



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Poškození tkáňových vzorků při zpracování tkáňovým automatem

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Klára Řehořová

Vedoucí práce: MUDr. Luděk Baumruk

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Poškození tkáňových vzorků při zpracování tkáňovým automatem“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14.8. 2017

.....

Klára Řehořová

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu primáři MUDr. Ludřkovi Baumrukovi vedoucímu mé bakalářské práce, za odborné vedení a cenné rady, které mi pomohly zpracovat tuto bakalářskou práci. Mé poděkování patří též slečně Gabriele Kočové DiS.za její pomoc a trpělivost a celému týmu Patologicko-anatomického oddělení ON Příbram a.s.

Poškození tkáňových vzorků při zpracování tkáňovým automatem

Abstrakt

Tato práce se zabývá zpracováním tkání v karuselovém tkáňovém procesoru a řeší problematiku poškození tkání, které mohou nastat při nesprávném dodržování základního postupu v laboratoři a zacházení tkání v procesoru. Zaměřila jsem se na několik hypotéz, které se v této práci budu snažit objasnit a docílit správného výsledku. Cílem práce je prokázat provedenými pokusy, ve které fázi zpracování tkáňových vzorků v karuselovém procesoru může dojít k závažnému poškození tkání. K řešení hypotéz jsem si vybrala několik tkáňových vzorků. Použity byly vzorky z klinických pracovišť a vloženy do nádobek s fixační tekutinou, tak jak je vedeno v běžných podmínkách praxe, tím pádem je vyloučena možnost, že mohlo dojít k poškození tkáně již ve fixační tekutině. K řadě pokusů byly použity tzv. zbytkové materiály tkání, ze kterých se zhotovily tkáňové bloky a vloženy do karuselového autotechnikonu značky Histomaster DDM – P800, který má jasně stanovený základní program pro naši laboratoř. V řešení pokusů bylo použito postupu k docílení a k zjištění problému, kde může docházet k poškození tkáňových vzorků. K poškození tkáňových vzorků může docházet např. jsou-li vynechány některé fáze, záměna fází, vysychání či zkrácená nebo naopak prodloužená doba vzorku v karuselovém procesoru. Provedeným výzkumem se zjistilo, že za poškození tkání může vysychání vzorku prosyceného acetonem. Hlavním zjištěním, že poškodit tkáně je velmi obtížné a správně fixovaná tkáň je velmi odolná.

Klíčová slova

Karuselový procesor; vzorky; fixovaná tkáň; pokusy; autotechnikon.

Damage to Tissue Specimen During Processing in Tissue Automat

Abstract

This work is engaging with processing of tissues in the Carusel tissue processor and solves problems of tissues damage, which can set in at incorrect keeping of a process in a laboratory and a treatment of tissues in the process. I concentrated on many hypotesis, which i will try to explain and achive a right results in this work. The goal of this bachelor is ploving by the executed attemps, in which phase of the processing of the tissue samples in the Carusel processor it can happen important damage of the tissues. I chose some tissues samples. The samples were used to use from clinical workplaces and they put in to cells with a fixation liquid, as it is guied intender conditions of a practice, so there is a already in the fixaton liquid. Left-over materials of tissue used to lines from which tissue block manufactured and took to the Carusal autotechnic by a mark Histamster DDM-P800, which has clearly specified a basic program for the our laboratory. In a solution of experiment used a procedur to a detection and a achivement of problems, where many occer to the damage of the tissue samples. To the damage of the tissue samples. To the damage of the tissue samples may occur for example: if some phases imitted, confusion of the phases, drying out or abridgment or the contrary an extended time of the samples in the Carusel processor. It discovered, that the tissue damage could cause the drying out by saturated acetone by the experiment. The main discovery is, that the damage of the tissue is very pestilentialamd the right fixed tissue is very resistant.

Kay words

Carusel processor; samples; fixed tissue; experiments; autotechnic.

Obsah

Úvod.....	8
Postup při zpracování bioptických vzorků.....	10
Histologická laboratoř Patologicko-anatomického oddělení ON Příbram a.s.	10
Histologie.....	10
Základní postupy při tvorbě histologických preparátů	11
Prosyncovací média a zalévací média	16
Odvodňovací a zalévací automaty	16
Krájení	17
Barvení.....	18
Montování řezů	20
Charakter poškození tkání	21
Možné příčiny poškození tkání – vypracované hypotézy.....	28
Metodický postup k ověření hypotéz.....	29
Výběr vzorků	29
Příprava tkáňových bloků (přikrojení).....	30
Zpracování tkáňových bloků v tkáňovém automatu.....	31
Zalévání tkáňových bloků do parafínu (zhotovení parafinových bloků).....	32
Zhotovení preparátů.....	32
Hodnocení preparátů.....	33
Pokusy k ověření hypotéz.....	34
Ověření hypotézy č. 1	35
Ověření hypotézy č. 2	36
Závěr	43
Seznam literatury	44
Seznam obrázků.....	46

Seznam příloh	46
Seznam použitých zkratk	47
Příloha - galerie obrázků.....	48

Úvod

Bioptické vyšetření, tj. kompletní posouzení vzorků odebraných pacientovi má i přes rozvoj dalších vyšetřovacích metod nadále důležitou roli při stanovení diagnózy. Význam tohoto vyšetření se v současné době naopak zvyšuje v souvislosti s individualizací léčby, neboť z odebraného zpracovaného vzorku je možné provést další doplňující vyšetření molekulárně-genetická, a to i zpětně po více letech.

Odběr vzorku není vždy jednoduchou záležitostí, může být pro pacienta zatěžující a odběr někdy nelze opakovat. Je proto mimořádně důležité, aby při zpracování vzorku nedošlo k jeho poškození či dokonce znehodnocení.

Prvním krokem ve zpracování fixovaného tkáňového vzorku je prosycení tkáně parafínem, který nahradí vodu obsaženou původně ve tkáni. Tento proces probíhá v autotechnikonu (tkáňové procesoru) a je v podstatě neopakovatelný, chyby které zde vzniknou, jsou proto většinou nevratné.

Technika zpracování vzorku v autotechnikonu je detailně rozpracována a postupuje se dle mezinárodně stanovených standardů, což by mělo zaručit bezchybné zpracování tkání. I při pečlivém dodržování stanovených postupů dochází bohužel někdy k poškození tkání, někdy i nevratnému.

Existuje závažný typ poškození tkáně, který následné hodnocení mikroskopických změn velmi ztěžuje či přímo znemožňuje a často znemožňuje i doplňující vyšetření imunohistochemická a molekulárně-genetická. Při tomto poškození dochází ke „ztvrdnutí“ tkáně obsažené v parafínovém bloku, krájení řezů je pak proto obtížné, řezy jsou potrhané a silné a nedrží na podložním sklíčku, na nabarvených preparátech je původní struktura obtížně rozpoznatelná, v krajních případech zcela setřená a nehodnotitelná, jednoznačnou diagnózu obvykle nelze stanovit. K tomuto typu poškození dochází naštěstí výjimečně, došlo k němu však opakovaně v různých laboratořích, včetně té v které pracuji. K tomuto poškození tkání v naší laboratoři došlo v roce 2013 a 2015, obrázky preparátů zhotovených z poškozených tkání jsou uvedeny níže.

V dostupné literatuře ani z informací získaných od kolegů jsme nenalezli jednoznačné vysvětlení, čím je daný typ poškození způsoben. Faktem je, že při rutinním provozu,

není možné detailně pátrat, jak k poškození došlo. Obvyklý postup je, že se provede technická kontrola tkáňového procesoru a vymění se používané chemikálie.

Účelem této práce bylo pokusit se objasnit, při kterém kroku při zpracování tkání v tkáňovém karuselovém procesoru by mohlo k tomuto nevratnému poškození tkání dojít a proces záměrně napodobit. Byly stanoveny dvě možné hypotézy vysvětlující poškození, obě byly sérií pokusů ověřeny.

Postup při zpracování bioptických vzorků

V části věnující se vlastní práci se odvolávám na řadu pojmů a postupů týkajících se zpracování bioptických vzorků. Dovoluji si je v následujícím textu stručně vysvětlit. Uvádím zde i údaje o laboratoři, v níž pracuji a kde byla praktická část práce provedena.

Histologická laboratoř Patologicko-anatomického oddělení ON Příbram a.s.

Naše histologická laboratoř je součástí Patologicko-anatomického oddělení Oblastní nemocnice Příbram a.s.. Laboratoř se zabývá zpracováním vzorků bioptických včetně peroperačních vyšetření, dále vzorků nekroptických (tkáňové vzorky odebrané z těla zemřelého při pitvě) a vzorků cytologických. Prostorové uspořádání, technické a personální vybavení splňuje požadovaná kritéria pro akreditaci (laboratoř splnila požadavky NASKLu a získala osvědčení o splnění podmínek Auditu II dle požadavků NASKLu.

Laboratoř přijímá vzorky jak z nemocnice, jejíž je součástí (Oblastní nemocnice Příbram a.s.), tak i ze soukromých ordinací lékařů ze spádové oblasti Příbramska.

Laboratoř provádí bioptická vyšetření všech orgánových soustav. Naše laboratoř není vybavena prostředky pro imunohistochemická vyšetření. Ty jsou prováděny na specializovaných pracovištích společně s molekulárně-genetickými vyšetřeními, pokud jsou nutná pro stanovení diagnózy.

Histologie

Histologie je vědní obor zabývající se mikroskopickou stavbou organismu. Histologie přispěla a přispívá k poznání mikroskopické stavby tkání, které tvoří orgány a tím přispěla a přispívá k pochopení jejich funkce. Dokonalá znalost normální mikroskopické struktury tkáně umožňuje rozpoznat patologické změny (Vacek, 1996).

Histologické vyšetření od pacientů odebraných vzorků tkáně (bioptické vyšetření) bylo a zůstává důležitou součástí laboratorního vyšetření a jeho význam se stále zvyšuje v souvislosti se zaváděním nových metod. Výsledek bioptického vyšetření je považován

za jednoznačný, pro stanovení diagnózy rozhodující a často již dalšími metodami není ověřován.

Základní postupy při tvorbě histologických preparátů

Průchod vzorku laboratoří

1. Odběru vzorků probíhá na jednotlivých odděleních ON Příbram a.s., případně v soukromých ordinacích. Odebraný materiál je v případě bioptického vzorku (vyšetření cytologická a nekrotická ponechávám stranou) je odebírajícím lékařem umístěn do nádoby s pufrovaným 4% formaldehydem. Nádoba musí být označena jménem, příjmením a rodným číslem pacienta. Ke každému odebranému vzorku musí být vyplněn průvodní list k bioptickému vyšetření – ten musí obsahovat základní údaje o pacientovi, jméno lékaře požadujícího vyšetření, adresu jeho pracoviště a další údaje týkající se onemocnění pacienta a speciálních požadavků lékaře (Laboratorní příručka).
2. Doručení vzorků je záležitostí odebírajícího pracoviště (pověřená osoba, sanitní vůz, pošta).
3. Příjem vzorků. Při přijetí vzorků je provedena kontrola souhlasu údajů na nádobce s materiálem a na průvodním listu, kontrola toho, zda nádoba opravdu obsahuje materiál – vzorek.
4. Po přijetí vzorku je tomuto přiděleno jedinečné, nezaměnitelné číslo vyšetření. Tímto číslem je označena nádoba se vzorkem i bioptická průvodka. Pod přiděleným číslem je učiněn záznam do příjmové knihy biotických vyšetření a do LIS.
5. Přikrojení. Jde o zpracování přijatého materiálu: Materiál je makroskopicky posouzen a popsán, rozhodne se o odběru reprezentativních částí. Tyto odebrané reprezentativní části materiálu se označují jako tkáňové bločky. Tloušťka tkáňových bloků je obvykle 2-3 mm, tvar závisí na druhu zpracovávané tkáně, je-li původní vzorek velký jsou odebírány části o rozměrech cca 10x10 mm. Podrobná metodika odběru tkáňových bloků je složitá.

Každý zhotovený tkáňový blok je uložen do plastové krabičky (kazety) s pevně uzavíratelným víčkem. Na části kazety k tomu určené se kazeta označí přiděleným jedinečným číslem bioptického vyšetření.

V průběhu přikrojení je odebraný vzorek doprovázen průvodkou (při přikrojení se znovu kontrolují údaje na nádobce a na průvodce). V další fázi zpracování vzorků tyto procházejí laboratoří již pouze pod přiděleným číslem, průvodka se přiřadí, až ke zhotoveným preparátům.

6. Prosycení tkáňových bloků parafínem. V tomto kroku je voda obsažená ve tkáni (resp. již fixační tekutina) nahrazena parafínem, principem procesu je, že voda je nejprve nahrazena alkoholem, alkohol acetonem, aceton xylenem, xylene rozpuštěným parafínovým voskem.

Proces probíhá obvykle automaticky v tzv. tkáňových automatech (autotechnikonech, tissue procesor). Tato fáze zpracování je velmi citlivá, poškození tkáně, pokud k němu dojde, bývá nevratné.

7. Zhotovení parafínových bločků tzv. zalévání. Proces probíhá v tzv. parafínové lince. Tkáňové bločky prosycené parafínem jsou vyňaty s kazety a umístěny do kovové formičky, na tuto formičku se přiloží shora kazeta (táž ve které byl vzorek umístěn, tedy označená číslem bioptického vyšetření). Kazeta i formička se následně vyplní rozpuštěným parafínovým voskem. Po zatuhnutí parafínu je kovová odstraněna, kazeta vyplněná parafínem a na ní nasedající tkáňový bloček v bloku parafínu se označují jako parafínové bločky.

8. Krájení parafínových bloků. Při tomto kroku jsou ze tkáně zalité v parafínu zhotoveny tenké řezy (2-3 μm silné). Tyto řezy obsahující tkáň prosycenou parafínem a okolní parafín bloku se zachytí na podložní sklíčko. Ke krájení slouží přístroje označované jako mikrotomy. Podložní sklíčko, na němž je řez zachycen musí být označeno jedinečným číslem bioptického vyšetření. Krájející laborantka je povinna kontrolovat číslo krájeného bločku a číslo podložního sklíčka (z parafínového bločku se obvykle zhotovuje více řezů).

Podložní sklíčko s nalepeným parafínovým řezem se označuje jako parafínový řez.

9. Barvení. Zhotovené parafinové řezy jsou nabarveny. V principu dochází nejprve k odparafinování řezů (parafin prosycující tkáň je nahrazen vodou, jde o opačný postup než při zhotovování parafinového bloku), poté je provedeno vlastní barvení, z nabarvených preparátů je následně odstraněna voda a je nahrazena xylenem. Vždy se provádí základní barvení HE, v případě potřeby je část parafinových řezů barvena jinou metodou barvení.

Základní barvení se provádí v barvicím automatu (ruční barvení je ovšem možné).

10. Montování. Při tomto kroku je nabarvený řez překryt krycím sklíčkem, přilnutí sklíčka ke tkáňovému řezu je zajištěno montovacím médiem (místo dříve používaného kanadského balzámu se dnes používají média syntetická, v naší laboratoři konkrétně Neo-mount® firmy Merck. Zakrytím nabarveného řezu krycím sklíčkem vzniká hotový nabarvený histologický preparát.

11. Odečítání. Tímto pojmem je míněno prohlédnutí a hodnocení preparátů pod mikroskopem se stanovením diagnostického závěru. K odečítání jsou preparáty umístěny do tzv. „deklů“ a jsou připojeny průvodní listy.

12. Archivace. Zhotovené preparáty se uchovávají po dobu pěti let, zhotovené parafinové bločky se uchovávají trvale.

K výše uvedeným pojům uvádím další podrobnosti.

Fixace

Fixace je důležitý proces při zpracování vzorků. Při fixaci dochází k zabránění znehodnocení samotného vzorku autolytickými procesy. Autolýza nastává po smrti organismu působením buněčných enzymů. Autolýza je proces, který mění strukturu buněk a má vliv na jejich barvitelnost. Změny buňky mohou způsobit i jiné vlivy než autolýza, jde zejména o působení bakterií a plísni (Jirkovská, 2006).

Fixační prostředky musí splňovat několik podmínek. Tyto prostředky musí rychle pronikat do tkáně, zároveň musí co nejlépe zachovat strukturu tkání a musí umožnit barvitelnost tkáně.

Existují dva druhy fixace, fyzikální a chemická fixace:

Fyzikální metody fixace

Fyzikální metody nejsou v histologii moc rozšířené. Jsou náročné na vybavení a velmi často dochází k poškození struktury tkáně. Nejčastěji používanou fyzikální metodou je tzv. freezing-drying (vysoušení za mrazu). Tato metoda je vhodná pro průkaz lipidů, enzymů či při imunohistochemickém vyšetření vzorků (Jirkovská, 2006).

Poměrně novou fyzikální metodou je použití mikrovlnného záření. Tento řízený proces je velmi šetrný ke tkáni a zachovává i barvitelnost (Jirkovská, 2006).

Fyzikální metody jsou používány hlavně pro vyšetření peroperačních biopsií, kde je nutné stanovit diagnózu v co nejkratším čase a rychlá fixace fyzikální metodou je tedy velmi vhodná.

Chemické metody fixace

Chemické metody fixace jsou velmi používané a to zejména z důvodu nízké ceny a jednoduchosti. Fixuje se roztokem jedné, nebo několika chemických sloučenin, tzv. fixační tekutinou. Možnou nevýhodou je délka fixace, která je závislá na mnoha faktorech. Velikosti tkáňového vzorku, teplotě fixace, množství fixační tekutiny (Vacek, 1996). Nejvýhodnější doba fixace pro běžné zpracování vzorků je 24 hodin (Jirkovská, 2006).

Druhy fixačních tekutin:

Formol

Formol je nejpoužívanější fixační tekutina. Používá se nejčastěji v koncentraci 10% (4% formaldehyd). V laboratoři se uchovává v lahvích z hnědého skla s vrstvou uhličitanu vápenatého, na světle se rozkládá na kyselinu mravenčí, která má nepříznivé účinky na fixaci tkáně (Vacek, 1996). Formol se ředí buďto vodou z vodovodu, fyziologickým roztokem – slaný formol, nebo puftrem – nárazníkový formol, v hodný zejména pro fixaci tkáně při imunohistochemických vyšetřeních (Jirkovská, 2006).

V současné době se již prakticky výhradně používají komerčně dodávané nádoby na vzorky již obsahující pufrovaný formol. Tím je fixace formaldehydem do značné míry standardizovaná.

Formol můžeme použít i ve směsi s jinými látkami. Smícháním chloridu vápenatého s formolem vznikne tzv. Bakerova tekutina která je vhodná na fixaci tkáně při průkazu lipidů. V neurohistologii se jako fixační tekutina používá brómformol. Ten vzniká smíšením bromidu amonného s formolem (Jirkovská, 2006).

Kyselina pikrová

Použití kyseliny pikrové v roztocích fixačních tekutin je výhodné, zachovává strukturu polysacharidů. Nejčastěji používané fixační tekutiny s obsahem kyseliny pikrové jsou tekutina Bouinova a Pateelsova. Tyto tekutiny nejsou vhodné pro použití u krevnatých tkání. Zároveň brání prosycení tkání celoidinem a tkáně prosycené Bouinovou tekutinou se nesmí propírat ve vodě. Při kontaktu s vodou by došlo ke zbobtnání vaziva a tím i k znehodnocení vyšetřované tkáně (Vacek, 1996).

Sloučeniny těžkých kovů

Mezi fixační tekutiny se sublimátem patří Susa, Zenkerova tekutina, Hellyho tekutina. Tyto tekutiny jsou nevýhodné, protože během fixace vznikají tzv. sublimátové sraženiny, které je následně nutné odstranit jódováním (Vacek, 1996). Tento proces prodlužuje čas při zpracování vzorku.

Alkoholy, aceton

Mezi další fixační tekutiny můžeme zařadit metylalkohol, ten je častěji využíván v cytologii jako fixační prostředek při barvení MayGrünwald-Giemsy. Při vyšetření vzorků na enzymovou aktivitu se používá jako fixativum vychlazený aceton, který snižuje aktivitu vyšetřovaných enzymů (Jirkovská, 2006). Jako fixační tekutina se může použít i alkohol, nejčastěji absolutní alkohol.

Prosyncovací média a zalévací média

Aby se tkáň dala krájet a mohl se utvořit histologický preparát, je nutné tkáň upravit. Tkáň je nutné prosytit zalévacím médiem, do kterého tkáň bude zalita. Tkáň, která nebyla prosycena zalévacím médiem, není možno zalít tak, aby se dala bez poškození dále zpracovat.

Zalévací média rozdělujeme na rozpustná a nerozpustná ve vodě.

Média rozpustná ve vodě

Mezi média rozpustná ve vodě patří želatina, celodal a syntetické vosky rozpustné ve vodě. Tyto média jsou výhodná. Tkáň vzorků se nemusí odvodňovat. Využívá se toho, že vzorky fixované formolem se před prosycením zalévacím médiem vypírají ve vodě. Média mísící se s vodou jsou tedy používány ve vzrůstajících koncentracích, dokud nedojde k úplnému prosycení tkáně. Po prosycení vzorků dojde k jeho zalití do zalévací komůrky, která je vyplněna nadbytkem zalévacího média (Jirkovská, 2006).

Média nerozpustná ve vodě

Mezi média nerozpustná ve vodě patří nejčastěji používaný parafín, dále celoidin a ve vodě nerozpustné pryskyřice. Vzorky při tomto procesu musí být nejprve odvodněny, následně prosyceny intermédiem, které umožní prosycení tkáně samotným zalévacím médiem. Jako intermédia jsou používány organická rozpouštědla, např. xylen, benzen, toluen. Tyto organická rozpouštědla vytlačují z tkáňových vzorků vodu a zároveň jsou mísitelná s vlastním zalévacím médiem. Po prosycení vzorku lázněmi média nerozpustného ve vodě se vzorek zalévá do nadbytku média do zalévací komůrky (Vacek, 1996).

Odvodňovací a zalévací automaty

V laboratořích je nejčastěji užíváno postupu prosycování a zalévání tkání do médií nerozpustných ve vodě. Tento proces je časově náročný, ale lze ho jednoduše automatizovat. K automatizaci se používá tkáňových automatů tzv. autotechnikonů. Jsou tři základní druhy autotechnikonů karuselový, lineární a přečerpávací tkáňový automat.

U karuselového typu autotechnikonu se tkáň uloží do košíků, které jsou připojeny ke karuselu, ty se ponořují do jednotlivých lázní uložených pod karuselem. Po uplynutí doby v jednotlivých lázních karusel vyzvedne košíky a posune je do dalších lázní (Jirkovská, 2006).

U lineárního typu autotechnikonu jsou jednotlivé roztoky řazeny za sebou. Vzorky jsou pohyblivým ramenem přenášeny z jedné lázně do druhé.

U přečerpávacího typu tkáňového automatu jsou roztoky přečerpávány do komory s uloženými tkáňovými vzorky, komora se vzorky se po uplynutí časového limitu vyprázdní a je do ní přečerpána jiná reagentie.

Pro rychlejší prosycení vzorků zalévacím médiem je možné použít vakuum, zvýšené teploty či infračerveného záření.

Krájení

Ke krájení parafinových bloků se používají dva druhy speciálních zařízení tzv. mikrotomů. Sáňkový mikrotom nebo rotační mikrotom.

Sáňkový mikrotom

Sáňkový mikrotom má pevnou základnu, po které se na kolejnicích pohybují tzv. saně. Na základně se nachází neapolská svorka, která slouží k uchycení parafinového bločku. Na podstavci je též umístěn mikrometrický šroub sloužící k přesnému nastavení tloušťky řezu. Pohybující se saně jsou vybaveny svorkami pro uchycení buďto mikrotomového nože, nebo držáku na mikrotomové žiletky. Ostří mikrotomového nože je chráněno krytem (Vacek, 1996).

Rotační mikrotom

U rotačního mikrotomu je vybavení samotného mikrotomu stejné. Skládá se z pevného podstavce s mikrometrickým šroubem, neapolskou svorkou a setrvačnickovým kolem. Svorka mikrotomového nože je umístěna na pevno. Pohybuje se vlastní neapolská svorka s upevněným parafinovým bločkem. V současné době jsou k dispozici i mikrotomy s motorizovaným pohonem (Jirkovská, 2006).

Po ukrojení, se řez přenese do vodní lázně a následně je napnut na podložní sklo. Preparáty jsou před samotným barvením sušeny v sušárně či termostatu.

Barvení

Tkáňové řezy se po ukrojení a řádném usušení barví. Neobarvené řezy jsou v běžné mikroskopii nehodnotitelné. Každá složka buňky má tu vlastnost, že je schopná na sebe navázat jiný druh barviva. To znamená, že se jednotlivé typy struktur od sebe dají velmi jednoduše odlišit (Vacek, 1996).

Druhy barviv:

Barviva zásaditá (bazická) barví chromatinové struktury jádra a bazofilní granula. Pokud se tkáň barví bazickými barvivy, je tzv. bazofilní. Nejpoužívanějším bazickým barvivem je hematoxylin (Vacek, 1996)

Barviva kyselá barví cytoplazmu buněk, eozinofilní granula, koloid štítné žlázy a další struktury. Pokud se tkáň barví kyselými barvivy, je eozinofilní, protože nejčastěji používané kyselé barvivo je eozin (Vacek, 1996).

Neutrofilie nastává u tkáňových struktur v případě, že se barví oběma barvivy naráz. Jak bazickými, tak kyselými, jedná se například o granula neutrofilních leukocytů (Vacek, 1996).

Rozdělení barvicích metod:

Základní barvení

Základní histologické barvicí metody jsou ty, které znázorňují základní struktury jednotlivých buněk. Jedná např. o barvení Hematoxylin-Eozin, Weigert van Gieson, Azan, barvení Massonovými trichromy – zelený, modrý a žlutý a další (Vacek, 1996).

Nejčastěji používaným základním barvením je barvení HE, toto barvení také bylo použito jako jediné v této práci.

Hematoxylin (organické barvivo získávané z kmene stromu původem z Jižní Ameriky) vytváří po oxidaci v tzv. hematein komplex s ionty kovů (označovaná jako mořidla). Tím vznikne vlastní barvivo, které se selektivně váže na DNA jádra buňky a znázorňuje strukturu chromatinu, včetně jadérka. Dle způsobu oxidace (použitého oxidačního činidla) a mořidla se rozlišuje řada typů hematoxylinů (např. Mayerův, Harrisův, Weigertův). U hematoxylinu dle Gilla je jako mořidlo použit síran hlinitý, jako oxidační činidlo jodičnan sodný. Gillův hematoxylin patří mezi tzv. progresivně barvicí hematoxyliny, tj. při působení nedochází k přebarvení a není nutné následující odstranění přebarvení diferenciacním roztokem (kyselý alkohol). V laboratoři používáme komerčně dodávaný roztok od firmy Merck.

Eosin je organické barvivo, který barví s různou intenzitou bílkoviny cytoplazmy i mezibuněčné hmoty.

Výsledek barvení HE:

Jádra buněk - chromatin jader se barví v různých odstínech tmavo modrošedé barvy

Cytoplazma – odstíny růžové barvy

Kolagenní vazivo - světle růžově

Svalovina - sytě růžovočervená

Hlen - modrošedá barva

Speciální barvicí metody

Jsou zaměřeny na znázornění určité tkáňové struktury, mikroorganismy, či chemické látky, ostatní tkáňové struktury se při těchto typech barvení zobrazují často jen stínovitě, vždy se proto provádí zároveň s některým barvením základním.

Do speciálních barvicích metod řadíme barvení na struktury bakterií (Gramovo barvení, barvení Ziehl-Neelsen nebo barvení dle Löfflera) či barvení na znázornění amyloidu (barvení kongo červení). Dále do této skupiny patří barvení zaměřená na neurohistologická vyšetření, průkaz polysacharidů, lipidů, enzymů a spousta dalších druhů barvení (Vacek, 1996).

Montování řezů

Po obarvení řezů se řezy montují mezi média, které umožňují jejich prohlížení pod mikroskopem, a krycí sklo. Jedná se o média průhledná s vysokým indexem lomu světla a zároveň látky, které nepoškozují zbarvení tkáně. Stejně jako zalévací média rozlišujeme i montovací média rozpustná a nerozpustná ve vodě.

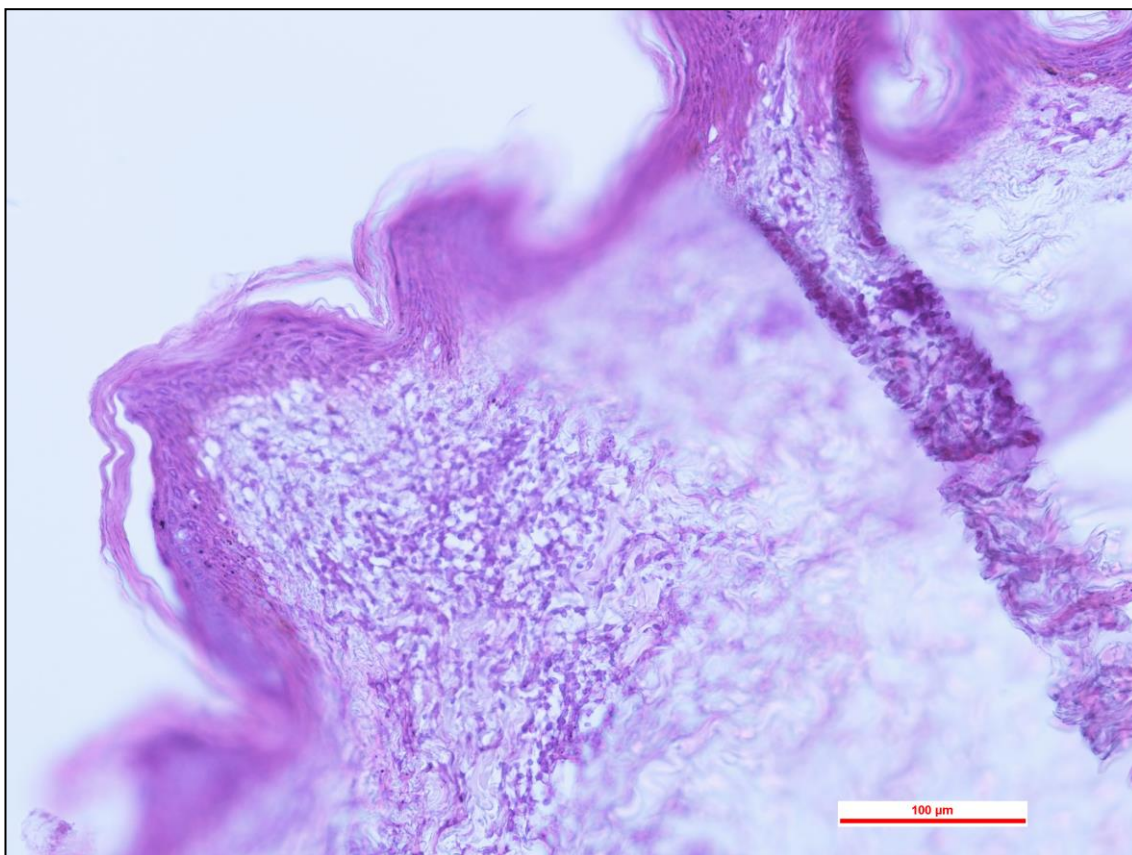
Montovací media rozpustná ve vodě se před použitím neodvodňují a jedná se například o glycerin, želatinu či Apáthyho sirup. Tyto média se používají při průkazu látek, které by mohla poškodit organická rozpouštědla např. lipidů (Vacek, 1996).

Mezi média nerozpustná ve vodě patří kanadský balzám, cedrový olej či syntetické pryskyřice. Tyto media se mohou použít, pouze pokud se tkáň nejprve odvodní po obarvení vzestupnou řadou alkoholů a následně prosytí xylenem. Tyto média se v xylenu rozpouštějí (Vacek, 1996).

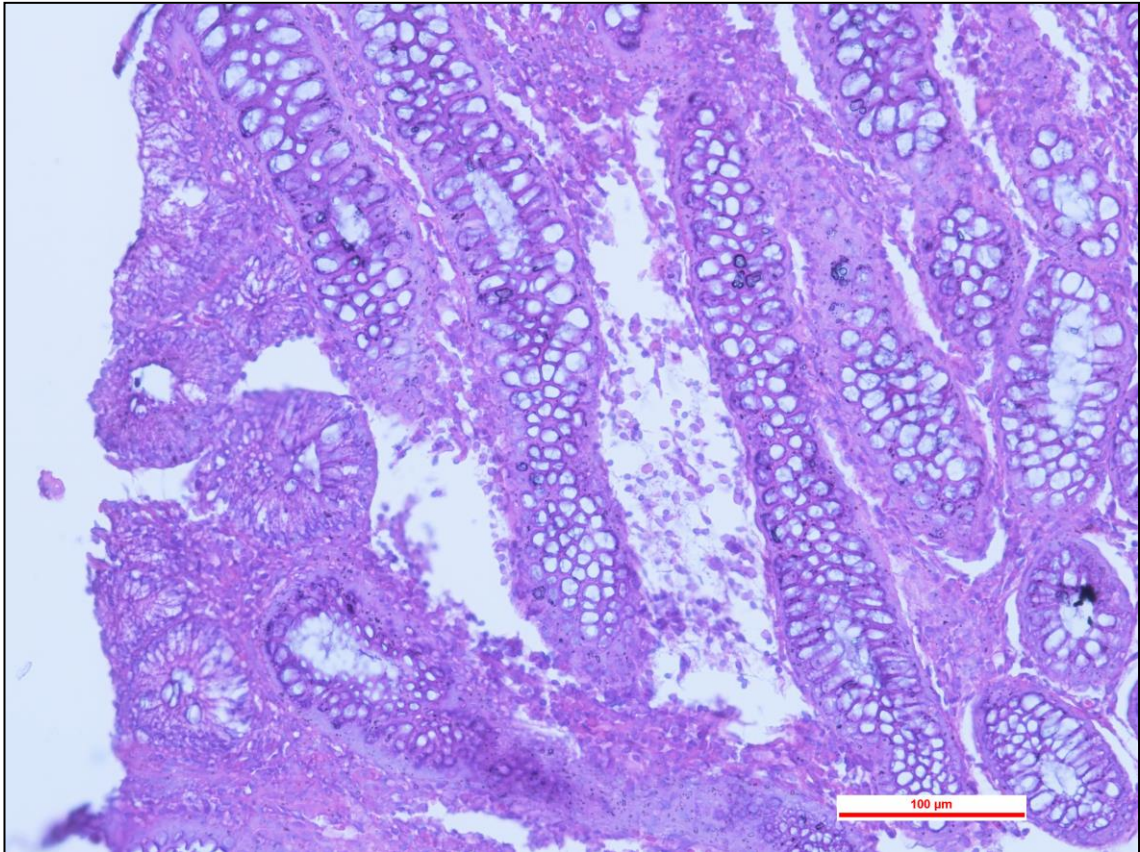
Charakter poškození tkání

Poškození tkáně, jehož příčinu se pokoušíme v práci vysvětlit, dokládáme snímky preparátů zhotovených ze tkání, které byly poškozeny v roce 2013 a 2015. Byly zhotoveny nové preparáty z archivovaných parafinových bloků.

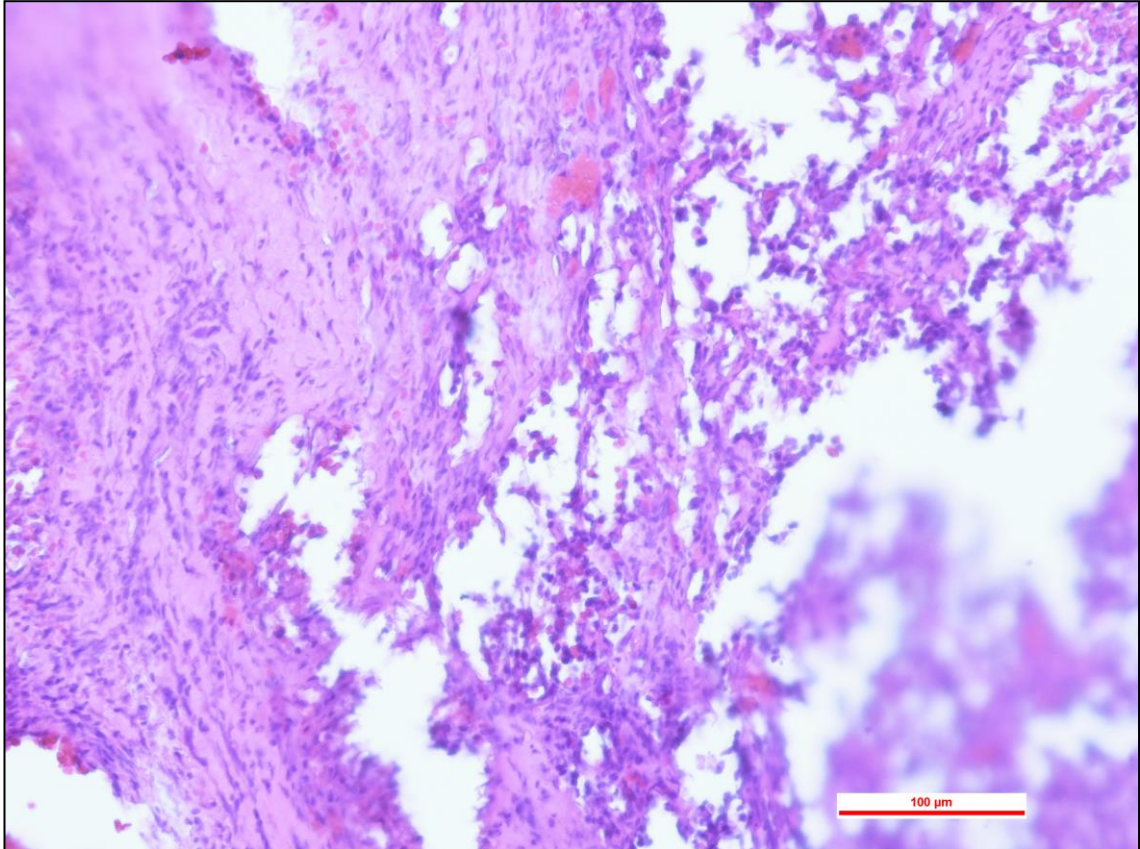
Jednalo se o následující tkáně: endoskopické biopsie zažívacího traktu, kožní excise a varle s tumorem. Obecně se na preparátech zhotovených z poškozených tkání projevují následující změny: Tkáň se při krájení trhá a řez je složen z řady částí, často přes sebe přeložených, nelze ukrojit tenký řez, tam kde lze tkáň prohlédnout jsou buňky „svráštělé“, protažené, ztrácí se jejich vzájemná koheze. Detaily cytoplasmy nelze rozeznat, barví se zcela stejnorodě. Nejvýznamnější změny se bohužel týkají jader – jádra jsou „svráštělá“, často až nitkovitě protažená, jádra jsou hyperchromatická, tj. chromatin je shluklý, jádra jsou přebarvená, nelze rozpoznat jednotlivé detaily, včetně jadérek, eventuálně mitóz, již vůbec nelze rozeznat mitózy atypické. Toto poškození jader je zvláště závažné, neboť na posouzení jaderných charakteristik je diagnostický proces založen z valné části.



Obr. 1 – Archivní preparát – pigmentový névus, poškození tkáně při zpracování (zvětšeno 200x)



Obr. 2 – Archivní preparát – tlusté střevo, poškození tkáně při zpracování (zvětšeno 200x)



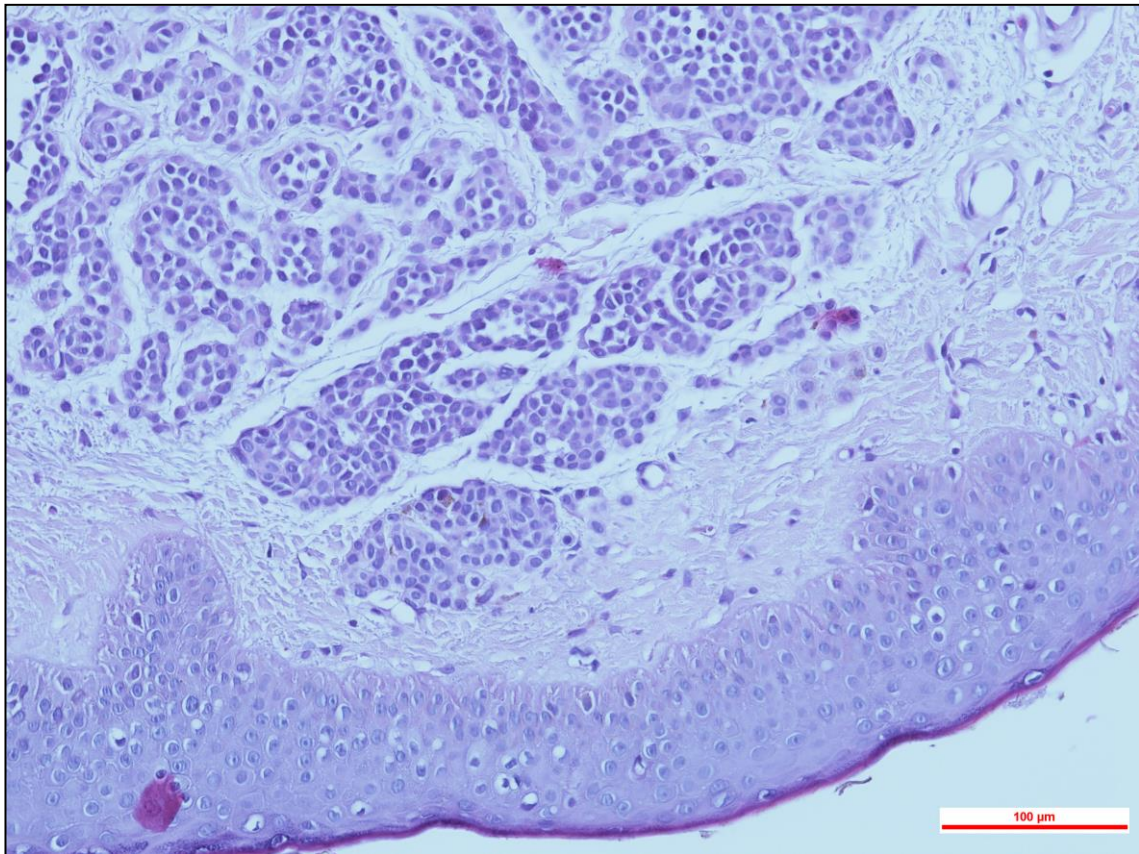
Obr. č. 3 – Archivní preparát – varle, poškození tkáně při zpracování (zvětšeno 200x)

Pro srovnání uveden vzhled vybraných typů tkání při absenci poškození. Kritéria, podle nichž byly tkáně vybrány, jsou uvedena v následující kapitole “Metodický postup k ověření hypotéz”.

Pigmentový névus

Správně by mělo být uvedeno, že jde o kožní excisi se zastiženým pigmentovým névem. Ve zhotovených preparátech je tedy zachycena kůže víceméně normální histologické struktury: Epidermis tvořena vícevrstevným dlaždicovým epitelem s keratinisací (sestává z několika vrstev buněk, které jsou nad bazální membránou nízce cylindrické, směrem k povrchu se oplošťují – vytvářejí vrstvu zárodečnou tvořenou buňkami zhruba kubickými spojenými můstky –tzv. stratum spinosum, zcela na povrchu jsou buňky oploštělé s keratinisací – tzv. stratum corneum. Mezi buňkami bazální vrstvy jsou ojediněle přítomny melanocyty, buňky produkující pigment melanin, který je v podobě jemných zrněk patrný ve světlé cytoplasmě. Ve škáře jsou přítomna adnexa kožní – chlupy, mazové žlázy, potní žlázy (Kazakov et al., 2012).

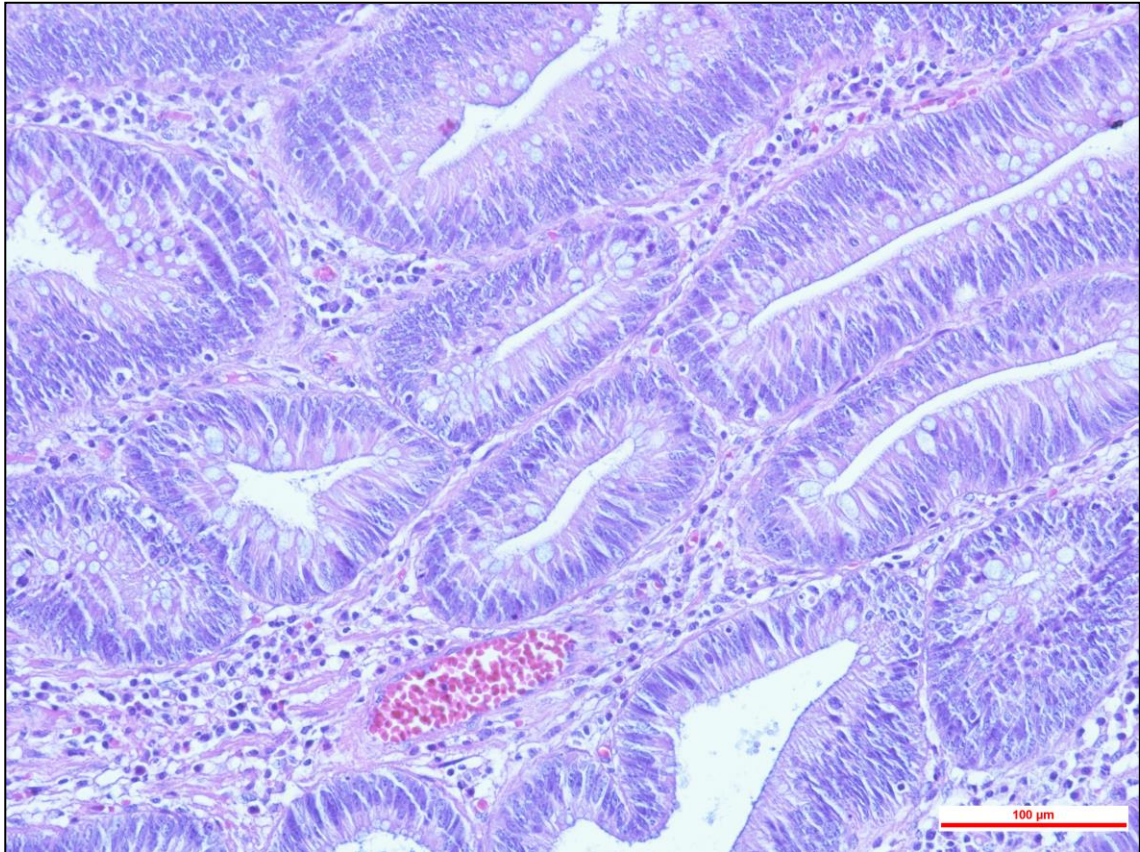
Vlastní névus je tvořen hnízdy (skupinkami) névových buněk. Tyto buňky mají polygonální tvar a připomínají buňky epitelové (jsou tzv. epiteloidního vzhledu). Cytoplasma je světlá, resp. bledě zbarvená eosinofilní (růžová). Jádra buněk jsou uniformní, okrouhlá až mírně oválná menší, obvykle mají zřetelná jádérka. Směrem od epidermis (do hloubky) se névové buňky stávají menšími a mají menší tmavěji se barvící jádra bez zřetelných jadérek (McKee et al., 2005).



Obr. č. 4 – Pigmentový névus (zvětšeno 200x)

Adenomový polyp tlustého střeva

Architektonicky vykazuje adenomový polyp uspořádání do podoby tubulů a místy papilárních struktur, jde o tzv. adenom tubopapilární. Cytologicky je tvořen epitelem sestávajícím z vysokých cylindrických buněk a tmavou bazofilní cytoplasmou, jádra jsou oválná s hrubou strukturou chromatinu a většinou zřetelnými jadérky. Jádra jsou umístěna v různých úrovních, přítomny jsou mitózy. Jde o tzv. tubupapilární adenom s dysplasií nízkého stupně (WHO klasifikace, 2010).



Obr. č. 5 – Adenomový polyp (zvětšeno 200x)

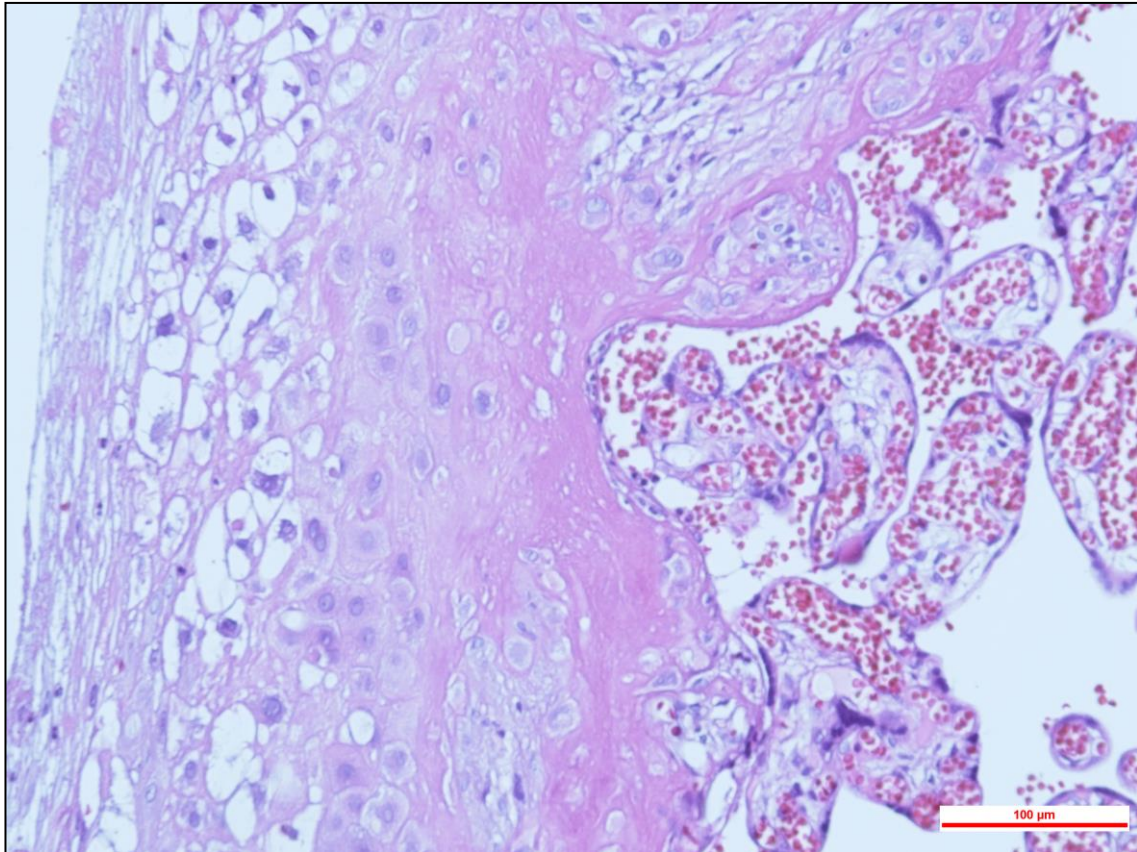
Placenta

Placenta je komplexní orgán s velmi složitou histologickou strukturou, při bioptickém vyšetření jsou tkáňové vzorky odebírány z více míst, aby byly zastíženy a vyšetřeny jednotlivé součásti placenty (pupečník v několika etážích, choriová ploténka, plodové obaly a místo jejich odstupu z placenty, centrální část placenty, basální ploténka). Pro účely práce byly tkáňové bloky odebírány z povrchové části placenty, zastížena je v nich tedy choriová ploténka s přilehlou částí horní části placenty.

V odebraných vzorcích je zastížena choriová ploténka krytá na povrchu amniem – tvořeno jednou vrstvou kubických buněk, vlastní ploténka je tvořena mesodermální tkání (řidká vazivová tkáň) s četnými cévami (rozlišení žil a tepen zde není možné na příslušný typ lze usoudit jen ze vzájemné polohy). Na spodní ploše ploténky jsou ostrůvky či souvislé úseky fibrinoidu (Langhansova).

Horní vrstva placenty je tvořena choriovými klky. Jejich struktura odpovídá zralé placentě (užita byla placenta zralého plodu), cévy klků (počet v jednom klku nepřesahuje 5) jsou umístěny těsně pod povrchem klku, kryt klku tvoří tenká vrstva

syncytiotrofoblastu, místy jsou patrné syncytiotrofoblastické uzly (masivní nahromadění jader syncytiotrofoblastu). Stroma klku tvoří řídká vazivová tkáň (Ernst et al., 2015).



Obr. č. 6 – Placenta (zvětšeno 200x)

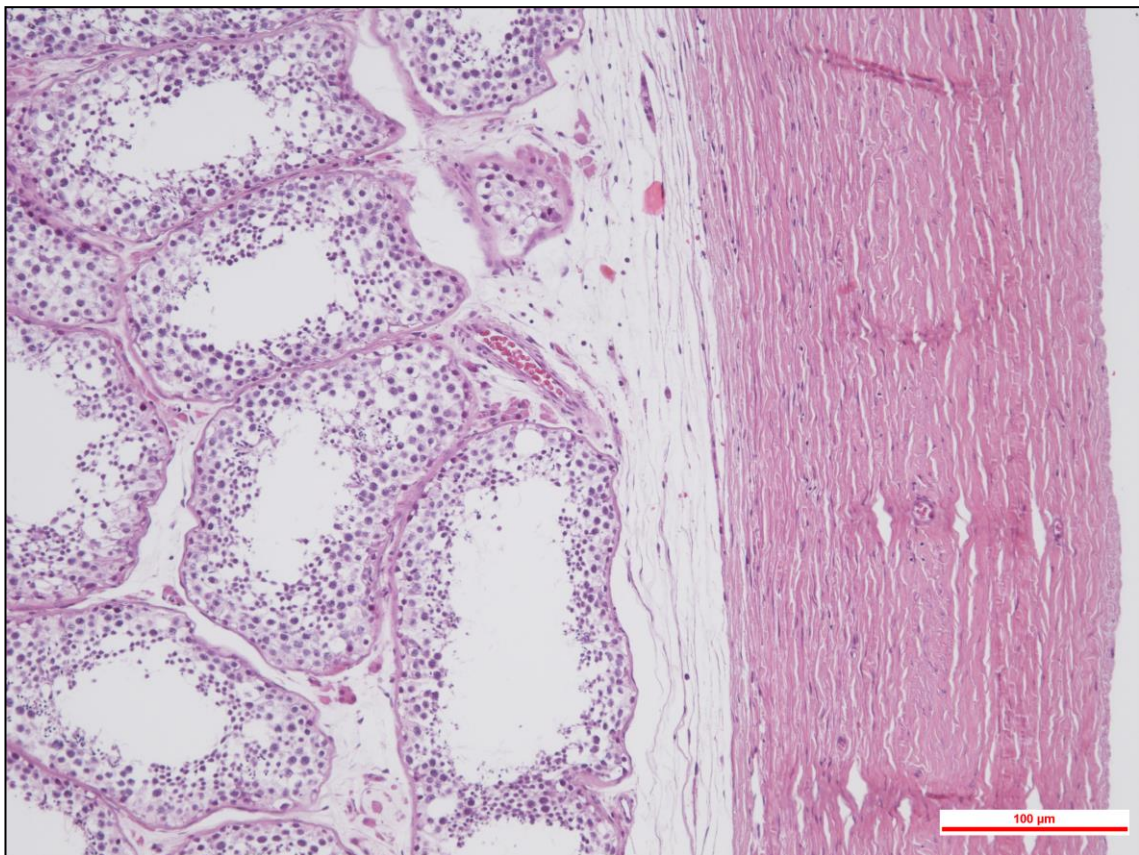
Varle

Varle je komplexní orgán, se složitou strukturou. V biotické laboratoři jsou vyšetřovány případy, kdy je varle odebráno z důvodů postižení závažným patologickým procesem, nejčastěji nádorovým. Varle, z jehož tkáně byly zhotoveny použité tkáňové bloky, bylo postiženo germinálním nádorem – seminomem klasického typu.

Tkáňové bloky byly zhotoveny z části varlete nádorem nepostížené (dle postupu lege artis musí být novotvar varlete vyšetřen kompletně).

Tkáňové bloky byly zhotoveny tak, že byl zastižen zevní obal varlete (tunica albuginea), a pod ním se nacházející tkáň varlete sestávající s tzv. stočených kanálků (canaliculi seminiferi contorti).

Tunica albuginea je silná blána tvořená hutným kolagenním vazivem, jen s malým počtem buněk. Semenotvorné kanálky mají v průměru 0,15 až 0,25 mm, stěna je tvořena tenkou vazivovou blankou. Výstelku tvoří vrstva podpůrných Sertoliho buněk, štíhlých, na stěnu kanálku však nasedajících rozšířenou nožkou, cytoplasma je světlá (obsahuje lipidy). Jádra Sertoliho buněk jsou oválná dlouhá osa je kolmá ke stěně kanálku, jaderná membrána je zřetelná chromatin chudý, jádro má měchýřkovitý vzhled, jadérka jsou patrná. Mezi Sertoliho buňkami se nachází semenotvorná tkáň sestávající z řady buněk vznikajících postupným dělením zárodečné kmenové buňky, terminálním stádiem dělení jsou spermie patrné v lumen kanálku. Pro detailní popis různých typů buněk odkazujeme na uvedenou literaturu (Wolf, 1966, Vacek 1996, Hes et al., 2007). Ve tkáni mezi kanálky se nacházejí jednotlivě i ve skupinkách buňky Leydigovy. Buněčná těla mají polygonální obrysy, cytoplasma je silně eosinofilní zásluhou přítomnosti tyčinkovitý krystaloidních útvarů (krystaloidy Reinkeho). Jádra okrouhlá, s hrubým chromatinem a nápadnými jadérky. Buňky produkují testosteron. (Wolf 1966, Vacek 1996)



Obr. č. 7 – Varle (zvětšeno 200x)

Možné příčiny poškození tkání – vypracované hypotézy

Pro vysvětlení poškození vzorků byly stanoveny následující dvě hypotézy:

1. V literatuře (Vacek, 1996) je uvedeno, že poškození vzorků připomínající poškození, které se práce snaží vysvětlit, může být způsobeno špatným odvodněním tkáně.

2. Charakter poškození vzorků vzbuzuje podezření na to, že poškození je způsobeno „vyschnutím“ tkáně, ke kterému by mohlo dojít při přerušení plynulosti přesunu tkáňových vzorků mezi jednotlivými lázněmi s reagensy při zpracování v karuselovém tkáňovém automatu – viz popis činnosti tkáňového karuselového automatu uvedený níže.

Při ověřování hypotéz jsme se snažili dosáhnout takového poškození tkání, aby bylo srovnatelné či totožné s poškozením tkání k němuž v praxi došlo. Jako srovnávací materiál byly použity archivní bločky poškozených tkání (viz výše).

Metodický postup k ověření hypotéz

Postupováno bylo v následujících krocích:

Výběr vzorků

Původ vzorků

Použity byly tkáňové vzorky dodávané na oddělení z klinických pracovišť, abychom se co nejvíce přiblížili podmínkám z běžné praxe. Zasláné vzorky byly odebírajícím lékařem vloženy do komerčně dodávaných nádobek již obsahujících fixační tekutinu – 4% pufrovaný formaldehyd. Použitím těchto nádobek je zajištěno, že fixace probíhá standardně u všech vzorků a je tak vyloučeno, že k případnému poškození tkáně mohla přispět nesprávná fixace.

Ke zhotovení tkáňových bloků pro účely této práce byl použit tzv. zbytkový materiál – tj. materiál, který zůstává po provedeném diagnostickém vyšetření. Zhotovené tkáňové bloky byly před umístěním do karuselového autotechnikonu skladovány za standardních podmínek v pufrovaném formaldehydu.

Vybrané tkáně

Z technických a časových důvodů nebylo možno ověřovat poškození všech vyšetřovaných typů tkání. Vybrány byly proto následující 4 druhy tkáňových vzorků:

1. Pigmentový névus – Zvolen byl z toho důvodu, že jde o běžný vzorek, jehož vyšetření v laboratoři je každodenní záležitostí, k dispozici též byly archivní bločky a z nich zhotovené preparáty, u nichž došlo k poškození, jehož příčinu se tato práce snaží zjistit.

Nevýhodou zvoleného vzorku je, že z jedné zasláné excise nebylo možno zhotovit potřebný počet tkáňových bloků a muselo být použito více excisí.

2. Adenomový polyp tlustého střeva – Zvolen byl z toho důvodu, že jde o běžný vzorek, jehož vyšetření v laboratoři je každodenní záležitostí, k dispozici též byly archivní bločky a z nich zhotovené preparáty, u nichž došlo k poškození, jehož příčinu se tato práce snaží zjistit.

Použit byl větší polyp, rozdělen byl na drobné částice, jejichž velikost odpovídá běžně zasílaným endoskopickým vzorkům (1-2 mm v průměru velké). Použitý materiál je tedy zcela stejnorodý.

3. Placenta – Zvolena byla proto, že jde o běžný materiál, velikost umožnila zhotovení vzorků z jediné odebrané placenty (vyloučení individuálních rozdílů), placenta je navíc tkáň, která se vzhledem ke své „houbovitosti“ dobře zpracovává a snadno se zhotovují histologické preparáty. Nevýhodou je, že nebyl k dispozici archivní poškozený materiál.

4. Varle – Pro tkáň varlete platí totéž, co je uvedeno u placenty. Navíc byly k dispozici archivní bločky, u nichž došlo k poškození, jehož příčinu se tato práce snaží vysvětlit.

Příprava tkáňových bloků (přikrojení)

1. Pigmentový névus

Z jedné kožní excise nebylo možno zhotovit potřebný počet tkáňových bločků, které by byli použity k ověření našich předpokladů. Použity byly proto čtyři kožní excise splňující následující podmínky: Pigmentové névy v kožních excisích člunkovitého tvaru s delším rozměrem okolo 10 mm, s kratším do 5 mm. Vytvořeny byly bločky tkáně silné asi 1,5 mm, řezy vedeny kolmo na delší osu excise člunkovitého tvaru.

2. Adenomový polyp

K vytvoření tkáňových bloků byl použit adenomový polyp o velikosti asi 20x20x15 mm. Z něho „uštípnutý“ částice o velikosti 2-3 mm v průměru velké. Tento postup zcela napodobuje odběr vzorku při endoskopických vyšetřeních.

3. Placenta

K vytvoření tkáňových bloků byla použita jedna placenta, ze které byli nakrájeny 1,5-2 mm silné kousky tkáně. Tkáň byla odebrána z povrchové části placenty, většinou je zastižena i choriová ploténka.

4. Varle

Na našem oddělení není možno získat tkáň varlete bez patologických změn – zdravé varle je odebíráno jen zcela výjimečně obvykle v souvislosti se změnou pohlaví. U varlete postiženého zánětem je struktura tkáně obvykle zcela zničena, u varlete odebraného v souvislosti s traumatem je rovněž struktura obvykle zcela setřena mechanickým poškozením a prokrvácením. Použito bylo proto odebrané varle postižené nádorem. Pro vytvoření zkušebních tkáňových bloků však byla použita tkáň varlete mimo přítomný novotvar. Vybrán byl případ, kde tumor zaujímal jen menší část objemu varlete (vlastní nádor nemohl být použit pro účely této práce, neboť dle postupu lege artis musí být zpracován prakticky kompletně). Odebrané tkáňové vzorky byli opět silné cca 1,5-2 mm, zachycen byl zevní obal varlete (tunica albuginea) a vlastní tkáň varlete pod ní.

Protože další zpracování zhotovených tkáňových bloků nemohlo být provedeno současně, byly všechny zhotovené tkáňové bloky do doby zpracování v tkáňovém automatu umístěny v neutrálním pufrovaném formaldehydu. Délka fixace se tedy u jednotlivých vzorků lišila. Dle dostupných informací však délka fixace v neutrálním pufrovaném formaldehydu kvalitu tkáně neovlivňuje.

Zpracování tkáňových bloků v tkáňovém automatu

Režim pohybu vzorků v karuselovém tkáňovém automatu byl měněn tak, aby bylo možno ověřit stanovené hypotézy. Podrobně proto rozvedeno níže.

Zalévání tkáňových bloků do parafínu (zhotovení parafinových bloků)

Zalévání bylo provedeno vždy po zpracování vzorků v karuselovém tkáňovém automatu. Zhotovené parafinové bloky byly uloženy za standardních podmínek do doby krájení preparátů. Kvalita parafinových bloků se časem nemění, uchovávají mohou být po desítky let, aniž by to ovlivnilo možnost zhotovování preparátů a jejich kvalitu.

Zhotovení preparátů

Krájení

Všechny parafinové bloky použité pro účely této práce byly krájeny za standardních podmínek (akreditovaný PATPB/SP/006 – Krájení parafinových bločků) na sáňkovém mikrotomu (Hyrax S30), nastavená tloušťka řezu 2-3 μm . Krájení všech bloků provedeno souhrnně, v jednom dni. Krájení prováděla jedna laborantka. Výše uvedený postup zaručil standardní podmínky zhotovení všech řezů.

Barvení

Barvení všech řezů proběhlo současně v barvicím automatu TST 44, program na barvení HE. Použit hematoxylin v modifikaci dle Gilla III (triple strenght), eosin použit žlutavý, v alkoholovém roztoku. Jde o barvení na oddělení rutinně používané (akreditovaný PATPB/PIB/001). To že proběhlo současně u všech zhotovených řezů vyloučilo možnost ovlivnění výsledku kolísající kvalitou barvicích roztoků.

Postup barvení dle pracovní barviví instrukce je následující:

1. lázeň xylenu	10 minut
2. lázeň xylenu	10 minut
3. lázeň xylenu	10 minut
4. lázeň xylenu	10 minut
5. lázeň acetonu	30 vteřin
6. lázeň 96% alkoholu	30 vteřin
7. lázeň 80% alkoholu	30 vteřin
8. lázeň 70% alkoholu	30 vteřin
9. destilovaná voda	1 minuta

10. roztok HE – GILL III	5 minut
11. tekoucí voda	10 minut
12. čpavková voda	5 vteřin
13. tekoucí voda	15 minut
14. lázeň 70% alkoholu	30 vteřin
15. barvicí roztok eozinu	1 minuta 20 vteřin
16. tekoucí voda	30 vteřin
17. lázeň 96% alkoholu	1 minuta
18. lázeň 96% alkoholu	1 minuta
19. lázeň 96% alkoholu	30 vteřin
20. lázeň acetonu	1 minuta
21. lázeň xylenu	1 minuta
22. lázeň xylenu	1 minuta
23. lázeň netoxické náhražky xylenu	1 minuta

Montování

Montování preparátů provedeno ručně standardním způsobem, použito montovací medium Neo-mount. Montování všech preparátů provedeno jednou laborantkou, souhrnně.

Hodnocení preparátů

Preparáty prohlíženy na mikroskopu Nikon E500i s digitální kamerou, snímky zhotoveny na témže mikroskopu v programu NIS – Elements F. Preparáty hodnoceny autorkou práce ve spolupráci s vedoucím práce.

Pokusy k ověření hypotéz

K ověření našich hypotéz byl použit karuselový tkáňový automat Histomaster DDM-P800.

Karuselový tkáňový automat pracuje následujícím způsobem:

Při otáčení víka karuselu je koš s tkáňovými vzorky přesunován mezi jednotlivými nádobami s reagensy. Víko karuselu se závěsem na koš s tkáňovými vzorky tedy vykonává kombinaci dvou pohybů: po ukončení pobytu vzorků v lázni se zvedne (vertikální pohyb) a pootočí (horizontální pohyb), následně klesne (vertikální pohyb). Především horizontální pohyb musí být přesný a dodržet vzdálenost mezi nádobami s reagensy, při zahájení sestupu musí být osa závěsu totožná s osou nádoby s reagensy. Vychýlení způsobí, že koš při sestupu narazí na okraj nádoby. V každé nádobě setrvá tkáňový koš po předem nastavenou dobu. V průběhu pobytu koše v nádobě s reagensy dochází v krátkých intervalech k jeho zvednutí a následnému poklesu v rozsahu asi 1 cm, tím je tekutina v koši udržována v pohybu, a tím je zlepšen průnik použitých reagensů do tkáně.

Pohyb ramene je komplikovaný a v praxi bylo opakovaně zjištěno, že může dojít k zaseknutí ramene při otáčivém pohybu. Pohyb ramene se někdy neobnoví a koš s tkáňovými vzorky zůstává viset v některé lázni, případně do lázně částečně ponořen. Může ovšem dojít k obnovení pohybu ramene karuselu po určité době zaseknutí – v tomto případě je cyklus dokončen a porucha tak není zaznamenána (zpracování tkáně trvá cca 12 hodin a přístroj pracuje bez dohledu v nočních hodinách). Tkáně ovšem mohou být pobytém mimo lázně „vysušeny“ a poškozeny.

Přístroj má 12 pozic s nádobami naplněnými reagensy, v posledních 3 pozicích jde o nádoby naplněné rozpuštěným parafinovým voskem. Pohyb košů s tkáňovými vzorky probíhá ve směru hodinových ručiček a tkáně prochází postupně mezi níže uvedenými reagensy.

Při pobytu vzorku v lázni se vzorky vždy zbaví reagensie z předchozí lázně a jsou prosyceny reagensy dané lázně. Před započítáním zpracování neobsahují vzorky samozřejmě reagensie, ale vodu.

Základní program karuselového tkáňového automatu Histomaster DDM-P800

- první pozice..... 80% alkohol (resp. lihobenzín)
- druhá pozice..... 96% alkohol (resp. lihobenzín)
- třetí pozice..... 96% alkohol (resp. lihobenzín)
- čtvrtá pozice..... 96% alkohol (resp. lihobenzín)
- pátá pozice..... 96% alkohol (resp. lihobenzín)
- šestá pozice..... aceton
- sedmá pozice..... xylén
- osmá pozice..... xylén
- devátá pozice..... parafín
- desátá pozice..... parafín
- jedenáctá pozice..... parafín

Základní program zpracování tkání v naší laboratoři je 12 hodinový. Košík s tkáňovými vzorky je v každé lázni s reagentií po dobu 1 hodiny. V poslední lázni parafínu zůstávají vzorky do doby ukončení programu laborantkou a jejich zalitím do parafínu.

Uvedený počet jedenácti pozic nesouhlasí s celkovým počtem 12ti pozic z následujícího důvodu: Do tkáňového automatu se současně zavěšují dva košíky s tkáňovými vzorky, jeden je proto o pozici před druhým. Rozdíl mezi oběma koši je v tom, že jeden je hodinu navíc v prvním alkoholu (80% alkohol). Časový rozdíl jedné hodiny pobytu navíc v 80% alkoholu nemá žádný vliv na výslednou kvalitu v parafínu zalitých tkání (ověřeno dlouholetou praxí, uváděno výrobcem autotechnikonů, uváděno v dostupné literatuře). Použití jedenácti pozic v této práci bylo tedy dostačující.

Ověření hypotézy č. 1

K odvodnění tkáňových vzorků slouží alkohol, který nahradí ve tkáni přítomnou vodu. Při dalších krocích je alkohol nahrazován dalšími reagentiemi, až se nakonec tkáň prosytí parafínem.

Reagencie jiné než alkohol vodu z tkáňových vzorků neodstraňují, neboť se s vodou nemísí (částečně se mísí aceton).

Pokud by bylo zkoumané poškození tkání způsobeno špatným odvodněním, mělo by vzniknout (být napodobeno) vynecháním všech či některých lázní alkoholů.

Ověření toho předpokladu bylo provedeno následovně:

Pokus č. 1: Při pokusu byly vynechány čtyři první alkoholy – vzorek byl umístěn rovnou do poslední alkoholové pozice s 96% alkoholem (před lázní s acetonem).

Výsledek: K poškození tkání nedošlo, zhotovené parafinové bloky se krájely bez problémů. Standardně zhotovené a nabarvené preparáty měly odpovídající kvalitu, při všech použitých zvětšeních v mikroskopu bylo možno hodnotit veškeré struktury cytoplasmy i jader nutné ke stanovení diagnózy. (Obr. č. 12-19 v galerii obrázků)

Pokus č. 2: Vynechány všechny lázně s alkoholem, vzorky byly umístěny rovnou do lázně s acetonem.

Výsledek: Stejný jako při pokusu jedna, nedošlo k závažnějšímu poškození tkáně, které by se projevilo na kvalitě preparátů. (Obr. č. 20-27 v galerii obrázků)

Závěr: Vynechání průchodu tkání alkoholem, tj. odvodnění tkání, nevysvětluje to poškození tkání, k jehož vysvětlení je zaměřena tato práce. Hypotéza č. 1 nebyla potvrzena. K odvodnění tkáně zřejmě stačí pobyt v acetonu, resp. nedostatečné odvodnění nevede k závažnému poškození tkáně.

Ověření hypotézy č. 2

Předpoklad, že poškození tkáně bylo způsobeno tím, že přesun mezi lázněmi nebyl plynulý, ale byl přerušen tak, že vzorek zůstal mimo lázeň, na vzduchu, byl ověřen sérií 7 pokusů, které proběhly následovně:

Pokus č. 1: Kazety s tkáňovými vzorky byly umístěny do první pozice a ponechány stanovenou dobu jedné hodiny v lázni s reagentem (80% alkoholem). Po hodině, kdy měl být vzorek přemístěn při pootočení ramene do druhé pozice, byl autotechnikon zastaven, kazety se vzorky vyjmuty a ponechány 1 hodinu na vzduchu. Po hodině „vysychání“ byly kazety s tkáňovými

vzorky znovu umístěny do autotechnikonu, a to do třetí pozice (96% alkoholu). Dále vzorek procházel standardním způsobem až do lázně s parafinem.

Vzorky tedy místo pobytu ve druhé lázni s reagensy po dobu jedné hodiny „vysychaly“, lázeň č. 2 byla tedy „přeskočena“ (Obr. č. 28-35 v galerii obrázků).

Pokus č. 2: Kazety s tkáňovými vzorky prošly první a druhou pozicí, poté byl autotechnikon zastaven, kazety se vzorky vyjmuty a ponechány 1 hodinu na vzduchu. Po hodině „vysychání“ byly kazety s tkáňovými vzorky znovu umístěny do autotechnikonu, a to do čtvrté pozice. Dále vzorek procházel standardním způsobem

Vzorky tedy místo pobytu ve třetí lázni s reagensy (96% alkoholem) po dobu jedné hodiny „vysychaly“, lázeň č. 3 byla tedy „přeskočena“ (Obr. č. 36-43 v galerii obrázků).

Pokus č. 3: Kazety s tkáňovými vzorky prošly první, druhou a třetí pozicí, poté byl autotechnikon zastaven, kazety se vzorky vyjmuty a ponechány 1 hodinu na vzduchu. Po hodině „vysychání“ byly kazety s tkáňovými vzorky znovu umístěny do autotechnikonu, a to do páté pozice. Dále vzorek procházel standardním způsobem

Vzorky tedy místo pobytu ve čtvrté lázni s reagensy (96% alkoholem) po dobu jedné hodiny „vysychaly“, lázeň č. 4 byla tedy „přeskočena“ (Obr. č. 44-51 v galerii obrázků).

Pokus č. 4: Kazety s tkáňovými vzorky prošly první, druhou, třetí a čtvrtou pozicí, poté byl autotechnikon zastaven, kazety se vzorky vyjmuty a ponechány 1 hodinu na vzduchu. Po hodině „vysychání“ byly kazety s tkáňovými vzorky znovu umístěny do autotechnikonu, a to do šesté pozice. Dále vzorek procházel standardním způsobem

Vzorky tedy místo pobytu v páté lázni s reagensy (96% alkoholem) po dobu jedné hodiny „vysychaly“, lázeň č. 5 byla tedy „přeskočena“ (Obr. č. 52-59 v galerii obrázků).

Pokus č. 5: Kazety s tkáňovými vzorky prošly standardním způsobem do páté pozice, poté byl tkáňový procesor zastaven, kazety vyjmuty a ponechány po dobu 1 hodiny na vzduchu. Po hodině byly kazety s tkáňovými vzorky znovu umístěny do autotechnikonu a to do sedmé pozice. Dále vzorek procházel standardním způsobem.

Vzorky tedy místo pobytu v šesté lázni s reagensy (acetonem) po dobu jedné hodiny „vysychaly“, lázeň č. 6 byla tedy „přeskočena“ (Obr. č. 60-67 v galerii obrázků).

Pokus č. 6: Kazety s tkáňovými vzorky prošly standardním způsobem do šesté pozice (lázeň s acetonem), poté byl tkáňový procesor zastaven, kazety vyjmuty a ponechány po dobu 1 hodiny na vzduchu. Po hodině „vysychání“ byly kazety s tkáňovými vzorky znovu umístěny do autotechnikonu a to do osmé pozice (lázeň s xylenem). Dále vzorek procházel standardním způsobem.

Vzorky tedy místo pobytu v sedmé lázni s reagensy (xylenem) po dobu jedné hodiny „vysychaly“, lázeň č. 7 byla tedy „přeskočena“ (Obr. č. 68-75 v galerii obrázků).

Pokus č. 7: Kazety s tkáňovými vzorky prošly standardním způsobem do sedmé pozice, poté byl tkáňový procesor zastaven, kazety vyjmuty a ponechány po dobu 1 hodiny na vzduchu. Po hodině byly kazety s tkáňovými vzorky znovu umístěny do autotechnikonu a to do deváté pozice. Dále vzorek procházel standardním způsobem.

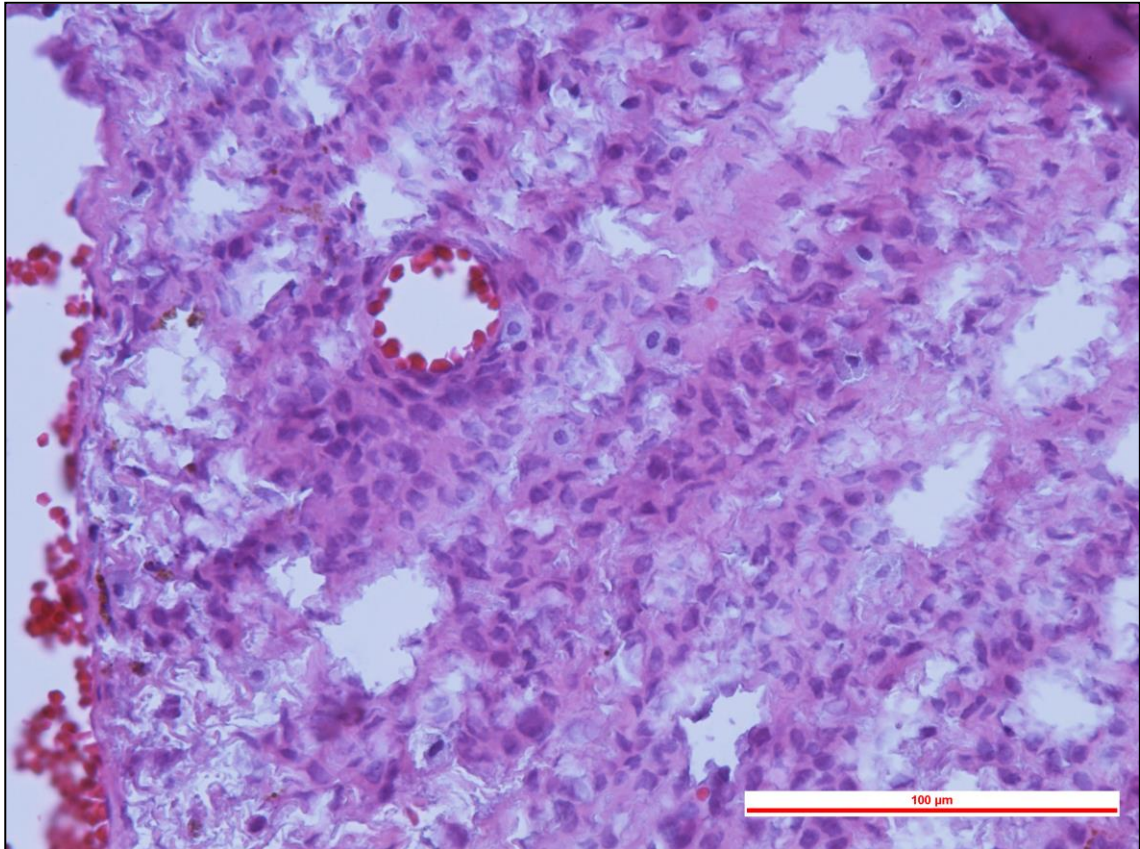
Vzorky tedy místo pobytu v osmé lázni s reagensy (xylenem) po dobu jedné hodiny „vysychaly“, lázeň č. 8 byla tedy „přeskočena“ (Obr. č. 76-83 v galerii obrázků).

Doba vysychání vzorků mohla být při výše uvedeném uspořádání pokusů zvolena libovolně, doba jedné hodiny se však zdála být nejvhodnější. Zaseknutí ramene karuselového autotechnikonu, které by vysvětlovalo „vyschnutí“ by pravděpodobně trvalo (při následném obnovení pohybu) nejspíše jednu hodinu.

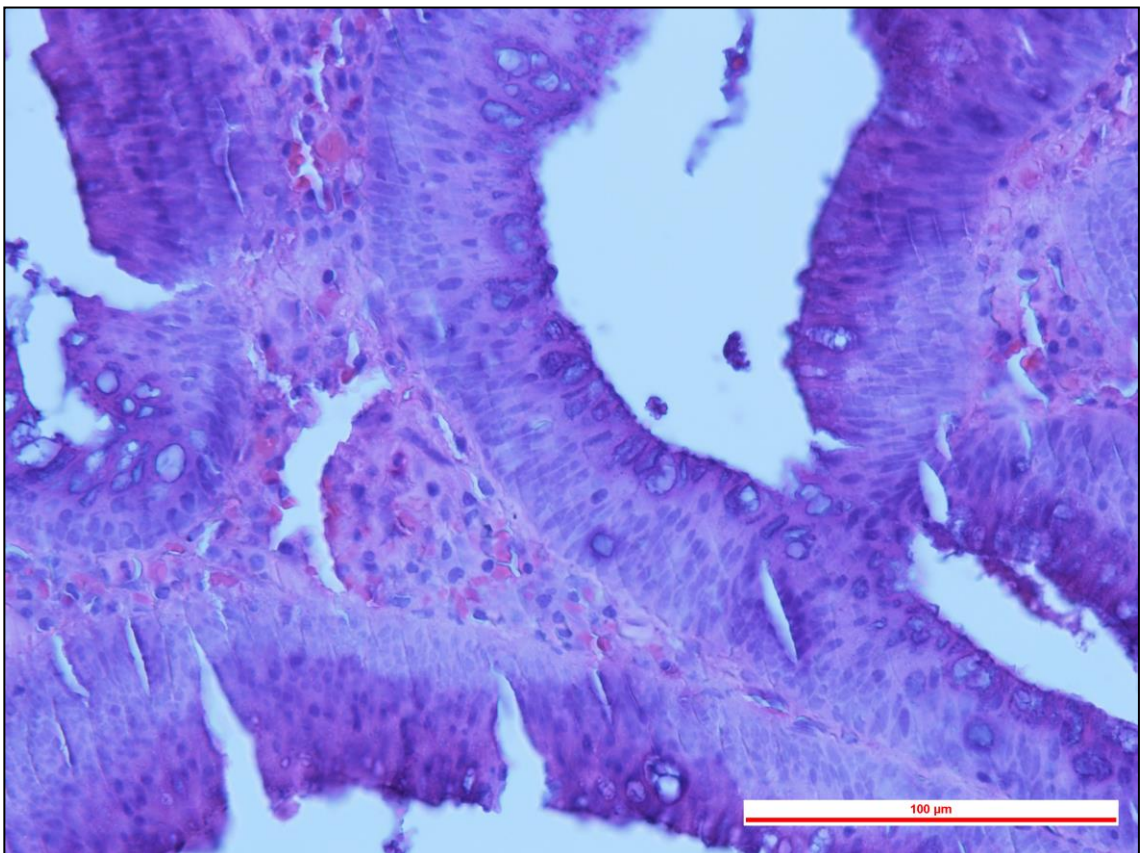
Výsledky pokusů:

Při pokusech č. 1,2,3,4,5 a 7 nedošlo k výraznějšímu poškození tkání, ze zhotovených parafínových bloků bylo možno nakrájet tenké řezy. Ty pevně držely na sklíčku, nebyly problémy s barvením řezů v barvicím automatu ani při montování. Při prohlížení preparátů pod mikroskopem bylo možno hodnotit mikroskopické struktury bez problémů při všech zvětšeních. Fotografie zhotovených preparátů jsou umístěny ve fotogalerii.

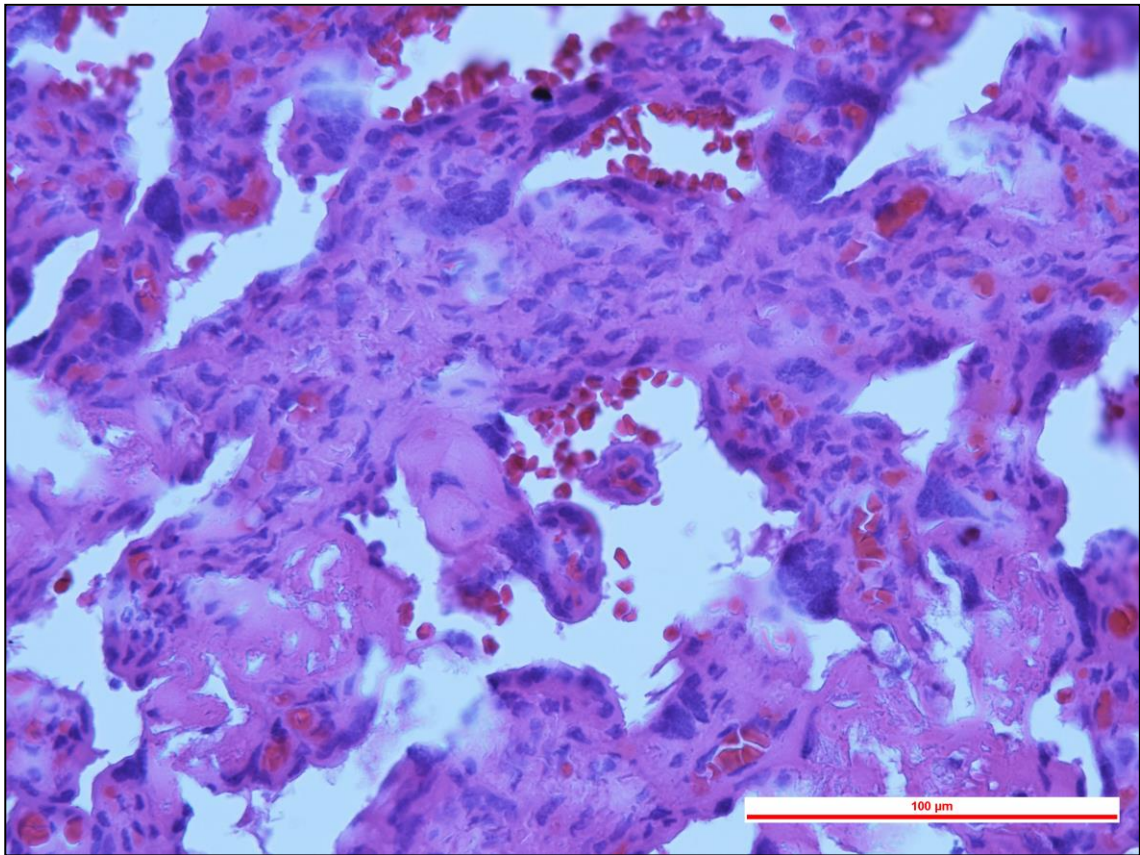
Při pokusu č. 6 (vzorek vysychal po dobu jedné hodiny, po té co opustil lázeň s acetonem) došlo k závažnému poškození tkání, které je zcela srovnatelné s poškozením patrným na archivním materiálu: Parafínové bločky nešly dobře krájet, řezy se trhaly, nedoržely na sklíčku, nešlo ukrojit tenký řez. Při montování bylo problémem vyvarovat se vzniku bublin. Při hodnocení pod mikroskopem shledán shodný obraz jako v preparátech archivních.



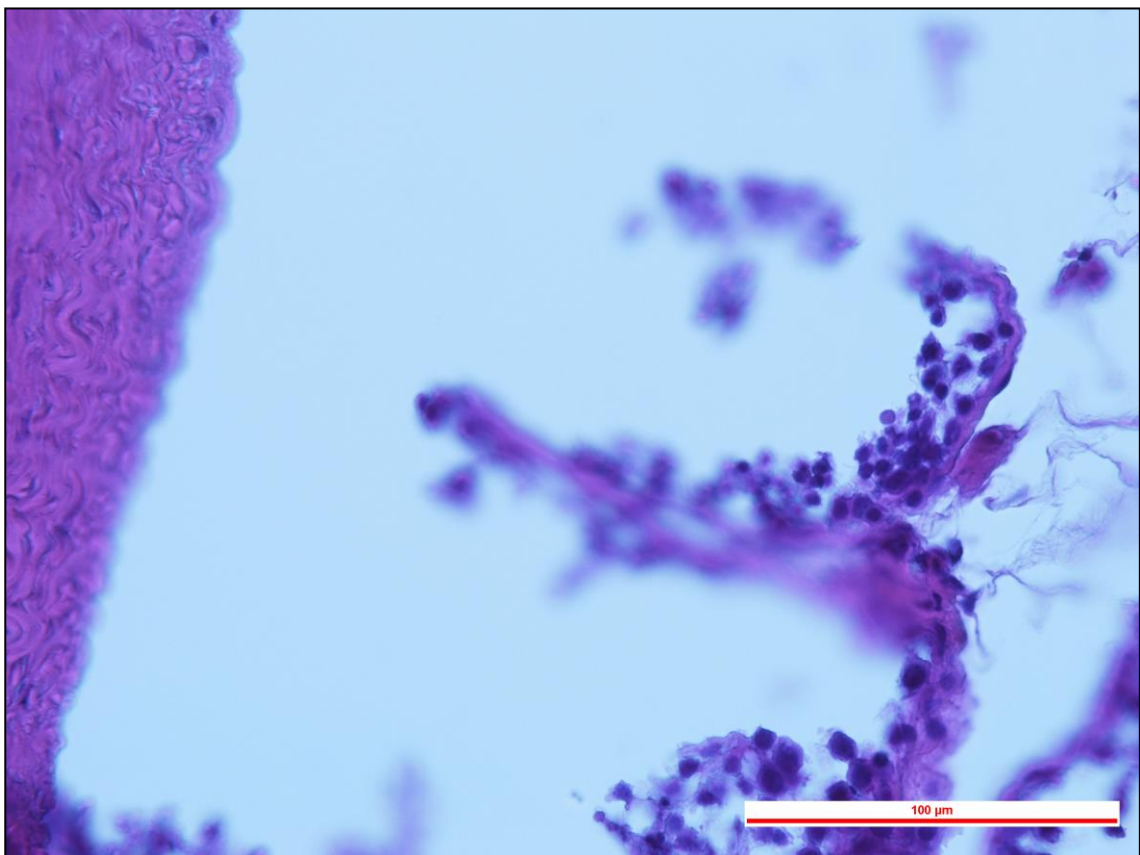
Obr. č. 8 – Pigmentový névus, poškozená tkáň (zvětšeno 400x)



Obr. č. 9 – Adenomový polyp tlustého střeva, poškozená tkáň (zvětšeno 400x)



Obr. č. 10 Placenta, poškozená tkáň (zvětšeno 400x)



Obr. č. 11 – Varle, poškozená tkáň (zvětšeno 400x)

Závěr: Z výše uvedeného je zřejmé, že poškození patrné na archivním materiálu lze imitovat tím, že tkáňové bloky jsou po prosycení acetonem ponechány na vzduchu („vysychají“). Provedené pokusy prokázaly platnost hypotézy č. 2. K poškození evidentně stačí, je-li doba vysychání jedna hodina.

Ze závěru je zřejmé, že bylo dosaženo cíle, který si práce stanovila, tj. vysvětlit poškození vzorků, které se v praxi vyskytuje. Vysvětlení je možno považovat za správné, neboť se poškození tkání podařilo pokusem napodobit.

Ke stanovení doby nutné ke vzniku poškození tkání byla práce rozšířena o dva další pokusy, při nichž byla doba „vysychání“ tkáňových bloků (po lázni s acetonem) zkrácena na 30 a 15 minut. Při prvním pokusu („vysychání“ po dobu 30 minut) zjištěno, že došlo k poškození všech čtyř typů tkáně (Obr. č. 84-95 v galerii obrázků). Při druhém pokusu („vysychání“ po dobu 15 minut) došlo k poškození tkáně placenty a varlete, poškození tkání pigmentového névu a adenomu tlustého střeva bylo nevýrazné (Obr. č. 96-107 v galerii obrázků)

Závěr

Provedenými pokusy se podařilo prokázat, ve které fázi zpracování tkáňových vzorků v karuselovém tkáňovém procesoru může dojít k závažnému poškození tkání, se kterým se laboratoře v praxi setkávají, naštěstí jen velmi vzácně.

Je zřejmé, že při poškození tkáně hraje rozhodující roli aceton – k poškození tkání při užitém uspořádání pokusů vedlo výhradně vyschnutí tkáně po prosycení tkáně touto látkou.

Práce prokázala, že k poškození užitých čtyř druhů tkání stačí doba „vysychání“ 30 minut, u dvou z nich (placenta, varle) pak 15 minut po prosycení tkání acetonem. Je tedy zřejmé, že citlivost různých tkání se liší.

Zjištění, že za poškození tkání je zodpovědné „vysychání“ vzorků prosycených acetonem vede k domněnce, že k méně výraznému poškození může dojít u vzorků umístěných v horní vrstvě kazet v košíku karuselového tkáňového automatu. Tyto vzorky se mohou octnout těsně nad hladinou reagentie. Nevyschnou úplně, ale k poškození může dojít. To by mohlo vysvětlit občas pozorovanou nižší kvalitu zpracování části vzorků, zvláště u citlivějších tkání (viz výše).

Protože užití acetonu při zpracování tkání není nezbytné, zdá se být nejjednodušší prevencí vzniku poškození tkání jeho vyřazení a náhrada xylenem. Neexistuje však jednoznačný konsensus, zda kvalita preparátů je shodná při a bez použití acetonu.

Překvapujícím zjištěním bylo, že poškodit tkáně je velmi obtížné a potvrzuje se, že řádně formaldehydem fixovaná tkáň je velmi odolná.

Jsem si vědoma, že pokusy nezahrnuly všechny možné kombinace, a poškození tkání tak může být důsledkem i jiných vlivů.

Seznam literatury

1. BOSMAN, F. T. *WHO classification of tumours of the digestive system*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2010. World Health Organization classification of tumours, 3. ISBN 978-9283224327.
2. DMITRY V. KAZAKOV .. [ET AL.]. *Cutaneous adnexal tumors*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2012. ISBN 9781605478548.
3. HEEREMA-McKENNEY, Amy, DE PAEPE, Monique. *Diagnostic Pathology Placenta*. Nizozemsko: Elsevier, 2015. ISBN 9781937242220.
4. HES, Ondřej, Michal MICHAL a Petr MUKENŠNÁBL. *Nádory varlat*. Plzeň: Euroverlag, 2007. ISBN 9788071770008.
5. JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. Praha: Galén, c2006. Základy (Galén). ISBN 8072622634.
6. KURMAN, Robert J. *WHO classification of tumours of female reproductive organs*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. World Health Organization classification of tumours. ISBN 978-9283224358
7. LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
8. MARTÍNEK, Jindřich a Zdeněk VACEK. *Histologický atlas*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2393-8.
9. MCKEE, Phillip H., Eduardo. CALONJE a Scott R. GRANTER. *Pathology of the skin: with clinical correlations. Volume 1 / [edited by] Phillip H. McKee, Eduardo Calonje, Scott R. Granter*. 3rd ed. Edinburgh: Elsevier Mosby, 2005. ISBN 978-0323036726.
10. MCKEE, Phillip H., Eduardo. CALONJE a Scott R. GRANTER. *Pathology of the skin: with clinical correlations Volume 2/ [edited by] Phillip H. McKee,*

Eduardo Calonje, Scott R. Granter. 3rd ed. Edinburgh: Elsevier Mosby, 2005. ISBN 0323036724.

11. PATPB/LP/ - Laboratorní příručka verze02
12. PATPB/PIB/001 Hematoxylin-Eosin (HE) verze01
13. PATPB/SOPV/001 – Bioptické vyšetření verze01
14. PATPB/SP/001 – Transport materiálu verze01
15. PATPB/SP/002 – Příjem materiálu verze01
16. PATPB/SP/003 - Makroskopické vyšetření, popis a přikrojení materiálu verze01
17. PATPB/SP/004 – Odvodnění tkáně a prosycení parafinem verze01
18. PATPB/SP/006 – Krájení parafinových bločků verze01
19. POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Speciální patologie. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Galén, c2007. ISBN 9788072624942.
20. SZÉP, Zoltán. *Priebojníkové excízie v dermatológii a dermatopatológii.* Plzeň: Euroverlag, 2013. ISBN 9788071779636.
21. VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika 1. díl.* Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 8070132019.
22. VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika 2. díl.* Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 8070132027.
23. WOLF, Jan. *Histologie: příručka pro studenty lék. fakult.* Praha: SZdN - Státní zdravotnické nakladatelství, 1966.

Seznam obrázků

Obr. č. 1 – Archivní preparát – pigmentový névus, poškození tkáně při zpracování (zvětšení 200x)

Obr. č. 2 – Archivní preparát – tlusté střevo, poškození tkáně při zpracování (zvětšené 200x)

Obr. č. 3 – Archivní preparát – varle, poškození tkáně při zpracování (zvětšené 200x)

Obr. č. 4 – Pigmentový névus (zvětšení 200x)

Obr. č. 5 – Adenomový polyp (zvětšení 200x)

Obr. č. 6 – Placenta (zvětšení 200x)

Obr. č. 7 – Varle (zvětšeno 200x)

Obr. č. 8 – Pigmentový névus, poškozená tkáň (zvětšeno 400x)

Obr. č. 9 – Adenomový polyp tlustého střeva, poškozená tkáň (zvětšeno 400x)

Obr. č. 10 Placenta, poškozená tkáň (zvětšeno 400x)

Obr. č. 11 – Varle, poškozená tkáň (zvětšeno 400x)

Seznam příloh

Galerie obrázků

Seznam použitých zkratk

ON Příbram a.s. – Oblastní nemocnice Příbram a.s.

NASKL – Národní autorizační středisko pro klinické laboratoře

LIS- Laboratorní informační systém

DNA – Deoxyribonukleová kyselina

PATPB – Patologické oddělení Příbram

WHO – Světová zdravotnická organizace

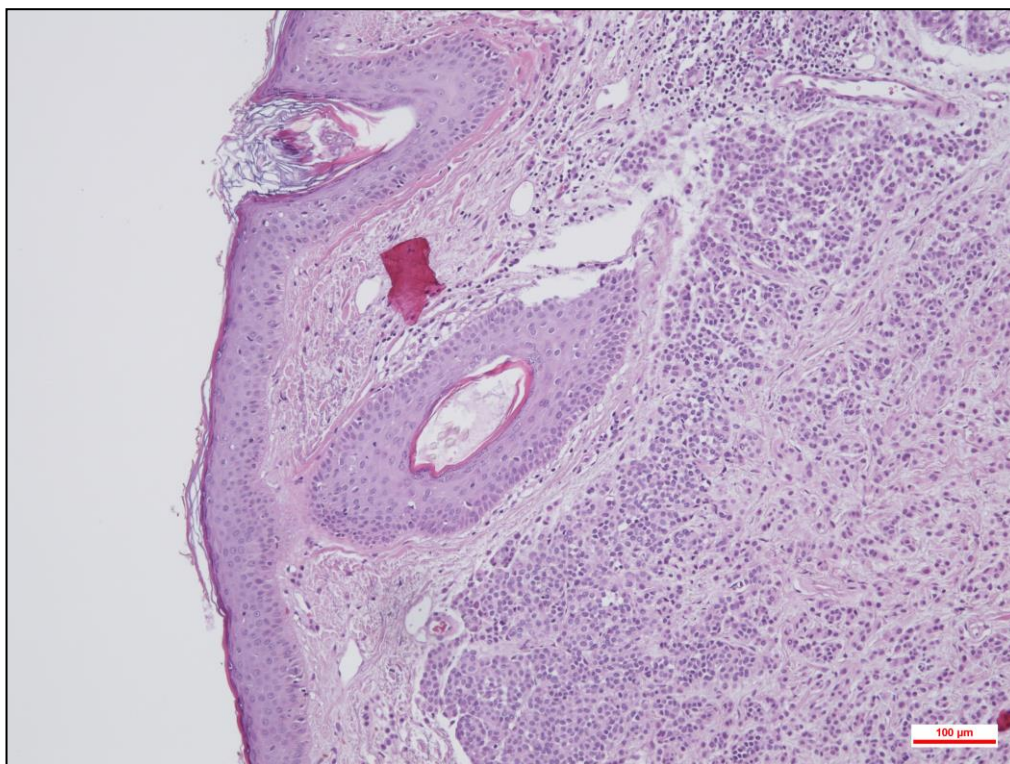
SP – Standardní postup

HE – Hematoxylin-Eosin

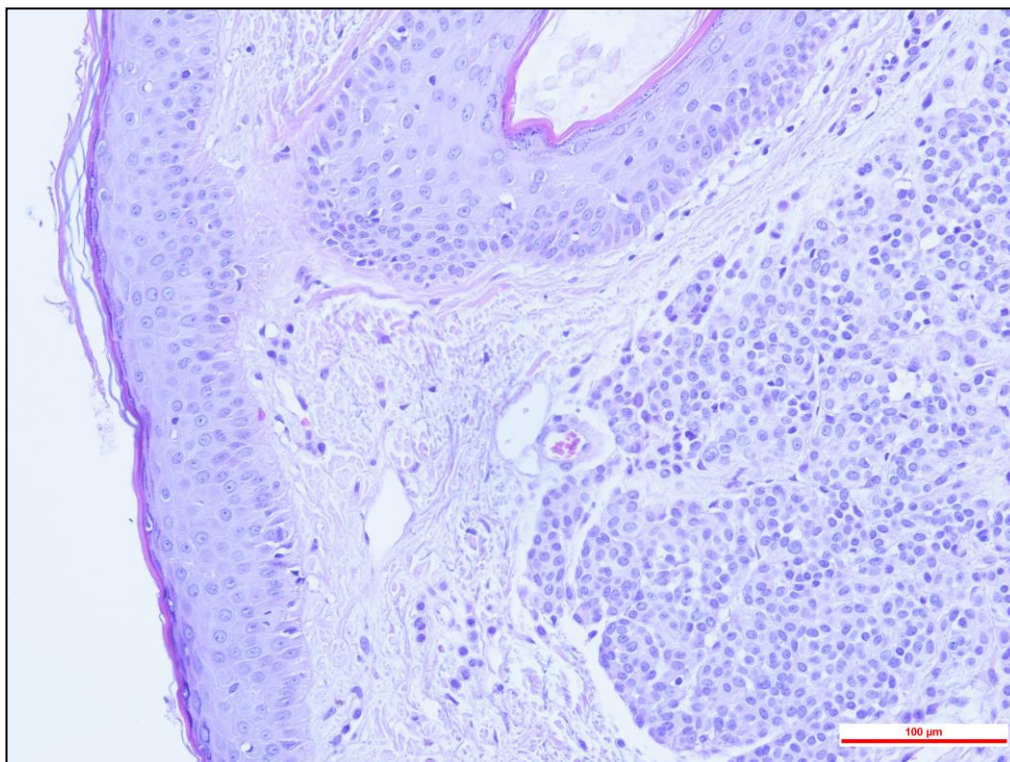
PIB – Pracovní instrukce barvicí

LP – Laboratorní příručka

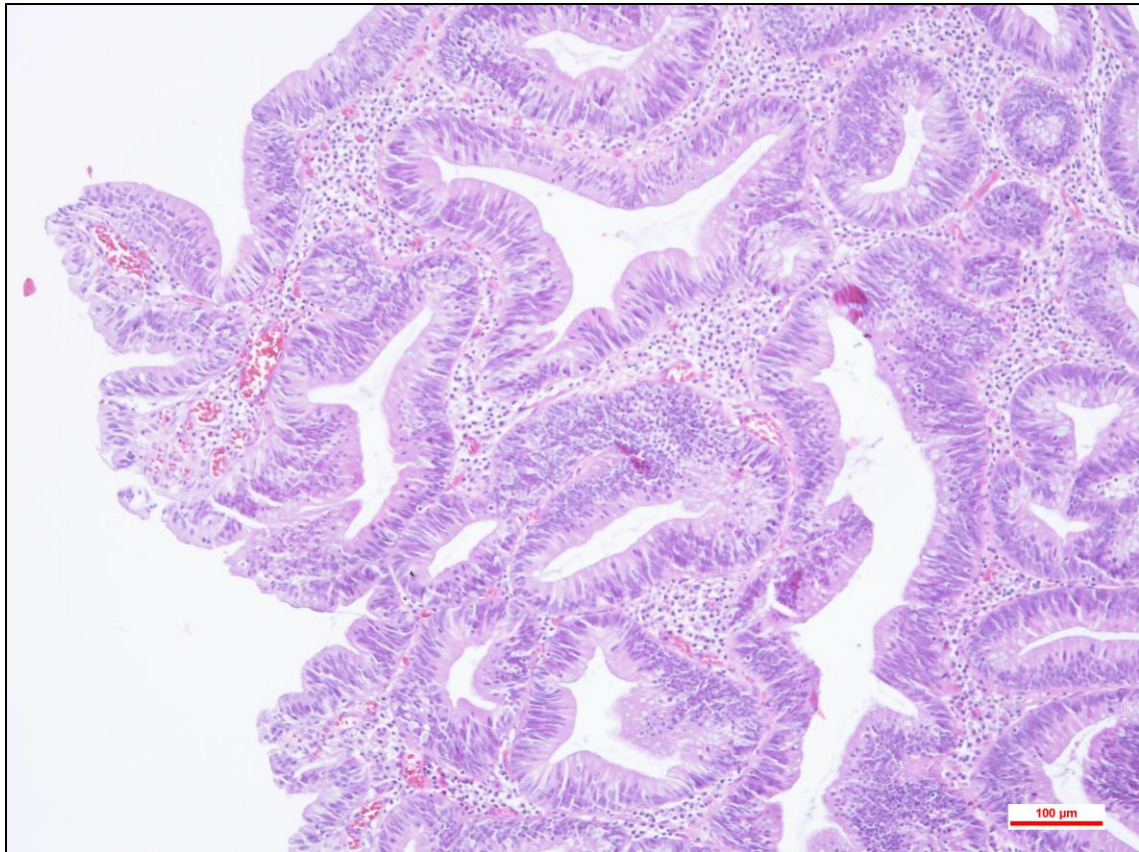
Příloha - galerie obrázků



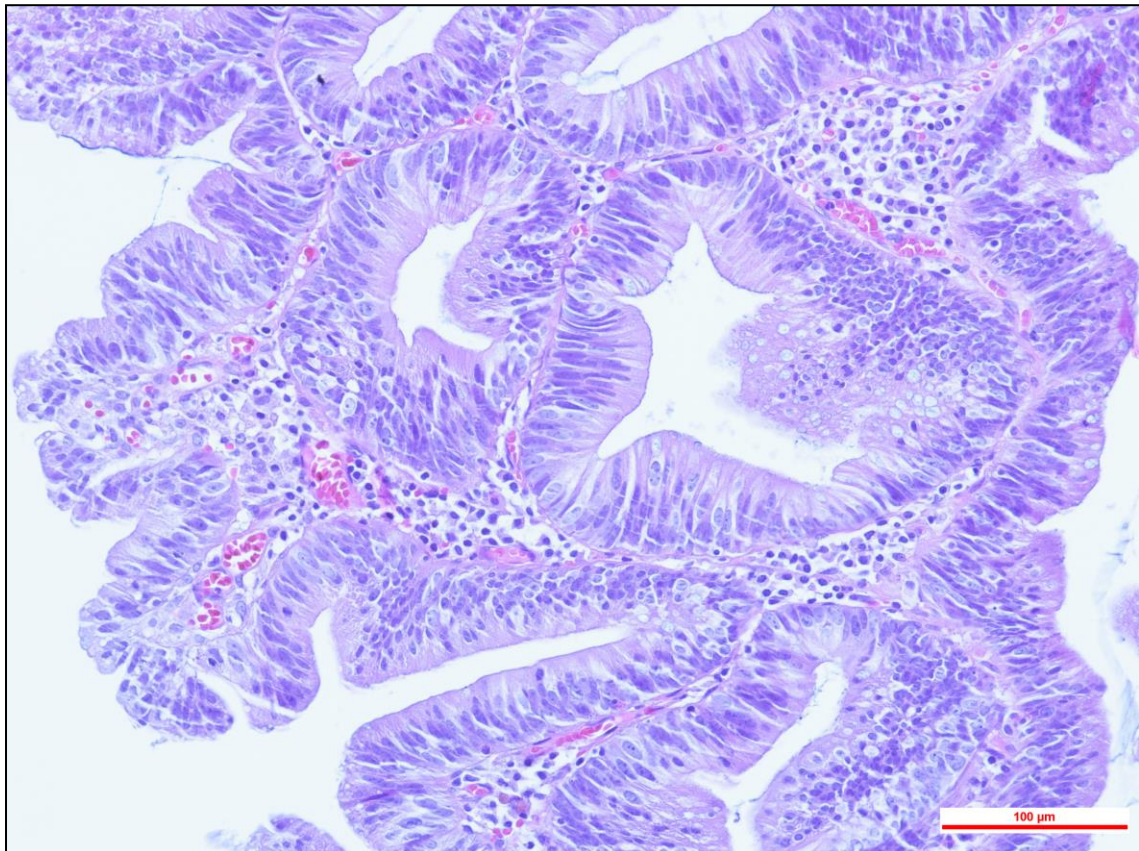
Obr. č. 12 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 1- Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



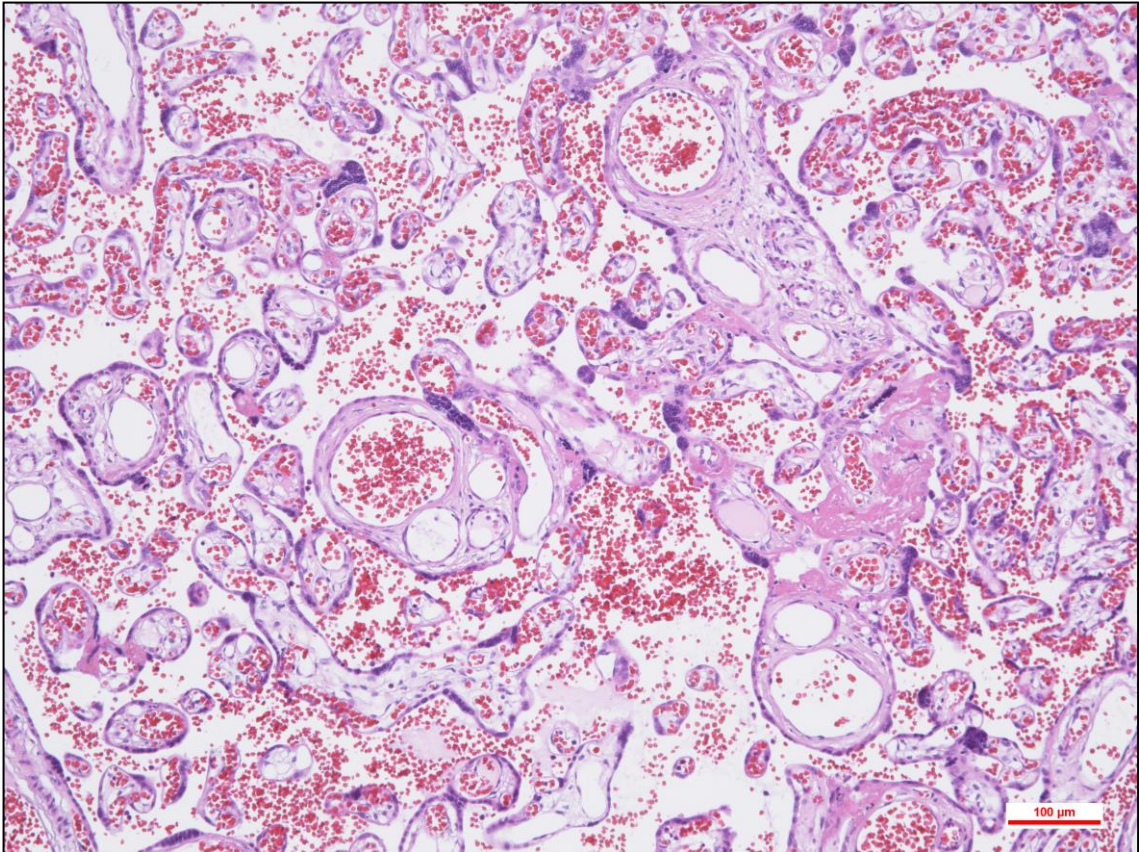
Obr. č. 13 - Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 1 – Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



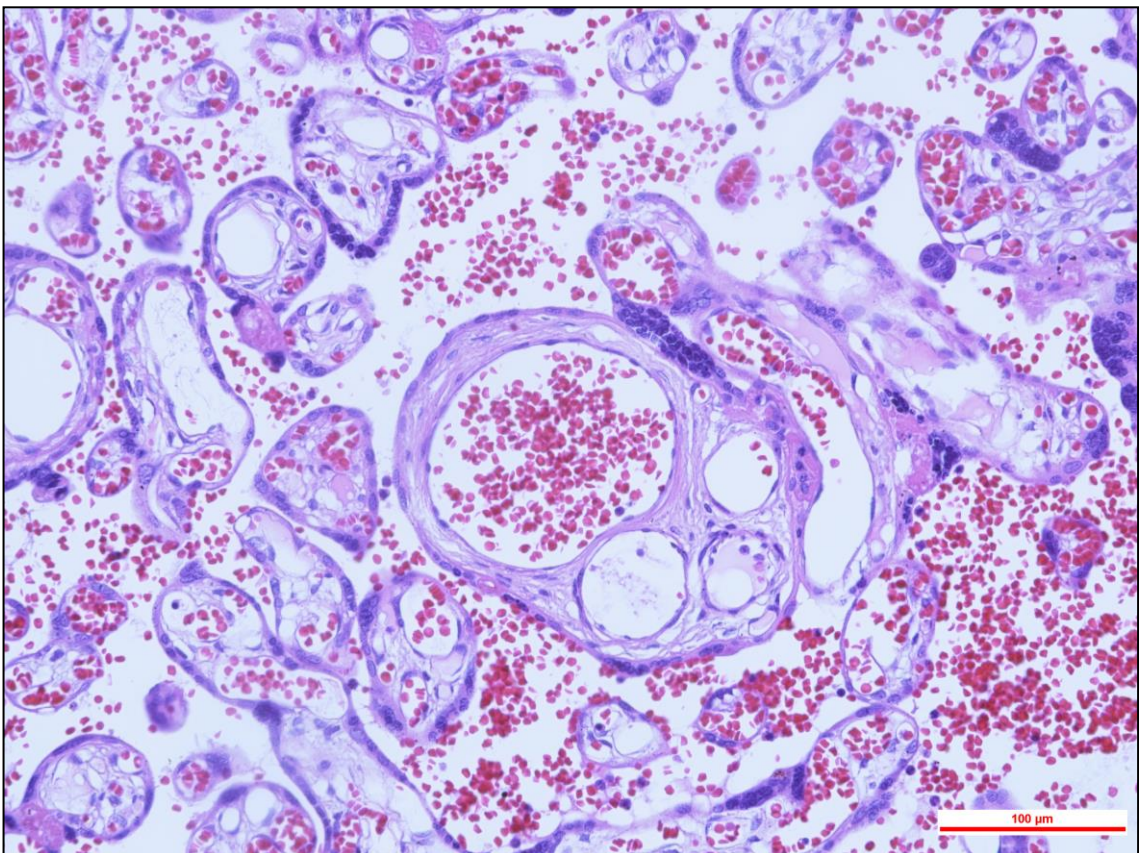
Obr. č. 14 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 1- Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



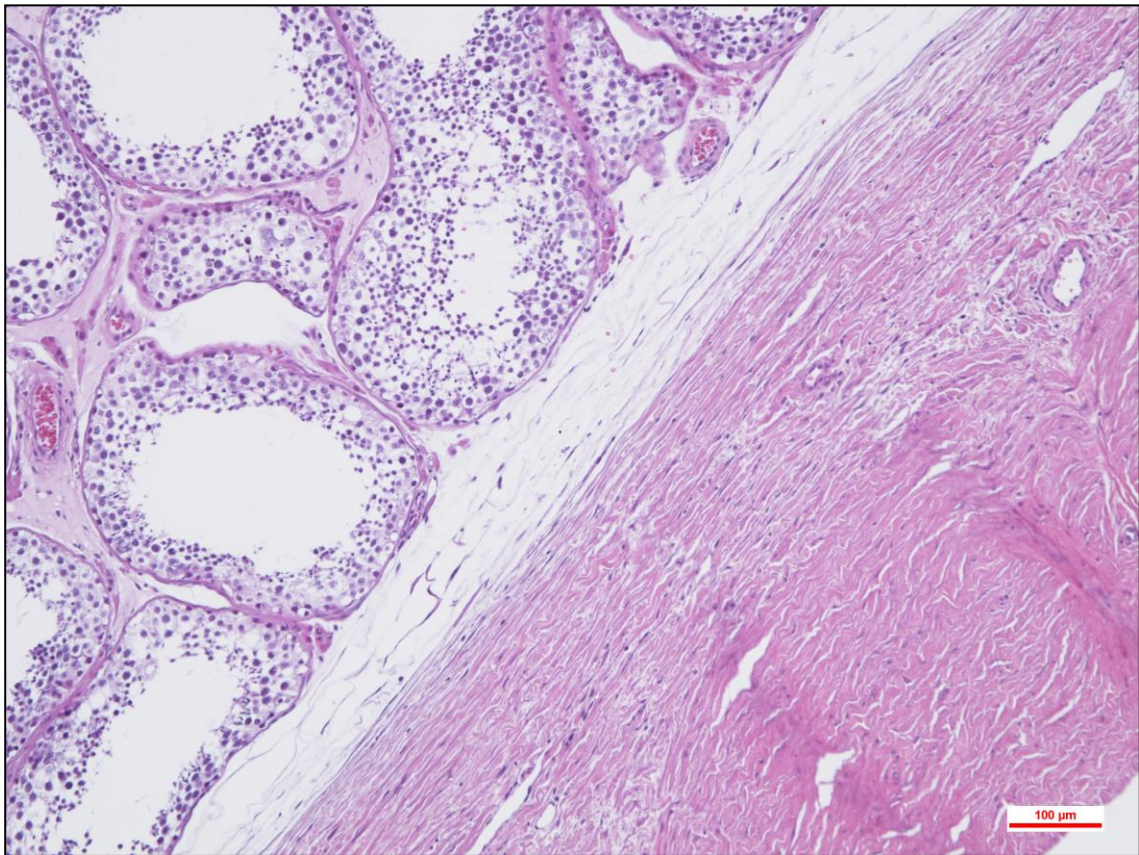
Obr. č. 15 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 1 - Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



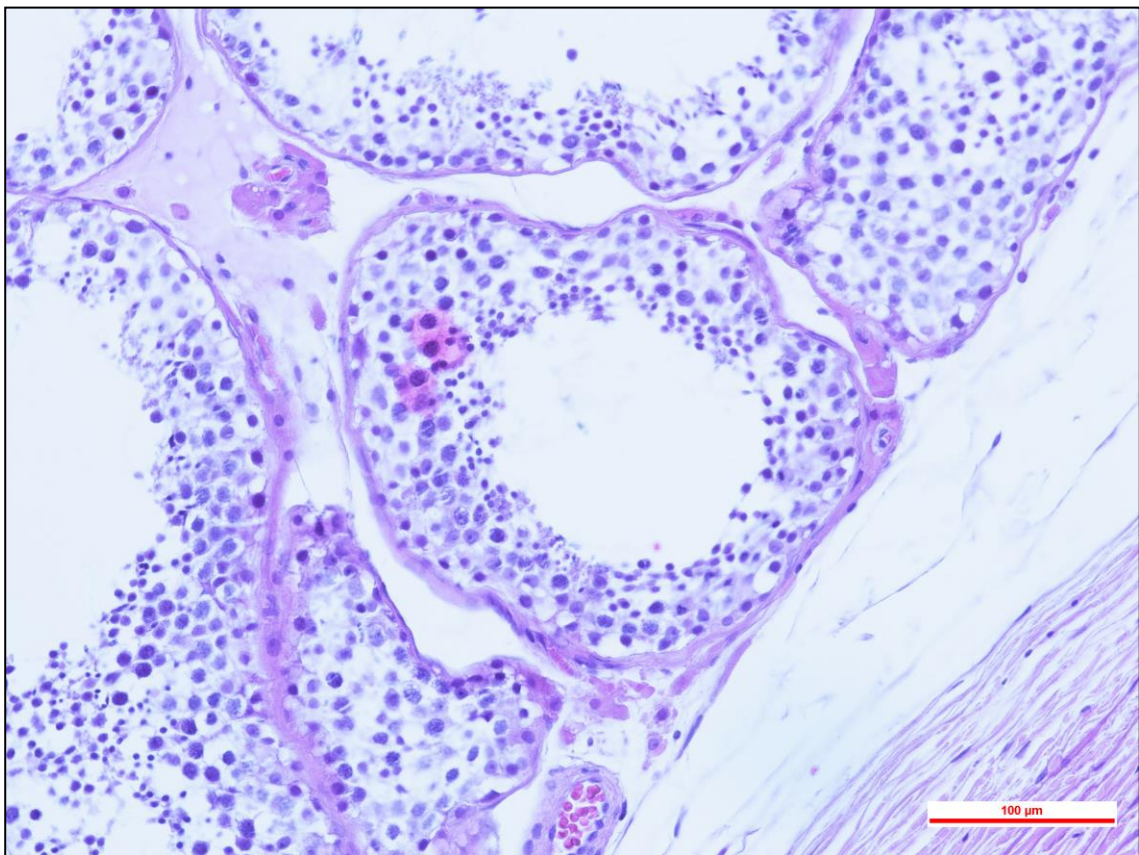
Obr. č. 16 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 1 - Placenta (zvětšeno 100x)



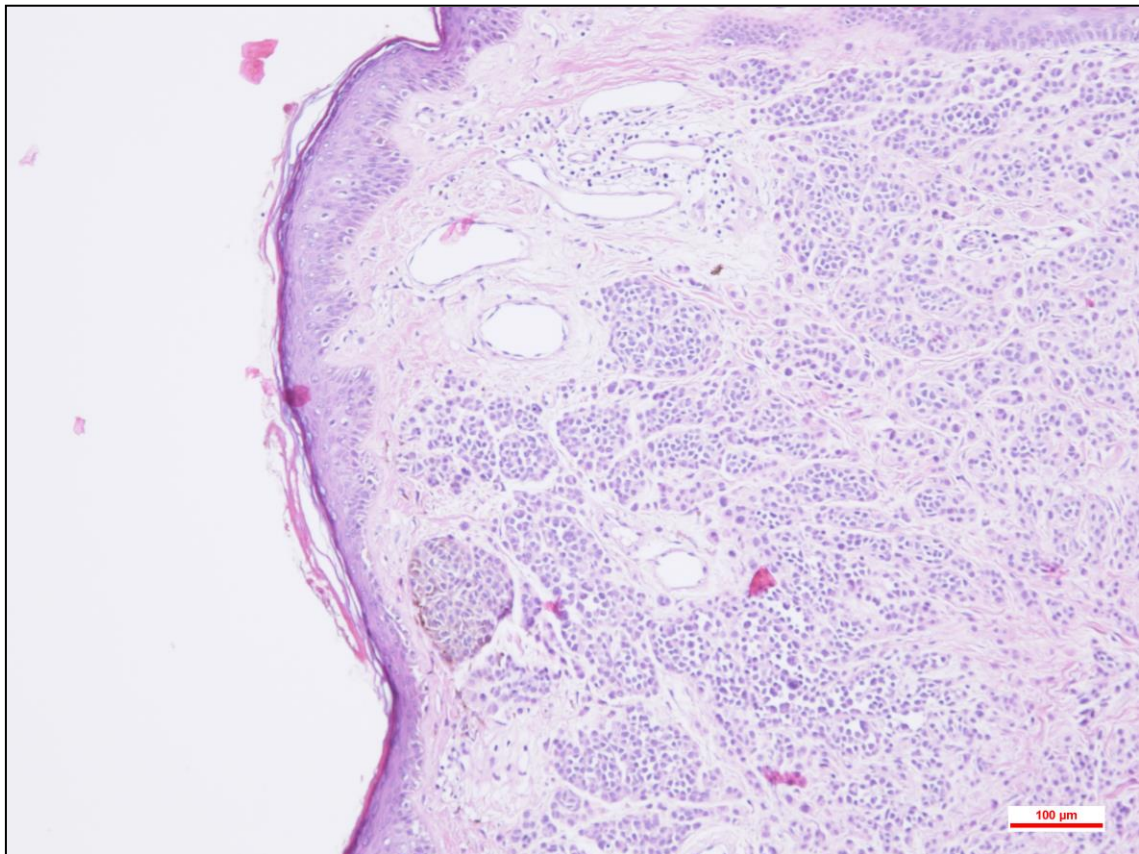
Obr. č. 17 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 1 - Placenta (zvětšeno 200x)



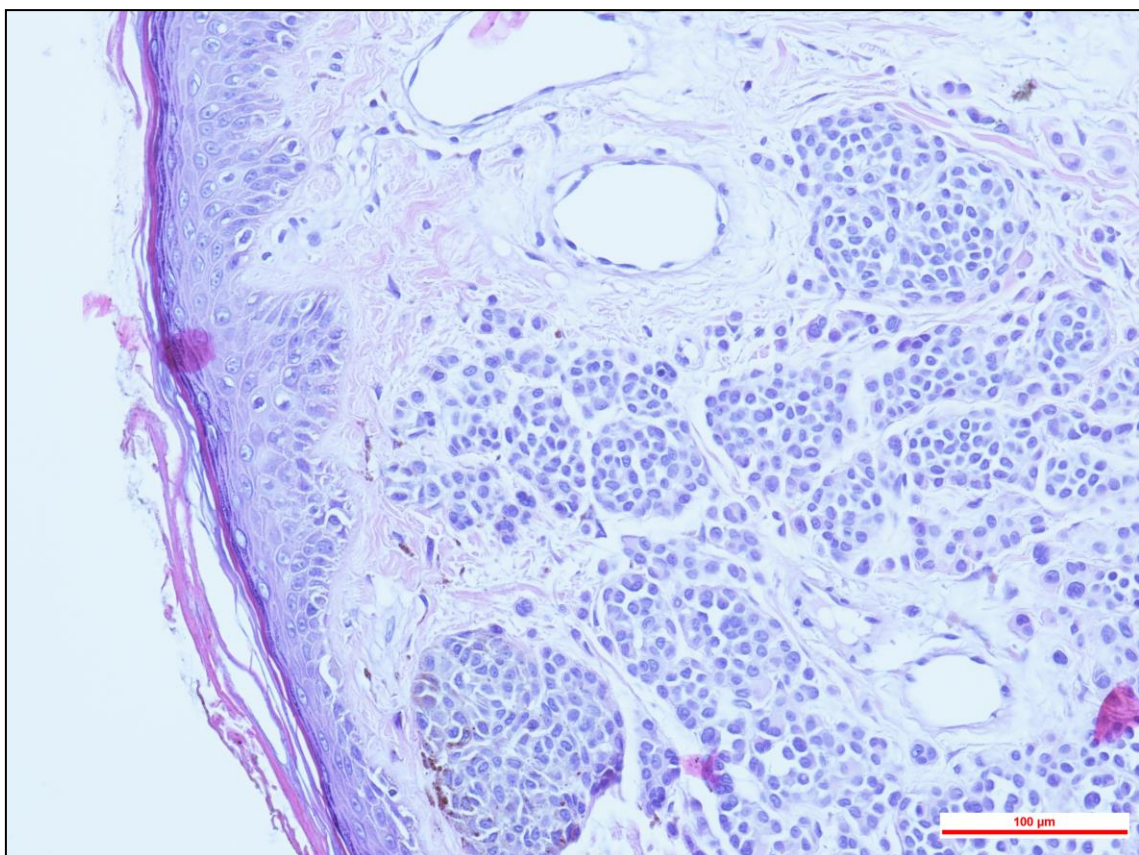
Obr. č. 18 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 1 - Varle (zvětšeno 100x)



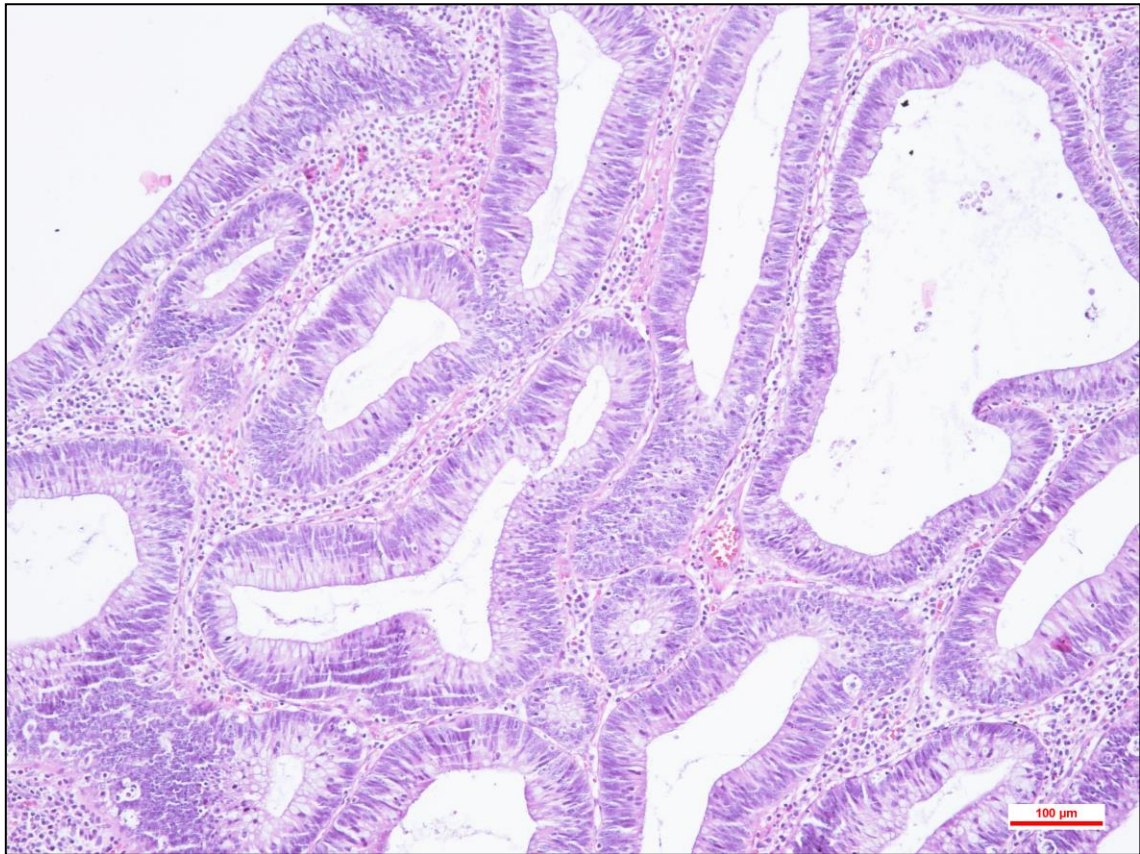
Obr. č. 19 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 1 - Varle (zvětšeno 200x)



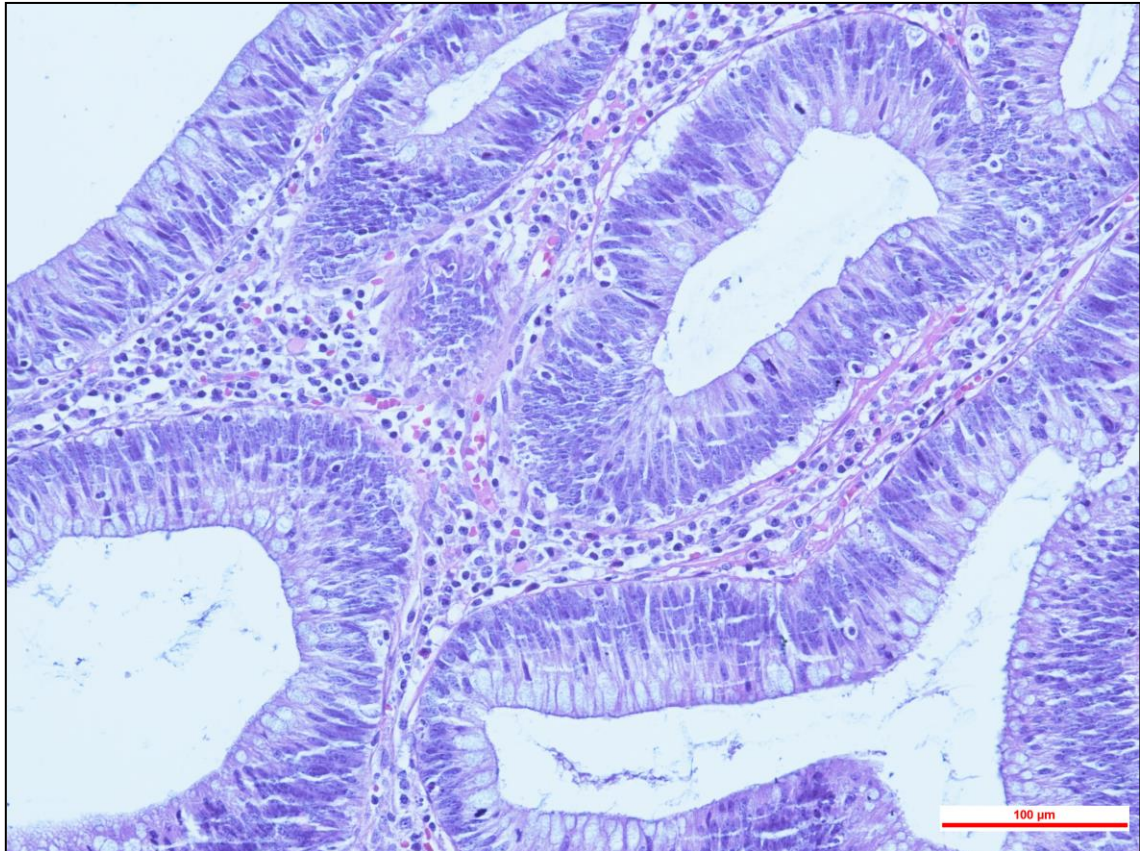
Obr. č. 20 - Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 2 - Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



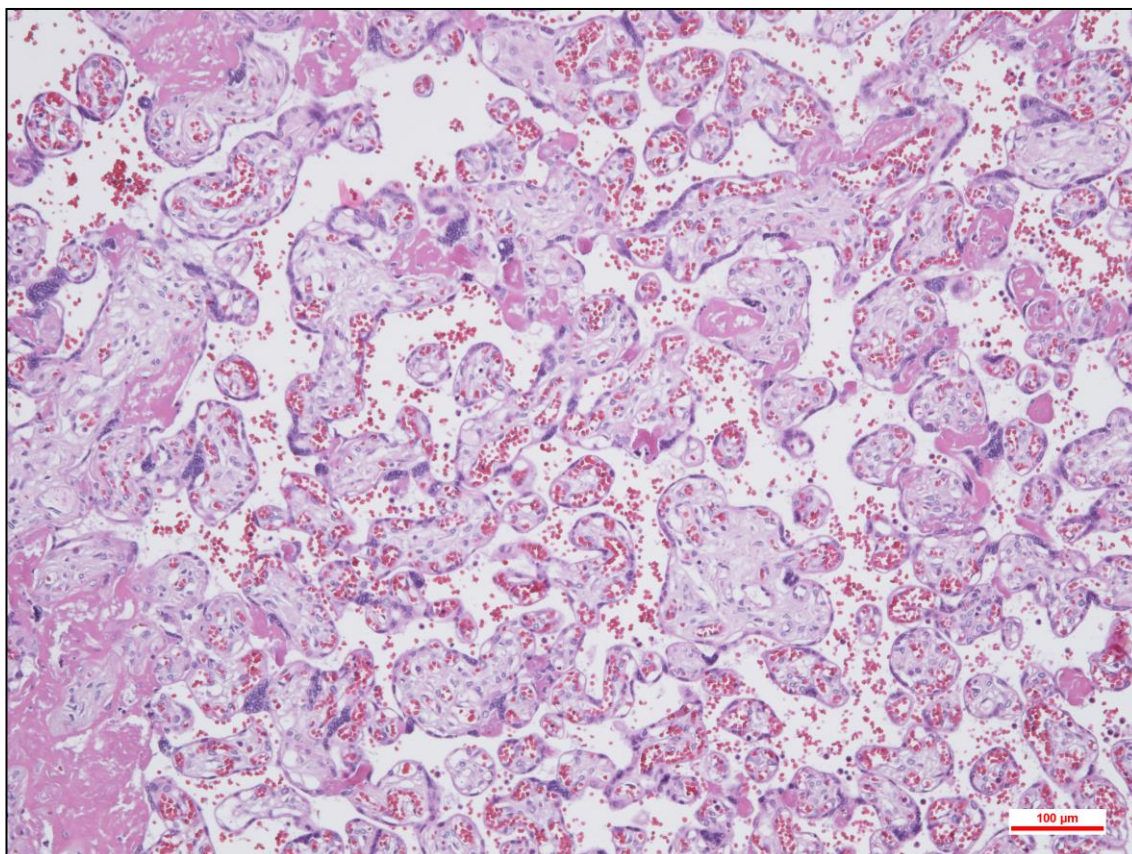
Obr. č.21 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 2- Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



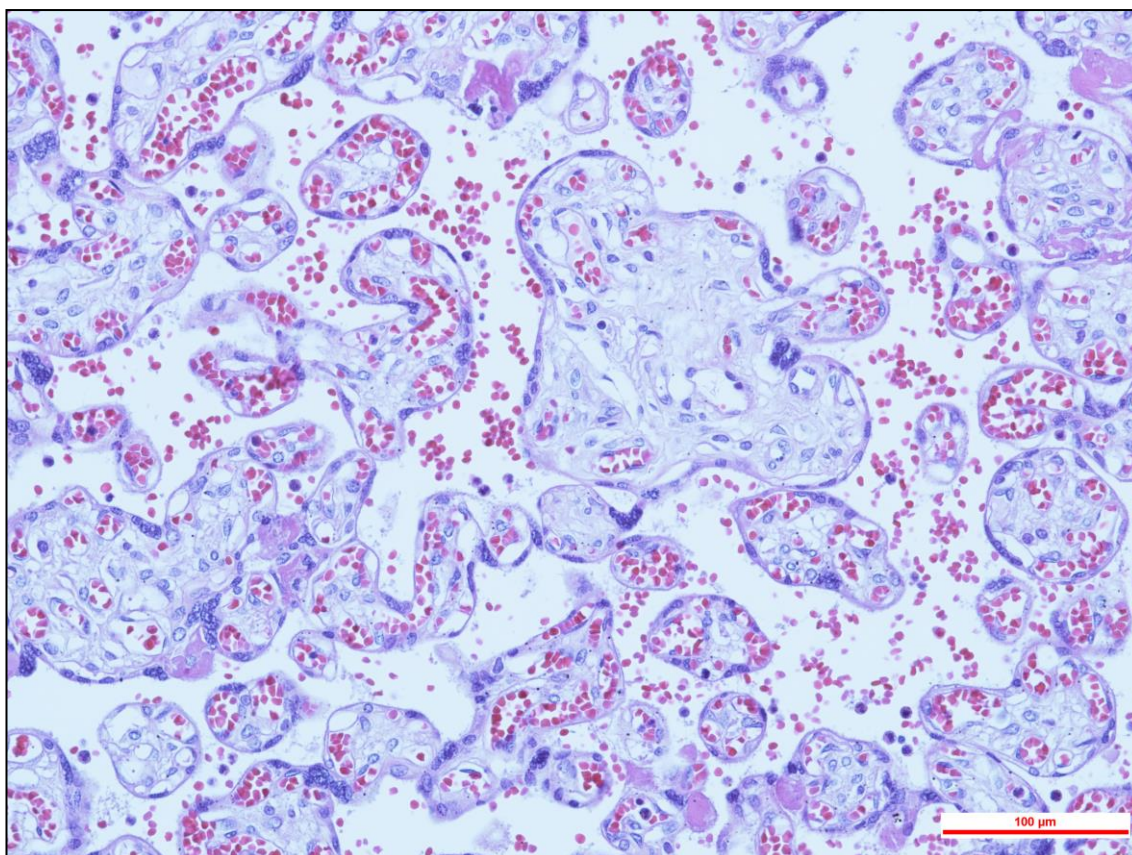
Obr. č. 22 - Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 2 – Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



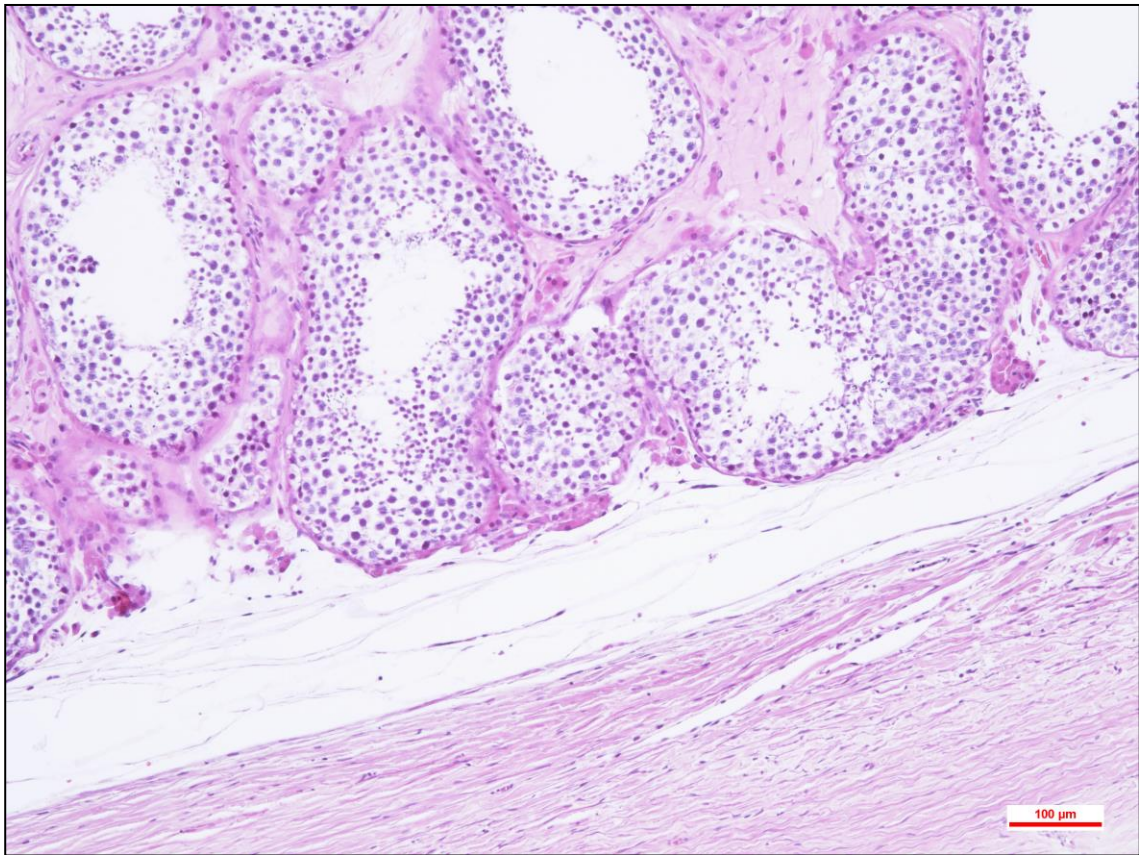
Obr. č. 23 - Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 2 – Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



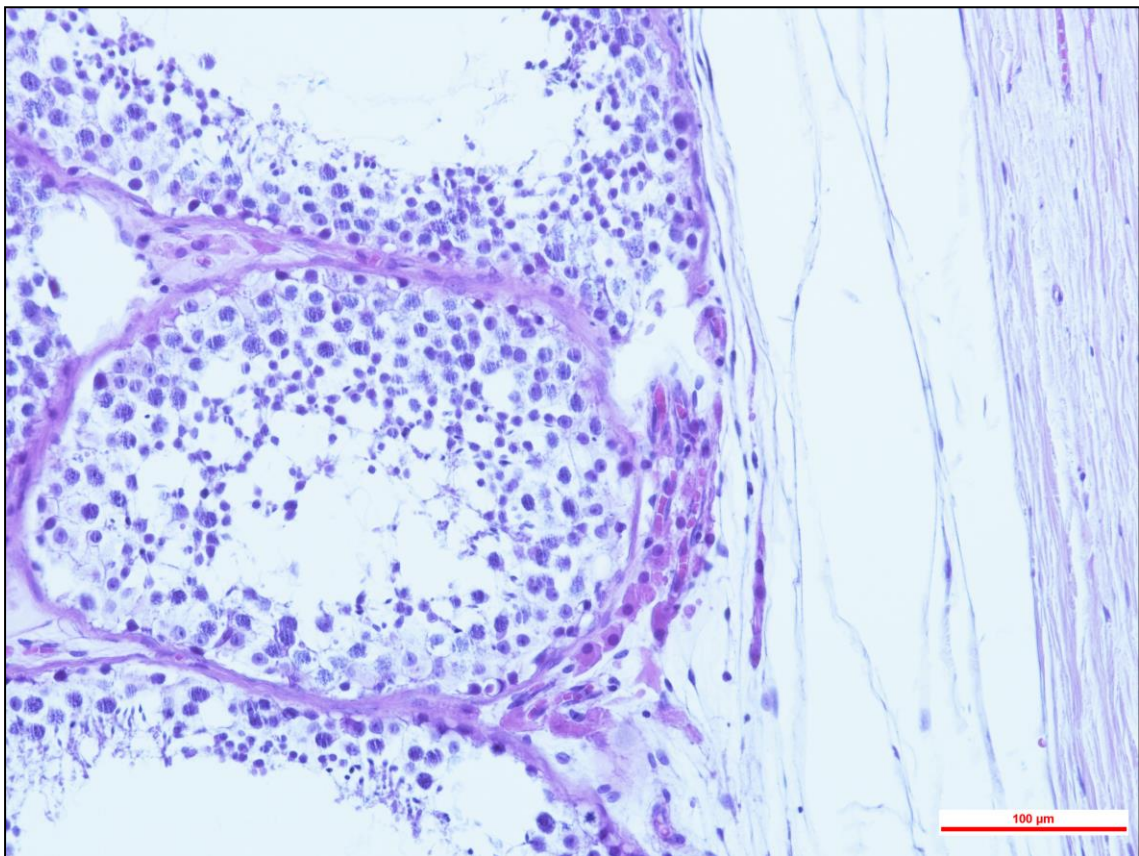
Obr. č. 24 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 2 - Placenta (zvětšeno 100x)



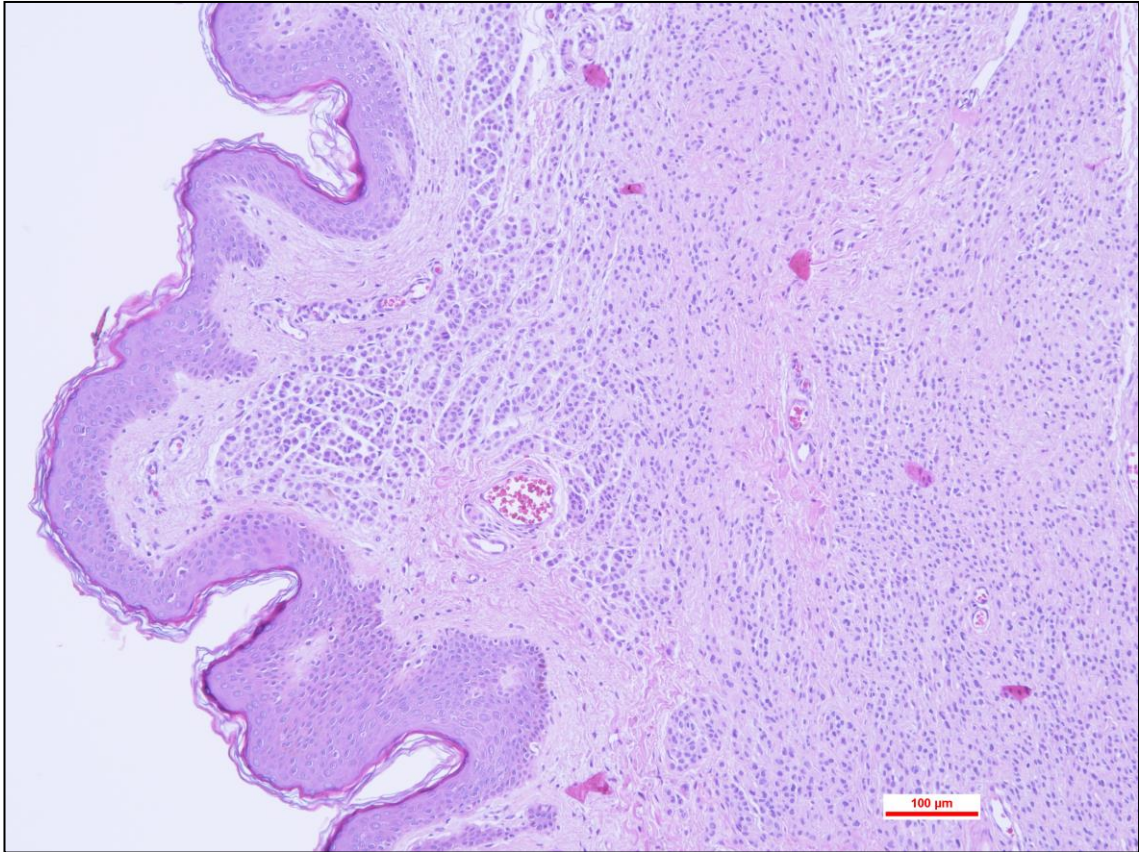
Obr. č. 25 - Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 2 – Placenta (zvětšeno 200x)



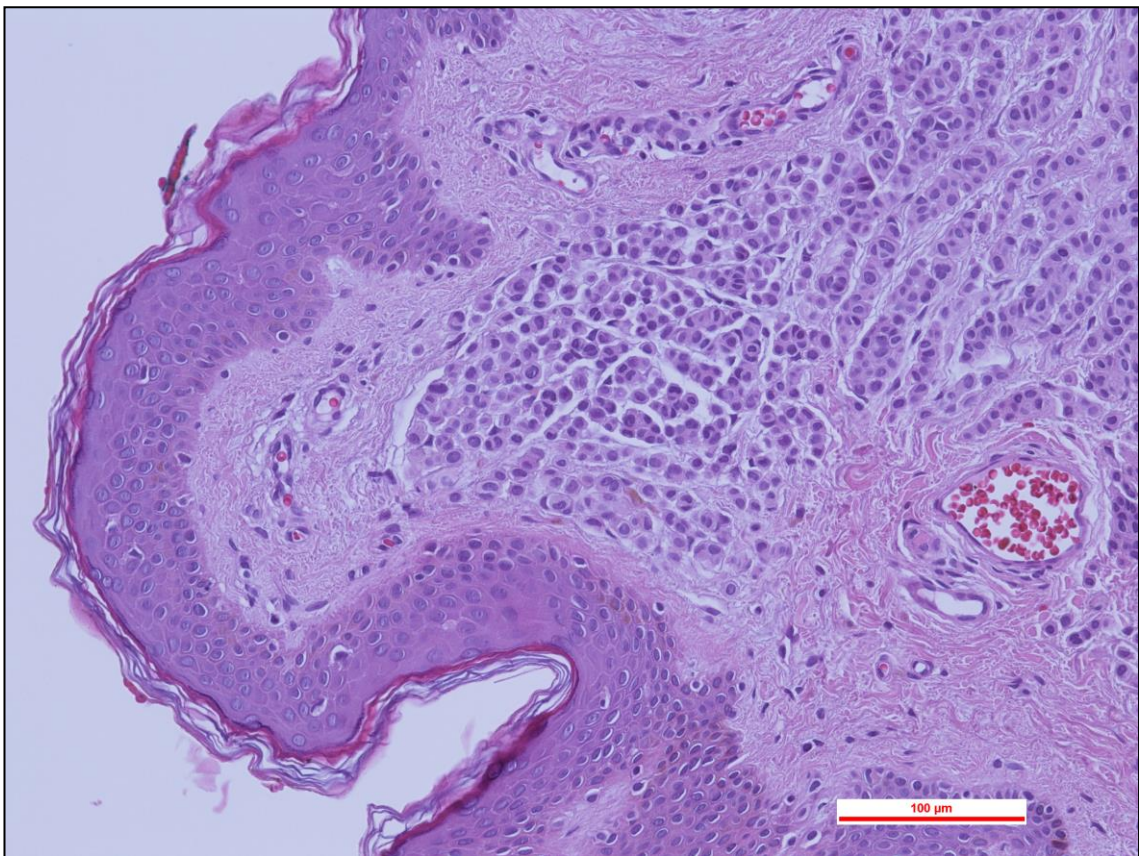
Obr. č. 26 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 2 – Varle (zvětšeno 100x)



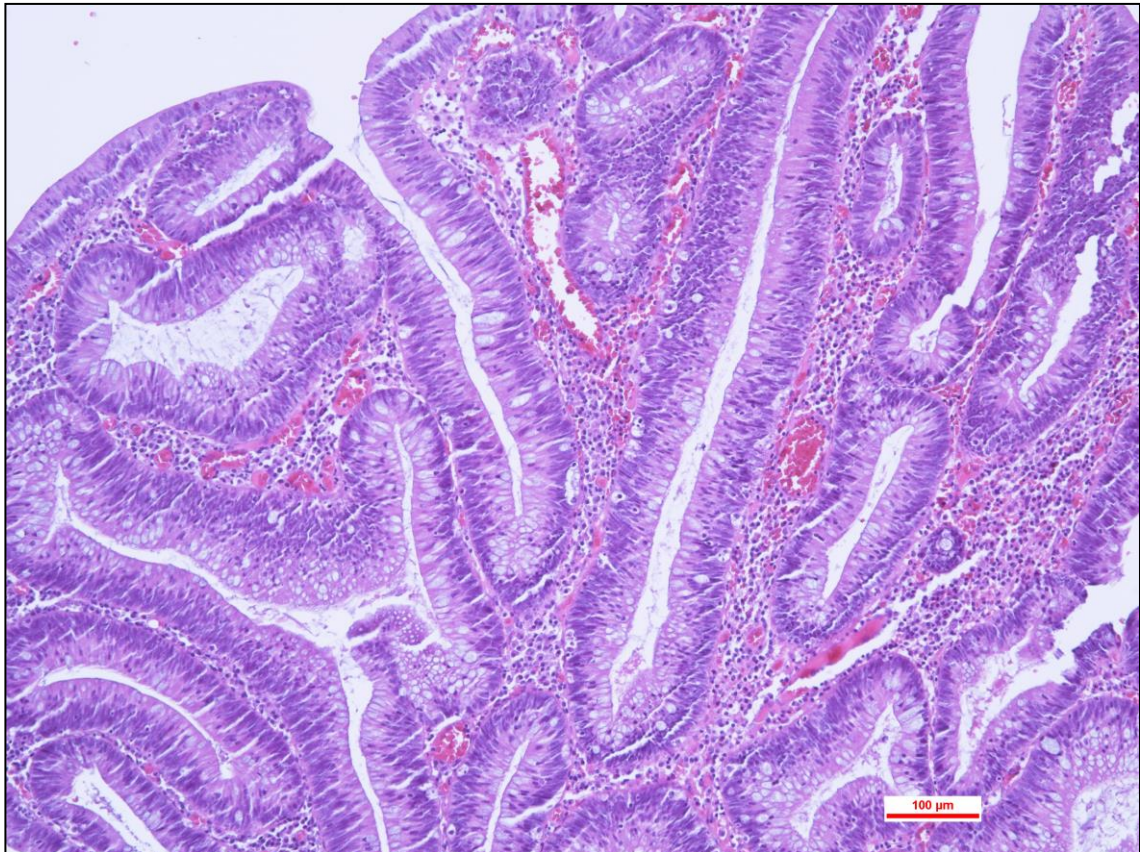
Obr. č. 27 – Ověření hypotézy č. 1, Pokus č. 2 - Varle (zvětšeno 200x)



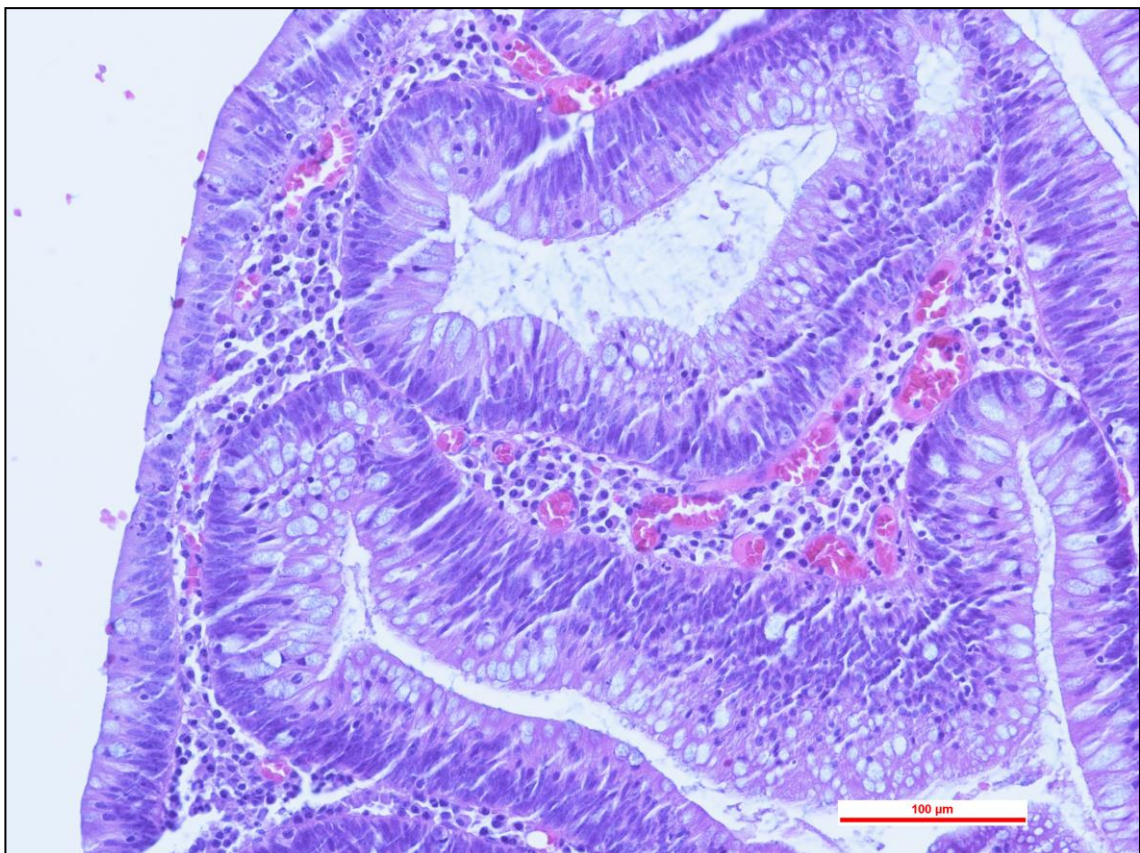
Obr. č. 28 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



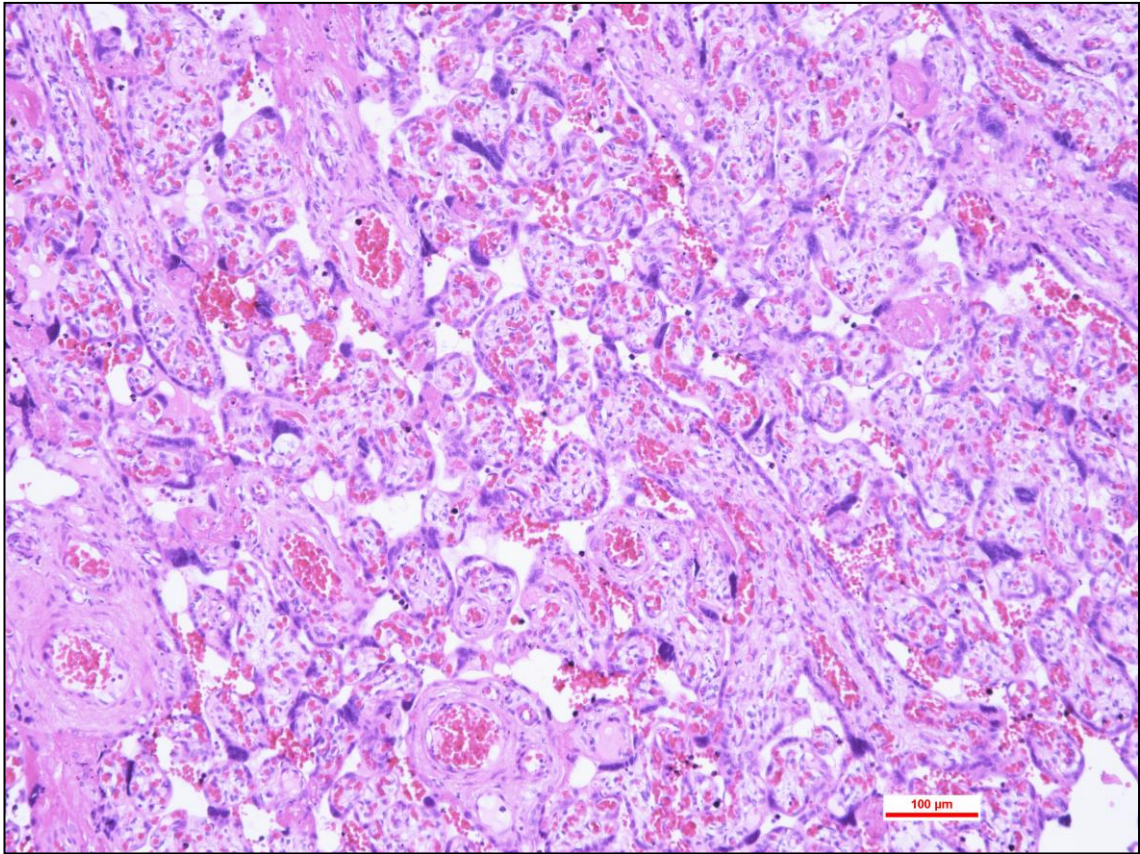
Obr. č. 29 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



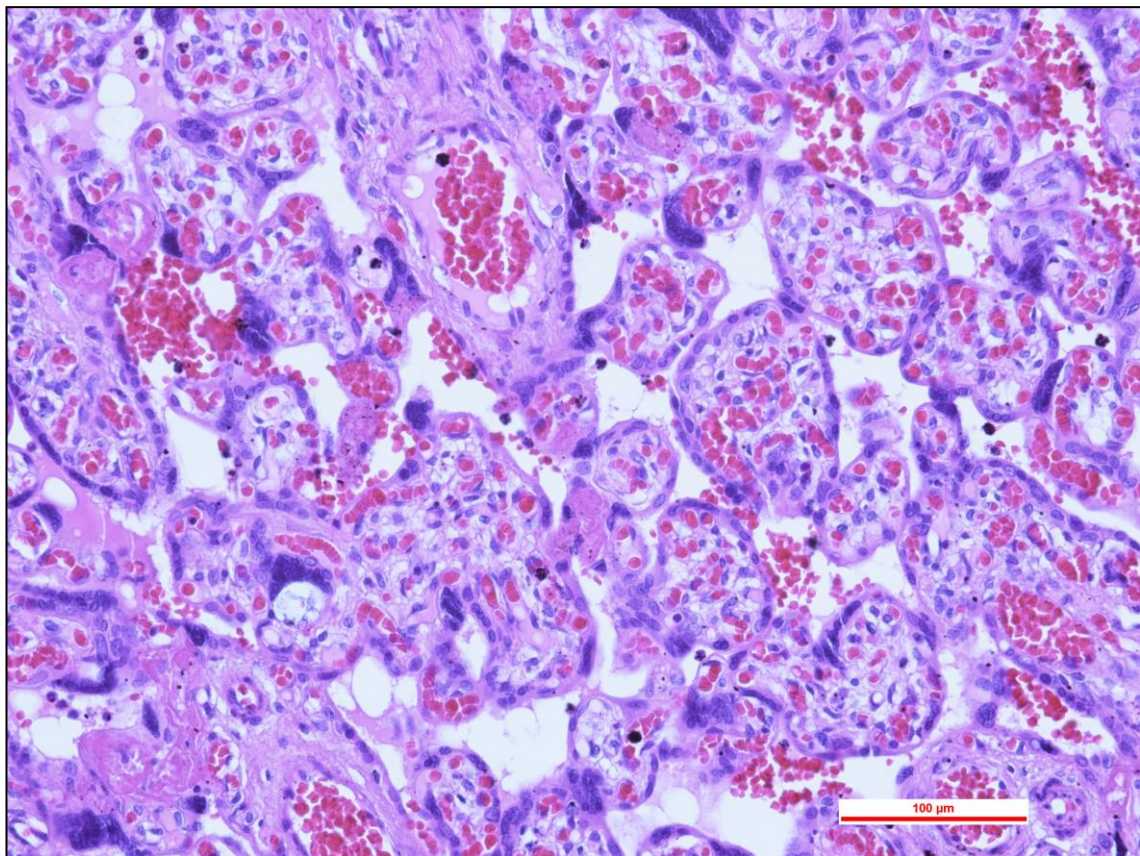
Obr. č. 30 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



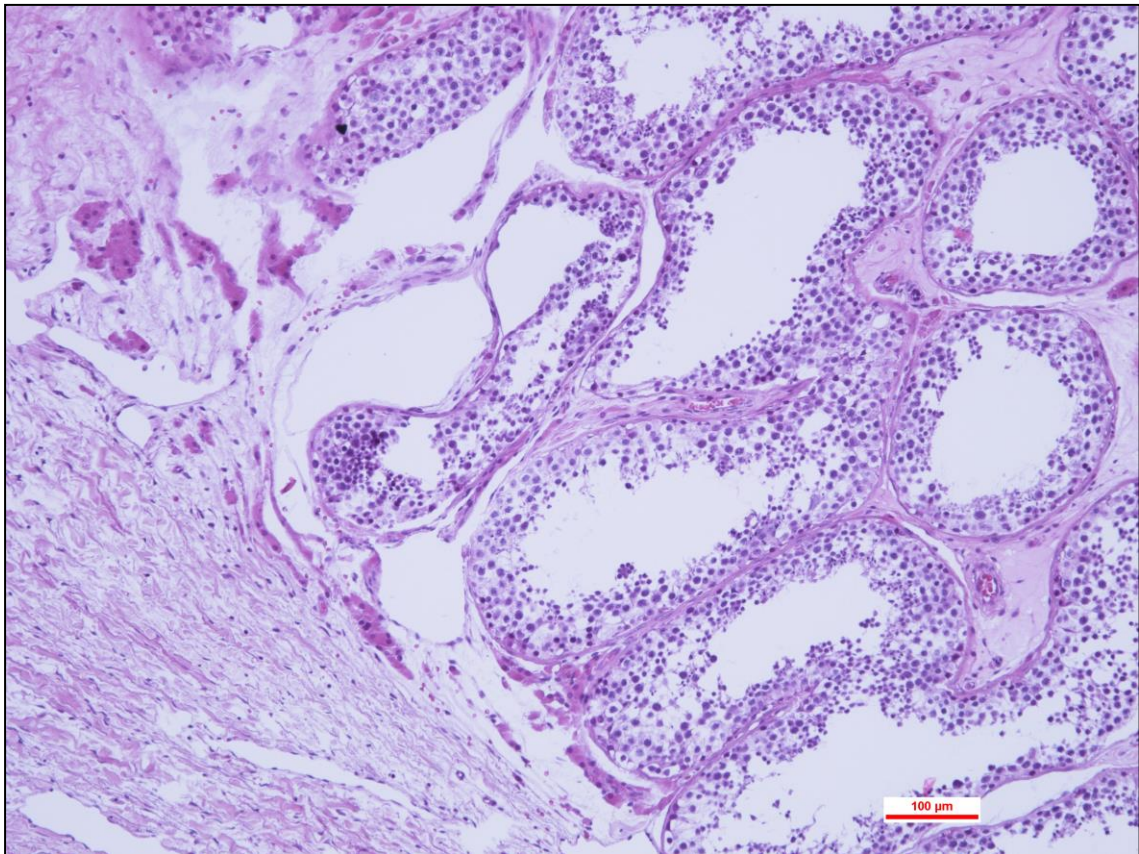
Obr. č. 31 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



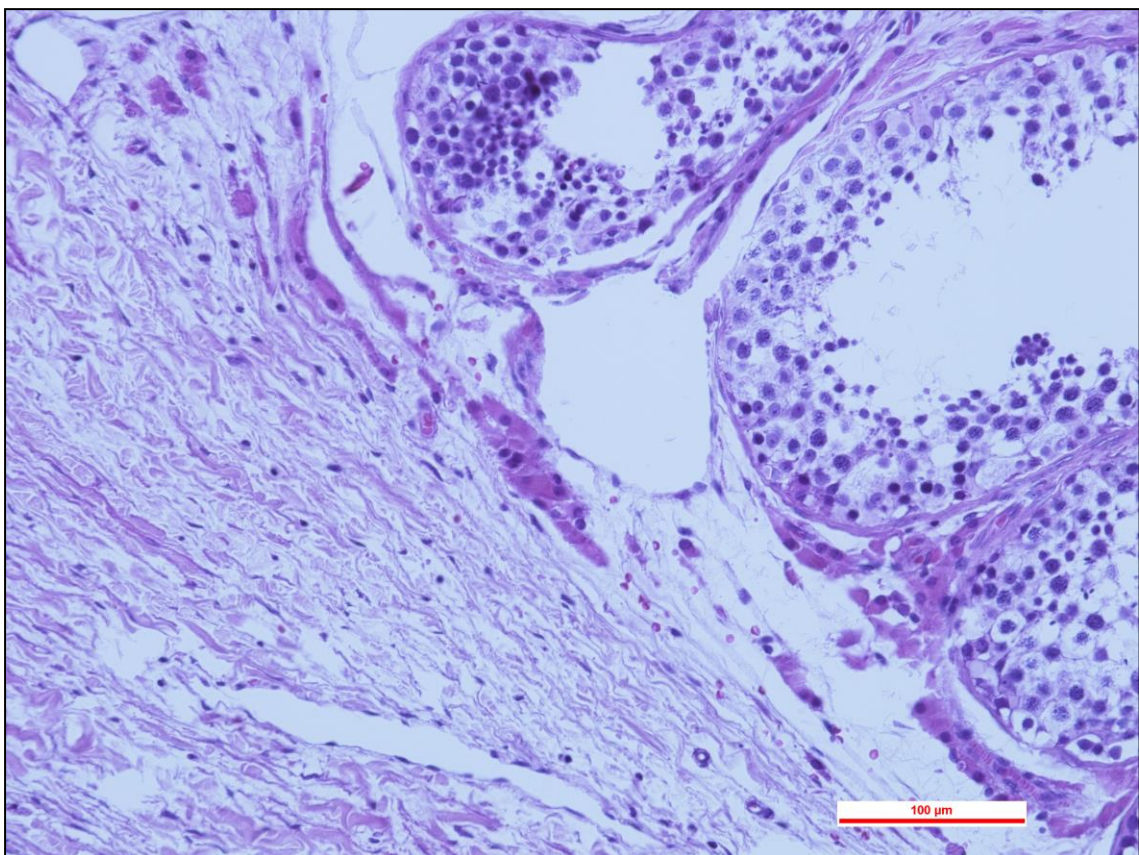
Obr. č. 32 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Placenta (zvětšeno 100x)



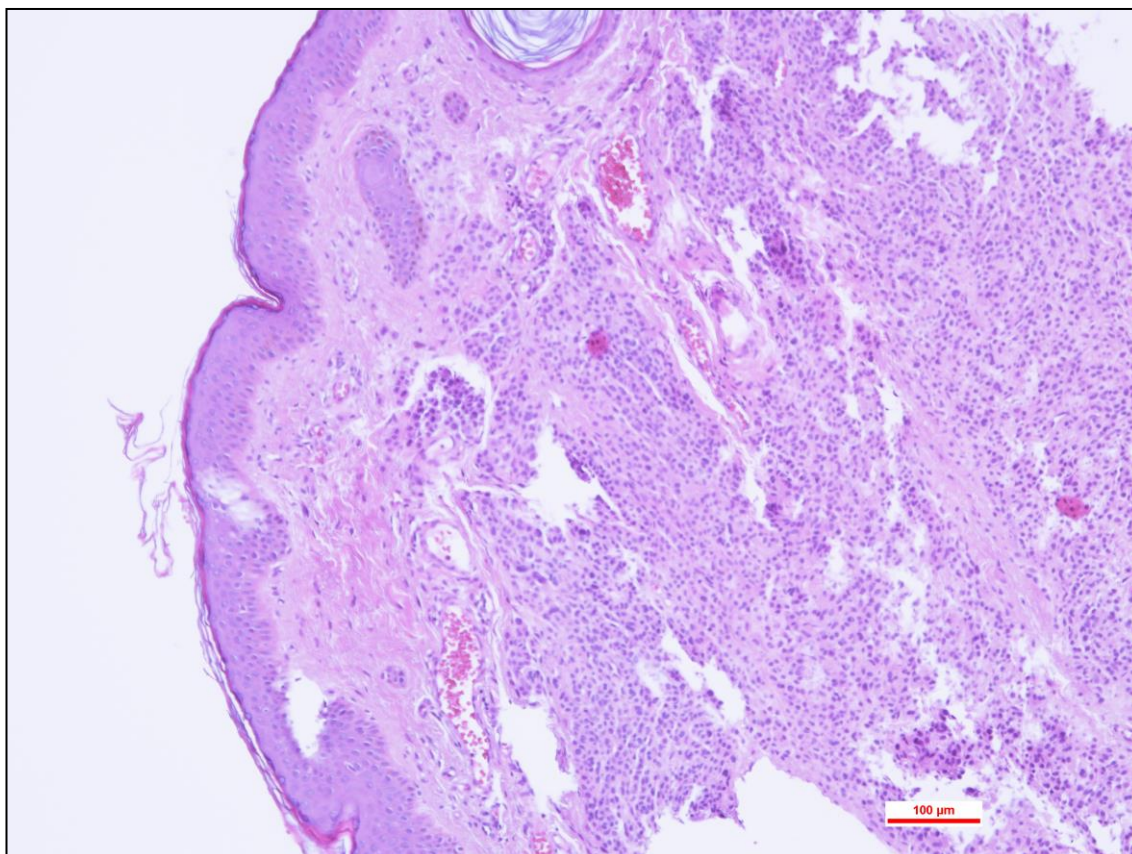
Obr. č. 33 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Placenta (zvětšeno 200x)



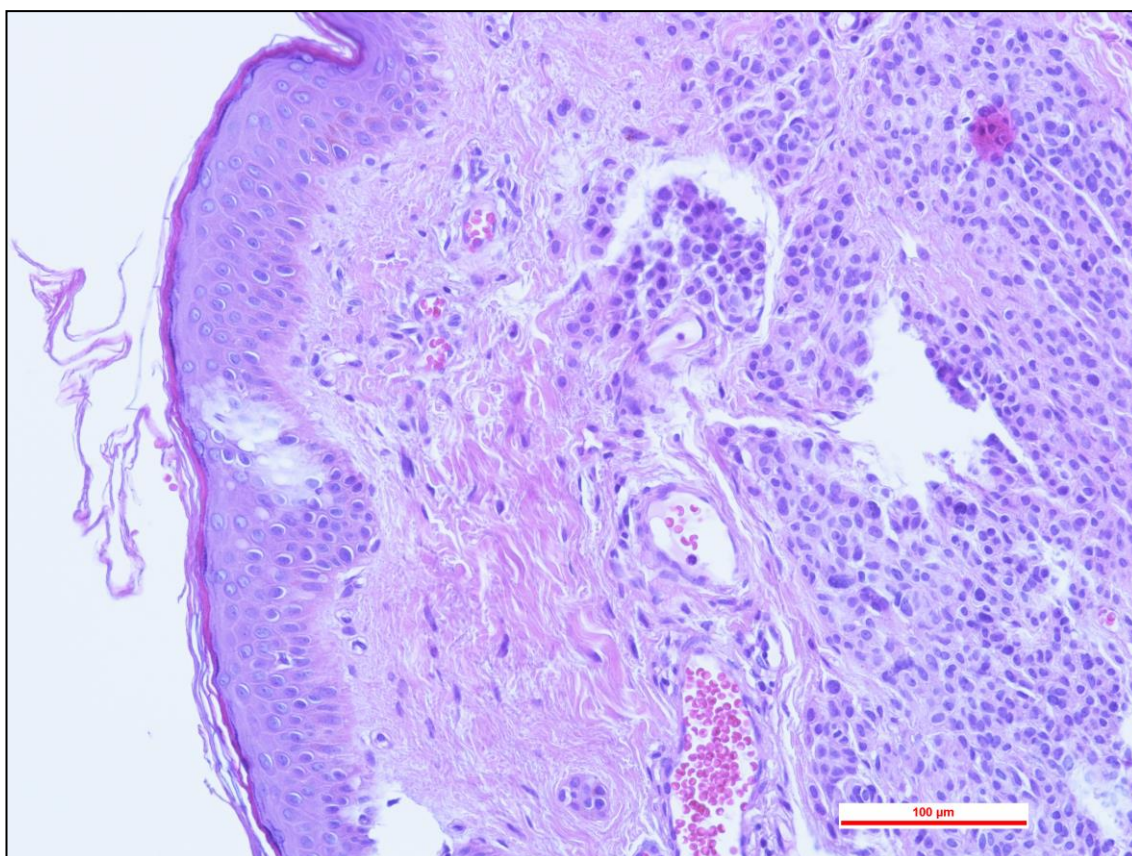
Obr. č. 34 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Varle (zvětšeno 100x)



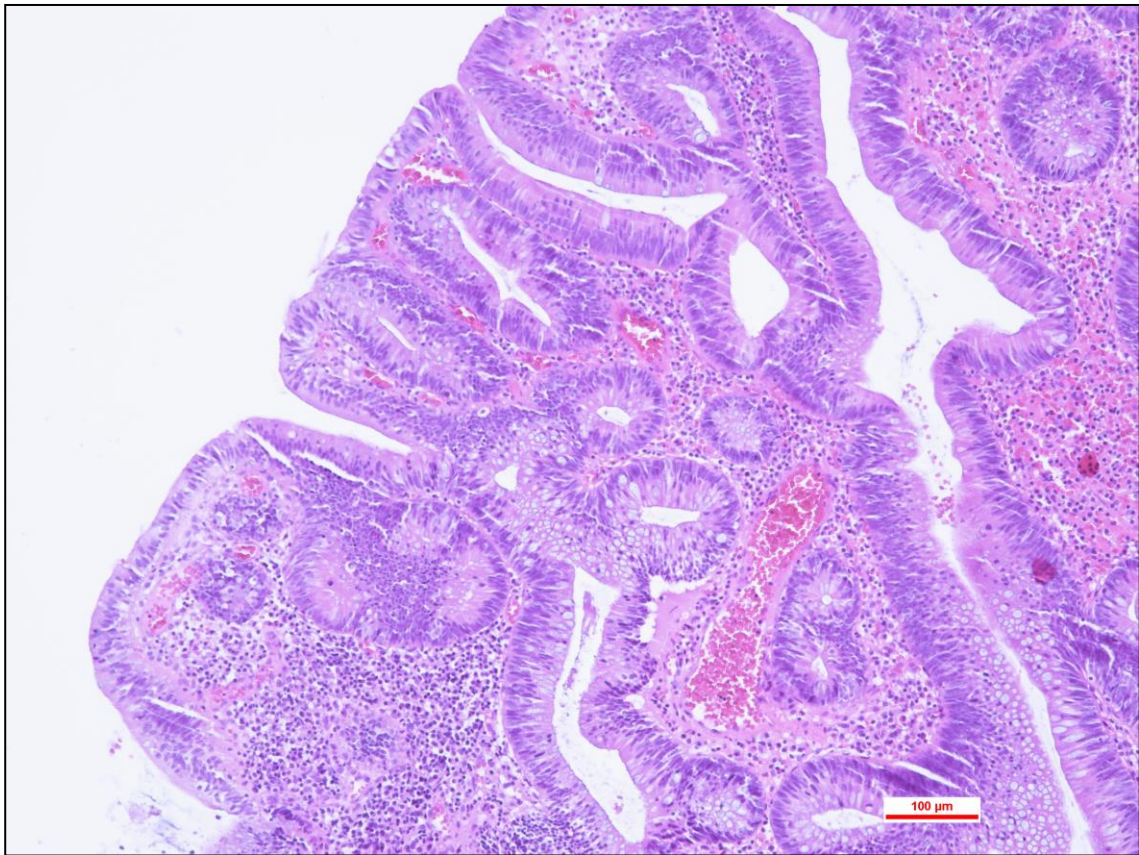
Obr. č. 35 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Varle (zvětšeno 200x)



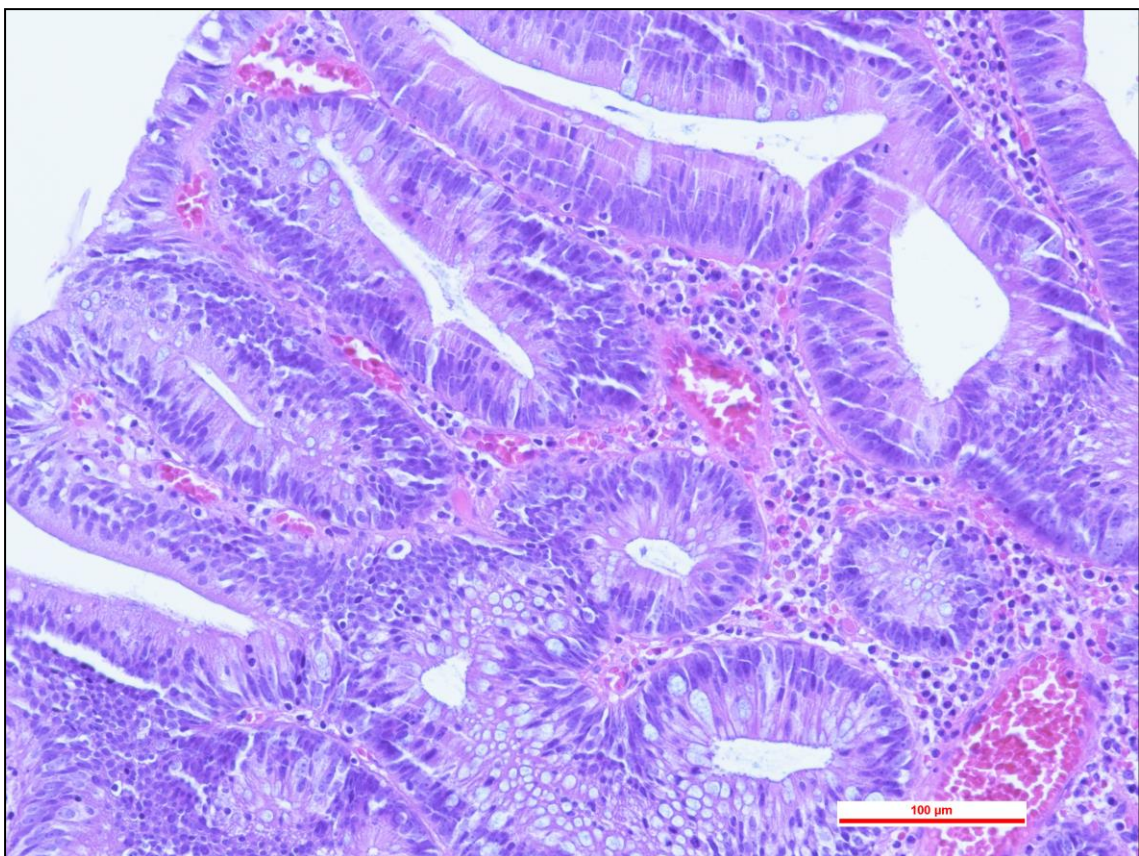
Obr. č. 36 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 2 - Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



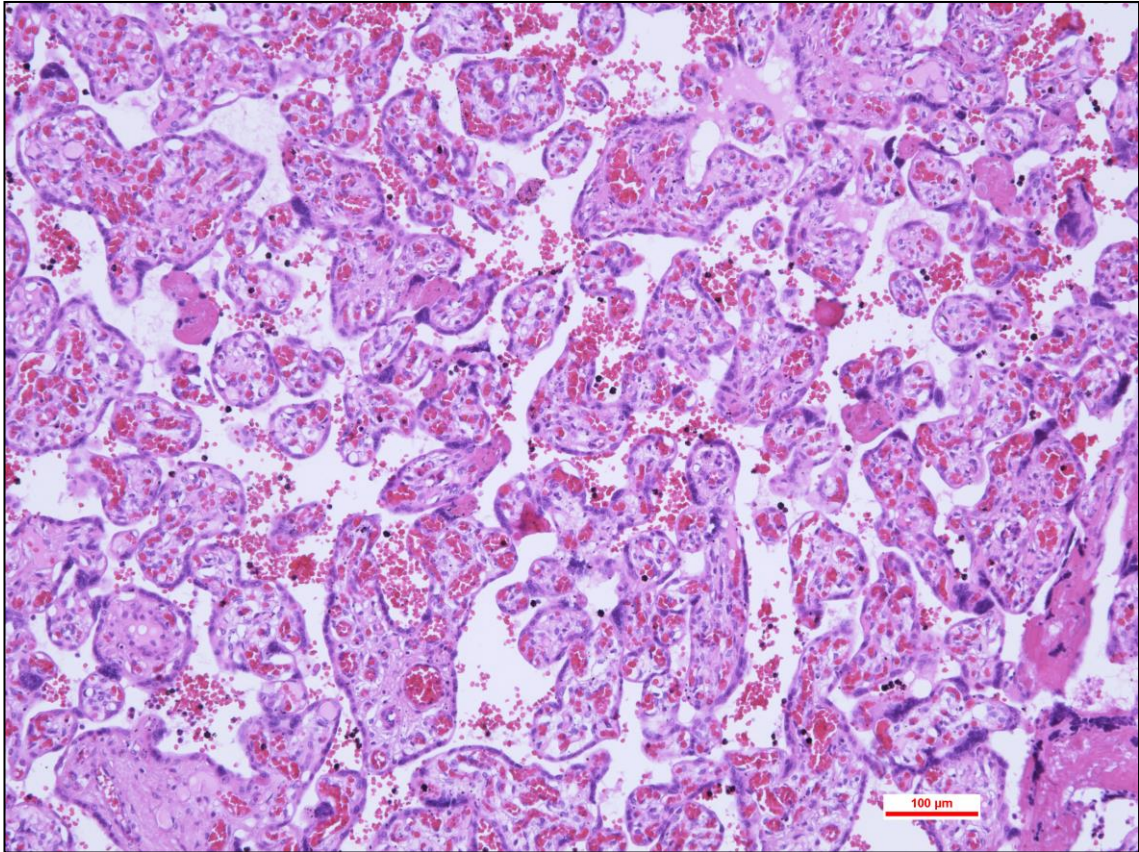
Obr. č. 37 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 2 - Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



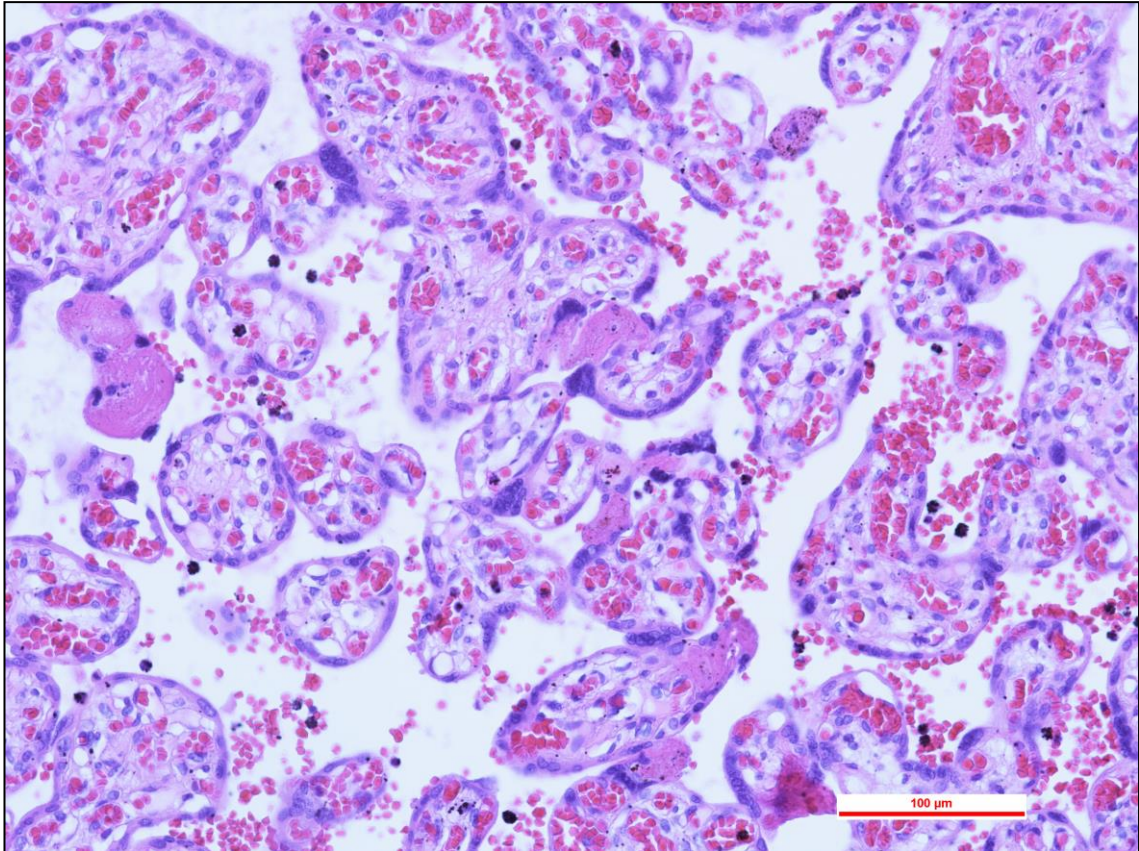
Obr. č. 38 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 2 - Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



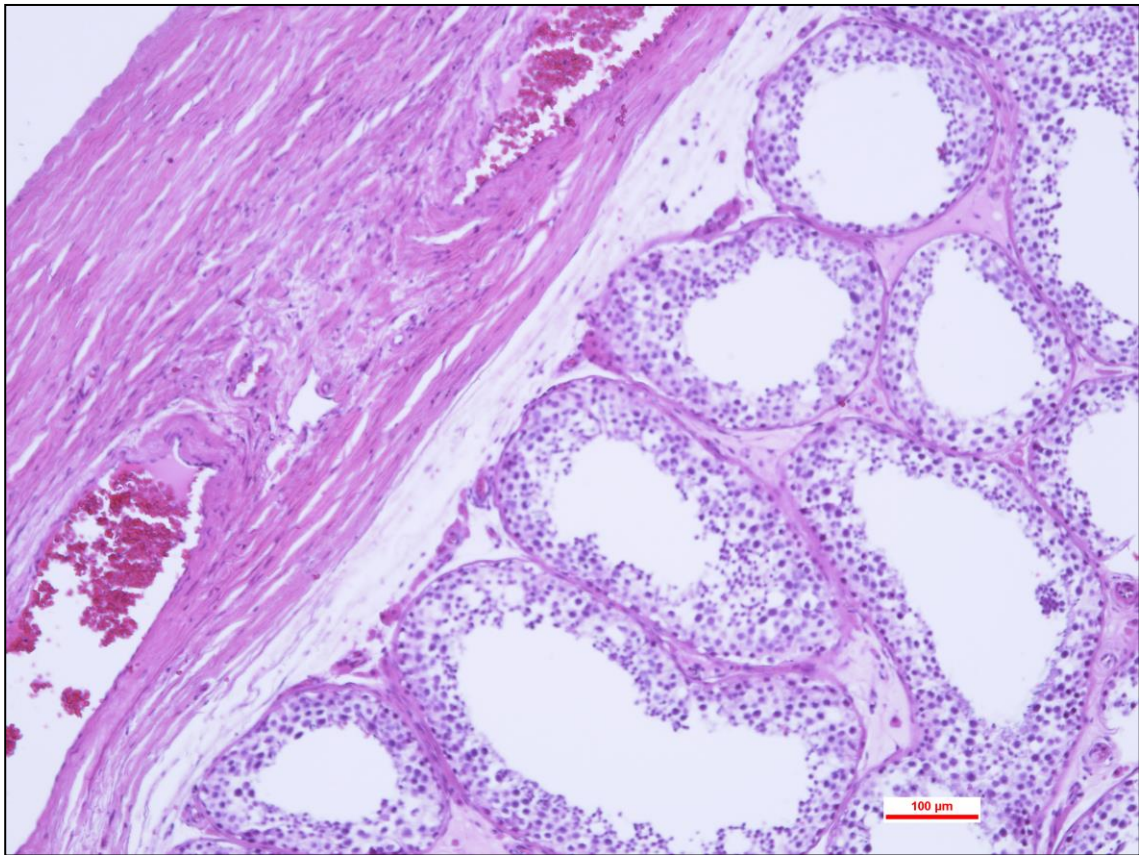
Obr. č. 39 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 2 - Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



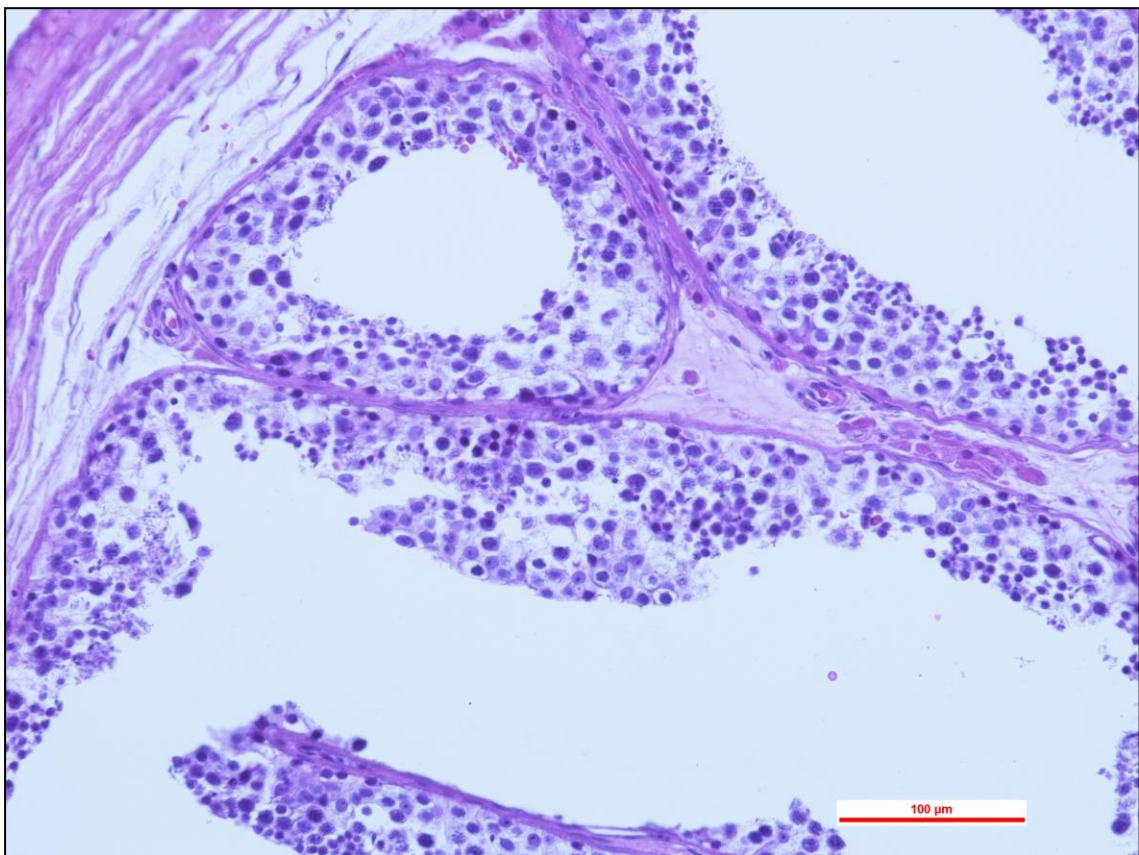
Obr. č. 40 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 2 - Placenta (zvětšeno 100x)



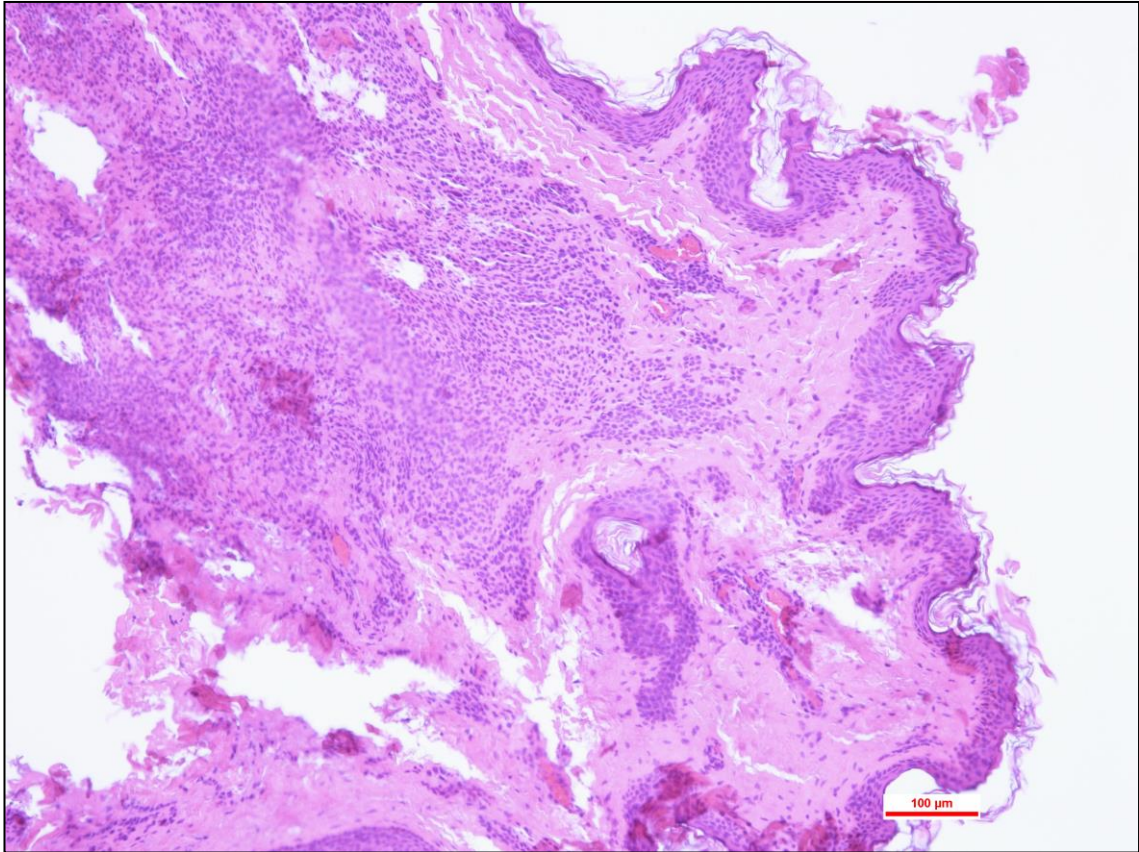
Obr. č. 41 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 2 - Placenta (zvětšeno 200x)



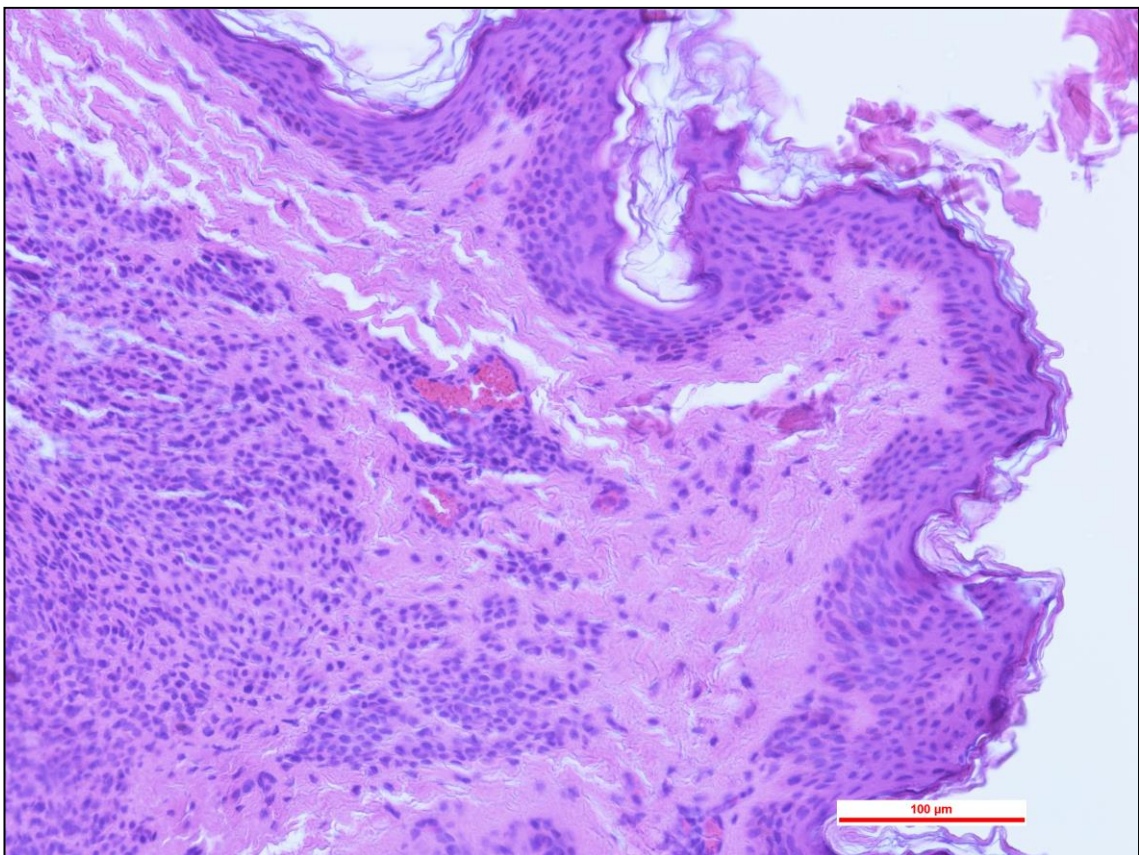
Obr. č. 42 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 2 - Varle (zvětšeno 100x)



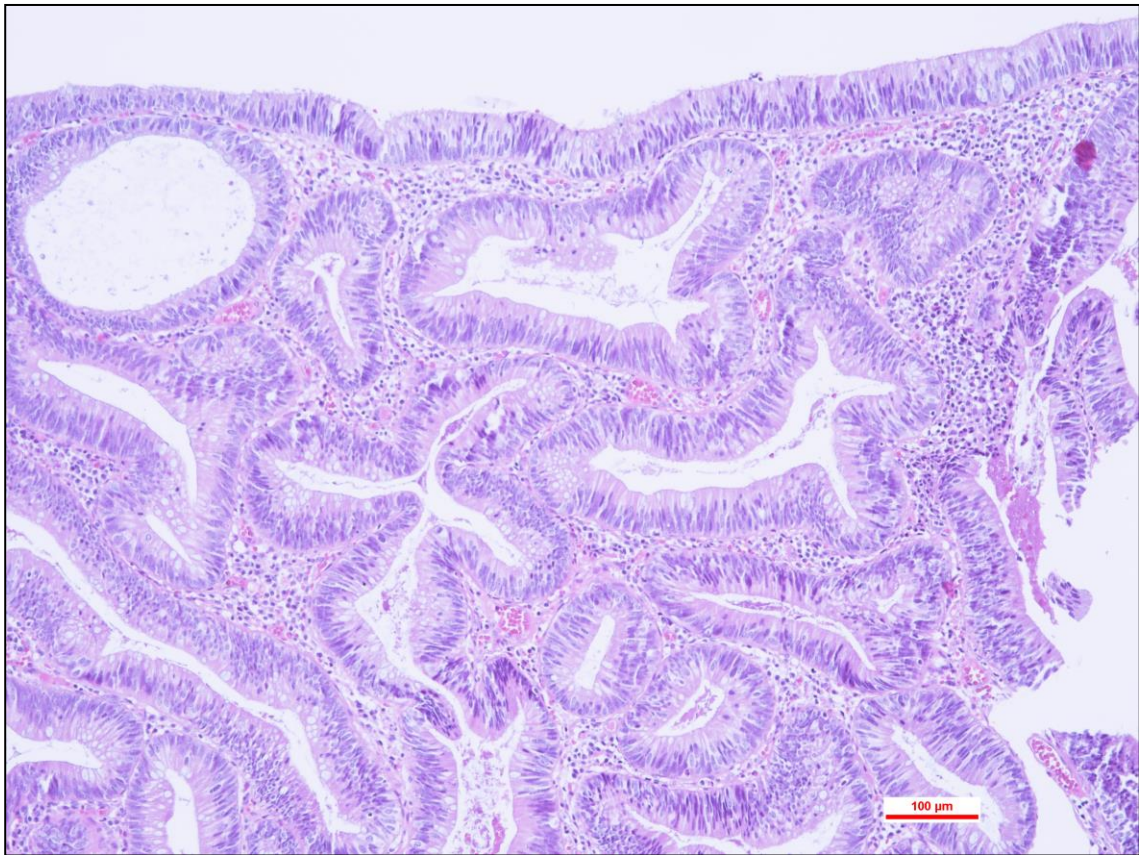
Obr. č. 43 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 2 - Varle (zvětšeno 200x)



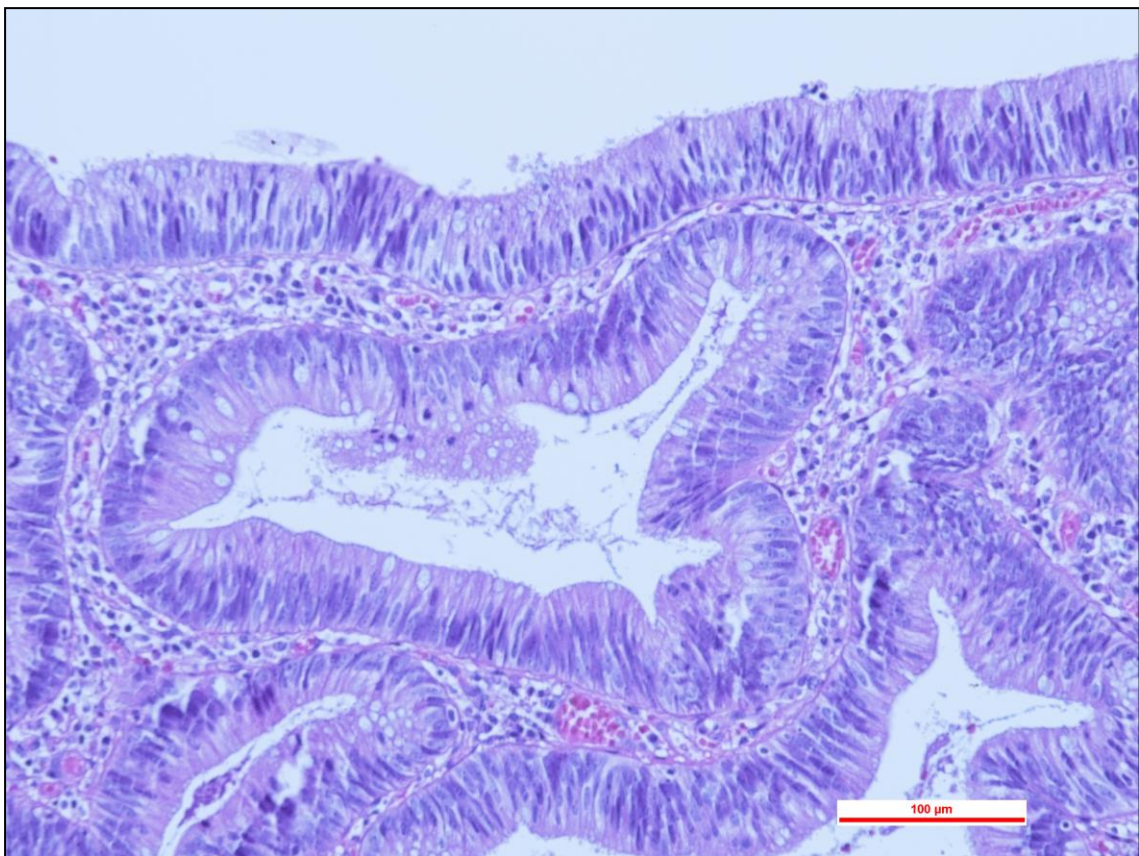
Obr. č. 44 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 3 - Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



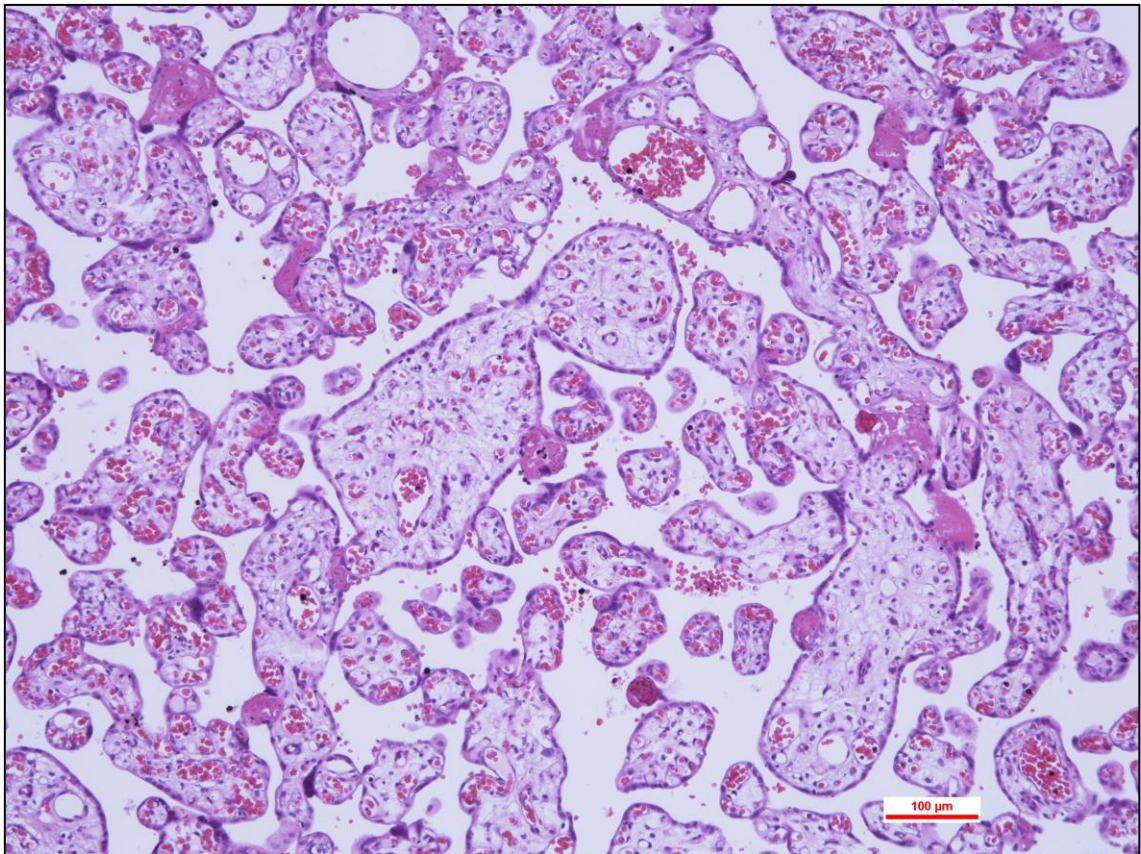
Obr. č. 45 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 3 - Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



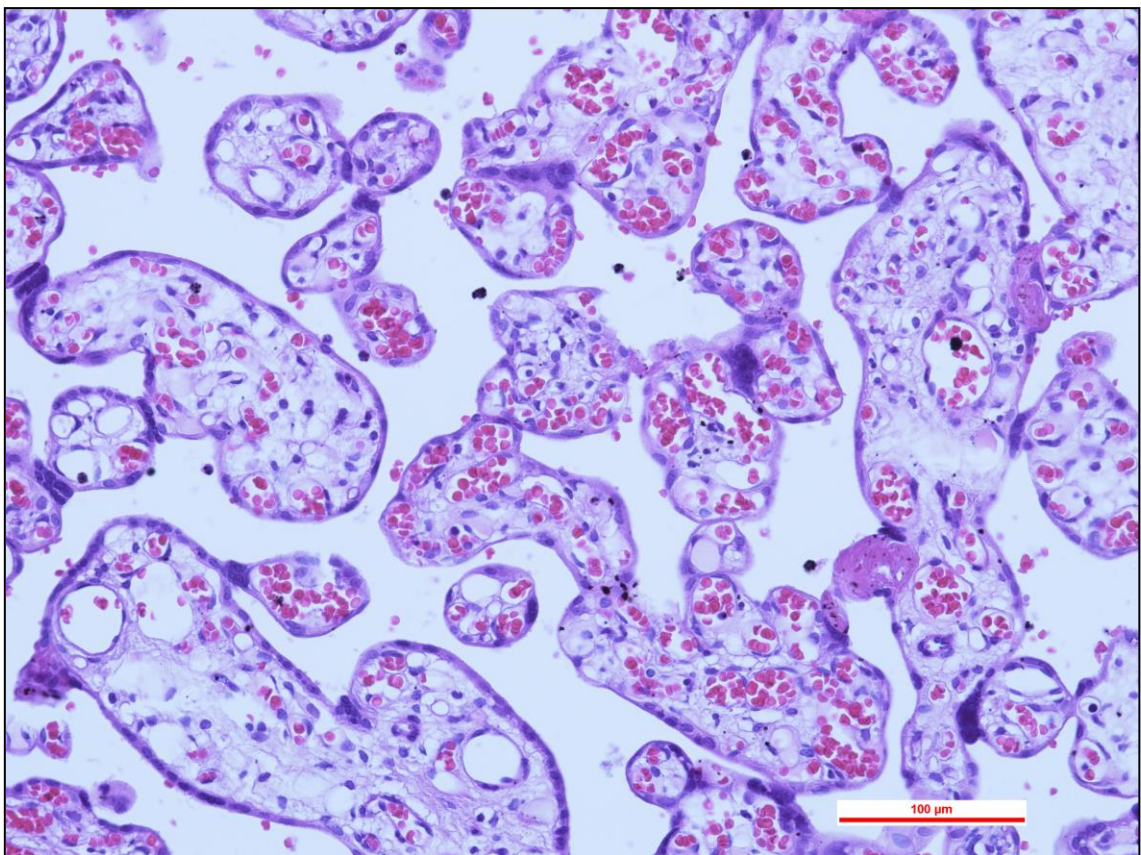
Obr. č. 46 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 3 - Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



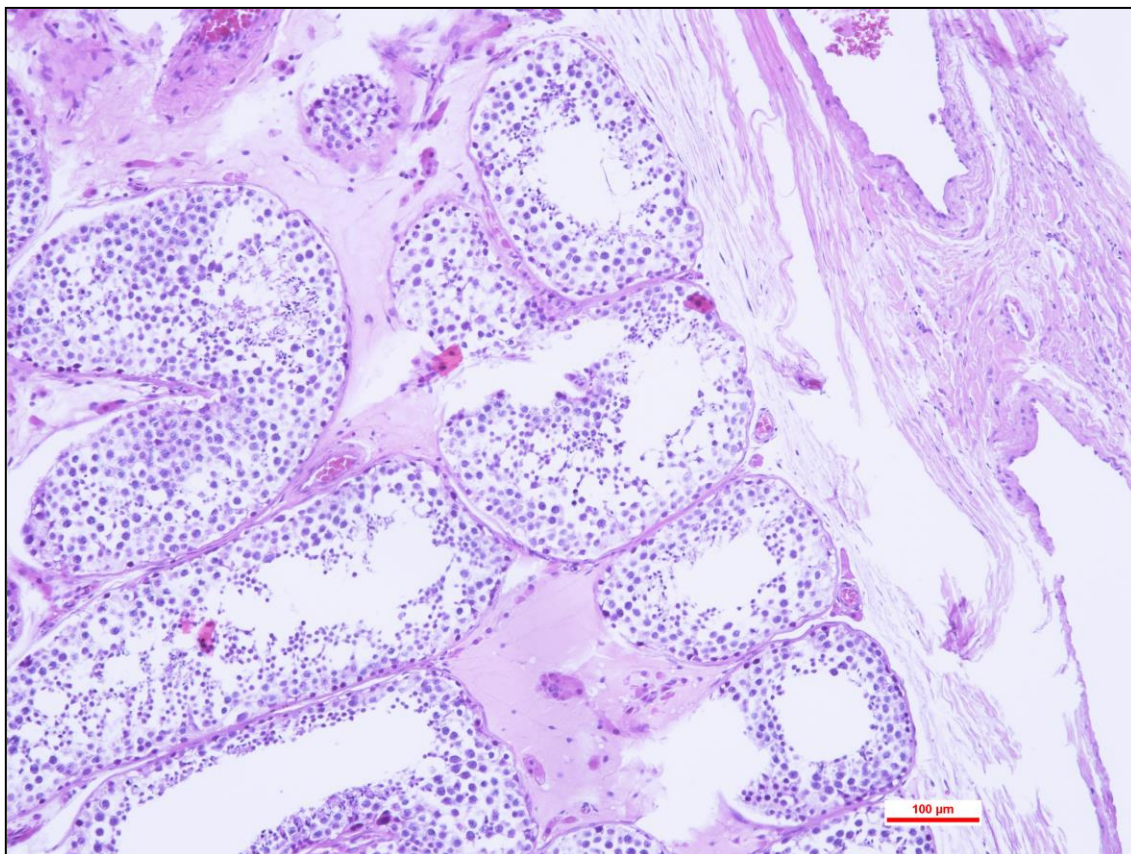
Obr. č. 47 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 3 - Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



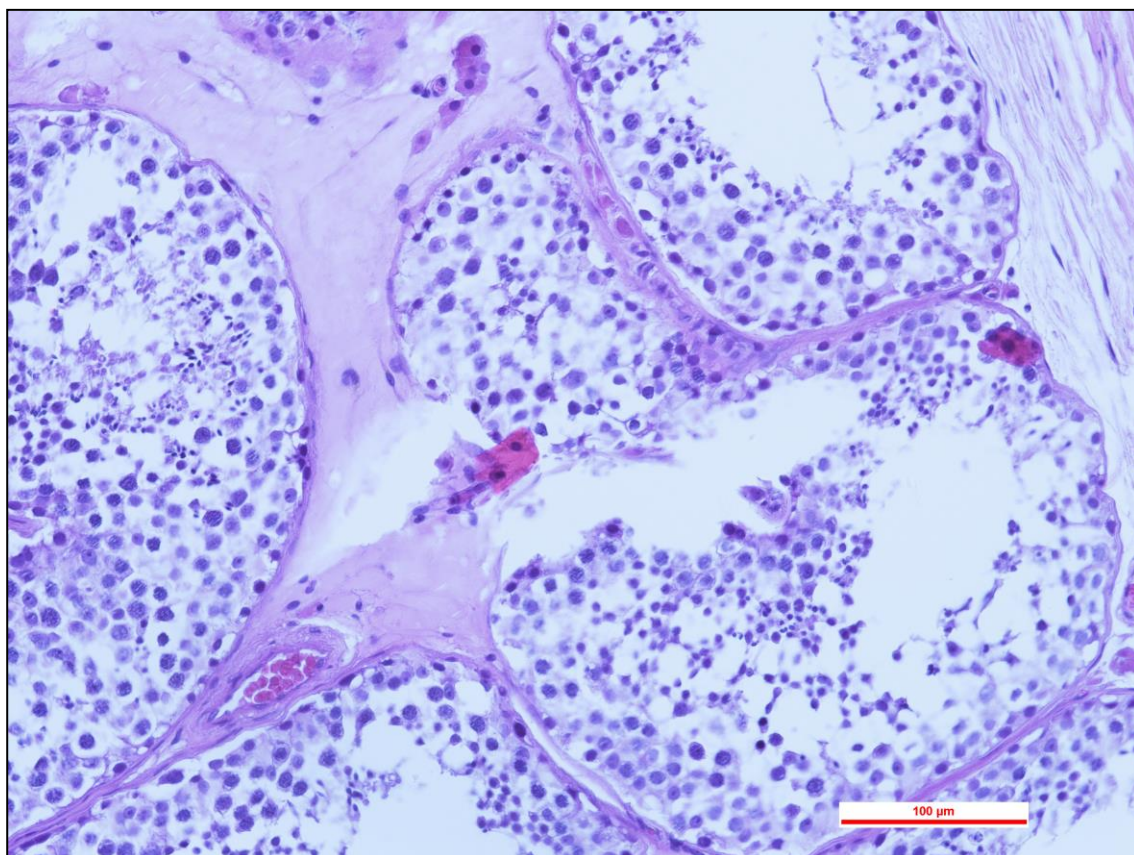
Obr. č. 48 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 3 - Placenta (zvětšeno 100x)



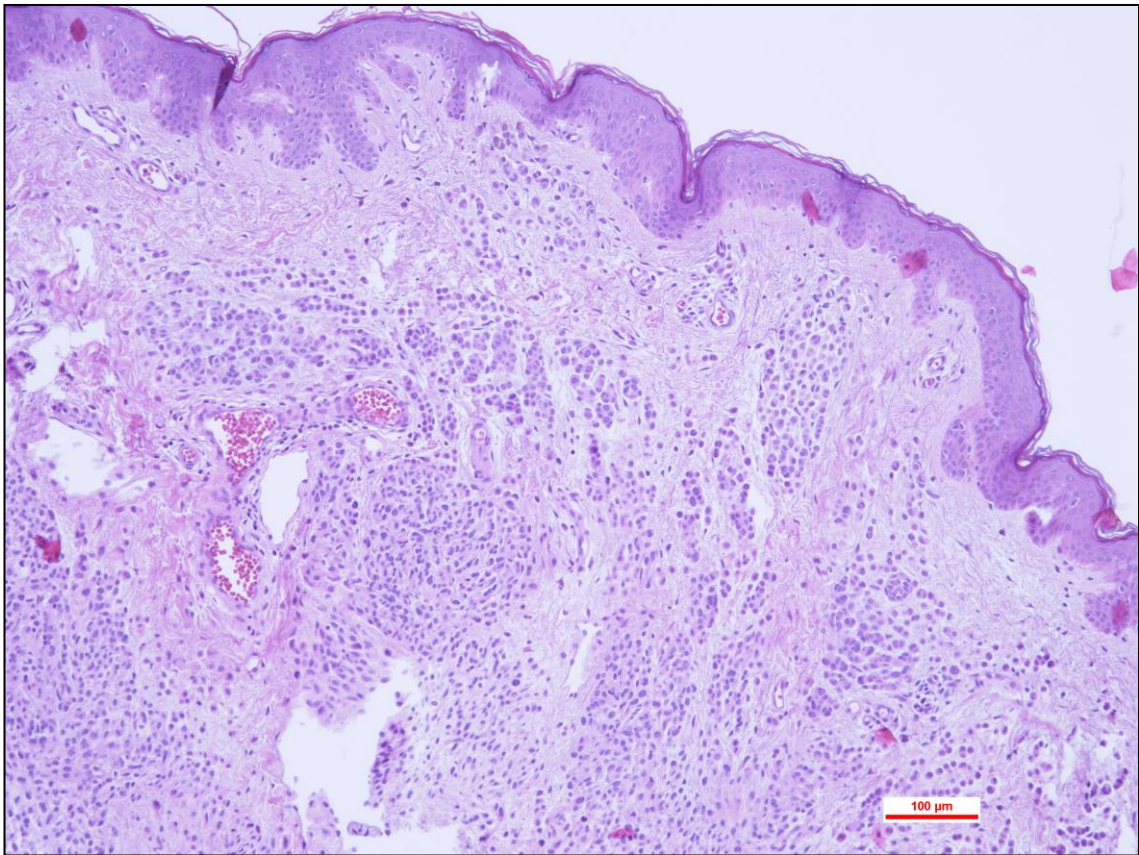
Obr. č. 49 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 3 - Placenta (zvětšeno 200x)



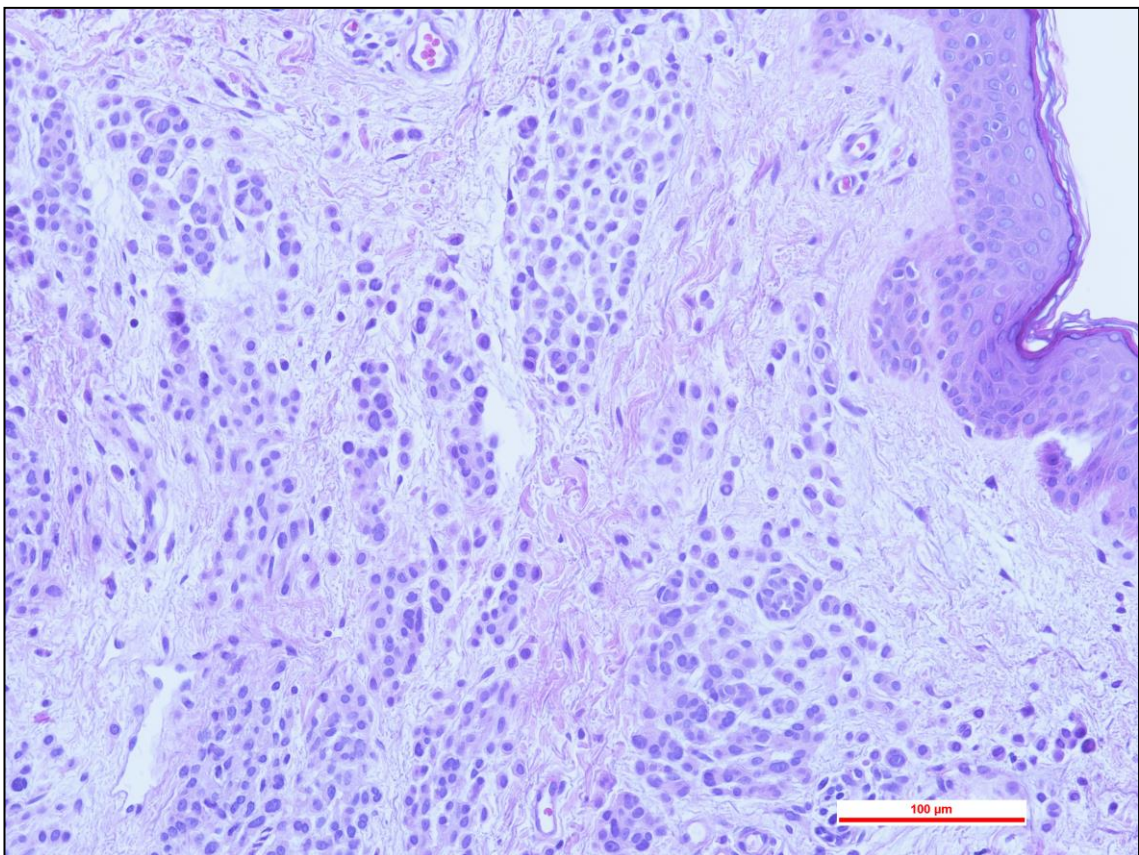
Obr. č. 50 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 3 - Varle (zvětšeno 100x)



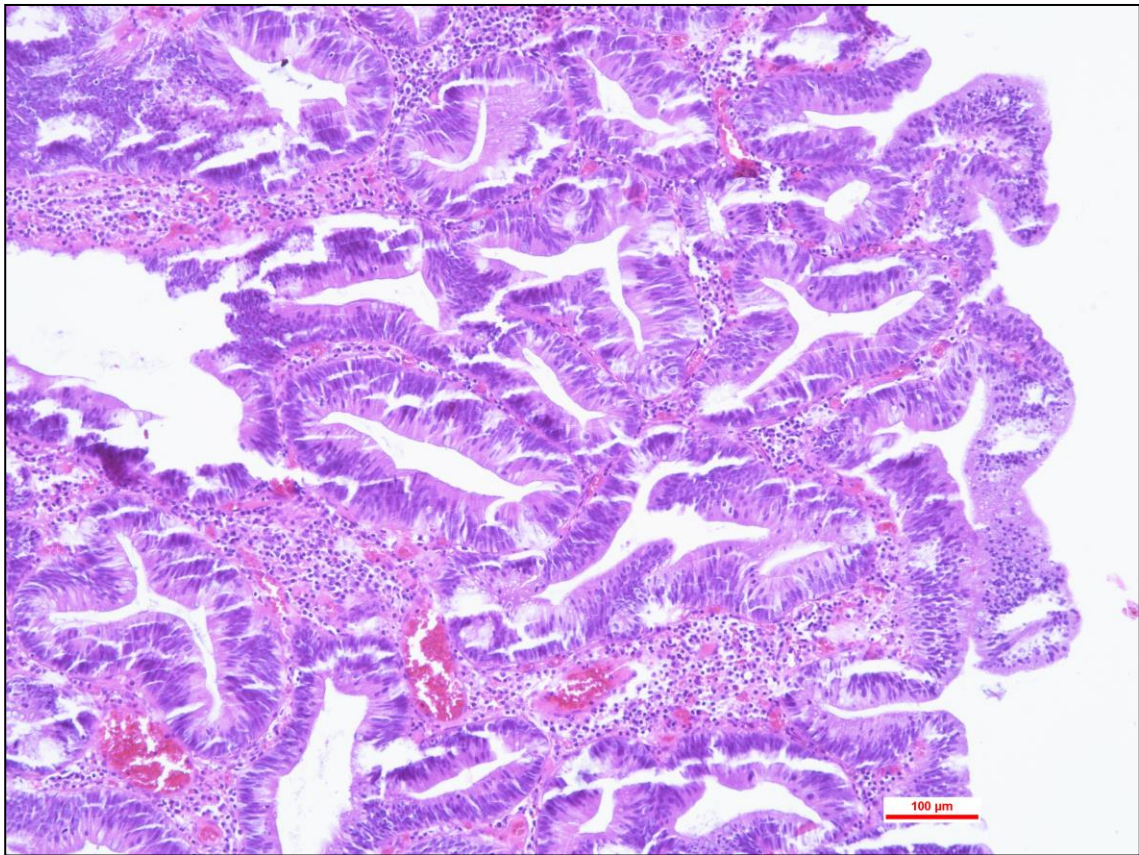
Obr. č. 51 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 3 - Varle (zvětšeno 200x)



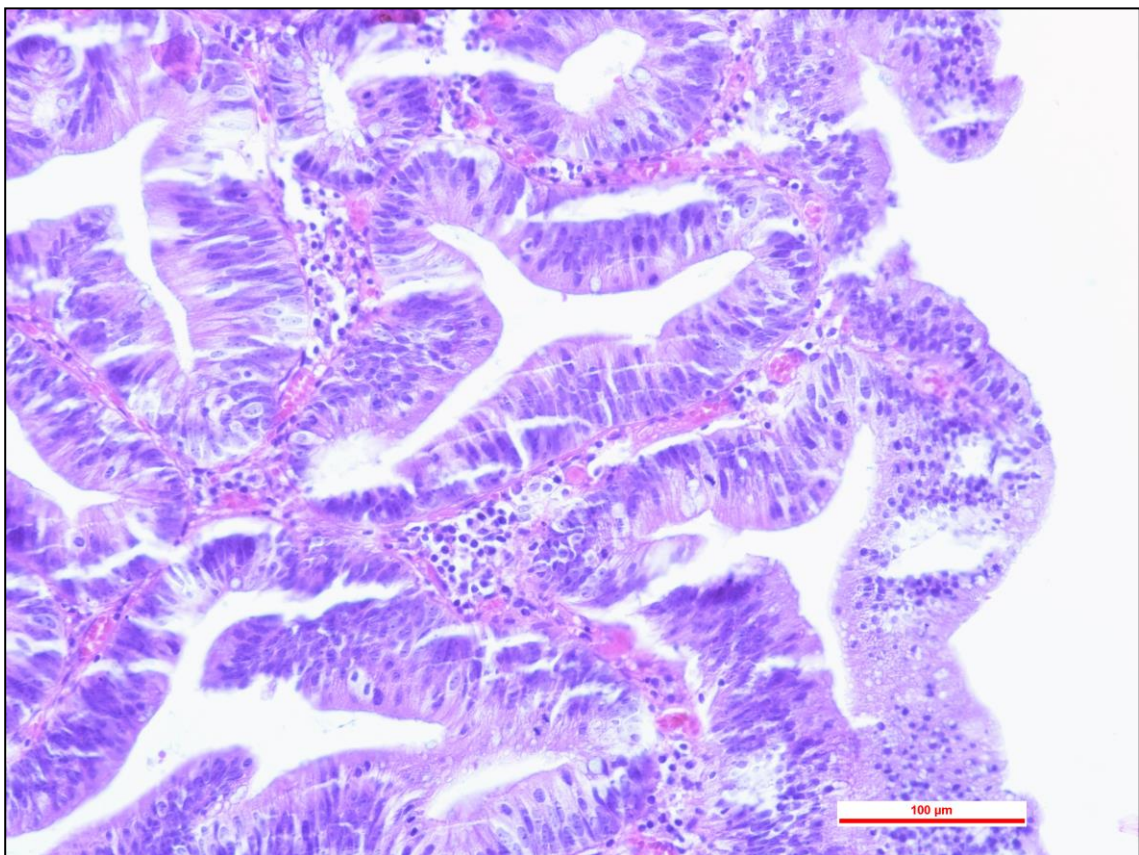
Obr. č. 52 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 4 - Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



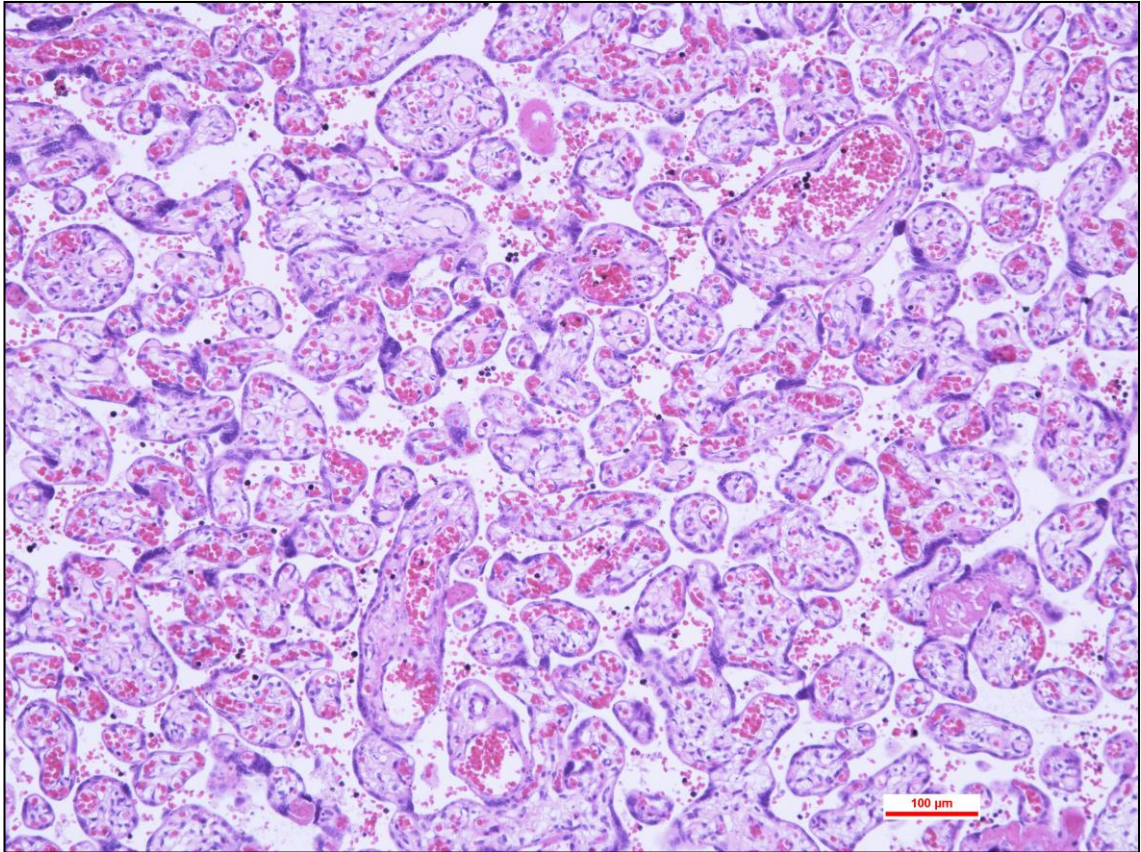
Obr. č. 53 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 4 - Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



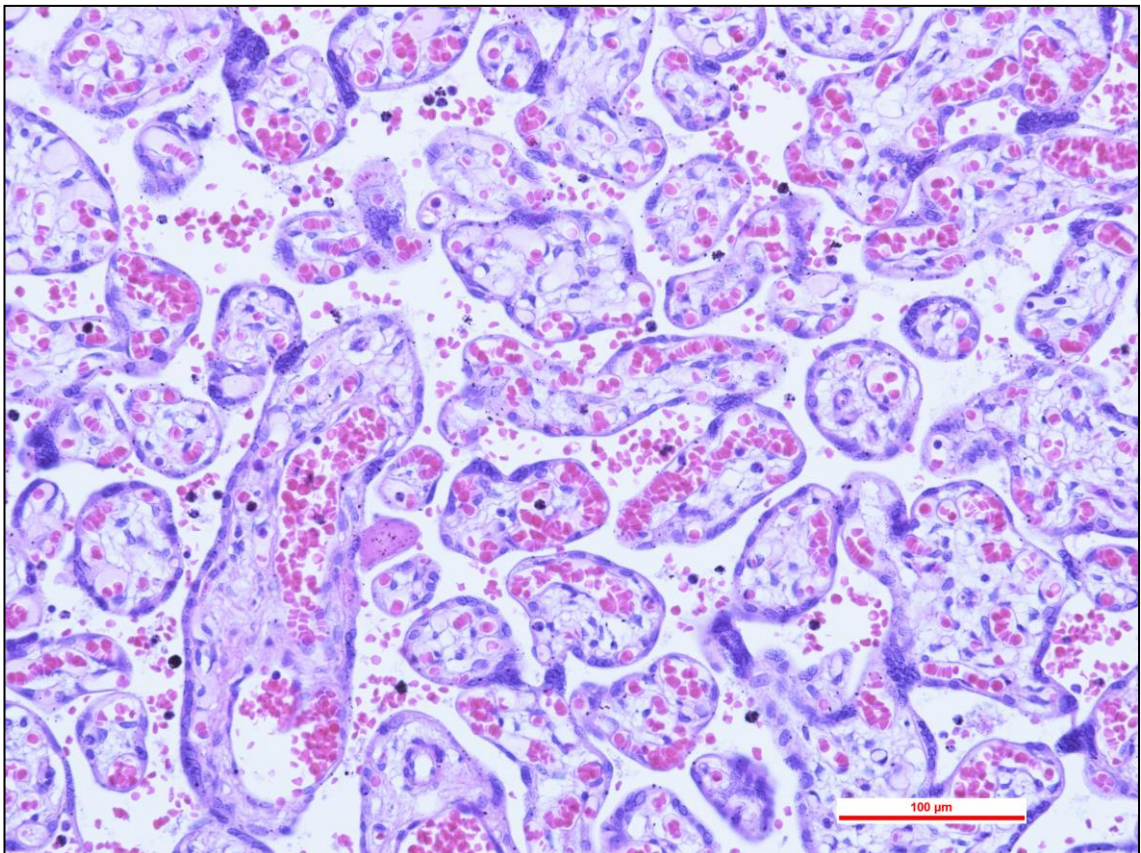
Obr. č. 54 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 4 - Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



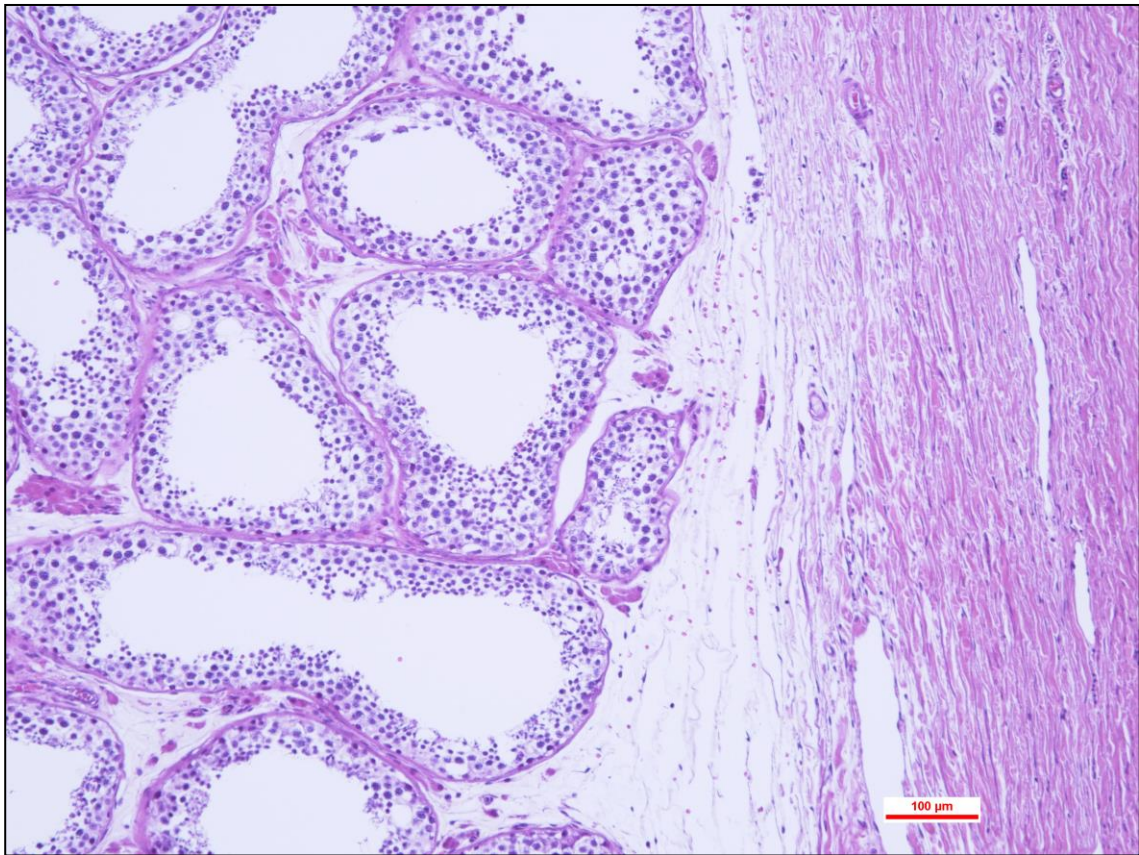
Obr. č. 55 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 4 - Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



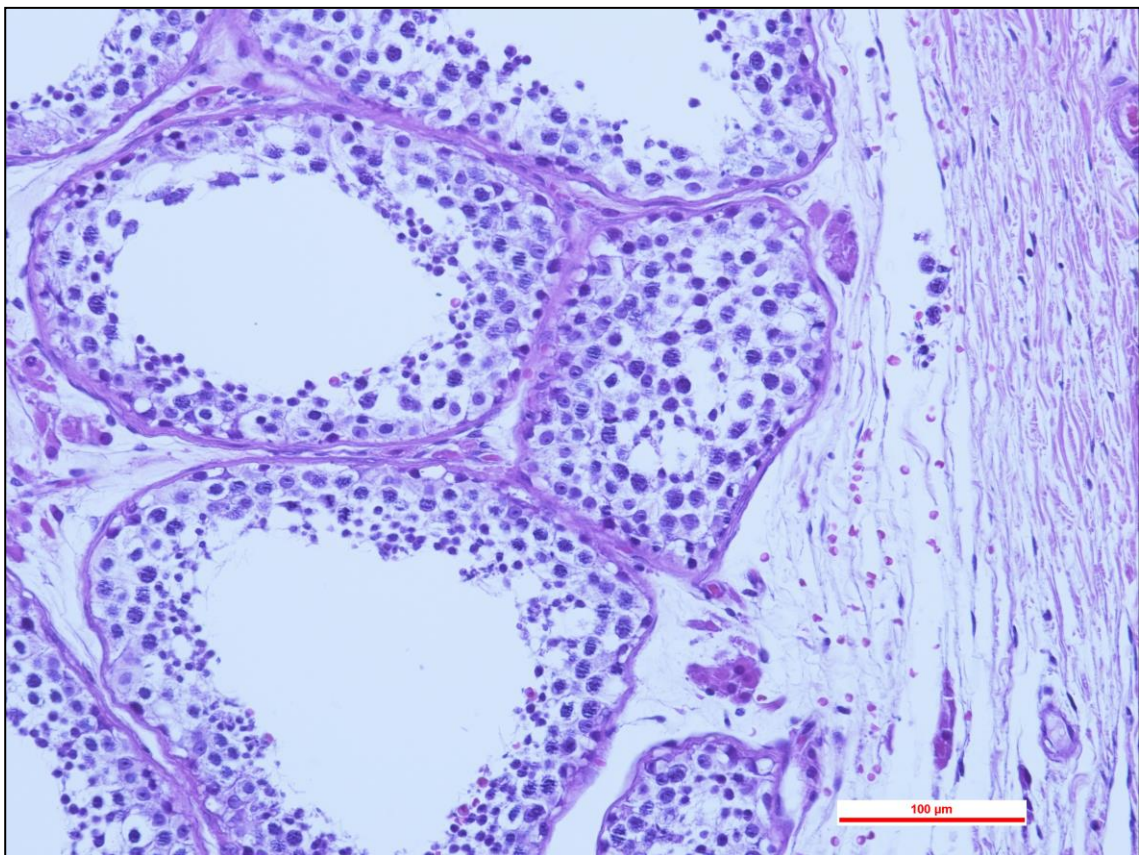
Obr. č. 56 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 4 - Placenta (zvětšeno 100x)



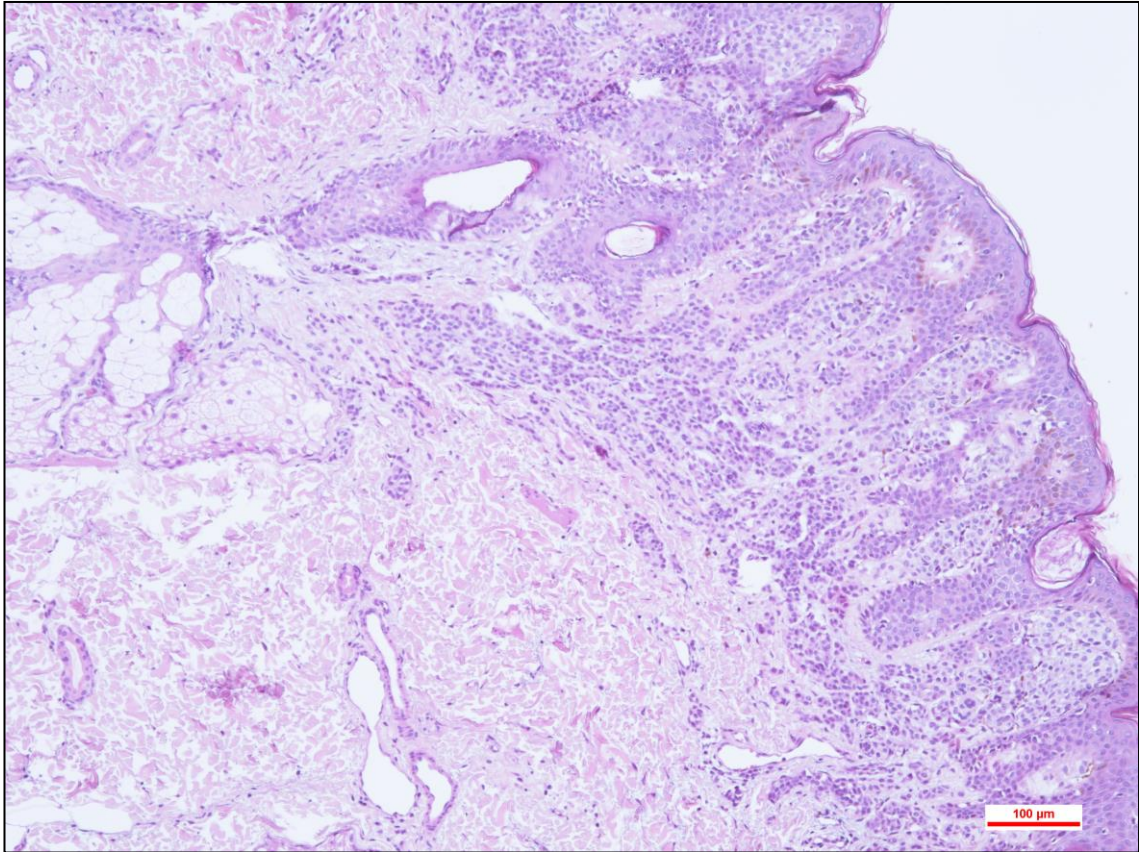
Obr. č. 57 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 4 - Placenta (zvětšeno 200x)



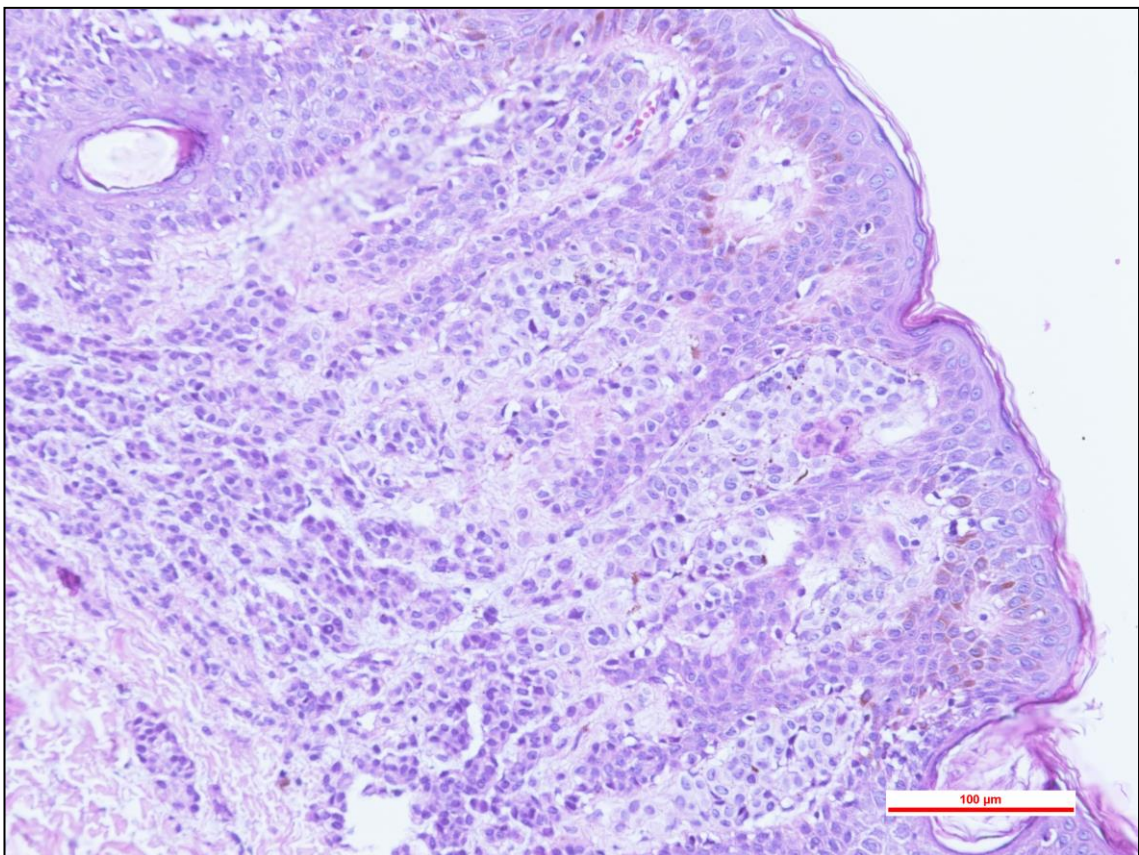
Obr. č. 58 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 4 - Varle (zvětšeno 100x)



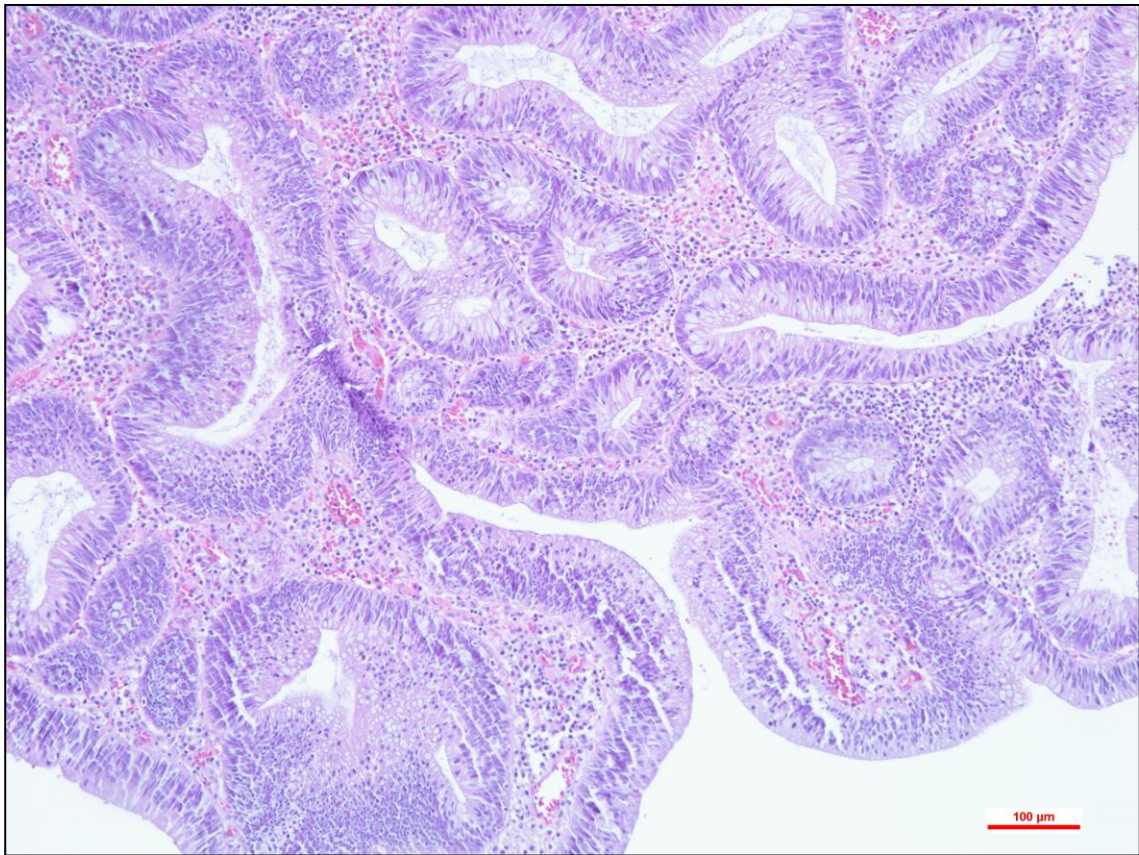
Obr. č. 59 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 4 - Varle (zvětšeno 200x)



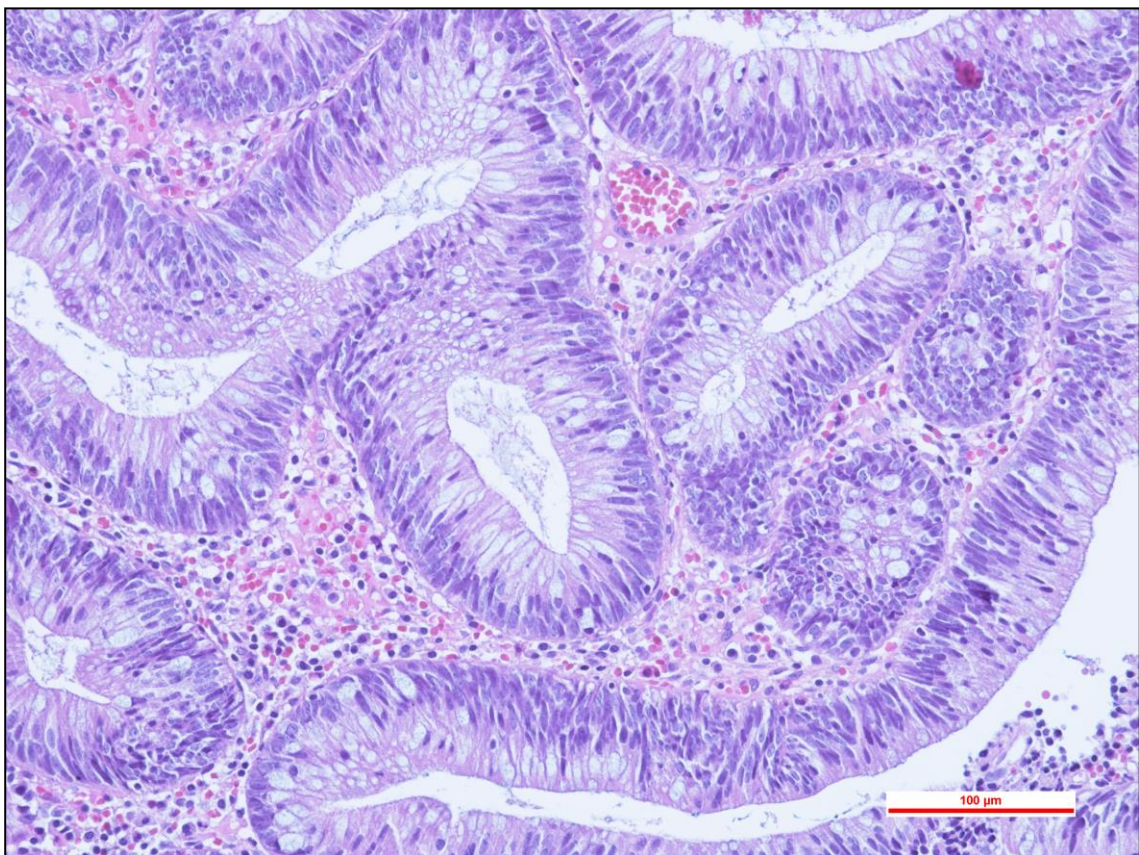
Obr. č. 60 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 5 - Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



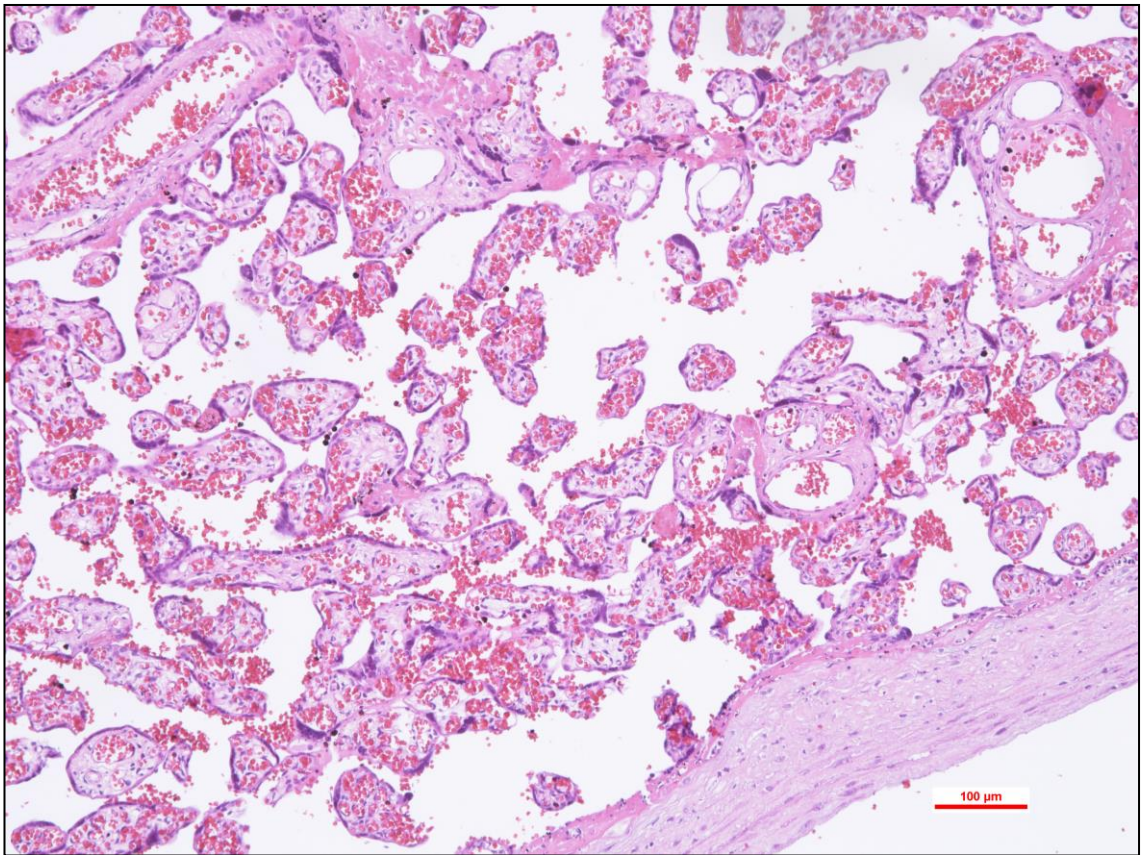
Obr. č. 61 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 5 - Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



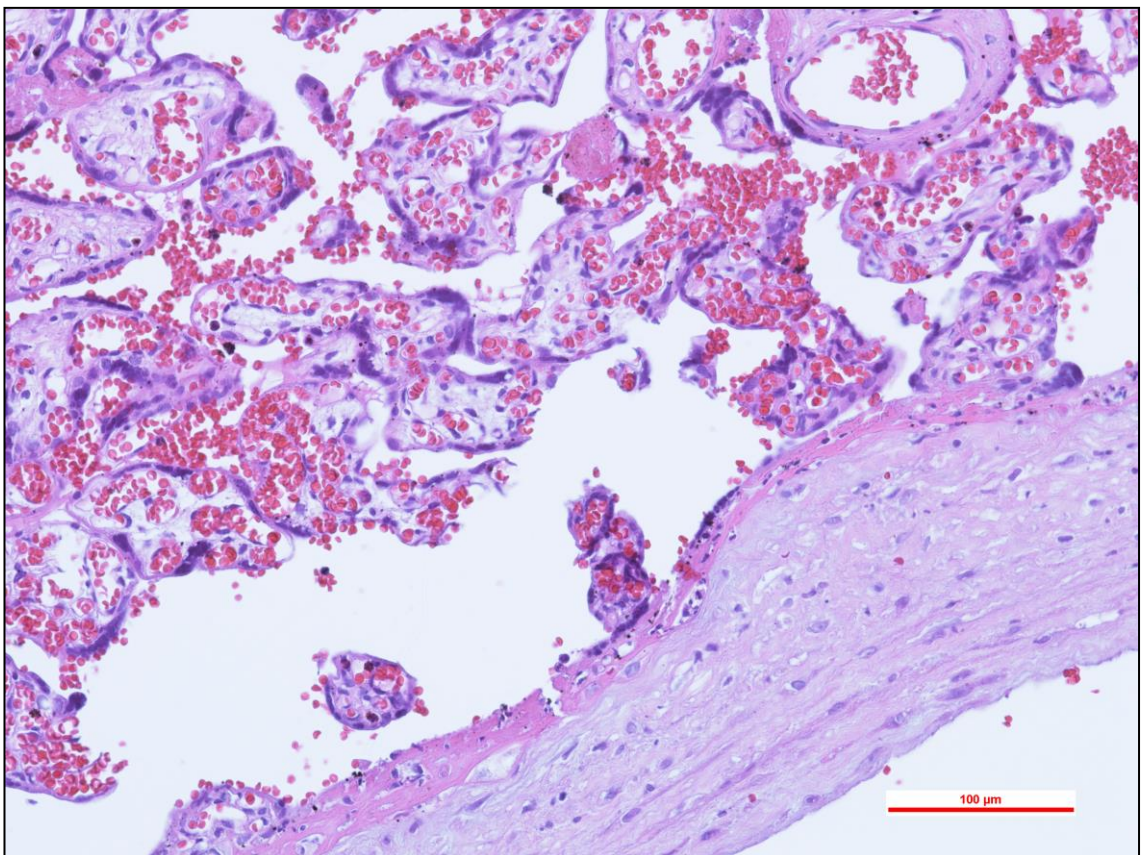
Obr. č. 62 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 5 - Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



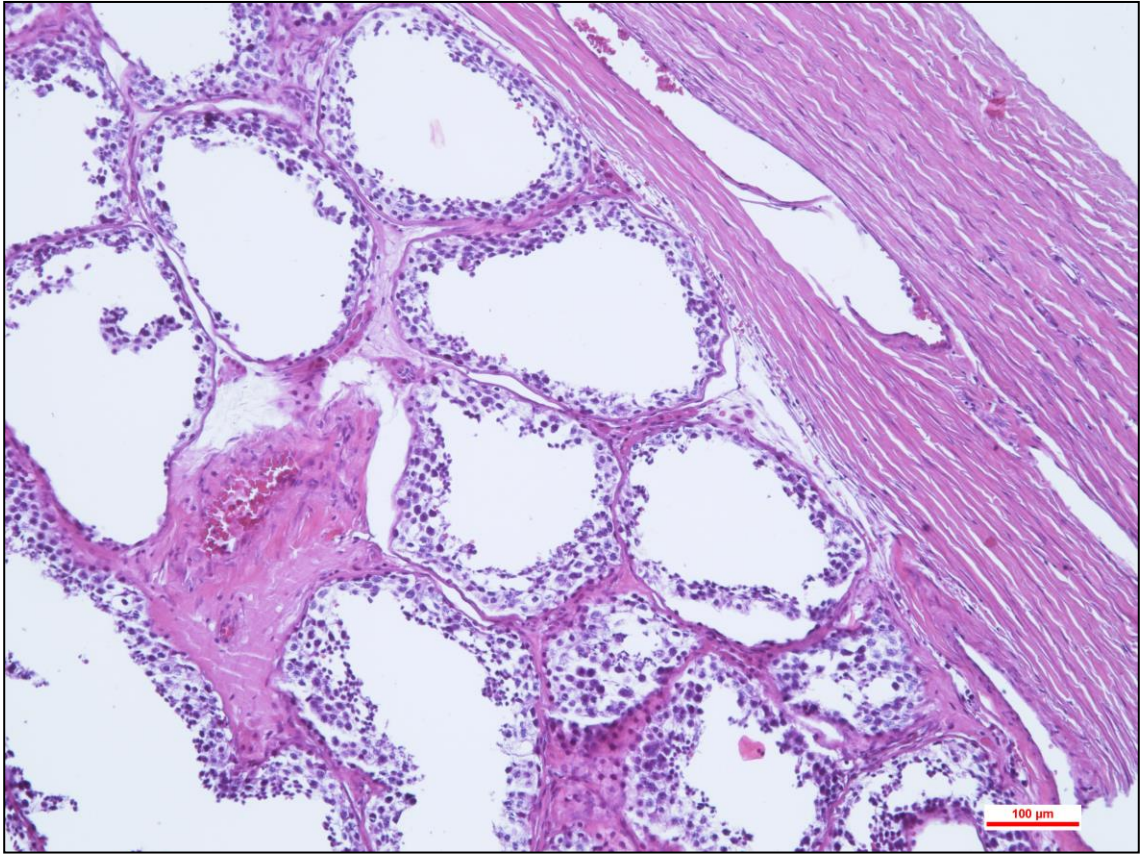
Obr. č. 63 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 5 - Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



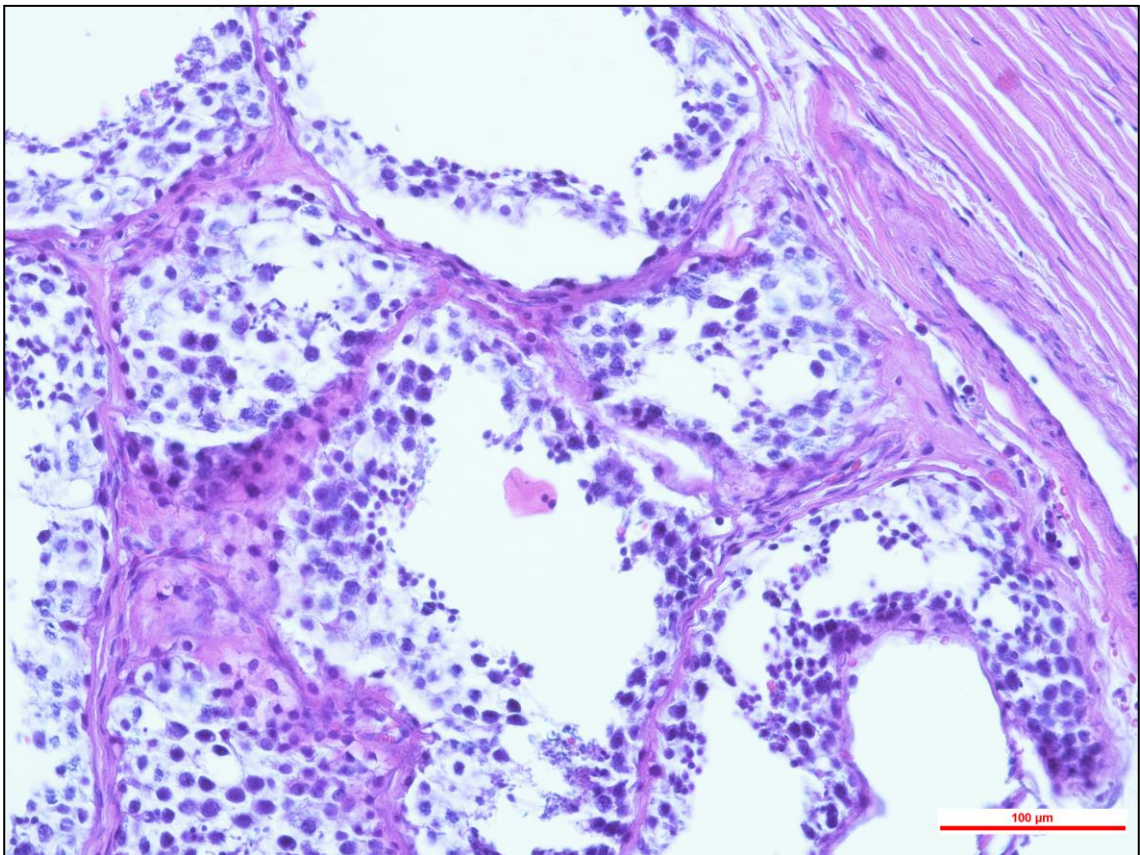
Obr. č. 64 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 5 - Placenta (zvětšeno 100x)



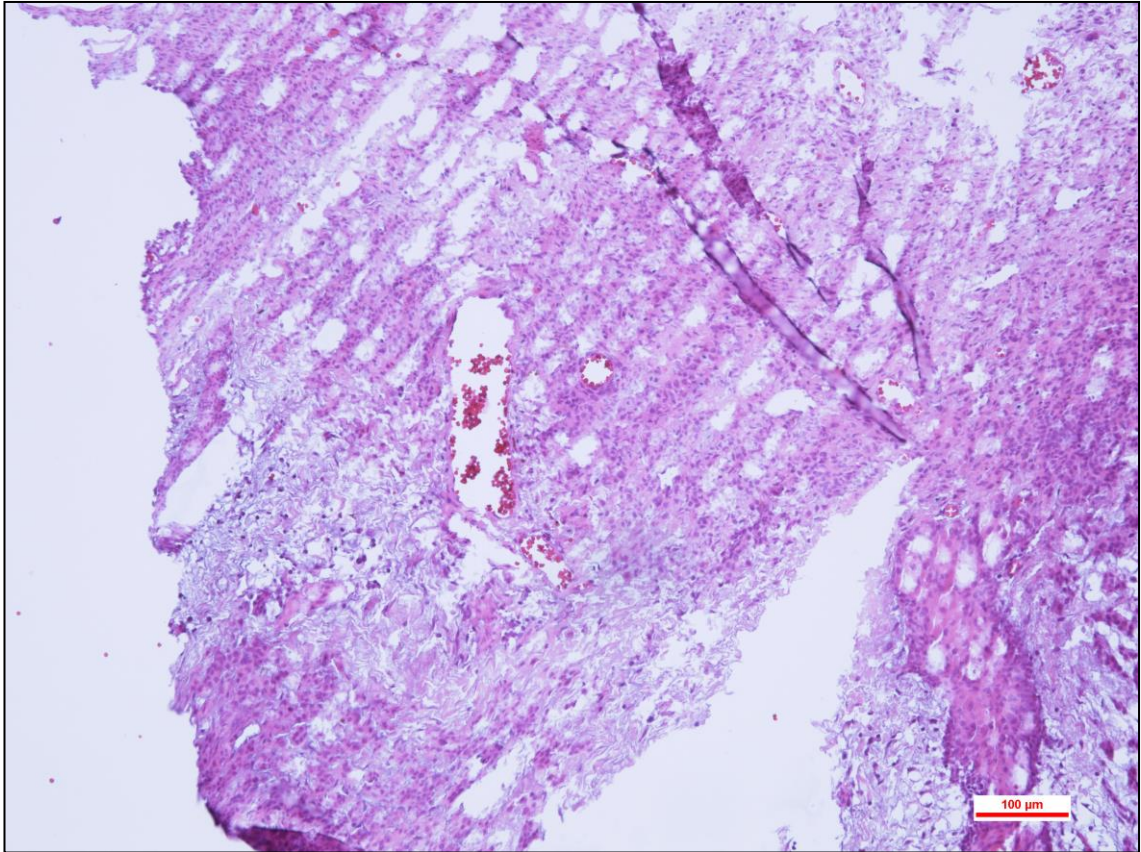
Obr. č. 65 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 5 - Placenta (zvětšeno 200x)



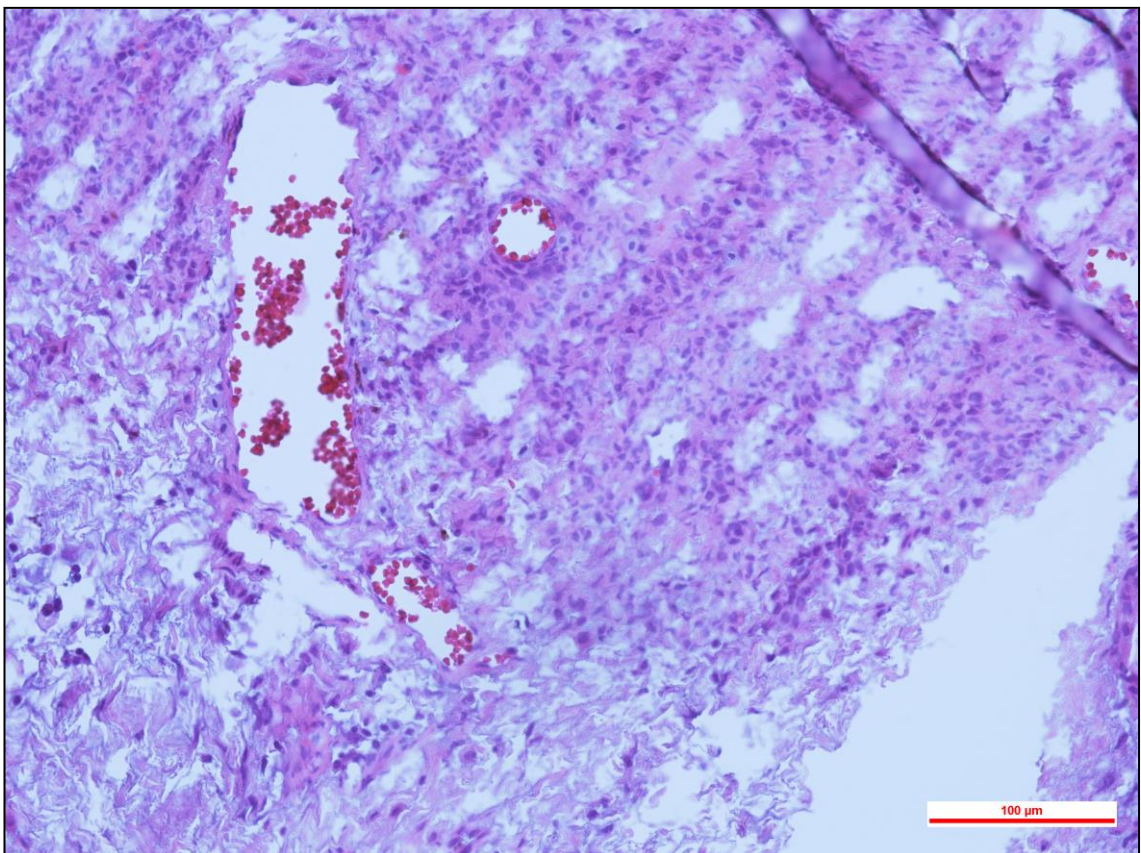
Obr. č. 66 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 5 - Varle (zvětšeno 100x)



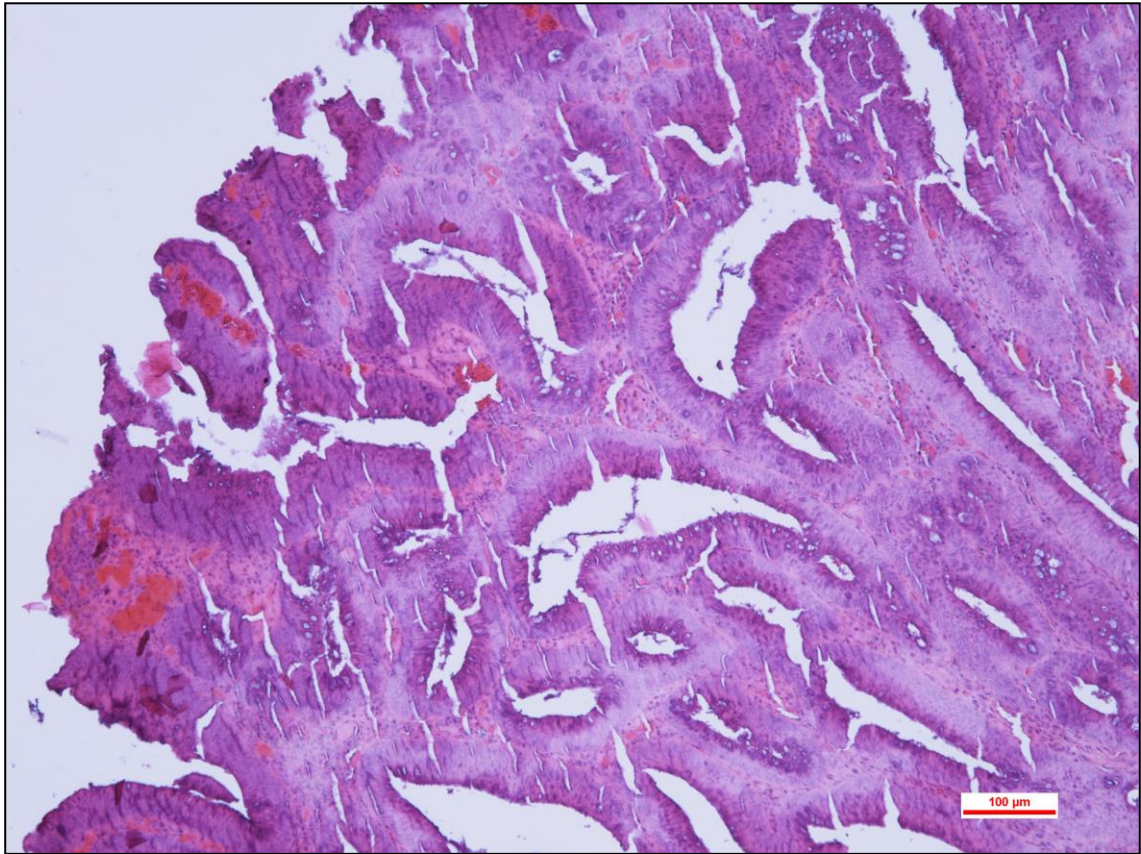
Obr. č. 67 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 5 - Varle (zvětšeno 200x)



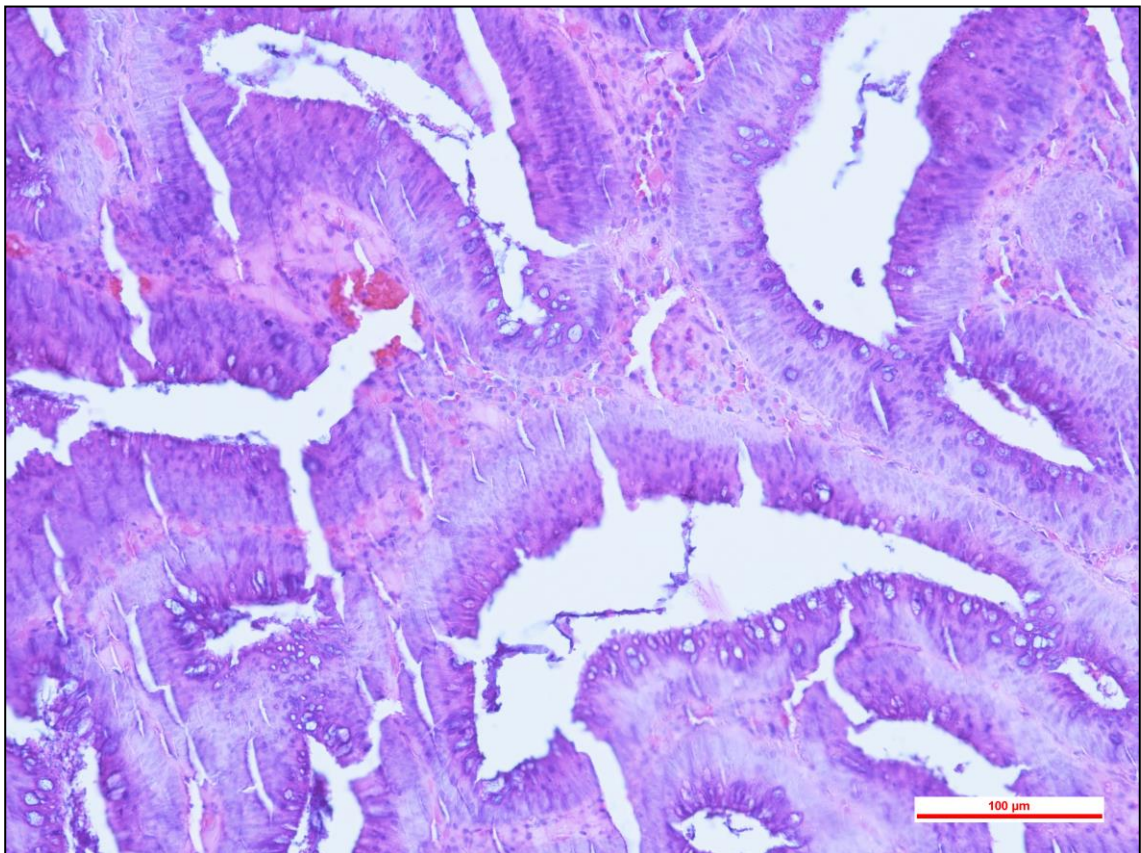
Obr. č. 68 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 6 - Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



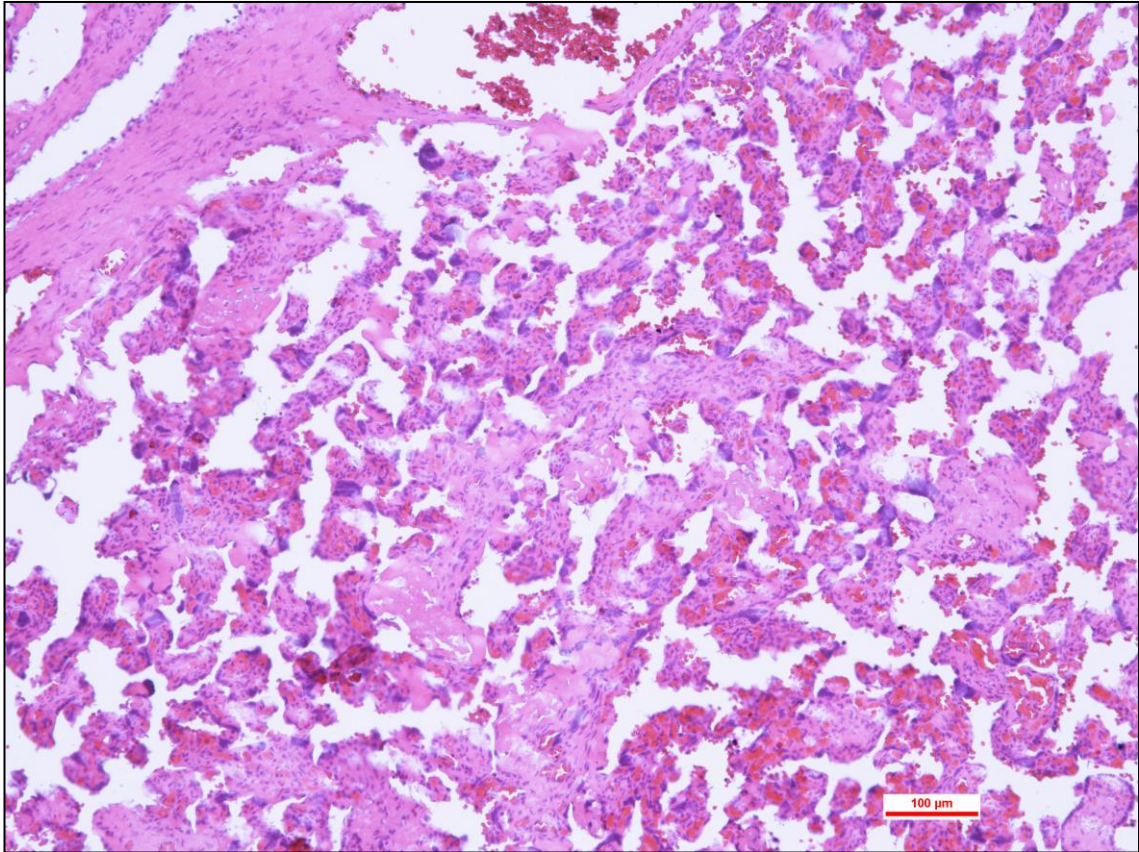
Obr. č. 69 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



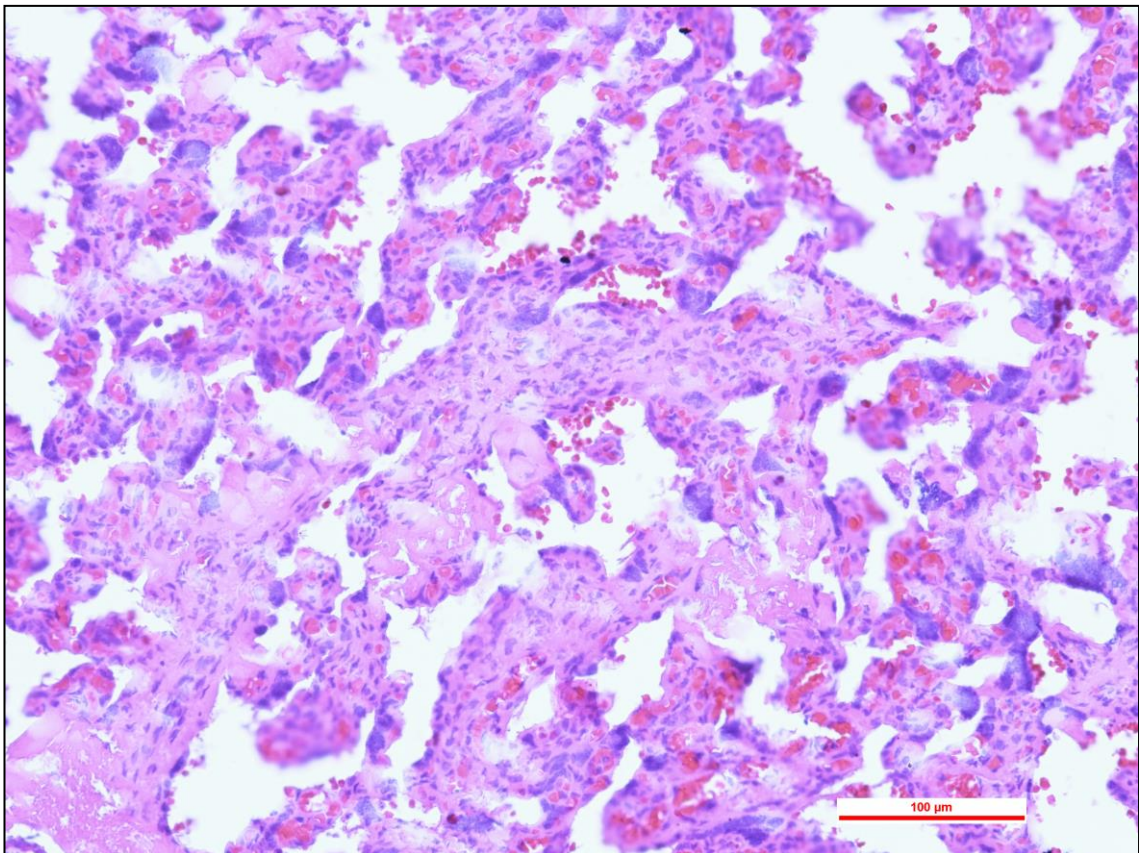
Obr. č. 70 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 6 - Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



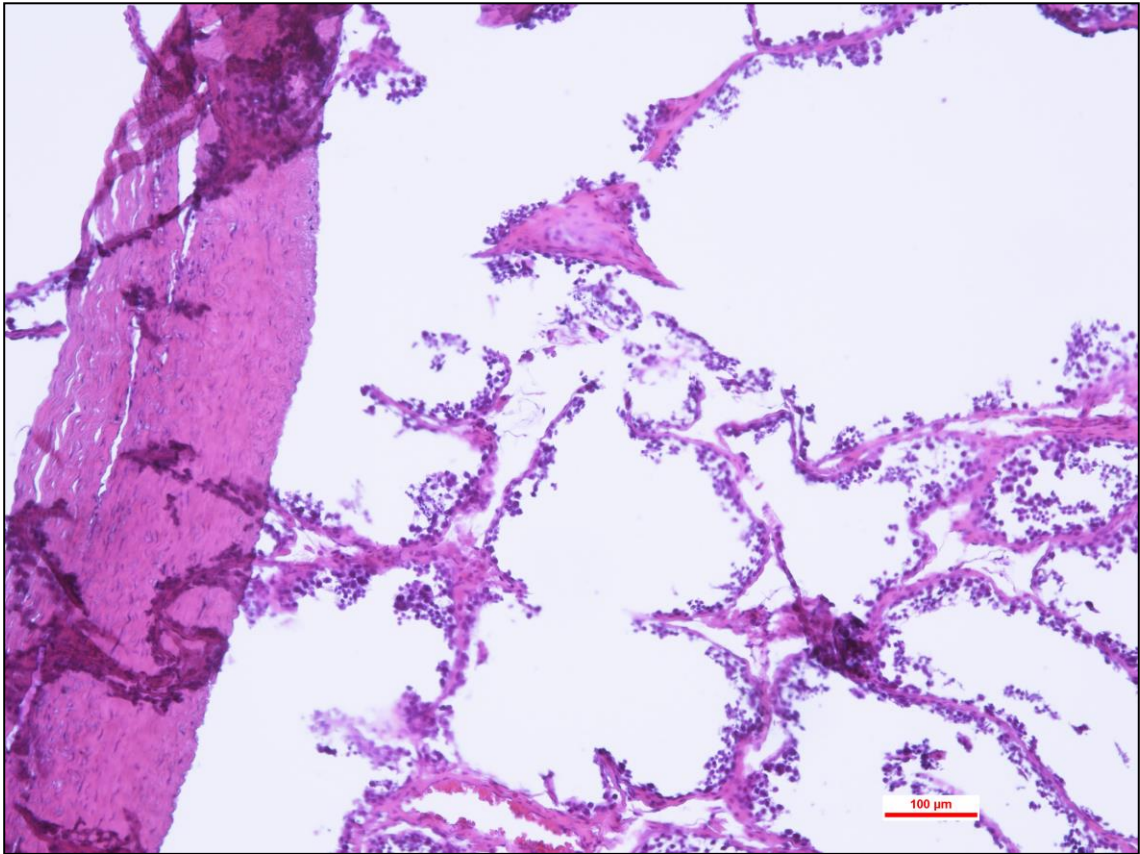
Obr. č. 71 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 6 - Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



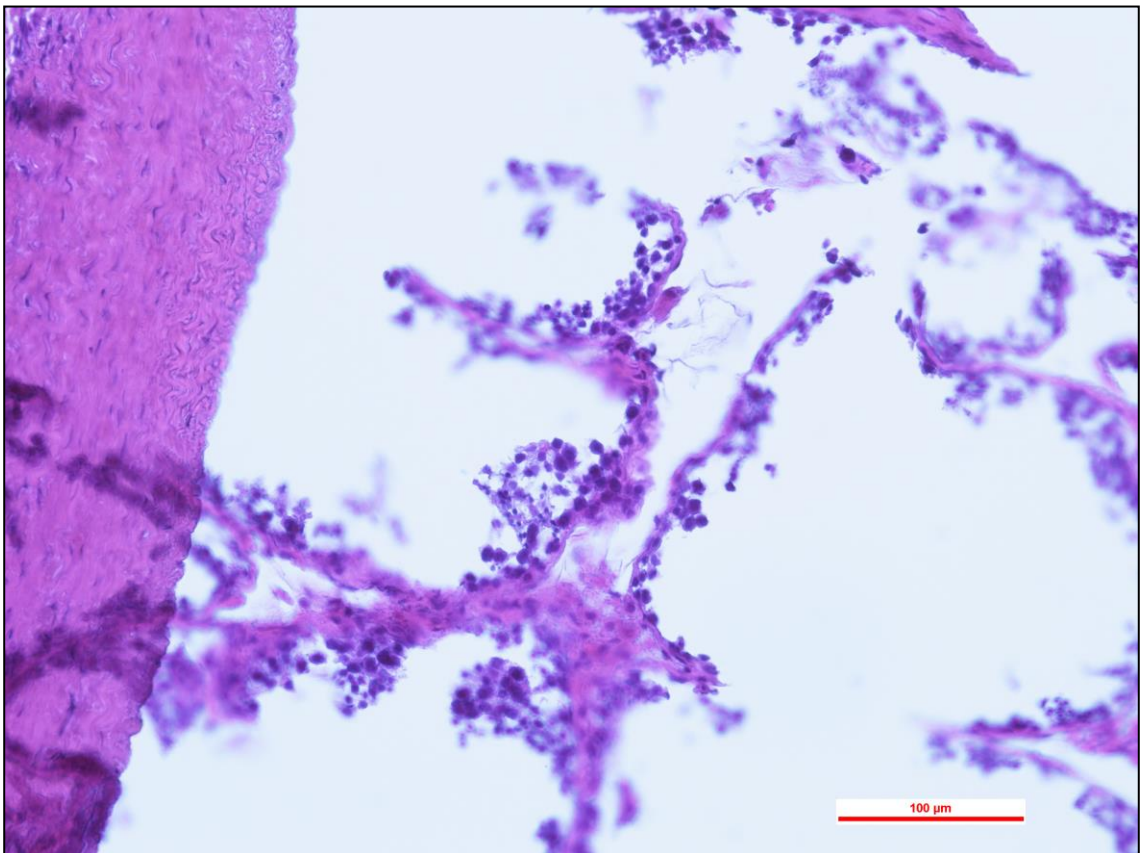
Obr. č. 72 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 6 - Placenta (zvětšeno 100x)



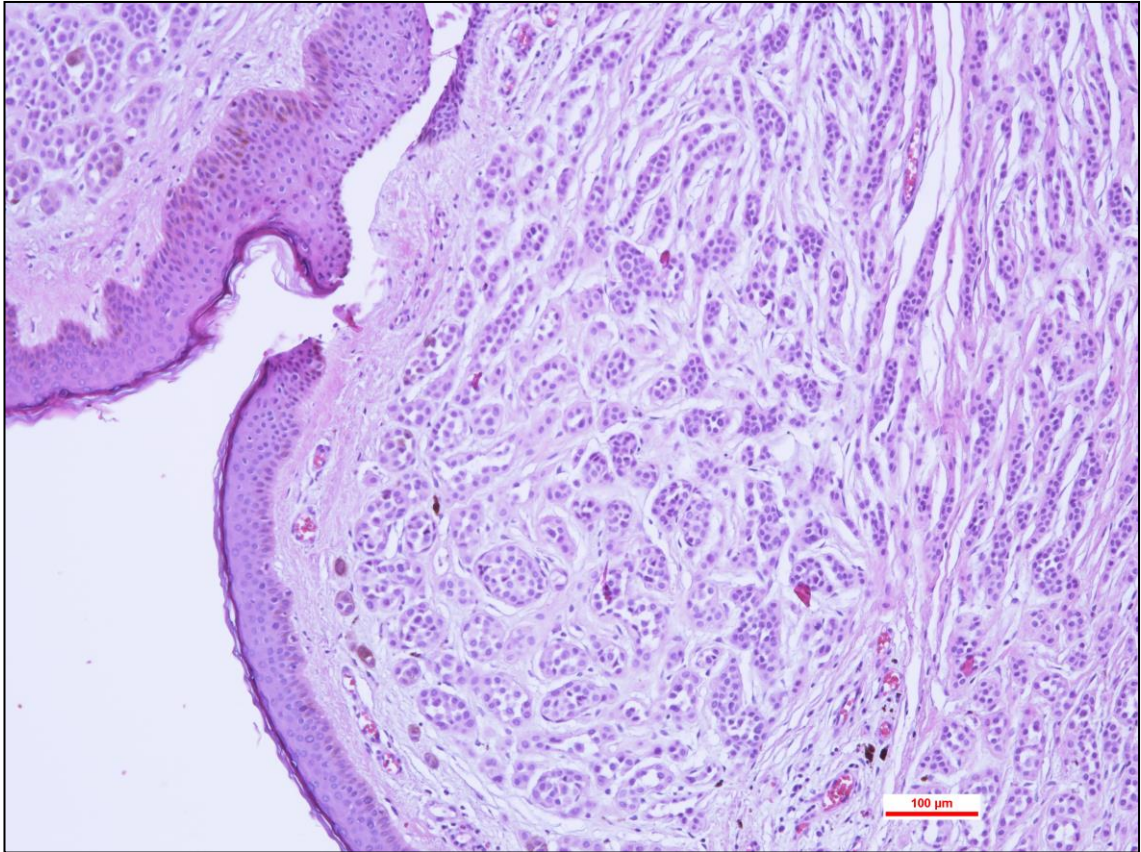
Obr. č. 73 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 6 - Placenta (zvětšeno 200x)



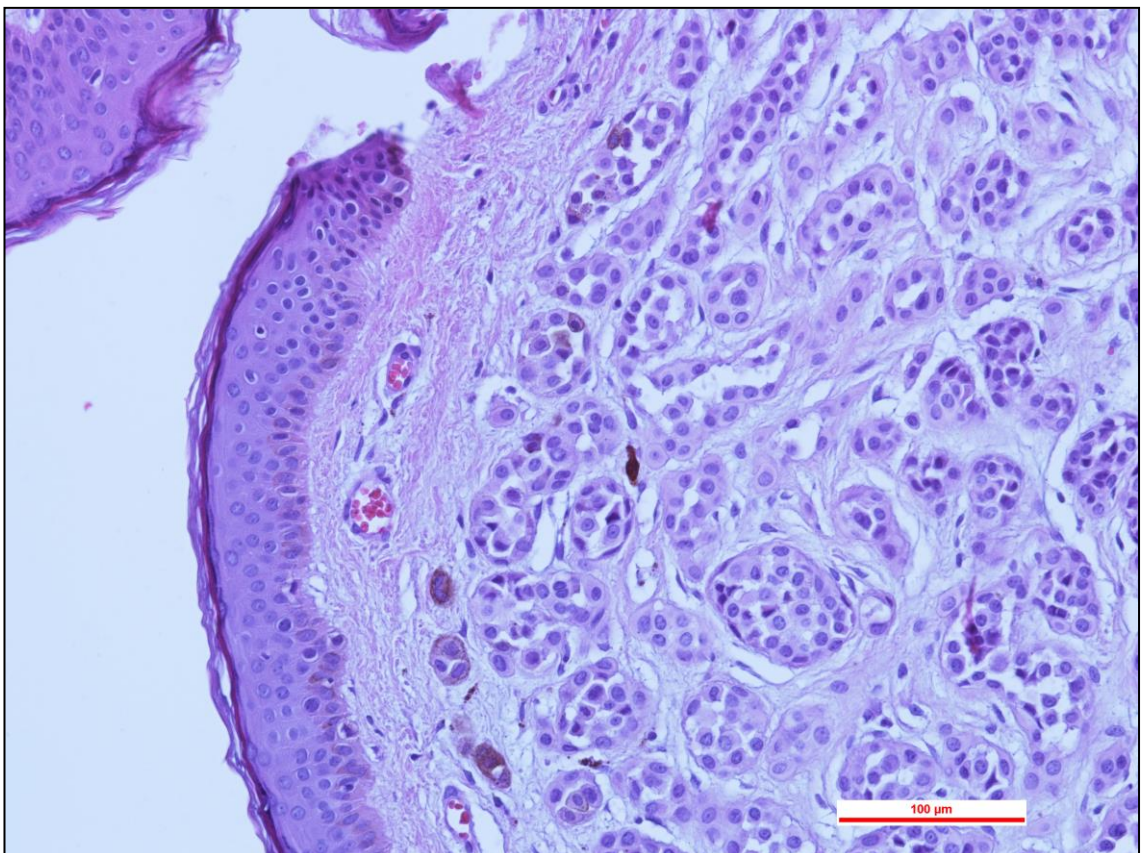
Obr. č. 74 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 6 - Varle (zvětšeno 100x)



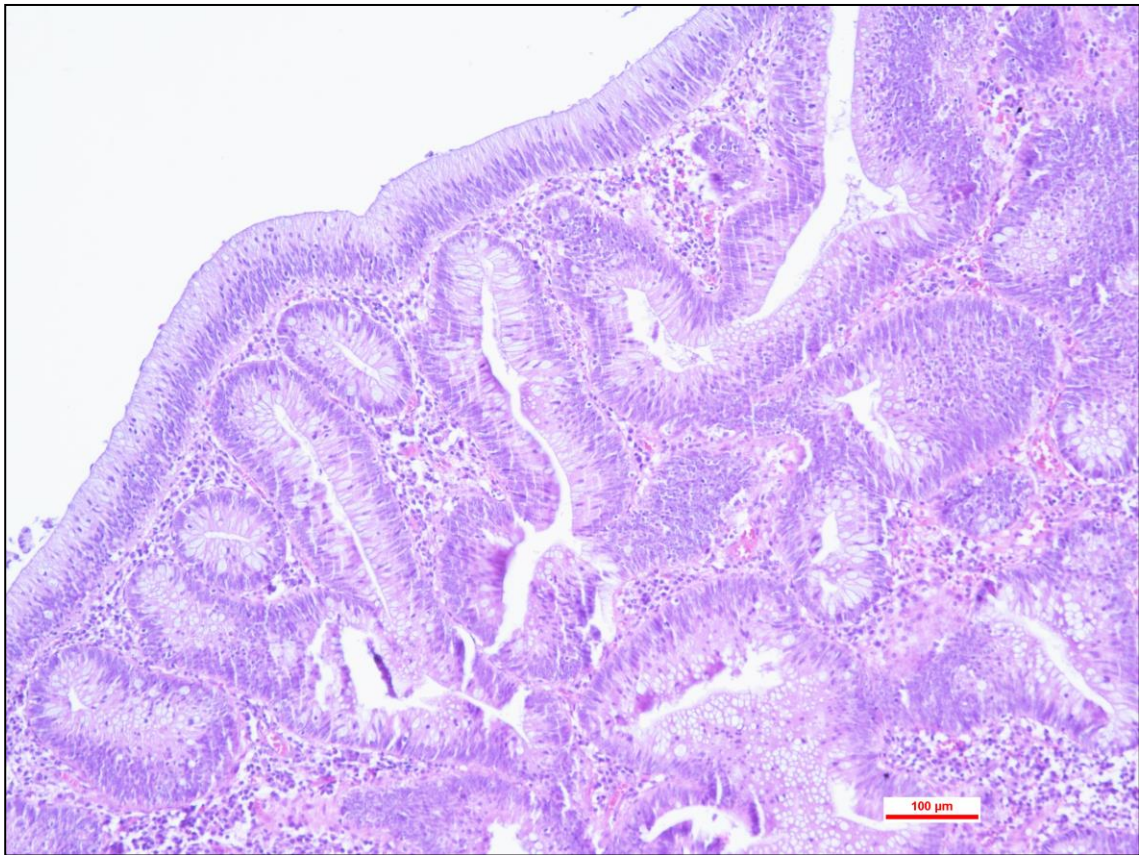
Obr. č. 75 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 6 - Varle (zvětšeno 200x)



Obr. č. 76 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 7 - Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



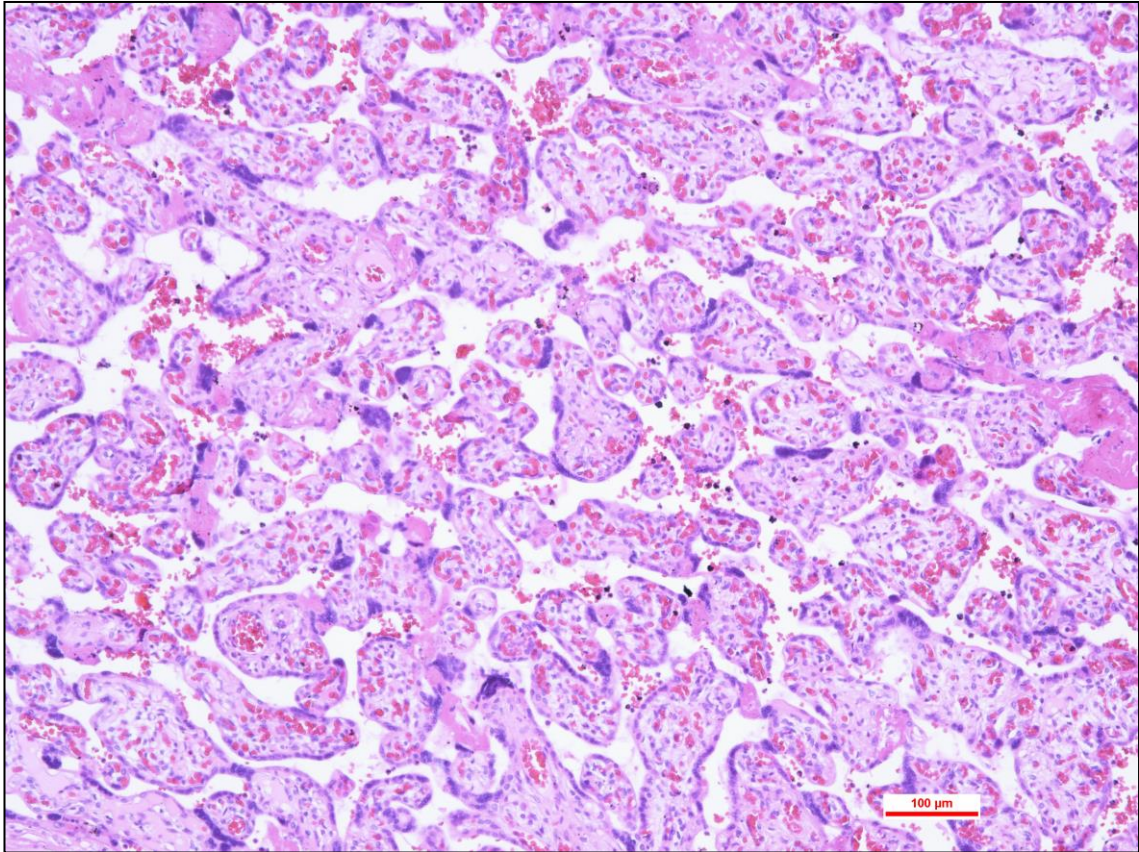
Obr. č. 77 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 7 - Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



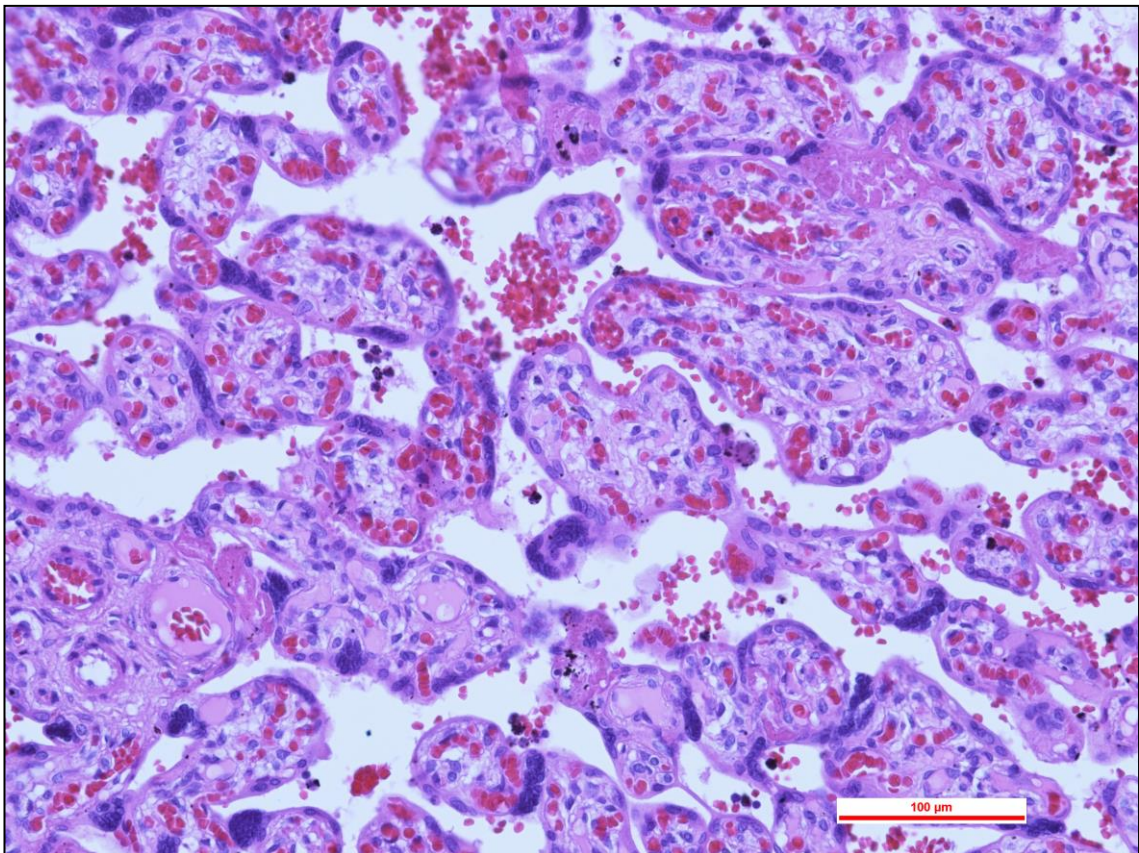
Obr. č. 78 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 7 - Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



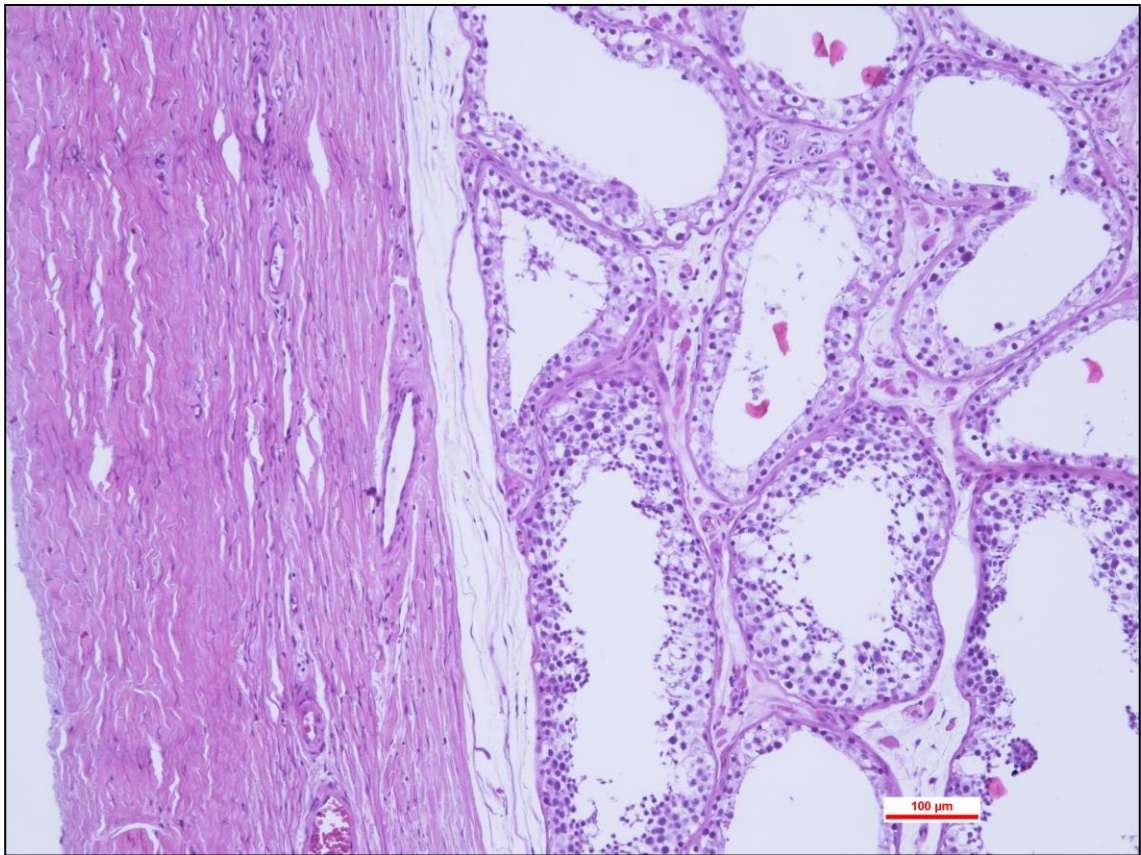
Obr. č. 79 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 7 - Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



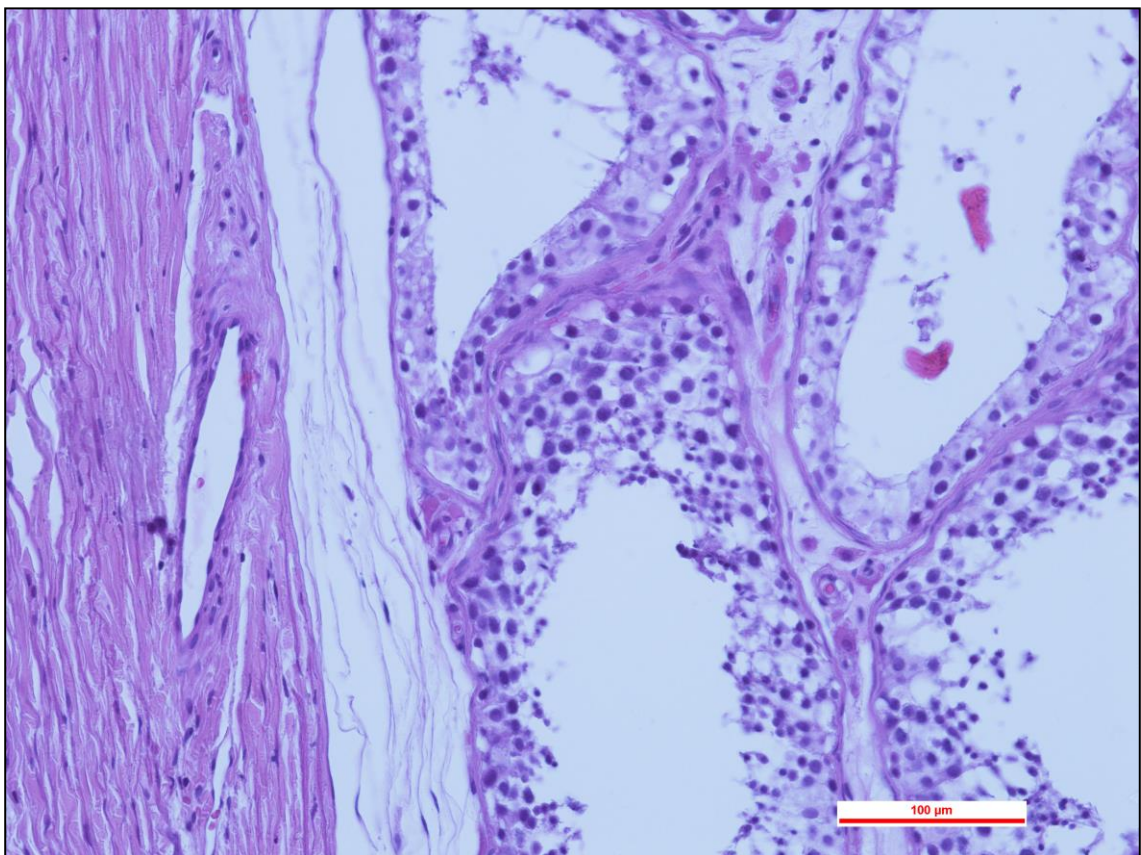
Obr. č. 80 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 7 - Placenta (zvětšeno 100x)



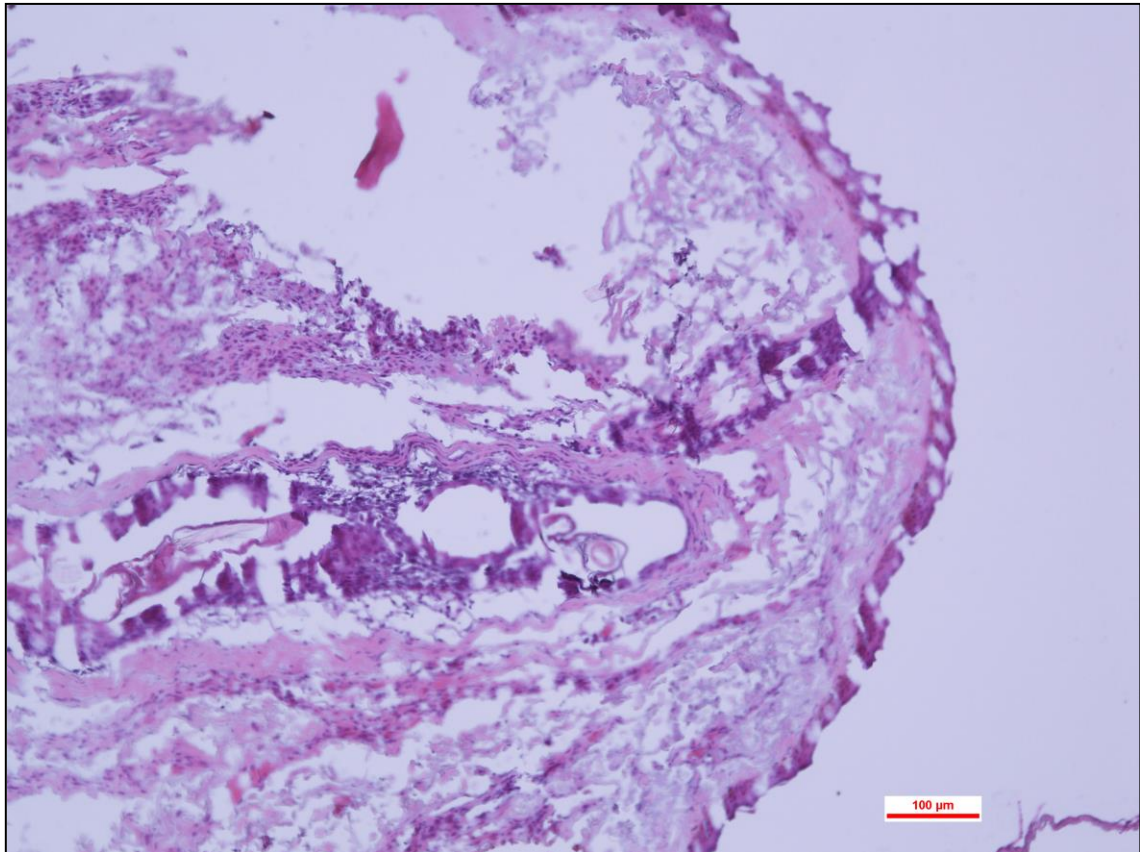
Obr. č. 81 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 7 - Placenta (zvětšeno 200x)



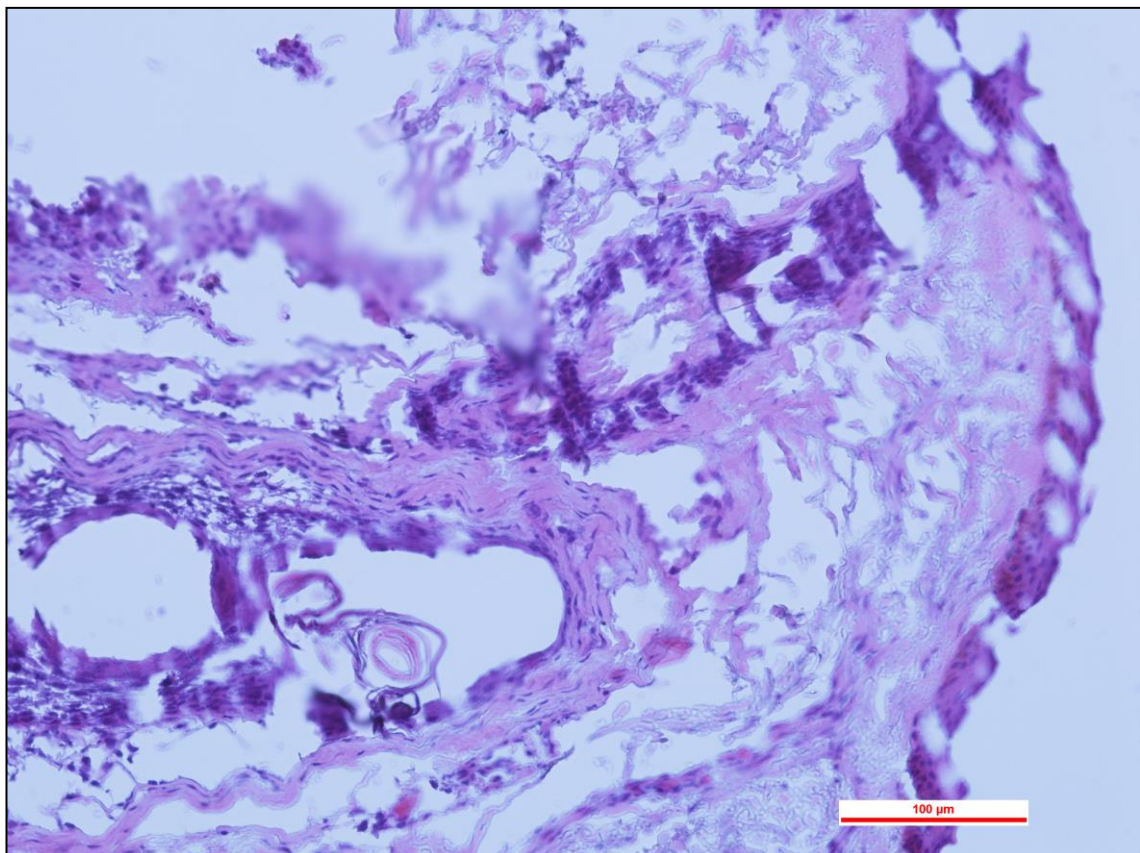
Obr. č. 82 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 7 - Varle (zvětšeno 100x)



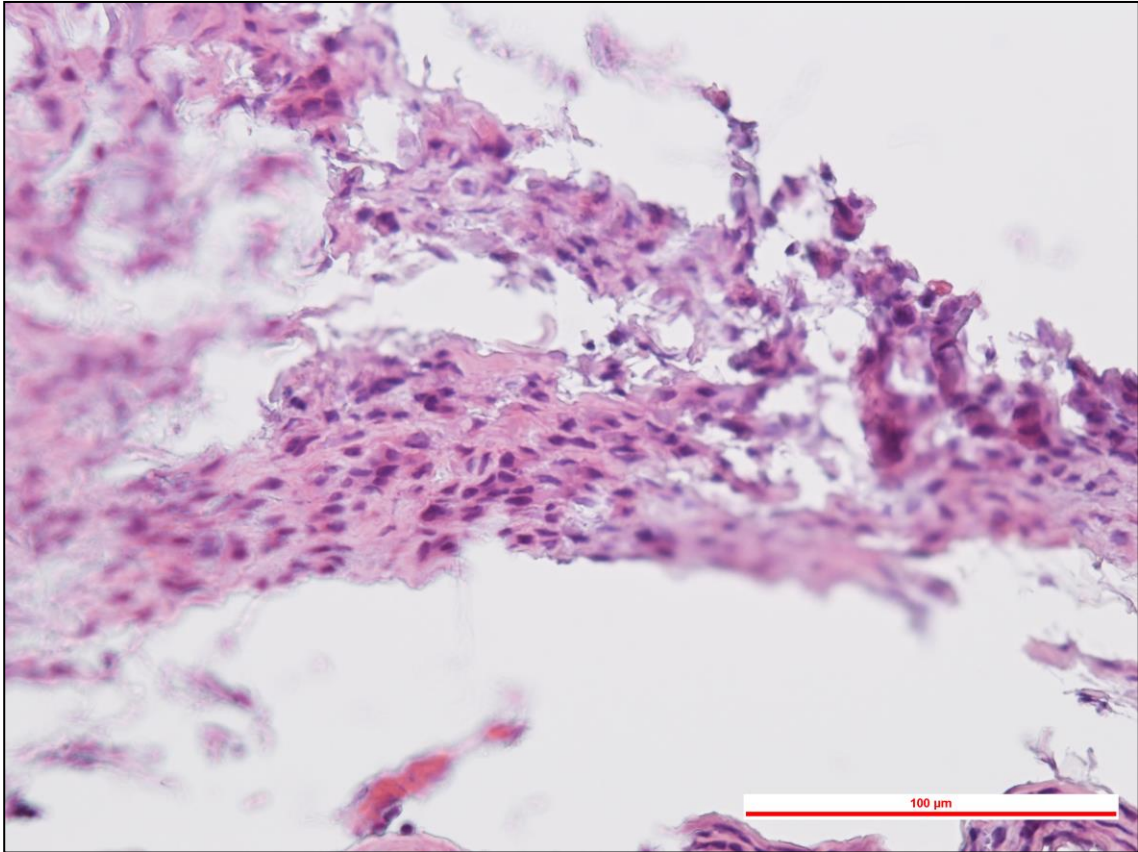
Obr. č. 83 – Ověření hypotézy č. 2, Pokus č. 1 - Varle (zvětšeno 200x)



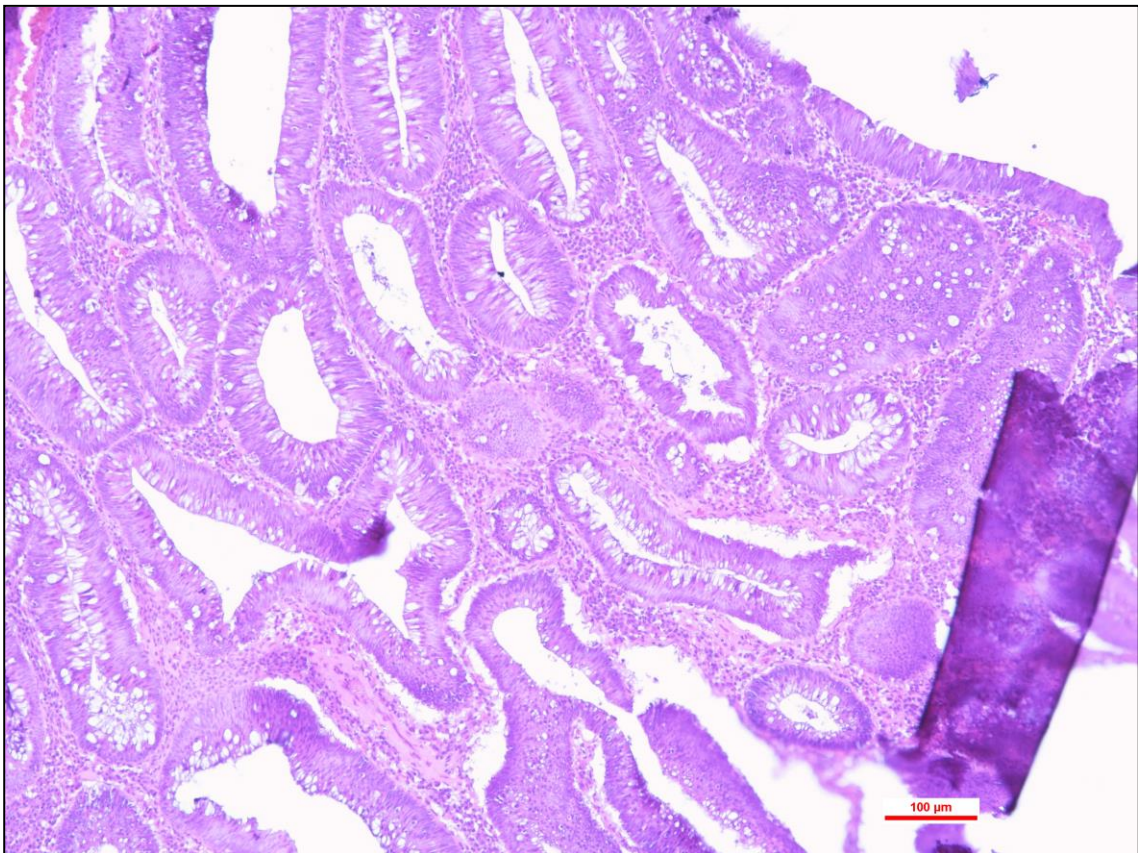
Obr. č. 84 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



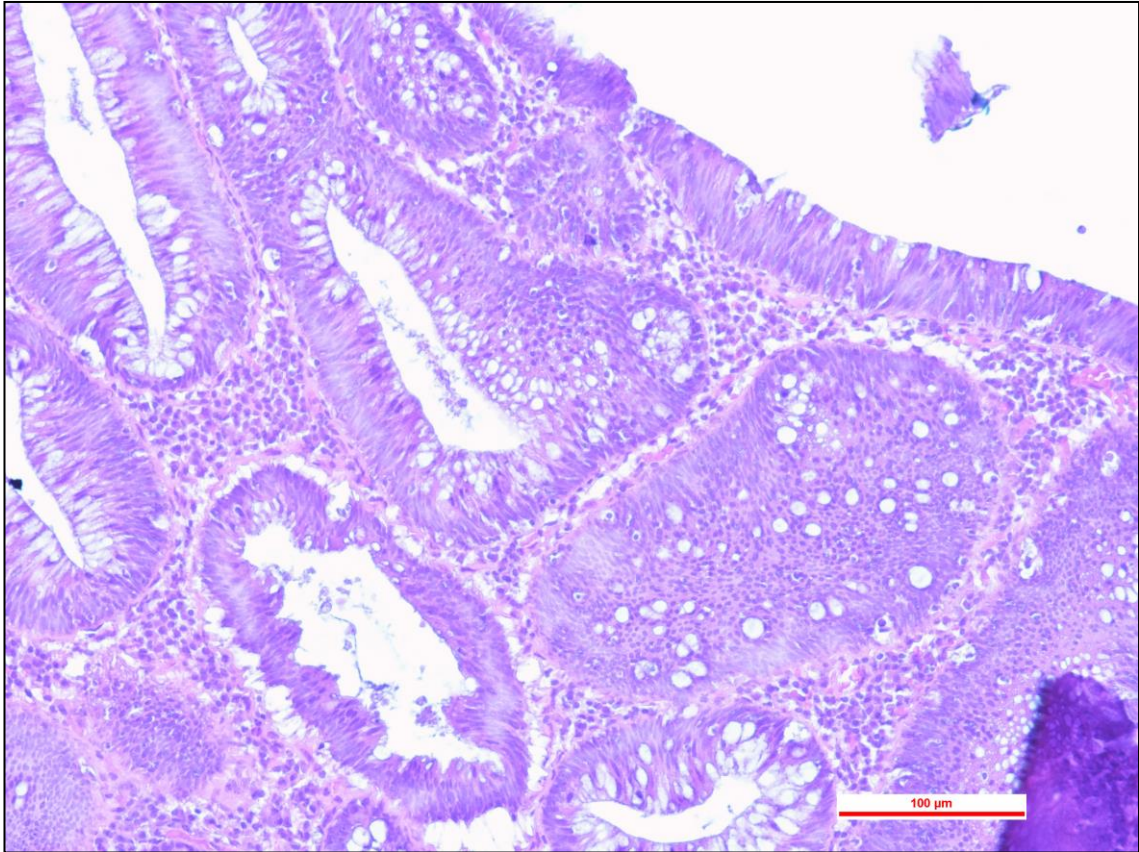
Obr. č. 85 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



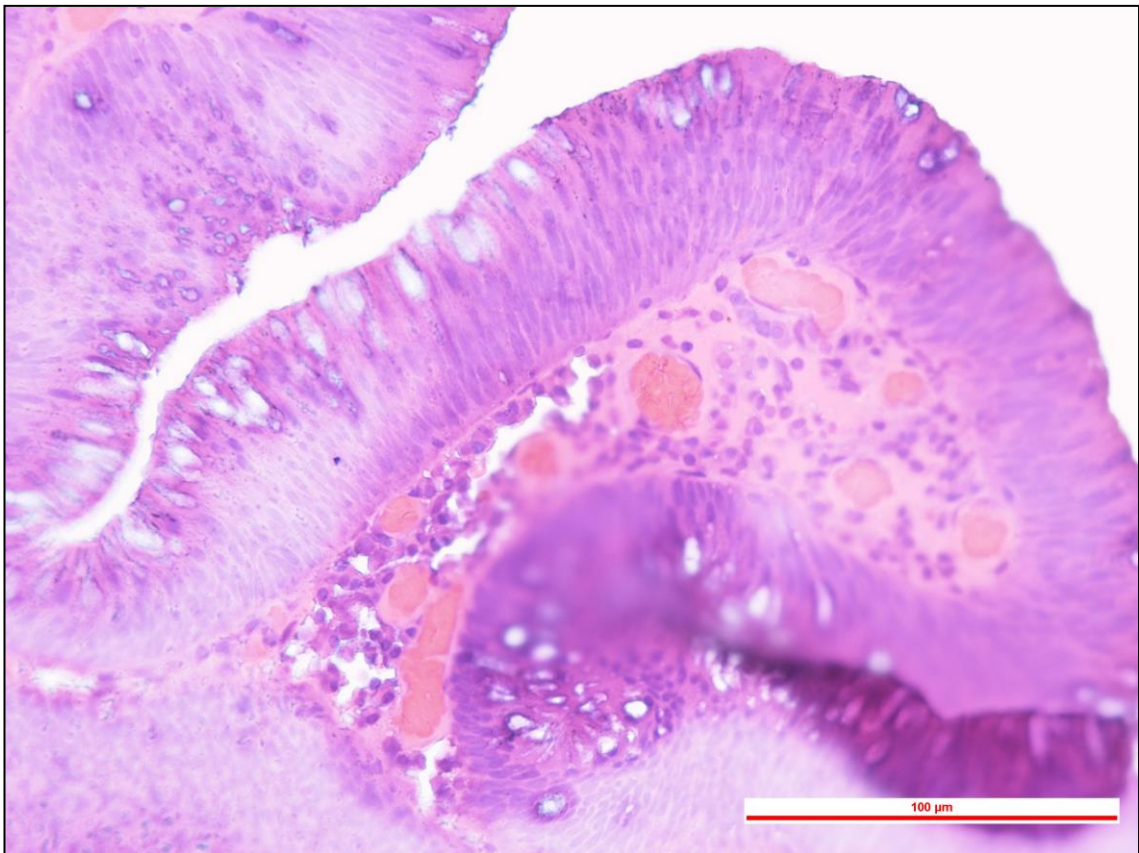
Obr. č. 86 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Pigmentový névus (zvětšeno 400x)



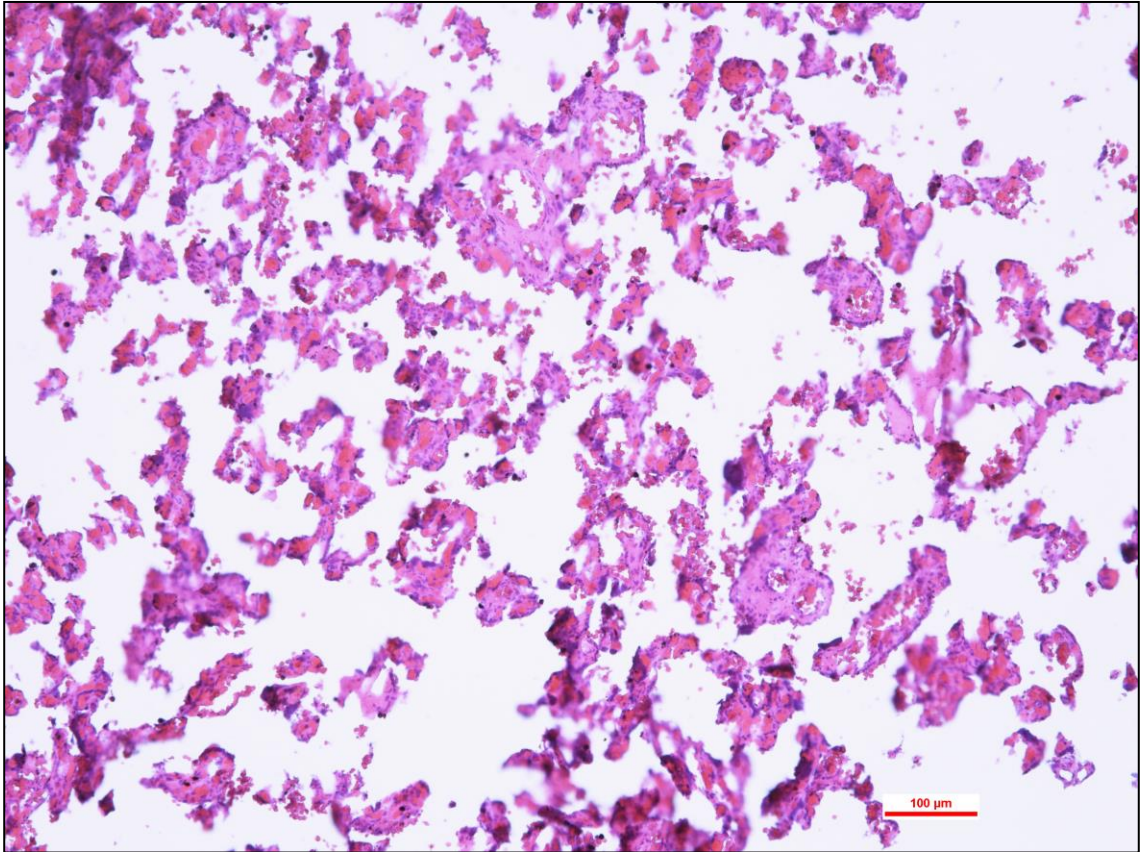
Obr. č. 87 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



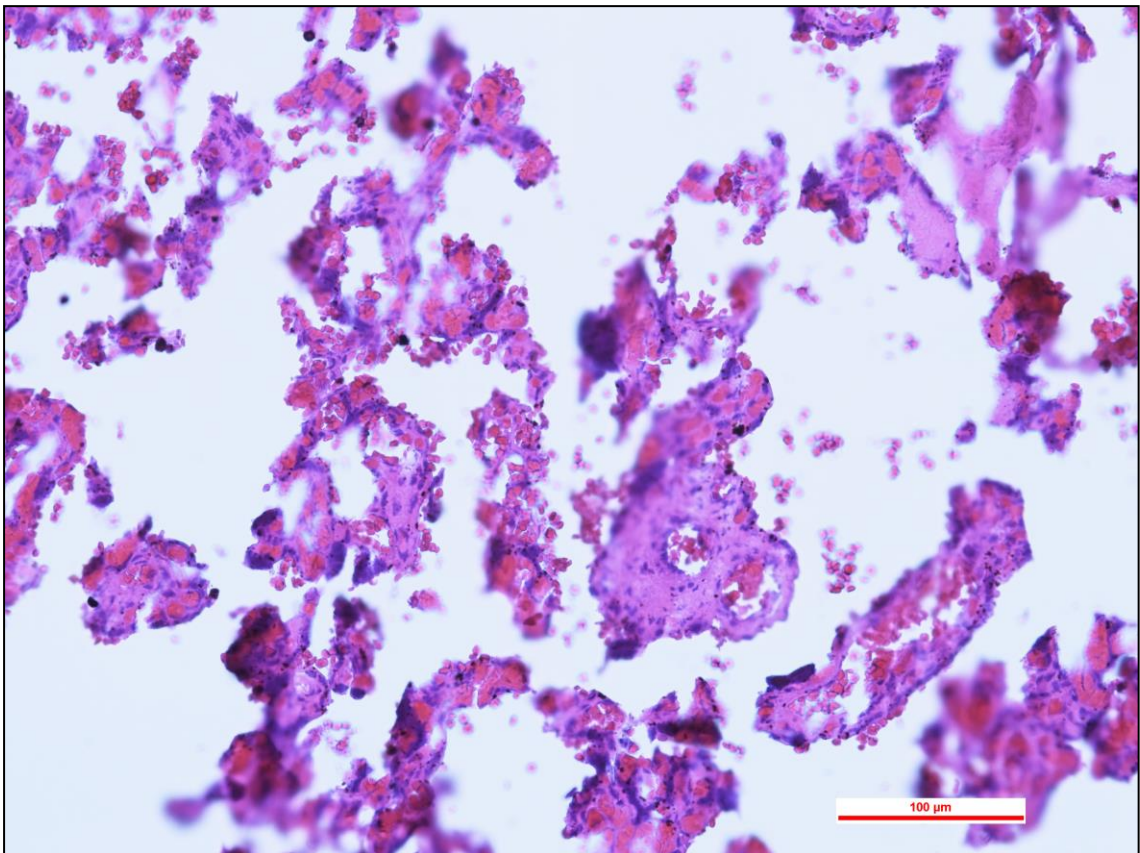
Obr. č. 88 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



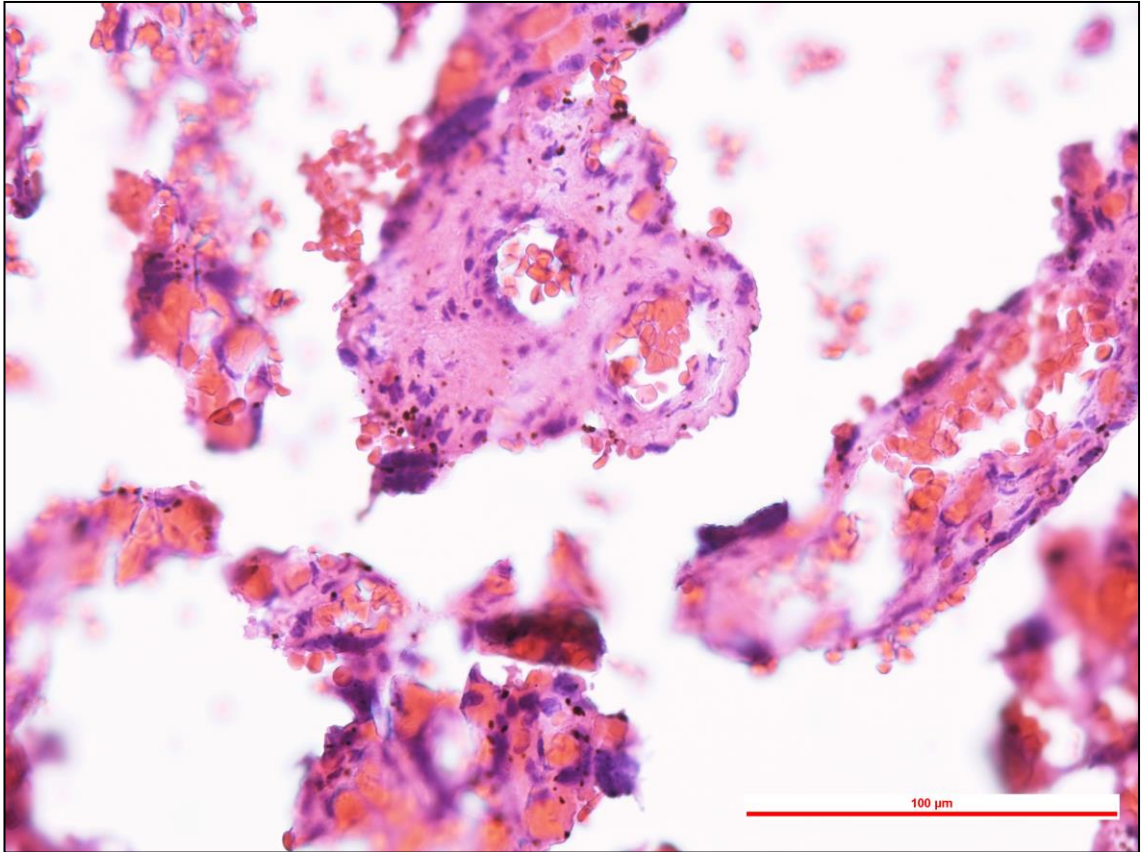
Obr. č. 89 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Adenomový polyp (zvětšeno 400x)



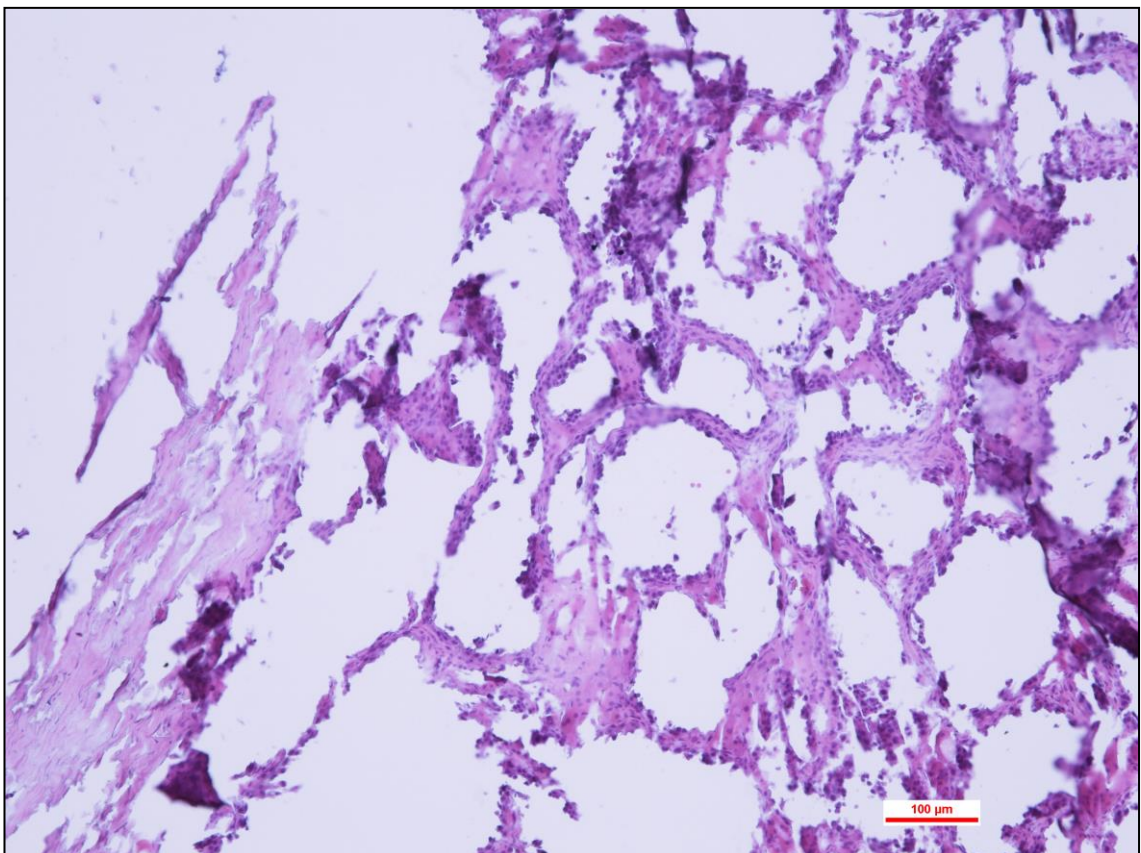
Obr. č. 90 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Placenta (zvětšeno 100x)



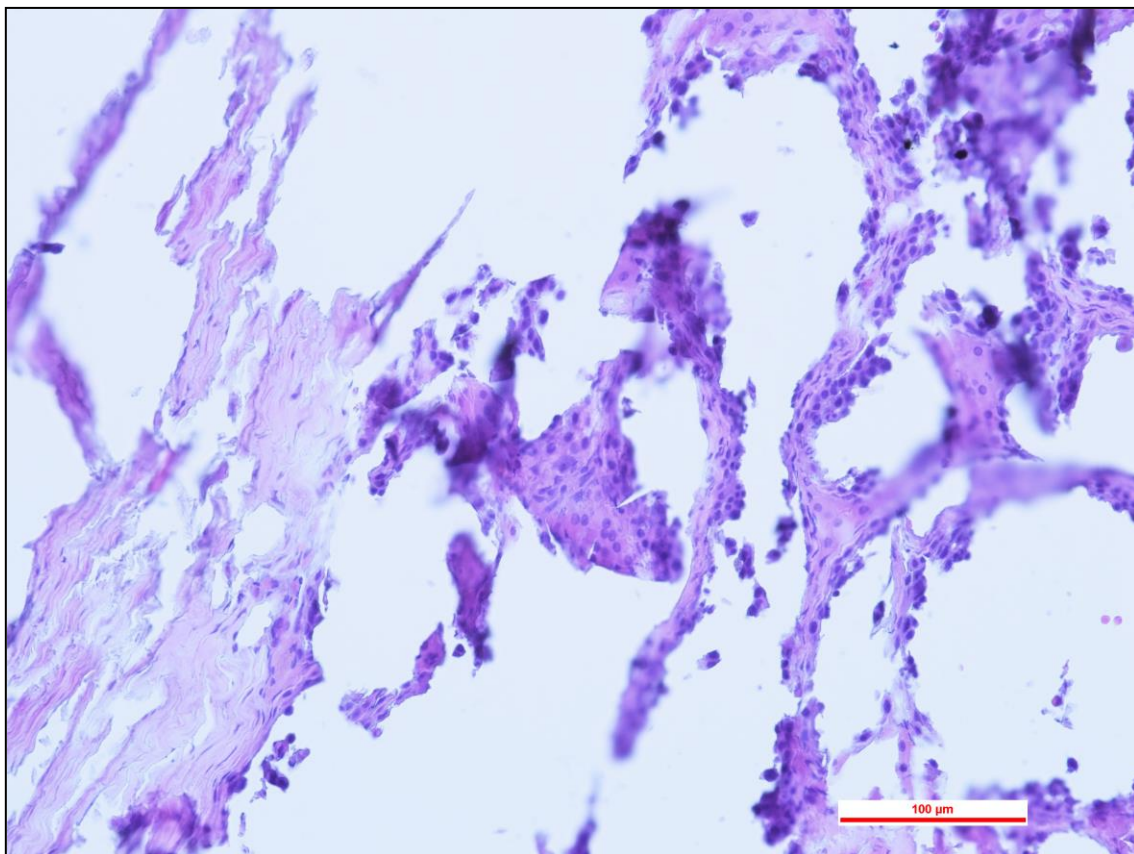
Obr. č. 91 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Placenta (zvětšeno 200x)



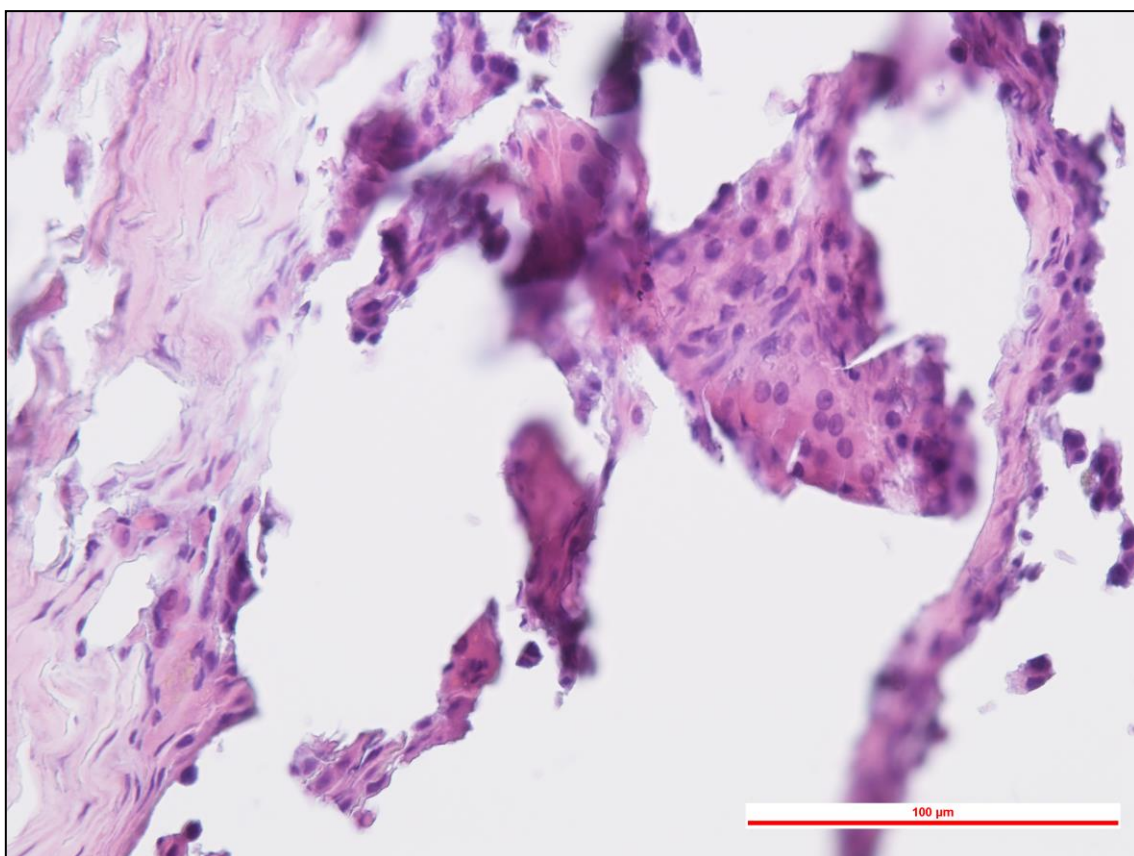
Obr. č. 92 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Placenta (zvětšeno 400x)



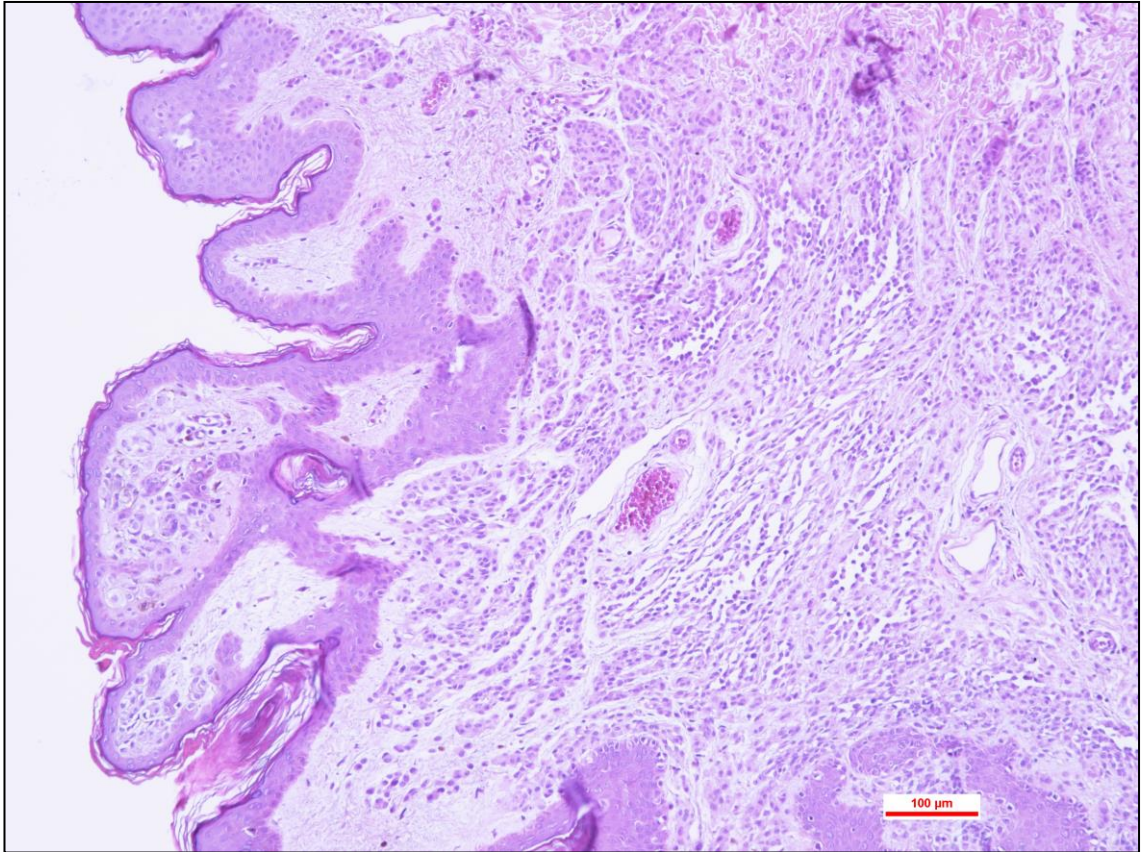
Obr. č. 93 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Varle (zvětšeno 100x)



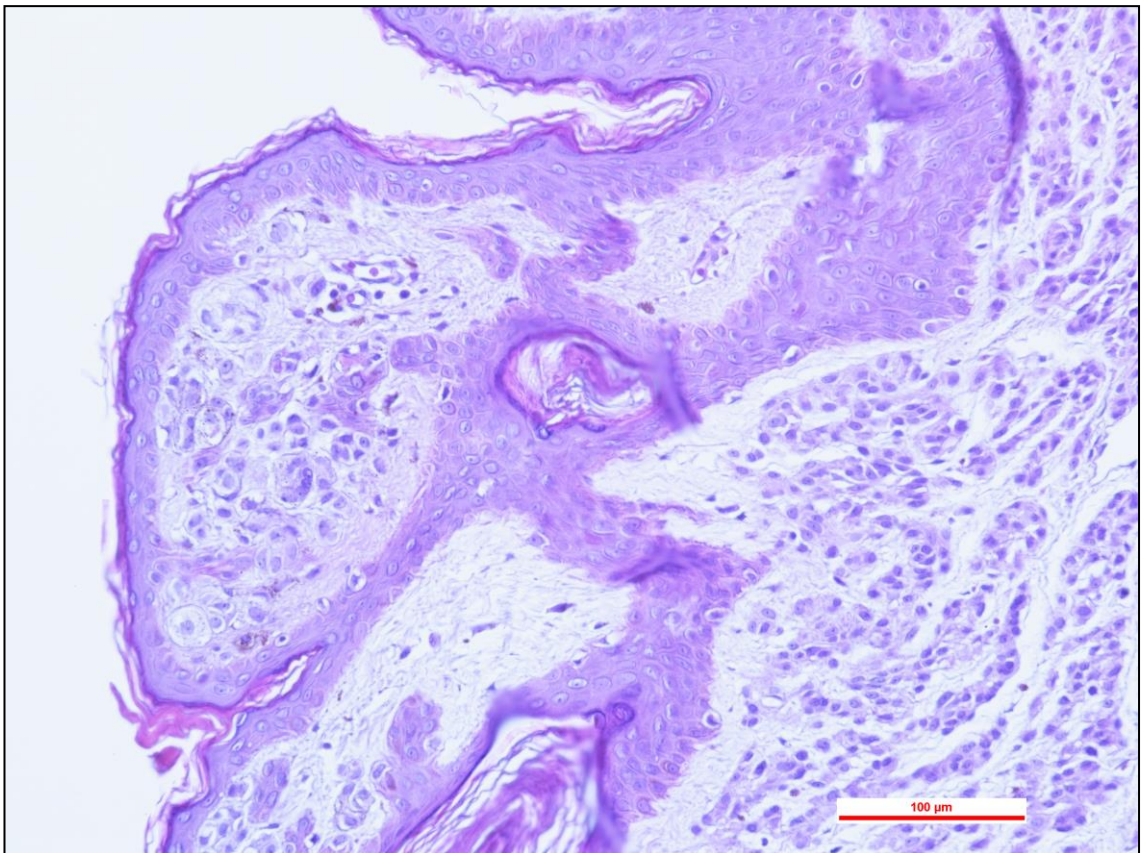
Obr. č. 94 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Varle (zvětšeno 200x)



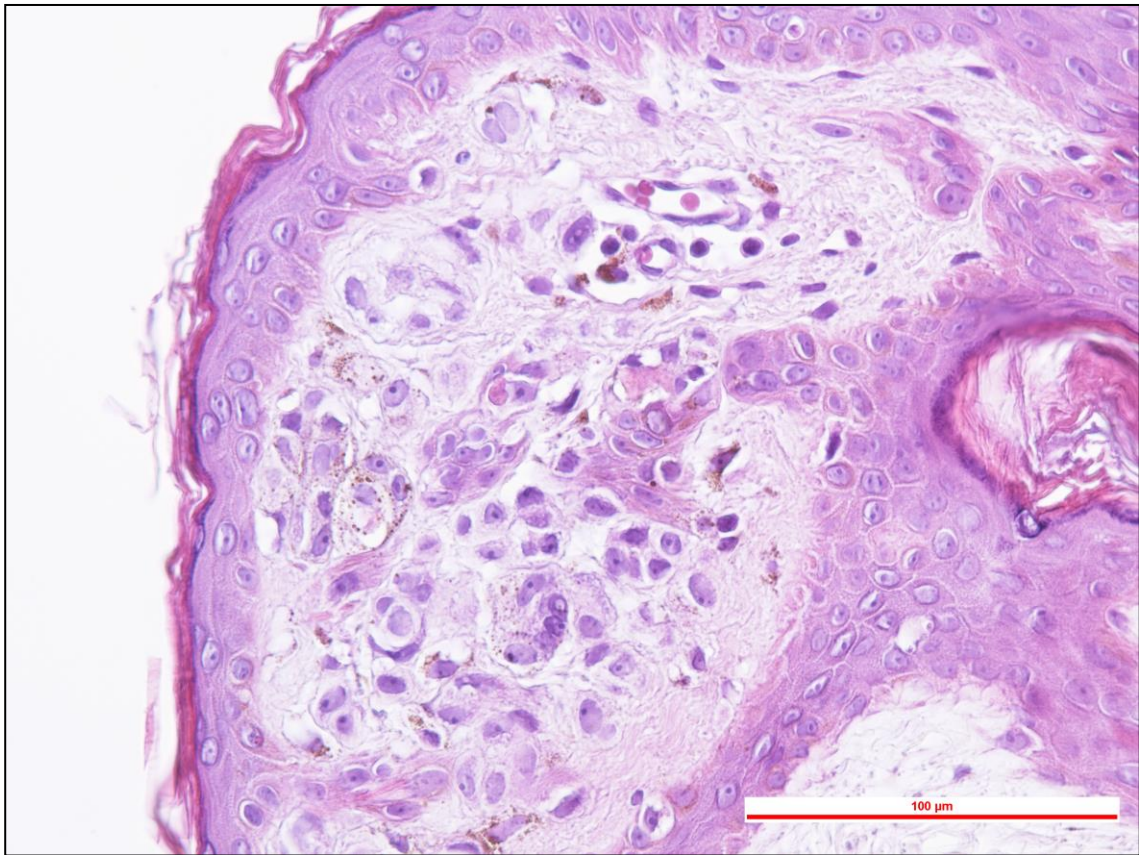
Obr. č. 95 – Poškozená tkáň po 30 minutovém vysychání – Varle (zvětšeno 400x)



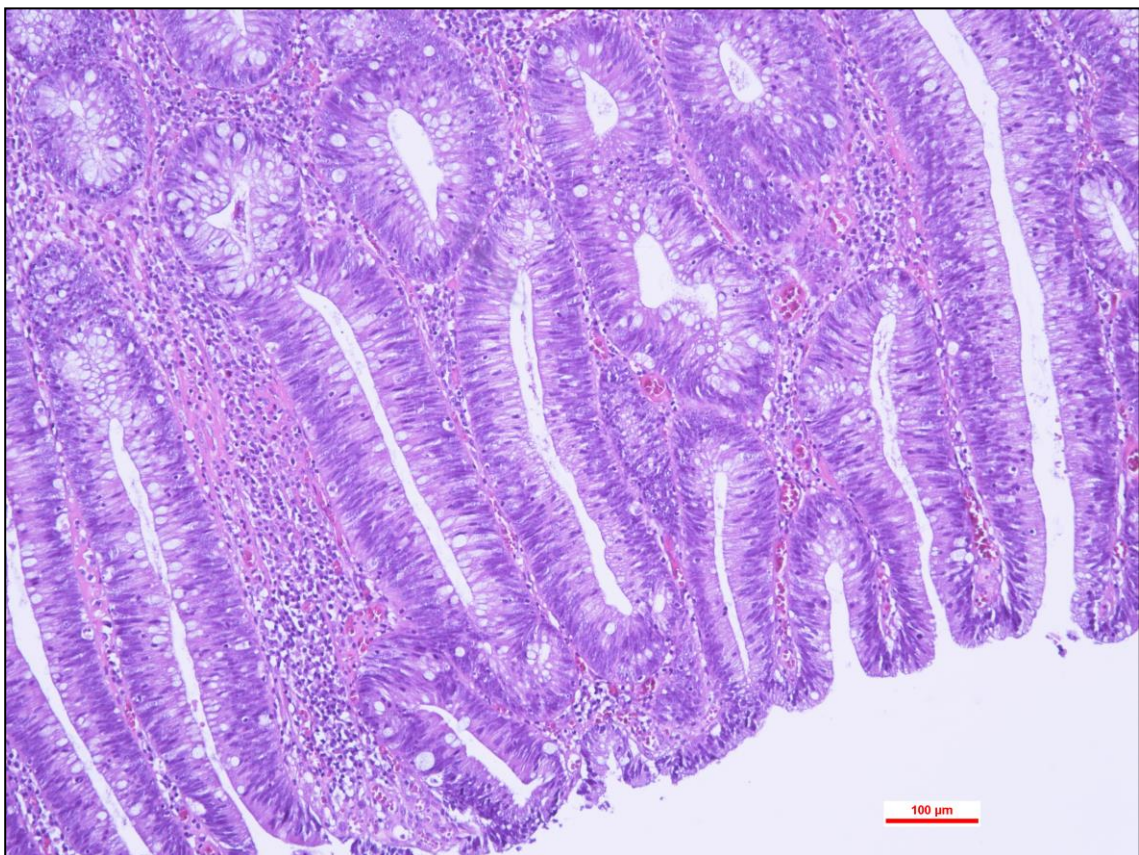
Obr. č. 96 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Pigmentový névus (zvětšeno 100x)



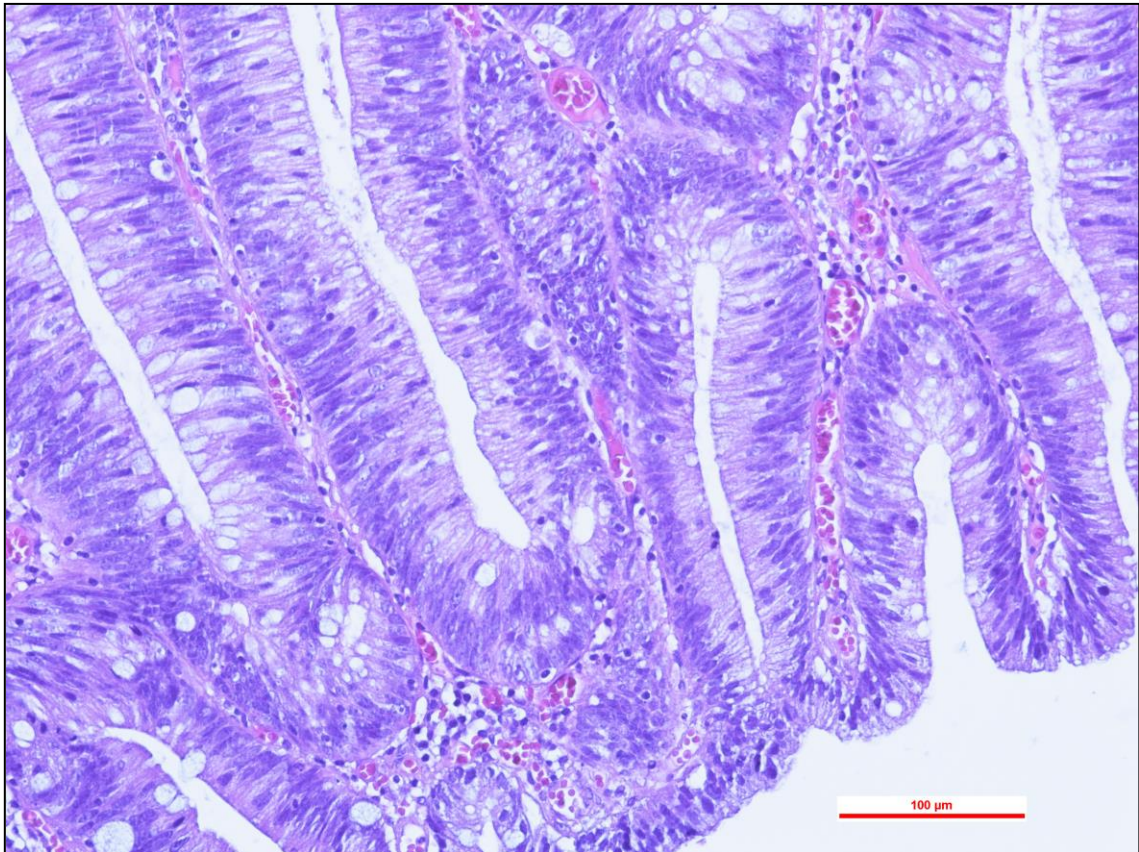
Obr. č. 97 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Pigmentový névus (zvětšeno 200x)



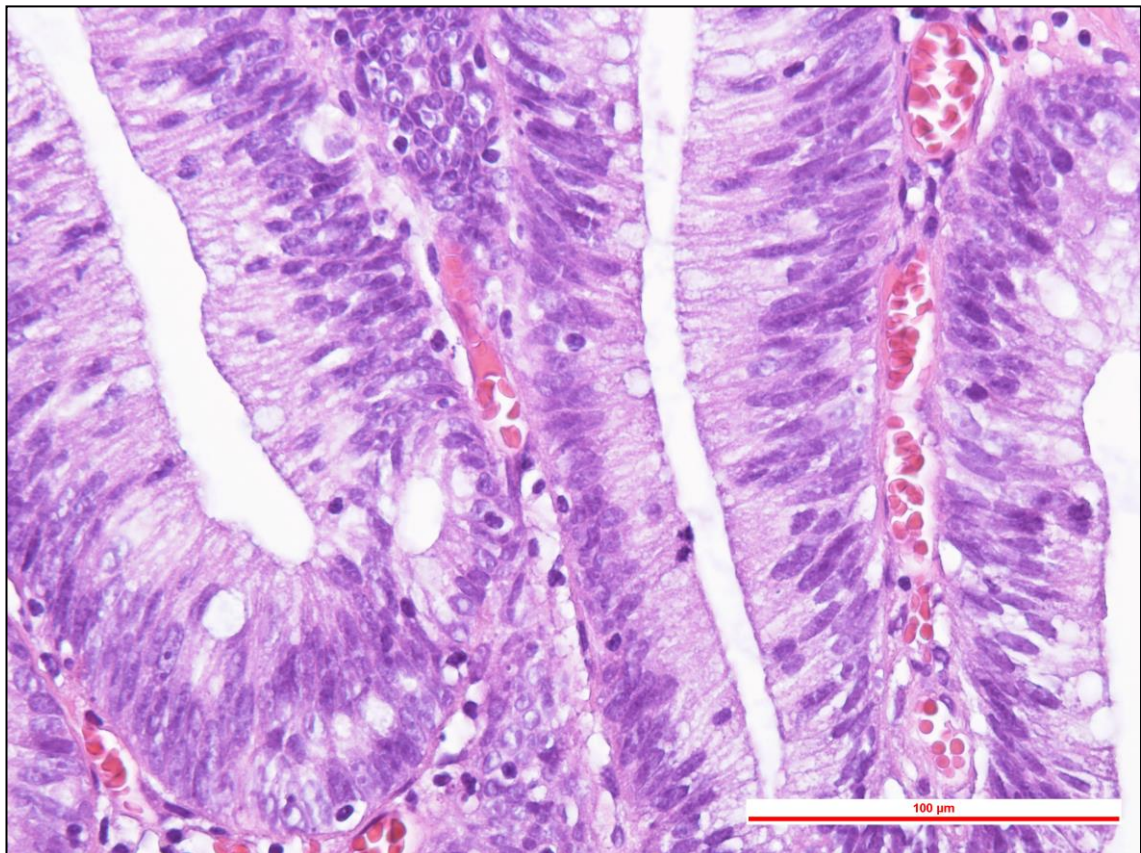
Obr. č. 98 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Pigmentový névus (zvětšeno 400x)



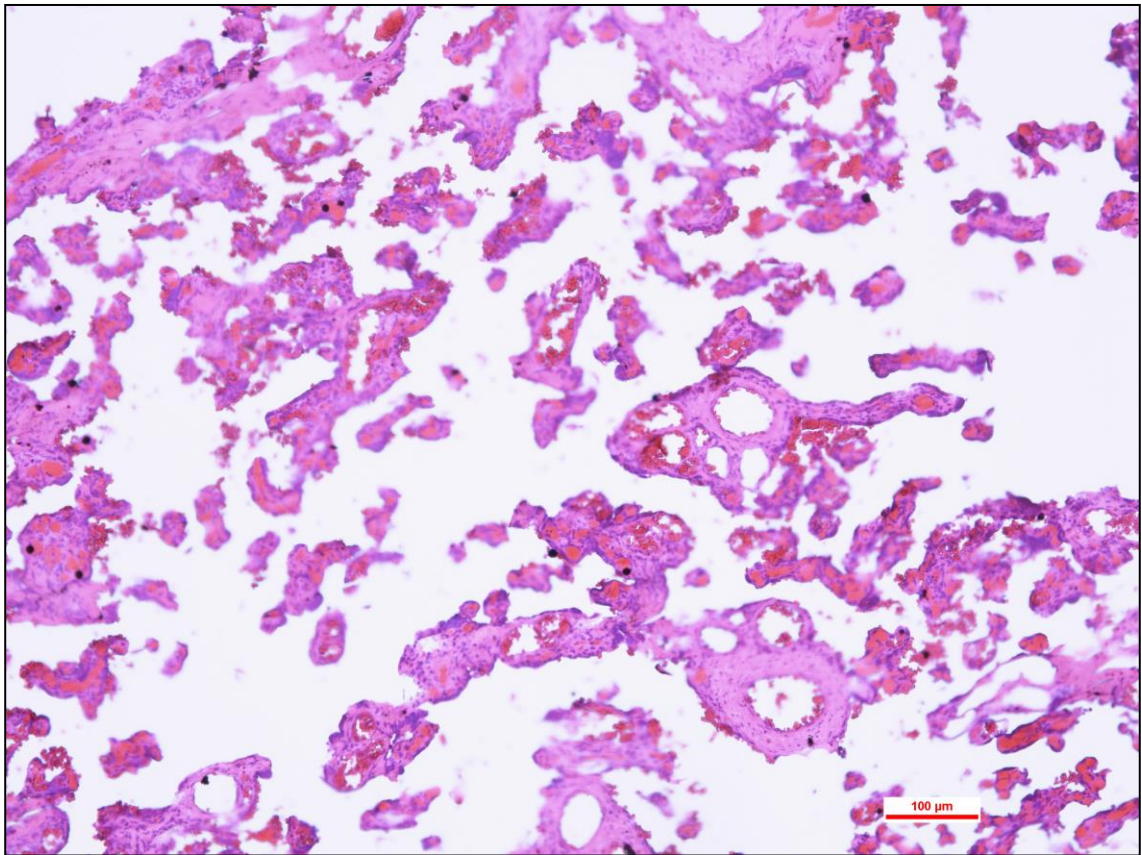
Obr. č. 99 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Adenomový polyp (zvětšeno 100x)



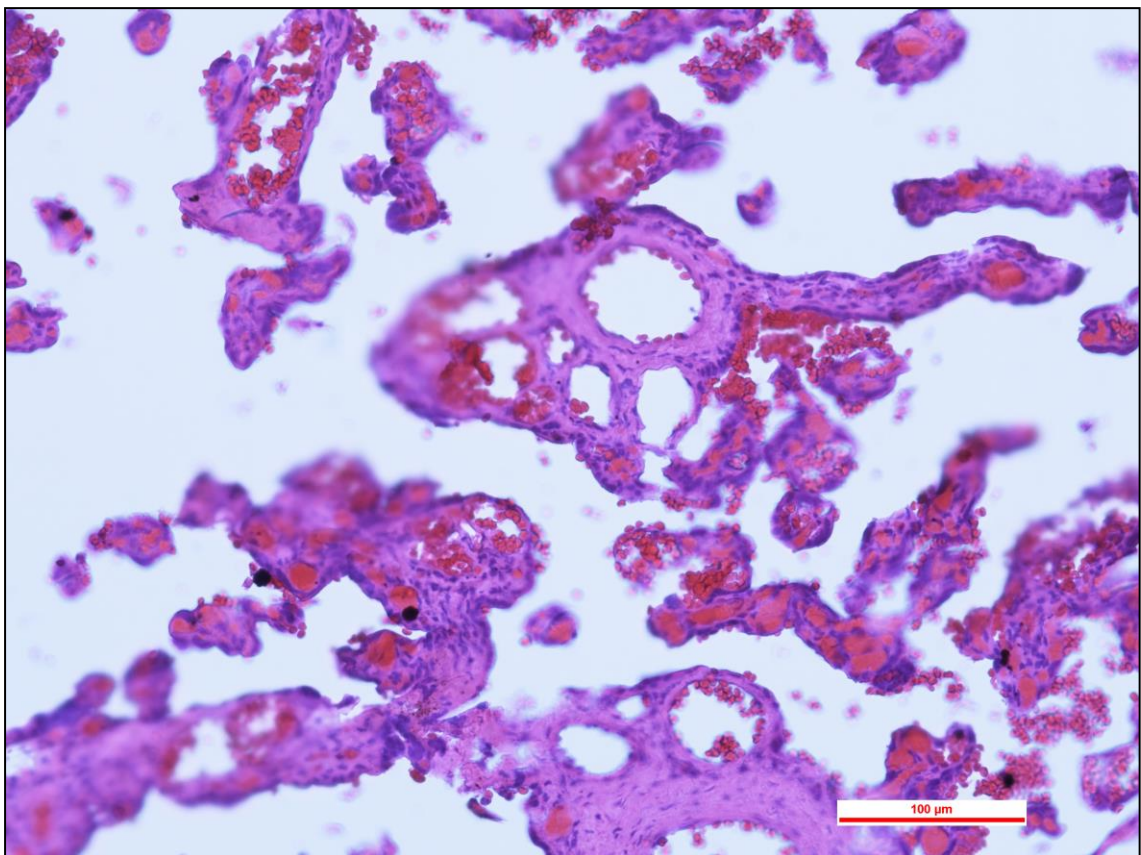
Obr. č. 100 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Adenomový polyp (zvětšeno 200x)



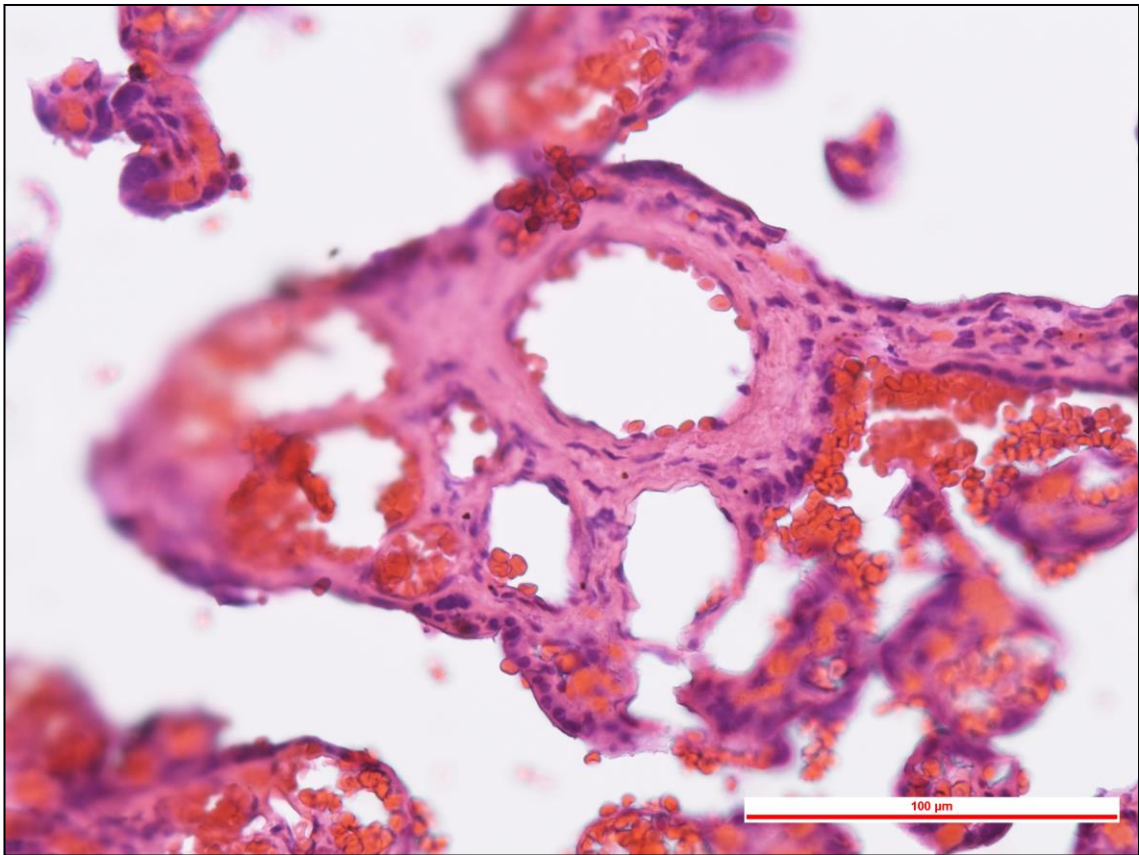
Obr. č. 101 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Adenomový polyp (zvětšeno 400x)



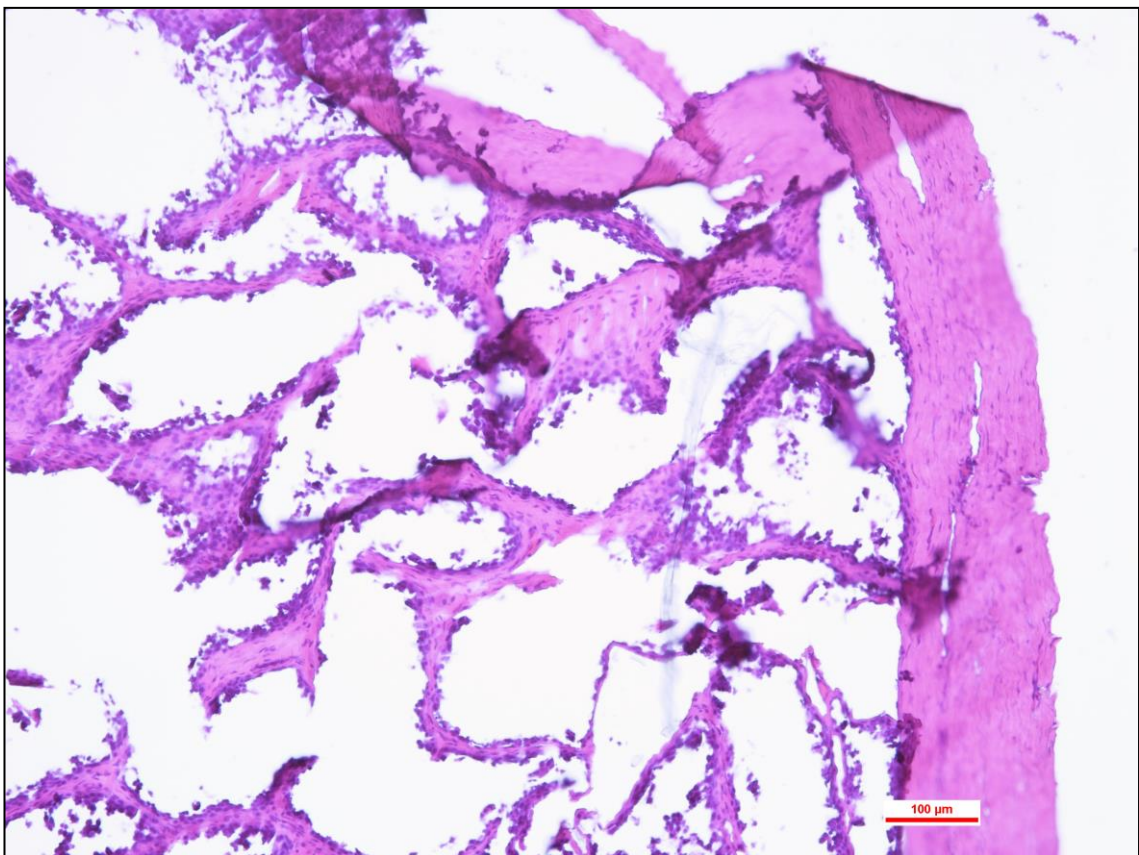
Obr. č. 102 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Placenta (zvětšeno 100x)



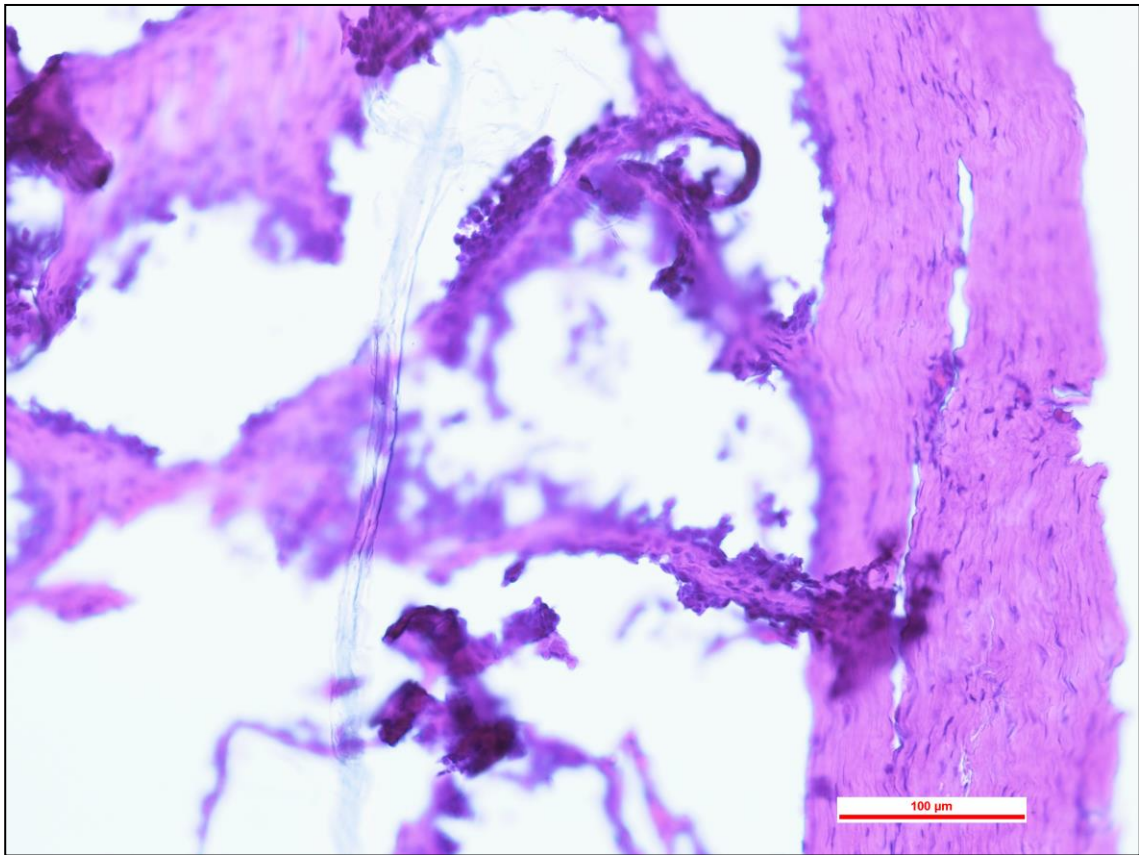
Obr. č. 103 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Placenta (zvětšeno 200x)



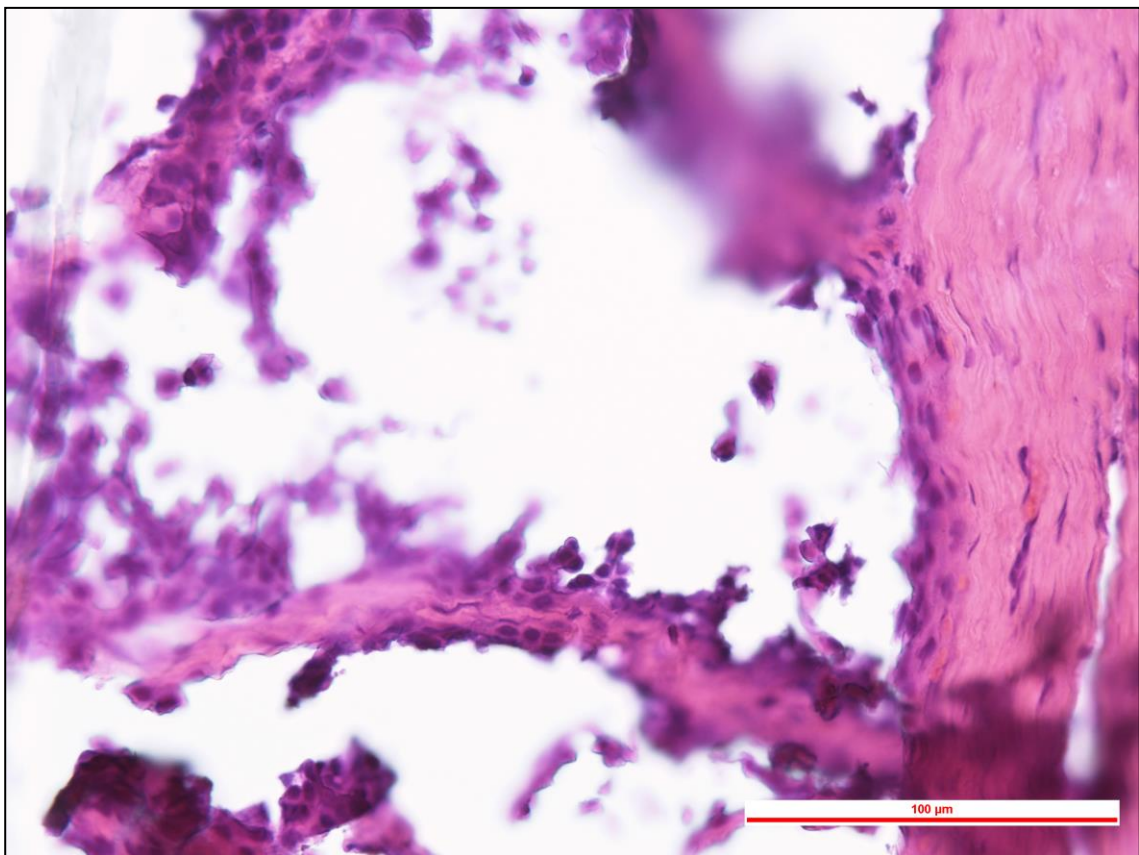
Obr. č. 104 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Placenta (zvětšeno 400x)



Obr. č. 105 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Varle (zvětšeno 100x)



Obr. č. 106 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Varle (zvětšeno 200x)



Obr. č. 107 – Poškozená tkáň po 15 minutovém vysychání – Varle (zvětšeno 400x)