



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Histologické vyšetření mozku na Alzheimerovu chorobu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ / ZDRAVOTNÍ

LABORANT

Autor: Kristýna Havelková

Vedoucí práce: Ing. Tomáš Nix, Ph.D.

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Histologické vyšetření mozku na Alzheimerovu chorobu“ 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 bakalářské 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

.....

Kristýna Havelková

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu bakalářské práce, Ing. Tomáši Nixovi, Ph.D. za jeho rady a čas, který mi věnoval při řešení dané problematiky. Dále chci také poděkovat celému kolektivu Oddělení patologie v Jindřichově Hradci za poskytnutí informací, vzorků pro testování a za možnost provádět výzkum v jejich laboratoři.

Histologické vyšetření mozku na Alzheimerovu chorobu

Abstrakt

Ve své bakalářské práci se zabývám histologickým vyšetřením mozku na Alzheimerovu chorobu. Výzkum jsem prováděla na Oddělení patologie v Nemocnici Jindřichův Hradec a.s. Práce je rozdělena do dvou částí – teoretická a praktická část.

V teoretické části se zabývám tím, co je vlastně histologie a histologické vyšetření, histologickou stavbou nervového systému a především mozku. Dále se zabývám Alzheimerovou chorobou, jejím popisem, druhy, příznaky, terapií a prevencí. Také zde zmiňuji Českou alzheimerovskou společnost a mýty o Alzheimerově chorobě. Na závěr teoretické části uvádím příklady jiných demencí.

V praktické části jsem prováděla histologické vyšetření mozku metodami Impregnace nervových vláken podle Palmgrena a Průkaz senilních drúz podle A. v. Braumühla – na zmrazených řezech. Tyto dvě metody slouží k obarvení nervových struktur (včetně drúz, které jsou typické pro Alzheimerovu chorobu), díky čemuž lze potvrdit či vyvrátit toto onemocnění. Dále jsem provedla základní barvení Hematoxylin-eosinem. Těmto barvením předcházelo zpracování biologického materiálu jako je fixace, přikrojení, zabalení, zalévání do parafínu, krájení a napínání preparátu na podložní sklo. Po barvení se preparát zamontoval pod krycí sklo a následně jsme provedly vyhodnocení pomocí mikroskopu.

Cílem mé bakalářské práce bylo napsat odbornou rešerši na dané téma, popsat zpracování mozku v histologické laboratoři, provést metody, které jsou typické pro průkaz Alzheimerovy choroby u zemřelých osob, vyhodnotit a porovnat preparáty zdravého a nemocného mozku.

Klíčová slova

Alzheimerova choroba; mozek; histologie; impregnace; Palmgren, Braunmühl, hematoxylin-eosin

Histological examination of the brain for the Alzheimer's disease

Abstract

In my bachelor thesis I deal with histological examination of the brain for the Alzheimer's disease. I conducted the research at the Department of pathology at the hospital in Jindřichův Hradec. The thesis is divided into two parts – theoretical and practical part.

In the theoretical part I deal with this, what is actually histology and histological examination, histological structure of the nervous system and especially the brain. I also deal with Alzheimer's disease, its description, types, symptoms, therapy and prevention. I also mention the Czech Alzheimer Society and myths about Alzheimer's disease. At the end of the theoretical part, I give the examples of other dementias.

In the practical part I performed the histological examination of the brain using methods of Impregnation of nerve fibers by Palmgren and Proof of senile druses by A. v. Braunmühl – on frozen sections. These two methods serve to stain the nerve structures (including the druses which are typical for Alzheimer's disease) which can confirm or deny this disease. I also did a basic staining with Hematoxylin-eosin. This staining was preceded by the processing of biological material such as fixation, trimming (with scalpel), packing, embedding in paraffin, slicing and stretching of the preparation on the slide glass. After staining, the preparation was mounted under the cover glass and then we performed evaluation using a microscope.

The aim of my bachelor thesis was to write a research on a given topic, to describe the processing of the brain in the histological laboratory, to perform methods that are typical for Alzheimer's disease for deceased persons, to evaluate and compare the preparations of the healthy and diseased brain.

Key words

Alzheimer's disease; brain; histology; impregnation; Palmgren; Braunmühl; hematoxylin-eosin

Obsah

Úvod.....	9
1 Teoretická část.....	10
1.1 Histologie	10
1.2 Nervová tkáň	11
1.2.1 Nervová buňka (neuron)	11
1.2.2 Nervová vlákna	12
1.2.3 Neuroglie	12
1.3 Nervový systém.....	12
1.3.1 Centrální nervový systém	13
1.3.2 Periferní nervový systém	19
1.4 Alzheimerova choroba	19
1.4.1 Alois Alzheimer	19
1.4.2 Popis onemocnění	20
1.4.3 Genetické faktory.....	21
1.4.4 Klinický obraz onemocnění	22
1.4.5 Druhy Alzheimerovy choroby	23
1.4.6 Makroskopické změny u Alzheimerovy choroby	23
1.4.7 Mikroskopické změny u Alzheimerovy choroby.....	24
1.4.8 Příznaky Alzheimerovy choroby	26
1.4.9 Terapie	26
1.4.10 Prevence.....	28
1.4.11 Česká alzheimerská společnost.....	28
1.4.12 Mýty o Alzheimerově chorobě	29
1.5 Jiné demence	30
1.5.1 Vaskulární (multiinfarktová) demence	30

1.5.2	Demence s Lewyho tělísky	30
1.5.3	Parkinsonova choroba	31
1.5.4	Frontotemporální lobární demence	32
2	Cíle a hypotézy	33
3	Metodika	34
3.1	Informace o pracovišti	34
3.2	Výzkumný materiál	34
3.3	Odběr materiálu pro histologické vyšetření	35
3.4	Příjem materiálu v laboratoři	36
3.4.1	Příjem těl zemřelých	36
3.5	Fixace materiálu	37
3.5.1	Fyzikální fixační prostředky	37
3.5.2	Chemické fixační prostředky	37
3.6	Přikrojení, zabalení	38
3.7	Zalévání do parafinu	38
3.7.1	Odvodnění	38
3.7.2	Prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafin	38
3.7.3	Prosycení tkáně parafinem	38
3.7.4	Vlastní zalití	39
3.8	Krájení preparátu a napínání na podložní sklo	39
3.8.1	Mikrotom sáňkový	39
3.8.2	Mikrotom zmrazovací (kryostat)	40
3.9	Barvení	40
3.9.1	Hematoxylin-eosin	40
3.9.2	Impregnace nervových vláken v parafinových řezech podle Palmgrena .	43
3.9.3	Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunnmühla – na zmrazených řezech.	46
3.10	Mikroskopování	48

3.10.1 Světelný mikroskop	48
3.10.2 Postup mikroskopování.....	49
4 Výsledky.....	51
5 Diskuze.....	62
6 Závěr.....	64
Seznam literatury	65
Seznam obrázků.....	68
Seznam zkratk	69

Úvod

Alzheimerova choroba poškozuje mozek a porušuje kognitivní funkce – myšlení, paměť, úsudek. Je nejčastější příčinou demence, kvůli které je nemocný odkázán na pomoci jiného člověka. Alzheimerovu nemoc poprvé popsal německý lékař Alois Alzheimer v roce 1907, v té době to byla vzácná nemoc. Nyní se demence vyskytuje u více než sedmi miliónů obyvatel Evropy.

V této práci jsem se zabývala histologickým vyšetřením mozku na tuto chorobu, které jsem provedla metodami Impregnace nervových vláken v parafínových řezech podle Palmgrena a Průkaz senilních drúz podle A. v. Braumühla – na zmrazených řezech. Také jsem vzorky obarvila základním barvením Hematoxylin-eosinem. Vyhotovené preparáty jsme poté vyhodnotily pomocí mikroskopu. Výsledky jsem zpracovala formou fotek a popisu preparátů.

1 Teoretická část

1.1 Histologie

Histologie se zabývá studiem tkání, které jsou složeny z buněk stejného původu, stavby a funkce (Slípka, 2014). Histologie se rozvíjí od té doby, kdy byl vynalezen mikroskop. Mikroskop je přístroj, kterým můžeme pozorovat mikroskopickou stavbu organismů. Mikroskopy se postupně stále zdokonalují. Existují světelné mikroskopy (mohou zvětšovat téměř 2 000násobně) a elektronové mikroskopy (mohou zvětšovat až 200 000násobně) (Vacek, 1995a). Také se využívá fluorescenční mikroskopie, které využívá fluorescenční barviva (fluorochrom). Vysokoenergetické UV záření je pohlceno fluorochromem a vyzářeno jako viditelné světlo (Vajner et al., 2010).

Poznávání mikroskopické stavby organismů nebylo závislé jen na zdokonalování mikroskopu, ale i na rozvíjení histologické techniky. Tato technika se zabývá především přípravou tzv. histologických preparátů. Aby vznikl histologický preparát, musí se předmět, který chceme pozorovat ve světelném mikroskopu, nejdříve zpracovat tak, aby byl dostatečně tenký a průsvitný. Ze začátku se histologické preparáty připravovaly prostými metodami (např. rozmělněním živočišné tkáně mezi dvěma sklíčky). Nyní se preparáty pro světelný mikroskop zhotovují krájením tenkých řezů na přístroji, který se nazývá mikrotom. Řezy jsou silné 6-10 μm (Vacek, 1995a). Tyto řezy se poté odparafinují, zavodní, obarví některou z metod histologické techniky a zamontují se mezi podložní a krycí sklíčko (Brychtová, Hlobilková, 2008). Pro elektronový mikroskop musí být řezy ještě tenčí, řezy se krájí na ultramikrotomu a jsou silné 60-70 nm. Hlavním úkolem zdravotního laboranta (v histologické laboratoři) je zhotovování těchto preparátů (Vacek, 1995a).

Histologie má velký význam v lékařství. Může se sledovat mikroskopická stavba lidského těla, což pomáhá pochopit správné funkce organismu. Díky tomu lze odlišit chorobné stavy (patologické) od normálních stavů (fyziologických) (Vacek, 1995a).

Histologické vyšetření je jedna z důležitých klinických metod. Díky histologii se může z tzv. probatorní excize (vyříznutý kousek tkáně) zjistit, zda pacient má nějaký nádor nebo jiný proces. Hraje tedy důležitou roli v diagnostice a při léčbě (Vacek, 1995a).

Histologické vyšetření se také využívá v patologicko-anatomických ústavech, které patří k lékařským fakultám, a na odděleních patologické anatomie, které patří k nemocnicím.

Zde lékaři stanovují příčiny úmrtí, a to jak pouhým okem, tak i právě histologickými metodami (Vacek, 1995a).

Dále se histologie využívá ve farmaceutickém průmyslu. Zde se zkoumá, jestli léky, které mají být dány k veřejnému použití, neobsahují škodlivé příměsi. Lék se dá pokusným zvířatům, které se po určité době usmrtí a jejich orgány se histologicky vyšetří (Vacek, 1995a).

Histologicky se dá zkoumat nejen stavba živočišného těla, ale i těla rostlinného. V lékařství je důležité zkoumání mikroskopické stavby lidského těla. Lidský organismus je složen z mnoha orgánů, ty jsou složeny z tkání a tkáně z buněk. Některé tkáně jsou složeny i z živé hmoty, která nemá buněčnou strukturu (Vacek, 1995a).

Rozdělení histologie podle složek lidského těla, kterými se zabývá:

- Cytologie (nauka o složení buňky)
- Nauka o složení tkání (histologie v užším slova smyslu)
- Mikroskopická anatomie (nauka o mikroskopickém složení orgánů) (Lüllmann-Rauch, 2012)

1.2 Nervová tkáň

1.2.1 Nervová buňka (neuron)

Nervové buňky mají různý tvar a velikost se pohybuje v rozmezí 5 μm až 150 μm . Jádro je kulovité, měchýřkovité a obalené zřetelným obalem, má málo chromatinu a díky tomu má v mikroskopu zřetelně viditelné jádro. Cytoplazma obsahuje mitochondrie, Golgiho komplex, Nisslova tělíska, neurofibrily a pigment (Vacek, 1995a). Neurony jsou složeny z perikaryonu (buněčného těla) a z výběžků (Slípka, 2014). Tyto výběžky jsou dvojího typu, a to dendrity a neurity (axony). Dendrity vedou nervové vzruchy od obvodu k tělu neuronu (dostředivě). Neurit vede nervové vzruchy od těla neuronu (odstředivě) (Vacek 1995a; Křivánková, Hradová, 2009).

Typy nervových buněk:

- Bipolární buňky – mají jeden dendrit a jeden neurit.
- Pseudounipolární buňky – z těla této buňky vychází jen jeden výběžek, který se v určité vzdálenosti dělí na dvě raménka (neuritické a dendritické).

- Multipolární buňky – mají hodně dendritů a jeden neurit. (Vacek, 1995a).
- Unipolární buňky – mají pouze dendrit (Orel, 2015).

1.2.2 Nervová vlákna

Nervová vlákna jsou dlouhé výběžky nervových buněk. Nervové vlákno může být holé nebo může být obaleno pochvou, a to buď myelinovou nebo Schwannovou (Vacek, 1995a).

1.2.3 Neuroglie

Funkce neuroglie je především podpůrná (tvoří oporu pro neurony a nervová vlákna), dále se účastní látkové výměny nervové tkáně, chorobných procesů a šíření nervových vzruchů (Vacek, 1995a). Tvoří více než polovinu objemu nervové tkáně a jejich počet je několikanásobně větší než počet neuronů (Orel, 2015).

- Makroglie – řadí se sem hlavně astrocyty, což jsou buňky s velkým množstvím výběžků, které se hvězdicovitě větví.
- Oligodendroglie – jsou buňky menší než makroglie, mají kulovité jádro a malý počet výběžků, které se větví jen málo nebo vůbec.
- Mikroglie – skládá se z malých, vřetenovitých buněk, které mají podlouhlé jádro, málo cytoplazmy a několik bohatě se větvících tenkých výběžků (Vacek, 1995a).

1.3 Nervový systém

Nervový systém se dělí na centrální nervový systém (CNS) a periferní nervový systém (PNS) (Klika et al., 1986). Do CNS patří mozek, mozeček a mícha. Do PNS se řadí periferní nervy, nervová ganglia a obvodová nervová zakončení. CNS a PNS tvoří jeden funkční celek (Vacek, 1995a).

Mozek a mícha se skládají z bílé a šedé hmoty, což jsou nervové tkáně (Vacek, 1995a). Bílá hmota obsahuje velké množství myelinizovaných nervových vláken, které způsobují nažloutle bílou barvu bílé hmoty (Lüllmann-Rauch, 2012). Mezi nervovými vlákny se vyskytuje malé množství neurogliových buněk a jejich výběžků a také se zde nachází řídká síť krevních vlásečnic. Šedá hmota obsahuje velké množství nervových buněk, nervová vlákna bez myelinových pochev, nervová vlákna s tenkou myelinovou pochvou a neuroglie. Šedorůžová barva šedé hmoty je způsobena přítomností bohaté sítě krevních vlásečnic a četných nervových buněk (Vacek, 1995a).

1.3.1 Centrální nervový systém

1.3.1.1 Mozek

Lidský mozek má hmotnost kolem 1400 gramů. Využívá až 20 % z celkového množství přijímaného kyslíku (Pfeiffer, 2007).

Bílá hmota je uvnitř mozku, šedá hmota je na povrchu (kůra) a také uvnitř. Uvnitř tvoří šedá hmota různě velká ložiska (jádra) (Martínek, Vacek, 2009). Jádra se skládají z různě velkých multipolárních nervových buněk a jejich výběžků a z neuroglie. Některá jádra jsou na pohled tmavě zbarvena, a to díky přítomnosti nervových buněk, které mají v cytoplasmě žlutohnědý nebo červenohnědý pigment (Vacek, 1995a).

Histologická stavba mozkové kůry je velmi složitá, není ve všech místech stejná a odpovídá její důležité funkci, což je řízení a kontrolování všech životních dějů, které probíhají v organismu. Ovládá vyšší nervovou činnost – citění, myšlení a vůli (Vacek, 1995a).

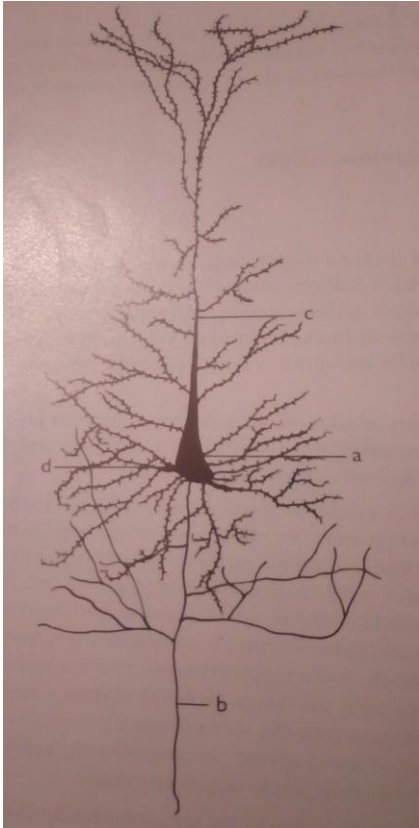
V histologii se k barvení kůry využívají speciální metody, zejména barvení toluidinovou modří nebo thioninem (Nisslovo barvení), barvení na myelin a impregnační metody. Při použití Nisslova barvení lze sledovat tvar a velikost buněk, jejich hustota a uspořádání ve vrstvy. Při barvení na myelin lze pozorovat vlákna s myelinovou pochvou, jejich počet, tloušťku, uspořádání ve svazky a proužky a různé rozdíly v místní úpravě vláken. Metody impregnační se využívají pro sledování jemných rozvětvení výběžků nervových buněk a vztahy mezi nimi (Vacek, 1995a).

Mozková kůra se dělí na izokortex a alokortex (Martínek, Vacek, 2009). Izokortex se vyvíjí z jednotného základu uspořádáním buněk do šesti vrstev. Pokrývá hemisféry mozku. Říká se mu také neokortex, protože je vývojově mladší. V některých oblastech kůry převládá rozvoj jedné vrstvy na úkor vrstev ostatních. Vrstvy se značí směrem od povrchu do hloubky kůry římskými číslicemi I. až VI. Až 11/12 mozkové kůry patří k izokortexu, zbytek je alokortex. To je vývojově starší kůra. Alokortex obsahuje čichové oblasti (tato část se jmenuje paleokortex), oblasti psychických a emočních funkcí a některých forem paměti (archikortex). Struktura alokortexu je jednodušší a jednodušší než izokortexu. Buněčné vrstvy se nevytváří úplně (Vacek, 1995a).

Hlavní typy multipolárních nervových buněk, vyskytující se v kůře mozku:

- Pyramidové buňky (obr. 1)

Tyto buňky mají tvar pyramid. Z vrcholu těchto buněk je hlavní dendrit (jde k povrchu kůry), po stranách těla buňky jsou vedlejší dendrity, ze středu těla vychází neurit, který jde do bílé hmoty. Vyskytují se především ve III. a V. vrstvě kůry (Vacek, 1995a).



Obr. 1: Pyramidová buňka mozkové kůry. (Zdroj: Vacek – 1995a)

a – tělo buňky

b – neurit

c – hlavní dendrit

d – vedlejší dendrit

- Zrnkovité buňky

Tyto buňky jsou malé. Téměř celé tělo buněk vyplňuje jádro, protože mají málo cytoplazmy. Mají dendrity, které jsou krátké a hojně keříčkovitě se větvící a končí v blízkosti buňky. Nacházejí se hlavně ve II. a IV. vrstvě kůry (Vacek, 1995a).

- Vřetenovité buňky (obr. 2)

Tyto buňky jsou podlouhlé, vřetenovité a mají ovoidní jádro. Z konce buněk vychází dlouhé dendrity. Horní dendrit dosahuje až k I. vrstvě kůry, dolní jde směrem dovnitř a větví se uvnitř VI. vrstvy. Neurity jsou po stranách buněk a vchází do bílé hmoty. Nacházejí se hlavně v VI. vrstvě (Vacek, 1995a).



Obr. 2: Vřetenovité buňky VI. Vrstvy. (Zdroj: Vacek – 1995a)

V kůře se nevyskytují jen tyto tři druhy buněk, ale i další druhy, které mají rozmanitý tvar, velikost i členitost výběžků. Jsou jen v některých částech kůry a jsou většinou pojmenovány podle vědců, kteří je popsali. Společně je pojmenováváme jako speciální buňky kůry (Vacek, 1995a).

Vrstvy mozkové kůry (obr. 3):

- I. vrstva – molekulární

Tato vrstva obsahuje jen velmi málo buněk, které většinou patří k neuroglii (Martínek, Vacek, 2009). Dále se zde nacházejí horizontální a hruškovité buňky Cajalovy, které jsou malé a jejich výběžky jdou souběžně s povrchem kůry. Také se zde vyskytují sítě konečných rozvětvení dendritů nervových buněk, které jsou uloženy hlouběji, a neuritů, které přicházejí do této části z jiných částí mozku (Vacek, 1995a).

- II. vrstva – zevní vrstva jádrová (granulární)

V této vrstvě se nachází malé pyramidové buňky (zrnité buňky). Neurit dosahuje do I. vrstvy nebo do vrstev uložených hlouběji (III. až VI.) (Klika et al., 1986).

- III. vrstva – zevní vrstva pyramidová

Obsahuje pyramidové buňky, jejichž velikost se od povrchu směrem do hloubky zvětšuje (malé jsou v povrchových částech, pod nimi jsou větší buňky a největší jsou na rozhraní III. a VI. vrstvy) (Klika et al., 1986; Vacek, 1995a).

- IV. vrstva – vnitřní vrstva jádrová (granulární)

Obsahuje hustě nakupené zrnkovité buňky, které jsou malé. Tato vrstva je podobná II. vrstvě (Klika et al., 1986; Vacek, 1995a).

- V. vrstva – vnitřní vrstva pyramidová

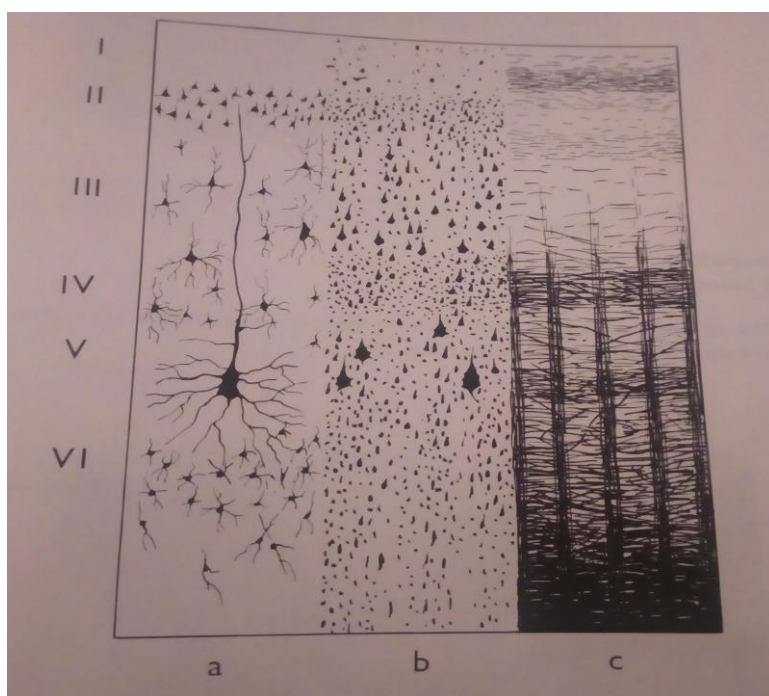
Obsahuje nepočtené pyramidové buňky velké velikosti. Jejich neurity jdou do bílé hmoty (Klika et al., 1986; Vacek, 1995a).

- VI. vrstva – multifonní

Obsahuje především vřetenovité buňky, které jsou postavené kolmo k povrchu a jejich neurity směřují do bílé hmoty. Na hranici této vrstvy s bílou hmotou (ve spodní části) se vyskytují mezi buňkami svazky nervových vláken s myelinovou pochvou. Díky tomu má tato vrstva žíhaný vzhled. V této vrstvě se nacházejí také Martinottiho buňky, které mají vřetenovitý nebo hvězdícovitý tvar, krátké dendrity a dlouhý neurit, který směřuje do molekulární vrstvy (I. vrstvy) (Vacek, 1995a).

Tato šestivrstevná stavba kůry není ve všech místech kůry stejná (liší se tloušťkou vrstev, charakterem, uspořádáním i hustotou buněk a funkcí). Prakticky to bylo zjištěno tak, že při porušení některých částí kůry způsobí poruchu nebo až ztrátu příslušných funkcí (Vacek, 1995a).

V kůře nejsou pouze buňky, ale i nervová vlákna, která mají silnější myelinovou pochvu. Sledování těchto vláken umožňuje barvení na myelin (Vacek, 1995a).



Obr. 3: Schéma mozkové kůry. (Zdroj: Vacek, 1995a)

a – preparát zhotovený impregnací, b – preparát barvení podle Nissla, c – preparát barvený na myelin; I – molekulární vrstva, II – zevní vrstva jádrová, III – zevní vrstva pyramidová, IV – vnitřní vrstva jádrová, V – vnitřní vrstva pyramidová, VI – multiformní vrstva

1.3.1.2 Mozeček

Mozeček se nachází v zadní lebeční jámě nad prodlouženou míchou a Varolovým mostem (Vacek, 1995a; Čihák, 2016). Mozeček se skládá z povrchové vrstvy šedé hmoty (kůra) a z bílé hmoty, která je uvnitř (dřeň). V bílé hmotě jsou uložena ložiska šedé hmoty (mozečková jádra). Na řezu má mozeček vzhled stromečku (dřeň mozečku se stromečkovitě větví) (Vacek, 1995a).

Vrstvy kůry mozečku:

- Molekulární vrstva

Tato vrstva obsahuje jen velmi málo buněk. Nacházejí se zde nervová vlákna, malé nervové a neurogliové buňky (Vacek, 1995a). Vyskytují se zde nejen malé nervové buňky hvězdčovitého tvaru, ale i větší buňky košíčkové (Klika et al., 1986). Buňky hvězdčovitého tvaru mají bohatě se větvící výběžky a košíčkové buňky jsou uloženy hlouběji v této vrstvě (Vacek, 1995a).

- Vrstva Purkyňových buněk

Tato vrstva obsahuje jednu vrstvu velkých nervových buněk, tzv. Purkyňových buněk (Klika, et al., 1986). Tyto buňky jsou hruškovité, mají zúžený konec (dendrit), který směřuje do molekulární vrstvy a větví se do dvou silnějších ramének. Raménka jdou k povrchu a parožnatě se rozvětvují. Z Purkyňových buněk jde dlouhý dendrit do bílé hmoty a k níže uloženým jádrům (Vacek, 1995a).

- Zrnitá vrstva

Tato vrstva obsahuje velké množství malých multipolárních zrnkovitých buněk především s krátkými dendrity, které se drápkovitě větví (Martínek, Vacek, 2009). Jejich neurity směřují k povrchu do molekulární vrstvy, kde se větví na dvě raménka ve tvaru písmene T. Dále se zde vyskytují větší zrnkovité buňky, které mají krátké dendrity a neurity větvcí se už v zrnité vrstvě. Také jsou v zrnité vrstvě neurogliové buňky (především astrocyty s krátkými výběžky) (Vacek, 1995a).

Ve dřeni (bílé hmotě) mozečku se nacházejí nervová vlákna s myelinovou pochvou a neuroglie. Vyskytují se zde neurity Purkyňových buněk a nervová vlákna z jiných částí šedých hmot. Do těchto vláken se řadí mechová a šplhavá vlákna (Klika et al., 1986; Vacek, 1995a).

Funkce mozečku je koordinace činnosti kosterního svalstva a udržování rovnováhy těla (Klika et al., 1986; Vacek, 1995a).

1.3.1.3 Mícha

Mícha je tvořena sloupcem šedé hmoty, který je obalen bílou hmotou. Uprostřed šedé hmoty je centrální míšní kanálek (Vacek, 1995a). Sloupec šedé hmoty má na průřezu motýlovitý tvar, na něm lze vidět přední a zadní míšní rohy (Lüllmann-Rauch, 2012).

Podle průřezů míchy lze rozeznat, o jakou část míchy jde (krční, hrudní, bederní a křížová), a to díky rozdílnému poměru šedé a bílé hmoty v těchto částech (Vacek, 1995a).

V šedé hmotě se nacházejí různě velké multipolární nervové buňky, nervová vlákna s tenkou myelinovou pochvou, neuroglie a sítě krevních vlásečnic (Vacek, 1995a).

1.3.1.4 Mozkomíšní obaly

Mozek a míchu obklopují vazivové blány (pleny, meningy). Tyto pleny se nazývají dura mater (tvrdá plena), arachnoidea (pavučnice) a pia mater (měkká plena). Tvrdá plena tvořící zevní obal se skládá z hustého kolagenního vaziva s elastickými vlákny, cévami a nervy (Vacek, 1995a; Krivánková, Hradová, 2009). Pavučnice je tvořena z jemné sítě kolagenních a retikulárních vláken (Klika et al., 1986). Měkká plena se skládá ze snopců kolagenních vláken a z vazivových buněk, obsahuje velké množství krevních cév a nervů (Vacek, 1995a).

1.3.2 Periferní nervový systém

1.3.2.1 Periferní nervy

Periferní nervy jsou svazky nervových vláken, které jsou obaleny pochvami (Vacek, 1995a). Umožňují komunikaci mezi CNS, orgány a receptory (Vajner, 2012).

1.3.2.2 Nervová ganglia

Nervová ganglia obsahují nervové buňky, vlákna, neurogliové buňky a vaziva (Vacek, 1995a).

1.3.2.3 Obvodová (periferní) nervová zakončení

- Zakončení hybná (motorická) – rozvětvení na koncích motorických neuritů v efektoech (výkonných orgánech), jako je například sval.
- Zakončení citlivá (senzitivní) – zachycují podněty z vnitřního nebo vnějšího prostředí (Vacek, 1995a).

1.4 Alzheimerova choroba

1.4.1 Alois Alzheimer

Alois Alzheimer se narodil se 14. června 1864 notáři Eduardovi Alzheimerovi a Theresii v Marktbreitu. Střední školu ukončil maturitou roku 1883 v Aschaffenburgu. Při svém studiu na univerzitách v Berlíně, Tübingenu a Würzburgu napsal dilmovou práci „Über die Ohrschmalzdrüsen“ (O ceruminálních žlázách). V této diplomové práci se objevovaly histologické obrázky (Koukolík, Jirák, 1998).

Oženil se v dubnu 1894 s Nathalií Geisenheimerovou, rozenou Wallersteinovou a měl s ní 3 děti (Koukolík, Jirák, 1998).

Roku 1906 Alzheimer referoval na 37. schůzi jihoněmeckých psychiatrů v Tübingenu o jedenapadesátileté paní, která trpěla známkami demence (Koukolík, Jirák, 1998). *Přednáška se jmenovala „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“ (O svérázném onemocnění mozkové kůry). Případ byl publikován v roce 1907. Tato publikace je základním kamenem pojmu Alzheimerovy nemoci (Koukolík, Jirák, 1998, s. 11).*

Od 16. července 1912 byl Alzheimer ředitelem Psychiatrické a neurologické kliniky Slezské univerzity Friedricha Viléma v Breslau (Koukolík, Jirák, 1998).

Alzheimer zemřel 19. prosince 1915 na ledvinové selhání (Koukolík, Jirák, 1998).

1.4.2 Popis onemocnění

Alzheimerova choroba je nejčastější příčina demence ve stáří. Představuje až 60 % všech demencí (Pidrman, 2007). Nemoc se objevuje již ve věku kolem 60 let (Mačák, Mačáková, 2004). Samostatně se vyskytuje v 50 % všech demencí, další podíl je v kombinaci s jinými příčinami. Často se vyskytuje tzv. smíšená (alzheimerovsko-vaskulární) forma demence. U této formy se na rozvoji demence podílí nejen Alzheimerova choroba, ale i cévní změny na mozku. Dále existuje forma demence, při které se překrývá Alzheimerova choroba a demence s Lewyho tělísky (někdy se této formě říká Lewy body varianta Alzheimerovy choroby). Také dochází k překrývání Alzheimerovy choroby s Parkinsonovou chorobou (Jirák et al., 2009).

Alzheimerova choroba je závažné neurodegenerativní onemocnění, které vede k úbytku některých neuronů (nervových buněk) a v důsledku toho dochází k mozkové atrofii (úbytku tkáně) (Jirák et al., 2009). Alzheimerova choroba postihuje šedou kůru mozkovou (Pidrman, 2007).

U pacientů s Alzheimerovou chorobou se v mozkové tkáni ukládá beta-amyloid (chorobně vzniklá bílkovina) do prostor mimo nervové buňky a dochází k poškození neuronů (Jirák et al., 2009; Vránová, 2013). Beta-amyloid se začíná ukládat 10-20 let před objevením prvních příznaků v jedné z nejdůležitějších funkčních sítí mozku (Hansson, 2017). Beta-amyloid tvoří krystalky (drúzy). Kolem drúz dochází k dalším

neurodegenerativním dějům. Vznikají tak neuritické plaky. Tyto plaky způsobují funkční postižení mozku. Toto postižení závisí na množství plaků (čím více je plaků v určité oblasti, tím více je tato oblast mozku postižena). Beta-amyloid vzniká z amyloidového prekurzorového proteinu. Tento protein je za normálních okolností v mozkových buňkách, je tělu vlastní a nezbytný. Je štěpen enzymem alfa-sekretázou na krátké rozpustné fragmenty, které mají svůj zatím ne zcela jasný fyziologický význam (zřejmě se podílejí na plasticitě nervových buněk a chrání je před poškozením). Za patologických podmínek je amyloidový prekurzorový protein štěpen enzymy beta- a gama-sekretázami, které vytvářejí delší fragmenty než za normálních okolností. Tyto delší fragmenty nejsou rozpustné, neplní fyziologické úkoly, sráží se a spojují se navzájem v dlouhé řetězce (polymerují) – tak vzniká beta-amyloid (Jiráček et al., 2009).

Přímo v neuronech dochází k degeneraci tau-proteinu. Takto změněný tau-protein vytváří vlákna tvaru dvoušroubovice a díky nim vznikají útvary, které se nazývají neurofibrilární klubka. Neurony s těmito klubky neplní svou funkci a zanikají (Jiráček et al., 2009).

Při této nemoci bývají porušeny i funkce neurotransmiterů (látek, které přenášejí nervové vzruchy mezi nervovými buňkami). Jako první bývá porušen acetylcholinergní systém, který za normálních stavů slouží k přenášení vzruchů, jež jsou důležité pro paměť, další poznávací funkce a nervosvalový přenos. Dále bývá poškozen například systém excitačních aminokyselin. Toto poškození způsobuje neschopnost se naučit nové věci a zapamatovat si nové informace (Jiráček et al., 2009).

1.4.3 Genetické faktory

V desetinách procenta až několika procentech se Alzheimerova choroba vyskytuje dědičně. Tvorba a ukládání beta-amyloidu je způsobena genetickými mutacemi na chromozomu 21, 14 a 1. Dalšími genetickými faktory mohou být různé genetické polymorfizmy, tzn. že geneticky zakódovaná bílkovina se může vyskytovat v několika málo odlišných formách. Takovou látkou je například apolipoprotein E epsilon 4, která se u nemocných vyskytuje častěji než u zdravých jedinců, ale není úplně nezbytná ke vzniku této nemoci (Jiráček et al., 2009). Většina případů této choroby však nemá genetické podmínění (Kalvach, 2004).

1.4.4 Klinický obraz onemocnění

Demence se rozvíjí pomalu. Ze začátku jsou lehce postiženy poznávací funkce. Mezi první příznaky se řadí poruchy krátkodobé paměti, poruchy všípivosti paměti a epizodické paměti. Jak se demence rozvíjí, tak poměrně brzo dochází k poruchám orientace v prostoru. Nejdříve nemocní bloudí v místech, které jsou dál od jejich bydliště a které nenavštěvovali moc často. Později bloudí i v místech, které znají a jsou v blízkosti jejich bydliště. V těžkých fázích choroby bloudí i ve svém bytě. Pacientům se také stává, že se špatně orientují v čase, například jdou nakoupit v noci. U nemocných se postupně snižuje až zaniká logické uvažování a soudnost. V těžkých stádiích choroby si nemocní nic nového nezapamatují, jsou kompletně dezorientováni (tento stav se nazývá amnestická dezorientace). Během vývoje Alzheimerovy choroby nemocní zapomínají jména i tváře, pojmou, snižuje se slovní zásoba (Jiráček et al., 2009).

Ve Spojených státech amerických byla provedena studie, která zkoumala, jak Alzheimerova choroba ovlivňuje čtení nahlas. Bylo porovnááno čtení 12 španělsko-anglicky mluvících pacientů s Alzheimerovou chorobou s 19 zdravými lidmi. Úkolem bylo čtení v angličtině, čtení ve španělštině, čtení většiny v angličtině se zakomponováním 6 španělských slov a čtení většiny ve španělštině se zakomponováním 6 anglických slov. Během čtení došlo k chybám v záměně jazyků (např. místo „the“ pacienti přečetli „la“) a k chybám v daném jazyce (např. místo „the“ pacienti přečetli „their“). Pacienti dělali více chyb a méně se opravovali než zdraví jedinci, především při čtení částí v nedominantním jazyku, které byly zakomponovány do dominantního jazyka. Pacienti dělali chyby i ve čtení v jednom jazyku více než zdraví jedinci, ale nezáleželo, zda četli anglicky nebo španělsky (Gollan et al., 2017).

Alzheimerova choroba má 3 stádia:

- Lehká demence – pacient trpí poruchami paměti, kdy si nemocný tyto poruchy uvědomuje a tyto poruchy jsou měřitelné testovacími metodami. Nemocný si nedokáže zapamatovat nové informace. Může se vyskytnout dezorientace v prostoru, především v místech, které jsou dále od bydliště nemocného a v místech, které nemocný nenavštěvuje často. U pacienta se mohou vyskytnout i změny nálady až deprese, a to v důsledku uvědomování si ztracení paměti (Jiráček et al., 2009).

- Střední demence – při této formě Alzheimerovy nemoci dochází k výrazným poruchám paměti, vyskytuje se často dezorientace v prostoru i čase (Jirák et al., 2009).
- Těžká demence – dochází k velmi těžkým poruchám paměti. Pacient si nezapamatuje žádné nové informace, je velmi dezorientován v prostoru i čase, často nepoznává ani své příbuzné a známé (Jirák et al., 2009).

Při Alzheimerově chorobě dochází ke smrti pacienta přibližně po 7 až 10 letech od výskytu prvních příznaků. Doba přežití může být i kratší, ale i delší. Předpokládá se, že s vývojem nových léčebných postupů se bude doba přežití prodlužovat (Jirák et al., 2009).

1.4.5 Druhy Alzheimerovy choroby

1.4.5.1 Raný výskyt Alzheimerovy choroby (presenilní)

Alzheimerova choroba se objevuje u lidí již před pětadesátým rokem života (Pfeiffer, 2007). Je to vzácný druh (asi 5 % ze všech nemocných), obvykle je to dědičná forma tohoto onemocnění. Progrese nemoci je při tomto typu rychlejší než u druhého typu (Kosik, Bowman, 2016).

1.4.5.2 Pozdní výskyt Alzheimerovy choroby (senilní)

Tato forma Alzheimerovy choroby se objevuje u lidí po pětadesátém roku života (Pfeiffer, 2007). Tvoří zbylých 95 % ze všech nemocných. Genetika může zvyšovat riziko rozvoje této nemoci, ale rozvoj tohoto druhu se dá ovlivnit životním stylem (Kosik, Bowman, 2016).

1.4.5.3 Velmi pozdní forma Alzheimerovy choroby

Tato forma se objevuje až po 85. roku věku nemocného (Preiss, Příkrylová Kučerová, 2006).

1.4.6 Makroskopické změny u Alzheimerovy choroby

Při Alzheimerově chorobě bývá mozek atrofický, tato atrofie postihuje hlavně frontální, temporální a parietální lalok (Mačák, Mačáková, 2004).

Při Alzheimerově chorobě se snižuje hmotnost i velikost mozku, tloušťka mozkové kůry a rozšiřují se mozkové komory jako při stárnutí. Tyto změny jsou výraznější u presenilních onemocnění, u nichž může hmotnost mozku klesnout o 200 až 300 g (až na hmotnost 900 g i méně). Makroskopický nález na mozku je při pozdní formě Alzheimerovy choroby často nenápadný, atrofie může být překryta otokem. Při Alzheimerově chorobě se lehce zužují závitky a mírně se rozšiřují rýhy mezi závitky (hlavně v temenní a spánkové kůře). U vyvinuté demence frontálního typu se vyskytují atrofie zvláště perfrontální oblasti (Koukolík, Jiráček, 1998).

Při hodnocení nálezů výpočetní tomografie a magnetické rezonance je nutné vzít v úvahu, že makroskopický nález mozku u stejně starých lidí s Alzheimerovou chorobou a „klinicky normálně stárnoucích“ je ve 40 % shodný (Koukolík, Jiráček, 1998).

1.4.7 Mikroskopické změny u Alzheimerovy choroby

1.4.7.1 Neurony

V cytoplazmě neuronů se vyskytují neurofibrily, které mohou (ale nemusí) klubičkovitě obtáčet jádra. V cytoplazmě některých neuronů se nacházejí granulovakuolární (Hiraniho) tělíčka, což jsou vakuoly velké 3–5 μm a obsahují jemně granulovaný útvar (Mačák, Mačáková, 2004).

Při Alzheimerově chorobě dochází ke zmenšování neuronů (Koukolík, Jiráček, 1998).

Snížení počtu neuronů při Alzheimerově chorobě je výraznější než u klinického stárnutí (například ve spánkové kůře je to až od 40–78 %). Velmi výrazný pokles počtu neuronů je v entoriální kůře. Zde neurony mizí úměrně s poškozením kognitivních funkcí. Neurony ubývají již v raných stádiích Alzheimerovy choroby (Koukolík, Jiráček, 1998).

Dále dochází ke změnám dendritických systémů včetně synapsí a tyto změny odpovídají míře poškození kognitivních funkcí. Počet synapsí se postupně snižuje, ale jejich poškození není rovnoměrné. Liší se v různých místech mozkové kůry, například čelní kůra je postižena více než týlní (Koukolík, Jiráček, 1998).

Mechanismus zániku neuronů není zcela jasný. Je možné, že se na něm podílejí odchylky činnosti určitých genů a jejich bílkovinných produktů, které spouštějí programovanou buněčnou smrt (apoptózu), tvorbu neuronálních klubek a oxidativní stres (Koukolík, Jiráček, 1998).

1.4.7.2 Senilní plaky (drúzy)

Jsou to kulovité útvary vzniklé dystrofickou změnou neuritických výběžků, jejich velikost se pohybuje v rozmezí 10–200 μm . V jejich centru se vyskytuje beta-amyloid (Koukolík, Jirák, 1998).

Jejich nález v mozkové tkáni není specifický pro Alzheimerovu chorobu, ale vyskytuje se i u starších osob. Významný je nález plaků v neokortexu (Mačák, Mačáková, 2004).

8 druhů senilních plaků a patogeneticky blízkých struktur (podle přítomnosti neuritů a amyloidu):

- Klasické neuritické plaky – obsahují amyloidové jádro s neurity, ve kterých jsou párová spirální vlákna.
- „Vyhořelé“ (burn out) plaky (jaderné plaky – core) - jsou tvořené hrudkami amyloidu.
- Plaky, které se vyskytují u klinického stárnutí, obsahují amyloidové jádro a dystrofické neurity. Párová spirální vlákna zde chybí.
- Difuzní plaky = preamyloidový vývojový stupeň plak – neobsahují neurity.
- Difuzní plaky v molekulární vrstvě – v nich se nacházejí dystrofické neurony, které obsahují ubikvintin.
- Volné neurity – jsou dystrofické a obsahují ubikvintin.
- Volné neurity – jsou dystrofické a s obsahují párová spirální vlákna.
- Neuropilová vlákna – jsou neurity, které obsahují párová spirální vlákna, nacházejí se v prostorech mimo plaky a jsou typické pro Alzheimerovu chorobu (Koukolík, Jirák, 1998).

1.4.7.3 Neuronální klubka

Neuronální klubka objevil Alzheimer. Jsou to vlastně změny neurofibril. Při barvení metodou „Impregnace solemi stříbra“ mají vzhled chumáče hrubších vláken (tenisové rakety), který prostupuje cytoplazmou neuronu (Koukolík, Jirák, 1998).

Dále se mikroskopicky může hodnotit například amyloidový β -protein, který se při Alzheimerově chorobě ukládá do jader senilních drúz a do stěn tepének. Potom například apolipoprotein E, glie, zánětlivé mechanismy atd. (Koukolík, Jirák, 1998).

1.4.8 Příznaky Alzheimerovy choroby

Příznaky se vyvíjejí pomalu, postupně a plíživě. Ze začátku se těžko rozeznává, zda má jedinec Alzheimerovu chorobu nebo jen klinicky (normálně) stárne (Koukolík, Jirák, 1998).

Jako první příznak se objevuje porucha recentní epizodické paměti, kdy pacient zapomíná každodenní události (např. „Co jsem měl k snídani?“). V prvních stádiích onemocnění bývá krátkodobá paměť zachována. Dalším vývojem Alzheimerovy choroby dochází k poruchám slovní paměti. V mírném stádiu choroby se vyskytuje porucha vybavování nově uložených informací a schopnost si pod tlakem vybavit a říct nějaké slovo. Jazyk bývá uchován, řeč je plynulá, ale obsahově prázdná. Postupně nemocní jedinci začínají bloudit i v místech, které velmi dobře znali. Časem nedokáží plánovat i jednoduché činnosti. Ve 40 % případů se objevují deprese, halucinace a agresivita. Tyto poruchy mohou zapříčinit terapeutické obtíže, protože nemocní si myslí, že jsou zdraví a léčit se nechtějí (Koukolík, Jirák, 1998). Pacienti, kteří si svou diagnózu uvědomují, jsou méně spokojeni s každodenním životem, základním fungováním a fyzickou pohodou než pacienti, kteří o své diagnóze neví. Pacienti, kteří čekají, že se jejich stav bude zhoršovat, mívají větší deprese, stres, nižší kvalitu každodenního života a jiné kognitivní potíže (Stites et al., 2017).

Při přechodu z mírné formy do těžší formy Alzheimerovy choroby se často objevují deprese (které často nepřetrvávají) a poruchy spánku (Koukolík, Jirák, 1998).

V pozdních stádiích nemoci pacienti ztrácejí schopnost komunikovat s okolím, udržovat oční kontakt, nepoznávají své blízké, neudrží se vsedě, trpí inkontinencí a přestávají mluvit. Někteří pacienti při této nemoci hubnou (Koukolík, Jirák, 1998).

Na tuto chorobu umírají muži dříve než ženy (Koukolík, Jirák, 1998).

1.4.9 Terapie

Alzheimerova choroba se nedá vyléčit, lze jen vhodnou léčbou zpomalit její průběh a rozvoj a zlepšit kvalitu života nemocných (Jirák et al., 2009).

1.4.9.1 Biologická léčba

- Kognitivní farmakoterapie

Při lehkých a středních formách Alzheimerovy choroby se k léčbě využívají inhibitory acetylcholinesteráz. Acetylcholinesterázy jsou enzymy, které odbourávají acetylcholin (neurotransmitter), kterého je při Alzheimerově chorobě nedostatek. Díky těmto inhibitorům dochází ke zvýšení množství acetylcholinu v mozku a tím se zlepšuje paměť (acetylcholin má pozitivní účinek na paměť). V České republice se často používají především 3 inhibitory acetylcholinesteráz – donepezil, rivastigmin a galantamin (Jirák et al., 2009).

Při těžších formách choroby se využívá látka nazývaná memantin. Tento lék chrání nervovou buňku před některými škodlivinami a zlepšuje schopnost učení (Jirák et al., 2009).

Při terapii lehké a střední formy Alzheimerovy nemoci nelze říct, který z výše popsaných léků je nejlepší. Lék se vybírá podle způsobu aplikace, která pacientovi vyhovuje, dále podle snášenlivosti těchto léků u pacienta a podle nákladů (Dreher, 2017).

Stále se hledají nové možnosti léčby a léky. Například ve Spojených státech amerických vyvinuli skupinu rozpustných modulátorů gama-sekretáz. Jeden z objevených modulátorů, tzv. SGSM-36, snižuje hladiny beta-amyloidu. Testy byly zatím provedeny jen na myších a buněčných modelech. Tento lék vypadá vhodně pro další klinický vývoj (Ogan, 2017).

Jako další, spíše doplňkové, léky se využívají látky, které ničí nadbytečné množství kyslíkových radikálů. Nadbytečné množství radikálů se váže na nervové buňky a poškozuje je. Mezi látky likvidující kyslíkové radikály patří například betakaroten, vitamín C a E, retinol, selen atd. (Jirák et al., 2009).

Dále se používají nootropní farmaka, která zlepšují mozkovou látkovou přeměnu, využití glukózy a jiných živin a působí proti nedostatku kyslíku. Mezi tyto látky patří například piracetam, pyritinol, atd. (Jirák et al., 2009). Využívá se i extrakt z Ginkgo biloby (Jinanu dvojlaločnatého) (Raboch, Pavlovský, 2012).

- Nekognitivní farmakoterapie

Tato terapie slouží ke zlepšení stavů, jako je porucha chování, změna nálady a porucha spánku. Používají se antipsychotika II. generace (nemají téměř žádné vedlejší účinky), antidepressiva (léky proti depresím) a léky proti úzkosti (anxiolytika) (Jirák et al., 2009).

1.4.9.2 Nebiologická léčba

Je důležité dělat s pacienty běžné každodenní aktivity, udržovat je v kontaktu s lidmi, lze také použít např. muzikoterapie. Nemocní by měli mít dobře čitelné a přehledné kalendáře a označení místností. S pacienty se má trénovat jejich paměť a je také možné využít kanisterapii, kdy se pacienti starají o psa a tím si také procvičují mozek. Dále se musí procvičovat somatické funkce (Koukolík, Jirák, 1998).

V České republice jsou tzv. Alzheimer centra (například v Českých Budějovicích, Jihlavě atd.), kde jsou pacienti ubytovaní a ošetřovatelé se o ně starají a oddalují tím zhoršování nemoci (Alzheimercentrum, © 2017).

1.4.10 Prevence

- Zdravější životní styl – kouření, vysoký krevní tlak, vysoký cholesterol, cukrovka a obezita ničí cévy a zvyšují riziko vzniku demence.
- Fyzická aktivita
- Zdravý jídelníček
- Cvičení mozku – když se učíme novým věcem, tak vznikají nové mozkové buňky a posilují se nervová spojení.
- Společenské aktivity – díky těmto aktivitám dochází ke stimulaci mozkových rezerv a snižují tím riziko vzniku demence a depresí (Česká alzheimerovská společnost, o.p.s., © 2015).

1.4.11 Česká alzheimerovská společnost

Společnost byla založena v roce 1997 na základě pocitu profesionálů i rodin nemocných, že se u nás demencím dostatečně nevěnuje. Díky této společnosti jsou od roku 2002 pojišťovnou hrazená kognitiva (léky na zlepšení vnímání, učení a paměti) (Jirák et al., 2009).

Pracovníci České alzheimerovské společnosti poskytují (osobně i telefonicky) základní informace týkající se demencí, sjednávají osobní schůzky a konzultace (Jiráček et al., 2009).

Společnost také vydává různé letáky a brožury, kterými informuje veřejnost o této problematice (Jiráček et al., 2009).

Internetová stránka společnosti, www.alzheimer.cz, poskytuje základní informace o činnosti České alzheimerovské společnosti a o problematice demencí (Jiráček et al., 2009).

1.4.12 Mýty o Alzheimerově chorobě

- POKUD BUDU ŽÍT DOSTATEČNĚ DLOUHO, DOSTANU ALZHEIMEROVU CHOROBU.

Existuje mnoho lidí, které Alzheimer vůbec nepostihuje. U mnoho lidí, kteří umřeli ve věku kolem 100 let a byli pitváni, bylo zjištěno, že měli počet buněk jako u zdravého člověka a během života nikdy netrpěli ztrátami paměti ani změnou osobnosti (Kosik, Bowman, 2016).

- JESTLIŽE SE V NAŠÍ RODINĚ OBJEVILA ALZHEIMEROVA CHOROBA, NAKONEC JI DOSTANU, AŽ PROTI TOMU DĚLÁM COKOLIV.

Zděděné geny ovlivňují rozvoj této nemoci, ale není vždy jisté, že když určitý gen neseme, onemocníme. Po 65 roce života stoupá riziko vzniku tohoto onemocnění každých 5 let dvakrát, to znamená, že po 85 roce života je riziko vzniku této nemoci až 50% (Kosik, Bowman, 2016).

Jedinec, který nese 1 gen *ApoE4* (apolipoprotein E 4) má 50% riziko vzniku Alzheimerovy choroby už ve věku 75 let. Když má jedinec tyto geny 2, pak je 50% riziko již ve věku 65 let. To ale nemusí být vždy pravda. Člověk může kromě genu *ApoE4* nést ještě i jiné geny, které riziko nemoci snižují. Také lze gen *ApoE4* potlačit správnou životosprávou, fyzickou aktivitou i intelektuálně obohacujícími činnostmi (Kosik, Bowman, 2016).

Můžou se ale vyskytnout i geny, které nelze potlačit ničím, např. gen *PSEN1* – presenilin 1. Když člověk nese právě tento gen, může Alzheimerovou chorobou trpět již

ve 45 letech. Možnost zdědění toho genu je 50%. Alzheimerova choroba se rozvine již v brzkém věku a její rozvoj už nelze nijak ovlivnit (Kosik, Bowman, 2016).

- NEPOTŘEBUJU SE STRACHOVAT ALZHEIMEROVY CHOROBY, PROTOŽE JI NIKDO V NAŠÍ RODINĚ NEMÁ.

U každého člověka je jisté riziko vzniku Alzheimerovy choroby. Většina pacientů, kteří touto nemocí onemocněli, nemá v genetických testech žádné Alzheimerovské geny. Existují i další faktory, které zvyšují riziko vzniku této choroby. Těmi faktory je více prodělaných otřesů mozku, vysoký krevní tlak, jiné zdravotní problémy a nesprávný životní styl (Kosik, Bowman, 2016). Dalším rizikovým faktorem je obezita způsobená vysokým obsahem tuků (Sah et al., 2017).

1.5 Jiné demence

1.5.1 Vaskulární (multiinfarktová) demence

Při této demenci dochází k ztvrdnutí, zablokování a prosakování cév. Takové cévy nejsou schopny zásobovat postižené části mozku krví a kvůli tomu odumírají mozkové buňky. Tuto demenci většinou způsobují malé mozkové mrtvice, o kterých nemocný vůbec neví. Může ji ale způsobit i jedna velká mozková mrtvice, když zastihne oblasti důležité pro paměť (Kosik, Bowman, 2016).

Symptomy:

- Zmatenost
- Problém s udržení pozornosti
- Obtíže nebo neschopnost plánování a rozhodování
- Neklid
- Nervozita
- Deprese
- Ztráta paměti (Kosik, Bowman, 2016)

1.5.2 Demence s Lewyho tělísky

Tato demence je neurodegenerativní onemocnění na hranici Parkinsonovy choroby a Alzheimerovy nemoci. Je pojmenovaná po MUDr. Friedrichovi Heinrichu Lewym. Lewy byl německý neurolog a internista (Jiráček et al., 2009).

Lewyho tělíska jsou kulovitá tělíska v neuronech, jsou to vlastně mikroskopické, abnormální shluky bílkoviny, která je v celé mozkové kůře a kvůli ní mozkové buňky degenerují (Kosik, 2016).

Tato demence se vyskytuje velmi často, až v 10–20 % všech demencí. Začíná nejčastěji v 75–80 letech. U pacientů dochází často k záměně této demence s Alzheimerovou chorobou, proto nebývá za života často diagnostikována (jen ve 4 %). Většinou se zjistí, že pacient trpěl demencí s Lewyho tělísky, až při pitvě (Jirák et al., 2009).

Symptomy:

- Problémy s chůzí a rovnováhou
- Halucinace
- Závratě
- Poruchy spánku
- Další poruchy nervového systému (Kosik, Bowman, 2016)

1.5.3 Parkinsonova choroba

Toto neurodegenerativní onemocnění postihuje většinou mozkový kmen. V pozdějších stádiích a při vzniku onemocnění ve vyšším věku jsou poškozeny i jiné části mozku. Parkinsonova choroba je někdy těžko odlišitelná od demence s Lewyho tělísky, někdy dochází ke kombinaci Parkinsonovy choroby s Alzheimerovou chorobou a (nebo) s vaskulárním onemocněním mozku. Tato choroba obvykle vypukne kolem 58-60 let. Vyskytuje se asi v 0,2 % populace (Jirák et al., 2009).

Symptomy:

- Třes
- Svalová ztuhlost
- Snížení až neschopnost hybnosti
- Poruchy rovnováhy a chůze
- Lehké poruchy kognitivních funkcí
- Porucha plánování a provádění složitějších aktivit
- Deprese, úzkost, záchvaty paniky
- Monotónní řeč
- Sehnuté schoulené držení těla a končetin

- Poruchy spánku
- Závratě
- Zácpa
- Sexuální dysfunkce
- Zvýšená únavnost
- Ztráta čichu, mimiky
- Mastná kůže
- Potíže s polykáním (Jirák et al., 2009)

1.5.4 Frontotemporální lobární demence

Vyskytuje se v 10 % všech demencí. Objevuje se kolem 45–65 lety. Nemoc trvá od 2 do 20 let, v průměru 8 let (Jirák et al., 2009). Postihuje čelní a spánkové mozkové laloky. Způsobuje změnu osobnosti, chování a poruchy řeči (Kosik, Bowmna, 2016). Vývoj této demence je postupný, nenápadný, plíživý, příznaky se postupně zhoršují, jak se zmenšují oblasti mozku (Jirák et al., 2009). Pacienti se stávají impulzivní. Často se nevhodně a nutkavě chovají a nemají dostatek empatie k ostatním lidem. Projevuje se ničím nebrzděná aktivita, například začínají malovat (Kosik, Bowman, 2016).

2 Cíle a hypotézy

Cílem mé bakalářské práce bylo seznámit se s onemocněním Alzheimerova choroba, popsat tuto nemoc, její příčiny, průběh a léčbu, dále popsat zpracování mozku v histologické laboratoři – příjem materiálu a metody vyšetření, vyzkoušet si metodu Impregnace nervových vláken podle Palmgrena a Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla – na zmrazených řezech, a nakonec vyhodnotit zhotovené preparáty a porovnat mozek nemocného a zdravého člověka.

Hypotéza č. 1:

Domnívám se, že i v parafinových bločkách, které byly vyhotoveny v roce 2013 a 2016 a u kterých byla Alzheimerova choroba prokázána, zhotovím dostatečně kvalitní preparáty na to, abych obarvila a objevila struktury, které jsou typické pro Alzheimerovu chorobu (senilní drúzy, Alzheimerovy změny fibril).

Hypotéza č. 2:

Domnívám se, že v preparátech zdravého mozku neobjevím žádné struktury, které jsou typické pro Alzheimerovu chorobu (senilní drúzy, Alzheimerovy změny fibril).

Hypotéza č. 3:

Domnívám se, že v preparátech z bločků mozku při Alzheimerově chorobě obarvených metodou Impregnace nervových vláken podle Palmgrena, která je typická pro průkaz změn fibril, objevím i senilní drúzy.

3 Metodika

3.1 Informace o pracovišti

Výzkumná část bakalářské práce byla vykonána na Oddělení patologie v Nemocnici Jindřichův Hradec a.s., U Nemocnice 380/III, Jindřichův Hradec 37738 pod vedením vedoucí laborantky Pavlína Chyškové a prim. MUDr. Dany Cempírkové.

Oddělení patologie provádí bioptická, cytologická, imunofluorescenční a imunohistochemická vyšetření pro všechna lůžková oddělení nemocnice a pro ordinace soukromých lékařů, kteří o tato vyšetření mají zájem. Pitvy a následná nekroptická vyšetření provádí laboratoř pouze pro nemocnici (Chyšková, 2017).

Oddělení patologie v Jindřichově Hradci je akreditováno k uskutečňování vzdělávacího programu pro obor specializačního vzdělávání PATOLOGIE (Chyšková, 2017, s. 5).

Oddělení je držitelem Osvědčení o registraci a je evidováno v Registru klinických laboratoř Národního autorizačního střediska pro klinické laboratoře při České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně a je zapojeno do programu zvyšování kvality ve zdravotnictví garantovaném MZ ČR (Chyšková, 2017, s. 6).

Dne 21. 7. 2011 obdrželo oddělení patologie Osvědčení o splnění podmínek Auditu I pro registrované odbornosti 807_823 – Laboratoř patologie, dne 10. 7. 2012 splnilo oddělení patologie i podmínky Auditu II pro registrované odbornosti 807_823 – Laboratoř patologie. Dne 10. 7. 2014 úspěšně absolvovala laboratoř i Dozorový audit A, tím byla prodloužena platnost Auditu II. V lednu 2016 požádala laboratoř o provedení Dozorového auditu B (Chyšková, 2017, s. 6).

Od roku 2014 je laboratoř zapojena do programu externího hodnocení kvality, který zajišťuje společnost SEKK (Chyšková, 2017, s. 6).

3.2 Výzkumný materiál

K vyšetření jsem měla k dispozici 1 parafínový bloček hipokampu od paní zemřelé v roce 2013, která trpěla Alzheimerovou chorobou, dále 2 parafínové bločky mozkové kůry frontálního laloku a hotové preparáty mozkové kůry frontálního laloku obarveného metodou Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla od pána zemřelého v roce 2016, který trpěl Alzheimerovou chorobou, 1 bloček a 1 vzorek mozkové kůry frontálního

laloku a 1 bloček hipokampu od osoby zemřelé v roce 2018, která Alzheimerovou chorobou netrpěla. Výzkumný materiál mi poskytlo Oddělení patologie Jindřichův Hradec.

3.3 Odběr materiálu pro histologické vyšetření

Materiál se získává buď ze živého pacienta během operace (tzv. biopsie) nebo ze zemřelého pacienta při pitvě (tzv. nekropsie) (Vacek, 1995b).

Mezi biopsie patří například:

- Probatorní excize – vyříznutí vzorku
- Probatorní punkce – nasátí malého množství tkáně stříkačkou s dutou jehlou
- Kyretáž – seškrábnutí části tkáně pomocí kyrety (speciální lžice, klička) (Vacek, 1995b; Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, © 2018).

Odebraný materiál musí být okamžitě fixován (viz kapitola Fixace – dále) a musí být správně označen, jak na nádobě, tak i na průvodním listu. Průvodní list by měl obsahovat odesílatele, jméno a příjmení pacienta, rodné číslo (číslo pojištěnce, datum narození), adresu trvalého bydliště pacienta (u hospitalizovaných pacientů i umístění pacienta), číslo zdravotní pojišťovny, klinickou diagnózu, dobu trvání nemoci či potíží, informace o dosavadní léčbě, místo odběru vzorku, druh fixační tekutiny, údaje o době mezi odběrem a fixací vzorku, předchozí histologická vyšetření, datum odběru (popř. čas), razítko odesílajícího oddělení, jméno a podpis lékaře. Na nádobě s materiálem musí být uvedeno jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, původ materiálu a zasílající oddělení (Vacek, 1995b; Chyšková, 2017).

Při odběru reprezentativního vzorku je důležité zabránit mechanickému zhmoždění tkáně. K poškození vzorku dochází také působením vysoké teploty, vysycháním a oplachováním vodou. Materiál ve fixační tekutině se nemá ukládat do lednice, protože nízkou teplotou se doba fixace prodlužuje. Nejlépe se vzorek tkáně fixuje při laboratorní teplotě (cca 24 hodin). Je nutné k vyšetření zasílat veškerý odebraný materiál (Chyšková, 2017).

Speciálním typem biopsie je peroperační biopsie, která se provádí během operace kvůli rychlému určení diagnózy při operaci ze zmrazených řezů. Materiál je do laboratoře zasílán bez fixační tekutiny. Vzorek se zpracovává na kryostatu. Vždy se ale musí

materiál vyšetřit i klasickým způsobem (z parafínových bločků). Toto vyšetření musí být hlášeno telefonicky předem. Označení průvodního listu a odběrové nádoby je stejné jako u klasické biopsie, pouze musí být navíc uvedeno telefonní číslo, na které se z laboratoře hlásí výsledek vyšetření (Chyšková, 2017).

Mozek se při pitvě odebírá celý, vloží se do nádoby s fixační tekutinou (formolem) a nechá se fixovat několik dní.

3.4 Příjem materiálu v laboratoři

Příjem histologického materiálu probíhá na Oddělení patologie v Jindřichově Hradci od 7:00 do 15:00. Laborant, který materiál přijímá, musí zkontrolovat údaje na žádance a na odběrové nádobě. Pokud se nalezne větší neshoda (např. špatné označení materiálu), materiál je nutné odeslat zpět odesílateli k opravě. Menší neshody lze vyřídit telefonicky (Chyšková, 2017).

3.4.1 Příjem těl zemřelých

Oddělení patologie v Jindřichově Hradci přijímá pouze těla osob, které zemřely na některém z oddělení Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s. (Chyšková, 2017).

Tělo zemřelého musí být řádně označeno identifikačními údaji (tj. jménem, příjmením, datem narození, datem a časem úmrtí, oddělení, místo úmrtí) a to na dvou různých místech – na dolní končetině (náplast s údaji nebo přímo na kůži nesmazatelným fixem) a na paži (identifikační náramek s údaji přímo z oddělení nebo přímo na kůži nesmazatelným fixem). Těla zemřelých novorozenců musí být opatřena nálepkou s identifikačními údaji. Zavedené katétry a drény se pouze odstříhnou a fixují leukoplastí, nesmí se odstraňovat. Pokud je tělo znečištěné a nedošlo k násilné smrti, musí se očistit (Chyšková, 2017).

Těla přijímá sanitář. Dvě hodiny od smrti zůstává tělo na oddělení a poté je sanitářem dopraveno na patologii. Při převozu zemřelých osob na oddělení patologie je důležité správně vyplnit podle elektronických vzorů z nemocničního informačního systému Průvodní list k pitvě zemřelého a List o prohlídce zemřelého (Chyšková, 2017).

Materiál ze zemřelých osob se získává při pitvě.

3.5 Fixace materiálu

Fixace slouží ke znemožnění samovolného rozkladu tkání (autolýze) tím, že fixační prostředky rychle vysráží (denaturují) bílkoviny protoplazmy buněk a tkání. Fixační prostředky musí zachovat co nejlépe stav buněk a tkání, barvitelnost tkáně a musí rychle pronikat do tkání (Vacek, 1995b; Lüllmann-Rauch, 2012).

3.5.1 Fyzikální fixační prostředky

Tato fixace se v histologii příliš nevyužívá. Mezi tyto fixační prostředky patří například fixace varem. Při této fixaci se malé kousky tkáně vaří ve 40% formolu 1 až 2 minuty. Tato fixace není dokonalá a dochází v ní k poškození struktury tkáně (Vacek, 1995b).

Dalším typem fyzikální fixace je vysušení za nízké teploty. Při této fixaci se malé kousky tkáně zmrazí a současně vysuší ve vakuu při teplotě -60°C (Vacek, 1995b).

3.5.2 Chemické fixační prostředky

Tato fixace se využívá v histologii nejčastěji, protože se poměrně snadno připravuje a provádí. Používají se roztoky jedné nebo více chemických sloučenin, tzv. fixační tekutina. Při fixaci je důležité, aby vyříznutý kousek tkáně nebyl příliš velký. Pokud se odebírá celý orgán, musí se alespoň zajistit dostatečné množství fixační tekutiny a vložit do dostatečně velké nádoby, aby se orgán nestlačil. Tkáň musí být do fixační tekutiny vložena co nejdříve po odběru. Fixační tekutiny musí být 20x až 50x více, než je objem tkáně (Vacek, 1995b).

Nejčastější fixační tekutinou je formol, který se do laboratoře dodává jako 40% vodný roztok. K fixaci se používá 10% formol, a proto je nutné dodávaný formol před použitím naředit. Je poměrně levný a jeho příprava k fixaci je rychlá a jednoduchá. Formol je bezbarvá kapalina dráždivého zápachu, která při styku s kůží způsobuje ztvrdnutí pokožky a může způsobit i ekzém, proto je nutné používat při manipulaci s formolem rukavice (Vacek, 1995b; Brychtová, Hlobilková, 2008; Lüllmann-Rauch, 2012).

Doba fixace formolem je 24 až 48 hodin, ale může se v něm tkáň nechat i delší dobu, aniž by došlo k přefixování. Mozek se ve formolu fixuje několik dní a poté se před přikrojením vypere v tekoucí vodě (Bancroft, 1975; Vacek, 1995b).

3.6 Příkrojení, zabalení

Mozek po fixaci a vyprání doktor přikrojí na lamely cca 1 cm velké a vybere reprezentativní vzorky, které se pak dále zpracovávají. Tyto vzorky se vloží do krabičky, která se popíše příslušným číslem vzorku. Do krabičky se také dá lísteček s číslem vzorku. Toto dvojí označení slouží ke kontrole správnosti. Pokud by došlo ke smytí čísla vzorku na krabičce, je v krabičce ještě lísteček. Krabička se zavře víčkem a vloží se ještě do formolu do té doby, než se vzorky vloží do tkáňového procesoru, což se provádí před koncem směny.

3.7 Zalévání do parafínu

Zalévání do parafínu se využívá k prosycení odvodněné tkáně rozehřátým parafínem při teplotě 56 až 58°C. Parafínem se vyplní i mikroskopické štěrby ve tkáni a umožní tak krájení tkáně na tenké řezy (cca 5 μm). Tato metoda se využívá nejčastěji, protože je snadná, rychlá a parafín je snadno dostupný (Vacek, 1995b).

3.7.1 Odvodnění

Provádí se stoupající řadou alkoholů (etanolů). Nejprve se vzorky vkládají do 70% alkoholu, poté do 80% alkoholu, 96% alkoholu a nakonec do absolutního alkoholu, ve kterých se nechávají většinou po dobu 1 hodiny (Vacek, 1995b).

3.7.2 Prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín

Po odvodnění je potřeba etanol ve vzorku nahradit látkou rozpustnou v parafínu (např. xylenem) (Lüllmann-Rauch, 2012).

3.7.3 Prosycení tkáně parafínem

Po prosycení xylenem se vzorek přenesse do tekutého parafínu (Vacek, 1995b).

Tyto 3 kroky zalévání se v této době provádí v tkáňovém procesoru (autotechnikonu), který je provede automaticky podle zvoleného programu.

Na oddělení patologie v Jindřichově Hradci se používá RVG/1 - Vakuový tkáňový procesor pro Histologii.

3.7.4 Vlastní zalití

K zalití do parafinu se na Oddělení patologie v Jindřichově Hradci používá zalévací linka. Do kovové krabičky se vloží vzorek tkáně, zalije se horkým tekutým parafinem, přikryje se plastovou krabičkou, která je popsána číslem vzorku, a ještě se zalije parafinem. Takto zalité vzorky se položí na chladicí desku. Po ztuhnutí a vychladnutí se plastová krabička s parafinem a vzorkem vyloupne z kovové krabičky a tím vzniká parafinový bloček, který se následně krájí.

3.8 Krájení preparátu a napínání na podložní sklo

Pro krájení preparátů se využívá přístroj nazývaný mikrotom (Orel, Procházka, 2017). Pro barvení hematoxylinem-eosinem a impregnaci podle Palmgrena jsem využívala mikrotom sáňkový a pro Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunnühla jsem využívala mikrotom zmrazovací (kryostat).

3.8.1 Mikrotom sáňkový

Parafinové bloky se na oddělení patologie v Jindřichově Hradci krájí na mikrotomu sáňkovém.

Nůž je upevněn na sáních, které se pohybují po kluzké ploše litinového podstavce, svorkou. Tato svorka umožňuje měnit sklon nože ke směru řezu a sklon nože k rovině řezu. Nosič s neapolskou svorkou je nasazen na mikrometrickém šroubu a slouží k upevnění bločku. Mikrometrický šroub má na dolním konci hlavici se stupnicí a páčkou k otáčení mikrošroubem. Hlavici se nastavuje mikrošroub na určitý počet mikrometrů, o který se mikrošroub pootočí pohybem páčky a nosič s bločkem se posouvá nahoru. Nůž je veden v rovině proti bločku a po každém řezu se mikrošroubem posouvá do výšky o nastavený počet mikrometrů proti bločku. Neapolskou svorkou lze pohybovat po svislé ose pomocí šroubu pro hrubý posun a lze jí také pohybovat ve dvou směrech k sobě kolmých, čímž lze správně nastavit bloček vzhledem k noži (Vacek, 1995b).

Po ukrojení se řezy napnou na podložní sklo natřené kamencovou želatinou. Toto napínání se provádí tak, že se na hladinu teplé destilované vody s želatinou pokladou nakrájené řezy a pomocí preparační jehly se připevní k podložnímu sklu. Natažené preparáty se poté uhladí navlhčeným savým papírem a vloží se na 45 minut do termostatu. Poté se barví (Vacek, 1995b; Orel, Procházka, 2017).

3.8.2 Mikrotom zmrazovací (kryostat)

Ve zmrazovacím mikrotomu lze krájet tkáň nefixovaná i fixovaná, ale nezalitá. Ve zmrazovacím mikrotomu se tkáň zmrazí a poté se krájí (Orel, Procházka, 2017). Kryostat je složen z upraveného rotačního mikrotomu, který je v boxu s nízkou teplotou (0°C až -30°C), která je udržována chladicím kompresorem. U nože je destička, která zabraňuje sbalování řezů. Chladí se i bloček i nůž. Krájení se ovládá pákou z venku, kterou se otáčí. Kryostat má nahoře skleněné okno, které slouží k pozorování krájení (Vacek, 1995b). Nakrájené řezy se obtisknou na podložní sklíčko, poté se barví (Ross, Pawlina, 2006).

3.9 Barvení

Standardní barvení zdůrazňuje nejdůležitější struktury a umožňuje tak jejich odlišení. Používají se bazická (kationtová) a kyselá (aniontová) barviva. Bazická barviva se vážou na aniontové složky a kyselá barviva se vážou na kationtové složky. Bazická barviva se využívají především k barvení jader a kyselá barviva především k barvení cytoplazmy (Lüllmann-Rauch, 2012).

3.9.1 Hematoxylin-eosin

Barvení hematoxylin–eosinem patří mezi základní barvení v histologii.

3.9.1.1 Princip metody

Hematoxylin (zásadité barvivo) barví jádra, eosin (kyselé barvivo) barví cytoplasmu. V laboratoři na oddělení patologie v Jindřichově Hradci se používá pro barvení většiny preparátů Weigertův železitý hematoxylin, ve kterém je jako oxidační činidlo chlorid železitý s kyselinou chlorovodíkovou. Přebytké barvivo se z řezů odstraňuje diferenciací (Chyšková, Simonidesová, 2012).

3.9.1.2 Roztoky a jejich příprava

- Weigertův železitý hematoxylin
 - Hematoxylin I – 10 g hematoxylinu rozpustit v 1000 ml 96% alkoholu
 - Hematoxylin II – 15 g chloridu železitého rozpustit v 1000 ml destilované vody a po rozpuštění přidat 10 ml kyseliny

chlorovodíkové o specifické váze 0,125 (25 ml destilované vody + 12 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové)

- Barvicí roztok hematoxylinu – hematoxylin I a II se smíchá v poměru 1:1
- Eosin 0,5% - 0,5 g eosinu rozpustit v trošce vody a doplnit do 100 ml 96% alkoholem
- Aceton – xylen – aceton a xylen dodaný v originálním balení smíchat v poměru 1:1
- Karbol – xylen – krystalický fenol umístit do termostatu (při zahřátí na 56 °C zkapalní). Zkapalněný fenol smíchat se xylenem v poměru 1:7 (1 díl fenolu, 7 dílů xylenu).
- Destilovaná voda, vodovodní voda
- 96%, 80%, 70% alkohol
- Xylen
- Kyselý alkohol (Chyšková, Simonidesová, 2012)

3.9.1.3 Pomůcky

Při tomto barvení se využívá barvicí řada (plastové kyvety), gáza na otírání preparátů, stojan na preparáty a stopky. K montování preparátů se využívají krycí sklíčka, gáza na otírání a montovací médium.

3.9.1.4 Postup barvení

K barvení se používá tkáň fixovaná formolem a zalitá do parafínu. Na oddělení patologie v Jindřichově Hradci se využívá barvicí řada (obr. 4 a obr. 5).



Obr. 4: Odparafinovací řada. (Zdroj: Kristýna Havelková)



Obr. 5: Barvicí, odvodňovací a projasňovací řada. (Zdroj: Kristýna Havelková)

1. Odparafinování

- a. Vložit do xylenu na 5 minut.
- b. Vložit do dalšího xylenu na 5 minut.
- c. Opláchnout v 96% alkoholu 3x (vždy oplachovat ve 3 96% alkoholech).
- d. Opláchnout v 80% alkoholu.

- e. Opláchnout v 70% alkoholu.
2. Opláchnout v destilované vodě.
3. Vložit do Weigertova železitého hematoxylinu na 5 minut.
4. Opláchnout 3x vodovodní vodou.
5. Krátce diferencovat 2,5% kyselým alkoholem.
6. Prát ve vodovodní vodě do zmodrání (5 až 10 minut).
7. Otrít okolí preparátu a přebytečné řezy.
8. Vložit do eosinu na 1 minutu.
9. 4x opláchnout v 96% alkoholu.
10. Odvodnění a projasnění
 - a. 2x opláchnout v aceton – xylenu, do třetího aceton – xylenu vložit na 2 minuty.
 - b. Vložit do karbol – xylenu na 2 minuty.
 - c. 2x opláchnout v xylenu, ve třetím xylenu preparáty ponechat do zamontování.
11. Zamontovat preparáty pod krycí sklo do montovacího média (Chyšková, Simonidesová, 2012).

3.9.1.5 Výsledek barvení

Jádra a chrupavka se zbarví modře, kolagenní vazivo růžově a svalstvo červeně (Chyšková, Simonidesová, 2012).

3.9.2 Impregnace nervových vláken v parafinových řezech podle Palmgrena

3.9.2.1 Princip metody:

Tkáň se impregnuje roztoky solí stříbra. Znázornění struktury nervových vláken je způsobeno redukcí na kovové stříbro pomocí redukčních činidel (Chyšková, Simonidesová, 2012).

3.9.2.2 *Roztoky a jejich příprava*

- Roztok A
 - Redestilovaná voda
- Roztok B
 - 1% HNO₃ (kyselina dusičná) – 1,5 g HNO₃ rozpustit ve 100 ml redestilované vody.
- Roztok C
 - Roztok glycínu – 1 g glycínu smíchat s 20 ml redestilované vody.
- Roztok D
 - Smíchat 25 ml 40% formolu s 75 ml redestilované vody a přidat 6 kapek roztoku B.
- Roztok E = impregnační roztok
 - Smíchat 15 g AgNO₃ (dusičnanu stříbrného) s 10 g KNO₃ (dusičnanu draselného) a se 100 ml redestilované vody. Přidat 1 ml roztoku C.
- Roztok F = redukční lázeň
 - Smíchat 2 g pyrogalolu s 90 ml redestilované vody. Přidat 110 ml absolutního alkoholu a 0,4 ml roztoku B.
- Roztok G = tónovací lázeň
 - Smíchat 0,5 g chloridu zlatitého se 100 ml redestilované vody a přidat 3 kapky kyseliny octové ledové.
- Roztok H = zesilovací lázeň
 - Smíchat 100 ml 50% alkoholu se 2 kapkami anilinového oleje.
- Roztok I = fixační lázeň
 - 5% sirmatan sodný – smíchat 5 g Na₂S₂O₃ (thiosíranu sodného) se 100 ml redestilované vody.
- Xylen
- 96%, 80%, 70% alkohol
- Aceton-xylen
- Karbol-xylen
- Vodovodní voda (Chyšková, Simonidesová, 2012)

3.9.2.3 Pomůcky

Při tomto barvení se využívá odparafinovací řada (jako při barvení Hematoxylin-eosinem). Dále se používají kádinky, odměrné válce, teploměr, skleněné kyvety, vaříč, váhy, termostat, pipeta, Pasteurovy pipety, gáza na otírání preparátů, stojan na preparáty a stopky. Na odvodnění a projasnění se využívá barvicí řada jako při barvení Hematoxylinem-eosinem (preparáty se ale nevkládají do eosinu a alkoholů, vkládají se až do aceton-xylynu). K montování preparátu se používají krycí sklíčka, gáza na otření a montovací médium (kanadský balzám).

3.9.2.4 Postup barvení

Při tomto barvení je velmi důležité používat dokonale čisté laboratorní sklo i chemikálie. Voda se používá redestilovaná (Chyšková, Simonidesová, 2012).

1. Odparafinování
 - a. Vložit do xylynu na 5 minut.
 - b. Vložit do dalšího xylynu na 5 minut.
 - c. Opláchnout v 96% alkoholu 3x (vždy oplachovat ve 3 96% alkoholech).
 - d. Opláchnout v 80% alkoholu.
 - e. Opláchnout v 70% alkoholu.
2. Vložit preparáty do roztoku D na 5 minut.
3. Prát v 3x měněné redestilované vodě, vždy 5 minut.
4. Předehřát impregnační roztok E na teplotu 43°C. Do takto předehřátého roztoku vložit vyprané preparáty a vložit je i s preparáty do termostatu na 15 minut.
5. Předehřát roztok F na teplotu 43°C. Vyjmout preparáty z roztoku E a nechat je volně ze sklíčka ztéci. Preparáty vložit do předehřátého roztoku F na 1 minutu.
6. Opláchnout preparáty v 50% alkoholu.
7. Prát preparáty v 3x měněné redestilované vodě, pečlivě otřít skla a okolí preparátu.
8. Pokud je to třeba, může se opakovat celá procedura od bodu 2. Druhá impregnace se provádí kratší dobu.
9. Tónovat preparáty v roztoku G tak dlouho, až je světlehnědý tón zbarvení stejnoměrně zeslaben (během několika minut).
10. Přenést preparáty do roztoku H asi na 15 sekund – sklem pohybovat.
11. Prát v tekoucí vodě asi 30 sekund.

12. Pokud je to potřeba, může se tónování zopakovat (bod 9).
13. Fixovat preparáty v roztoku I 3 sekundy – sklem pohybovat.
14. Prát preparáty v tekoucí vodě asi 30 sekund.
15. Odvodnění a projasnění
 - a. Vložit preparáty do 96% alkoholu na 2 minuty.
 - b. Vložit preparáty 3x do aceton-xylenu, vždy na 2 minuty.
 - c. Vložit preparáty do karbol-xylenu na 2 minuty.
 - d. Vložit preparáty 3x do xylenu, vždy na 2 minuty.
16. Zamontovat preparáty pod krycí sklo do kanadského balzámu. (Chyšková, Simonidesová, 2012)

3.9.2.5 Výsledek barvení

Nervová vlákna a neurofibrily se barví černě až černohnědě, ostatní tkáň se barví růžově šedě až fialově šedě (Chyšková, Simonidesová, 2012).

3.9.3 Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla – na zmrazených řezech

Při tomto barvení se tkáň nezalévá do parafínu. Po přikrojení se vzorky pořádně vyperou a osuší a poté se krájí na zmrazovacím mikrotomu a poté se barví.

3.9.3.1 Princip metody

Metoda slouží ke znázornění vláknění drúz, znázornění gangliových buněk (s výběžky a intracelulárními fibrilami) a makroglie (Chyšková, Simonidesová, 2012).

3.9.3.2 Roztoky a jejich příprava

- Roztok A = impregnační roztok
 - 20% vodný roztok dusičnanu stříbrného
- Roztok B = čpavková voda
 - Smíchat 80 ml destilované vody s 16 kapkami čpavku (amoniaku).
- Roztok C = redukční roztok
 - Smíchat 20 ml neutrálního formaldehydu 40% s 80 ml vodovodní vody.
- Roztok D = tónovací lázeň
 - Smíchat 100 ml destilované vody s 20 kapkami 1% vodného roztoku chloridu zlatitého (světlého).

- Roztok E = ustalovací lázeň
 - 5% roztok sirnatanu sodného ve 40% alkoholu
- Destilovaná a vodovodní voda
- 96% alkohol
- Aceton-xylen
- Karbol-xylen
- Xylen (Chyšková, Simonidesová, 2012)

3.9.3.3 Pomůcky

Při tomto barvení se používají skleněné kyvety, pipeta, Pasteurovy pipety, kádinky a vaříč. K montování preparátu se používají krycí sklíčka, gáza na otření a montovací médium (kanadský balzám).

3.9.3.4 Postup barvení

Při tomto barvení je velice důležitý bod 4, protože příliš dlouhé praní v roztoku B neprospívá impregnaci a zeslabuje výsledek (Chyšková, Simonidesová, 2012).

Pokud se chce potlačit impregnace gangliových buněk a jejich výběžků a zdůraznit senilní drúzy, použije se pro impregnaci místo 20% vodného roztoku dusičnanu stříbrného pouze 2% vodní roztok. Potom se gangliové buňky impregnují jako stíny, jemné výběžky gangliových buněk se neimpregnují a tím kontrastněji vystoupí plst'ovitá síť drúz (Chyšková, Simonidesová, 2012).

1. Zmrazené řezy 10 až 20 μm silné vložit do 40% alkoholu.
2. Řez přenést do destilované vody, kde se dokonale bez záhybu vypne. Takto vypnutý řez natáhnout na podložní sklíčko se zaschlou kamencovou želatinou a nechat zaschnout. Preparát přenést do nové destilované vody na 5 minut.
3. Předehřát roztok A na teplotu 50 až 60°C a impregnovat v něm vyprané preparáty 30 minut.
4. Přenést preparáty, které dostanou hnědou barvu, do roztoku B na 5 až 10 sekund, kde se barva změní na žlutou.
5. Poté preparáty protáhnout destilovanou vodou a redukovat v roztoku C 1 až 3 sekundy. U příliš starého preparátu oplach vodou vynechat.
6. Přenést preparáty rychle zpět do roztoku B na 10 až 20 sekund a poté redukovat roztokem C 5 minut (bez oplachu vodou).

7. Preparáty vyprat v destilované vodě asi 10 minut a zlatit v roztoku D tak dlouho, než se hnědošedá barva řezů změní na šedofialovou (asi 10 minut).
8. Vyprat preparáty v destilované vodě.
9. Vložit preparáty do roztoku E na 5 minut pro ustálení impregnace.
10. Dobře vyprat preparáty v destilované vodě.
11. Odvodnění a projasnění
 - a. 4x opláchnout v 96% alkoholu.
 - b. 2x opláchnout v aceton – xylenu, do třetího aceton – xylenu vložit na 2 minuty.
 - c. Vložit do karbol – xylenu na 2 minuty.
 - d. 2x opláchnout v xylenu, ve třetím xylenu preparáty ponechat do zamontování.
12. Zamontovat preparáty pod krycí sklo do kanadského balzámu (Chyšková, Simonidesová, 2012).

3.9.3.5 Výsledek barvení

Vláknění drúz se barví černě, znázorněny jsou i gangliové buňky s výběžky a intracelulárními fibrilami a makroglie. Pozadí je téměř bezbarvé (Chyšková, Simonidesová, 2012).

3.10 Mikroskopování

3.10.1 Světelný mikroskop

Je to přístroj, který umožňuje zvětšení pozorovaných předmětů (Rosina, 2013). *Rozlišovací schopnost nejlepších světelných mikroskopů je zhruba 0,2 μm* (Orel, Procházka, 2017, s. 76). Rozlišovací schopnost je nejmenší vzdálenost 2 bodů, které lze rozlišit (Schindler, 2014). Zvětšení mikroskopu je součin úhlového zvětšení okuláru a příčného zvětšení objektivu (Vacek, 1995b).

3.10.1.1 Mechanická část

Tuto část mikroskopu tvoří stativ (kovový stojan), k němuž je připojen stolek mikroskopu a nosič tubusu (na něm je tubus). U dolního konce tubusu je revolverový měnič objektivů, v horním konci je okulár. Při zaostřování se pohybuje tubus nahoru nebo dolů s pastorkem po ozubené tyči pro hrubé zaostření nebo mikrometrickým šroubem

pro jemné zaostření. Pod revolverovým měničem je pohyblivě připojen další kotouč s otvory pro našroubování objektivů. Větší mikroskopy mají křížový stolek, na který se dávají preparáty. Na tomto stolku lze posouvat preparát ve dvou směrech (Vacek, 1995b).

3.10.1.2 Osvětlovací zařízení

Osvětlovací zařízení tvoří zdroj světla (mikroskopická lampa se žárovkou, ve starších mikroskopech zrcátko), kolektor (soustřeďuje paprsky světla) a kondenzor (patří také k optické části mikroskopu) (Rosina, 2013; Vacek, 1995b).

3.10.1.3 Optická část

Optickou část tvoří kondenzor, objektivy a okuláry. To jsou soustavy čoček, jejichž kombinací se odstraňují hlavní optické vady – vadu sférickou (kulovou) a vadu chromatickou (barevnou) (Vacek, 1995b). Sférická vada je způsobena tím, že rovnoběžný svazek paprsků se nesoustředí do jednoho bodu. Lze ji odstranit kombinací vypouklé a vyduté čočky. Chromatická vada je způsobena průchodem bílého světla čočkou, které se rozkládá. Láme se do ohnisek na jednotlivé základní barvy. Červení paprsky se lámou nejméně (ohnisko je dále od čočky), nejvíce se láme světlo fialové (ohnisko je blízko u čočky). Lze ji odstranit kombinací spojných čoček a rozptylek (Beneš, 2015; Vacek 1995b).

Objektivy vytvářejí skutečný, převrácený a zvětšený obraz předmětu. Využívají se suché a imerzní objektivy (Vacek, 1995b).

Dnes se často využívají mikroskopy binokulární, díky nimž můžeme preparát pozorovat oběma očima. Tento mikroskop tedy má 2 okuláry (Vacek, 1995b).

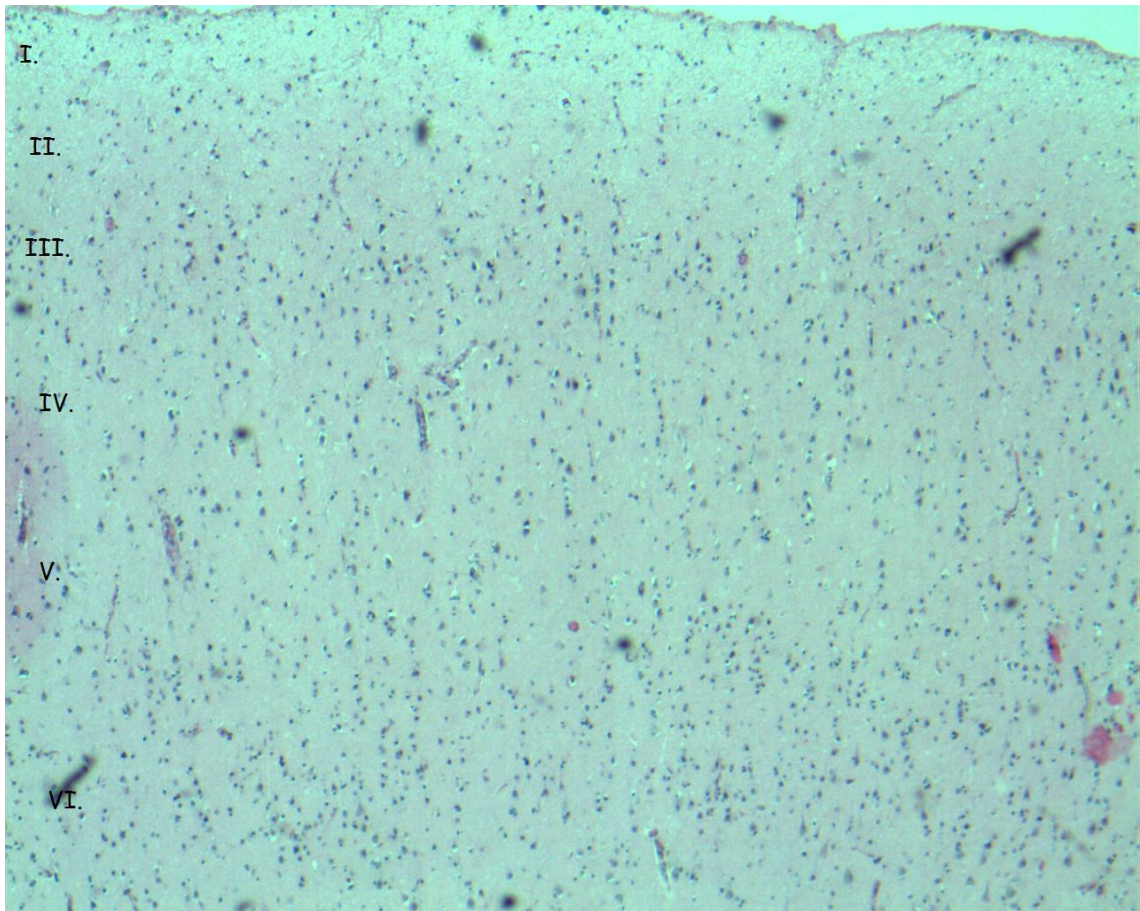
3.10.2 Postup mikroskopování

- Nejprve se pomocí šroubů vycentruje osvětlení.
- Poté se na stolek mikroskopu položí preparát a uchyť se svorkami.
- Dále se provede hrubé zaostření – hledí se přitom ze strany na preparát, který se posune do polohy, kdy se objektiv téměř dotkne krycího sklíčka.
- Poté se provede zaostření makrošroubem tak, aby se našel obraz a jemným zaostřením mikrošroubem se obraz doostří.
- Nejprve se pozoruje nejslabším objektivem, pak silnějším a nakonec nejsilnějším.

- Po ukončení činnosti se objektiv nejprve zdvihne do nejvyšší polohy a poté se preparát odstraní.

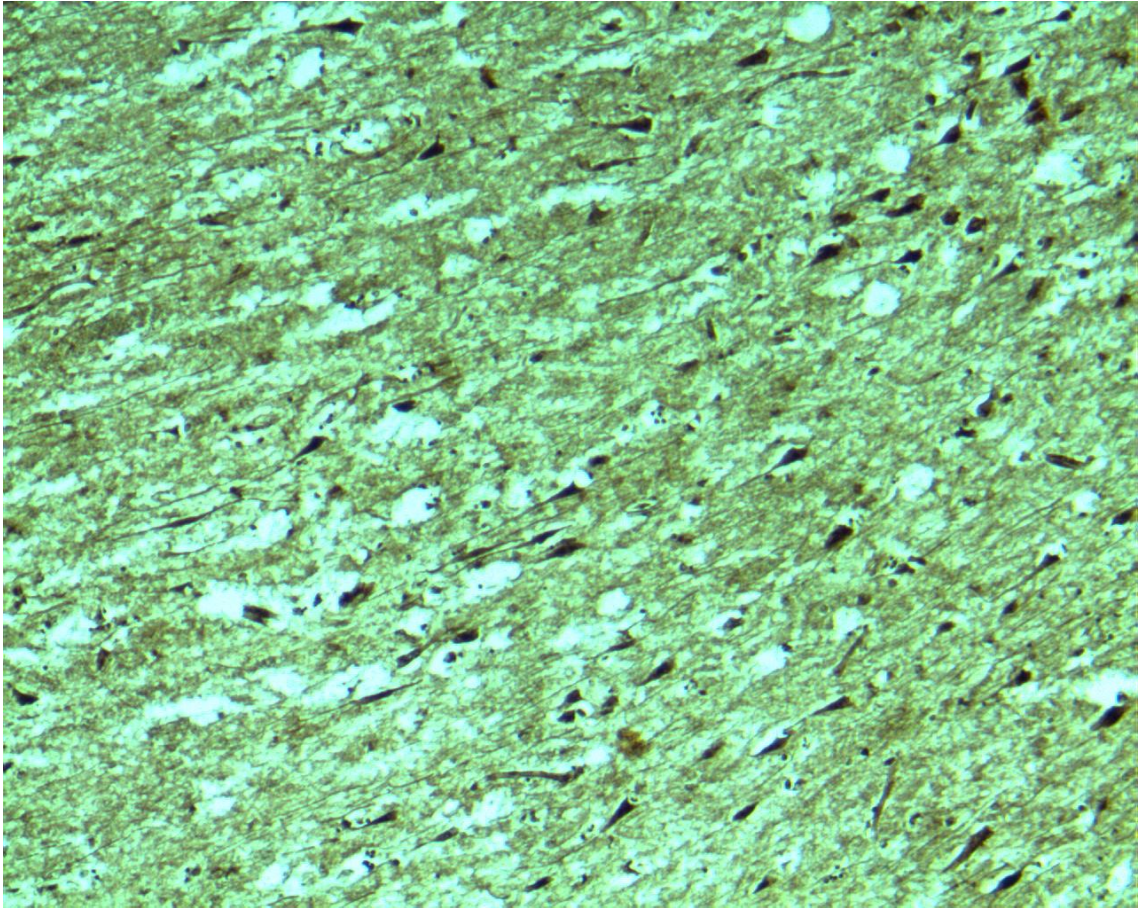
Po skončení mikroskopování se musí mikroskop chránit před prachem a musí se očistit (Vacek, 1995b).

4 Výsledky



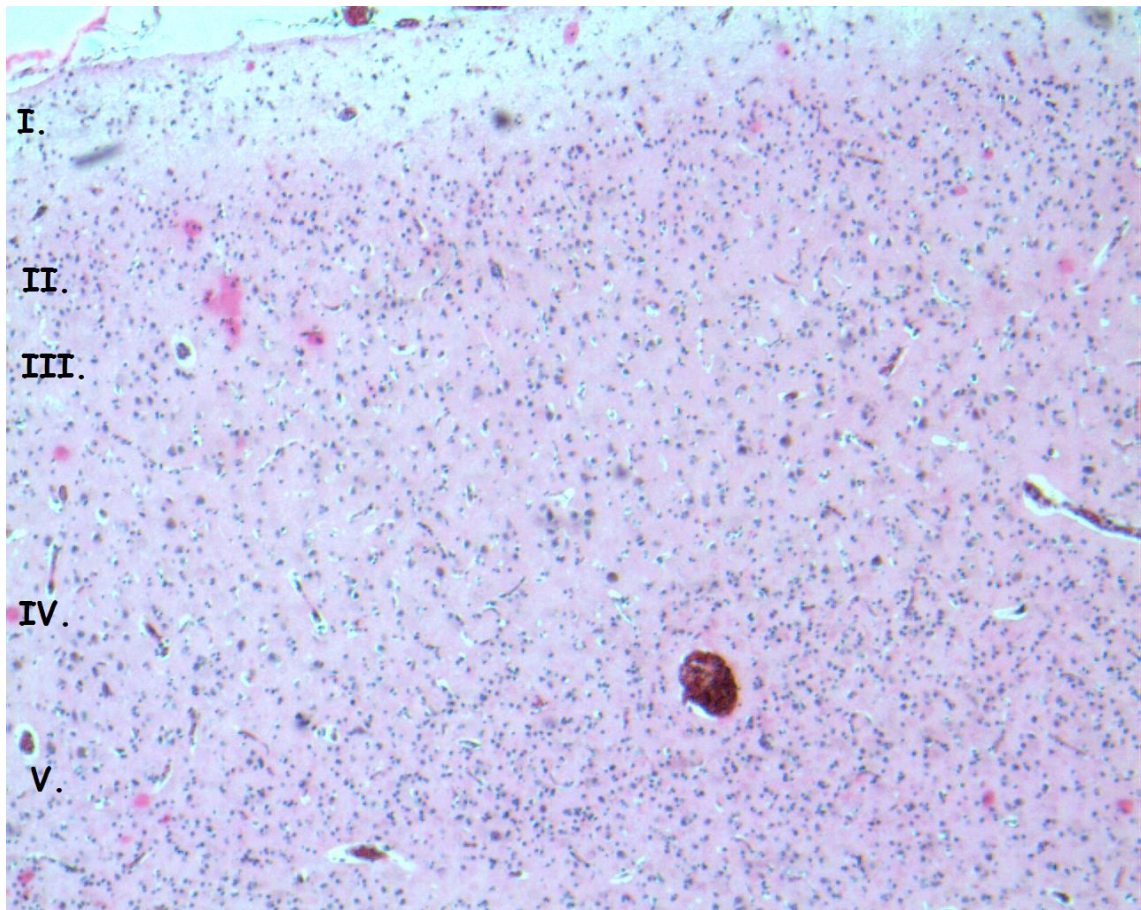
Obr. 6: Mozková kůra frontálního laloku zdravého mozku obarvená Hematoxylinem-eosinem (zvětšení: 5x). (Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 6) je zachycena mozková kůra frontálního laloku zdravého mozku obarvená Hematoxylin-eosinem a zvětšená 5x. Je zde vidět všech 6 vrstev kůry – I. vrstva molekulární, II. zevní vrstva jádrová, III. zevní vrstva pyramidová, IV. vnitřní vrstva jádrová, V. vnitřní vrstva pyramidová a VI. vrstva multiformní. Všechny buňky jsou normální, beze změn.



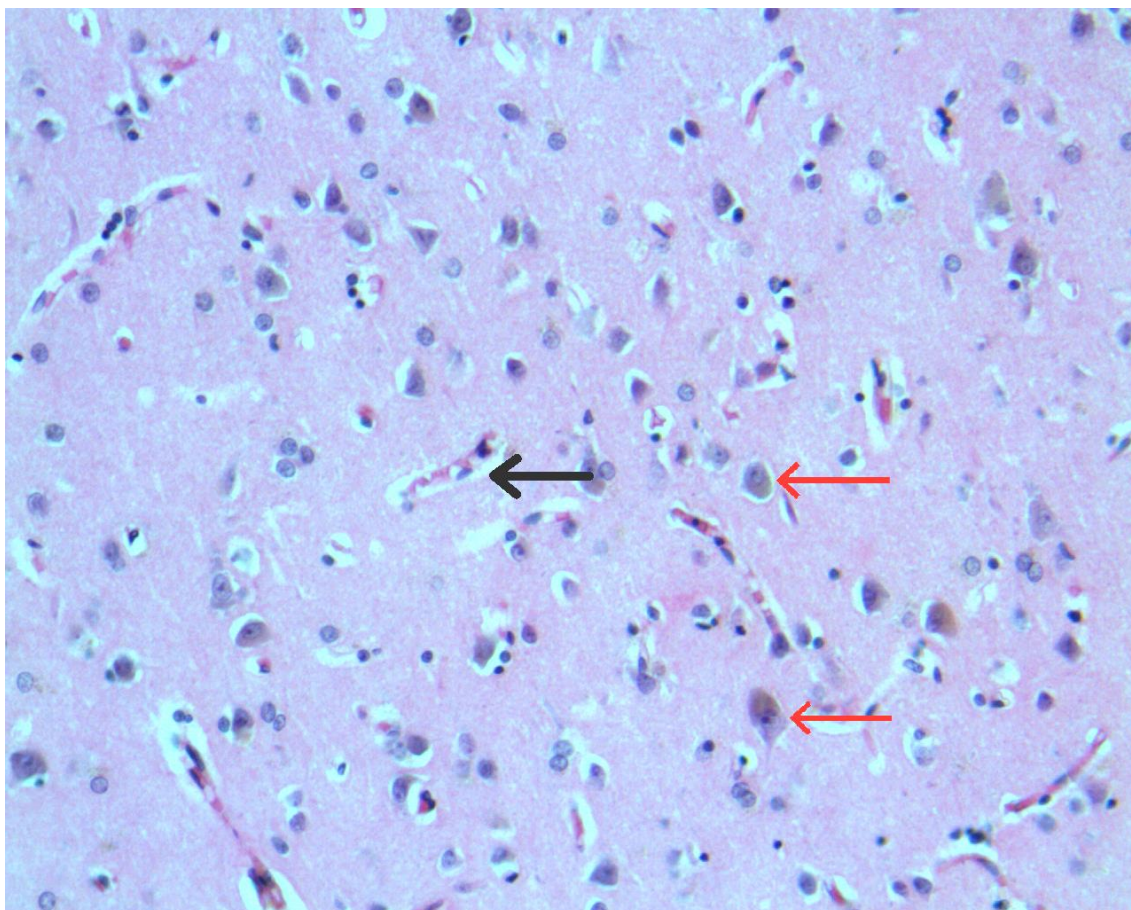
Obr. 7: Mozková kůra frontálního laloku zdravého mozku obarvená metodou Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla – na zmrazených řezech (zvětšení: 10x). (Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 7) je zachycena mozková kůra frontálního laloku zdravého mozku obarvená metodou Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla – na zmrazených řezech a zvětšená 10x. Jsou zde vidět nervové buňky, které jsou normální, beze změn. Neuropil (část šedé hmoty mozkové, která vyplňuje prostory mezi perikaryi a cévami) je bez přítomnosti senilních drúz.



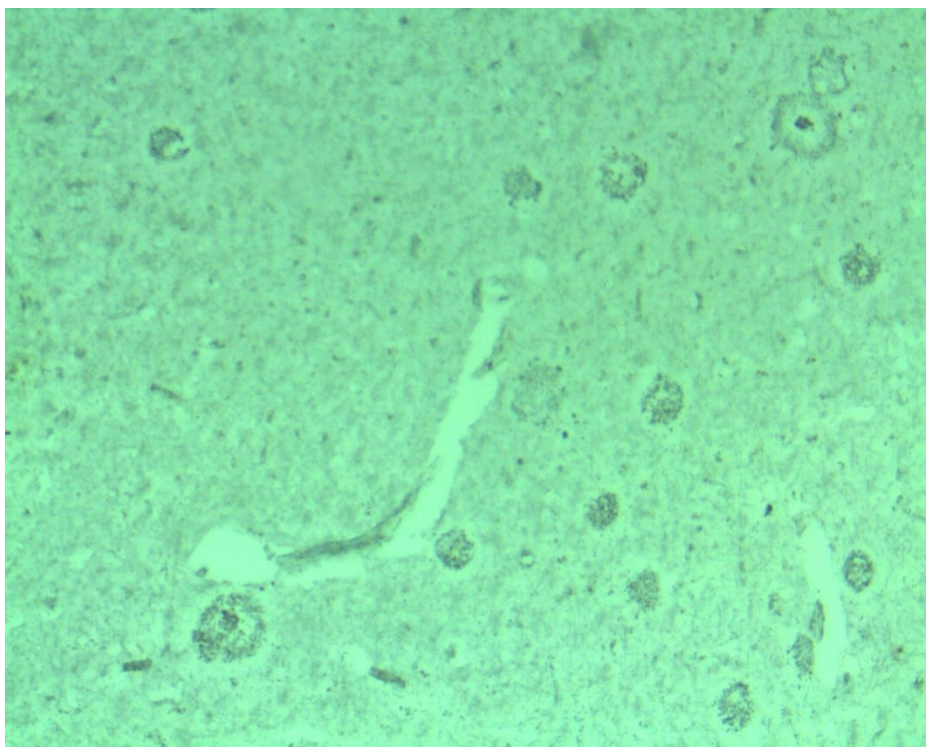
Obr. 8: Mozková kůra frontálního laloku při Alzheimerově chorobě – barvení Hematoxylin-eosinem (zvětšení: 5x). (Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 8) je zachycena mozková kůra frontálního laloku při Alzheimerově chorobě obarvená Hematoxylin-eosinem zvětšená 5x. Je zde vidět, že jednotlivé vrstvy mozkové kůry (I. vrstva molekulární, II. zevní vrstva jádrová, III. zevní vrstva pyramidová, IV. vnitřní vrstva jádrová a V. vnitřní vrstva pyramidová; VI. vrstva multifonní na tomto preparátu viditelná není) jsou prořídle a lehce dezorganizované, s úbytkem gangliových buněk (pyramidových buněk), které jsou zmenšené, a se zmožením glie.

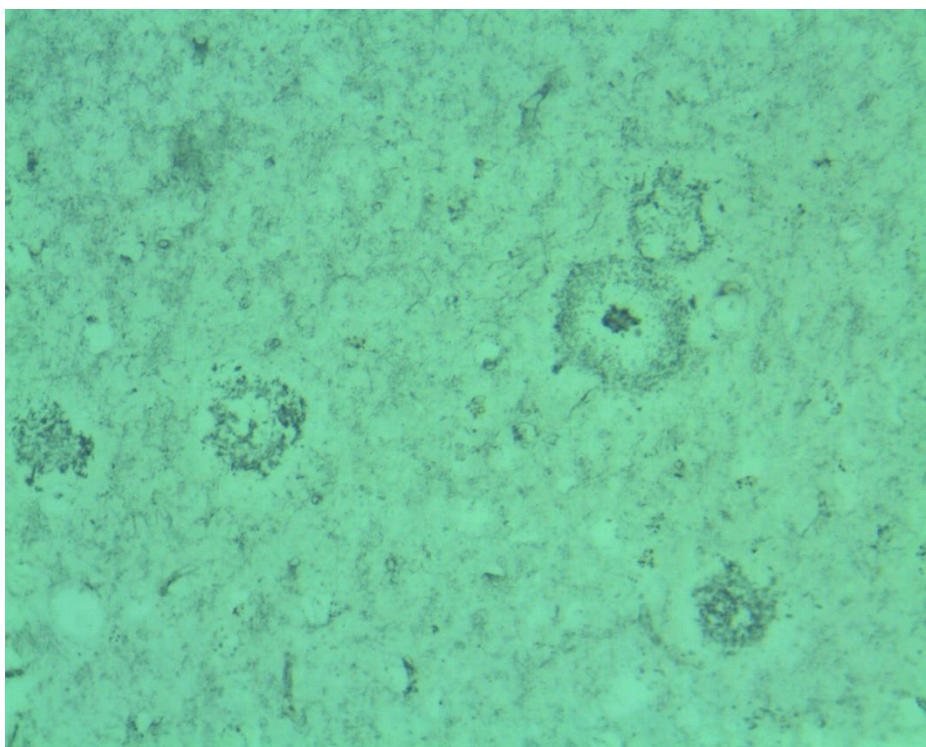


Obr. 9: Mozková kůra frontálního laloku při Alzheimerově chorobě – barvení Hematoxylin-eosinem (zvětšení: 20x). (Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 9) je zachycena mozková kůra frontálního laloku při Alzheimerově chorobě obarvená Hematoxylin-eosinem zvětšená 20x. Je zde vidět, že gangliové buňky jsou zmenšené (a jejich počet je nižší) s větším množstvím lipofuscinu (žluto-hnědých pigmentových granulí složených z lipidů) v cytoplazmě těchto buněk (tyto gangliové buňky jsou na obr. 9 označeny červenými šipkami). Lipofuscin je fagocytovaný i v cytoplazmě glie. Dále jsou zde patrné rozšířené perivaskulární prostory s depozity lipofuscinu (viz označení černou šipkou na obr. 9).

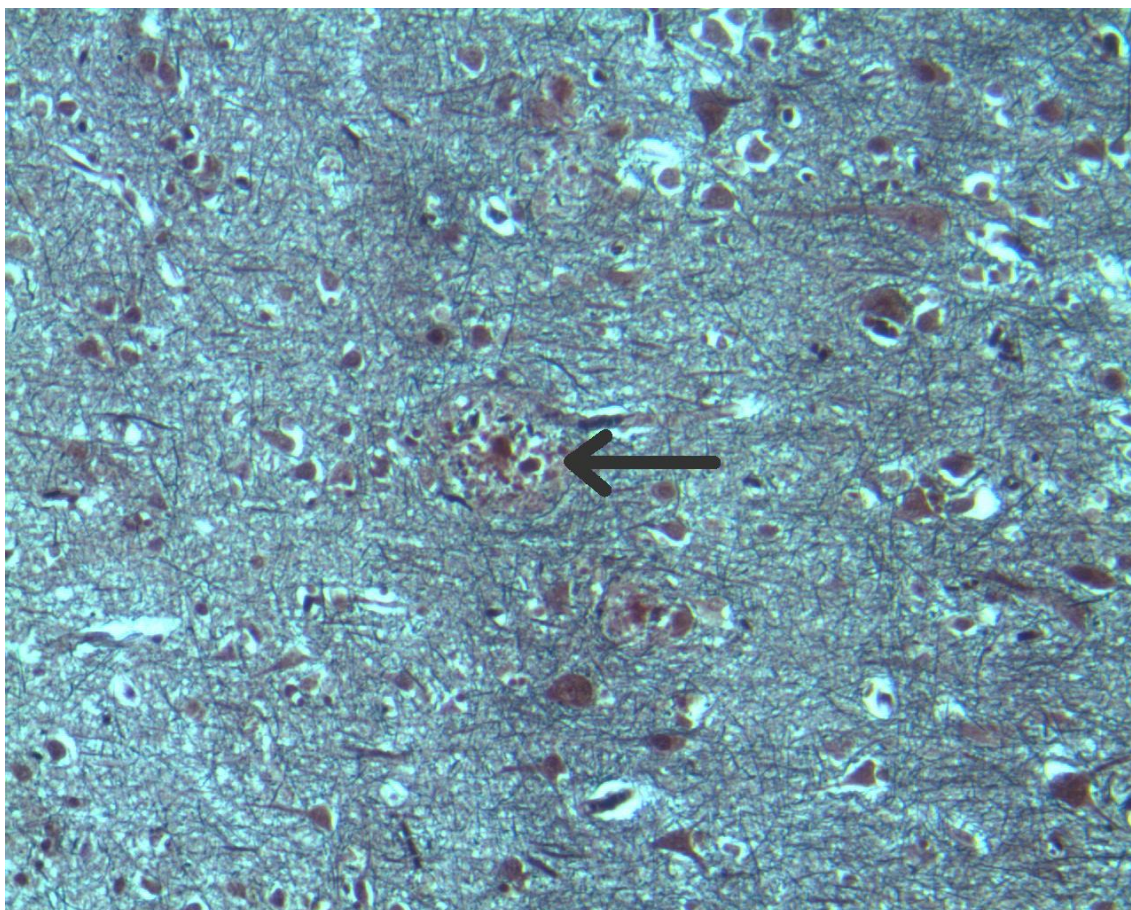


Obr. 10: Mozková kůra frontálního laloku při Alzheimerově chorobě – Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla – na zmrazených řezech (zvětšení: 10x). (Zdroj: Kristýna Havelková)



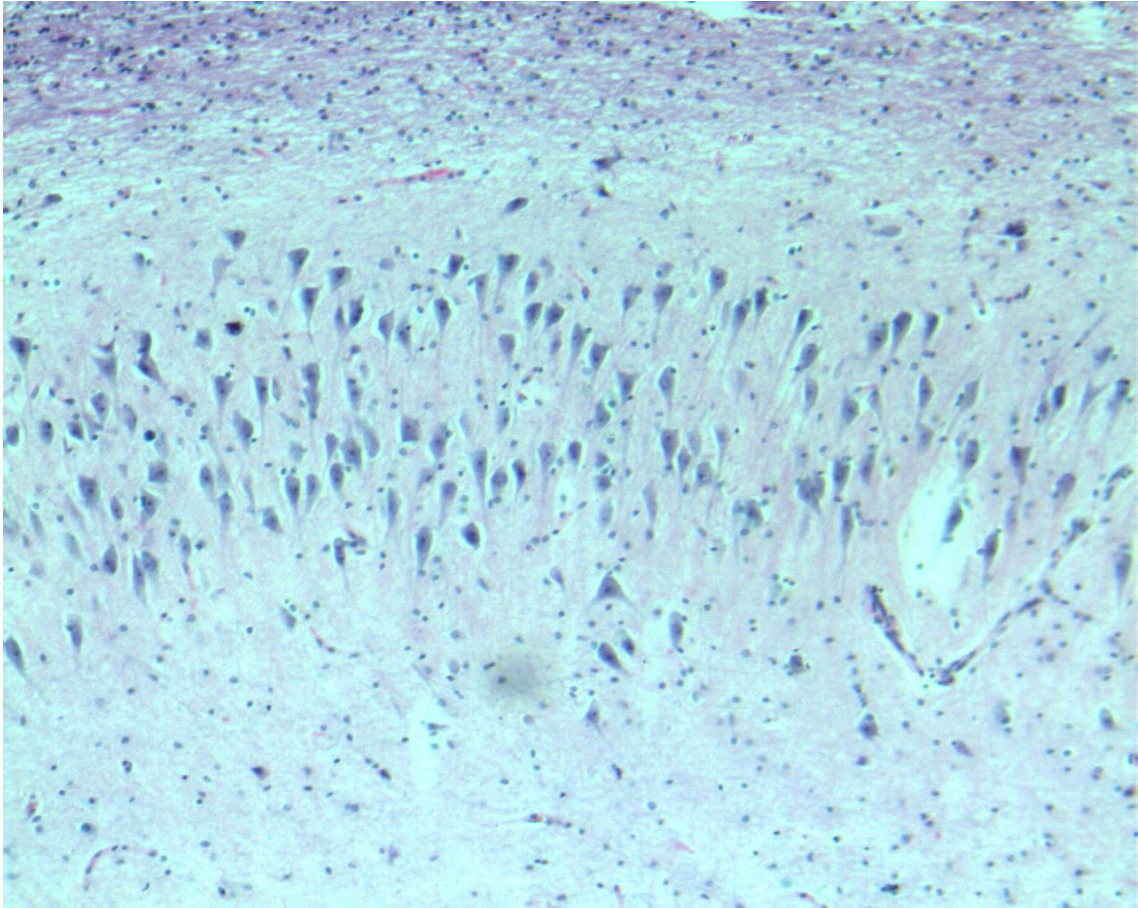
Obr. 11: Mozková kůra frontálního laloku při Alzheimerově chorobě – Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla – na zmrazených řezech (zvětšení: 20x). (Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 10 a obr. 11) je zachycena mozková kůra frontálního laloku při Alzheimerově chorobě obarvená metodou Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla – na zmrazných řezech. Na obr. 10 je tento preparát zvětšený 10x a na obr. 11 je zvětšený 20x. Na těchto fotkách jsou vidět senilní drúzy, které se jeví jako změť drobných vláken v neuropilu kůry frontálního laloku s dobře patrným centrálním terčíkem.



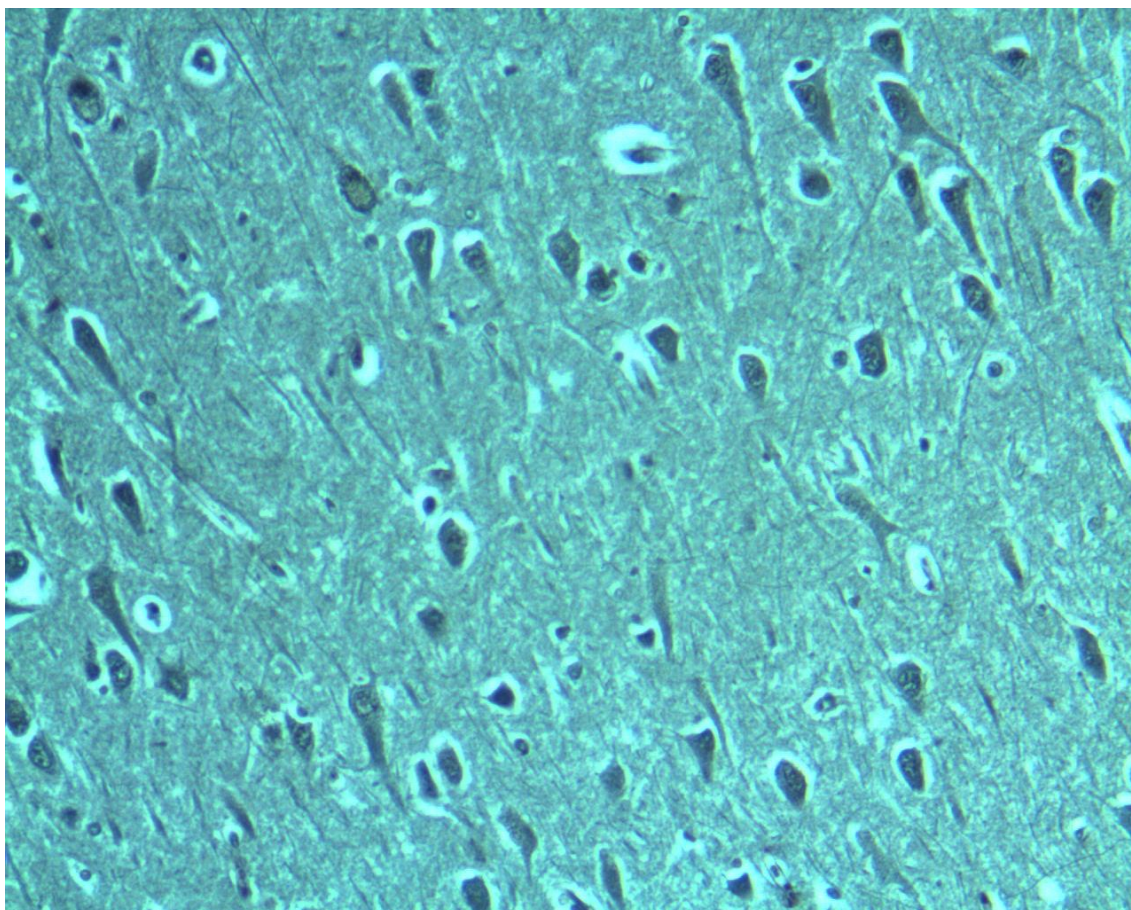
Obr. 12: Mozková kůra frontálního laloku při Alzheimerově chorobě – Impregnace nervových vláken podle Palmgrena (zvětšení: 20x). (Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 12) je zachycena mozková kůra frontálního laloku při Alzheimerově chorobě obarvená metodou Impregnace nervových vláken podle Palmgrena zvětšená 20x. Je zde vidět senilní drúza (viz. označení černou šipkou na obr. 12), což je obláčkovitý neostře ohraničený útvar v neuropilu kůry frontálního laloku s centrálním terčíkem. Drúzy mohou být až 100 μm velké.



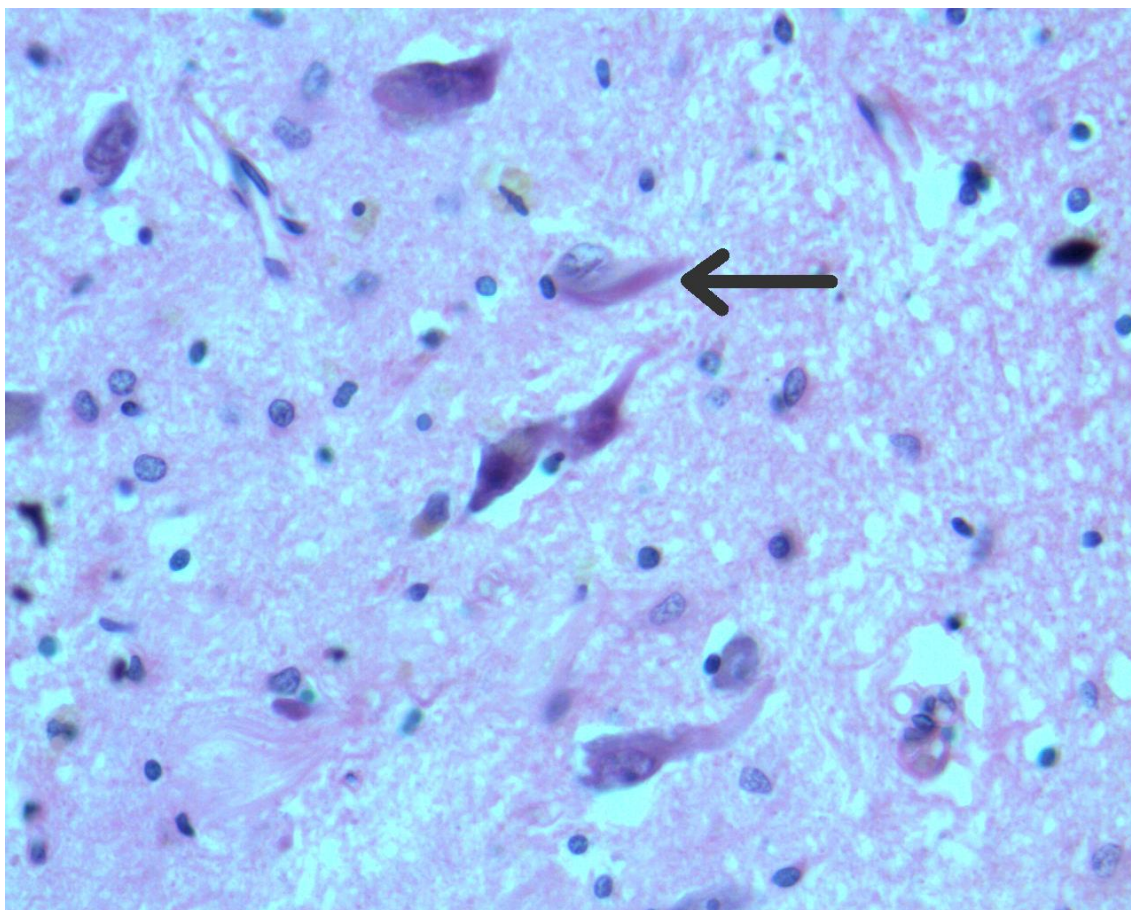
Obr. 13: Hipokampus zdravého mozku – barvení Hematoxylin-eosinem (zvětšení: 10x).
(Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 13) je zachycen hipokampus zdravého mozku obarvený Hematoxylin-eosinem zvětšený 10x. Jsou zde vidět pyramidové buňky přiměřeného charakteru v normálním počtu.



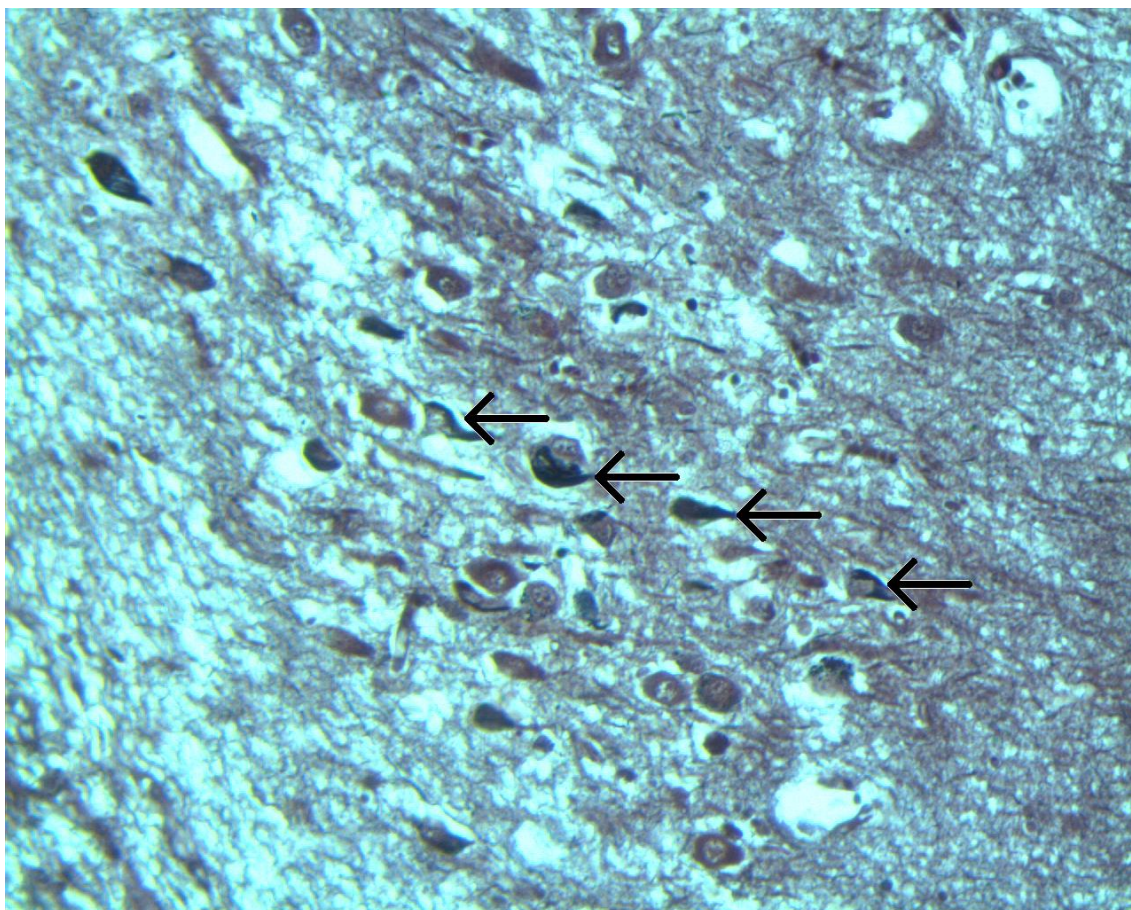
Obr. 14: Hipokampus zdravého mozku – Impregnace nervových vláken podle Palmgrena (zvětšení: 20x). (Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 14) je zachycen hipokampus zdravého mozku obarvený metodou Impregnace nervových vláken podle Palmgrena zvětšený 20x. Jsou zde vidět nervové buňky, které jsou normální, beze změn.



Obr. 15: Hipokampus při Alzheimerově chorobě – barvení Hematoxylin-eosinem (zvětšení: 40x). (Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 15) je zachycen hipokampus při Alzheimerově chorobě obarvený Hematoxylin-eosinem zvětšený 40x. Jsou zde vidět gangliové buňky s degenerativními změnami – Alzheimerovými změnami fibril. Jde o nápadně silná „spečená“ vlákna (viz označení černou šipkou na obr. 15) v perikaryu atrofických neuronů (neurofibrillary tangles – neurofibrilární klubka).



Obr. 16: Hipokampus při Alzheimerově chorobě – Impregnace nervových vláken podle Palmgrena (zvětšení: 20x). (Zdroj: Kristýna Havelková)

Na tomto preparátu (obr. 16) je zachycen hipokampus při Alzheimerově chorobě obarvený metodou Impregnace nervových vláken podle Palmgrena zvětšený 20x. Touto metodou se degenerativní změny – Alzheimerovy změny fibril zvýrazní, jsou lépe viditelné jako černá „spečená“ vlákna v perikaryu (viz označení černými šipkami na obr. 16).

5 Diskuze

Ve své bakalářské práci se zabývám histologickým vyšetřením mozku na Alzheimerovu chorobu. Jako materiál jsem používala parafinové bločky mozkové kůry frontálního laloku a hipokampu zemřelých osob, které trpěly Alzheimerovou chorobou, z roku 2013 a 2016 (nemohla jsem použít čerstvé vzorky, protože se již neprovádí tolik pitev jako dříve a v době mého výzkumu jsem neměla k dispozici žádný mozek s Alzheimerovou chorobou). Dalším materiálem byl vzorek mozkové kůry frontálního laloku a hipokampu zemřelé osoby z roku 2018. Z těchto vzorků jsem udělala parafinové bločky. Ze všech parafinových bloček jsem nakrájela tenké řezy na mikrotomu a napnula na podložní sklo. Takto připravené preparáty jsem poté obarvila Hematoxylin-eosinem a provedla jsem metodu Impregnace nervových vláken podle Palmgrena. Jeden vzorek čerstvé zdravé mozkové kůry jsem zpracovala na kryostatu a obarvila metodou Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla. Tuto metodu jsem provedla pouze ze zdravého mozku, protože z parafinových bloček, které se uchovávají v archivu, již tato metoda použít nelze. Abych mohla porovnat preparáty zdravého a nemocného mozku obarvené touto metodou, měla jsem k dispozici již hotové preparáty, které se v archivu také skladují.

Laboratorní výzkum jsem prováděla na Oddělení patologie v Nemocnici Jindřichův Hradec a.s.

Hypotéza č. 1:

V 1. hypotéze jsem předpokládala, že i v parafinových bločkách z roku 2013 a 2016, u kterých byla Alzheimerova choroba prokázána, zhotovím dostatečně kvalitní preparáty na to, abych obarvila a objevila struktury, které jsou typické pro tuto nemoc (senilní drúzy, Alzheimerovy změny fibril).

Tato hypotéza se mi potvrdila. Ve všech preparátech, které jsem zhotovila z těchto parafinových bloček, jsem objevila struktury typické pro Alzheimerovu chorobu (senilní drúzy, Alzheimerovy změny fibril).

Hypotéza č. 2:

Ve 2. hypotéze jsem předpokládala, že v preparátech zdravého mozku neobjevím žádné struktury, které jsou typické pro Alzheimerovu chorobu (senilní drúzy, Alzheimerovy změny fibril).

Tato hypotéza se mi také potvrdila. Ve všech preparátech zdravého mozku, které jsem zhotovila, jsem neobjevila žádný patologický nález.

Hypotéza č. 3:

Ve 3. hypotéze jsem předpokládala, že v preparátech z parafinových bločků mozku při Alzheimerově chorobě obarvených metodou Impregnace nervových vláken podle Palmgrena, které je typické pro průkaz změn fibril, objevím i senilní drúzy.

Tato hypotéza se potvrdila také, což dokazuje obr. 12 (viz Výsledky). I v preparátech obarvených metodou podle Palmgrena lze vidět nejen Alzheimerovy změny fibril, ale i senilní drúzy.

6 Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo seznámit se s onemocněním Alzheimerova choroba, popsat tuto nemoc, její příčiny, průběh a léčbu, dále popsat zpracování mozku v histologické laboratoři – příjem materiálu a metody vyšetření, vyzkoušet si metodu Impregnace nervových vláken podle Palmgrena a Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla – na zmrazených řezech, a nakonec vyhodnotit zhotovené preparáty a porovnat mozek nemocného a zdravého člověka. Všechny dané cíle byly splněny.

V preparátech mozkové kůry frontálního laloku (od zemřelých osob, které trpěly Alzheimerovou chorobou) obarvených Hematoxylin-eosinem jsem objevila dezorganizaci vrstev mozkové kůry, které byly prořídle, s úbytkem gangliových buněk, které byly zmenšené, a se zmnožením glie. Při větším zvětšení jsem objevila gangliové buňky s větším množstvím lipofuscinu v cytoplazmě buněk a rozšířené perivaskulární prostory s depozity lipofuscinu.

V preparátech této nemocné kůry obarvených metodami Impregnace nervových vláken podle Palmgrena a Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla jsem objevila senilní drúzy.

V preparátech zdravé kůry obarvených Hematoxylin-eosinem a metodou Průkaz senilních drúz podle A. v. Braunmühla jsem neobjevila žádný patologický nále. Všechny buňky byly normální, beze změn a v normálním počtu.

V preparátech hipokampu při Alzheimerově chorobě obarvených Hematoxylin-eosinem a metodou Impregnace nervových vláken podle Palmgrena jsem našla degenerativní změny – Alzheimerovy změny fibril, které se jeví jako silná „spečená“ vlákna (metodou podle Palmgrena se tyto změny zvýraznily).

V preparátech hipokampu zdravého mozku obarvených Hematoxylin-eosinem a metodou Impregnace nervových vláken podle Palmgrena jsem objevila normální nále – buňky přiměřeného charakteru v normálním počtu a beze změn.

V této bakalářské práci jsem dokázala, že v preparátech mozku s Alzheimerovou chorobou se vyskytují struktury typické pro tuto nemoc (senilní drúzy, Alzheimerovy změny fibril) a v preparátech zdravého mozku se tyto změny nevyskytují.

Seznam literatury

1. *Alzheimer* [online], 2017. Copyright © Alzheimercentrum [cit. 2018-04-16]. Dostupné z: <http://www.alzheimercentrum.cz/>
2. BANCROFT, John D., 1975. *Histochemical techniques*. 2d ed. Boston: Butterworths. ISBN 04-070-0033-X.
3. BENEŠ, Jiří, Jaroslava KYMPLOVÁ a František VÍTEK, 2015. *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory: pro studium i praxi*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4712-5.
4. BRYCHTOVÁ, Svetlana a Alice HLOBILKOVÁ, 2008. *Histopatologický atlas*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1650-3.
5. *Česká alzheimerovská společnost, o.p.s.* [online], 2015. [cit. 2018-04-23]. Dostupné z: <http://www.alzheimer.cz/>
6. ČIHÁK, Radomír, 2016. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-5636-3.
7. DREHER, Jan, 2017. *Psychofarmakoterapie: stručně, jasně, přehledně*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0133-7.
8. GOLLAN, Tamar H., Alena STASENKO, Chuchu LI a David P. SALMON, 2017. Bilingual language intrusions and other speech errors in Alzheimer's disease. *Brain and Cognition* [online]. **118**, 27-44 [cit. 2017-11-02]. DOI: 10.1016/j.bandc.2017.07.007. ISSN 02782626. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278262617301215>
9. HANSSON, Oscar, 2017. Researchers Discover Where Earliest Signs of Alzheimer's Occur in the Brain. *NeuroscienceNews.com*[online]. 1. 11. 2017 [cit. 2017-11-02]. Dostupné z: <https://neurosciencenews.com/alzheimers-early-signs-7849/>
10. CHYŠKOVÁ, Pavlína a Dagmar SIMONIDESOVÁ, 2012. *SOPV č. 5 - Znázornění buněčných a tkáňových struktur v histologických řezech: Příloha SOPV č. 5 - Barvicí metody přehledné a speciální, Impregnační metody*. PAO Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.
11. CHYŠKOVÁ, Pavlína, 2017. *LABORATORNÍ PŘÍRUČKA ODDĚLENÍ PATOLOGIE: Podklady pro spolupráci mezi oddělením patologie a klinickými pracovišti*. Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.

12. JIRÁK, Roman, Iva HOLMEROVÁ a Claudia BORZOVÁ, 2009. *Demence a jiné poruchy paměti: komunikace a každodenní péče*. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-2454-6.
13. KALVACH, Zdeněk, 2004. *Geriatric a gerontologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0548-6.
14. KLIKA, Eduard, Zdeněk VACEK, Milan DVOŘÁK a Karol KAPPELLER, 1986. *Histologie: Učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Avicenum. ISBN 08-110-86.
15. KOSIK, K. S. a Alisa BOWMAN, 2016. *Jak přelstít Alzheimer: co můžete udělat, abyste snížili riziko této nemoci*. Praha: Práh. ISBN 978-80-7252-668-0.
16. KOUKOLÍK, František a Roman JIRÁK, 1998. *Alzheimerova nemoc a další demence*. Praha: Grada. ISBN 80-716-9615-3.
17. KŘIVÁNKOVÁ, Markéta a Milena HRADOVÁ, 2009. *Somatologie: učebnice pro střední zdravotnické školy*. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-2988-6.
18. *Lékařská fakulta Masarykovy univerzity* [online], 2018. Brno [cit. 2018-04-21]. Dostupné z: http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/HP_txt7-1.htm
19. LÜLLMANN-RAUCH, Renate, 2012. *Histologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3729-4.
20. MAČÁK, Jiří a Jana MAČÁKOVÁ, 2004. *Patologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0785-3.
21. MARTÍNEK, Jindřich a Zdeněk VACEK, 2009. *Histologický atlas*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2393-8.
22. OGAN, Terri, 2017. One Step Closer Toward a Treatment for Alzheimer's Disease?. *NeuroscienceNews.com* [online]. 18. 10. 2017 [cit. 2017-11-02]. Dostupné z: <http://neurosciencenews.com/alzheimers-treatment-7766/>
23. OREL, Miroslav a Roman PROCHÁZKA, 2017. *Vyšetření a výzkum mozku: pro psychology, pedagogy a další nelékařské obory*. Praha: Grada. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-5539-7.
24. OREL, Miroslav, 2015. *Nervové buňky a jejich svět*. Praha: Grada. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-5070-5.
25. PFEIFFER, Jan, 2007. *Neurologie v rehabilitaci: pro studium a praxi*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1135-5.

26. PIDRMAN, Vladimír, 2007. *Demence*. Praha: Grada. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-1490-5.
27. PREISS, Marek a Hana PŘIKRYLOVÁ KUČEROVÁ, 2006. *Neuropsychologie v neurologii*. Praha: Grada. Psyché (Grada). ISBN 80-247-0843-4.
28. RABOCH, Jiří a Pavel PAVLOVSKÝ, 2012. *Psychiatrie*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1985-9.
29. ROSINA, Jozef, 2013. *Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4237-3.
30. ROSS, Michael H. a Wojciech PAWLINA, 2006. *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology* [online]. 5th ed. Philadelphia [cit. 2017-12-17]. ISBN 07-817-6790-3.
31. SAH, Saroj Kumar, Chan LEE, Jung-Hee JANG a Gyu Hwan PARK, 2017. Effect of high-fat diet on cognitive impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **493**(1), 731-736 [cit. 2017-11-02]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.122. ISSN 0006291x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X17317059>
32. SCHINDLER, Jiří, 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl. a přeprac. vyd.* Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-4771-2.
33. SLÍPKA, Jaroslav, 2014. *Základy histologie*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2809-7.
34. STITES, Shana D, Jason KARLAWISH, Kristin HARKINS, Jonathan D RUBRIGHT a David WOLK, 2017. Awareness of Mild Cognitive Impairment and Mild Alzheimer's Disease Dementia Diagnoses Associated With Lower Self-Ratings of Quality of Life in Older Adults. *The Journals of Gerontology: Series B* [online]. **72**(6), 974-985 [cit. 2017-11-02]. DOI: 10.1093/geronb/gbx100. ISSN 1079-5014. Dostupné z: <http://academic.oup.com/psychsocgerontology/article/72/6/974/4004839/Awareness-of-Mild-Cognitive-Impairment-and-Mild>
35. VACEK, Zdeněk, 1995a. *Histologie a histologická technika*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-701-3201-9.
36. VACEK, Zdeněk, 1995b. *Histologie a histologická technika*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-701-3202-7.

37. VAJNER, Luděk, 2012. *Lékařská histologie II.: mikroskopická anatomie*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2165-4.
38. VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ, 2010. *Lékařská histologie I.: cytologie a obecná histologie*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-1860-9.
39. VRÁNOVÁ, Dagmar, 2013. *Chronická onemocnění a doporučená výživová opatření*. Olomouc: ANAG. ISBN 978-80-7263-788-1.

Seznam obrázků

1. VACEK, Zdeněk, 1995a. *Histologie a histologická technika*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-701-3201-9.

Seznam zkratek

μm – mikrometr

a.s. – akciová společnost

Atd. – a tak dále

Cca – circa

CNS – centrální nervový systém

Č. - číslo

g – gram

ml – mililitr

Např. – například

nm – nanometr

o.p.s. – obecně prospěšná společnost

Obr. – obrázek

PNS – periferní nervový systém

Popř. – popřípadě

Prim. – primář(ka)

S. – strana

Tj. – to je

Tzn. – to znamená

Tzv. – takzvaný, takzvaně