

ÚSTAV HISTOLOGIE A EMBRYOLOGIE LF UK V PLZNI



Principy a příklady imunohistochemie

PŘÍRUČKA PRO STUDENTY

MUDr. Milena Beranová, Ph.D.
Mgr. Zbyněk Tonar

leden 2002

Práce byla podporována grantem FRVŠ F3 2082:
„Zavedení imunohistochemických metod
do praktických cvičení z histologie“

Obsah

1 Úvod	3
1.1 Cíl práce	3
1.2 Historie	3
1.3 Literatura dostupná ke studiu	4
1.4 Příklady využití imunohistochemie	4
2 Teoretické základy imunohistochemie	5
2.1 Základní typy imunohistochemických metod	5
2.1.1 Přímá metoda	6
2.1.2 Nepřímá dvojestupňová metoda	6
2.1.3 Nepřímé trojestupňové metody	6
2.2 Získávání protilátek pro IHC	7
2.2.1 Polyklonální protilátky	7
2.2.2 Monoklonální protilátky	7
3 Imunohistochemický protokol	8
3.1 Obecné schéma imunohistochemického protokolu	8
3.2 Odběr a fixace tkáně	8
3.3 Krájení a napínání histologických řezů	10
3.4 Optimalizace prezentace antigenů	10
3.4.1 Použití proteáz	10
3.4.2 Použití mikrovlnného záření	11
3.5 Blok endogenní aktivity enzymů	11
3.6 Blok pozadí	11
3.7 Vazba protilátek a detekčního systému	12
3.8 Chromogeny	12
3.8.1 Průkaz u značení pomocí enzymů	13
3.8.2 Průkaz u značení pomocí fluorochromu	14
3.9 Barvení pozadí	14
3.10 Další metodické poznámky	14
3.10.1 Artefakty	14
3.10.2 Zásady práce a její kontrola	15
3.10.3 Kvantifikace nálezu	15
4 Příbuzné metody	15
4.1 Enzymová histochemie	16
4.2 Lektinová histochemie	16
4.3 In situ hybridizace (ISH)	16
4.4 FISH	16
5 Postup při výrobě imunohistochemických preparátů	17
5.1 Zalití tkáně	17
5.2 Krájení řezů	18
5.3 Napínání řezů	18
5.4 Rozpuštění paraplástu	19
5.5 Zavodnění tkáně a obnovení přístupnosti antigenů částečnou proteolýzou	19

5.6	Blokáda endogenní peroxidázy a nespecifické vysycení tkáně bílkovinami	20
5.7	Reakce s primární a sekundární protilátkou	20
5.8	Reakce s ABC komplexem a vizualizace chromogenu	21
5.9	Nespecifické dobarvení tkáňového pozadí	22
5.10	Odvodnění a montování preparátů	22
6	Mikrofotografie preparátů	23
6.1	Poděkování:	23
6.2	Použité primární protilátky	23
6.2.1	Anti-CD45R0	23
6.2.2	Anti-Alpha-Smooth Muscle Actin	23
6.2.3	Anti-Insulin	24
6.3	Použitý detekční systém	24
6.4	Popisky mikrofotografií	24
	Reference	31

1 Úvod

1.1 Cíl práce

Cílem tohoto projektu je umožnit stručné seznámení se základními imunohistochemickými metodikami, jejich principy, základními kroky jejich provedení a jejich možným použitím v medicíně. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni zajišťuje pro studující I. a II. ročníku všeobecného lékařství i stomatologie výuku teoretického předmětu „Histologie a embryologie“, v jehož rámci se studenti na praktických cvičeních mohli zatím přímo seznamovat jen s technikami přehledných a speciálních histologických barvicích metod. V současnosti jsme však svědky prudkého rozvoje molekulárně-biologického poznání biomedicínských jevů. Výzkum se dnes téměř výlučně odehrává na molekulární úrovni, čím dál více a čím dál rychleji se jeho výsledky promítají do práce klinické.

Imunohistochemické a imunocytologické metody mají široké spektrum použití, a to zejména v biotické diagnostice. Zvláště v případě nádorových lézí je často imunohistochemická či imunocytologická charakteristika tkáně za pomoci jednoho či více markerů rozhodující, a to jak pro biotickou diagnostiku jako takovou, tak často též pro následný postup klinický. Výběr konkrétních imunohistochemických metod, jež jsou zde obsaženy, byl konzultován s prof. MUDr. Michalem Michalem z Ústavu patologické anatomie LF UK v Plzni, neboť inovace výuky histologie by měla mimo jiné sloužit pro lepší připravenost studentů pro navazující předměty „Patologie“ a „Patologická fyziologie“, ev. pro pozdější spolupráci budoucích kliniků s patologií. Studenti by měli porozumět nejčastěji užívaným metodikám včetně jejich omezení a úskalí.

Ústav histologie a embryologie se i nadále hodlá věnovat prohlubování molekulárně-biologického chápání biomedicínských jevů studenty LF UK – již v minulosti byla na našem pracovišti úspěšně zavedena in situ hybridizace (ve spolupráci s Ústavem biologie LF UK v Plzni, stanovení mRNA PAI-1). V současnosti provádíme již i některé z DNA diagnostických metod (ve spolupráci s Šiklovým ústavem patologické anatomie LF UK v Plzni např. metodu TGGE (temperature gradient gel electrophoresis)).

1.2 Historie

Imunohistochemie (IHC) se rozvíjela jako jedna z modernějších metod, které původně vycházely z tzv. „histochemie“, a to zaváděním postupně objevovaných zákonitostí specifické imunologické reakce a s rozvojem její dostupnosti pro běžné laboratoře. Původní histochemie vznikala přibližně od 30. let XX. století na hranici histologie a analytické chemie a biochemie. Jejím cílem je identifikovat a lokalizovat chemické látky v místě jejich výskytu v tkáních na úrovni histologické či cytologické.

Základem pro IHC byla možnost kovalentní vazby molekul imunoglobulinů s jinými molekulami, což se stalo předmětem výzkumu již ve 30. letech XX. století. Ve 40. letech se zdařil první průkaz antigenů v tkáni pomocí fluoresceinem značené protilátky (tzv. přímou imunofluorescenční metodou). Do patologické diagnostiky se tyto techniky dostávaly od 50. let a postupně byla zlepšována specifita, senzitivita a dostupnost stále širšího spektra metod, k čemuž napomohl i rozvoj molekulárního, proteinového a genového inženýrství nezbytný pro produkci reagensů potřebné kvality a kvantity. V 70. letech XX. století byly

připraveny protilátky proti jednomu epitopu (antigenní determinantě), tzv. monoklonální protilátky.

Rovněž spojení enzymu s protilátkou, kterého se začalo využívat ve stejné době, vyústilo v širší zavedení IHC do praxe, a to zejména u tkáňových řezů fixovaných ve formolu a zalitých v parafinu. Tím vznikla možnost unifikovat odběr tkáně a retrospektivně vyšetřovat vzorky již dříve odebrané.

Do **imunohistochemie** spadají všechny techniky využívající mono- či polyklonální **značené protilátky, kterými lokalizujeme a vizualizujeme příslušné tkáňové antigeny**. IHC je využívána ke specifitějšímu průkazu látek v preparátech, objasnění distribuce prokazovaných látek (schopných zúčastnit se reakce jako antigeny), a to extra- i intracelulárních strukturních a informačních molekul, enzymů nebo sekrečních produktů. V současnosti je role IHC v diagnostické praxi u řady chorob prakticky nezastupitelná.

1.3 Literatura dostupná ke studiu

Předkládaný dokument není vědeckou prací, v níž by každá zásadní informace byla doložitelná citací z primárních pramenů, neboť jde o informace dlouho známé a v praxi používané. Přesto zde uvádíme některé z publikací, kterými jsme byli inspirováni. V mnohých z nich je možno nalézt podrobné zpracování dílčích témat souvisejících s imunohistochemií. Základní představu o metodice zpracování histologických preparátů je možné čerpat jak z klasických učebnic histologické techniky, např. [15] nebo [14], tak z moderních kompendií[3].

Klasickou prací jednoho ze zakladatelů histochemie je [7]. Přehled o zpracování histologického materiálu a o základních metodách v histologii lze získat u [12] nebo [4]. Teoretický přehled o IHC je důkladně a promyšleně zpracován v [2]. Principy IHC, cenné podklady k laboratorním postupům a jejich využití v bioptické diagnostice přehledně podává [6] a [11]. Detailnější přehled o histochemii a IHC u jednotlivých orgánových systémů v patologii a její roli v diagnostickém procesu viz [5]. Možnosti IHC v soudnělékařské diagnostice zpracovává [13].

K pochopení zákonitostí využívaných v metodice imunohistochemie je zapotřebí ovládat základní termíny z imunologie, s nimiž se lze seznámit v učebnicích, např. [8]. Pro pokročilejší čtenáře a zájemce o hlubší studium imunologických jevů uvádíme [1] a [9].

Využití molekulárně-genetických metod v klinické práci a přehled nejdůležitějších diagnostických postupů popisuje [10]. Jedná se zejména o popis izolace nukleových kyselin, Southernův přenos a analýzu restrikčních fragmentů, polymerázovou řetězovou reakci a její modifikace, ligázovou řetězovou reakci a in situ hybridizaci.

1.4 Příklady využití imunohistochemie

K nejdůležitějším skupinám antigenů prokazovaných v praxi patří zejména:

Intermediární filamenta – cytokeratiny (typické pro různé typy epitelových buněk), vimentin (v buňkách mezenchymového původu), desmin (ve svalové tkáni), neurofilamenta, gliový fibrilární acidický protein (neuroglie a myoepitelové buňky)

Mikrofilamenta – aktin a myosin

CD antigeny – zejména v diagnostice neoplazií lymfatického systému (lymfoproliferativní choroby)

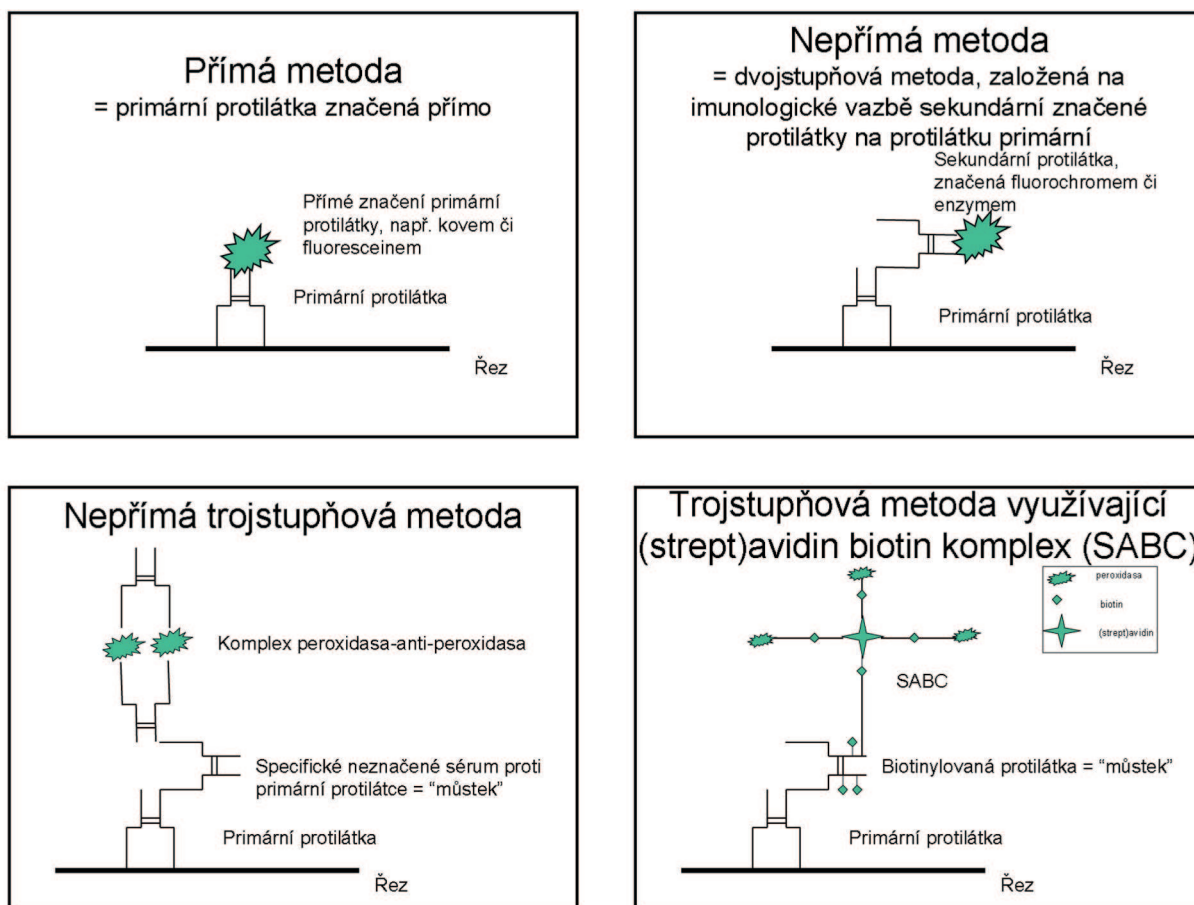
estrogenové a progesteronové receptory – značí se jádra v hormon-senzitivních buňkách, v nichž hormony působí jako regulační faktory genové exprese a diferenciaci buněk, metody se užívá v diferenciální diagnostice nádorů prsu a dělohy.

Je možné prokazovat i řadu jiných antigenů typických či specifických pro určité tkáně, resp. buňky určitého původu nebo diferenciačního stadia.

2 Teoretické základy imunohistochemie

Základním cílem imunohistochemických a imunocytochemických metod je detekce specifických antigenních determinant (molekul či jejich částí) s využitím imunologické vazby, t.j. na principu vazby antigenu a protilátky. Tuto vazbu si můžeme obrazně představit jako vztah specifického klíče (protilátky, která je zpravidla volná) k zámku (tkáňovému antigenu, jenž je zpravidla pevně fixován na určitou strukturu, např. na povrch buňky.¹)

2.1 Základní typy imunohistochemických metod



Obrázek 1–4: Schéma IHC metod

¹Existují ovšem i obrácené modifikace, kdy naopak protilátky nacházející se v tkáni můžeme detekovat tak, že k nim přidáme v roztoku příslušné antigeny.

Rozdělení typů imunohistochemických metod:

- přímá metoda
- nepřímá metoda dvojstupňová
- nepřímé trojstupňové metody
 - metoda peroxidáza-anti-peroxidázového komplexu (PAP)
 - metoda avidin-biotin komplexu (ABC)

Schéma těchto metod ukazují obrázky 1–4.

2.1.1 Přímá metoda

Jde o nejjednodušší způsob lokalizace antigenu ve tkáni. Primární protilátka je přímo označena fluoresceinem, enzymem nebo kovem, jehož rozmístění v tkáni pak hodnotíme. Přímé metody lze užít, je-li antigen ve studované tkáni přítomen v dostatečně vysoké koncentraci. Konjugované protilátky jsou dostupné pro široké spektrum antigenů a mají využití zejména v nativních řezech. Při použití na parafinových řezech je tato metoda málo citlivá.

2.1.2 Nepřímá dvojstupňová metoda

Nepřímé IHC metody jsou ve srovnání s přímými sice komplikovanější, ale výhodou je, že mohou být mnohem citlivější. Na tkáňové řezy se nejprve aplikuje neoznačená protilátka (imunoglobulin) nebo sérum, které jsou specifické proti prokazovanému antigenu a nazýváme je primární protilátkou. Ve druhé vrstvě nanášíme protilátku proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete, které bylo dárce primární protilátky. Druhá (sekundární) protilátka je značená fluorochromem nebo enzymem a imunologickou vazbou se váže na protilátku primární.

2.1.3 Nepřímé trojstupňové metody

Jedná se o amplifikační metody sloužící k zesílení signálu v případě, že množství molekul antigenu v tkáni je nízké. V první fázi reaguje primární specifické antisérum s antigenem prokazovaným v tkáni. Ve druhé fázi je aplikována nezačtená specifická protilátka proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky se používají v první a třetí fázi. Tato sekundární protilátka je nazývána také protilátka spojovací a tvoří „můstek“. Můstek je nutno přidávat v nadbytku, aby nebyla vazebně vysycena obě ramena (Fab-fragmenty²) jeho IgG molekuly, což by poskytlo falešně negativní výsledek. Ve třetí fázi nanášíme značený komplex, například PAP, tj. **peroxidáza-anti-peroxidázový komplex**. Metodika je citlivější než obě metody předešlé, avšak časově náročnější.

Při nahrazení peroxidázy v komplexu alkalickou fosfatázou dostaneme metodu APAAP, tj. **alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza**. Tento postup je vhodný pro vyšetřování takových preparátů, kde je velmi vysoká aktivita endogenní peroxidázy a nelze tak spolehlivě zaručit její úplnou inaktivaci.

²Obsahují variabilní oblast, která je antigeně specifická.

Další nepřímou trojstupňovou metodou je technika **avidin-biotin komplexu (ABC metoda)**. Využívá schopnost velice pevné (prakticky ireverzibilní) neimunologické a druhotně nespecifické vazby vaječného glykoproteinu bílku avidinu s vitamínem biotinem. Avidin má schopnost vázat čtyři molekuly biotinu. Některá vazebná místa avidinu jsou volná a některá jsou obsazena komplexem biotin-peroxidáza, resp. biotin-alkalická fosfatáza. Volná místa jsou připravena pro navázání biotinylované protilátkové molekuly (můstku). Při použití avidinu získaného z bakterie *Streptomyces avidinii*, který dává lepší reakci, nazýváme tento komplex SABC, tj. **streptavidin-biotin-komplex**. K dispozici jsou velmi citlivé detekční soupravy poskytující uspokojivé výsledky i při minimálním množství komplexu antigen-protilátka. ABC, resp. SABC metoda patří při správné metodice v současnosti k nejcitlivějším a je velmi rozšířená. Princip spočívá v označení sekundární protilátky biotinem a jeho následné vazbě se (strept)avidin-biotinovým komplexem označeným křenovou peroxidázou. Enzymatická aktivitu této peroxidázy nám pak indikuje ta místa v preparátu, na nichž došlo k primární specifické reakci.

2.2 Získávání protilátek pro IHC

2.2.1 Polyklonální protilátky

Jsou produktem mnoha aktivovaných klonů B lymfocytů a proto jsou namířeny proti více epitopům určitého antigenu nebo směsi antigenů. Získávají se imunizací laboratorních zvířat antigenem (nebo jejich směsí). Při imunizaci organismu dochází ke stimulaci různých B lymfocytů a k jejich proliferaci a diferenciaci na plazmatické buňky. Je produkováno spektrum protilátek proti různým epitopům příslušné bílkoviny s různou schopností se na ni vázat. Po úspěšné imunizaci se zvířeti odebere sérum či ascites obsahující protilátky proti původnímu imunogenu. Specifita polyklonálních protilátek velice závisí na imunizačním protokolu, resp. na tom, v jaké fázi imunitní odpovědi zvířete jsou z něj protilátky získávány.

2.2.2 Monoklonální protilátky

Jelikož jsou produktem jednoho klonu B lymfocytů, jsou specifické proti jediné antigenní determinantě. Fúzí normálních B lymfocytů pocházejících z imunizovaného živočicha a neoplastických myelomových buněk lze připravit tzv. hybridomy, což jsou klony buněk schopné produkce monoklonálních protilátek. Zatímco mateřský normální B lymfocyt (od imunizovaného dárce) je nositelem specifity produkované protilátky, myelomová buňka je nositelem vysokého až neomezeného proliferačního potenciálu, „nesmrtelnosti“. Hybridom tedy zdědí po myelomové buňce možnost nepřetržitého růstu a po aktivovaném B lymfocytu schopnost syntetizovat monoklonální protilátku namířenou proti jedné antigenní determinantě.

3 Imunohistochemický protokol

3.1 Obecné schéma imunohistochemického protokolu

1. odběr a fixace tkáně
2. krájení a napínání histologických řezů
3. optimalizace prezentace antigenů
4. blok aktivity endogenních enzymů
5. blok pozadí
6. vazba primární protilátky
7. vazba sekundární protilátky
8. detekční systém
9. demaskování komplexu antigen-protilátka
10. barvení pozadí (zejména buněčných jader)
11. dehydratace a montáž preparátu

Konkrétní námi použitý postup je dokumentován v části věnované popisu výroby IHC preparátů (strana 17).

3.2 Odběr a fixace tkáně

Cílem fixace je zachování struktury buněk a tkání ve stavu, který je co nejpodobnější tomu, v němž se vyskytují zaživa. Dokonalost fixace odebrané tkáně má zásadní význam pro správnost imunohistochemické detekce, neboť schopnost správné identifikace buněčných proteinů závisí na jejich zachování v tkáňových řezech.

Fixace zastaví metabolické děje jejich zpomalením (v případě zmrazení) či stabilizací enzymů a dalších proteinů. Toho lze dosáhnout:

- fixačními roztoky (pufrovaný vodný roztok formaldehydu event. s kyselinou pikrovou a kyselinou octovou jako Bouinova tekutina, roztok glutaraldehydu, ethanolu) nebo parami
- zmrazením tkáně
- eventuálně i teplem (při fixaci tkáně pomocí mikrovln nedochází ke ztrátě proteinů ve srovnání s chemickou fixací)

Při výběru fixace tkáně pro IHC je zapotřebí skloubit do jisté míry protichůdné tendence:

- zachovat morfologii tkáňových struktur
- zachovat antigenicitu a minimalizovat vznik artefaktů

Průkaz látky, která je předmětem našeho zájmu, je třeba provést *in situ*, tj. přímo v místě jejího normálního výskytu v tkáni. Chemické látky, jež chceme identifikovat, je zapotřebí imobilizovat, fixovat, popřípadě jejich solubilitu vhodným způsobem změnit nebo jí přizpůsobit výběr látek, s nimiž přijde během zpracování do styku. Nebývá to problém u větších a málo difuzibilních makromolekul, jakými jsou proteiny a některé polysacharidy – ty jsou zpravidla fixativem precipitovány či pevně zesíťovány s ostatními precipitovanými molekulami v tkáni.

Během fixace se prakticky nelze vyhnout vzniku **artefaktů**. Když chemické fixativum proniká do hloubky tkáně (zejména to platí pro dehydratující fixativa, jakými jsou alkohol, aceton aj.), představuje jeho čelní hranice výrazný fyzikálně-chemický gradient, který může změnit distribuci některých typů molekul v tkáni a kupříkladu je „natlačit“ na biomembrány (o něž se tyto látky zastaví). V případě vysoce difuzibilních rozpustných látek s malými molekulami (ionty, nízkomolekulární jednoduché sacharidy, některé organické kyseliny, urea) nedochází během klasického způsobu chemické fixace k jejich imobilizaci a během interakce s roztokem fixativa je původní distribuce těchto látek v tkáni zcela setřena.

Některým těmto změnám u uvedeného typu látek je možné předejít vaskulární perfuzí tkáně fixativem, ale ani tehdy se nezabrání změnám v jejich distribuci na intracelulární úrovni.

Posledně uvedenému zkruslení v rozmístění vysoce rozpustných látek lze předejít rychlým zmrazením tkáně (pro zhotovení kryostatových řezů), event. následným mrazovým vysoušením ve vakuu (mrazová sublimace, freeze-drying, zvaná též lyofilizace). Některé termosenzitivní enzymy nelze totiž prokazovat v parafinových řezech, protože by byly inaktivovány³ teplotou tekutého parafinu při zalévání bločku (cca 56 °C). Tyto metody navíc umožňují provést následně průkaz aktivity většiny endogenních (tj. v tkáni se vyskytujících) enzymů. Rovněž deformace tkáně („scvrknutí“ typické pro řadu způsobů chemické fixace) je zde méně výrazná. V rovině praktické realizace má ovšem i tato metoda některá úskalí. Nepříjemné jsou např. důsledky fragility zmrazeného bločku projevující se ve snadném porušení souvislosti tkáně.

Během zpracovávání tkáně je výběr chemikálií samozřejmě omezen na takové, které v jiných ohledech strukturu tkáně či prokazovanou látku významně nepoškodí. Zpravidla je naším cílem získat též takový preparát, jehož mikroskopický obraz a zejména průkaz cílové látky v něm je v čase stabilní (to však v některých případech nebývá vždy možné, preparát postupně „bledne“ a musí být vyhodnocován krátce po svém zhotovení). Fixace často zvyšuje propustnost buněčné membrány a umožňuje průnik látek (barviv aj.) přes plazmalemu.

Z výše uvedeného plyne, že výběr správného fixativa je vázán na konkrétní reakci, kterou se chystáme následně provádět, a na typ prokazované látky. Proto bývá součástí všech reakčních souprav pro imunohistochemii též informace o požadovaném typu fixace. V současné době je dostupné široké spektrum reagentů umožňujících provádět velkou část imunohistochemických reakcí na běžných řezech, tj. fixovaných pufrovaným neutrálním roztokem formaldehydu a zalitých do parafinu (resp. paraplastu). Změny antigenů, ke kterým během fixace dochází, mohou i nemusí ovlivnit jejich reaktivitu v IHC reakci podle

³Odolnost různých enzymů vůči fixačním postupům a jiné fyzikálně-chemické manipulaci se však velmi liší.

vztahu místa změn k reakčnímu místu antigenu. Proto je vhodné zvolit jako součást dané IHC metodiky konkrétní vyzkoušený či výrobcem doporučený způsob fixace.

Nejčastěji používanými činidly jsou aldehydy, zejména pufrovaný vodný roztok formaldehydu o koncentraci např. 4 %, který má tu výhodu, že má (díky pufru $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) schopnost udržet si svou hodnotu pH i po přidání menšího množství kyselého či zásaditého roztoku. Byl použit i v námi prováděném protokolu. Aldehydy při fixaci rychle reagují s aminoskupinami aminokyselin (vyčnívajícími mimo peptidický skelet) a dalších sloučenin a za určitých podmínek ponechají zachovanou alespoň část enzymatické a imunoglobulinové aktivity, což umožňuje použít IHC metody na lokalizaci příslušných aktivit ve tkáních. Mění se struktura cytosolu a vzniká z něho gel, např. tvorbou příčných methylenových můstků, které mohou vázat rozpustné proteiny k nerozpustným proteinům cytoskeletu. K dalším činidlům chemické fixace patří vedle aldehydů i alkoholy (ethanol či methanol, jež odnímají z tkáně vodu), kyseliny (octová, trichloroctová, pikrová), event. soli těžkých kovů. Nepříznivé vlivy fixace na tkáň lze částečně ovlivnit dalšími postupy.

3.3 Krájení a napínání histologických řezů

Každou tkáň lze mikrotomem krájet na jinou minimální tloušťku řezů, za úspěch lze považovat hodnoty kolem 5 μm (při této tloušťce je u většiny tkání zachycena přibližně jedna vrstva buněk).

Nakrájené řezy je třeba napnout na kapce vody na podložní sklíčka předem potažená vhodnou lepidlovou substancí, kterou může být např. směs bílek-glycerin, želatina, poly-L-lysin, APES (3-amino-propyl-triethoxysilan). Pro IHC je nutno volit vhodná media pro lepení tak, aby byla dostatečně účinná a trvanlivá (vydržela např. var v mikrovlnné troubě) a nevedla k nespecifické reakci. V našem případě jsme použili sklíčka potažená APES. Jejich přípravu popisujeme na straně 17.

3.4 Optimalizace prezentace antigenů

Čím je struktura tkáně díky fixačním postupům lépe zachovaná, tím bývají původní tkáňové antigeny obtížněji prokazatelné. Nepříznivé vlivy fixace na tkáňové antigenní struktury lze však do jisté míry zmírnit. Tkáňové řezy je proto vhodné před dalšími kroky zpracování ošetřit, a to tak, aby jejich povrchy lépe „nabízely“ antigeny primární protilátce, tzn. aby antigeny nebyly „překryty“ jinými molekulami bránícími specifické reakci. Tento krok lze provést na deparafinovaných a rehydratovaných řezech.

3.4.1 Použití proteáz

Částečná digesce molekul tkáně proteolytickými enzymy může do jisté míry obnovit antigenní vlastnosti biologického materiálu v parafinovém bločku. Nejčastěji používané proteázy v IHC jsou trypsin, pepsin, pronáza a ficin. Proteázy mají na parafinových řezech limitovaný dosah účinnosti a pravděpodobně narušují jen povrchové části proteinů.

Při aplikaci proteolytických enzymů se stává, že tkáňové řezy ztrácejí přilnavost ke sklíčku. Tomu lze zabránit potahováním sklíček speciálními médii (APES, poly-L-lysin, Elmerova želatina, chromželatina).

3.4.2 Použití mikrovlnného záření

Mikrovlny lze v IHC použít:

- k urychlení difuze při zpracování,
- k podpoře průběhu chemickým reakcí při barvení,
- ke stabilizaci proteinů (fixaci teplem),
- pro revitalizaci tkáňových antigenů, tj. příznivému ovlivnění jejich reaktivity a průkaznosti pro další fáze IHC reakcí (v tom případě se lze někdy obejít bez digesce řezů).

Při použití mikrovln vstupuje do procesu revitalizace antigenních struktur tepelný efekt, který urychluje difuzi, podporuje vznik chemické reakce a stabilizuje bílkoviny. Zde je praxí ověřena určitá výjimka z jinak obecného pravidla, že nadměrně vysoká teplota by mohla nepříznivě ovlivnit tkáň z důvodu denaturace bílkovin. Účinnost řady komerčně dostupných protilátek je závislá na použití mikrovln – je třeba se řídit instrukcemi výrobce protilátky. Využití mikrovln však přináší určitý efekt i v případech, kdy výrobce podmiňuje účinek preparátu použitím speciálního detekčního systému, fixačního média či změnou postupu zpracování. Některá pracoviště provádějí vlastní testování konkrétní protilátky na sérii pozitivních a negativních kontrolních vzorků tkáně, kde porovnávají na stejných tkáňových řezech účinek digesce a mikrovln.

Metoda regenerace antigenu (antigen retriever), spočívající v povaření řezu v citrátovém pufru v mikrovlnné troubě, se používá např. pro progesteronový a estrogení receptor, které jsou uloženy v jádře. Metodu lze interpretovat tak, že konformačními změnami při absorpci mikrovln může dojít k ustálení takového uspořádání antigenu, které je pro danou IHC reakci vhodnější.

3.5 Blok endogenní aktivity enzymů

Pro průkaz vazby antigenu a protilátky se běžně používají protilátky značené enzymem, např. peroxidázou či alkalickou fosfatázou. Protože se tyto enzymy vyskytují také přirozeně ve zpracovávané tkáni, mohou do značné míry znehodnotit výsledek vyšetření ve smyslu falešně pozitivní reakce. Z toho vyplývá potřeba blokovat endogenní aktivity enzymů. V případě použití peroxidázy použijeme jako substrát 1-3% roztok H_2O_2 v methanolu nebo destilované vodě po dobu 20-30 minut. Při použití alkalické fosfatázy použijeme v závěrečném médiu lavamizol. Pro blokování endogenního avidinu a biotinu (řada tkání obsahuje endogenní biotin, např. ledviny a játra) lze použít blok s 0,1-0,01% avidinem v PBS (phosphate-buffered saline) 20 minut a následně blok s 0,01-0,001% biotinem v PBS 20 minut.

3.6 Blok pozadí

I nespecifická (a tudíž v IHC nežádoucí) reakce pozadí může způsobit pozitivitu. Mezi příčiny falešně pozitivní nespecifické reakce patří:

- aktivita endogenních tkáňových enzymů (odstraňuje se vysycením těchto enzymů jejich substrátem),

- endogenní avidin-biotinová aktivita (potlačitelná inkubací s 0,1-0,01% avidinem a 0,001% biotinem); endogenní biotin je přítomen v játrech, tukové tkáni a mléčné žláze,
- kontaminace řezů nebo reagensů cizorodými látkami,
- křížové reakce (zkřížená reaktivita) protilátky s podobnými epitopy na různých antigenech,
- nespecifická vazba primární protilátky na kolagen, laminin, elastin, proteoglykany, keratin, tukovou tkáň a jiné pojivové struktury v důsledku nekovalentních hydrofobních interakcí (tkáňové proteiny jsou hydrofobnější po působení fixativ obsahujících aldehyd),
- nespecifické vazby v důsledku elektrostatických interakcí (jejich vliv lze částečně eliminovat užitím pufrů s vyšší iontovou silou),
- poškození řezu (např. vyschnutím) vedoucí k neadekvátní reaktivitě pozadí (řez nesmí během zpracování vyschnout),
- difuze tkáňových antigenních struktur do okolní tkáně,
- nespecifická reakce sekundárních, resp. terciárních protilátek s Fc receptory imunoglobulinů přítomných ve tkáni (v cytoplazmatických membránách, často na makrofázích a granulocytech),
- pohlčení antigenu fagocyty,
- nekróza tkáně spojená s vyjitím cytoplazmatického obsahu. do intercelulárních prostor

Nespecifickému vychytávání specifické protilátky (zejména primární, ale i sekundární nebo terciární) lze částečně předejít vysycením tkáně bílkoviny (nespecifickým sérem nebo např. mlékem). Tkáň se tak saturuje „neškodnými“ proteiny a nespecifické přibarvení pozadí je potom menší.

3.7 Vazba protilátek a detekčního systému

Následuje vlastní reakce tkáňového antigenu s primární protilátkou. Podle konkrétní použité metodiky je následována i specifickou reakcí sekundární a terciární protilátky. Výsledkem je přítomnost chromogenu v místě, kde došlo ke specifické vazbě.

Reakce mezi antigenem a protilátkou probíhá nejlépe při neutrálním pH. Na příbalovém letáku protilátky je uvedeno, zda ji lze použít na fixovanou či jen na zmrazenou tkáň, jaké je doporučené ředění, popř. další důležité informace. Při inkubaci protilátky s tkání v chladu a přes noc lze užít větší naředění (tj. nižší koncentraci) ve srovnání s inkubací v termostatu při 37 °C. Probíhá-li reakce antigenu s primární protilátkou blíže chemické rovnováze, tj. bez nadměrného nadbytku reagensů a při nižších teplotách, lze v případě použití polyklonálních protilátek doufat, že se uplatní především nejspecifičtější klony zastoupené ve směsi protilátek.

3.8 Chromogeny

Samotná vazba antigenu s protilátkou ve tkáních probíhá bez viditelné reakce. Abychom mohli preparát pozorovat běžnými metodami světelné mikroskopie, je nutno k vizualizaci

lokalizace antigenu a na něj navázaných molekul v preparátu použit dalších látek, tzv. chromogenů.

Podle způsobu vizualizace, tj. podle typu použitého chromogenu, rozlišujeme v optické mikroskopii tyto nejpoužívanější metody:

imunofluorescenční – jsou přímé i nepřímé; z fluorochromů se nejčastěji užívají FITC (fluorescein-isothiokyanát), TRITC (tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát), DANSYL (1-dimethyl-aminonaftalen-5-sulfonylchlorid), deriváty rhodaminu B, texaská červeně,

imunoenzymové – protilátky jsou značeny konjugací s enzymy; nejužívanějšími enzymovými markery jsou křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza, acetylcholinesteráza; často užívaný je PAP komplex sestávající z neznačené primární protilátky a komplexu peroxidáza-antiperoxidáza.

3.8.1 Průkaz u značení pomocí enzymů

Jako markerů se často používá velmi stabilních enzymů s relativně nenáročnými podmínkami pro úspěšný průkaz. Vizualizace je prováděna metodou katalytické histochemie. Často využívanou metodou značení jsou imunoperoxidázové techniky. Jejichž principem je označení místa, kde došlo ke specifické reakci s prokazovaným tkáňovým antigenem, peroxidázou, jejíž přítomnost se v další fázi zviditelní vhodnou reakcí, kdy produktem činnosti peroxidázy je nějaký nerozpustný pigment. Používá se zejména křenové peroxidázy (horseradish peroxidase). Je-li součástí histochemického procesu enzymatická reakce, je samozřejmě nutné zachovat pro ni vhodné podmínky, jako jsou optimální pH, teplota, iontová síla roztoku, poměr mezi enzymem a substrátem a nepřítomnost inhibitorů.

Je-li detekční komplex značený peroxidázou (např. u metody SABC, ABC, PAP), používáme jako chromogen 3,3'-diaminobenzidin (DAB). Křenová peroxidáza (HRP, horseradish peroxidase) reaguje se svým substrátem, kterým je peroxid vodíku. Oxidací původně rozpustného DAB, který se této reakce účastní jako donor elektronů, vzniká stabilní hnědý produkt, který je nerozpustný v alkoholu a proto se během dehydratace před montováním řezů nevyplaví. Je třeba vyvarovat se použití roztoků s azidem sodným (NaN_3), který je konzervačním činidlem v některých protilátkách a pufrech, neboť je současně inhibitorem peroxidázy.

Vedle DAB lze použít i jiné chromogeny, např. 3-amino-9-ethylkarbazol (AEC) karmínově červené barvy. V případě systému značeného alkalickou fosfatázou používáme jako substrát naftol-AS-MX fosfát nebo Fast Blue BB či Fast red. Výsledkem pak je červené, resp. modré zbarvení reakce. Nevýhodou AEC je však rozpustnost reakčního produktu v alkoholu, díky čemuž je nutné montovat řezy do hydrofilního média.

Pozn.: Obsahuje-li studovaná tkáň v případě aplikace imunoperoxidázových technik významnější množství vlastní (tzv. endogenní) peroxidázy, je třeba tuto nejprve inaktivovat, jinak by její případná reaktivita s chromogenem znehodnotila značení míst ve tkáni, na nichž došlo ke specifické průkazní reakci.

3.8.2 Průkaz u značení pomocí fluorochromu

Fluorochromy jsou barviva vykazující fluorescenci. Při použití této metody musíme mít k dispozici fluorescenční mikroskop. Při fluorescenci je světlo kratší vlnové délky (modré, fialové či UV) absorbováno a emitováno jako světlo o delší vlnové délce. V excitovaném stavu molekula fluorochromu podléhá nevratným konformačním změnám, kvůli nimž se tento děj nemůže u stejné molekuly opakovat. Proto během excitace fluorochromu UV světlem intenzita emitovaného světla postupně slábne (tzv. vysvícení). Fluorescenční mikroskop má jako světelný zdroj nejčastěji rtuťovou či xenonovou výbojku (u konfokálních mikroskopů jím bývá i zdroj laserového paprsku), mezi zdroj a vzorek a před okulár jsou vřazeny filtry k selekci vhodné budící vlnové délky, resp. k odlišení excitovaného světla od budícího záření (aby škodlivé UV nesměřovalo do okuláru).

Častými chromogeny používanými při imunofluorescenčních technikách jsou:

- fluoresceinisothiokyanát (FITC, zelená barva),
- tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát (TRITC, červená barva),
- texaská červeň (červená barva).

Imunofluorescenční metodiky se užívají zejména na kryostatových preparátech, jako uzavíracího média se používá filtrovaný glycerín v PBS. Média pro montování nesmí vykazovat vlastní fluorescenci. Na jednom histologickém řezu lze prokazovat i více antigenů současně za použití různých chromogenů.

3.9 Barvení pozadí

Ani při používání imunohistochemických technik se kvůli předběžné orientaci v preparátu často nevyhneme potřebě paralelního využití přehledných typů histologických barvení, resp. alespoň dobarvení jader v IHC preparátu, a to zejména pro lokalizaci pozitivní reakce vůči okolním známým strukturám preparátu.

3.10 Další metodické poznámky

3.10.1 Artefakty

Při mikroskopování je nutné vědět o možné přítomnosti artefaktů, abychom je mylně nezahrnuli do hodnocení preparátu. Kromě problematiky nespecifických reakcí, probíraných v dalším bodě, jde nejčastěji o:

- sraženiny fixačního činidla,
- zuby po mikrotomovém noži,
- zřasení a sklady (nedostatečné natažení tkáně),
- lomy v tkáni,
- bílá místa a štěrby z nerovnoměrné kontrakce (smrštění) tkáně vlivem různých roztoků (zejména fixačních) a teplotních změn,
- bubliny vzduchu,
- špína, prach,
- sraženiny barviva.

3.10.2 Zásady práce a její kontrola

Konečný výsledek IHC vyšetření je ovlivněn mnoha faktory, které mohou vést až k falešné pozitivitě či negativitě vyšetření. Jako u každé výzkumné metody se i u imunohistochemie snažíme o co nejvyšší:

- reprodukovatelnost naší práce,
- senzitivitu,
- specificitu.

Tyto zásady jsou nezbytné pro **validitu** metody. Pro ověření validity IHC průkazů, tj. „zda naše metody skutečně dávají takové výsledky, jaké očekáváme a jejich výsledek odpovídá cíli, který jsme si naplánovali“, je nutno zařazovat do zpracování paralelně se zkoumanými vzorky i tzv. pozitivní a negativní kontroly.

Správnou **negativní kontrolou** u IHC reakce může být preparát, který:

- vůbec neobsahuje prokazovanou látku (antigen) a IHC reakce je proto u něj negativní
- obsahuje sice prokazovaný antigen, ale během IHC procedury jsme u něj vynechali reakci s primární protilátkou (v případě, že by preparát byl přesto pozitivní, odhalili jsme tak nespecifickou reakci detekčního systému).

Pokud bychom byli zcela důslední, měli bychom mimo uvedené kontroly testovat i účinnost blokování endogenní peroxidázy (u DAB) a nespecifickou zkříženou reaktivitu detekčního systému (tj. bez primární a sekundární protilátky).

Jako **pozitivní kontrolu** zpravidla používáme preparát, o němž s jistotou *a priori* víme, že prokazovaný antigen musí obsahovat, a proto je v jeho případě IHC reakce pozitivní. Pro posouzení validity IHC reakce je nezbytné zejména studium vlivu fixace a dalších procedur na tkáň.

3.10.3 Kvantifikace nálezu

Imunohistochemická reakce nám do určité míry umožňuje provést i kvantitativní odečet výsledku, tj. posoudit míru přítomnosti prokazovaného antigenu v tkáni. Tato kvantifikace by však měla být nejen přesná, což s využitím digitálního zpracování obrazu a softwaru pro obrazovou analýzu nebývá již dnes větší problém, ale také správná, tj. metodicky validní, bez systematických chyb, srovnatelná se standardy a vhodně interpretovaná, což bývá nejobtížnější část takového vyhodnocení. Při zachování zmíněných zásad je nutné v řadě případů (s výjimkou těch nejpropracovanějších) slevit z požadavků kvantitativního hodnocení na semikvantitativní.

4 Příbuzné metody

Na tomto místě připomínáme existenci některých metod, s nimiž se lze v oboru specifických průkazů tkáňových a buněčných struktur také setkat. Většina z nich souvisí s imunohistochemií historicky, využitím stejných či obdobných principů, laboratorním zpracováním, nebo jde o metody používané k obdobným účelům jako IHC a patří do rodiny metod tzv. afinitní histochemie.

4.1 Enzymová histochemie

Usuzuje na přítomnost a lokalizaci enzymu z výsledku jeho činnosti (jedná se tedy o nepřímý průkaz), která může být zviditelněna různými srážecími reakcemi (precipitace s kationty kovů, azokopulační reakce za vzniku azobarviv, indigogenní reakce, tvorba formazanů), syntetickými reakcemi (produktem je málo rozpustný produkt o vyšší molekulové hmotnosti) či metodou substrátových filmů.

4.2 Lektinová histochemie

Lektiny (fytohemaglutininy) jsou proteiny a glykoproteiny neimunní povahy⁴ získávané z rostlin, živočichů či mikroorganismů. Lektiny jsou schopny selektivně rozpoznávat a obsazovat terminální mono- a oligosacharidové řetězce glykoproteinů, glykopeptidů a glykolipidů, a to s vysokou vazebnou specifitou obdobnou reakci antigen-protilátka, čehož se využívá k vizualizaci přítomnosti těchto látek (lektin je označen fluorochromem, enzymaticky či jiným markerem), resp. k aglutinaci buněk přemostěním oligosacharidů integrálních glykoproteinů jejich buněčné membrány. Využití lektinové histochemie je tak obdobné imunohistochemii. Průkaz některých konkrétních oligosacharidových sekvencí na buněčném povrchu může mít značný diagnostický význam (např. pro posouzení fáze vývoje a diferenciaci buňky, přítomnost aglutinogenů atd).

4.3 In situ hybridizace (ISH)

Jedná se o detekci specifické sekvence nukleotidů DNA či mRNA pomocí komplementární oligonukleotidové či polynukleotidové označené sondy (tzv. próby). Lze ji užít na parafinových řezech, řezech z kryostatu nebo buněčných nátěrech.

4.4 FISH

Fluorescenční ISH – je to hybridizace fluorochromem značené DNA sondy s jadernými chromozómy či s jádry obarvenými jiným fluorochromem viditelným v jiné části spektra. Molekulární sonda se hybridizuje k DNA značené ještě jiným (counterstaining) markerem. Aby byla sonda fluorescenčně detekovatelná, může být sama značená přímo, nebo je značená nepřímo přes sekundární protilátku.

⁴nejde tedy o protilátky

5 Postup při výrobě imunohistochemických preparátů

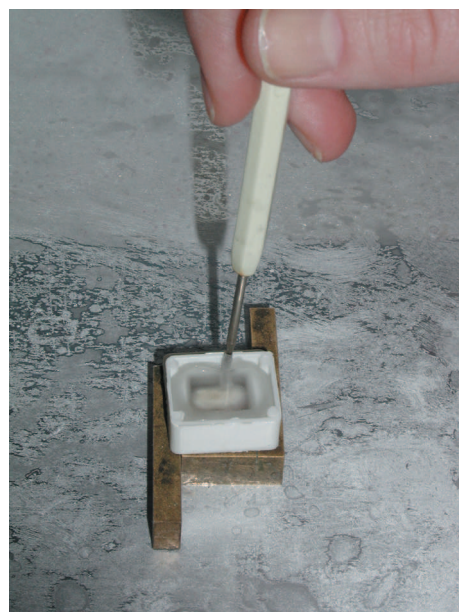
Uvedený postup zhotovování imunohistochemických preparátů popisuje pouze konkrétní námi použitou metodiku při použití těchto reagensí:

- primární protilátka: Monoclonal mouse Anti-human T cell, CD45R0, clone UCHL1 (výrobce DAKO Corporation, USA),
- detekční systém: Novostain *Super ABC Kit* (universal) (výrobce Novocastra Laboratories Ltd., Velká Británie).

Popis slouží jako příklad pro demonstraci nejdůležitějších fází výroby preparátů studentům. Zakládá se sice na reálné laboratorní praxi, avšak nemůže být univerzální a při použití odlišných chemikálií nebo při rozdílných laboratorních zvyklostech jiného pracoviště je zapotřebí jej odpovídajícím způsobem přizpůsobit.

5.1 Zalití tkáně

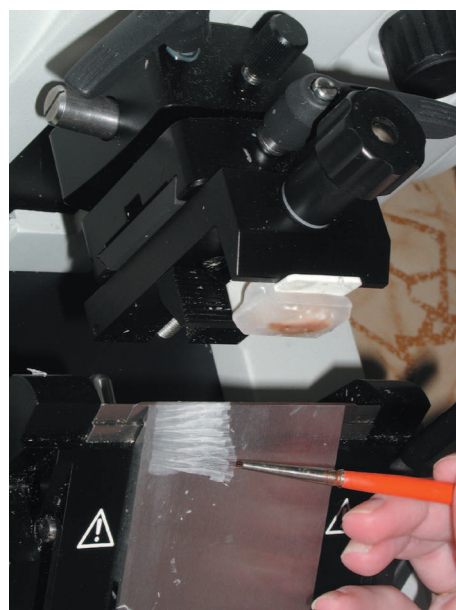
Nejprve je nutno tkáň prosytit zalévacím médiem, poté se nechá ztuhnout ve formě vhodné pro upnutí do mikrotomu. Většina zalévacích médií však není mísitelná s vodou, proto je třeba tkáň odvodnit stoupající řadou alkoholů, prosytit rozpouštědlem zalévacího média, které tkáň projasní (methylnsalicylát, methylbenzoát), a prosytit parafinem⁵. Pak následuje vlastní zalití tkáně do rozehrátého parafinu (cca 56 °C) v zalévací komůrce, jehož smyslem je zpevnění tkáně, aby ji bylo možno krájet na tenké řezy. Rychlé ochlazení na chlazené plotně zabrání velké objemové retrakci parafinu. Pokud jsou v chladnoucím paraplastu bubliny, je nutno je jehlou odstranit. Pro histochemii volíme co nejkratší dobu zalévání a co nejnižší teploty.



⁵V praxi se používá většinou směs parafinu a plastických polymerů, známá pod jménem paraplast.

5.2 Krájení řezů

Bloček je upnut do rotačního mikrotomu a krájen na histologické řezy o síle 5–10 μm , které se při vhodné teplotě parafinu a pracovní místnosti slepují do pásky.



5.3 Napínání řezů

Řezy jsou přeneseny (štětečkem, jehlou) na teplou vodní hladinu, kde se rozpnou. Pak se přenesou na podložní sklíčko předem potažené APES⁶ a nechají se dále rozpínat na temperované podložce. Poté sklíčka s napnutými řezy zasychají v termostatu (nejlépe přes noc).

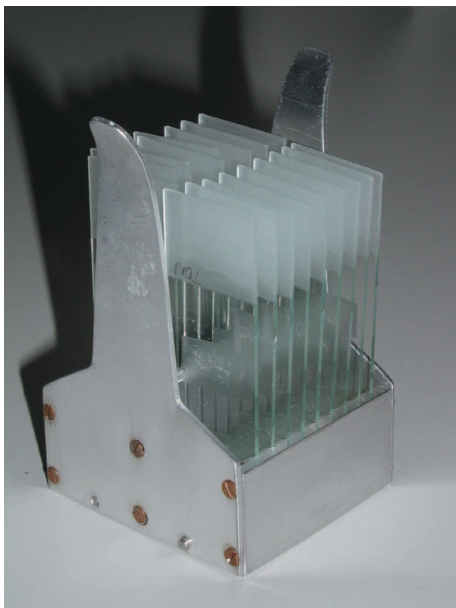


Příprava skel potažených APES (3-aminopropylethoxysilan): Připravíme 2% roztok APES v acetonu (např. 1 ml APES + 49 ml acetonu) a ponoříme sklíčka do tohoto roztoku na 20 s, pak je rychle opláchneme v koncentrovaném acetonu (max. 10 s) a v destilované vodě (max. 10 s). Pak znovu zopakujeme opláchnutí v acetonu i ve vodě a necháme oschnout při pokojové teplotě. Nakrájené řezy natáhneme na APES sklíčka a před zahájením vlastního barvení je necháme schnout buďto přes noc v termostatu (37 °C) nebo při pokojové teplotě 48 hodin.

⁶Alternativou k APES je v imunohistochemii potahování skel poly-L-lysinem. Pro běžné histologické řezy postačí potažení skel směsí glycerinu s bílkem, resp. kamencovou želatinou.

5.4 Rozpuštění paraplastu

4. Hotové řezy se srovnají do košíčku. Nejprve je třeba řezy „odparafinovat“, tj. odstranit zalévací médium (parafin) jeho rozpuštěním v xylolu (směs izomerů xylenu).



5.5 Zavodnění tkáně a obnovení přístupnosti antigenů částečnou proteolýzou

Protážením preparátů sestupnou alkoholovou řadou, tj. roztoky ethanolu o postupně klesající koncentraci (96 %, 80 % a 70 %) zajistíme plynulou hydrataci tkáně a převedení z hydrofobní fáze do hydrofilní. Toho je zapotřebí, jelikož další manipulace s preparáty se bude provádět právě ve fázi hydrofilní (vodné roztoky). Dalším krokem je enzymatické trávení tkáně po dobu 30 min (resp. podle instrukcí výrobce primární protilátky) přehřátým 2% roztokem pepsinu při 37 °C, jehož smyslem je zajištění lepší přístupnosti tkáňových antigenních determinant pro následující reakce.



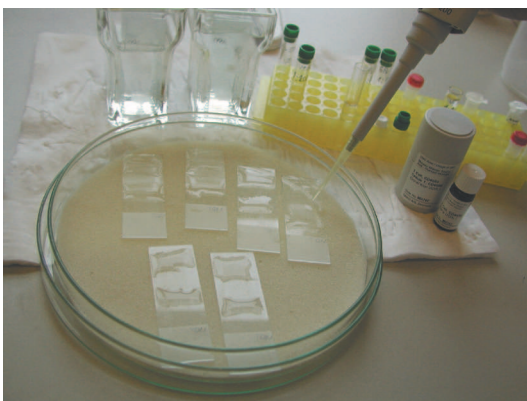
5.6 Blokáda endogenní peroxidázy a nespecifické vysycení tkáně bílkoviny

Po oplachu preparátů v destilované vodě (3krát po 5 minutách) následuje blokáda endogenní peroxidázy ponořením na 20 minut do kyvety s roztokem 1,8 ml peroxidu vodíku ve 100 ml methanolu (roztok je připraven těsně před použitím). Po opětovném oplachu v destilované vodě (3krát po 5 minutách) inkubujeme preparáty s neimunním sérem 30 minut při pokojové teplotě (nebo přes víkend do lednice). Místo neimunního séra lze použít 5% roztok odtučněného sušeného mléka v PBS po dobu 30 minut. Vysycením tkáně bílkoviny lze předejít nespecifickému vychytávání specifické protilátky (zejména primární, ale i v dalších krocích). Nespecifické přibarvení pozadí je potom menší.



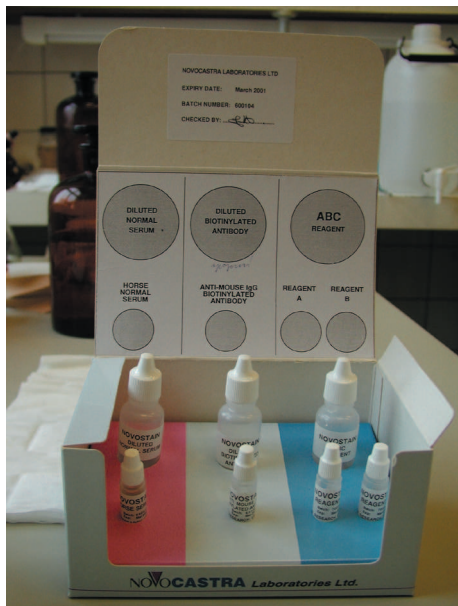
5.7 Reakce s primární a sekundární protilátkou

Po krátkém oplachu destilovanou vodou následuje inkubace preparátu s primární protilátkou. Primární protilátku nejprve naředíme na odpovídající koncentraci doporučenou výrobcem; pro ředění primární protilátky použijeme PBS konzervovaný azidem sodným (NaN_3). Napipetujeme na preparát 100–150 μl naředěné primární protilátky a necháme probíhat reakci přes noc v lednici (může stačit i několik desítek minut při 37 °C - postupujeme individuálně dle instrukcí výrobce). Po oplachu PBS pufrem (3krát po 5 minutách) přichází reakce se spojovací (sekundární) biotinylovanou protilátkou (4 ml PBS smíchané s 1 kapkou séra z detekční soupravy a s 5 μl biotinylované protilátky). Oplachujeme PBS pufrem 3krát po 5 minutách a necháme inkubovat tkáň se spojovací (sekundární) biotinylovanou protilátkou po 45 min při 37 °C.



5.8 Reakce s ABC komplexem a vizualizace chromogenu

Po dalším oplachu v PBS (3krát po 5 minutách) aplikujeme na tkáň ABC komplex z detekční soupravy a necháme probíhat reakci opět po 45 minut při 37 °C. ABC komplex jsme předem připravili ze 4 ml PBS, 10 μ l roztoku A a 10 μ l roztoku B z detekční soupravy a směs jsme nechali 30 minut před použitím stát.

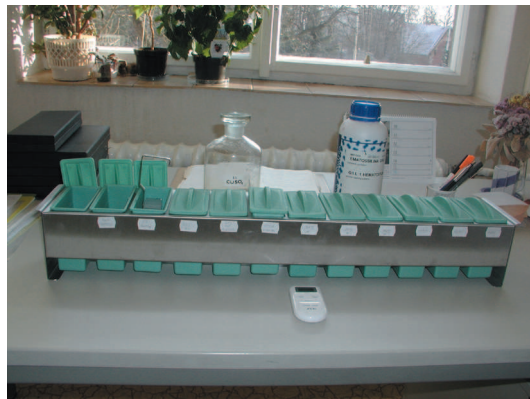


Následuje další oplach v PBS. Rozpustíme 10 mg 3,3'-diaminobenzidinu v několika kapkách N,N-dimethylformamidu a 30 ml PBS, těsně před použitím přidáme 15 μ l peroxidu vodíku a zfiltrujeme. Filtrát pak nakapeme na tkáňové řezy a ponecháme jej působit 10 minut. Výsledkem je hnědý stabilní produkt vizualizující místa, v nichž proběhla specifická IHC reakce.



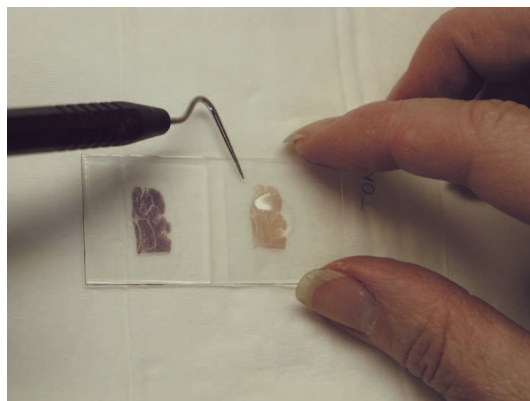
5.9 Nespecifické dobarvení tkáňového pozadí

Přemístíme sklíčka do kyvet a dvakrát v nich vyměníme čistou destilovanou vodou. Provedeme kontrastování v 5% roztoku CuSO_4 po dobu 10 minut. Poté opět naplníme kyvety čistou destilovanou vodou. Dobarvujeme buněčná jádra Gillovým hematoxylinem po dobu 30 sekund.



5.10 Odvodnění a montování preparátů

Po vyprání nadbytečného barviva v destilované vodě odvodníme řezy vzestupnou alkoholovou řadou (70 – 80 – 96 %) a přes aceton, roztok xylenu v acetonu a následný roztok acetonu v xylenu převedeme preparáty do xylolu. Montujeme (uzavíráme) řezy do solakrylu, syntetických pryskyřic či kanadského balzámu a pokryjeme krycím sklíčkem. Preparát se nechá zaschnout v termostatu.



6 Mikrofotografie preparátů

6.1 Poděkování:

- panu doc. RNDr. Josefu Reischigovi, CSc., vedoucímu Ústavu biologie LF UK v Plzni, za možnost přístupu k mikroskopu Olympus AX70 Provis s vybavením pro mikrofotografii,
- paní Jaroslavě Beránkové, laborantce Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni, za zvládnutí přípravy imunohistochemických preparátů,
- slečně Janě Sazimové, laborantce Ústavu histologie a embryologie LF UK v Plzni, za spolupráci při výrobě preparátů.

6.2 Použité primární protilátky

6.2.1 Anti-CD45R0

- Celým názvem: Monoclonal Mouse Anti-Human T Cell, CD45R0, Clone UCHL1 (výrobce DAKO Corporation, USA).
- Imunogen: IL-2 dependentní linie B lymfocytů, CA1.
- Popis reaktivity: CD45 je označení pro rodinu povrchových glykoproteinů, které hrají významnou roli v aktivaci T lymfocytů. U člověka zahrnuje tato rodina minimálně 5 izoforem o velikosti 180–220 kDa, které vznikají alternativním splicingem tří exonů. Zde použité protilátky anti-CD45R0 rozpoznávají nízkomolekulární isoformu CD45R0, která je exprimována na většině thymocytů a aktivovaných T lymfocytů, avšak pouze na části subpopulace klidových T lymfocytů. Rovněž část buněk myelomonocytární řady (granulocyty a monocyty) dává pozitivní reakci, zatímco většina normálních B lymfocytů a NK buněk jsou negativní. Anti-CD45R0 UCHL1 se váže na cca 50 % humánních CD4+ a 35 % CD8+ T lymfocytů v periferní krvi.
- Použitá tkáň:
 - tonsilla palatina člověka
 - epiglottis člověka
 - thymus člověka
 - stěna ezofagu člověka

6.2.2 Anti-Alpha-Smooth Muscle Actin

- Celým názvem: Monoclonal Mouse Anti-Alpha-Smooth muscle Actin, 1A4 (výrobce DAKO Corporation, USA).
- Imunogen: NH₂-terminální syntetický dekaeptid alfa-aktinu hladkého svalu.
- Popis reaktivity: Aktin o relativní molekulové hmotnost 42 kDa patří k dominantním kontraktiním proteinům řady buněčných typů a je popsáno alespoň šest jeho odlišných izotypů. Tvoří difuzně uspořádaná cytoplazmatická mikrofilamenta o síle

6 nm. Tato protilátka reaguje s α -aktinem hladkého svalu, který se nachází v cévní stěně, viscerální svalovině včetně trávicího a urogenitálního traktu, myometria, v pericytech a myoepiteliálních buňkách slinných žláz a mléčné žlázy. V diagnostice neoplazií tedy napomáhá pozitivita tkáně v případě karcinomu pocházejícího ze slinných žláz, z prsní žlázy, v případě leiomyomu a leiomyosarkomu. Protilátka nereaguje s aktinem přítomným ve fibroblastech (β - a γ -cytoplazmatický aktin), v kosterní svalovině (α -sarkomerický aktin) a v kardiomyocytech (α -myokardiální aktin).

- Použitá tkáň:
 - aterosklerotické aneurysma aortae abdominalis člověka
 - pars membranacea urethrae prasete domácího

6.2.3 Anti-Insulin

- Celým názvem: Polyclonal Guinea Pig Anti-Insulin (výrobce DAKO Corporation, USA).
- Imunogen: Prasečí pankreatický inzulin.
- Popis reaktivity: Inzulin je jedním z tř. sedmi známých polypeptidů produkovaných pankreatem. Je secernován B-buňkami Langerhansových ostrůvků a reguluje uti-
zaci glukózy, proteinů a tvorbu a depozici neutrálních lipidů. Tato protilátka má
zkříženou reaktivitu pro několik typů savčích inzulinů a značí cytoplazmu inzulin-
produkujících B-buněk, které u člověka a řady laboratorních savců tvoří převážnou
většinu populace pankreatických ostrůvků.
- Použitá tkáň: pankreas myši a morčete

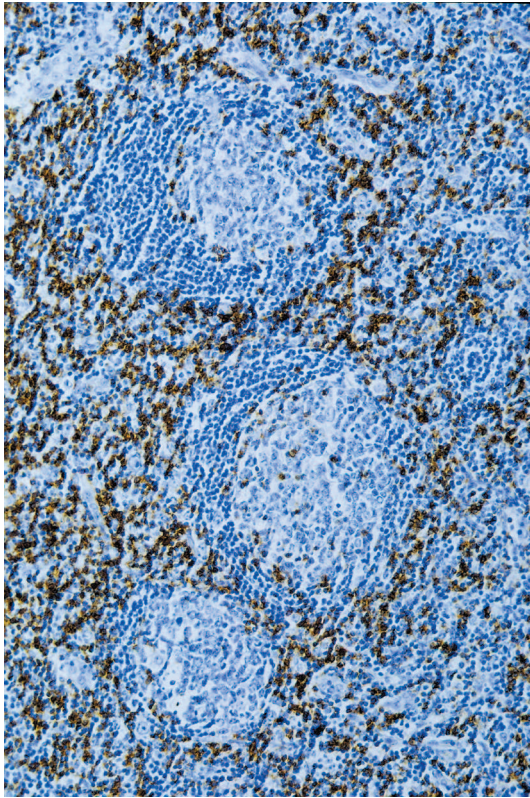
6.3 Použitý detekční systém

Novostain *Super ABC Kit* (universal) (výrobce Novocastra Laboratories Ltd., Velká Bri-
tánie). Souprava zahrnuje:

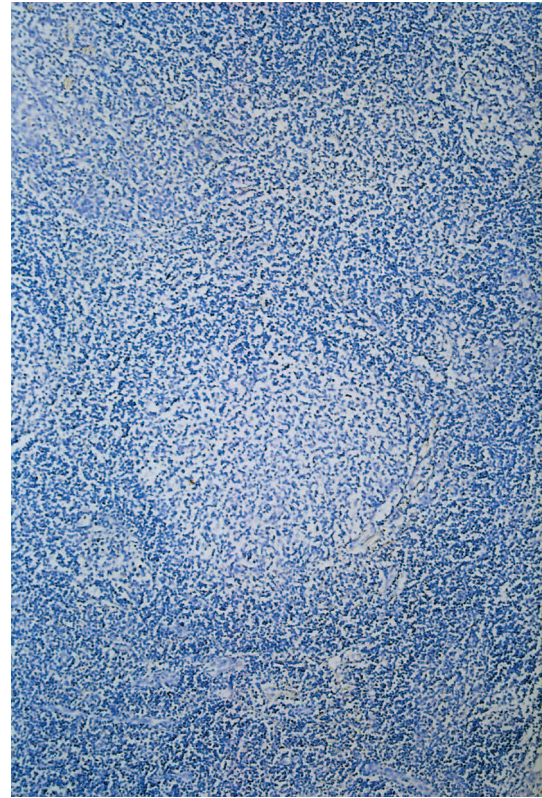
- normální sérum
- biotinylovaný anti-imunoglobulin
- roztok A (avidin)
- roztok B (biotinylovaný enzym).

6.4 Popisky mikrofotografií

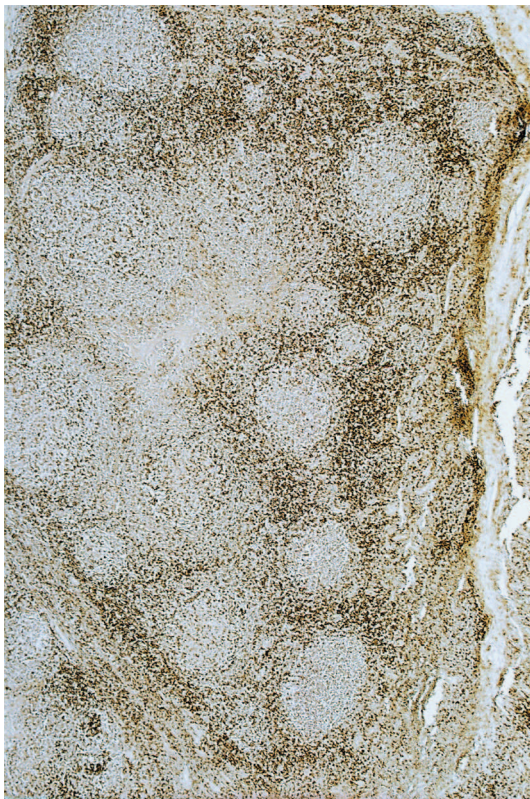
Udávané zvětšení značí přesný poměr, kolikrát je zobrazení v tiskové velikosti (snímky
7,5 cm x 11,25 cm) větší nežli reálné struktury tkání. Mezi snímky pankreatu jsou pro
srovnání vedle vlastních preparátů imunohistochemických zařazeny i negativní kontroly a
preparáty obarvené běžnými přehlednými metodami.



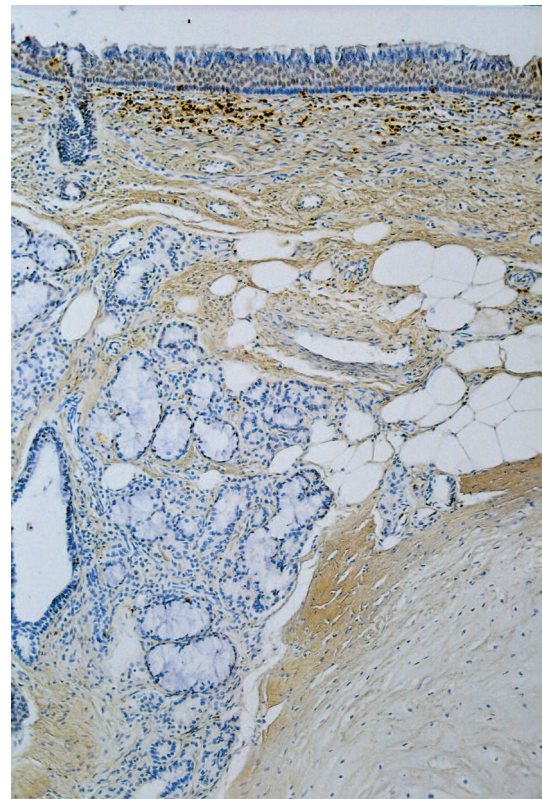
Obr. 1: tonsilla palatina, člověk, Anti-CD45R0, Gill, 146×



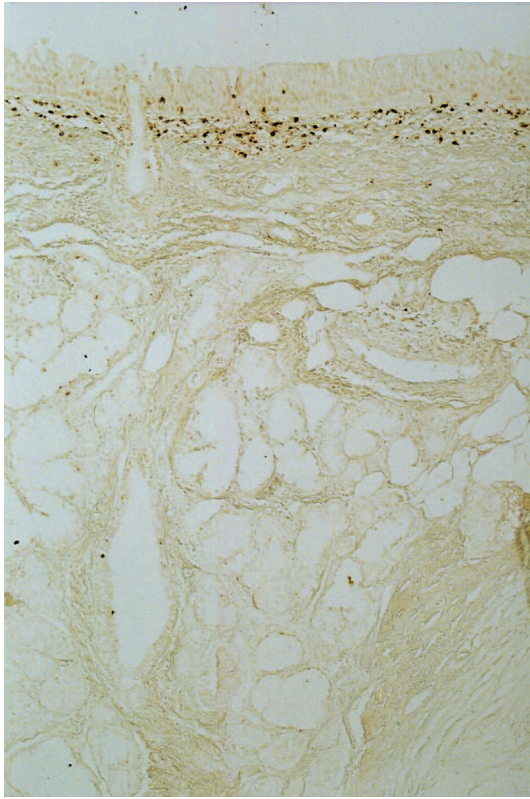
Obr. 2: tonsilla palatina, člověk, negativní kontrola, Gill, 73×



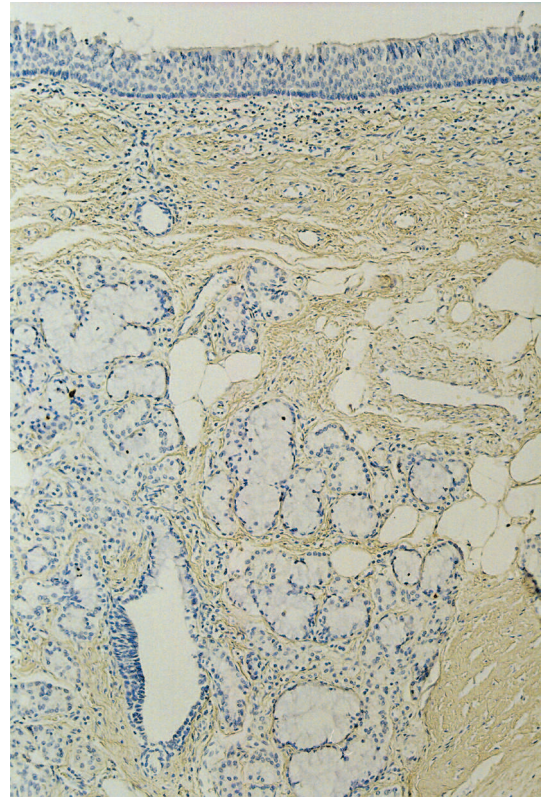
Obr. 3: tonsilla palatina, člověk, Anti-CD45R0, 29×



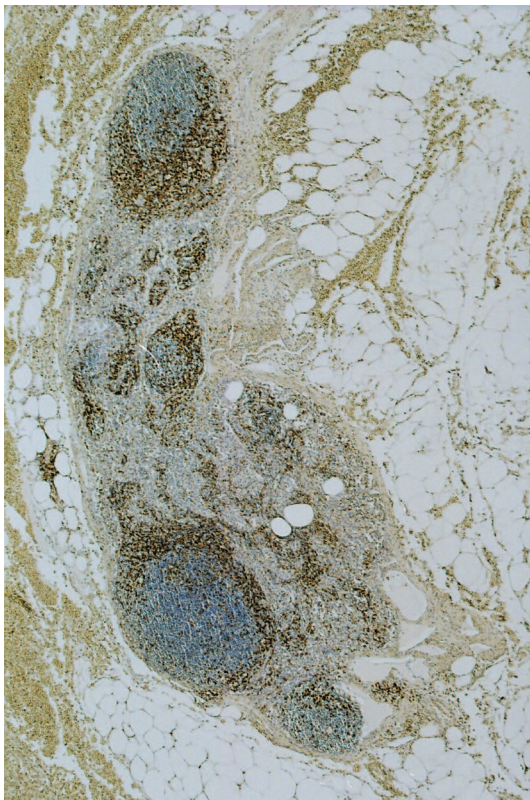
Obr. 4: lymfoidní infiltrace v mukóze epiglottis, člověk, Anti-CD45R0, Gill, 83×



Obr. 5: lymfoidní infiltrace v mukóze epiglottis, člověk, Anti-CD45R0, 83×



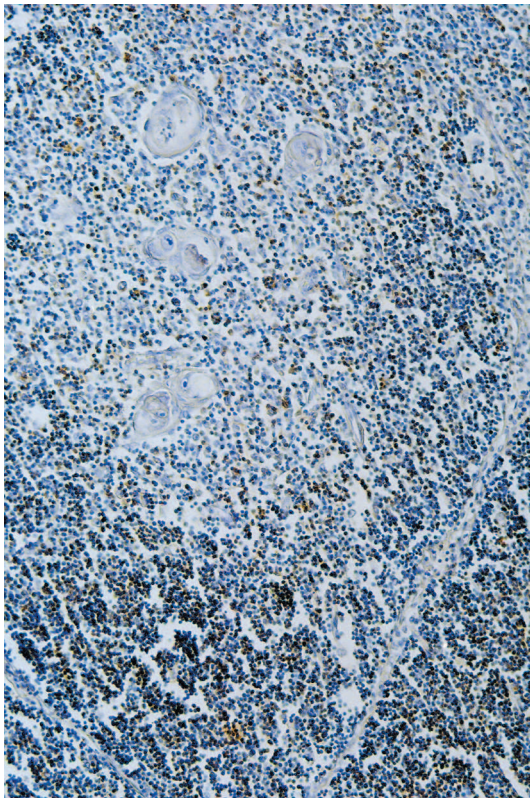
Obr. 6: epiglottis, člověk, negativní kontrola, Gill, 83×



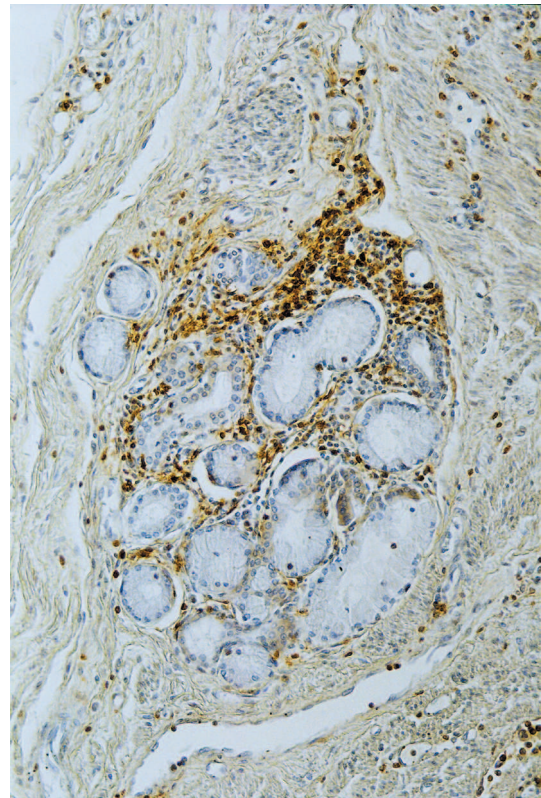
Obr. 7: lymfatické folikuly v adventicii u aneuryzmatické abdominální aorty (AAA), člověk, Anti-CD45R0, Gill, 35×



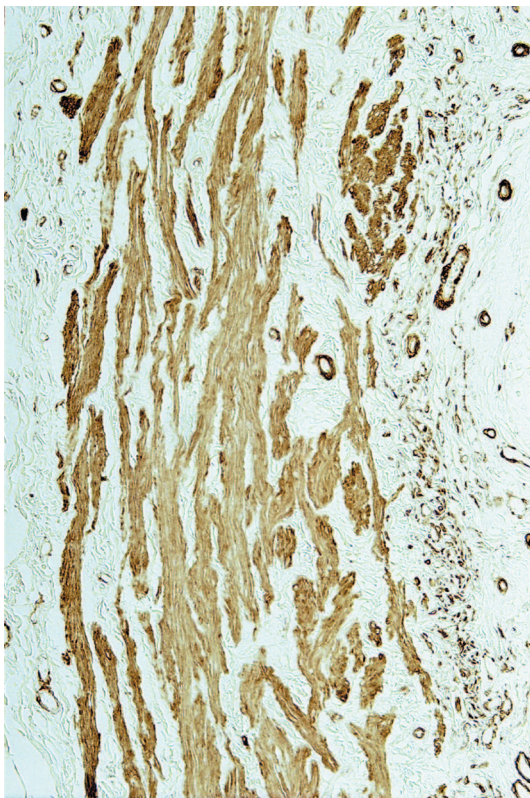
Obr. 8: AAA, detail zánětlivé infiltrace tunica media AAA, člověk, Anti-CD45R0, Gill, 73×



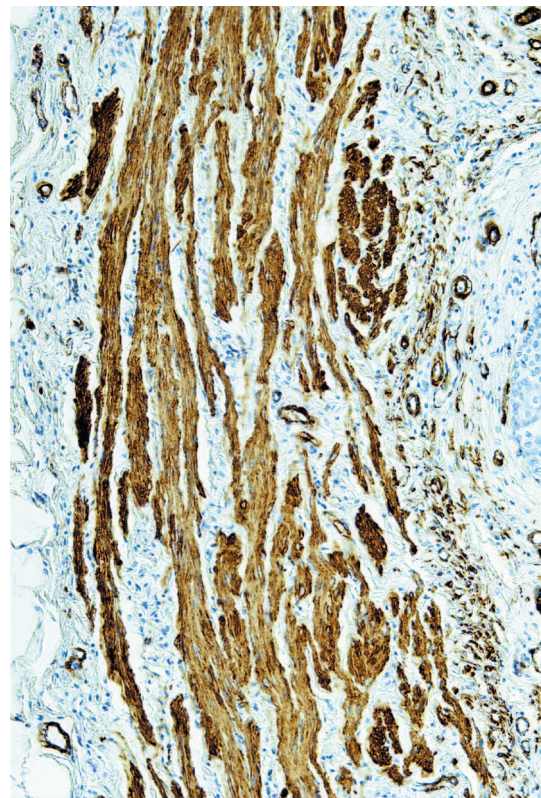
Obr. 9: kůra a dřeň thymu, člověk, Anti-CD45R0, Gill, 146×



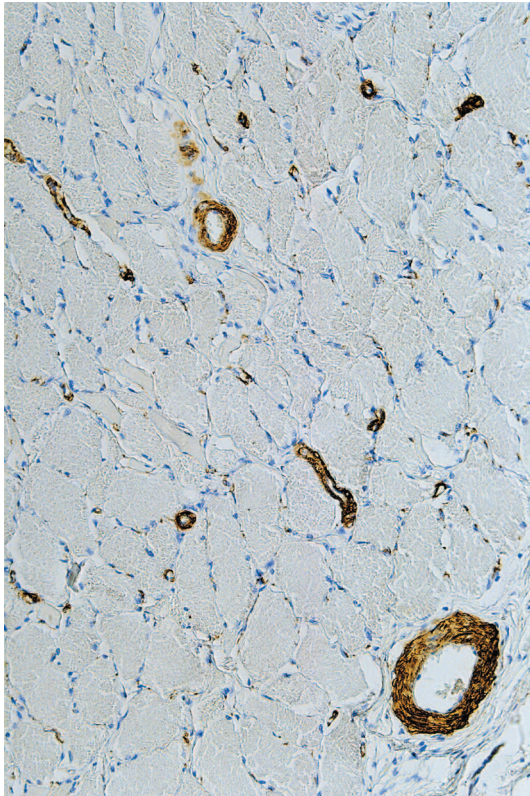
Obr. 10: pozitivní buňky (lymfoidní infiltrace) v mucinózních žlázkách submukózy jícnu, Anti-CD45R0, člověk, Gill, 137×



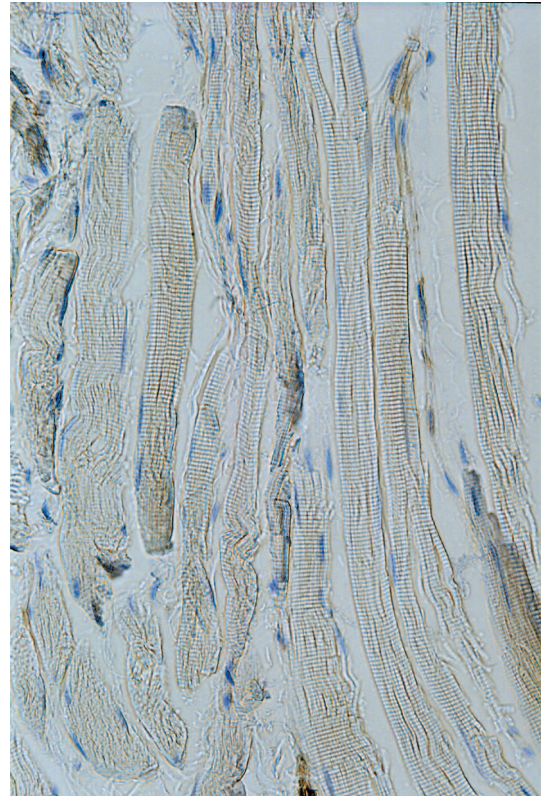
Obr. 11: hladká svalovina membranózní uretry, prase (samice), Anti- α -SM-Actin, 118×



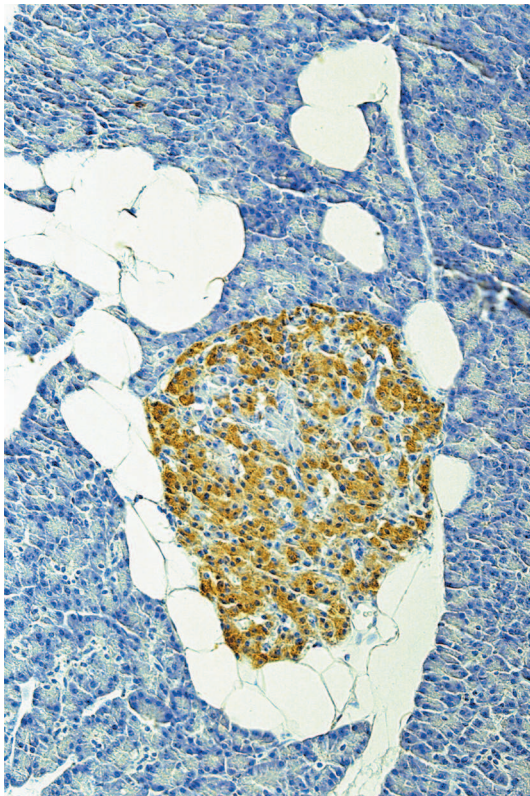
Obr. 12: hladká svalovina membranózní uretry, prase (samice), Anti- α -SM-Actin, Gill, 118×



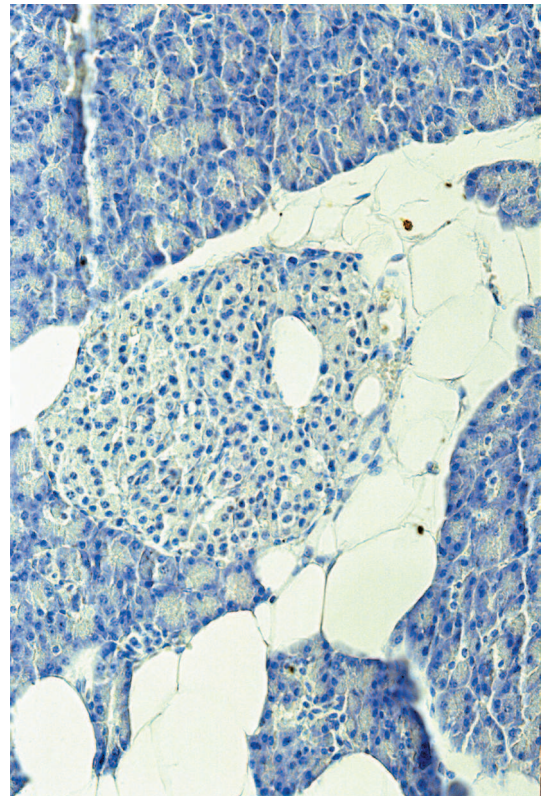
Obr. 13: negativita kosterního svalu (příčný průřez) a pozitivita hladké svaloviny cév, prase, Anti- α -SM-Actin, Gill, 146 \times



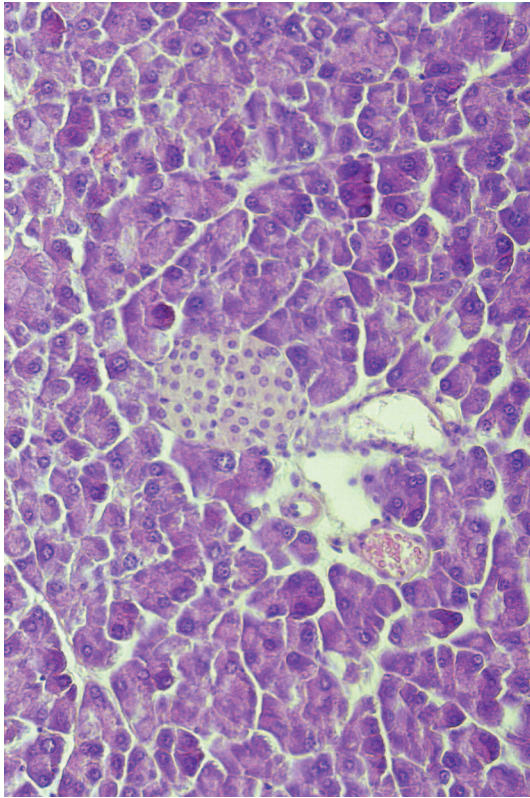
Obr. 14: negativita kosterního svalu (podélný průřez), prase, Anti- α -SM-Actin, Gill, 268 \times



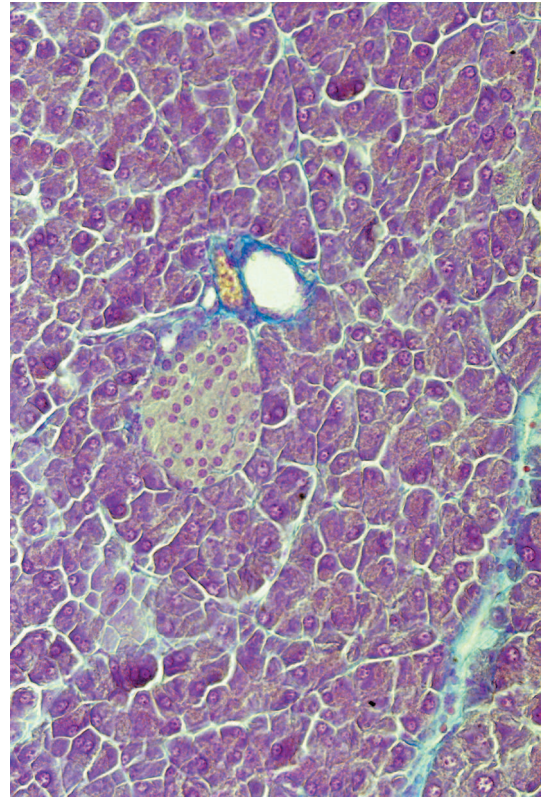
Obr. 15: pankreas, morče, Anti-Insulin, Gill, 146 \times



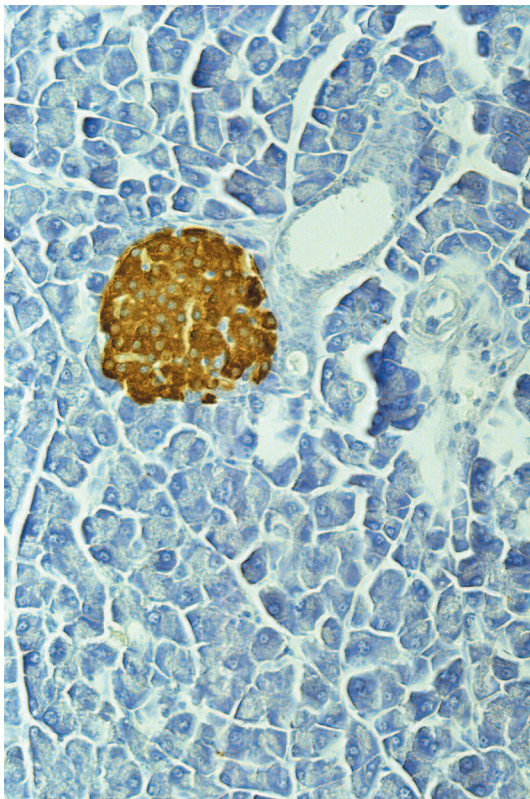
Obr. 16: pankreas, morče, negativní kontrola, Gill, 204 \times



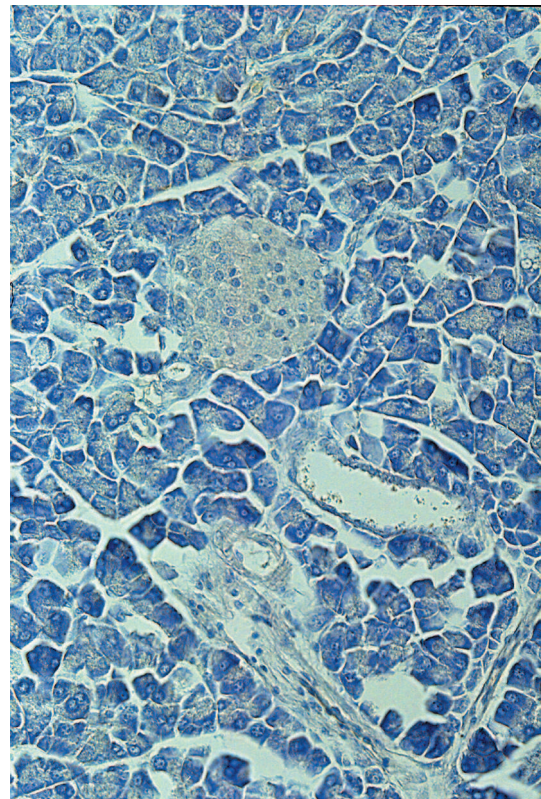
Obr. 17: pankreas, myš, hematoxylin-eosin, 214×



Obr. 18: pankreas, myš, Malloryho modrý trichrom, 214×



Obr. 19: pankreas, myš, Anti-Insulin, Gill, 214×



Obr. 20: pankreas, myš, negativní kontrola, Gill, 216×

Zkratka:	Vysvětlení:
Gill	Gillův hematoxylin užívaný k dobarvení imunohistochemických řezů
HE	hematoxylin-eosin
Mallory	Malloryho modrý trichrom

Tabulka 1: Zkratky v popiskách mikrofotografií

Reference

- [1] Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (1997): Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia. ISBN 0-7216-4024-9
- [2] Ambrosius H., Luppá H. (1987): Immunhistochemie. Springer Verlag, Berlin. ISBN 3-05-500316-0
- [3] Bancroft J.D., Stevens A. (1996): Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, New York. ISBN 0-443-04760-X
- [4] Čech S., Horký D., Lauschová I., Sedláčková M., Šťastná J. (1998): Histologická praktika a metody vyšetřování tkání a orgánů. Masarykova univerzita, Brno. ISBN 80-210-1774-0
- [5] Filipe M.I., Lake B.D. (1983): Histochemistry in pathology. Churchill Livingstone, London. ISBN 0-443-02429-4
- [6] Gomolčák P. (1997): Základy imunohistochemie v patologii. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, Brno. ISBN 80-7013-239-6
- [7] Gomori G. (1953): Microscopic histochemistry. Principles and practice. The University of Chicago Press, Chicago. Vydavatelství DVPZ, Brno. ISBN 80-7013-239-6
- [8] Hořejší V., Bartůňková J. (1998): Základy imunologie. Triton, Praha. ISBN 80-85879-73-X
- [9] Janeway C.A., Travers P., Walport M., Capra J.D. (1999): Immunobiology. 4th edition. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, London/New York. ISBN 0-8153-3217-3
- [10] Korabečná, M. (1999): Aplikace molekulární genetiky v klinické praxi. Karolinum, Praha. ISBN 80-7184-844-1
- [11] Lukáš Z., Dráberová E., Feit J., Vojtěšek B. (1997): Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice. Acta Facultatis Medicae Universitatis Masarykianae Brunensis, Brno. ISBN 80-210-0620-X
- [12] Maňáková E., Seichertová A. (2001): Metody v histologii. Karolinum, Praha. ISBN 80-246-0230-X
- [13] Toupalík P. (2001): Imunohistochemické diagnostické metody v soudnělékařské praxi. Karolinum, Praha. ISBN 80-246-0163-X
- [14] Vacek Z. (1988): Histologická technika. Avicenum, Praha.
- [15] Wolf J. (1954): Mikroskopická technika optická i elektronová pro biologické účely. Státní zdravotnické nakladatelství, Praha.