

**Metoda: PAS reakce**

Kristýna Kaválková, ZL2

Školitel: Vladimíra Maxová, DiS.

**Úvod:**

PAS reakce je jedním z běžně používaných histologických barvení, které slouží pro průkaz polysacharidů. I přestože se jedná o jedno ze základních barvení, následuje vždy až po barvení hematoxylin-eosin a to buď rutinně, nebo na vyžádání lékaře. Název této reakce vzniknul složením počátečních písmen dvou reagensů obsažených v barvení – Periodic acid (PA; kyselina jodistá) a Schiffovo činidlo (S). Samotná reakce má 3 různé modifikace – „klasická“ PAS, PAS rce. s natrávením diastázou (slouží pro průkaz glykogenu), PAS rce. s alciánovou modří (slouží pro průkaz kyselých mukopolysacharidů).

**Princip metody:**

PAS rce. je oxidační metodou. Její princip spočívá v oxidaci hydroxylových skupin hexóz kyselinou jodistou za vzniku aldehydů. Přítomnost aldehydů se pak následně dokazuje Schiffovým činidlem, které způsobuje jejich fialovo-červené zbarvení.

**Podmínky odběru a transportu materiálu:**

Podmínky a způsob odběru závisí na povaze odebíraného materiálu. Obvykle se jedná o biopsie, které jsou prováděny ambulantně nebo na operačním sále. Způsobem odběru pak může být např.: punkční biopsie, trepanobiosie, excize, resekce aj.

Odebraný materiál by pak měl být do laboratoře dopraven v co nejkratším čase, buď v nativním, nebo fixovaném stavu. V nativním stavu přichází do laboratoře ve FN Lochotín např. ledvinné punkce, které jsou pak dále zpracovávány a fixovány. Orgány či jejich části na oddělení přichází ve fixační tekutině – obvykle se jedná o 4 % pufrovaný formaldehyd. Dalším materiálem, který může být barven pomocí PAS metody, jsou krevní nátěry a nátěry kostní dřeně. Tento materiál je odebírán do nádobek s K<sub>3</sub>EDTA. Odebraný materiál je obvykle ihned rozetřen na sklo, kde se nechá zaschnout, a následně se fixuje alkoholem – methanolem. Pokud by nedošlo okamžitě k nátěru např. periferní krev má do jeho provedení stabilitu 2 – 5 h.

**Přístrojové vybavení:**

K této barvicí metodě není nutně zapotřebí speciálního přístrojové vybavení – lze ji provádět ručně. Avšak pro usnadnění práce lze využít barvicího a montovacího vybavení.

**Postup zhotovení histologického preparátu:**

Materiál je nutno ihned po odběru fixovat ve vhodné fixační tekutině (pufrovaný formol), aby nedošlo k autolýze vzorku. Následně se vzorek ve vhodné kazetce vloží do autotechnikonu, který preparát odvodní a prosytí parafínem. Po vyndání z autotechnikonu se vzorek zalévá do bločků, které se následně na mikrotomu krájí na řezy (tloušťka několika mikrometrů). Zhotovené řezy, natažené na sklíčko se před samotným barvením musí odparafinovat, prochází tedy lázněmi – xylenu, acetonu, sestupnou řadou ethanolů (96%, 96%, 80%, 70%), vody. Po tomto posledním kroku se přechází k barvení.

Výše zmíněný postup byl popis např. pro orgán po resekci, avšak barvení PAS může být uplatňováno i na nátěru krevním nebo z kostní dřeně.

Název barvení	„Klasická“ PAS rce.	PAS rce. + alcianová modř	PAS rce. s natrávením diastázou
Postup	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Odparafinovat do destilované vody</li> <li>2. 0,5% roztok kyseliny jodisté – 5 min</li> <li>3. Oplach v deionizované vodě</li> <li>4. Schiffovo činidlo – 5 min</li> <li>5. Prát pod tekoucí vodou – 15 min</li> <li>6. Dobarvit Gillovým hematoxylinem – 7 min</li> <li>7. Diferencovat v kyselém alkoholu</li> <li>8. Prát pod tekoucí vodou – 5 min</li> <li>9. Odvodnit, projasnit</li> <li>10. Montovat</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Odparafinovat do destilované vody</li> <li>2. Roztok alcianové modři – 30 min</li> <li>3. oplach v deionizované vodě</li> <li>4. 0,5% roztok kyseliny jodisté – 5 min</li> <li>5. Oplach v deionizované vodě</li> <li>6. Schiffovo činidlo – 5 min</li> <li>7. Prát pod tekoucí vodou – 15 min</li> <li>8. Dobarvit Gillovým hematoxylinem – 7 min</li> <li>9. Diferencovat v kyselém alkoholu</li> <li>10. Prát pod tekoucí vodou – 5 min</li> <li>11. Odvodnit, projasnit</li> <li>12. Montovat</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Odparafinovat do destilované vody</li> <li>2. 15 minut inkubace v roztoku diastázy</li> <li>3. oplach v deionizované vodě</li> <li>4. 0,5% roztok kyseliny jodisté – 5 min</li> <li>5. Oplach v deionizované vodě</li> <li>6. Schiffovo činidlo – 5 min</li> <li>7. Prát pod tekoucí vodou – 15 min</li> <li>8. Dobarvit Gillovým hematoxylinem – 7 min</li> <li>9. Diferencovat v kyselém alkoholu</li> <li>10. Prát pod tekoucí vodou – 5 min</li> <li>11. Odvodnit, projasnit</li> <li>12. Montovat</li> </ol>
Výsledek	Polysacharidy (mucin, granula žírných buněk, bazální a retikulární vlákna) – červeně	Kyselé polysacharidy – modře; ostatní polysacharidy - růžovočerveně	Glykogen se nebarví, proto je nutné srovnání s PAS rcí. bez natrávení diastázou

#### Úskalí metody:

Metoda je jednoduchá a běžně při ní nedochází k žádným problémům. Pokud by došlo k nehodnotitelnému výsledku barvení, chyba by mohla být způsobena lidským faktorem, vadnými reagensii nebo špatnou přípravou vzorku před samotným barvením.

#### Uplatnění metody (změny při patologických stavech):

Tato metoda a její modifikace se používá pro průkaz polysacharidů jako např: mucin, granula serózních buněk. Tímto barvením se též zkoumá bazální membrána (BM) např. glomerulů. Na takovém preparátu se sleduje tloušťka a případná přítomnost výběžků na bazální membráně. Tyto změny mohou značit např. membranózní glomerulopatii (zesílení glomerulární BM), membranoproliferativní glomerulonefritidu (tzv. spikes či holes – výběžky, „díry“). Na pracovišti Patologie FN Plzeň se tato metoda rutinně uplatňuje nejen u renálních biopsií, ale i např. u materiálu odebraného z trávicího traktu – žaludeční biopsie (modifikace AMP), při diagnostice některých nádorů aj.

U nátěrů nachází barvení PAS využití u diagnostiky akutních leukémií – (např. AML M6 – erytroblasty jsou PAS pozitivní, AML M4 – myeloblasty jsou PAS negativní) a jiných chronických a akutních krevních onemocnění.