

Sborník Československé společnosti histo- a cytochemické
při ČSAV

Communications of The Czechoslovak society for histochemistry
and cytochemistry

Vol. 2

1967

Nová modifikace indofenolové reakce
k histochemickému průkazu
peroxidáz a pseudoperoxidáz

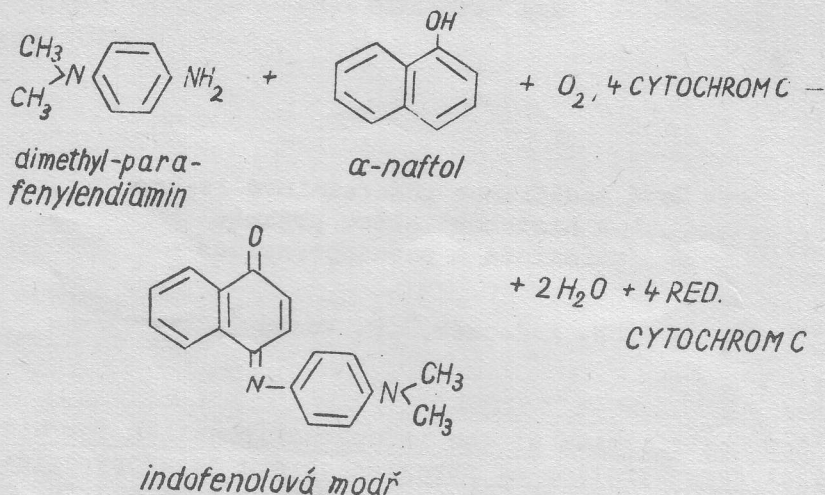
R. Koďousek,^x P. Vácha^x

New modification of the indophenol reaction for histochemical demonstration of peroxidases and pseudoperoxidases.—
New modifications of the Winkler-Schultze's method for peroxidases are described, using some commercial substances known as essential ingredients in colour photography (TSS-substance and T32-substance, Agfa). Alternative use of stable "indophenol-brown" method for pseudoperoxidases is recommended.

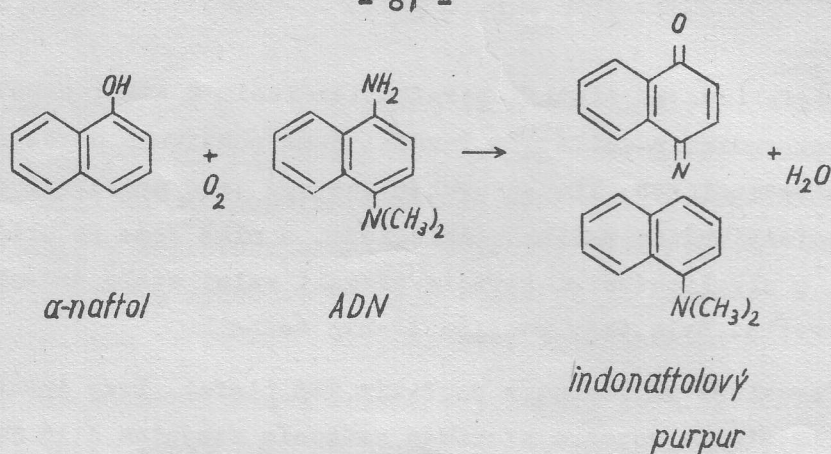
Indofenolová reakce je v histologii známa již velmi dlouhou dobu, v podstatě od pozorování EHRLICHova 1885. Syntéza barevné látky z α -naftolu a dimethyl-p-fenylendiaminu, podmíněná účinkem peroxidáz, se v dalším období stala podkladem dobře známé a k diagnostickým účelům hojně používané Winkler-Schultzeho reakce k znázornění granulí leukocytů myeloidní řady a k odlišení nezralých myeloidních elementů od elementů lymfoidních. Tato reakce bývá zpravidla uváděna eponymickým označením podle obou zmíněných autorů, ale poměrně často se mluví také o M-NADI reakci ("M" = myeloperoxidáza, stabilní peroxidáza), v protikladu s tkáňovou G-NADI reakcí ("G" = Ge-

^x Ústav patologické anatomie lékařské fakulty Palackého university, Olomouc

webe), která je nejspíše podmíněna účinkem cytochromoxidázy. Chemicky probíhá reakce následovně (KISZELY a PÓŠALAKY 1964):



V této souvislosti je třeba připomenout i problematiku pseudoperoxidáz, která nachází hlavní uplatnění v Lepehneho benzidinové reakci na hemoglobin. V této souvislosti se totiž zdůrazňuje katalyzující účinek různých látek, např. porfyrinů, hemoglobinu apod., při oxidativní syntéze barviva indofenolového typu. Indofenolová modř (IFM) má přes své výrazné zbarvení pro histologii velmi nepříznivou vlastnost, která ji vylučuje z obecného používání v laboratorní technice. Je totiž extrémně nestálá a preparáty nevydrží déle než několik minut po zhotovení. V dřívější době se sice objevily pokusy o stabilizaci IFM Lugolovým roztokem či molybdenanem amonným, výsledek je však sporný. Neobyčejná labilita indofenolové modři vedla v nedávné době NACHLASe 1958 k hledání jiné možnosti. Touto alternativou byla náhrada původního dimethyl-p-fenylendiaminu nově připravenou sloučeninou, totiž 4-amino-N,N-dimethylnaftylinem (ADN), která kondenzuje za přispění kyslíku na stálejší indofenolový purpur:



Indofenolový purpur (IFP) má údajně lepší histochemické vlastnosti než původní indofenolová modř. Zůstává však, podobně jako IFM, v lipidech rozpustný a není substantivní pro bílkoviny. Přes relativně lepší stabilitu vzniklé sloučeniny se v literatuře doporučuje prohlížet a fotografovat preparáty ihned, neboť IFP je přítomen ve formě drobných granulí, která ve starších preparátech splývají. Syntézu ADN uvádí PEARSE 1960.

V naší laboratoři jsme se zaměřili na dva aspekty: 1) náhradu toxického a relativně nestálého p-fenylendiaminu za látku v laboratoři běžně dosažitelnou, a bez uvedených nepříznivých vlastností; 2) stabilizaci výsledného indofenolového produktu.

V naší práci jsme používali histologických řezů z nekroptických tkání a z tkání experimentálních zvířat, fixovaných 10% formalinem či Bakerovým kalciumformolem (4°C, 12 až 24 hod.). Řezy, zhotovené zmrazovacím mikrotomem, byly zpracovány buď volně, anebo zachycené a přischlé na albuminizovaná podložní skla. Sledovali jsme tedy I. metody na peroxidázy a II. metody na pseudoperoxidázy (hemoglobin). V každé z uvedených skupin jsme aplikovali dvě techniky. I. První byla modifikací reakce podle Winklera-Schultze a spočívala v náhradě dimethyl-p-fenylendiaminu chemikálií typu TSS ev.

T 32 Agfa (údajně diethyl-parafenylendiamin a ethyl-oxyethyl-p-fenylendiamin-sulfát)^x. Později jsme používali obyčejně jen substanci TSS. 11. Ve druhém postupu jsme pracovali s čistým p-fenylendiamin-dihydrochloridem, s nímž jsme po přidání NaNO₂ a alkalického α-naftolu získali velmi stálé tmavohnědé barvivo. Bylo tedy použito těchto technik:

Ii. Peroxidázová reakce s použitím TSS (Agfa). Rezy inkubovat asi 1/2 min. v roztoku získaném smíšením stejných dílů 1% alkalického α-naftolu podle Winklera-Schultze a 1% vodného roztoku TSS. Zamontovat do neutralizované glycerin-želatiny a prohlížet ihned pod mikroskopem, neboť výsledné modré zbarvení je krajně nestálé. (Myeloperoxidázová granula leukocytů jsou modře zbarvena.)

X Iii. Peroxidázová reakce s použitím p-fenylendiaminu. K 5 ml 2% p-fenylendiaminu (dihydrochlorid) přidat 1 ml 4% NaNO₂ (či jiné oxidans) a k vzniklému temně hnědozelenému roztoku přidat 5 ml 1% alkalického α-naftolu podle Winklera-Schultze. Vodou doplnit na 20 ml. Postup barvení preparátů je obdobný, jako sub Ii. (Výsledné tmavohnědé zbarvení je stálé.)

IIi. Pseudoperoxidázová reakce s použitím TSS (Agfa). K 5 ml alkalického α-naftolu přidat 5 ml 1% vodného roztoku TSS (Agfa), doplnit vodou do 20 ml, přidat 2 kapky 30% H₂O₂. Roztok ihned nalít na preparáty, nebo v něm volně preparát rozprostřít. Zpravidla jsou patrný krátce po vložení preparátu do barvicího roztoku bublinky unikajícího plynu. Preparát se intenzivně modře zbarví již během několika málo vteřin. Montování do neutralizované glycerin-želatiny. Prohlížet ihned, a případnou fotodokumentaci provést bezprostředně. (Přidání ne-

^x Tato látka je běžně dostupná. Užívá se jako barvotvorná substance při vyvolávání barevných filmů Agfacolor či Orwocolor.

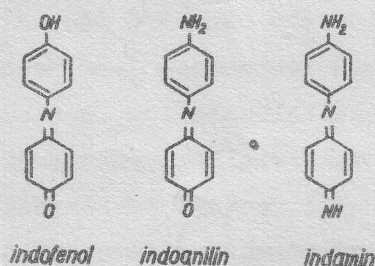
ly. na 2 ml 2g/l 3% (10xřed) H_2O_2

- 89 -

patrného množství H_2O_2 k roztoku uvedeném sub Ii vede k mohutnému a rychlému vytvoření modrého barviva indofenolového typu v místech pseudoperoxidázového působení /preferenčně hemoglobin v erythrocytech/. Erythrocyty jsou zbarveny masivně modře. Tímto způsobem se dají znázornit i kapiláry krevní. Neutrální tuk je metachromaticky purpurově červeně zbarvený.)

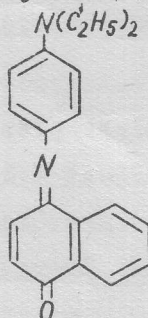
IIIi. Pseudoperoxidázová reakce s použitím p-fenylendiaminu. Postup je obdobný, jako je při přípravě roztoku sub Iii, ke 20 ml výsledného roztoku přidat 2 kapky 30% H_2O_2 . Postup je pak obdobný, jako sub Iii. (Erythrocyty jsou temně hnědě zbarveny na žlutavém pozadí. Zbarvení je stálé.)

Při aplikaci metod, využívajících zbarvení indofenolového typu, je třeba vzít v úvahu několik skutečností, především chemickou podstatu sloučenin této skupiny obecně. Jak známo, jde především o vlastní indofenoly, dále o indoaniliny a o indaminy.



Podle FIERZE a DAVIDA 1926 vznikají indofenoly společnou oxidací z aminofenolů + fenolů či naftolů, takže v druhém případě lze mluvit o naftyl-indofenolech. Indoaniliny vznikají z para-fenylendiaminu + fenolu či naftolu. Para-fenylendiamin se užívá ve výchozí podobě nesubstituovaný, nebo ve formě dimethyl- či diethyl-derivátu. Indaminy vznikají pak společnou oxidací p-diaminů s monoaminy. V našem případě používáme místo původního dimethyl-parafenylendiaminu, který je toxický a

nestálý, substance TSS (Agfa). Reakční pochod za vzniku sytě modrého barviva indofenolového typu je podle naší dosavadní představy analogický jako u dimethylderivátu. Vzniká-li v případě dimethyl-parafenylendiaminu α -naftolová modř, pak v našem případě jde o diethylový homolog této sloučeniny:



Podle výše uvedené klasifikace bychom měli látku hodnotit ve smyslu indoanilinu, vzniklého oxidativním sloučením diethyl-parafenylendiaminu (= p-amino-diethylanilinu) s α -naftolem, a reakci označit spíše jako "nafto-indoanilinovou". Vzhledem k praktickým potřebám však tuto terminologii dále nerozvádíme a zůstáváme u skupinového označení těchto látek ve smyslu "indofenolů". Naftolovou komponentu jsme používali ve formě ne-substituovaného α -naftolu. Postup, v němž byl α -naftol nahrazen naftolem řady AS s cílem, omezit difuzi výsledného reakčního produktu, nebyl vhodný. Tmavohnědé zbarvení, vzniklé za použití p-fenylendiaminu, zatím označujeme jako indonaftolová hněd. Uvedené výsledky jsou nyní rozpracovávány chemicky. Indonaftolovou hněd jsme izolovali a studovali chromatograficky a spektrofotometricky. Výsledek tohoto vyšetření bude uveden na jiném místě. X

Pokud jde o zhodnocení praktického využití uvedených výsledků, lze říci ve stručnosti toto: 1) Pro běžnou oxidázovou reakci typu Winkler-Schultze je původní postup vhodný; místo málo stálého a toxického dimethyl-parafenylendiaminu lze však

použít komerčního vzorku substance TSS (Agfa). Výsledné zbarvení je v tomto případě sytě modré, avšak krajně nestálé.

2) Stabilní zbarvení preparátů lze dosáhnout s použitím para-fenylendiaminu způsobem Iii, kde se využívá syntézy trvanlivého tmavohnědého barviva, označeného v naší laboratoři jako indonafťolová hněď. 3) Pro pseudoperoxidázy -zejména hemoglobin- a dále pro studium kapilár (díky masivně pozitivní reakci erythrocytů) lze s výhodou použít obě reakce, uvedené jako Iii a Iiii. V obou případech je pozitivita erythrocytů velmi výrazná, zejména v Iii, avšak trvanlivost preparátů je zaručena pouze v Iiii.

Ehrlich P.: Das Sauerstoffbedürfniss des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. - Berlin, 1885

Pierz H., David E.: Künstliche organische Farbstoffe. - Springer, Berlin, 1926

Kiszely G., Pósalaky Z.: Mikrotechnische und histochemische Untersuchungsmethoden. - Akadémiai Kiadó, Budapest, 1964

Pearse A. G. E.: Histochemistry theoretical and applied. - Churchill, London, 1960

Nachlas M. M.: J. Histo-Cytochem. 6, 445, 1958