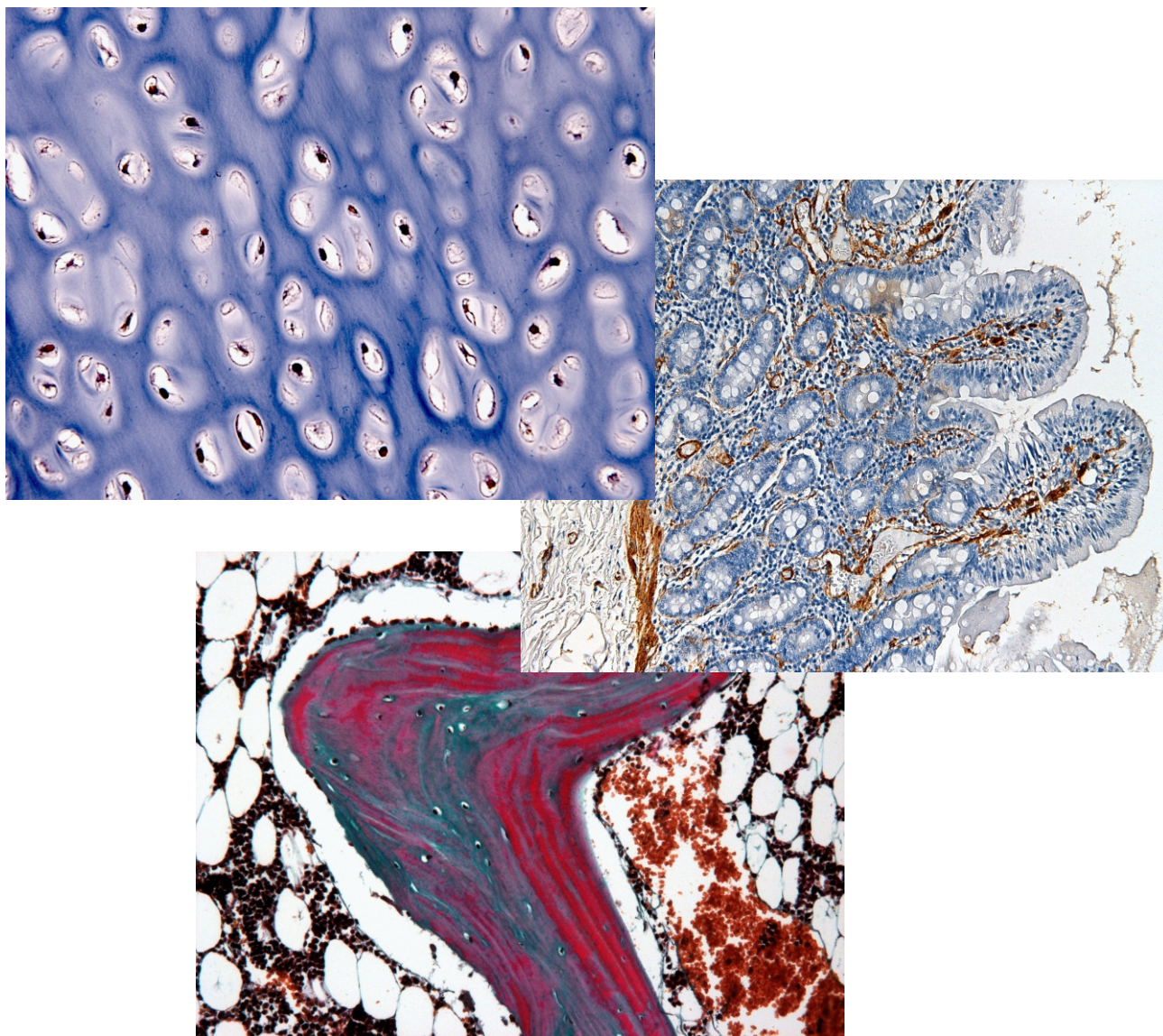


Přehled histologických barvení včetně imunohistochemie

Výukový materiál pro praktická cvičení z histologie

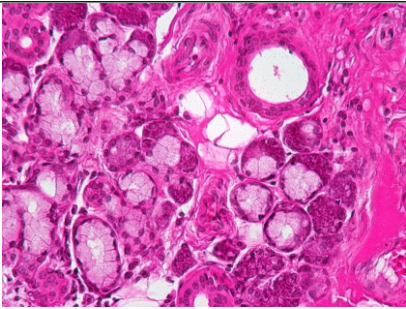
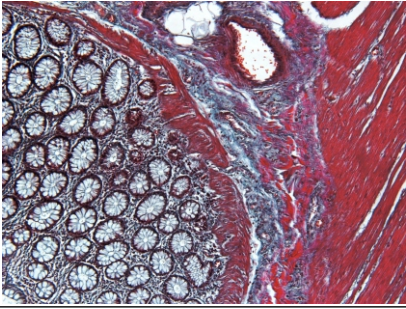
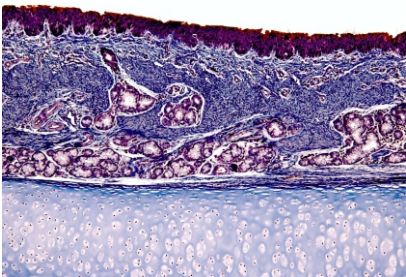
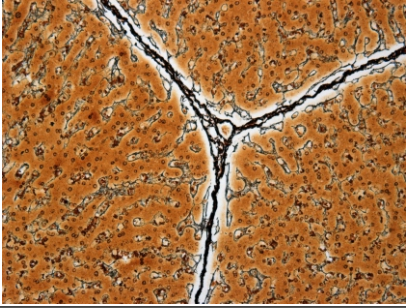
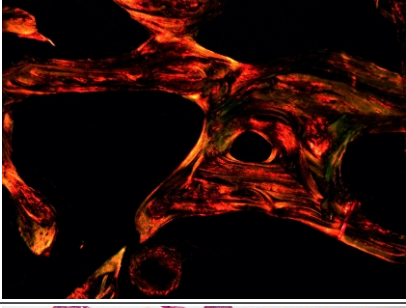
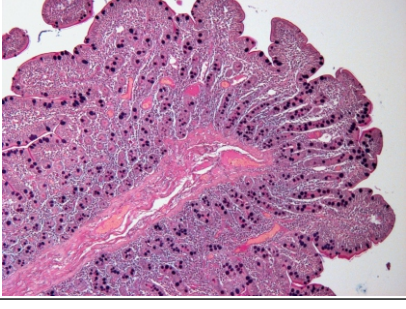
Anna Malečková



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Přehled vybraných metod barvení v histologii

Název barvení	Princip	Obarvené struktury	Příklad
Hematoxylin a eosin	Elektrostatická interakce mezi barvivem a tkání: Bazické - hematoxylin Kyselé - eosin	<ul style="list-style-type: none"> ● Modrá, fialová (hematoxylin) Jádro Ribozómy ● Růžová (eosin) Cytoplasma Mitochondrie Kolagenní vlákna 	
Zelený trichrom	Elektrostatická interakce mezi barvivem a tkání	<ul style="list-style-type: none"> ● Červená Svalovina ● Zelená Kolagenní vlákna ● Černá Elastická vlákna 	
Barvení podle Malloryho (modrý trichrom)	Elektrostatická interakce mezi barvivem a tkání: kyselý fuchsin, anilinová modř	<ul style="list-style-type: none"> ● Modrá (anilin) Kolagenní vlákna ● Červená (kyselý fuchsin) Svaly (proteiny) ● Hnědá Jádra 	
Barvení podle Gomoriho (stříbření)	Redukce iontů stříbra za vzniku černého elementární stříbra	<ul style="list-style-type: none"> ● Černá Retikulární vlákna 	
Pikrosiriová červeň	Kolagenní vlákna lze po obarvení sledovat v polarizovaném světle	<ul style="list-style-type: none"> ● Červená Kolagen typu I ● Zelená Kolagen typu III 	
PAS (Periodic Acid Schiff)	Makromolekuly s četnými cukernými zbytky reagují po oxidaci kyselinou jodistou s Schiffovým reagentem za vzniku purpurového zbarvení	<ul style="list-style-type: none"> ● Červenofialová (purpurová) Mucin, glykoproteiny 	

Imunohistochemie

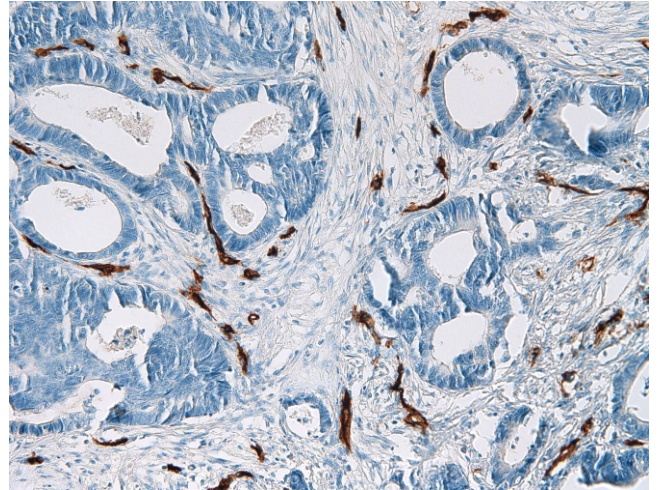
Imunohistochemie je metoda, která je založena na reakci protilátek (imunoglobulinů) se specifickými antigeny bílkovinné povahy. Antigeny můžeme nacházet na povrchu buněk, v jejich cytoplasmě, ale také ve složkách extracelulární hmoty – na různých typech vláken, či jako součást základní hmoty.

Protilátky se na antigeny vážou s vysokou specifitou a vytváří komplex antigen-protilátka. Vizualizace komplexu je zajištěna úpravou protilátek – navázáním fluorescenčních barviv, elektrodenzních částic zlata či enzymů reagujících se substrátem za vzniku viditelné barvy.

V současnosti je imunohistochemie velmi rozšířenou metodou, která má své místo nejen ve výzkumu, ale také v rutinní histopatologické praxi. Průkaz specifických antigenů je využíván jak pro zpřesnění diagnostiky, tak pro možnou predikci léčby a léčebné odpovědi řady onemocnění, včetně nádorových.

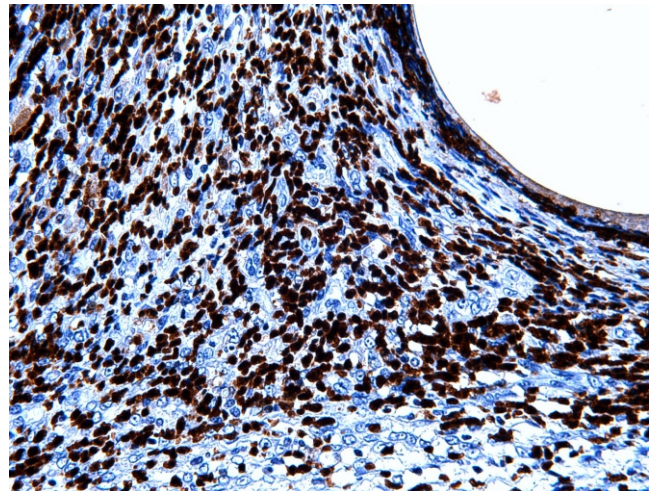
Imunohistochemické barvení - průkaz znaku CD34, který se vyskytuje na endotelových buňkách. Komplex antigen-protilátka označen enzymem peroxidázou, která reagovala po přidání substrátu za vzniku hnědého zbarvení. Jádra buněk dobarvena hematoxylinem (modře).

Preparát: jaterní metastáza kolorektálního karcinomu, člověk



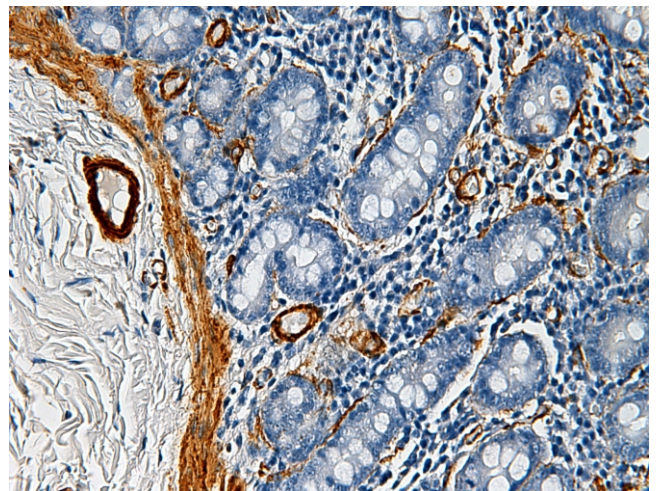
Protein S100A9, vyskytující se v buňkách imunitního systému, na obrázku makrofágy.

Preparát: tenké střevo, prase



Hladkosvalový aktin, SMA, který je přítome v cytoplasmě svaloviny. Na preparátu viditelná svalovina v cévách a v lamina muscularis mucosae.

Preparát: tenké střevo, prase



Základní typy imunohistochemických metod

Principem imunohistochemických metod je detekce makromolekul (např. proteinů, glykoproteinů) s využitím specifické imunologické vazby protilátky na hledaný antigen. Parafínové nebo zmrazené řezy jsou inkubovány s protilátkami, které se vážou na hledané antigeny za vzniku komplexu antigen-protilátka, tzv. imunokomplexu. Pro vizualizaci imunokomplexu je nezbytná úprava protilátek jejich označením fluorescenčním barvivem, kovem nebo enzymem. Antigen může být ve tkáni detekován buď přímou, nebo nepřímou metodou.

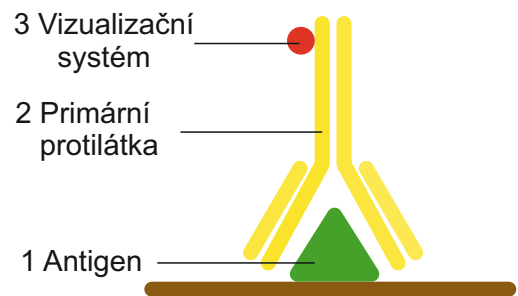
Přímá metoda

Přímá metoda využívá pouze jeden typ protilátek přímo označených vizualizačním systémem. Po inkubaci tkáně s primární protilátkou, která se váže na hledaný antigen, lze bez dalších mezikroků přistoupit k vizualizaci vzniklých imunokomplexů.

Výhody: jednodušší protokoly barvení, nižší nespecifické obarvení pozadí preparátu.

Nevýhody: omezená citlivost metody při malém množství antigenu ve vyšetřované tkáni – falešná negativita.

- 1 Antigen – makromolekula (např. protein, glykoprotein, apod.), kterou chceme v tkáni detekovat
- 2 Primární protilátka – protilátka specificky reagující s hledaným antigenem, společně vytvářejí imunokomplex
- 3 Vizualizační systém – navázán přímo na primární protilátku, umožňuje zobrazení komplexu antigen-protilátka



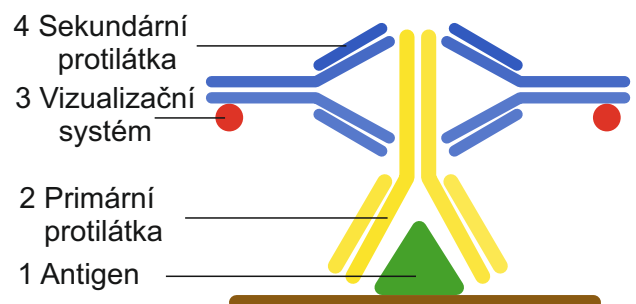
Nepřímá metoda

Při použití nepřímé metody se nijak neznačená primární protilátka váže na antigen podobně jako v případě metody přímé. Po vymytí nenavázaných primárních protilátek se tkáň inkubuje s tzv. sekundárními protilátkami. Sekundární protilátky se vážou na Fc-fragment primární protilátek a jsou značené vizualizačním systémem.

Výhody: větší citlivost metody díky možnosti navázání více sekundárních protilátek na primární protilátku (antigeny).

Nevýhody: nespecifická vazba sekundárních protilátek na pozadí, složitější barvicí protokol.

- 1 Antigen
- 2 Primární protilátka
- 3 Vizualizační systém
- 4 Sekundární protilátka – váže se na primární protilátku, umožněna vazba více sekundárních protilátek na jednu primární protilátku



Protilátky v imunohistochemii

Klíčové pro imunohistochemii jsou protilátky a jejich schopnost specificky rozpoznat antigeny ve tkáni. Protilátky se nevážou na celý antigen, ale pouze na jeho část zvanou epitop. Specifita protilátky je závislá na její schopnosti rozpoznat daný epitop, a to i v přítomnosti dalšího velkého množství antigenů. Afinita je síla, s jakou se protilátka váže na antigen. Protilátky s vysokou afinitou se váží na antigen rychleji a stabilněji než protilátky s afinitou malou. Protilátky používané v imunohistochemii by měly mít vysokou specifitu i afinitu.

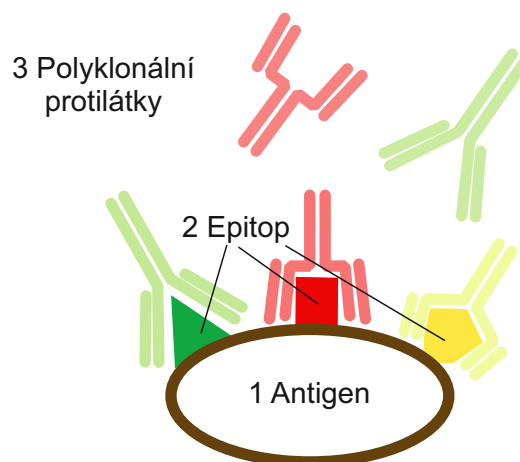
V zásadě rozlišujeme 2 druhy protilátek – polyklonální a monoklonální.

Polyklonální protilátky – jsou získávány z plazmy imunizovaných zvířat. Izolovaný antigen, který chceme ve tkáni pomocí imunohistochemie detekovat, se vpraví do organismu jiného živočišného druhu (např. králíka, kozy), než z jakého izolovaný protein původně pochází (z člověka, potkana, apod.). Imunizací dochází k aktivaci mnoha klonů B-lymfocytů, které produkují celé spektrum protilátek proti mnoha různým epitopům daného antigenu.

Výhody: rozeznávají větší množství epitopů antigenu

Nevýhody: nižší afinita, možná nespecifická vazba protilátek na jiné, než hledané antigeny

- 1 Antigen
- 2 Epitopy
- 3 Polyklonální protilátky

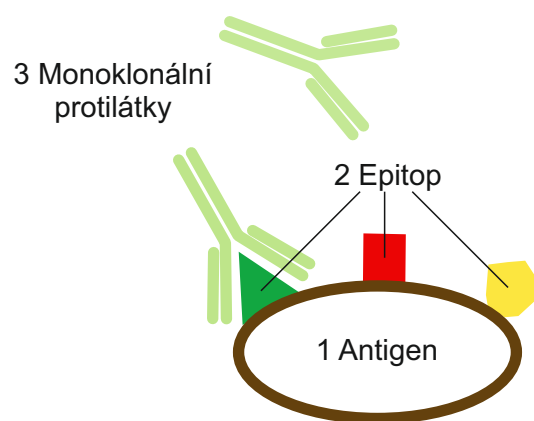


Monoklonální protilátky – jsou získávány z jednoho klonu B-lymfocytů, který je izolován z imunizovaného zvířete. Izolovaný B-lymfocyt produkuje protilátky jen proti jednomu epitopu antigenu. Pro získání dostatečného množství protilátky jsou B-lymfocyty spojením s lymfocytárními nádorovými buňkami přeměny v tzv. hybridomy. Buňky díky fúzi získávají schopnost téměř neomezeného dělení a zároveň si všechny klony zachovávají schopnost produkce protilátky proti jednomu epitopu.

Výhody: specifické pro jeden epitop, vyšší afinita.

Nevýhody: změny v prostorovém uspořádání antigenu (např. vlivem fixace tkáně) mohou vést k „zakrytí“ epitopu pro monoklonální protilátku.

- 1 Antigen
- 2 Epitopy
- 3 Monoklonální protilátky

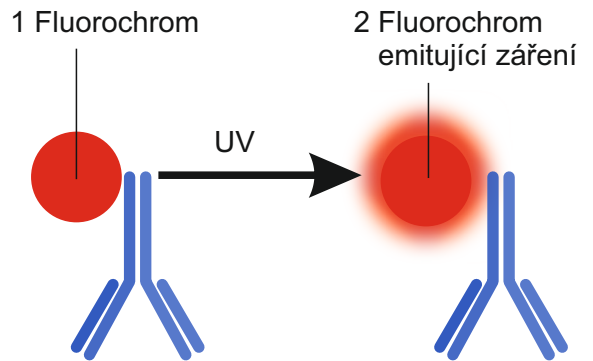


Vizualizace komplexu antigen–protilátka

Protilátky ani samotný komplex antigen–protilátka nejsou pro oko viditelné. Abychom mohli imunokomplex pozorovat v mikroskopu, je třeba použít speciálně upravené protilátky. Nejčastější úpravou protilátek je navázání fluorescenčního barviva, enzymu nebo částic zlata.

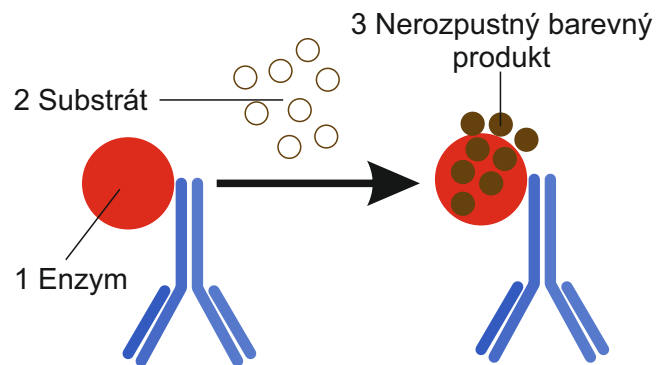
Fluorescence

Sekundární protilátka může být označena flourochromem, tedy látkou, která je schopna fluorescence. Fluorescence je fyzikální jev, při kterém je fluorochrom schopen absorpce světelného záření, např. UV záření, a následně emituje záření o jiné vlnové délce (v jiné barvě). Kamera fluorescenčního mikroskopu je schopna záření zachytit a imunokomplex ve tkáni najít.



Enzymatická reakce

Dalším způsobem vizualizace imunokomplexu je označení sekundární protilátky enzymem (nejčastěji peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou). Po navázání sekundární protilátky značené enzymem je přidán substrát, který po reakci s enzymem vytváří nerozpustný barevný produkt.



- 1 Enzym navázaný na protilátku – peroxidáza, alkalická fosfatáza
- 2 Substrát – ve vodě rozpustná sloučenina reagující s enzymem, např. diaminobenzidin (DAB, reaguje s peroxidázou)
- 3 Nerozpustný barevný produkt – reakce substrátu s enzymem vede ke vzniku nerozpustného barevného produktu, který umožňuje lokalizaci imunokomplexu

Částice kovu

Pro účely elektronové mikroskopie je možné protilátku označit navázáním velmi malých částic zlata. Díky své vysoké elektronové denzitě je možno částice pozorovat v elektronovém mikroskopu bez další úpravy vzorků. Používají se částice o velikost 6 – 25 nm, je tedy možné detekovat více antigenů v jednom vzorku za použití více velikostí zlatých částic.

