



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# TESTOVÁNÍ METOD PRO BARVENÍ VZORKŮ ŽIVOČIŠNÉ TKÁNĚ

TESTING OF NEW METHODS OF ANIMAL TISSUE STAINING

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Mgr. Věra Feitová

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

MUDr. Jarmila Klusáková, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0866/2014</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Mgr. Věra Feitová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	<b>MUDr. Jarmila Klusáková, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.	

### Název bakalářské práce:

Testování metod pro barvení vzorků živočišné tkáně

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární přehled dané problematiky zaměřený na postup zpracování tkání, význam barvení tkání pro diagnostiku, přehled metod barvení tkání a parametry ideální metody.

2. Experimentální část

- testování nových technik barvení vzorků tkání zaměřených na barvení povrchů
- aplikace metod na reálné vzorky a srovnání s jinými technikami
- vyhodnocení výsledků a diskuse.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Mgr. Věra Feitová  
Student(ka)

-----  
MUDr. Jarmila Klusáková, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Pro určení diagnózy pacienta bývá potřeba i informace o struktuře tkáně a patologických změnách. Biopsie je diagnostická metoda, při které je pacientovi odebrán vzorek tkáně, fixován a následně vyšetřen. Tkáň prochází procesem odvodnění, vytvoření parafinového bločku, krájením, opětovným zavodněním a barvením. Pro značení resekcčních okrajů je možné použít stříbření, kdy se tkáň krátce ponoří do 10% roztoku dusičnanu stříbrného  $\text{AgNO}_3$ . Po nakrájení na vhodné řezy se stříbro vyvolá vývojkou pro černobílou fotografii. Další metodou je ponoření do roztoku chloridu železitého a po nakrájení na řezy vysrážení hexakynoželeznatanu železitého  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  (berlínské modři) pomocí roztoku hexakynoželeznatanu draselného  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , též zvaného žlutá krevní sůl.

## **ABSTRACT**

For accurate diagnosis, detailed information about tissue structure and pathology is often needed. A biopsy is a diagnostic test, used to obtain tissue samples for further examination. The tissue undergoes fixation, cutting, dehydration, paraffin embedding, slicing, rehydration and staining. Silver may be used to mark resection borders, when the tissue sample is immersed in a 10% aqueous solution of argent nitrate  $\text{AgNO}_3$ . After cutting, the silver is developed using a common black and white photographic developer. Another option is immersing the tissue sample into an aqueous solution of ferric chloride and, after cutting, using an aqueous solution of potassium ferrocyanide  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  to produce ferric ferrocyanide  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ , otherwise known as Prussian blue.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

biopsie, barvení, resekcční okraj

## **KEY WORDS**

biopsy, staining, surgical margin

FEITOVÁ, V. *Testování metod pro barvení vzorků živočišné tkáně*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 31 s. Vedoucí bakalářské práce MUDr. Jarmila Klusáková, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
Podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce paní MUDr. Jarmile Klusákové PhD. za odborné rady, cenné připomínky a trpělivost při zpracování zadané problematiky. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům, celé rodině, zaměstnavatelům a nejbližšímu okolí za podporu a porozumění během celého studia.

## Obsah

1	Úvod	6
2	Teoretická část	8
2.1	Příprava preparátu pro histologické vyšetření	8
2.1.1	Fixace	8
2.1.2	Přikrajování	10
2.1.3	Odvodnění a projasnění tkání	10
2.1.4	Další postup	11
2.1.5	Barvení	11
2.2	Zpracování nefixované tkáně	13
3	Experimentální část	14
3.1	Chemikálie	14
3.2	Přístroje	14
3.3	Materiál	15
3.4	Metody	15
3.4.1	Obarvení povrchu stříbrem	15
3.4.2	Obarvení povrchu berlínskou modří	16
3.4.3	Obarvení povrchu Turnbullovou modří	17
3.4.4	Obarvení povrchu chromanem stříbrným	18
3.4.5	Obarvení povrchu chromanem barnatým	19
3.4.6	Obarvení povrchu jodidem stříbrným	19
3.4.7	Obarvení tkáně chromanem zinečnatým	20
3.4.8	Obarvení povrchu síranem barnatým	20
3.4.9	Obarvení povrchu uhličitanem měďnatým	21
4	Výsledky a diskuse	22
4.1	Obarvení povrchu stříbrem	22
4.2	Obarvení povrchu berlínskou modří	23
4.3	Obarvení povrchu Turnballovou modří	25
4.4	Obarvení povrchu chromanem stříbrným	25
4.5	Obarvení povrchu chromanem barnatým	27
4.6	Obarvení povrchu jodidem stříbrným	27
4.7	Obarvení povrchu chromanem zinečnatým	27
4.8	Obarvení povrchu síranem barnatým	28
4.9	Obarvení povrchu uhličitanem měďnatým	28
5	Závěr	29
6	Použitá literatura	30

# 1 ÚVOD

Pro určení přesné diagnózy pacienta často nestačí jen klinické nebo biochemické vyšetření, ale je potřeba i informace o struktuře tkáně a případných patologických změnách na úrovni buňky a jejích organel. Za tímto účelem se provádí tzv. biopsie, což je diagnostická metoda, při které se pacientům odebírá vzorek dané tkáně a následně se posílá do biotické laboratoře k morfologickému vyšetření. Klíčovou roli hraje biotické vyšetření především v onkologii.

Pokud se jedná o zhoubný nádor, pak je velmi důležité, jestli se chirurgickým zákrokem podařilo nádorovou tkáň zcela odstranit. Často se stává, že zhoubný nádor má velmi nepravidelný tvar a destruuje okolní tkáň infiltrativním způsobem. Hranice takového tumoru nejsou při operačním zákroku okem patrné. Chirurg na jedné straně musí odstranit tumor celý, na druhé straně se musí snažit, aby zdravé tkáně odstranil co nejméně.

Z tohoto důvodu je (kromě informace o charakteru tumoru samotného) velmi důležitá informace, zda byl tumor odstraněn skutečně celý. Situace není vždy stejná. Pokud je tumor ve tkáni, kterou lze bez následků odstranit a/nebo je tumor vysoce zhoubný, chirurg provede raději rozsáhlejší zákrok. V opačném případě (zejména pokud je léze snadno dostupná, například na kůži) se snaží spíše o menší resekci.

V každém případě je nutné zjistit, zda byla tkáň tumoru odstraněna celá. Pokud ne, zpravidla se chirurgický zákrok opakuje a resekční pole se přiměřeně zvětší. Tento postup je možné v případě potřeby opakovat. Někdy se takového histologického vyšetření provádí v průběhu samotné operace a zpracovává se hluboce zmražená tkáň.

Při běžném zpracování se tkáň fixuje (typicky formaldehydem) a charakter tkáně se mění. Z odebrané tkáně se zalévají do parafínu vybrané bločky. Stává se, že při zalévání a krájení není pořízený řez celou odebranou tkání, protože bloček může být orientovaný šikmo nebo se část 5 mikrometrů silného řezu může odtrhnout. Okraj obarvené tkáně na skle proto nemusí odpovídat skutečnému okraji resekované tkáně a tuto situaci je nutné rozpoznat a napravit (dalšími řezy do větší hloubky, změnou orientace bloku vůči noži a podobně).

Jediný způsob, jak toho dosáhnout, je nějakým způsobem obarvit či označit povrch tkáně před dalším zpracováním. Pak musí na histologickém preparátu okraj tkáně odpovídat okraji řezu. Pokud tomu tak není, je nutné zjednat nápravu.

Barvení resekčních okrajů je standardní proces při vyšetřování prakticky každého zhoubného tumoru. Vzhledem k tomu, že předem nebývá charakter vzorku jasný, zpravidla se barví všechny odebrané tkáně u celistvých lézí (ne u fragmentované tkáně, abrazi a podobně).

Tradičně se na toto značení používá tuš (černá nebo barevná). Odebraný vzorek se potře tuší nebo do tuše ponoří a pak se tuš koaguluje Bouinovým roztokem. Výhoda je výrazné značení, které přetrvá další zpracování. Nevýhoda je zbarvení tkáně načerno a s tím spojená ztráta přehledu po povrchu tkáně. Tuš navíc barví a tím znehodnocuje roztoky při dalším zpracování tkáně.

Z dalších možností se používá bílá korekční tekutina pro psací stroje nebo komerčně dostupné barevné roztoky. Ty mají i další nevýhody - nedají se dobře koagulovat a dochází ke znečištění řezu, pokud se barvivo neponechá dostatečně zaschnout.

Výborné je stříbření povrchu tkáně, které vytvoří dobře zbarvený povrch stálý vůči jakémukoliv dalšímu zpracování. Nevýhoda je vysoká cena dusičnanu stříbrného.

Velmi důležité je obarvit povrch odebrané tkáně před odběrem vzorků. Každý vzorek musí mít obarvenou jen tu část, která odpovídá povrchu vzorku. Rozmazání barviva po řezné ploše znemožní detekci šikmého bloku a výrazně sníží spolehlivost procedury. Počet zpracovávaných vzorků je často vysoký a čekat na zasychání barviva nebývá možné.

Hledá se tedy další metoda, která by barvení tuší nahradila či ještě lépe, překonala. Jelikož zpracování tkáně od odběru vzorku až po hotový mikroskopický preparát je mnohastupňový proces, musí ideální metoda splňovat některá kritéria:

- musí fungovat na vlhké, čerstvé i formolem fixované tkáni
- musí vydržet promývání tkáně vzestupnou řadou alkoholů, xylenem a zalití horkým parafínem
- musí být čistě povrchová, není účelem probarvit tkáň do hloubky (právě naopak, takové barvení by interferovalo s následným standardním barvením hematoxylinem eosinem)
- barvivo by mělo při krájení vydržet na povrchu a nerozmazat se na řeznou plochu
- pigment nesmí být růžový (protože po barvení tkáně hematoxylinem – eosinem je preparát růžový)
- musí být dostatečně kontrastní, aby byl na preparátu jasně rozeznatelný od obarvených struktur tkáně

Z ekonomických a procesních důvodů musí být barvení pokud možno okamžité, nesmí být příliš drahé ani složité (nejlépe dvoufázové, kdy se na začátku celý vzorek pokryje roztokem A a barevná změna se roztokem B vyvolá až po nakrájení na hotové řezy) a nesmí být toxické.

Předložená práce je zaměřena na vývoj nové metody barvení okrajů histologických preparátů.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Příprava preparátu pro histologické vyšetření

Vzorky tkáně se odebírají za účelem určení diagnózy buď ze živých osob (biopsie) nebo při pitvách (nekropsie). Obvyklá velikost vzorku je zhruba  $1 \times 1 \times 0,5 \text{ cm}$ . Pokud je množství odebraného materiálu větší, je nutné z něj v bioptické laboratoři vykrojit reprezentativní vhodně veliký vzorek nebo více vzorků. Této činnosti se říká přikrajování. Postup zpracování odebrané tkáně zahrnuje následující kroky [1]:

1. Fixaci tkáně
2. Přikrajování (výběr vhodných vzorků z větších tkáňových odběrů)
3. Odvodnění vzorku vzestupnou řadou alkoholů
4. Převedení tkáně do xylenu
5. Sycení horkým tekutým parafínem
6. Zalítí do parafinového bločku
7. Krájení tenkých řezů
8. Natažení na podložní sklo
9. Vymytí parafínu xylenem
10. Zavodnění sestupnou řadou alkoholů
11. Barvení řezu vodními barvivy
12. Odvodnění řezu
13. Montáž pod krycí sklo lepené syntetickým médiem (Solakryl) nebo tradičně kanadským balzámem

#### 2.1.1 Fixace

Fixace je první a zároveň klíčový krok při přípravě tkáně pro mikroskopickou diagnostiku. Cílem fixace je udržet vzorek tkáně v morfologickém stavu co nejvíce podobném tomu před odběrem a zabránit autolýze, tedy degradačním procesům, které ve tkáni začínají hned po zastavení cévního zásobování a jsou způsobeny v buňkách obsaženými enzymy. Fixační činidlo vzorek zároveň mechanicky zpevní, čímž umožní další zpracování. Dále je nutné zachovat schopnost tkáně vázat barviva a zachovat antigenní struktury tkáně [2].

Fixace je komplexní proces zahrnující denaturaci proteinů, propojení řetězců bílkovin (cross-linking) a vytvoření nerozpustné sraženiny. Podle mechanismu účinku se fixace dělí na:

- fyzikální (mrazové vysoušení) jen pro speciální výzkumné účely, dále se tím nezabýváme
- chemickou (pro rutinní diagnostické účely)

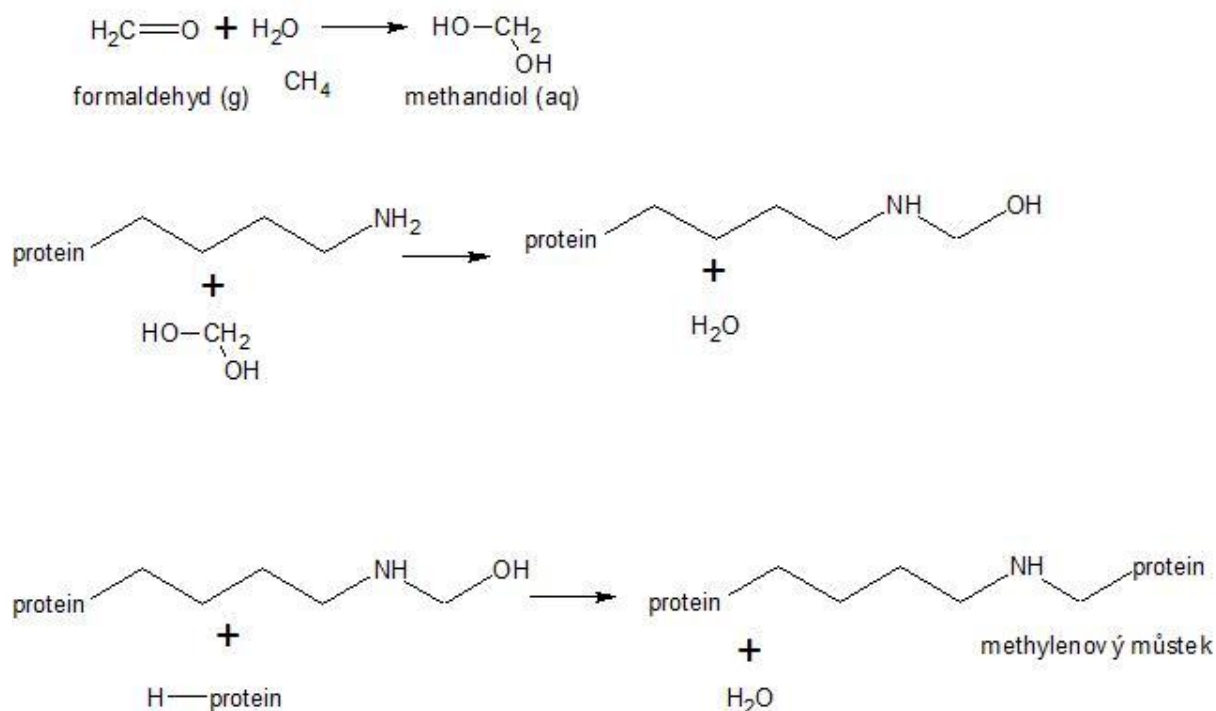
##### 2.1.1.1 Chemická fixace

Tkáň se buď ponoří do fixačního roztoku, nebo (jako v případě velkých kusů tkáně či celých orgánů) se roztok napustí do cévního systému (fixace perfuzí). Celý proces musí být reprodukovatelný. Volbu fixačního činidla dále ovlivňuje, pro jaký typ mikroskopu bude preparát určen, zda světelný nebo elektronový. Kvalita fixace je ovlivněna dobou mezi odebráním tkáně a fixací, která by měla být co nejkratší; pH (je pokud možno neutrální); osmolalitou (používají se isotonické roztoky, protože výrazně hypertonické roztoky vedou ke

smršťování buněk i celých tkání). Fixační roztok musí tkáň dobře a rychle prostoupit, přičemž prostupnost je ovlivněna velikostí částic, koncentrací a hustotou činidla. Je lépe používat větší objemy činidla (cca 25–50 krát převyšující objem vzorku), roztoku je možné během fixace i vyměnit [2].

#### 2.1.1.1.1 Fixační činidla

Z aldehydů se používají formaldehyd a glutaraldehyd, které způsobují propojení bílkovinných řetězců tvorbou methylenových můstků především u aminokyseliny lysinu. Ostatní složky buněčného obsahu se zachytí mezi sesíťované proteiny [3].



Obrázek 1 Fixace formaldehydem [3], [4]

**Formaldehyd**, štiplavý jedovatý plyn snadno rozpustný ve vodě, je asi nejčastěji používané fixační činidlo. Uchovává se ve tmavých lahvích jako 40% nasycený roztok formaldehydu ve vodě zvaný formol. Před použitím se ředí na 10% roztok formolu, tedy 4% roztok formaldehydu a k zabránění polymerizace se přidává methanol o koncentraci do 15%. Pufruje se na pH 7,2-7,4 pomocí dihydrogenfosforečnanu sodného a fosforečnanu sodného [5].

**Glutaraldehyd** funguje na stejném principu, ale můstky bývají stabilnější. Jeho 2% roztok se využívá pro fixaci preparátů určených pro elektronový mikroskop. U odběrů pro elektronový mikroskop nebývá cílem stanovení kompletnosti excise, problematikou zpracování pro elektronový mikroskop se dále nezabýváme.

Jako fixační činidla lze použít i alkoholy (především methanol a ethanol), která ale způsobují přílišnou křehkost tkáně, takže se pro fixaci větších kousků nepoužívají. Uplatnění najdou v cytologii např. při fixaci stěrů z děložního čípku [6].

Z organických kyselin se používá kyselina pikrová, která reaguje se zásaditými skupinami aminokyselin za tvorby nerozpustných pikrátů, čímž proteiny denaturuje.

Používají se i sloučeniny těžkých kovů (dichroman draselný a kyselina chromová, chlorid rtuťnatý a pro elektronovou mikroskopii oxid osmičelý). Sloučeniny chromu stabilizují bílkoviny a fosfolipidy, ale způsobují degradaci DNA. Používají se jen v kombinovaných fixačních roztocích. Chlorid rtuťnatý (sublimát) reaguje s –SH skupinami na aminokyselině cystein. Uvnitř vzorku ale tvoří amorfni sraženiny, což limituje jeho použití. Z oxidačních činidel se někdy využívá oxid osmičelý. Je rozpustný v polárních (vodných) a nepolárních rozpouštědlech. Šetrně stabilizuje proteiny uvnitř cytoplazmy a reaguje s fosfolipidy, kde propojuje lipidové řetězce v místech nenasyčených dvojných vazeb, čímž stabilizuje membránové struktury. Kromě fixace způsobuje i obarvení tkáně do tmavě hnědé, ale špatně proniká hluboko do tkáně, což limituje velikost vzorku na 1–2 mm<sup>3</sup> [6].

Používají se i standardizovaná směsná fixační činidla, např. Bouinova tekutina (roztok o složení 3 dílů kyseliny pikrové a 1 dílu formolu, vzorky zároveň fixuje a barví na žluto) nebo Zenkerova tekutina (5 g chloridu rtuťnatého, 1 g dichromanu draselného, 2,5 g síranu sodného a 91,5 g destilované vody, roztok je oranžové barvy, fixace probíhá 24 hodin a poté je nutné vzorek dalších 24 hodin promývat vroucí vodou).

Dalším standardizovaným roztokem je Methacarn, neboli směs tvořená ze 60% absolutním methanolem, ze 30% procent chloroformem a zbylých 10% je kyselina octová ledová. Výhodou je krátká doba fixace (4 hodiny stačí), ale dá se použít k uskladnění tkání i na několik týdnů.

Pro diagnostické účely spojené s hodnocením kompletnosti excise se používá prakticky výhradně fixace formaldehydem.

Ve fixačním roztoku vzorek obvykle stráví 12 – 24 hodin, poté se roztok ze vzorku vypírá pramenitou vodou [2].

### **2.1.2 Přikrajování**

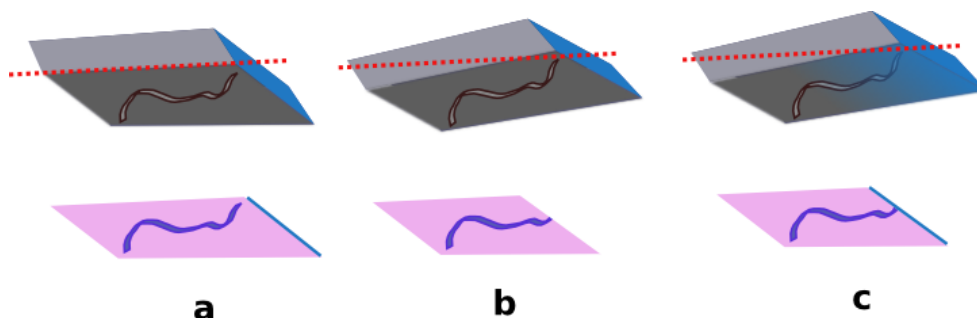
Drobné vzorky tkáně se zpracovávají celé, z větších se vykrajují reprezentativní kousky (tzv. prikrajování). A právě před prikrajováním bývá potřeba označit některou ze stran tak, aby bylo barvivo vidět na histologickém řezu. Pokud sledovaný jev zasahuje až do zbarveného okraje, je jasné, že zasahuje i do okraje odebrané tkáně a resekce byla nekompletní. Používá se tuš, která se sráží Bouinovým roztokem (roztok o složení 3 dílů kyseliny pikrové a 1 dílu formolu), který je v laboratoři obvykle přítomen jako fixační tekutina. Dále se dají použít práškové tetovací pigmenty pro označení vnějšího povrchu a nejrůznější barevné inkousty. [7]

### **2.1.3 Odvodnění a projasnění tkání**

Aby bylo možné tkáň sytit parafínem, je nejdřív potřeba ji odvodnit, což se dělá pomocí alkoholové řady o vzrůstající koncentraci (60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%). Jelikož parafín není rozpustný v alkoholu, tkáň vysušená alkoholem se dále sytí xylenem, který se mísí s alkoholem a rozpouští parafín [6].

## 2.1.4 Další postup

Vzorky jsou dále zalaty do parafinu a po ztuhnutí se mikrotomem krájí na 5–10 µm silné histologické řezy, které se následně připevňují na podložní skla. Poté se z preparátu opačným způsobem (xylen a sestupná řada alkoholů, zavodnění) odstraňuje parafin, aby se mohl barvit (barviva jsou ve vodě rozpustná) [6].



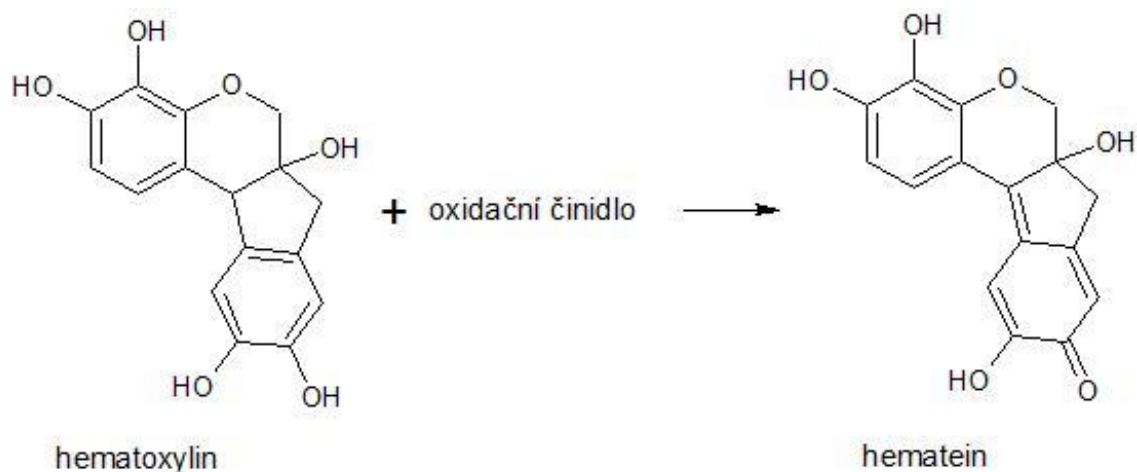
Obrázek 2 a) Bloček tkáně (nahore) má jednu stranu obarvenou. Rovina řezu je červeně. Dole je řez, obarvený, a je patrné zbarvení okraje. b) Tkáň v bločku je orientována šikmo, což se běžně stává. Řez je menší a není zde zachycený barvený okraj. Je tudíž jasné, že okraj řezu neodpovídá okraji excidované tkáně a je nutné zjednat nápravu (změna orientace tkáně, hlubší řezy). c) Situace jako u b), ale povrch tkáně je znečištěný barvivem i na řezné ploše, což se stane, pokud barvivo není zaschlé, koagulované nebo vhodně vybrané (běžná situace u tuší a komerčně dostupných barviv). Na řezu se znečištění projeví jako falešný okraj excise (což může vést k nesprávné indikaci dalších zákroků).

## 2.1.5 Barvení

Barvení je nezbytnou součástí přípravy preparátu. Obarvení buněčných struktur umožňuje rozeznat orgány a jiné buněčné struktury od sebe, jejich morfologii a eventuálně i patologii. Existuje mnoho metod barvení, z nichž nejvýznamnější a rutinně používaná je barvení hematoxylinem a eosinem. Výsledkem je obarvená tkáň, kde se DNA a RNA (jádro, ribozomy a endoplazmatické retikulum, mitochondrie) barví modro-fialově a cytoplazma a membrány se barví červeně nebo růžově. Z důvodu nutnosti obarvit velké množství preparátů se používají barvicí automaty [6].

### 2.1.5.1 Hematoxylin

Hematoxylin je přírodní barvivo původně z červeného jádrového dřeva jihoamerického stromu Kreveně obecné (*Haematoxylum campechianum*, *Fabaceae*), který je znám již od 16. století a dříve používán k barvení tkanin [8], [9]. Pro barvení preparátů je důležitá schopnost komplexů hematoxylinu s hliníkem barvit nukleové kyseliny na modro, především obsah buněčných jader, což umožňuje odhalit změny ve velikosti, uspořádání a tvaru chromatinu.



Obrázek 3 Hematoxylin

Samotný hematoxylin je bezbarvý a sám o sobě ani nebarví. Aby mohl fungovat jako barvivo, je potřeba vytvořit komplexy s hliníkatými kationty. Hematoxylin je nejdřív oxidován na žluto-hnědý hematein a ten poté tvoří komplexy s trojmocnými kationty kovů (nejčastěji hlinítkými, ale dají se použít i ionty železité a chromité).

Oxidace hematoxylinu probíhá i samovolně vzdušným kyslíkem, ale je to reakce pomalá (v řádu týdnů), takže se používají oxidační činidla jako jodid sodný NaI nebo oxid rtuťnatý HgO, od kterého se ale z ekologických důvodů spíše upustilo.

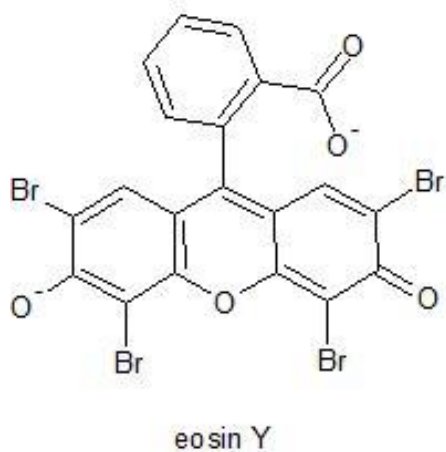
Jako zdroj hliníkatých kationtů slouží síran hliníkový  $Al_2(SO_4)_3$ , síran amonno-hliníkový  $AlNH_4(SO_4)_2$  nebo síran draselno-hliníkový  $AlK(SO_4)_2$ . Spolu s hemateinem vytváří hlinítký kation pozitivně nabitý komplex, jehož přesná struktura není dosud známa.

Tento komplex není příliš dobře rozpustný ve vodě, takže se do roztoků přidávají vícesytné alkoholy (nejčastěji ethylenglykol), které zvyšují stabilitu a prodlužují použitelnost roztoků.

Pozitivně nabitý hematoxylin (či přesněji komplexy hemateinu s hlinítkými ionty) se váže na DNA prostřednictvím elektrostatických sil k fosfátovým zbytkům v řetězci DNA. Aby se zabránilo vazbě (a barvení) jiných záporně nabitých molekul v buňce, snižuje se pH během barvení, což zařídí protonizaci těchto aniontů [6].

### 2.1.5.2 Eosin

Eosin je fluorescentní červené barvivo vzniklé reakcí bromu s fluoresceinem. Existují dvě velmi podobné sloučeniny, které se označují jako eosin a to slabě nažloutlý eosin Y (tetrabromderivát fluoresceinu) a slabě modrý eosin B (imperiální červeně, dibromdinitroderivát fluoresceinu). Obě barviva jsou vzájemně zaměnitelná a používají se ve formě vodných nebo alkoholových roztoků [6].



Obrázek 4 Eosin

### 2.1.5.3 Postup barvení

1. odstranění parafínu, zavodnění preparátu
2. barvení jader a jiných záporně nabitých struktur hematoxylinem, obarví se do červena
3. propláchnutí vodou
4. slabě zásaditý roztok způsobí zmodrání hematoxylinu
5. propláchnutí vodou a kontrola, jestli jsou jádra dostatečně kontrastní oproti pozadí
6. slabý alkoholový roztok způsobí odbarvení pozadí
7. propláchnutí vodou
8. barvení eosinem
9. propláchnutí vodou
10. vzestupná řada alkoholů
11. xylén
12. krycí sklíčko připevněné solakrylem nebo kanadským balzámem

## 2.2 Zpracování nefixované tkáně

Fixace formolem je výhodná i z dalších důvodů: tkáň není nutné zpracovávat okamžitě, je po fixaci pevnější a fixace inaktivuje převážnou část patogenů ve tkáni (bakterie, viry).

Nicméně kromě tkání fixovaných výše uvedenými způsoby je někdy nutné zpracovat tkáň nefixovanou. To nastává v situaci, kdy fixace destruuje látku, kterou ve tkáni chceme prokázat (například některé antigeny nebo nukleové kyseliny a dále denaturace poškozuje enzymy, které potom nelze použít pro histochemické reakce). Dále se někdy prokazovaná látka z tkáně při fixaci vyplaví (například některé komplexy antigen-protilátka).

Fixace se rovněž vynechává z časových důvodů (například diagnostické biopsie v průběhu operace).

Nefixovaná tkáň se zpravidla před krájením mrazí, zmražené řezy se lepí na sklíčka a dále zpracovávají.

Proto je žádoucí, aby (zejména u preoperačních biopsií) značení povrchu tkáně fungovalo i na čerstvé nefixované tkáni.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Při vyhledávání použitelných reakcí byla použita literatura zabývající se anorganickou a analytickou chemií a Český lékopis 2009, sekce zabývající se zkouškami totožnosti iontů a skupin [10] [11] a Lékárenské kontrolní karty, verze z roku 2003. Lékopis a kontrolní karty byly zvoleny především proto, že reakce jsou sestaveny tak, aby byly jednoduché na provedení i instrumentaci a výsledky byly jednoznačné a barevné. Byly zvoleny anorganické sloučeniny, aby se nerozpouštěly v xylenu a parafínu. Koncentrace roztoků vycházely z lékopisných zkoušek totožnosti iontů a skupin, ale požívali jsme koncentrace vyšší, protože na povrchu tkáně může docházet k naředění ve zbytku fixačního činidla [11]. Reakce byly vybírány s důrazem na jednoduchost provedení za běžné laboratorní teploty a maximálně dvoustupňový postup. Výsledné sloučeniny nesměly být rozpustné ani ve vodě ani v alkoholu o různé koncentraci. Práce probíhala v laboratořích firmy MDgK-plus spol. s.r.o., která se zabývá histopatologickou a cytologickou diagnostikou.

#### 3.1 Chemikálie

Dusičnan stříbrný p.a., Dr. Kulich Pharma, s.r.o. (ČR)

Kyselina dusičná, Fagron a.s. (ČR)

Fomatol LQN, Foma Bohemia spol. s.r.o. (ČR)

Chlorid železitý p.a., Fagron a.s. (ČR)

Hexakvanoželeznatan draselný p.a., Penta s.r.o. (ČR)

Síran železnatý p.a., Fagron a.s. (ČR)

Hexakvanoželezitan draselný p.a., Fagron a.s. (ČR)

Ag test, Likochem (ČR)

Chroman draselný p.a. Penta, s.r.o. (ČR)

Chlorid barnatý p.a., Dr. Kulich Pharma, s.r.o. (ČR)

Jodid draselný p.a., Fagron a.s. (ČR)

Heptahydrát síranu zinečnatého, p.a., Fagron a.s. (ČR)

Pentahydrát síranu měďnatého p.a., Fagron a.s. (ČR)

Uhličitan sodný p.a., Fagron a.s. (ČR)

Ethanol, Penta s.r.o. (ČR)

Xylen, Penta s.r.o. (ČR)

Hematoxylin

Eosin

#### 3.2 Přístroje

##### Mikroskop a kamera

Nikon 90i, motorový posun stolu Prior, řízení obrazová analýza LIM, skládání obrazů vlastní vývoj.

Objektiv VC PlanApo 20/0.75

## Zpracování tkání

Thermo Excelsior™ AS Tissue Processor

Thermo HM 450 Sliding Mikrotome

Thermo Gemini™ AS tissue stainer

Thermo ClearVue™ Coverslipper

### 3.3 Materiál

Jako testovací tkáň posloužily fixované žaludky s hladkým serózním povrchem.

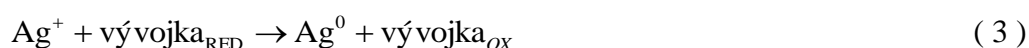
### 3.4 Metody

#### 3.4.1 Obarvení povrchu stříbrem

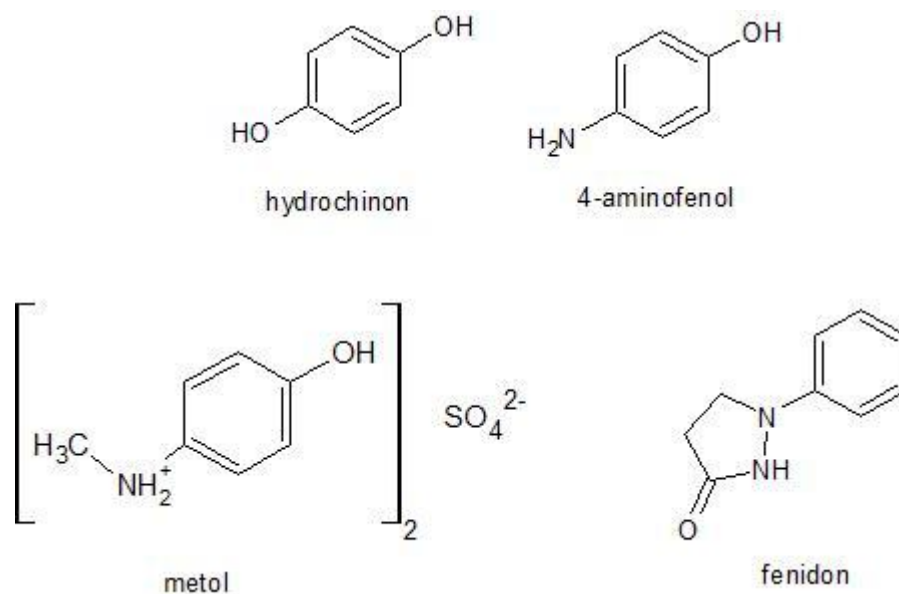
Barvení stříbrem je založeno na reakci dusičnanu stříbrného  $\text{AgNO}_3$  s chloridovými anionty běžně přítomnými ve všech tkáních. Stříbro je následně vyredukováno z chloridu stříbrného pomocí fotografické vývojky za použití reakcí a chemikálií známých z černobílé fotografie [12], [13].



Chlorid stříbrný je světlocitlivý, po osvitě se uvolňuje elementární stříbro. Proces černání je samovolný, ale lze jej urychlit fotografickou vývojkou, která redukuje další chlorid stříbrný na elementární stříbro. Dříve světlem uvolněné elementární stříbro funguje jako krystalická jádra. Ve fotografii je jednu chvíli fotografie už vyvolaná tak akorát a následně se přebytečný dosud nezreagovaný chlorid (obecně halogenid nejčastěji bromid) vymyje v tzv. ustalovači, což je roztok thiosíranu sodného  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  [14].



Jako redukční činidla se ve vývojkách používá hydrochinon, 4-aminofenol a jeho deriváty (metol, tedy hemisulfát N-methyl-4-aminofenolu) nebo fenidon (1-fenyl-3-pyrazolidinon). Tyto látky se samy oxidují a vyredukovávají stříbrné kationty na elementární černé stříbro, které je okem vidět [13].



Obrázek 5 Redukční činidla ve vývojkách

### Roztoky

- 0,5 M vodný roztok dusičnanu stříbrného okyselený 2–5 ml koncentrované kyseliny dusičné (68,4% HNO<sub>3</sub>) na 100 ml roztoku
- fotografická vývojka Fomatol LQN [15] ředěná 1:5 (tato vývojka obsahuje jako redukční činidlo hydrochinon a fenidon), ale použít se dá i jakákoli komerčně dostupná rychlá vývojka

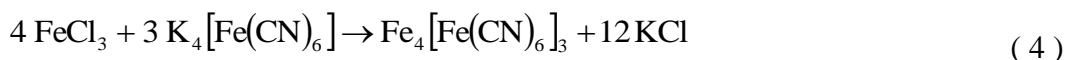
### Postup

1. Tkáň se po vyjmutí z fixační tekutiny osuší vatou.
2. Krátce se ponoří do roztoku dusičnanu stříbrného.
3. Opět se osuší vatou.
4. Poté se tkáň obvyklým způsobem přikrajuje na kousky vhodně veliké pro zpracování do parafinových bločků.
5. Následně se tyto kousky namočí do fotografické vývojky (zde Fomatol, ale použít se dá jakákoli komerčně dostupná rychlá fotografická vývojka), kde téměř okamžitě dojde k vysrážení elementárního stříbra a označení původního řezu (čímž se odliší od řezů vzniklých při přikrajování, které jsou nezbarvené). Vysrážené stříbro nemá sklon se rozmazávat, není ho nutné dále koagulovat a v dalším procesu je stálý.
6. Poté se tkáň opláchně ve vodě, ustalovač není nutný.
7. Tkáň se dále zpracovává obvyklým způsobem (vzestupná řada alkoholů, xylen, parafín, barvení...).

### 3.4.2 Obarvení povrchu berlínskou modří

Železité ionty reagují s žlutou krevní solí (hexakynoželeznan draselný, nově hexakyanidoželeznan draselný) K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] za vzniku výrazně modrého

hexakynoželezitanu železitého (nově hexakyanidoželezitanu železitýého)  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  (tzv. berlínská modř), který je viditelný pouhým okem [16].



#### Roztoky

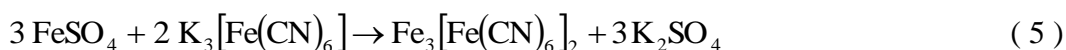
- 0,6 M vodný roztok chloridu železitého
- 0,3 M vodný roztok žluté krevní soli

#### Postup

1. Tkáň se po vyjmutí z fixační tekutiny osuší vatou.
2. Poté se ponoří do do roztoku chloridu železitého nebo žluté krevní soli
3. Opět se osuší vatou.
4. Tkáň se obvyklým způsobem přikrajuje na kousky vhodně veliké pro zpracování do parafinových bločků
5. Kousky tkáně se ponoří do roztoku žluté krevní soli nebo chloridu železitého (opačný roztok než při prvním máčení), aby došlo k vytvoření komplexu berlínské modři.
6. Opět se opláchně ve vodě.
7. Dále se tkáň zpracovává obvyklým způsobem.

#### 3.4.3 Obarvení povrchu Turnbullovou modří

Turnbullova modř je komplexní sloučenina podobná berlínské modři. Vzniká reakcí železnaté soli s červenou krevní solí (hexakynoželezitanem draselným, nově hexakyanidoželezitanem draselným). Výsledná sloučenina je výrazně modrý komplex hexakynoželezitan železnatý (nově hexakyanidoželezitan železnatý)  $\text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ .



#### Roztoky

- 0,6 M vodný roztok síranu železnatého
- 0,3 M vodný roztok červené krevní soli

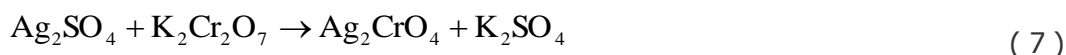
#### Postup

1. Tkáň se po vyjmutí z fixační tekutiny osuší vatou.
2. Poté se ponoří do do roztoku síranu železnatého nebo červené krevní soli
3. Opět se osuší vatou.
4. Tkáň se obvyklým způsobem přikrajuje na kousky vhodně veliké pro zpracování do parafinových bločků
5. Kousky tkáně se ponoří do roztoku červené krevní soli nebo síranu železnatého (opačný roztok než při prvním máčení), aby došlo k vytvoření komplexu Turnbullovy modři.
6. Opět se opláchně ve vodě.
7. Dále se tkáň zpracovává obvyklým způsobem.

### 3.4.4 Obarvení povrchu chromanem stříbrným

Chroman stříbrný je tmavě červená sloučenina prakticky nerozpustná ve vodě, rozpustná v kyselině dusičné a amoniaku [17]. Je toxický. K barvení chromanem stříbrným je možno použít několik postupů. Byla zkoušena i reakce již vyredukovaného stříbra na tkáň s tzv. kyselinou na stříbro a obarvení celého povrchu tkáně chromanem stříbrným za pomoci dusičnanu stříbrného.

Kyselina na stříbro je roztok dichromanu draselného v kyselině sírové. Byla zakoupena komerčně dostupná kyselina na stříbro *Ag test* od firmy Likochem. Kyselinu na stříbro ale lze i připravit, rozpuštěním 1,5 g dichromanu draselného v 16 ml destilované vody a následným okyselením 2 ml koncentrované kyseliny sírové. Stříbro reaguje s kyselinou sírovou za vzniku síranu stříbrného (reakce 5), který následně reaguje s dihydrogenem za vzniku chromanu stříbrného (reakce 6), který je červený (informace od firmy Likochem).



Metoda je myšlena jako doplněk k barvení stříbrem, kdy se na již obarveném černém povrchu vyznačí červeně specifická místa.

#### Roztoky

- kyselina na stříbro *Ag test* (Likochem)

#### Postup

1. Tkáň se obarví stříbrem jako v 3.1
2. Poté se kapátkem nanese na patřičná místa malé množství kyseliny na stříbro.

Další možností je obarvit na červenou větší plochu. Chroman draselný reaguje s dusičnanem stříbrným za vzniku červeného chromanu stříbrného [18].



#### Roztoky

- již používaný 0,5 M roztok  $\text{AgNO}_3$
- roztok chromanu draselného o třech koncentracích 0,25 M, 0,125 M, 0,05 M; kvůli toxicitě chromanu draselného jsme hledali nejnižší možnou koncentraci.

#### Postup

Pro větší názornost na větší ploše:

1. Na větší kus tkáně byl namalován pruh dusičnanem stříbrným
2. Osušeno vatou
3. Na stejné místo byl nanesen pruh chromanu draselného

A obvyklým způsobem:

1. Tkáň se po vyjmutí z fixační tekutiny osuší vatou.
2. Krátce se ponoří do roztoku dusičnanu stříbrného.
3. Opět se osuší vatou.
4. Tkáň se obvyklým způsobem přikrajuje.
5. Kousky tkáně se ponoří do roztoku chromanu draselného
6. Tkáň se osuší vatou a dál zpracovává obvyklým způsobem

### 3.4.5 Obarvení povrchu chromanem barnatým

Chroman barnatý je citrónově žlutá ve vodě nerozpustná sloučenina. V malířství je známý jako žlutý ultramarín. Je toxický. Pro přípravu jsem použila reakci [19].



#### Roztoky

- 0,25 M roztok chloridu barnatého
- roztok chromanu draselného o třech koncentracích 0,25 M, 0,125 M, 0,05 M

#### Postup

1. Tkáň se po vyjmutí z fixační tekutiny osuší vatou.
2. Poté se ponoří do do roztoku chloridu barnatého
3. Opět se osuší vatou.
4. Tkáň se obvyklým způsobem přikrajuje na kousky vhodně veliké pro zpracování do parafinových bločků
1. Kousky tkáně se ponoří do roztoku chromanu draselného
2. Opět se opláchnou ve vodě.
5. Dále se tkáň zpracovává obvyklým způsobem

Tkáň se nejdřív máčí v roztoku chloridu barnatého, protože jeho roztok je, na rozdíl od roztoku chromanu draselného, bezbarvý, ale vyzkoušen byl i opačný postup.

### 3.4.6 Obarvení povrchu jodidem stříbrným

Jodid stříbrný AgI je žlutá fotocitlivá sloučenina prakticky nerozpustná ve vodě, nerozpouští se ani v koncentrovaném amoniaku. Působením světla se barva mění se žluté na zelenošedou, což pro účel barvení tkáně nevádí, protože i tmavý proužek je na povrchu vidět [14].

Reakce:



nebo



## Roztoky

- již používaný 0,5 M roztok dusičnanu stříbrného
- 0,5 M roztok jodidu draselného

## Postup

1. Tkáň se po vyjmutí z fixační tekutiny osuší vatou.
2. Krátce se ponoří do roztoku dusičnanu stříbrného.
3. Opět se osuší vatou.
4. Tkáň se obvyklým způsobem přikrajuje.
8. Kousky tkáně se ponoří do roztoku jodidu draselného.
9. Tkáň se osuší vatou a dál zpracovává obvyklým způsobem.

### 3.4.7 Obarvení tkáně chromanem zinečnatým

Chroman zinečnatý je žlutý ve vodě nerozpustný pigment, známý též jako zinková žlut' [19]. Dříve byl používán v malířství. Časem mění barvu do zelena.



## Roztoky

- 0,25 M roztok síranu zinečnatého (bílé skalice)
- roztok chromanu draselného o třech koncentracích 0,25 M, 0,125 M, 0,05 M

## Postup

1. Tkáň se po vyjmutí z fixační tekutiny osuší vatou.
2. Poté se ponoří do do roztoku síranu zinečnatého
3. Opět se osuší vatou.
4. Tkáň se obvyklým způsobem přikrajuje na kousky vhodně veliké pro zpracování do parafinových bločků
5. Kousky tkáně se ponoří do roztoku chromanu draselného
6. Opět se opláchně ve vodě.
7. Dále se tkáň zpracovává obvyklým způsobem

Tkáň se nejdřív máčí v roztoku síranu zinečnatého, protože jeho roztok je, na rozdíl od roztoku chromanu draselného, bezbarvý.

### 3.4.8 Obarvení povrchu síranem barnatým

Síran barnatý je bílá, ve vodě prakticky nerozpustná sloučenina [20].



## Roztoky

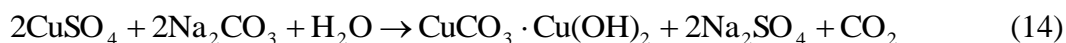
- 0,25 M roztok chloridu barnatého ( $\text{BaCl}_2$ )
- 0,25 M roztok síranu zinečnatého ( $\text{ZnSO}_4$ )

## Postup

1. Tkáň se po vyjmutí z fixační tekutiny osuší vatou.
2. Krátce se ponoří do roztoku chloridu barnatého.
3. Opět se osuší vatou.
4. Tkáň se obvyklým způsobem přikrajuje.
5. Kousky tkáně se ponoří do roztoku síranu zinečnatého
6. Tkáň se osuší vatou a dál zpracovává obvyklým způsobem

### 3.4.9 Obarvení povrchu uhličitanem měďnatým

Zásaditý uhličitan měďnatý  $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$  je modro-zelená ve vodě nerozpustná anorganická sloučenina. Vzniká reakcí uhličitanu sodného se síranem měďnatým ve vodném roztoku. V přírodě se vyskytuje jako nerost malachit [21].



## Roztoky

- 1M roztok modré skalice ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
- 1M roztok uhličitanu sodného

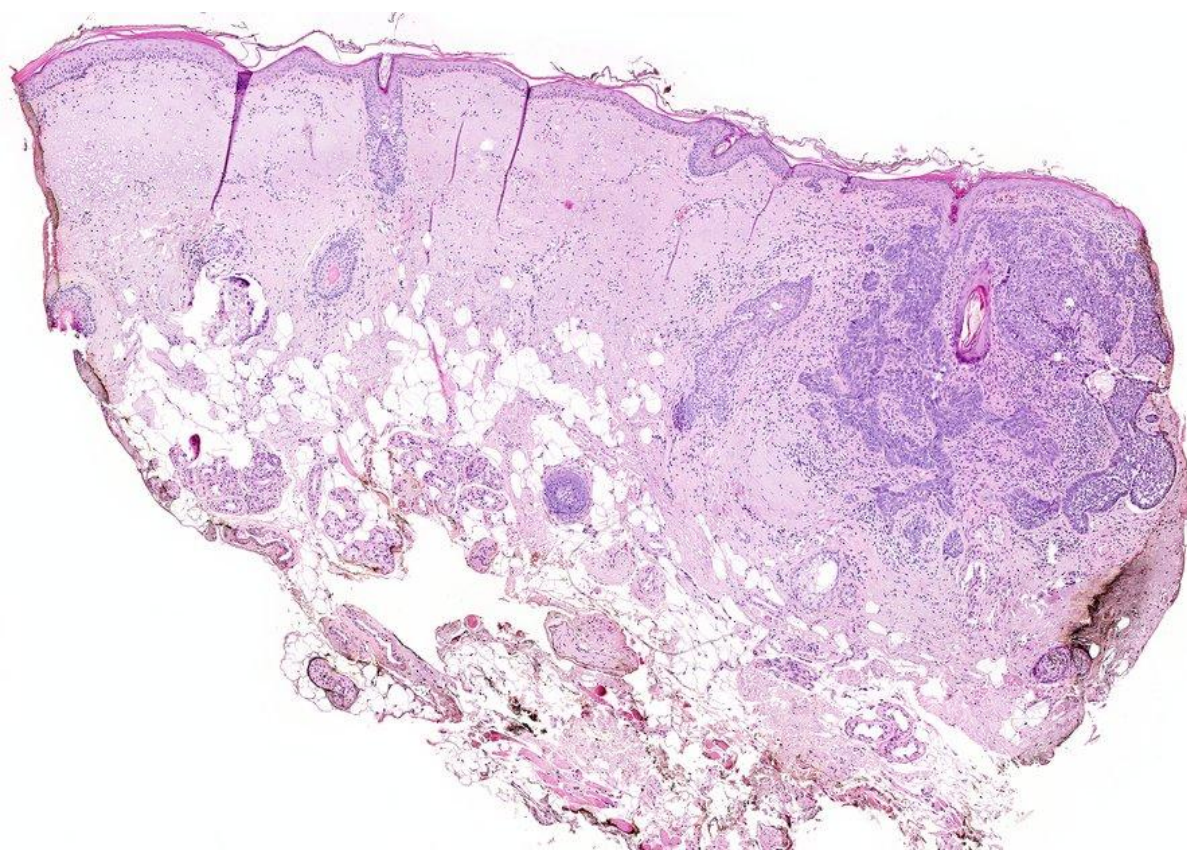
## Postup

1. Tkáň se po vyjmutí z fixační tekutiny osuší vatou.
2. Krátce se ponoří do roztoku uhličitanu sodného nebo modré skalice.
3. Opět se osuší vatou.
4. Tkáň se obvyklým způsobem přikrajuje.
5. Kousky tkáně se ponoří do modré skalice nebo uhličitanu sodného
6. Tkáň se osuší vatou a dál zpracovává obvyklým způsobem

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Obarvení povrchu stříbrem

Výsledkem stříbření okrajů tkáně je standardně vypadající preparát s tenkou tmavou linkou na části okraje tkáně. Stříbro je jen na povrchu, neproniká do hloubky a nešpiní řeznou plochu preparátu. Metoda je zvláště vhodná pro označování okrajů kožních tumorů, protože u těch je zvláště důležité zjistit, jestli tumor zasahuje do okraje excise nebo ne (pak není odstraněn celý). Naopak se nehodí k označování zánětlivých lézí, protože mívají difúzní charakter a jsou zpravidla rozsáhlé. Cílem zákroku nebývá odstranění léze, ale stanovení diagnózy. Barvení povrchu může interferovat s diagnózou (diagnostika povrchového plísňového onemocnění může být problematická, pokud stříbro pronikne mezi lamely keratinu a pro důkaz hub je potřeba provést impregnaci stříbrem).



*Obrázek 6* Na obrázku je kožní excize zachycující zhoubný kožní tumor – infiltrující bazaliom. Vlevo je nepostížené korium, vpravo vidíme nepravidelné modré čepy bazaliomu. Nahoře je epidermis, která se stříbí jen minimálně. Ostatní okraj je zabarven černě nebo černohnědě (stříbření). Vpravo vidíme, jak tumor zasahuje do nastříbřeného okraje, je tedy jednoznačné, že léze nebyla odstraněna celá a že bude nutné pacienta operovat znovu.

Barvení stříbrem ale není vhodné pro tkáň fixovanou Methacarnem (obsahuje chloroform, tedy další zdroj chloru jiný než chloridy tkáně samotné). Dále tato metoda není vhodná pro

tkáně s velkým množstvím cév a cévní tumory, protože dusičnan stříbrný proniká cévami příliš hluboko dovnitř tkáně.

Výhodou je, že až do umístění do vývojky tkáň nemění barvu, což usnadní orientaci patologovi při přikrajování. Stříbro zůstává pevně navázané na povrchu a nekontaminuje roztoky používané při zpracování (alkoholovou řadu, xylen), což je výhodné z ekonomického a provozního hlediska fungování laboratoře.

Nevýhodou je cena dusičnanu stříbrného a pracnost, pokud se ve vývojce koupe každý kousek tkáně zvlášť (lze eliminovat použitím kazet, které obsahují více kousků, a celá dávka se vyvíjí naráz).

## 4.2 Obarvení povrchu berlínskou modří

Metoda, kde dochází na povrchu odebrané tkáně ke sražení berlínské modří má nad tradičními postupy (tuš a komerčně dostupná barviva) podobné výhody jako dusičnan stříbrný. V první fázi se na povrch tkáně aplikuje hexakyanoželeznatan draselný a osuší, čímž se vzhled odebrané tkáně nijak nenaruší. Pak se odeberou vzorky a ponoří do roztoku chloridu železitého, přičemž berlínská modř vznikne jen na původním povrchu vzorku. Berlínská modř odolá dalšímu zpracování tkáně, nerozmažává se a nešpiní plochu řezu a je na histologickém řezu dobře patrná. Potřebné roztoky jsou levné, netoxické a snadno dostupné (reakce na berlínskou modř dle Perlse je běžně využívaná metoda na průkaz hemosiderinu ve tkáni a reagentie jsou proto dostupné v každé histologické laboratoři). Metoda splňuje požadavek na dvoufázové zpracování.

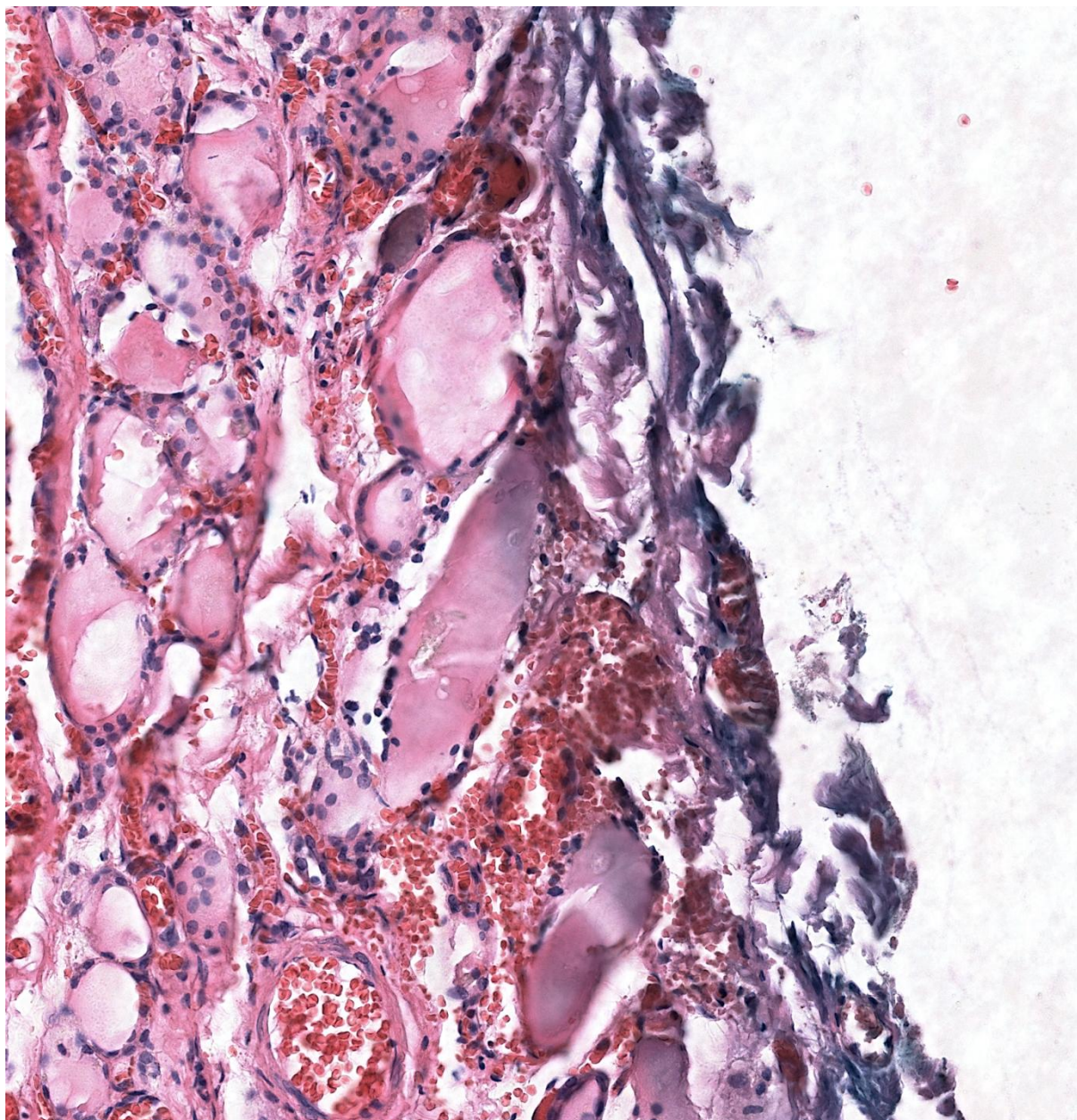


*Obrázek 7* Makroskopický snímek povrchu fixovaného orgánu (žaludek, seróza, tedy zvenku). Štětcem nanesený roztok žluté krevní soli, pak chlorid železitý. Vznikla berlínská modř.

Metoda byla posléze vyzkoušena v rutinním provozu. Její význam bude zřejmě hlavně pro barvení větších tkáňových vzorků (štítná žláza, prso, velké tumory), pro malé vzorky se zdá být vhodnější metoda s dusičnanem stříbrným. Metoda bude zavedena v laboratoři do rutinního provozu jako inovace pro následující akreditační řízení.



*Obrázek 8* Na obrázku je štítná žláza, nodulární struma. Povrch je zbarvený berlínskou modří. Řez barvený HE.



*Obrázek 9* Detail z obrázku 8. Berlínská modř zbarvuje zevní povrch resekatu

#### **4.3 Obarvení povrchu Turnballovou modří**

Výsledek je v podstatě totožný s barvením berlínskou modří. A jelikož je žlutá krevní sůl netoxická, zatímco červená ano, preferuje se barvení berlínskou modří. Na histologickém řezu je výsledek obou metod podobný.

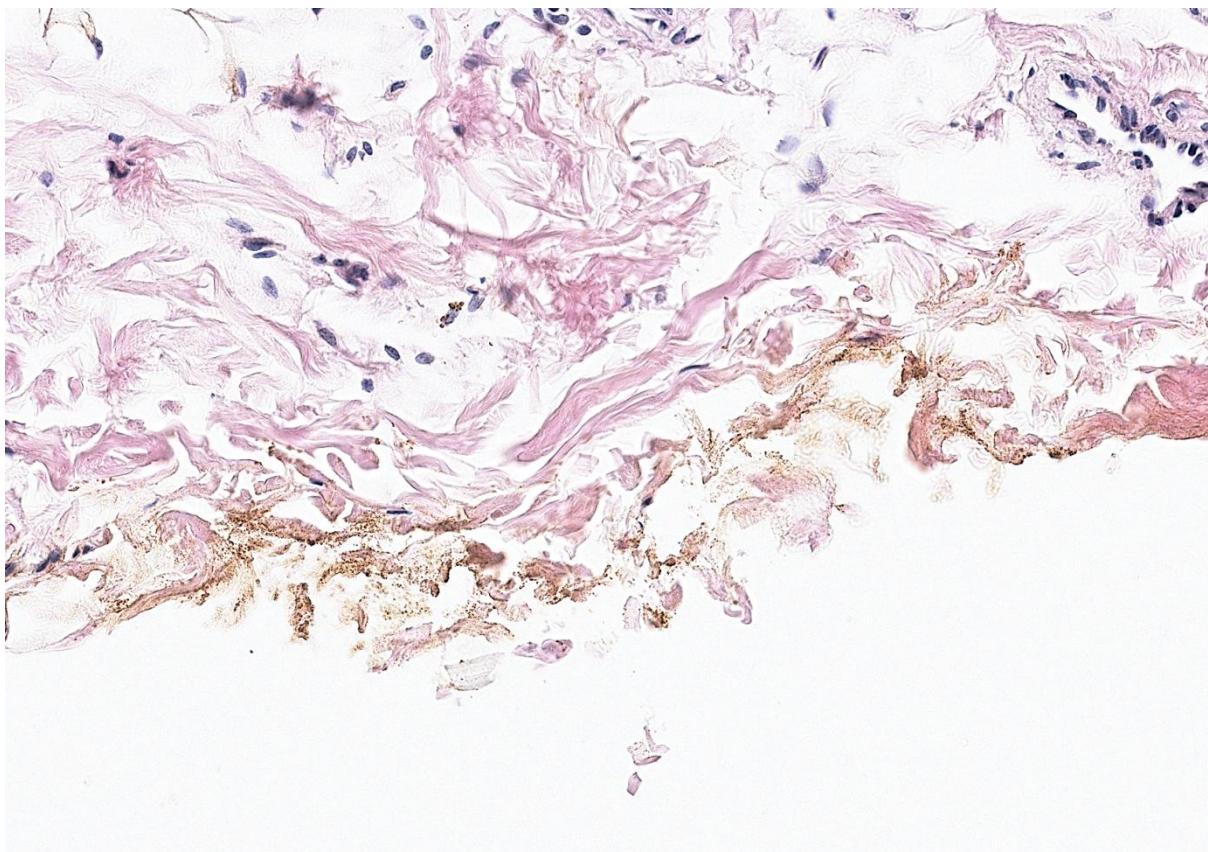
#### **4.4 Obarvení povrchu chromanem stříbrným**

Metoda se používá k testování pravosti (nikoli ryzosti) stříbrných šperků a slitků. Aby postup fungoval, musí být k dispozici dostatek stříbra. V případě stříbrných slitin, musí koncentrace stříbra být vyšší než 25%. V našem případě postup nefungoval, stříbra tedy nebylo na povrchu vyredukováno dostatečné množství. (zdroj: firma Likochem)

Druhý postup, při kterém se barví větší plocha a tkáň se máčí v roztoku dusičnanu stříbrného, na první pohled fungoval, na tkáni se vytvořil hnědo-oranžový pruh v místě, kam byly nanášeny chemikálie. Bohužel barvivo následné zpracování nevydrželo a na finálním preparátu už pod mikroskopem hnědo-červený chroman vidět není.



*Obrázek 10* Vzorek fixované tkáně. Makroskopický snímek povrchu fixovaného orgánu (žaludek, seróza, tedy zvenku). Štětcem nanášený roztok dusičnanu stříbrného, pak chroman draselný. Vznikl chroman stříbrný.



*Obrázek 11* Okraj tkáně barvené chromanem stříbrným, řez tkáně z obrázku 10 na histologickém řezu. Zbarvení není příliš výrazné, červené zbarvení není na histologickém řezu jednoznačné.

#### **4.5 Obarvení povrchu chromanem barnatým**

Metoda fungovala na skleněné misce a pracovní ploše kolem preparátu, ale chlorid barnatý na povrchu fixované tkáně nedržel a vždy se utřel. Nepomohl ani obrácený postup s chromanem, který sice při potřísnění do tkání proniká dobře, do fixovaných tkání ale ne. Trocha žlutého chromanu barnatého se udržela v záhybech tkáně, ale nebylo to zbarvení trvalé a neodolalo následnému promývání v alkoholech.

#### **4.6 Obarvení povrchu jodidem stříbrným**

Barvení jodidem stříbrným fungovalo částečně, ale barva byla velmi nevýrazná a na povrchu příliš dobře nedržela. Navíc je jodid stříbrný světlocitlivý a časem by sejně došlo k vyredukování černého stříbra, dost možná že ještě v průběhu zpracování a pod mikroskopem by tak byl viditelný stejný stříbrný proužek, jako když se barví stříbrem rovnou.

#### **4.7 Obarvení povrchu chromanem zinečnatým**

Nefungovalo ani barvení chromanem zinečnatým, ani chroman ani síran zinečnatý opět nepronikly do povrchu tkáně a při zpracování se utřely. Povrch tkáně je příliš pevný a hladký a zřejmě je pro chemikálie obtížně prostupný.

#### **4.8 Obarvení povrchu síranem barnatým**

Barvení síranem barnatým taktéž nefungovalo, protože žádný z roztoků se na povrchu tkáně nezachytil.

#### **4.9 Obarvení povrchu uhličitánem měďnatým**

Toto barvivo se zpočátku jevílo atraktivně jednak kvůli barvě a jednak proto, že suroviny jsou snadno dostupné, levné a netoxické. Bohužel, ani roztok síranu měďnatého ani uhličitánu nepronikaly do tkáně a z povrchu se utřely.

## 5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo najít novou jednoduchou, dvoustupňovou metodu pro barvení povrchu tkáně pro histopatologická vyšetření vhodnou pro rutinní použití. Taková metoda byla nalezena v podobě barvení povrchu berlínskou modří. Toto barvivo se na povrch tkáně váže pevně, nevymývá se, je dobře viditelné, zpracování je dvoustupňové a ani jeden z výchozích roztoků není výrazně barevný, což by komplikovalo přikrajování.

Dále byla hledána barviva, která by se dala vzájemně kombinovat, aby možné barvit různé části tkáně různým způsobem. To je důležité v situaci, kdy je nutné odebranou tkáň správně orientovat a přesně stanovit místo přesahu tumoru mimo odebranou tkáň. (Pokud například klinik odebírá kůži s tumorem pod okem a označí jednotlivé strany odebraného vzorku a potřebuje dostat odpověď typu: tumor zasahuje do okraje odebrané tkáně ve střední části resekátu směrem k oku. V takovém případě rozšíří výkon a odebere další tkáň jen v udaném směru. Toho nelze bez různých zabarvení dosáhnout.

Pokusem o takovou metodu bylo obarvení postříbřeného povrchu kyselinou na stříbro (roztok chromanu draselného okyselený kyselinou sírovou). Metoda bohužel nefungovala, zřejmě proto, že stříbra bylo na povrchu tkáně vyredukované příliš malé množství na to, aby reakce s chromanem proběhla a byla dostatečně výrazná.

Obecně je fixovaná tkáň obtížný materiál k barvení. Seróza na povrchu je hladká, tkáň je celkově tuhá a prostoupena formolem. pH je proměnlivé (záleží, jaký formol klinik použil). Roztoky určené k barvení se na povrchu tkáně dále ředí a často dochází k jejich úplnému setření během zpracování. Situaci dále ztěžuje požadavek na rychlost a jednoduchost, bioptická laboratoř zpracovává velké množství vzorků, proces musí být rutinní.

## 6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] ROSS, M. H. a W. PAWLINA. *Histology: a text and atlas : with correlated cell and molecular biology*. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams, 2011, p. 2-13. ISBN 1451101503.
- [2] ELTOUM, I., J. FREDENBURGH, R. B. MYERS a W. E. GRIZZLE. Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues. *Journal of Histotechnology*. 2001, **24**(3), p. 173-190. DOI: 10.1179/014788801794812426.
- [3] THAVARAJAH, R., V. K. MUDIMBAIMANNAR, U. K. RAO, K. RANGANATHAN a J. ELIZABETH. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2012, **16**(3), p. 400-405. DOI: 10.4103/0973-029X.102496. ISSN 0973-029x.  
Dostupné také z: <http://www.jomfp.in/text.asp?2012/16/3/400/102496>
- [4] SOMPURAM, S. R., K. VANI, E. MESSANA a S. A. BOGEN. A Molecular Mechanism of Formalin Fixation and Antigen Retrieval. *American Journal of Clinical Pathology*. 2004, **121**(2), p. 190-199. DOI: 10.1309/brn7-ctx1-e84n-wwpl.
- [5] FOX, C. H., F. B. JOHNSON, J. WHITING a P. P. ROLLER. Formaldehyde fixation. *Journal of histochemistry and cytochemistry*. Stanford: HighWire Press, 1985, **33**(8), p. 845-853. ISSN 1551-5044.
- [6] BANCROFT, J. D. a M. GAMBLE. *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2008, p. 56-63. ISBN 0443102791.
- [7] WESTRA, W. H. General Approach to Surgical Pathology Specimens. **In:** WESTRA, W. H., R. H. HRUBAN, T. H. PHELPS a C. ISACSON. *Surgical pathology dissection: an illustrated guide*. 2nd ed. New York: Springer, 2003, p. 2-13. ISBN 0-387-95559-3.
- [8] TITFORD, M. The long history of hematoxylin. *Biotechnic*. 2005, **80**(2), 73-78.  
DOI: 10.1080/10520290500138372.  
Dostupné také z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/10520290500138372>
- [9] PEYCHL, L. Kreveň obecná, dárce hematoxylinu. *Česko-slovenská patologie*. 2000, **36**(3), 126-127.
- [10] Zkoušky totožnosti. **In:** *Český lékopis 2009: (ČL 2009) = Pharmacopea bohemica MMIX : (Ph.B.MMIX)*. První vydání. Praha: Grada, 2009, s. 163-167.
- [11] Zkoumadla. **In:** *Český lékopis 2009: (ČL 2009) = Pharmacopea bohemica MMIX : (Ph.B.MMIX)*. První vydání. Praha: Grada, 2009, s. 448-603.

- [12] FEIT, J. Značení resekcčních okrajů tkáně stříbřením. *Česko-slovenská patologie*. 2005, **41**(3), 115-117.
- [13] POLÁŠEK, J. *Amatérská fotografie a fotografika*. 2. dopl. vyd. Praha: Merkur, 1990. ISBN 80-703-2456-2.
- [14] REMY, H. Použití halogenidů stříbra ve fotografii. **In:** REMY, H. *Anorganická chemie: II. díl. 2. vyd.* Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1972. Řada chemické literatury, 1971, s. 412-413.
- [15] *Bezpečnostní list výrobku Fomatol LQN*. FOMA BOHEMIA, s.r.o. [online]. 2009 [cit. 16. 5. 2016].  
Dostupné z: <http://fomaobchod.cz/inshop/files/70003/FOMATOL-LQN%20%20%20PL.pdf>
- [16] GREENWOOD, N. a A. EARNSHAW *Chemie prvků*. Praha: Informatorium, 1993, s. 1351-1352. ISBN 80-85427-38-9.
- [17] REMY, H. Sloučeniny chromové. REMY, H. **In:** *Anorganická chemie: II. díl. 2. vyd.* Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1971, s. 178-182.
- [18] PERRY, D. L. *Handbook of inorganic compounds*. 2nd ed. Boca Raton: Taylor, 2011, s. 366. ISBN 9781439814611.
- [19] ŠULCOVÁ, P. *Vlastnosti anorganických pigmentů a metody jejich hodnocení*. 2. vyd. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2008, s. 41. ISBN 978-80-7395-057-6.
- [20] VOHLÍDAL, J. a K. ŠTULÍK. *Chemické a analytické tabulky*. 1. vyd. Praha: Grada, 1999. ISBN 80-716-9855-5.
- [21] REMY, H. Měď. **In:** REMY, H. *Anorganická chemie: II. díl. 2. vyd.* Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1971, s. 378.