

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd



Bakalářská práce

**IMUNOHISTOCHEMICKÉ METODY A JEJICH VYUŽITÍ
K DETEKCI PATOLOGICKÝCH MARKERŮ
U EXPERIMENTÁLNÍCH ZVÍŘECÍCH MODELŮ**

**IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS AND THEIR APPLICATION FOR
THE DETECTION OF PATHOLOGICAL MARKERS IN EXPERIMENTAL
ANIMAL MODELS.**

Helena Faltýsková

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové 2007

Poděkování

Děkuji panu PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté studijní materiály, cenné rady a podnětné připomínky při zpracování mé bakalářské práce. Děkuji také své rodině za všestrannou podporu.

1 Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je popsat základní imunohistochemické metody a možnosti jejich využití v detekci antigenů, které mají nějakou souvislost s časnými stádii aterogeneze.

Podstatou imunohistochemických metod jsou vysokoafinitní reakce mezi biologickými makromolekulami, konkrétně mezi rozličnými imunogenními strukturami (antigeny) a proti nim tvořenými protilátkami. Imunohistochemické metody lze rozdělit podle metodiky na přímé, nepřímé a nepřímé trojstupňové (např. sendvičová metoda).

Proces aterogeneze je doprovázen změnami vlastností buněk cévní stěny a endotelu. Má vliv na expresi řady tkáňových faktorů a adhezivních molekul, jakými jsou např. VCAM-1, nebo endoglin. Sledováním změn exprese těchto markerů je možné studovat vliv jednotlivých rizikových faktorů na rozvoj aterosklerózy.

Ve světelné mikroskopii byla exprese VCAM-1 pozorována v tunica media cév pod aterosklerotickými pláty a v aterosklerotických plátech. Silná exprese byla pozorována také na cévním endotelu. Exprese endoglinu byla pozorována hlavně v cévním endotelu, a to jak v oblasti aorty, tak menších cév a kapilár v okolním myokardu. U velkých aterosklerotických plátů byla exprese endoglinu na několika místech pozorována i v aterosklerotických plátech. Fluorescenční barvení VCAM-1 a endoglinu potvrdilo expresi obou markerů popsanou ve světelné mikroskopii. Byla nalezena pouze velmi slabá kolokalizace obou antigenů, a to v oblasti několika buněk endotelu, který pokrývá aterosklerotický plát. Z toho lze usuzovat, že VCAM-1 a endoglin nejsou exprimovány stejnými buňkami.

Tato bakalářská práce prokázala význam imunohistochemických barvení pro zjišťování lokalizace antigenů v aterosklerotických plátech. Byla také zavedena metoda fluorescenční detekce kolokalizace dvou markerů na jednom tkáňovém řezu, která bude sloužit ke zjišťování spektra markerů, které jsou exprimovány různými buňkami v aterosklerotických plátech.

Abstract

The aim of this thesis is to describe basic immunohistochemical methods and their application for the detection of antigens which are related to early phase of atherogenesis.

Principle of immunohistochemical methods consists of highmolecular affinity reactions among different immunogenic structures (called antigens) and their antibodies. According to their principles, immunohistochemical methods could be divided into direct, indirect and triple grade indirect methods (for example the sandwich method).

The changes in the function of endothelium and the structure of the vesseal wall are critical for the atherogenesis. These changes are accompanied by the expression of tissue markers and cell adhesion molecules, for example endoglin or VCAM-1. Due to monitoring of these pathological markers and changes in their expression it is possible to study the influence of several factors on atherogenesis.

In the light microscopy we detected the expression of VCAM-1 in tunica media below the atherosclerotic plaque as well as in atherosclerotic plaque. Strong expression was detected also in endothelium. Expression of endoglin was observed mostly on endothelium, not only in aorta, but also in small vessels and capillaries in surrounding myocardium. It is also possible to see the expression of endoglin inside the large plaques. The expression of VCAM-1 and endoglin described by the light microscopy was confirmed also by fluorescent staining. We found very weak colocalization of both markers only, namely in some few endothelial cells covering the atherosclerotic plaque. Thus, we proposed that VCAM-1 and endoglin are not produced by the same cells.

This thesis demonstrated the significance of immunohistochemical staining for the detection and localization of antigens in atherosclerotic plaques. We set up fluorescent detection of colocalization of two different markers in one histological slide. This method will be in used for the detection of wide spectrum of markers which are produced in atherosclerotic plaques by different cells.

2 Obsah

1	ABSTRAKT	1
2	OBSAH	3
3	ÚVOD, HISTORIE.....	5
4	TEORETICKÉ ZÁKLADY IMUNOHISTOCHEMIE.....	6
4.1	ZÁKLADNÍ TYPY IMUNOHISTOCHEMICKÝCH METOD	6
4.1.1	<i>Přímá metoda.....</i>	6
4.1.2	<i>Nepřímá metoda.....</i>	7
4.1.3	<i>Nepřímé trojstupňové metody.....</i>	7
4.1.4	<i>Metodika EnVision.....</i>	10
4.2	ZÍSKÁVÁNÍ PROTILÁTEK PRO IMUNOHISTOCHEMII	12
4.2.1	<i>Polyklonální protilátky</i>	12
4.2.2	<i>Monoklonální protilátky</i>	12
5	IMUNOHISTOCHEMICKÝ PROTOKOL.....	14
5.1	OBEČNÉ SCHÉMA IMUNOHISTOCHEMICKÉHO PROTOKOLU	14
5.2	ODBĚR A FIXACE TKÁNĚ	14
5.2.1	<i>Formaldehyd.....</i>	15
5.2.2	<i>Ethanol.....</i>	15
5.2.3	<i>Aceton</i>	16
5.3	OPTIMALIZACE PREZENTACE ANTIGENŮ	16
5.3.1	<i>Použití proteáz</i>	16
5.3.2	<i>Mikrovlnné záření.....</i>	17
5.4	BLOK ENDOGENNÍ AKTIVITY ENZYMŮ.....	17
5.4.1	<i>Peroxidázová aktivita</i>	17
5.4.2	<i>Aktivita alkalické fosfatázy</i>	18
5.4.3	<i>Biotin.....</i>	18
5.4.4	<i>Avidin.....</i>	18
5.5	BLOK NESPECIFICKÉHO POZADÍ.....	18
5.5.1	<i>Hydrofobní interakce</i>	19
5.5.2	<i>Elektrostatické interakce.....</i>	19

5.5.3	<i>Přítomnost přirozených protilátek</i>	19
5.5.4	<i>Kontaminace řezů nebo reagensů cizorodými látkami</i>	20
5.5.5	<i>Zkřížená reaktivita</i>	20
5.5.6	<i>Difúze tkáňových antigenních struktur do okolní tkáně</i>	20
5.5.7	<i>Další nescifické reakce</i>	20
5.6	CHROMOGENY	21
5.6.1	<i>Průkaz značení pomocí enzymů</i>	21
5.6.2	<i>Průkaz značení pomocí fluoroforů</i>	21
5.7	BARVENÍ POZADÍ	22
6	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
6.1	SLEDOVANÉ MARKERY ATEROGENEZE.....	23
6.1.1	<i>Buněčné adhezivní molekuly</i>	23
6.1.2	<i>Endoglin</i>	25
6.2	POUŽITÉ MATERIÁLY	26
6.2.1	<i>Tkáňové řezy</i>	26
6.2.2	<i>Protilátky</i>	26
6.2.3	<i>Detekční systémy</i>	27
6.3	PRACOVNÍ POSTUP	27
6.3.1	<i>Nepřímá imunofluorescence na zmrazených řezech</i>	27
6.3.2	<i>ABC systém</i>	27
7	VÝSLEDKY	29
7.1.1	<i>Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu</i>	29
7.1.2	<i>Imunohistochemické barvení endoglinu v oblasti aortálního sinu</i>	29
7.1.3	<i>Kolokalizace endoglinu a VCAM-1</i>	29
8	ZÁVĚR	36
9	SEZNAM ZKRATEK	37
10	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	38

3 Úvod, historie

Význam imunohistochemických metod spočívá v detekci specifických antigenních determinant v buňkách a tkáních. Spektrum uplatnění těchto metod je velmi široké. Z medicínského hlediska má imunohistochemická charakteristika tkání rozhodující význam v bioptické diagnostice při detekci patologických markerů. Slouží nejen k diagnostice onemocnění, ale také ke kontrole následné léčby, sledování progresu onemocnění, popřípadě ke stanovení prognózy.

Za základ dnešních moderních imunohistochemických metod lze považovat histochemii, metodu zavedenou přibližně ve třicátých letech dvacátého století, která vyšla z principů histologie, analytické chemie a biochemie. Chemické reakce prováděné na buňkách a tkáních dovolily identifikovat chemické látky i místa enzymové aktivity a lokalizovat je nejen na úrovni histologické, ale také na úrovni cytologické.

Postupné objevování zákonitostí specifické imunologické reakce vedlo k efektivnímu propojování histochemických a imunologických metod. Ve čtyřicátých letech dvacátého století tak došlo k prvnímu úspěšnému průkazu antigenu ve tkáni pomocí fluoresceinem značené protilátky, tedy metodou zvanou dnes „přímá imunofluorescenční metoda“. Od padesátých let dvacátého století byly imunohistochemické metody zaváděny do patologické diagnostiky. V sedmdesátých letech dvacátého století byly připraveny tzv. monoklonální protilátky, tedy protilátky namířené proti jedinému epitopu, jejichž využití vedlo k dalšímu zvýšení specifity. Ve stejné době se ke značení protilátek začaly využívat enzymy, což umožnilo zavedení imunohistochemie do širší laboratorní praxe. Zároveň tak vznikla možnost vyšetřovat retrospektivně i dříve odebrané vzorky.

S rozvojem molekulárního, proteinového a genového inženýrství docházelo a neustále dochází ke zvyšování specifity a senzitivity imunologických reakcí i k rozšiřování spektra jednotlivých imunohistochemických metod, protože jejich role v diagnostické praxi je v dnešní době takřka nenahraditelná [1].

4 Teoretické základy imunohistochemie

Podstatou imunohistochemických metod jsou vysokoafinitní reakce mezi biologickými makromolekulami, konkrétně mezi rozličnými imunogenními strukturami (antigeny) a proti nim tvořenými protilátkami.

Základními předpoklady pro využití metod imunohistochemie k detekci antigenů a dosažení věrohodných výsledků jsou vhodné vlastnosti vyšetřované tkáně (antigeny nesmí difundovat z místa, kde se nacházejí) i patřičná specifita metody pro daný prokazovaný antigen. Významnou roli hraje také samotný proces detekce antigenu a výběr použitých reagensů. Je třeba zajistit, že fixace preparátu nepovede k blokování nebo denaturaci reaktivních skupin, a že vzniklý reakční produkt bude nerozpustný a detekovatelný - ať už ve světelné nebo fluorescenční mikroskopii [2].

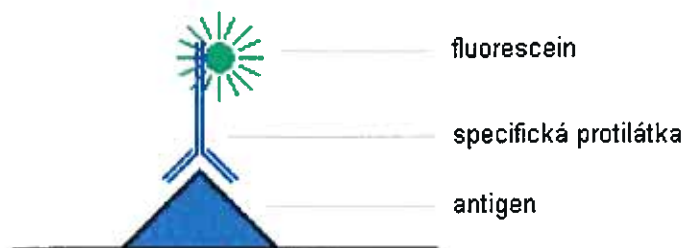
4.1 Základní typy imunohistochemických metod

Jako imunohistochemickou metodu můžeme označit takovou metodu, která k identifikaci, lokalizaci a vizualizaci antigenu ve tkáni využívá monoklonální nebo polyklonální protilátky značené chemickou sloučeninou umožňující jejich průkaz.

4.1.1 Přímá metoda

Je nejstarší a nejjednodušší imunohistochemickou metodou. K lokalizaci antigenů ve tkáních využívá enzymem nebo fluoroforem značenou protilátku. Pokud je antigen ve tkáni přítomen v dostatečné koncentraci, dochází k imunologické vazbě antigen-protilátka.

Provedení metody je poměrně rychlé a vzhledem k použití pouze jedné protilátky se daří do značné míry omezit různé nespecifické reakce. Získaný signál je ale slabý a přímá metoda imunohistochemické detekce antigenu je v dnešní době pro svou nízkou senzitivitu využívána minimálně, případně pouze ve fluorescenční mikroskopii [3].



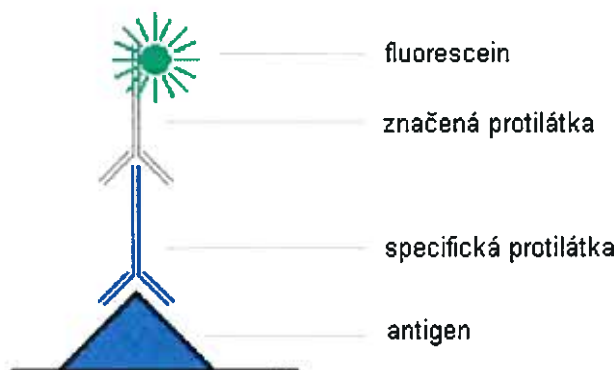
Obr. 1 *Přímá metoda.* Značená protilátka se váže přímo na antigen.

4.1.2 Nepřímá metoda

Vyšší citlivostí, ve srovnání s přímou metodou, se vyznačuje metoda nepřímá. Na antigen se váže neznačená specifická primární protilátka. Po jejím navázání na antigen je třeba aplikovat značenou sekundární protilátku schopnou detekovat protilátku primární. Aby mohlo dojít k vazbě sekundární protilátky na primární, musí každá pocházet z jiného živočišného druhu.

Nepřímá metoda je sice poněkud komplikovanější, ale výhodou oproti metodě přímé je fakt, že stejná značená protilátka může být využita k detekci mnoha odlišných antigenů. Vzhledem ke schopnosti sekundární protilátky vázat se na různé epitopy primární protilátky dochází také k amplifikaci signálu a tedy ke zvýšení senzitivity.

Nepřímé metody byly původně využívány k detekci autoprotilátek [4].



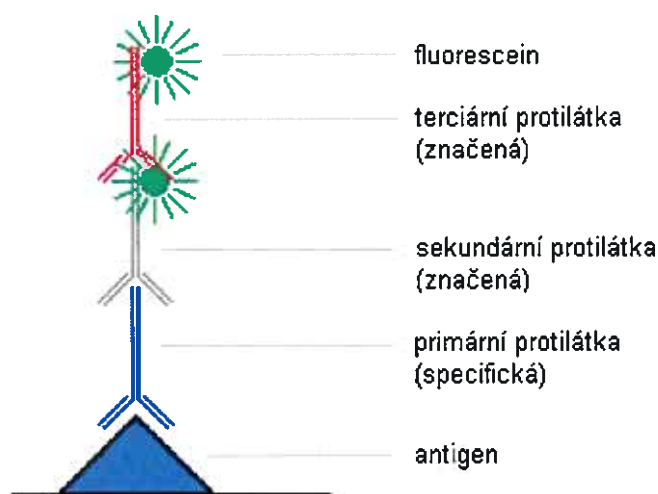
Obr. 2 *Nepřímá metoda.* Značená protilátka vázaná na různé epitopy specifické protilátky vyvolá zesílení signálu.

4.1.3 Nepřímé trojstupňové metody

Jedná se o amplifikační metody využívané především k detekci antigenů, které se ve tkáni nacházejí jen ve velmi nízkých koncentracích.

4.1.3.1 *Sendvičová metoda*

Nepřímá dvoustupňová metoda je zde rozšířena o třetí fázi, ve které se na značenou sekundární protilátku specificky váže ještě protilátka terciární, také značená. První a druhá fáze metody, tedy vazba primární specifické protilátky na tkáňový antigen a následně vazba sekundární značené protilátky, se svým průběhem neliší od nepřímé metody. Po aplikaci terciární protilátky se sekundární protilátka dostává do role antigenu, terciární protilátce poskytuje k navázání dostatek antigenních determinant. Obě protilátky, sekundární i terciární, jsou značeny stejným enzymem, resp. fluoroforem. Přidáním třetí vrstvy protilátek dochází tedy k dalšímu zesílení signálu [5] .



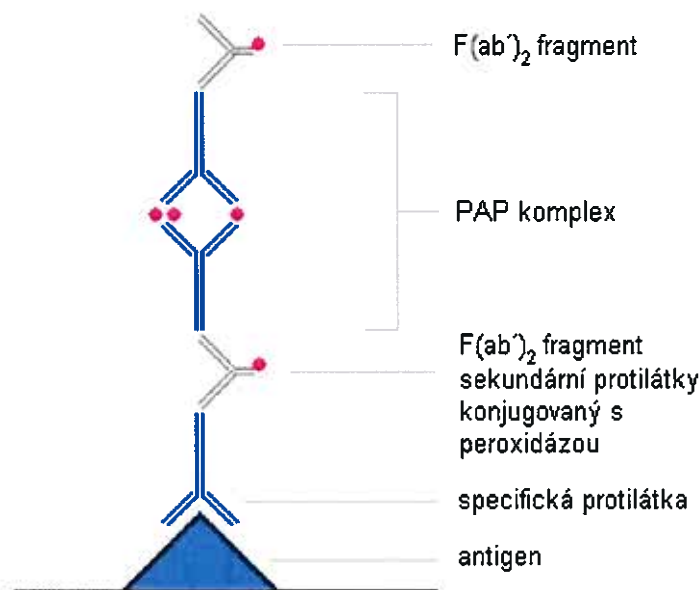
Obr.3 *Sendvičová metoda*. Vazba terciární protilátky vede k amplifikaci signálu.

4.1.3.2 *Metoda solubilních enzymových imunokomplexů*

V první fázi reaguje specifická primární protilátka s prokazovaným antigenem. Druhá fáze zahrnuje aplikaci neznačené specifické protilátky. Tato sekundární protilátka bývá někdy označována jako protilátka spojovací, protože její molekula tvoří jakýsi můstek mezi primární protilátkou a finálním značeným komplexem aplikovaným ve třetí, poslední fázi detekce. Můstek je nutné aplikovat v nadbytku, aby se jeden z jeho dvou Fab fragmentů navázal na primární protilátku a druhý zůstal volný pro vazbu s protilátkou imunokomplexu. Tímto opatřením lze předejít falešně negativnímu výsledku. Obě vazby sekundární protilátky jsou symetrické a tedy stejně pevné. Komplex nanášený ve třetí fázi

detekce je tvořený enzymem a protilátkou proti tomuto enzymu. Primární protilátka a protilátka enzymového imunokomplexu musí pocházet ze stejného živočišného druhu, zatímco protilátka sekundární je namířena právě proti těmto imunoglobulinům [6].

Jednotlivé techniky jsou označovány podle konkrétních použitých enzymových komplexů – například PAP technika využívá křenovou peroxidázu (peroxidase-anti-peroxidase). V preparátech s vysokou aktivitou endogenní peroxidázy (erytrocyty, svalová vlákna, játra, ledviny) je vhodnější technika APAAP, která místo peroxidázy využívá alkalickou fosfatázu (alkaline-phosphatase-anti-alkaline-phosphatase). PAP komplex sestává ze dvou protilátek a tří molekul peroxidázy, APAAP komplex tvoří pouze jedna protilátka konjugovaná se dvěma molekulami alkalické fosfatázy. Využití afinity protilátky k antigenu (enzymu) je způsob mnohem šetrnější než případná chemická konjugace a vzniklý imunokomplex je navíc i velmi stabilní. Velikou výhodou ve srovnání s výše uvedenými metodami je také větší počet enzymových molekul vázaných na jediný antigen a s tím spojená vyšší senzitivita [7].



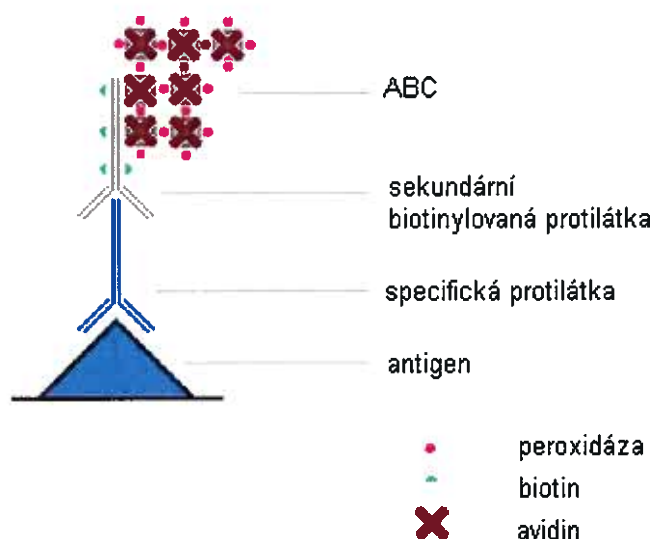
Obr.4 Metoda PAP. Signál je zesílen F(ab')₂ fragmenty značenými peroxidázou.

4.1.3.3 ABC metoda

V dnešní době asi nejvyužívanější nepřímou trojstupňovou metodou je technika avidin-biotin komplexu (ABC). Je založena na vysoké afinitě avidinu k biotinu a tedy na velmi pevné, neimunologické a druhově nespecifické vazbě. Avidin je glykoprotein

vaječného bílku schopný vázat celkem čtyři molekuly biotinu, vitamínu skupiny B. V praxi je však častěji využíván streptavidin (avidin produkovaný bakterií *Streptomyces avidinii*), protože komplex streptavidin-biotin (SABC) poskytuje lepší reakci.

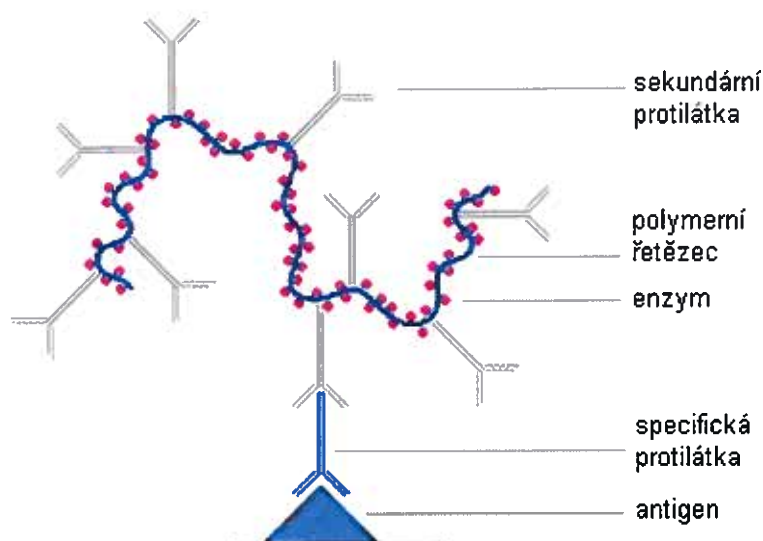
V první fázi této metody dochází k imunologické reakci mezi antigenem a primární specifickou protilátkou, na kterou se v další fázi váže s biotinem konjugovaná sekundární protilátka. Pro vazbu na sekundární biotinylovanou protilátku jsou připravena pouze některá vazebná místa streptavidinu, protože ostatní místa jsou již obsazena komplexem biotin-enzym (peroxidáza, resp. alkalická fosfatáza). Pevně vázaný SABC je potom schopen výrazně zesílit signál celé této sestavy [8].



Obr.5 Metoda ABC. Amplifikace signálu je dána vícenásobnou vazbou komplexu avidin-biotin-peroxidáza.

4.1.4 Metodika EnVision

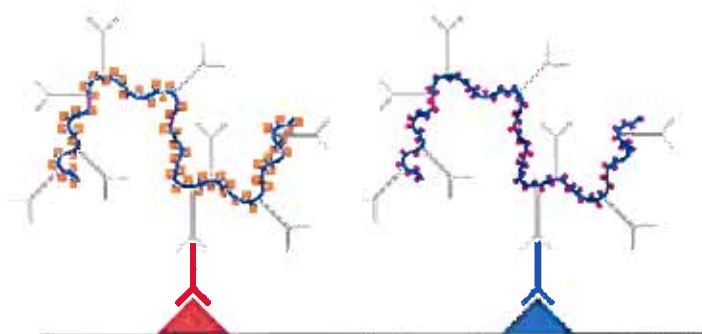
Základem struktury, která se v tomto případě váže na primární specifickou protilátku, je polymerní řetězec konjugovaný se sekundární protilátkou a s enzymem. Na jeden takovýto řetězec je vázáno asi sedmdesát molekul enzymu (peroxidáza nebo alkalická fosfatáza) a přibližně deset molekul sekundární protilátky (anti-rabbit nebo anti-mouse). Tím je dána výrazná schopnost tohoto systému amplifikovat původní signál [9].



Obr.6 Metodika EnVision. Na primární specifickou protilátku je navázán polymerní řetězec konjugovaný s enzymem a sekundární protilátkou.

Metodika EnVision je vhodná pro současnou detekci dvou nebo více různých tkáňových antigenů v jednom histologickém řezu. Detekce jednotlivých antigenů probíhá postupně, vždy podle stejného schématu: histologický řez je inkubován s první primární protilátkou, na ni se posléze váže první značený polymer a následuje inkubace s prvním chromogenem. Mezi jednotlivými fázemi je nutné aplikovat blokující sérum, aby se zabránilo zkřížené reaktivitě a vzniku nespecifických vazeb. Toto sérum pochází ze stejného živočišného druhu jako tkáňové antigeny [10].

Systém EnVision umožňuje použití různých chromogenů, např. DAB, Enhanced DAB, Fast red, nebo Fuchsin.



Obr.7 Metodika EnVision. Pomocí jedné metody lze detekovat postupně dva, případně i více různých antigenů na stejném tkáňovém řezu.

4.2 Získávání protilátek pro imunohistochemii

Protilátka je klíčovou strukturou všech imunohistochemických metod. Dostupnost antisér, imunoglobulinových frakcí a monoklonálních protilátek proti neustále narůstajícímu počtu klinicky využitelných tkáňových antigenů umožňuje významné kvalitativní i kvantitativní rozšíření imunohistochemie jako metody studia tkání a buněk.

4.2.1 Polyklonální protilátky

Po opakované imunizaci antigenem dochází v organismu k aktivaci mnoha klonů B lymfocytů a následně k tvorbě velmi heterogenní směsi protilátek. Protilátky produkované různými klony reagují s různými epitopy antigenu. Specifita těchto polyklonálních protilátek je dána především prostorovou komplementaritou vazebného místa protilátky s epitopem. Důležitou roli hraje také komplementarita elektricky nabitých skupin a hydrofobní vazby. Většina antigenů má různé antigenní determinanty, z nichž některé jsou antigennější a imunitní odpověď na ně může ostatní odpovědi převážit. V důsledku toho je různá i schopnost vytvořených protilátek vázat se na daný antigen. Polyklonální sérum obsahuje protilátky různých tříd a podtříd, různých fyzikálně-chemických a biologických vlastností.

Nejvíce využívaným živočichem pro produkci polyklonálních protilátek je králík, především pro relativně nízké nároky na odchov. Využít lze také kozly, prasata, ovce, koně nebo morčata. Složení směsi protilátek vytvořených po imunizaci stejným antigenem se liší u různých živočišných druhů, ale také u stejného zvířete mezi jednotlivými odběry. Dávka potřebná k vyvolání imunitní odpovědi u zvířete závisí na síle daného antigenu. Imunizace probíhá opakovaně, aby byla zajištěna dostatečná hladina protilátek v séru. Kvalitu polyklonálního séra lze zvýšit afinitní purifikací - protilátka je vyvázána na antigen, izolována od ostatních sérových proteinů a následně z vazby uvolněna [11].

4.2.2 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky byly poprvé připraveny v sedmdesátých letech dvacátého století. Reprezentují jednu složku polyklonální odpovědi. Jako produkt jediného klonu plazmatických buněk jsou immunochemicky identické - stejné třídy imunoglobulinů, stejných fyzikálně-chemických vlastností. Jsou namířené pouze proti jednomu specifickému epitopu, na který se váží se stejnou afinitou.

Postup při výrobě monoklonálních a polyklonálních protilátek je zpočátku identický, zvíře je imunizováno daným antigenem. K získání monoklonálních protilátek je třeba po vyvolání imunitní odpovědi plazmatické buňky izolovat ze sleziny nebo lymfatických uzlin imunizovaného zvířete a buněčnou suspenzi fúzovat s nesmrtelnými myelomovými buňkami. Tyto buňky jsou odvozeny od mutantní buněčné linie nádorových B lymfocytů, které ztratily svou schopnost syntetizovat imunoglobuliny. Fúze obou typů buněk probíhá za speciálních podmínek a jejím výsledkem jsou hybridomy, relativně nesmrtelné buňky schopné produkovat protilátky žádané specifity. Tyto hybridní buňky potom jako jediné přežívají v selekčním médiu, neboť životnost slezinných buněk je omezená a mutované myelomové buňky postrádají enzymatickou výbavu potřebnou k syntéze nukleotidů. Jednotlivé buněčné linie jsou testovány na produkci protilátek požadované specifity a vybrané klony dále množeny [12].

Příprava monoklonálních protilátek je časově i technicky velice náročná, ale pokud se podaří vypěstovat hybridom produkující imunoglobuliny žádané kvality a specifity, získáme protilátky prakticky v neomezeném množství. Pro přípravu většího množství protilátek není nutná opakovaná příprava antigenu zahrnující opakovanou imunizaci zvířat a testování získaných sér. Hybridomy lze dlouhodobě uchovávat zmrazené v tekutém dusíku. Ve výrobě monoklonálních protilátek je z ekonomických důvodů nejpoužívanějším zvířetem myš.

Používání monoklonálních protilátek má ale i svá úskalí. Nevýhodou může být právě jejich až příliš úzká specifita. V případě, že antigen je během přípravy preparátu výrazně pozměněn, není monoklonální protilátka schopna jej rozeznat a navázat se na něj. Dalším jevem vylučujícím použití monoklonálních protilátek je zkřížená reakce. Je-li daný epitop součástí dvou nebo více různých antigenů, nelze tyto antigeny rozlišit pomocí monoklonálních protilátek [13].

5 Imunohistochemický protokol

Pro zajištění správného průběhu imunohistochemických metod je třeba držet se základního pracovního postupu. Ten nezahrnuje pouze fázi analytickou. Věnuje se také fázi preanalytické a postanalytické. Pokud chceme dosáhnout správného a přesného výsledku, je nutné věnovat všem těmto fázím stejnou pozornost [13].

5.1 *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 nespecifického pozadí
6. vazba primární protilátky
7. vazba sekundární protilátky
8. detekční systém
9. demaskování systému antigen-protilátka
10. dobarvování buněčných jader
11. odvodnění a montování preparátu

5.2 *Odběr a fixace tkáně*

Správný odběr a fixace zkoumané tkáně je velice důležitou součástí imunohistochemických metod. Pro dobrou reprodukovatelnost výsledků je nutné ochránit zkoumané tkáně a buňky před nejrůznějšími degradačními vlivy tak, aby jejich struktura zůstala zachována ve stavu co nejpodobnějším živé tkáni. Správná identifikace buněčných proteinů je závislá na jejich zachování v tkáňových řezech.

V imunohistochemii se často používají tzv. kryostatové řezy, zejména z toho důvodu, že některé antigenní struktury nemohou podstoupit proceduru, která je nutná pro zpracování řezů do parafinu. Nevýhodou použití zmrazených řezů je však horší morfologická struktura než je tomu u řezů parafinových [14].

Fixace tkání deaktivuje lysozomální enzymy a zabraňuje tak následné autolýze buněk, zároveň funguje jako inhibitor růstu hnilobných bakterií. Působí jako prevence osmotických změn, svraštění a tedy i morfologických změn, zajišťuje retenci všech

tkáňových a buněčných komponent a uchování původních vazeb a reaktivity proteinů, lipidů a dalších buněčných složek. Způsob fixace a dalších úprav vyšetřovaných tkání úzce souvisí se způsobem jejich získání a zpracování (chromozomové, krevní a cytologické nátěry, kryostatové nebo parafínové řezy). Stabilizace tkání a buněk spočívá ve zpomalení nebo zastavení metabolických pochodů, ve stabilizaci enzymů a dalších proteinů. K tomuto účelu jsou používány speciální fixační roztoky, nejčastěji roztoky aldehydů (formaldehydu pro světelnou nebo glutaraldehydu pro elektronovou mikroskopii) nebo alkoholy (ethanol, methanol), dále organické kyseliny (octová, trichloroctová, pikrová), případně další chemické sloučeniny (soli těžkých kovů). Jmenované chemikálie mají vliv na stabilitu proteinů. S novými požadavky na zachování mikrostruktury tkáně se začala používat také činidla ovlivňující stabilitu lipidů a sacharidů. Vedle fixace chemické existují ještě další formy – zmrazení tkání nebo fixace teplem (mikrovlnami) [15].

5.2.1 Formaldehyd

K fixaci histologických preparátů se používá jeho vodný roztok, který reaguje s nenabitými NH_2 skupinami proteinů, tím dochází k tvorbě metylenových můstků mezi jednotlivými polypeptidovými řetězci. Zvyšuje se tak negativní náboj, tkáň se okyseluje a zvyšuje se její bazofilie. Původně byl formaldehyd považován za mírný fixační prostředek, který je možno po fixaci odstranit během odvodnění alkoholem. Dnes je znám vliv aldehydových fixativ na konformační změny. Tento fakt může vyvolat obavu o zachování imunoreaktivity zkoumaných tkání a schopnost tkáňových antigenů reagovat zejména s monoklonálními protilátkami. Ale při výběru vhodných protilátek a patřičném postfixačním ošetření preparátu jsou aldehydová fixativa vhodná a použitelná i pro metody využívající monoklonální protilátky [16].

5.2.2 Ethanol

Nízká schopnost penetrace do tkání je příčinou nepříliš častého využití ethanolu jako fixativa. Nicméně, pro malé části tkání lze ethanol s výhodou využít, fixace takových preparátů probíhá poměrně rychle a mikrostruktura tkání zůstává velmi dobře zachovaná. Bílkoviny, polypeptidy a glycidy obsažené v alkoholem fixované tkáni podléhají pravděpodobně precipitaci nebo se stáčí do klubka a dochází u nich ke sterickým změnám reaktivních skupin, které ale nevedou k blokaci klíčových antigenních determinant. Tyto

změny navíc usnadňují průnik protilátek do tkání, fixace ethanolem je proto vhodná také pro imunohistochemické metody (například pro detekci povrchových membránových antigenů, jejichž epitopy obsahují sacharidové složky). Nejčastěji jsou alkoholová fixativa využívána u zmrazených řezů. Preparáty fixované v ethanolu (narozdíl od preparátů fixovaných v činidlech odlišného charakteru) není vhodné vystavovat působení proteáz ani jiným procesům, které ovlivňují antigenní struktury. Tyto postfixační úpravy preparátu by mohly vést k nevratné destrukci vyšetřované tkáně [17].

5.2.3 Aceton

Aceton má výbornou schopnost zachování imunoreaktivity buněk a tkání. Jeho využití ale není tak široké, jak by se dalo předpokládat. Důvodem je opět jeho nízká schopnost penetrace do tkání. Acetonová fixace není úplná, navíc prodloužená doba inkubace může zapříčinit rozpad buněčných membrán. Prakticky je aceton jako fixativum (obvykle ve směsi s methanolem) využíván pouze u kryostatových řezů, případně u krevních nátěrů. I na ně se ale výše uvedená rizika vztahují [17].

5.3 *Optimalizace prezentace antigenů*

Za antigen lze obecně považovat každou strukturu, která je schopna vyvolat tvorbu protilátek. Obvykle je taková struktura složena z epitopů neboli antigenních determinant (konkrétní funkční skupiny schopné vyvolat protilátkovou odpověď) a z makromolekulárního nosiče.

V průběhu fixace i dalšího zpracování tkáňových řezů dochází ke změnám antigenních determinant, k jejich maskování a někdy i zablokování. Aby nedocházelo ke zkreslování výsledků imunohistochemických vyšetření, je třeba tyto nepříznivé vlivy fixace zmírnit. K demaskování zablokovaných epitopů lze použít proteolytické enzymy nebo mikrovlnné záření [18].

5.3.1 Použití proteáz

Antigenní vlastnosti biologického materiálu může do určité míry ovlivnit částečná digesce molekul tkáně proteolytickými enzymy. Působením proteáz se část nežádoucích vazeb uvolní a antigeny se odblokují. Mezi nejčastěji používané enzymy se řadí trypsin,

pepsin, pronáza nebo ficin. Je třeba si uvědomit, že enzymatická digesce může uvolnit tkáňové řezy od podložního sklíčka. Před použitím proteáz je proto nutné zajistit pevnou adhezi tkání na skla, například potahováním sklíček speciálními médii (poly-L-lysin, Elmerova želatina, chromželatina, apod.) [18].

5.3.2 Mikrovlnné záření

Novější metodou revitalizace antigenu je mikrovlnná stimulace. Inkubace řezů v mikrovlnné troubě působí na antigenní struktury tepelným efektem, který jednak urychluje difuzi při zpracování, jednak podporuje vznik chemické reakce při barvení. Mikrovlny jsou neionizující elektromagnetické záření o vlnové délce od 1 mm do 1 m. Považením tkáňových řezů v roztocích organických sloučenin (citrátový pufr, močovina, glycin) nebo v roztocích solí obsahujících Al^{3+} nebo Zn^{2+} dochází v antigenních strukturách ke konformačním změnám. V praxi bylo ověřeno, že mikrovlnné ozáření a s ním spojené vysoké teploty nepůsobí na peptidické vazby destruktivně. Proteiny nepodléhají denaturaci, ale jsou naopak mikrovlnami stabilizovány. Mechanismus tohoto působení není přesně známý, pravděpodobně se na něm podílí právě zvýšená teplota spolu s účinkem mikrovln na sekundární nekovalentní vazby (vodíkové můstky, hydrofobní vazby) [15].

5.4 Blok endogenní aktivity enzymů

Nutnost blokace aktivity endogenních enzymů vyplývá ze skutečnosti, že enzymy používané pro průkaz vazby protilátky na antigen se mohou přirozeně vyskytovat ve zkoumané tkáni. Pokud bychom aktivitu těchto endogenních tkáňových enzymů dostatečně neblokovali vysycením jejich substrátem, byl by konečný výsledek vyšetření znehodnocen falešně pozitivní reakcí. Jedná se zejména o peroxidázu a alkalickou fosfatázu, ale i další molekuly neenzymatického charakteru [15].

5.4.1 Peroxidázová aktivita

Endogenní *peroxidázovou a pseudoperoxidázovou aktivitu* můžeme pozorovat například u hemoglobinu v erytrocytech, myoglobinu ve svalových vláknech, cytochromů (granulocyty, monocyty) a také u kataláz (játra, ledviny). Všechny tyto molekuly způsobují rozklad peroxidu a uvolnění kyslíku. Peroxidázovou aktivitu lze blokovat zhruba 20

minutovou inkubací v 3% vodném roztoku H₂O₂. Pseudoperoxidázová aktivita se objevuje jako důsledek použití hemolytického séra, kdy vyšetřovanou tkáň kontaminují přítomné produkty rozpadu erytrocytů. Použitím čerstvého neimunního séra bez známek hemolýzy tuto kontaminaci eliminujeme [19].

5.4.2 Aktivita alkalické fosfatázy

Endogenní aktivita ALP se může projevit v kostech, v jaterní a ledvinné tkáni, případně v některých buňkách bílé krevní řady. Tuto aktivitu je možné inhibovat pomocí 5mM roztoku levamizolu. Aktivitu alkalické fosfatázy pocházející z gastrointestinálního traktu potlačí proplach řezů ve slabě kyselém roztoku.

5.4.3 Biotin

Biotin jako vitamin se v organismu vyskytuje vázaný na enzymy nebo další proteiny v různých tkáních, zejména v játrech, ledvinách, tukové tkáni a mléčné žláze. Jeho endogenní vazebná aktivita pro avidin byla zjištěna také v mastocytech a myelinu. Protože je poměrně výrazná, je nutné ji blokovat inkubací v 0,1% roztoku avidinu a 0,01% roztoku biotinu v PBS (fosfátový pufr).

5.4.4 Avidin

Sacharidy obsažené v molekule *avidinu* mohou svou vazbou na tkáňové komponenty také vyvolat falešně pozitivní reakci. K jejímu potlačení lze využít analoga avidinových sacharidů (např. alfa-metyl-D-mannosid), ale častější a spolehlivější metodou je náhrada avidinu v reakčních směsích streptavidinem, jehož molekula sacharidy neobsahuje [19].

5.5 Blok nespecifického pozadí

Nespecifické barvení pozadí je patrně nejčastějším problémem imunohistochemických metod. Jeho příčinou může být celá řada faktorů, od nespecifických vazeb mezi jednotlivými složkami inkubačních médií a tkáněmi, přes přítomnost endogenních enzymů ve tkáních, až po difúzi podmíněné lokalizační artefakty.

5.5.1 Hydrofobní interakce

Molekuly většiny proteinů, v první řadě postranní řetězce neutrálních aromatických aminokyselin (fenylalanin, tyroxin, tryptofan), mají hydrofobní charakter. Intramolekulární hydrofobní vazby mají veliký význam pro udržení terciární struktury proteinů, intermolekulární hydrofobní interakce usnadňují vznik imunokomplexů a zajišťují jejich stabilitu. Mezi tkáně a buňky inklinující k nespecifické reakci pozadí v důsledku hydrofobních interakcí řadíme zejména vazivo (kolagen, laminin, elastin, proteoglykany), epitelie (keratin) a adipocyty. Hydrofobní interakce mezi imunoglobuliny a zesíťovanými proteiny fixované tkáně lze ovlivnit optimalizací fixace. Vliv na sílu interakcí má přítomnost iontů v pufrch. Jedná se zejména o fosfáty, sírany, chloridy, dusičnany, kyanidy, amonné, sodné a vápenaté kationty. Čím nižší je jejich koncentrace, tím slabší jsou hydrofobní vazby. Nejčastější metodou inhibice nespecifických hydrofobních interakcí je aplikace blokujícího roztoku proteinů. Blokovací proteiny by měly pocházet ze séra stejného živočišného druhu jako sekundární či konjugovaná protilátka, použít lze ale i mléko. Fixace aldehydy (formalín, glutaraldehyd) hydrofobicitu tkáňových proteinů naopak zesiluje [2].

5.5.2 Elektrostatické interakce

Iontové vazby představují jednu z hlavních sil, které se podílí na imunochemických reakcích mezi antigeny a jejich protilátkami. Zároveň ale mohou být příčinou nespecifického barvení pozadí. Při fyziologickém pH (7,0 – 7,8) mají molekuly imunoglobulinů IgG většinou negativní náboj. Je to dáno jejich izoelektrickým bodem, který leží v oblasti pH 5,8 – 7,3. Pokud se negativně nabitá molekula IgG setká s pozitivně nabitými tkáňovými proteiny, dochází mezi nimi ke vzniku elektrostatických vazeb. Nespecifickou adsorpci primárních protilátek potom následuje vazba sekundárních, popřípadě konjugovaných protilátek. Takto vzniklé nespecifické zabarvení tkáňových řezů lze nejlépe eliminovat aplikací roztoku neutrálních proteinů. K tomu opět poslouží sérum živočišného druhu, z něž je vyrobena sekundární či konjugovaná protilátka [20].

5.5.3 Přítomnost přirozených protilátek

Přirozené protilátky se mohou v séru vyskytnout vlivem předchozí antigenní stimulace z vnějšího prostředí. Pokusy o jejich izolaci nebo odstranění ze séra zatím nebyly

úspěšné. Vzhledem k nízkým koncentracím těchto protilátek můžeme nespecifické reakci zabránit vyšším zředěním inkubační směsi.

5.5.4 Kontaminace řezů nebo reagensů cizorodými látkami

Izolované antigeny používané pro imunizaci bývají málokdy zcela čisté. Pokud organismus imunizovaného zvířete zareaguje na nějakou nečistotu tvorbou protilátek, mohou se tyto později stát zdrojem nespecifické reakce. Koncentrace kontaminujících protilátek bývají obvykle nízké, a proto je také možné předejít takové reakci vyšším naředěním séra. Pokud by titer těchto protilátek byl příliš vysoký, je nutné provést afinitní absorpci séra. Nespecifické reakce vyvolané přítomností přirozených nebo kontaminujících protilátek vyloučíme také používáním monoklonálních antisér [13].

5.5.5 Zkřížená reaktivita

Tato nespecifická reakce vzniká v důsledku přítomnosti shodných nebo velmi podobných antigenních determinant na různých antigenech. Protilátka namířená proti takové antigenní determinantě se potom může vázat nespecificky. Jako příklad lze uvést onkofetální protein, jehož některé epitopy můžeme najít i na běžných tkáňových proteinech. Nespecifickou reakci lze odstranit použitím antiséra z hyperimunizovaného zvířete.

5.5.6 Difúze tkáňových antigenních struktur do okolní tkáně

Týká se zejména molekul, které jsou v plazmě hodně koncentrované a mohou před fixací proniknout do tkání. Pokud tkáň není bezprostředně po odebrání patřičně fixována a antisérum není dostatečně zředěné, riziko difúze se zvyšuje.

5.5.7 Další nespecifické reakce

Existují však i další příčiny falešně pozitivní reakce: nekróza tkáně spojená s vylitím buněčného obsahu do intracelulárních prostor, vyschnutí řezu během zpracování nebo pohlčení antigenu fagocyty [13].

5.6 Chromogeny

Chromogeny jsou bezbarvé organické sloučeniny obsahující barvotvornou skupinu atomů: chromofor nebo fluorofor. Působíme-li vhodným způsobem na takovou skupinu atomů (enzymatická reakce, absorpce světla), dochází k vývinu barvy a tedy ke zviditelnění chromoforu.

5.6.1 Průkaz značení pomocí enzymů

Detekce antigenu, respektive vizualizace enzymu navázaného na protilátku nebo jinou molekulu (streptavidin, avidin, biotin) je prováděna metodami katalytické histochemie. Jako markery jsou běžně využívány velmi stabilní enzymy s relativně nenáročnými podmínkami pro úspěšný průkaz, nejčastěji se jedná o křenovou peroxidázu (HRP, horseradish peroxidase).

Principem imunoperoxidázových technik je zviditelnění enzymu vhodnou reakcí, jejímž produktem je nerozpustný pigment. V případě HRP je substrátem peroxid vodíku a jako chromogen je využíván nejčastěji 3,3'-diaminobenzidin (DAB). Toto původně rozpustné barvivo se během reakce oxiduje a vzniká stabilní hnědě zbarvený produkt nerozpustný v alkoholu. Použít lze ale i další chromogeny, např. karmínově červený AEC (3-amino-9-ethylkarbazol). Nevýhodou AEC je rozpustnost výsledného produktu v alkoholu, což vylučuje dehydrataci pomocí alkoholové řady před montováním. Proto je při použití AEC nutné montovat řezy do hydrofilního media [21].

Vzhledem k tomu, že součástí histochemické detekce je enzymatická reakce, musí být pro ni zajištěny vhodné podmínky (optimální pH, teplota, nepřítomnost inhibitorů, poměr mezi enzymem a substrátem, iontová síla roztoku). Komplikací průkazu enzymu imunoperoxidázovou technikou je často vysoká endogenní peroxidázová nebo pseudoperoxidázová aktivita studované tkáně. Tato aktivita může být zdrojem falešně pozitivního výsledku a je nutné ji předem potlačit [22].

5.6.2 Průkaz značení pomocí fluoroforů

Fluorescenční techniky využívají schopnosti molekul fluoroforů absorbovat světlo konkrétní vlnové délky a emitovat záření větší vlnové délky, než jakou samy absorbovaly. Světla různých vlnových délek jsou od sebe oddělena pomocí filtrů tak, aby

ve fluorescenčním mikroskopu bylo možné pozorovat pouze pozitivní emitovaný signál na černém pozadí.

Fluorescenční mikroskop je vybaven velice silným zdrojem světla, nejčastěji rtuťovou nebo xenonovou výbojkou. Mezi světelným zdrojem a preparátem je umístěna první sada filtrů, jejímž úkolem je excitace jednotlivých fluoroforů světlem o vybraných vlnových délkách. Druhá sada filtrů umístěná před okulárem slouží k odstínění škodlivého budícího záření a do objektivu vpouští pouze světlo emitované daným fluoroforem. Nejpoužívanějšími fluorofory v současné době jsou fluorescein-isothiokyanát (FITC) emitující zelenou barvu, tetrametyl-rhodamin-isothiokyanát (TRITC) emitující červenou barvu a texaská červeň, vzácně fluorofory emitující modrou barvu (např. kumarin).

Kombinací protilátek s různou specifitou a značených různými fluorofory je možné s pomocí softwaru sledovat simultánně více různých antigenů na jednom preparátu. Nevýhodou fluorescenční mikroskopie obecně je působení silného záření na molekuly fluoroforů. Fluorofory jsou intenzivním světlem postupně rozkládány, podléhají nevratným konformačním změnám a nakonec ztrácí schopnost absorpce a emise záření [23].

5.7 Barvení pozadí

Při výskytu pozitivní reakce ve zkoumaném imunohistochemickém preparátu je potřeba lokalizovat danou pozitivitu vzhledem k okolním známým strukturám. Pro předběžnou orientaci bývá nejčastěji využíváno dobarvování buněčných jader. K tomu se využívá pro světelnou mikroskopii nejčastěji hematoxylin a pro fluorescenční např. Hoechst, či DAPI [24].

6 Experimentální část

6.1 Sledované markery aterogeneze

6.1.1 Buněčné adhezivní molekuly

Buněčné adhezivní molekuly jsou látky proteinového charakteru, které jsou exprimované na povrchu všech tkání organismu. Účastní se řízení řady fyziologických dějů jako jsou embryogeneze, buněčný růst a diferenciaci, hojení ran či obnova tkání. Uplatnění nalézají ale také při patologických procesech, podílejí se např. na interakcích mezi složkami imunitního systému [25].

Podle strukturních vlastností rozlišujeme 4 základní skupiny adhezivních molekul. Jsou to selektiny, integriny, immunoglobulinová skupina a kadheriny.

Imunoglobulinová skupina adhezivních molekul představuje 50% všech povrchových molekul leukocytů. Jedná se o látky glykoproteinového charakteru tvořené opakujícími se imunoglobulinovými doménami z beta řetězců. Zprostředkovávají jak homofilní (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na stejnou molekulu ve druhé buňce), tak heterofilní interakce (vazba adhezivní molekuly v jedné buňce na neidentickou molekulu ve druhé buňce). Patří sem celá řada adhezivních molekul: antigenně specifické receptory T lymfocytů a B lymfocytů (TCR, BCR), koreceptory T lymfocytů důležité pro správnou funkci při imunitních reakcích (CD4 a CD8) a další [26].

Z hlediska vztahu k ateroskleróze jsou nejvýznamnějšími zástupci vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) a intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) [27].

6.1.1.1 Funkce ICAM-1, VCAM-1

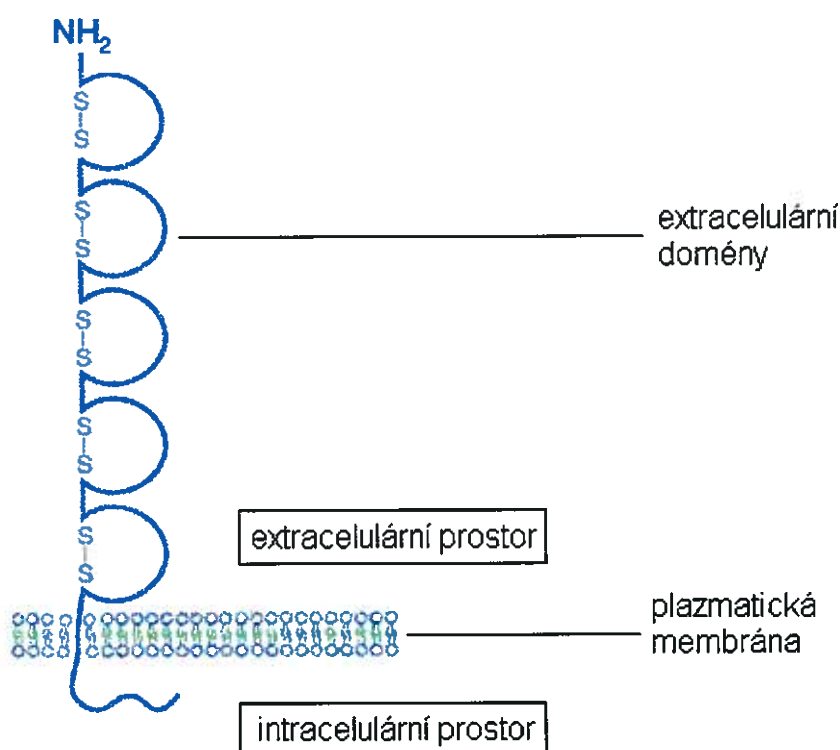
Jak ICAM-1, tak VCAM-1 se významně podílí na diapedezi leukocytů. Prostřednictvím vazby povrchových struktur leukocytů ($\alpha_4\beta_1$ integrinu, někdy také $\alpha_4\beta_7$ integrinu) stabilizují jejich adhezi na endotel.

ICAM-1 je schopen interagovat s řadou dalších molekul, jako jsou C3b složka komplementu, fibrinogen nebo bakteriální lipopolysacharid.

VCAM-1 zřejmě selektivně vycytává mononukleární leukocyty, které, na rozdíl od neutrofilů, exprimují α_4 integriny [28].

6.1.1.2 Struktura ICAM-1, VCAM-1

Jedná se o transmembránové glykoproteiny. Molekula VCAM-1 má celkem sedm extracelulárních domén, přičemž domény 1 a 4 fungují jako specifická vazebná místa pro vazbu $\alpha_4\beta_1$ integrinu (VLA-4) a $\alpha_4\beta_7$ integrinu. Molekula ICAM-1 má pět extracelulárních domén (viz obr. 8). Domény 1 a 3 jsou specifickými vazebnými místy pro vazbu $\alpha_1\beta_2$ integrinu (LFA-1), respektive pro vazbu $\alpha_M\beta_2$ integrinu (tj. komplement receptor 3 nebo též Mac-1), které jsou exprimovány na leukocytech [29].



Obr.8 Struktura molekuly ICAM-1. Extracelulární část je tvořena sérií domén. (převzato z Price D.T. et. al., upraveno)

6.1.1.3 Exprese VCAM-1 a ICAM-1

VCAM-1 je exprimován endoteliálními buňkami, makrofágy a hladkosvalovými buňkami [30]. Studie na králících a myších prokázaly, že endotel exprimuje VCAM-1 ještě před akumulací makrofágů a T lymfocytů v oblastech, které jsou predispoziční ke vzniku lézí. Lokalizace těchto míst je často ovlivněna hemodynamickými vlastnostmi, především shear stresem.

ICAM-1 je exprimován ve stejných oblastech jako VCAM-1, ale exprese ICAM-1 je pozorována navíc i v oblastech s nízkou pravděpodobností výskytu aterosklerotických lézí.

U malých aterosklerotických lézí jsou VCAM-1 i ICAM-1 exprimovány především endoteliálními buňkami, VCAM-1 je exprimován i hladkosvalovými buňkami, které přiléhají k aterosklerotické lézi. U pokročilejších aterosklerotických lézí jsou VCAM-1 i ICAM-1 exprimovány většinou buněk, které se nacházejí v tunica intima [31].

Expese těchto adhezivních molekul je ovlivňována řadou faktorů, které se uplatňují i v patogenezi aterosklerózy. Hypercholesterolémie, oxidované LDL, diabetes, kouření a hemodynamický stres (nízký shear stress) zvyšují expresi jak ICAM-1, tak VCAM-1. Expese obou těchto molekul může být indukována také zánětlivými cytokiny (např. IL-1 nebo TNF- α) [32].

6.1.2 Endoglin

6.1.2.1 Struktura proteinu

Endoglin (CD 105) se nachází na buněčném povrchu jako homodimerická transmembránová bílkovina o hmotnosti 180 kDa. Její vnější domény váží s vysokou afinitou izoformy TGF- β 1 a TGF- β 3 [33]. Transmembránové a intracelulární domény CD 105 mají podobnost s betaglykanem ze 71% [34].

6.1.2.2 Expese endoglinu

Expese endoglinu byla lokalizována převážně na cévním endotelu, a to jak v aortě, tak i v menších cévách a kapilárách okolního myokardu. Dále byla expese CD 105 detekována u makrofágů, hladkých svalových buněk a fibroblastů. Jeho tvorba se zvyšuje při hypoxii.

Výsledky imunohistochemické detekce ve světelné mikroskopii prokázaly expresi v aterosklerotických plátech, zejména na cévním endotelu. Výrazná expese byla pozorována také v tunica media pod vyvíjejícím se aterosklerotickým plátem.

Endoglin je považován za významný marker angiogeneze. Jeho expese je významná jak v embryonálním vývoji, tak při procesu hojení ran, při infarktech a během kancerogeneze [35]. Zvýšená expese endoglinu je dávana do souvislosti s horší prognózou nádorového onemocnění. Mutace genu pro endoglin navíc vede k rozvoji hereditární hemorrhagické telangiektázie [36].

6.2 Použité materiály

6.2.1 Tkáňové řezy

Veškerá imunohistochemická barvení byla provedena na cévách získaných z geneticky modifikovaného kmene myši. Jednalo se o samice kmene C57BL/6J s dvojitým deficitem apolipoproteinu E a LDL-receptoru vážící 15-20 gramů. Tyto myši byly zakoupeny v *Taconic Europe (Dánsko)* a ustájeny ve zvěřinci Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

Odebrané segmenty tkáně tvořila aorta spolu s horní polovinou srdce. Tyto segmenty byly ponořeny do zmrazovacího média (*tissue freezing medium, Leica, Praha, Česká republika*), následně zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při minus 80°C. Imunohistochemická analýza byla provedena v 1 cm aortálního sinu a části aortálního oblouku. Pro hodnocení byly nakrájeny série příčných řezů o tloušťce 7 μm na zmrazovacím mikrotomu.

Pro detekci exprese VCAM-1 a endoglinu byla použita metodika avidin-biotin s detekcí pomocí DAB, který poskytuje v místě detekce antigenu ve tkáni hnědou barevnou reakci.

6.2.2 Protilátky

6.2.2.1 Primární protilátky

Pro detekci exprese endoglinu v cévní stěně jsme použili pro světelnou i fluorescenční mikroskopii stejnou monoklonální protilátku: Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) ve zředění 1/100 (*Pharmingen, USA*).

K detekci exprese markeru VCAM-1 v cévní stěně byla použita pro světelnou mikroskopii monoklonální protilátka Rat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) ve zředění 1/100 (*Pharmingen, USA*). Pro fluorescenční mikroskopii jsme z důvodu snahy detekovat oba antigeny (VCAM-1 i endoglin) na stejném řezu použili jinou protilátku: Goat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) ve zředění 1/100 (*R&D Systems, USA*).

6.2.2.2 Sekundární protilátky

Jako sekundární byla pro světelnou mikroskopii použita monoklonální protilátka Goat Anti-Rat IgG (*Vector Laboratories*).

Pro fluorescenční mikroskopii jsme použili monoklonální protilátky Chicken Anti-Goat ALEXA 588 (červená) a Goat Anti-Rat ALEXA 486 (zelená) (*Molecular Probes*).

6.2.3 Detekční systémy

K vizualizaci navázaných protilátek ve světelném mikroskopu jsme použili diaminobenzidín (DAB substrát-chromogen roztok, *DAKO, Carpinteria, USA*).

Histologické řezy pozorované ve fluorescenčním mikroskopu byly zamontovány do speciálního fluorescenčního média Vectashield (*Vector Laboratories*).

Fotodokumentace a digitalizace snímků z fluorescenčního mikroskopu Olympus BX byla provedena digitální kamerou Pixelink PL-A642 (*Vitana Corp., USA*) za pomoci softwaru LUCIA verze 5.0 (*Laboratory Imaging Prague, Česká republika*).

6.3 Pracovní postup

6.3.1 Nepřímá imunofluorescence na zmrazených řezech

- 1) oschnutí řezů v termostatu (60 minut)
- 2) fixace tkáňových řezů v acetonu (-20°C; 15 minut)
- 3) usušení řezů (15 minut)
- 4) promytí řezů v PBS (2x5 minut)
- 5) aplikace směsi primárních protilátek Rat Anti-Mouse CD105 (endoglin) (*Pharmingen, USA*) a Goat Anti-Mouse CD106 (VCAM-1) (*R&D Systems, USA*) (inkubace 60 minut)
- 6) promytí řezů v PBS (2x5 min)
- 7) aplikace sekundární protilátky Chicken Anti-Goat ALEXA 588 (*Molecular Probes*) (inkubace 60 minut, ve tmě)
- 8) promytí řezů v PBS (4x5 minut, ve tmě)
- 9) aplikace sekundární protilátky Goat Anti-Rat ALEXA 486 (*Molecular Probes*) (inkubace 60 minut)
- 10) promytí řezů v PBS (5 minut)
- 11) dobarvení jader pomocí fluorescenčního barviva Hoechst
- 12) montování do fluorescenčního média Vectashield (*Vector Laboratories*)

6.3.2 ABC systém

- 1) oschnutí řezů (30 minut)
- 2) fixace tkáňových řezů v acetonu (-20°C; 15 minut)
- 3) usušení řezů (30 minut)

- 4) promytí řezů v PBS (2x5 minut)
- 5) aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (30 minut)
- 6) inkubace s avidinem D (15 minut)
- 7) promytí řezů v PBS (5 minut)
- 8) inkubace s biotinem (15minut)
- 9) inkubace s primární protilátkou Rat Anti-Mouse (*Pharmlingen, USA*) (60 minut)
- 10) promytí řezů v PBS (2 x 5 minut)
- 11) aplikace 10% blokujícího zvířecího séra (15 minut)
- 12) aplikace biotinylované sekundární protilátky Goat Anti-Rat IgG (*Vector Laboratories*) (inkubace 30 minut)
- 13) promytí řezů v PBS (2x5 minut)
- 14) promytí řezů v 3% H₂O₂ (15 minut)
- 15) promytí řezů v PBS (2x5 minut)
- 16) inkubace s komplexem avidin-biotin (ABC) (*Vector Laboratories*) (30minut)
- 17) promytí řezů v PBS (2x5 minut)
- 18) inkubace s roztokem chromogenu (DAB)
- 19) dobarvení bučných jader v hematoxylinu (5 sekund)
- 20) oplach řezů v acetonu
- 21) proplach řezů v aceton-xylenu (10:1) (3 minuty)
- 22) proplach řezů v aceton-xylenu (1:10) (3 minuty)
- 23) proplach řezů v xylenu (3 x 2 minuty)
- 24) montování do Eukittu

7 Výsledky

7.1.1 Imunohistochemické barvení VCAM-1 v oblasti aortálního sinu

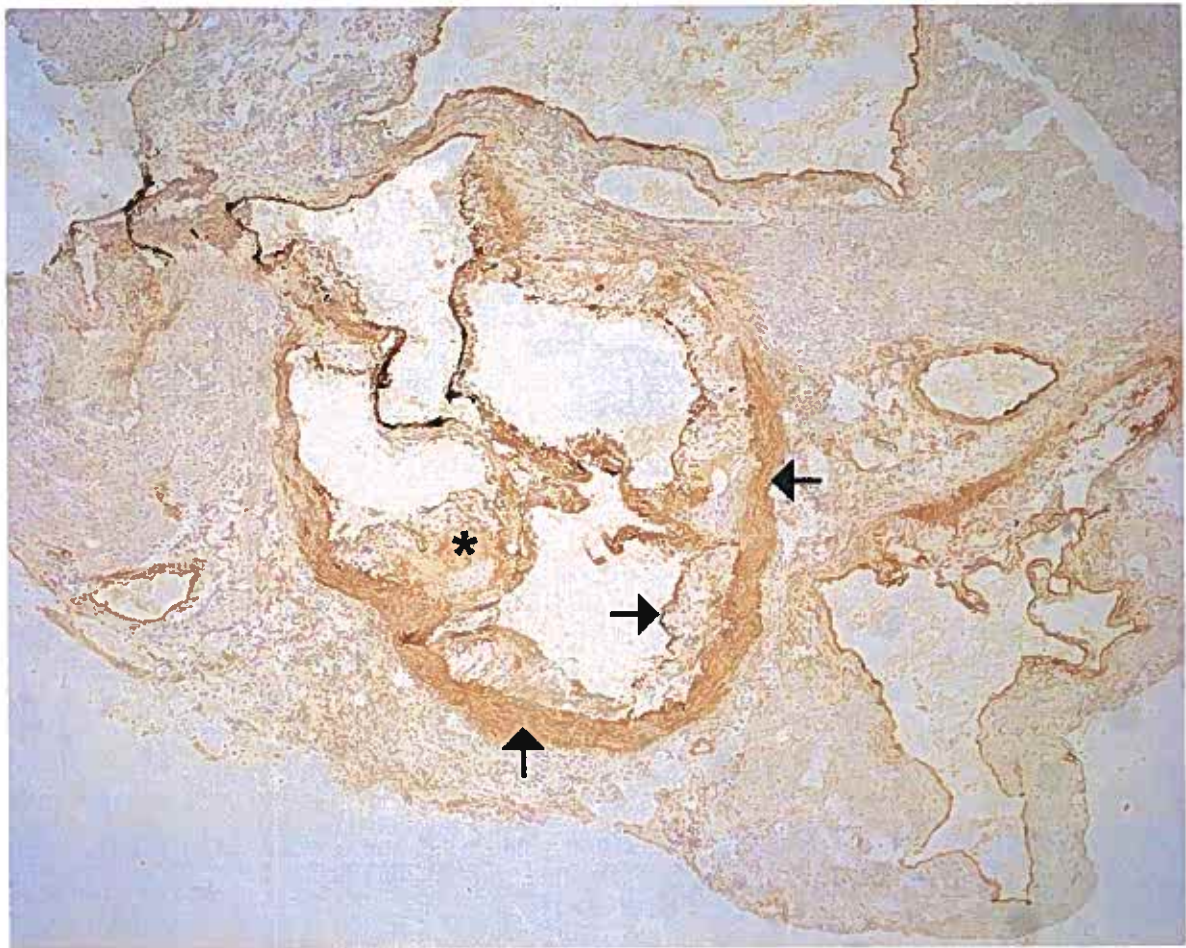
Ve světelné mikroskopii byla exprese VCAM-1 pozorována v tunica media cév pod aterosklerotickými pláty a v aterosklerotických plátech. Silná exprese byla pozorována také na cévním endotelu (v oblasti plátu i mimo něj). Viz obr. 9 a 10.

7.1.2 Imunohistochemické barvení endoglinu v oblasti aortálního sinu

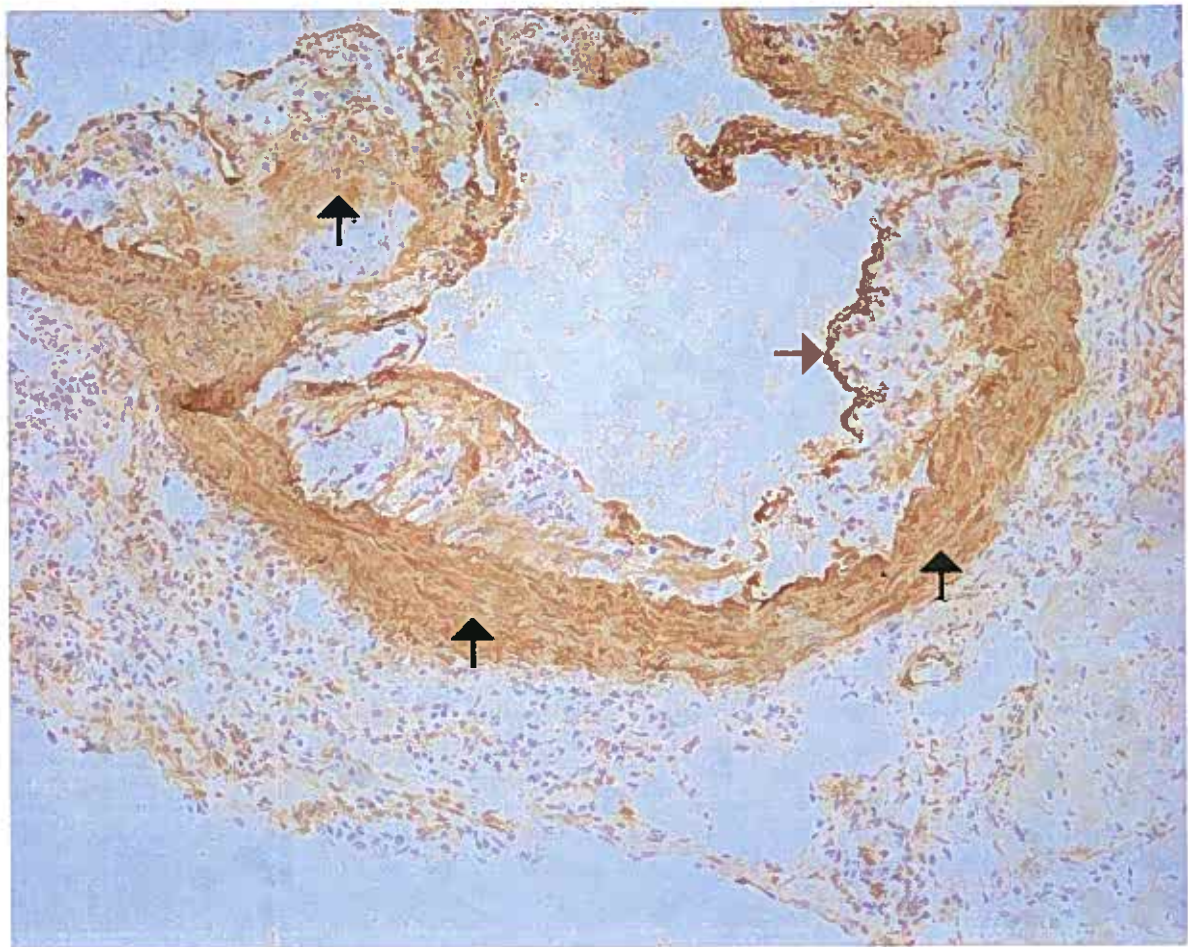
Expresí endoglinu byla pozorována hlavně v cévním endotelu, a to jak v oblasti aorty, tak menších cév a kapilár v okolním myokardu. U velkých aterosklerotických plátů byla exprese endoglinu na několika místech pozorována i v aterosklerotických plátech. Viz obr. 11 a 12.

7.1.3 Kolokalizace endoglinu a VCAM-1

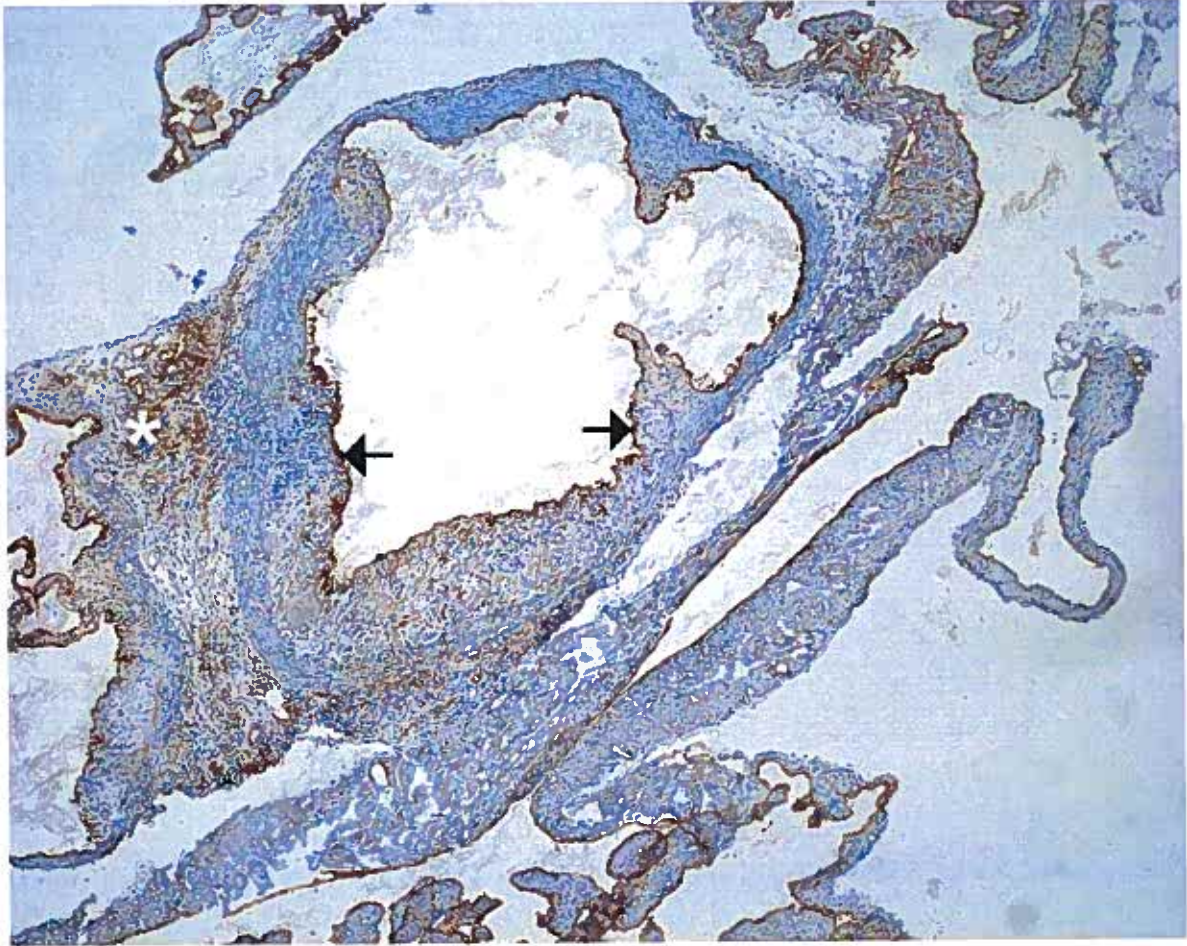
Fluorescenční barvení demonstrující barvení VCAM-1 a endoglinu potvrdilo expresi obou markerů popsanou ve světelné mikroskopii. Byla nalezena pouze velmi slabá kolokalizace obou antigenů, a to v oblasti několika buněk endotelu, který pokrývá aterosklerotický plát. Z toho lze usuzovat, že endoglin a VCAM-1 jsou v aterosklerotických plátech exprimovány převážně různými buňkami. Viz obr. 13 a 14.



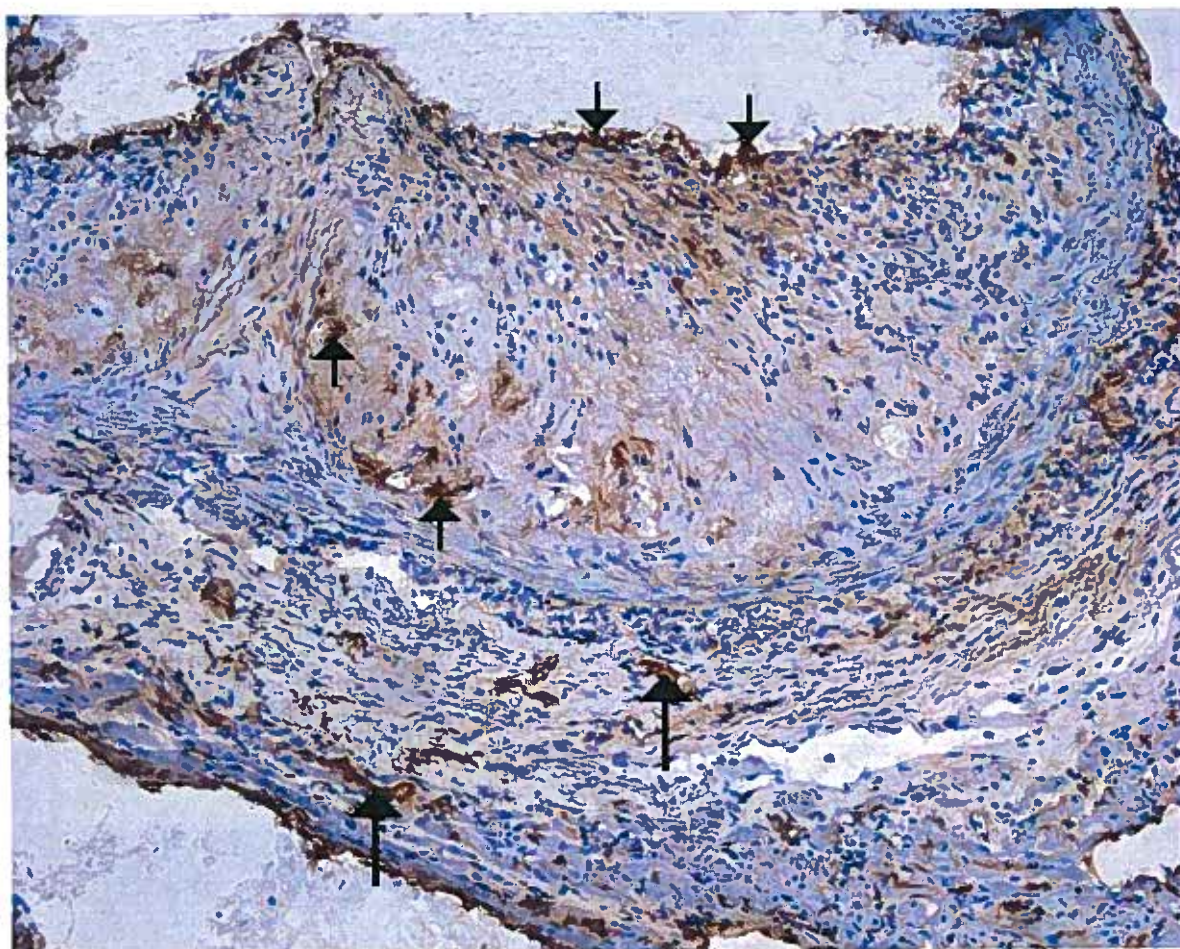
Obr.9 *Imunohistochemické barvení VCAM-1; zvětšeno 40x.* Silná exprese je pozorována na cévním endotelu, v tunica media cévy pod aterosklerotickým plátem (označeno šipkami) i v aterosklerotickém plátu (označeno hvězdičkou). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.



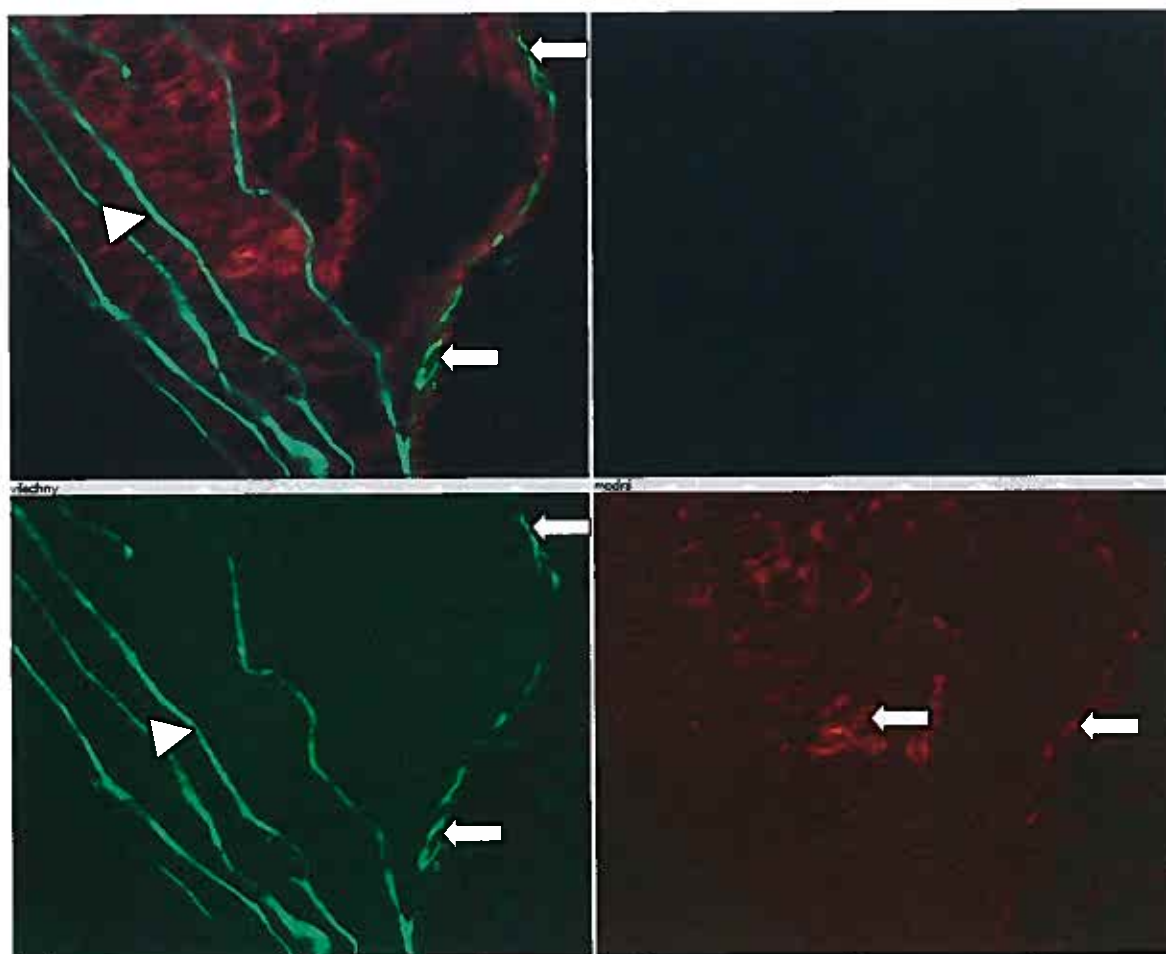
Obr.10 Imunohistochemické barvení VCAM-1; zvětšeno 100x. Na obrázku je patrná silná exprese zejména v tunica media cévy pod aterosklerotickým plátem. Šipky ukazují také na expresi VCAM-1 na cévním endotelu a v aterosklerotickém plátu. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.



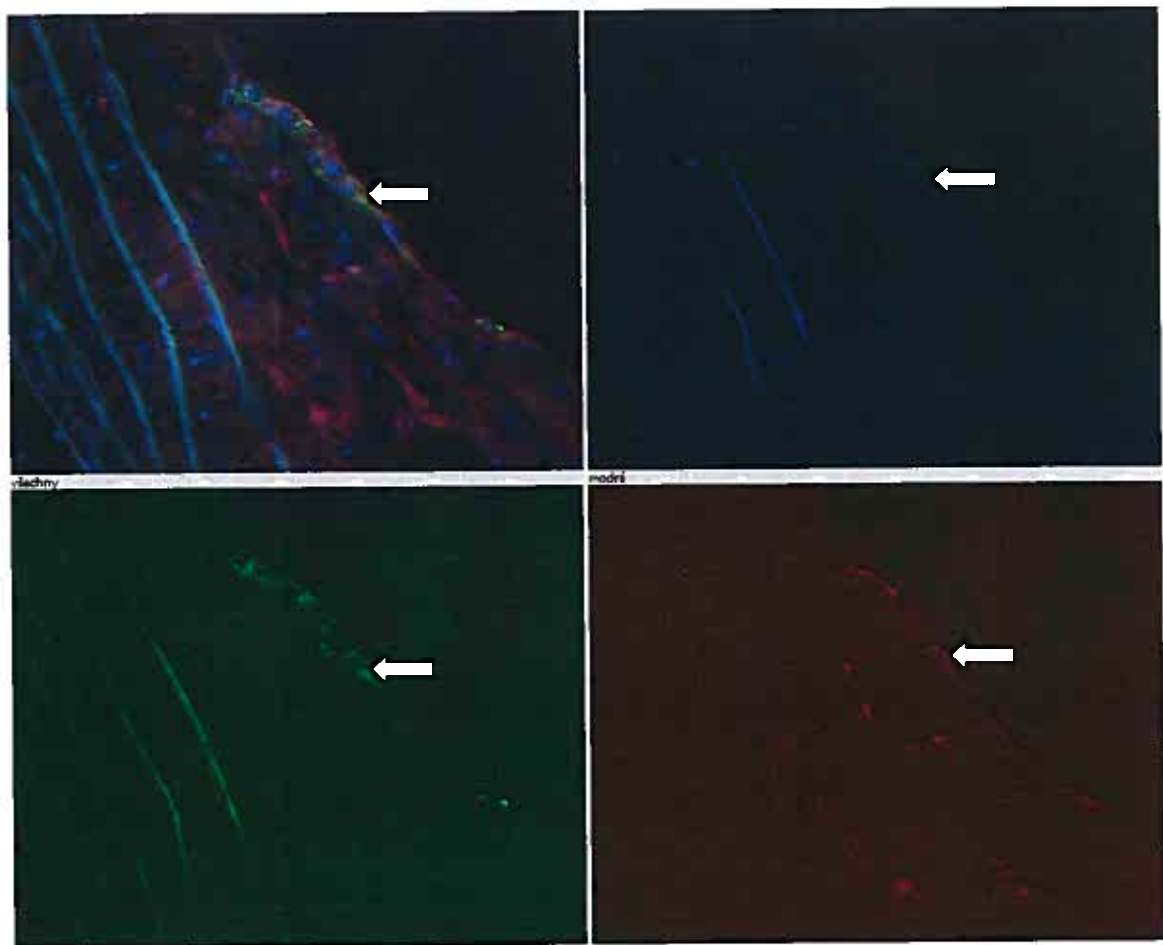
Obr.11 Imunohistochemické barvení endoglinu; zvětšeno 40x. Exprese endoglinu je detekována na endotelu aorty (označeno černými šipkami) a také v menších cévách a kapilárách okolního myokardu (označeno bílou hvězdičkou v levé části obrázku). Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.



Obr.12 Imunohistochemické barvení endoglinu; zvětšeno 100x. Na detailu cévní stěny můžeme pozorovat endoteliální expresi endoglinu lokalizovanou zejména na povrchu aterosklerotického plátu. Slabou expresi vidíme také uvnitř plátu a v okolním myokardu. Buněčná jádra jsou dobarvena hematoxylinem.



Obr.13 Imunohistochemické barvení endoglinu a VCAM-1, kolokalizace obou antigenů pomocí fluorescenční mikroskopie; zvětšeno 400x. Zelený barevný kanál představuje barvení endoglinu na endotelu aterosklerotického plátu (šipka). Zelené rovnoběžné podélné struktury jsou elastické blanky v tunica media, tato vlákna zde vykazují autofluorescenci (konec šipky). Červený barevný kanál ukazuje na barvení VCAM-1 v celé oblasti plátu (šipka). Modrý kanál nezobrazuje žádné barvení, viditelná je pouze autofluorescence elastických vláken v tunica media aorty. V obrázku spojujícím všechny barevné kanály se ukazuje, že oba antigeny jsou víceméně exprimovány jinými buňkami.



Obr.14 Imunohistochemické barvení endoglinu a VCAM-1, kolokalizace obou antigenů pomocí fluorescenční mikroskopie; zvětšeno 400x. Zelený barevný kanál představuje barvení endoglinu na endotelu aterosklerotického plátu (šipka). Červený barevný kanál ukazuje na barvení VCAM-1 v celé oblasti plátu (šipka). Modrý kanál ukazuje na barvení buněčných jader ve stěně cévy, viditelná je také autofluorescence elastických vláken v tunica media aorty. V obrázku, kde jsou všechny barevné kanály spojené, lze kolokalizaci exprese VCAM-1 a endoglinu pozorovat pouze na jednom místě (šipky).

8 Závěr

V této bakalářské práci jsme se zaměřili zejména na základní seznámení s metodami imunohistochemie a na standardizaci imunohistochemických barvení ve světelné a fluorescenční mikroskopii. S použitím v literatuře nejčastěji citovaných metodik (avidin-biotin technika ve světelné mikroskopii a metoda nepřímé imunohistochemie ve fluorescenční mikroskopii) jsme sledovali lokalizaci vybraných markerů, které se podílí na aterogenezi v cévní stěně u apoE/LDLR deficientního myšího modelu aterosklerózy.

Výsledky studia exprese VCAM-1 v oblasti aortálního sinu a oblouku ve světelné mikroskopii prokázaly jeho expresi zejména na cévním endotelu a v aterosklerotických plátech. Výrazná exprese byla pozorována také v tunica media pod vyvíjejícím se aterosklerotickým plátem. Tyto výsledky jsou plně v souladu s literárními údaji a potvrzují roli VCAM-1 v experimentální aterogenezi.

Dalším sledovaným markerem byl endoglin, cílem bylo popsat jeho lokalizaci v oblasti aortálního oblouku u použitého experimentálního modelu. Tento potenciálně nový faktor zasahuje do regulace funkcí významného antiaterogenního faktoru TGF- β a změny jeho exprese by tak mohly hrát roli v procesu aterogeneze. Exprese endoglinu byla lokalizována na cévním endotelu, a to jak v aortě, tak i v menších cévách a kapilárách okolního myokardu.

Posledním úkolem byla kolokalizace VCAM-1 a endoglin exprimujících buněk. Ve fluorescenční mikroskopii byla imunohistochemicky prokázána rozdílná lokalizace jejich exprese v jednom histologickém řezu. Z toho lze usuzovat, že VCAM-1 a endoglin nejsou exprimovány stejnými buňkami.

9 Seznam zkratek

ABC	avidin-biotin komplex
AEC	3-amino-9-ethylkarbazol
ALP	alkalická fosfatáza
APAAP	alkaline-phosphatase-anti-alkaline-phosphatase
apoE	apolipoprotein E
CAM	cell adhesive molecules; buněčné adhezivní molekuly
CD	cluster of differentiation
DAB	3,3'-diaminobenzidin
Fab	fragment antigen binding; antigen vázající fragmenty
FITC	fluorescein-isothiokyanát
HRP	horseradish peroxidase; křenová peroxidáza
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecule-1
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
LDL	low density lipoprotein
LDLR	LDL receptor
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen
PAP	peroxidase-anti peroxidase
PBS	phosphate buffered saline; fosfátový pufr
SABC	streptavidin-biotin komplex
TGF- β	transforming growth factor β
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TRITC	tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát
VCAM-1	vascular cell adhesive molecule-1
VLA	very late antigen

10 Seznam použité literatury

- [1] K. Tanji, E. Bonilla, Optical imaging techniques (histochemical, immunohistochemical, and in situ hybridization staining methods) to visualize mitochondria, *Methods Cell Biol* 80 (2007) 135-154.
- [2] C.J. Van Noorden, Direct comparison of enzyme histochemical and immunohistochemical methods to localize an enzyme, *Mar Environ Res* 54 (2002) 575-577.
- [3] R.Y. Moore, J.P. Card, Neurotransmitter histochemistry: comparison of fluorescence and immunohistochemical methods, *Methods Enzymol* 103 (1983) 619-630.
- [4] K. Kashima, S. Yokoyama, T. Daa, I. Nakayama, P.A. Nickerson, S. Noguchi, Cytoplasmic biotin-like activity interferes with immunohistochemical analysis of thyroid lesions: a comparison of antigen retrieval methods, *Mod Pathol* 10 (1997) 515-519.
- [5] K. Chida, Immunohistochemical detection of alkaline phosphatase in formalin-fixed and paraffin-embedded rat organs by means of avidin-biotin peroxidase complex method, *Okajimas Folia Anat Jpn* 70 (1993) 203-207.
- [6] J. Ellis, G. Halliday, A comparative study of avidin-biotin-peroxidase complexes for the immunohistochemical detection of antigens in neural tissue, *Biotech Histochem* 67 (1992) 367-371.
- [7] K.M. Fung, A. Messing, V.M. Lee, J.Q. Trojanowski, A novel modification of the avidin-biotin complex method for immunohistochemical studies of transgenic mice with murine monoclonal antibodies, *J Histochem Cytochem* 40 (1992) 1319-1328.
- [8] A. Kiss, M. Palkovits, L.R. Skirboll, Light microscopic triple-colored immunohistochemical staining on the same vibratome section using the avidin-biotin-peroxidase complex technique, *Histochemistry* 88 (1988) 353-356.
- [9] E. Sabattini, K. Bisgaard, S. Ascani, S. Poggi, M. Piccioli, C. Ceccarelli, F. Pieri, G. Fraternali-Orcioni, S.A. Pileri, The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques, *J Clin Pathol* 51 (1998) 506-511.

- [10] K.H. Wiedorn, T. Goldmann, C. Henne, H. Kuhl, E. Vollmer, EnVision+, a new dextran polymer-based signal enhancement technique for in situ hybridization (ISH), *J Histochem Cytochem* 49 (2001) 1067-1071.
- [11] A.C. Feller, M.R. Parwaresch, H.H. Wacker, H.J. Radzun, K. Lennert, Combined immunohistochemical staining for surface IgD and T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies in human tonsils, *Histochem J* 15 (1983) 557-562.
- [12] S.M. Sagar, Somatostatin-like immunoreactive material in the rabbit retina: immunohistochemical staining using monoclonal antibodies, *J Comp Neurol* 266 (1987) 291-299.
- [13] S.M. Hsu, J. Cossman, E.S. Jaffe, A comparison of ABC, unlabeled antibody and conjugated immunohistochemical methods with monoclonal and polyclonal antibodies--an examination of germinal center of tonsils, *Am J Clin Pathol* 80 (1983) 429-435.
- [14] W.Y. Naritoku, C.R. Taylor, A comparative study of the use of monoclonal antibodies using three different immunohistochemical methods: an evaluation of monoclonal and polyclonal antibodies against human prostatic acid phosphatase, *J Histochem Cytochem* 30 (1982) 253-260.
- [15] H.J. Shin, D.M. Shin, T. Shah, J.Y. Ro, Methods in pathology. Optimization of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemical staining by microwave heating in zinc sulfate solution, *Mod Pathol* 7 (1994) 242-248.
- [16] A. Hoog, V.E. Gould, L. Grimelius, W.W. Franke, S. Falkmer, G. Chejfec, Tissue fixation methods alter the immunohistochemical demonstrability of synaptophysin, *Ultrastruct Pathol* 12 (1988) 673-678.
- [17] A.M. Mekota, M. Vermehren, Determination of optimal rehydration, fixation and staining methods for histological and immunohistochemical analysis of mummified soft tissues, *Biotech Histochem* 80 (2005) 7-13.
- [18] J.A. Ramos-Vara, M.E. Beissenherz, Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers, *J Vet Diagn Invest* 12 (2000) 307-311.
- [19] J.E. Hill, P.C. McCaskey, M.T. Sutton, S. Hafner, "Comparison of immunochemical (enzyme-linked immunosorbent assay) and immunohistochemical methods for the detection of central nervous system tissue in meat products," a

comment on: *J. Food Prot.* 69(3):644-650 (2006), *J Food Prot* 70 (2007) 276-277; author reply 277-279.

- [20] R.Y. Osamura, N. Komatsu, E. Nakahashi, K. Watanabe, Light and electron microscopical combined staining by immunohistochemical and enzyme histochemical methods using rat prolactin-secreting pituitary tumours, *Histochem J* 12 (1980) 371-379.
- [21] S. Leal, C. Diniz, C. Sa, J. Goncalves, A.S. Soares, C. Rocha-Pereira, P. Fresco, Semiautomated computer-assisted image analysis to quantify 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride-immunostained small tissues, *Anal Biochem* 357 (2006) 137-143.
- [22] D. Erdogan, C. Elmas, C. Ilgaz, Visualization of sperm by immunohistochemistry: application of alternative counterstains, *Arch Androl* 51 (2005) 233-238.
- [23] K. Egervari, Z. Szollosi, Z. Nemes, V. Kaczur, Comparison of immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization assessment of HER-2 status in routine practice, *Am J Clin Pathol* 125 (2006) 155-156.
- [24] N. Solanes, M. Rigol, J. Ramirez, J. Segales, M. Roque, J.M. Marimon, F. Perez-Villa, E. Roig, G. Sanz, M. Heras, Histological basis of the porcine femoral artery for vascular research, *Anat Histol Embryol* 34 (2005) 105-111.
- [25] Y. Jang, A.M. Lincoff, E.F. Plow, E.J. Topol, Cell adhesion molecules in coronary artery disease, *J Am Coll Cardiol* 24 (1994) 1591-1601.
- [26] J. Joseph-Silverstein, R.L. Silverstein, Cell adhesion molecules: an overview, *Cancer Invest* 16 (1998) 176-182.
- [27] Z. Mareckova, S. Heller, K. Horky, [Cell adhesion molecules and their role in pathophysiologic processes], *Vnitr Lek* 45 (1999) 46-50.
- [28] P.L. Walpola, A.I. Gotlieb, M.I. Cybulsky, B.L. Langille, Expression of ICAM-1 and VCAM-1 and monocyte adherence in arteries exposed to altered shear stress, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15 (1995) 2-10.
- [29] H. Li, M.I. Cybulsky, M.A. Gimbrone, Jr., P. Libby, An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium, *Arterioscler Thromb* 13 (1993) 197-204.
- [30] K. Ley, Y. Huo, VCAM-1 is critical in atherosclerosis, *J Clin Invest* 107 (2001) 1209-1210.
- [31] M.J. Elices, L. Osborn, Y. Takada, C. Crouse, S. Luhowskyj, M.E. Hemler, R.R. Lobb, VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin

- VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site, *Cell* 60 (1990) 577-584.
- [32] M.I. Cybulsky, K. Iiyama, H. Li, S. Zhu, M. Chen, M. Iiyama, V. Davis, J.C. Gutierrez-Ramos, P.W. Connelly, D.S. Milstone, A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis, *J Clin Invest* 107 (2001) 1255-1262.
- [33] J. Obreo, L. Diez-Marques, S. Lamas, A. Duwell, N. Eleno, C. Bernabeu, A. Pandiella, J.M. Lopez-Novoa, A. Rodriguez-Barbero, Endoglin expression regulates basal and TGF-beta1-induced extracellular matrix synthesis in cultured L6E9 myoblasts, *Cell Physiol Biochem* 14 (2004) 301-310.
- [34] A. Letamendia, P. Lastres, L.M. Botella, U. Raab, C. Langa, B. Velasco, L. Attisano, C. Bernabeu, Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan, *J Biol Chem* 273 (1998) 33011-33019.
- [35] M. Guerrero-Esteo, P. Lastres, A. Letamendia, M.J. Perez-Alvarez, C. Langa, L.A. Lopez, A. Fabra, A. Garcia-Pardo, S. Vera, M. Letarte, C. Bernabeu, Endoglin overexpression modulates cellular morphology, migration, and adhesion of mouse fibroblasts, *Eur J Cell Biol* 78 (1999) 614-623.
- [36] F. Lebrin, M. Deckers, P. Bertolino, P. Ten Dijke, TGF-beta receptor function in the endothelium, *Cardiovasc Res* 65 (2005) 599-608.