

Vizualizační systémy pro lektinovou histochemii a imunohistochemii

Vizualizace – jelikož vazba antigenu s protilátkou (v případě imunohistochemie) nebo oligosacharidového zbytku s lektinem (v případě lektinové histochemie) není viditelná, je nutné ji v dalším kroku vizualizovat. Metody vizualizace jsou pro oba typy vazeb podobné.

Metody vizualizace

1. Vytvoření barevné sloučeniny in situ pomocí enzymové histochemie
2. fluorochromem
3. avidin-biotin
4. kov
5. digoxigen

Vytvoření barevné sloučeniny in situ pomocí enzymové histochemie

Protilátka je značena enzymem. Enzym rozštěpí substrát, který jsme dodali. Produkt pak reaguje s chromogenem za vzniku barevné sloučeniny.

Nejčastěji používané enzymy, jejich substráty a chromogeny:

Alkalická fosfatáza (ALP)

Musíme dodržet alkalické prostředí (pH 9).

Substrát :

- glycerfosfát (zastaralé)
- α -naftylfosfát (NP)
- bromo- chloro- indolilfosfát (BCIP)

Chromogen :

- nitrotetrazoliová modř (NBT) – modrá reakce
- fast red – červená reakce – rozpustná alkoholem a xylenem

Křenová peroxidáza (HRP)

Substrát :

- Peroxid vodíku

Chromogen :

- Diaminobenzidin (DAB) – černohnědá reakce – nerozpustná, osmiofilní
- Aminoethylkarbazol (AEC) – červená reakce – výsledný produkt je rozpustný alkoholem a xylenem, a proto musíme použít media rozpustná ve vodě, jako je např. želatina.

Fluorochrom

Jde o fluorescenční barvivo. Tyto látky mají schopnost přijmout energii ve formě excitačního světla. Excitační světlo musí mít krátkou vlnovou délku a tudíž mají vysokou energii. Elektrony fluorochromu díky přijaté energii přeskočí na energeticky vyšší hladinu, kde ovšem nemohou setrvat, a tak se vrací zpět na svou původní energetickou hladinu. Při přeskoku zpět vyzáří energii ve formě fluorescenčního záření, které má nižší energii, a tedy delší vlnovou délku. Fluorescenční světlo jsme schopni pozorovat fluorescenčním mikroskopem.

Nejčastější typy fluorochromů :

1. FITC (fluoresceinisothiokyanát) zelený
2. TRITC (rhodamin) červený
3. Dapi (diamidinofenylylindol) modrý

Avidin - biotin

Avidin je vaječný glykoprotein. Biotin je vitamín H patřící do skupiny vitamínů B (některá literatura uvádí vitamín B7). 1 molekula avidinu dokáže navázat až 4 molekuly biotinu. Jde o velmi silnou neimunogenní vazbu. Toho se dá využít pro amplifikaci signálu. Používá se to např. pokud struktura kterou hledáme je zastoupena v malé míře. Molekula avidinu není plně obsazena biotinem, na který je navázána peroxidáza (popř. alkalická fosfatáza). Volné místo je určeno pro biotinylovanou protilátku.

Kov

Značení protilátek kovem se používá pro metody elektronové mikroskopie. Pro značení se používají těžké kovy. Musejí být elektronově denzní.

Nejčastěji používaný kov: částice koloidního zlata

Digoxigenin

Digoxigenin se získává z náprstníku. Používá se v lektinové histochemii. Lektin je označen digoxigeninem a pak je následně používána protilátka proti digoxigeninu. Protilátka je značena fluorochromem či enzymem.

Přímá metoda

Je to nejjednodušší způsob lokalizace antigenu (popř. oligosacharidového zbytku) ve tkáni. Používáme jen primární protilátku, která je již přímo značena fluorochromem, enzymem či kovem. Tato metoda se již příliš nepoužívá, jelikož prokazovaná struktura musí být ve tkáni dostatečně zastoupena a musí být dobře přístupna protilátce. Na parafinových řezech není tolik citlivá.

Nepřímá dvoustupňová metoda

U této metody používáme primární protilátku namířenou proti hledanému antigenu (v případě lektinové histochemie je primární protilátka namířena proti lektinu), která není značena. Na primární protilátku navážeme protilátku sekundární, která se váže na Fc fragment imunoglobulinu zvířete, ze kterého byla získána primární protilátka. Sekundární protilátka je již značena fluorochromem, enzymem či kovem.

Nepřímá trojstupňová metoda

Jde o metodu amplifikační, která se používá k zesílení signálu. Signál je potřeba zesílit např.: v případě, že je ve tkáni nízké množství molekul antigenu.

1. stupeň – Použijeme primární protilátku proti hledanému antigenu. Není značena.
2. stupeň – přidává se protilátka, která je namířena proti imunoglobulinům zvířete od kterého je protilátka primární a protilátka použita ve 3. stupni. Tato protilátka také není značena. Je označována jako protilátka spojovací.
3. stupeň – nanáší se značený komplex př.:

PAP – peroxidáza-anti-peroxidázový komplex APAAP – alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza (u preparátů, kde je vysoká aktivita endogenní peroxidázy a nemůžeme si tak být jisti její plnou inaktivací)

Trojstupňová metoda využívající ABC popř. SABC

ABC- avidin- biotin komplex

SABC- streptavidin- biotin komplex

1. stupeň – navázání primární protilátky (neznačené) na hledaný antigen.
2. stupeň – navázání biotinylované sekundární protilátky na protilátku primární. Ta vytvoří můstek.
3. stupeň – navázání ABC popř. SABC na můstek (biotinylovaná protilátka). Biotin v komplexu je značen peroxidázou či alkalickou fosfatázou a jejich aktivita nám pak značí místa, kde se nachází hledaná struktura a také v jaké míře. Zviditelnění se provádí pomocí enzymové histochemie.

Literatura

- VAJNER, . *Imunohistochemie II* [přednáška k předmětu Histologické techniky, obor Zdravotní laborant, 2. If Univerzita Karlova]. Praha. 9.5.2011.
- TOUPALÍK, Pavel. *Imunohistochemické diagnostické metody v soudnělékařské praxi*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2001. ISBN 80-246-0163-X.
- MAŇÁKOVÁ, Eva a Alexandra SEICHERTOVÁ. *Metody v histologii*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2002. 54 s. ISBN 80-246-0230-X.
- TONAR, Zbynek. *Nepřímé trojstupňové metody* [online]. [cit. 2011-05-20]. <<http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node11.html>>.

- TONAR, Zbynek. *Nepřímá dvojestupňová metoda* [online]. [cit. 2011-05-20]. <<http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node10.html>>.
- TONAR, Zbynek. *Přímá metoda* [online]. [cit. 2011-05-20]. <<http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node9.html>>.
- TONAR, Zbynek. *Lektinová histochemie* [online]. [cit. 2011-05-20]. <<http://www.lfp.cuni.cz/Histologie/education/guides/ihc/node35.html>>.
- ŠPAČEK, Martin. *Histochemie* [online]. [cit. 2011-05-20]. <<http://histologie.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/histochemie-tisk.pdf>>.
- Univerzita Palackého v Olomouci - Ústav histologie a embryologie. *Barvení v histologii* [online]. [cit. 2011-05-20]. <http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/histologie/vyuka/imuno06.pdf>.