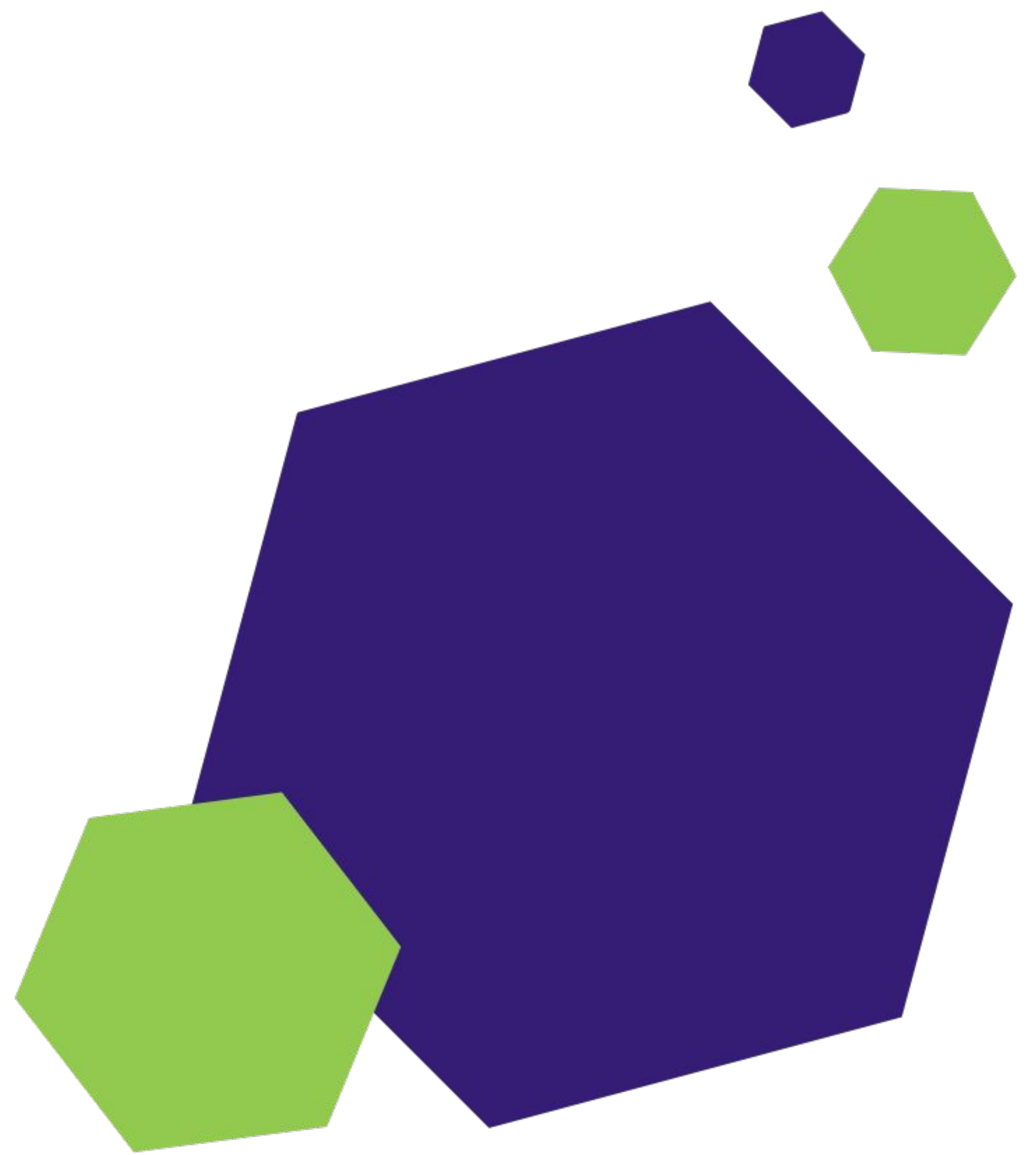
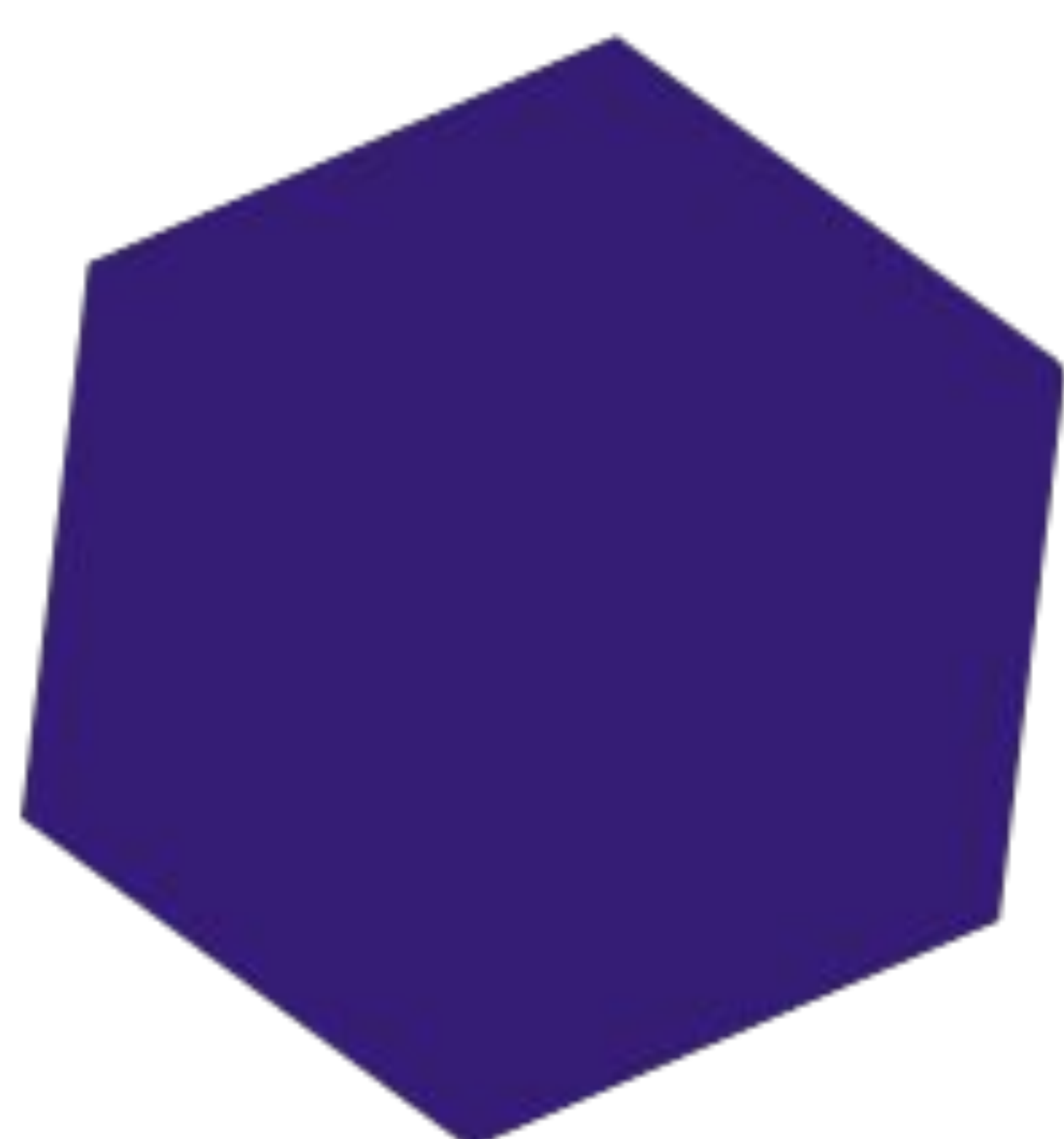


baria



# ÚVOD DO **DEKALCIFIKACE**

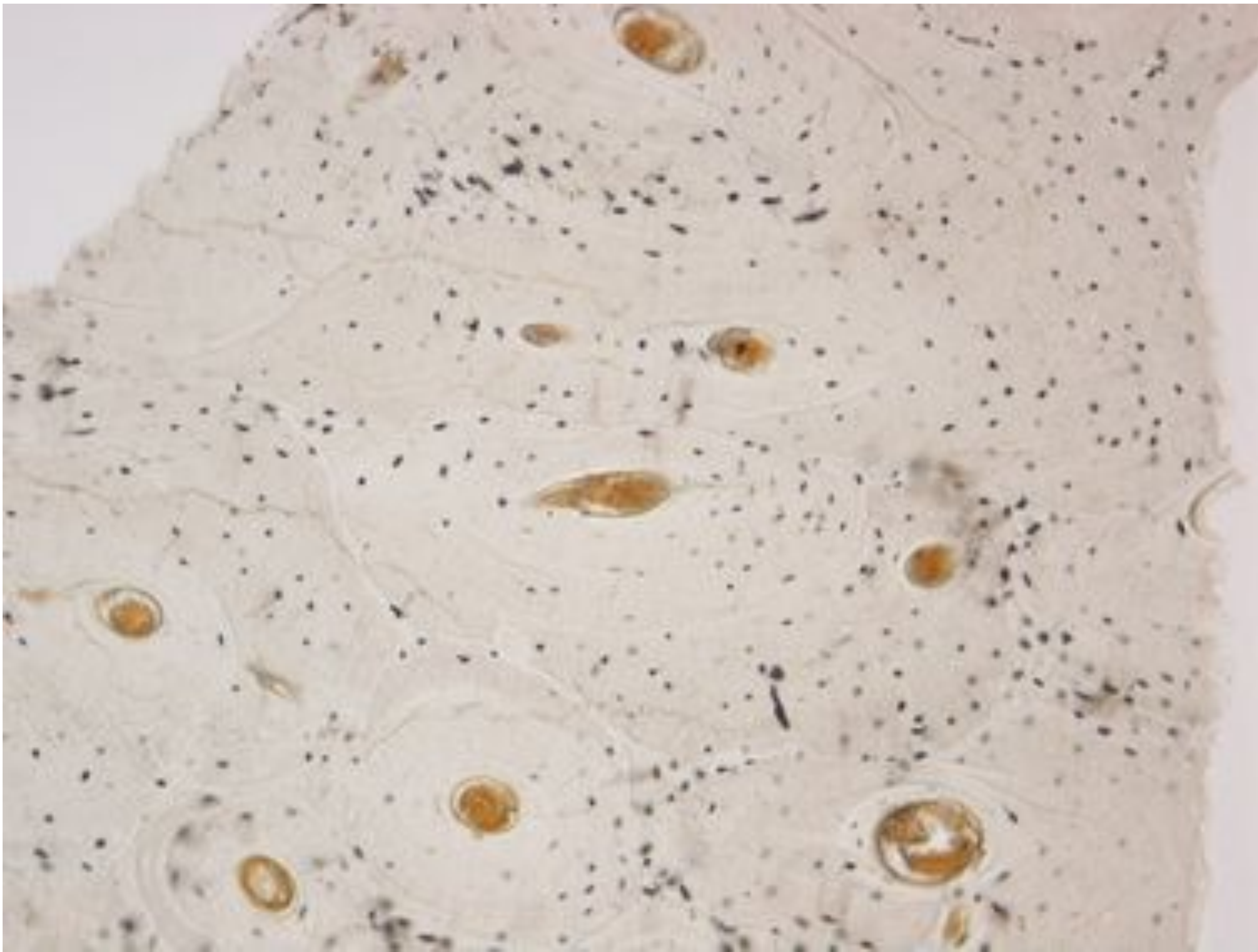
Geoffrey Rolls, BAppSc, FAIMS



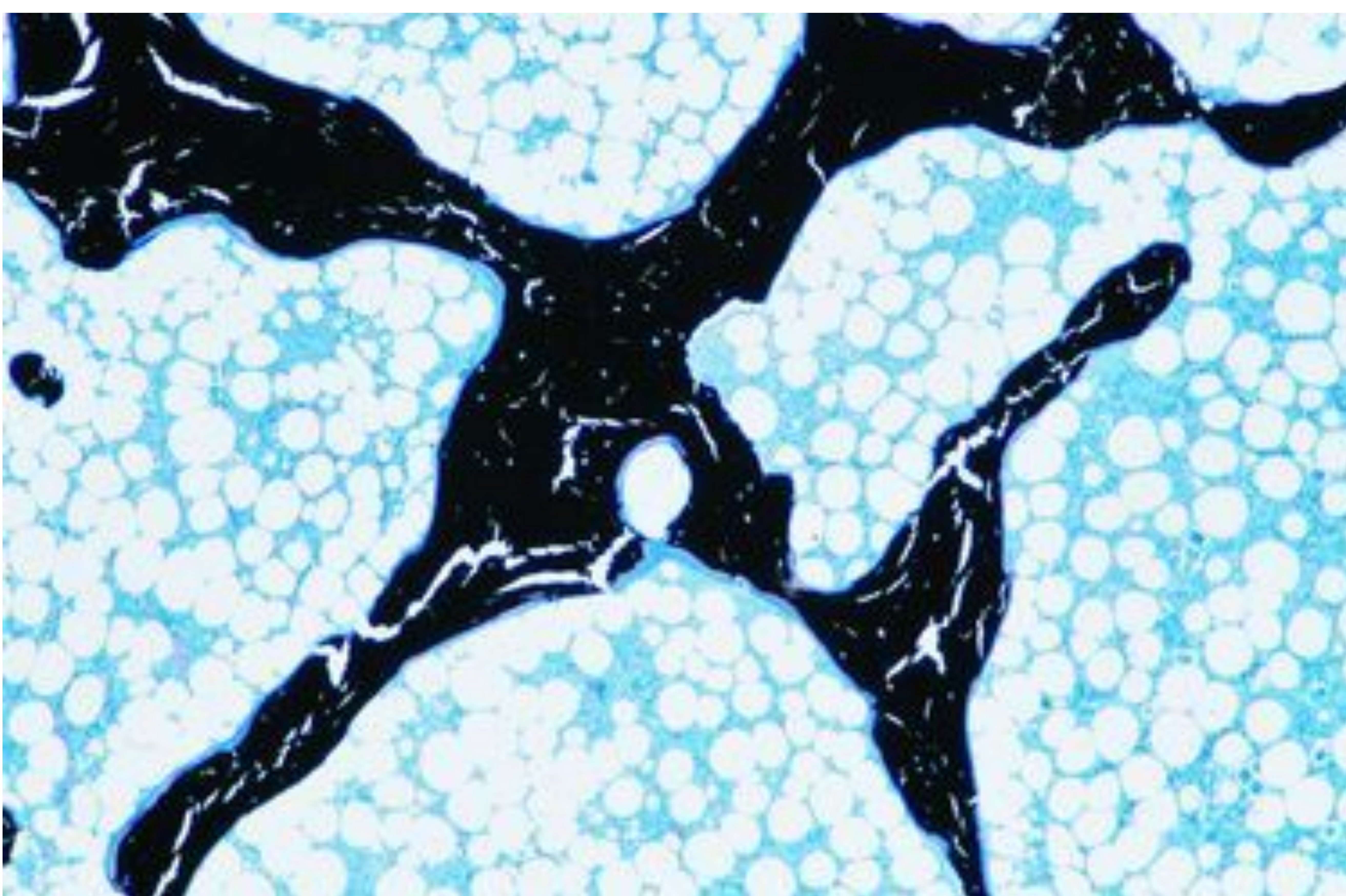
**Dekalcifikace** popisuje techniku odstraňování minerálů z kosti nebo jiné kalcifikované tkáně, aby bylo možné připravit kvalitní parafínové řezy, které si zachovávají všechny základní mikroskopické prvky. Dekalcifikace se provádí po důkladném zafixování vzorku a před rutinním zpracováním do parafínu. V tomto e-booku je popsána základní struktura kosti a jsou uvedeny technické možnosti pro přípravu řezů. Je zde diskutován postup pro dekalifikaci a úspěšné monitorování procesu, a jsou také uvedeny některé oblíbené možnosti ve výběru reagentů.

# ÚVOD

Je-li potřeba histolog, aby vyrobil řezy z kostí nebo jiných kalcifikovaných vzorků, je zde k dispozici řada možností. Při výběru techniky a metody zpracování je třeba vzít v úvahu typ prováděného vyšetření. Například, pokud se zkoumá metabolické onemocnění kostí a je nutné odlišit mineralizovanou kost od osteoidu, nebo pokud je požadováno morfometrické měření, může být nezbytné zachovat a prokázat obsah minerálů produkcí řezů nedekalcifikované kosti. Jelikož je mineralizovaná kost tak tvrdým materiálem, je k dispozici omezená škála technik k výrobě řezů z ní. Po fixaci ji lze přímo řezat do tenkých destiček a poté brousit pomocí abrazivních povrchů, aby se vytvořily tenké „broušené“ profily (viz obrázek 1). Je také možné připravit vzorky kostí prosycením akrylovými nebo epoxidovými pryskyřicemi, které mají po polymeraci tvrdost ekvivalentní tvrdosti mineralizované kosti. Poté je možné z prosycených vzorků vyrobit řezy pomocí vysoce odolného mikrotomu (doporučujeme upřednostnit rotační před sáňkovým, např. vhodným typem je Biocut) a za použití nože z karbidu wolframu nebo nože diamantového (viz obrázek 2). Další možnosti zpracování mineralizované spongiózní kosti jsou zmrazené řezy [1-3].



**Obrázek 1: Nebarvený broušený řez kompaktní kostí.** Řada osteonů (Haversovy systémy) je řezána příčně. Osteony se skládají z koncentrických vrstev kosti (lamel) obklopujících centrální Haversův kanál obsahující cévy. Uvnitř lamel jsou lakuny (prostory), které obvykle obsahují osteocyty. Na vysušených broušených řezech, jako je tento, se jeví jako černé struktury díky částicím abraziva a vzduchu, které jsou v nich obsaženy.



**Obrázek 2: Nedekalcifikovaný řez spongiózní kosti (Von Kossa).** Kost byla fixována ve formalínu, a zpracována a zalita do epoxidové pryskyřice pro řezání. Kalcifikovaná kost je černá a lem osteoidu na povrchu trámčů (trabekul) je obarven modře, stejně jako složky kostní dřeně. Všimněte si, že navzdory podpoře polymerizovanou pryskyřicí v tomto případě kalcifikovaná matrix při přípravě řezu popraskala.

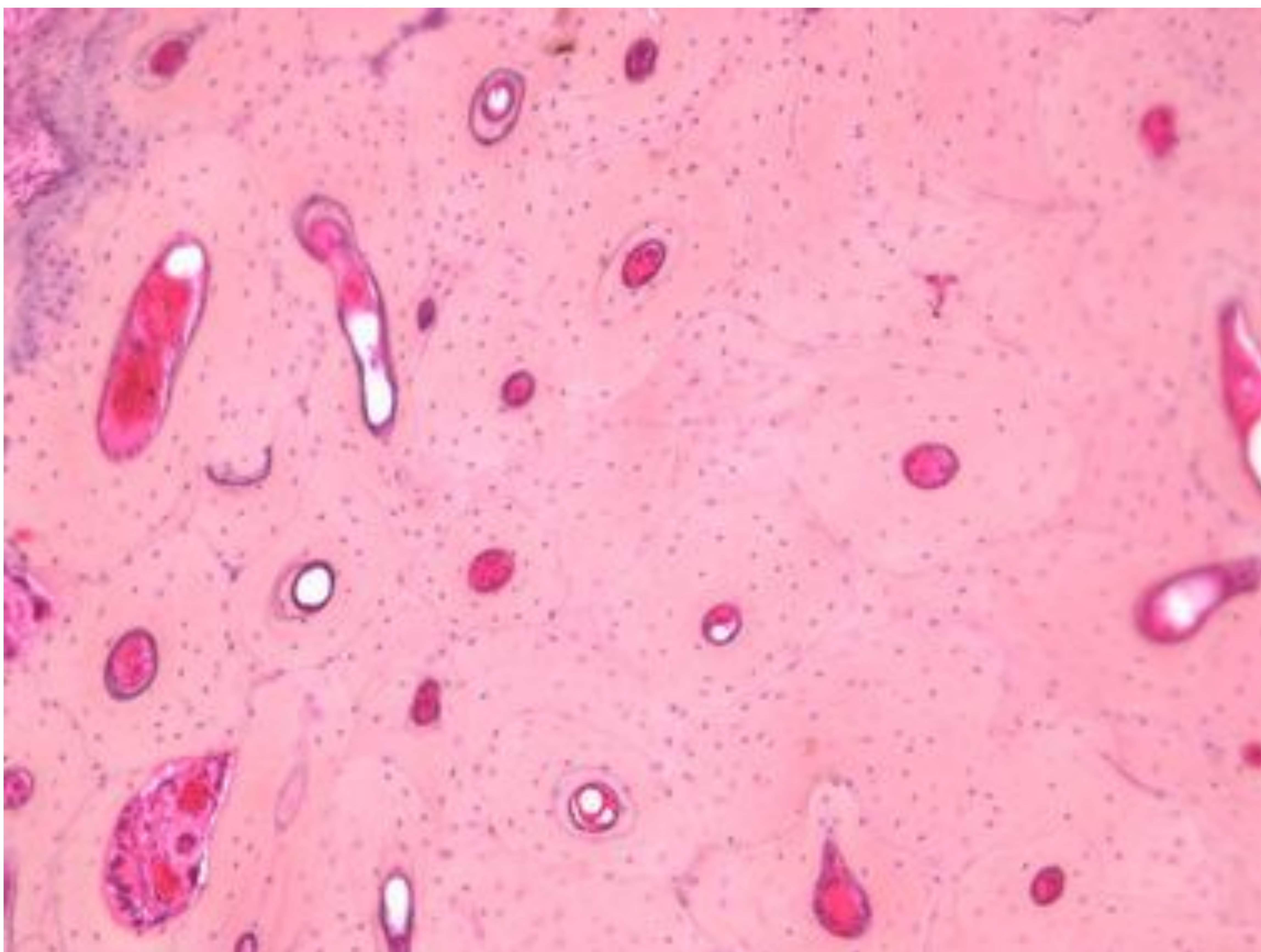
Mnohem častěji se kostní a jiné kalcifikované vzorky po fixaci dekalifikují (demineralizují) a zpracovávají standardní metodou pro výrobu parafínových řezů. Dekalcifikované řezy se používají k vyšetření kostní dřeně a k diagnostice nádorů, infekcí nebo k jiným účelům. Vzorky mohou mít podobu trepanace kyčelního hřebene nebo kousků kostí odstraněných při operaci (např. hlavice stehenní kosti) nebo vypreparovaných z amputačních vzorků. Při výběru vhodných kostních vzorků ke zpracování se často používají jemné detailní rentgenové snímky. Kromě kostí mohou i jiné tkáně podléhat kalcifikaci spojené s degenerativními procesy, jako je nekróza (dystrofická kalcifikace), nebo se může vyskytovat ve stěnách cév či v ledvinách, plicích nebo jinde (metastatická kalcifikace). [4] Pokud jsou kalcifikované oblasti ve vzorcích tkání značné, může být nemožné získat slušné řezy bez předchozího odvápnění vzorku. Další možností je použít „povrchovou dekalifikaci“ do parafínového bloku, aby bylo možné získat řezy tam, kde se při zpracování vzorku nepředpokládala přítomnost vápníku.

Postup dekalifikace je poměrně jednoduchý a je podrobně popsán ve standardních textech o histologických technikách. [1-3] Má-li však být dosaženo vysoce kvalitních výsledků, je třeba zdůraznit některé body.

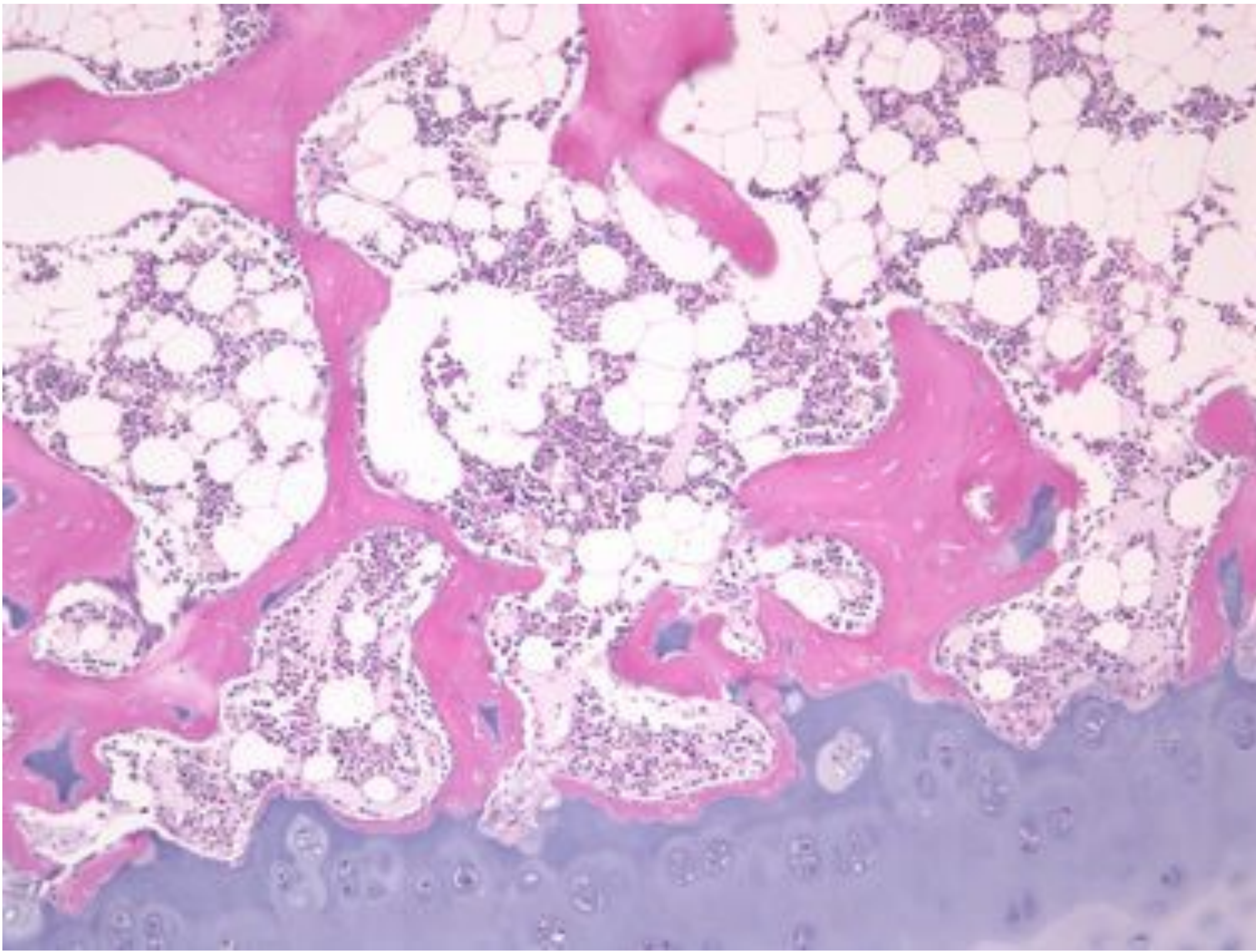
# Struktura kosti

Kost se skládá z buněk (osteocytů) obklopených kalcifikovanou matrix obsahující kolagenová vlákna typu 1. V matrix je vápník ve formě krystalů hydroxyapatitu  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , které jsou uloženy mezi vláknitými elementy. Tyto krystaly se rozpouštějí během procesu dekalifikace, který, pokud probíhá správně, zanechává soudržnou tkáň s fyzikálními vlastnostmi husté vláknité pojivové tkáně.

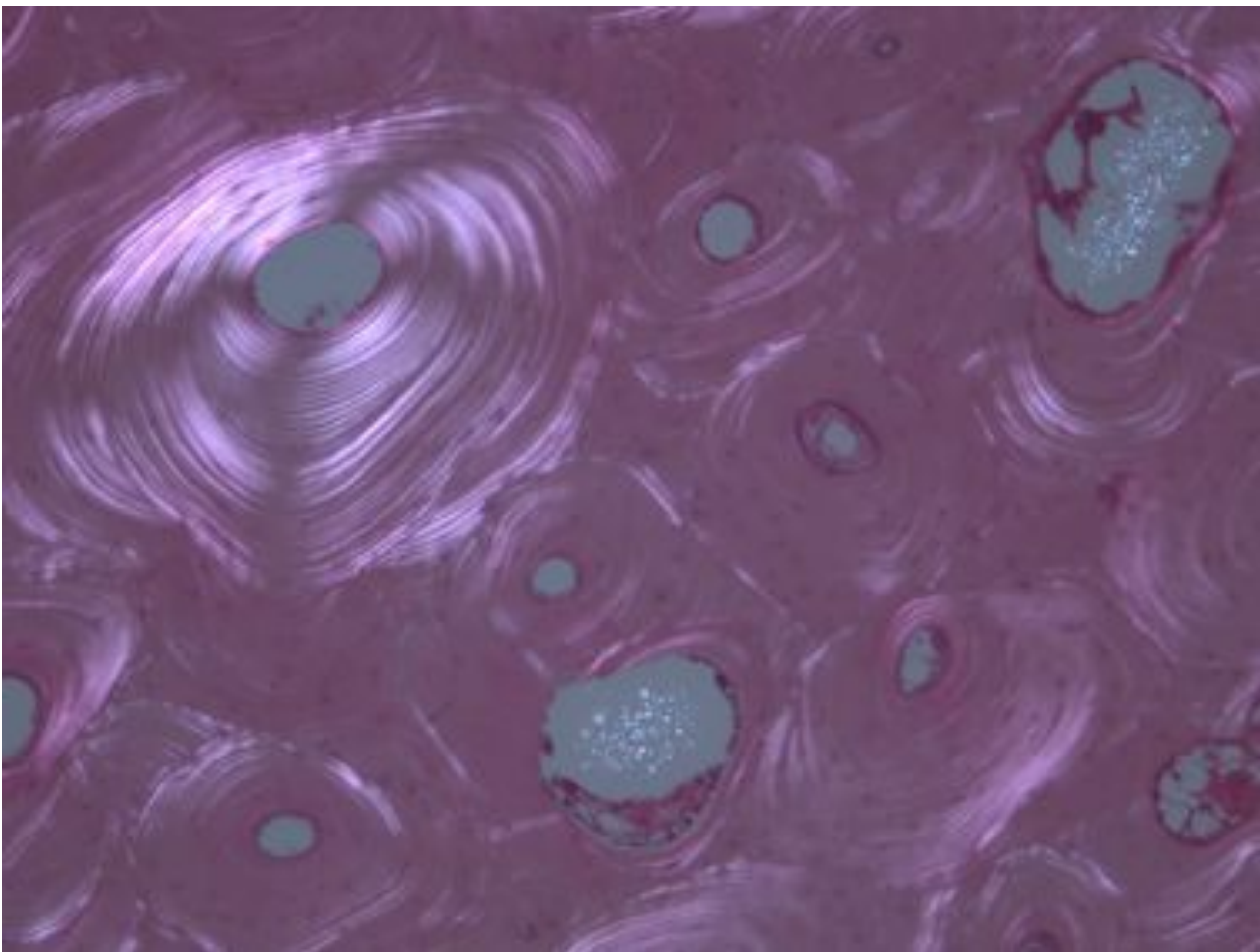
Existují dva typy zralých kostí. Kortikální neboli kompaktní kost tvoří osy dlouhých kostí a větší části plochých kostí lebky a má velmi hustou strukturu založenou na uspořádání válcovitých struktur zvaných osteony (obrázek 3). Trabekulární (spongiózní) neboli houbovitá kost má mnohem jemnější uspořádání sestávající z tenkých přepážek (trabekul) spojujících kostní destičky, mezi nimiž se nachází kostní dřeň. Nachází se v obratlích a na epifýzách dlouhých kostí (obrázek 4). Jak kompaktní, tak i pórovitá kost se vyvíjejí ve vrstvách nebo lamelách, v nichž jsou strukturně orientována kolagenní vlákna a vykazují charakteristický obraz pod mikroskopem v polarizovaném světle (viz obrázek 5). [2-3, 5]



**Obrázek 3: Příčný řez z dlouhé kosti optimálně dekalifikované pomocí kyseliny mravenčí (H&E).** Zobrazeny jsou četné osteony s periferními cementovými liniemi. Jsou přítomna dobře zbarvená jádra osteocytů, což naznačuje, že koncový bod dekalifikace nebyl překročen.



**Obrázek 4: Dekalcifikovaný řez spongiózní kosti (růžová) a hyalinní chrupavky (modrá) z epifýzy dlouhé kosti (H&E).** Jemné trabekuly kosti jsou dobře zachovány, stejně jako jemná struktura kostní dřene a přidružených adipocytů. Bazofilní/acidofilní rovnováha barvení je dobře zachována, což naznačuje, že dekalciﬁkace kyselinou mravenčí byla optimální.



**Obrázek 5: Dekalcifikovaný řez kompaktní kostí z dříku dlouhé kosti (H&E).** Řez je vyfotografován v polarizovaném světle, aby byly patrné koncentrické lamely tvořící osteony. Dvojlom je způsoben orientací kolagenních vláken v kostní matrix, která se mezi po sobě jdoucími vrstvami liší.

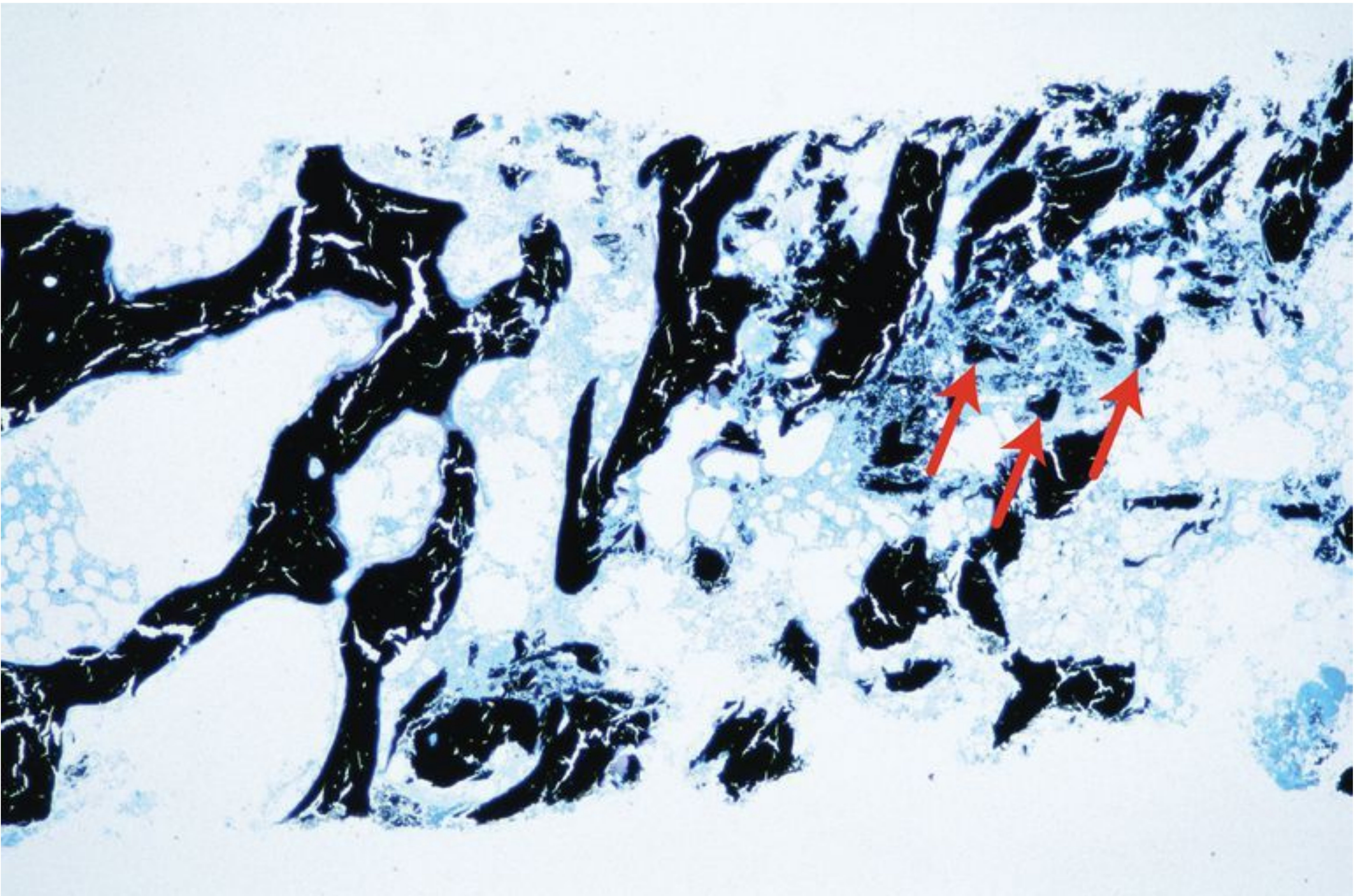
Je důležité pečlivě zvážit povahu každého vzorku kosti přijatého ke zpracování, protože relativní množství kortikální a spongiózní kosti je důležité a určuje dobu potřebnou pro dekalifikaci a zpracování. Například vzorek z trepanace kyčelního hřebene se skládá z okraje kortikální kosti, která překrývá válec kosti spongiózní. Kortikální kost odevzdává při dekalifikaci vápenaté soli jako poslední, a pokud není zcela dekalifikována, bude obtížné získat slušné řezy.

## Fixace kosti

Pro ochranu buněčných a vláknitých prvků kosti před poškozením kyselinami používanými jako odvápnovací činidla je obzvláště důležité tyto vzorky před odvápněním důkladně fixovat. [2-3] Špatně fixované vzorky se během dekalifikace macerují a následně se špatně barví. To je velmi patrné v oblastech obsahujících kostní dřev. Proto je běžnou praxí, že laboratoře před zahájením dekalifikace **prodlužují dobu fixace** kostních vzorků. Je důležité zajistit snadný přístup fixačního prostředku do kosti, proto by měla být z velkých vzorků odstraněna kůže a měkké tkáně, pokud je to možné. Vzorky kostí by měly být co nejdříve rozřezány na tenké plátky, aby se zlepšila fixace, a mělo by být zajištěno dostatečné množství fixativa. K přípravě kostních plátků by se měly používat kvalitní pilky s jemnými zuby. Hrubé pilky mohou způsobit značné mechanické poškození a vtlačit úlomky kosti do měkkých tkání přítomných ve vzorku (viz obrázek 6).

Pufrovaný formalín je uspokojivým fixačním prostředkem pro kosti, ale tam, kde je důležité zachovat kostní dřev, používají některé laboratoře alternativy, jako je některá ze směsí zinkového formalínu, B5, formolactový alkohol (Davidsonův fixační prostředek) nebo Bouin.





**Obrázek 6: Vzorek z trepanace**, u něhož byly při přípravě vtlačeny úlomky kostí do prostorů dřeně (šipky). Jedná se o nedekalcifikovaný pryskyřičný řez obarvený Von Kossovou metodou k průkazu vápníku.

# Dekalcifikační činidla - přehled

Existují tři hlavní typy dekalcifikačních činidel:

- na bázi silných minerálních kyselin
- na bázi slabších organických kyselin
- složené z chelatačních činidel

Většina laboratoří si pro své pohodlí vybírá z mnoha dostupných patentovaných činidel. Potenciální uživatelé těchto produktů by měli nahlédnout do příslušného bezpečnostního listu, aby zjistili přítomnou aktivní složku, pokud není jasně uvedena v poskytnutých technických informacích.

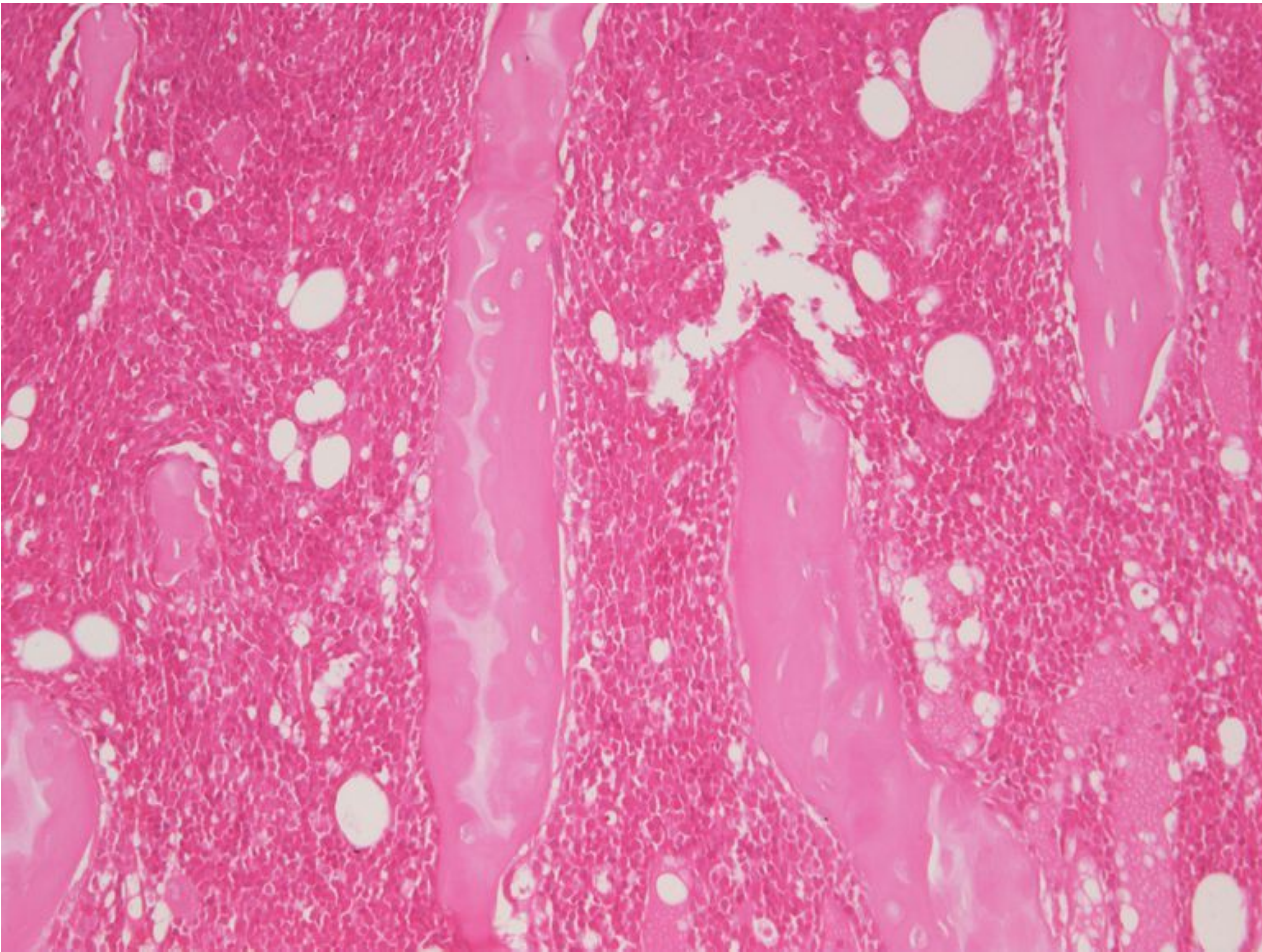
## Odvápňovací činidla - silné kyseliny

Nejrychleji působí silné kyseliny, jako je kyselina chlorovodíková nebo dusičná v koncentraci do 10 %, ale při nadměrně dlouhém použití rychle způsobí ztrátu jaderného zbarvení a může dojít k maceraci tkání. Je důležité, aby se použil vhodný koncový test – určil se kritický čas, po kterém už dochází k degradaci tkáně. Obecně platí, že patentované odvápnovače, o nichž se tvrdí, že působí rychle, jsou založeny na silných kyselinách, nejčastěji kyselině chlorovodíkové, a mají-li být dosaženy dobré výsledky, měly by být používány konzervativně s ohledem na dodané pokyny. Například přípravek Surgipath Decalcifier II® má rychlý účinek a obsahuje kyselinu chlorovodíkovou. Obrázek 7 ukazuje důsledky delšího ošetření odvápnovačem s minerální kyselinou za dosažením vhodného konečného bodu.

Tabulka 1 uvádí několik nejběžnějších odvápnovačů na bázi minerálních kyselin. Podrobnější výčet lze nalézt ve standardních učebnicích histologie.

**Tabulka 1: Odvápňovače na bázi minerálních kyselin**

ODVÁPŇOVAČ	SLOŽENÍ	KOMENTÁŘ
Kyselina dusičná [6]	<p>5% HNO<sub>3</sub> v destilované vodě</p> <p>40 ml 10% kyseliny dusičné</p>	<p>Rychlý účinek, překročení kritického času zhoršuje následné barvení.</p>
Perenyiho roztok [6] (1882)	<p>30 ml 0,5% kyseliny chromové</p> <p>30 ml absolutního alkoholu</p>	<p>Tradiční odvápňovací prostředek, který odvápňuje pomaleji než roztok kyseliny dusičné. Poměrně rychlý účinek, překročení kritického času zhorší barvení.</p>
Kyselina chlorovodíková [3]	<p>5-10% kyseliny chlorovodíkové v destilované vodě</p> <p>50 ml nasyceného roztoku chloridu sodného</p>	<p>Před vložením do HCl by se měl ze vzorku vymýt formalín, aby se zabránilo tvorbě bis-chlormethyletheru (je karcinogenní). Rychlý účinek, překročení kritického bodu zhorší barvení.</p>
Von Ebnerův roztok [6]	<p>42 ml destilovaná voda</p> <p>8 ml kyseliny chlorovodíkové</p>	<p>Rychlý účinek, překročení kritického bodu zhorší barvení.</p>



**Obrázek 7: Řez dekalcifikovanou spongiózní kostí (H&E).** Tento vzorek byl dekalcifikován odvápnovačem s kyselinou chlorovodíkovou po příliš dlouhou dobu bez použití vhodného koncového testu. Ačkoli jsou tkáňové elementy soudržné, barvení je velmi slabé a vykazuje úplnou absenci jaderného barvení spolu se silně nediferencovaným eozinem.

## Odvápňovací činidla - slabé kyseliny

Slabé kyseliny, jako je kyselina mravenčí, jsou oblíbené a hojně používané k odvápnování. Kyselinu mravenčí lze použít jako prostý 10% vodný roztok nebo v kombinaci s formalínem či s pufrem. Ačkoli je pomalejší než činidla se silnými kyselinami, působí mnohem šetrněji a méně pravděpodobně zasáhne do jaderného barvení. [1,7] Příkladem patentovaného dekalifikátoru na bázi kyseliny mravenčí je od společnosti Surgipath Decalcifier I®. Obsahuje také formalín a tvrdí se, že fixuje i odvápnuje a působí šetrně. Jsou používány i jiné kyseliny, například kyselina trichloroctová (TCA). Kyselina pikrová jako součást některých fixačních prostředků má slabé odvápnovací vlastnosti.

**Tabulka 2: Slabé kyselé odvápnovače**

ODVÁPŇOVAČ	SLOŽENÍ	KOMENTÁŘ
Kyselina mravenčí [8]	10% kyselina mravenčí v destilované vodě  25 ml kyseliny mravenčí	Jednoduchý a účinný odvápnovač.
Evans and Krajian [8]	10 g citrátu sodného  75 ml destilované vody  18 ml kyseliny mravenčí	Účinný odvápnovač na bázi kyseliny mravenčí pufrovaný citrátem.
Kristensen [8]	3.5 g mravenčanu sodného  82 ml destilovaná voda  5-25 ml kyseliny mravenčí	Účinný odvápnovač na bázi kyseliny mravenčí pufrovaný mravenčanem.
Gooding and Stewart [8]	5 ml 40% formaldehydu  75 ml destilované vody	Odvápnovač kyseliny mravenčí s přídavkem formalínu, který fixuje a odvápnuje.

## Odvápňovací činidla - chelatační činidla

Chelatační činidla, jako je kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA), fungují tak, že zachycují vápenaté ionty z povrchu krystalu apatitu a pomalu zmenšují jeho velikost. Vzhledem k tomu, že tento proces je velmi pomalý, ač velmi šetrný (v závislosti na velikosti vzorku může být zapotřebí několika týdnů), není toto činidlo vhodné pro urgentní vzorky, ale spíše pro výzkumné aplikace, kde je vyžadována velmi kvalitní morfologie nebo je třeba zachovat určité molekulární prvky pro techniky, jako je IHC, FISH nebo PCR. [9] Používá se v koncentraci přibližně 14 % jako neutralizovaný roztok. [1,10] Rychlost, s jakou EDTA odvápnuje, závisí na pH. Obvykle se používá při pH 7,0. Při pH 10 působí rychleji, ale při alkalickém pH může dojít k poškození některých tkáňových elementů. [10]

**Tabulka 3: Chelatační činidla**

ODVÁPŇOVAČ	SLOŽENÍ	KOMENTÁŘ
Neutrální EDTA [1]	250 g disodné soli EDTA  1750 ml destilované vody  Přídavkem hydroxidu sodného upravte pH na 7,0 (bude potřeba asi 25 g)	Působí pomalu, ale způsobuje malé poškození tkáně. Běžná barvení jsou z velké části neovlivněna.

# Faktory ovlivňující rychlost dekalcifikace

## Koncentrace

Koncentrace účinné látky ovlivňuje rychlost odstraňování vápníku. Publikované receptury dekalcifikačních roztoků dosahují rovnováhy mezi rychlostí a stupněm poškození tkáně. Je třeba mít na paměti, že koncentrace účinné látky se vyčerpá, jak se postupně spojuje s vápníkem, a proto je rozumné použít velký objem dekalcifikačního roztoku a několikrát jej během procesu dekalcifikace obnovit.

## Teplota

Zvýšená teplota urychlí odvápnění, ale také zvýší míru poškození tkáně, proto je třeba postupovat velmi opatrně.

## Míchání

Jemné míchání může mírně zvýšit rychlost odvápnění. [1]

## Přístup tekutin

Stejně jako při fixaci by měl mít čerstvý dekalcifikátor volný přístup ke všem povrchům vzorku. Tím se zlepší difuze a pronikání do vzorku a usnadní se rozpuštění, ionizace a odstranění vápníku.



# Další techniky pro zvýšení účinnosti odvápnování

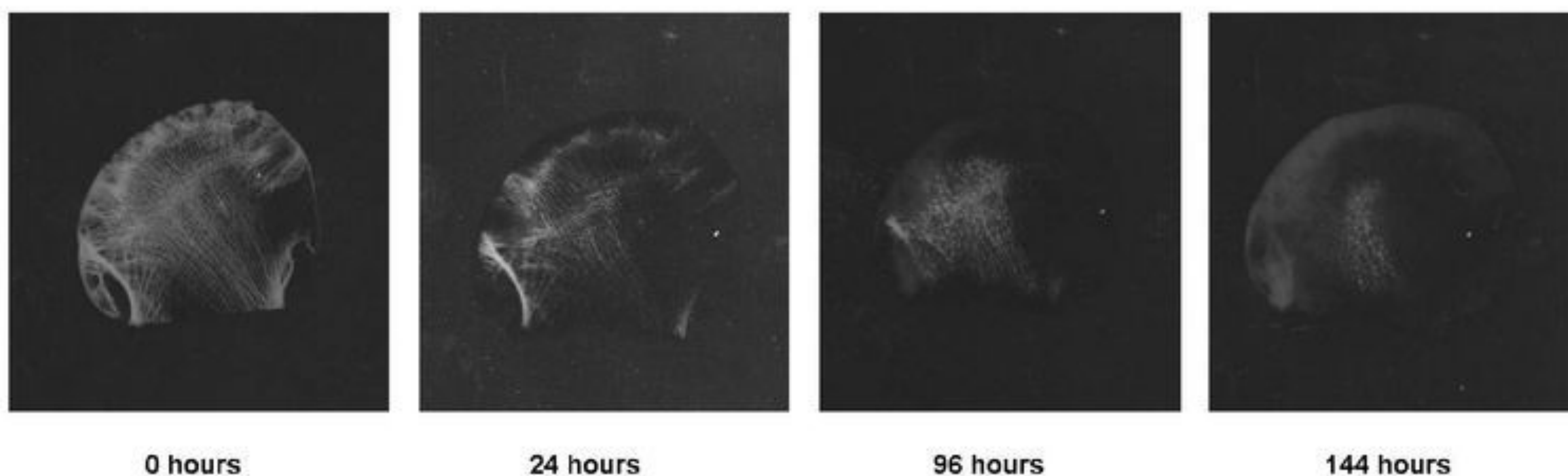
Sonikace s použitím EDTA byla úspěšně použita k urychlení dekalifikace vzorků z trepanace pro následnou molekulární analýzu. Během procesu je třeba pečlivě kontrolovat teplotu. [9] Mikrovlnné ošetření bylo použito s dekalifikačními přípravky obsahujícími kyselinu chlorovodíkovou, ale zvýšená teplota může poškodit morfologii a způsobit artefakty při barvení. [10] Do některých dekalifikačních protokolů byly začleněny iontoměničové pryskiřice. Přidávají se do nádoby s dekalifikátorem a vychytávají ionizovaný vápník, čímž zachovávají účinnost kyseliny. Pokud se kyselé dekalifikátory používají v dostatečném množství a pravidelně se vyměňují, je použití iontoměničů pravděpodobně zbytečné. [3] Elektrolytická dekalifikace, při níž se kost umístí do kyselého dekalifikátoru a připojí se k elektrodě, kterou se pouští proud, je technika, která nenašla široké přijetí kvůli možnosti tepelného poškození vzorku. [3]

# Stanovení koncového bodu odvápnění

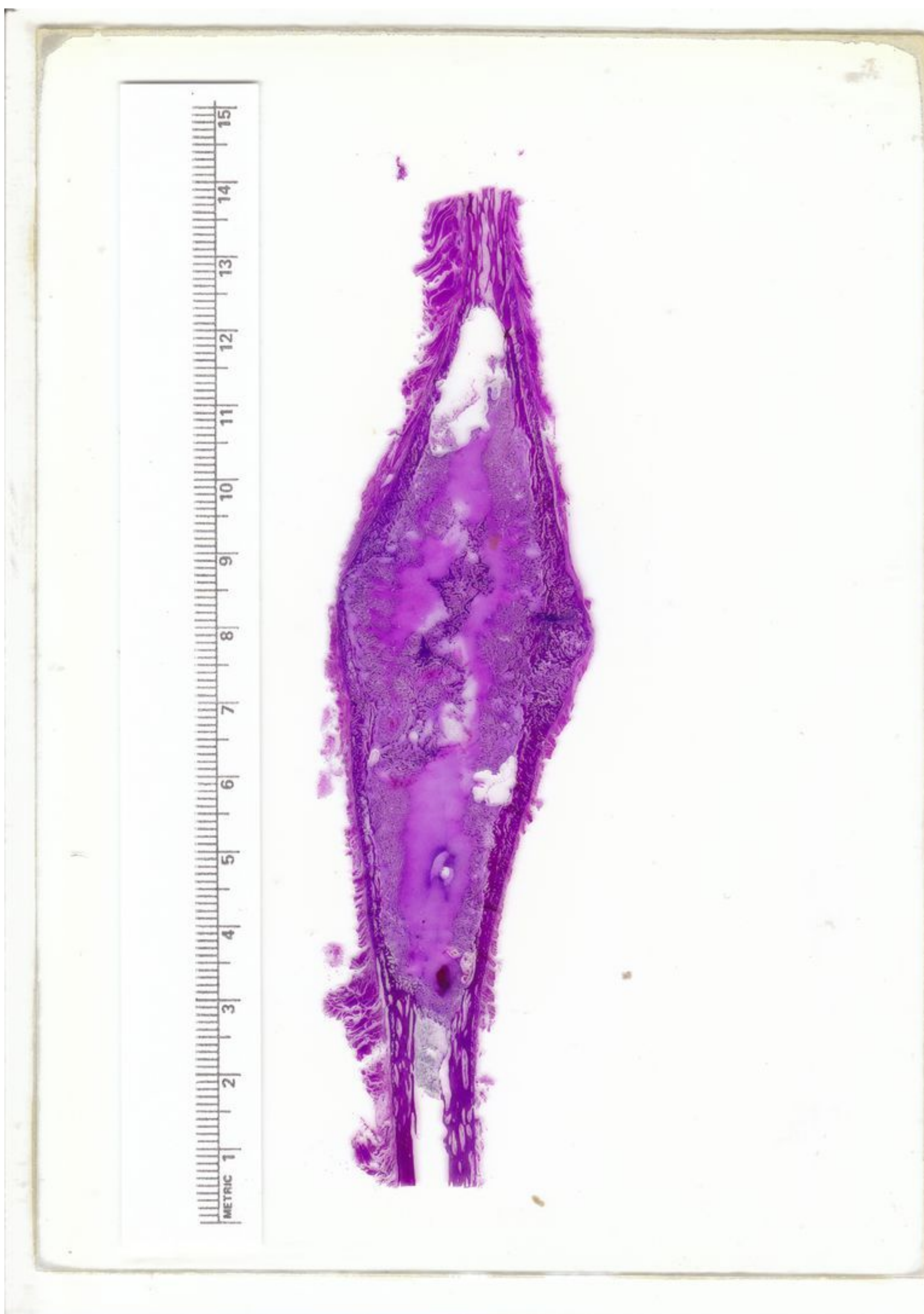
Má-li být dosaženo vysoce kvalitních výsledků, je důležité určit bod, kdy byl odstraněn veškerý vápník, protože od tohoto bodu se zdá, že poškození tkáně probíhá stále rychleji. Nadměrné odvápnění, zejména při použití silných kyselých odvápňovačů, narušuje barvení bazofilních prvků, jako jsou buněčná jádra, a za určitých okolností může způsobit maceraci měkčích tkáňových prvků. Na druhou stranu, vzorky, které jsou neúplně odvápněné, může být obtížně nebo zcela nemožné nařezat.

Nejlepší metodou, zejména u velkých vzorků, jako jsou hlavice stehenní kosti, je rentgenování vzorku. Kvalitní rentgenový snímek jasně odhalí drobné zbytky vápenatých usazenin a v případě potřeby umožní další ošetření. Je to vynikající metoda pro sledování procesu dekalifikace velkých vzorků, jako jsou hlavice femuru (viz obrázek 8). Při použití některých kyselých dekalifikátorů (zejména kyseliny mravenčí) lze použít jednoduchý chemický test. Roztok šťavelanu amonného se přidá k finálnímu vzorku po odvápnění, který byl neutralizován hydroxidem amonným. [1] Je-li přítomen vápník, vytvoří se sraženina šťavelanu vápenatého, což naznačuje, že odvápnění je pravděpodobně neúplné a je nutná delší doba odvápnění. Tento test je samozřejmě nejlépe provádět na relativně nedávno vyměněném odvápňovacím prostředku (vystaveném tkáni například pouze jednu hodinu). Fyzikální testy vyžadují manipulaci: ohýbání, sondování nebo ořezávání vzorku, aby bylo možné „nahmatat“ zbývající neodvápněná místa. Ačkoli tato metoda může být ve zkušených rukou úspěšná, obecně se považuje za nespolehlivou. Při ohýbání nebo sondování může dojít k mechanickému poškození a malá ložiska vápníku mohou být snadno přehlédnuta. [7] Byla také popsána metoda stanovení koncového bodu pomocí pečlivého zvažení vzorku po opláchnutí a rozetření. Tato metoda může být účinná u velkých vzorků. [10]

Pokud se domníváte, že konečný bod odvápnění je blízko, a chcete proces zpomalit, aby nedošlo k nadměrnému odvápnění a následnému poškození tkáně, což se může stát v případě, že vaše laboratoř není během víkendu navštěvována lidmi, lze vzorky vyjmout z odvápňovače, opláchnout a vložit zpět do formalínu (což je důležité, pokud se používá kyselina chlorovodíková). V odvápnění pak lze pokračovat, až to bude vhodné. [10] Alternativou je uchovávat vzorky v odvápňovači v chladu při teplotě 4 °C, aby se proces zpomalil. [1]



**Obrázek 8: Řada rentgenových snímků po procesu odvápnění hlavice femuru odvápňovačem typu kyselina mravenčí / citrát.** Rentgenové snímky (po 0, 24, 96 a 144 hodinách) byly vytvořeny pomocí Hewlett-Packard Faxitron® a umožňují přesné sledování procesu a správnou identifikaci koncového bodu.



**Obrázek 9: Odvápňený parafínový řez lýtkovou kostí (fibulou) (H&E).** Všimněte si velikosti vzorku. Byl odvápňen činidlem s kyselinou mravenčí pomocí testu koncového času a poté zpracován do parafínu pomocí prodlouženého programu. Třináctiletý mladík utrpěl po pádu patologickou zlomeninou pravé lýtkové kosti. Rentgenový snímek ukázal kostní zvětšení střední osy (R) lýtkové kosti. Patologická diagnóza byla kostní cysta s patologickou zlomeninou. Řez byl připraven v kostní laboratoři Ústavu patologie ozbrojených sil (USA) v roce 1983.

# Ošetření po odvápnění a před zpracováním

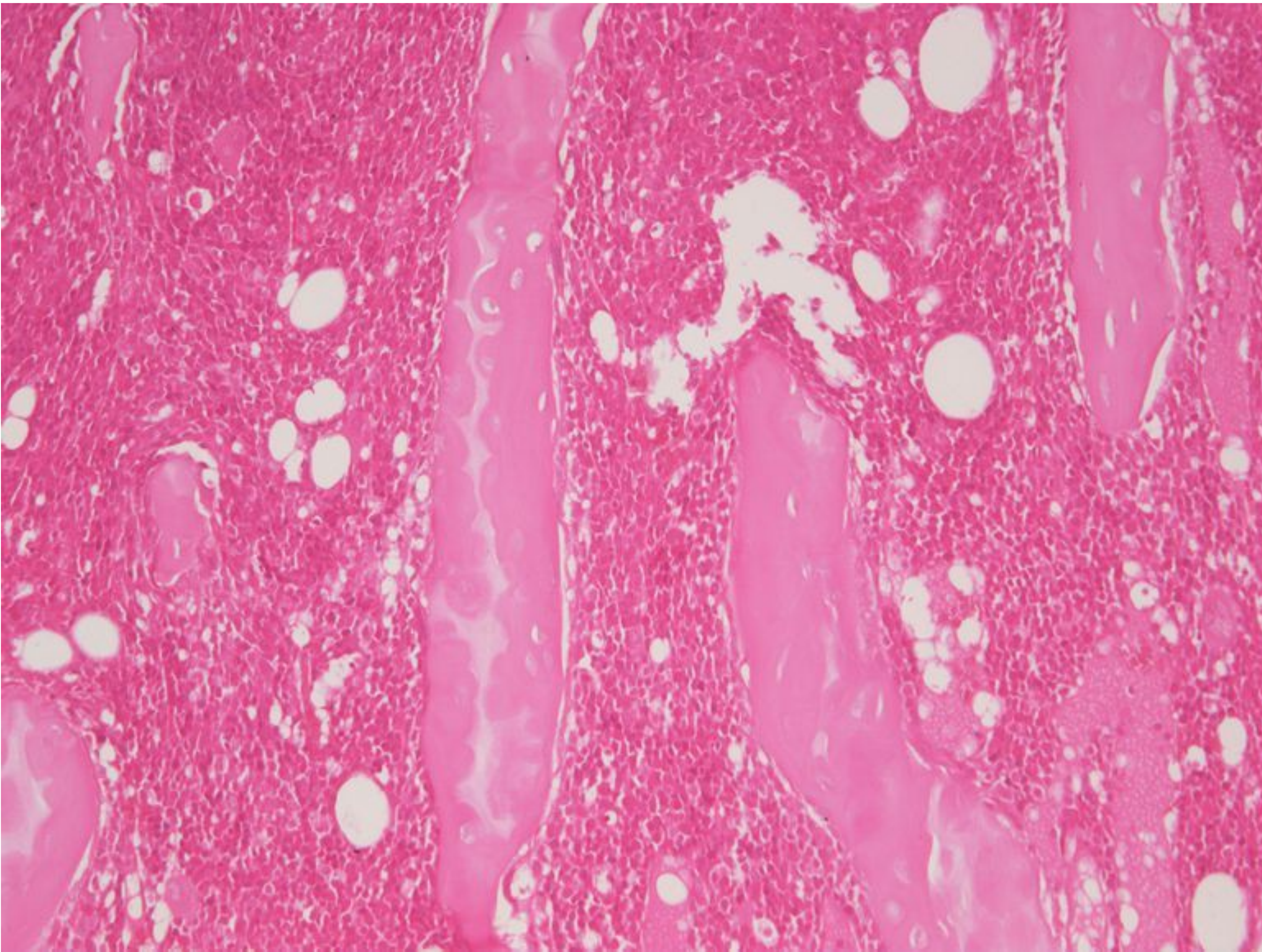
Byly publikovány různé metody neutralizace zbytků odvápňovače před dalším zpracováním tkáně, včetně intenzivního promývání v pramenité vodě nebo aplikace alkalických roztoků. Obecně by mělo stačit krátké a účinné promytí pramenitou vodou, protože během zpracování bude takto odstraněna veškerá zbývající kyselina. [1] Je důležité odstranit většinu odvápňovače, aby nedošlo ke kontaminaci roztoků v technikonu kyselinou.

## Výběr vhodného programu v technikonu pro odvápněnou kost nebo jiné odvápněné tkáně

Jakmile je vápník odstraněn, lze použít standardní program zpracování. Je třeba mít na paměti, že navzdory úplnému odvápnění bude kost, zejména kompaktní, obsahovat husté oblasti, které vyžadují důkladné zpracování. Je lepší použít program, který je příliš dlouhý než příliš krátký. Váš výběr bude záviset na povaze a velikosti vzorku. Aplikace vakua během prosycování parafínem by měla zlepšit kvalitu hotových bloků.

# Odvápňení povrchu

Jedná se o způsob řešení malých neočekávaných usazenin vápníku, s nimiž se lze setkat v parafinových blocích (viz obrázek 10). Obvykle je vápník objeven po hrubém zkrojení bloku v mikrotomu. V této fázi je důležité pokusit se vyhnout se výraznému narušení povrchu bloku. Po obnažení tkáně lze blok vyjmout z mikrotomu a umístit lícem dolů do kyselého odvápňovače na 15 – 60 minut. Tato povrchová úprava umožní odvápňovači proniknout do malé hloubky bloku a rozpustit vápník. Blok lze poté důkladně opláchnout vodou, aby se odstranila zbytková kyselina, ochladit a krájet. Bude zapotřebí pečlivé vyrovnání bloku, protože odvápňovač pronikne do velmi malé vzdálenosti do bloku a umožní provést pouze několik řezů. [1,11]



**Obrázek 10: Řez ze vzorku granulomu, ve kterém došlo k neočekávaným usazeninám vápníku (modrá).** Mohly by být připraveny řezy mnohem lepší kvality, pokud by bylo na tento blok aplikováno povrchové odvápnění.





# Zdroje

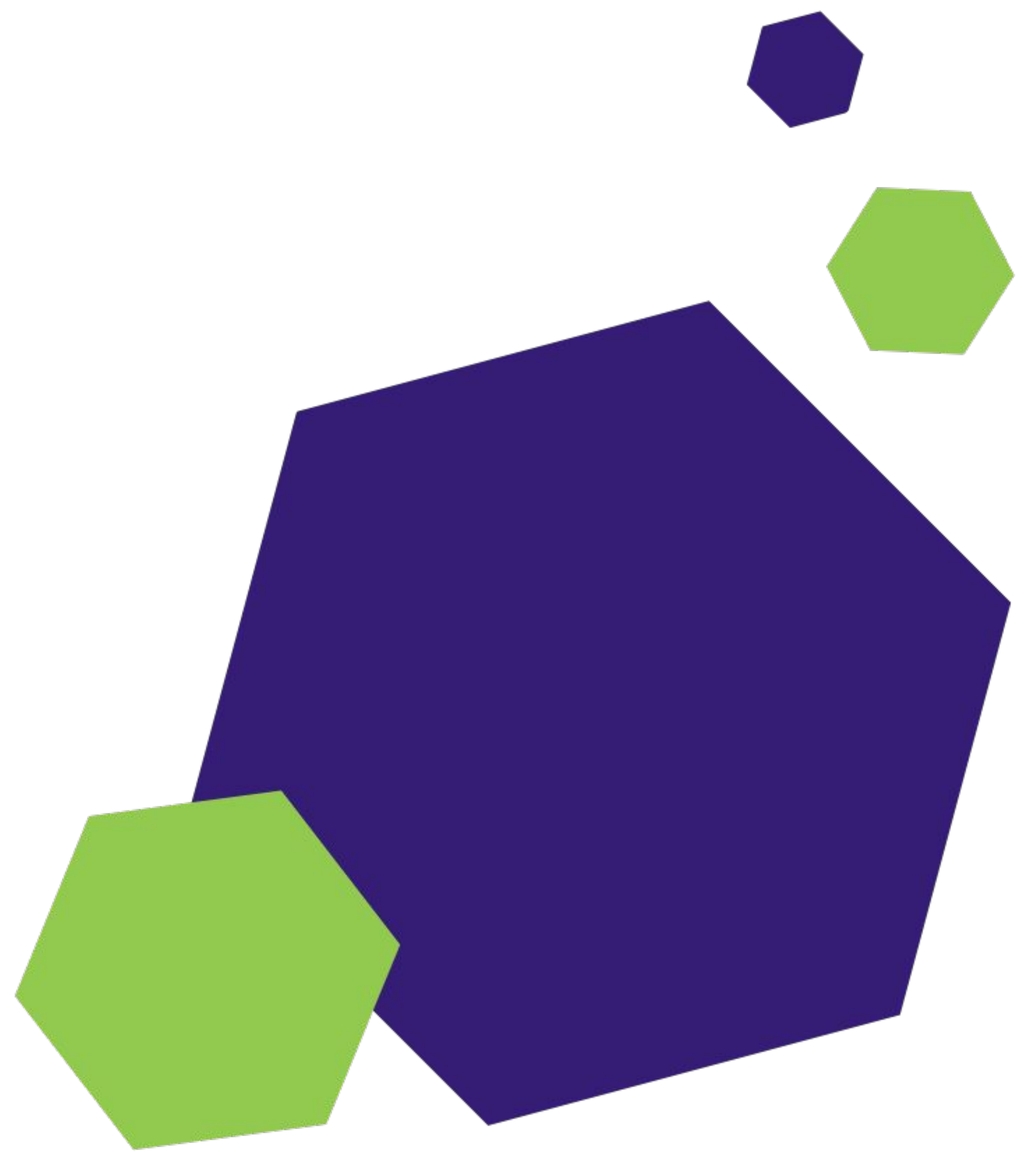
- 1.** Page KM. Bone. In Bancroft JD and Stevens A eds. Theory and Practice of Histological Techniques. New York: Churchill Livingstone, 1996.
- 2.** Moore RJ. Bone. In Woods AE and Ellis RC eds. Laboratory histopathology. New York: Churchill Livingstone, 1994;7.2-10.
- 3.** Carson FL. Histotechnology. 2nd ed. Chicago: ASCP Press, 2007.
- 4.** Vardaxis NJ. Pathology for the health sciences. Melbourne: Macmillan Australia Pty Ltd, 1997.
- 5.** Young B, Heath JW. Wheater's Functional Histology. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000.
- 6.** Clayden EC. Practical section cutting and staining. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1971.
- 7.** Skinner RA, Hickmon SG, Lumpkin CK, Aronson J, Nicholas RW. Decalcified Bone: Twenty Years of Successful Specimen Management. The Journal of Histotechnology 1997;20;267-277.
- 8.** Wallington EA. Histological Methods for Bone. London: Butterworths, 1972.
- 9.** Reineke T, Jenni B, Abdou MT et al. Ultrasonic Decalcification Offers New Perspectives for Rapid FISH, DNA, and RT\_PCR Analysis in Bone Marrow Trephines Am J Surgical Pathology 2006;30.
- 10.** Callis G, Sterchi D. Decalcification of Bone: Literature Review and Practical Study of Various Decalcifying Agents, Methods, and Their Effects on Bone Histology. The Journal of Histotechnology 1998;21;49-58.
- 11.** Rolls GO. Difficult Blocks and Reprocessing. Leica Microsystems, 2011.

# NĚCO MÁLO O BARIÍ

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

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

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



**baria**

