

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany
obyvatelstva

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Květen 2016

Veronika Maurerová



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

Centrální nervová soustava a neurohistologické barvicí metody

The central nervous system and staining methods in neurohistology

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Richard Becke

Veronika Maurerová

Kladno, květen 2016

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Veronika Maurerová**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Centrální nervová soustava a neurohistologické barvicí metody**
Téma anglicky: The central nervous system and staining methods in neurohistology

Zásady pro vypracování:

Cílem práce je porovnání nejběžnější histologické barvicí metody, jakou je hematoxylin-eosin, se speciálními histologickými barvicími metodami včetně impregnačních metod, pro pozorování jednotlivých buněk v centrální nervové soustavě a jejich výběžků včetně myelinové pochvy. Stručný popis historie a autorství jednotlivých vybraných neurohistologických barvicích metod. Předmětem praktické práce bude popis výroby preparátu: odběr materiálu (zprostředkováno odborně pověřenou osobou), fixace, odvodnění, zalévání do parafínu, krájení řezů, odparafínování, barvení řezů podle vybraných histologických barvicích metod, projasnění řezu, montování řezu. V rámci praktické části budou zhotoveny vlastní preparáty pomocí všech uvedených barvicích metod a stručný popis jejich mikroskopického obrazu podle zjištěných poznatků z odborné literatury.

Seznam odborné literatury:

- [1] Čihák Radomír, Anatomie 2, ed. 3., Praha: Grada, 2013, 459 s., ISBN 978-80-247-4788-0
- [2] Renate Lullman- Rauch, Histologie, ed. 3., Praha: Grada, 2011, 556 s., ISBN 978-80-247-3729-4
- [3] John D. Bancroft, Theory and practice of histological techniques, ed. 1., New York: distributed in the U.S. of America by Longman, 1977, 436, ISBN 978-0443015342

zadání platné do: 30.09.2017

Vedoucí: MUDr. Richard Becke

vedoucí katedry / pracoviště

děkan

V Kladně dne 18.12.2015

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Centrální nervová soustava a neurohistologické barvicí metody“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně 20. května 2016

.....

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu bakalářské práce MUDr. Richardu Beckemu za jeho odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohli tuto práci zkompletovat. V další řadě bych chtěla poděkovat paní Elišce Boučkové, která mi ochotně věnovala svůj čas a nemálo se podílela na realizaci praktické části bakalářské práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celému Histologickému a embryologickému ústavu 1. LF UK v Praze, jež mi propůjčili prostory a vybavení ke zhotovení jednotlivých histologických preparátů.

ABSTRAKT

Bakalářská práce „Centrální nervová soustava a neurohistologické barvicí metody“ se věnuje popisu jednotlivých částí centrální nervové soustavy, jako je koncový mozek, mozeček a hřbetní mícha. V teoretické části lze také nalézt charakteristiku a místo výskytu různých typů neuronů a dalších buněk vyskytující se v centrální nervové soustavě. Dále v rámci teoretické části je zahrnuto stručné autorství vybraných neurohistologických barvicích metod. Praktická část obsahuje popis výroby preparátu, od odběru tkáně, fixace, odvodnění, zalévání do parafínu, přes krájení řezů, jejich odparafinování, až po vlastní barvení, následné projasnění a montování. Popis vlastního barvení řezů kůry koncového mozku, mozečku a příčných řezů hřbetní míchou zahrnuje tyto metody: hematoxylin-eosin, Nisslova metoda, Bielschowského impregnace, barvení luxolovou modří. Cílem bakalářské práce je porovnání mikroskopického obrazu řezů tkání obarvených nejběžnější a nejpoužívanější histologickou barvicí metodou (hematoxylin-eosin) se speciálními barvicími metodami a popis mikroskopického obrazu.

KLÍČOVÁ SLOVA

Centrální nervová soustava, výroba preparátu, metoda hematoxylin-eosin, Nisslova metoda, Bielschowského impregnace, barvení luxolovou modří

ABSTRACT

Master's Thesis "The central nervous system and neurohistological staining methods" is describing individual parts of the central nervous system, such as the cerebrum, cerebellum and spinal cord. The theoretical part include the characteristics and location of different types of neurons and other cells in the central nervous system. Next, the theoretical part is describing a short authorship choice of staining methods in neurohistology. The practical part is describing the manufacture of the slides, taking of tissue, fixation, dehydration, embedding into paraffin wax, cutting slices, their deparifination, staining, clearing and mounting. Staining of cortex of the brain, cerebellum and spinal cord includes these methods: hematoxylin-eosin, Nissl's method, Bielschowsky's impregnation, staining by Luxol fast blue. The purpose of the Master's Thesis is to compare microscopic image of tissues, which were stained by common histological methods: hematoxylin-eosin method to special methods and description of the microscopic image.

KEY WORDS

Central nervous system, making of sections, Hematoxylin-eosin method, Nissl's method, Bielschowsky's impregnation, Luxol fast blue stain

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav.....	10
2.1	Neuron, nervová buňka (neurocyt)	11
2.1.1	Perikaryon	11
2.1.2	Výběžky nervové buňky	13
2.1.3	Klasifikace neuronů	14
2.2	Neuroglie (gliové buňky)	16
2.2.1	Astrocyty.....	17
2.2.2	Oligodendrocyty	18
2.2.3	Mikroglie (Hortegova glie).....	19
2.2.4	Ependymové buňky	20
2.3	Oddíly centrální nervové soustavy.....	20
2.3.1	Koncový mozek (Telencephalon).....	21
2.3.2	Mozeček (cerebellum)	23
2.3.3	Hřbetní mícha (Medulla spinalis)	25
2.4	Princip výroby histologického preparátu	26
2.4.1	Odběr histologického materiálu a fixace	27
2.4.2	Zalévání do parafínu	27
2.4.3	Krájení řezů.....	28
2.4.4	Deparafinace	28
2.4.5	Barvení parafínových řezů.....	29
2.4.6	Odvodnění, projasnění a montování	29
2.5	Historie a autorství neurohistologických barvicích metod.....	30
2.5.1	Hematoxylin-eosin.....	30
2.5.2	Nisslova metoda.....	30
2.5.3	Bielschowského metoda	30
2.5.4	Barvení luxolovou modří	31
3	Cíl práce.....	32
4	Metodika práce	33
4.1	Odběr histologického materiálu a fixace.....	33
4.2	Zalévání do parafínu	33
4.2.1	Odvodnění.....	33

4.2.2	Prosycení tkáně benzenem.....	34
4.2.3	Prosycení tkáně parafinem.....	34
4.2.4	Vlastní zalití do parafínu.....	35
4.3	Krájení řezů.....	35
4.4	Deparafinace	36
4.5	Barvení	37
4.5.1	Barvení hematoxylin-eosinem	37
4.5.2	Barvení – Nisslova metoda 1	39
4.5.3	Barvení – Nisslova metoda 2	39
4.5.4	Barvení podle Bielschowského.....	40
4.5.5	Barvení luxolovou modří	42
4.6	Odvodnění, projasnění a montování	42
4.7	Pozorování histologického preparátu v mikroskopu.....	44
5	Výsledky.....	45
5.1	Kůra koncového mozku (Hematoxylin-eosin).....	45
5.2	Kůra koncového mozku (Nisslova metoda).....	46
5.3	Kůra koncového mozku (Bielschowského impregnace).....	47
5.4	Koncový mozek (barvení luxolovou modří).....	48
5.5	Mozeček (Hematoxylin-eosin).....	49
5.6	Mozeček (Nisslova metoda).....	50
5.7	Mozeček (Bielschowského impregnace).....	51
5.8	Mozeček (Barvení luxolovou modří).....	52
5.9	Mozeček (Barvení luxolovou modří).....	53
5.10	Hřbetní mícha (Hematoxylin-eosin).....	54
5.11	Hřbetní mícha (Nisslova metoda).....	55
5.12	Hřbetní mícha (Bielschowského impregnace).....	56
6	Diskuse.....	57
7	Závěr	60
8	Seznam použitých zkratk	61
9	Seznam použité literatury	62
10	Seznam obrázků.....	65
11	Seznam tabulek.....	66

1 Úvod

Mozek a mícha. Tyto dva orgány se neodmyslitelně řadíme k nejdůležitějším a svojí strukturou a stavbou i k nejsložitějším orgánům našeho lidského těla. Centrální nervová soustava včetně periferních nervů, patří k nejméně probádaným útvarům lidského těla a některé myšlenkové pochody, vnímání, či význam některých nervových drah jsou dodnes záhadou.

Lidé, jak je zřejmé, mají vždy strach z každého onemocnění, a tudíž se bojí neznáma z toho, co každá nemoc skrývá. Ve dvacátém století se společnost obávala převážně kardiovaskulárních a onkologických onemocnění, dnes, v 21. století, lidé mají strach z onemocnění postihující nervovou soustavu, především z demence. Je to pro ně něco neznámého, něco nepochopitelného a nevysvětlitelného, lidé netuší, co se děje kolem nich a nemají ponětí jak takové nemoci, jako například demence, předcházet. Dodnes se neví, co je přesnou příčinou často se vyskytujících onemocnění, jako jsou Huntingtonova nemoc, Creutzfeldt-Jakobova nemoc, Parkinsonova choroba a mnoho dalších, či v posledních letech více a více se vyskytující Alzheimerovy nemoci, jejíž hlavním projevem je právě demence. Proto jakékoliv nové poznatky týkající se nervové soustavy, ať už centrálního nebo periferního nervstva, jsou přínosem pro lidstvo do budoucnosti.

Aby bylo možné zjistit patologické struktury v centrální nervové soustavě a jiné odchylky od fyziologického stavu, je důležité dokonale znát morfologickou a funkční stavbu mozku a hřbetní míchy. Proto cílem této práce je seznámení s vlastní strukturou jednotlivých částí centrální nervové soustavy a jejich možnostmi zobrazení v mikroskopickém obrazu pomocí speciálního barvení.

Tato práce také seznamuje s celým postupem výroby vlastního preparátu od krájení, přes zalévání tkáně do parafinu, až po samotné barvení a pozorování preparátu vytvořeného autorem v mikroskopu.

2 Současný stav

Základním stavebním kamenem celého lidského organismu je buňka. Podle tvaru a typu buněk a množství mezibuněčné hmoty rozlišujeme 4 tkáně:

- epitelová tkáň,
- pojivová tkáň,
- svalová tkáň,
- nervová tkáň.

Nervová tkáň je velmi specializovaná tkáň, která přijímá informace, zpracovává informace a zajišťuje odpověď na tyto podmínky. Základní funkce nervové soustavy jsou *dráždivost* (příjem podnětu a jeho přeměna na elektrochemický akční potenciál), *vodivost* (přesné, rychlé šíření signálu), koordinace tělesných funkcí a sekrece neurohormonů (Čech, 2011, str. 69).

Nervová tkáň vznikla z ektodermy, kromě buněk mikroglie, které jsou mezenchymového původu. Základními stavebními kameny jsou nervové buňky (neurony) a buňky gliové (neuroglie; z řeckého *neuron*-nerv, *glia*-lep), které tvoří malé množství mezibuněčné hmoty (Junqueira, 1997, str. 153). V centrální nervové soustavě se vyskytuje asi 85 miliard neuronů a asi 10 krát více gliových buněk (Slípka, 2014, str. 95).

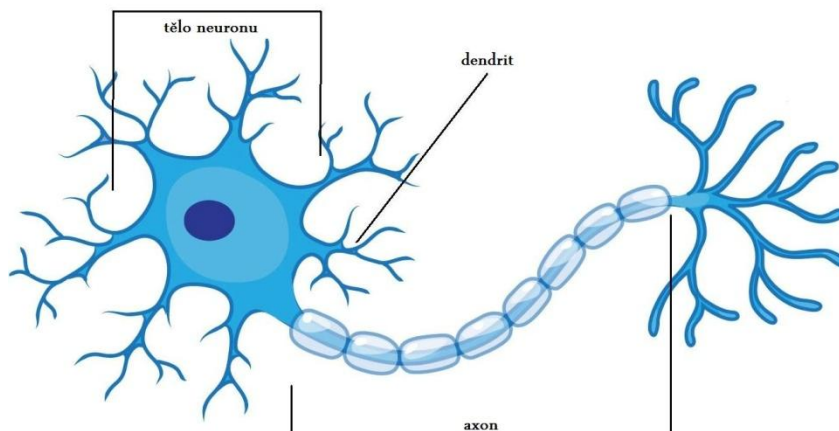
„Z anatomického hlediska vytváří centrální nervový systém, který zahrnuje koncový mozek, hřbetní míchu a mozeček, a periferní nervový systém, který představují nervy a ganglia.“ (Lichnovský, 2002, str. 58)

„Nervy jsou svazky nervových vláken, které spojují CNS s receptory a efekty obsaženými v periférii.“ (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 148)

Skupina perikaryí vyskytujících se mimo centrální nervovou soustavu označujeme jako ganglia (nervové uzliny), (Čihák, 2004, str. 213).

2.1 Neuron, nervová buňka (neurocyt)

Neuron je základní morfologickou, funkční a trofickou jednotkou nervové tkáně. Jedná se o dráždivé a vodivé buňky, které mají tři základní části: tělo neuronu (perikaryon), aferentní výběžek (dendrit) a eferentní výběžek (axon, neurit), (Vajner, 2010, str. 71-72).



Obrázek 1 - Základní části neuronu. Vlastní překlad, (Phillips, 2014).

Hlavním zdrojem energie je glukóza, která je k neuronu transportována pomocí astrocytů a do nervové buňky proniká pomocí přenašeče GLUT-3. Veškerá zásoba glukózy vystačí pro funkci a přežití neuronů přibližně na 2 až 3 minuty. Jedná se o aerobní glukózový metabolismus (Vajner, 2010, str. 73). O velké spotřebě energie neurony svědčí četnost *mitochondrií* různého tvaru i velikosti. Mitochondrie se vyskytují ve všech částech neuronu (v perikaryu, v dendritech, presynaptických úsecích neuritu) a mohou se přemísťovat (Čihák, 2004, str. 214).

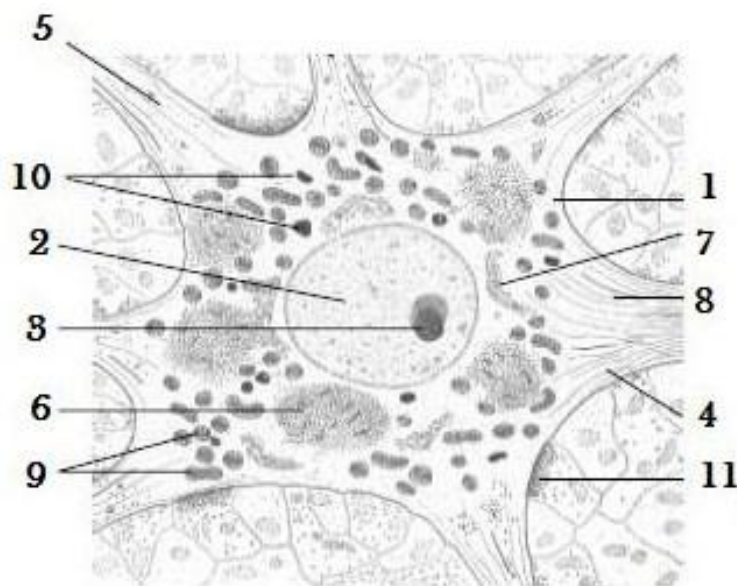
2.1.1 Perikaryon

(z řeckého peri-kolem, karyon-jádro) Jedná se o trofické centrum neuronu. Je to část neuronu, která obsahuje cytoplasmu a jádro. Tělo neuronu může být různého tvaru: ovoidní, hvězdicovité, sférické, pyramidové, a o různé velikosti 4 až 150 μm . V lehce bazofilní cytoplasmě je centricky uloženo velké světlé (jemně rozptýlený chromatin) měchýřkovité *jádro* kulovitého tvaru, nacházející se především v interfázi, neboť neurony se v postnatálním období již nedělí. Pod světelným mikroskopem lze v jádře vidět alespoň jedno nápadně tmavě zbarvené *jadérko* kulatého tvaru (Čech, 2011, str. 69-70). Perikaryon obsahuje hustou síť *granulárního endoplasmatického retikula* a spolu s polysomy obsahují bazofilní granula. Tyto útvary, které se po obarvení vhodným bazickým barvivem (toluidinová modř, metylenová modř, krezyllová violet a thionin) ve světelném mikroskopu jeví jako shluk hrudek, nazýváme *Nisslova substance* nebo tigrOID (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 152). Četnost granulárního endoplasmatického retikula a ribozomů ukazuje na aktivní produkci velkého množství proteinů, které jsou určeny nejenom pro potřeby vlastní buňky, ale i pro export. Nisslova substance se vyskytuje v perikaryu, v odstupech dendritů, nikdy se nevyskytuje v místě odstupu axonu (odstupový konus). Podle množství Nisslovy

substance se dá určit typ nebo funkční stav neuronu. U vyčerpaných neuronů dochází ke značnému poklesu množství Nisslovy substance. Tento jev nazýváme tigrolýza (chromatolýza). *Hladké endoplazmatické retikulum* se nenachází jenom v perikaryu, ale také v dendritech a axonech. Vyskytuje se v malém množství a s největší pravděpodobností má vztah k transportním dějům v neuronu. Další dobře vyvinutou organelou nervové buňky je *Golgiho aparát*, jež rozdělujeme na několik oddílů (Golgiho pole). Cisterny Golgiho aparátu leží v těsné blízkosti s granulárním endoplazmatickým retikulem a označujeme tuto soustavu jako „systém GERL“ (Čihák, 2004, str. 213-214). V blízkosti systému GERL můžeme nálezt *lysosomy*. Lysosomy řadíme mezi vesikulární útvary stejně jako lipofuscinová granula a melaninová granula. Vesikulární útvary jsou od cytoplazmy odděleny jednou vrstvou cytoplazmatické membrány. Množství *lipofuscinových granul*, která obsahují hnědý pigment lipofuscin, s věkem výrazně přibývá. Obdobně je v buňkách uložen černý pigment melanin, který je součástí *melaninových granul* (Slípka, 2014, str. 97).

Velký význam pro udržení konkrétního tvaru nervové buňky mají elementy *cytoskeletu*, který je tvořen *neurotubuly* a *neurofilamenty*. Neurotubuly (v neuronu takto označované mikrotubuly), o průměru asi 24 nm, jsou útvary dlouhého trubicovitého tvaru nacházející se v perikaryu, dendritech i axonu. Skládají se z tubulinu α a β , a podílejí se na pohybu látek v cytoplasmě. Neurofilamenta mají průřez kolem 1 nm. Opět se nacházejí v perikaryu i ve výběžcích neuronu. *Centrosom* v perikaryu chybí, proto nervová buňka není schopna reprodukce (Čihák, 2004, str. 214).

„Až 25 % povrchu perikarya je pokryto synaptickými kontakty, ale většina synaptických kontaktů je na dendritech.“ (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 152)



Obrázek 2 - Struktura těla neuronu. Vlastní překlad, (Barinov, 2011, str. 94); 1-perikaryon, 2-jádro, 3-jadérko, 4-axon, 5-dendrit, 6-Nisslova substance, 7-Golgiho aparát, 8-mikrotubuly, 9-mitochondrie, 10-lysosomy, 11-synapse.

2.1.2 Výběžky nervové buňky

Každá nervová buňka má dva typy výběžků: dendrity a axon.

Dendrity

Nervová buňka může mít jeden až několik desítek dendritů. Dendrity jsou většinou krátké bohatě se větvící výběžky vybíhající z perikarya, která vedou nervový impuls celulipetálně. Větvení dendritů připomíná větvení stromů, kdy výběžky široce odstupují z perikarya, mohutně se větví a distálně se ztenčují. Tomuto větvení se říká *abortizace* (Mescher, 2013, str. 165). Výjimku tvoří pouze Purkyňovy buňky, jejichž dendritické výběžky připomínají spíše „vějíř“, neboť se větví v jedné rovině (Slípka, 2014, str. 97). Dendrity jsou zakončeny tzv. *dendritickými trny* (dendritic spines), které jsou součástí synapsí a podílí se na předávání nervového impulsu. Dendritické trny zvětšují kontaktní plochu neuronu o 40 % někdy až o 90 %. V centrální nervové soustavě se dendrity vyskytují vždy bez myelinové pochvy (Vajner, 2014, str. 74).

V dendritech se nacházejí všechny organely, které jsou v perikaryu, pouze jejich množství s rostoucím větvením klesá. To ale neplatí pro mitochondrie, hladké endoplazmatické retikulum a Nisslovu substanci, která se nevyskytuje pouze v nejtenčích větévkách dendritu (Čihák, 2004, str. 216).

Axon (neurit)

Každá nervová buňka má právě jeden výběžek, který vede nervový impuls celulifugálně, a nazýváme ho axon. Výjimku tvoří pouze amakrinní buňky sítnice, jež nemají žádný axon. Tento typ výběžku neuronu dosahuje různé délky (až 100 cm) a oproti dendritu je jeho průměr v celé své délce téměř konstantní (v centrální nervové soustavě je průměr axonu 0,2 až 0,6 μm). Axon je ohraničen buněčnou membránou *axolemmou* (plasmalema), (Čech, 2011, str. 70-71). Cytoplasma axonu, neboli axoplasma, neobsahuje na rozdíl od perikarya Nisslovu substanci, volné ribosomy a Golgiho aparát. V axoplasmě lze nalézt mitochondrie, hladké endoplazmatické retikulum, neurotransmitery, lysosomy či podélně uspořádané neurotubuly a neurofilamenta, která se podílejí na transportu potřebných látek do konečné části axonu, nebo zajišťují pevnost a tvar výběžku (Čihák, 2004, str. 216-217). Stabilizace mikrotubulů a udržování konstantní vzdálenosti mezi nimi je zajištěna pomocí MAP proteinů (s Mikrotubuly Asociované Proteiny), (Slípka, 2014, str. 99).

Axon rozdělujeme na tyto části: odstupový konus, iniciální segment, vlastní axon a koncový axon.

- **Odstupový konus** (axonový hrbol), je místo axonu, kdy výběžek vystupuje z perikarya. Zde už se nevyskytuje téměř žádná Nisslova substance.
- Pokud je axon obalen myelinovou pochvou, potom můžeme na axonu rozlišit část zvanou **iniciální segment**, který leží právě mezi začátkem myelinové pochvy a odstupovým konusem. V této části axonu je lokalizováno mnoho iontových kanálů, neboť se jedná o důležité místo vzniku akčního potenciálu, tedy vznik nervového impulsu šířící se dál.

- **Vlastní axon** může, ale také nemusí být obalený segmentovanou myelinovou pochvou (viz 3.1.2. Myelinová pochva).
- **Koncová část axonu** se mohutně větví na tenké větévky *telodendrie*, které jsou na svých koncích rozšířeny v terminální butony (*boutons terminaux*), pomocí kterých je zajištěn kontakt axonu s membránou dalších buněk. V telodendriích se nevyskytují neurofilamenta ani neurotubuly, ale můžeme zde nalézt velké množství mitochondrií a synaptických vesikul obsahující chemické mediátory, jako jsou acetylcholin, noradrenalin, dopamin, serotonin, histamin a další (Paulsen, 2004, str. 128).

Myelinová pochva

Myelinová pochva v centrální nervové soustavě je vytvořena prostřednictvím oligodendrocytů. Během vývoje nervové buňky se oligodendrocyt obtáčí kolem axonu a pomocí rotace kolem výběžku se na axonu vytváří tenké vrstvy vytahované membrány oligodendrocytů. Vzniká segmentovaná myelinová pochva, která se skládá přibližně z 60 lipoproteinových otáček axolemy (Slípka, 2014, str. 98-100). Jedna buňka oligodendroglie pomocí svých výběžků vytváří myelinové pochvy na více axonech a jeden segment myelinové pochvy vznikl prostřednictvím jedné oligodendroglie. Segmenty myelinové pochvy se pravidelně střídají s nemyelinizovanými úseky (Ranvierovými zářezy), (Lichnovský, 2002, str. 61-62). V periferní nervové soustavě tuto funkci přebírají Schwannovy buňky, kde vždy jedna Schwannova buňka vytváří myelinovou pochvu pouze jednoho axonu.

V centrální nervové soustavě, se vyskytují také axony, které nejsou obaleny myelinovou pochvou, říkáme jim nemyelinizovaná vlákna či *šedá vlákna Remakova*. Šedá vlákna patří mezi nejtenčí axony vyskytující se v centrální nervové soustavě. Jedná se o holá vlákna, která společně s výběžky neuroglií tvoří *neuropil* („hmota“ mezi myelinizovanými výběžky a buňkami nervové soustavy), (Čihák, 2004, str. 217-218).

2.1.3 Klasifikace neuronů

Všechny nervové buňky centrální nervové soustavy lze klasifikovat podle délky a počtu výběžků (axon a dendrity), jejich velikosti a funkce.

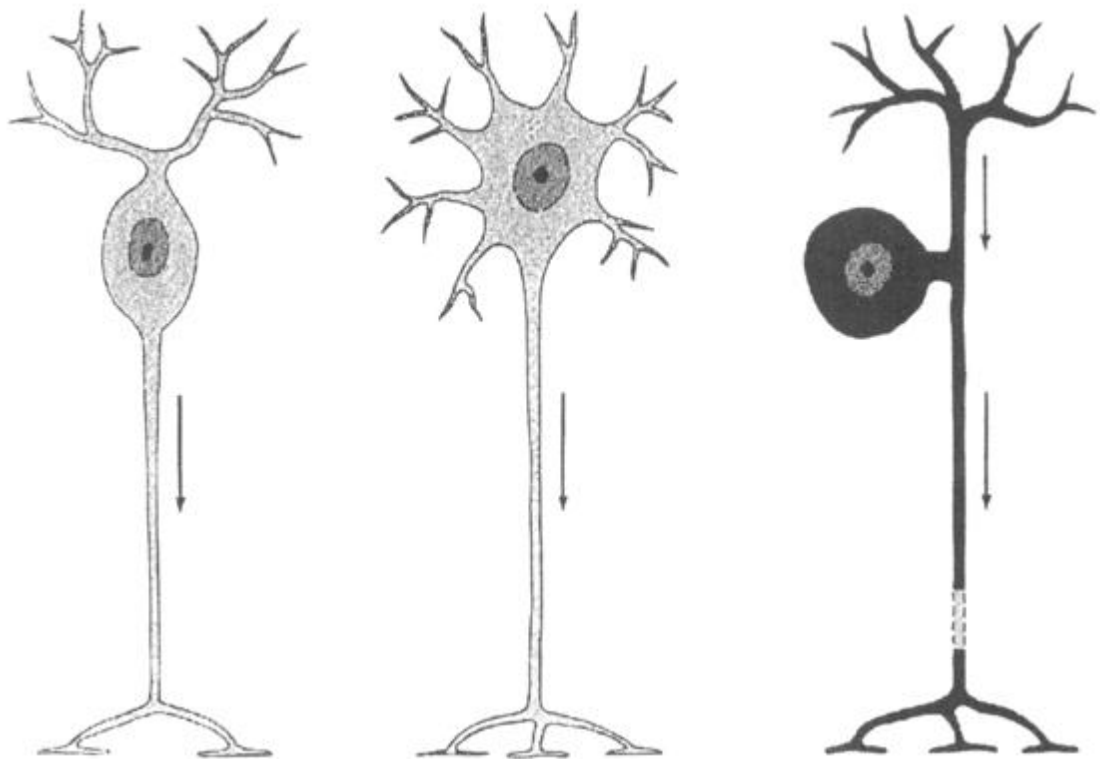
Podle počtu výběžků

Všechny druhy nervových buněk mají právě jeden axon, tedy mohou se lišit pouze různým počtem dendritů.

- **Unipolární neurony** tyto nervové buňky, mají pouze jeden výběžek – axon. Vyskytují se převážně během vývoje nervové soustavy, neboť axon vzniká dříve než dendrity. U dospělých jedinců se k unipolárním neuronům řadí smyslové buňky (čichové buňky nosní, fotoreceptory – tyčinky a čípky).
- **Bipolární neurony** jsou nervové buňky, které mají jeden axon a jeden dendrit (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 151). Dendrit většinou odstupuje z nervové buňky z opačného pólu, než odstupuje axon. Vyskytují se v malém počtu především

jako spojovací neurony v sítnici oka, ve spirálních a vestibulárních gangliích vnitřního ucha.

- **Multipolární neurony** jsou nervové buňky, které mají jeden axon a více než jeden dendrit. V centrální nervové soustavě se vyskytují nejčastěji. Můžou mít typicky hvězdicovitý tvar (např. motorické neurony předních rohů míšních) nebo pyramidový tvar (např. pyramidové buňky kůry mozku). Mezi multipolární neurony se řadí Purkyňovy buňky.
- **Pseudounipolární neurony** se řadí mezi speciální typ nervových buněk, kdy během vývoje nervových buněk (většinou z bipolárních neuronů) došlo v určité vzdálenosti od těla neuronu ke splynutí axonu s dendritem a vznikl tak jeden výběžek obalený myelinovou pochvou ve tvaru „T“, který vykonává funkci axonu i dendritu (Vacek, a1995, str. 111). Tento výběžek nazýváme *dendraxon* (Slípka, 2014, str. 96). Nervový vzruch je pomocí tohoto výběžku veden rychleji, neboť nervové impulsy obcházejí vlastní tělo nervové buňky (Vajner, 2010, str. 72). Perikarya těchto buněk mají pouze trofickou funkci (Slípka, 2014, str. 96).



Obrázek 3 - Klasifikace neuronů podle počtu výběžků, (Barinov, 2011, str. 95); zleva: bipolární, multipolární, pseudounipolární.

Podle délky axonu a velikosti těla

Podle délky axonu a velikosti těl nervových buněk rozlišujeme dva typy neuronů:

- **Golgi typ I** (Velké nervové buňky s dlouhým axonem) jsou nervové buňky s velkým perikariem a axonem dlouhým až 1 m. Ke Golgiho typu I řadíme motorické neurony předních rohů míšních a pyramidové buňky isocortexu (Paulsen, 2004, str. 129).
- **Golgi typ II** (Malé nervové buňky s krátkým axonem) je typ nervových buněk, které mají malá perikarya a krátké axony (jen několik μm), (Paulsen, 2004, str. 129). Tyto axony se v těsné blízkosti těla nervové buňky rozsáhle větví (Čech, 2011, str. 74).

Podle tvaru těla

Podle charakteristického tvaru těla nervové buňky rozlišujeme tyto typy nervových buněk:

- **Hvězdicovité neurony** řadíme mezi multipolární neurony s hvězdicovitým tvarem těla. Vyskytují se v předních rozích míšních.
- **Pyramidové neurony** jsou multipolární neurony, jejichž tělo má pyramidovitý tvar. Nacházejí se v kůře mozku.
- **Purkyňovy neurony** (hruškovitý tvar těla) patří mezi multipolární neurony vyskytující se v isocortexu mozečku (Z přednášky MUDr. Richarda Beckeho, přednášeno 7. 10. 2014, Histologický a embryologický ústav 1. LF UK).

Podle funkce

Podle funkce rozdělujeme nervové buňky do tří skupin:

- **Senzitivní neurony** jsou neurony, které vedou nervový vzruch z receptorů do míchy a mozku (Čech, 2011, str. 74).
- **Motorické neurony** patří k nervovým buňkám vedoucí nervový vzruch z centrální nervové soustavy k efektorovým orgánům, jakou jsou svalové tkáně a endokrinní a exokrinní žlázy (Vajner, 2010, str. 72).
- **Asociační neurony** (interneurony) patří mezi nervové buňky, které zajišťují spojení mezi jednotlivými neurony. Leží mezi senzitivními a motorickými typy neuronů (Vajner, 2010, str. 73). Asi 97 % všech neuronů jsou právě podle funkce asociační (Čech, 2011, str. 75).

2.2 Neuroglie (gliové buňky)

(z řeckého *glia*-lep, tmel) Vedle nervových buněk v centrální nervové soustavě se zde vyskytují ještě buňky neuroglie, které mají podpůrnou, vyživovací, obranou a fagocytární funkci a též se podílejí na tvorbě myelinové pochvy (Junquiera, 1997, str. 162-164). Oproti nervovým buňkám jsou buňky neuroglie menší, neschopny vést vzruch, ale neztrácejí schopnost dělení. Na jeden neuron připadá přibližně 10 buněk neuroglie. Buňky neuroglie v centrální nervové soustavě jsou makroglie (astrocyty, oligodendrocyty), mikroglie a ependymové buňky (Slípka, 2014, str. 109).

2.2.1 Astrocyty

(z řeckého *astron*-hvězda) Hvězdčovitě gliové buňky ektodermálního původu řadí se mezi makroglie. Astrocyty jsou největší a nejčastěji se vyskytující gliové buňky v centrální nervové soustavě a mají převážně podpůrnou funkci. Dále zajišťují iontovou rovnováhu v okolí nervových buněk, či pomocí speciálního faktoru dokáží stimulovat T-lymfocyty (ochranná funkce), (Čihák, 2004, str. 226). V centru malých těl astrocytů se nachází kulovité až oválné jádro (Vajner, 2010, str. 78). V cytoplazmě převažují především gliová filamenta, která vytvářejí fibrily o průměru 10 μm, jež tvoří cytoskelet astrocytů (Vajner, 2010, str. 78). Z cytoplazmy vybíhají četné a dlouhé výběžky, které jsou na svém konci plošně rozšířeny v tzv. pedikly. Astrocyty pomocí pediklů obalují kapiláry v centrální nervové soustavě a vytvářejí vrstvu *membrana limitans gliae perivascularis*, která odděluje nervové buňky od endotelu kapilár a reguluje tak látkovou výměnu mezi krví a neurony. Astrocyty vytvářejí i další vrstvu *membrana limitans gliae superficialis* ležící pod pia mater. Tato vrstva izoluje nervovou tkáň od řídkého vaziva pia mater (Junqueira, 1997, str. 162). Dobrá regenerační schopnost astrocytů se uplatňuje při opravách poškozené nervové tkáně, kde v místě poškození vzniká gliová vrstva (Čech, 2011, str. 76).

Podle délky výběžku a množství fibril rozlišujeme dva typy astrocytů: plazmatické a fibrilární.

Plazmatické astrocyty

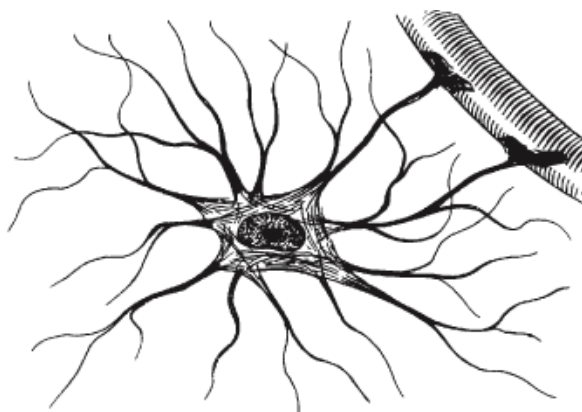
Výběžky plazmatických astrocytů jsou silnější a kratší a bohatě se větví v porovnání s vláknitými astrocyty (Vajner, 2010, str. 78). Také obsahují méně gliových filament a mají bohatě granulární cytoplasmu (Paulsen, 2004, str. 130). Nacházejí se především v šedé hmotě v centrální nervové soustavě.



Obrázek 4 - Plazmatický astrocyt. Upraveno, (Čechovič, 2010).

Fibrilární (vláknité) astrocyty

Pomocí dlouhých, štíhlých a málo větvících se výběžků odlišujeme vláknité astrocyty od plazmatických astrocytů (Junquiera, 1997, str. 164). Fibrilární astrocyty obsahují velké množství gliových filament a nacházejí se v bílé hmotě v centrální nervové soustavě (Slípka, 2014, str. 109).



Obrázek 5 - Fibrilární astrocyt. Upraveno, (Čechovič, 2010).

2.2.2 Oligodendrocyty

(z řeckého *oligo*-málo, *déndros*-strom) Jedná se o buňky neuroglie ektodermálního původu, které jsou oproti astrocytům menší a méně se větví. Výběžky jsou krátké, tenké a hladké. Cytoplasma oligodendrocytů je bohatá na organely. Obsahuje velké množství mitochondrií, mohutný Golgiho komplex a mnoho cisteren granulárního endoplasmatického retikula. Počet buněk oligodendrocytů se zvyšuje s rostoucí složitostí centrální nervové soustavy (Vajner, 2010, str. 78). Oligodendrocyty se nacházejí v bílé i v šedé hmotě, kde sedí v těsné blízkosti těl nervových buněk (Čihák, 2002, str. 226). V bílé hmotě leží oligodendrocyty v řadách kolem axonu a vytvářejí myelinové pochvy (viz 3.1.2. Myelinová pochva), (Paulsen, 2004, str. 130).



Obrázek 6 - Oligodendrocyty. Upraveno, (Čechovič, 2010).

2.2.3 Mikroglie (Hortegova glie)

Mikroglie jsou malé buňky vřetenovitého tvaru s tyčkovitým jádrem. Mají tenké, ale dlouhé bohatě se větvící trnité výběžky. Tvoří asi 10 % buněk všech typů neuroglie (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 162). V šedé hmotě se se mikroglie vyskytují ve větším množství než v bílé hmotě. Oproti ostatním gliovým buňkám jsou mikroglie mezenchymového původu. Vznikají zřejmě v kostní dřeni a pomocí kapilár, které vstupují do orgánů centrální nervové soustavy, se dostávají do nervové tkáně (Čihák, 2004, str. 227). V cytoplasmě mikroglíí se nachází velké množství lysozomů, což vypovídá o jejich hlavní funkci, jež je fagocytóza. Buňky mikroglie se aktivují při chorobných procesech nervové tkáně, kdy pohlcují zbytky rozpadlých nervových nebo krevních buněk. Při tomto procesu buňky mikroglie ztrácejí výběžky, postupně se zaoblují a přeměňují se v tzv. zrnčkovité buňky (Vacek, 1997, str. 123).



Obrázek 7 - Mikroglie. Upraveno, (Čechovič, 2010).

2.2.4 Ependymové buňky

(z řeckého *epi-na*, *endýein*-obléknout) Jedná se o epiteloidní buňky cylindrického až plochého tvaru uspořádaných v jedné vrstvě, na jejichž povrchu se nacházejí řasinky, které zajišťují cirkulaci míšního moku. Tyto buňky se vyskytují v centrálním kanálku v míše a v mozkových komorách (dutinách). Base ependymových buněk je plochá, nebo může vytvářet dlouhé výběžky *tancyty*, které se nejvíce vyskytují v třetí mozkové komoře (Lichnovský, 2002, str. 61). Chybí basální membrána.

2.3 Oddíly centrální nervové soustavy

Základními oddíly centrální nervové soustavy jsou: koncový mozek (histologicky nejvíce významná je mozková kůra), mozeček a hřbetní mícha. Koncový mozek, mozeček i hřbetní mícha jsou tvořeny dvěma základními druhy hmoty – bílou a šedou (Čech, 2011, str. 101).

- **Šedá hmota** (Substantia grisea) je za živa vlivem prokrvení šedorůžová. Své pojmenování získala podle fixovaných preparátů mozku, pro které je šedá barva typická. Substantia grisea, šedá hmota, se skládá převážně z těl neuronů, plazmatických astrocytů a buněk mikroglie. Terminální úseky axonů a dendritů, nemyelinizované axony, výběžky buněk neuroglie označujeme názvem *neuropil*.
- **Bílá hmota** (Substantia alba) má žlutobílou barvu a je tvořena převážně množstvím axonů s myelinovými pochvami. Axony probíhají v patrných svazcích, které označujeme jako *nervové dráhy*. Mezi svazky axonů jsou převážně oligodendrocyty, fibrilární astrocyty a kapiláry (Čihák, 2004, str. 228).

2.3.1 Koncový mozek (Telencephalon)

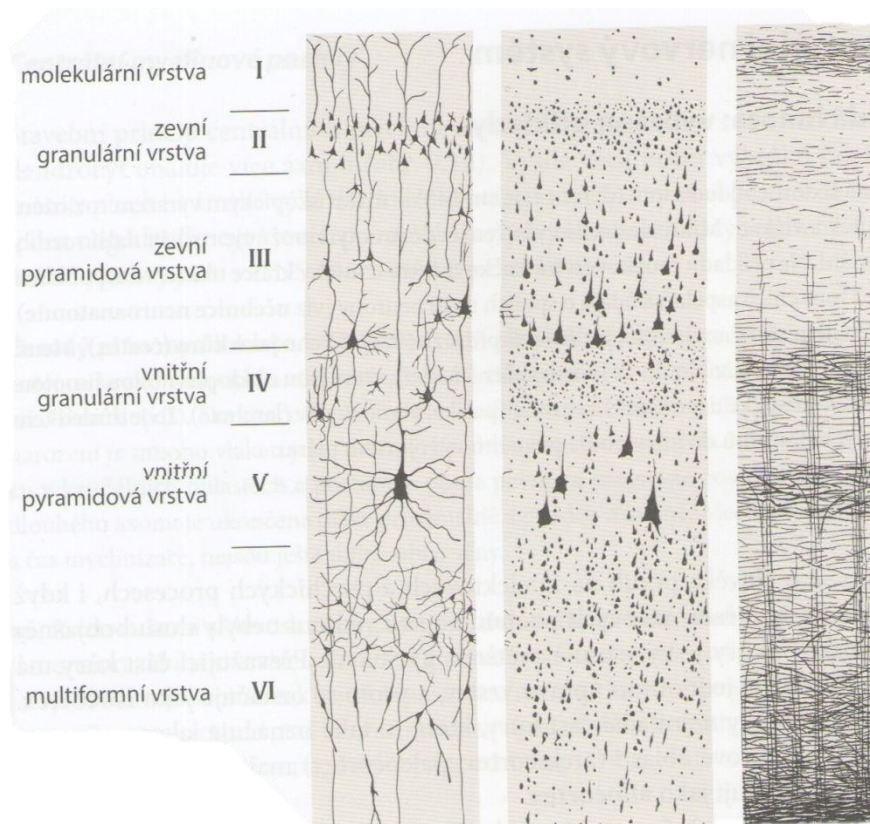
Mozek je tvořen šedou a bílou hmotou. Na povrchu mozku se nachází šedá hmota, která tvoří mozkovou kůru (Cortex cerebri). Mozková kůra je histologicky nejvíce významná a má charakteristické uspořádání neuronů do typických vrstev, které popisuje cytoarchitektonika mozkové kůry (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 169). Zaujímá plochu 20 až 25 cm² a tloušťka této vrstvy činí 1,5 až 5 mm. Menší část šedé hmoty můžeme také nalézt uvnitř mozku ve formě jader. Pod šedou hmotou se nachází bílá hmota (Čech, 2011, str. 105).

Mozková kůra (Cortex cerebri) – Isocortex

Mladší fylogenetickou část mozku, která zaujímá asi 11/12 povrchu, nazýváme *isocortex*. Šířka isocortexu činí 1,5 až 5 mm a obsahuje přibližně 8 až 9 miliard neuronů (Čech, 2011, str. 105). Podle cytoarchitektoniky mozkové kůry, která popisuje velikost, tvar a hustotu neuronů, rozlišujeme 6 horizontálně uspořádaných vrstev:

- I. *Molekulární vrstva* (Lamina molecularis) je nejsvrchnější vrstva isocortexu, která obsahuje malé Cajalovy neurony. Je to vrstva tvořena především vlákny a plazmatickými astrocyty. Výběžky plazmatických astrocytů tvoří na povrchu tenkou ochrannou vrstvu (membrane limitans glie superficialis).
- II. *Zevní granulózní vrstva* (Lamina granularis externa) je složena z hvězdicovitých a multipolárních neuronů, která mají malá těla a v této vrstvě se vyskytují v hojně hustotě.
- III. *Zevní pyramidová vrstva* (Lamina pyramidalis externa) je tvořena pyramidovými neurony o malé až střední velikosti. Dále se zde vyskytují hvězdicovité buňky a Martinottiho neurony.
- IV. *Vnitřní granulózní vrstva* (Lamina granularis interna) obsahuje hustě uspořádané hvězdicovité neurony. Tato vrstva je nejvíce vyvinuta v oblasti týlního laloku, kde tvoří zrakové centrum.

- V. *Vnitřní pyramidová vrstva* (Lamina pyramidalis interna) obsahuje řídko rozložené velké pyramidové buňky (Betzovy neurony, neboli Betzovy „pyramidy“) a malé množství multipolárních nervových buněk.
- VI. *Multiformní vrstva* (Lamina multiformis) obsahuje vřetenovité neurony, malé multipolární buňky (neurony s malými perykaryi), hvězdčicovité buňky a Martinottiho nervové buňky. Hranice mezi šedou a bílou hmotou není ostrá (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 169).



Obrázek 8 - Vrstvy isocortexu (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 170).

Cytoarchitektonika isocortexu je téměř ve všech místech stejná, ale existují jisté významné lokální rozdíly, které se liší tloušťkou některých vrstev, počtem jednotlivých buněk, uspořádáním vláken v jednotlivých vrstvách či v cévním zásobení (Čihák, 2004, str. 381).

„Pro tyto rozdíly a pro nutnost lokalizovat funkce jakož i patologické změny byly vypracovány cytoarchitektonické korové mapy, z nichž nejvíce používaná je cytoarchitektonická mapa podle Korbiniana Brodmanna. Brodmann rozčlenil kůru na 11 krajín, které se dále dělí na 52 areí.“ (Čihák, 2004, str. 381)

V isocortexu rozlišujeme dva základní druhy neuronů:

- **Pyramidové buňky** jsou multipolární neurony typu Golgi I patřící mezi eferentní neurony. Vyskytují se převážně v III. vrstvě (Zevní pyramidová vrstva) a V. vrstvě (Vnitřní pyramidová vrstva). Perikarya mají na řezu trojúhelníkovitý tvar s vrcholem orientovaným k povrchu mozku, z kterého vystupuje delší

apikální dendrit, jenž vystupuje až do I. vrstvy (Molekulární vrstva). Ze středu bázi perikaryí vystupují axony, které mají myelinovou pochvu. Betzovy pyramidové neurony mají velikost těla až 100 µm.

- **Hvězdicovité (multipolární) neurony** se řadí mezi neurony typu Golgi II. Hvězdicovité buňky se kromě I. vrstvy (Molekulární vrstva), kde se nevyskytují vůbec, nacházejí ve všech vrstvách. Nejvíce však v II. vrstvě (Zevní granulární vrstva) a IV. vrstvě (Vnitřní granulární vrstva), (Čihák, 2004, str. 379).

Vedle základních druhů neuronů se v isocortexu vyskytují méně časté typy buněk:

- **Vřetenovité neurony** patří mezi neurony, jejichž tělo má vřetenovitý tvar a leží kolmo k povrchu. Dendrity neopouštějí kůru na rozdíl od axonů, které přecházejí do bílé hmoty.
- **Martinottiho neurony** jsou menší multipolární neurony s paprscitě rozvětvenými dendrity. Nacházejí se především ve spodnějších vrstvách kůry. Axony vystupují kolmo až do I. vrstvy (Molekulární vrstva).
- **Horizontální buňky Cajalovy** jsou vřetenovitě protažené buňky, které v isocortexu leží rovnoběžně s povrchem cortex cerebri. Vyskytují se především v I. vrstvě (Molekulární vrstva), (Čihák, 2004, str. 379).

2.3.2 Mozeček (cerebellum)

„Mozeček jako celek je důležitým regulačním centrem motoriky. Dochází zde k průběžnému porovnávání signálů z mozkové kůry o zamýšlených pohybech se signály z receptorů pohybového aparátu a z kůry o skutečném průběhu pohybu. Na základě tohoto porovnání mozeček zajišťuje optimální provedení pohybů končetin a udržování rovnováhy.“ (Čihák, 2004, str. 367)

Rozděluje se na tři hlavní části: mozečkový červ (vermis cerebelli) a dvě mozečkové hemisféry (hemispheria cerebelli), (Čech, 2011, str. 103).

Šedá hmota se rozprostírá na povrchu mozečku ve formě asi 1 mm tlusté mozečkové kůry (cortex cerebelli) a ve formě jader (nuclei cerebelli) v blízkosti stropu IV. mozkové komory. Bílá hmota vyplňuje prostor kolem jader a nachází se pod mozečkovou kůrou (Čech, 2011, str. 103).

Kůra mozečku (Cortex cerebelli)

Na celém rozsahu kůry mozečku se nemění trojvrstvé uspořádání. Kůra mozečku je členěna na tyto tři vrstvy:

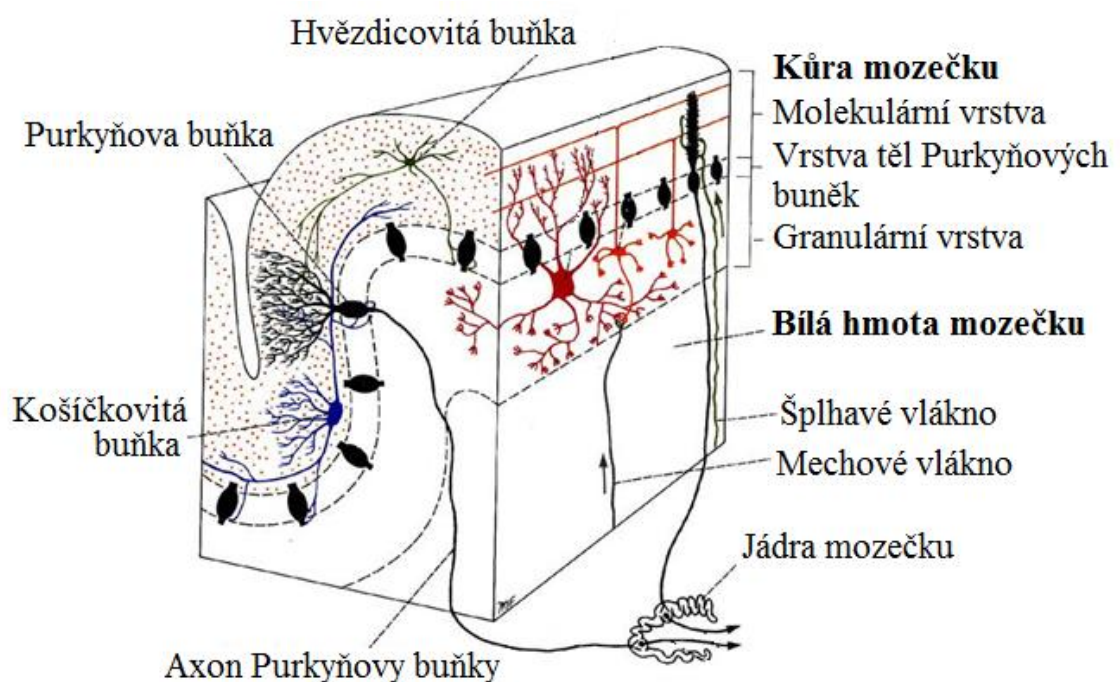
- **Molekulární vrstva** (Stratum moleculare) je nejsvrchnější vrstva kůry mozečku. Nacházejí se zde malé multipolární neurony, včetně hvězdicovitých buněk, a větší tzv. košíčkovité buňky. Kolaterály z axonů košíčkovitých neuronů jsou v synapsi s těly Purkyňových buněk. V této vrstvě je typicky málo nervových buněk, převládají nervová vlákna.

- **Vrstva těl Purkyňových buněk** (Stratum gangliosum) je prostřední vrstva kůry mozečku, která je tvořena těly Purkyňových buněk. Purkyňovy buňky jsou nervové buňky s tělem hruškovitého tvaru o průměru asi 50 až 70 μm . Axony Purkyňových buněk jsou jediná vlákna, která vycházejí z kůry mozečku, prostupují bílou hmotu a jsou v synapsi s neurony v mozečkových jádrech. Vedle Purkyňových buněk můžeme v kůře nalézt Bergmannovu glii. Bergmannova glie jsou dlouhé cylindrické buňky v kůře mozečku s podpůrnou funkcí.
- **Granulární vrstva** (Stratum granulosum) je třetí a nejhlubší vrstva mozečkové kůry. Je tvořena velkým množstvím malých multipolárních neuronů o průměru těl 3 až 4 μm . Axony těchto malých buněk (multipolární neurony) procházejí do povrchové vrstvy (Stratum moleculare), rozvětvují se do písmene „T“ a jsou v synapsi s dendrity Purkyňových buněk (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 172).

Bílá hmota mozečku

Bílá hmota mozečku se skládá ze tří typů myelizovaných nervových vláken (Čech, 2011, str. 104).

- **Paralelní vlákna** jsou tvořeny axony granulárních buněk nejspodnější vrstvy mozečkové kůry. Působí aktivačně na Purkyňovy buňky, hvězdicovité buňky a košíčkovité buňky.
- **Šplhavá vlákna** (axony) procházejí bílou hmotou do první vrstvy (Stratum moleculare) a jsou v synapsi s dendrity Purkyňových buněk.
- **Mechová vlákna** jsou axony, které vstupují do třetí vrstvy (Stratum granulosum), kde ztrácejí myelinovou pochvu a jsou v synapsi s dendrity malých multipolárních neuronů (Čihák, 2004, str. 363).

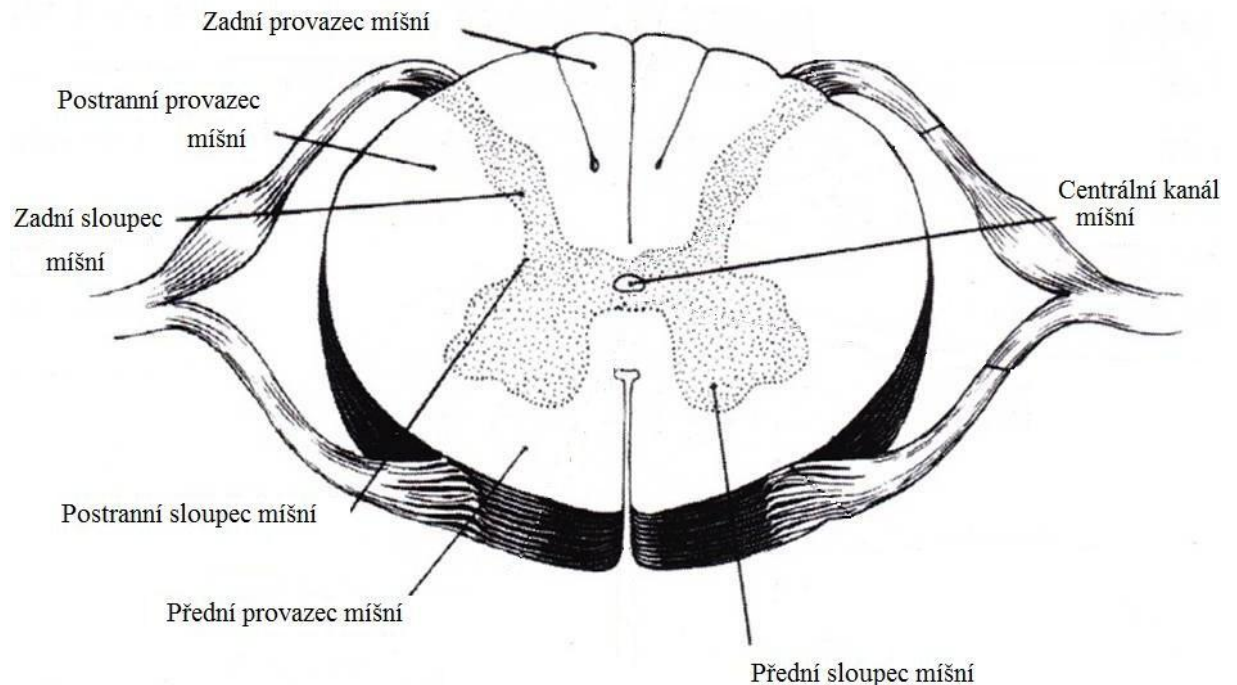


Obrázek 9 - Vrstvy mozečku. Vlastní překlad, (Snell, 1984).

2.3.3 Hřbetní mícha (Medulla spinalis)

Hřbetní mícha je 40 až 50 cm dlouhý provazec oválného (krční a hrudní úsek) nebo kruhovitého (ostatní části míchy) tvaru. Průměr míchy se pohybuje v rozmezí 10 až 13 mm a váží kolem 33 g. Hřbetní mícha je uložena v páteřním kanálu (Saccus durae matris) a je chráněna míšními obaly (Čihák, 2004, str. 234).

Na příčném řezu hřbetní míchou se uprostřed nalézá centrální kanál míšní (Canalis centralis), který prostupuje celou délkou míchy, je vyplněn mozkomíšním mokem a vystlán ependymem. Ependymové buňky řadíme k neuroglii. Kolem centrálního kanálu se rozprostírá šeda hmota míšní ve tvaru písmene „H“. Úseky písmene „H“ rozdělujeme podle polohy na příčném řezu míchou na míšní rohy zadní (Cornua posteriora), míšní rohy přední (Cornua anteriora) a míšní rohy postranní (Cornua lateralia). V prostoru jsou tyto úseky nazývány míšními sloupci a rozdělují míchu na tři části: zadní sloupce míšní (Columnae posteriores), přední sloupce míšní (Columnae anteriores) a postranní sloupce míšní (Columnae laterales). Bílá hmota obklopuje šedou hmotu míšní a je rozdělena na tři části (provazce): zadní provazec míšní (Funiculus posterior), přední provazec míšní (Funiculus anterior) a postranní provazec míšní (Funiculus lateralis), (Čihák, 2004, str. 236-238).



Obrázek 10 - Hřbetní mícha. Vlastní překlad, (Gaskins, 2012).

Šedá hmota míšňí

Šedá hmota míšňí se skládá z těchto hlavních typů nervových buněk:

- **Kořenové buňky** (Cellulae radicales) se nacházejí v předním a postranním sloupci míšňím. Jedná se o velké multipolární neurony, s nejvíce vyvinutým granulárním endoplasmatickým retikulem, označované jako *motoneurony* (Ross, 2006, str. 320).
 - a) *Motoneurony* α jsou multipolární neurony o velikosti 60 až 100 μm ležící v předních rozích míšňích. Axony opouštějí šedou hmotu v podobě předních kořenů míšňích a pokračují jako motorická vlákna ke kosterním svalům, kde jsou zakončeny jako motorické ploténky.
 - b) *Motoneurony* γ patří mezi neurony, které jsou podobné motoneuronům α , ale liší se svojí velikostí. Oproti motoneuronům α jsou motoneurony γ menší. Průměr jejich perikaryí je 30 až 40 μm . Vlákna těchto neuronů inervují svalové vlákno nervosvalových vřetének.
 - c) *Motoneurony viscerální* jsou neurony nacházející se v postranním sloupci míšňím. Jsou podobné motoneuronům γ . Axony viscerálních motoneuronů vystupují z míchy společně s vlákny předních kořenů a vedou vzruch pro správnou funkci hladkého svalstva.
- **Spojovací buňky** (Interneurony) jsou nervové buňky vyskytující se ve všech částech šedé hmoty míšňí, nejvíce však v zadním sloupci míšňím. Jedná se o malé buňky, které navzájem pomocí axonů propojují neurony míchy nebo je spojují s axony vzestupných drah.
- **Buňky provazců** (Cellulae funiculares) patří mezi multipolární neurony, které se nacházejí v zadním sloupci míšňím. Neurity těchto buněk vystupují ze šedé hmoty míšňí do bílé hmoty a vedou vzruch do vyšších center centrální nervové soustavy (mozková jádra). Také mohou pomocí axonů propojovat jednotlivé míšňí segmenty.

Buňky šedé hmoty míšňí se v šedé hmotě shlukují a vytvářejí oblasti zvané jádra, která mají svůj konkrétní název. Ohraničení těchto jader v šedé hmotě míšňí není přesné, proto byla šedá hmota rozdělena na 10 segmentů, které označujeme jako Rexedovy zóny.

2.4 Princip výroby histologického preparátu

Možností jak zhotovit histologický preparát je celá řada. Jednotlivé postupy se liší použitými chemikáliemi, dobou působení chemikálií, tloušťkou řezů, a dalšími aspekty. Různorodost je závislá nejenom na typu tkáně, ale také na velikosti tkáně a typu buněčných struktur, které chceme v daném preparátu pozorovat. I přese všechny tyto odlišnosti mají veškeré histologické barvicí metody společné kroky výrobního postupu, které dávají možnost vzniku histologického preparátu: odběr histologického materiálu a jeho fixace, zalévání tkáně do parafínu, krájení řezů, deparafinace, barvení parafinových řezů, odvodnění, projasnění a montování (Mescher, 2013, str. 2).

2.4.1 Odběr histologického materiálu a fixace

Nejčastější způsoby odběru histologického materiálu jsou biopsie a nekropsie. V případě biopsie se jedná o odběr kousku tkáně z živého člověka, získaný většinou operativně. Způsob odběru materiálu, který se odebere při pitvě již ze zemřelého člověka, označujeme nekropsií (Vacek, b1995, str. 25-26).

Jednotlivé buňky tkáně, obsahují spoustu enzymů, které způsobují rozklad vlastní buňky (autolýzu). Autolýzu je nutné co nejdříve zastavit pomocí fixace, aby nedošlo k masivnímu poškození celé tkáně a tím i znehodnocení budoucího histologického preparátu (Vacek, b1995, str. 26). Princip fixace spočívá v rychlé denaturaci autolytických enzymů. Fixace může být provedena pomocí fyzikálních fixačních prostředků (fixace tkáně nízkou nebo vysokou teplotou) nebo chemickými fixačními prostředky, z nich nejvíce užívanou chemikálií je 10% formol (Jirkovská, c2006, str. 16-18).

POZN: 10% formol je 4% roztok aldehydu kyseliny mravenčí neboli formaldehydu. Aby nedocházelo ke vzniku kyseliny mravenčí, je roztok stabilizován pomocí hydroxidu vápenatého, který vzniklou kyselinu mravenčí neutralizuje (Horváth, 1988, str. 24).

2.4.2 Zalévání do parafínu

Aby se odebraná tkáň mohla nakrájet na tenké řezy (jinak nelze pozorovat buněčné struktury tkáně), je potřeba ji zalít do parafínu, kde tkáň získá potřebnou pevnost na krájení a tím nedochází k mechanickému poškození tkáně vlivem krájení (Vacek, b1995, str. 34). Jelikož voda je nemísitelná s parafínem, do kterého tkáň zaléváme, je nutné provést nejdříve odvodnění tkáně pomocí vzestupné řady alkoholu. Vzestupná řada alkoholů se skládá z 50%, 70%, 80%, 90%, 96% a 100% etanolu (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 516). Tkáň tedy postupně přendáváme z jedné lázně alkoholu do druhé lázně alkoholu s vyšší koncentrací etanolu. Kdybychom tkáň ihned vložili do 100% etanolu, došlo by ke smrštění tkáně a tím k jejímu porušení. Doba ponechání tkáně v jednotlivých lázních alkoholu závisí na velikosti a typu odvodňované tkáně (Vacek, b1995, str. 34-35).

Jelikož se parafin nerozpouští v etanolu, je potřeba tkáň prosytit takovou látkou, která se dobře mísí s etanolem a zároveň se v ní rozpouští parafin. Nejčastěji takovou používanou látkou (intermediem) je benzen. Prosycení tkáně benzenem probíhá postupně, nejčastěji ve třech lázních benzenu (Vacek, b1995, str. 37).

Tkáň prosycená benzenem se přenesse do lázně s parafinem. Parafin má teplotu 56-58 °C. Prosycení parafinem se provádí ve třech stejných krocích. Je důležité dodržovat teplotu parafinu, neboť teplota 58 °C se nesmí překročit, aby tkáň neztvrdla (Jirkovská, c2006, str. 20-21).

K vlastnímu zalévání tkáně do parafinu, se používá kvalitní ještě nepoužitý parafin (nelze použít parafin z prosycování). Zalévání tkáně se provádí v zalévací komůrce. Nejčastěji se jedná o papírovou krabičku a dřevěný špalíček, který slouží jako nosič zalité tkáně, nebo o kovovou komůrku, kde nosičem zalité tkáně je speciální zalévací kazeta z ABS. Po zalití tkáně parafinem je důležité rychlé a rovnoměrné ochlazení parafinu a jeho následné dotunutí (Vacek, b1995, str. 39).

2.4.3 Krájení řezů

Krájení parafinových bločků na tenké řezy (několik μm) se provádí pomocí zařízení zvané *mikrotom*. Existují dva základní typy: sáňkový a rotační. U sáňkového mikrotomu je pevně ukotvený parafinový bloček a pohybuje se mikrotomový nůž, který ukrajuje tenké parafinové řezy (Vacek, b1995, str. 51-53). Naopak u rotačního mikrotomu je upevněn nůž a pohybujeme parafinovým blokem, tak že otáčíme klikou na přístroji (Vacek, b1995, str. 53-54). Speciálním typem mikrotomu je mikrotom zmrazovací neboli Cryocut. Výhodou tohoto mikrotomu je, že tkáň nemusí být zalitá, pouze se zmrazí oxidem uhličitým a následně se nakrájí pomocí mikrotomového nože, který je připevněný na pohyblivém rameni. Velkou výhodou zmrazovacího mikrotomu je, že tento způsob zhotovení tenkého řezu je rychlý, tedy lze využít například v průběhu operace, kdy je důležité znát rychlou odpověď, o jakou „poruchu“ tkáně se jedná (Jirkovská, c2006, str. 25).

Ukrojený řez parafinového bločku roztáhneme a připevníme na podložní sklíčko pomocí směsi bílku s glycerinem a kapkou destilované vody (Vacek, b1995, str. 62). Další možností je, že ukrojený řez přeneseme na hladinu teplé destilované vody a řez podebereme pomocí podložního sklíčka, čímž řez ke sklíčku přilne. Sklíčko i s řezem položíme na teplou ploténku (teplota 45-50 °C) a necháme odpařit vodu, čím se řez vypne a připevní více na sklíčko (Jirkovská, c2006, str. 26).

2.4.4 Deparafinace

Před každým barvením řezu je nutné vlastní řez odparafinovat, neboť k barvení se používají vodné roztoky barviv, které jsou nemísitelné a nerozpustné v parafinu. Deparafinace se provádí pomocí dvou lázní xylenu, dvou lázní alkoholu (100% a 96% etanol) a poté pereme v destilované vodě, aby nedocházelo k ředění barvicích roztoků (Jirkovská, c2006, str. 32).

2.4.5 Barvení parafínových řezů

Buněčné struktury můžou být bazofilní nebo eosinofilní. Mezi bazofilní struktury v buňce patří jádro, ribozomy a granulární endoplazmatické retikulum, které se barví bazickými barvami, jako jsou hetomaxylín, thionín, toluidinová modř. Eosinofilní buněčné struktury jsou lysozomy a mitochondrie, které lze obarvit pomocí kyselých barev: eosin, anilínová modř, kyselý fuchsin (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 517).

Hematoxylin-Eosin

Hematoxylin je bazická barva, která barví jádra buněk modře. Hematoxylin barví i další basofilní buněčné struktury. Tyto hematoxylinem obarvené struktury odbarvíme diferencováním v kyselém etanolu (etanol s kyselinou chlorovodíkovou), aby zůstaly modře obarvená pouze buněčná jádra a chrupavky (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 517). Poté řezy barvíme eosinem, který červeně obarvuje svalové buňky a vazivo (Jirkovská, c2006, str. 32).

Nisslova metoda

Obarvení tigroidu (granulární endoplazmatické retikulum a ribozomy) pomocí 0,1% roztoku thioninu, nebo 0,1% toluidinové modře. Výsledkem jsou modře obarvené ribozomy, jak vázané na endoplazmatické retikulum, tak volné v cytoplazmě (Vacek, b1995, str. 104).

Impregnace nervových fibril podle Bielschowského

Základní impregnační metoda, která znázorňuje výběžky nervových buněk. Řezy impregnujeme v roztoku dusičnanu stříbrného a později v amoniakálním roztoku stříbra. Výsledkem jsou černě zbarvené nervové výběžky (Bancroft, 2008, str. 369-370).

Barvení luxolovou modří

Nejvíce používaná barvicí metoda pro znázornění myelinových pochv nejenom v centrální nervové soustavě. Myelinové pochvy se vlivem roztoku luxolové modře barví do modra. Jádra buněk se dobarvují jádrovou červení, a tedy je můžeme vidět v mikroskopickém obrazu červené (John D. Bancroft, 2008, str. 351-352).

2.4.6 Odvodnění, projasnění a montování

Barvení řezů se provádí pomocí vodných roztoků barviv, proto je nutné po dokončení barvení parafínových řezů obarvený řez odvodnit pomocí alkoholu (96% a 100% etanol). Dále následuje projasnění řezů karboxylenem a dvou lázní xylenu (Vacek, b1995, str. 73). Řezy poté zamontujeme do montovacího media, které musí být průhledné a mít stejný index lomu jako má sklo, což je 1,5. Mezi taková montovací media patří kanadský balzám, Entanal nebo DePex (Lüllmann-Rauch, 2012, str. 516).

2.5 Historie a autorství neurohistologických barvicích metod

Všechny metody poznali světlo světa v průběhu 19. století a počátku 20. století. V tomto období nebyla věda (hlavně přírodní vědy) tolik podporována, především z důvodů politického dění v Evropě. Proto nebyly vědecké články tak často publikovány a překládány do mateřských jazyků dalších vědců. Z těchto příčin se často stávalo, že na stejném poznatku a objevu se podílelo více autorů a záleží na literárním zdroji, komu je zásluha připsána.

2.5.1 Hematoxylin-eosin

Barvivo hematoxylin se získává ze stromu *Haematoxylum campechianum*, který pochází z Mexika a střední Ameriky. Do Evropy bylo toto barvivo přivezeno za účelem barvení látek a tkanin. Německý anatom Heinrich von Waldeyer-Hartz provedl několik pokusů barvení touto látkou na svých histologických preparátech a roku 1863 vydává o tom článek. Ale hematoxylin sám o sobě není dobré barvivo a proto je potřeba do roztoku hematoxylinu přidat nějaké mořidlo, jednoduchou kovovou sůl, která pomáhá vázat barvu na požadovanou tkáň. O tento poznatek se zasloužil Böhmer roku 1865.

Na objevu eosinu se podílelo nezávisle na sobě více autorů. Polský chemik Heinrich Caro nasyntetizoval červeno-žluté barvivo, které nazval po své dívce, Eosin. Roku 1875 publikoval německý chemik Emil Fischer práci o látce zvané Eosin Y, kde „Y“ znamená „yellowish“ (nažloutlý). Tento typ eosinu se v histologických laboratořích používá běžně do dnes.

Pomocí těchto dvou metod roku 1876 obarvil tkáň chemik Wissowzky. Tato metoda je dnes známá jako metoda Hematoxylin-eosin (Wilson, 2014).

2.5.2 Nisslova metoda

Objevitelem Nisslovy substance a Nisslovy metody je německý psychiatr a neuropatolog Franz Nissl. Nissl se narodil v Mnichově 9. září 1860 a zemřel 11. srpna 1919. Jako student Mnichovské univerzity objevil barvicí účinky anilinu, jež modře barví buněčná jádra a další buněčné struktury (Nisslova substance), které byly objeveny spolu s Nisslovou barvicí metodou. Díky tomuto objevu získal roku 1884 Nissl cenu Mnichovské univerzity za neurologii. O rok později roku 1885 na stejné téma napsal disertační doktorskou práci. Během svého života velice úzce spolupracoval s Alzheimerem a Brodmannem, s kterým také popsal cytoarchitekturu mozkové kůry, jež bylo založeno především na Nisslově barvení (Wade, 2012).

2.5.3 Bielschowského metoda

Tato impregnační metoda je pojmenovaná podle svého objevitele Maxe Bielschowského. Max Bielschowsky se narodil roku 1869 ve Vratislavi a zemřel roku 1940. Studoval medicínu v Berlíně, kterou roku 1893 úspěšně dokončil. Po ukončení studií se věnoval vědecké činnosti společně s dalším neurologem Paulem Schusterem, s kterým vydali práci popisující roztroušenou sklerózu a další neurodegenerativní onemocnění. Aby mohli zkoumat poškozené nervové tkáně, zdokonalil impregnační

metodu pomocí stříbření, na které již pracoval kolega Carl Weiger. Bielschowsky publikoval svoji impregnační metodu ve stejný čas jako Španěl Santiago Ramón y Cajal, avšak jejich objevy byly nezávislé na sobě (Ashwal, 1990).

2.5.4 Barvení luxolovou modří

Základní kameny k dnes známým metodám barvicí myelinové pochvy položil německý patolog Karl Weigert roku 1885. Princip metody byl založen na několika týdenní fixaci nervové tkáně v roztoku dichromanu draselného, který zviditelňuje proteiny a lipidy nerozpustné ve vodě a organických rozpouštědlech. Chrom se ukládal do míst buňky, kde se nacházejí fosfolipidy (myelinové pochvy). Řezy potom byly následně dobarveny hematoxylinem, který v místech, kde byl chrom navázaný, tvořil modré zbarvení. Jelikož nejběžnější fixační tekutinou je formaldehyd, který neobsahuje ionty chromu, je tato metoda zastaralá a již se nepoužívá (Kiernan, 2010). Nejvíce používanou metodou pro znázornění myelinových pochev je metoda Klüver-Barrera, která kombinuje tyto barvicí roztoky: luxolová modř MBS (myelin blue solution), krysolová violet a diferenciační roztok uhličitanu lithného, a zbarvuje myelinové pochvy do modra (Snodgrass, 1961). Autory této metody, jak už je patrné z názvu, kteří využívají alkoholický roztok aminové soli sulfonovaného ftalocyaninu mědi zvaný luxolová modř, jsou Klüver a Barrera, jež popsali tuto metodu v roce 1953 (John D. Bancroft, 2008, str. 351).

3 Cíl práce

Jelikož se mozek a další části centrální soustavy skládají z několika druhů a typů buněk, je potřeba použít při zhotovení histologického preparátu speciálních barvicích metod, které „zviditelní“ námi požadované buňky. Pomocí impregnačních metod zvýrazníme nervová vlákna, pomocí barvení luxolovou modří MBS zviditelníme myelinové pochvy axonů a pomocí Nisslovy metody obarvíme tigroidní substanci vyskytující se v těle neuronu. Vše bude porovnáno s nejběžněji používanou metodou, jako je hematoxylin-eosin.

Než dojde k samotnému barvení tkáně preparátu, je nutné provést několik předcházejících kroků. Vše začíná odběrem tkáně od pacienta. V případě centrální nervové soustavy se ve většině případů jedná o nekropsii. Dále bude popsáno odvodnění preparátu, zalévání tkáně do parafinu, aby bylo možné v dalším kroku tkáň nakrájet na slabé řezy v řádech mikrometrů, které nám umožňují pozorovat jednotlivé vrstvičky buněk tkáně v mikroskopu. Teprve po krájení a odparafinování vzniklých řezů je možné preparáty barvit námi zvolenou metodou. Po obarvení řezů dochází k opětovnému odvodnění a okamžitému montování řezů. V mikroskopu pak pozorujeme výsledky naší práce a jednotlivé buňky centrální nervové soustavy, jako je kůra mozku, mozeček a příčný řez hřbetní míchy.

Preparáty byly zhotoveny autorem za použití jednoduchých přístrojů a pomůcek jako jsou: podložní sklíčka, laboratorní jehly, zalévací komůrky, barvicí kyvety, rotační mikrotom a termostat. Všechny preparáty byly vyrobeny v laboratořích Histologického a embryologického ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze na Albertově.

4 Metodika práce

4.1 Odběr histologického materiálu a fixace

Všechny námi potřebné části centrální nervové soustavy (koncový mozek, mícha a mozeček) byly odebrány pověřenou osobou v příslušném patologickém ústavu za účelem vzdělávání studentů na 1. LF UK (Ústav histologie a embryologie). Získaný materiál nekropsii byl ihned uložen do 10% roztoku formolu, aby se zabránilo autolýze jednotlivých buněk tkáně, po dobu 24 hodin. Tímto způsobem jsme získali 3 tkáňové bločky: tkáňový bloček míchy, tkáňový bloček koncového mozku (s kůrou) a tkáňový bloček mozečku.

4.2 Zalévání do parafínu

Před samotným zaléváním je nutné tkáň nejdříve odvodnit a prosytit intermediem, které je dobře mísitelné s etanolem a dobře rozpouští parafín (v našem případě používáme benzen). Až pak tkáň zaléváme do parafínu.

4.2.1 Odvodnění

Tkáň vyjmeme z nádob s 10% formolem, propereme v destilované vodě, aby nedocházelo k ředění roztoků etanolu, a začneme tkáň odvodňovat vzestupnou řadou alkoholů (Tabulka 1: Doba odvodňování tkáň v jednotlivých lázních alkoholů).

Tabulka 1 - Doba odvodňování tkáň v jednotlivých lázních alkoholů, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní šetření).

Lázeň	Koncentrace etanolu (objemový zlomek)	Doba odvodňování v jednotlivé lázni	Den a čas provedení
1. lázeň alkoholu	50% etanol I	2 hodiny a 10 minut	PÁ: 8.40 – 10.50
2. lázeň alkoholu	50% etanol II	1 hodina a 15 minut	PÁ: 10.50 – 12.05
3. lázeň alkoholu	70% etanol	20 hodin 45 minut	PÁ: 12.05 – PO: 8.50
4. lázeň alkoholu	80% etanol I	40 minut	PO: 8.50 – 9.30
5. lázeň alkoholu	80% etanol II	5 hodin a 10 minut	PO: 9.30 – 14.40
6. lázeň alkoholu	90% etanol I	50 minut	PO: 14.40 – 15.30
7. lázeň alkoholu	90% etanol II	17 hodin a 15 minut	PO: 15.30 – ÚT: 8.45
8. lázeň alkoholu	96% etanol I	6 hodin a 55 minut	ÚT: 8.45 – 15.40
9. lázeň alkoholu	96% etanol II	16 hodin a 20 minut	ÚT: 15.40 – ST: 8.00
10. lázeň alkoholu	100% etanol I	1 hodina	ST: 8.00 – 9.00
11. lázeň alkoholu	100% etanol II	1 hodina	ST: 9.00 – 10.00
12. lázeň alkoholu	100% etanol III	1 hodina	ST: 10.00 – 11.00

Ve 100% etanolu nesmí tkáň zůstat déle než 1 hodinu, jinak by došlo k jejímu ztvrdnutí.

Příprava roztoků

V laboratoři se nachází pouze 96% etanol, proto je nutné ostatní koncentrace etanolu připravit ředěním 96% etanolu.

- 50% etanol připravíme tak, že smícháme 45 dílů destilované vody a 50 dílů 96% etanolu (na výrobu 1l 50% etanolu je potřeba 520 ml 96% etanolu a 480 ml destilované vody).
- 70% etanol připravíme tak, že smícháme 26 dílů destilované vody a 70 dílů 96% etanolu (na výrobu 1l 70% etanolu je potřeba 730 ml 96% etanolu a 270 ml destilované vody).
- 80% etanol připravíme tak, že smícháme 16 dílů destilované vody a 80 dílů 96% etanolu (na výrobu 1l 80% etanolu je potřeba 836 ml 96% etanolu a 164 ml destilované vody).
- 90% etanol připravíme tak, že smícháme 6 dílů destilované vody a 90 dílů 96% etanolu (na výrobu 1l 90% etanolu je potřeba 940 ml 96% etanolu a 60 ml destilované vody).

100% etanol – lze koupit ve specializovaném obchodě jako 99,90% etanol, který musíme stabilizovat pomocí vyžihané modré skalice. Jakmile bílé krystalky vyžihané modré skalice zmodrají, alkohol již není bezvodný a je potřeba přidat další vyžihanou modrou skalici.

4.2.2 Prosycení tkáně benzenem

Protože parafin není rozpustný v etanolu, je potřeba tkáň prosytit látkou, v které se parafin rozpouští. V našem případě používáme benzen. Jednotlivým lázním benzenu předcházejí acetonové lázně, aby došlo k lepšímu prosycení tkáně benzenem.

Tkáňové bločky vložíme do první lázně acetonu. Po uplynutí 1 hodiny přendáme do další nově připravené lázně acetonu, kde necháme tkáň prosytit opět 1 hodinu. Následují tři lázně benzenu po dobu 10 minut. Vždy je třeba připravit novou lázeň benzenu, aby došlo k dokonalému prosycení tkání benzenem.

Aceton I.....	1 hodina (ST: 11.00 – 12.00)
Aceton II	1 hodina (ST: 12.00 – 13.00)
Benzen I.....	10 minut (ST: 13.00 – 13.10)
Benzen II.....	10 minut (ST: 13.10 – 13.20)
Benzen III.....	10 minut (ST: 13.20 – 13.30)

4.2.3 Prosycení tkáně parafínem

Abychom mohli tkáň zalít do parafínu, je nutné, tkáň dokonale prosytit parafínem, jinak by docházelo při krájení řezů k jejich trhání.

Tkáňové bločky vyjmeme z benzenové lázně a vložíme do první lázně s parafínem, který udržujeme při teplotě 56 °C. Tkáňové bločky necháme v této první

parafínové lázni přes noc. Druhý den přendáme tkáňové bločky do druhé lázně parafínu o teplotě 56 °C, kde necháme tkáň prosycovat do dalšího dne. Následující den přemístíme bločky do třetí parafínové lázně o teplotě 56 °C, kde necháme bločky 6 hodin.

Parafín I	20 hodin	(ST: 13.30 – ČT: 9.30)
Parafín II	24 hodin	(ČT: 9.30 – PÁ: 9.30)
Parafín III	6 hodin	(PÁ: 9.30 – 15.30)

4.2.4 Vlastní zalití do parafínu

Po 6 hodinách vyjmeme tkáňové bločky prosycené parafínem z parafínové lázně. Bločky umístíme do papírové komůrky odpovídající velikosti tkáňového bločku (musíme dát pozor na orientaci tkáně) a začneme zalévat rozpuštěným parafínem o teplotě 60 °C. Pomalu zaléváme tkáň v komůrce až po její okraj. Po ztuhnutí parafínu, vyjmeme z papírové komůrky a parafínový bloček ořízneme, aby okraje parafínu kolem tkáně nebyli příliš velké a všechny strany byly rovné. Oříznutý parafínový bloček přitmelíme k dřevěnému špalíčku, který označíme číselným údajem, abychom mohli správně identifikovat, o jakou tkáň se jedná. Již hotový parafínový bloček necháme zcela vytvrdnout do druhého dne.

4.3 Krájení řezů

Parafínové bločky postupně upevníme do držáku rotačního mikrotomu. Nastavíme tloušťku řezu na 8 μm. Pomalým, ale plynulým pohybem krájíme řezy tenké 8 μm, které pomocí štětečku a laboratorní jehly přeneseme na podložní sklíčko, které jsme si předem potřeli malým množstvím vaječného bílku s glycerolem. Těsně vedle řezu na sklíčko kápeme kapičku destilované vody, která nám řez vypne. Sklíčko s vypnutým řezem umístíme na elektricky vyhřívanou ploténku a necháme vodu odpařit. Sklíčko s vysušením řezem popíšeme pomocí tužky a umístíme do termostatu na 37 °C, kde řezy necháme odležet do druhého dne.

Příprava roztoků

Vaječný bílek s glycerolem – stejné množství rozšlehaného vaječného bílku smícháme se stejným množstvím glycerolu.

4.4 Deparafinace

Parafín je látka, která je nerozpustná ve vodě, proto před samotným barvením (barvy jsou vodnými roztoky barviv) je nutné přilepený řez na sklíčku odparafinovat, aby vodný roztok barviv potřebných k barvení mohl působit na jednotlivé buňky tkáně.

Sklíčko s řezem vložíme na 5 minut do první lázně xylenu, poté vyjmeme, lehce osušíme hadříkem a přendáme do druhé lázně xylenu, kde opět necháme po dobu 5 minut. Opětovně osušíme a přendáme na 5 minut do lázně s 100% etanolem. Následuje další lázeň s 96% etanolem, kde předem otřené sklíčko necháme 5 minut. Sklíčka následně přendáme do kyvety s vodou a necháme pod tekoucí vodou „prát“ přibližně 5 minut. (Proud vody nesmí dopadat přímo na sklíčka s řezy, mohlo by dojít k jejich odlepení.) Po „vyprání“ řezů přendáme sklíčka do destilované vody, aby během samotného barvení nedocházelo k ředění vodných roztoků.

Xylen I	5 minut
Xylen II	5 minut
100% etanol	5 minut
96% etanol	5 minut
praní v tekoucí vodě	5 minut



Obrázek 11 – Deparafinace, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie); zleva: Xylen I, Xylen II, 100% etanol, 96% etanol.

Příprava roztoků

100% etanol (viz 4.2.1 Odvodnění)

4.5 Barvení

Samotné barvení následuje ihned po deparafinaci. Důležité je, aby řez nevyschnul, neboť by došlo k poškození preparátu. Proto je nutné, mít řezy neustále v lázni nebo alespoň v destilované vodě, čímž zabráníme jejich vysušení.

4.5.1 Barvení hematoxylin-eosinem

Sklička s řezy umístíme do barvicí kyvety s hematoxylinem (Harissův) na 5 minut. Poté řezy opláchneme v destilované vodě, kam umístíme všechny barvené řezy a po jednom řezu postupně diferencujeme v kyselém alkoholu, za kontroly v mikroskopu. Pozorujeme, zda jádra změnila barvu na hnědou. Vše musí probíhat dostatečně rychle, aby nedošlo k vysušení preparátu. Řezy umístíme do kyvety s vodou a po přidání posledního sklička 10 minut „pereme“ pod tekoucí vodou. Vlivem „praní“ řezů ve vodě jádra buněk zčernají. Aby jádra zmodrali, každý řez na pár vteřin ponoříme do lázně s 2% roztokem hydrogenuhličitanu sodného, opláchneme v destilované vodě a potom barvíme 5 minut v 0,5% roztoku eosinu. Eosin je agresivní barva, která obarví i vlastní skličko, proto je důležité řezy pořádně opláchnou v destilované vodě. Následuje oplach ve 3 kyvetách s destilovanou vodou. V každé kyvetě řez pereme 5 sekund, aby došlo k dokonalému odbarvení vlastního sklička.

Harrisův hematoxylin.....	5 minut
Destilovaná voda.....	5 sekund
Kyselý alkohol.....	do zhnědnutí jader
Praní v tekoucí vodě.....	10 minut
2% hydrogenuhličitan sodný	5 sekund
Destilovaná voda.....	3 sekundy
0,5% eosin.....	5 minut
Destilovaná voda I.....	5 sekund
Destilovaná voda II.....	5 sekund
Destilovaná voda III	5 sekund



Obrázek 12 - Barvení hematoxylin-eosinem včetně deparafinace, odvodnění a projasnění,, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie); zleva: Xylen I, Xylen II, 100% etanol, 96% etanol, Harrisův hematoxylin, kyselý alkohol, 2% hydrogen uhličitán sodný, eosin, 96% etanol, 100% etanol, xylen I, xylen II.

Příprava roztoků

Harrisův hematoxylin – komerčně vyráběný, není potřeba v laboratoři připravovat, pouze se přefiltrujeme.

Kyselý alkohol – ke 100 ml 96% etanolu přidáme 5 kapek kyseliny chlorovodíkové.

2% hydrogenuhlíčitán sodný – na výrobu 1l roztoku je potřeba 20 g hydrogenuhlíčitánu sodného a 1000 ml destilované vody.

0,5% roztok eosinu – na výrobu 1l roztoku je potřeba 5 g eosinu a 1000 ml destilované vody.

4.5.2 Barvení – Nisslova metoda 1

Hadříkem osušené kyvety přemístíme do kyvety v termostatu s 0,1% roztokem toluidinové modře, kde necháme řezy barvit 40 minut při teplotě 37 °C. Po 40 minutách následuje oplach sklíček v destilované vodě a hned poté diferenciaci v 96% etanolu.

0,1% toluidinová modř (37 °C).....	40 minut
Destilovaná voda.....	oplach
96% etanol.....	5 sekund

Příprava roztoků

0,1% toluidinová modř – 90 ml octanového pufru smícháme s 10 ml 1% roztokem toluidinové modře

1% roztok toluidinové modře – na výrobu 1l roztoku je potřeba 10 g toluidinové modře a 1000 ml destilované vody.

octanový pufr – k 50 ml octanu sodného přidáme 40 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové

roztok kyseliny chlorovodíkové – 100 ml 37,5% roztoku kyseliny chlorovodíkové (komerčně vyráběný roztok) smícháme se 100 ml destilované vody a doplníme destilovanou vodou na objem 250 ml.

4.5.3 Barvení – Nisslova metoda 2

Poněvadž preparáty obarvené toluidinovou modří neposkytly kvalitní histologické preparáty, obměnili jsme Nisslovu metodu tak, že jsme místo toluidinové modře použili roztok thioninu.

Sklička s preparáty vložíme do kyvety naplněné roztokem 0,1% thioninu ohřátým na 37 °C a odložíme do termostatu (teplota 37 °C) na 30 minut. Vyjmuté řezy opláchneme v destilované vodě. Řezy je možno diferencovat v 96% etanolu, ale z důvodu, aby nedošlo k opětovnému vyblednutí preparátu, nediferencujeme.

0,1% thionin (37 °C).....	30 minut
Destilovaná voda.....	oplach

Příprava roztoků

0,1% thionin – k 90 ml octanového pufru přidáme 10 ml 1% vodného roztoku thioninu

1% roztok thioninu – na výrobu 1l roztoku je potřeba 10 g thioninu a 1000 ml destilované vody.

octanový pufr – k 50 ml octanu sodného přidáme 40 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové

roztok kyseliny chlorovodíkové – 100 ml 37,5% roztoku kyseliny chlorovodíkové (komerčně vyráběný roztok) smícháme se 100 ml destilované vody a doplníme destilovanou vodou na objem 250 ml.

4.5.4 Barvení podle Bielschowského

Řezy přeneseme do kyvety obsahující 20% roztok dusičnanu stříbrného a necháme roztok působit 2,5 hodiny ve tmě. Na další 3 minuty přemístíme řezy do redukčního roztoku. Následuje praní v 10% etanolu po dobu 2 minut. Mezi jednotlivými kroky nezapomínáme sklíčka s řezy otírat hadříkem. Sklíčka vložíme do amoniakálního roztoku stříbra a necháme roztok působit 2 minuty, načež pereme obarvené řezy po jednom v pěti kyvetách obsahující redukční roztok (v každé kyvetě nechám řez 3 sekundy, v poslední 7 sekund). Vyprané řezy shromažďujeme v kyvetě s destilovanou vodou. Po přidání posledního řezu, přendáme sklíčka do 5% roztoku sirnatanu sodného, kde necháme sirnatan působit 2 minuty. Nato řezy pereme 2 minuty v tekoucí vodě.

20% dusičnan stříbrný.....	2,5 hodiny
Redukční roztok.....	3 minuty
10% etanol.....	2 minuty
Amoniakální roztok stříbra.....	2 minuty
Redukční roztok I.....	3 sekundy
Redukční roztok II.....	3 sekundy
Redukční roztok III.....	3 sekundy
Redukční roztok IV.....	3 sekundy
Redukční roztok V.....	7 sekund
Destilovaná voda.....	dle potřeby
5% sirnatan sodný.....	2 minuty
Praní v tekoucí vodě.....	2 minuty



Obrázek 13 - Barvení podle Bielschowkého, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie); zleva: 20% roztok dusičnanu stříbrného, redukční roztok, 10% etanol, amoniakální roztok stříbra, chlorid zlatitý, sinitan sodný, destilovaná voda.

Příprava roztoků

20% dusičnan stříbrný – na výrobu 1l roztoku je potřeba 200 g dusičnanu stříbrného a 1000 ml destilované vody.

5% sinitan sodný – na výrobu 1l roztoku je potřeba 50 g sinitanu sodného a 1000 ml destilované vody.

Amoniakální roztok stříbra – (roztok na 8 řezů) ke 30 ml 20% dusičnanu stříbrného přidáme 30 ml 96% alkohol. Po kapkách přidáváme amoniak (ihned dojde po každé kapce k zhnědnutí) až do té doby, dokud nebude roztok čirý. Je důležité roztok pořád míchat, aby nedocházelo k falešným výsledkům. Nakonec přidáme k hotovému roztoku ještě 15 kapek amoniaku. (Nutno připravit na každé barvení čerstvé).

Redukční roztok – k 25 ml formaldehydu přidáme 100ml 96% alkoholu a 375 ml destilované vody.

4.5.5 Barvení luxolovou modří

Řezy opláchneme v destilované vodě (asi 3 sekundy každé sklíčko), abychom neředili roztoky používané během barvení. Potom všechny řezy přendáme do kyvety s obsahující 0,1% roztok Luxolové modře MBS (Luxol Fast Blue) v 96% etanolu. Řezy necháme v kyvetě barvit 30 minut při teplotě 58 °C. Po 30 minutách sklíčka s řezy opláchneme nejdříve v 70% alkoholu a poté v destilované vodě. Následuje diferencování v 0,05% roztoku uhličitanu lithného po dobu 10 minut. Opět opláchneme v destilované vodě a přendáme do kyvety s jádrovou červení, kde za dobu 10 minut se nám jádra zbarví červeně. Sklíčka s řezy opláchneme ve třech lázních destilované vody. V každé kyvetě sklíčka oplachujeme 5 sekund.

Destilovaná voda.....	3 sekundy
0,1% Luxolová modř MBS.....	30 minut
70% etanol.....	15 sekund
Destilovaná voda.....	3 sekundy
0,05% uhličitan lithný.....	10 minut
Destilovaná voda.....	3 sekundy
Jádrová červen.....	10 minut
Destilovaná voda I.....	5 sekund
Destilovaná voda II.....	5 sekund
Destilovaná voda III.....	5 sekund

Příprava roztoků

0,1% luxolová modř MBS – ve 100 ml 96% etanolu rozpustíme 0,1 g komerčně vyráběné luxolové modři MBS

70% etanol - připravíme tak, že smícháme 26 dílů destilované vody a 70 dílů 96% etanolu (na výrobu 1l 70% etanolu je potřeba 730 ml 96% etanolu a 270 ml destilované vody).

0,05% uhličitan lithný – ve 100 ml destilované vody rozpustíme 0,05 g uhličitanu lithného.

Jádrová červen – ve 100 ml destilované vody nad kahanem za stálého míchání rozpustíme 10 g síranu hlinitého a 0,1 g jádrové červeně. Vše po vychladnutí přefiltrujeme, aby roztok neobsahoval hrudky.

4.6 Odvodnění, projasnění a montování

Všechny barvicí roztoky jsou roztoky vodné, proto je důležité preparáty dokonale odvodnit pomocí alkoholů.

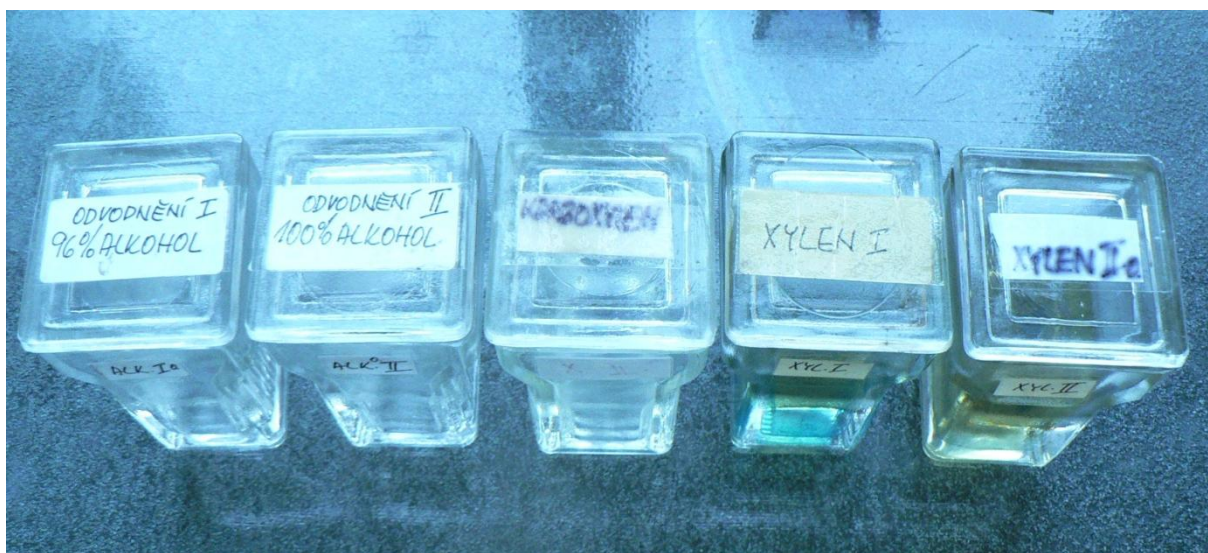
Preparáty přendáme do kyvety obsahující 96% roztok etanolu. Preparáty jen smočíme a rychle přendáme do lázně s 100% etanolem, odkud je rychle přendáme do

lázně obsahující karbol-xylen, kde je necháme 5 minut. Na dalších 5 minut přendáme sklíčka s preparáty do kyvety s xylenem. Sklíčka lehce osušíme hadříkem a po té přendáme do druhé lázně xylenu na dobu 5 minut.

Odvodněné a projasněné preparáty otřeme suchým hadříkem. Na krycí sklíčko položené na stole kápneme malé množství montovacího media DePex. Přiložíme sklíčko s preparátem tak, aby celý preparát ležel pod krycím sklíčkem, a pomocí laboratorní jehly vytěsníme všechny vzduchové bubliny. Zkontrolujeme preparáty pod mikroskopem, zda se nevyskytují mikroskopické vzduchové bubliny, které taky vytěsníme. Po odstranění všech bublinek necháme montovací médium pořádně zaschnout v termostatu při 37 °C do druhého dne. Vysušené a hotové preparáty očistíme žiletkou (přebytečné montovací medium) a vyleštíme kapkou ironu a jemného hadříku, co nepouští chloupky.

96% etanol.....	smočit a ihned vyndat
100% etanol.....	smočit a ihned vyndat
Karbo-xylen.....	5 minut
Xylen I.....	5 minut
Xylen II.....	5 minut
DePex	kapka, přiložit krycí sklíčko

U Nisslovy metody není lázeň karbo-xylenu a místo lázní etanolu jsme použili dvě lázně acetonu. Všechny časy a postup je stejný.



Obrázek 14 - Odvodnění a projasnění obarveného řezu, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie); zleva: 96% etanol, 100% etanol, karbo-xylen, Xylen I, Xylen II.

Příprava roztoků

100% etanol (viz 4.2.1 Odvodnění)

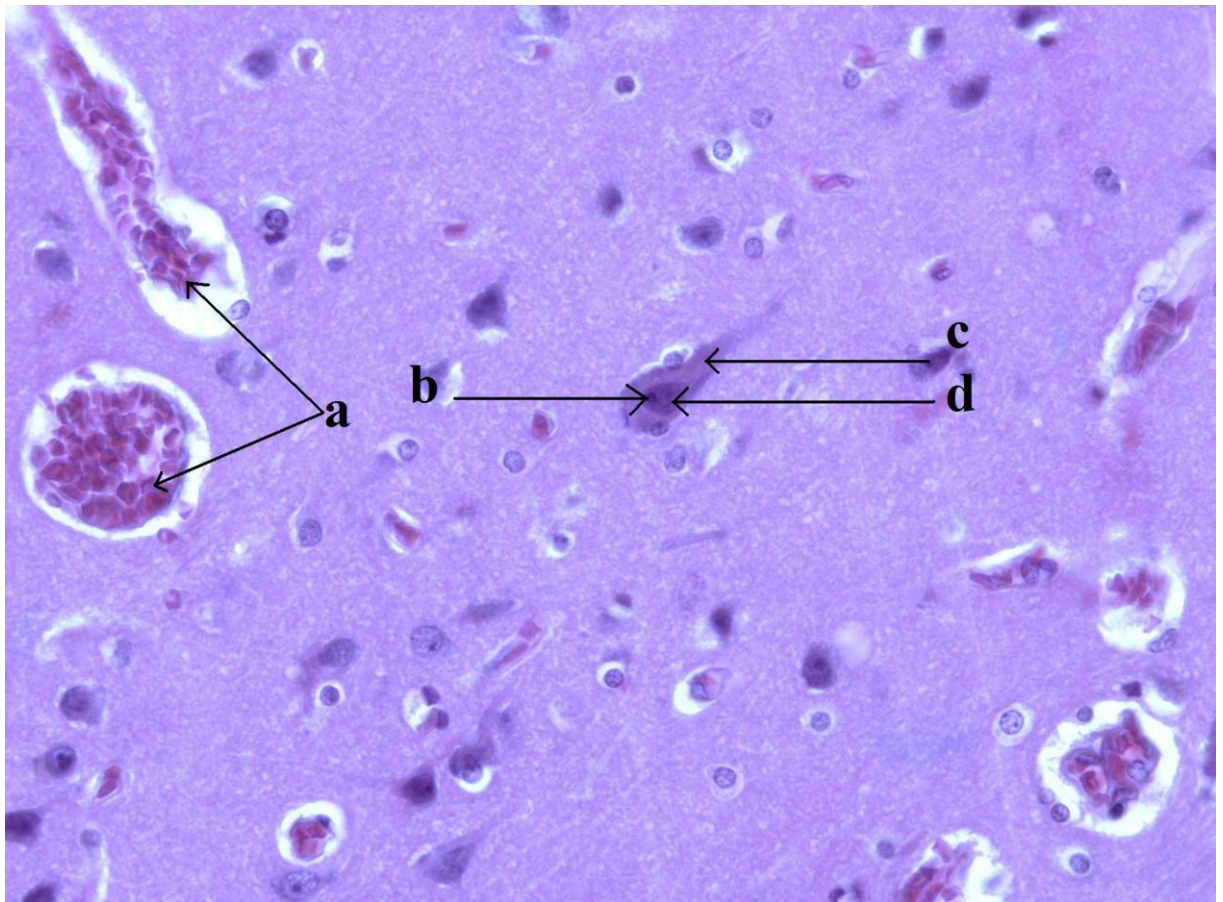
karbol-xylen - je připraven z 3 dílů xylenu a 1 dílu fenolu (na přípravu 400ml roztoku karboxylenu smícháme 300 ml xylenu a 100 ml fenolu).

4.7 Pozorování histologického preparátu v mikroskopu

Očištěné a vyleštěné preparáty vložíme do mikroskopu a při zvětšení 40x fotíme mikroskopický obraz pomocí kamery Leica DMLB DC 300 a počítačového programu Imagine Manager 500, který nám umožňuje nastavit si kontrast a jas získaného obrazu v mikroskopu.

5 Výsledky

5.1 Kůra koncového mozku (Hematoxylin-eosin)



Obrázek 15 - Preparát kůry koncového mozku (Hematoxylin-eosin). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

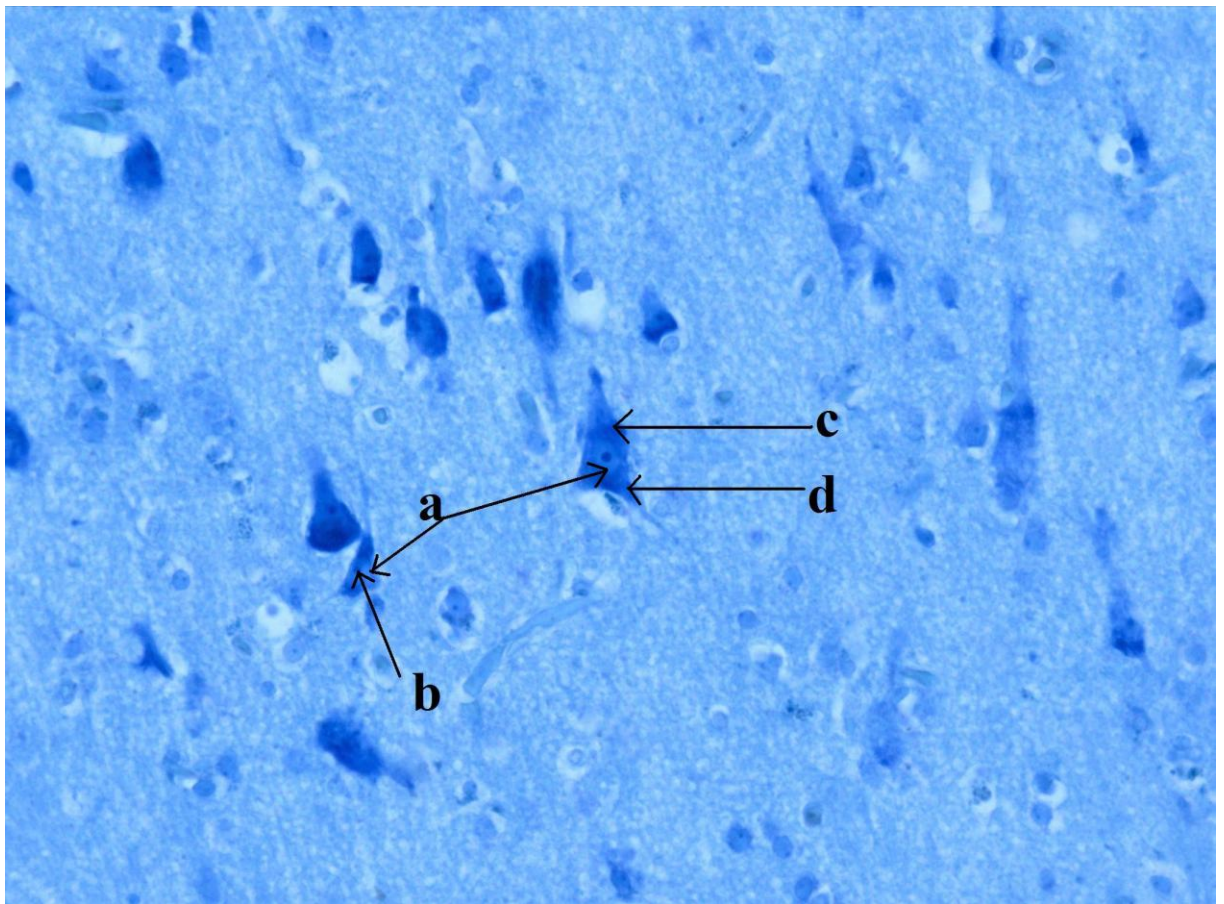
a – venulky

b – jádérko

c – Betzova pyramidová nervová buňka

d – jádro nervové buňky

5.2 Kůra koncového mozku (Nisslova metoda)



Obrázek 16 - Preparát kůry koncového mozku (Nisslova metoda). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

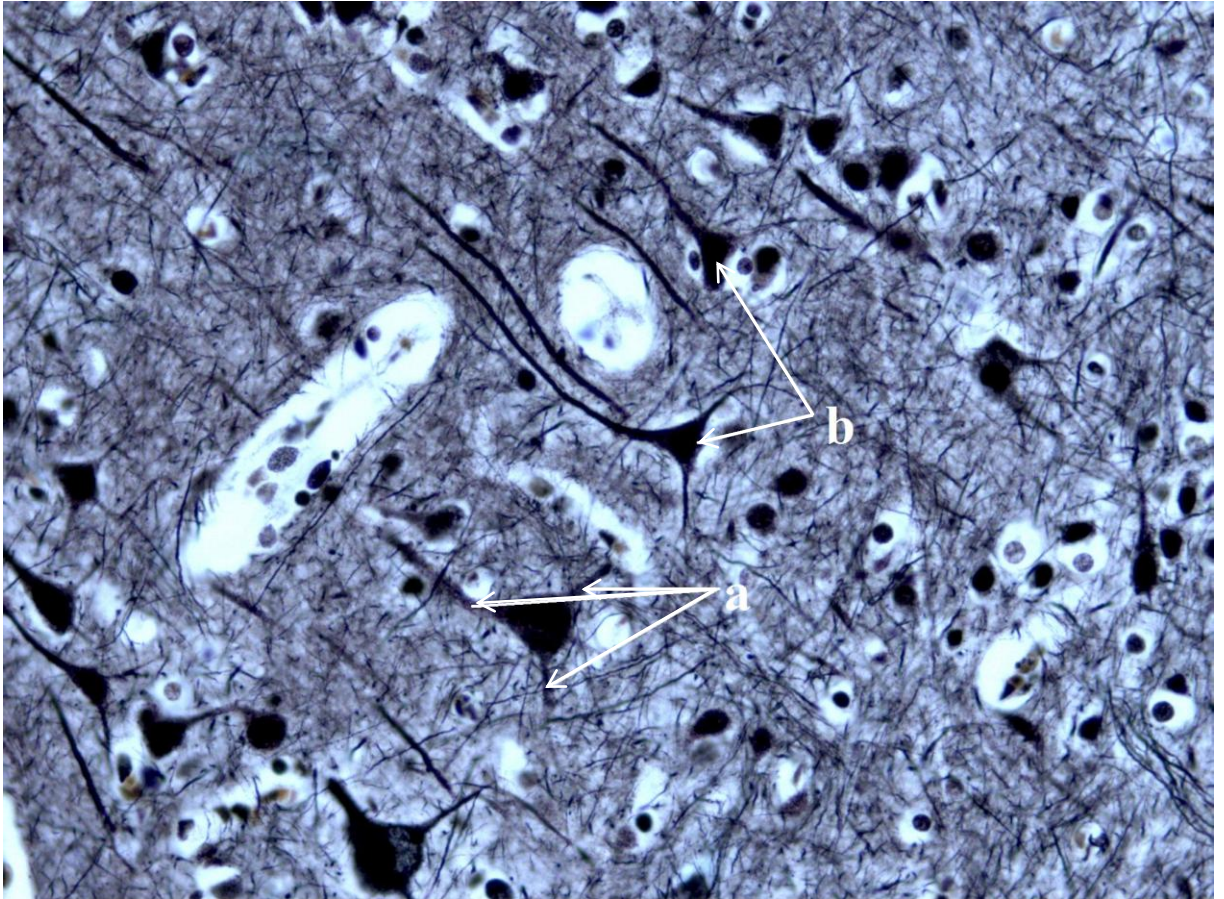
a – jádra nervových buněk

b – jádérko

c – Pyramidová nervová buňka

d – odstupující dendrit Pyramidové nervové buňky

5.3 Kůra koncového mozku (Bielschowského impregnace)

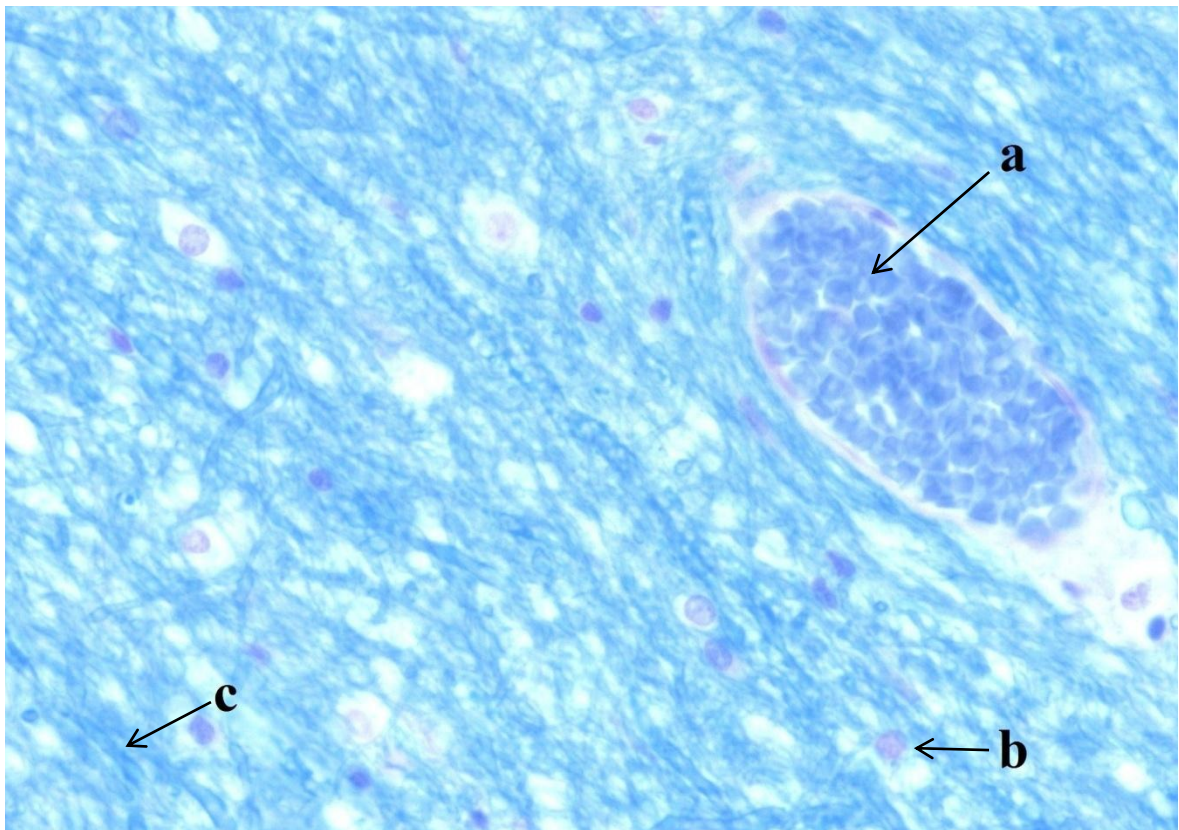


Obrázek 17 - Preparát kůry koncového mozku (Bielschowského impregnace). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

a – odstupující dendrity Pyramidových neuronů

b – Pyramidové neurony

5.4 Koncový mozek (barvení luxolovou modří)



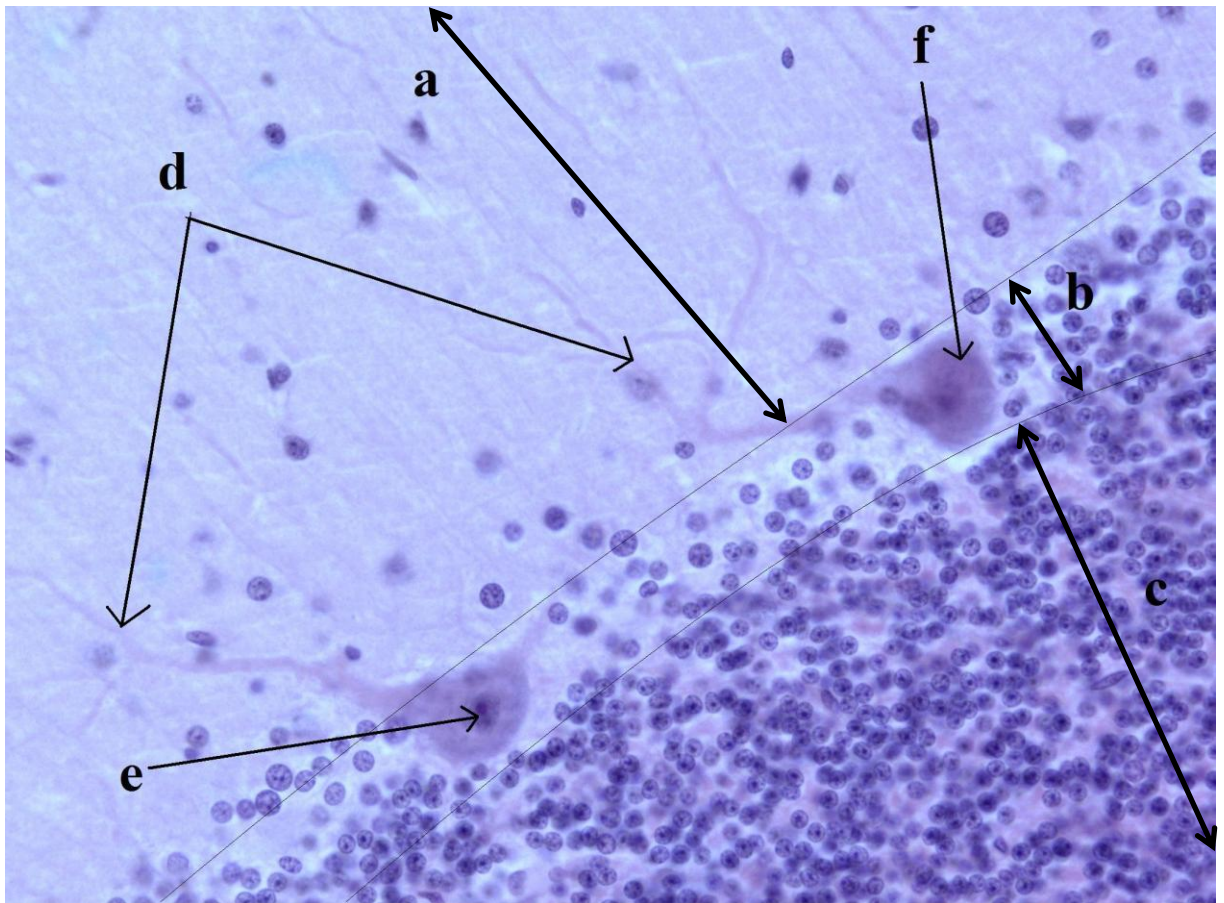
Obrázek 18 - Preparát koncového mozku (Barvení luxolovou modří). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

a – venulka s erytrocyty

b – jádro gliové buňky

c – axon obalený myelinovou pochvou

5.5 Mozeček (Hematoxylin-eosin)



Obrázek 19 - Preparát mozečku (Hematoxylin-eosin). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

a – Molekulární vrstva (Stratum moleculare)

b – Vrstva těl Purkyňových buněk (Stratum neuronorum piriformium)

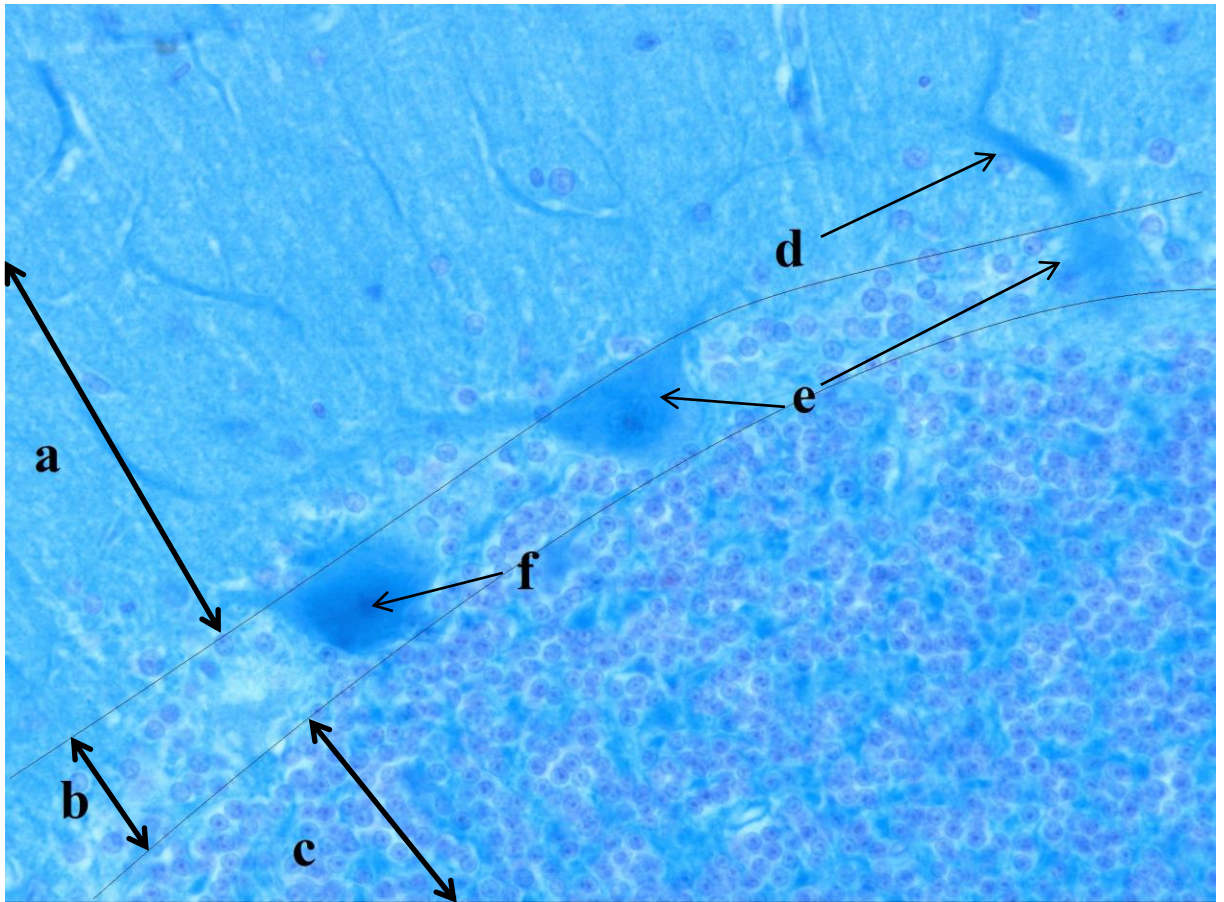
c – Granulární vrstva (Stratum granulosum)

d – větvičí se dendrity Purkyňových buněk

e – jádro s jadérkem

f – Purkyňova buňka

5.6 Mozeček (Nisslova metoda)



Obrázek 20 - Preparát mozečku (Nisslova metoda). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

a – Molekulární vrstva (Stratum moleculare)

b – Vrstva těl Purkyňových buněk (Stratum neuronorum piriformium)

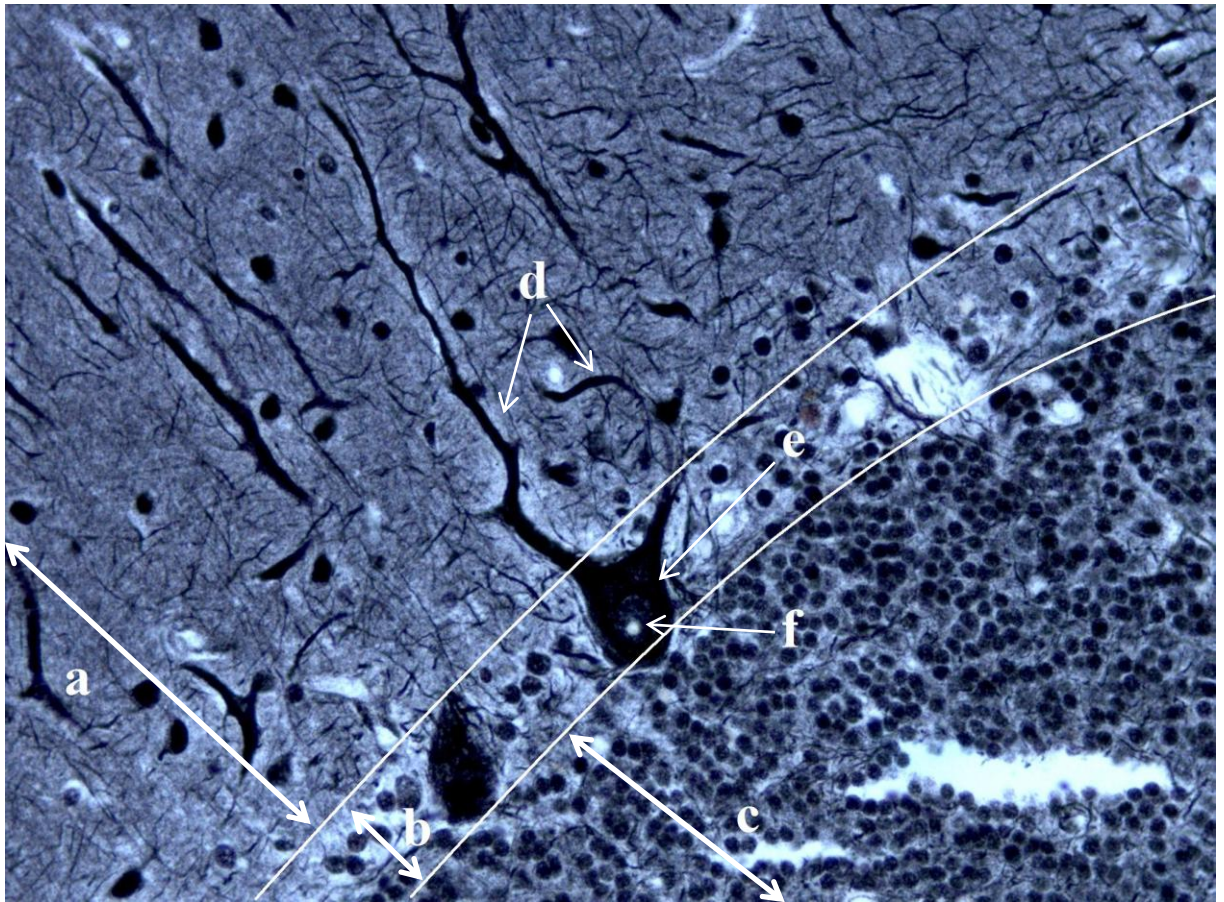
c – Granulární vrstva (Stratum granulosum)

d – větvící se dendrit Purkyňovy buňky

e – Purkyňovy buňky

f – jádro s jadérkem

5.7 Mozeček (Bielschowského impregnace)



Obrázek 21 - Preparát mozečku (Bielschowského impregnace). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

a – Molekulární vrstva (Stratum moleculare)

b – Vrstva těl Purkyňových buněk (Stratum neuronorum piriformium)

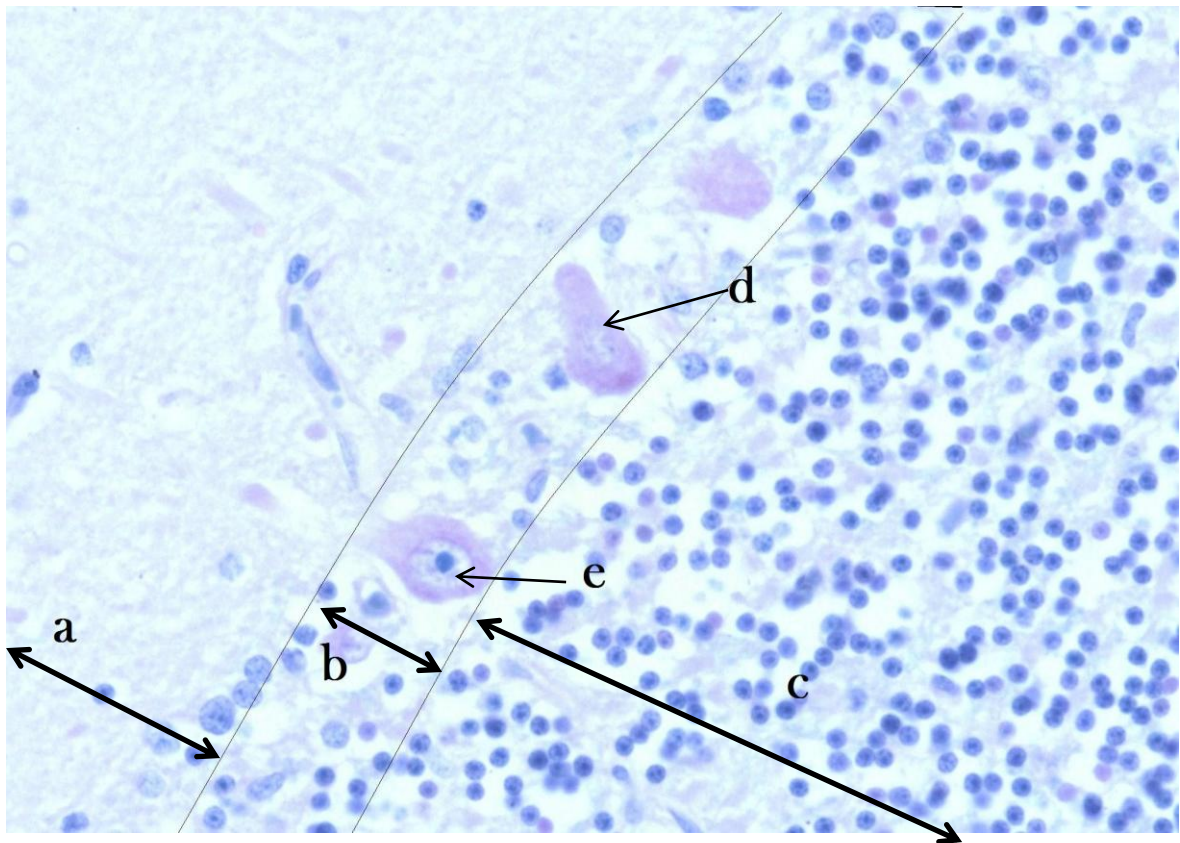
c – Granulární vrstva (Stratum granulosum)

d – větvící se dendrity Purkyňovy buňky

e – Purkyňova buňka

f – jádro s jadérkem

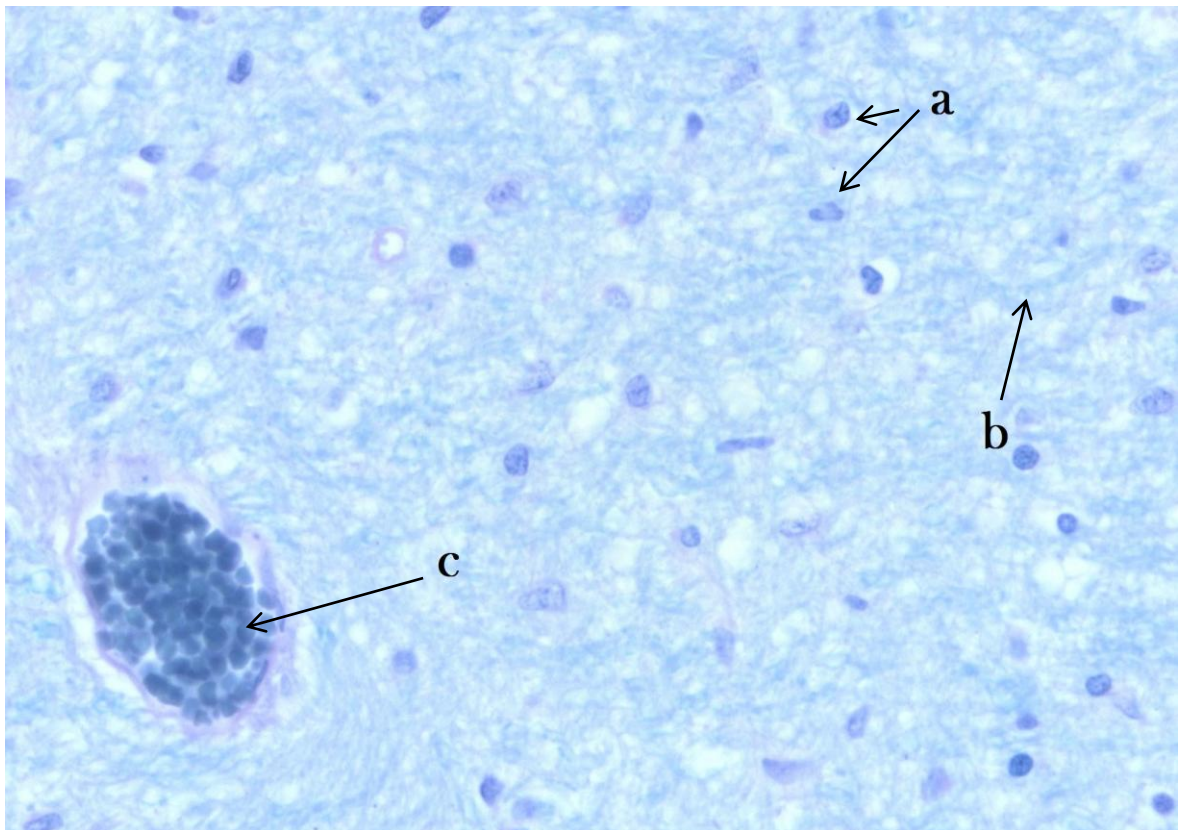
5.8 Mozeček (Barvení luxolovou modří)



Obrázek 22 - Preparát mozečku (Barvení luxolovou modří). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

- a – Molekulární vrstva (Stratum moleculare)
- b – Vrstva těl Purkyňových buněk (Stratum neuronorum piriformium)
- c – Granulární vrstva (Stratum granulosum)
- d – Purkyňova buňka
- e – jádro s jadérkem Purkyňovy buňky

5.9 Mozeček (Barvení luxolovou modří)



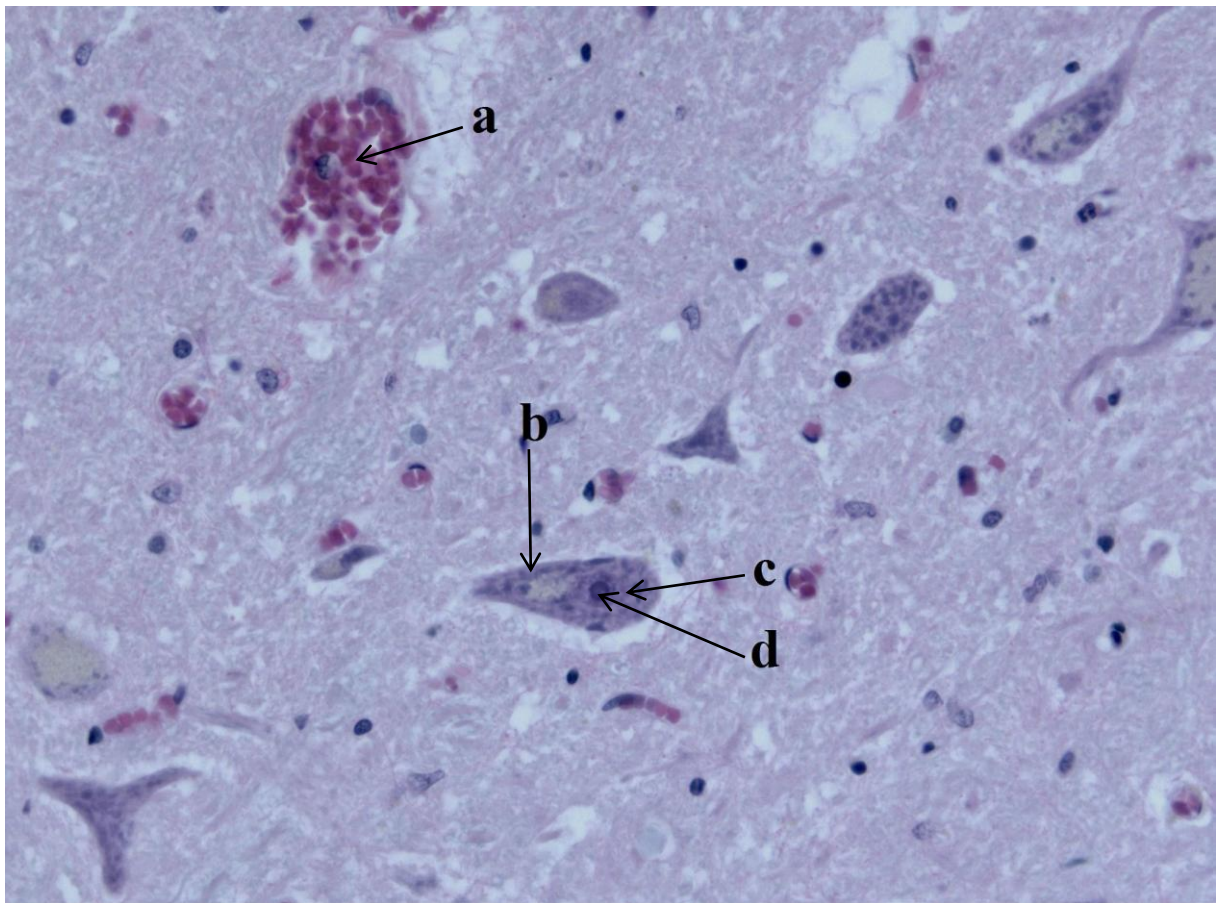
Obrázek 23 - Preparát mozečku (Barvení luxolovou modří). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

a – jádra gliových buněk

b – axon obalený myelinovou pochvou

c – venulka s erytrocyty

5.10 Hřbetní mícha (Hematoxylin-eosin)



Obrázek 24 - Preparát hřbetní míchy (Hematoxylin-eosin). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

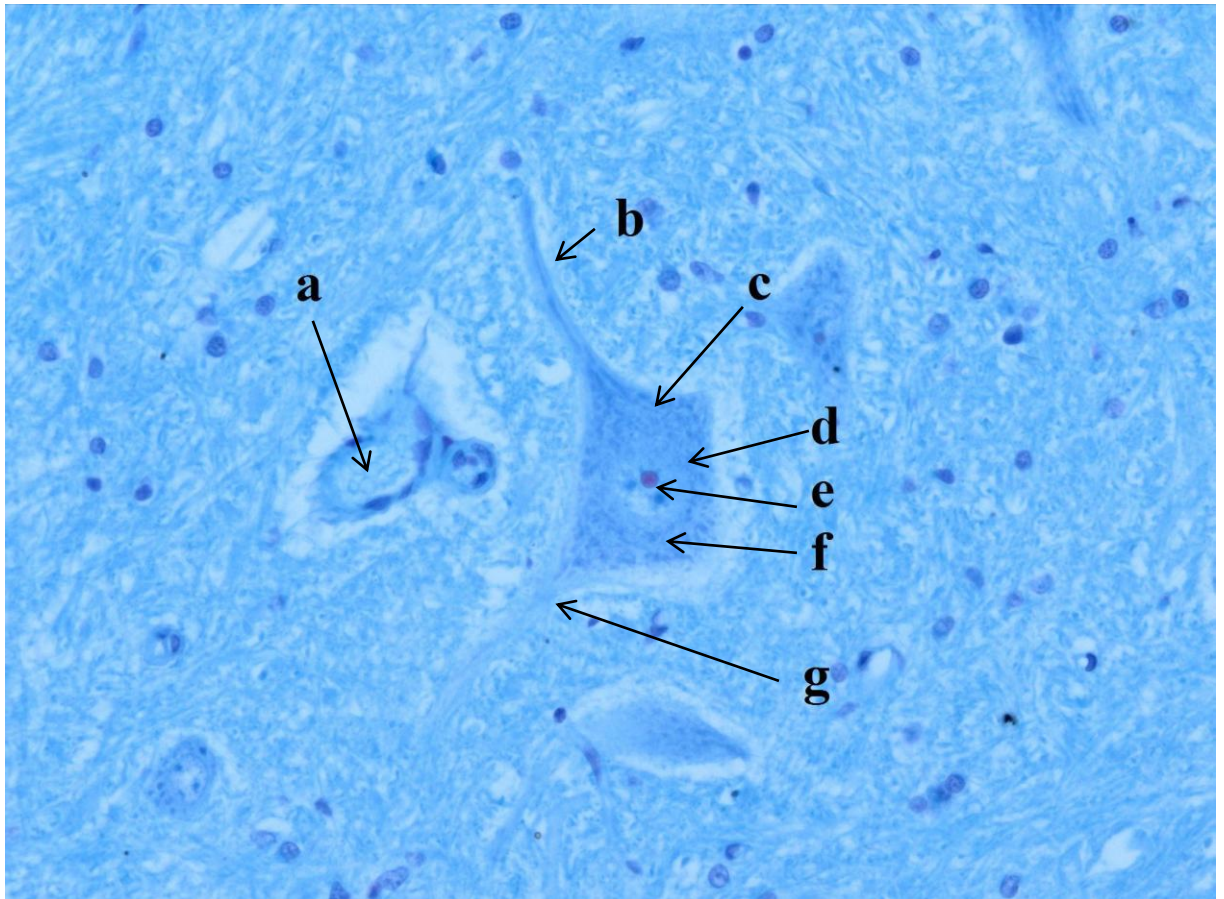
a – venula s erytrocyty

b – α -motoneuron

c – jádro α -motoneuronu

d – jadérko

5.11 Hřbetní mícha (Nisslova metoda)



Obrázek 25 - Preparát hřbetní míchy (Nisslova metoda). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

a – venula s erytrocyty

b – odstupující dendrit

c – α -motoneuron

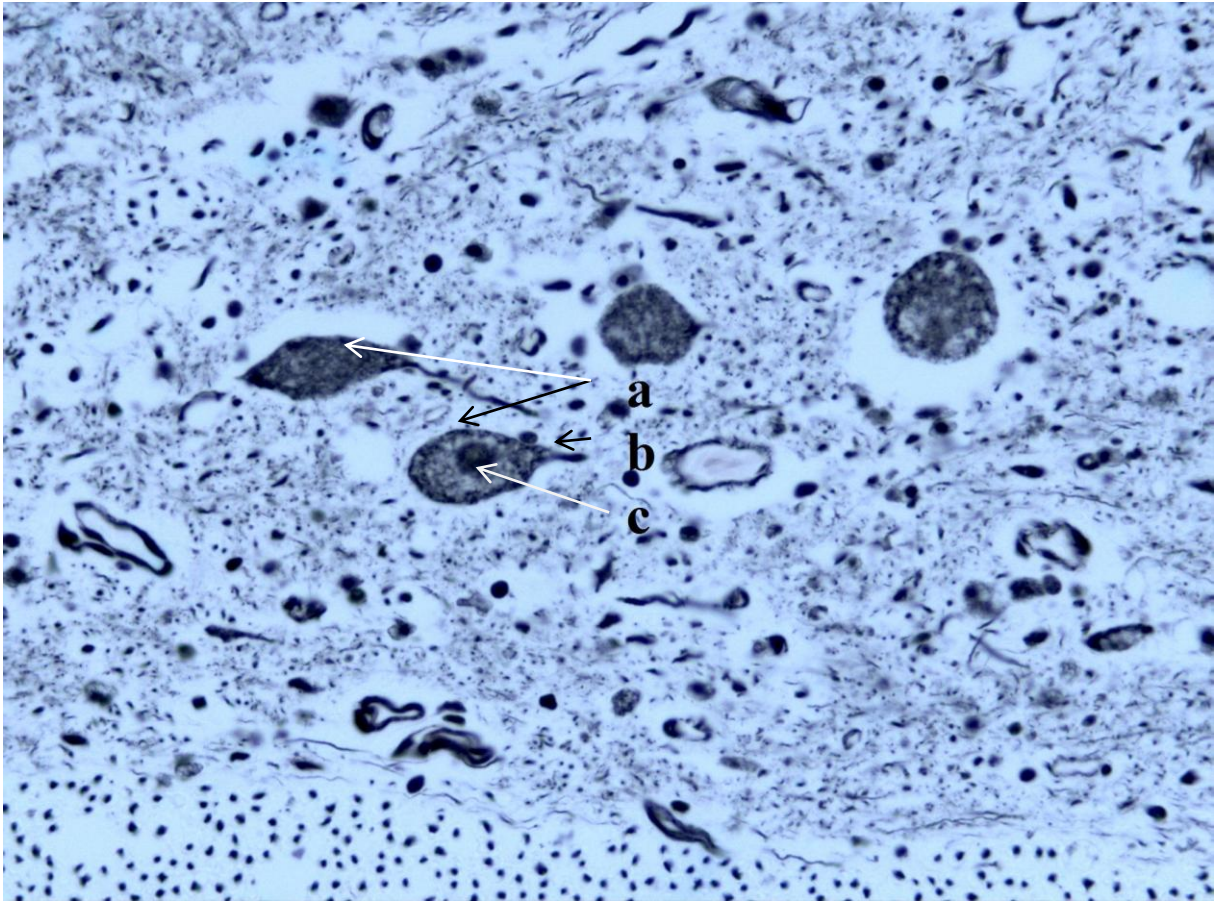
d – jádro α -motoneuronu

e – jádérko

f – Nisslova substance

g - axon

5.12 Hřbetní mícha (Bielschowského impregnace)



Obrázek 26 - Preparát hřbetní míchy (Bielschowského impregnace). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).

a – α -motoneurony

b – dendrit α -motoneuronu

c – jádro α -motoneuronu

6 Diskuse

Základní a nejčastěji používanou metodou v histologii je hematoxylin-eosin. Pomocí této metody lze znázornit jádra a cytoplazmu jednotlivých buněk.

U koncového mozku lze rozlišit buněčná těla s jádry pyramidových neuronů, který mají svůj typický tvar, ale už nelze rozlišit malá těla s jádry, zda patří gliovým buňkám, či menším neuronům. V mikroskopickém obrazu touto metodou rozlišíme šedou hmotu (kůru mozku), která obsahuje pyramidové neurony, od bílé hmoty, kde se pyramidové nervové buňky nevyskytují a celkový počet jader je malý, ale nelze určit přesnější hranici mezi bílou a šedou hmotou.

Oproti tomu u mozečku, pomocí barvení hematoxylinem-eosinem rozlišíme bílou hmotu od šedé hmoty a navíc lze rozlišit i jednotlivé tři vrstvy mozečkové kůry. Na povrchu se nachází molekulární vrstva, která obsahuje malé množství buněk, tedy malé množství jader. Další vrstva, vrstva těl Purkyňových buněk, obsahuje typické Purkyňovy buňky. Pod touto vrstvou se nachází granulární vrstva charakteristická velkým počtem malých multipolárních neuronů, tedy velkým počtem jader. Bílá hmota leží pod granulární vrstvou, kde se vyskytují gliové buňky. Zde je vidět pár jader.

U míchy je naopak větší hustota jader uprostřed preparátu, neboť nervové buňky se převážně vyskytují v šedé hmotě, které leží uvnitř míchy. Nelze rozlišit jednotlivé typy neuronů, výjimečně lze rozpoznat α -motoneurony, které mají charakteristickou velikost. Není zde patrně vidět tvar šedé hmoty do písmene „H“.

Tato metoda je používána ve všech akreditovaných laboratořích v České republice a je považována za základní histologickou barvicí metodu. Užití dalších speciálních metod záleží na šikovnosti a zkušenosti odčítajícího patologa (histologa), neboť zkušený patolog (histolog) vyčte z mikroskopického obrazu tkáně obarvené hematoxylin-eosinem mnohem více než běžný laik na základě znalostí získaných z literatury.

Podobnou metodou, která znázorňuje také především těla buněk, je Nisslova metoda. Tato metoda barví tzv. Nisslovu substanci, která se nachází nejenom v tělech nervových buněk, ale také v odstupech dendritů. Výsledkem barvení je tedy tmavě modře obarvená Nisslova substance v těle nervové buňky a odstupech dendritů. Na základě tohoto faktu lze rozlišit nervové buňky od ostatních buněk vyskytující se v nervové tkáni, neboť ostatní buňky nemají dendrity. Námi vytvořené preparáty byly nejdříve obarveny pomocí toluidinové modře.

Než jsme stačili pořídit fotografie mikroskopického obrazu našich histologických preparátů, došlo k jejich vyblednutí. Proto další barvení Nisslovou metodou bylo pomocí thioinu. Fotografie mikroskopických obrazů jednotlivých řezů byly provedeny téměř ihned po dokončení výroby histologického preparátu. Dnes lze na sklíčkách preparátů pozorovat opětovně vyblednutí tkáně.

Pomocí Nisslovy metody a znázornění Nisslovy substance je možné rozlišit jednotlivé vrstvy isocortexu mozkové kůry. Nejvíce viditelná je V. vrstva (Vnitřní

pyramidová vrstva), kde se vyskytují velké pyramidové nervové buňky (Betzovy neurony). Na obrázku (Obrázek 16 - Preparát kůry koncového mozku (Nisslova metoda). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).) lze pouze pozorovat V. vrstvu isocortexu, neboť zvětšení histologického preparátu je příliš velké na pozorování jednotlivých vrstev. V mikroskopickém obrazu je možno pozorovat bílou hmotu, která se nachází pod jednotlivými vrstvami isocortexu.

U tkáně mozečku, lze opět pozorovat jednotlivé tři vrstvy kůry mozečku. Nejlépe pozorovatelnou vrstvou je Vrstva těl Purkyňových buněk, charakteristická velkými Purkyňovými buňkami s typickým odstupem dvou dendritů. Pod Granulární vrstvou se nachází bílá hmota, která je v mikroskopickém obrazu také patrná.

V mikroskopickém obrazu preparátu hřbetní míchy pozorujeme α -motoneurony, které se nacházejí v šedé hmotě míšni. Lze také rozlišit axon od dendritu u již zmiňovaných α -motoneuronu, ve kterém se vyskytuje obarvená Nisslova substance. Při menším zvětšení je vidět typický tvar šedé hmoty do tvaru písmene „H“.

Nisslova metoda neposkytuje oproti barvení hematoxylin-eosinem podrobnější obraz histologického preparátu. Dnes se již v laboratořích histologie nepoužívá. Použití této metody v klinické oblasti je jen výjimečné. Slouží především ke studijním a vzdělávacím účelům převážně budoucích lékařů.

Ze všech našich použitých barvicích metod nejlépe znázorňující neurony včetně jejich výběžků je Bielschowského metoda.

U preparátu koncového mozku rozlišíme při menším zvětšení šedou hmotu od bílé hmoty. U šedé hmoty, tedy u kůry koncového mozku, je možné rozlišit i pět jednotlivých vrstev isocortexu, podle vyskytujících se neuronů charakteristických jejich velikostí a počtem výběžků. Neurony jsou viditelně odlišné od gliových buněk, které nemají dendrity a axon. Na obrázku (Obrázek 17 – Preparát kůry koncového mozku) jsou vidět pyramidové Betzovy neurony vyskytující se převážně v III. vrstvě (Zevní pyramidová vrstva), jejichž axony prostupují až do I. vrstvy (Molekulární vrstva).

U mozečku (Obrázek 21 - Preparát mozečku (Bielschowského impregnace). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).) pozorujeme větvení Purkyňových buněk nacházející se ve Vrstvě těl Purkyňových buněk v kůře mozečku. Rozlišitelné jsou i další dvě vrstvy kůry mozečku (Molekulární vrstva a Granulární vrstva) a bílá hmota mozečku.

V mikroskopickém obrazu preparátu míchy (Obrázek 26 - Preparát hřbetní míchy (Bielschowského impregnace). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).) můžeme rozlišit bílou hmotu od šedé hmoty, které leží ve středu tkáně a má typický tvar písmene „H“. V šedé hmotě jsou patrné α -motoneurony a další nervové buňky, včetně jejich dendritů a axonů.

Tento typ stříbření se v klinických laboratořích do dnes stále používá. Sice nejde o běžnou barvicí metodu, která by byla na denním pořádku, ale pořád má své uplatnění v medicíně. Tato metoda je prováděna pouze ve větších laboratořích specializovaných se na onemocnění nervové soustavy.

Pro průkaz myelinových pochev v parafinových řezech se nejčastěji používá barvení luxolovou modří MBS. Jelikož jsme řezy nebarvily další barvicí metodou na průkaz myelinové pochvy, tedy nemáme mikroskopické obrazy míchy s čím porovnat, byla tato metoda barvení luxolovou modří MBS provedena pouze na preparátech koncového mozku s kůrou a mozečku.

Modře zbarvená místa v mikroskopickém obrazu mozku (Obrázek 18 - Preparát koncového mozku (**Barvení luxolovou modří**). **Zvětšeno 40×**. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie). znázorňují výskyt myelinových pochev. Nejvíce patrná je tedy bílá hmota, kde se vyskytuje nejvíce axonů obalených myelinovou pochvou. Fialově červená jsou zbarvená jádra všech buněk, které jsme dobarvili jádrovou červení.

V mikroskopickém obrazu tkáně mozečku (Obrázek 22 - Preparát mozečku (**Barvení luxolovou modří**). **Zvětšeno 40×**. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).) jsou opět vidět charakteristické Purkyňovy buňky, jež mají červenofialové zbarvení a jejich těla se vyskytují mezi Molekulární vrstvou a Granulární vrstvou v šedé hmotě mozečku. Modře zbarvená místa opět odpovídají výskytu myelinových pochev, které se hojně vyskytují v bílé hmotě mozečku.

Ze všech speciálních barvicích metod pro centrální nervovou soustavu se barvení luxolovou modří používá nejčastěji.

V histologických ústavech specializovaných na barvení tkání centrální nervové soustavy se používá specializovaná metoda NOR. Pomocí této metody se prokazují priony Creutzfeldt-Jakobovy nemoci. Jednotlivé řezy tkáně se barví pomocí vodného roztoku dusičnanu stříbrného a roztoku želatiny v 1% kyselině mravenčí. Vše v poměru 2 : 1 (Laboratorní příručka nemocnice A, 2016).

7 Závěr

Cílem mé bakalářské práce s názvem „Centrální nervová soustava a neurohistologické barvicí metody“ bylo seznámit se s jednotlivými buňkami nervové tkáně a strukturou jednotlivých orgánů centrální nervové soustavy, jež jsou tvořeny právě zmiňovanou nervovou tkání. Jako zajímavost je v rámci teoretické části popsána stručná historie námi vybraných barvicích metod: hematoxylin-eosin, Nisslova metoda, Bielschowského metoda, barvení luxolovou modří.

Cílem praktické části bylo vytvořit vlastní histologické preparáty a porovnat jejich mikroskopické obrazy. V průběhu psaní bakalářské práce jsem navštívila pět histologických ústavů patřících k nemocnicím, abych zjistila a porovнала metody barvicí tkáně centrální nervové soustavy, které se ještě používají v klinické laboratoři ke klinickým účelům. K těmto účelům se stále využívá metoda barvení luxolovou modří MBS, občas je využívána Bielschowského metoda a Nisslova metoda se již vůbec dnes nevyužívá. Na použití jednotlivých metod záleží na velikosti histologické laboratoře a její specializaci. Navštíveny byly tři nemocnice v Praze, jedna ve středočeském kraji a poslední v plzeňském kraji.

Osobně zhotovené preparáty budou sloužit ke studijním účelům studentům 1. LF UK v Praze. Doufám, že ke studijním účelům bude sloužit i teoretická část, v které jsem stručně popsala celou nervovou tkáň včetně oddílů centrální nervové soustavy.

Vznik mé bakalářské práce dal impulz ke zlepšení Nisslovy barvicí metody, neboť jak se stalo nám, preparáty po delší době „vyblednou“. Nyní se provádí pokusné obměny této techniky v Histologickém a embryologickém ústavu 1. LF UK v Praze.

8 Seznam použitých zkratek

%	procenta
°C	stupeň Celsia (jednotka teploty)
1. LF UK	1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
ABS	Akrylobutadien-styren kopolymer
cm	centimetr [10^{-3} m] (jednotka délky)
CNS	centrální nervová soustava
g	gram (jednotka hmotnosti) – základní jednotka soustavy SI
h	hodina [3 600 s] (jednotka času)
l	litr (jednotka objemu) – základní jednotka soustavy SI
m	metr (jednotka délky) – základní jednotka soustavy SI
MBS	myelin blue solution
ml	mililitr [10^{-3} l] (jednotka objemu)
mm	milimetr [10^{-6} m] (jednotka délky)
mol·l ⁻¹	moly na litr (jednotka látkového množství)
nm	nanometr [10^{-9} m] (jednotka délky)
s	sekunda (jednotka času) – základní jednotka soustavy SI
α	alfa
β	beta
μm	mikrometr [10^{-6} m] (jednotka délky)

Pozn.: V seznamu nejsou uvedeny symboly a zkratky všeobecně známé nebo používané jen ojediněle s vysvětlením v textu.

9 Seznam použité literatury

Literární zdroje

1. ASHWAL, Stephen. 1990. The Founders of child neurology [online]. San Francisco: Norman Pub. in association with the Child Neurology Society [cit. 2016-04-14]. ISBN 0930405269. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=eDvHZWRo9_0C&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false
2. BANCROFT, John D a Alan STEVENS. 1977. Theory and practice of histological techniques. New York: distributed in the U.S. of America by Longman. ISBN 9780443015342.
3. BANCROFT, John D. a Marilyn GAMBLE. 2008. Theory and practice of histological techniques. 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. ISBN 978-0-443-10279-0.
4. ČECH, Svatopluk a Drahomír HORKÝ. 2011. Histologie a mikroskopická anatomie pro bakaláře. 2., přeprac. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 9788021055445.
5. ČIHÁK, Radomír. 2004. Anatomie. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 802471132x.
6. GILLISPIE, Charles Coulston, Frederic Lawrence HOLMES a Noretta KOERTGE. 2008. Complete dictionary of scientific biography [online]. 2008. Detroit, Mich: Charles Scribner's Sons [cit. 2016-04-14]. ISBN 9780684315591. Dostupné z: <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-2830903181.html>
7. HORKÝ, Drahomír a Svatopluk ČECH. 2007. Základy histologické techniky pro zdravotní laboranty. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 9788021044678.
8. HORVÁTH, Alex. 1988. Práca s bioptickým materiálom. 1. vyd. Martin: Osveta. Edícia pre stredných zdravotníckych pracovníkov.
9. JIRKOVSKÁ, Marie. c2006. Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky. 1. vyd. Praha: Galén. Základy (Galén). ISBN 80-726-2263-3.
10. JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O KELLEY. 1997. Základy histologie. Vyd. v ČR 1. Jinočany: H. ISBN 8085787377.
11. LICHNOVSKÝ, Václav. 2002. Základy histologie pro bakaláře. 2. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého. ISBN 8024404397.
12. LÜLLMANN-RAUCH, Renate. 2012. Histologie. 1. české vyd. Praha: Grada. ISBN 9788024737294.

13. MESCHER, Anthony L. 2013. Junqueira's basic histology: text and atlas. Thirteenth edition. New York [etc.]: McGraw-Hill Medical. ISBN 978-007-1780-339.
14. MOKRÝ, Jaroslav. 2011. Handbook of practical classes in histology and embryology. 2nd ed. Hradec Králové: Libor Dvořák. ISBN 9788026006305.
15. PAULSEN, Douglas F. 2004. Histologie a buněčná biologie. Vyd. 1. Jinočany: H & H Vyšehradská. ISBN 8073190249.
16. ROSS, Michael H. a Wojciech PAWLINA. 2006. Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams. ISBN 07-817-6790-3.
17. SLÍPKA, Jaroslav. 2014. Základy histologie. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 9788024628097.
18. SNELL, Richard S. 1984. Clinical and functional histology for medical students. 1st ed. Brown: Boston : Little. ISBN 0316802166. Dostupné také z: <https://sisu.ut.ee/histology/cerebellum>
19. VACEK, Zdeněk. 1995. Histologie a histologická technika. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 978-807-0132-029.
20. VACEK, Zdeněk. 1995. Histologie a histologická technika. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-701-3201-9.
21. VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ. 2010. Lékařská histologie I. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 9788024618609.
22. WHITEHOUSE, Peter J, Konrad MAURER a Jesse F BALLENGER. c2000. Concepts of Alzheimer disease: biological, clinical, and cultural perspectives. Baltimore: Johns Hopkins University Press. ISBN 0-8018-6233-7.

Internetové zdroje

23. SNODGRESS, Ann B., Charles H. DORSEY a Leonard B. LACEY. 1961. Luxol fast blue staining of degenerating myelinated fibers. The Anatomical Record [online]. 140(2), 83-90 [cit. 2016-04-04]. DOI: 10.1002/ar.1091400203. ISSN 0003276x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1091400203>
24. STAHNISCH, F. W. 2015. Max Bielschowsky (1869–1940). Journal of Neurology [online]. 262(3), 792-794 [cit. 2016-02-28]. DOI: 10.1007/s00415-014-7544-z. ISSN 03405354. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00415-014-7544-z>
25. GASKINS, Jr Patrick. 2012. ASUHAN KEPERAWATAN PADA Tn. S DENGAN GANGGUAN SISTEM MUSKULOSKELETAL: FRAKTUR LUMBAL DI RUANG BEDAH UMUM PRIA (C) RUMAH SAKIT UMUM DAERAH Dr. SOEDARSO PONTIANAK [online]. In: . [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <http://jrpatrickgaskins.blogspot.cz/>

26. WADE, Nicholas, Marco PICCOLINO a Adrian SIMMONS. 2012. Franz Nissl. In: Portraits of European Neuroscientists [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://neuroportraits.eu/portrait/franz-nissl>
27. ENERSEN, Ole Daniel. 2016. Franz Nissl. In: Whonamedit: A dictionary of medical eponyms [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://www.whonamedit.com/doctor.cfm/2465.html>
28. WILSON, Martin a Paul SMITH. 2014. H and E Part One: History, Background and Solutions. In: Agar scientific [online]. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://www.agarscientific.net/h-and-e-part-one-history-background-and-solutions/>
29. GLEES, Paul. 2008. NISSL, FRANZ. In: Encyclopedia.com [online]. <http://www.encyclopedia.com/>: Oxford University Press, Columbia Encyclopedia [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-2830903181.html>
30. MINISTERSTVO PRÁCE A SOCIÁLNÍCH VĚCÍ. 2010. Počet lidí s demencí roste. Pomůže Plán Alzheimer. In: Ministerstvo práce a sociálních věcí [online]. Praha [cit. 2016-03-30]. Dostupné z: <http://www.mpsv.cz/cs/10044>
31. PHILLIPS, Devin K. 2014. Speed of the Human Brain. In: ASU: School of Life Sciences [online]. Tempe: Arizona State University [cit. 2016-04-12]. Dostupné z: <https://askabiologist.asu.edu/plosable/speed-human-brain>
32. KIERNAN, John A. 2010. Staining Sections of the Central Nervous System. In: Dako: Agilent Pathology Solutions [online]. Glostrup: Dako [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: http://www.dako.com/dist/28829_2010_conn14_staining_sections_central_nervous_system_kiernan.pdf

10 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Základní části neuronu. Vlastní překlad, (Phillips, 2014).	11
Obrázek 2 - Struktura těla neuronu. Vlastní překlad, (Barinov, 2011, str. 94).....	12
Obrázek 3 - Klasifikace neuronů podle počtu výběžků, (Barinov, 2011, str. 95).	15
Obrázek 4 - Plazmatický astrocyt. Upraveno, (Čechovič, 2010).....	18
Obrázek 5 - Fibrilární astrocyt. Upraveno, (Čechovič, 2010).	18
Obrázek 6 - Oligodendrocyty. Upraveno, (Čechovič, 2010).....	19
Obrázek 7 - Mikroglie. Upraveno, (Čechovič, 2010).	20
Obrázek 8 - Vrstvy isocortexu, (Lullmann-Rauch, 2012, str. 170).	22
Obrázek 9 - Vrstvy mozečku. Vlastní překlad, (Snell, 1984).....	24
Obrázek 10 - Hřbetní mícha. Vlastní překlad, (Gaskins, 2012).	25
Obrázek 11 – Deparafinace, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	36
Obrázek 12 - Barvení hematoxylin-eosinem včetně deparafinace, odvodnění a projasnění, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	38
Obrázek 13 - Barvení podle Bielschowkého, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	41
Obrázek 14 - Odvodnění a projasnění obarveného řezu, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).....	43
Obrázek 15 - Preparát kůry koncového mozku (Hematoxylin-eosin). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	45
Obrázek 16 - Preparát kůry koncového mozku (Nisslova metoda). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	46
Obrázek 17 - Preparát kůry koncového mozku (Bielschowského impregnace). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	47
Obrázek 18 - Preparát koncového mozku (Barvení luxolovou modří). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	48
Obrázek 19 - Preparát mozečku (Hematoxylin-eosin). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	49
Obrázek 20 - Preparát mozečku (Nisslova metoda). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	50
Obrázek 21 - Preparát mozečku (Bielschowského impregnace). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	51
Obrázek 22 - Preparát mozečku (Barvení luxolovou modří). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	52
Obrázek 23 - Preparát mozečku (Barvení luxolovou modří). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	53
Obrázek 24 - Preparát hřbetní míchy (Hematoxylin-eosin). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	54
Obrázek 25 - Preparát hřbetní míchy (Nisslova metoda). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	55
Obrázek 26 - Preparát hřbetní míchy (Bielschowského impregnace). Zvětšeno 40×. (Veronika Maurerová, 2016, vlastní fotografie).	56

11 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Doba odvodňování tkáně v jednotlivých lázních alkoholů, (Veronika Maurerová, 2016, vlastní šetření)	33
---	----