

SOŠ agropotravinárska a technická,
Kušníerska brána 349/2, Kežmarok



LABORATÓRNA TECHNIKA

Špeciálne histologické techniky

4. ročník

Parafínová technika, zmrazovacia technika a
špeciálne farbiace techniky

(Učebný text)

Ing. Martina Lachová

Kliknutím zadáte dátum.

NÁRODNÝ PROJEKT

„Zlepšenie stredného odborného školstva v Prešovskom samosprávnom kraji“





OBSAH

1 ŠPECIÁLNE HISTOLOGICKÉ TECHNIKY	3
1.1 Parafínová technika	3
1.1.1 Fixácia	3
1.1.2 Premývanie	5
1.1.3 Zalievanie vzorky do parafínu	5
1.1.4 Rezanie parafínových bločkov	7
1.1.5 Vyrovnávanie a lepenie parafínových rezkov	7
1.1.6 Odparafínovanie rezov	8
1.1.7 Farbenie histologických preparátov	8
1.1.8 Odvodnenie histologického preparátu	9
1.1.9 Vyjasnenie histologického preparátu	9
1.1.10 Uzavieranie (montovanie) zafarbených rezov	10
1.2 Zmrazovacia technika	11
1.3 Špeciálne metódy farbenia	13
1.3.1 Dôkaz tukov	13
1.3.2 Dôkaz polysacharidov	14
1.3.3 Dôkaz železa Thurnbullovou modrou	15
2 BIBLIOGRAFIA	16





1 ŠPECIÁLNE HISTOLOGICKÉ TECHNIKY

Materiál, ktorý sa spracováva v histologickom laboratóriu, môže byť:

- **čerstvý**, získaný operatívne zo živého zvierťa – **biopsia**, napr. :
 - ✓ „**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,
- **starší**, získaný pitvou z uhynutého zvierťa viac hodín po smrti – **nekropsia**.



POSTUP ZÍSKAVANIA MATERIÁLU NA ZHOTOVENIE HISTOLOGICKÝCH PREPARÁTOV

1. Vzorka sa odoberie čo najskôr po uhynutí zvierťa.
2. Podľa možnosti má mať *tvar kocky* s hranou 5-10 mm.
3. *Kocka sa musí rezať* ostrým skalpelom alebo žiletkou, vystrihnutím sa tkanivo rozmlíga.
4. Tkanivo musí byť **ihneď** *fixované* vložením do *fixačnej tekutiny*.
5. Tkanivo musí byť *presne označené*.
 - ✓ **Vyplní sa sprievodný list** (žiadanka na histologické vyšetrenie), na ktorom sa udáva odosielateľ, nacionálne zvierťa, klinická diagnóza, dátum odberu, fixačná tekutina, požadované vyšetrenie.
 - ✓ **Označí sa nádobka s materiálom** - základné údaje.

1.1 Parafínová technika

Používa sa vo všetkých veterinárnych laboratóriách. Postup prípravy histologického preparátu touto technikou možno rozdeliť na tieto **úkony**: fixácia, premývanie, zalievanie do parafínu, rezanie, montovanie na podložné sklíčko, farbenie a montovanie do kanadského balzamu, resp. umelých silíc.

1.1.1 Fixácia

Fixácia je rýchle **vyzrážanie (denaturácia)** bielkovín protoplazmy buniek a tkanív fixačnými prostriedkami, ktoré majú zabrániť samovoľnému rozkladu tkanív (autolýze).

Autolýza je podmienená pôsobením enzýmov a vedie k hrubým zmenám protoplazmy, až k úplnému rozkladu buniek a tkanív.



Fixačné roztoky musia spĺňať tri hlavné podmienky:

1. zachovať čo najlepšie štruktúru tkaniva,
2. zachovať farbitelnosť tkanív,
3. rýchle prenikať do tkanív.

Fixačné prostriedky používané na fixáciu sú:

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

Metodika fixácie

Tkanivový bloček sa vloží do fixačnej tekutiny, pritom sa riadime niekoľkými pravidlami:

1. Tkanivový bloček po odbere vložíme do fixačnej tekutiny **čo najskôr**. Tkanivo sa musí fixovať **úplne čerstvé (obr. 1)**.
2. Tkanivový bloček **nesmie byť príliš veľký** (hrúbka nesmie presiahnuť 1 cm). Ak sa majú fixovať **celé orgány**, fixačná tekutina sa vstrečne priamo do ciev.
3. **Plošné orgány** (črevá, blany) **sa** pred vloženíom do fixačnej tekutiny **napínajú** na korkovú (plastovú) platničku pomocou špendlíkov.
4. Fixačné tekutiny musia byť v dostatočnom množstve, najmenej 10x viac, ako je objem tkanivového bločku.
5. Fixačná tekutina musí mať zo všetkých strán **dostatočný prístup k tkanivovému bločku**. Preto tkanivový bloček podkladáme filtračným papierom.



Obr. 1 Fixovaný tkanivový bloček



Hlavné druhy fixačných tekutín

Formalín (formol) je najčastejšie používaná fixačná tekutina. Východiskovou látkou na prípravu formalínu je **aldehyd kyseliny mravčej - formaldehyd**. Je to **bezfarebná tekutina**, dráždivého zápachu. **Rýchle** preniká do tkanív, tkanivo sa po ňom dobre farbí a dobre ho **konzervuje**. Nevýhodou formalínu je, že dochádza k napučaniu tkanív, bunkám dodáva sklovitý vzhľad.

Fixačná tekutina s kyselinou pikrovou - Bouinova [buenova] sa používa na fixovanie väčších kúskov materiálu, do ktorého dobre preniká a pritom nepoškodzuje štruktúru tkaniva, tkanivo sa po fixácii dobre farbí. **Nehodí sa** na **fixáciu prekrvených orgánov** (sleziny), lebo krv pôsobením Bouinovej tekutiny hemolyzuje a zráža sa na tvrdú, ťažko krájateľnú hmotu.

Fixačné tekutiny so sublimátom rýchle prenikajú a tkanivo sa po fixácii dobre farbí. Nevýhodou je, že po fixácii vznikajú v tkanivách čierne zafarbené zrazeniny, tzv. „sublimátové zrazeniny“, ktoré musia byť odstránené jódomou tinktúrou alebo Lugolovým roztokom.

Susa je najpoužívanejšia fixačná tekutina.

Zenkerová tekutina sa používa na fixovanie kúskov tkanív, ktoré majú hranu najviac 5 mm.

Fixačné tekutiny s alkoholom – etanol, ktorý zle preniká, rozpúšťa lipidy a spôsobuje zmraštenie tkanív. Na druhej strane **tkanivá chemicky nezmení**.

Oxid osmičelý (OsO_4) je jedným z najlepších fixačných prostriedkov, ktorý zvlášť dobre zachováva štruktúru buniek. Nevýhodou je, že ide o drahý roztok, rýchlo sa redukuje, čo sa prejaví sčernením roztoku.

1.1.2 Premývanie

Premývanie vzorky sa robí kvôli odstráneniu fixačnej tekutiny tak, že necháme vodu pomaly tiecť na rebrový lievik. Medzi jeho rebriami odteká premývací tekutina z fľaše.

- Vzorky fixované **formalínom** sa premývajú 2 – 4 hodiny pod tečúcou vodou.
- Po použití **Zenkerovej tekutiny** treba vzorku premývať 24 hodín.
- Vzorky fixované **Bouinovou tekutinou** sa premývajú 24 hodín a viac, v troch kúpeľoch s 80% alkoholom s pridaním niekoľkých kvapiek koncentrovaného roztoku uhličitanu lítneho.
- Po použití roztoku **Susa** sa na premývanie používa 90% alkohol a premývanie trvá 12 – 24 hodín.

1.1.3 Zalievanie vzorky do parafínu

Princíp zalievania do parafínu spočíva v presycovaní odvodneného tkaniva zohriatym parafínom pri teplote 56 – 58°C. Parafín vyplní všetky mikroskopické štrbiny v tkanive, takže sa tkanivo dá krájať v tenkých rezoch s hrúbkou niekoľko tisíc mm.

Výhodou je jej jednoduchosť a rýchlosť. Parafín je dostupný a pomerne lacný.

Nevýhodou je isté zvrátenie pri odvodňovaní a presycovaní tkanív parafínom pri pomerne vysokej teplote.



POSTUP ZALIEVANIA VZORKY DO PARAFÍNU

1. Odvodnenie vzorky.
2. Presýtenie vzorky tekutinou rozpúšťajúcou parafín.
3. Presýtenie vzorky parafínom.
4. Vlastné zalievanie do parafínu (obr. 2).
 - ✓ Tkanivo je vložené do kovovej formy (obr. 2a), zaliate teplým tekutým parafínom (obr. 2b).
 - ✓ Vychladne – parafínové bločky (obr. 2c).



a)



b)



c)

Obr. 2 a) vloženie tkaniva do kovovej formy, b) zalíatie tkaniva tekutým parafínom, c) vychladené parafínové bločky

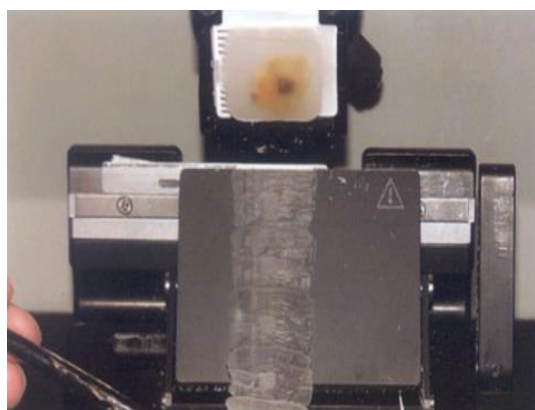


1.1.4 Rezanie parafínových bločkov

V súčasnosti sa používajú na krájanie tkanivových bločkov elektronické **mikrotómy** (obr. 3). Vzorok sú narezané a umiestnené na sklo.

Výhody a nevýhody parafínových rezov sú:

- ✓ 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.



a)



b)

Obr. 3 a, b) Rezanie parafínových bločkov elektronickým mikrotómom

1.1.5 Vyrovnávanie a lepenie parafínových rezkov

Rezy sa vyrovnávajú buď:

- **Na ohrievanej platničke** (piecka pre histológiu)

Na podložnom sklíčku rovnomerne rozotrieme zmes bielka s glycerolom. Do stredu sklíčka naniesieme skalpelom parafínový rez a podlejeme malým množstvom destilovanej vody tak, aby zhora ostal suchý. Potom podložné sklíčko položíme na piecku vyhriatu na 40-45°C. Vyrovnávanie rezu urýchlíme pomocou preparačných ihliel. Destilovanú vodu zlejeme, podložné sklíčko označíme a uložíme ho na noc do termostatu vyhriateho na 37°C. Za tento čas sa zvyšok vody odparí a rez sa prichytí na podložné sklíčko.



- **V teplej vode**

Parafínové rezy sa vyrovnávajú na hladine destilovanej vody teplej 40°C vo vysokej Petriho miske alebo sklenenej škatuli (obr. 4). 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.



a)



b)

Obr. 4 a, b) Vyrovnávanie parafínových rezkov v teplej vode

1.1.6 Odparafínovanie rezov

Aby tkanivo prijalo vodné roztoky farbív, musí sa z neho odstrániť parafín. Preparáty sa vkladajú do sklenených kyviet s drážkami. Najprv sa ponoria do xylénu, potom do zostupného radu etanolu (96, 90 a 70%) a napokon do destilovanej vody.

1.1.7 Farbenie histologických preparátov

Pretože nezafarbené histologické preparáty sa dajú hodnotiť iba mikroskopom s fázovým kontrastom, treba preparáty na bežné mikroskopovanie farbiť (obr. 5).

Farbivá používané v histológii rozdeľujeme na:

- **zásadité (bazické) jadrové**, ktorými sa farbía **jadrá buniek**. Najčastejšie používané zásadité farbivo je **hematoxylín**. Bunkové štruktúry, ktoré sa farbía zásaditými farbivami, označujeme ako **bazofilné**,
- **kyslé farbivá (plazmatické)** farbía **cytoplazmu**. Najznámejšie kyslé farbivo je **eožín**. Bunkové štruktúry, ktoré zafarbía kyslými farbivami nazývame **eožínofilné**.



O netrofílii sa hovorí vtedy, keď sa bunková štruktúra vôbec nezafarbí, alebo sa slabozafarbí obidvoma typmi farbív.

Rozoznávame dva typy farbenia:

- **prieľadné**, ktoré slúži na zobrazenie všetkých zložiek tkaniva, výsledok farbenia: **jadrá buniek sú tmavomodré**,
erytrocyty sú oranžové,
svalovina je červená,
ostatné zložky sú ružové,
- **selektívne**, ktoré sa používa na rozlíšenie niektorých súčastí tkanív, výsledok farbenia: **jadrá buniek sú červenohnené**,
kolagén je červený,
svalovina je žltá.



Obr. 5 Farbenie histologických preparátov

1.1.8 Odvodnenie histologického preparátu

Odvodnenie je predpoklad pre zhotovenie dokonalého trvalého preparátu. Odvodňuje sa vo vzostupnom rade etanolu (80 a 96%).

1.1.9 Vyjasnenie histologického preparátu

Robí sa v dvoch kúpeľoch karboxylénu a dvoch kúpeľoch xylénu.



1.1.10 Uzavieranie (montovanie) zafarbených rezov

Na uzavieranie sú vhodné len tie rezy, ktoré po vyjasnení neobsahujú zakalené miesta. Zakalené miesta treba odstrániť ďalším odvodnením v 96% alkohole.

Zafarbené rezy montujeme medzi podložné a krycie sklíčko do **uzavierajúceho (montovacieho) média**, ktoré musí byť dokonalé priehľadné, nesmie poškodzovať zafarbenie tkaniva a musí mať vysoký index lomu.

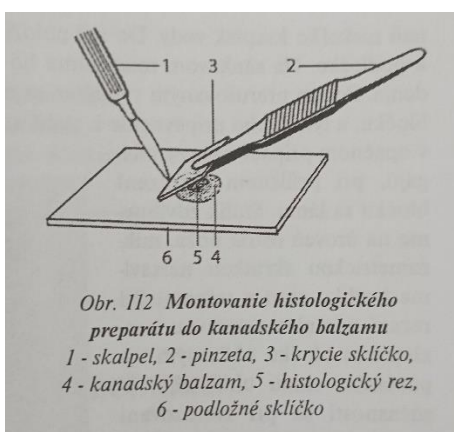
Látky používané na montovanie sa delia na 2 skupiny:

- 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 gumy.



POSTUP MONTOVANIA

1. Sklíčko vytiahneme z kvety so xylénom.
2. Xylén okolo zafarbeného rezu na spodnej strane utrieme.
3. Na rez dáme kvapku kanadského balzamu a pinzetou priložíme krycie sklíčko.
4. Balzam vytlačený krycím sklíčkom utrieme handričkou namočenou v xyléne.
5. Hotový preparát vložíme na 2 dni do sušiarne vyhriatej na 40°C.
6. Ak použijeme glycerín, glycerínovú želatínu alebo sirup z arabskej gumy, zafarbený preparát netreba odvodňovať a vyjasňovať (obr. 6).



Obr. 6 Montovanie histologického preparátu do kanadského balzamu



OTÁZKY

1. Aký materiál sa môže spracovávať v histologickom laboratóriu?
2. Vymenujte, aké pravidlá musíte dodržiavať pri fixácii tkaniva.
3. Opíšte postup zalievania tkanivového bločku do parafínu.
4. Vymenujte spôsoby vyrovnávania parafínových rezkov.
5. Aké farbivá používame v histológii?

1.2 Zmrazovacia technika

Používa sa na rýchlu histologickú diagnostiku a pri rezaní tkanív, ktoré neznášajú zaliatie do parafínu (napr. dôkaz lipidov). Uplatňuje sa aj pri stanovení rýchlej diagnózy počas priebehu operácie - **peroperačná diagnóza**.



POSTUP

1. Zmrazené tkanivové bločky sa **režú po fixácii** (ako pri parafínovej technike).
2. Po fixácii sa **premývajú pod tečúcou vodou**.
3. **Bločky sa presycujú** zmesou 1 diel glycerolu a 4 diely vody (1:4) – lepšia konzistencia tkaniva.
4. Zmrazené bločky sa **režú na zmrazovacom mikrotóme (obr. 7) so zmrazovacím zariadením**.
5. Pri rezaní **položíme na stolík** mikrotómu kúsok **filtračného papiera** a kvapneme naň niekoľko **kvapiek vody**.
6. **Položíme tkanivový bloček** a prstom **pritlačíme** k podložke.
7. Prerušovaným **vypúšťaním CO₂** **zmrazíme** celý bloček, a tým ho pripevníme k stolíku.
8. Bločky musia byť dokonalé zmrazené, ináč sa miagajú alebo lámu.
9. Stolík zdvihneme na úroveň ostria noža a mikrometrickou skrutkou **nastavíme hrúbku rezu a režeme**.
10. Pri rezaní udržiavame **správnú konzistenciu** občasným **vypúšťaním CO₂**.
11. **Rezy zachytené na noži** sa prenášajú do **Petriho misky s vodou**, aby sa vyrovnali.
12. Ak je rez krehký, spracúva sa až po nalepení na podložné sklíčko **želatínou**.



Obr. 7 Mikrotóm



POSTUP PRI PRÍPRAVE ŽELATÍNOVÉHO ROZTOKU

1. Želatínu rozpustíme v 100 cm³ teplej destilovanej vody.
2. Pridáme rozšľahaný vaječný bielok a 10 cm³ 5% kyseliny karbolovej na konzervovanie.
3. Ochladíme, čím vznikne rôsolovitá masa, ktorú uchovávame v chladničke.
4. 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

1. Rez preniesieme z destilovanej vody pomocou podložného sklíčka alebo skalpela do vlažného roztoku zriedenej želatíny.
2. Rez sa preniesie zo želatíny na podložné sklíčko a preparačnou ihlou sa vyrovná.
3. Prebytočný roztok želatíny odsajeme filtračným papierom.
4. Želatínový povlak sa nechá 1 hodinu stvrdnúť v nádobe parami formalínu.
5. Napokon na 3 – 5 minút vzorku 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.

1.3 Špeciálne metódy farbenia

Používajú sa na demonštráciu rôznych látok / antigénov – HISTOCHÉMIA, IMUNOHISTOCHÉMIA.

1.3.1 Dôkaz tukov

Tkanivo, v ktorom máme dokázať tuky, nesmie prísť do styku s rozpúšťadlami tukov. Preto ho zalievame do parafínu a bloček režeme na zmrazovacom mikrotóme. Zafarbené rezy sa zalievajú do glycerolovej želatíny, ktorú pripravíme takto:

- ✓ 7g tzv. zlatej želatíny necháme 1 hod. napučať v 40 cm³ destilovanej vody,
- ✓ pridáme 50g 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.

Farbenie Sudanom III

Potreby: - roztok farbiva Sudan III (príprava: 0,3 g Sudanu III rozpustíme v 100 cm³ horúceho 70% alkoholu, pretrepeme, dáme do termostatu pri T 58°C, necháme vychladnúť a prefiltrujeme),

- destilovaná voda,
- Mayerov hematoxylín,
- histologické kyvety na farbenie.



POSTUP

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



Hodnotenie: Lipidy sú oranžové,
Jadrá buniek modré.

1.3.2 Dôkaz polysacharidov

Medzi polysacharidy zaraďujeme glykogén, mukopolysacharidy v žalúdočnom hliene, glykoproteíny zo slinných žliaz, glykolipidy z mozgového tkaniva.

Reakcia PAS

Podstatou je oxidácia polysacharidov, pri ktorej vznikajú aldehydy reagujúce so Schiffovou reagensiou tak, že sa zafarbia na **fialovočerveno**.

Potreby: - Schiffova reagensia – kyselina fuksínsiričitá (1g bázičného fuksínu rozpustíme v 200 cm³ vriacej destilovanej vode, 5 minút trepeme a ochladíme na 50°C, pridáme 20 cm³ odmeraného roztoku c(HCl) = 1 mol.l⁻¹ vytemperovaného na 25°C, na koniec pridáme 1g pyrosiričitanu sodného alebo draselného a roztok necháme 14 – 24 hodín stáť v uzavretej nádobe),

- ✓ na druhý deň pridáme 1 – 2g aktívneho uhlia a trepeme 1 minútu,
- ✓ prefiltrujeme, získame číry filtrát, ktorý uchováваме v tme pri teplote 0 až 4°C,
- ✓ pred použitím na reakciu sa filtrát nechá zohriať na laboratórnu teplotu, ak zružovie – nedá sa použiť.



POSTUP

1. Rezy zbavené parafínu preniesime na 10 minút do 0,5 – 1% roztoku kyseliny jódistej.
2. 3x opláchneme v destilovanej vode.
3. Necháme 25 minút pôsobiť Schiffovu reagensiu.
4. Rezy premývame pod tečúcou vodou 30 minút.
5. Dofarbíme 0,1 – 1% roztokom svetlej zelene 1 – 5 minút.
6. Opláchneme destilovanou vodou.
7. Odvodníme, prejasníme a rezy montujeme do kanadského balzamu.

Hodnotenie: Mucín, bazálne membrány a iné polysacharidové zložky sa farbja na červeno.
Ostatné tkanivá na zeleno.



1.3.3 Dôkaz železa Turnbullovou modrou

Zisťujeme prítomnosť Fe v tkanive. Pri práci sa nesmú používať železné nástroje a roztoky nesmú obsahovať stopy Fe.

- Potreby:** - ferrikyanid draselný (príprava: zmiešame rovnaké diely 1% HCl a 20% ferrikyanidu draselného),
- jadrová červeň (príprava: v 100 cm³ horúceho 5% roztoku síranu hlinitého rozpustíme 0,1g jadrovej červene, ochladíme a prefiltrujeme),
 - destilovaná voda,
 - 10% sírnik amónny,
 - histologické kvety.



POSTUP

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

Hodnotenie: Hemosiderín sa farbí na modro.

Jadrá na červeno.

Plazma na ružovo.



OTÁZKY

1. Opíšte prípravu histologického preparátu zmrazovacou technikou.
2. Vymenujte špeciálne metódy farbenia.



2 BIBLIOGRAFIA

Dykova, I. (5. máj 2023). Dostupné na Internete: <https://adoc.pub/histologicke-techniky.html>

MVDr. Júlia Sokolová a kolektív. (2005). *Laboratórna technika I*. Bratislava: PROXIMA PRESS.

Zajícová, B. (9. máj 2023). Dostupné na Internete: <https://www.slideserve.com/perrin/histologick-technika>

