Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra pedagogiky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Tvorba a praktické využití studijních materiálů pro cvičení z histologie a histologické techniky

(koncipováno pro 3. a 4. ročník SZŠ Alšovo nábřeží 6, Praha)

Creation and practical use of study materials for exercises in histology and histological techniques

(disigned for the 3rd and 4th year laboratory assistant of SZŠ Alšovo nábřeží 6, Prague)

Michaela Semerádová

Vedoucí práce: PhDr. Alena Thorovská

Studijní program: Specializace v pedagogice

Studijní obor: Učitelství praktického vyučování a odborného výcviku

2022

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Tvorba a praktické využití studijních materiálů pro cvičení z histologie a histologické techniky (koncipováno pro 3. a 4. ročník SZŠ Alšovo nábřeží 6, Praha 1) potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 24.3.2022

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování paní **PhDr. Aleně Thorovské** za její cenné rady a podporu při vedení mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala paní RNDr. Kláře Sopkové, vedoucí oboru Laboratorní asistent, Diplomovaný zdravotní laborant Vyšší odborné zdravotnické školy a Střední zdravotnické školy, Alšovo nábřeží 6, Praha 1, za její podporu a poskytnutí interních zdrojů při psaní mé bakalářské práce.

Rovněž děkuji MUDr. Petru Hrabalovi, primáři Oddělení patologie Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice**,** Praha 6, Střešovice, za jeho podporu v mém profesním rozvoji a poskytnutí interních zdrojů pro psaní mé bakalářské práce.

ABSTRAKT

Práce bude zaměřena na problematiku tvorby a praktického využití studijních materiálů k předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky. Tvorba a praktické využití těchto podkladů má velký potenciál především v rámci propojení odborných znalostí a zkušeností z laboratorní praxe s praktickou výukou v prostředí školní laboratoře. Zároveň zde vytváří prostor pro možnost rozvíjet a formovat budoucí laboratorní asistenty pro praxi již v období studia. Pro výzkumné šetření bude využita dotazníková metoda. O vyplnění dotazníku byli požádání současní žáci 3. a 4. ročníku a dále absolventi (2020/2021) oboru Laboratorní asistent.

Součástí práce je didaktická analýza učiva předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky vycházející z rámcově vzdělávacího programu (RVP) a školního vzdělávacího programu (ŠVP).

Cílem práce je postup tvorby a praktické využití studijního materiálu pro předmět Cvičení z histologie a histologické techniky.

Dílčím cílem je poukázat na důležitost kvalitní přípravy praktické výuky, která žáky motivuje, aby následně u daného oboru po dokončení studia zůstali a nastoupili do histologických laboratoří.

KLÍČOVÁ SLOVA

Histologie, histologická technika, rámcově vzdělávací program (RVP), školní vzdělávací program (ŠVP), didaktická analýza, studijní materiál, motivace, dotazník.

ABSTRACT

The work will focus on the creation and practical use of study materials for the subjekt Exercises in Histology and Histological Techniques. The creation and practical use of these materials has great potential, especially in the connection of professional knowledge and experience from laboratory practice with practical teaching in the school laboratory. At the sametime, it creates space for the opportunity to develop and shape future laboratory assistants for practice already during the study period. A questionnaire method is used for the research survey. Current 3rd and 4th year students, including graduates of the Laboratory Assistant field, were asked to complete the questionnaire.

Part of the work is a didactic analysis of the subject Exercises in Histology and Histological Techniques based on FEP and SEP.

The aim of the work is the process of creation and practical use of study material for the subject Exercises in Histology and Histological Techniques.

The partial goal is to point out the importance of quality preparation of practical teaching, which motivates pupils to stay in the given field after graduation and join histological laboratories.

KEYWORDS

Histology, histological technique, Framing Educational Program (FEP), School Educational Programe (SEP), didactic analysis, study material, motivation, questionnai.

Obsah

Úvod ... 8
TEORETICKÁ ČÁST ... 9
1 Obor laboratorní asistent – od historie k současnosti ... 9
1.1 Charakteristika oboru laboratorní asistent ... 9
1.2 Profil absolventa oboru laboratorní asistent ... 10
1.2.1 Klíčové kompetence ... 11
1.2.2 Odborné kompetence ... 11
2 Vymezení pojmu histologie a histologická technika ... 12
2.1 Histologie ... 12
2.1 Histologická technika ... 13
3 Charakteristika předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky ... 14
3.1 Obsahové, časové a organizační vymezení předmětu ... 14
3.2 Výchovně – vzdělávací cíle předmětu ... 15
4 Dokumenty pro plánování výuky ... 16
4.1 Rámcový vzdělávací program (RVP) ... 16
4.2 Školní vzdělávací program (ŠVP) ... 16
4.2.1 Učební plán ... 17
4.2.2 Učební osnovy ... 20
4.2.3 Mezipředmětové vztahy ... 21
4.2.4 Tématický plán ... 21
5 Didaktická analýza učiva ... 22
5.1 Učivo ... 22
5.1.1 Obsahová dimenze učiva ... 23
5.2 Diferenciace učiva ... 24

5.2.1 Učivo základní ... **24**
5.2.2 Učivo rozšiřující ... **24**
5.2.3 Učivo doplňující (prohlubující) ... **25**
5.3 Pojmová a vztahová analýza ... 25
5.3.1 Tematické celky ... **25**
5.3.2 Jednotlivá témata ... **26**
5.4 Dimenze ideová a metodická ... 26
5.4.1 Cíle ... **27**
5.4.2 Organizační formy vyučování ... **28**
5.4.3 Vyučovací metody používané ve výuce odborných předmětů ... **29**
5.4.4 Materiální didaktické prostředky ... **29**
PRAKTICKÁ ČÁST ... 30
6 Studijní materiál ... 30
6.1 Ukázka vyučovací hodiny s využitým studijního materiálu ... 35
6.1.1 Plán vyučovací hodiny ... **36**
6.1.2 Vstupní dovednosti a znalosti žáků ... **37**
6.1.3 Nové učivo ... **37**
6.1.4 Cíle hodiny ... **43**
Klíčové kompetence ... **43**
6.1.5 Hodnocení ... **44**
6.1.6 Materiální a nemateriální didaktické pomůcky ... **45**
6.1.7 Struktura vyučovací hodiny (časová osa) ... **45**
6.1.8 Instruktáž ... **48**
6.1.9 Cvičná práce pro žáky ... **48**
6.2 Ukázka praktického využití pracovního listu ... 49

7 Dotazníkové šetření 51
7.1 Dotazník – zadané otázky 53
7.1.1 Dotazníkové šetření – vlastní dotazník 53
7.2 Vyhodnocení dotazníkového šetření 55
7.3 Shrnutí výsledků šetření 60
Závěr 61
Seznam použitých informačních zdrojů 63
Seznam příloh 65

Úvod

Tématem bakalářské práce je tvorba a praktické využití studijního materiálu pro cvičení z histologie a histologické techniky (koncipováno pro 3. a 4. ročník SZŠ Alšovo nábřeží 6, Praha). Téma bylo zvoleno zcela záměrně, protože je mi velmi blízké a zároveň jej považuji za velmi důležité. Již od roku 2003 působím v histologické laboratoři na Oddělení patologie v Ústřední vojenské nemocnici – Vojenské fakultní nemocnici v Praze, kde dále získávám pracovní zkušenosti na pozici zástupce vedoucí laborantky. V roce 2017 jsem složila státní atestační zkoušky se specializovanou působností v oboru histologie (odbornost specialisty zdravotní laborant pro histologii). V roce 2017 jsem začala vyučovat na Vyšší odborné zdravotnické škole a Střední zdravotnické škole, Alšovo nábřeží 6/82, Praha 1, praktické vyučování v předmětu – Cvičení z histologie a histologické techniky. Spatřuji tedy velký potenciál ve vzájemném provázání odborných znalostí získaných v pracovním procesu a možnosti rozvíjet a formovat budoucí laboratorní asistenty pro praxi již v období studia.

Téma této bakalářské práce si klade za cíl přiblížit postup tvorby a praktické využití studijního materiálu pro předmět Cvičení z histologie a histologické techniky.

Dílčím cílem je poukázat na důležitost kvalitní přípravy praktické výuky, která žáky motivuje, aby následně u daného oboru po dokončení studia zůstali a nastoupili do histologických laboratoří.

V teoretické části je práce zaměřena na didaktickou analýzu, která předcházela vlastní tvorbě studijního materiálu.

V praktické části je bakalářská práce zaměřena na kroky, které vedly k vlastní tvorbě studijního materiálu a dále je zde prezentována ukázka praktického využití studijního materiálu. Součástí praktické částí je i snaha o potvrzení domněnky, jak se žákům/absolventům pracuje/pracovalo se studijním materiálem. K ověření domněnky je využito metody dotazníkového šetření.

V závěru práce jsou shrnuty poznatky v práci uvedené.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Obor laboratorní asistent – od historie k současnosti

Oboru laboratorní asistent předcházel historicky obor zdravotní laborant. Obor se poprvé začal vyučovat v roce 1946/47, kdy jeho podobu připravil profesor MUDr. Z. Vacek, DrSc., který působil na škole až do roku 2000. Obor zdravotní laborant byl ukončen ve školním roce jako 2007/08. Ale již o dva roky dříve v roce 2005 došlo k zavedení oboru laboratorní asistent a k další významné změně, kdy byla škola přejmenována na Vyšší odbornou školu zdravotnickou a Střední zdravotnickou školu, Praha 1, Alšovo nábřeží 6.
Školu absolvovalo již více než 18 000 studentů. Mnozí z řad studentů se stali významnými kapacitami a proslavili se v oborech, které vystudovali. Ale i mnozí absolventi se po nabytí odborných znalostí v praxi a specializacích v daných oborech vrací jako učitelé odborných předmětů či učitelé praktického vyučování.[1]

1.1 Charakteristika oboru laboratorní asistent

Obor laboratorní asistent se dle vzdělávacího programu zaměřuje především na „*osvojování teoretických poznatků a získávání praktických odborných dovedností, ale také na rozvíjení klíčových a občanských kompetencí a zohlednění individuálních vzdělávacích potřeb žáků*“.[2] (ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 11)

Přijetí na obor laboratorní asistent je uskutečňováno dle platných předpisů školy, a dále je podmíněno zdravotní způsobilostí žáka.

Studium je organizováno ve formě denního studia. Vlastní výuka se skládá z teoretického vyučování a z praktického vyučování, která je realizována v prostorách školy. Škola disponuje školními laboratořemi, které plně odpovídají potřebám praktického vyučování daného oboru.

[1] Vyšší odborná zdravotnická škola a Střední zdravotnická škola, Alšovo nábřeží 6/82, Praha 1 [online]. [cit. 2022-01-30] dostupné z: https://www.szspraha1.cz/o-skole-2
[2] Citace z ŠVP, které byly využity v kapitole 1, byly čerpány z písemných interních zdrojů Vyšší odborné školy zdravotnické a Střední zdravotnické školy, Alšovo nábřeží 6, Praha 1.

Žáci se během studia seznámí v rámci praktického vyučování se *„cvičením z chemie, cvičením z biologie, analytické chemie, laboratorní techniky, vybraných laboratorních metod, cvičením z histologie a histologické techniky, cvičením z hematologie a transfuzní služby, cvičením z mikrobiologie a imunologie“*. Během studia je pro žáky 3. ročníku stanovena v měsíci červnu souvislá odborná praxe v rozsahu 4 týdnů. Souvislá odborná praxe je realizována na odborných pracovištích, která se školou spolupracují. Studium je ukončené maturitní zkouškou. Maturitní zkouška se skládá ze dvou částí, a to společnou a profilovou. Podmínky pro maturitní zkoušku jsou stanoveny tak, aby *„nejméně dvě ze tří zkoušek žák konal ze vzdělávací oblasti odborného vzdělávání. Jedna z povinných zkoušek musí být formou praktické zkoušky“*.

Studium mají žáci obohacené především o „*odborné přednášky, besedy a exkurze ve zdravotnických zařízeních a v dalších vzdělávacích institucích (Akademie věd ČR, lékařské fakulty, Vysoká škola chemicko-technologická, ostatní zdravotnické školy apod.)*“. (ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 10–12)

Výuka se zaměřuje především k nasměrování žáků k samostatnosti, ale i schopnosti týmové práce, důraz je kladen na osobní zodpovědnost.

1.2 Profil absolventa oboru laboratorní asistent

Profil absolventa nám charakterizuje uplatnění žáka po ukončení vzdělání v praxi. To znamená, že nám přesně definuje rozsah získaných vědomostí a dovedností. Profil absolventa je dán rámcovým vzdělávacím programem (RVP), kde je především kladen důraz na formování, rozvíjení a utváření klíčových kompetencí. Vždy je důležité zaměřovat se na základní oblasti rozvoje kompetencí, zkušeností, ale také dovedností. Především oblast klíčových kompetencí nám dává základ pro možnost dalšího učení. Mít kompetence znamená, že je žák vybaven komplexní soustavou vědomostí, dovedností a postojů, které jsou navzájem propojeny. Díky tomuto propojení je žák schopen obstát v různých situacích,

ve kterých se může ocitnout v rámci studia, praxe, ale i v osobním životě. (Mazáčová, 2008, s. 14)

Profil absolventa pro obor laboratorní asistent vychází z RVP a dále je popsán v ŠVP Vyšší odborné školy zdravotnické a Střední zdravotnické školy, Praha 1. „*Absolvent je připraven k výkonu práce zdravotnického pracovníka, který pod odborným dohledem poskytuje laboratorní diagnostickou péči a vykonává činnosti v rámci léčebné a preventivní péče v rozsahu své odborné způsobilosti stanovené vyhláškou MZ ČR“.* (ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 1)

1.2.1 Klíčové kompetence

Jsou chápány jako soubor schopností, dovedností, postojů a hodnot. Tyto schopnosti jsou velmi podstatné pro rozvoj osobnosti každého žáka, umožňují mu kvalitní začlenění do společnosti. Klíčové kompetence nabývá žák v rámci vyučovacího procesu i mimo něj, nejsou tudíž přímo vázány na „*konkrétní vyučovací předměty, lze je rozvíjet prostřednictvím všeobecného i odborného vzdělávání, v teoretickém i praktickém vyučování, ale i prostřednictvím dalších aktivit doplňujících výuku. U absolventa byly rozvíjeny všechny klíčové kompetence zejména vzhledem k jeho profesnímu zaměření. Klíčové kompetence byly stanoveny v souladu s profilem absolventa“.* (ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 7)

1.2.2 Odborné kompetence

Každý absolvent je veden k získání odborných kompetencí, tyto kompetence jsou nezbytné při provádění jednotlivých pracovních činností a vyjadřují profesní profil absolventa. Odborné kompetence nám zaručují odbornou způsobilost pro výkon povolání a jsou definovány kvalifikačními normami, které definují konkrétní požadavky a způsobilost absolventa k výkonu povolání v oboru laboratorní asistent. Požadavky na odborné kompetence tvoří ucelený soubor, který zahrnuje znalosti z oblasti kognitivní, afektivní i psychomotorické, které jsou nezbytné pro výkon pracovní činnosti absolventa. (ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 6)

2 Vymezení pojmu histologie a histologická technika

2.1 Histologie

Pokud se zaměříme, co je hlavním předmětem a cílem histologie, můžeme říci, že se jedná ve své podstatě o nauku o mikroskopické stavbě organismu (stavba jednotlivých tkání, uspořádaní buněk). Počátek rozvoje histologie je spojován především s vynálezem mikroskopu, který svým postupným vývojem a zdokonalováním do dnešní podoby umožnuje pozorovat a rozlišovat jednotlivé mikroskopické struktury organismu. V současné době se využívá k pozorování mikroskopické stavby organismu jak mikroskopů světelných, tak i mikroskopů elektronových. Ty nám poskytují informaci o nejmenší struktuře – ultrastruktuře, což je submikroskopická struktura buněk a tkání. Pozorováním a rozpoznáváním jednotlivých struktur tkání a stavby orgánů získáváme poznatky nejen o jejich stavbě, ale i o jednotlivých funkcích. Na základě dokonalé znalosti mikroskopické stavby orgánů zdravého jedince můžeme určovat mikroskopické změny, které poukazují na patologický stav – určováním těchto změn se zabývá patologická histologie. (Vacek, 1972, s. 15-16)

Histologie jako obor má v současné medicíně obrovský význam. V dnešní době se o histologický nález, který stanoví lékař patolog odečtením změn v mikroskopického obrazu z histologického preparátu (lékař s odbornou způsobilostí v oboru patologie), opírá lékař klinického oddělení. Na základě diagnózy stanovené patologem je pak dále ošetřujícím lékařem či konziliárním výsledkem navrhován další léčebný postup pro pacienta. Léčebným postupem je myšleno například operační řešení, onkologické terapie – chemoterapie, radioterapie, popřípadě kombinace těchto postupů. V neposlední řadě u případů, u kterých bohužel ani současné poznání neumožňuje efektivní léčbu, se volí paliativní péče.

Histologické metody jako takové jsou využívány především v lékařství, ale využívají se i ve veterinární medicíně a setkáváme se s ní i při rozpoznávání mikroskopické stavby rostlin v oboru botanika.

Histologii můžeme také rozdělit podle toho, kterou ze struktur lidského organismu zkoumá. Pokud se zabývá stavbou buňky, hovoříme o cytologii, pokud se věnuje především stavbě tkání, jedná se o histologii v užším slova smyslu. Zaměřuje-li se především na mikroskopickou stavbu orgánů, jedná se o mikroskopickou anatomii. (Vacek, 1972, s. 17-18)

Podrobné pozorování a rozlišování mikroskopické stavby organismu je úzce provázáno s postupy histologické techniky.

2.1 Histologická technika

Hlavním úkolem zdravotního (histologického) asistenta i laboranta je zhotovování histologických preparátů. Preparáty se zhotovují z různých orgánů a tkání v histologické laboratoři, která disponuje speciálním vybavením, které umožňuje vytvoření histologického preparátu. K zhotovení histologického preparátu se používají četné histologické techniky, které jsou neustále zdokonalovány a obohacovány o nové poznatky (Vacek, 1995, s. 7)

Histologický preparát (trvalý preparát)

Vytvoření kvalitního histologického preparátu je hlavním cílem a náplní histologické techniky. Nejpoužívanější metodou je příprava histologického preparátu, který bude možné pozorovat ve světelném mikroskopu. Nejprve je nutné si uvědomit, že tkáně a orgány jsou velmi hmotné, abychom je mohli prosvítit paprskem světla v mikroskopu. Musíme si tedy nejprve přikrojit malé kousky tkáně – vzorky, tyto malé vzorky tkáně fixovat, nechat projít tkáňovým procesorem. Takto připravené vzorky tkáně zaléváme do parafínu, necháme ztuhnout a krájíme na přístrojích zvaných mikrotomy. Mikrotomy nám umožnují nakrájení tenkých řezů, které se vypnou na podložním sklíčku. Dále se tenké histologické řezy vypnuté na podložním sklíčku obarví z důvodu rozlišení všech buněk a tkání. Pokud bychom řezy neobarvili, nebylo by je možné hodnotit ve světelném mikroskopu. Na závěr se preparáty uzavírají pomocí krycího sklíčka a pryskyřice. Takto vzniklý trvalý histologický preparát je posléze mikroskopován lékařem patologem za účelem stanovení diagnózy.

(Junqueira,1997 s.1)

3 Charakteristika předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky

Předmět Cvičení z histologie a histologické techniky je charakterizován jako komplexní spojení dvou předmětů, a to histologie a histologické techniky. Hlavní náplní předmětu je žáky v rámci praktické výuky seznámit s mikroskopickým obrazem a následným rozborem stavby buněk, tkání a orgánů lidského těla. Dále žákům poskytuje dostatečný prostor osvojit si praktické návyky při práci s biologickým materiálem, se kterým se žáci setkávají v rámci práce ve školní laboratoři. U žáků se rozvíjí schopnost orientovat se v pracovních postupech základních, speciálních histologických barvení a imunohistochemických metod. Vede žáky ke schopnosti orientovat se ve vyhodnocování vzorků. V rámci výuky předmětu je kladen velký důraz na používání přesné odborné lékařské terminologie. Lékařská terminologie v latinském jazyce vychází z odborné znalosti latinského jazyka, který je zařazen dle učebního plánu v 1. ročníku. Vědomosti z předmětu cvičení z histologie a histologické techniky jsou nedílnou součástí odborného vzdělávání. (ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 291)

3.1 Obsahové, časové a organizační vymezení předmětu

Praktickému vyučování daného předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky předchází teoretická příprava v rámci předmětu Histologie a histologické techniky, tato skutečnost zajišťuje plynulou návaznost teoretických a praktických vědomostí

Předmět je dle studijního plánu zařazen do 3. a 4. ročníku studia na SZŠ. Časová dotace pro daný předmět je stanovena v rozsahu dvou vyučovacích hodin (2x45min) jedenkrát týdně.

Praktické vyučování předmětu probíhá v prostoru školní laboratoře, která je plně vybavována pro potřebu výuky daného předmětu (školní laboratoř obsahuje specializované vybavení, které žáci využívají k vlastnímu nácviku, cvičení i procvičování pracovních postupů, které jsou pro daný předmět specifické). (ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 291)

3.2 Výchovně – vzdělávací cíle předmětu

Hlavním výchovně vzdělávacím cílem předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky je naplnění klíčových a odborných kompetencí, které přesně definuje profil absolventa oboru laboratorní asistent.

Mezi stěžejní kompetence lze zahrnout především kompetence k učení a kompetence, které přispívají k řešení problémů. Zásadní kompetencí je schopnost provádět laboratorní a diagnostické práce v laboratoři zdravotnického zařízení pod dohledem zdravotnického pracovníka, který má způsobilost pracovat bez odborného dohledu, to vše za předpokladu bezpodmínečného dodržování zásad bezpečnosti práce a ochrany zdraví při práci (způsobilost pracovat bez odborného dohledu je stanovena legislativou).Nelze opomenout i kompetence, které vedou k využívání informačních a komunikačních technologií včetně práce s citlivými daty, myšleno s osobními údaji pacientů v rámci zdravotnické dokumentace, kazuistiky atd.[3] (ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 291 - 293)

[3] Citace z ŠVP, které byli využity v kapitole 3, byly čerpány z písemných interních zdrojů Vyšší odborné školy zdravotnické a Střední zdravotnické školy, Alšovo nábřeží 6, Praha 1.

4 Dokumenty pro plánování výuky

Dokumenty pro plánování výuky jsou nezbytnou oporou pro realizaci výchovně – vzdělávacího procesu. Vlastní proces musí být pečlivě naplánován, musí mít jasnou osnovu, která vede k naplnění cílů, kterých má byt dosaženo. Efektivní naplnění vzdělávání plyne z kvalitně zpracovaných školních vzdělávacích programů (ŠVP), jež má škola vypracované pro každý obor (obor Laboratorní asistent). Při vlastní tvorbě ŠVP vychází škola z rámcového vzdělávacího programu. (Stará, 2009, s.7)

4.1 Rámcový vzdělávací program (RVP)

Rámcový vzdělávací programy (RVP) jsou dokumenty státní úrovně, které odpovídají nejnovějším poznatkům vědních disciplín, pedagogiky a psychologie. Přesně vymezují státem stanovený rámec pro tvorbu školních vzdělávacích programů škol. V České republice bylo RVP zavedeno do vzdělávání školským zákonem (zákon č. 561/2004 Sb.). (Národní pedagogický institut České republiky– online)

RVP stanovuje obsah vzdělávání v daném oboru (obor 53–43–M/01 Laboratorní asistent), jeho délku, podmínky přijímání uchazečů, průběh a ukončování vzdělávání, konkrétní cíle, formy, učivo a průřezová témata. Dále nám RVP přesně specifikuje profil absolventa pro daný obor, kde je kladen důraz především na formování, rozvíjení a utváření klíčových kompetencí. *„Učitelé se snaží naplnit tyto kompetence a na základě nich precizují vzdělávací cíle a vybírají učivo“.* V neposlední řadě RVP vymezuje možnost individuální úpravy vzdělávacího obsahu pro žáky se speciálními vzdělávacími potřebami. (Stará, 2009, s. 8-9)

4.2 Školní vzdělávací program (ŠVP)

Školní vzdělávací program (ŠVP) vychází z příslušného RVP a musí ho mít vypracovaný všechny školy (v předškolním, základním, základním uměleckém, jazykovém a středním vzdělávání). Za zpracování a vydání zodpovídá ředitel školy nebo školského zařízení.

ŠVP stanovuje obsah a časový plán vzdělávání, jeho délku, podmínky přijímání uchazečů, průběh a ukončování vzdělávání, ale také formy a konkrétní cíle vzdělávání. Vymezuje možnost individuální úpravy vzdělávacího obsahu pro žáky se speciálními vzdělávacími potřebami. Dále ŠVP musí obsahovat personální zabezpečení, stanovení materiálních a bezpečnostních podmínek práce a ochrany zdraví, za nichž se vzdělávání v konkrétní škole nebo školském zařízení uskutečňuje. (Národní pedagogický institut České republiky– online)

Cíle ŠVP musí být formulovány vždy jasně a srozumitelně, a to jak pro pedagogy, tak i pro rodiče. *„Pedagogové se s ním identifikují a aktivně s ním pracují“.* (Trojan, 2017, s.83)

4.2.1 Učební plán

Učební plán je nedílnou součástí koncepce školy, v tomto konkrétním případě VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1. Pokud si učební plán rozebereme na jednotlivé složky, jsou v plánu uvedeny konkrétní předměty dané školy. Předměty mají stanoveno, ve kterém ročníku a v jaké časové dotaci budou vyučovány. Dále je zde uvedena celková týdenní dotace. Předměty jsou rozděleny na povinné, povinně volitelné a volitelné. *„Učební plán jednotlivých vzdělávacích programů je stanoven rámcově a ředitel rozhoduje o tom, jaká časová dotace bude přidělena jednotlivým vyučovacím předmětům“.* (Kalhous, Obst, 2009 s. 140)

V níže uvedené tabulce č.1 je uveden učební plán pro obor 53–43–M/01 - Laboratorní asistent [4](ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 22-23)

[4] Citace z ŠVP, které byly využity v kapitole 4, byly čerpány z písemných interních zdrojů Vyšší odborné školy zdravotnické a Střední zdravotnické školy, Alšovo nábřeží 6, Praha 1

Vzdělávací oblast/Obsahový okruh	Předmět	Studium				Týdenní dotace(celkem + disponibilní)
		1. ročník	2. ročník	3. ročník	4. ročník	
Povinné předměty						
Jazykové vzdělávání a komunikace	Český jazyk a literatura	2+1	3	3	2+1	**10+2**
	Anglický jazyk	3	3+1	2+1	2	**10+2**
	Konverzace v anglickém jazyku			0+1		**0+1**
Společenskovědní vzdělávání	Dějepis	2	2			**4**
	Občanská nauka	1	0+1	0+1		**1+2**
Přírodovědné vzdělávání	Fyzika	2	2			**4**
	Chemie	0+3	0+3			**0+6**
	Biologie	0+2				**0+2**
Matematické vzdělávání	Matematika	3	3	1+1	0+2	**7+3**
Vzdělávání pro zdraví	Tělesná výchova	2	2	2	2	**8**
Vzdělávání v informačních a komunikačních technologiích	Informační a komunikační technologie	2	2			**4**
Ekonomické vzdělávání	Ekonomika				2	**2**
Odborné vzdělávání	Somatologie	2				**2**
	Odborný latinský jazyk	0+2				**0+2**
	Patologie		2			**2**

Vzdělávací oblast/Obsahový okruh	Předmět	Studium				Týdenní dotace(celkem + disponibilní)
		1. ročník	2. ročník	3. ročník	4. ročník	
	Cvičení z chemie	1	1			**2**
	Základy genetiky		1			**1**
	Cvičení z biologie	1				**1**
	Analytická chemie		3			**3**
	Biochemie			2	2	**4**
	Laboratorní technika	3				**3**
	Vybrané laboratorní metody			2		**2**
	Výchova ke zdraví a veřejné zdravotnictví		1			**1**
	První pomoc	1				**1**
	Klinická biochemie		2	2	2	**6**
	Cvičení z klinické biochemie			4	4	**8**
	Histologie a histologická technika			2	2	**4**
	Cvičení z histologie a histologické techniky			2	2	**4**
	Hematologie a transfuzní služba			2	2	**4**
	Cvičení z hematologie a transfuzní služby			2	2	**4**

Vzdělávací oblast/Obsahový okruh	Předmět	Studium				Týdenní dotace(celkem + disponibilní)
		1. ročník	2. ročník	3. ročník	4. ročník	
	Mikrobiologie, imunologie a epidemiologie		2	2	2	**6**
	Cvičení z mikrobiologie a imunologie			2	2	**4**
Volitelné předměty						
Volitelné předměty • Volitelná konverzace v cizím jazyku • Matematický seminář					0+2	**0+2**
Celkem hodin		**33**	**34**	**34**	**33**	**112+22**

Tabulka 1 - Učební plán – obor Laboratorní asistent

(ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 22-23)

4.2.2 Učební osnovy

Učební osnovy jsou obvykle zpracovány rámcově, a to pro každý vyučovací předmět, ať již je povinný, povinně volitelný či volitelný. Struktura učebních osnov je tvořena ze dvou částí. V první části nám stanovuje základní pojetí předmětu, cíle a metody práce, ve druhé části nám uvádí jednotlivé tematické celky a jednotlivá témata. Posloupnost jednotlivých tematických celků a časový rámec, který bude potřebný pro jednotlivé tematické celky a jednotlivá témata, si stanovuje učitel daného předmětu. (Kalhous, Obst, 2009, s. 140)

V případě předmětu cvičení z histologie a histologická technika máme ve 3. ročníku stanoveno celkem 19 tématických celků a ve 4. ročníku 11 tématických celků vycházejících z ŠVP. Jejich časový rámec je rozpracován v tematickém plánu.

Vlastnímu zpracování tematického plánu předchází porada předmětové a metodické komise, na které se synchronizují časové rámce témat tak, aby teoretická příprava předcházela praktickému vyučování a dále, aby byl časový rámec shodný i v jednotlivých skupinách, na něž se žáci v rámci praktického vyučování dělí.

4.2.3 Mezipředmětové vztahy

Mezipředmětové vztahy dále poukazují na vzájemný obsah a charakter u odborných předmětů a praktického vyučování, ale i vzájemnou propojenost s předměty všeobecně vzdělávacími. Dále jsou mezipředmětové vztahy stanoveny učebním plánem a učebními osnovami, uspořádáním učiva v jednotlivých předmětech a v neposlední řadě průběhem vyučovacího procesu. Každý učitel musí dokonale znát učební plán, učební osnovy, učebnice odborných předmětů a profil absolventa daného oboru. Je zde důležitá i vzájemná spolupráce učitelů s předmětovou a metodickou komisí.

Hlavním cílem mezipředmětových vztahů je navazování na znalosti, které žák již získal či získává v jiných předmětech, vzájemným propojováním znalostí, které vedou u žáka k rozvoji především systémového myšlení a minimalizuje se rozvoj tzv. předmětové izolovanosti. (Čadílek, Loveček, 2005, s. 114)

4.2.4 Tématický plán

Vlastní tématický plán si zpracovává sám každý učitel daného předmětu, při jeho zpracování vychází z učebních osnov daného předmětu. Stanovuje nám obsah a časový rámec daného učiva, které je rozvrženo do jednotlivých tematických celků a témat, dále může obsahovat poznámky s využitými didaktickými technikami, metodami a formami. Vypracovaný tematický plán předkládá učitel k posouzení předmětové komisi. Závěrečné schválení tematického plánu provádí ředitel školy. Tematický plán může být učitelem využíván dlouhodobě, dokud není zapotřebí jeho inovace. (Čadílek, Loveček, 2005, s. 110)

5 Didaktická analýza učiva

Didaktickou analýzu bychom mohli shrnout jako celkovou činnost učitele při plánování učiva. Jedná se myšlenkové procesy, které umožňují pojmout učební látku z pedagogického hlediska a přeměnit ji na učivo, které dále dělíme na učivo základní, rozšiřující a doplňující (prohlubující), ale i jeho uspořádání. Podroužek (1998) charakterizuje didaktickou analýzu takto: *„Didaktická analýza je myšlenková činnost učitele nebo také metoda, která mu umožňuje pochopit obsah, rozsah a strukturu učební látky a najít výchovnou a vzdělávací hodnotu učební látky. Dále stanovit konkrétní výukové cíle v souladu s obecnými cíli výchovy a vzdělání v určitém učebním předmětu, v určitém ročníku a na určitém stupni školy".*[5] (metodický portál RVP.cz)

Didaktickou analýzu učiva můžeme také jednoduše formulovat jako *„Soubor znalostí a dovedností,* které nám mají pomoci *učinit učivo „vyučovatelným".* (Kalhous, Obst, 2009, s. 143)

5.1 Učivo

Učivo můžeme shrnout jako celek poznatků a činností, které si má žák osvojit v průběhu vyučování, a to především v podobě získaných vědomostí, dovedností, ale také správných návyků a postojů. Hlavním principem pro utváření vědomostí jsou procesy vnímání, myšlení a paměti. Tyto procesy probíhají na základě vysvětlení a vlastního pochopení daného učiva. Nesmíme opomenout vlastní praktické použití učiva. (Čadílek, Loveček, 2005, s.24)

Učivo, které vstupuje do vyučovacího procesu, nemůžeme pojmout jako pevný celek, jelikož prochází změnami v procesu osvojování žáky. *„Postupně prochází stavem projektovým, prezentačním, komunikačním, interiorizačním a aplikačním, přičemž prodělává značné změny".* Pokud se zaměříme na jednotlivé stavy, projektový se týká vlastní přípravy učitele, kdy je učivo ve stavu učitelových příprav, které vycházejí z učebních osnov. Stav prezenční je doba, kdy je žákům prezentováno učivo například pomocí učebnice, výkladu či prezentací. Komunikační stav je fáze, při níž se žák s učivem seznamuje, aby si jej následně vnitřně osvojil, tedy interiorizoval. (Maňák, Janík, Švec, 2008, s. 25)

[5] Odborný článek – autor Mikesková, 2012, Didaktická analýza učiva dostupné z: metodický portál rvp.cz.

Na učivo se může nahlížet z několika úhlů pohledu:

Budeme-li nahlížet na učivo z pohledu laika, bude se nám učivo jevit jako seznamování se s nepřeberným množstvím nových informací ve formě poznatků, údajů a z toho vyplývajících faktů, které si žák musí osvojit. Výše zmíněné si pak žák musí osvojit a naučit se je propojovat různými způsoby s již osvojenými vědomostmi. Pro vlastní osvojení však nestačí, aby žák pouze memoroval, musí se rozvíjet i schopnost propojování různých poznatků, dat a operací, které vedou k hlubšímu pochopení a osvojení učiva. V současnosti se stále setkáváme s vyžadováním mechanického učení, které vede nesporně k osvojení učiva, ale následná reprodukce učiva žákem je bez vnímání souvislostí. Zaměříme-li se na učivo blíže, vyjeví se nám, že učivo zahrnuje *„zcela odlišné poznatkové prvky, které je nutno si osvojit různým způsobem. Rozlišuje vědecké a běžné poznávání, do něhož zařazuje také učební poznávání, které zahrnuje všechny druhy lidského poznávání a na vyšších úrovních se blíží poznávání vědeckému“.* (Maňák, Janík, Švec, 2008, s. 27)

Budeme-li pohlížet na učivo z pohledu školy, bude jeho obsah pojímán jako obsah vyučování či vzdělávání a posléze jako výsledek výuky školního vzdělávání. U učiva se setkáváme v tradičním pojetí se třemi složkami. Jedná se o vědomosti, dovednosti a hodnotovou orientaci žáka. V neposlední řadě mezi složky školního učení můžeme zařadit i vlastnosti člověka. Výše zmíněné složky učiva můžeme shrnout jako cílové kompetence žáka. *„Například Stehr (2001) vymezuje v širším pojetí znalosti, resp. vědění, jako „připravenost, kompetentnost k jednání“, jako předpoklad, schopnost „něco uskutečnit“.* (Kalhous, Obst, 2009, s. 126)

5.1.1 Obsahová dimenze učiva

Obsahová dimenze se týká obsahu vzdělávání tedy učiva. Učivu, které je zprostředkováno ve výuce, je důležité věnovat primární pozornost jak z hlediska žáka, tak učitele. Učitel dříve, než je možné učivo předat žákům, musí provést obsahově náročnou didaktickou transformaci poznatků, při niž dochází k přeměně učební látky na učivo. Učivo a posléze znalosti si žáci osvojují. (Maňák, Janík, Švec, 2008, s. 25)

5.2 Diferenciace učiva

V případě diferenciace neboli členění učiva je důležitým faktorem pracovat s fakty a vědomím, že ne všichni žáci mohou dosáhnout stejného rozsahu v osvojování učiva. Schopnosti jednotlivých žáků jsou značně rozdílné a z tohoto poznatku vycházíme při rozdělení učiva na základní, rozšiřující a doplňující (prohlubující).

5.2.1 Učivo základní

Pokud bychom se nejprve zaměřili na základní učivo, je zajisté důležité zmínit, že u počátků stál profesor Otokar Chlup, jenž jako jeden z prvních pedagogů vyslovil požadavek na vymezení základního učiva. Základní učivo chápal jako *„prvky podstatné, nezbytné, formulující smysl, ducha i tělo člověka, prvky tvořící důležité stránky v řetězu vědní soustavy, vyhovující cíli a účelnosti se zřetelem k potřebám individuálním, odstupňované podle věku a schopností dětí“.* (Maňák, Janík, Švec, 2008, s. 25)

Současné pojetí se od původního příliš neliší, ve své podstatě nám základní učivo stanovuje minimální hranice z hlediska obsahu a stupně osvojení učiva. Základní učivo nám dává též hranici mezi věděním a nevěděním, a každý žák si jej musí osvojit v takové míře, aby mohl být hodnocen v rozsahu výborně – dostatečně. Základní učivo nám vytváří základní osu, kterou musí žák zvládnout, aby mohl splnit základní vzdělávací program. Učivo základní má být probráno a procvičeno ve škole, dále musí být zřetelně odděleno od učiva prohlubujícího a rozšiřujícího.[6](Pecina, 2012, s. 38)

5.2.2 Učivo rozšiřující

Učivo rozšiřující dává možnost prohloubení základního učiva a jeho rozšíření o další prvky, a to především pro rozvoj nadání a rozšíření rozhledu. Dále nám vymezuje rozsah učiva z hlediska obsahu a struktury. Žáci využívají osvojených znalostí, které nabyli i v rámci ostatních předmětů, a jsou schopni osvojené poznatky, vědomosti a dovednosti vzájemně propojovat. Znalosti a dovednosti, jež si žáci osvojí v rámci rozšiřujícího učiva, jsou pak schopni využít k vykonávání složitější práce. (Pecina, 2012, s. 38)

[6] Online zdroj – Pecina, Didaktika praktického vyučování pro technické obory 1. díl. Výuková podpora. 2012.

V rámci předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky se rozšiřující učivo využívá převážně při rozboru a zakreslování mikroskopického obrazu jednotlivých struktur v tkáních v trvalých preparátech. Žáci jsou schopni preparát nejprve dle pracovního potupu zhotovit, následně obarvit příslušnou barvicí metodou a pomocí mikroskopu zhodnotit a zakreslit mikroskopický obraz trvalého preparátu.

5.2.3 Učivo doplňující (prohlubující)

Učivo doplňující (prohlubující) ve své podstatě skrývá detailnější a hlubší vědomosti. Primárně je určeno pro žáky nadané a se zájmem o daný obor (nebo předmět). V případě předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky se jedná vždy o žáky, kteří plánují setrvat v daném oboru, tzn. chtějí po ukončení studia nastoupit do histologických laboratoří, či pokračovat dále ve studiu na lékařských fakultách. Tito žáci běžně dosahují v taxonomii dle Blooma 5. a 6. úrovně, což znamená, že jsou schopni myslet velmi tvořivě, vytvářejí si syntézu a hodnotí danou problematiku, jsou velmi zvídaví. Ze strany učitele je třeba tento fakt zohlednit a již ve fázi přípravy na vyučování počítat s časovým rámcem i pro doplňující (prohlubující) učivo. Učivo tohoto charakteru již vyžaduje individuální přístup k žákům. (Pecina, 2012, s. 38)

5.3 Pojmová a vztahová analýza

Pojmová a vztahová analýza se zabývá především samotnými otázkami výběru učiva stanoveného pro daný předmět. V tomto konkrétním případě se bude zabývat předmětem cvičení z histologie a histologické techniky. Tento předmět je zařazen dle učebního plánu do 3. a 4. ročníku s časovou dotací dvou hodin jedenkrát týdně. Jednotlivé tématické celky a z toho vyplývající témata jsou dána osnovami výše zmíněného předmětu, které vycházejí z ŠVP pro obor laboratorní asistent. ŠVP je dáno RVP pro vzdělávací obor 53–43–M/01 Laboratorní asistent.

5.3.1 Tematické celky

Předmět Cvičení z histologie a histologické techniky je vyučován ve 3. a 4. ročníku oboru Laboratorní asistent.

Jednotlivá témata na sebe vzájemně navazují a zároveň jim předchází znalosti, které si žáci osvojují v rámci teoretické přípravy v předmětu Histologie a histologická technika. Důraz je kladen na přesnou odbornou lékařskou terminologii.

Ve 3. ročníku máme stanoveno celkem 19 tématických celků vycházejících z ŠVP:

Histologická laboratoř, Světelný mikroskop, Histologické vyšetření, Fixace, Buňka a buněčné organely, Zalévání tkání do různých médií, Krycí a žlázové epitely, Resorpční epitel, Krájení parafínových bloků, Barvení parafínových řezů hematoxyline a eozinem, Svalová tkáň, Nervová tkáň, Znázornění kolagenních vláken, Srdce a cévy, Lymfatické orgány, Znázornění elastických a retikulárních vláken, Žlázy s vnitřní sekrecí, Trávicí systém, Pojiva.

Ve 4. ročníku je stanoveno celkem 11 tematických celků vycházejících z ŠVP:

Cytologická barvení, Jádrová barvení, Dýchací systém, Přehled histochemických metod (průkaz polysacharidů a průkaz lipidů), Mužský pohlavní systém, Ženský pohlavní systém, Nervový systém, Neurohistologické vyšetřovací metody, Speciální a histopatologické metody, Močový systém, Histochemický průkaz enzymů. (ŠVP – VOŠ a SZŠ Alšovo Nábřeží 6, Praha 1, s. 293–296)

5.3.2 Jednotlivá témata

Tematické celky se dále dělí na jednotlivá témata. Jako příklad je uvedené téma – Průkaz polysacharidů – PAS reakce s kontrolním řezem. Toto téma je součástí tematického celku Přehled histochemických metod, kam zařazujeme průkaz polysacharidů. Průkaz polysacharidů se dále dělí na dvě dělící témata, a to průkaz polysacharidů pomocí PAS reakce a průkaz polysacharidů pomocí PAS reakce s kontrolním řezem.

Výše zmíněné téma bude podrobně zpracováno v praktické části v kapitole 6.1.Ukázka vyučovací hodiny s využitým studijního materiálu.

5.4 Dimenze ideová a metodická

Dimenze ideová se zaměřuje především na cílové hodnoty, kterých chceme v rámci výchovně – vzdělávacího procesu dosáhnout.

Edukační cíle nám určují celou řadu ideálů, představ, vizí a pokroků, kterých chceme dosáhnout.

Dimenze metodická patří problematice vlastního dosažení stanovených cílů výchovně vzdělávacího procesu, dále sem náleží organizační formy výuky, výukové metody a didaktické prostředky. (Maňák, Janík, Švec, 2008, s.23–25)

5.4.1 Cíle

Cíl má téměř každá záměrná lidská činnost a můžeme ho jednoduše definovat jako něco, čeho chceme dosáhnout pomocí předem promyšleného plánu. Cíl slouží učiteli jako základ pro měření efektivity výuky ve vztahu k poznatkům, znalostem, dovednostem i chování, které si má žák osvojit.

Obecné cíle

Obecné cíle jsou jasně a stručně vyjádřeny v poměrně širokém rozsahu, jsou všeobecné, a nejsou tudíž dostatečně konkrétní. Zjednodušeně řečeno, nám ukazují pouze směr, kterým se chce učitel vydat.

Dílčí cíle (cíle úseků)

Dílčí cíle tvoří hlavní podporu při vytváření cílů konkrétních. Jsou stanovovány učitelem pro každou vyučovací hodinu. Pro plánování výuky musí být cíle formulované zcela konkrétně a podrobně – takto formulované cíle se nazývají učební požadavky. *„Učební požadavky jsou formulace popisující schopnosti, které se mají žáci naučit a jejichž osvojení je ověřitelné“.*

Konkrétní učební požadavky

Konkrétní učební požadavky nám přesně a jasně stanovují, co si má žák osvojit. musí z nich být zcela přesně zjevné, zda bylo cíle dosaženo, či nikoliv. Dále musí být konkrétní učební požadavky v souladu s vědeckým poznáním a v neposlední řadě musí vyhovovat učiteli a žákům. (Petty, 2013, s. 393–397)

Klasifikace konkrétních úkolů v oblasti kognitivní, afektivní a psychomotorické

Podle B.S. Blooma lze klasifikovat učební proces do tří oblastí:

Kognitivní cíle (vzdělávací) – týkají se osvojení vědomostí a intelektuálních dovedností. Tyto dovedností seřadil Bloom do šesti hierarchicky uspořádaných kategorií, kdy je obtížnost stanovená od nejnižší po ty nejvyšší – znalost, porozumění, aplikace, analýza, syntéza a hodnocení.

Afektivní cíle (postojové) - se týkají morálních a jiných postojů, názorů, hodnot, ale i schopnosti vnímat a vyjadřovat, či naopak potlačovat emoce.

Psychomotorické cíle (výcvikové) – se týkají osvojování senzomotorických dovedností – jsou hlavní náplní praktického vyučování a odborného výcviku. (Petty, 2013, s. 393–397)

5.4.2 Organizační formy vyučování

Organizační forma vyučování nám dává možnost naplánování a uspořádání podmínek výuky takovým způsobem, který povede k naplnění specifických výukových cílů. Realizace cílů musí být naplňována v souladu s didaktickými zásadami, vyučovacími metodami a s využitím didaktických prostředků. Organizační formu vyučování tedy utvářejí vnější a vnitřní podmínky, v nichž je realizován vyučovací proces.

Organizační formy vyučování lze rozdělit do tří základních skupin podle způsobu organizace, podle zřetele k jednotlivci a kolektivu a dále z hlediska způsobu plánování výchovně – vzdělávací práce školy.

V rámci praktického vyučování předmětu cvičení z histologie a histologické techniky se využívá organizační forma vyučování podle způsobu organizace, a to vyučovací hodina, praktické vyučování a samostatná práce žáků. Dále se využívá organizační forma vyučování, tedy individuální a skupinová.

Z hlediska způsobu plánování výchovně vzdělávací práce školy jsou obsaženy všechny složky, tedy učební plán, učební osnovy, studijní materiál, tematický plán a v neposlední řadě je nezbytnou součástí příprava na vyučování (normální či široká, která je volena dle náročnosti jednotlivých témat). (Čadílek, Loveček, 2005, s. 91)

5.4.3 Vyučovací metody používané ve výuce odborných předmětů

Vyučovací metoda je zjednodušeně řečeno cesta, způsob, který vede k naplnění cíle, charakter metody nám určuje daný cíl. Vyučovací metoda je promyšlený a cílevědomě uspořádaný systém činností a postupů učitele, který podporuje vlastní aktivitu žáků tak, aby mohlo dojít k dosažení vzdělávacích cílů.

V rámci předmětu cvičení z histologie a histologické techniky jsou využívány metody:

- metody z hlediska etap vyučovacího procesu: motivační, expoziční, fixační a diagnostická, aplikační a dále metody hodnocení osvojeného učiva
- metody slovní: monologické, a to nejčastěji vysvětlování, vypravování a instruktáž, dialogické metody – diskuze, metody písemných prací, metody práce s technickou dokumentací
- metody názorně – demonstrační: předvádění, pozorování
- metody praktické: laboratorní činnost
- metody z hlediska aktivity a samostatnosti žáků: metody problémové

(Čadílek, Loveček, 2005, s. 42-68)

5.4.4 Materiální didaktické prostředky

Didaktické prostředky se dělí na nemateriální a materiální. *„Didaktickými prostředky a jejich kombinacemi působí učitel na žáky, stimuluje je pro učení, navozuje smyslový a rozumový kontakt s učivem, motivuje, organizuje poznávací proces v celku i v jeho fázích, řídí, reguluje a kontroluje učební činnosti žáků tak, aby bylo ve stanoveném čase dosaženo stanovených cílů“.* Didaktické prostředky nemateriální vesměs obsahují již výše popsané metody a formy, ale i mezipředmětové vztahy atd. Z pohledu odborného výcviku či praktického vyučování jsou nezastupitelné pro realizaci vyučování didaktické prostředky materiální. Mezi materiální didaktické prostředky můžeme zařadit – učební pomůcky, metodické pomůcky, didaktickou techniku, školní potřeby i výukové prostory a prostředí. (Rambousek, 2014, s. 5-10)

PRAKTICKÁ ČÁST

6 Studijní materiál

Předmět cvičení z histologie a histologické techniky má ve své podstatě žákům ozřejmit znalosti získané v přímé návaznosti na teoretickou přípravu v odborném předmětu histologie a histologická technika, která předchází praktickému vyučování. Hlavní náplní a cílem je přiblížit se s žáky reálné práci v rutinní histologické laboratoři v prostředí a prostoru školní laboratoře.

Žáci se musí během praktického vyučování, které je na předmět stanoveno v časové dotaci dvou hodin jedenkrát týdně, zvládnout seznámit s učivem, osvojit si jej a v neposlední řadě nabýt veškerých požadovaných kompetencí, které stanovuje profil absolventa. Aby tyto všechny požadavky mohly být řádně naplněny, je velmi důležité si veškerý čas při plánování hodin řádně promýšlet a naplánovat. Proto je nezbytné, aby studijní materiál vycházel vždy z didaktické analýzy učiva, která je navázána na rámcový vzdělávací program, školního vzdělávacího programu. Nemůžeme také opomenout důležitost oborové porady a předmětové komise.

Výzkum stavu výuky histologie v České republice

Na význam a prospěšnost vytváření studijních materiálů se zaměřil i výzkum uskutečněný v roce 2014, který se zabýval *stavem výuky histologie na školách vyššího stupně sekundárního vzdělávání v České republice. Výzkumu se zúčastnilo celkem 260 respondentů ze všech krajů České republiky.* Výzkum realizovala Klára Maratová,

Cílem tohoto výzkumu bylo především ověřit si, jakým způsobem využívají učitelé biologie středoškolské učebnice a další zdroje pro přípravu výuky. Dále se tento výzkum mimo jiné věnoval otázce, zda jsou si učitelé schopni obstarávat trvalé histologické preparáty. *Na základě odpovědí bylo zjištěno, že přesto že 98 % učitelů biologie považuje výuku histologie za důležitou, pouze 33 % učitelů ji považuje za přínosnou pro všechny žáky bez ohledu na jejich budoucí povolání. Dále bylo zjištěno, že pouze 25 % respondentů má pro výuku k dispozici kvalitní trvalé preparáty v dostatečném množství.* (Trendy v didaktice biologie, 2014, s. 52)

Vlastní vytváření studijního materiálu

Vlastnímu vytváření studijního materiálu v tomto případě předcházel sled událostí, které bych zde ráda zmínila. Jen tak bude zřejmé, co vedlo k jeho vytvoření. V první řadě podotýkám, že jsem absolventem Vyšší odborné zdravotnické školy (VOŠ) a Střední zdravotnické školy (SZŠ), Alšovo nábřeží 6/82, Praha 1. Tuto školu jsem v roce 2003 ukončila maturitní zkouškou (obor zdravotní laborant), následně jsem přijala pracovní nabídku své učitelky praktického vyučování a nastoupila na Oddělení patologie do Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice Praha, kde dále získávám pracovní zkušenosti na pozici zástupce vedoucí laborantky. V roce 2017 jsem složila státní atestační zkoušky se specializovanou působností v oboru histologie (odbornost specialisty Zdravotní laborant pro histologii). V roce 2017 jsem začala vyučovat na Vyšší odborné zdravotnické škole a Střední zdravotnické škole, Alšovo nábřeží 6/82, Praha 1, praktické vyučování v předmětu – Cvičení z histologie a histologické techniky. Studijní materiál byl poprvé žáky použit v rámci praktické výuky v září v roce 2019.

Původní pojetí výuky předmětu

Předmět byl z počátku vyučován tradičním způsobem, kdy hlavní oporou byla kniha Histologická technika, jejímž autorem je prof. MUDr. Zdeněk Vacek, DrSc., žáci si zapisovali učivo do sešitu. Tento koncept výuky byl ale z mého pohledu značně nevýhodný, jelikož velkou část vyučovací hodiny představovalo psaní poznámek a na vlastní praktickou činnost zbývalo málo času. Proto byl postupně tento koncept z mé strany nahrazován pracovními listy, které byly zaměřené na jednotlivé tematické části. Tento koncept byl podporován vedoucí oboru i vedením školy, žáky byl pozitivně přijímán. Na základě podnětu a podpory vedení školy jsem pracovní lisy zpracovala do uceleného studijního materiálu. Při tvorbě studijního materiálu jsem čerpala z knih prof. MUDr. Zdeňka Vacka, DrSc., z příručky Digitální mikro a makrofotografie pro učitele, ale především z interních dokumentů Oddělení patologie, Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice Praha. Rovněž jsem využila zkušeností, které jsem nabyla během let své praxe na výše zmíněném pracovišti, kde působím dodnes.

Uspořádání studijního materiálu

Žákům byl předložen studijní materiál určený pro předmět Cvičení z histologie a histologické techniky, jehož obsah byl vytvořen ve formě kombinace studijního textu a pracovního sešitu. Obsah studijního materiálu byl důmyslně sestaven tak, aby jednotlivé tématické celky (studijní materiál obsahuje 40 tematických celků) a jednotlivá témata na sebe navazovala a plně odpovídala všem dokumentům důležitým pro plánování výuky. Součástí studijního materiálu jsou i volné listy určené k mikroskopování trvalých preparátů. Trvalé preparáty (didaktická pomůcka) jsem vytvořila a v případě potřeby dotvářím v histologické laboratoři, kde pracuji. Žáci trvalé preparáty mikroskopují a zakreslují si jejich mikroskopický obraz a popis na tyto volné listy. Studijní materiál obsahuje v menším rozsahu i mikro a makrofotografie, které dokreslují určité činnosti, které nemohou být z technického důvodu náročnosti na vybavení školní laboratoře realizovány s žáky přímo v rámci praktického vyučování. Žáci se s nimi seznamují reálně až v rámci souvislé měsíční praxe na odborných pracovištích, tedy v histologických laboratořích.

Obsah studijního materiálu byl sestaven i v souladu s maturitními okruhy pro praktickou maturitní zkoušku, což přináší značné výhody pro učitele i žáka, jelikož žák přesně ví, jaké znalosti a v jakém rozsahu budou v rámci maturitní zkoušky vyžadovány. Nemá potřebu hledat vypracované okruhy k praktické maturitní zkoušce v prostředí internetu, kde není záruka, že jím zvolený zdroj je kvalitně zpracován. V neposlední řadě se studijní materiál prokázal velmi přínosný v rámci přechodných období při distanční výuce.

Doplněk pro tvorbu mikro a makro fotografie

Tuto část bych ráda uvedla podrobněji, neboť se domnívám, že je velmi podstatná a žáky obohacuje o nové dovednosti. Tvorba mikro a makrofotografie nejen dotváří studijní materiál, který je žákům předkládán, ale žáci se naučí v rámci výuky a využívání studijního materiálu pořizovat si makro a mikrofotografie své práce. V první řadě si žáci pořizují makrofotografie preparátů, které si sami zhotovili v průběhu výuky a dále si pořizují mikrofotografie trvalých preparátů.

V rámci pořizování mikro a makrofotografií používají žáci svá mobilní zařízení, pro tento účel je mají povolené využívat v rámci výuky. Postup v rámci pořizování fotografii vychází ze základních pravidel:

Jednoduché mikro a makrofotografie můžeme pořizovat i mobilním zařízením. U pořizování mikrofotografie to provádíme následujícím postupem. Přitiskneme čočku mobilního telefonu těsně na okulár mikroskopu, v němž máme vyložený preparát, zaostříme a vytvoříme tak mikrofotografii. U pořizování makrofotografií používáme především vzájemný poměr velikosti předmětů. To znamená, že například vzdálenost mezi například obarveným preparátem a mobilním preparátem se pohybuje okolo 25 cm.
(Novotný, Polesná, 2013, s. 8–17)

Takto pořizované mikro a makrofotografie během výuky ve 3. a 4. ročníku využívají žáci následně ve 4. ročníku k přípravě na praktickou maturitní zkoušku. součástí praktické maturitní zkoušky je totiž rozeznávání mikroskopické stavby jednotlivých orgánů.

Efektivní časový managment

S využitím studijního materiálu v rámci výuky byl získán nesporně širší časový rámec pro vlastní nácvik pracovního postupu v rámci vyučovací hodiny. Dále se domnívám, že pokud žáci mají ve studijním materiálu již popsány jednotlivé kroky pracovního postupu barvení, eliminuje se tím nejen ztráta času při vlastním nácviku činnosti, ale především i možnost chybného zaznamenávání vlastního postupu barvení.

Dále jsem přesvědčena, že právě skutečnost, že pracuji každý den v histologické laboratoři a zároveň vyučuji praktickou výuku, mám velkou možnost uplatnit efektivní time managment. Praktická výuka je zaměřena v určité rovině na co nejreálnější přiblížení práce v prostředí laboratoře. Myslím si, že mohu díky svým schopnostem lépe volit načasování a posloupnost úkonů tak, jak se reálně provádějí v histologické laboratoři. Spatřuji v tomto nespornou výhodu proti kolegům, kteří učí tento předmět pouze na základě teoretických znalostí.

Eliminace chyb u žáků se specifickými poruchami učení (SPU)

Nejprve je nutno předeslat, že i na oboru laboratorní asistent, potažmo v praktickém vyučování předmětu cvičení z histologie a histologické techniky, se vyskytují žáci s poruchami učení. U těchto žáků velmi často vznikají systematické chyby, pokud by si měli text zapisovat v rámci diktování poznámek. Toto studijní materiál eliminuje.

Dále je možné podotknout, že i v rámci rutinní práce v histologických laboratořích jsou laboranty též oficiálně využívány pracovní postupy v tištěné podobě, respektive se to přímo vyžaduje na základě akreditace Českého institutu pro akreditaci (ČIA). Český institut pro akreditaci hodnotí také kvalitu histologické laboratoře na Oddělení patologie v Ústřední vojenské nemocnici – Vojenské fakultní nemocnici v Praze.

Komu je studijní materiál určen

Popisovaný studijní materiál je určen výhradně žákům Vyšší odborné zdravotnické školy a Střední zdravotnické školy, Alšovo nábřeží 6, Praha 1. Studijní materiál bude v celém rozsahu uveden jako příloha této bakalářské práce (příloha č. 1).

6.1 Ukázka vyučovací hodiny s využitým studijního materiálu

Téma: Průkaz polysacharidů – PAS reakce s kontrolním řezem

Pro ukázku vyučovací hodiny s využitím studijního materiálu bylo zvolené téma Průkaz polysacharidů – PAS reakce s kontrolním řezem. Toto téma je součástí tematického celku Přehled histochemických metod, kam zařazujeme i průkaz polysacharidů. Průkaz polysacharidů se dále se dělí na dvě dělící témata, a to průkaz polysacharidů pomocí PAS reakce a průkaz polysacharidů pomocí PAS reakce s kontrolním řezem.

Zvolení konkrétního tématu ukázkové vyučovací hodiny

Pro ukázku vyučovací hodiny bylo téma Průkaz polysacharidů pomocí PAS reakce s kontrolním řezem zvoleno zcela záměrně. Žákům vždy činí značné potíže pochopení jednotlivých souvislostí mezi metodami PAS reakce a PAS reakce s kontrolou. Z pohledu žáků je vždy velmi náročné porozumět a určit správnou interpretaci výsledků daného postupu barvení, jež se na první pohled zdá vždy jasné a srozumitelné. Největší obtíž činí právě výše zmíněná interpretace výsledků, která se určuje tak, že je-li průkaz PAS reakce pozitivní, jedná se ve výsledku o červenofialově zabarvenou nerozpustnou substanci. Na tu nám navazuje PAS reakce s kontrolním řezem, která nám, velmi zjednodušeně řečeno má pomoci určit, zda se jedná o přítomnost glykogenu, nebo zda jde o jasně PAS pozitivní diazorezistentní polysacharid.

6.1.1 Plán vyučovací hodiny

V rámci přípravy na vyučovací hodinu byly nejprve vydefinovány základní údaje o škole a oboru vzdělání, kde vzdělávání probíhá. Dále byl popsán předmět a cílová skupina žáků. V rámci přípravy konkrétního plánu na vyučovací hodinu bylo zvoleno téma Průkaz polysacharidů – PAS reakce s kontrolním řezem. Toto téma je součástí tematického celku – Přehled histochemických metod. Cílovou skupinou byla skupina 12 žáků, konkrétně se jednalo o 12 dívek ze 4. ročníku.

V rámci přípravy plánu vyučovací hodiny a k její následné realizaci byly použity metody monologu (výkladu), metody podle etap vyučování. Motivační a expoziční metody byly využity k seznámení s novým pracovním postupem. Metoda aplikační se uplatnila k vlastnímu provedení nové činnosti. Názorně – demonstrační byla použita při pozorování a manipulaci s předměty a předvádění činnosti. Metoda dovednostně – praktická následovala při nácviku pracovní činnosti a v neposlední řadě se uplatnili i metody aktivizační a motivační.

Dle své zkušenosti s výukou se domnívám, že v rámci praktického vyučování předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky je žádoucí, aby se jednotlivé metody vzájemně prolínaly, z mého pohlédnu totiž zajišťují větší plynulost pochopení a propojování učiva. Domnívám se, že dobře promyšlený, vypracovaný, a hlavně v závěru úspěšně realizovaný plán vyučovací hodiny je nezbytnou součástí přípravy každého učitele.

Základní údaje plánu vyučovací hodiny

ŠKOLA: Vyšší odborná zdravotnická škola a Střední zdravotnická škola, Alšovo nábřeží 6/82, Praha 1

OBOR VZDĚLÁNÍ:	Laboratorní asistent
VYUČOVACÍ PŘEDMĚT:	Cvičení z histologie a histologické techniky
CÍLOVÁ SKUPINA:	4. ročník (skupina 12 žákyň, věk 18-19 let)
TÉMA:	Průkaz polysacharidů – PAS reakce s kontrolním řezem
ČASOVÁ DOTACE:	2x45 minut

6.1.2 Vstupní dovednosti a znalosti žáků

Opakování učiva

Opakování bylo s žáky provedeno formou pracovního listu. Průkaz polysacharidů – PAS reakce podrobná ukázka práce s pracovním listem bude popsána v kapitole 6.2 Ukázka praktického využití pracovního listu. Na základě jeho vyplnění se prokázalo, že žák umí definovat přehled histochemických metod, průkazu polysacharidů, pomocí PAS reakce.

Příklady:

Definujte, co prokazuje? *PAS pozitivní substance = glykogen, neutrální mukopolysacharidy, mukoproteiny-barví se červenofialově*

Popište, jaký je její princip? *Oxidací kyseliny jodisté se z polysacharidů uvolní aldehydické skupiny, které reagují se Schiffovo reagens za vzniku červenofialového zabarvení*

(Semerádová, 2020, s.2)

Hlavní myšlenka

Žákům byla znovu shrnuta hlavní myšlenka, kterou je důležité vždy připomínat. Tato myšlenka zároveň představuje nejvýznamnějším motivaci.

„Je důležité mít na paměti, že jen z kvalitně zhotoveného histologického preparátu je možné stanovit přesnou diagnózu“. (Semerádová, 2019, s.2)

Tento osobní citát žákům neustále vštěpuji, jako hlavní předpoklad pro jejich práci v histologické laboratoři. Vychází z poznatku, který je pro práci laboranta nezbytný. Má jim vtisknout, že práce v histologické laboratoři je neodmyslitelně spjata s osobní zodpovědností, že chyba a nezodpovědný přístup může znamenat v důsledku poškození, či dokonce smrt pacienta.

6.1.3 Nové učivo

Průkaz polysacharidů – PAS reakce s kontrolním řezem toto téma je součástí tematického celku Přehled histochemických metod, kam zařazujeme i průkaz polysacharidů.

Cíl tématu (dílčí cíle)

Cílem tématu bylo, aby žák zvládl praktický nácvik vlastního postupu (barvení) průkazu PAS reakce s kontrolním řezem v souladu s bezpečností práce a požární ochrany. Dále je třeba, aby ovládal základní orientaci ve výsledném mikroskopickém obrazu obarveného preparátu. Dílčím cílem byla snaha o kontinuální rozvoj postoje žáka k zodpovědnosti (důležitost následného stanovení Dg. lékařem patologem) a rozvoje jemné motoriky rukou.

Nové znalosti

Žákům byly předány nové znalosti nejprve v podobě faktů a vysvětlení pojmů a dále jim byla připomenuta hlavní myšlenka.

Fakta:

PAS reakce je základní reakcí k průkazu polysacharidů, slouží k průkazu PAS pozitivních substancí. PAS reakce s kontrolním řezem slouží k rozlišení PAS pozitivní substance glykogenu.

Pojmy

Polysacharidy – jsou složené sacharidy, zahrnující širokou skupinu látek různých chemických vlastností, jejichž společným rysem je rozhodující účast sacharidů na jejich skladbě.

PAS reakce – základní metoda k průkazu polysacharidů

PAS reakce s kontrolou – metoda k průkazu glykogenu

PAS pozitivní substance – je komplex glykogenu, neutrálních mukopolysacharidů, mukoprotein

Glykogen – je polysacharid, který se rozštěpí pomocí enzymů

Neutrální mukopolysacharid – můžeme prokazovat např. v žaludečním hlenu

Kyselý mukopolysacharid – můžeme zaznamenat např. v tenkém a tlustém střevě

Mukoprotein – komplex proteinu a polysacharidů s převahou proteinové složky, zahrnují též sérové globuliny. (Vacek, 1995, s. 127–129)

Výukové metody

Při výkladu nového učiva byla využita metoda výkladu. Žáci souběžně sledují textovou část studijního materiálu, kterou tvoří pracovní postup barvení. Pracovní postup, který je v rámci nového učiva využíván žáky, je totožný s tím, s nímž pracují laboranti v rutinní laboratoři, kde jsou pracovní postupy označovány PP. Dále byla využita metoda instruktáže, pomocí níž byl žákům předveden vlastní postup barvení tak, aby byli žáci schopni následně pracovní postup nacvičovat samostatně pod dohledem učitele. V rámci celého procesu je nezbytné žáky motivovat a podporovat jejich rozvoj ve všech rovinách (kognitivní, afektivní i psychomotorický). Pozitivní motivace především ve směru afektivním je nezbytná pro následnou práci ve všech zdravotnických zařízeních.

Nácvik vlastního postupu práce

Podle níže popsaného postupu a po názorné instruktáži bylo postupováno po jednotlivých krocích. Úkolem žáka bylo provést krok č. 2–10 = vlastní průkaz (barvení) PAS reakce s kontrolním řezem. Krok č.1, deparafinace, se provádí v rutinní laboratoři programy v barvících automatech s odtahem. V prostorách školní laboratoře byl proveden v digestoři pod dohledem učitele. Následně krok č. 11 byl žákem proveden rovněž v digestoři pod dohledem učitele.

Bylo zkontrolováno, zda mají žáci zapnutý plášť a zda si nasadili jednorázové rukavice. Jelikož se pracovalo s chemikáliemi, zvolili jsme rukavice nitrilové. Následně byla podložní skla označená pomocí popisovače, aby nemohlo dojit k záměně. Žáci si popsali matovanou plošku podložního skla identifikačními údaji, což v prostředí školní laboratoře představuje jméno a příjmení žáka. Dále byly jednotlivé reagencie nality do kyvet a podle postupu byla podložní skla s řezem žákem přendávána pomocí pinzety z jedné kyvety do druhé. Kyvety byly naplněny reagencií pod dolní klenutý okraj, což nám zajistilo, aby byl řez celý pokryt. Vyvarujeme se tak vysušení a znehodnocení řezů. Oplach byl proveden ve vysoké kyvetě, čas byl měřen minutkou.

Závěrečný krok byl proveden v digestoři pod dohledem učitele. V rutinní laboratoři jej provádí barvící automat kombinovaný s montovacím strojem. Po dokončení činnosti byla provedena dezinfekce pracovního prostoru, použitý kontaminovaný materiál byl vložen do odpadkového koše označeného pro likvidaci biologického materiálu. Byla provedena dezinfekce pracovního stolu pomocí povrchové dezinfekce a dále byla po sejmutí rukavic provedena pomocí dezinfekčního gelu dezinfekce rukou.

TÉMA: Průkaz polysacharidů – PAS reakce s kontrolním řezem

PAS reakce s kontrolním řezem

Žákům bylo vysvětleno, k čemu se využívá metoda PAS reakce s kontrolním řezem. Tato metoda slouží k průkazu glykogenu. Důležité, jak již bylo zmíněno, je vysvětlit žákům některé pojmy, například jim oživit v paměti, co již znají z biochemie. Musí si uvědomit, co je to glykogen, že je to polysacharid, který se rozštěpí pomocí enzymů Alfa – amylázy (ty se nacházejí i ve slinách). Dále bylo nutné žáky upozornit a vysvětlit jim, že reakce u metody PAS reakce s kontrolním řezem se provádí souběžně na dvou řezech vyšetřované tkáně, to znamená na dvou sklíčkách. U výsledků bylo velmi důležité poukázat, že pokud je reakce pozitivní v obou řezech, jde o jasně PAS pozitivní, diastázorezistentní polysacharid.

Pracovní postup:[7]

1. Deparafinace (2x5 minut xylen následuje 2x5 minut 96% alkohol)
2. Oplach v destilované vodě
   Jeden řez – kontrolní – opláchneme v destilované vodě.
   Druhý řez zůstane v destilované vodě do doby barvení.
3. Kontrolní řez – inkubace ve slinách 30 minut
4. Dostatečné vyprání řezu v destilované vodě
   Obě sklíčka:
5. 1% kyselina jodistá 1 hodina
6. Praní ve vodě 2 minuty
7. Schiffovo reagens 20 minut
8. Praní ve vodě 2 minuty
9. Mayerův hematoxylin 6 minut
10. Praní ve vodě 5 minut
11. Odvodnění (2x2 minuty 96% alkohol, následuje 2x2 minuty aceton), projasnění (2x2 minuty v xylenu), montování (provádíme pomocí syntetické pryskyřice)

[7] Pracovní postup: Barvení histologických řezů – Oddělení patologie. Praha: Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha 2014

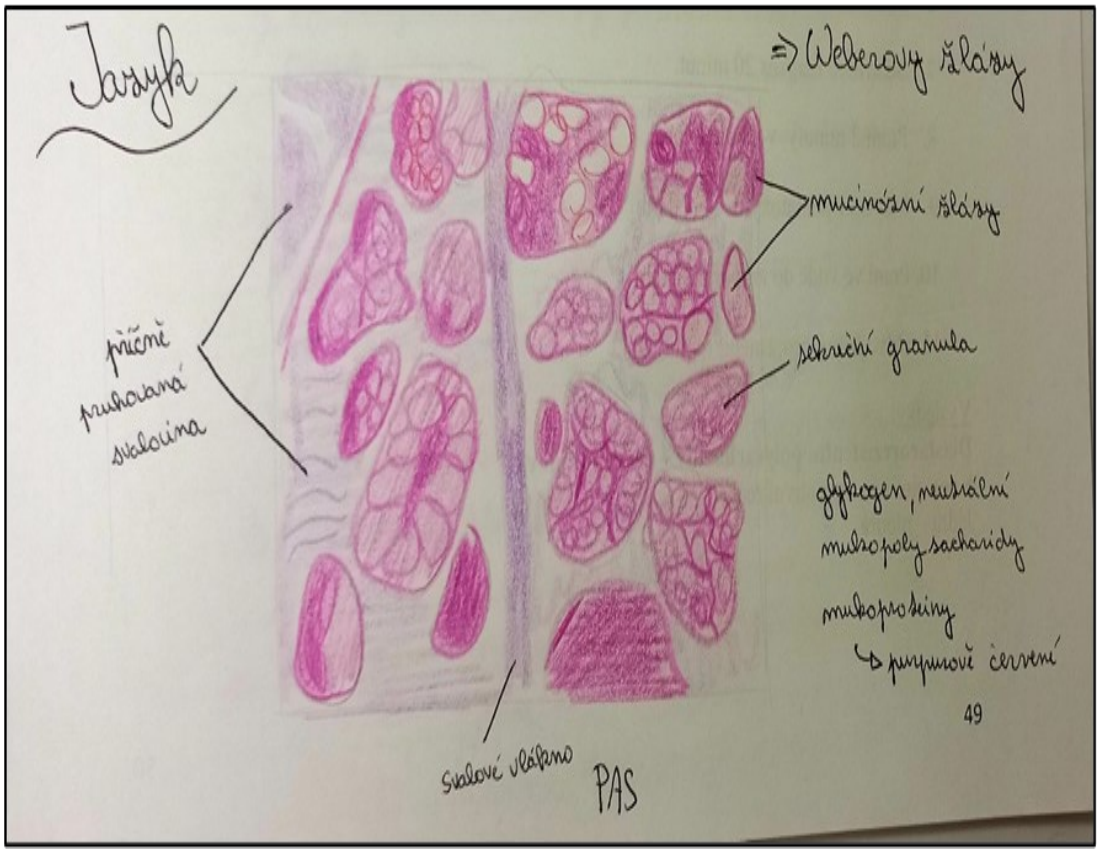
Výsledky:

Diazorezistentní polysacharidy – červenofialově

Kontrolní řez – negativní reakce

Jádra – modrá

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis. (Semerádová, 2019, s. 49–50)



Obrázek 1 - Zakreslení a popis mikroskopovaného preparátu

Fotografie nákresu pochází ze studijního materiálu absolventky 2020/2021, fotografie byl použita s ústním svolením autorky.

Jednotlivé postupy metod byly upraveny pro potřeby a časové možnosti výuky, žáci mikroskopují a zakreslují trvalé preparáty, které jsou zhotovovány dle platných laboratorních postupů.

6.1.4 Cíle hodiny

Kognitivní cíle

Na konci vyučovací hodiny byl žákem předložen zhotovený (obarvený) preparát, u kterého byl kladen důraz na:

- vysvětlení pracovního postupu metody PAS reakce s kontrolním řezem
- vlastní provedení metody v souladu s bezpečností práce a požární ochrany
- zhodnocení, zakreslení a popis mikroskopovaného obrazu preparátu obarveného metodou PAS reakce s kontrolním řezem. (Semerádová, 2020, s. 5)

Afektivní cíle

Pro potřebu dosahování afektivního cíle bylo využito zapojení žáků aktivizační metodou, nadále byla využita metoda motivační, čímž byla u žáků podpořena nejen sociálně komunikační dovednost. U žáků byl podpořen především rozvoj postojových hodnot v oblasti osobní zodpovědnosti při vykonávání daných činností.

Poznámka: U žáků byl tímto způsobem kladen důraz na schopnosti, které žák uplatní nejen při jednotlivých hodinách praktického vyučování, ale následně také při ústní obhajobě praktické části maturitní zkoušky a v neposlední řadě i v reálném profesním životě při práci v laboratoři. (Semerádová, 2020, s. 5)

Senzomotorické cíle

Bylo využito zapojení žáků aktivizační metodou, čímž bylo u žáků podpořeno zdokonalování jemné motoriky ruky. Žák předvedl dle předepsaného postupu:

- deparafinaci, vlastní barvení, odvodnění, projasnění, montování, zhodnocení a zakreslení a popis mikroskopovaného preparátu. (Semerádová, 2020, s. 5)

Klíčové kompetence

V případě klíčových kompetencí bylo sledováno, jak je žák schopen samostatné práce ve školní laboratoři pod odborným dohledem vyučujícího s odbornou způsobilostí v daném oboru, zda ovládá a dodržuje bezpečnost práce a řídí se pokyny požární ochrany. Dále bylo sledováno, zda zhotovuje a barví histologické preparáty dle probraných postupů, provádí mikroskopování, zakreslování a popis trvalých preparátů s využitím předloh v PC.

6.1.5 Hodnocení

Diagnostické(vstupní)

Bylo provedeno technikou dialogu a pomocí pracovního listu.

Žák definuje přehled histochemických metod, průkazu polysacharidů, pomocí PAS reakce:

Co prokazuje? *PAS pozitivní substance = glykogen, neutrální mukopolysacharidy, mukoproteiny-barví se červenofialově*

Jaký je její princip? *Oxidací kyseliny jodisté se z polysacharidů uvolní aldehydické skupiny, které reagují se Schiffovo reagens za vzniku červenofialového zabarvení*

(Semerádová, 2020, s. 2)

Formativní

Byla provedena kontrola zhotovených a zakreslených preparátů. Společně s žáky provedeme kontrolu jimi zhotovených preparátů, zhodnotíme správnost provedení: splnil/nesplnil. Shrneme vznik možných nedostatků: nedodržení postupu, jež se dá určit dle zjevných změn v obarvené tkáni, nedokonalé zamontování preparátů způsobené nevhodným množstvím montovacího média. (Semerádová, 2020, s. 6)

Sumativní

Byl zhodnocen požadovaný úkol obarvení a zakreslení preparátu obarveného metodou PAS s kontrolním řezem. Při hodnocení bylo přihlíženo k pracovní motivaci a k pracovnímu úsilí během činnosti. Důraz byl kladen na správné provedení pracovního postupu za předpokladu dodržování bezpečností práce a požární ochrany. Dále byl kladen důraz na správné zhodnocení výsledků (PAS pozitivní reakce s kontrolním řezem), zda byl žák schopen určit, jedná-li se o důkaz přítomnosti glykogenu, či jde o jasně pozitivní diastázorezistentní polysacharid. V neposlední řadě se také hodnotilo, zda bylo provedeno řádně zakreslení a popis mikroskopovaného preparátu do pracovního listu. (Semerádová, 2020, s. 6)

6.1.6 Materiální a nemateriální didaktické pomůcky

Učební pomůcky

Studijní materiál: Cvičení z histologie a histologické techniky (autor Michaela Semerádová)
Kniha: Histologická technika (autor. Zdeněk Vacek)

Nářadí, nástroje a speciální pomůcky

Kyveta velká, minutka – vše 13x.
Laboratorní digestoř, mikroskopy, mikroskop s překlopením obrazu do PC a TV (součást vybavení laboratoře)
Rukavice jednorázové nitrilové (krabice vel. M), žlutý kontejner na nebezpečný odpad, popisovač Leica, pinzety, dezinfekční gel, dezinfekce povrchu

Materiálová příprava

Reagencie potřebné pro metodu PAS s kontrolním řezem (1% kyselina jodistá, Schiffovo reagens, Maierův hematoxylin), 13x preparát se vzorkem tkáně, 12x trvalé preparáty, 12x pracovní postupy (žáci mají ve studijním materiálu na straně 50), 1x deparafinační set (xylen, alkohol), 1x sada odvodnění a projasnění (96% alkohol, aceton, xylen), montovací médium (Pertex/Solakryl), krabička krycích skel (50 ks), balík filtračních papírů, buničina přířezová 10x15cm, balíček gázy
1x mikrofotografie výsledného průkazu (barvení)PAS reakcí s kontrolním řezem, pracovního postupu a trvalý preparát pro dataprojekci z mikroskopu či PC na TV. Povoleny jsou u žáků mobilní telefony, které jsou využívány za účelem pořizování mikrofotografií mikroskopovaných trvalých preparátů.

6.1.7 Struktura vyučovací hodiny (časová osa)

Časové rozvržení vyučovací hodiny je vždy velmi důležitou součástí pro správné rozvržení činností v rámci výuky. V níže uvedené tabulce byly zaznamenány jednotlivé fáze hodiny, činnosti, učební úkoly a v neposlední řadě i organizační forma výuky.

ČAS	FÁZE HODINY	ČINNOSTI, UČEBNÍ ÚKOLY, ORGANIZAČNÍ FORMA
0-5	Zahájení hodiny	Pozdrav s žáky, sdělení tématu a cíle hodiny a organizační forma. Téma: Průkaz polysacharidů – PAS reakce s kontrolním řezem Cílem tématu bylo, aby žák zvládl praktický nácvik vlastního postupu (barvení) průkazu PAS reakce s kontrolním řezem v souladu s bezpečností práce a požární ochrany. Dále také, aby ovládal základní orientaci ve výsledném mikroskopickém obrazu obarveného preparátu. Dílčím cílem byla snaha o kontinuální rozvoj postoje žáka k zodpovědnosti (důležitost následného stanovení Dg. lékařem patologem) a rozvoj jemné motoriky rukou. Organizační forma: 1) skupinová – při instruktáži 2) individuální – při vlastním nácviku pracovní činnosti
6-10	Opakování učiva	Shrnutí předchozí látky, pracovní list
11-15	Motivace žáků	Hlavní myšlenka, PC ukázka preparátů – práce s využitím propojení projekce s mikroskopem
16-35	Nové učivo	Základní princip metody, postup metody PAS reakce s kontrolním řezem, pojmy INSTRUKTÁŽ – názorné předvedení vlastního postupu barvení průkazu retikulárních vláken Opora – studijní materiál str. 49–50 – zakreslování mikroskopovaného z trvalého preparátu.

36-45	Řízené cvičení	Vlastní provedení praktické činnosti – obarvení preparátu, dodržování bezpečnosti práce a požární ochrany.
45-50	*přestávka*	
50-80	Řízené cvičení	Vlastní provedení praktické činnosti – obarvení preparátu, dodržování BOZP a PO
81-85	Hodnocení	Formální – kontrola zhotovených i zakreslených preparátů, společně s žáky provedeme kontrolu jimi zhotovených i zakreslených preparátů. Sumativní – zhodnotíme správnost provedení, případně shrneme vznik a možnost odstranění nedostatků.
84-90	Ukončení hodiny	Shrnutí hodiny a zhodnocení práce žáků. Zadání případného úkolu do systému Bakaláři (zadání okruhu k opakování)

Tabulka 2 - Časová osa vyučovací hodiny.

(Semerádová, 2020, s. 6)

6.1.8 Instruktáž

V rámci instruktáže bylo názorné předvedení nácviku vlastního postupu (barvení) průkazu PAS reakce s kontrolním řezem, a dále byl žákům připomenut postup pro již osvojenou činnost mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

6.1.9 **Cvičná práce pro žáky**

Po předvedení instruktáže a dovysvětlení drobných nejasností následovalo zadání práce žákům ve znění:

„Žáci budete pracovat samostatně, každý samostatně dle instruktáže o postupu barvení provedete vlastní nácvik průkazu (obarvení) preparátu pomocí PAS reakce s kontrolním řezem, budete se přitom řídit pracovním postupem uvedeným na straně 50 ve studijním materiálu cvičení z histologie a histologické techniky, budete se řídit pokyny bezpečnosti práce a požární ochrany.

Následně provedete mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou a její zakreslení na straně 49–50 - Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

Po dokončení činnosti provedete dezinfekci pracovního prostoru, použitý kontaminovaný materiál vložíte do žlutého kontejneru, a provedete dezinfekci suchých rukou pomocí dezinfekčního gelu“.

6.2 Ukázka praktického využití pracovního listu

Pracovní listy pro předmět Cvičení z histologie a histologické techniky.

Pracovní listy byly vytvářeny jako původní studijní výukový materiál. Vlastní tvorba pracovních listů probíhala na základě pozitivních předpokladů, které nám pracovní listy poskytují. Pracovní listy by měly obsahovat zejména *„záznam a utřídění základních a nejdůležitějších poznatků a jejich zafixování“*. Při tvorbě pracovních listů nesmíme opomenout vhodně zvolit cíle, které nám následně poskytují zpětnou vazbu a reflektují jejich funkčnost. Vlastní rozložení pracovních listů je velmi důležitým faktorem pro jejich následné úspěšné využití. Kvalitně vytvořené pracovní listy nám poskytují efektivní didaktickou pomůcku, která nám za předpokladu správného využití umožňuje *„fixaci nabytých znalostí, zkušeností či dovedností“.* (Mrázová, 2013, s. 6–23)

V současné době jsou pracovní listy ve výuce předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky využívány především k opakování jednotlivých témat a dále jsou využívány pro potřebu ověřování znalostí žáků v testu, v neposlední řadě byly využívány i v rámci distanční výuky. Pracovní listy poskytly v rámci distanční výuky svůj velký potenciál, který nám umožňuje jejich relativně snadné přetvoření v online podobu, která mohla byt žákům předložena pomocí aplikace Teams.

Níže uvedený pracovní list byl použit k opakování znalostí, které žáci získali v předešlé vyučovací hodině, tudíž bylo možné plynule navázat na nové učivo. Práce s pracovními listy zároveň šetří čas a při práci se aktivizují všichni žáci, a to je především v případě opakování a ukotvování učiva velmi důležité. Ukázka vyplněného pracovního listu žákem bude uvedena jako samostatná přílohy této bakalářské práce (příloha č. 2).

PŘEHLED HISTOCHEMICKÝCH METOD

Téma – PRŮKAZ POLYSACHARIDŮ – PAS reakce

1. Doplňte, co je principem PAS reakce.

Oxidace polysacharidů, při které vznikají *aldehydy*,
jež reagují se Schiffovým reagens za vzniku *červenofialové (purpurové)* sraženiny.

2. Určete, základní složky, které nám umožní prokázat PAS reakce.

a) *glykogen*

b) *glykoprotein*

c) *glykolipidy*

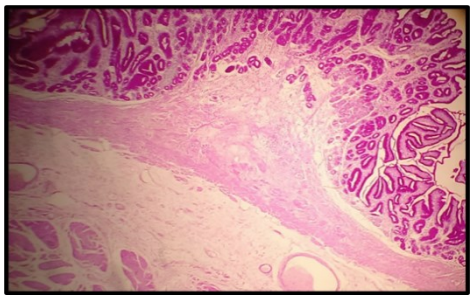
d) *mukopolysacharidy*

3. Stanovte barvy výsledného barvení PAS reakce.

a) *červenofialové (purpurové) – PAS pozitivní substance*

b) *modrá – jádra*

4. Určete, co můžeme stanovit z fotografie histologického preparátu?



Obrázek 2 - Mikrofotografie – PAS reakce

(autor mikrofotografie Semerádová)

a) *Podle jednotlivých vrstev, které vidíme, se jedná se o tkáň z žaludku.*
b) *Preparát je obarvený PAS reakcí, ve sliznici je patrná červenofialová (purpurová) sraženina.*

7 Dotazníkové šetření

Dotazníkové šetření[8] vyplývá z potřeby zjistit u žáků 3. a 4. ročníku a absolventů zpětnou vazbu na jejich osobní zkušenost a práci se studijním materiálem, který využívají či využívali v rámci předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky.

Cíl dotazníkového šetření

Cílem dotazníkového šetření bylo získání zpětné vazby, jak se žákům pracuje se studijním materiálem využívaným v předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky.

Metoda šetření

Písemná podoba metody dotazníkového šetření byla zvolena na základě možnosti předání či zaslání dotazníku všem respondentům, kteří mohli být v souvislosti s dotazníkovým šetřením osloveni. Dále nám tento způsob metody umožňuje oslovit respondenty plně anonymním způsobem, což můžeme považovat za značnou výhodu. Výsledné údaje šetření nejsou zkresleny tak, jako by byly v případě zvolení metody rozhovoru, kdy přímá konfrontace může právě výsledné údaje šetření zkreslit.

Cílová skupina respondentů

V rámci dotazníkového šetření byla oslovena celková skupina 36 respondentů. Respondenty tvořilo 24 žáků 3. a 4. ročníku oboru Laboratorní asistent Vyšší odborné zdravotnické školy a Střední zdravotnické školy, Alšovo nábřeží 6, Praha 1. Dále 12 absolventů téhož oboru. Věkové rozmezí stávajících žáků i absolventů je 17 – 21let, v zastoupení pohlaví se jednalo o 5 chlapců a 31 dívek.

Považuji za velmi důležité zmínit, že před vlastním předáním dotazníků žákům 3. a 4. ročníku i absolventům, bylo o tomto záměru informováno vedení školy prostřednictvím vedoucí oboru laboratorní asistent.

[8] HENDRYCH, Martin. *Tvorba studijního textu a pracovních listů pro předmět Estetika zvuku.* Praha ČVUT 2020.Bakalářská práce České vysoké učení technické v Praze, Masarykův ústav vyšších studií. Pro zpracování dat z dotazníkového šetření v kapitole 7 byla využita metodika uvedené práce.

Způsob pokládání otázek

Otázky pro dotazníkové šetření byly zvoleny v kombinaci uzavřené odpovědi s možností volby ANO – NE – NEVÍM a dále s možností rozvinutí odpovědi. Dotazník byl v tištěné podobě předán všem respondentům, žákům stávajících ročníků i absolventům. Dále je důležité zmínit, že respondenti byli předem poučeni, jakým způsobem s dotazníkem pracovat. Součástí dotazníku bylo písemné poučení – viz ukázka vlastního dotazníku kapitola 7.1.1. Dotazníkové šetření – vlastní dotazník.

Před vlastním vyhodnocením byly nejprve všechny dotazníky shromážděny a teprve potom následně vyhodnocovány, což vedlo k zaručení kýžené anonymity u shromážděných dotazníků.

Předpokládaný výstup z dotazníkového šetření

Jak již bylo zmíněno výše, cílem dotazníkového šetření byla zpětná vazba žáků a absolventů na práci se studijním materiálem. Přesněji řečeno, jak se žákům pracuje se studijním materiálem. V případě absolventů, jak se žákům s tímto studijním materiálem pracovalo v rámci předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky. Zda žákům tento studijní materiál pomáhá či pomáhal v přípravě na výuku a jakým způsobem je možné dále studijní materiál rozšířit, inovovat či do něj implementovat nové informace týkající se rozvoje v oblasti histologie a histologické techniky.

Předpokládá se, že toto šetření přinese odpovědi na otázky:

1) Zda by chtěli žáci pracovat po ukončení studia v histologické laboratoři.
2) Zda jsou spokojeni s průběhem a způsobem vedení výuky v rámci předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky.
3) Zda využívají studijní materiál v rámci domácí přípravy na výuku (ústní zkouška, souhrnné opakování, v případě 4. ročníku příprava k praktické maturitní zkoušce).
4) Zda by uvítali změnu ve studijním materiálu (např. obrázkové doplnění, forma textu, inovace v oboru).
5) Zda je práce se studijním materiálem pro žáky přínosná.

7.1 Dotazník – zadané otázky

7.1.1 Dotazníkové šetření – vlastní dotazník

Dotazníky byly předány v níže uvedené podobě 36 respondentům. Návratnost dotazníků byla 100 %.

Dotazník byl opatřen i průvodním dopisem. Žákům 3. a 4. ročníku byly dotazníky po domluvě s vedoucí oboru předány v tištěné podobě na konci vyučovací hodiny. Absolventům byl dotazník zaslán pomocí e-mailové korespondence s prosbou o vyplnění dotazníku a zpětná vazba proběhla též prostřednictvím e-mailové korespondence. Absolventi vyplněné dotazníky naskenovali a připojili jako přílohy.

Vzhledem ke skutečnosti, že dotazník byl vyplňován anonymně, bude součástí samostatné přílohy této bakalářské práce uvedena ukázka vyplněného dotazníku (příloha č. 3)

DOTAZNÍKOVÉ ŠETŘENÍ

(k bakalářské práci – Michaela Semerádová – UPVOV)

ročník/rok _____

Dobrý den, milí žáci a absolventi,

chtěla bych Vás touto cestou požádat o vyplnění krátkého dotazníku. Dotazník je plně anonymní, Vaše odpovědi budou zpracovány pouze pro potřebu mé bakalářské práce. Na základě Vašich odpovědí dotazník vyhodnotím a zapracuji do studijního materiálu.

Vaším úkolem bude vyplnit 5 otázek.

Cílem šetření je získání zpětné vazby, jak se Vám pracuje se studijním materiálem využívaným v předmětu cvičení z histologie a histologické techniky.

Děkuji Vám za spolupráci.

Michaela Semerádová

Vždy zaškrtněte možnost a rozveďte Vaši odpověď:

1) Zvažujete, že byste chtěli pracovat v histologické laboratoři? Uveďte důvody.

ANO NE NEVÍM

---

2) Vyhovuje Vám způsob průběhu výuky v rámci předmětu cvičení z histologie a histologické techniky? Uveďte v čem.

ANO NE

---

3) Využíváte studijní materiál v rámci domácí přípravy na výuku (ústní zkouška, souhrnné opakování, v případě 4. ročníku příprava k praktické maturitní zkoušce)?

ANO NE

---

4) Uvítali byste změnu ve studijním materiálu (např. obrázkové doplnění, forma textu, inovace v oboru)?

ANO NE

---

5) Je pro Vás práce se studijním materiálem přínosná?

ANO NE

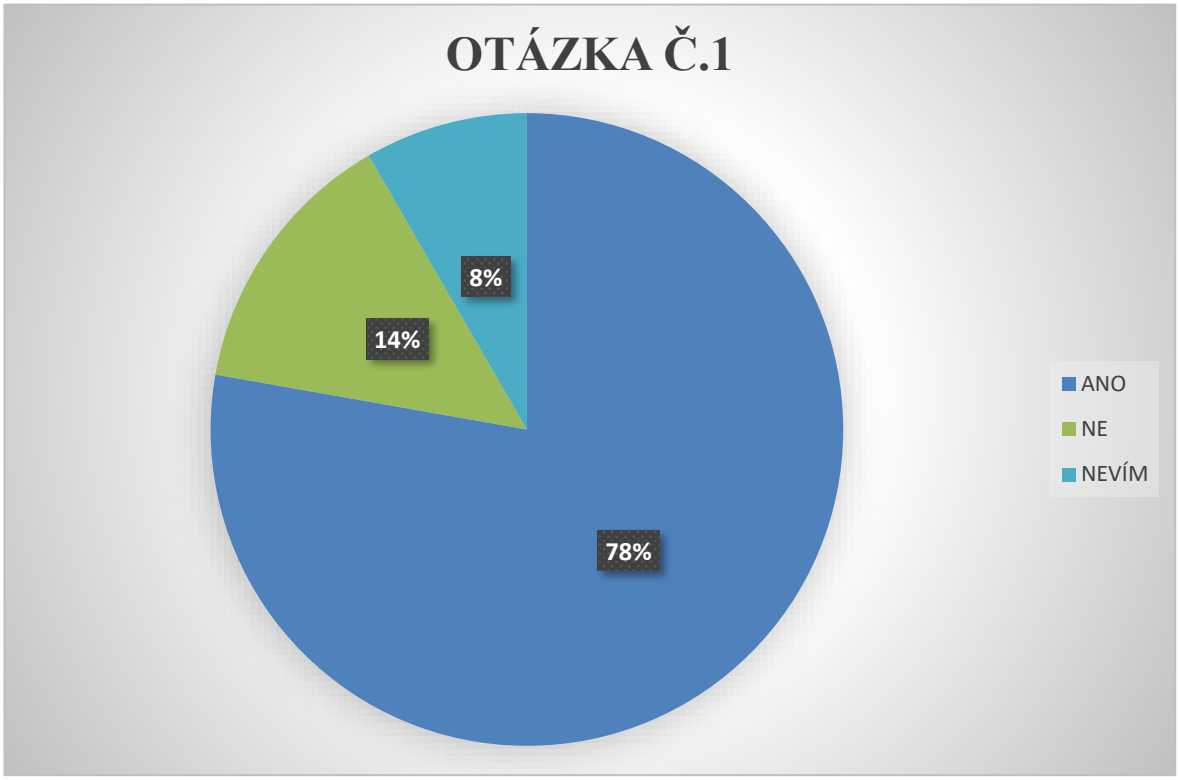
7.2 Vyhodnocení dotazníkového šetření

V rámci dotazníkové šetření bylo předáno 24 dotazníků žákům 3. a 4. ročníku, dále bylo předáno 12 dotazníků absolventům. Pro vyhodnocení bylo využito všech 36 vyplněných dotazníků.

Cílem dotazníkového šetření bylo získání zpětné vazby, jak se žákům pracuje se studijním materiálem využívaným v předmětu cvičení z histologie a histologické techniky.

Pro výstupní hodnocení byl zvolen program Excel, kam byla všechna získaná data přenesena a překontrolována. Následně došlo vyhodnocení. Pro tvorbu grafického poměrového vyjádření byl zvolen též program Excel. (Hendrych, 2020, s. 20)

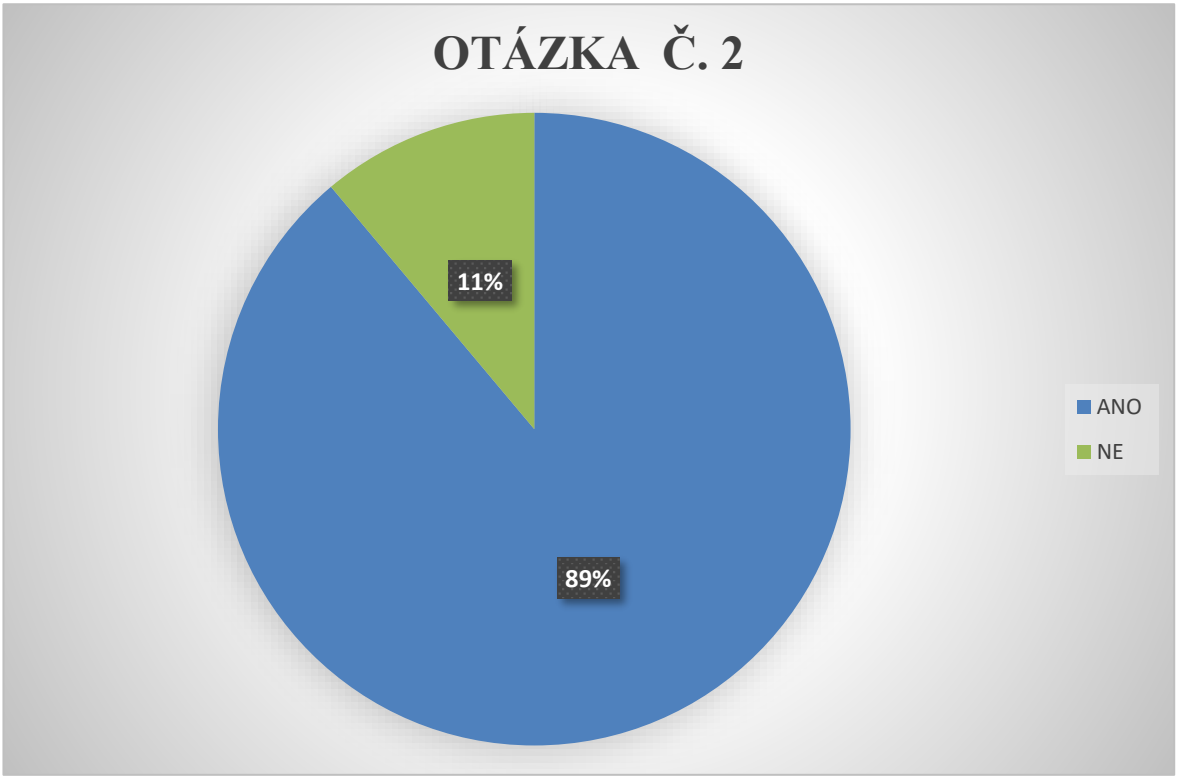
Otázka č. 1: Zvažujete, že byste chtěli pracovat v histologické laboratoři? Uveďte důvody.



Graf 1 - Dotazníkové šetření – otázka č. 1

Vyhodnocení: Většina dotázaných, přesně 78 %, zvažuje, že by chtěli pracovat v histologické laboratoři. Pouze 22 % respondentů odpovědělo, že neví nebo nechtějí pracovat v histologické laboratoři. U otevřené odpovědi převažoval názor, že by žáci/absolventi chtěli pracovat v histologické laboratoři především z důvodu, že laboratoře nejsou plně automatické a stále se vyvíjejí.

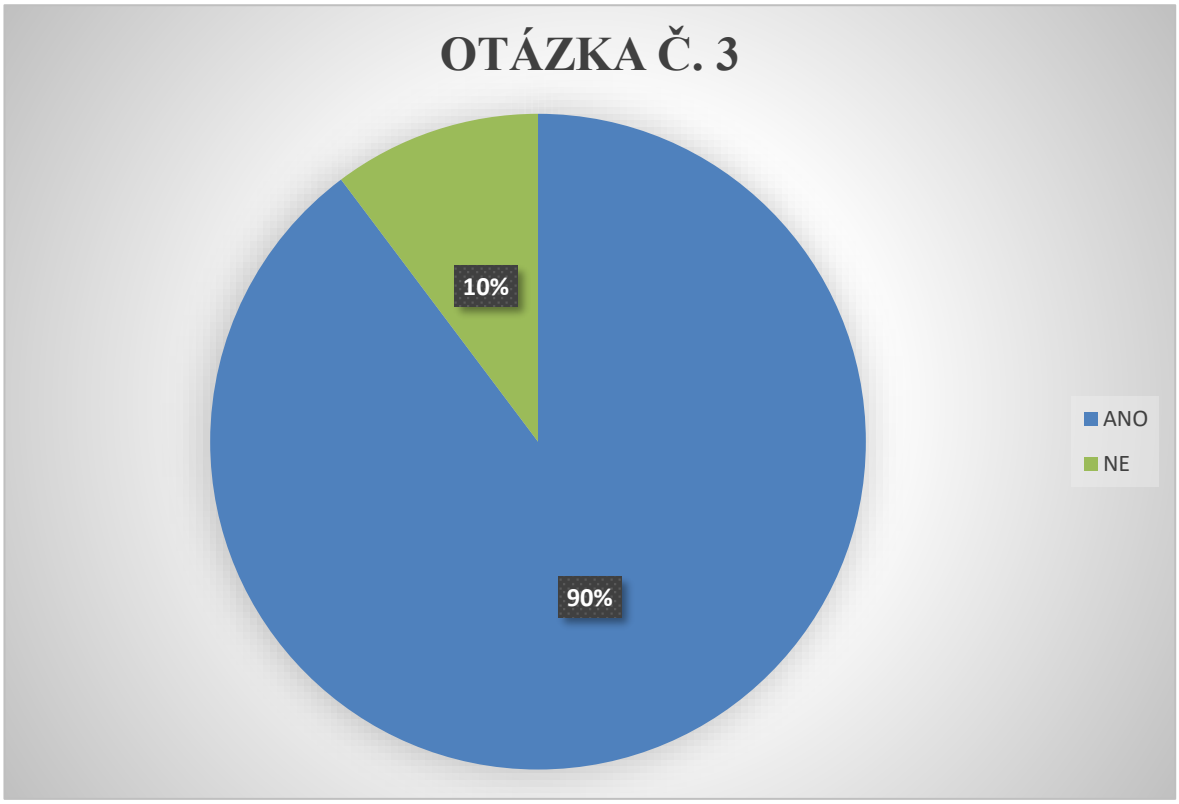
Otázka č. 2: Vyhovuje Vám způsob průběhu výuky v rámci předmětu cvičení z histologie a histologické techniky? Uveďte v čem.



Graf 2 - Dotazníkové šetření – otázka č. 2

Vyhodnocení: 89 % žáků/absolventů uvedlo, že jim vyhovuje/vyhovoval způsob průběhu výuky. V otevřené části odpovědi převažoval názor, že žákům/absolventům plně vyhovuje/vyhovoval systém výuky, který navazuje na teoretickou přípravu.

Otázka č. 3: Využíváte studijní materiál v rámci domácí přípravy na výuku (ústní zkouška, souhrnné opakování, v případě 4. ročníku příprava k praktické maturitní zkoušce)?

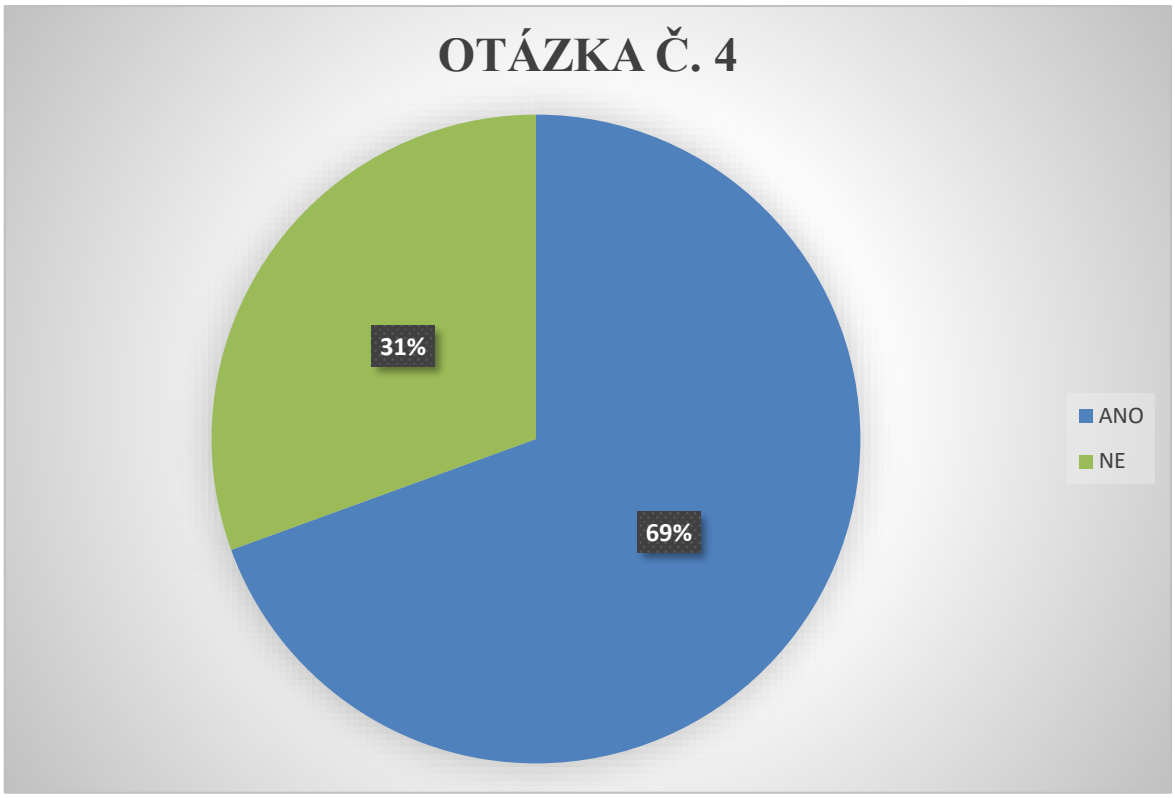


Graf 3 - Dotazníkové šetření – otázka č. 3

Vyhodnocení: V otázce využití studijního materiálu v rámci domácí přípravy na výuku (ústní zkouška, souhrnné opakování, v případě 4. ročníku příprava k praktické maturitní zkoušce) se vyslovilo celých 90 % dotázaných respondentů, že studijní materiál využívají. Pro příklad cituji odpověď absolventa/ky:

„Ze studijního materiálu jsem se učila furt, i na teoretický předmět. Vše tam bylo krásně vysvětlené, a když jsem něco nechápala, studijní materiál mi pomohl. Dokonce jsem z histologie maturovala a díky studijnímu materiálu jsem byla připravena a odmaturovala jsem za 1“.

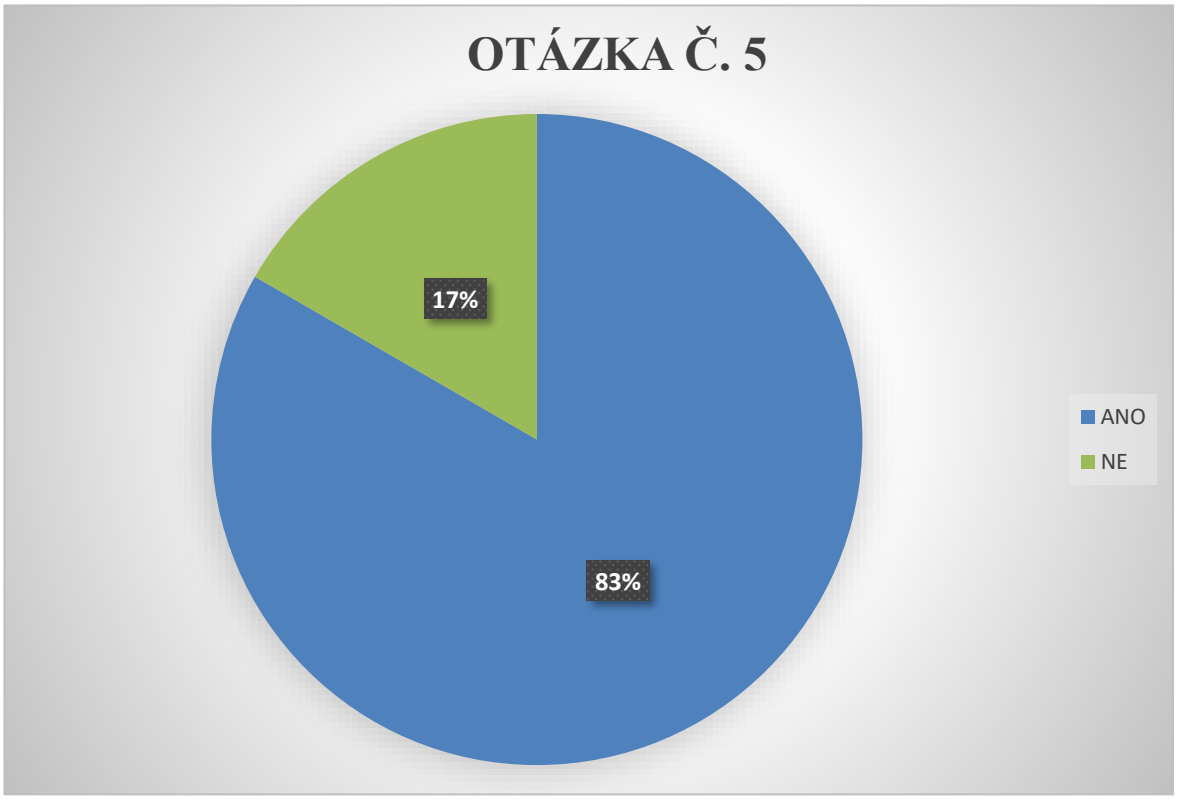
Otázka č. 4: Uvítali byste změnu ve studijním materiálu (např. obrázkové doplnění, forma textu, inovace v oboru)?



Graf 4 - Dotazníkové šetření – otázka č. 4

Vyhodnocení: V této otázce odpovědělo 69 % dotázaných respondentů, že by uvítali změnu ve studijním materiálu. V otevřené části odpovědi uvedli respondenti jako podnět pro inovaci možnost většího rozšíření obrazového materiálu.

Otázka č. 5: Je pro Vás práce se studijním materiálem přínosná?



Graf 5 - Dotazníkové šetření – otázka č. 5

Vyhodnocení: Téměř 83 % oslovených respondentů se vyjádřilo, že vnímají práci se studijním materiálem jako přínosnou. V otevřené části především u žáků, kteří jsou ve 4. ročníku a u absolventů převládají odpovědi, že jim pomáhá/pomohl se připravit na praktickou maturitní zkoušku.

7.3 Shrnutí výsledků šetření

Na základě výsledků získaných v rámci dotazníkového šetření byl kladně potvrzen cíl šetření i předpokládané domněnky.

Pozitivní aspekt přinesly výsledky dotazníku především v otázce zájmu žáků/absolventů pracovat v histologické laboratoři po ukončení studia. Toto se jeví jako velmi pozitivní ukazatel pro zaměstnavatele.

Velmi zajímavé výsledky přinesly odpovědi žáků/absolventů na otázku, zda by uvítali změnu ve studijním materiálu (např. obrázkové doplnění, forma textu, inovace v oboru). U této otázky se vyjádřilo celých 69 % dotázaných respondentů, že by uvítali změnu ve studijním materiálu. V otevřené části odpovědi převažoval jednoznačně podnět pro větší rozšíření v oblasti obrázků. Tato odpověď poukázala na možnost studijní materiál inovovat a rozšířit jej o větší množství obrazového materiálu.

Dále data získaná v rámci dotazníkového šetření poskytla odpověď na otázku spokojenosti žáků s průběhem vyučovacího procesu. Celkem 89 % žáků/absolventů odpovědělo, že způsob výuky je plně vyhovující.

Výsledky grafů jednoznačně dokládají, že studijní materiál a způsob jeho využívání je pro žáky/absolventy přínosný.

Mimo výsledky, které byly předmětem tohoto dotazníkového šetření, mohu doložit zájem o práci v histologické laboratoři i na reálném příkladu, kdy se z mé žákyně stala počátkem září 2021 má kolegyně na Oddělení patologie Ústřední vojenské nemocnice-Vojenské fakultní nemocnice v Praze. V současné době u ní probíhá desetiměsíční adaptační proces a souběžně si zvyšuje stupeň vzdělání studiem na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, obor Zdravotní laborant.

Na základě dostupných dat jsem pevně přesvědčena, že tento studijní materiál hraje velmi významnou roli v efektivnějším pochopení učiva v předmětu Cvičení z histologie a histologické techniky. Získaná data poukázala i na možnost inovace studijního materiálu v oblasti obrazového aparátu.

Závěr

Cílem bakalářské práce byla tvorba a praktické využití studijního materiálu pro předmět Cvičení z histologie a histologické techniky, který byl koncipován výhradně pro 3. a 4. ročník SZŠ Alšovo nábřeží 82, Praha.

V rámci bakalářské práce byla nejprve v teoretické části nastíněna didaktická analýza, která předcházela vlastní tvorbě studijního materiálu. Didaktická analýza učiva dopomohla k zanalyzování učiva daného předmětu a stala se vodícím prvkem pro vlastní realizaci studijního materiálu.

V praktické části byla bakalářská práce zaměřena na kroky, které vedly k vlastní tvorbě studijního materiálu a dále zde byla prezentována ukázka praktického využití studijního materiálu. Další část se zabývala potvrzením domněnky, jak se žákům/absolventům pracuje se studijním materiálem. K ověření domněnky bylo využito metody dotazníkového šetření.

Ukázka praktického využití studijního materiálu byla pojata ve formě vyučovací hodiny na téma – Průkaz polysacharidů – PAS reakce s kontrolním řezem. Téma bylo zvoleno zcela záměrně, žákům vždy činí značné potíže pochopení jednotlivých souvislostí mezi metodami PAS reakce a PAS reakce s kontrolním řezem.

Dotazníkové šetření mělo za cíl získání zpětné vazby, jak se žákům pracuje se studijním materiálem využívaným v předmětu cvičení z histologie a histologické techniky. Potvrdilo kladné výsledky šetření i předpokládané domněnky. Procentuální výsledky zcela jednoznačně potvrdily, že cíl dotazníkového šetření byl naplněn. Studijní materiál pro předmět cvičení z histologie a histologické techniky dle názoru respondentů zkvalitňuje a zefektivňuje výukový proces.

Získané výsledky v rámci dotazníkového šetření poukázaly i na možnost, jak studijní materiál inovovat. Na základě výsledků jsem dospěla k závěru, že studijní materiál bude rozšířen o obrazovou přílohu, a to v podobě doplnění foto přílohy mikrofotografií trvalých preparátů.

Na základě získaných výsledků se domnívám, že cíl mé bakalářské práce byl splněn.

Závěrem své bakalářské práce bych ráda uvedla svůj zcela osobní názor, jenž jednoznačně směřuje k naplnění dílčího cíle bakalářské práce. Soustavně je třeba poukazovat na důležitost kvalitní přípravy praktické výuky, která žáky motivuje, aby následně u daného oboru po dokončení studia zůstali a nastoupili do histologických laboratoří. Myslím, že velký význam má studijní materiál v otázce podpory ve výuce i v domácí přípravě žáků. Tento aspekt byl velmi dobře patrný i v rámci distanční výuky, jež troufám si říct, zasáhla právě žáky 3. a 4. ročníku i absolventy zdravotnických škol v největším rozsahu.

Žáci museli propojit státem nařízenou pracovní povinnost se studiem. Stejný problém nastával i u mne. Působila jsem nejen jako učitel praktického vyučování, ale také od 22.12.2020 do 23.7.2021 jako zdravotní laborant na odběrovém úseku pro SARS-CoV-2 v Ústřední vojenské nemocnici – Vojenské fakultní nemocnici v Praze.

Osobně mohu říci, že toto byla největší osobní zkušenost v přípravě na výuku pro mne i mé žáky/absolventy. Kompetence, které v rámci této formy studia a pracovní povinnosti žáci i absolventi získali, mají velký morální význam. Troufám si tvrdit, že afektivní rozvoj v tomto směru nabyl téměř maximálního rozsahu.

Seznam použitých informačních zdrojů

ČADÍLEK, Miroslav a Aleš LOVEČEK, *Didaktika odborných předmětů.* Brno 2005[online]. [cit: 2022-02-05] dostupné z: http://boss.ped.muni.cz/

HENDRYCH, Martin. *Tvorba studijního textu a pracovních listů pro předmět Estetika zvuku.* [online]. Praha, 2020 [cit. 2022-02-27] Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze, Masarykův ústav vyšších studií. Ing. Petr Svoboda, Ph.D., PEAD.IGIP. dostupné z: https://dspace.cvut.cz/handle/10467/90673

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H & H. 1997. ISBN 80-85787-37-7.

KALHOUS, Zdeněk a Otto OBST. *Školní didaktika*. Vyd. 2. Praha: Portál, 2009. ISBN 978-80-7367-571-4.

KAPOUNOVÁ, Jana a Pavel KAPOUN. *Bakalářská a diplomová práce: od zadání po obhajobu*. Praha: Grada, 2017. ISBN 978-80-271-0079-8.

MAŇÁK, Josef, Tomáš JANÍK a Vlastimil ŠVEC. *Kurikulum v současné škole*. Brno: Paido, 2008. Pedagogický výzkum v teorii a praxi. ISBN 978-80-7315-175-1.

MRÁZOVÁ, Lenka. *Tvorba pracovních listů: metodický materiál*. Brno: Moravské zemské muzeum, 2013. ISBN 978-80-7028-403-2.

MAZÁČOVÁ, Nataša. *Vybrané pedagogické inovace v současné škole: studijní text pro distanční studium*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta. ISBN 978-80-7290-373-3.

MIKESKOVÁ, Šárka. Metodický portál RVP.CZ [online]. [cit.:2022-02-05] dostupné z: https://clanky.rvp.cz/

Národní pedagogický institut České republiky [online]. [cit.: 2022-02-06] dostupné z: http://www.nuv.cz/t/rvp

NOVOTNÝ, Petr a Marie POESOVÁ. *Digitální mikro – a makrofotografie pro učitele: příručka k projektu Věda do škol*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, 2013. ISBN 978-80-7290-686-4.

PECINA, Pavel. Didaktická praktického vyučování pro technické obory 1. díl. Výuková podpora. 2012. [online]. [cit.:2022-02-05] dostupné z: https://is.muni.cz/

PETTY, Geoffrey. *Moderní vyučování*. 6., rozš. a přeprac. vyd. Přeložil Jiří FOLTÝN. Praha: Portál, 2013. ISBN 978-80-262-0367-4.

RAMBOUSEK, Vladimír. *Materiální didaktické prostředky*. V Praze: Univerzita Karlova, Pedagogická fakulta, 2014. ISBN 978-80-7290_664_2.

SEMERÁDOVÁ, Michaela. *Cvičení z histologie a histologické techniky*, Text vytvořen ve formě kombinace studijního textu a pracovního sešitu

Poznámka: Zdrojem pro studijní matriál byla i interní dokumentace a fotodokumentace pořízená na Oddělení patologie, Ústřední vojenské nemocnice-Vojenské fakultní nemocnice v Praze. Seznam požitých interních zdrojů je uveden v celém rozsahu v bibliografii studijního materiálu.

SEMERÁDOVÁ, Michaela, *Plán vyučovací hodiny,* Praha 2020. Seminární práce. Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta

STARÁ, Jana. *Plánování výuky: úvod do plánování výuky: práce se vzdělávacími cíli: distanční text*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, 2009. ISBN 978-80-7290-418-1.

Školní vzdělávací program (ŠVP) Vyšší odborné školy zdravotnické a Střední zdravotnické školy, Praha 1, Alšovo nábřeží 6.

Poznámka: ŠVP pro obor 53–43–M/01 Laboratorní asistent– tento zdroj byl poskytnut v písemní podobě pro potřebu využití v této bakalářské práce.

Trendy v didaktice biologie: sborník abstraktů… Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, [2014] -.

TROJAN, Václav. *Řízení pedagogického procesu v současné škole*. Praha: Vydavatelství Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy, 2017. ISBN 978-80-7290-961-2.

VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika: učební text pro zdravotnické školy: obor zdravotních laborantů*. 3. vyd. Praha: Avicenum.1972. ISNB 08-028-72

Vyšší odborná zdravotnická škola a Střední zdravotnická škola, Alšovo nábřeží 6/82, Praha 1 [online]. [cit. 2022-01-30] dostupné z: https://www.szspraha1.cz/o-skole-2

VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-202-7.

Seznam příloh

Příloha 1 - Studijní materiál pro předmět Cvičení z histologie a histologickou techniku ... 67
Příloha 2 - Pracovní list ... 136
Příloha 3 - Dotazníkové šetření ... 137

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Zakreslení a popis mikroskopovaného preparátu ... 42
Obrázek 2 - Mikrofotografie – PAS reakce ... 50

Seznam tabulek

Tabulka 1 - Učební plán – obor Laboratorní asistent. ... 20
Tabulka 2 - Časová osa vyučovací hodiny. ... 47

Seznam grafů

Graf 1 - Dotazníkové šetření – otázka č. 1 ... 55
Graf 2 - Dotazníkové šetření – otázka č. 2 ... 56
Graf 3 - Dotazníkové šetření – otázka č. 3 ... 57
Graf 4 - Dotazníkové šetření – otázka č. 4 ... 58
Graf 5 - Dotazníkové šetření – otázka č. 5 ... 59

Seznam zkratek

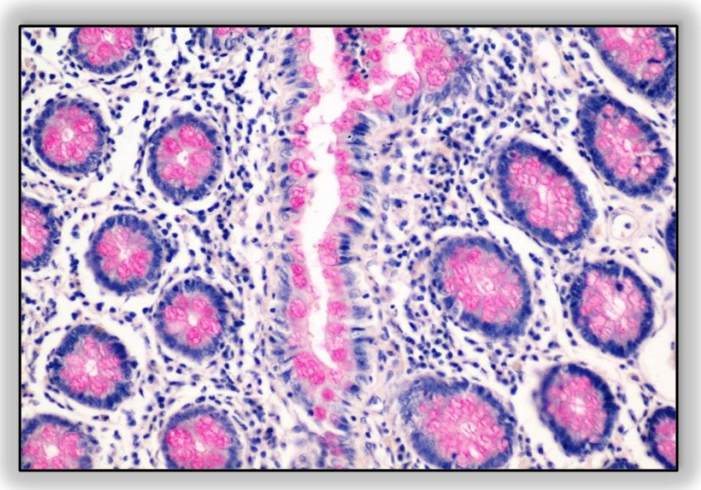
BOZP	Bezpečnost práce
ČIA	Český institut pro akreditaci
Dg	Diagnóza
PO	Požární ochrana
PP	Pracovní postup
FEP	Framing Educational Program
RVP	Rámcově vzdělávací program
SEP	School Educational Programe
SPU	Specifické poruchy učení
ŠVP	Školní vzdělávací program
SZŠ	Střední zdravotnická škola
UPVOV	Učitelství praktického vyučování a odborného výcviku
VOŠ	Vyšší odborná škola

Vyšší odborná škola zdravotnická
a Střední zdravotnická škola

Praha 1, Alšovo nábřeží 6, PSČ 110 00
Tel. 221 771 111, fax 222 320 006, IČO: 00638749
E-mail voszaszs@szspraha1.cz
Webové stránky www.szspraha1.cz
Detašované pracoviště
Praha 5, Duškova 7, PSČ 150 00

Příspěvková organizace nezapsaná v OR, zřizovatel Hlavní město Praha se sídlem Mariánské nám. 2/2, 110 01 Praha 1 IČ: 00064581

Cvičení z histologie a histologické techniky



Autor: Michaela Semerádová

Úvod

Dostává se Vám do rukou studijní materiál Cvičení z histologie a histologické techniky, jehož text je vytvořen ve formě kombinace studijního textu a pracovního sešitu.

Jedná se o velmi zjednodušené strukturované výtahy požadovaného učiva pro předmět cvičení z histologie a histologické techniky. Studijní materiál byl vytvořen v souladu s rámcovým vzdělávacím programem a školním vzdělávacím programem školy.

Při tvorbě studijního materiálu jsem čerpala z výtahu a přímé citace knih prof. MUDr. Zdeňka Vacka, DrSc., z interních dokumentů Oddělení patologie Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice Praha, v neposlední řadě, ze zkušeností, které jsem nabyla během let své praxe na výše zmíněném pracovišti, kde působím dodnes.

Tento studijní materiál je určen žákům Vyšší odborné zdravotnické školy a Střední zdravotnické školy, Alšovo nábřeží, Praha 1.

„JE DŮLEŽITÉ MÍT NA PAMĚTI, ŽE JEN Z KVALITNĚ ZHOTOVENÉHO HISTOLOGICKÉHO PREPARÁTU JE MOŽNÉ STANOVIT PŘESNOU DIAGNÓZU.“

Obsah:[9]

1. BOZP 4
2. HISTOLOGICKÁ LABORATOŘ 5
3. HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ 7
4. PRÁCE S BINOKULÁRNÍM MIKROSKOPEM 9
5. FIXACE 10
6. MIKROSKOPOVÁNÍ BUNĚK (BUNĚČNÉ ORGANELY A INKLUZE) 13
7. ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PO FIXACI 14
MIKROSKOPOVÁNÍ: základní typy epitelů, krycí epitel, typy žlázových buněk 17
8. ZALÉVACÍ MEDIA ROZPUSTNÁ VE VODĚ 18
MIKROSKOPOVÁNÍ: resorpční epitel (metody znázornění) 20
9. MIKROTOMY 21
MIKROSKOPOVÁNÍ: slizniční a retikulární vazivo, heparinocyty 26
MIKROSKOPOVÁNÍ: chrupavka, kost 29
10. BARVENÍ PARAFINOVÝCH ŘEZŮ: HEMATOXYLIN – EOSIN 30
MIKROSKOPOVÁNÍ: hladké svalstvo, kosterní a srdeční sval 32
MIKROSKOPOVÁNÍ: základní neurohistologické metody 33
11. PŘEHLEDNÉ BARVÍCÍ METODY 34
MIKROSKOPOVÁNÍ: histologické stavba srdce, aorty a cévního svazku 37
MIKROSKOPOVÁNÍ: lymfatická uzlina, slezina a brzlík 38
12. ZNÁZORNĚNÍ ELASTICKÝCH VLÁKEN 39
MIKROSKOPOVÁNÍ: hypofýza, štítná žláza 40
MIKROSKOPOVÁNÍ: nadledviny a demonstrace Langerhansových ostrůvků 41
13. PŘEHLED ZÁKLADNÍCH CYTOLOGICKÝCH METOD 42
MIKROSKOPOVÁNÍ: slinné žlázy, pankreas, jícen 44
MIKROSKOPOVÁNÍ: tenké střevo, tlusté střevo 45
MIKROSKOPOVÁNÍ: appendix, játra 46
14. PRŮKAZ RETIKULÁRNÍCH VLÁKEN 47
MIKROSKOPOVÁNÍ: průdušnice, plíce (demonstrace elastiky v plicích) 48
15. PŘEHLED HISTOCHEMICKÝCH METOD 49
MIKROSKOPOVÁNÍ: ledvina, přechodný epitel, demonstrace buněčných inkluzí 52
16. PŘEHLED CYTOLOGICKÝCH METOD 53
17. HISTOCHEMICKÝ PRŮKAZ ENZYMŮ 54
MIKROSKOPOVÁNÍ: varle, prostata 57
18. CYTOCHEMIE RESORPČNÍHO EPITELU 58
MIKROSKOPOVÁNÍ: vaječník, děloha 59
19. NEUROHISTOLOGICKÉ METODY 60
MIKROSKOPOVÁNÍ: mícha, mozek, mozeček 62
20. ZHOTOVENÍ PREPARÁTU PEROPERAČNÍ BIOPSIE 63
21. ZÁKLADY ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE 65
22. ZÁKLADNÍ HISTOPATOLOGICKÉ METODY 66
BIBLIOGRAFIE 68

[9] Obsah studijního materiálu byl ponechán v podobě, v jaké je reálně ve studijním materiálu Cvičení z histologie a histologické techniky.

1. BOZP (bezpečnost a ochrana zdraví při práci)

Smyslem BOZP je:

- Počínat si tak, **abych neohrozil** jiné ani sám sebe, **nezpůsobil škody** na majetku a okolním prostředí.
- Každý pak **zodpovídá za způsobenou škodu** dle míry porušení povinností a dle platných zákonů.

Základní pravidla:

1. V laboratoři je **zakázáno jíst, pít, kouřit.**
2. Vstupovat do laboratoře je možné jen s **ochrannými pracovními prostředky** (plášť, boty s pevnou špičkou, vlasy stažené).
3. **Používání osobních ochranných prostředků** (rukavice, popřípadě ústenka, brýle atd.)
4. **Dodržování hygienických předpisů**, používání správných mycích, čistících a dezinfekčních prostředků.
5. Pracovníci, kteří přicházejí do styku s nebezpečnými chemickými látkami a směsmi, stejně jako s nebezpečnými odpady, musí být poučení v potřebném rozsahu s účinky těchto látek, zejména se způsoby, jak zacházet s ochrannými opatřeními a se **zásadami první pomoci.**
6. **V případě jakéhokoliv problému či poranění jsou povinni toto hlásit neodkladně vyučujícímu.**
7. **Dojde-li k požáru, nahlásíme vyučujícímu!**

   Prvořadým úkolem při likvidaci požáru je záchrana osob! Pokud není možné uhašení požáru vlastními silami, je nutné vyhlásit požární poplach a přivolat Hasičský záchranný sbor tel. 150. Dále se postupuje dle pokynů uvedených v požární poplachové směrnici.
8. Základy hygienických opatření v **HISTOLOGICKÉ LABORATOŘI:**

- Kromě běžných bezpečnostních opatření se musí dbát na časté větrání během práce, používání odtahové skříně a digestoře, aby byly odvětrávány z ovzduší laboratoře výpary (aceton, xylen aj.), jejichž vdechování je škodlivé.
- **S vyšetřovaným materiálem je třeba zacházet jako s potencionálně infekčním materiálem.**

- Hlavním úkolem histologického asistenta/laboranta je zhotovování histologických preparátů. K tomuto účelu slouží četné histologické techniky, které jsou stále zdokonalovány a obohacovány o nové metody.

- Histologické preparáty jsou zhotovovány v histologické laboratoři se speciálním vybavením.

„JE DŮLEŽITÉ MÍT NA PAMĚTI, ŽE JEN Z KVALITNĚ ZHOTOVENÉHO HISTOLOGICKÉHO PREPARÁTU JE MOŽNÉ STANOVIT PŘESNOU DIAGNOZU.“

HISTOLOGICKÁ LABORATOŘ:

- Základním předpokladem pro práci v histologické laboratoři je pořádek, přesnost a čistota.

- Chemikálie se musí uchovávat v uzavřených nádobkách, nejlépe z tmavého skla. Jedy musí být zvlášť pečlivě uchovány dle příslušných předpisů v uzamčené skříňce a o jejich spotřebě musí být vedena přesná evidence.

- Nádobky musí být vždy pečlivě označeny štítkem s názvem chemikálie, u názvu roztoku i datum přípravy, jméno osoby, která roztok připravila.

- K zařízení histologické laboratoře patří především: přístroje, nástroje a laboratorní sklo.

PŘÍSTROJE:

- Mikroskopy (různé typy), elektrická ploténka pro napínání parafínových řezů, vodní lázeň, termostaty, autotechnikony, barvící automat, zalévací linka s chladící ploténkou, mikrotomy (různé typy), kryostat atd.

NÁSTROJE:

- Pinzety, nože, nůžky, preparační jehly, žiletky atd.

LABORATORNÍ SKLO:

- Laboratorní sklo se používá jednak běžně užívané v chemických laboratořích, jako jsou např. kádinky, baňky, pipety, odměrné válce, prachovnice dále mnoho jednorázových pomůcek.

- Specifickým sklem pro histologickou laboratoř jsou kyvety – používají se k barvení histologických preparátů, dále skla podložní, krycí.

Podložní sklíčko:

Jedná se o sklíčko obdélníkového tvaru s částečným matováním na jednom konci.

Matování souží k identifikačnímu označení podložního sklíčka.

Krycí sklíčko:

Má tvar čtverce nebo obdélníku, jeho tloušťka nesmí přesáhnout 0,2 mm.

Kyvety:

Slouží k barvení preparátů, jsou to skleněné nádoby opatřené skleněným víčkem, opatřena na vnitřních stranách drážkami pro zasunutí podložních skel.

MYTÍ LABORATORNÍHO SKLA:

Laboratorní sklo musí být vždy dokonale čisté. K čištění se používají v moderních laboratořích myčky laboratorního skla.

Obr. Kyveta, podložní a krycí sklíčka.

3. HISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Odběr materiálu:

Odběr materiálu probíhá na základě doporučených postupů. Dodržení postupů je jednou z podmínek pro správné zpracování a zaručuje též správné stanovení výsledků. Jedná se zejména o kvalitu a fixaci biologického materiálu. **Při nedodržení postupů může dojít k vážnému pochybení, která můžou v důsledku vést k poškození nebo následné smrti pacienta**.

Materiál, který se zpracovává v histologické laboratoři, dělíme na:

BIOPSIE: získáváme z operačního výkonu

NEKROPSIE: získáváme z pitvy

K histologickému vyšetření jsou přijímány nejčastěji:

- Probatorní excize: lékař vyřízne malý kousek tkáně

- Kyretáž (seškrábnutí): malých částek tkáně pomocí kyrety (několik mm sliznice děložní)

- Probatorní punkce: napíchnutí orgánu dutou jehlou, nasazenou na injekční stříkačku, do níž se nasají malé kousky tkáně.

- Resekát: odběr např. celých orgánů nebo jejich částí

Postup značení a evidence:

Vzorky zasílané k vyšetření musí být ve vhodných nádobkách, pečlivě uzavřených, označených a s vyplněnou žádankou.

OKAMŽITĚ FIXOVAT!!!

Identifikace materiálu:

Nádobka se vzorkem a žádanka musí být identifikována shodně. Jednoznačná identifikace pacienta na žádance a vzorku:

- **Jméno a příjmení pacienta**
- **Číslo pojištěnce (rodné číslo pacienta)**

Do laboratoře je přijímán materiál spolu s žádankou, která obsahuje další nezbytné předdefinované povinné údaje. **Vzorek je vždy přijat do laboratoře pouze s řádně vyplněnou žádankou.**

Je samozřejmé, že při dalším zpracování materiálu nesmí dojít k záměně, musí se stále pečlivě dodržovat označení, aby nedošlo k chybě, která zejména v případě zpracování biopsie může mít dalekosáhlé následky!

Histologický laborant nebo asistent musí rovněž zachovávat lékařské tajemství a nesmí nikomu sdělovat skutečnosti, které se v rámci výkonu své práce dozví, jinak se vystavuje nebezpečí soudního postihu.

Příjem vzorků:

Laborant či asistent přijímající vzorky k vyšetření provede kontrolu biologického materiálu a žádanky. Na žádance i vzorku kontroluje shodnost údajů.

Svým podpisem na žádance odsouhlasí, že:

- Žádanka má vyplněné všechny povinné údaje, které jsou shodné se vzorkem.
- Laboratoř je schopna zhotovit požadované vyšetření (např. genetické, histochemické atd.)
- V případě peroperační biopsie doplní čas příjmu na oddělení.

Evidence žádanek k bioptickému vyšetření:

Každému přijatému vzorku je přidělené bioptické číslo, které je zapsáno dle zvyklostí laboratoře na žádanku i nádobku se vzorkem. Toto číslo může být nahrazeno i čárovým kódem či dalším kódovým značením.

Pod tímto přiděleným označením je vzorek po celou dobu zpracování a vyšetření i archivace, aby byla zřejmá jeho jednoznačná identifikace.

4. PRÁCE S BINOKULÁRNÍM MIKROSKOPEM

Mikroskopování:

- Při práci v histologické laboratoři se nejčastěji používá mikroskop ke kontrole postupů a výsledků barvení histologických preparátů.
- K tomuto účelu jsou vhodné binokulární mikroskopy.

Postup mikroskopování:

Provede se hrubé zaostření, v tomto případě hledíme z počátku ze strany mikroskopu na preparát. Následně již hledíme do okulárů a provedeme jemné doostření mikrometrickým šroubem, až se nám v zorném poli objeví obraz pozorovaného preparátu.

Preparát pozorujeme nejprve na nejmenším zvětšení a postupně jej zvyšujeme. Jednotlivé objektivy vyměňujeme pootočením revolverového měniče objektivů

Zvětšení:

Při normální délce tubusu se rovná součinu vlastního zvětšení okuláru a objektivu. U binokulárního mikroskopu musíme výsledné zvětšení znásobit o zvětšení hranolu (je udáno na přední straně tubusu).

Péče o mikroskop:

Mikroskop se nikdy nesmí bezdůvodně nechat zapojený se zapnutým osvětlením.

Po skončení mikroskopování je vždy nutné vypnout ze zdroje a uložit pečlivě do skříněk, abychom mikroskop chránili před prachem.

Pokud je nutné mikroskop očistit, provádíme očištění kovových částí měkkým suchým hadříkem, pokud je nutno očištění optických částí, tak lněným hadříkem.

Speciální typy mikroskopů

Fluorescenční mikroskop:

Je přizpůsoben na ultrafialové paprsky, které se při dopadu na některé látky anorganické a organické povahy mění v záření s větší vlnovou délkou, viditelnou lidskému oku tak, že tyto látky fluoreskují barevným světlem.

Elektronový mikroskop:

Dává nám informace o ultrastruktuře buněk, proces je zdlouhavý, pracný a náročný.

Princip: Záření je emise elektronů ve vakuu. Elektrony jsou emitovány z katody, která je tvořena rozžhaveným wolframovým vláknem. Obraz v elektronové mikroskopii pozorujeme nepřímo, projekcí na fluorescenčním stínítku. Výsledkem elektronové mikroskopie je fotografie (elektronogram).

5. FIXACE

- fixace je šetrná konzervace buněk a tkání = zastaví biologické procesy v tkáni. Zabraňuje samovolnému rozkladu tkáně – **AUTOLÝZE**
- zastaví, zpomalí metabolické děje.
- při fixaci dochází VŽDY ke změně struktury tkáně

Fixační prostředek musí splňovat tyto podmínky:

1. Fixace musí být šetrná
2. Zachovat barvitelnost tkáně
3. Rychle pronikat do tkáně.

Fixace:

1. **Fyzikální** - (teplem, varem, chladem, zmražením)

2. **Chemická** – používanější, je založena na působení par nebo roztoků účinných látek = **fixačních tekutin:**

   Formol
   Fixační tekutiny s kyselinou pikrovou
   Fixační tekutiny se sublimátem
   Ostatní fixační tekutiny

FORMOL

- Nejvíce používaná fixační tekutina.
- Bezbarvá tekutina – silně dráždící sliznici a kůži.
- Výchozím pro přípravu je aldehyd kyseliny mravenčí (36–38 % roztok formaldehydu ve vodě).
- K fixaci se používá roztok: formol o koncentrace 10 % popřípadě 20 %.
- Délka fixace je 24 hodin i déle.
- Formol je fixační prostředek vhodný pro přehledné histologické preparáty, proniká rychle do tkáně – tkáň se poměrně dobře barví.
- Krátkodobá fixace nepoškodí tuky.

Neutrální formol:

- Pro účely fixace je důležitá neutralizace formolu pomocí uhličitanu vápenatého, který neutralizuje kyselinu mravenčí.

Slaný formol:

- Příprava slaného formolu se provádí ředěním neutrálního formolu fyziologickým roztokem v poměru 1:9.

Nevýhody formolu:

- Způsobuje zbobtnání tkáně.
- Buňkám dává sklovitý vzhled, proto raději volíme formol neutrální.
- **FORMOLOVÉ SRAŽENINY** – vznikají v krevnatých orgánech.

FIXAČNÍ TEKUTINY S KYSELINOU PIKROVOU

Tekutina Bouinova:

- Je žluté barvy, patří též k používaným fixačním tekutinám. Vhodná pro průkaz polysacharidů
- Rychle proniká do tkáně a tkáň se dobře barví.
- Průměrná doba fixace 24hodin.

NEVÝHODY: **nehodí se k fixaci krevnatých orgánů**. Působením Bouinovy tekutiny krev hemolyzuje a sráží se v tvrdou, těžko krájitelnou tkáň.

Rovněž se nehodí k fixaci tkání určených k zalití do celoidinu (zabraňuje pronikání celoidinu do tkáně).

FIXAČNÍ TEKUTINY SE SUBLIMÁTEM

SUSA, Tekutina Zenkerova, Tekutina Hellyho

- Tekutiny se sublimátem nesmí přijít do styku s kovem (koroze).

NEVÝHODY: vznik **sublimátové sraženiny**.

- Komplexní sraženina buněčných proteinů se rtutí, odstraňují se **jodováním. Komplexní vazba rtuti na tkáňové bílkoviny**
- **Jodování = po fixaci je nutné přenést bločky přímo do etanolu 90 %, k němu se přidá jodová tinktura nebo Lugolův roztok za účelem odstranění sublimátové sraženiny.**

SUSA

- Čirá bezbarvá tekutina.
- Fixace 24 hodin.
- Po fixaci následuje jodování.

Tekutina Zenkerova

- Oranžové barvy. Bez formolu – dichroman draselný. Doba fixace 24hodin.

- Po fixaci se musí tkáňový bloček nejprve vyprat 24hodin v tekoucí vodě za účelem vyprání dvojchromanu draselného, snižujícího barvitelnost, následuje jodování.

Tekutina Hellyho

- Má podobné použití jako tekutina Zenkerova.
- Hodí se dobře k fixaci krevnatých orgánů (slezina).
- Fixují se velmi malé kousky 2–6 hodin.
- Vyprání 24hodin v tekoucí vodě – poté jodování.

OSTATNÍ FIXAČNÍ TEKUTINY

Aceton

- Vychlazený aceton se požívá při fixaci tkání u peroperačních biopsií.

Etanol

- Bezvodý alkohol.
- K průkazu Ca, Fe, můžeme u Nisslovy metody.

Oxid osmičelý – k fixaci pro EM

- Lehce nažloutlý.
- Nutno fixovat velmi malé vzorky tkáně, řádově v mm k postfixaci u aldehydové fixace Karnovského roztokem (směs glutaraldehydu a paraformaldehydu) pro EM.

NEVÝHODY: roztok není stálý, proniká do tkáně pomalu, může způsobit přefixování tkáně.

Úkol: Seznámit se s chemickým složením fixačních tekutin.

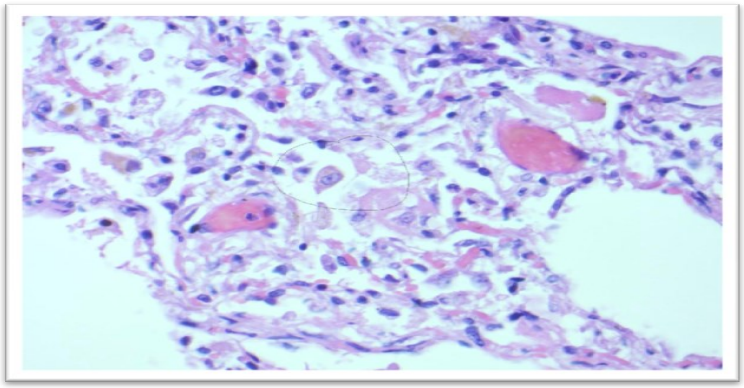
6. MIKROSKOPOVÁNÍ BUNĚK (BUNĚČNÉ ORGANELY A INKLUZE)

Buněčné organely:

- Jsou **metabolicky aktivní struktury buněk se specializovanou funkcí** uložené v cytoplazmě.
- Patří k nim jádro, mitochondrie, endoplazmatické retikulum, Golgiho komplex, centrioly, ribozomy, lysozomy a peroxizomy.

Buněčné inkluze:

- **Jako inkluze jsou označovány produkty látkové výměny, které nejsou integrální součástí cytoplazmy**, které se mohou v cytoplasmě dočasně nebo trvale ukládat. Může jít o látky, které vznikají prvotně v buňce (**inkluze endogenní**), nebo o látky, které buňka přijímá z okolí (**inkluze exogenní**).
- Z inkluzí endogenních se nejčastěji vyskytují různá sekreční granula, inkluze glykogenu, lipidů a parakrystalky bílkovin.
- **Glykogen** nazývaný též živočišný škrob je polysacharid tvořící se polymerací glukózy.
- **Tukové inkluze** se vyskytují v cytoplasmě v podobě kapének různé velikosti, které lze prokázat barvivy rozpustnými v tucích.
- **Pigmenty** jsou inkluze barevné povahy. Vznikají buď v organismu, nebo jsou do něho zanesené z okolního prostředí. Pigmenty se prokazují v buňkách speciálními metodami.



Obr. Plicní tkáň z nekroptického materiálu v centru s makrofágem, kde je viditelná eozinofilně se barvící cytoplasma, jádro i drobné jadérko.

7. ZPRACOVÁNÍ VZORKŮ PO FIXACI

(ZALÉVÁNÍ DO MÉDIÍ NEROZPUSTNÝCH VE VODĚ)

PRINCIP ZALÉVÁNÍ DO PARAFÍNU:

Princip: Záleží v prosycení odvodněné tkáně rozehřátým parafínem. Parafín vyplní všechny mikroskopické štěrbiny v tkáni, takže se dají krájet tenké řezy

Má 4 etapy:

1. odvodnění tkáně vzestupnou alkoholovou řadou
2. prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafín mísící se s alkoholem např. xylenem
3. prosycení tkáně tekutým parafínem (56–58 °C)
4. vlastní zalití do parafínu

K odvodnění a prosycení tkáně se v laboratoři používá tkáňový procesor (autotechnikon).

1. **ODVODNĚNÍ TKÁNĚ**

- Přikrojený vzorek tkáně je uložen v kazetách, které jsou složené do speciálního koše, v němž postupně projdou celým procesem v tkáňovém procesoru.
- Odvodnění tkáně se provádí vzestupnou řadou alkoholů o koncentraci 70 %, 80 % a 96 %. Následuje lázeň 96% alkoholu s xylenem v poměru1:1.

2. **PROSYCENÍ TKÁNĚ XYLENEM (intermedium)**

- INTERMEDIUM –látka, která se mísí s alkoholem i se zalévacím médiem (s parafinem) 3 lázně xylenu
- Po odvodnění se alkohol v tkáni nahradí xylenem, protože alkohol se nemísí s parafinem.

3. **PROSYCENÍ TKÁNĚ PARAFÍNEM**

- Poslední 3 lázně jsou parafínové, s nastavenou teplotou cca 56–58°C. V této fázi vyplní parafín všechny mikroskopické štěrbiny ve tkáni.
- Krok 1-3 trvá cca 12hodin.

Typy parafinů:

Měkký: bod tání pod 50 °C, vhodný k průkazu enzymů.
Tvrdý: bod tání vyšší než 50°C.

Zkvalitňování parafínu:

Přepouštěním: v termostatu při teplotě 58°C. K přepuštěnému parafínu se přidá včelí vosk (3-5 g vosku na 100 g parafínu). Umožňuje krájení tenkých řezů.

4. VLASTNÍ ZALITÍ TKÁNĚ DO PARAFINU

- Zalévání se provádí pomocí zalévacího automatu.
- Kazety s tkání vyjmuté z tkáňového procesoru se vloží do vyhřáté komory zalévacího automatu.
- Otevře se kazetka s tkání, pomocí pinzety se z kazety vyjme tkáň a vloží se do nerezové kovové formičky – **tkáň se orientuje na řeznou plochu**.
- Zalije se rozpuštěným parafínem.
- Zalitá formička se přiklopí částí kazety, označenou číslem vzorku, nechá se ztuhnout na chladící desce.
- Po ztuhnutí se vyklopí z kovové formičky tkáňový bloček, okrojí se přebytečný parafín kolem tkáně.
- Takto je bloček připraven k následujícímu KRÁJENÍ.

PŘÍPRAVA BEZVODÉHO ALKOHOLU:

- Absolutní alkohol: připravuje se z 96% alkoholu, pomocí karbidu vápníku nebo pomocí vyžíhané modré skalice.

ZALÉVÁNÍ DO CELOIDINU:

Použití: kosti, šlachy, a v neurohistologii. Tvrdé tkáně a velké objekty Nelze krájet tenké řezy.

Celoidin: je čistá nitrocelulóza rozpuštěná v etanol éteru.

Princip:

Záleží v prosycování tkáně postupně koncentrovanějšími roztoky celoidinu při pokojové teplotě.

- Po prosycení tkáně se bloček zalije postupně do roztoků celoidinu o koncentraci 2 % až 10 %, celoidin se nechá ztuhnout. Vlastní zalití se provádí 10 % celoidinem.
- Celoidinové bločky se tvrdí v 70 % etanolu.

Postup:

1. Odvodnění (vzestupná řada etanolů).
2. Prosycení tkáně (etanol éterem). 6–8 hod,
3. Prosycení celoidinem (postupné zalití 2-10 % celoidinem) 2, 4, 8, 10 % nebo 2.5, 5, 10 %.
4. Vlastní zalití se provádí 10 % celoidinem.
5. Tvrzení bločků v 70 % etanolu, v němž se uchovává blok až do krájení.

Úkol: Jakým způsobem se můžeme přesvědčit o množství vody v bezvodém alkoholu?

Obr. Tkáňový procesor.

Obr. Vlastní zalévání tkáně do parafínu.

MIKROSKOPOVÁNÍ: základní typy epitelů, krycí epitel, typy žlázových buněk

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

8. ZALÉVACÍ MEDIA ROZPUSTNÁ VE VODĚ

1. ZALÉVÁNÍ DO ŽELATINY:

Postup:

- Prosycování tkáňového bločku, postupně koncentrovanějším roztokem želatiny (10–20 %) při teplotě 37 °C. Vlastní zalití se provádí do 20% želatiny.
- Bloček se zchladí a pak tvrdí ve formolu (tvrzení je nezbytné, jinak zůstane bloček mazlavý a nedá se ukrojit).
- Tvrzené želatinové bločky krájíme v kryostatu.

Příprava želatiny:

- Roztok želatiny 10–20% se připraví rozpuštěním odváženého množství v destilované vodě.
- Želatinu necháme 15 minut bobtnat.
- Dolijeme vodou do požadované koncentrace.
- Dáme do termostatu (cca 57 °C) dokud se želatina zcela nerozpustí.
- Želatina nesmí obsahovat sraženiny ani bublinky.
- Takto připravenou želatinu můžeme uchovat v termostatu, přesto je ale lepší, udělat vždy želatinu čerstvou.

2. ZALÉVÁNÍ DO CELODALU:

Celodal:

- Je polymer močoviny a formolu, je to čirá, bezbarvá a silně viskózní tekutina rozpustná ve vodě.
- Po přidání kyselin rychle tuhne, tuhnutí urychluje i působení vyšších teplot = celodal je v tu chvíli nerozpustný.
- Zalívat do celodalu můžeme přímo nebo po prosycení.

Výhody:

- Nemusíme odvodňovat.
- Krájení je rychlé, krájíme na sáňkovém mikrotomu, (důležité je zvlhčování bločku i nože pomocí alkoholu).
- Lze zhotovit velmi tenké řezy.

Nevýhody:

- Silně se přibarvuje tkáň.

3. ZALÉVÁNÍ DO VOSKŮ ROZPUSTNÝCH VE VODĚ:

- Jsou vysoce rozpustné ve vodě.

Výhoda: tkáň se nemusí odvodňovat.

Nevýhoda: špatné napínání řezů na podložní sklo.

MIKROSKOPOVÁNÍ: resorpční epitel (metody znázornění)

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

9. MIKROTOMY

(KRÁJENÍ PARAFINOVÝCH BLOČKŮ, NAPÍNÁNÍ A LEPENÍ)

MIKROTOMY:

1. sáňkový mikrotom
2. rotační mikrotom
3. kryostat

1. SÁŇKOVÝ MIKROTOM:

- slouží ke krájení parafínových, celoidinových nebo celodalových bločků.

Obr. *Sáňkový mikrotom.*

Jednoduchý popis mikrotomu:

1. Na levé straně je mikrometrický šroub se stupnicí v µm, nastavujeme na něm požadovanou sílu řezů.
2. Neapolská svorka – upevnění tkáňového bloku.
3. Nůž je pohyblivý vůči pevně upnutému bločku.

2. ROTAČNÍ MIKROTOM:

- slouží pouze ke krájení parafinových bločků.

Obr. Rotační mikrotom.

Jednoduchý popis mikrotomu:

1. Mikrotomový nůž je fixně upevněn a proti němu se pohybuje svorka s bločkem poháněná otáčením s klikou.
2. Mikrometrický posun pomocí mikrometrického šroubu (v případě vyobrazeného mikrotomu navolení síly řezu pomocí tlačítek na displeji).

3. KRYOSTAT:

V kryostatu se krájí nezalité tkáně (popřípadě tkáně zalité do želatiny).

Krájení nefixované tkáně se využívá především při peroperačních biopsiích, nebo při krájení řezů, v nichž chceme prokazovat např. lipidy.

Obr. K*ryostat.*

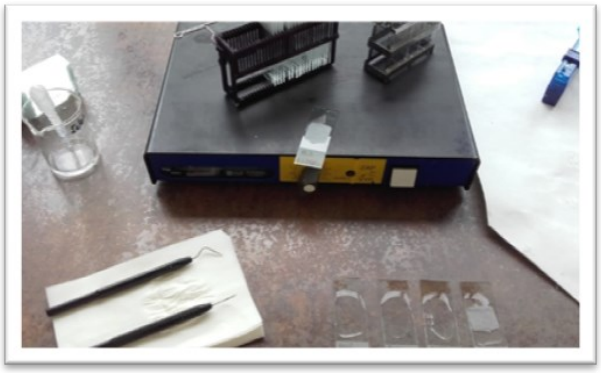
Jednoduchý popis mikrotomu:

1. Kryostat je v podstatě rotační mikrotom, který je vsazen do chladící komory.
2. Nůž i bloček jsou samostatně chlazeny na teplotu cca - 25 °C, v případě potřeby může být tato teplota zvýšena či snížena dle druhu krájené tkáně.
3. Systém krájení je stejný jako u rotačního mikrotomu.

Krájení parafínových bločků na mikrotomech:

Nakrájené řezy se přenášejí na čistá podložní skla, která mohou být opatřená adhezní směsí (kamencová želatina, bílek s glycerinem, Poly-L-lysine solution atd.) Podložní sklo musí být označené číslem shodným s číslem krájeného bločku.

1. Parafinový bloček se upne do svorky mikrotomu.
2. Nejprve se provede hrubé zkrojení, tak aby byl zastižen celý průřez tkáňového vzorku.
3. Vlastní krájení řezů o síle 3 - 4µm.
4. Krájí se buď jeden řez, nebo se vzorek prokrajuje, popřípadě se krájí řezy sériové.
5. Ukrojené řezy se pomocí preparační jehly přenesou na kapku 0,5% želatiny kápnutou na podložním sklíčku nebo se mohou podkápnout malým množstvím vody (nejlépe destilované).
6. Na vyhřívací ploténce se pomocí preparační jehly řezy na podložním sklíčku upraví a napnou.
7. Ze sklíčka se opatrně slije přebytečná želatina nebo odsaje zbytek vody, řez si přidržujeme preparační jehlou.
8. Preparáty se umístí do stojánku a dosuší se v termostatu či v barvícím automatu.
9. Takto jsou řezy připravené k **BARVENÍ**



NEJČASTĚJŠÍ OBTÍŽE KRÁJENÍ

řezy se kroutí a svinují:

- tvrdým parafínem
- kvůli nízké teplotě
- řezy jsou silné

řezy se srážejí dohromady:

- tupý nůž
- měkkým parafínem
- vysokou teplotou v místnosti

příprava 0,5% roztoku želatiny:

0,5 g želatiny

100 ml destilované vody

Želatinu nasypeme do destilované vody a zahřejeme v mikrovlnné troubě. Necháme zchladnout a před použitím zfiltrujeme. Roztok želatiny se připravuje denně čerstvý.

Příprava kamencové želatiny:

100 ml 1% roztoku želatiny ve vodě

0,1 g síran chromitodraselný

Rozpustit a doplnit do 200 ml destilovanou vodou. Uchovat v lednici, před použitím ještě jednou ředit destilovanou vodou.

Úkol: Krájení a napínání

MIKROSKOPOVÁNÍ: slizniční a retikulární vazivo, heparinocyty

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

ZHOTOVENÍ PREPARÁTŮ Z TVRDÝCH TKÁNÍ:

Spočívá v zbavení tkáně vápenatých solí, účinkem zředěných kyselin, které přemění nerozpustné soli, v soli rozpustné ve vodě.

Pravidla dekalcifikace: Fixovaná tkáň, po fixaci vyprat v etanolu. Dekalcifikace musí být rychlá, s použitím dostatečného množství dekalcifikačního roztoku.

Po dekalcifikaci vypírání v roztoku 5% kamence draselného.

Nesmí se přenést do vody = došlo by k zbobtnání tkáně

Dekalcifikační tekutiny:

- 5% kyselina dusičná
- 5% kyselina trichloroctová
- Kyselina mravenčí
- Chelaton

MODIFIKACE METODY ODVÁPNĚNÍ KOSTÍ 5 % KYSELINOU DUSIČNOU

Spočívá v "dokonalé" fixaci tkáně 10 % formolem a v rozpuštění minerálních solí účinkem 5% kyseliny dusičné, která přemění nerozpustné soli v soli rozpustné ve vodě a následným vypráním tkáně v 10% formolu.

1) velikost vzorku cca 10x10x5 mm

2) dostatečná fixace (dofixování) tkáně v 10 % formolu, 24–48 hodin (delší doba tkáni neškodí)

3) odvápnění v 5% roztoku kyseliny dusičné, teplota cca 22 °C, kontrola po 30–60 min. (kosti lebky odvápnění 12 hodin)

4) kontrola odvápněného vzorku opatrným vpíchnutím jehly

5) vyprání vzorku tkáně v 10 % formolu 1-2 hodiny

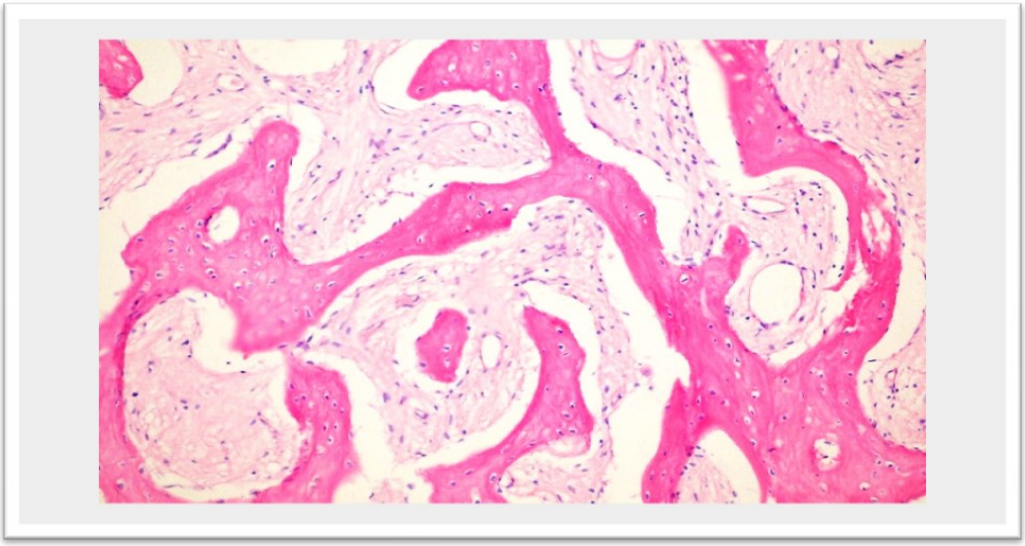
6) rutinní zpracování (tkáňový procesor, zalití do parafínu)

7) krájení na sáňkovém mikrotomu řezů o síle 3 μm, napínáme je na 0,5 % želatinu na podložní skla opatřená kamencovou želatinou

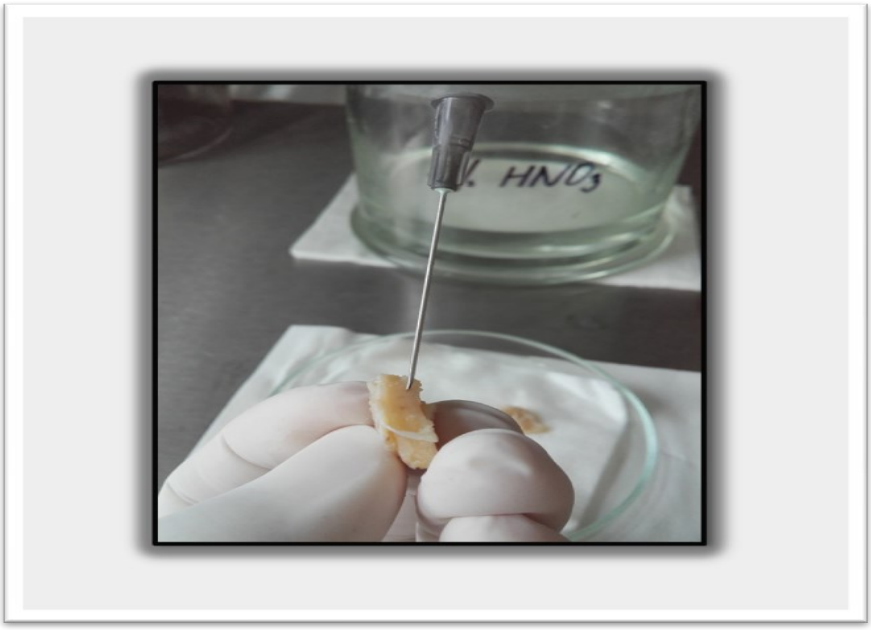
8) barvení Mayerovým hematoxylinem 10 min., eosinem 5 vteřin, speciální barvení dle jednotlivých metod, imunohistochemický průkaz, použití kvalitních podložních skel.

Výše popsaný postup jsem vytvářela od ledna 2017 na Oddělení patologie Ústřední vojenské nemocnice a Vojenské fakultní nemocnice v Praze.
Do běžné praxe je uveden od 2. 5. 2017: SP/08/v01 Odvápňování tkáňových vzorků.
autor: Michaela Semerádová

Úkol: Existují ještě jiné možnosti zpracování tvrdých tkání?



Obr. Odvápněný vzorek tkáně.



Obr. Zkouška fáze odvápnění vzorku kosti.

MIKROSKOPOVÁNÍ: chrupavka, kost

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

10. BARVENÍ PARAFINOVÝCH ŘEZŮ: HEMATOXYLIN – EOSIN

Barvení histologických řezů:

- Histologické řezy se barví z důvodu rozlišení všech buněk a tkání, pokud bychom řezy neobarvily, nebylo by možné je hodnotit ve světelném mikroskopu. V základních – přehledných barvicích metodách používáme vždy kombinaci jednoho jádrového (obvykle bazického) barviva a jednoho nebo více barviv plasmatických (kyselých)
- Neobarvené histologické řezy se nedají pozorovat v běžně používaném mikroskopu, dají se prohlédnout v mikroskopu s fázovým kontrastem.

HEMATOXYLIN – EOSIN: základní přehledné barvení histologického preparátu – jádrové barvivo – hematoxylin, plasmatické barvivo – eosin.

Příprava hematoxylinu k barvení:

- Každý hematoxylin barví v podobě barevného (hemateinového) laku.
- Hematoxylin musíme nejprve oxidovat– vznikne hematin (ještě nebarví)
- Působením různého druhu mořidla vznikne různý typ hematoxylinu

Hematoxyliny dle druhu mořidla:

- **Kamencové**: Harrisův, Mayerův hematoxylin
- **Železité**: Weigertův, Heidenhainův hematoxylin

Jako kyselé barvivo v metodě HE používáme eosin:

- Eosin žlutý
- Eosin červený
- Eosin rozpustný v alkoholu
- Nejčastěji používáme 0,1-0,5 % vodného roztoku žlutého eosinu.

Postup barvení HE:

1. Deparafinace (2x 5 minut xylen, 2x 5 minut alkohol)
2. Oplach v destilované vodě
3. Hematoxylin (Mayerův, Harrisův) 3-10 min
4. Praní ve vodě 5 minut
5. Eosin1-3 minuty
6. Oplach v destilované vodě
7. Odvodnění (2x 2 minuty alkohol, 2x2 minuty aceton)
8. Projasnění (2x2 minuty xylen)
9. Montování

Výsledky:
Jádra – modře
Chrupavka – modře
Kolagenní vazivo – růžově
Sval – červeně
Erytrocyty – oranžově

Deparafinace:

- Slouží k odstranění parafinu z řezu.
- Provádí se: 2x 5minut xylen, 2x 5 minut alkohol.
- Následuje oplach v destilované vodě.

Odvodnění:

- Provádí se: 2x2 minuty alkohol, 2x2 minuty aceton.

Projasnění:

- Provádí se: 2x2 minuty xylen.

Montování (montovací média a jejich výběr):

- Montovací médium musí být dokonale průhledná látka s vysokým indexem lomu světla.

- Obarvené preparáty montujeme tak, že na podložní sklíčko kápneme kapku montovacího média a přiklopíme krycím sklíčkem. Přebytečné médium otřeme gázou.

Montovací média:

A. Nerozpustná ve vodě:(nejprve musíme provést odvodnění a projasnění)

- Kanadský balzám
- Solakryl
- Pertex

B. Rozpustná ve vodě:(montujeme přímo z vody, používáme u **průkazu lipidů a enzymů**)

- Glycerin
- Permafluor – komerčně vyráběné montovací médium
- Glycerinová želatina
- Levulózový sirup
- Sirup z arabské gumy

HEMATOXYLIN – EOSIN:

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: hladké svalstvo, kosterní a srdeční sval

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: základní neurohistologické metody

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

11. PŘEHLEDNÉ BARVICÍ METODY

(WEIGERT VAN GIESON, AZAN, MASSONOVY TRICHROMY)

WEIGERT VAN GIESON

slouží k průkazu kolagenních vláken

Postup:

1. Deparafinace
2. Oplach v dest. vodě
3. Weigertův hematoxylin 10 min. (míchá se roztok A+B v poměru 1:1)
4. Praní ve vodě 1 min.
5. Kyselý alkohol 5 vteřin
6. Praní ve vodě 5 min.
7. Van Gieson (pikrofuchsín) 5 min.
8. Krátký oplach ve vodě
9. Odvodnění, projasnění, montování.

Výsledky:

jádra – modročerně
kolagenní vazivo – třešňově červeně
svalstvo, erytrocyty – žlutě

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis

AZAN

Slouží k průkazu kolagenních vláken.

Někdy bývá tato metoda označována jako – modrý trichrom.

Postup:

1. Deparafinace.
2. Vyprat v dest. vodě.
3. Roztok Azokarmínu 30 min v termostatu při 58 °C.
4. Krátký oplach dest. vodou.
5. Diferencování v anilínovém alkoholu, za kontroly v mikroskopu. Dokud nevynikne ostré červené zbarvení jader na růžovém podkladu.
6. Diferencování přerušíme oplachem v kyselém alkoholu.
7. Oplach v destilované vodě.
8. Moření řezu 5-15 min. v 5 % kyselině fosfowolframové.
9. Krátce opláchneme řezy dest. vodou.
10. Barvíme roztokem anilínové modře s oranž G 5-15 min.
11. Opláchneme řezy ve vodě.
12. Odvodníme, projasníme, montujeme.

Výsledky:

jádra – karmínově červeně
erytrocyty – oranžově (červeně)
kolagenní vazivo – jasně modře
svalstvo červeně
hlen a amyloid – modře
(hlen se kyselými barvivy někdy přibarvuje, amyloid je patologická struktura)

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

MASSONOVY TRICHROMY

Modrý, zelený a žlutý – založené na schopnosti kolagenních vláken (kolagenu typu I) barvit se kyselými barvivy

Postup:

1. Deparafinace.
2. Oplach v dest. vodě
3. Weigertův železitý hematoxylin 10 min.
4. Oplach v dest. vodě.
5. Diferencování v kyselém alkoholu.
6. Oplach v dest vodě.
7. Praní ve vodě 5 minut.
8. Kyselý fuchsin – ponceau de xylidine 5 min. (nebo roztok červeně).
9. Oplach destilovanou vodou.
10. 1%kyselina fosfomolybdenová (fosfowolframová) 5 minut.
11. Bez oplachování 1% světlá zeleň nebo anilinová modř – je nutno kontrolovat pod mikroskopem.
12. Opláchnout dest. vodou.
13. Odvodnit, projasnit, zamontovat.

Výsledek barvení:

kolagenní vazivo – zeleně nebo modře
(žlutá – žlutý trichrom samostatná metoda – Hematoxylin – eosin + šafrán)
jádra – modročerná
svalstvo – červeně

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: histologické stavba srdce, aorty a cévního svazku

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: lymfatická uzlina, slezina a brzlík

Úkol: Mikroskopování preparátu zakreslení a popis.

12. ZNÁZORNĚNÍ ELASTICKÝCH VLÁKEN

ORCEIN:

1. Deparafinace.
2. Vyprat v tekoucí vodě
3. Orcein – 60 minut, oplach v dest. vodě. Při 38 až 40 °C.
4. Diferencování kyselým alkoholem, až elastická vlákna ostře vyniknou na zcela lehce přibarveném pozadí, vyprání ve vodě.
5. Mayerův nebo Harrisův hematoxylin 3–6 minut, oplach v pramenité vodě.
6. Voda 5 minut, do zmodrání jader.
7. Odvodnění, projasnění, montování.

Výsledek:
Elastická vlákna – sytě červenohnědě
Jádra – modře

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

ALDEHYD – FUCHSIN

Výsledek:
Elastická vlákna – **ostře fialově**
Jádra – modře

RESORCIN – FUCHSIN

Výsledek:
Elastická vlákna – **modročerně**
Jádra – červeně

MIKROSKOPOVÁNÍ: hypofýza, štítná žláza

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: nadledviny a demonstrace Langerhansových ostrůvků.

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

13. PŘEHLED ZÁKLADNÍCH CYTOLOGICKÝCH METOD

Cytologické barvení slouží k znázornění jaderného chromatinu a různých cytoplazmatických struktur, např. sekreční granula, mitochondrie.

HEIDENHAINOVO BARVENÍ

základní cytologická metoda, slouží k zvýraznění některých cytologických struktur např. mitochondrie, centrioly, chromatin

1. Deparafinace.
2. Oplach ve dest. vodě – 5 minut.
3. Moření v 2,5 % kamenci železitém (síran železitoamonný) – 24 hodin, oplach v dest. vodě.
4. Alkoholický roztok hematoxylinu – 24 hodin, oplach v dest. vodě.
5. Diferencování ve 2,5 % kamenci železitém (zčernání jader a cytoplazma šedá).
6. Praní v pramenité vodě – 15 minut.
7. Odvodnění, projasnění, montování.

SPECIÁLNÍ KAMENEC NA MOŘENÍ A NA DIFERENCOVÁNÍ!!!

Výsledek:

Jaderný chromatin, mitochondrie, sekreční granula – modročerně až černě
ostatní struktury jako při přehledné barvicí metodě!

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

Dobarvení jader u speciálních metod:

HEMATOXYLINEM:

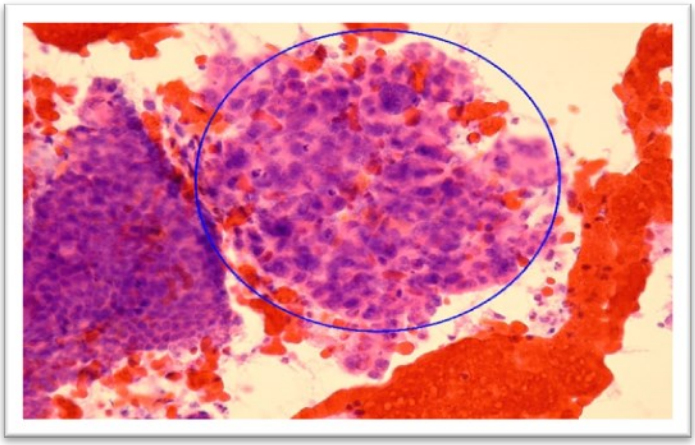
- Mayerův, Harrisův hematoxylin – modře.
- Weigertův hematoxylin – modročerně až hnědočerně.

JÁDROVOU ČERVENÍ:

- Jádrová červeň – jádra jsou červená.

CYTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ BUNĚK V NÁTĚRECH:

- Barvení nátěrů z malých částeček tkáně nebo z tekutin obsahujících volné buňky (např. punktáty z dutiny břišní, pohrudnicové, sputum, sekret poševní, aspirační cytologie atd.).
- Barvení: **PAPANICOLAU, MAY GRÜNWALD – GIEMSA**.



Obr. Cytologický nátěr.

MIKROSKOPOVÁNÍ: slinné žlázy, pankreas, jícen

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: tenké střevo, tlusté střevo

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: appendix, játra

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

14. PRŮKAZ RETIKULÁRNÍCH VLÁKEN

IMPREGNACE GOMORIHO:

Tato metoda patří mezi metody impregnační, slouží k **znázornění retikulárních vláken.**

1. Deparafinace.
2. Oplach v dest. vodě.
3. Oxidace 0,5% manganistan draselný 3-5 min. Oplach dest. voda.
4. Bělení 2 % siřičitanem draselným – 2 min.
5. Praní ve vodě 10 min.
6. Moření 2% kamenec železitý1 min.
7. Praní ve vodě 5 min.
8. Amoniakální roztok stříbra 1 min.
9. Krátký oplach v dest. vodě.
10. Redukce v 10 % formolu – 5 min. Oplach v dest. vodě.
11. 1% chlorid zlatitý 10-15 min.
12. Praní ve vodě 5 min. Oplach v dest. vodě. Ještě fixace 1 % thiosíranem sodným 1 min. a důkladně vyprat v tekoucí vodě 5 min
13. Jádrová červeň 5-10 min.
14. Odvodnění, projasnění, montování.

Příprava amoniakálního roztoku stříbra:

10% dusičnan stříbrný smícháme s 10 % hydroxidem sodným, kdy nám smícháním vznikne sraženina, po kapkách přidáváme amoniak a opatrné promícháváme, toto opakujeme tak dlouho, dokud se sraženina nerozpustí. K roztoku pak následně přidáme pár kapek 10 % dusičnanu stříbrného, dokud nevznikne opalescence, vzniklý roztok doplníme dest. vodou do 100 ml.

Výsledky:

retikulární vlákna – **černě**
jádra – červeně

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: průdušnice, plíce (demonstrace elastiky v plicích)

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

15. PŘEHLED HISTOCHEMICKÝCH METOD

(PRŮKAZ POLYSACHARIDŮ, PRŮKAZ LIPIDŮ)

PRŮKAZ POLYSACHARIDŮ:

PAS reakce: (glykoproteiny, glykolipidy, glykogen)

Jejím principem je oxidace polysacharidů, při které vznikají aldehydy, jež reagují se Schiffovým reagens za vzniku červenofialové sraženiny.

Postup:

1. Deparafinace.
2. Oplach ve vodě.
3. 1% kyselina jodistá 5 minut.
4. Praní ve vodě 10 minut.
5. Schiffovo reagens 20 minut (nejlépe v temnu).
6. Praní ve vodě 10 minut.
7. Mayerův nebo Harrisův hematoxylin 5 minut.
8. Oplach vodou 5 minut.
9. Odvodnění, projasnění, montování.

Výsledky:
PAS pozitivní substance (nerozpustné sraženiny) - červenofialově
Jádra – modře

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

PAS reakce s kontrolním řezem:

- Tato metoda slouží k průkazu glykogenu.
- Glykogen: je polysacharid, který se rozštěpí pomocí α – amylázy
- Reakce se provádí souběžně na dvou řezech vyšetřované tkáně (na dvou sklíčkách).
- **Je-li PAS reakce pozitivní pouze na jednom, amylázou neinkubovaném řezu, pak jde o důkaz přítomnosti glykogenu, který byl na druhém řezu rozštěpen na glukózu.**
- **Pokud je reakce pozitivní v obou řezech, jde o jasně PAS pozitivní, diastázorezistentní polysacharid.**

Postup:

1. Deparafinace.
2. Oplach v destilované vodě.

   Jeden řez – kontrolní – opláchneme v destilované vodě.

   Druhý řez zůstane v destilované vodě do doby provedení vlastní PAS r.
3. Kontrolní řez – inkubace ve slinách 30 minut.
4. Dostatečné vyprání řezu v destilované vodě.

   Vlastní PAS reakce na obou řezech:
5. 1% kyselina jodistá 1 hodina. (10–30 min)
6. Praní 2 minuty v tekoucí vodě.
7. Schiffovo reagens 20 minut.
8. Praní 2 minuty v tekoucí vodě.
9. Mayerův hematoxylin 1–10 min.
10. Praní ve vodě do zmodrání jader.
11. Odvodnění, projasnění, montování.

Výsledky:

Diastázorezistentní polysacharidy – červenofialově
Kontrolní řez – negativní reakce
Jádra – modrá

PRŮKAZ LIPIDŮ:

- Základní metodou pro průkaz lipidů je barvení tkáně barvivy rozpustnými v tucích a nerozpustnými ve vodě, nejpoužívanější metodou je barvení **OLEJOVOU ČERVENÍ**. Lze použít také barviva sudanové řady (sudan III, sudan IV, sudanová čerň)

Pravidla pro zpracování vzorku, v němž chceme prokázat lipidy:

- Tkáň, ve které chceme prokazovat lipidy, nesmí přijít do kontaktu s rozpouštědly tuků, jako je např. vysokoprocentní alkohol, xylen atd.
- K fixaci se používá nejčastěji formol, doba fixace by neměla překročit 48 hodin.
- Tkáň krájíme v kryostatu.

Postup:

1. Oplach v destilované vodě.
2. Oplach v 50% alkoholu.
3. Olejová červeň O 20 minut.
4. Oplach v destilované vodě.
5. Mayerův hematoxylin 6 minut.
6. Voda 5 minut.
7. **Z vody – montování do glycerinu (ihned prohlížet).**

Výsledky:
Tukové kapénky – červené
Jádra – modře

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: ledvina, přechodný epitel, demonstrace buněčných inkluzí

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

16. PŘEHLED CYTOLOGICKÝCH METOD

(PRŮKAZ MITOCHONDRIÍ)

HEIDENHAINOVO BARVENÍ

základní cytologická metoda, slouží k zvýraznění některých cytologických struktur např. mitochondrie, centrioly, chromatin

Postup:

1. Deparafinace.
2. Oplach ve dest. vodě – 5 minut.
3. Moření v 2,5 % kamenci železitém (síran železitoamonný) – 24 hodin, oplach v dest. vodě.
4. Alkoholický roztok hematoxylinu – 24 hodin, oplach v dest. vodě.
5. Diferenciace ve 2,5 % kamenci železitém (zčernání jader a cytoplazma šedá).
6. Praní v pramenité vodě – 15 minut.
7. Odvodnění, projasnění, montování.

Výsledky:
Jaderný chromatin, **mitochondrie**, sekreční granula – **modročerně až hnědočerně.**

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

17. HISTOCHEMICKÝ PRŮKAZ ENZYMŮ

Enzymy a jejich vlastnosti:

Složité chemické reakce probíhají při látkové výměně v buňkách a tkáních, jsou uskutečňovány pomocí enzymů, jež působí při těchto reakcích jako **katalyzátory**.

Enzymy jsou buď rozpuštěné **v cytoplazmě**, nebo jsou vázané na určité struktury např. mitochondrie, Golgiho komplex, mikroklky, **žíhaný lem** atd.

Po chemické stránce patří mezi **bílkoviny**.

Enzymy reagují s určitým druhem látky, kterou označujeme jako **substrát**.

Aktivita enzymů závisí na řadě činitelů (pH a teplota).

Každý enzym má nejvyšší aktivitu jen v určitém rozmezí pH a teploty. Pokud toto nedodržíme, má to za následek snížení aktivity enzymů, popřípadě může nastat i inaktivace enzymů.

Inaktivátor = vysoká teplota nebo látky se specifickým inaktivačním účinkem.

Aktivátor = látka, která zvyšuje aktivitu enzymů.

Odběr materiálu a fixace:

Pokud možno odebíráme a okamžitě fixujeme tenké malé vzorky.

K fixaci používáme vychlazeného bezvodého acetonu (vychlazeného na 0 °C až 4 °C, po dobu 8–12 hodin).

Tkáň zaléváme zkráceným způsobem do parafínu (popřípadě se dá využít k fixaci i vychlazený formol či Bakerova tekutina a po fixaci krájet tkáň v kryostatu).

Při odvodnění tkáně nahrazujeme alkohol acetonem.

K průkazu NESPECIFICKÉ ESTERÁZY a ALKALICKÉ FOSFATÁZY je nejčastěji používána:

metoda azokopulační

Princip: působením enzymu se odštěpí ze substrátu (jako substrát se používá sloučenina naftolu – α-naftylfosfát nebo α-naftylacetát) naftol, který pak prokazujeme pomocí diazoniové soli. Naftol reaguje s diazosolí (kopuluje) za vzniku barevné, ve vodě nerozpustné sraženiny – **azobarviva**. Protože se sloučeniny naftolu v organizmu nevyskytují, je reakce specifická.

PRŮKAZ NESPECIFICKÉ ESTERÁZY:

Postup:

1. Deparafinace (xylen, **aceton**).
2. Oplach ve vodě – 5 minut.
3. Inkubace při pokojové teplotě 10–20 minut; případně zvýšíme teplotu na 37 °C. Inkubační roztok: (fosfátový) pufr (pH 7,4) 20ml alfa – naftylacetát – substrát alfa, dáme do suché nádobky nejprve alfa – naftylacetát, který rozpustíme v několika kapkách acetonu, potom přidáme pufr a diazovanou sůl (Fast Blue) přefiltrovat.
4. Oplach v dest. vodě.
5. Jádrová červeň 5–15 minut dobarvení jader.
6. Oplach v dest. vodě.
7. **Montování do glycerinu.**

Výsledky:
Černé azobarvivo v místě výskytu nespecifické esterázy
Jádra – červeně

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

PRŮKAZ ALKALICKÉ FOSFATÁZY:

žíhaný lem resorpčního epitelu (sliznice tenkého střeva, proximální tubulus ledvin)

Postup:

1. Deparafinace (xylen, **aceton**).
2. Oplach řezů v dest. vodě.
3. Inkubace 20–30 minut při 37 °C. Inkubační roztok: Michaelis (veronal-acetátový pufr) pufr (pH 9,2) 20ml substrát – alfa-naftyl fosfát, diazotovaná sůl (fast blue/red) smísit, přefiltrovat.
4. Oplach v dest. vodě.
5. Jádrová červeň/kamencový hematoxylin dobarvení jader.
6. Oplach v dest. vodě.
7. **Montování do glycerinu.**

Výsledky:

Černé nebo hnědočervené azobarvivo (podle diazočinidla) vznikne v místě výskytu alkalické fosfatázy
Jádra – doplňkovým barvivem podle odstínu azobarviva

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: varle, prostata

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

18. CYTOCHEMIE RESORPČNÍHO EPITELU

Resorpční epitel:

- Buňky jsou přizpůsobeny k tomu, aby přijímaly ze zevního prostředí různé látky, které pak odevzdávají, buď beze změny nebo po předchozím zpracování do prostředí vnitřního (do krve nebo lymfy).
- **Mikroklky** – soubor mikroklků je patrný ve světelném mikroskopu jako **žíhaný lem.**
- **Žíhaný lem** – jsou na něj vázány enzymy uplatňující se při resorpci, (např. alkalická fosfatáza).
- **Resorpční epitel – tvoří výstelku tenkého a tlustého střeva a proximálních tubulů ledvin**.
- Buňky jsou kubické až cylindrické, na apikálním povrchu mají **žíhaný lem**.

ALCIÁNOVÁ MODŘ:

– barvení na mucin – hlen (glykoproteinové povahy), znázornění glykosaminoglykanů (GAG) mezibuněčné hmoty pojivových tkání, především hyalinní chrupavky, kolagenního a rosolovitého vaziva.

Postup:

1. Deparafinace.
2. Oplach v dest. vodě.
3. 1 % Alciánová modř 1-2 hodiny.
4. Oplach v dest. vodě.
5. Jádrová červeň 5-10 min.
6. Oplach v dest. vodě.
7. Odvodnění, projasnění, montování.

Výsledky:

mucin– modrozeleně
jádra – červeně

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis

MIKROSKOPOVÁNÍ: vaječník, děloha

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

19. NEUROHISTOLOGICKÉ METODY

(např. NISSLOVA METODA, LUXOLOVÁ MODŘ)

NISSLOVA METODA:

Barvení Nisslovy – tigroidní substance (Nisslova tělíska). Podstatou metody je barvení ribosomů – GER toluidinovou modří nebo jiným bazickým barvivem (metylenová modř, thionin). Nejlépe vychází v tkáni fixované v 96% alkoholu, lze fixovat i formolem. Prokazuje se v parafinových nebo i celoidinových řezech.

Postup:

1. Deparafinace.
2. Vyprání v destilované vodě.
3. 0.1% toluidinová modř, 30 minut při 37 °C (termostat), poté nechat vychladnout.
4. Oplach v destilované vodě.
5. Diferencování v 96% alkoholu za kontroly v mikroskopu.
6. Odvodnit, projasnit, zamontovat.

Výsledek:

hrudky Nisslovy **tigroidní substance a jadérko – intenzivně tmavofialové modré až modrofialové.** Cytoplasma neuronů – světle modře až světle fialově

LUXOLOVÁ MODŘ:

Postup:

1. Deparafinace, oplach 96% alkohol.
2. 0.1 % Luxolová modř 24 hodin při 56 °C, pak vyndat a nechat v barvě vychladnout (10–15 min).
3. Opláchneme v 96% alkoholu a dáme do destilované vody.
4. Řezy ponoříme na chvilku do 0.05% uhličitanu lithného.
5. Diferencujeme střídavě v 70% alkoholu a v 0.05% uhličitanu lithném, vlastní diferencování je v 70% alkoholu.
6. Opláchneme v destilované vodě.
7. Jádrová červeň 10 minut. (k dobarvení jader)
8. Opláchnout v destilované vodě.
9. Odvodnit, projasnit, zamontovat.

Výsledek: **fosfolipidy (myelin) – modře,** jádra – červeně

NISSLOVA METODA – NISSLOVA SUBSTANCE:

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

MYELINOVÉ POCHVY – LUXOLOVÁ MODŘ:

Úkol: Mikroskopování zhotoveného preparátu danou metodou, zakreslení a popis.

MIKROSKOPOVÁNÍ: mícha, mozek, mozeček

Úkol: Mikroskopování preparátu, zakreslení a popis.

20. ZHOTOVENÍ PREPARÁTU Z PEROPERAČNÍ BIOPSIE

- Kontrola identifikačních údajů a obsahu nádobky se vzorkem a následné zaevidování. Do laboratoře je dodána žádanka společně se vzorkem v nativním stavu, následuje nezbytné přidělení identifikačního čísla vzorku, zapsání do nemocničního informačního systému (na žádance musíme zaznamenat datum a čas příjmu vzorku).
- Následuje přikrojení a popis vzorku, přilepení přikrojeného vzorku ke stolečku pomocí kryomedia, zmražení na mrazící destičce uvnitř kryostatu (- 25 až – 55 °C.
- Krájíme zmražené kryostatové řezy žiletkovým nožem ve zmrazovacím mikrotomu při – 25 °C, síla řezu cca 5 μm.
- Přilepení řezu na číslem označené podložní sklo potřené kamencovou želatinou. Fixace řezu ve vychlazeném acetonu (cca 5 °C) cca 5 vteřin. Oplach preparátu vodou.

Následný postup:

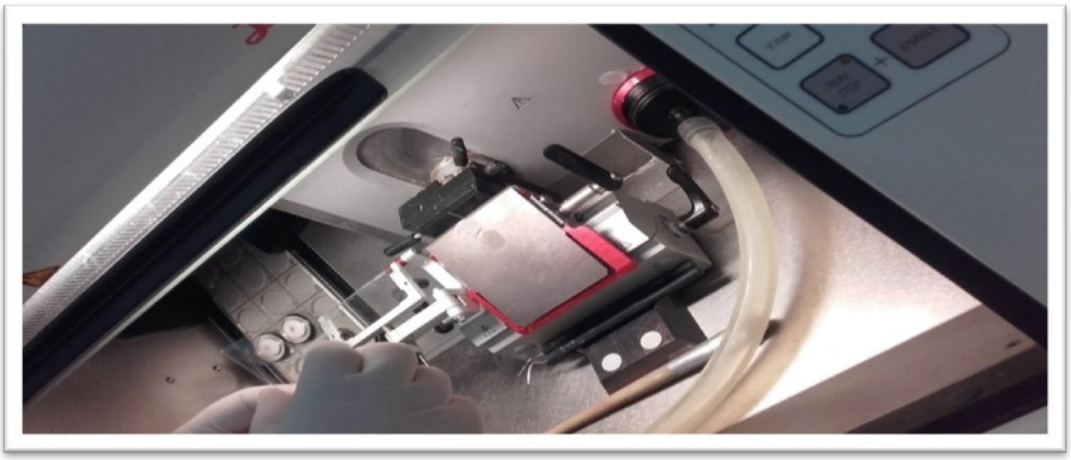
1. Harrisův hematoxylin cca 90 vteřin – 2 min (podle počtu preparátů).
2. Oplach vodou.
3. Zmodrání jader ve čpavkovém alkoholu (100 ml 70% alkohol s benzínem + 1 ml amoniaku).
4. Oplach vodou.
5. Eosin cca15 vteřin.
6. Oplach vodou.

Odvodnění:

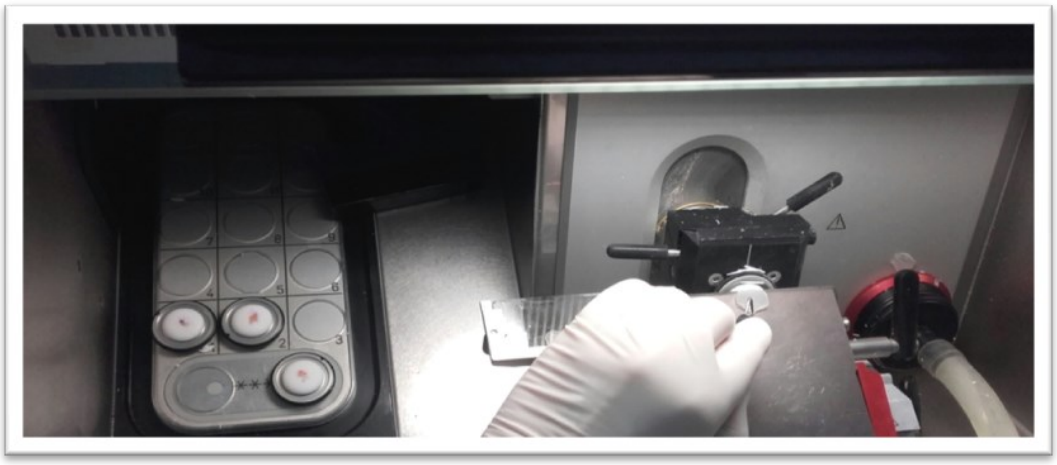
1. 2x 96% alkohol s benzinem po cca 2 vteřinách
2. 2x aceton cca po 2 vteřinách
3. 2x xylen cca po 2 vteřinách

- Zamontování preparátu montovacím mediem, zhotovený preparát se předá se žádankou lékaři.
- Po zpracování zmrazovací technikou je zbytek materiálu fixován 10 % formolem a zpracován rutinní histologickou technikou.

Obrázek c



Obrázek d



Obrázek e

Obr. a, b, c *Krájení vzorku tkáně v kryostatu.*

21. ZÁKLADY ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE

Transmisní elektronová mikroskopie – ultrastruktura buněk a tkání:

- Informace o ultrastruktuře buněk, proces je zdlouhavý, pracný a náročný.
- Princip**:** zdrojem záření je emise elektronů ve vakuu. Elektrony jsou emitovány z katody, která je tvořena rozžhaveným wolframovým vláknem.
- Obraz v elektronové mikroskopii pozorujeme nepřímo, projekcí na fluorescenčním stínítku. Výsledkem elektronové mikroskopie je fotografie (elektronogram).

Zpracování řezů a odběr:

- Velikost do 1 mm^3
- Provádí se pod vrstvou fixačního roztoku. Krájíme ostrou žiletkou.
- Ihned fixujeme v nadbytku fixačního média.

Fixace:

- Okamžitá, šetrná, vysoká pronikavost, zvýšený kontrast pozorovatelných struktur.
- **Nejčastěji dvojitá fixace:** glutaraldehyd a paraformaldehyd 1-6 % (Karnovského roztok) - rychle proniká do tkáně, oxid osmičelý (1 % nebo 2 %) – k postfixaci – těžký kov zvyšuje kontrast.

Vlastní zalití:

- Prosycení tkáně zalévacím médiem.
- Zalévání do pryžové nebo želatinové kapsle.
- Polymerizace (ztuhnutí) při teplotě 56–60 °C asi 3 dny.
- Zalévací média: polyesterové pryskyřice, epoxidové pryskyřice.

Úprava bločků přikrojení pyramidy:

- Odkrojíme přebytečné médium žiletkou do tvaru pyramidy, lze provést trimováním.

Krájení:

- Ultramikrotomem, polotenké řezy – tloušťka 1µ, zkrojení malé pyramidky, ze které budou pořízeny ultratenké řezy (cca 60–65 nm silné)
- **Řezy se krájí na vodní hladinu**
- Provádí se na vodní hladině pomocí štětečků nebo filtračního papíru nebo pomocí těkavých látek nebo se rovnou sbírají na elektronmikroskopické síťky.

Zachycení řezů na nosné síťky:

- Nosné síťky (měděné terčíky Ø 3 mm, různý počet ok).
- Vhodné někdy pokrýt síťky membránou z formwaru.

Kontrastování řezů:

Nejčastěji kombinovaná metoda – směs uranylacetátu a citranu olovnatého

22. ZÁKLADNÍ HISTOPATOLOGICKÉ METODY

(ZNÁZORNĚNÍ AMYLOIDU, BAKTERIÍ A PLÍSNÍ)

AMYLOID: - je patologický produkt poruchy metabolizmu bílkovin.

Barvení:

1. **Kongo červeň**
2. **Metylenová violeť**
3. **Saturnová červeň**

1. Kongo červeň:

- je nespecifická, metoda barví i jiné látky než amyloid. V laboratořích je často hojně využívána.

Výsledek:

Amyloid – rudě červeně
Jádra – modře

2. Metylenová violeť:

- je metoda specifická, metachromatická = výsledná barva je jiná, než je barva použité barvy.

Výsledek:

Amyloid – fialovočervený
Ostatní tkáňové složky – namodralé

3.Saturnová červeň:

Výsledek:
Amyloid – karmínově červeně
Jádra modře

BARVENÍ BAKTERIÍ:

1. Barvení podle Grama:

Výsledek:

Gram+	**tmavomodře**
Gram-	**růžově**
Jádra	červeně

2. dle Ziehl – Neelsona:

Výsledek:

Tuberkulózní bacily – tmavě až karmínově červeně
Jádra – modře
Ostatní tkáň – světle modře

PLÍSNĚ:

dle Grocotta:

- impregnační metoda.

- **princip:** je založená na prosycování solemi stříbra, které se vyredukuje na plísních.

Výsledek:

Plísně – tmavošedě až černě
Jádra – růžovočerveně

BIBLIOGRAFIE

NOVOTNÝ, Petr a Marie POESOVÁ. Digitální mikro – a makrofotografie pro učitele: příručka k projektu Věda do škol. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, 2013. ISBN 978-80-7290-686-4.

VACEK, Zdeněk. *Histologie.* Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-201-9.

VACEK, Zdeněk. *Histologická technika.* Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-202-7.

Zároveň se opírám o interní dokumentaci a o fotodokumentaci pořízenou na Oddělení patologie, Ústřední vojenské nemocnice-Vojenské fakultní nemocnice v Praze.

Směrnice: Příjem a průchod vzorků laboratoří – oddělení patologie. Praha: Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha 2015.

Pracovní postup: Zalévání do parafinu – oddělení patologie. Praha: Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha 2015.

Pracovní postup: Krájení parafínových bločků – oddělení patologie. Praha: Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha 2012.

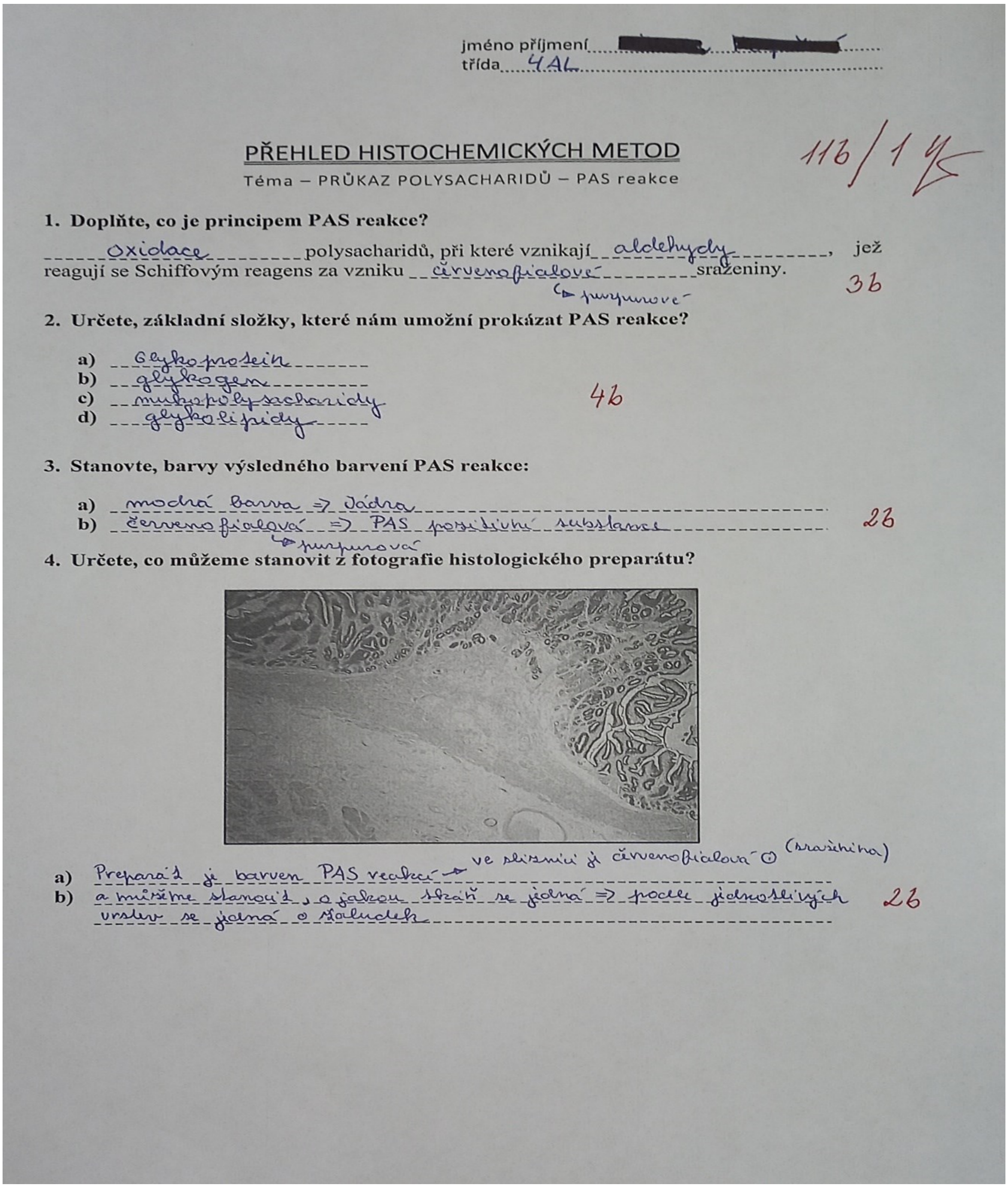
Pracovní postup: Barvení histologických řezů – oddělení patologie. Praha: Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha 2014.

Pracovní postup: Zhotovení preparátu peroperační biopsie – oddělení patologie. Praha: Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha 2014.

Fotografie:

Fotografie makroskopické i mikroskopické, které jsou použity v této publikaci, jsou pořízeny na Oddělení patologie, Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice Praha. Při jejich tvorbě jsem vycházela z publikace Digitální Mikro – a makrofotografie pro učitele a dále ze zkušeností, které plynou z praxe v naší laboratoři.

Vedení Oddělení patologie Ústřední vojenské nemocnice – Vojenské fakultní nemocnice Praha, U Vojenské nemocnice 1200, Praha 6, 169 02, souhlasí s použitím interní dokumentace, jakožto i s použitím fotodokumentace ve studijním materiálu Cvičení z histologie a histologické techniky, který je určen studentům Vyšší odborné zdravotnické školy a Střední zdravotnické školy, Alšovo nábřeží 6, Praha 1.



jméno příjmení [redacted]
třída 4AL

PŘEHLED HISTOCHEMICKÝCH METOD

Téma – PRŮKAZ POLYSACHARIDŮ – PAS reakce

11b / 1 / 5

1. Doplňte, co je principem PAS reakce?

oxidace polysacharidů, při které vznikají aldehydy, jež reagují se Schiffovým reagens za vzniku červenofialové sraženiny.
↳ purpurové

3b

2. Určete, základní složky, které nám umožní prokázat PAS reakce?

a) Glykoprotein
b) glykogen
c) mukopolysacharidy
d) glykolipidy

4b

3. Stanovte, barvy výsledného barvení PAS reakce:

a) modrá barva => Jádra
b) červenofialová => PAS pozitivní substance
↳ purpurová

2b

4. Určete, co můžeme stanovit z fotografie histologického preparátu?

a) Preparát je barven PAS reakcí → ve sliznici je červenofialová ⊙ (sraženina)
b) a můžeme stanovit, o jakou tkáň se jedná => podle jednotlivých vrstev se jedná o žaludek

2b

Příloha 3 - Dotazníkové šetření

DOTAZNÍKOVÉ ŠETŘENÍ

(k bakalářské práci – Michaela Semerádová – UPVOV)

ročník/rok absolvent 2021

Dobrý den, milí žáci a absolventi,

chtěla bych Vás touto cestou požádat o vyplnění krátkého dotazníku. Dotazník je plně anonymní, Vaše odpovědi budou zpracovány pouze pro potřebu mé bakalářské práce. Na základě Vašich odpovědí dotazník vyhodnotím a zapracuji do studijního materiálu.

Vaším úkolem bude vyplnit 5 otázek.

Cílem šetření je získání zpětné vazby, jak se Vám pracuje se studijním materiálem využívaným v předmětu – Cvičení z histologie a histologické techniky.

1 Děkuji Vám za spolupráci

Michaela Semerádová

Vždy zaškrtněte možnost a rozveďte Vaši odpověď:

1) Zvažujete, že byste chtěli pracovat v histologické laboratoři? Uveďte důvody.

(ANO) NE NEVÍM

Dříve jsem o tom nemyšlela vůbec jasně, že jsem moc ráda, že na histologii jsem. Líbí se mi, že laboratoř histologie není plně zautomatizovaná a je se stále co učit.

2) Vyhovuje Vám způsob průběhu výuky v rámci předmětu cvičení z histologie a histologické techniky? Uveďte v čem.

(ANO) NE

(to mělo moc bavilo)

Ano, hodina vždy začínala opakováním, hodně jsme barvili a měli jsme i skvělou školu ⇒ která mám doplňovala znalosti k teoretickému přednášení, což se mám velmi hodilo.

Každou hodinu jsme psali test, to mám také vyhovovalo. Člověk se připravoval průběžně, když někdo nebyl se známkou spokojen, bez problému se dalo domluvit na opravě.

3) Využíváte studijní materiál v rámci domácí přípravy na výuku (ústní zkouška, souhrnné opakování, v případě 4. ročníku příprava k praktické maturitní zkoušce)?

(ANO) NE

Ze studijního materiálu jsem se učila furt, i na teoretický předměty.
⇒ vše tam bylo krásně vysvětlení a hodně jsem něco nechápala, studijní materiál mi pomohl. Dokonce jsem i z histologie maturovala a díky studijnímu materiálu jsem byla připravena a odmaturovala jsem za 1.

4) Uvítali byste změnu ve studijním materiálu (např. obrázkové doplnění, forma textu, inovace v oboru)?

(ANO) NE

ano, více obrázků, nejlépe barevných

2

5) Je pro Vás práce se studijním materiálem přínosná?

(ANO) NE

Díky studijnímu materiálu jsem odmaturovala, takže ano!