

# Histochemie a imunohistochemie, elektronová mikroskopie

Příprava histologických preparátů pro vyšetření světelným mikroskopem je sled pracovních úkonů v laboratoři, které mají za cíl vytvořit co nejlépe hodnotitelný histologický preparát s výraznějším požadovaných struktur. Termín histologický preparát má svůj původ v termínu „histologie“, který podobně jako patologie pochází z řečtiny a opět se jedná o složeninu slov *histos* = tkáň a *logos* = nauka. To znamená, že histologie je vědní disciplína, která se zabývá studiem mikroskopické stavby živočišných a rostlinných tkání a orgánů mnohobuněčných organismů. V lékařství se histologie používá pro popis změn tkání v důsledku onemocnění nebo smrti.

V nejobecnějším schématu prochází vzorek tkáně těmito kroky: fixace, zalití, krájení, barvení. Tkáň po odběru prochází změnami, které mění její vlastnosti. Cílem fixace je proto zachovat stav buněk a tkání co možná nejvěrněji. Nejběžnější metodou je chemická fixace formolem, který stabilizuje bílkoviny. Druhou možností jak fixovat tkáň je jejich hluboké zmrazení, které však přichází v úvahu pouze u některých typů preparátů, jako např. ledviny. Pokud je vzorek dostatečně prosycen formolem zalévá se do tekutého parafínu. Parafín prostoupí tkáň a po jeho zatvrdnutí je tak připravena ke krájení na tenké řezy. Tkáň zalitá do parafínu se nazývá blok nebo bloček. Před vlastním krájením je blok umístěn do speciálního přístroje - mikrotomu, který je vybaven ostrým nožem. Pomocí něj dochází k řezání bloku na tenké plátky, které jsou natahovány na podložní mikroskopické sklíčko. Před vlastním barvením se samozřejmě musí z preparátu odstranit parafín, a to působením xylenu, který rozpouští a vyplavuje tuky.

Vlastní barvení je nejnáročnějším úkonem v histologické technice. Je nutné znát nejen principy účinku barviv, ale musíme vědět, které struktury v histologickém preparátu chceme zvýraznit. Na základě toho volíme typ barvení. V obecné rovině lze říci, že rozlišujeme dva základní typy barvení histologických preparátů. První bychom mohli nazvat nespecifický, kdy se nabarví celý preparát, popř. se zvýrazní pouze jádro a zbytek buňky. K tomuto barvení se používají barviva jako hematoxylin, popř. hematoxylin-eozin. Druhým typem barvení je specifický a při něm se používají speciální barviva, která reagují s určitými strukturami v tkáni. Barviva, resp. barvení jsou většinou nazývány podle svého objevitele. Tak máme např. barvení dle Massona, dle Goldnera nebo van Giesona. Vedle specifických histologických struktur je na Ústavu klinické a molekulární patologie také prováděna histochemie, což znamená průkaz určitých chemických prvků nebo sloučenin v tkáni. Z nejvýznamnějších metod je možno jmenovat např. PAS reakci na detekci sacharidů nebo barvení Sudanovou černí a zvýraznění tuků.

Na Ústavu klinické a molekulární patologie je k dispozici široký výběr různých typů barviv a lze říci, že lze zvýraznit každou klinicky významnou část tkáně.

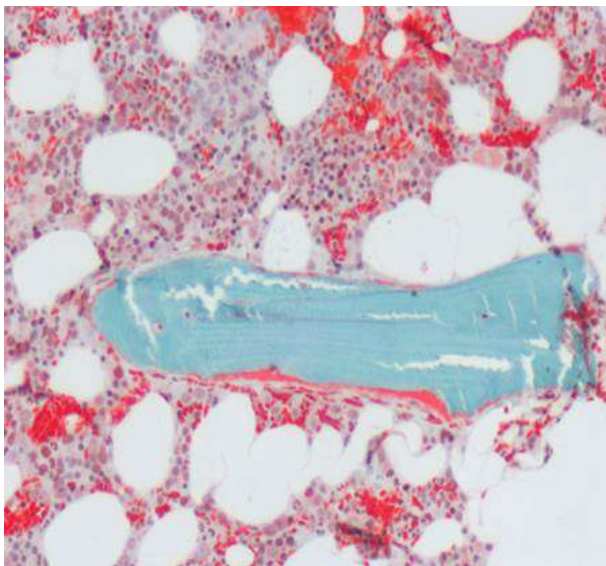
Druhou významnou činností prováděnou na Ústavu klinické a molekulární patologie je **imunohistochemie**. Princip přípravy mikroskopických preparátů je v podstatě obdobný jako u histochemického zpracování, ale má v některých případech drobné modifikace. Imunohistochemicky detekujeme pouze bílkoviny. Jedná se o metodu, která dokáže určit množství a lokalizaci požadovaného proteinu nejen v rámci buňky, ale i v rámci sledované tkáně. Principem metody je vazba mezi sledovaným proteinem, který funguje jako antigen a protilátkou. Vzhledem k tomu, že vazba protein-protilátka je přísně specifická je i imunohistochemie mimořádně přesná. Pravdou je, že podmínky, za kterých dojde k vazbě mezi proteinem a protilátkou se liší v závislosti na proteinu a je třeba je optimalizovat, aby nedocházelo k falešným výsledkům. Po vazbě protilátky na protein je následně vzniklý komplex vizualizován buď fluorescenčně, ale ve většině případů enzymaticky a je možno jej sledovat pod mikroskopem. V ideálním případě jsou na tkáňovém řezu vidět okrsky s přítomností sledovaného proteinu (hnědé zbarvení – pozitivita) a okrsky ve kterých se protein nevyskytuje (modré zbarvení – negativita).

Co se týče **histologických** vyšetření, kdy je potřeba, aby patolog rozeznal jednotlivé komponenty tkání, provádí se na Ústavu klinické a molekulární patologie celkem asi 51 barvicích postupů, které odlišují 18 různých histologických a cytologických struktur. Základním je barvení hematoxylin-eozinem (HE), který barví celý řez. Toto barvení se provádí u většiny histologických preparátů a následují specializovaná barvení podle požadavků lékaře. Např. při požadavku na barvení pigmentů a anorganických látek přicházejí v úvahu tyto typy barvení: lipofuscin dle Schmorla, průkaz melaninu dle Massona (Fontana), bělení melaninu peroxidem vodíku, metoda Pearls na průkaz železa, metoda Fouchet – průkaz bilirubinu, metoda dle von Kossa – průkaz vápníku, metoda dle Okamoto – průkaz mědi.

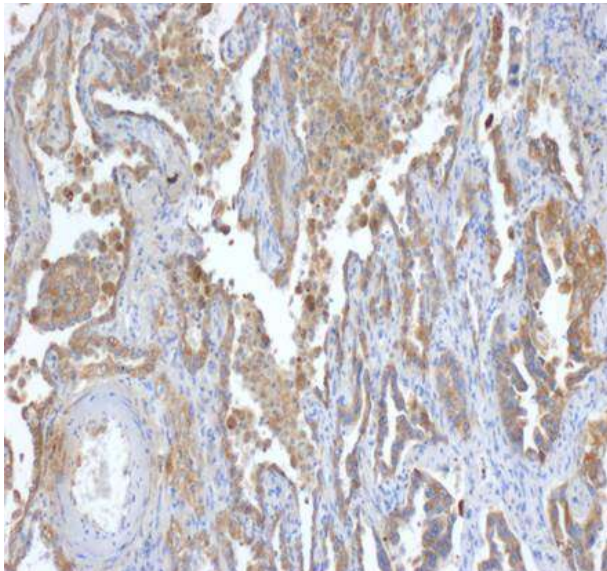
Pro **imunohistochemická** vyšetření má Ústav klinické a molekulární patologie k dispozici 350 komerčně dodávaných protilátek. To znamená, že může detekovat až 350 různých proteinů, z nichž některé z nich mají mimořádný diagnostický a prognostický význam. Přítomnost některých proteinů umožní odhalit např. původ nádoru, a tím lépe nastavit léčbu. Ústav klinické a molekulární patologie je referenčním pracovištěm pro vyšetření přítomnosti proteinu HER2/neu. Jedná se o receptorový protein, který se nachází v membránách buněk. V rámci pracoviště je vyšetřována jeho přítomnost a množství u buněk nádorů mléčné žlázy. Jeho vysoké zastoupení značí horší prognózu a indikuje pacientku k nasazení cílené biologické léčbě. Mezi 350 vyšetřujícími proteiny jsou ty, které se nacházejí jak na povrchu buněk, tak proteiny intracelulární a jaderné. Povětšinou se jedná o proteiny, které jsou součástí tzv. intracelulárních signálních drah. To jsou složité kaskády procesů uvnitř každé buňky a při jejich narušení dochází např. ke vzniku a rozvoji nádorového onemocnění. Proto je také ovlivňování těchto drah jedním ze základních léčebných postupů. Ročně se na ústavu provede kolem 6 500 imunovyšetření z 29 000 biopsií.

**Elektronová mikroskopie (ELMI)** je metoda ke sledování buď ultrastrukturálních součástí tkání nebo buněk (transmisní-prozařovací ELMI, TEM) nebo k prohlížení povrchů (rastrovací – scanovací ELMI, REM). Princip ELMI je v podstatě shodný s mikroskopií světelnou, jen se místo svazků fotonů využívá paprsek elektronů (odtud název) a místo klasických optických čoček se využívá systém čoček elektromagnetických. Zásadní rozdíl mezi pozorováním světelným a ELMI je, že u ELMI je vzorek umístěn ve vakuu, což vyplývá z povahy proudu elektronů. Dalším rozdílem, je že při transmisní ELMI musí být řezy mnohem tenčí (až 100x) než řezy pro světelnou mikroskopii. Toho se docílí krájením preparátu, zalitým ve speciálních pryskyřicích, na tzv. ultramikrotomech. Posledním významným rozdílem je, že preparáty pro ELMI se nebarví. Dochází pouze k jejich pokovení (zlato, polonium, těžké kovy), čímž se zvýší kontrast struktur (TEM), popř. se zlepší schopnost povrchů odrážet elektrony (REM). Příprava vzorů pro ELMI je časově i finančně náročnější než pro světelnou mikroskopii, proto se ELMI využívá pouze pro specializované vyšetření a diagnostické postupy.

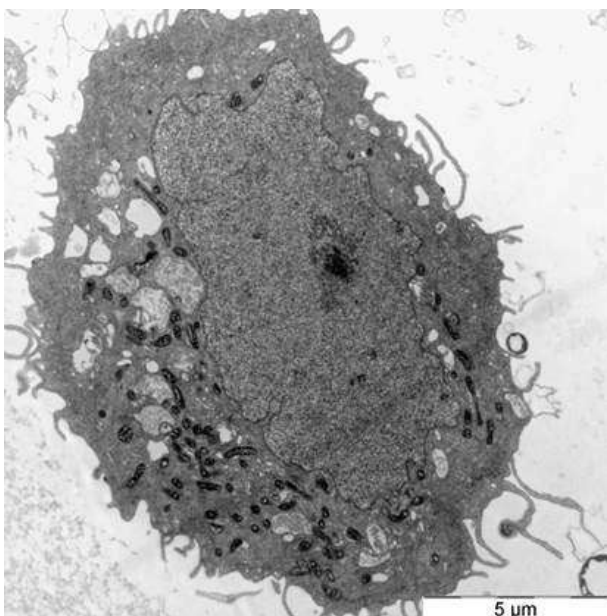
Na Ústavu klinické a molekulární patologie se vyšetření **transmisní elektronovou mikroskopií** používá zejména pro zpřesnění diagnostiky onemocnění ledvin. V kombinaci s dalšími mikroskopickými technikami umožňuje rozpoznat strukturální změny ledvinových klubiček (glomerulů) při tzv. glomerulopatiích, které představují největší část chorob v nefrologii a tvoří jednu z hlavních příčin chronického selhání ledvin. Správná interpretace ELMI snímků výrazně zpřesňuje diagnózu, a vytváří tím i základní předpoklad pro léčbu. V omezené míře se ELMI využívá k popisu změn morfologického obrazu kostní dřeně nebo pro studium řasinek v dýchacích cestách. Ročně se na ústavu provede kolem 70 elektronmikroskopických vyšetření.



obr. 1 Barvení kostí dle Goldnera (červená-spongiózní kost, zelená- kompaktní kost)



obr. 2 Imunohistochemická lokalizace proteinu LC3 adenokarcinomu plic (hnědá)



obr. 3 Elektronmikroskopický snímek buňky v tkáňové kultuře



obr. 4 Pohled do imunohistochemické laboratoře



obr. 5 Pohled do imunohistochemické laboratoře (vlevo automaty k barvení mikroskopických preparátů)



obr. 6 Pohled do mikroskopické laboratoře