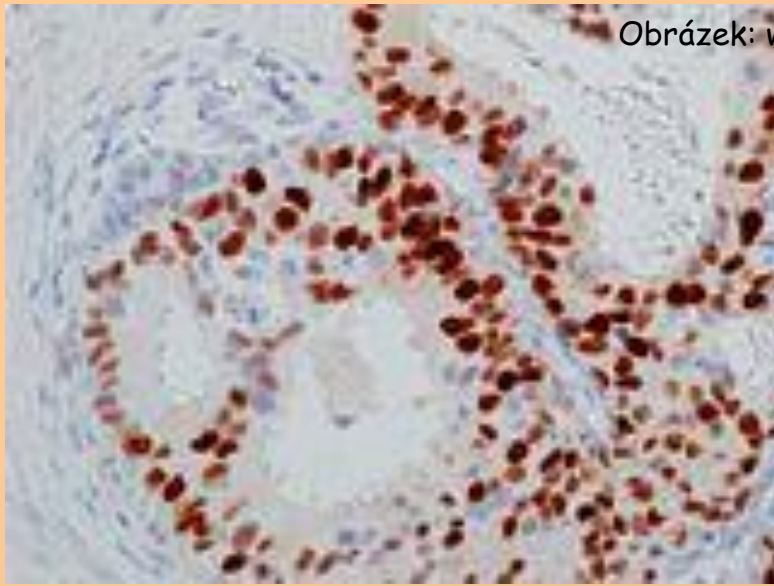
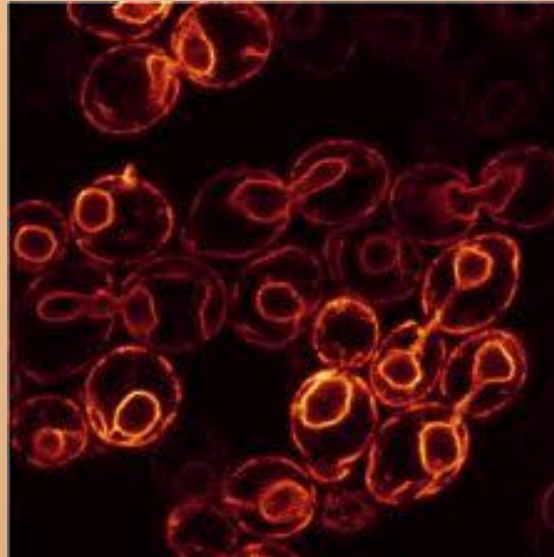




IMUNOHISTOCHEMIE



<http://gold.uni-graz.at>



Základem je vazba molekul imunoglobulinů s molekulami antigenů ve tkáni.

Jsou techniky, které využívají mono- či polyklonální značené protilátky, kterými lokalizujeme a vizualizujeme příslušné tkáňové antigeny.

Význam

Patologie:

- ✓ **diagnostický = určení diagnózy**
- ✓ **prognostický = určení terapie (predikce)**
(karcinom prsu, karcinom tlustého střeva,
maligní lymfomy)

Historie imunohistochemie

- ❑ 30. léta XX.století (histologie, Ach, Bi)
histochemie
lokalizovat chemické látky v místě výskytu
v tkáni na úrovni histologické nebo cytologické
- ❑ 40. léta XX. století první průkaz Ag ve tkáni
pomocí fluoresceinem značené Ab
- ❑ 50. léta patologická diagnostika
- ❑ 70. léta XX. století
 - monoklonální Ab
 - značka na Ab je enzym

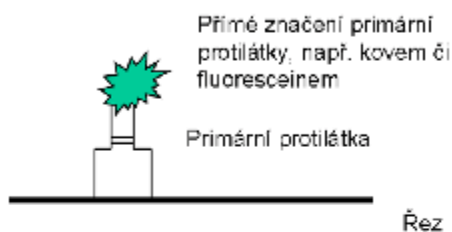
Význam IHC

- ❖ v diagnostické praxi u řady chorob
- ❖ v rostlinné biochemie
 - přesná lokalizace Ag v rostlinném pletivu
 - analýza kinetických parametrů v jejich přirozeném prostředí
 - změny aktivit enzymů způsobené regulačními mechanismy nebo stresovými faktory

ZÁKLADNÍ TYPY IMUNOHISTOCHEMICKÝCH METOD

Přímá metoda

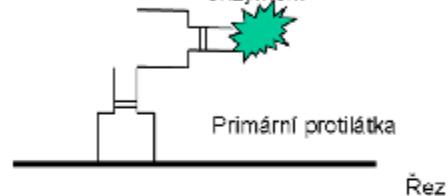
= primární protilátka značená přímo



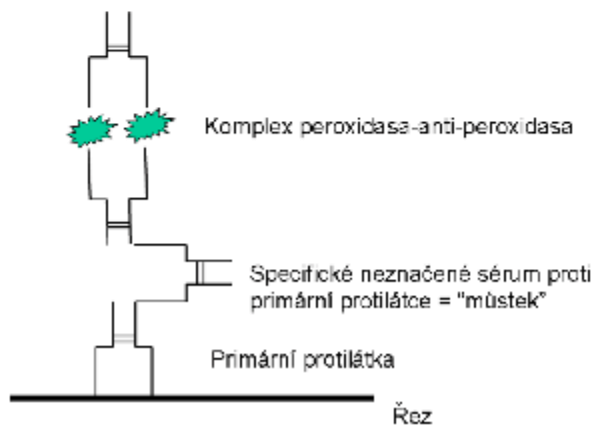
Nepřímá metoda

= dvojestupňová metoda, založená na imunologické vazbě sekundární značené protilátky na protilátku primární

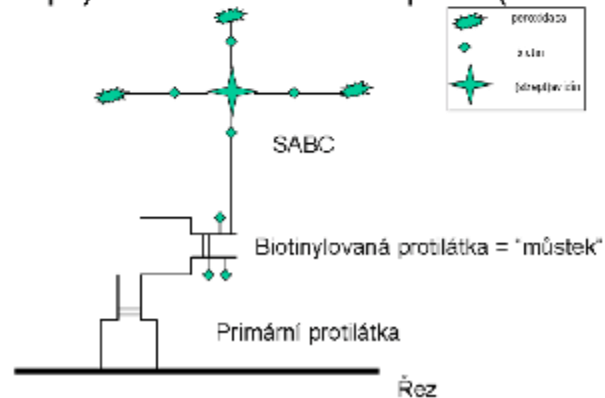
Sekundární protilátka, značená fluorochromem či enzymem



Nepřímá trojstupňová metoda

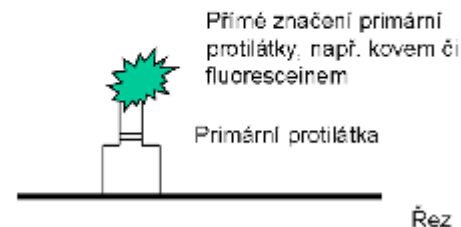


Trojstupňová metoda využívající (strept)avidin biotin komplex (SABC)



Přímá metoda

Přímá metoda
= primární protilátka značená přímo



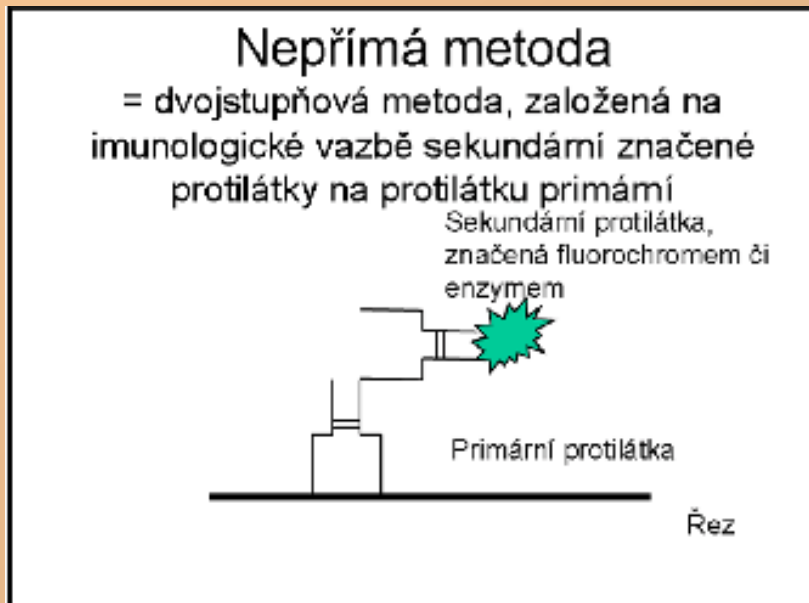
Primární Ab je přímo označena fluoresceinem, enzymem nebo kovem

- ✓ Ag ve tkáni ve vysoké koncentraci
- ✓ konjugované Ab dostupné pro široké spektrum Ag a využívají se zejména v nativních řezech.
- ✓ při použití v parafinovaných řezech je metoda málo citlivá

Nepřímá dvoustupňová metoda

Provedení je komplikovanější, ale metoda je citlivější.

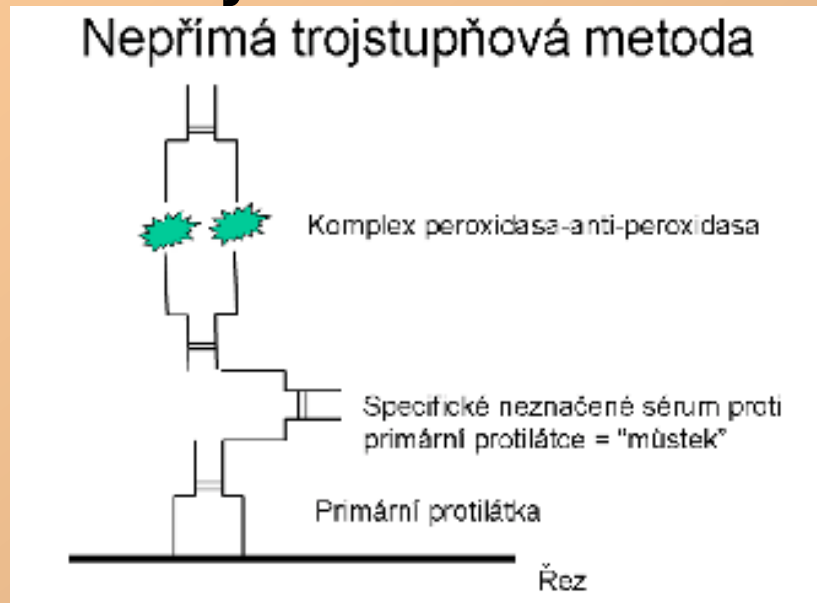
- ✓ Na tkáňové řezy se aplikuje neoznačená Ab specifická proti prokazovanému Ag (primární Ab)
- ✓ na ni se nanáší Ab proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete, jež byl dárce primární Ab, která je značená



Nepřímé trojstupňové metody

- ✓ slouží k zesílení signálu, když množství Ag ve tkáni nízké
- ✓ první krok: reakce specifické Ab s Ag ve tkáni
- ✓ druhý krok: aplikace neznačená Ab proti imunoglobulinů zvířete, jehož protilátky se používají v první a třetí fázi.

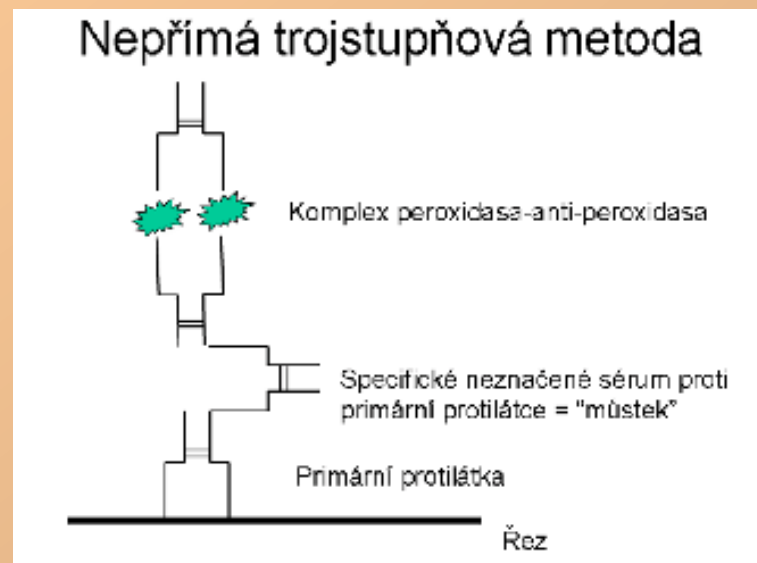
Sekundární Ab = spojovací, tvoří **můstek**, který se přidává v nadbytku.



- ✓ třetí fáze nanáší se značený komplex

Dva typy nepřímé trojstupňové metody

- ❖ metoda PAP nebo APAAP
- ❖ metoda ABC



Metoda PAP nebo APAAP

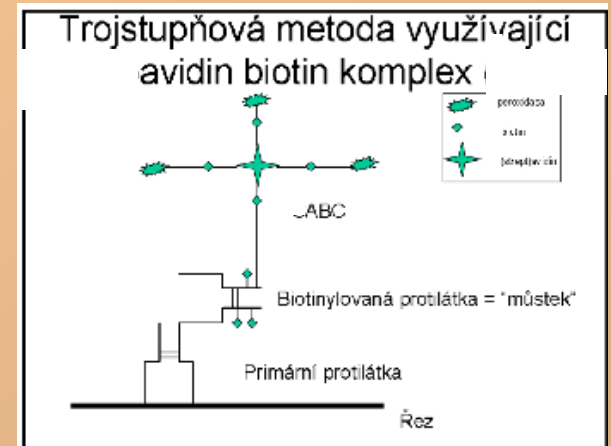
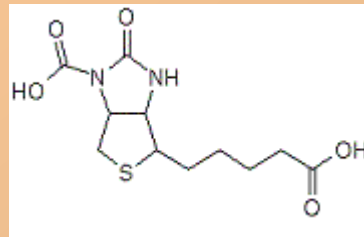
- ✓ třetí krok nanáší se značený komplex, např. **PAP**
 - **peroxidasa-anti-peroxidasový komplex.**
- ✓ nebo značený komplex s alkalickou fosfatasou **APAAP**
 - **alkalická fosfatasa-anti-alkalická fosfatasa**
(když preparáty obsahují vysokou aktivitu endogenní peroxidasy a nelze spolehlivě zaručit její inaktivaci)

Metoda ABC (avidin-biotin komplex)

Založená na tvorbě pevné irreverzibilní vazby mezi **biotinem** a **avidinem**

Avidin bílkovina vaječného bílku

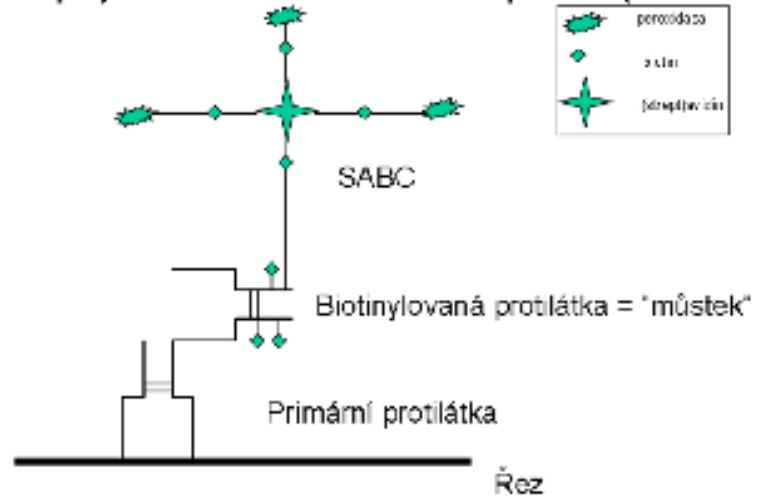
Biotin vitamin H



Avidin může vázat až 4 molekuly biotinu.

- ❖ některá vazebná místa avidinu jsou volná
- ❖ jiná jsou obsazena biotinem značeným **peroxidasou** nebo biotin-**alkalická fosfatasa**
- ❖ volná místa avidinu jsou připravena pro navázání biotinylované protilátkové molekuly (můstku).

Trojstupňová metoda využívající (strept)avidin biotin komplex (SABC)



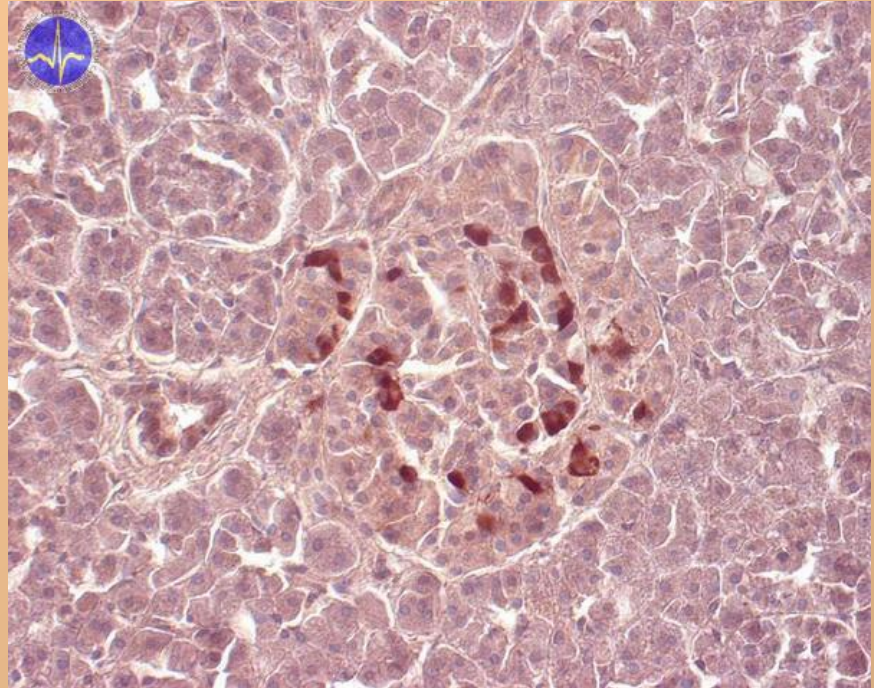
Metoda SABC

avidinu z bakterie *Streptomyces avidinii*, který dává lepší reakci se tento komplex

K dispozici jsou citlivé detekční soupravy, poskytující uspokojivé výsledky při minimálním množství komplexu antigen-protilátka.

Metoda ABC v praxi

**Ab somatostatin v D-buňkách
Langerhansových ostrůvků**



Postup při imunohistochemii

- ❖ **rostlinný či živočišný materiál nařezat**
- ❖ **napínání řezu**
- ❖ **fixace**
- ❖ **eliminace endogenních enzymů**
- ❖ **blok pozadí**
- ❖ **vazba Ab a detekčního systému**
- ❖ **odvodňování a montování preparátů**

Krájení a napínání řezů

- ❖ Každou tkáň lze krájet mikrotomem na jinou minimální tloušťku řezů
úspěch 5 μm (u tkání je zachycena jedna vrstva buněk)
- ❖ Nakrájené řezy napnout na kapce vody
na podložním sklíčku potaženém vhodnou lepidivou substancí:
 - ❑ směs bílek-glycerin
 - ❑ želatina
 - ❑ poly-L-lysin
 - ❑ APES (3-amino-propyl-triethoxysilan)

Zalítí tkáně

Aby bylo možné tkáň krájet je třeba ji upevnit:

- ❖ bezová duš
- ❖ prosytit tkáň zalévacím médiem a nechat ztuhnout pak teprve lze upnout do mikrotomu a krájet
- ❖ zalévací média nejsou mísitelná s vodou, je třeba napřed tkáň odvodnit

odvodnění tkáně:

stoupající řadou alkoholů, která tkáň projasní (methylsalicylát, methylbenzoát)

zalítí tkáně:

- ❖ parafin (56°C)
- ❖ směs plastických polymerů = **paraplast**
- ❖ v zalévací komůrce
- ❖ v chládnoucím paraplastu odstraňovat bubliny jehlou

Fixace tkáně

Cíl fixace: je zachování struktury buněk a tkání ve stavu, který je co nejpodobnější tomu, v němž se vyskytují zaživa.

- ❖ **Fixace zastaví nebo zpomalí metabolické děje (v případě zmrazení)**
- ❖ **Stabilizace enzymů či proteinů působením činidel**

Způsoby fixací:

- ✓ **fixačními roztoky**
- ✓ **zmrazením tkáně**
- ✓ **teplem**

fixační roztoky nebo páry:

- ✓ aldehydy (pufrovaný vodný roztok formaldehydu)
- ✓ alkoholy (ethanol, methanol –odnímají vodu z tkáně)
- ✓ kyseliny (octová, trichloroctová, pikrová)
- ✓ glutaraldehyd
- ✓ soli těžkých kovů

zmrazení tkáně:

zpomalení metabolických procesů

teplem

fixace tkáně pomocí mikrovln

Při výběru způsobu fixace je třeba dbát:

- ❑ zachování morfologie tkáňových struktur
- ❑ zachovat antigenicitu a minimalizovat vznik artefaktů

Průkaz látky v místě jejího normálního výskytu *in situ*

- ✓ Chemické látky, které chceme identifikovat, je zapotřebí imobilizovat, fixovat.
- ✓ Velké málo difunzibilní makromolekuly nedělají problémy (proteiny a polysacharidy).

Artefakty

- ❖ Chemické fixativum proniká do hloubky tkáně, jeho čelní hranice představuje výrazný fyzikálně-chemický gradient, což může změnit distribuci některých typů molekul ve tkáni (natlačit je na biomembrány).
- ❖ Difunzibilní malé rozpustné molekuly během klasického způsobu fixace nejsou imobilizovány a jejich původní distribuce je setřena.

malé rozpustné molekuly – fixace

- ✓ rychlé zmrazení tkáně
- ✓ rychlé zmrazení tkáně s následnou mrazovou sublimací (mrazové vysoušení ve vakuu – lyofilizace)

termosenzibilní enzymy

nelze prokazovat v parafinových řezech
(56°C teplý parafin)

inaktivace

Cílem získat **preparát**, kde průkaz cílové látky by byl
v čase stabilní.

Eliminace endogenní aktivity enzymů

- ❖ Pro prokázání vazby Ag-Ab se používají značky (peroxidasa, alkalická fosfatasa)
- ❖ Tyto enzymy se mohou vyskytovat přirozeně ve zkoumané tkáni (falešně pozitivní reakce)

Blokace endogenní aktivity enzymů:

- ✓ **peroxidasa:** substrát 1-3% peroxid vodíku v methanolu nebo ve vodě (20-30 min)
- ✓ **alkalická fosfatasa** lavamizol
- ✓ **avidin a biotin**
(může se vyskytovat v játrech a ledvinách)
blokace:
0,1 – 0,01% avidin v PBS (20 min)
0,01 – 0,001% biotin v PBS (20 min)

Blok pozadí

Nespecifická reakce může způsobit falešnou pozitivitu:

- ☐ **aktivita endogenních tkáňových enzymů**
- ☐ **endogenní avidin-biotin**
- ☐ **kontaminace řezů nebo reagensů cizorodými látkami**
- ☐ **křížové reakce (protilátky s podobnými epitopy)**
- ☐ **nespecifická vazba primární protilátky v důsledku nekovalentních hydrofobních interakcí**
- ☐ **nespecifické vazby v důsledku elektrostatických interakcí (užít pufrů s vyšší iontovou silou)**
- ☐ **poškození řezu (např. vyschnutí)**
- ☐ **difúze tkáňových antigenních struktur do okolní tkáně**
- ☐ **nespecifická reakce sekundárních, terciálních protilátek s Fc receptory Ig přítomných v tkáni**
- ☐ **pohlčení antigenu fagocyty**
- ☐ **nekróza tkáně spojená s vylitím cytoplazmatického obsahu do intercelulárních prostor**

Nespecifickému vychytávání specifické protilátky

Lze částečně předejít vysycením tkáně bílkovinami:

- ✓ mléko
- ✓ nespecifické sérum

Tkáň se saturuje neškodnými proteiny a nespecifické přibarvování je potom menší.

Vazba protilátek a detekčního systému

- ✓ antigen v tkáni se váže s primární Ab
- ✓ na primární Ab vazba sekundární, popř. terciální Ab
- ✓ poslední Ab je značená chromogenem
- ✓ výsledkem je přítomnost chromogenu v místě, kde došlo ke specifické vazbě, tj v místě, kde se vyskytoval hledaný Ag

Pro úspěšnou detekci je třeba dodržovat podmínky příbalového letáku protilátky (pH, typ fixace, ředění, doba inkubace atd.).

Chromogeny

Vizualizace lokalizace antigenu.

- ❖ fluorochromy – imunofluorescence
 - FITC** (fluorescein-izothiokyanát)
 - TRITC** (tetramethyl-rhodamin-izothiokyanát)
 - DANSYL** (1-dimethyl-aminonaftalen-5-sulfonylchlorid)
 - deriváty **rhodaminu B**
 - texaská červen**
- ❖ enzymy – imunoenzymové lokalizace
 - křenová **peroxidasa**
 - alkalická fosfatasa**
 - acetylcholinesterasa**
- ❖ kovy částice zlata 5-20 nm

Enzymová značka a její substrát:

produktem činnosti enzymu je **nerozpustný** pigment.

peroxidasa

3,3'-diaminobenzidin (DAB) peroxidasa reaguje se svým substrátem peroxidem vodíku. Oxidací rozpustného DAB je stabilní hnědý produkt, nerozpustný v alkoholu, a proto se během dehydratace před montováním řezů nevyplaví.

Pozor na azid sodný – konzervační činidlo protilátek, který je inhibítozem peroxidasy.

3-amino-9-ethylkarbazol (AEC)
(karmínově červené zbarvení)

Alkalická fosfatasa

naftol-AS-MX fosfát

Fast Blue BB

Fast red

Výsledkem je červené nebo modré zbarvení, které je však rozpustné v alkoholu, proto musíme montovat řezy do hydrofilního média.

Fluorescenční značka a fluorescenční mikroskop

- ✓ **Fluorochromy jsou barviva, která vykazují fluorescenci.**
- ✓ **Fluorescenci detekujeme pomocí fluorescenčního mikroskopu.**

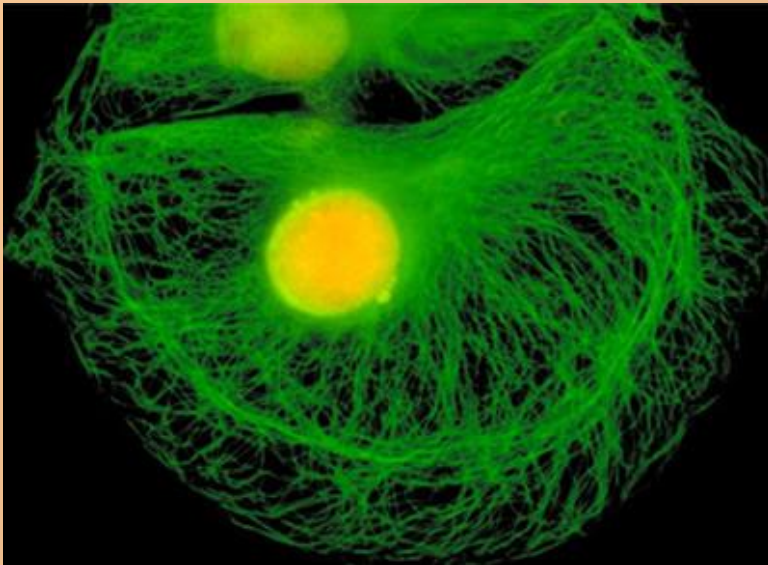
Fluorescence: světlo kratší vlnové délky absorbováno a je emitováno světlo o delší vlnové délce

- ❖ **během excitace fluorochromu UV světlem intenzita emitovaného světla slábne (vysvícení).**
- ❖ **fluorescenční mikroskop má jako světelný zdroj rtuťovou nebo xenonovou výbojku nebo laser**
- ❖ **mezi zdroj a vzorek a před okulár jsou vřazeny filtry k selekci vhodné budící vlnové délky či odlišení excitovaného světla od budícího (a aby UV nesměřovalo do okuláru).**

Chromogeny při imunofluorescenčních technikách:

- ❖ **fluorescein-izothiokyanát (FITC, zelená barva)**
- ❖ **tetramethyl-rhodamin-izothiokyanát (TRITC, červená)**
- ❖ **texaská červeně (červená barva)**

Média pro montování nesmí vykazovat vlastní fluorescenci. Na jednom histologickém řezu lze prokazovat i více antigenů za současného použití různých chromogenů.



PtK2 buňky ledvin obrázek: www.under-microscope.com



Artefakty a jejich řešení

- ✓ sraženiny fixačního činidla
- ✓ zuby po mikrotomovém noži
- ✓ zřasení a sklady (nedostatečné natažení tkáně)
- ✓ bílá místa a štěrby z nerovnoměrné kontrakce (smrštění)
- ✓ bubliny vzduchu
- ✓ špína a prach
- ✓ sraženiny barviva

ŘEŠENÍ

zařazení negativní a pozitivní kontroly

Negativní kontrola

- ☐ preparát, který neobsahuje prokazovanou látku (antigen)
- ☐ obsahuje antigen, ale během procesu jsme vynechali reakci s primární Ab

Pozitivní kontrola

Preparát, o kterém víme, že obsahuje prokazovaný Ag, reakce v případě IHC je pozitivní.

Imunohistochemie v praxi

Zalití tkáně



krájení řezů



Bloček je upnut do rotačního mikrotomu a krájen na histologické řezy (5-10 μm), které při vhodné teplotě parafinu a místnosti se slepují do pásy.

ŘEZÁNÍ OBJEKTŮ

volná ruka



ruční (svorkový) mikrotom



vibratom



**strojní mikrotom - rotační
sáňkové**



**zmrazovací
mikrotom**

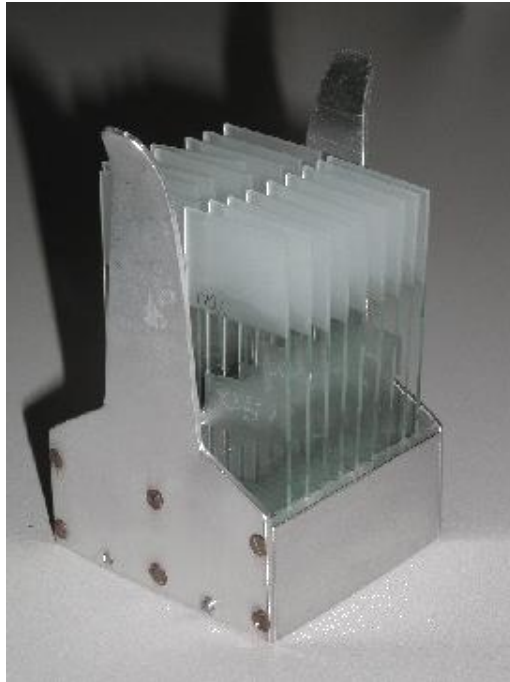


Napínání řezů



Řezy jsou přeneseny (štětečkem nebo jehlou) na teplou vodní hladinu, kde se rozpnou. Pak se přenesou na podložní sklíčko potažené **APES** a nechají se rozpínat na temperované podložce, poté řezy zasychají v termostatu (přes noc). Místo APES lze použít
poly-L-lysin
glycerin-bílek
kamencová želatina

Rozpuštění paraplastu



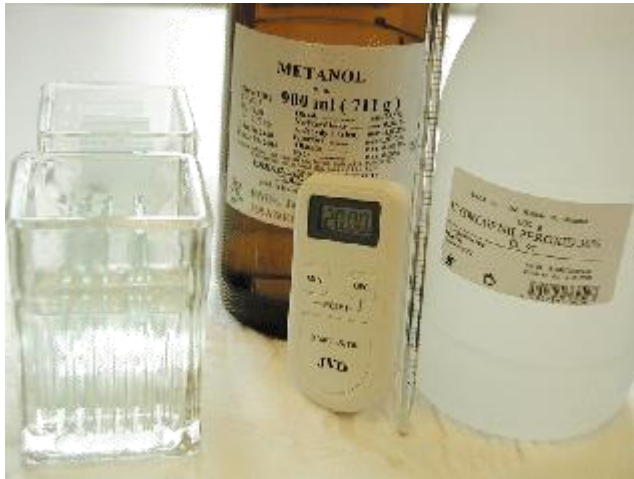
Řezy je třeba odparafinovat (odstranit zalévací médium) jeho rozpuštěním v xylolu (směs izomerů xylenu).

Zavodnění tkáně a obnovení přístupnosti antigenů částečnou proteolýzou.



- ❖ protažení preparátů sestupnou alkoholovou řadou (96, 80 a 70%) – zajistí se plynulá hydratace tkáně (z hydrofobní na hydrofilní)
- ❖ enzymové trávení tkáně 30 minut s předehřátým 2 % pepsinem při 37°C, zajistí lepší přístupnost tkáňových antigenních determinant

Blokace endogenní peroxidasy a nespecifické vysycení tkáně bílkoviny.



- ❖ Preparát opláchnout dest. vodou (3x5 min)
- ❖ blokace peroxidasy 20 min v kyvetě (1,8 ml peroxidu v 100 ml methanolu)
- ❖ oplach dest. vodou
- ❖ inkubace s neimunním sérem nebo 5% sušené mléko v PBS (odstranění nespecifických interakcí protilátky s pozadím)

Reakce s primární a sekundární protilátkou.



- ❖ Inkubace s primární protilátkou, ředěnou v PBS (na preparát nakápneme 100-150 μ l protilátky, inkubace přes noc v lednici).
- ❖ Oplach pufrem (3x5min).
- ❖ Reakce se spojovací (sekundární) biotinylovanou protilátkou (4 ml PBS + 1 kapka séra + 5 μ l biotinylované protilátky).
- ❖ Inkubace 45 min při 37°C. Oplach 3x5 min PBS.

Vizualizace chromogenu



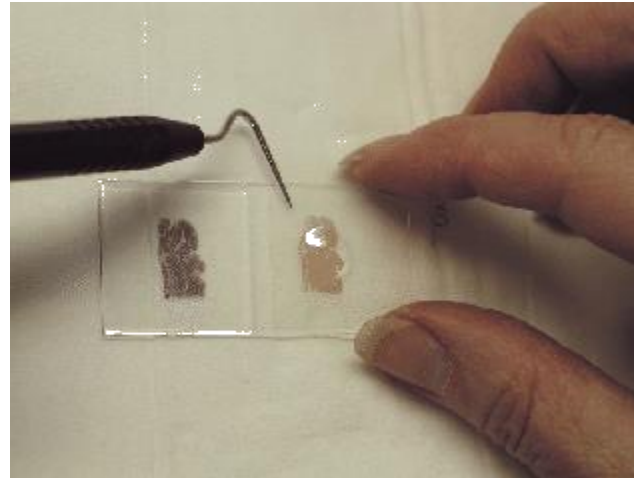
- ❖ Po oplachu na preparát ABC-komplex (45 min při 37°C) (4 ml PBS + 10 μ l A + 10 μ l B). Oplach v PBS.
- ❖ 10 mg 3,3'-diaminobenzidin v několika kapkách N,N-formamidu + 30 ml PBS + 15 μ l peroxidu vodíku a zfiltrujeme. Filtrát 10 min na preparát.

Nespecifické dobarvení tkáňového pozadí



- ❖ Sklíčka do kyvet s dest. vodou (2x vyměnit).
- ❖ Provedeme kontrastování v 5% CuSO_4 (10 min)
- ❖ Opět oplach v kyvetách (2x dest. voda)
- ❖ Dobarvení buněčných jader Gillovým hematoxylinem (30 s)

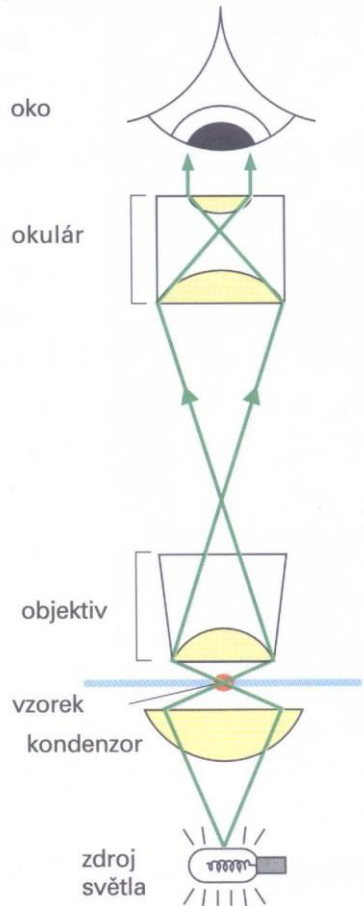
Odvodnění a montování preparátů



- ❖ vyprání nadbytečného barviva
- ❖ odvodnění vzestupnou alkoholovou řadou (70-80-96%)
acetón, xylén
- ❖ uzavřít do solakrylu nebo kanadský balzám, krycí sklíčko
zaschnout v termostatu

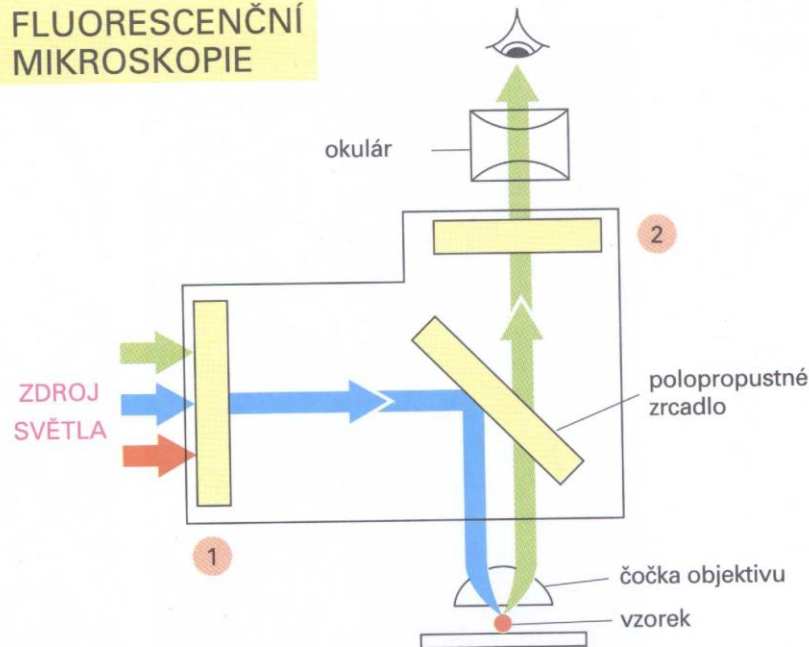
Základní mikroskopické techniky

SVĚTELNÝ MIKROSKOP

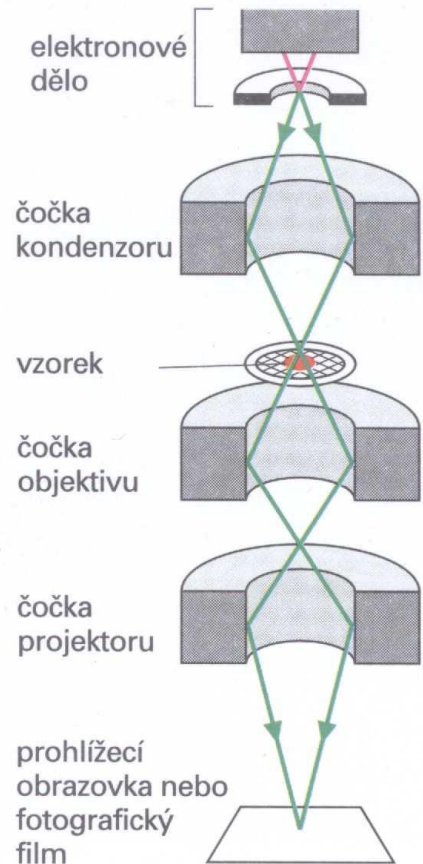


dráha světla
ve světelném mikroskopu

FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE



TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE



HISTORIE SVĚTELNÉ MIKROSKOPIE



The First Compound Microscope (circa 1595)



Simple Sliding Rod Microscope (circa 1640s)



Guiseppe Campani Turned Ivory Monocular Microscope (circa 1662)



English Tripod Microscope by John Yarwell (circa 1680s)

Italský původ

Anglický původ



Leeuwenhoek Microscope (circa late 1600s)

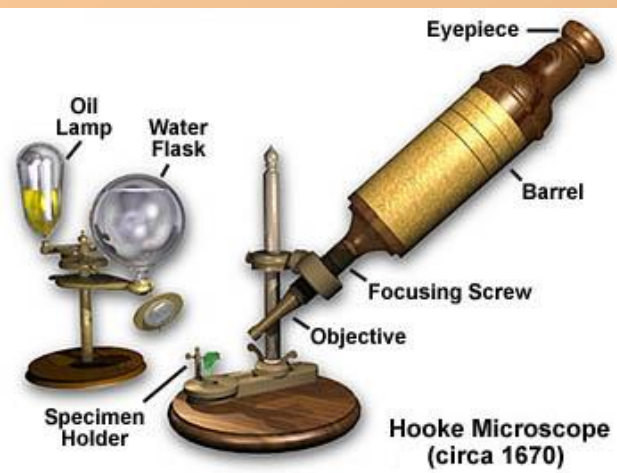


Designed for medical students in the late 19th Century, this Wenham-style binocular microscope, designed and built by Henry Crouch typifies advancements of the period.



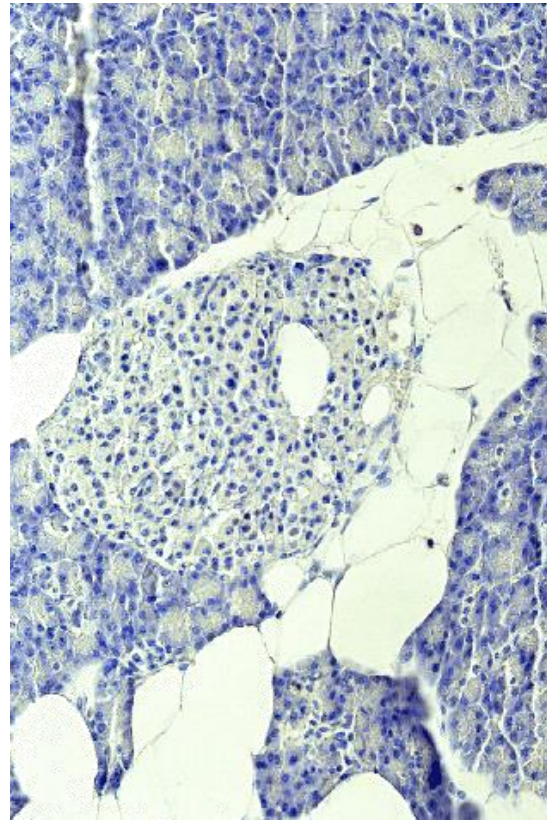
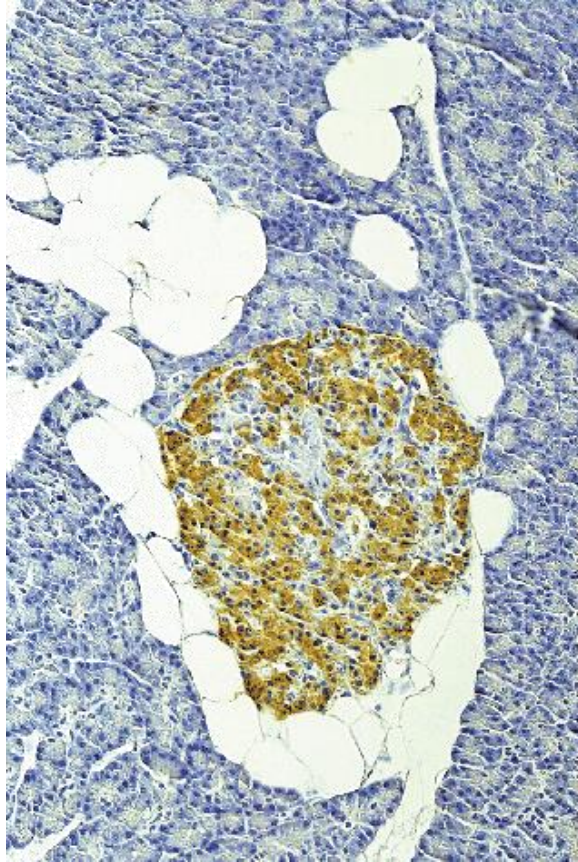
The Olympus Provis AX-70 (circa 1998)

This state-of-the-art microscope contains accessories for DIC, fluorescence, polarized light, phase contrast, and photomicrography using several film formats and digital image capture.

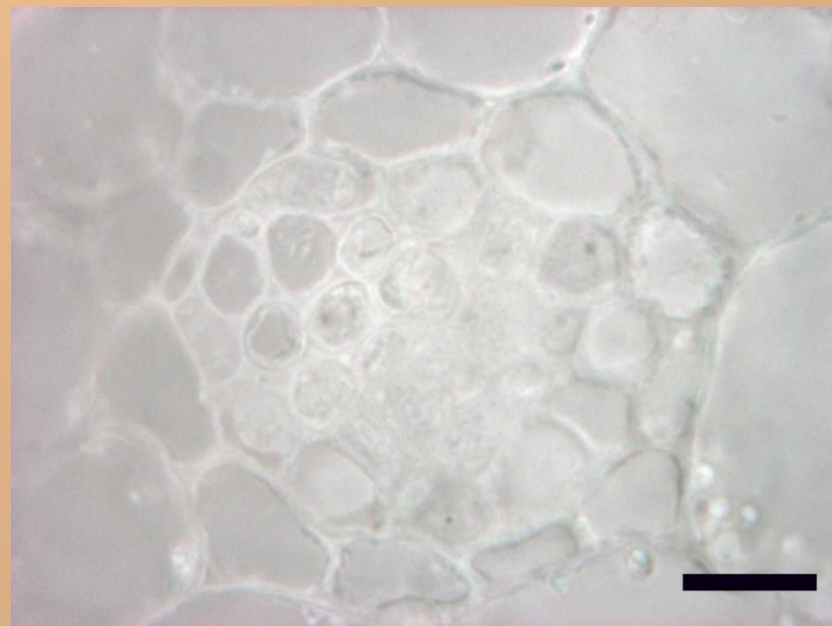
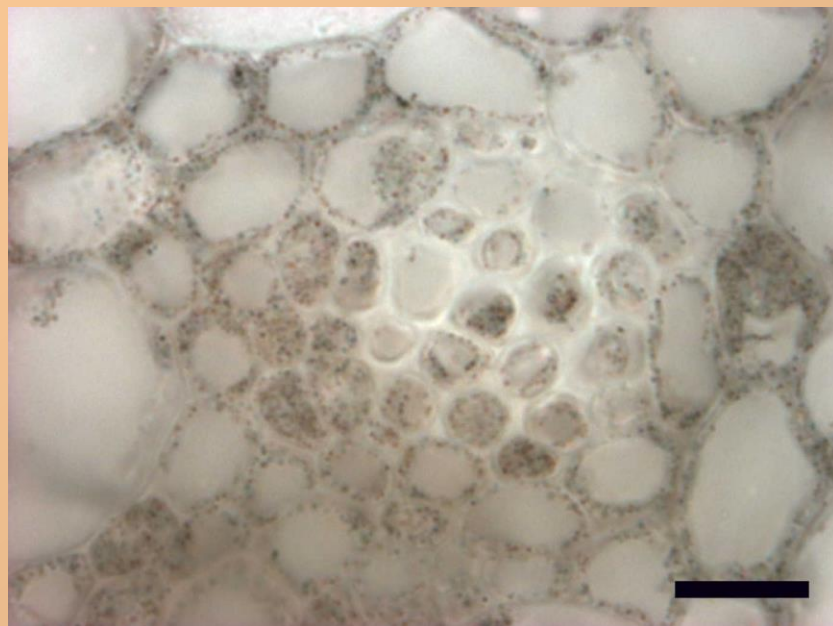
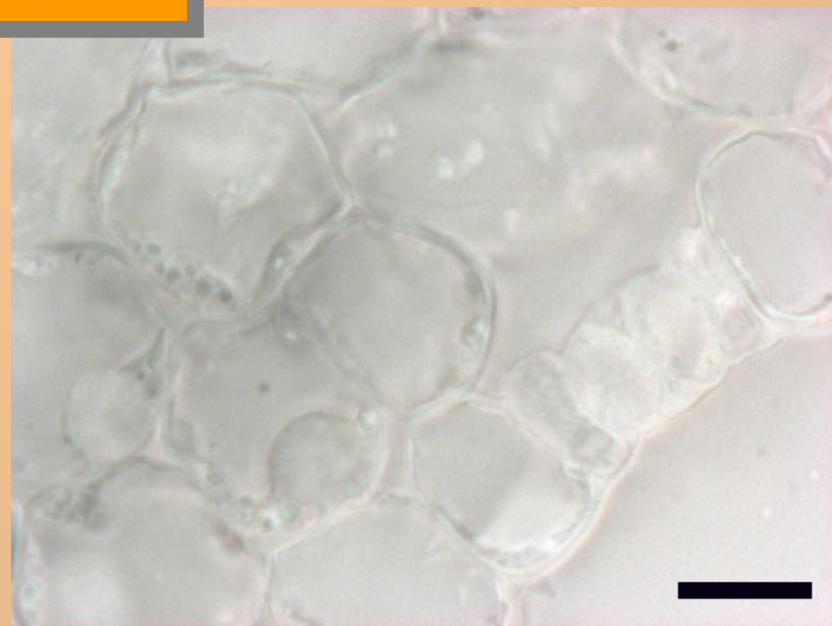
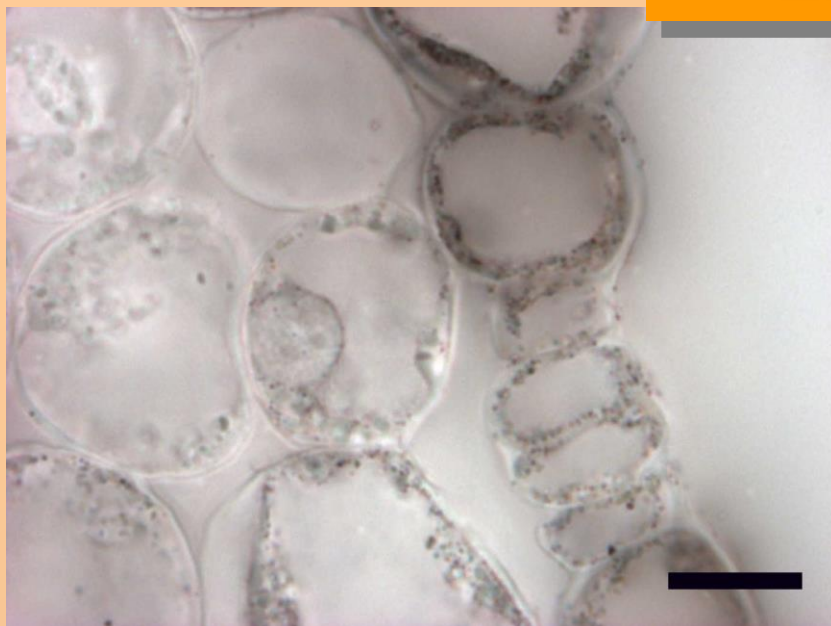


Hooke Microscope (circa 1670)

Anti-insulin-pankreas



LIST



úsečka - 10 μm , zvětšení - 1000 x

Vysvětlení fotografií:

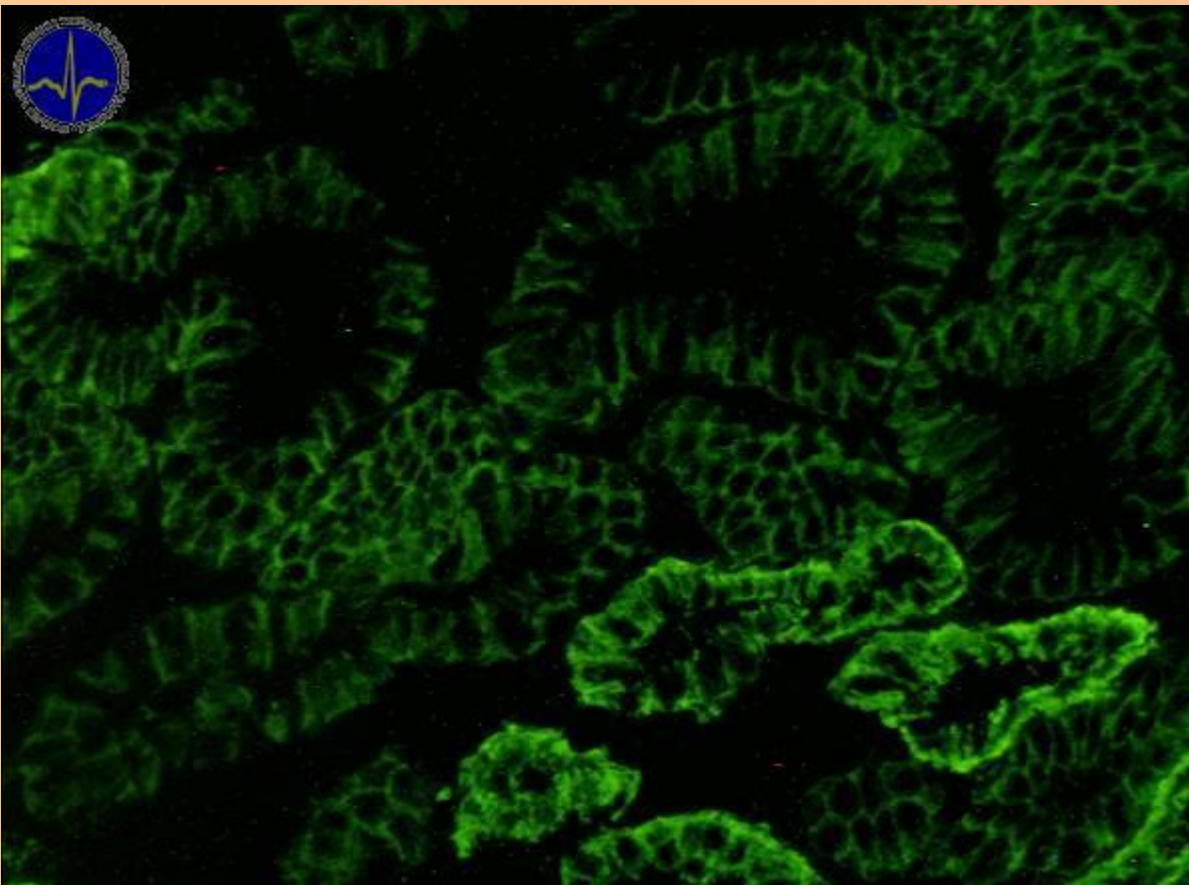
Vpravo vždy kontrola – vynechání primární protilátky

Vlevo : proti Ag navázaná primární Ab (králičí)
 sekundární Ab (kozí proti králičí)
 značená 10 nm částicemi Au
 následuje zviditelnění částic Au
 stříbrem (technika podobná fotografické)

nahoře: buněčná stěna

dole: floem

aminoaldehyddehydrogenasa



ledvina

Výskyt Na^+/K^+ ATPasy v bazolaterálním labyrintu proximálního a distálního tubulu