baria

ÚVOD DO RUTINNÍHO A SPECIÁLNÍHO BARVENÍ

James Anderson, Geoffrey Rolls

ÚVOD

Rutinní barvení H&E a speciální barvení hrají zcela zásadní roli v tkáňové diagnostice a výzkumu. Zbarvení jinak transparentních řezů tkáně umožňuje vysoce kvalifikovaným patologům a výzkumným pracovníkům zobrazit pod mikroskopem morfologii (strukturu) tkáně, nebo zkoumat vzorek z hlediska přítomnosti nebo prevalence určitých typů buněk, struktur nebo dokonce mikroorganismů, jako jsou např. bakterie.

V histopatologické laboratoři se termínem „rutinní barvení” rozumí barvení hematoxylinem a eosinem (H&E), které se „rutinně“ používá u všech tkáňových vzorků k odhalení základních tkáňových struktur a stavu tkání. Termín „speciální barvení” se používá již dlouho a rozumí se jím velký počet alternativních technik barvení, které se používají v případech, kdy barvení H&E neposkytuje všechny informace, které patolog nebo výzkumný pracovník potřebuje.

Příprava tkáně na barvení

Předtím, než je možné tkáň obarvit a zkoumat, musí být připravena tak, aby bylo možné získat velmi tenký řez o tloušťce pouze jedné buňky a umístit ho na podložní sklíčko. Součástí této přípravy je fixování tkáně (aby nedošlo k jejímu rozkladu), poté její zpevnění a upevnění tak, aby mohla být nakrájena na potřebné velmi tenké řezy (obvykle 2–7 μm). Pro tento účel existují dvě hlavní techniky označované jako zmrazené řezy a parafínové řezy.

Zmrazené řezy se používají tehdy, pokud odpovědi potřebujeme rychle – obvykle během operace, kdy chirurg potřebuje určit resekční okraj při odstraňování nádoru. Tyto řezy je možné získat rychle, avšak kvalita řezu obvykle není stejně vysoká jako u parafínové techniky. Postup přípravy zmrazeného řezu je následující:

1. Tkáň je rychle zmrazena, aby byla uchována a zpevněna.
2. Zmrazená tkáň je krájena na kryostatu a umístěna na podložní sklíčko, kde později proběhne barvení.
3. Řez je fixován okamžitě, tedy ještě předtím, než začne probíhat rozklad, a poté se barví.

Pokud mají být připraveny parafínové řezy, vzorek je nejprve umístěn do fixativa (fixačního činidla) a poté je struktura tkáně zpevněna prosycením vzorku parafínovým voskem. Tento proces je časově náročnější než vytvoření zmrazených řezů, nicméně ve většině případů zajišťuje vyšší kvalitu barvení a výsledné vzorky (označované jako bloky) mohou být uchovány téměř neomezeně dlouho. Postup vytvoření parafínových řezů je následující:

1. Fixací je tkáň uchována (obvykle s použitím roztoku formaldehydu).

2. Přikrojením je oddělena určitá část tkáně, která má být dále zkoumána.

3. Při zpracování tkáně se používá řada reagencií k nahrazení vodného prostředí buněk hydrofobním roztokem, který umožní prosycení tkáně parafínovým voskem.

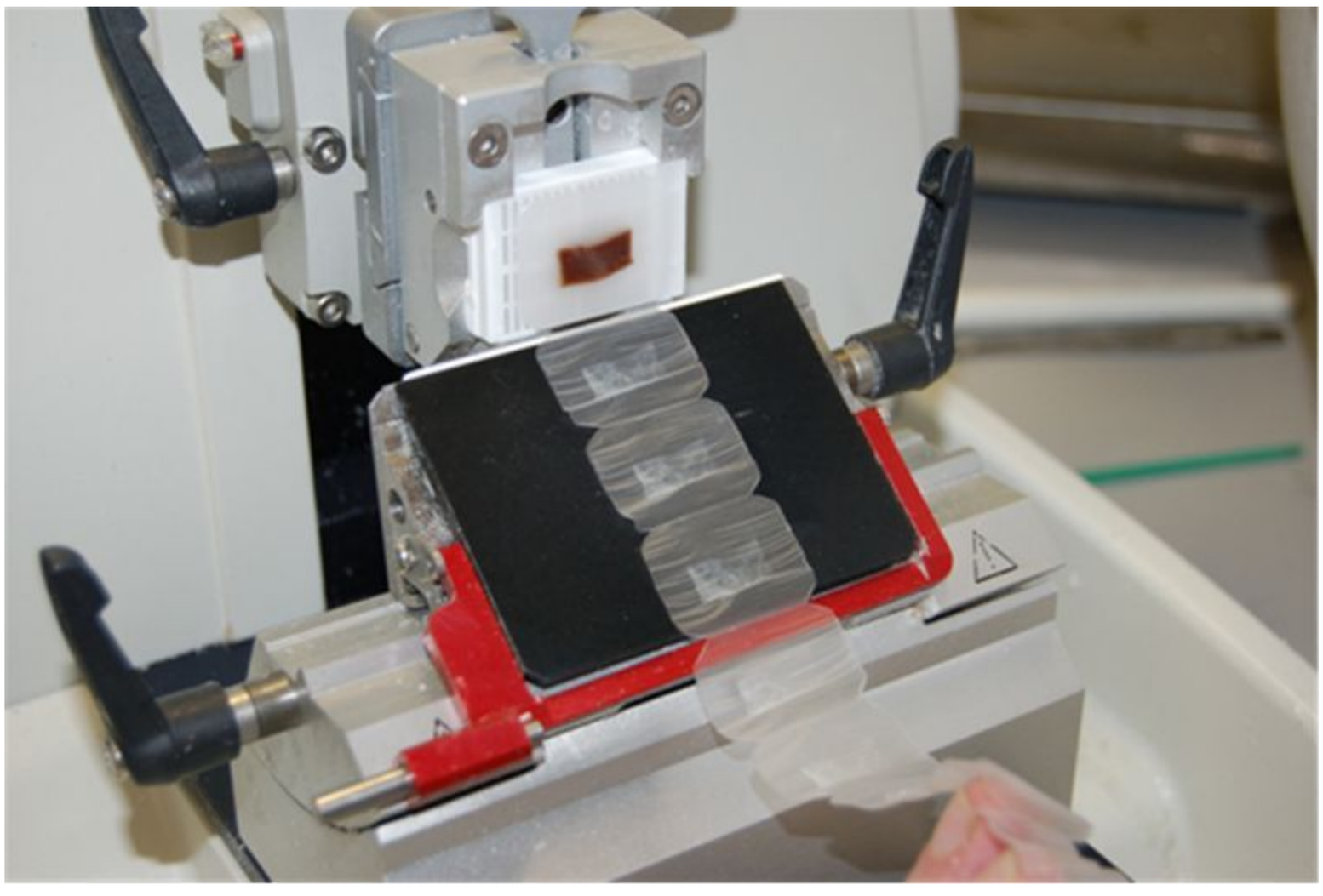
4. Upevnění tkáně do parafínového bloku umožňuje správně zorientovat vzorek pro krájení řezů a jejich další zpracování či skladování.

5. Krájení se provádí na mikrotomu, který krájí velmi tenké řezy, jež se napínají na vodní hladině a poté jsou přeneseny a umístěny na podložní sklíčka.

6. Podložní sklíčka jsou poté vysušena v sušárně nebo na plotně, aby se odstranila vlhkost a tkáň lépe přilnula ke sklíčku.

7. Tkáň na sklíčku je nyní připravena k barvení.

8. Prvním krokem při barvení je odvoskování (odparafínování), kdy je pomocí rozpouštědla odstraněn vosk ze sklíčka před barvením. Toto se vždy provádí jako součást procesu barvení. Jakmile je barvení dokončeno, řez je přikryt krycím sklíčkem, a tím je preparát uchován.



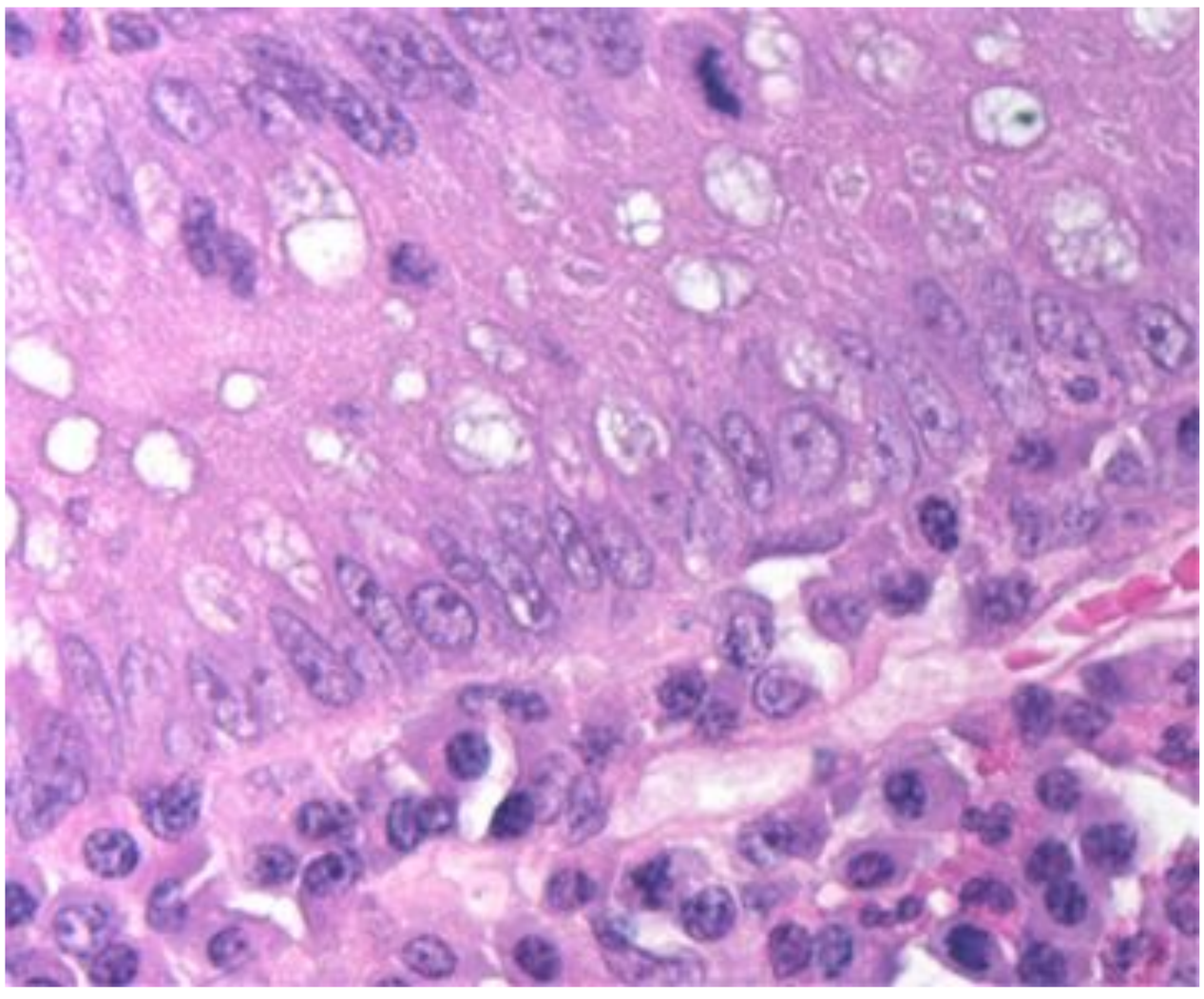
Obrázek 1: *Laborant krájí sérii tenkých řezů pro barvení.*

Proč je barvení H&E rutinní

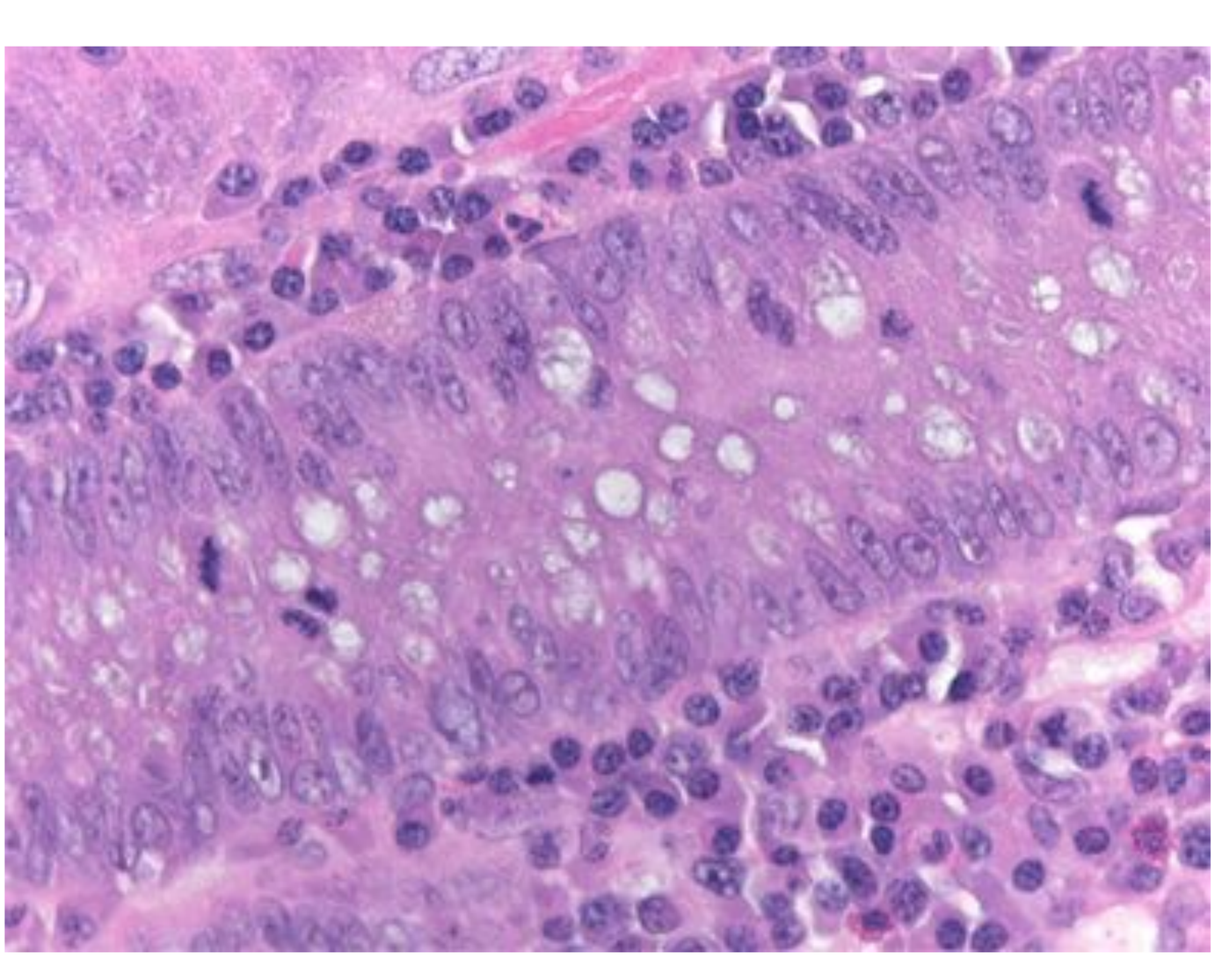
Barvení hematoxylinem a eosinem (H&E) se používá rutinně v histopatologických laboratořích, protože poskytuje patologovi/výzkumnému pracovníkovi velmi podrobné zobrazení tkáně. Toho je dosaženo pomocí jasně zbarvených buněčných struktur včetně cytoplazmy, jádra, organel a extrabuněčných komponent. Tyto informace jsou často dostatečné ke stanovení diagnózy onemocnění na základě uspořádání (nebo neuspořádání) buněk a také upozorňují na jakékoli abnormality nebo konkrétní indikátory v buňkách (např. změny jádra obvykle přítomné u rakoviny). I když se využívají pokročilé metody barvení, barvení H&E nadále tvoří rozhodující součást diagnostického obrazu, protože zobrazuje základní morfologii tkáně, což umožňuje patologovi/výzkumného pracovníkovi správně interpretovat pokročilé barvení.

V klinické histologické laboratoři je u všech vzorků nejprve provedeno barvení H&E a speciální nebo pokročilé barvení je vyžádáno jen tehdy, pokud jsou potřeba další informace pro podrobnější analýzu, například k rozlišení mezi dvěma morfologicky podobnými typy rakoviny.

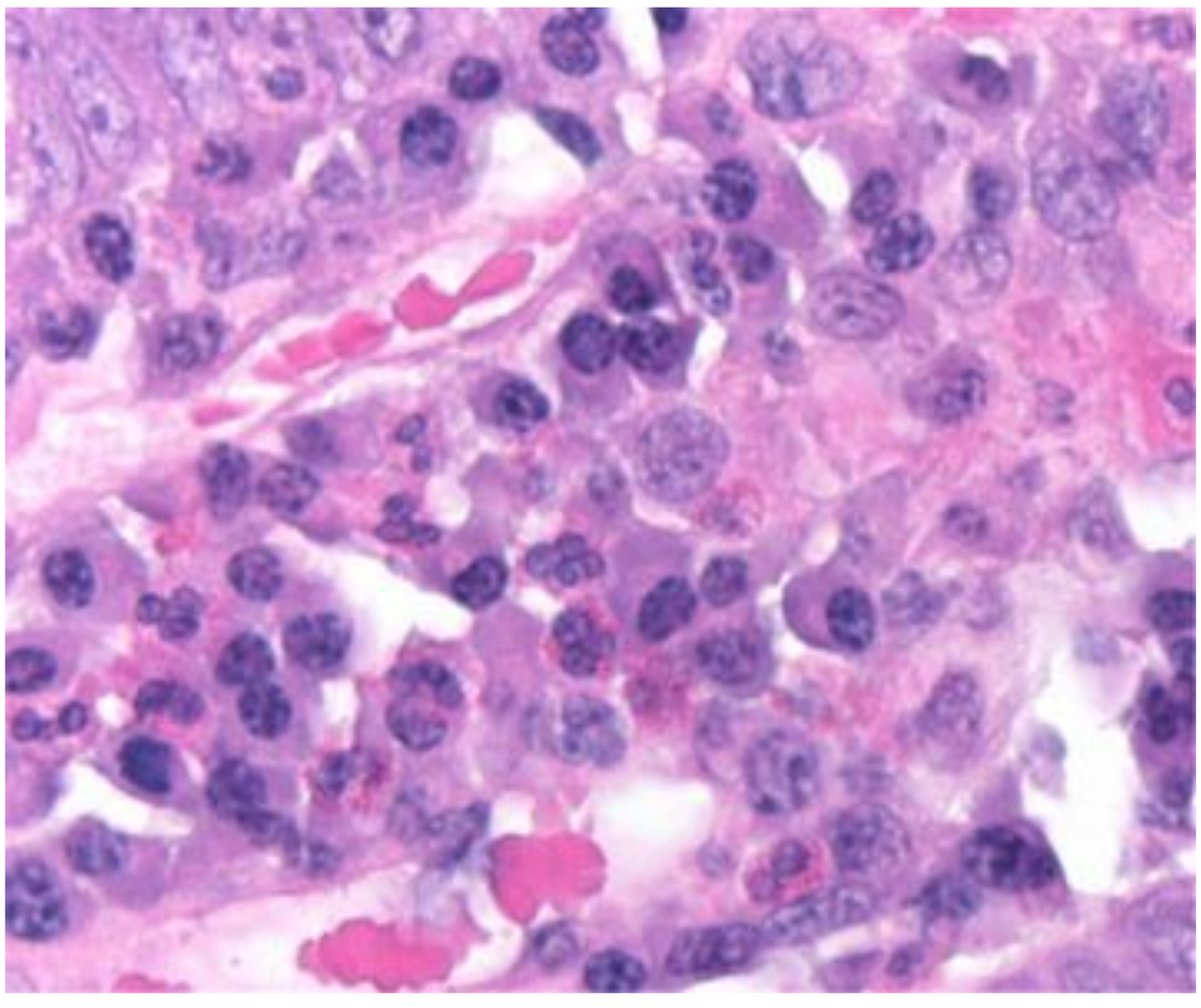
Kvůli potřebnému objemu barvení H&E většina klinických laboratoří využívá plně automatizované systémy a manuální barvení je v dnešní době vzácné.



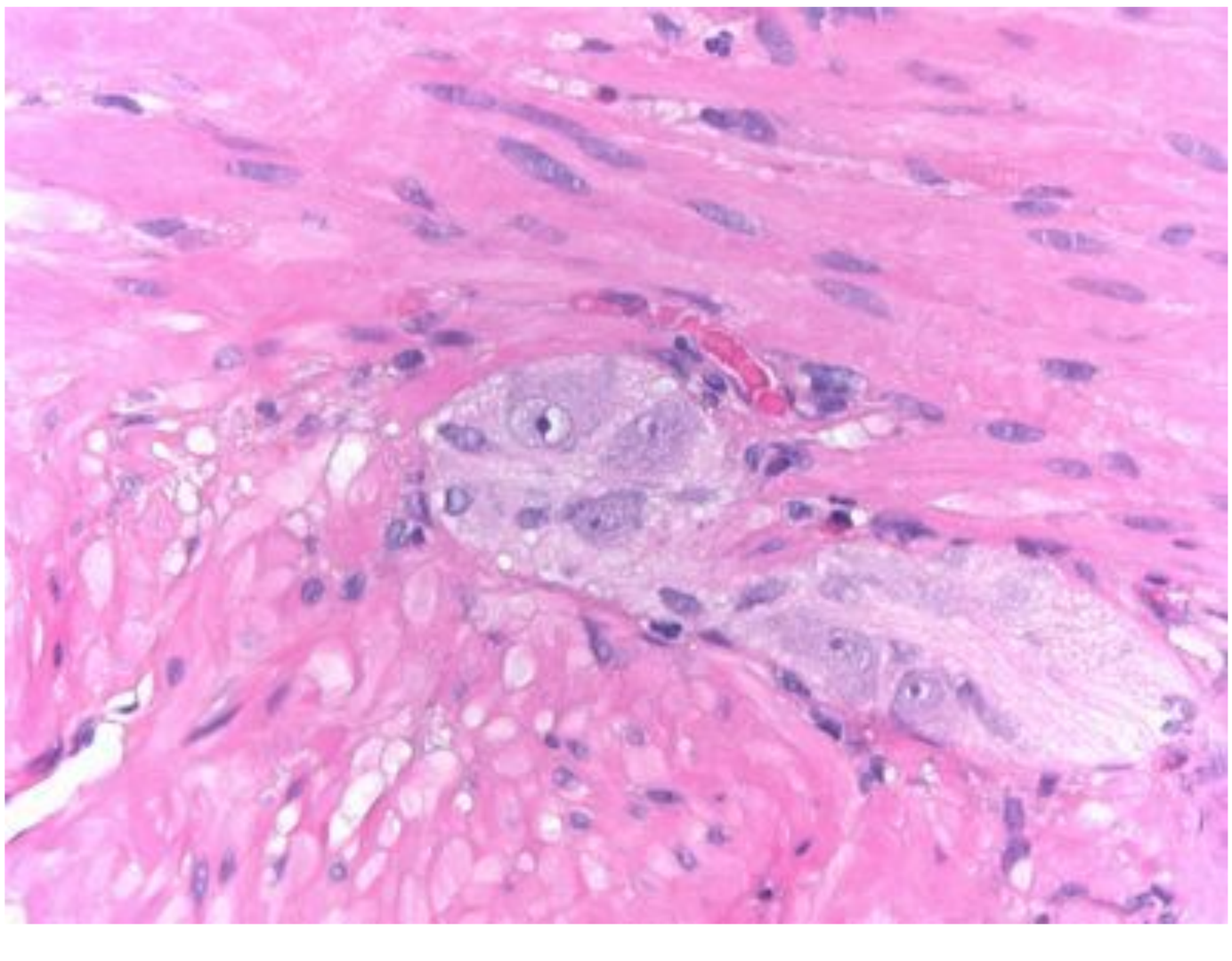
Obrázek 2: *Tento řez ze sliznice tenkého střeva ukazuje dobře definovaný heterochromatin a jádra epiteliálních buněk a plazmatických buněk v lamina propria.*



Obrázek 3: *Mitotické figury jsou ostře zbarveny ve žlázovém epitelu v řezu tkáně tenkého střeva.*



Obrázek 4: *V této části lamina propria tenkého střeva je cytoplazma plazmatických buněk obarvena hematoxylinem s výjimkou světlého perinukleráního prostoru, což odpovídá dobře vyvinutému Golgiho aparátu.*



Obrázek 5: *Tento autonomní ganglion z myenterického plexu, umístěný mezi vrstvami hladkého svalstva zevní svalové vrstvy (muscularis externa) tenkého střeva, obsahuje gangliové neurony, které ukazují dobře definovanou bazofilní Nisslovu substanci (agregace endoplazmatického retikula a ribozomální RNA) v jejich cytoplazmě.*

Chemie barvení H&E

Barvení H&E používá dvě barviva: hematoxylin a eosin. Tato kombinace se používá proto, že každé barvivo barví jiné prvky tkáně.

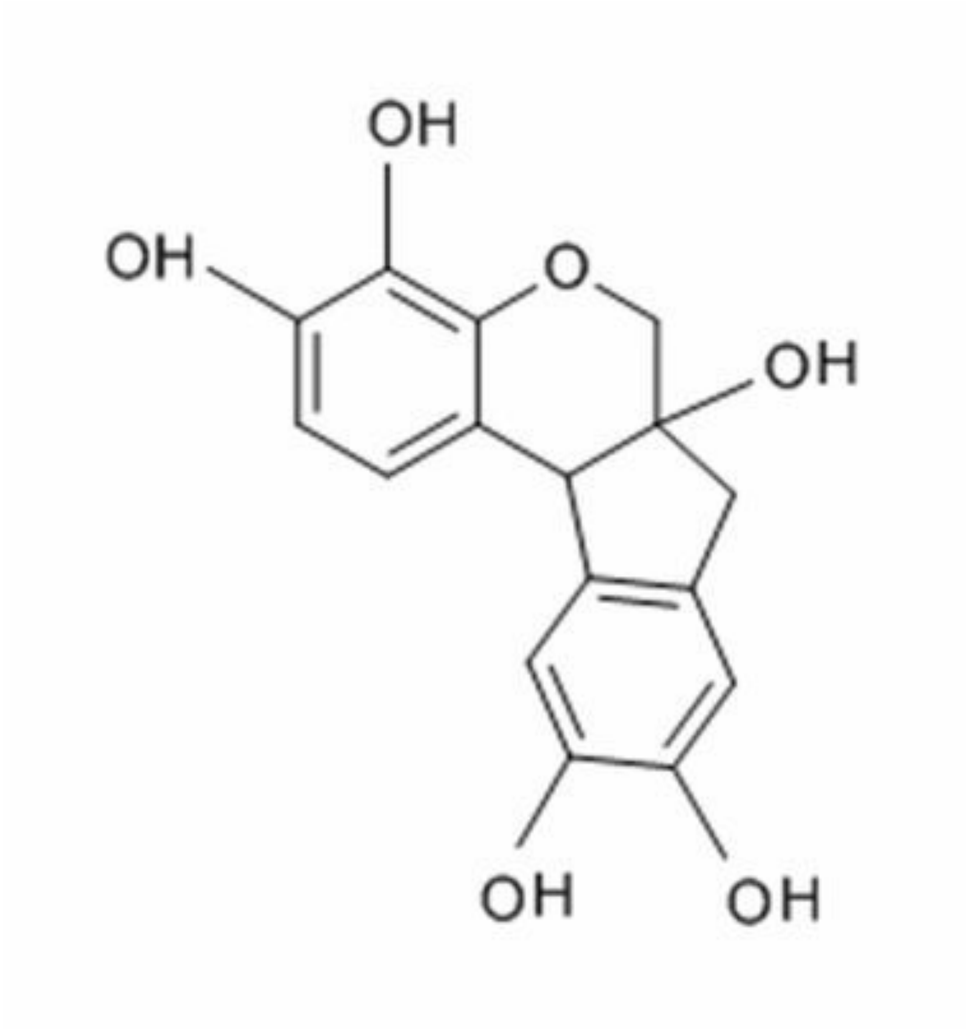
Hematoxylin je **bazické** (jaderné) barvivo s fialovomodrým odstínem. Barví kyselé nebo bazofilní struktury včetně buněčného jádra (které obsahuje DNA a nukleoprotein) a organely obsahující RNA jako např. ribozomy a drsné endoplazmatické retikulum.

Eosin je **kyselé** barvivo, které je obvykle načervenalé nebo růžové. Barví základní, nebo acidofilní, struktury, k nimž patří cytoplazma, buněčné stěny a extracelulární vlákna.

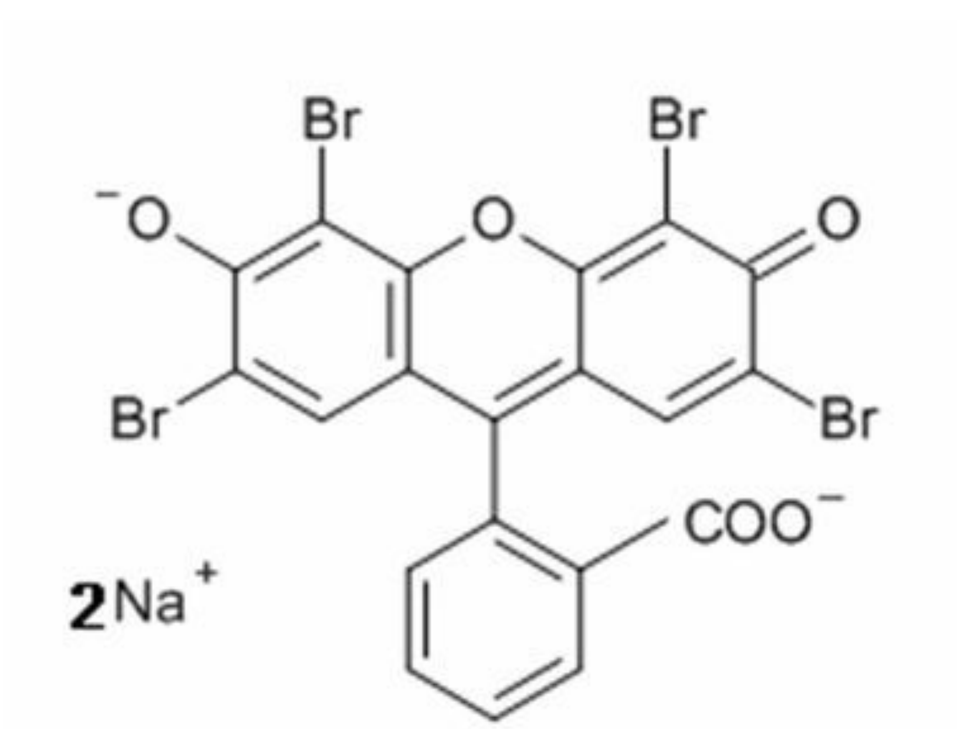
PŮVOD **BARVIV**

Hematoxylin se získává z kampeškového dřeva pocházejícího z kreveně obecné a je purifikován. Poté je oxidován a smíchán s ustalovačem (obvykle hliníkem), aby se vázal na buněčné struktury. Z mnoha hematoxylinových roztoků používaných v histologii jsou nejoblíbenější Gillův hematoxylin, Harrisův hematoxylin a Mayerův hematoxylin.

Eosin vzniká reakcí bromu s fluoresceinem. V histologii se obvykle používají dvě varianty eosinu: eosin Y, který je nažloutlý, a eosin B, který je nepatrně do modra. Eosin Y je nejoblíbenější.



Obrázek 6: *Chemická struktura hematoxylinu.*



Obrázek 7: *Chemická struktura eosinu Y.*

SPECIÁLNÍ BARVENÍ

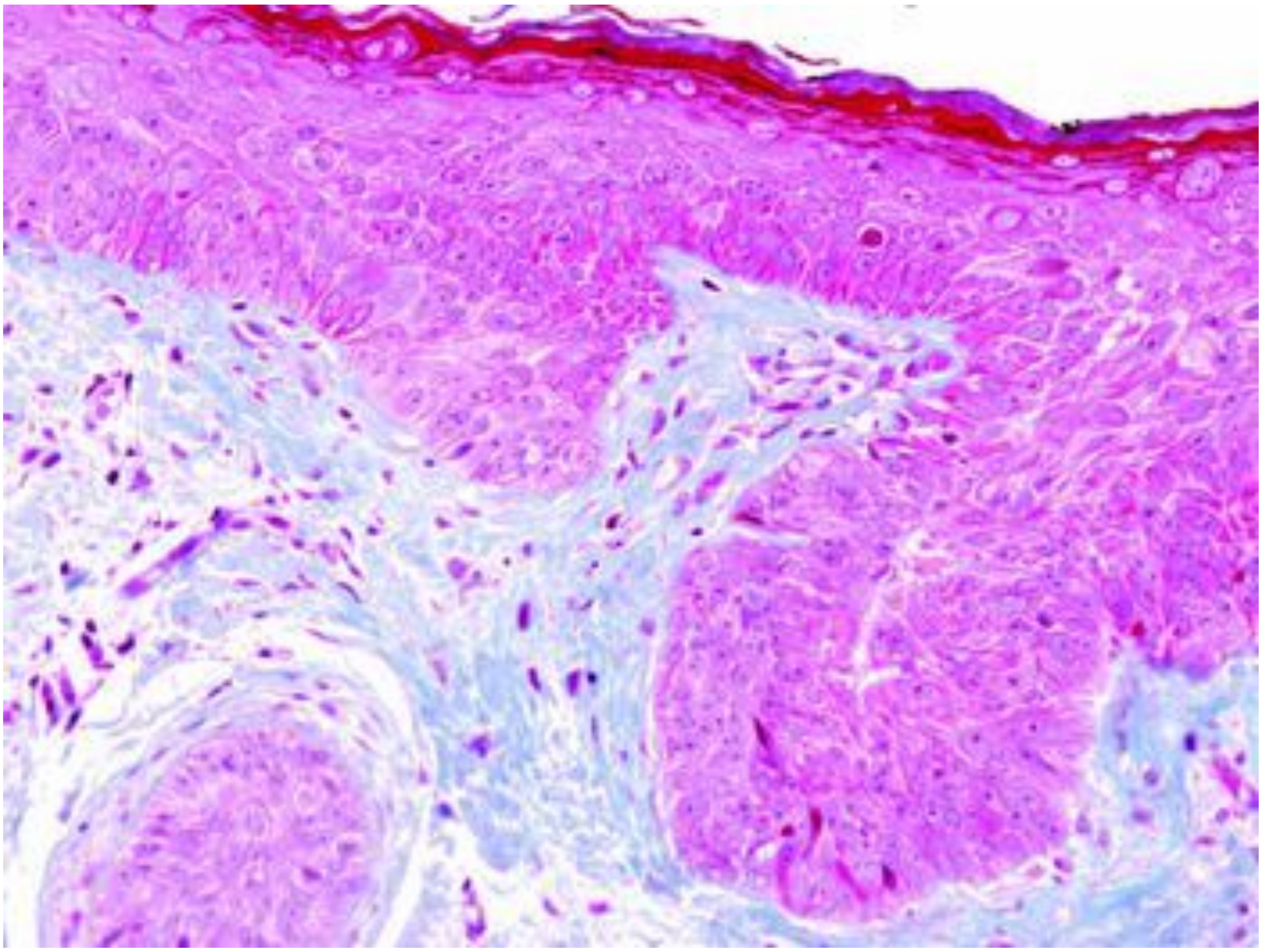
Termín „speciální barvení“ tradičně odkazoval na jakékoli jiné barvení než H&E. Zahrnuje širokou škálu metod, které lze použít k zobrazení konkrétních tkáňových struktur, prvků nebo dokonce mikroorganismů neidentifikovaných barvením H&E.

Další metody barvení využívají imunohistochemii nebo in situ hybridizaci k lokalizaci specifických proteinů nebo sekvencí DNA/RNA. Tyto metody byly někdy také zařazovány do skupiny „speciálního barvení“. Nicméně se celkem liší, pokud jde o metodu a účel, a v současnosti se obvykle řadí samostatně do třetí kategorie známé jako „pokročilá barvení“.

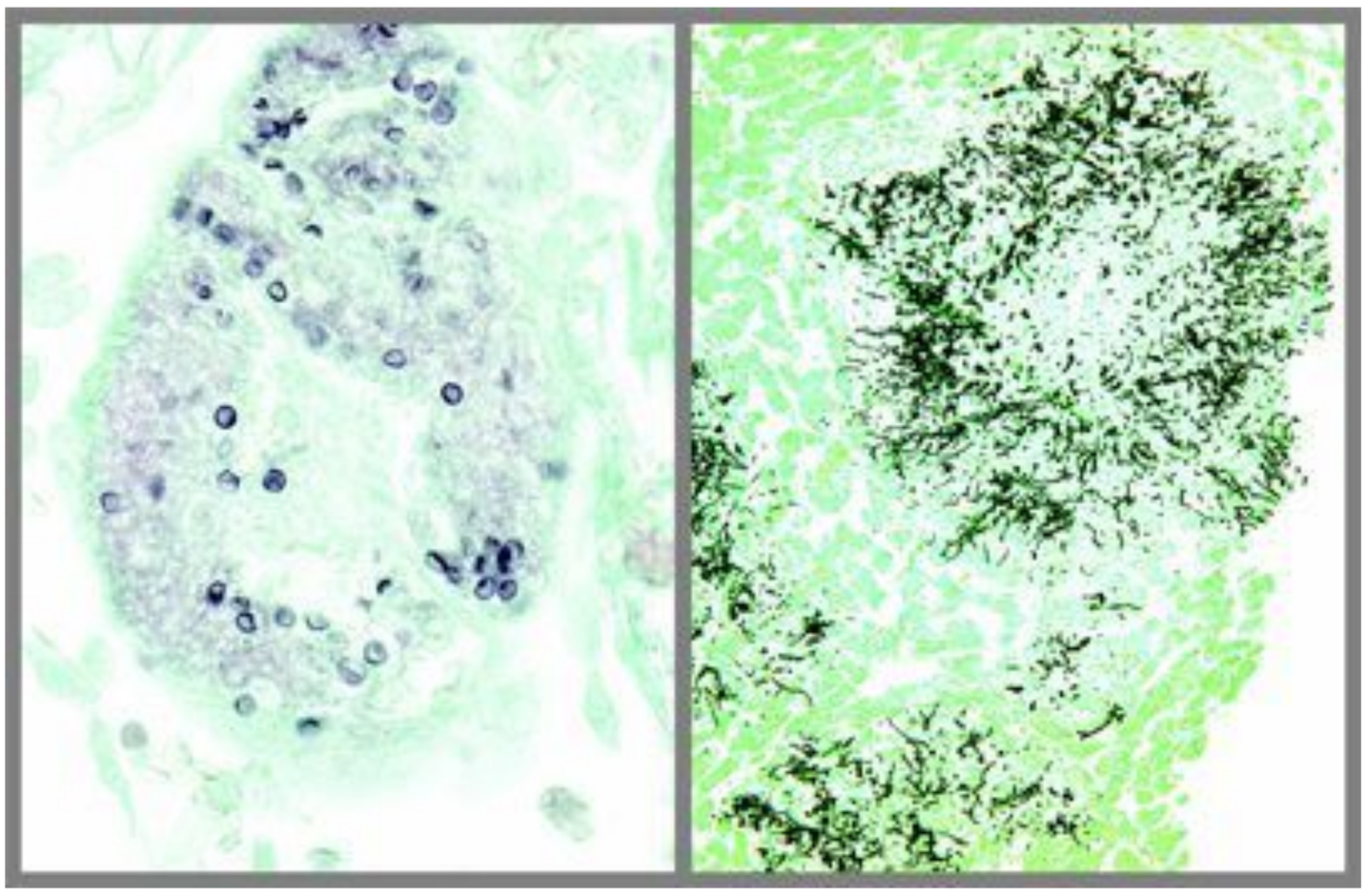
Třebaže existují doslova stovky speciálních barvení pro nejrůznější účely, pouze několik z nich se používá pravidelně v klinické histologii. Rozmanitost barvení rovněž znamená, že speciální barvení není tak automatizované jako barvení H&E. Ačkoli mnohé větší laboratoře využívají automatizované nástroje pro běžnější barvení, stále ještě je zde prostor pro ruční barvení. Složitost některých barvení také mluví proti využití automatizace.

NĚKTERÉ BĚŽNÉ DRUHY SPECIÁLNÍHO BARVENÍ

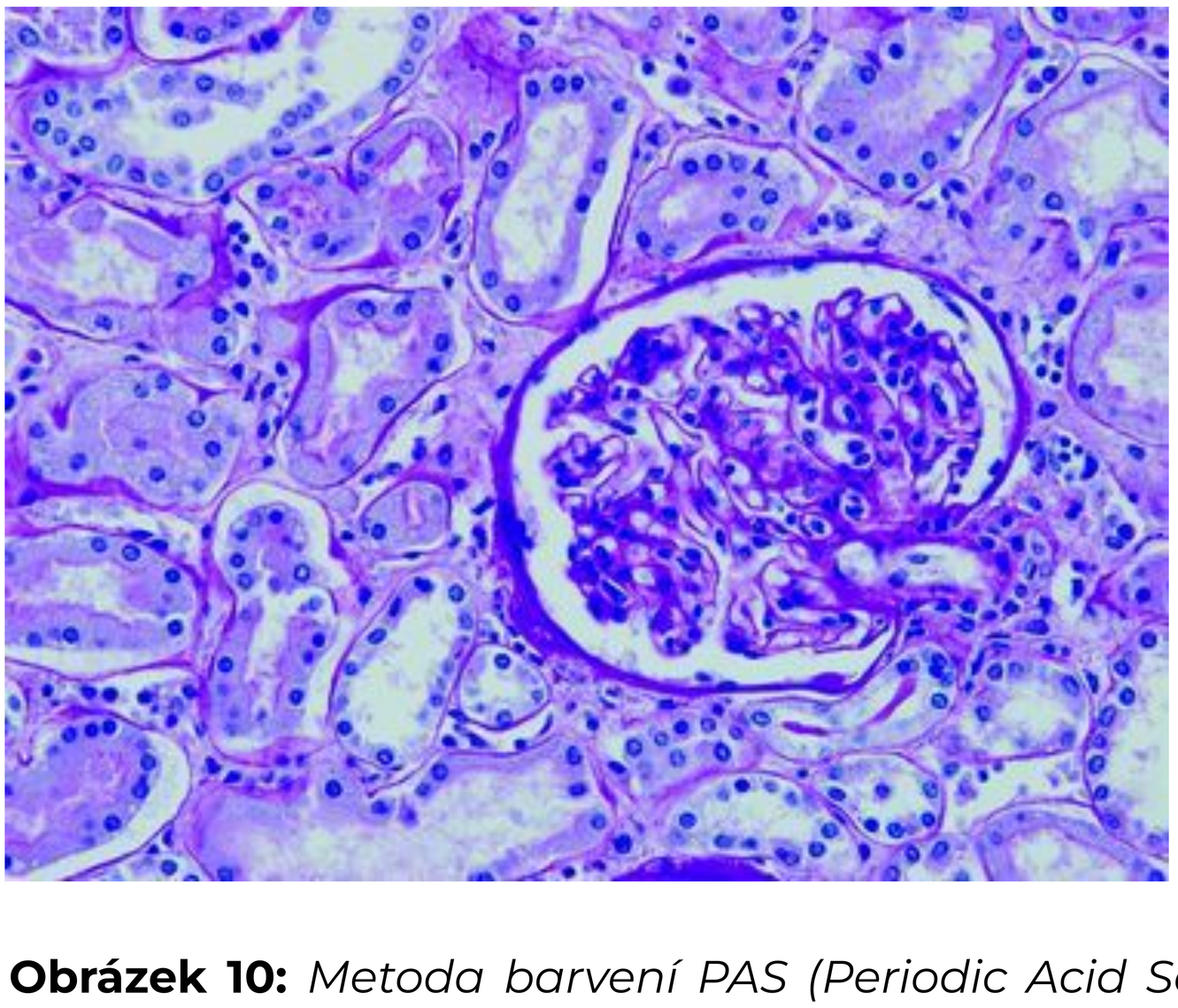
Obrázky níže zachycují některé běžné druhy speciálního barvení a jejich využití.



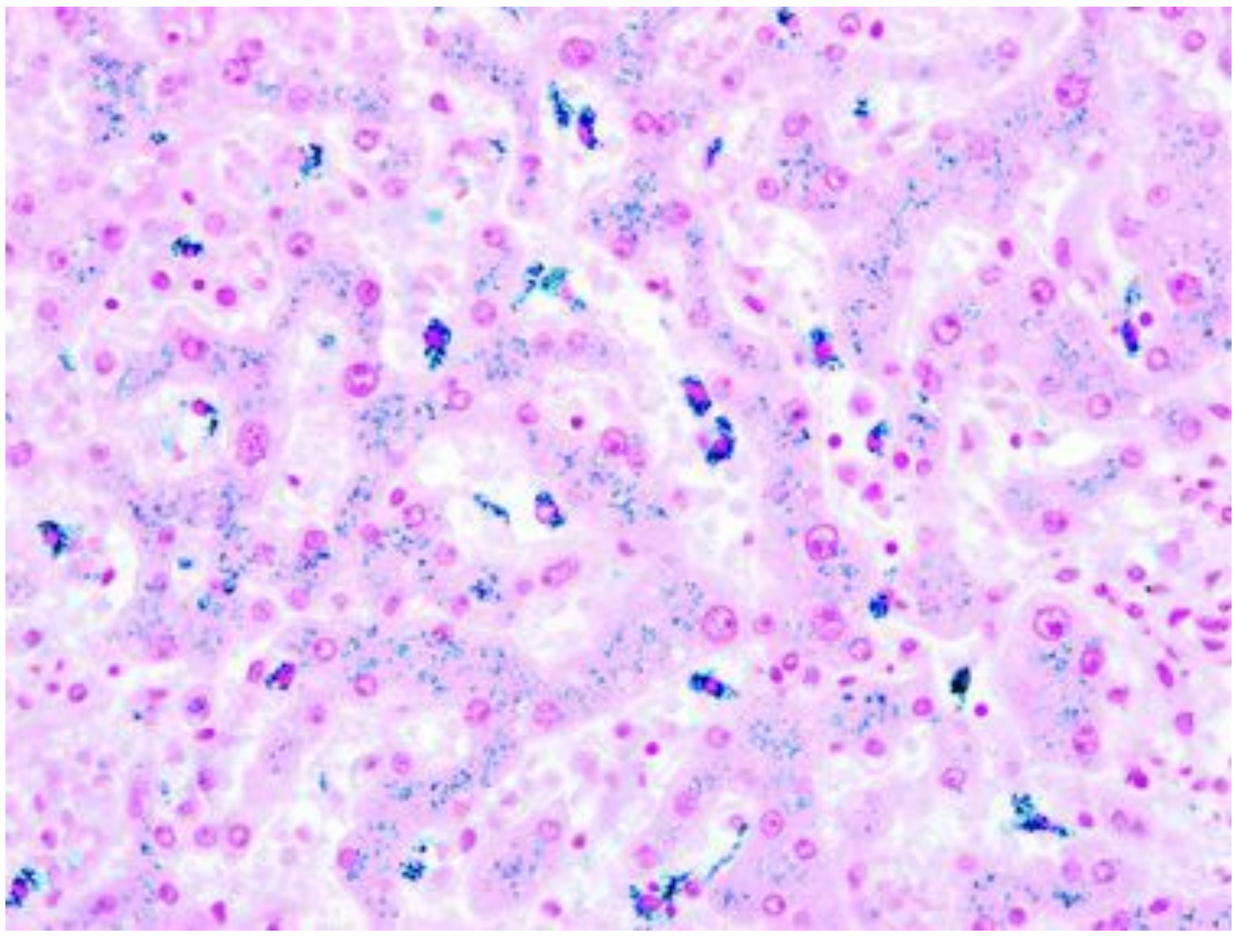
Obrázek 8: *Massonův trichrom (kůže). Toto barvení je určeno k použití při histologickém pozorování kolagenních vláken pojivové tkáně ve vzorcích tkáně. Využívá se k odlišení kolagenu a hladkého svalu u nádorů a k detekci onemocnění nebo změn pojivové/svalové tkáně.*



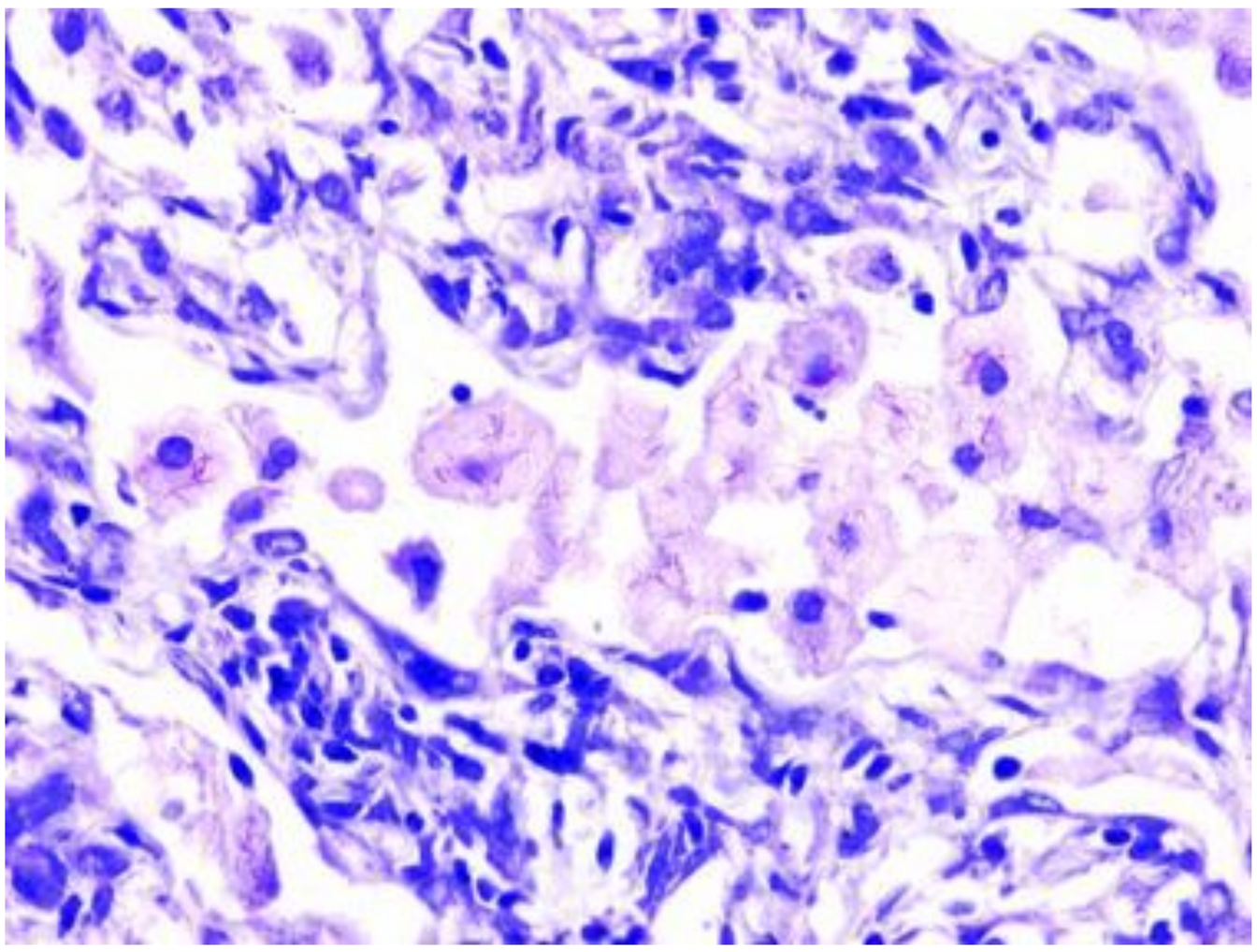
Obrázek 9: *Modifikované GMS barvení stříbrem (vlevo: Pneumocystis, plíce) (vpravo: aspergillová infekce, plíce). Modifikované GMS barvení stříbrem je určeno k použití při histologickém pozorování plísní, bazální membrány a některých oportunistických organismů, jako je např. pneumocystis carinii ve vzorcích tkáně.*



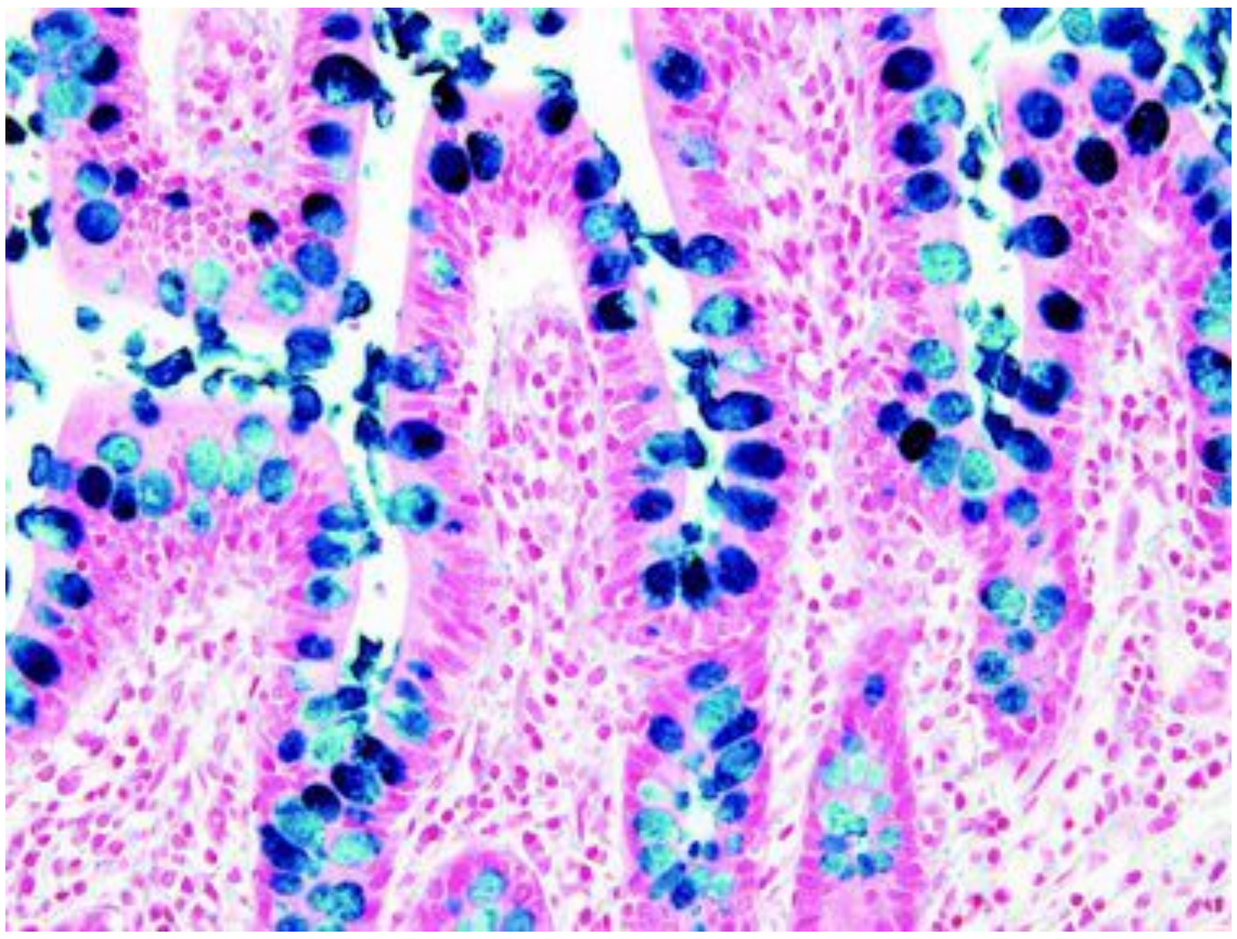
Obrázek 10: *Metoda barvení PAS (Periodic Acid Schiff) (ledviny). Barvení PAS se používá převážně pro barvení struktur obsahujících vysokou koncentraci sacharidů, jako je např. glykogen, glykoproteiny, proteoglykany obvykle zjištěné v pojivových tkáních, sliznicích a v bazálních membránách. Často se používá k barvení ledvinových biopsií, jaterních biopsií, určitých poruch ukládání glykogenu v příčně pruhovaném svalstvu a při podezření na mykotické infekce.*



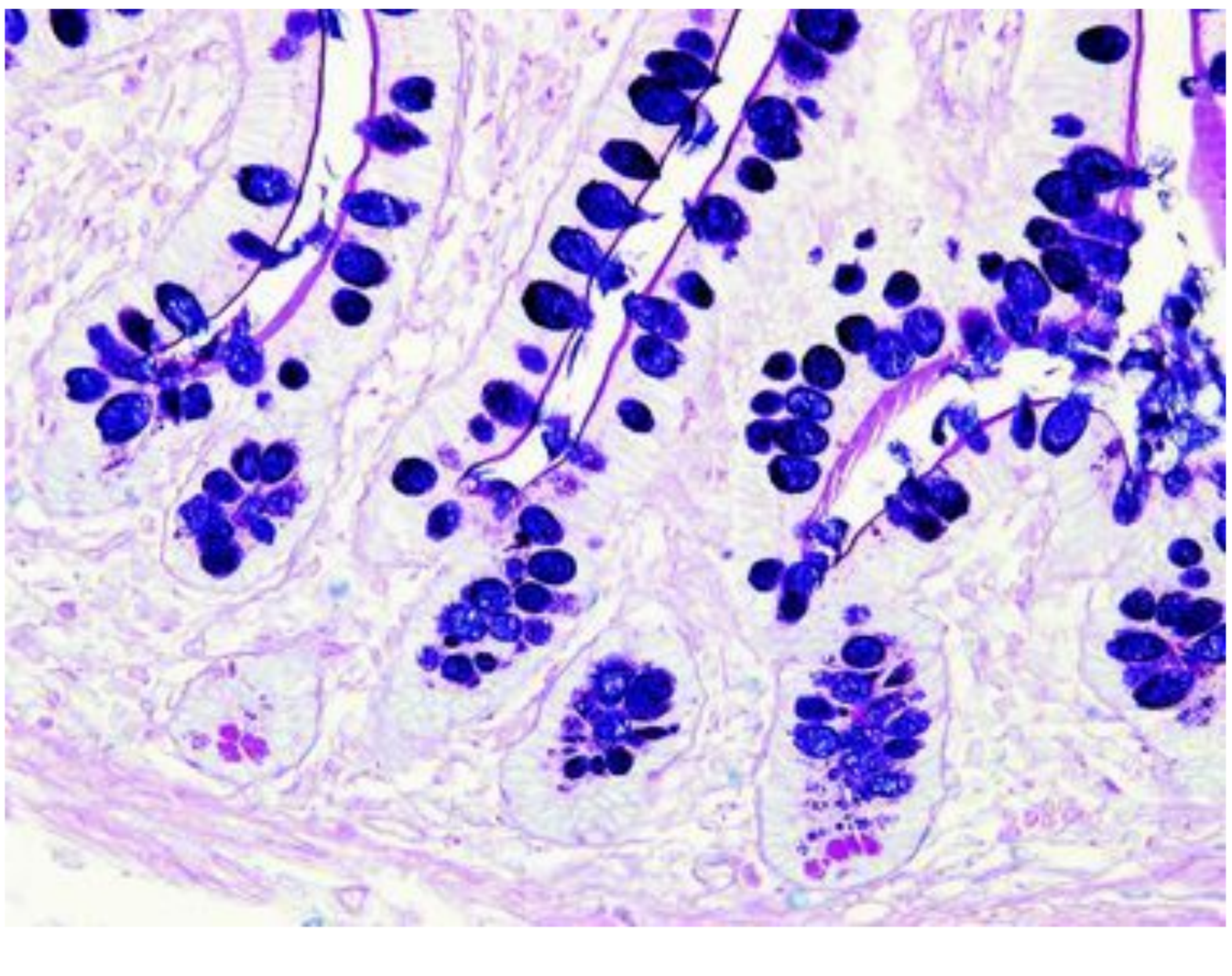
Obrázek 11: *Perlsovo barvení pruskou (berlínskou) modří pro průkaz železa (játra). Toto barvivo se používá k detekování a identifikování trojmocného (Fe3+) železa v tkáňových preparátech, krevních nátěrech nebo nátěrech kostní dřeně. Minimální množství trojmocného železa (hemosiderinu) se běžně vyskytuje v kostní dřeni a ve slezině. Abnormální množství železa může naznačovat hemochromatózu a hemosiderózu.*



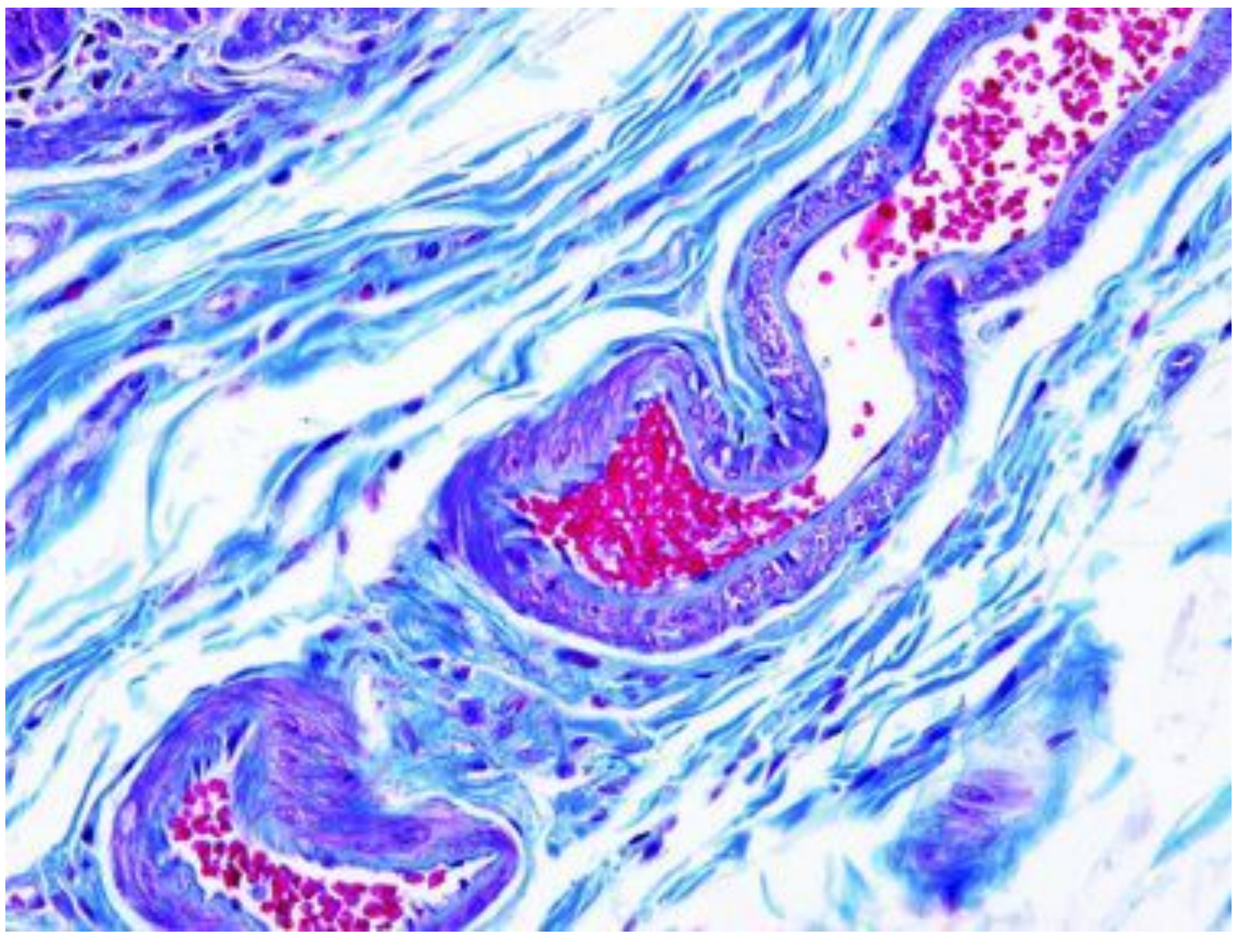
Obrázek 12: *Barvení dle Ziehl Neelsena (Acid Fast Bacillus, plíce). Toto barvení se používá k detekci a identifikaci acidorezistentních tyčinek ve tkáni. Bacilli jsou tyčinkovité bakterie. Hlavní funkcí tohoto barvení je identifikovat tuberkulózu v plicní tkáni.*



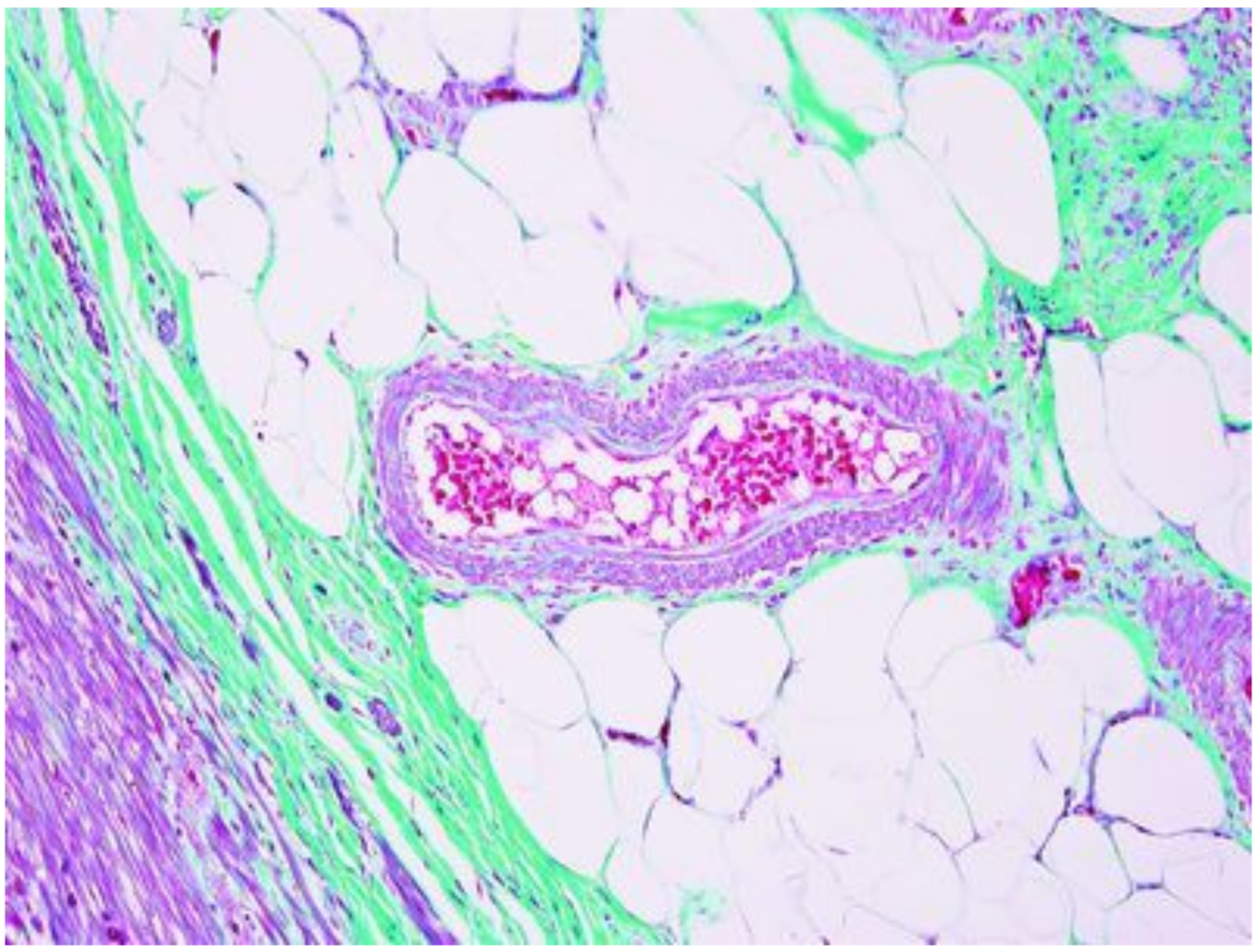
Obrázek 13: *Alciánová modř (střevo). Barvení alciánovou modří se obvykle připravuje s pH 2,5 a používá se k průkazu kyselých mukopolysacharidů a kyselých mucinů. Nadměrné množství kyselých mukopolysacharidů se objevuje v mezoteliomech, určité množství se běžně vyskytuje ve stěnách cév, avšak zvyšuje se v případě raných aterosklerotických lézí.*



Obrázek 14: *Alciánová modř a PAS (střevo). Barvení kombinující vlastnosti alciánové modři a metody PAS (Periodic Acid Schiff).*



Obrázek 15: *Impregnace dle Gömöriho (modrá) (podslizniční vrstva). Trichromová barviva se používají k barvení a identifikaci svalových vláken, kolagenu a jader. Lze je použít ke kontrastování kosterního, srdečního nebo hladkého svalu. Impregnace podle Gömöriho je zjednodušení složitějšího barvení Massonovým trichromem a kombinuje barvení plazmy (chromotrop 2R) a barvení pojivových tkání k zajištění brilantního kontrastního obrazu.*



Obrázek 16: *Impregnace dle Gömöriho (zelená) (podslizniční vrstva). Trichromová barviva se používají k barvení a identifikaci svalových vláken, kolagenu a jader. Lze je použít ke kontrastování kosterního, srdečního nebo hladkého svalu. Impregnace podle Gömöriho je zjednodušení složitějšího barvení Massonovým trichromem a kombinuje barvení plazmy (chromotrop 2R) a barvení pojivových tkání k zajištění brilantního kontrastního obrazu.*

NĚCO MÁLO O BARII

Společnost Baria vznikla v roce 2002 a dodává produkty, materiál a přístroje jak do klinických laboratoří, tak pro výzkumné i průmyslové účely.

Od počátku se zaměřujeme především na špičkovou kvalitu distribuovaného zboží, které pochází od předních dodavatelů a odpovídá poznatkům současné vědy.

Poskytujeme také odbornou podporu a servis, naši zaměstnanci mají dlouholeté zkušenosti s prací v laboratoři a zároveň jsou to ochotní lidé, kteří vám rádi s čímkoliv pomohou.

baria