

Principy enzymové histochemie

Enzymová histochemie (též nazývaná katalytická histochemie) je metoda sloužící k detekci aktivity enzymů v buňkách nebo tkáních organismu. V současnosti je in situ prokázáno asi 150 enzymů, tj. asi 1/10 z celkového počtu enzymů. Samotný princip katalytické aktivity spočívá ve dvou krocích.

První krok je samotná *histochemická reakce*: *tkáň s enzymem + substrát = produkt*.

Druhý krok je "**reakce vizualizace**": z testovaného produktu první reakce vznikne barevná a nerozpustná sloučenina.

Aby proběhly obě tyto výše uvedené reakce musí být dodrženy určité podmínky.

- Zachování aktivity enzymů
- Zachování struktury buněk a tkání - kryostatové řezy (chemická fixace téměř vždy snižuje aktivitu enzymu)
- Ph prostředí
- Substrát v nadbytku

Tyto optimální podmínky zajistíme pomocí *inkubačního prostředí*, které má tyto složky:

1. **Substrát**: ten by měl být rozpustný ve vodě při pH optimální pro daný enzym a měl by mít schopnost vytvářet barevný finální produkt a zároveň dostatečně rychle pronikat do míst fyziologické lokalizace enzymu. Pokud je produkt reakce bezbarvý, přidává se do IP činidlo sloužící k jeho zviditelnění.
2. **Aktivátory**: tj. látka zvyšující aktivitu enzymu
3. **Inhibitory**: tj. látka snižující aktivitu enzymu
4. **Vhodný pufr**: zajistí potřebné pH optimum (fosfátový, citranový, tris-maleátový, octanový, aj.)

Nejprve tedy nabídneme enzymu vhodný substrát:

Enzym	Funkce
oxidoreduktázy	katalyzují oxidační nebo redukční reakce
transferázy	přenášejí chemické skupiny z jedné mlk na druhou
hydrolázy	štěpí esterové, glykosidické a peptidové vazby za přítomnosti vody
fosfatázy	různé fosfáty <ul style="list-style-type: none">■ glycerolfosfát (zastaralé)■ α-naftylfosfát (nebo substituované)■ BCIP
dehydrogenázy	oxidovatelný substrát odštěpující vodík
peroxidázy	peroxid vodíku
esterázy	hydrolyzovatelný ester
glykosidázy	glykosidická vazba (cukry, glykoproteiny, glykolipidy)
sulfatázy	sulfoestery
nukleotidázy	nukleotidový řetězec
proteázy	protein nebo peptid
ligázy	katalyzují syntetické reakce za současného štěpení ATP.

Poté zviditelníme reakční produkt reakcí s chromogenem – **vizualizační reakce**:

Precipitace s kationty kovů	vznik barevné nerozpustné soli Pb, Co
Simultanní azokopulace	produkt (naftol) se převede na azobarvivo
Indigogenní reakce	štěpení na indoxyl a jeho oxidace na indigo
Tetrazoliová metoda	redukce tetrazoliové soli na barevný formazan
Peroxidázová reakce	oxidace DAB (diaminobenzidin)

Samotné provedení

- Průkaz se provádí na volných řezech (na hod. sklíčku nebo v malinkých Petriho miskách v inkubačním roztoku) nebo na řezech adhezí přilepených na podložní sklíčko.
- Inkubace 37 °C nebo laboratorní teplota. Délka inkubace je od několika minut až do dvou hodin (závisí na množství enzymu ve tkáni a citlivosti metody)
- Fixace:
 - čerstvé kryostatové řezy z nefixované tkáně
 - řezy z fixovaných vzorků
 - řezy připravené lyofylizací
- Každý histochemický průkaz je třeba doplnit o kontrolní pokus a inhibiční testy.

Kontrolní pokus: slouží k verifikaci výsledků a provádí se jednoduše tak, že se v inkubačním roztoku vynechá substrát.

Inhibiční testy: jsou indikovány v těch případech, kdy stejný substrát je atakován několika enzymy současně.

Odkazy

Použitá literatura

- ŠPAČEK, Martin. *Enzymová histochemie* [online]. [cit. 2011-05-23]. <<http://histologie.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/histochemie-tisk.pdf>>.
- WikiSkripta. *Fluorescence* [online]. [cit. 2011-05-23]. <<https://www.wikiskripta.eu/w/Fluorescence>>.
- Masarykova univerzita v Brně, Lékařská fakulta - Ústav histologie a embryologie. *Alkalická histochemie* [online]. [cit. 2011-05-23]. <http://www.med.muni.cz/histology/MedAtlas_2/OH_txt1-3-5-2.htm>.
- TONAR, Zbyněk. *Zymografie* [online]. [cit. 2011-05-23]. <<http://web.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/node26.html>>.
- SMETANA, Karel. *Katalytická histochemie* [online]. [cit. 2011-05-23]. <<http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/mikroskopicke-metody-smetana.pdf>>.