

LABORATÓRNA TECHNIKA

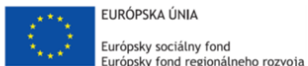
Špeciálne histologické techniky



Parafínová technika, zmrazovacia technika
a špeciálne farbiace techniky

NÁRODNÝ PROJEKT

„Zlepšenie stredného odborného školstva v Prešovskom samosprávnom kraji“



„Tento projekt sa realizuje vďaka podpore z Európskeho sociálneho fondu a Európskeho fondu regionálneho rozvoja v rámci operačného programu Ľudské zdroje“

Ing. Martina Lachová

OBSAH: Špeciálne histologické techniky

➔ Parafínová technika

➔ Zmrazovacia technika

➔ Špeciálne farbiace techniky



ŠPECIÁLNE HISTOLOGICKÉ TECHNIKY

Odber materiálu:

1. Biopsia – zo živého zvierata,

- „*probatórna*“ *excízia* - odobratie malého kúska tkaniva za diagnostickým účelom,
- *probatórna punkcia* – nabodnutie orgánu širšou dutou ihlou nasadenou na striekačku, do ktorej sa ťahom piestu natiahnu malé čiastočky tkanív,
- *kyretáž* – zoškrabnutá malá čiastočka tkaniva pomocou lyžičky - kyrety

2. Nekropsia – starší materiál, získaný pitvou z uhynutého zvierata.

Zasielanie vzoriek na histologické vyšetrenie

Postup:

- ✓ vzorka sa odoberie čo najskôr po uhynutí zvierťa,
- ✓ podľa možnosti má mať *tvar kocky* s hranou 5-10 mm,
- ✓ *rezať* ostrým skalpelom alebo žiletkou (vystrihnutím sa tkanivo rozmliaga),
- ✓ tkanivo **ihneď** *fixovať* vložením do *fixačnej tekutiny*,
- ✓ tkanivo presne *označiť*.

Vyplní sa sprievodný list (žiadanka na histologické vyšetrenie): odosielateľ, nacionálne zvierťa, klinická diagnóza, dátum odberu, fixačná tekutina, požadované vyšetrenie.

Označí sa nádobka s materiálom - základne údaje

Parafínová technika

➔ Fixácia

➔ Premývanie

➔ Zalievanie vzorky do parafínu

➔ Rezanie parafínových bločkov

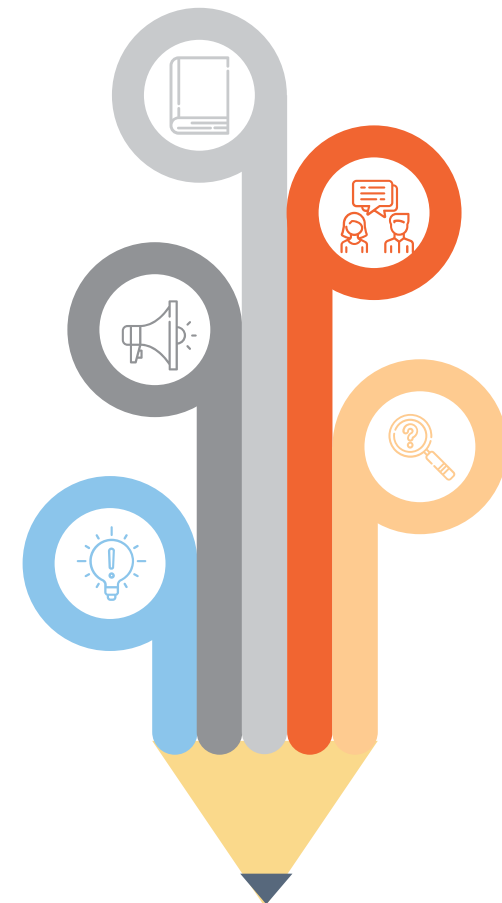
➔ Vyrovnanie a lepenie

➔ Odparafínovanie rezov

➔ Farbenie histologických preparátov

➔ Vyjasnenie histologických preparátov

➔ Uzavieranie zafarbených rezov



Fixácia

Rýchle vyzrážanie (denaturácia) bielkovín protoplazmy buniek a tkanív fixačnými prostriedkami – zabráni samovoľnému rozkladu tkanív (autolýze).

Podmienky fixácie:

- ✓ zachovať čo najlepšie štruktúru tkaniva,
- ✓ zachovať farbitelnosť tkanív,
- ✓ rýchle prenikanie do tkanív (rovnomé predfixovanie celej vzorky).

Fixačné prostriedky:

- **fyzikálne** – menej rozšírené, používa sa teplo alebo rýchle vysušenie tkaniva,
 - **chemické** – najpoužívanejšie pre jednoduchú prípravu a fixáciu.
-

Metodika fixácie



Fixovaný tkanivový bloček

- ✓ Tkanivový bloček po odbere vložíme do fixačnej tekutiny **čo najskôr** (fixuje sa čerstvé).
- ✓ Tkanivový bloček nesmie byť príliš veľký (nesmie presiahnuť 1 cm).
Celé orgány – fixačná tekutina sa vstrekuje priamo do ciev alebo dostatočné množstvo fixačnej tekutiny.
- ✓ Plošné orgány (črevá, blany) sa pred vložením do fixačnej tekutiny napínajú na korkovú (plastovú) platničku pomocou špendlíkov.
- ✓ Dostatočné množstvo fixačnej tekutiny – 10x viac, ako objem tkanivového bločku.
- ✓ Dostatočný prístup fixačnej tekutiny k tkanivovému bločku (zo všetkých strán – podkladáme filtračný papier).

Fixačné tekutiny

Formalín (formol)

- ✓ najčastejšie používaná,
- ✓ východiskovou látkou je aldehyd kyseliny mravčej,
- ✓ bezfarebná tekutina, dráždivého zápachu,
- ✓ rýchlo preniká do tkanív, po fixácii sa tkanivo dobre farbí a dobre ho konzervuje,

nevýhoda: napučiavanie tkanív, bunky majú sklovitý vzhľad.

Bouinova [buenova] – s kyselinou pikrovou,

- ✓ vhodné na fixáciu väčších kusov materiálu,
- ✓ nepoškodzuje štruktúru tkaniva, dobre farbí,
- ✓ nevhodná na prekrvené orgány (slezina) – krv sa zráža-tvrdá ťažko kráateľná hmota.

Zenkerová tekutina

- ✓ fixácia kusov tkanív s hranou najviac 5 mm.

Fixačná tekutina so sublimátom

- ✓ rýchle prenikajú do tkanív, po fixácii dobre farbí,

nevýhoda: - po fixácii vznikajú v tkanivách čierne zafarbené zrazeniny – sublimátové zrazeniny (odstraňuje sa jódomou tinktúrou, Lugolovým roztokom).

Susa - najpoužívanejšia fixačná tekutina.

Fixačná tekutina s alkoholom

- ✓ etanol, zle preniká, rozpúšťa lipidy a spôsobuje zmraštenie tkanív.

Oxid osmičelý

- ✓ drahý roztok, rýchlo redukuje – sčernenie roztoku.

Premývanie

- ✓ odstraňuje sa fixačná tekutina,
 - ✓ premýva sa:
 - *formalínom* 2 – 4 hodiny pod tečúcou vodou,
 - *Zenkerovou tekutinou* 24 hodín,
 - *Bouinovou tekutinou* 24 hodín a viac v troch kúpeľoch s 80% alkoholom + niekoľko kvapiek koncentrovaného roztoku uhličitanu lítneho,
 - *Susou* 2 – 24 hodín s 90% alkoholom.
-

Zalievanie bločkov do parafínu

Cieľ

Spracovanie do formy, z ktorej môžu byť pripravené rezy na mikroskopické vyšetrenie.

Výhody:

- ✓ dostupný a pomerne lacný,
- ✓ vzorky sa dajú krájať vo veľmi tenkých rezoch a v súvislých sériách rezov.

Nevýhody:

- ✓ pri vysokej teplote - zvráštenie pri odvodňovaní a presycovaní tkanív.



Postup zalievania vzorky do parafínu

1. Odvodnenie vzorky.
2. Presýtenie vzorky tekutinou rozpúšťajúcou parafín.
3. Presýtenie vzorky parafínom.
4. Vlastné zalievanie do parafínu:
 - Tkanivo je vložené do kovovej formy, zaliate teplým tekutým parafínom.
 - Vychladne – parafínové bločky.



vloženie tkaniva do kovovej formy



zaliatie tkaniva tekutým parafínom

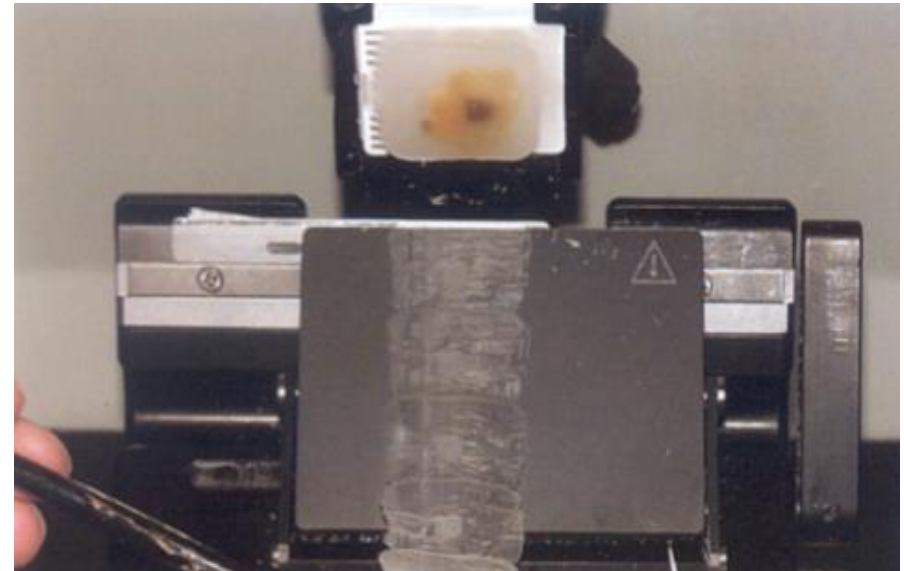


vychladené parafínové bločky

Rezanie parafínových bločkov

◇ ? Výhody a nevýhody parafínových rezov

- ✓ pomerne tenké rezy, ktoré môžeme farbiť takmer všetkými metódami,
- ✓ uchovávanie nakrájaných rezov na sklíčku a zvyšky tkanív zaliate v parafínovom bloku,
- ✓ neobmedzenú dobu možnosť kedykoľvek nakrájať ďalšie rezy a doplniť farbenie,
- ✓ alkoholová rada a zaliatie do parafínu ničí enzýmy a spôsobuje vylúhovanie tukov,
- ✓ odvodňovaním môže dôjsť k usmrteniu tkaniva.



Rezanie parafínových bločkov
elektronickým mikrotómom

Vyrovnávanie a lepenie parafínových rezkov

Na ohrievanej platničke

- ✓ na podložné sklíčko rovnomerne rozotrieme zmes bielka s glycerolom (lepidlo),
- ✓ skalpelom prenesieme parafínový rez a podlejeme malým množstvom destilovanej vody (zhora musí ostať suchý),
- ✓ podložné sklíčko položíme na piecku (40-45°C), rez vyrovnáme preparačnou ihlou,
- ✓ zlejeme destilovanú vodu, podložné sklíčko označíme a uložíme na noc do termostatu (37°C) – voda sa odparí a rez sa prichytí na podložné sklíčko.

V teplej vode

- ✓ rezy sa vyrovnávajú na hladine destilovanej vody (40°C) vo vysokej Petriho miske alebo sklenenej škatuli,
- ✓ podložné sklíčko natreté zmesou bielka s glycerolom sčasti ponoríme pod plávajúci rez, preparačnou ihlou ho prichytíme a vytiahneme z vody,
- ✓ necháme odkvapkať a uložíme cez noc do termostatu.

Vyrovnávanie parafínových rezkov v teplej vode



Odparafínovanie rezov

- ✓ odstránenie parafínu – tkanivo prijme roztoky farbív,
- ✓ ponárajú sa do:
 1. xylénu,
 2. zostupného radu etanolu (96, 90 a 70%)
 3. destilovanej vody.

Farbenie histologických preparátov



Farbenie histologických
preparátov

Farbivá:

zásadité jadrové (bazické) = bazofilné

- ✓ farbía sa jadrá buniek,
- ✓ najznámejšie farbivo je *hematoxylín*,

kyslé farbivá (plazmatické) = eozinofilné

- ✓ farbía cytoplazmu,
- ✓ najznámejšie farbivo je *eozín*.

Netrofília – bunková štruktúra sa vôbec nezafarbí alebo sa slabo zafarbí obidvoma typmi farbív.

Typy farbenia

Priehľadné

✓ slúži na zobrazenie všetkých zložiek tkaniva,

✓ výsledok farbenia:

jadrá buniek sú tmavomodré,

erytrocyty sú oranžové,

svalovina je červená,

ostatné zložky sú ružové.

Selektívne

✓ používa sa na rozlíšenie niektorých súčastí tkanív,

✓ výsledok farbenia:

jadrá buniek sú červenohnené,

kolagén je červený,

svalovina je žltá.

Odvodnenie a vyjasnenie preparátu

Odvodnenie preparátu

- ✓ predpoklad pre zhotovenie dokonalého trvalého preparátu,
- ✓ odvodňuje sa vo vzostupnom rade etanolu (80 a 96%).

Vyjasnenie preparátu

- ✓ robí sa kúpeľom 2x karboxylénom a 2x xylénom.
-

Uzavieranie (montovanie) zafarbených rezov

- ✓ vhodné sú rezy neobsahujúce zakalené miesta (odstránime odvodnením v 96% alkohole),
- ✓ montujeme medzi podložné a krycie sklíčko do **uzavierajúceho (montovacieho) média** – dokonalé priehľadné, nepoškodzuje zafarbené tkanivá, vysoký index lomu.

Látky používané na montovanie

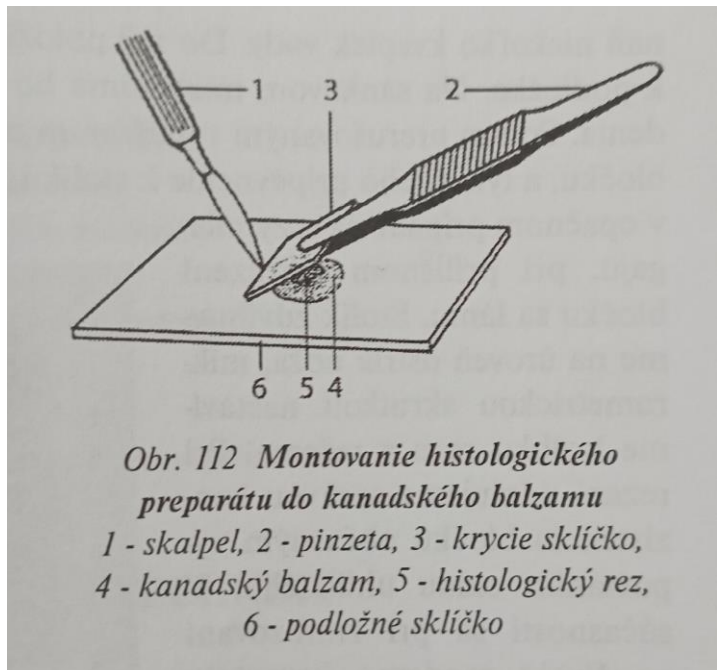
Látky, ktoré sa nemiešajú s vodou,
ale sú rozpustné v xyléne:

- ✓ kanadský balzam (živica z kanadskej jedle),
- ✓ hustý cédrový olej,
- ✓ syntetické živice.

Látky, ktoré sa nemiešajú s vodou:

- ✓ glycerín,
- ✓ glycerínová želatína,
- ✓ sirup z arabskej gummy.

Postup montovania preparátu



Montovanie histologického praparátu do kanadského balzamu

- ✓ Sklíčko vytiahneme z kvety so xylénom.
- ✓ Xylén okolo zafarbeného rezu na spodnej strane utrieme.
- ✓ Na rez dáme kvapku kanadského balzamu a pinzetou priložíme krycie sklíčko.
- ✓ Balzam vytlačený krycím sklíčkom utrieme handričkou namočenou v xyléne.
- ✓ Hotový preparát vložíme na 2 dni do sušiarne vyhriatej na 40°C.
- ✓ Ak použijeme glycerín, glycerínovú želatínu alebo sirup z arabskej gummy, zafarbený preparát netreba odvodňovať a vyjasňovať.



- ❖ Aký materiál sa môže spracovávať v histologickom laboratóriu?
- ❖ Vymenujte, ktoré pravidlá musíte dodržiavať pri fixácii tkaniva.
- ❖ Opíšte postup zalievania tkanivového bločku do parafínu.
- ❖ Vymenujte spôsoby vyrovnávania parafínových rezkov.

Zmrazovacia technika



Zmrazovacia technika

- ✓ histologická technika,
 - ✓ používa sa na rýchlu histologickú diagnostiku, na rezanie tkanív, ktoré neznášajú zaliatie do parafínu (napr. dôkaz lipidov),
 - ✓ uplatňuje sa pri stanovení rýchlej diagnózy počas priebehu operácie - **peroperačná diagnóza.**
-

Postup zmrazovacej techniky

- ✓ zmrazené tkanivové bločky sa **režú po fixácii** (parafínová technika),
 - ✓ po fixácii sa **premývajú** pod **tečúcou vodou**,
 - ✓ **bločky sa presycujú** zmesou 1 diel glycerolu a 4 diely vody (1:4) – lepšia konzistencia tkaniva,
 - ✓ zmrazené bločky sa **režú na zmrazovacom mikrotóme so zmrazovacím zariadením**,
 - ✓ pri rezaní **položíme na stolík** mikrotómu kúsok **filtračného papiera** a kvapneme naň niekoľko **kvapiek vody**,
 - ✓ **položíme tkanivový bloček** a prstom **pritlačíme** k podložke.
-

Postup zmrazovacej techniky

- ✓ prerušovaným **vypúšťaním CO₂ zmrazíme** celý bloček, a tým ho pripevníme k stolíku,
 - ✓ musia byť dokonalé zmrazené, ináč sa miagajú alebo lámu,
 - ✓ stolík zdvihneme na úroveň ostria noža a mikrometrickou skrutkou **nastavíme hrúbku rezu a režeme,**
 - ✓ pri rezaní udržiavame **správnou konzistenciu** občasným **vypúšťaním CO₂,**
 - ✓ **rezy zachytené na noži** sa prenášajú do **Petriho misky s vodou** aby sa vyrovnali,
 - ✓ ak je rez krehký, spracúva sa až po nalepení na podložné sklíčko **želatínou.**
-

Príprava želatínového roztoku

- ✓ Želatínu **rozpustíme** v 100 cm³ teplej destilovanej vode.
 - ✓ Pridáme rozšľahaný **vaječný bielok** a 10 cm³ 5% **kyseliny karbolovej** na konzervovanie.
 - ✓ **Ochladíme**, čím vznikne rôsolovitá masa, ktorú uchováваме v chladničke.
 - ✓ Pripravíme **roztok na lepenie**: 10 g roztoku rozpustíme v 100 cm³ teplej destilovanej vody. Teplota zriedeného roztoku na lepenie nemá prekročiť 37°C.
-

Postup pri lepení

- ✓ Rez prenesieme z destilovanej vody pomocou podložného sklíčka alebo skalpela do vlažného roztoku zriedenej želatíny.
 - ✓ Rez sa prenesie zo želatíny na podložné sklíčko a preparačnou ihlou sa vyrovná.
 - ✓ Prebytočný roztok želatíny odsajeme filtračným papierom.
 - ✓ Želatínový povlak sa nechá 1 hodinu stvrdnúť v nádobe parami formalínu.
 - ✓ Napokon na 3 – 5 minút ponoríme do 10% formalínu.
-

Farbenie

- ✓ postupné prenášanie do roztokov farbív v miskách alebo hodinových sklíčkach,
 - ✓ rezy nalepené na podložnom sklíčku farbíme v histologických kyvetách,
 - ✓ pri montovaní rezov do kanadského balzamu (ako pri parafínovej technike), vzorku odvodníme a vyjasníme.
-

Špeciálne metódy farbenia

➔ Dôkaz tukov

➔ Dôkaz polysacharidov

➔ Dôkaz železa



Dôkaz tukov

- ✓ tkanivo, v ktorom máme dokázať tuky, **nesmie** prísť do styku s rozpúšťadlami tukov,
 - ✓ zalievame ho do parafínu a bloček režeme na zmrazovacom mikrotóme,
 - ✓ zafarbené rezy zalievame do **glycerolovej želatíny**:
 - 7 g tzv. zlatej želatíny necháme 1 h napučať v 40 cm³ destilovanej vody,
 - pridáme 50 g bezvodého glycerolu s mernou hmotnosťou 1,25 a 0,5 cm³ kyseliny karbolovej,
 - pri stálom miešaní vo vodnom kúpeli zohrievame 15 minút,
 - teplé prefiltrujeme a necháme vychladnúť.
-

Dôkaz tukov

farbenie Sudanom III

Postup

- ✓ Rezy farbíme roztokom Sudanu III 30 – 60 minút.
- ✓ Dvakrát opláchneme v destilovanej vode.
- ✓ Jadrá odfarbíme Mayerovým hematoxylínom 3 – 5 minút.
- ✓ Rezy prenesieme do pramenistej vody na 10 minút a necháme ich **zmodrieť**.
- ✓ Rezy montujeme do uzavieracieho média miešajúceho sa s vodou.

Hodnotenie

Lipidy sú oranžové,
Jadrá buniek modré.

Dôkaz polysacharidov

Postup

- ✓ Rezy zbavené parafínu prenesieme na 10 minút do 0,5 – 1% roztoku kyseliny jódistej.
- ✓ 3x opláchneme v destilovanej vode.
- ✓ Necháme 25 minút pôsobiť Schiffovu reagensiu.
- ✓ Rezy premývame pod tečúcou vodou 30 minút.
- ✓ Dofarbíme 0,1 – 1% roztokom svetlej zelene 1 – 5 minút.
- ✓ Opláchneme destilovanou vodou.
- ✓ Odvodníme, prejasníme a rezy montujeme do kanadského balzamu.

Hodnotenie

Mucín, bazálne membrány a iné polysacharidové zložky sa farbja červeno.

Ostatné tkanivá na zeleno.

Dôkaz železa Thurnbullovou modrou

Postup

- ✓ Rezy zbavené parafínu prenesieme na 1 – 24 hodín do 10% sírniku amónneho.
- ✓ Opláchneme v niekoľkých kvapkách destilovanej vody.
- ✓ Ponoríme do čerstvo pripraveného roztoku ferrikyanidu draselného na 20 – 25 minút.
- ✓ Opláchneme 2x v destilovanej vode a potom premývame 10 minút pod tečúcou vodou.
- ✓ Jadrá dofarbíme jadrovou červeňou 5 – 7 minút.
- ✓ Preparát odvodníme, prejasníme a zamontujeme do kanadského balzamu.

Hodnotenie

Hemosiderín sa farbí na modro.

Jadrá na červeno.

Plazma na ružovo.



- ❖ **Opíšte prípravu histologického preparátu zmrazovacou technikou.**
- ❖ **Vymenujte špeciálne metódy farbenia.**

Stredná odborná škola agropotravinárska a technická



 **Kušnierska brána 349/2, 060 01 Kežmarok**

 www.soskezmarok.sk

 sekretariat@soskezmarok.sk

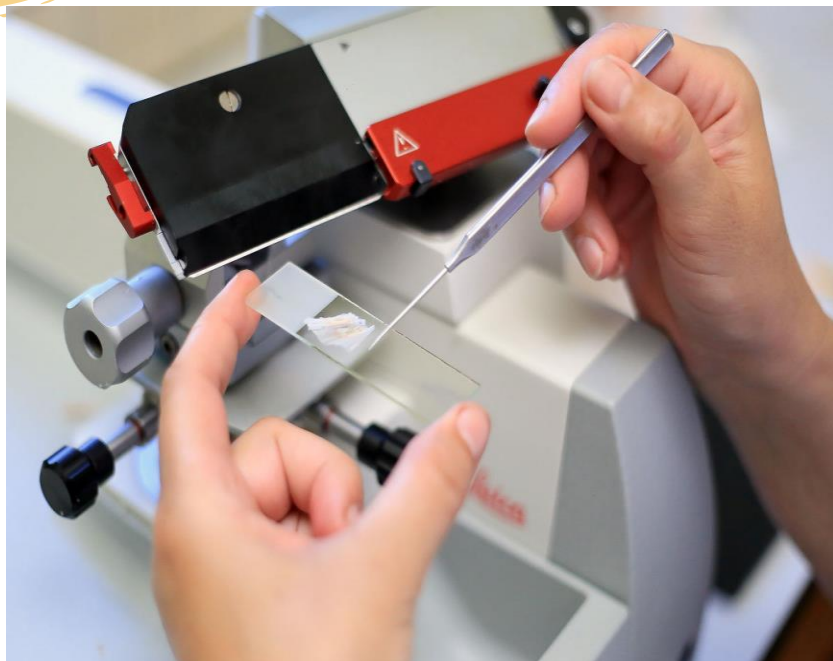
 +421 52 452 30 40



Učiteľ

Ing. Martina Lachová

 lachova.m@gmail.com



Ďakujem za
pozornosť.

