

Histochemie

Jedná se o histologickou metodu, při které prokazujeme ve vzorku tkáně přítomnost specifických látek nebo např. enzymatickou aktivitu. Využíváme při této metodě specifickou chemickou reakci. Tato metoda spojuje zobrazení morfologie buněk a tkání s popisem výskytu dané chemické látky v buňkách. Může se užívat i k průkazu buněčných inkluzí. V histochemii můžeme prokazovat přítomnost např. polysacharidů, lipidů, tak i funkčních enzymů.

Konvenční histochemie

Průkazy anorganických iontů a sloučenin

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

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

Perlsova reakce

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

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

Metodika barvení

Složení barvicího roztoku

1. ferrokyanid draselný (=hexokynoželednatan draselný, žlutá krevní sůl)
2. destilovaná voda
3. kyselina chlorovodíková (2%)

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

PAS reakce

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

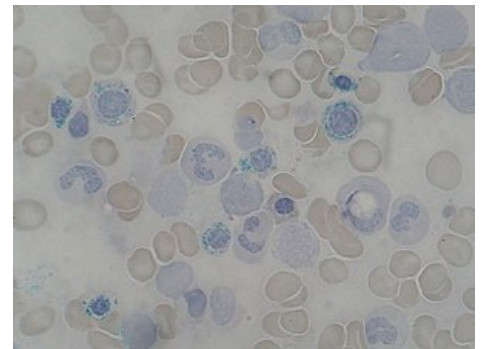
Struktury které lze touto metodou detekovat, označujeme jako PAS pozitivní (např. **glykogen** v **játrech**).

Metodika barvení

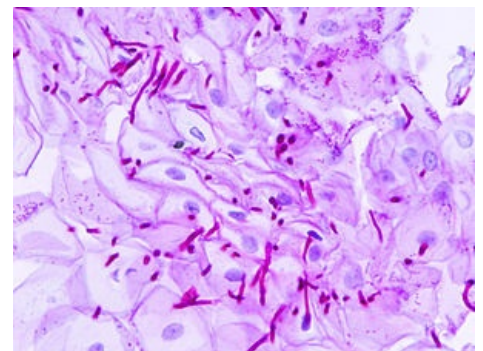
Složení Schiffova reagens:

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

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



Sideroblasty obarvené Perlsovou reakcí



Kandidóza zvýrazněná PAS reakcí

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

Feulgenova reakce

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

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

Průkaz lipidů

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

Průkaz fosfolipidů: Fosfolipidy barvíme luxolovou modří. Metoda je vhodná pro znázornění **myelinové pochvy** nervových vláken

Katalytická histochemie

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

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

Pro zachování funkce enzymu nelze tkáň obvykle fixovat.

Afinitní histochemie

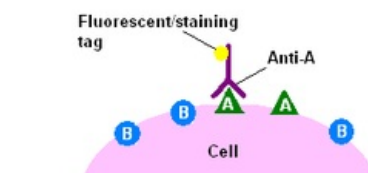
Jeden z mladších oborů, který je stále více využíván jak ve výzkumu, tak v hlavně diagnostice. Umožňuje prokázat v cílové tkáni velmi nepatrná množství látek.

Imunohistochemie

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

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

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



Přímá imunohistochemie

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

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

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

Lektinová histochemie

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

In situ hybridizace

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

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

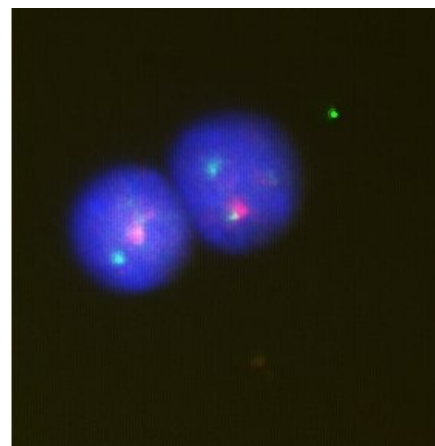
Odkazy

Související články

- [Principy konvenční histochemie ve světelné mikroskopii](#)
- [Barvení ve světelné mikroskopii](#)
- [Barvení hematoxylin-eosin](#)

Použitá literatura

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



FISH metoda