

Histochemie

Jedná se o histologickou metodu, při které prokazujeme ve vzorku pomocí chemické reakce přítomnost látek (např. enzymatická aktivita). Zabývá se morfologií buněk, ale navíc popisuje chemické látky v buňkách a prokazuje buněčné inkluze. V histochemii prokazujeme přítomnost např. polysacharidů, lipidů, enzymů.

Konvenční histochemie

Průkazy anorganických iontů a sloučenin

Diagnosticky významné je prokazování určitých látek v těle ať už v případě soudního lékařství (zde např. kvůli otravám – As, Pb, Hg, Ag) nebo v patologii kvůli odchylkám od norem výskytu látek (Ca, Fe, Zn, Al).

- **Ca²⁺** se v těle vyskytuje v rozpustné, nerozpustné, ionizované i neionizované formě. Prokazuje se např. ionizovaný díky barvení HE modře v alkalické reakci (pH > 9).
- **Fe³⁺** se prokazuje pomocí Perlsovy reakce (viz níže).
- **Zn** jako součást inzulinu, či jako kofaktor mnohých enzymů se prokazuje pomocí zinconu s modrým výsledkem, dithizonem s červeným výsledkem

Perlsova reakce

Siderofágy (makrofágy) pohlcují staré nebo poškozené erythrocyty. Degradací hemu v nich pak vznikají železití ionty (najdeme je ještě ve ferritinu), které se ukládají do zásobní formy železa - hemosiderinu. Po přidání žluté krevní soli (hexokyanoželeznatan draselný) a HCl (pro vytvoření kyselého prostředí) vzniká reakcí s hemosiderinem modrá sraženina označovaná jako tzv. Berlínská modř (~ Prussian blue).

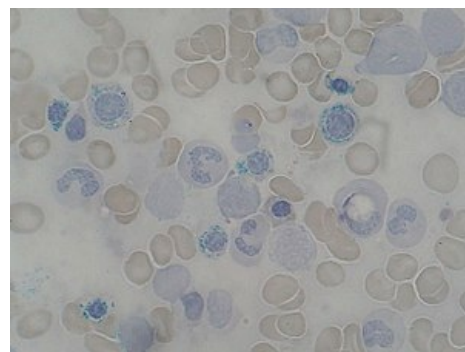
Perlsova reakce se tedy používá k průkazu hemosiderinu, který se ve velkém množství fyziologicky nachází pouze v siderofázích. Slouží také k odlišení lipofuscinu, hematoidinu a hematinu, které jsou Perls negativní.

Metodika barvení

Složení barvicího roztoku

1. ferrokyanid draselný
2. destilovaná voda
3. kyselina chlorovodíková (2%)

Řezy se umístí na 30 minut do barvicího roztoku při teplotě 60 °C. Poté jsou řezy vyjmuty z barvicího roztoku a dobarveny jádrovou červení nebo hematoxylinem.



Sideroblasty obarvené Perlsovou reakcí

PAS reakce

PAS (**P**eriodic **A**cid **S**chiff) reakce je založena na oxidaci volných hydroxylových vazeb, např. 1,2-glykolová vazba mezi dvěma sousedními uhlíky v hexosách, pomocí kyseliny jodisté (HIO₄). Vznikají aldehydové skupiny, které reagují s Schiffovým reagens (bazický fuchsin + pyrosiřičitan sodný Na₂S₂O₅) za vzniku nové komplexní sloučeniny, která má purpurovou barvu.

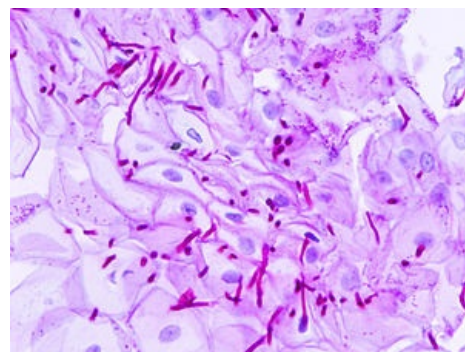
Struktury které lze touto metodou detekovat, označujeme jako PAS pozitivní (př. glykogen v játrech).

Metodika barvení

Složení Schiffova reagens:

1. bazický fuchsin (=pararosanilin)
2. destilovaná voda
3. pyrosiřičitan sodný
4. koncentrovaná kyselina chlorovodíková

Tkáňový řez se oxiduje v 1% kyselině jodisté po dobu 10 minut. Poté je vyjmut, opláchnut ve vodě a následuje barvení Schiffovým reagens po dobu 10 minut. Nakonec se řez opláchnut v destilované vodě a dobarví hematoxylinem (10 minut).



Kandidóza zvýrazněná PAS reakcí

Bestův karmín se používá jako metoda průkazu glykogenu v místě s příliš vysokou koncentrací, kde PAS metoda není přehledná.

Feulgenova reakce

Jedná se o reakci, která prokazuje přítomnost DNA. Spočívá v hydrolýze DNA pomocí kyseliny chlorovodíkové, přičemž se odštěpí purinové báze od sacharidů a odhalí se tak aldehydové skupiny na deoxyribóze. Poté, podobně jako u průkazu polysacharidů, reagují aldehydové skupiny s Schiffovým činidlem za vzniku nerozpustné purpurové sraženiny.

Metoda se používá například v patologii v nádorové diagnostice k určení polyploidie buněk.

Průkaz lipidů

Lipidy se prokazují na zmražených řezech díky tomu, že barvivo má větší afinitu k tukům ve tkáni, než k látce ve které je rozpuštěno. Barviva se tedy rozpouštějí v organických rozpouštědlech (isopropanolol, propylen glykol atd), která ale musí být dostatečně naředěna. K barvivům, která jsou užívána ke znázornění tuků, patří Sudan III a IV (červené) a Sudanová čern (černé), dále olejová červen nebo nilská modř (rozlišení kyselých a neutrálních lipidů). Tuky se z tkání nesmí během zpracování vyplavit. Jako fixační prostředek používáme Bakerovu tekutinu (voda, formol, chlorid vápenatý) – redukuje solubilitu nepolárních lipidů.

Průkaz fosfolipidů – barvíme luxolovou modří. Metoda vhodná pro znázornění **myelinové pochvy** nervových vláken

Katalytická histochemie

Tato metoda je poměrně náročná, přičemž využívá základního principu, že enzym reaguje se substrátem, který je přeměn na konečný produkt histochemické reakce. Teprve tento produkt je poté přeměněn na barevnou sloučeninu (vizualizační reakce). Tento princip se využívá v mnoha aplikacích, tj. od markerů protilátek nebo hybridizačních sond (viz níže), přes detekce metabolických procesů v buňce, po patologie a soudního lékařství. Při všech těchto postupech se musí zachovat 4 základní pravidla pro uskutečnění katalytické histochemie:

- **Přesnost** – při zachování morfologie sledovaných buněk či tkání nesmí produkt difundovat a musí zůstat v místech s předpokládaným výskytem enzymu.
- **Specifita** – konečný produkt je výsledkem reakce pouze jednoho očekávaného enzymu. Toto se ověřuje na kontrolních řezech.
- **Reprodukovatelnost** – pokus se může zopakovat bez významných odchylek.
- **Validita** – při manipulaci s tkání nesmí být enzym ztracen, jeho distribuce a aktivita je zachována.

Pro zachování funkce enzymu nelze tkáň obvykle fixovat

Afinitní histochemie

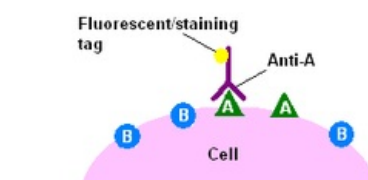
Jeden z mladších oborů, který je stále více využíván jak ve výzkumu, tak v diagnostice. Umožňuje prokázat v cílové tkáni velmi nepatrná množství látek.

Imunohistochemie

Využívá se základního principu interakce antigen–protilátka, kdy se protilátky specificky vážou na cílový antigen, proti kterému byly „vypěstovány“. **Monoklonální** protilátky jsou produkovány hybridomami. **Polyklonální** protilátky vznikají po imunizaci v organismu člověka nebo zvířete. V imunohistochemii se využívají oba druhy protilátek. Přitom bývají nějakým způsobem značené, a tím dochází k vizualizaci místa interakce a průkazu antigenů.

Využívá se buď přímého značení protilátky nebo se neznačená protilátka vizualizují pomocí jiné značené protilátky:

- **Přímá reakce** – v tomto případě nasedají primární protilátky, které jsou značené, na antigen. Označí tak místo interakce, avšak nevýhodou je nízká citlivost a nutnost použít zvýšené množství protilátek.
- **Nepřímá reakce, ABC reakce, PAP reakce atd.** – zamezuje nevýhodám přímé reakce a zvyšuje senzitivitu reakce. Primární protilátka přisedá na svůj antigen a sekundární protilátky se vážou na primární protilátky. Antigen je tak označen mnohem vyšším počtem molekul markerů, čímž se zvyšuje citlivost reakce.



Přímá imunohistochemie

Mezi markery (značky), které se používají k vizualizaci reakce, patří:

- fluorochromy – pro zviditelnění reakce ve fluorescenčním mikroskopu
- avidin-biotinový komplex – komplex často užívaný k amplifikaci signálu (ABC metoda)
- autoradiografie – protilátky nesou radioaktivní látky, které vysílají záření na fotografickou emulzi
- enzymy – využívá se katalytické histochemie; protilátka nesoucí enzym přisedá na antigen a po dodání substrátu jej enzym přemění na barevný produkt např. PAP(peroxidáza- antiperoxidáza) reakce

Použití imunohistochemie umožňuje například zviditelnění filament cytoskeletu, hormonů, receptorů apod.

Lektinová histochemie

Lektiny jsou proteiny (nebo glykoproteiny), kterých se využívá například k určování krevních skupin, mitogenních stimulací lymfocytů či normálních buněk. Váží se vysoce specificky na sacharidové části makromolekul.

In situ hybridizace

Pokud je známa určitá sekvence nukleotidů v DNA či mRNA, je možné připravit označený kus sekvence (tzv. sondu/probu) komplementární k originální sekvenci nukleotidů. Na základě párování bazí pak přisedá označená proba na komplementární úsek DNA/mRNA a zviditelňuje ji. Užívá se pro i pro identifikaci chromosomů v interfázi, velmi často jako FISH (fluorescenční in situ hybridizace).

 Podrobnější informace naleznete na stránkách *Hybridizace in situ, Vyšetření chromosomů*.

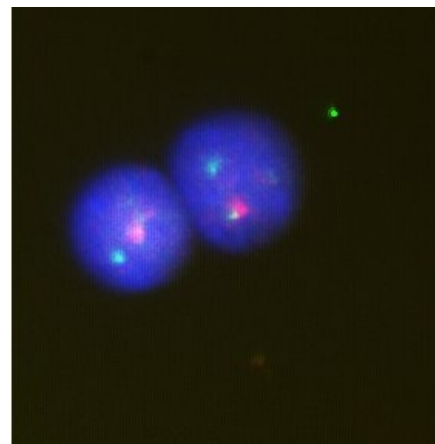
Odkazy

Související články

- Principy konvenční histochemie ve světelné mikroskopii
- Barvení ve světelné mikroskopii
- Barvení hematoxylin-eosin

Použitá literatura

- MAŇÁKOVÁ, Eva a Alexandra SEICHERTOVÁ. *Metody v histologii*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2002. 54 s. ISBN 80-246-0230-X.
- JUNQUIERA, L. Carlos, José CARNEIRO a Robert O KELLEY, et al. *Základy histologie*. 1. vydání. Jinočany : H & H, 1997. 502 s. s. 14-25. ISBN 80-85787-37-7.



FISH metoda