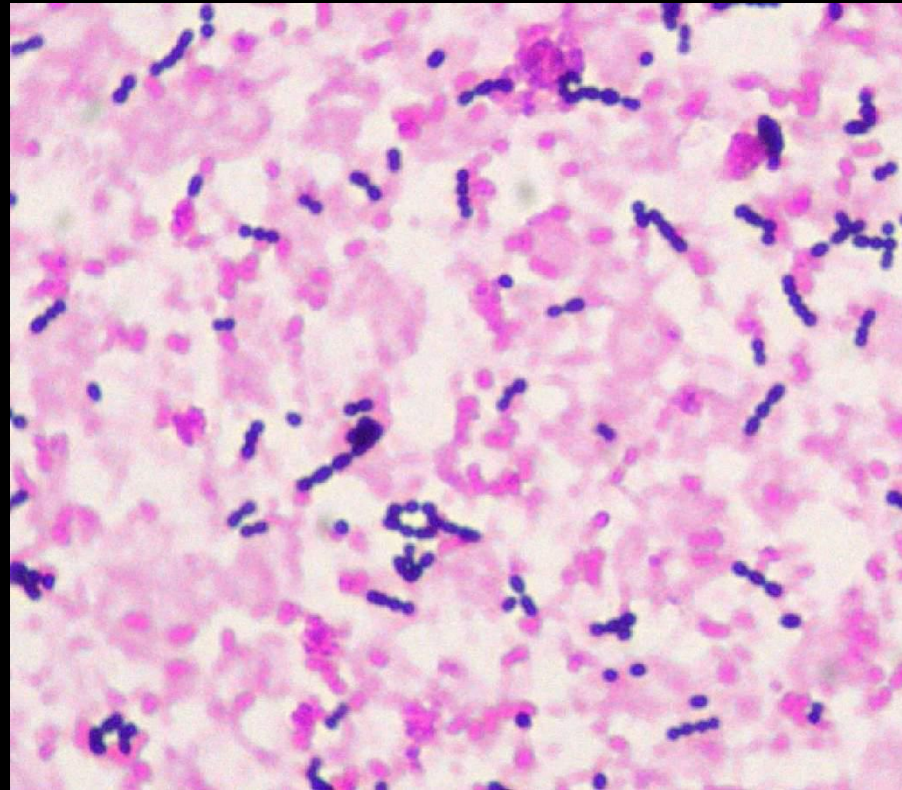
**eukaryotické buňky (prvoci, živočichové, rostliny, houby)**

**protoplasma rozdělená membránami na oddíly (kompartmenty)**

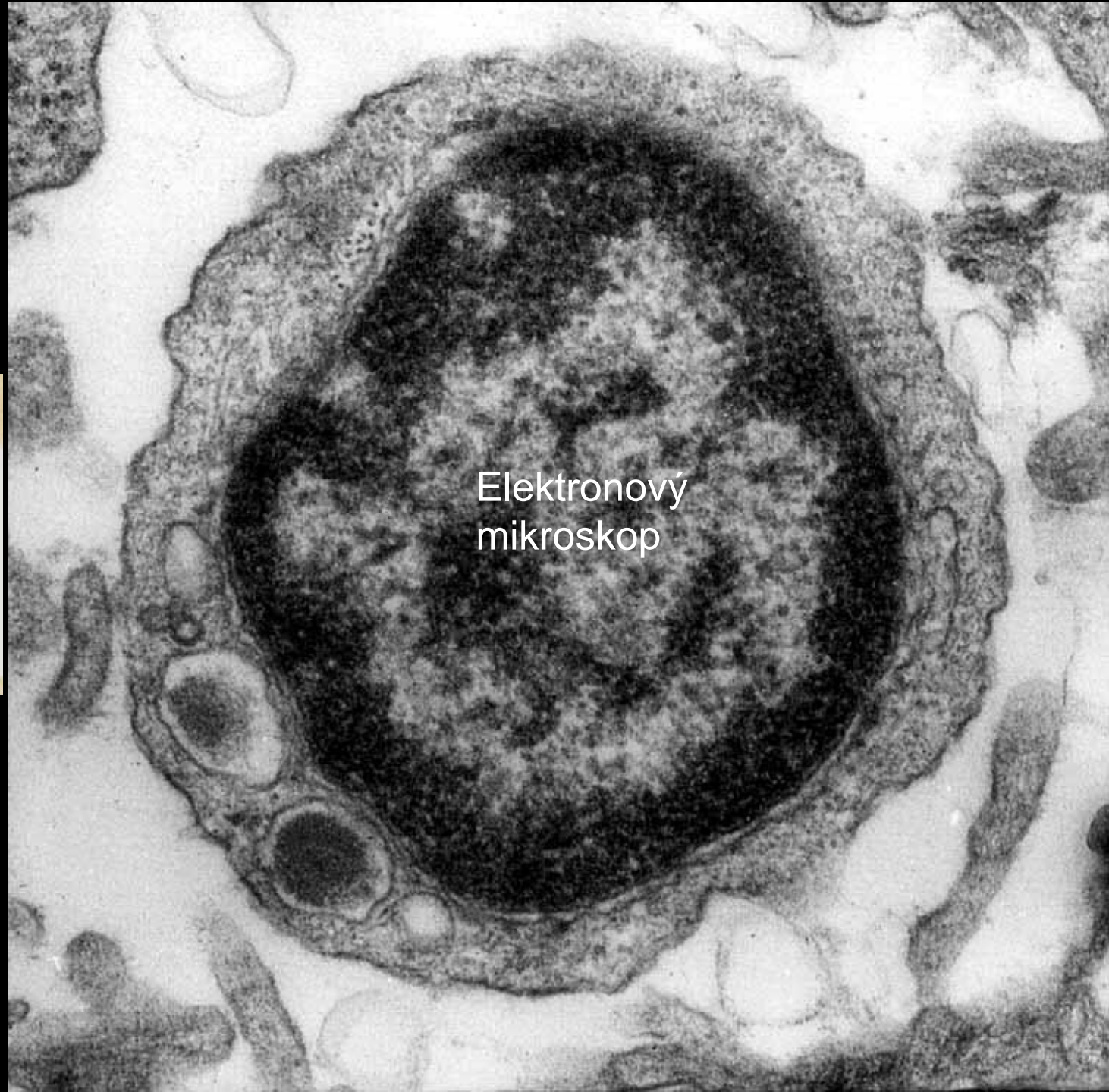
# Prokaryotická buňka

Elektronový  
mikroskop

Světelný  
mikroskop



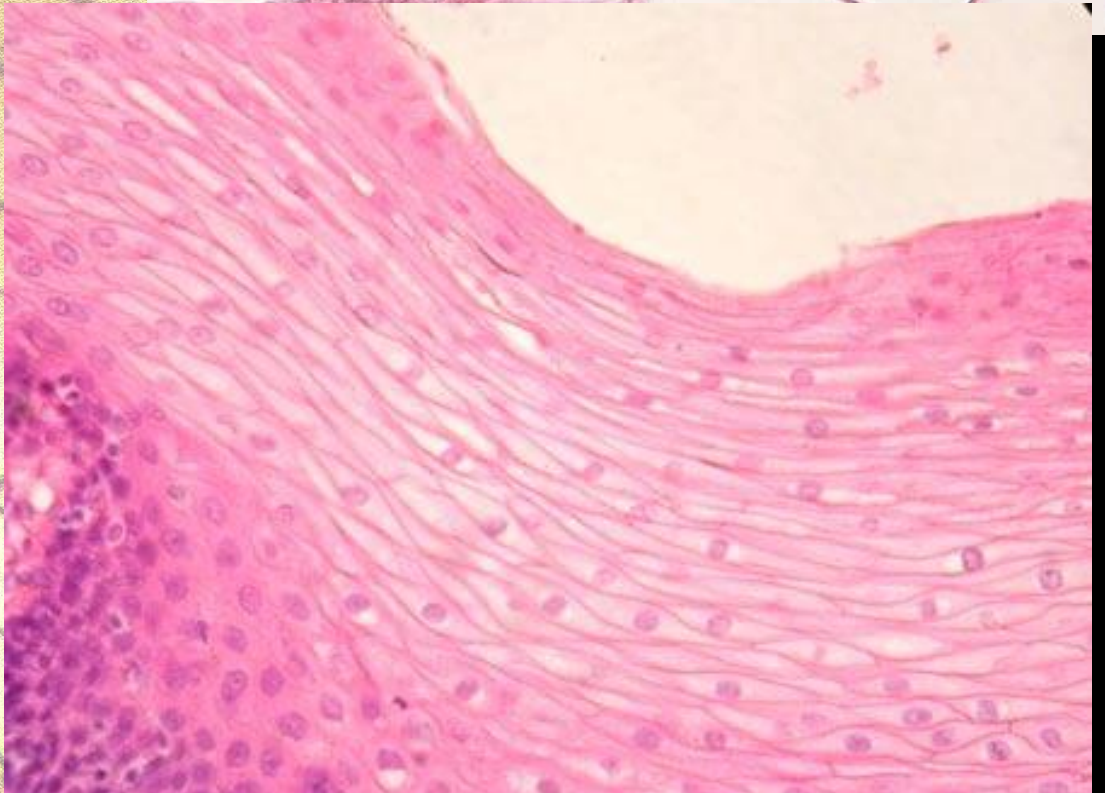
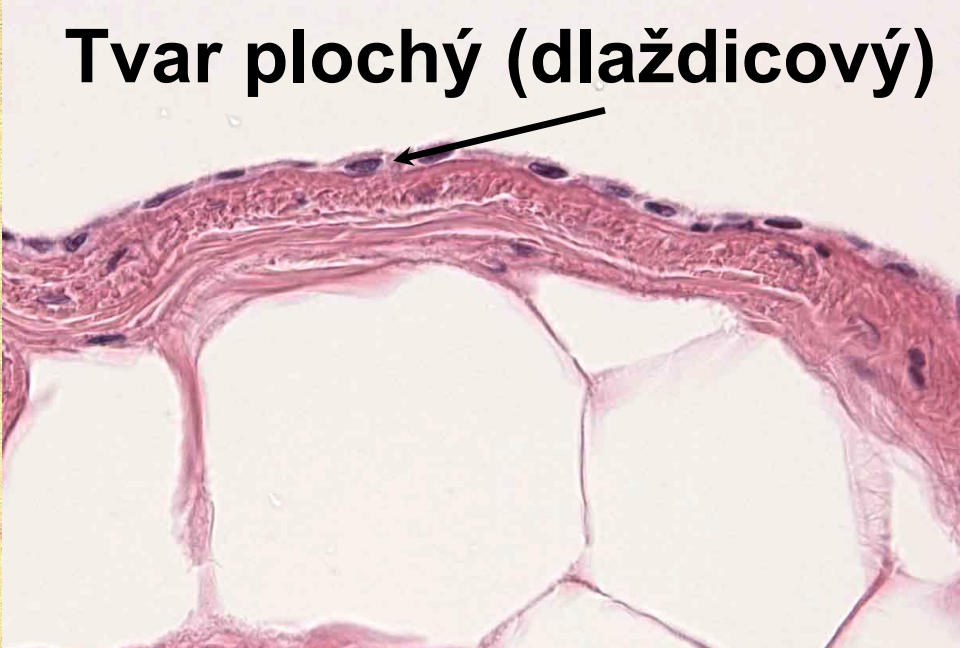
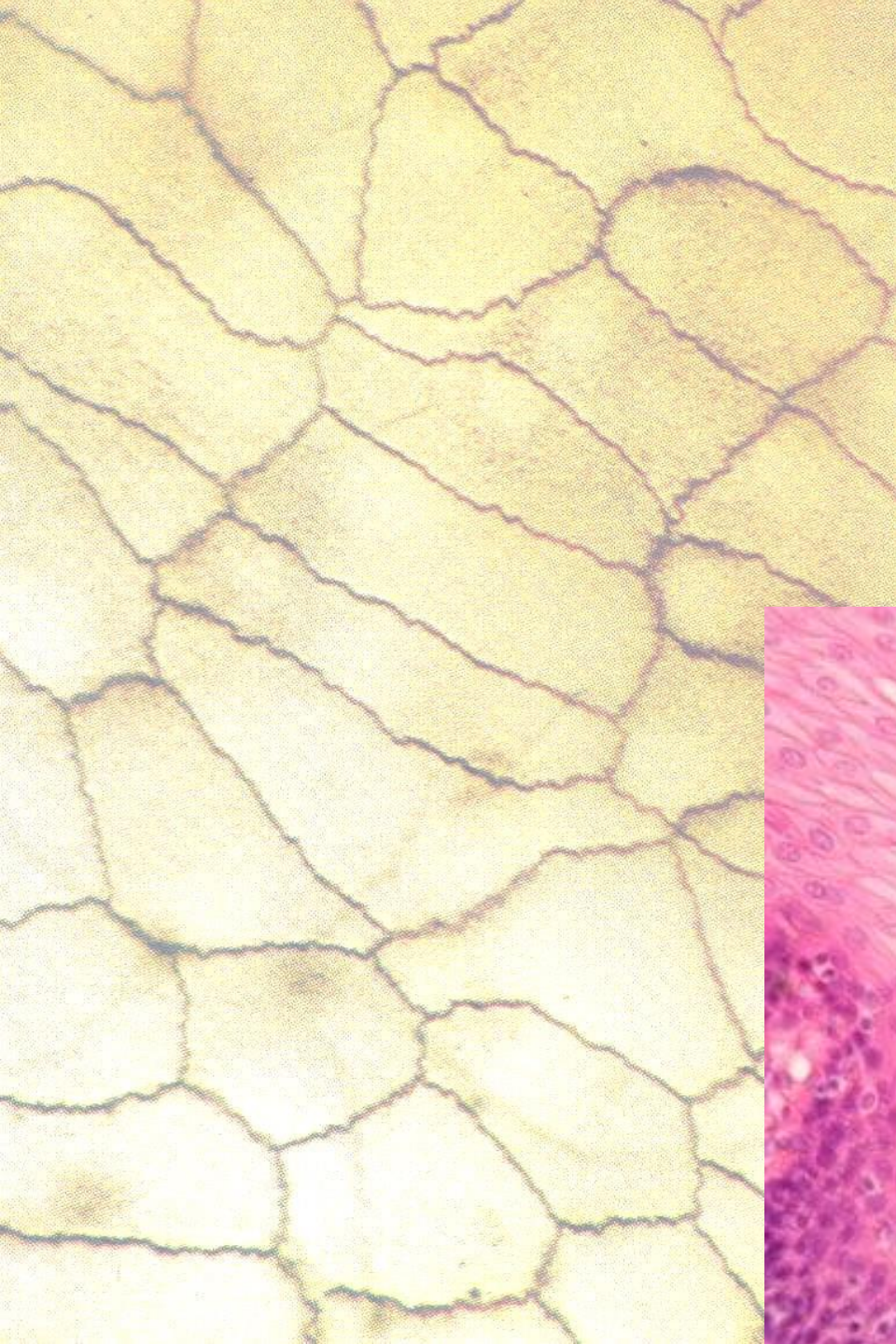
**Eukaryotická  
buňka  
(lymfocyt)**



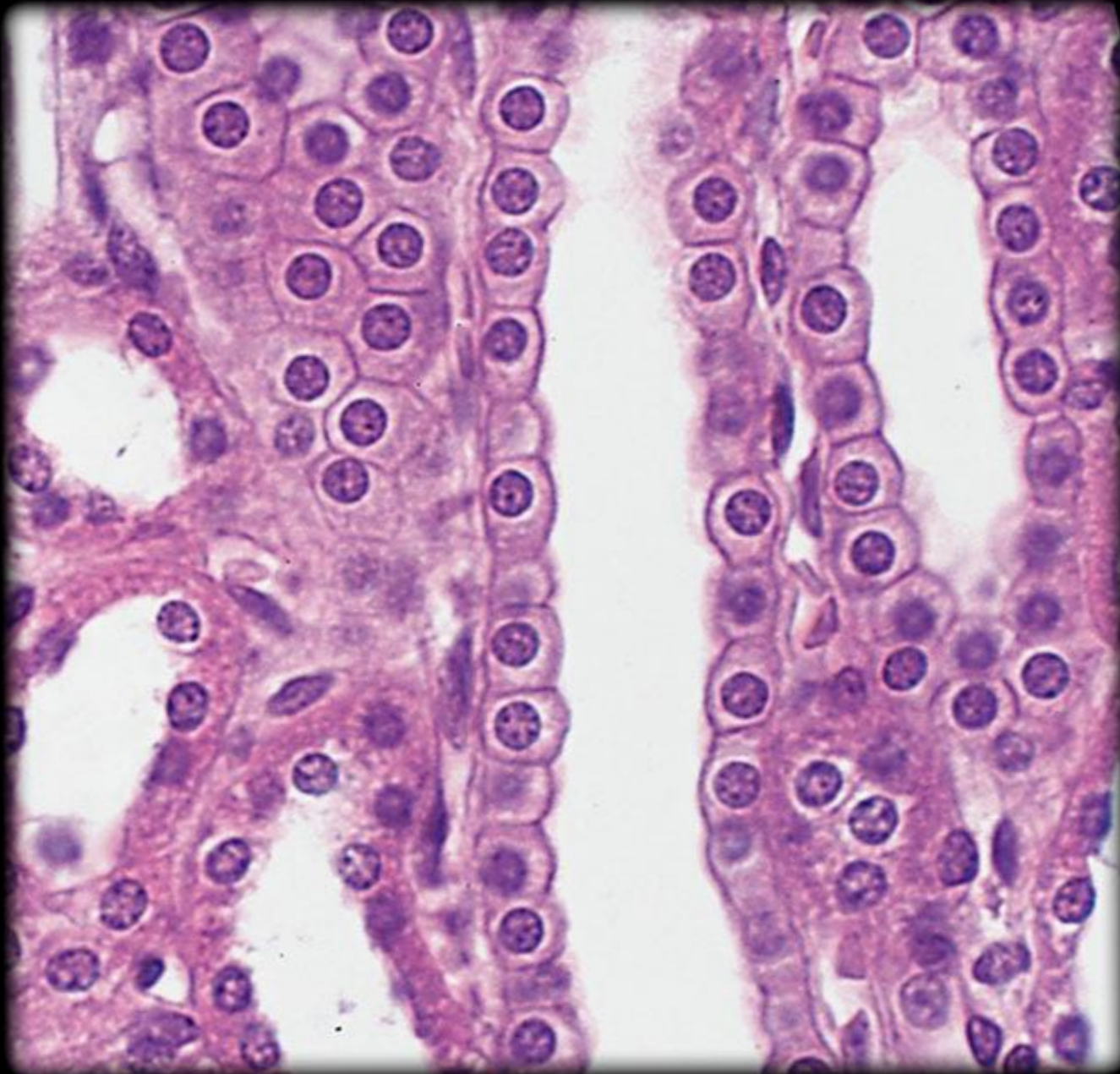
# Obecné vlastnosti buněk

- tvar
- velikost
- délka života
- stupeň diferenciacce

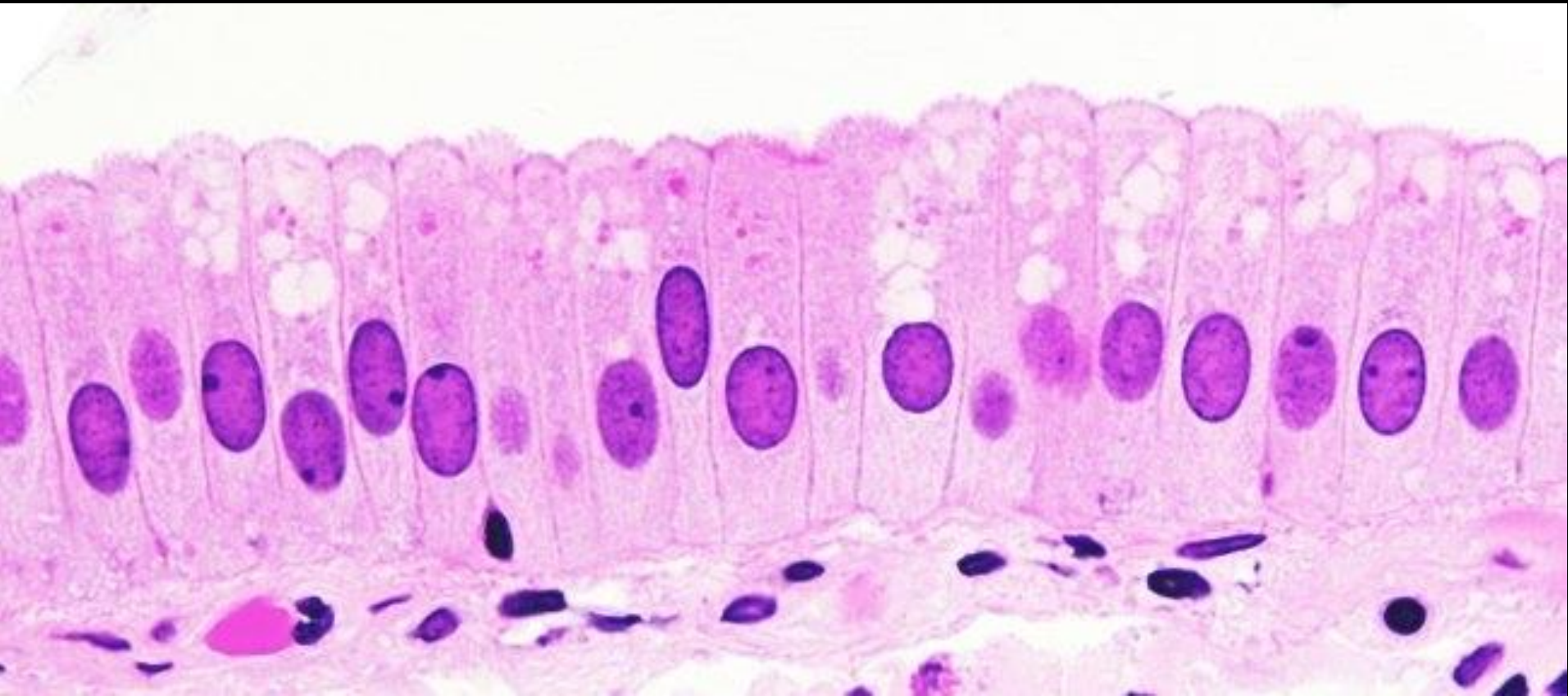
**Tvar plochý (dlaždicový)**



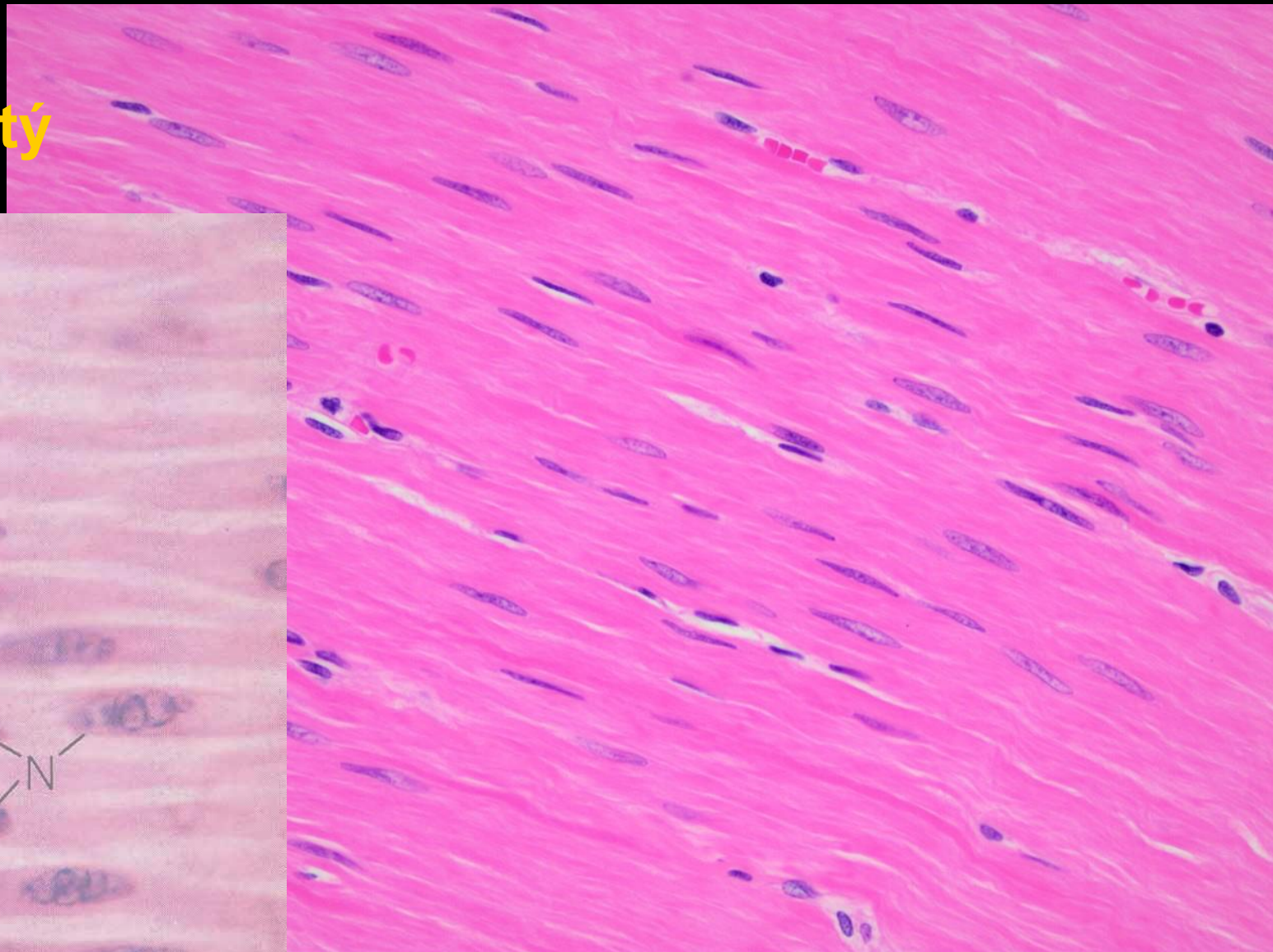
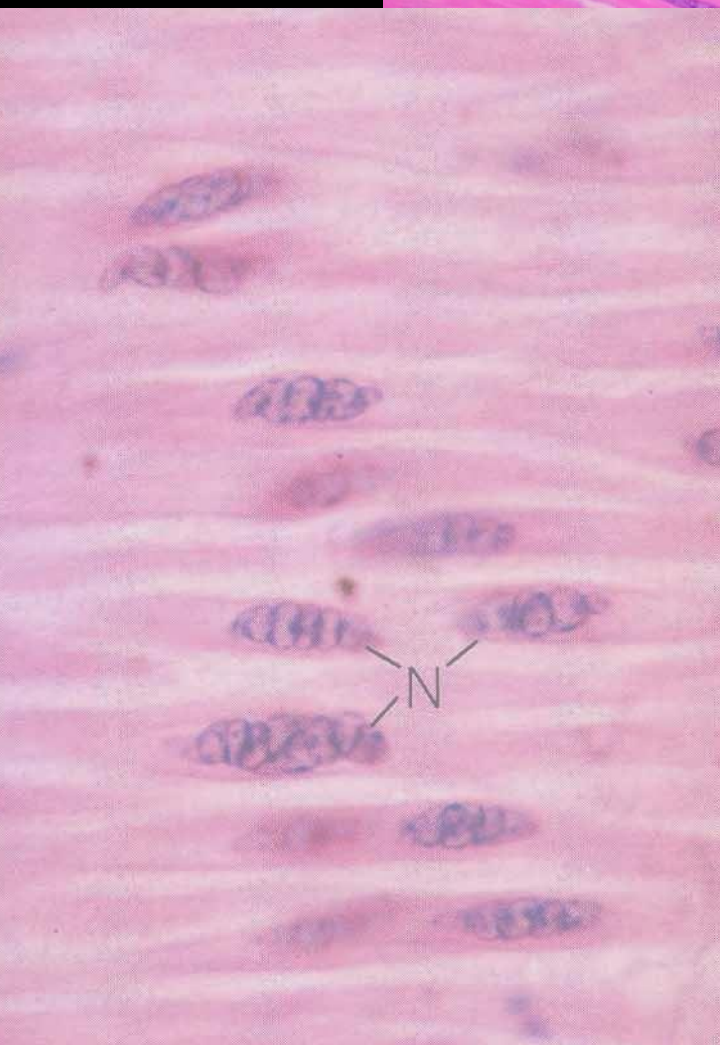
# Tvar kubický



# Tvar cylindrický

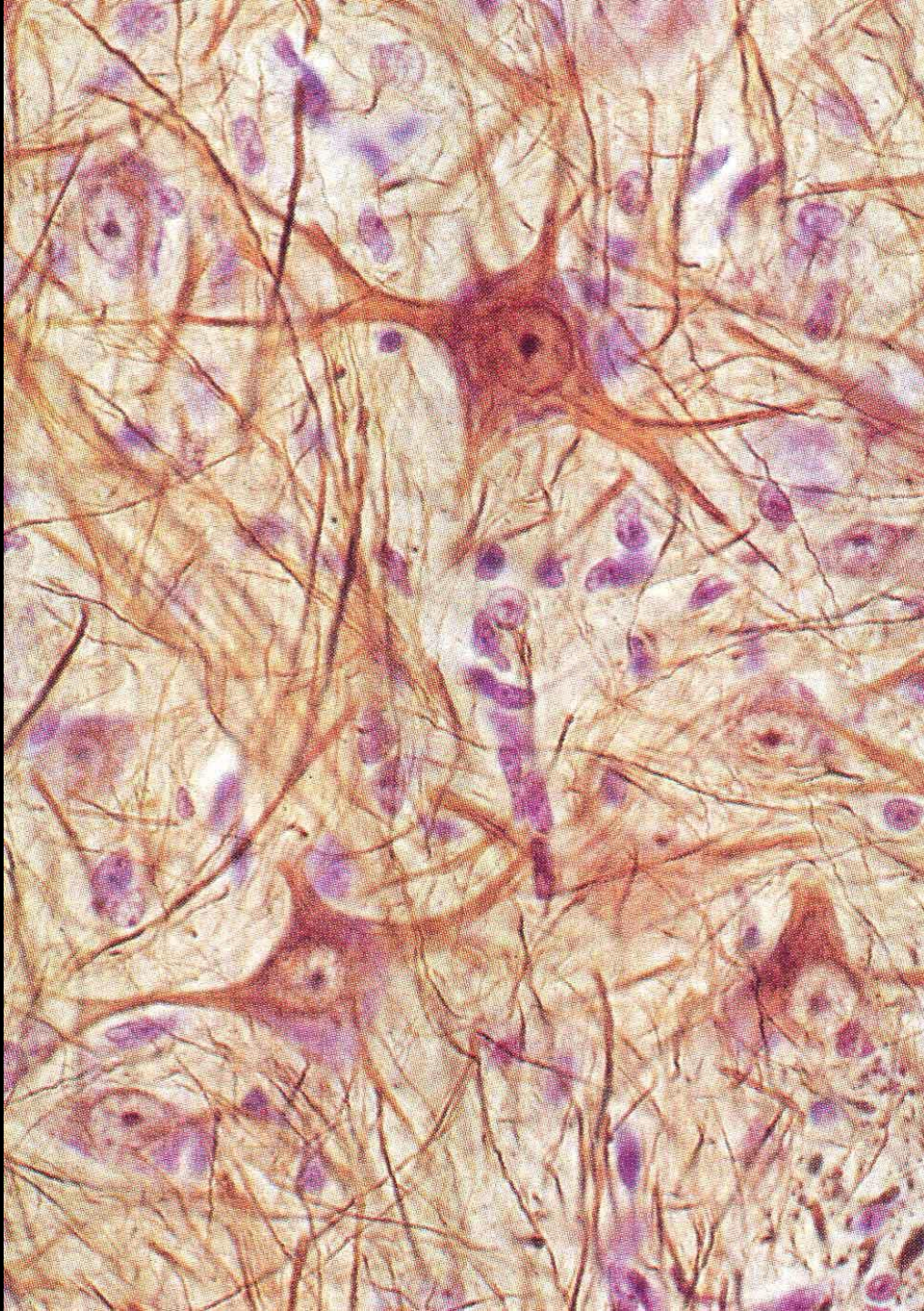


# Tvar vřetenovitý



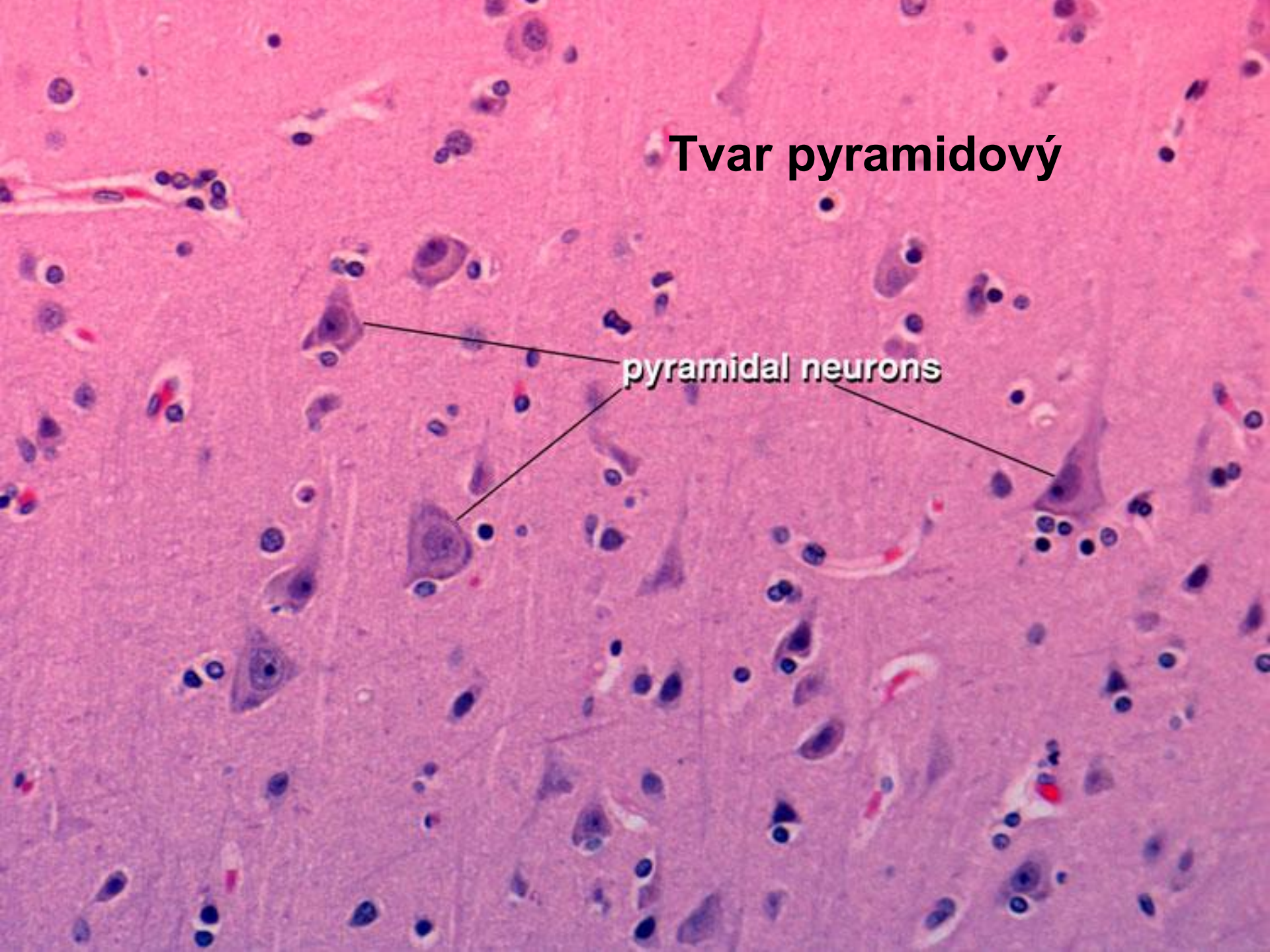


# Tvar hvězdicovitý

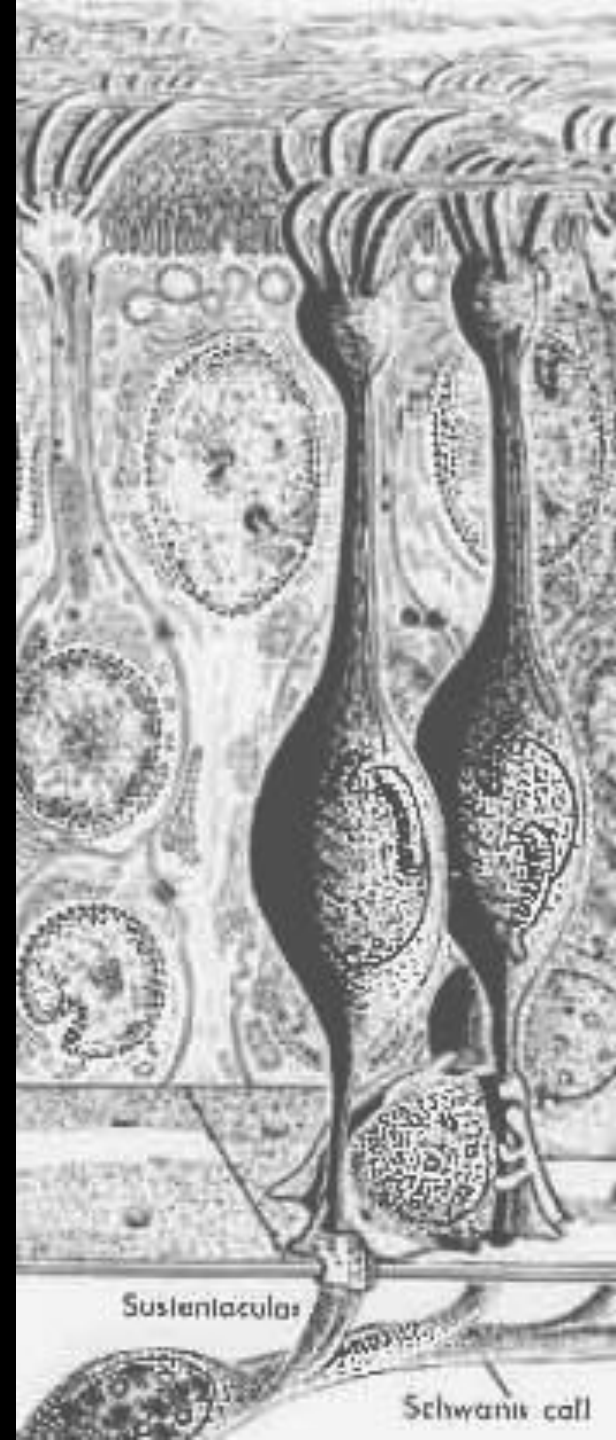
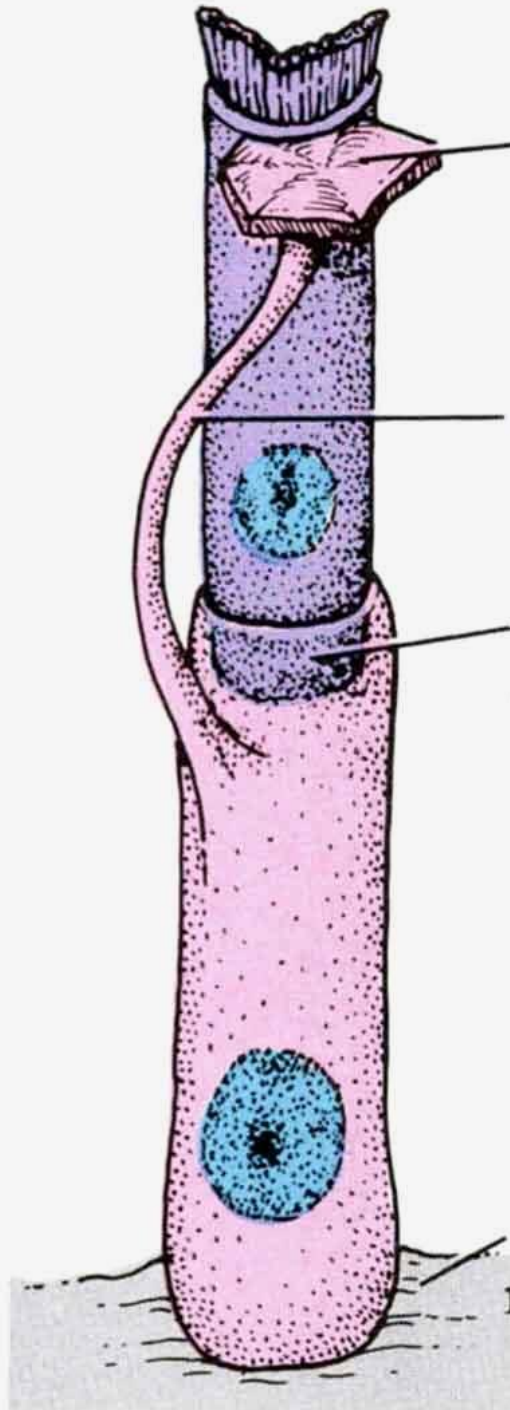
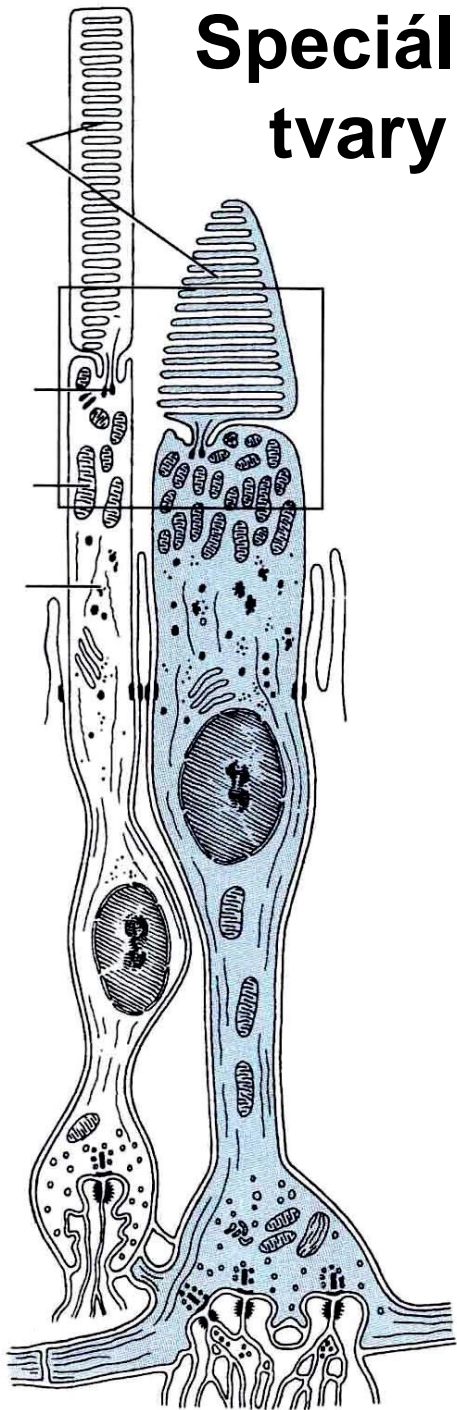


# Tvar pyramidový

pyramidal neurons



# Speciální tvary



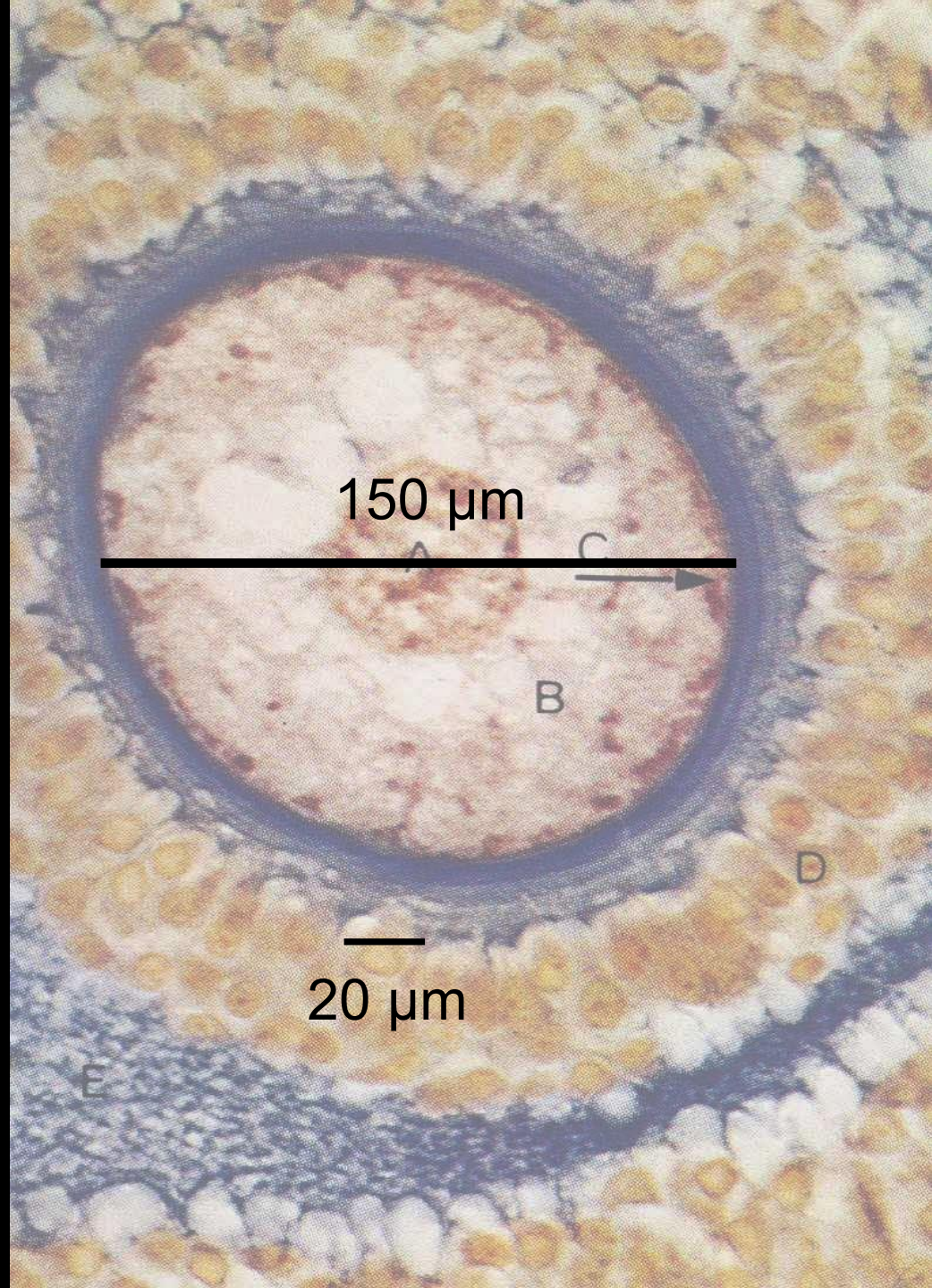
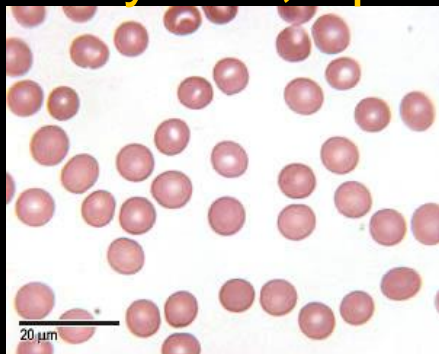
# Velikost buněk

průměrná lidská buňka  
10-20  $\mu\text{m}$

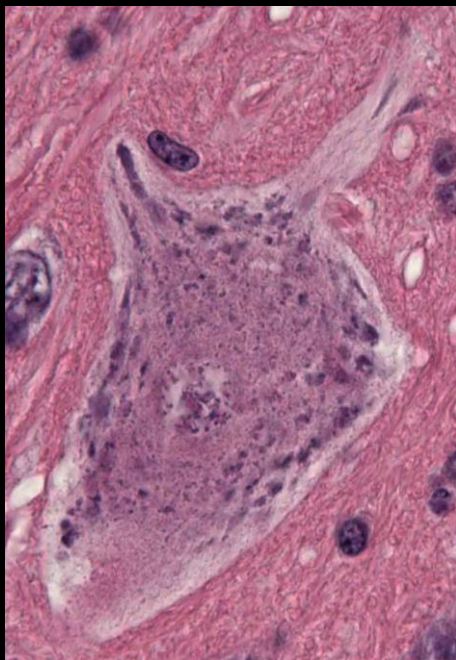
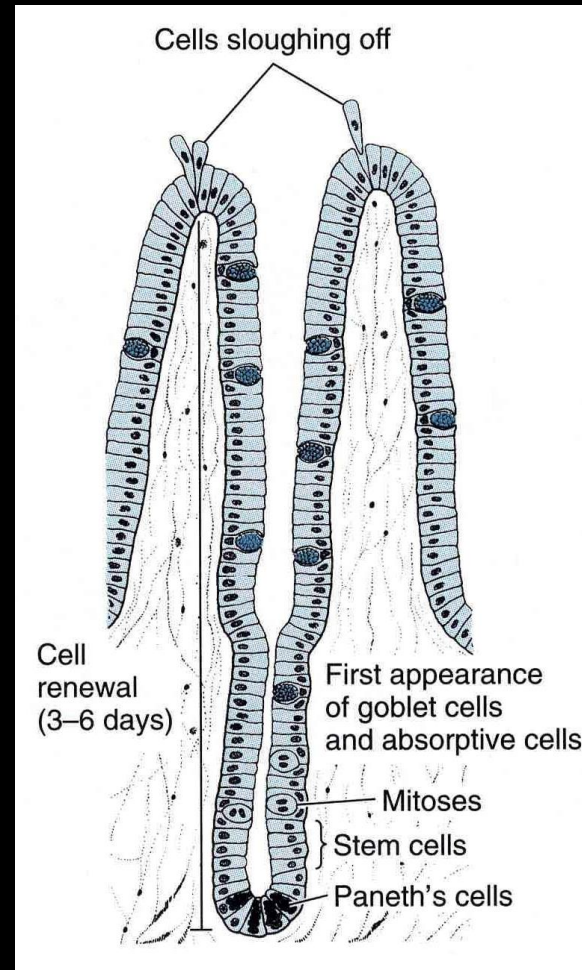
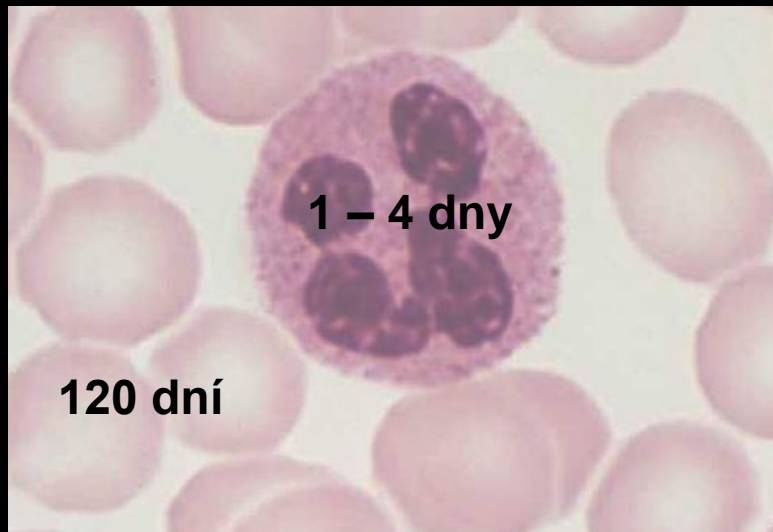
největší – oocyt – 150  $\mu\text{m}$

nejmenší – hlavní buňky  
příštítných žláz nebo malé  
granulární neurony mozečku  
– 4-5  $\mu\text{m}$

měřítko – erytrocyt – 7,5  $\mu\text{m}$



# Délka života



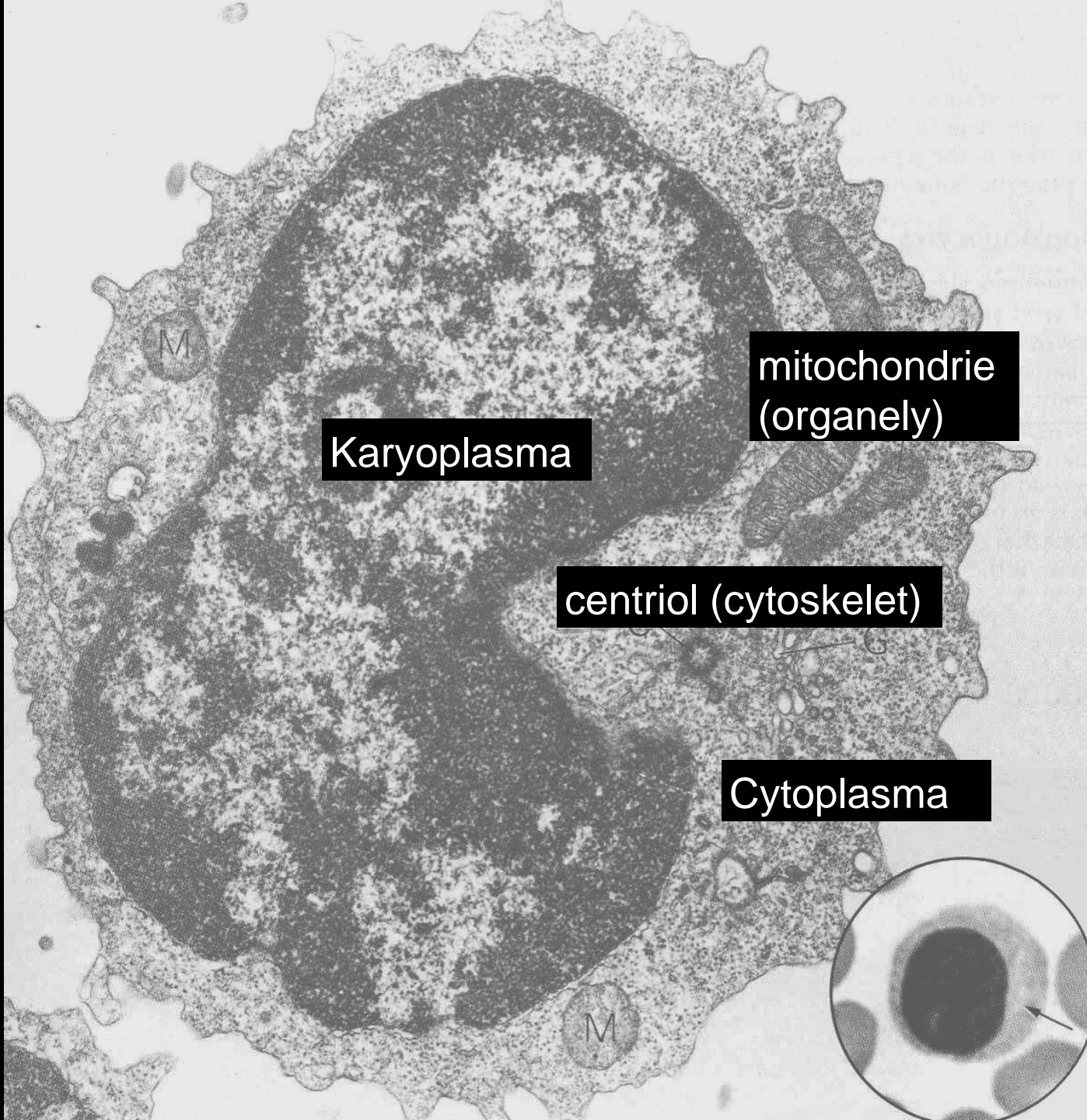
# SOUČÁSTI EUKARYOTICKÉ BUŇKY

**protoplasma = karyoplasma + cytoplasma**

**karyoplasma = obsah jádra**

**cytoplasma = matrix (cytosol) + cytoplasmatické struktury**

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

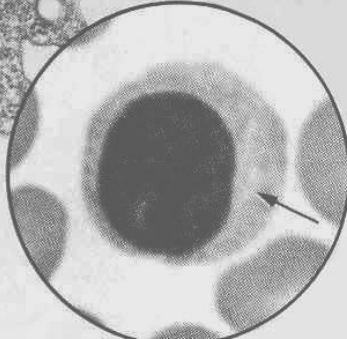


Karyoplasma

mitochondrie  
(organely)

centriol (cytoskelet)

Cytoplasma





**THANK YOU FOR YOUR  
ATTENTION!**