

İmmünohistokimya

IMMUNOCYTOCHEMISTRY

Hakkı DALÇIK*, Vedat KÖKSAL**, Cannur DALÇIK***

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD,

** Gülhane Askeri Tıp Akademisi Histoloji ve Embriyoloji ABD,

*** Başkent Üniversitesi, ANKARA

Son yıllarda hemen hemen birçok araştırma dallarında kullanılır hale gelen immünohistokimya tekniğinin gün geçtikçe önemi artmaktadır. Hücrelerin yapılarını, birbiriyle ve değişik moleküllerle olan ilişkilerini ve bir takım hücresel mekanizmaların nasıl işlediğini açıklamaya yardımcı olan bu teknik multidisiplin bilim dallarının ilgi alanına girmiştir. Bu derlemenin her geçen gün daha da önemi artan immünohistokimya tekniğini kullanmayı amaçlayanlara ışık tutacağını umut ediyoruz.

ANTİJEN VE ANTİKORLAR

Antikorlar

Antikorlar B lenfositlerden farklılaşan plazma hücreleri tarafından üretilen glikoprotein yapısında immunoglobülinlerdir. Immunoglobülinler birbirlerinden hem yapı hem de fonksiyonel açıdan farklılıklar gösteren IgE, IgG, IgA, IgE ve IgD olmak üzere beş sınıfa ayrılırlar. Bununla beraber, faredede IgG'nin IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 ve insanda da IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 gibi alt grupları bulunmaktadır.

IgG molekülü, sekonder immün cevapta üretilen en önemli immunoglobülinlerdir. Dört ayrı polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Birbirinin aynı olan iki ağır ve hafif zincir birbirlerine kovalen disülfid bağlantılarıyla ve kovalen olmayan etkileşimlerle tutunurlar (Şekil 1). "Y" şeklindeki IgG'nin iki antijen bağlama bölgesi ile bir sabit (constant) bölgesi bulunmaktadır. Antijen bağlama bölgesi "Y" nin kollarında bulunmaktadır ve bu kollar disülfid köprüleri sayesinde bükülebilme özelliğine sahiptir. IgG molekülü çeşitli proteolitik enzimlerle muamele edildiğinde, değişik fonksiyonel özellikleri olan fragmanlara ayrılır. Papain ile muamele edildiğinde 2 Fab ve 1 Fc bölgelerine ayrılmaktadır. Fab bölgesi IgG'nin antijen bağlama bölgesini içermektedir. Fc fragmanı ise sabit bölgeyi oluşturur ve komplemanları ve değişik hücre yüzey re-

septörlerini bağlamaktadır. Serumlara karşı antikorlar üretilirken (başka türlere karşı) bu antikorlar Fc fragmanına karşı oluşur, çünkü Fc bölgesi IgG moleküllerinde sabit kalmaktadır. Bu özellik antiserum oluşumunun temelini oluşturmaktadır (örn: rabbit-anti-mouse IgG).

Pentamer şeklindeki IgM molekülleri, 5 tane "Y" şeklindeki monomerin Fc fragmanlarının tutunması ile oluşmaktadır. IgM molekülleri total Ig'lerin %5'ini oluşturmaktadır ve primer immün cevapta önemli rolü bulunmaktadır. IgG molekülüne göre antijenle bağlanma kapasitesi daha düşüktür.

IgA moleküllerinin serum oranları düşüktür ve daha çok göz yaşı, tükürük ve süt gibi vücut sıvılarında bulunmaktadır. Bu sıvılarda IgA dimer şeklindedir, ancak monomer, trimer ya da tetramer şeklinde de bulunabilmektedir.

IgE molekülleri monomerik yapıda olup çeşitli allerjik ve parazitik reaksiyonlardan sorumlu olan moleküllerdir. IgD molekülü de monomerik olup B hücrelerinin yüzeylerinde yerleşim göstermektedirler.

Antijenler

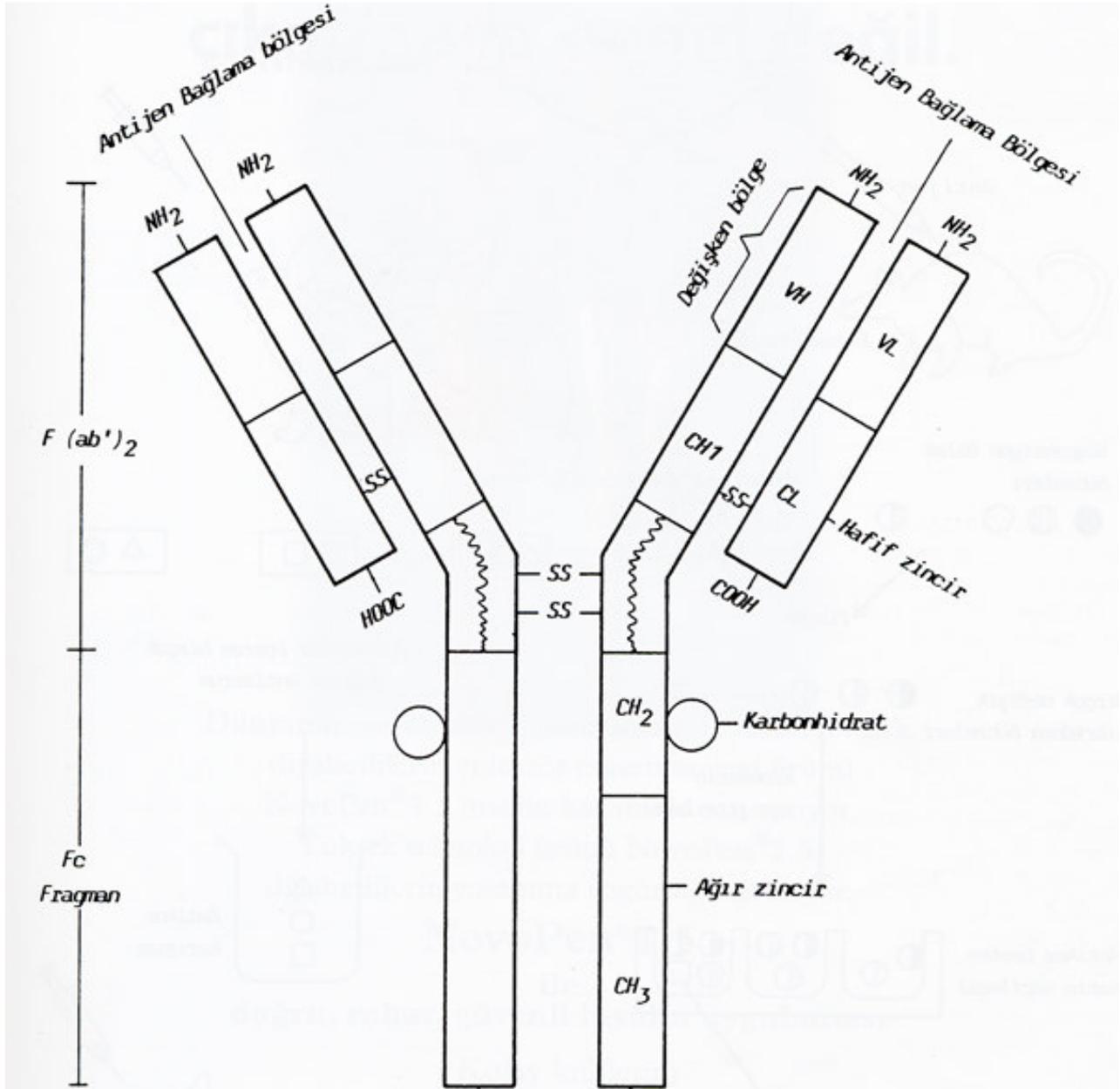
Antikor üretimini uyaran ve spesifik olarak antikorlarla bağlanma özelliği gösteren moleküllere antijen denmektedir. Antijenler genellikle büyük proteinler ya da polisakkarid molekülleridir ve molekül ağırlıkları 40.000'den daha büyüktür. Lipoprotein ve glikoproteinler immün cevap oluşturmalarına karşın pürifiye lipidler antijenik özellik göstermezler. Antijenin üzerindeki antikora bağlanma bölgesine epitop ya da antijenik determinant bölgesi adı verilmektedir.

ANTİKORLARIN ÜRETİMİ

a) **Poliklonal Antiserum:** İmmünohistokimyasal çalışmalarda kullanılan antikorların en kolay üretilme yolu poliklonal antiserum oluşturmalarıdır. Poliklonal antiserumun üretimi genellikle tavşanlarda yapılmaktadır. Genel olarak istenilen antijenin tavşan deri altına ijeneksiyonu şeklinde olmaktadır (Şekil 2). Hayvanın antijene karşı sekonder immün cevap oluşturabilmesi için çeşitli zaman dilimleri içinde birçok ijeneksiyon yapılmaktadır. İmmünohistokimyada antijenlere yüksek

Geliş Tarihi: 18.10.1995

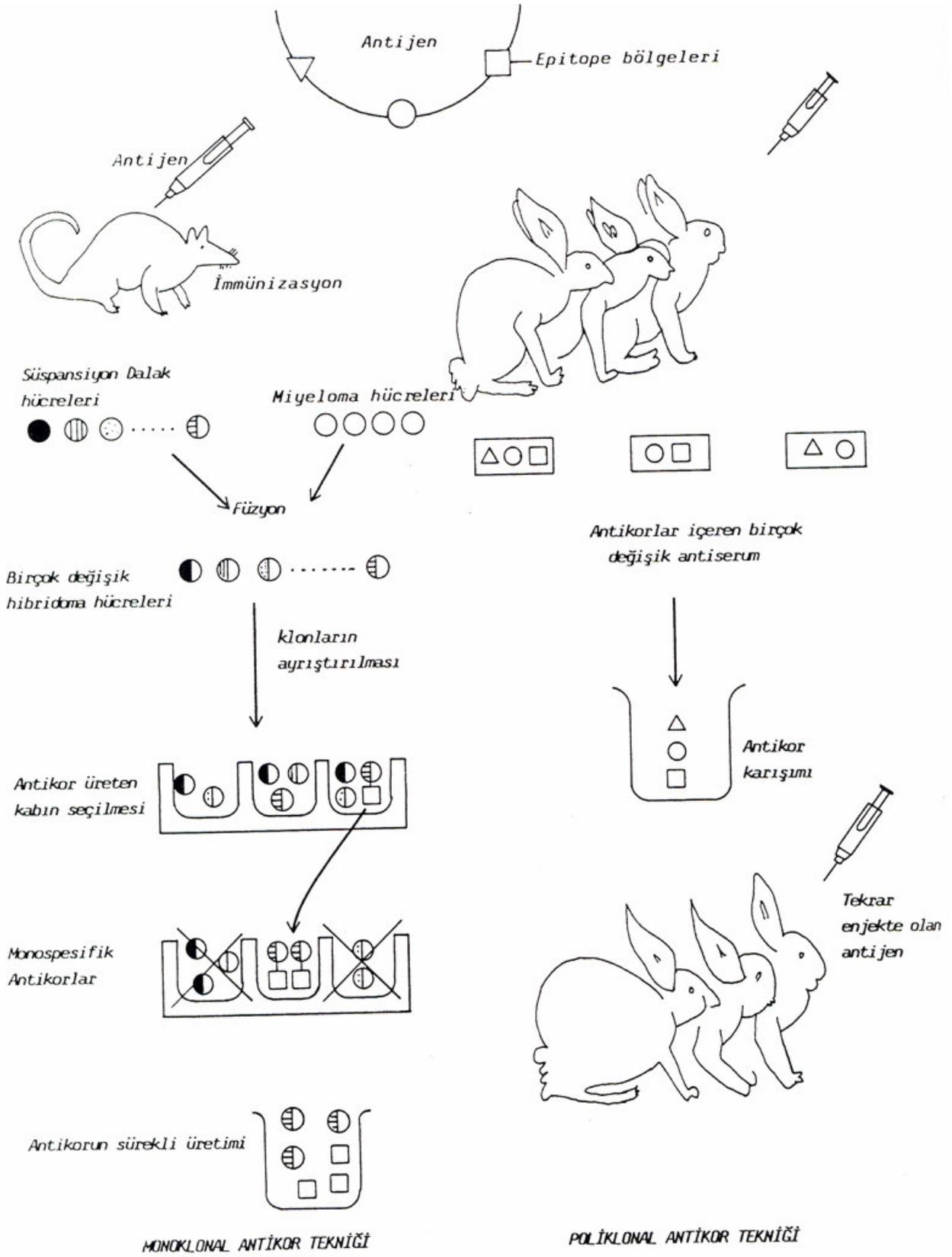
Yazışma Adresi: Dr. Hakkı DALÇIK
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD, ANKARA



Şekil 1. IgG molekülünün temel yapısı.

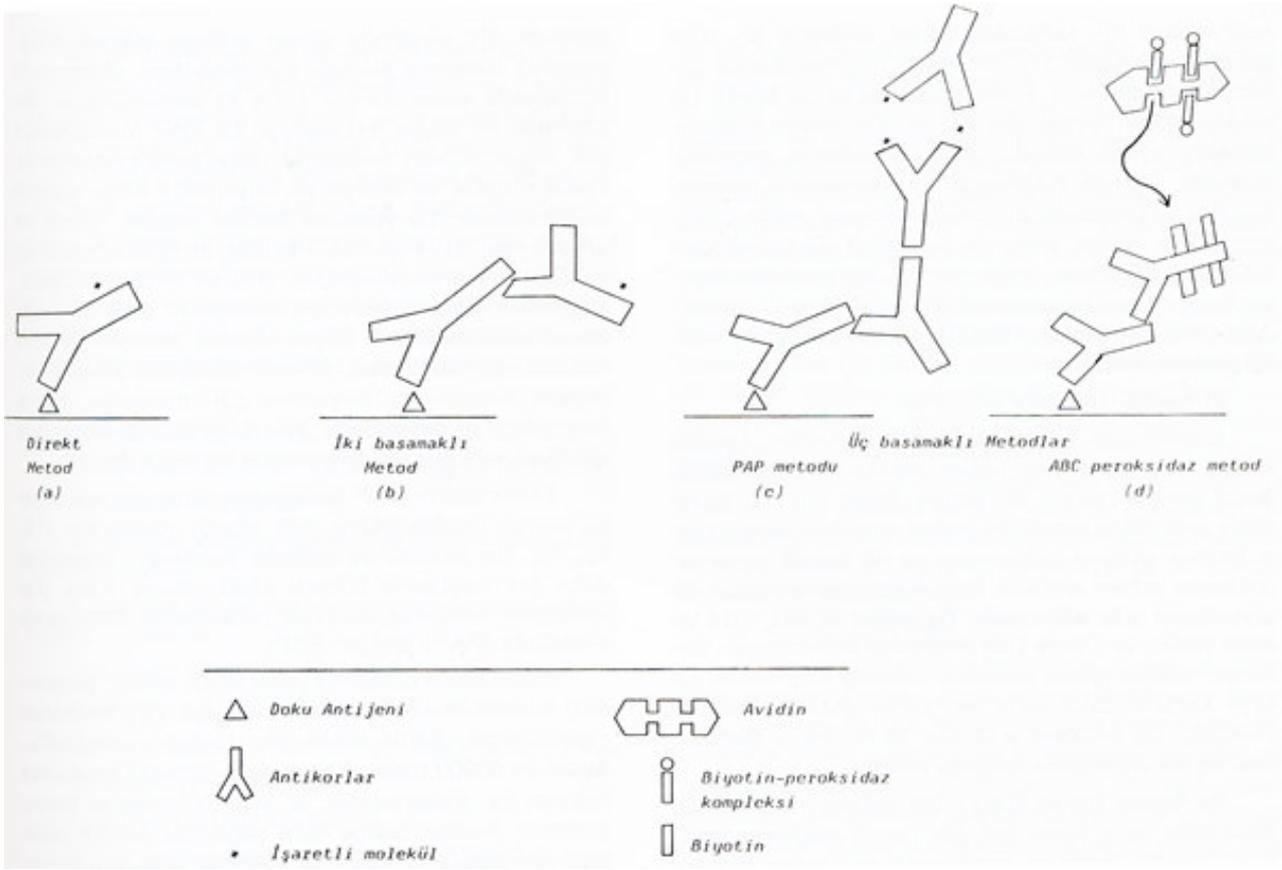
afinitesi olan antikorlar tercih edilmektedir. Moleküllerin antikor üretimine yol açabilmeleri için molekül ağırlıkları 1000'den fazla olmalıdır. Hapten olarak anılan küçük moleküller antikorlara spesifik olarak bağlandıkları halde, küçük olduklarından bir immün cevap oluşturmazlar. İmmünizasyon sırasında serumdan küçük örnekler alınır ve antikor konsantrasyonlarına bakılır. Bunun için; RIA, ELISA ya da immünopresipitasyon yöntemleri kullanılabilir. Eğer serumda yeterince antikor oluşmuşsa hayvanın serumu immünohistokimya tekniğinde kullanılabilir. Bu serumun içindeki Ig olmayan proteinleri çeşitli tekniklerle ortadan kaldırmak mümkündür.

b) Monoklonal Antikorlar: Monoklonal antikorların üretimi ilk kez 1975 yılında Köhler ve Milstein (1) tarafından geliştirilmiştir. Temel olarak B hücrelerini myeloma B hücreleri ile birleştirerek oluşturulan hibrid hücreleri klon yapmak suretiyle çoğaltılması ile gerçekleştirilir (Şekil 2). Sonuçta belirli bir antikor klonunu sayısız olarak üretebilen ölümsüz hücreler elde edilmiş olmaktadır. Bu işlemde kullanılan myeloma hücreleri sadece fare ya da sıçandan elde edilirler. Antikor üreten B hücreleri dalakta konsantre olduklarından bu organ çıkartılmaktadır. B hücreleri izole edilir ve myeloma B hücreleri ile birleştirilir ve sonuçta hibrid hücreler elde edilir. Böylece birleşmiş



hücreler hem sürekli antikor üretmekte hem de myeloma

Şekil 2. Antikor üretiminde kullanılan Monoklonal ve Poliklonal antikor teknikleri.



Şekil 3. Bugün kullanılan immünohistokimya tekniklerinden dört temel metodu (a) tek basamaklı (direkt) metod, (b) iki basamaklı metodlar, (c) üç basamaklı metodlar: PAP, (d) avidin-biotin teknikleri.

hücreleri gibi ölümsüz özelliği göstermektedir. Birleşmiş dalak hücreleri ile myeloma hücreleri ise kültür ortamında birkaç gün içinde ölürler. Myeloma hücrelerinin ölüm nedenini ortamda bulunan HAT (Hipoksantin aminopiterin timidin) maddesi oluşturmaktadır (2). Çünkü bu hücreler, HGPR (Hipoksantin guanin fosforibosil transferaz) enziminden yoksundurlar. Sonuçta, hibridoma içeren süpermatantlar alınır ve antikorun varlığı ELISA testi ile araştırılır.

İMMÜNOSİTOKİMYA TEKNİKLERİ

1. Direkt Metod
2. İndirekt Metod

1. Direkt Metod: Coons ve ark. (3,4) doku antijenlerini belirlemek için ilk kez işaretli primer antikorları kullanmışlardır. Buna aynı zamanda tek basamaklı metod da denilmektedir (Şekil 3a). Doku antijenleri araştırılması istenen bir peptid olabileceği gibi bir enzim ya da bir nörotransmitter de olabilir. Antikorları işaretlemek için rhodamin gibi floresan maddeler, horseradish peroxidase (HRP) gibi enzimler veya ferritin ya da koloidal altın partikülleri kullanılır. İşaretli primer antikor, üreten ve satan şirketlerden sağlanabildiği gibi, araştır-

macılar kendi laboratuvarlarında da üretebilmektedirler. İşaretli primer antikor ile dokudaki araştırılmak istenen antijenlerin lokalizasyonları ve varlığı hakkında kısa sürede sonuçlar alınabilmektedir. Fakat bu özellik bir avantaj olmasına karşın bu yöntemin dezavantajları daha fazladır. Bunları şöyle sıralayabiliriz:

- 1) Primer antikor işaretlenirken, antikorun antijene bağlanma oranını azaltabilir, çünkü bu işlem sırasında antikorun bağlanma bölgeleri az da olsa yapısal değişikliğe uğramaktadır.
- 2) Her bir primer antikoru işaretlemek oldukça zaman alıcı bir işlemdir.
- 3) Düşük derece duyarlılık göstermektedir.

2. İndirekt Metod: İşlem olarak direkt metod ile benzerlik göstermektedir. En büyük farkı, işaretli maddeler ortama aktararak primer antikora bağlanmaktadır.

a) İki basamaklı metodlar

i) Primer antikora bağlanan maddeler (reagentlar)

Bu yöntemde primer antikorun doku ile muamele edilmesinden sonra bazı maddeler ortama aktarılır. Bu kategoride kullanılan maddeler protein A-koloidal altın kompleksleri (5), radyoaktif işaretli antijenler (6), altın

işaretli antijenlerdir (7). Protein-A, staphylococcus aureus türlerinden elde edilen bakteriyel bir proteindir. Bu madde hemen hemen tüm immüno globülinlere bağlanabilmekte, ayrıca koloidal altın partiküllerine yapışabilmektedir. Protein A-koloidal altın kompleksi postembedding immünoelektron mikroskopide sıkça kullanılmaktadır. Yakın zamanda protein G (G tipi streptokokal bakterilerinden izole edilmiş) immünohistokimya da kullanılmaya başlanmıştır (8,9). Protein G, protein A'ya göre çok değişik türlerdeki IgG'ye bağlanma özelliği göstermektedir.

ii) İşaretli sekonder antikorlar

Günümüzde en çok kullanılan methodur. Burada işaretli sekonder antikor kullanılmaktadır, yani kullanılan ikincil antikor işaretli olmaktadır (Şekil 3b). İki basamaklı metodların temelinde primer antikorun araştırılması istenen antijene bağlanması ve bir işaretli sekonder antikorun primer antikora bağlanması ve bu işaret ile görüntünün elde edilmesidir. Bu metod ilk kez 1954 yılında Weller ve Coons (10) tarafından kullanılmıştır. Sekonder antikor primer antikorun üretildiği hayvandaki IgG'ye karşı hazırlanmıştır ve primer antikora bağlanmaktadır. Bu sekonder antikorlar bir florokrom (floresan madde) ya da enzimle konjuge edilirler.

Florokrom olarak fluorescein isothiocyanate (FITC), rhodamine veya Texas red gibi işaretli maddeler (marklar); enzim olarak da peroksidaz ve alkalin fosfataz kullanılmaktadır. İşaretli sekonder antikor metodu, direkt metoda göre son derece yüksek duyarlılığa sahiptir. Çünkü birçok sekonder antikor tek tek olan primer antikora bağlanabilmekte ve böylelikle işaretli maddeler sayısal açıdan çok olması nedeniyle görülebilirlik artmaktadır ve böylece direkt metoda göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir.

b) Üç basamaklı ve beş basamaklı metodlar: PAP, Double-Bridge, ABC teknikleri

İmmünohistokimya tekniklerinde duyarlılığı arttırmak için sürekli uğraşlar verilmektedir. İşte üç basamaklı metod da buna yöneliktir. Bu yöntemde kısaca "IgG Sandwich"i oluşturulmaktadır. Yani kısaca, işaretli sekonder antikorlar primer antikora bağlanmakta ve başka işaretli sekonder antikorlar da diğer işaretli sekonder antikorlara bağlanmaktadır. Bu yöntem birçok avantajı da beraberinde getirmiştir. Peroksidaz-anti-peroksidaz (PAP) ve Avidin-biotin kompleks (ABC) metodlarının işaretli sekonder antikor tekniğine göre çok daha verimli olduğu kabul edilmektedir.

PAP yöntemi Ludwig Sternberg (11) tarafından geliştirilmiş ve uygulanmaya başlanmıştır. Bu teknikte primer antikor özgün olduğu bir antijene bağlanmaktadır, sonra işaretli olmayan sekonder antikor primer antikora bağlanmakta ve üçüncü basamakta da, PAP kompleksi işaretsiz sekonder antikora bağlanmaktadır (Şekil 3c). Yalnız anti-peroksidaz ile primer antikorun aynı hayvandan geliştirilmiş olması gerekmektedir. Bu yöntemde primer antikor

yüksek dilüsyonlarda kullanma olanağı bulunmaktadır, dolayısıyla non-spesifik boyanma çok daha az olabilmektedir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı ise PAP molekülünün çok büyük olması nedeniyle doku penetrasyonunda zorluk olmakta ve dolayısıyla duyarlılıkta biraz azalma olabilmektedir. Bu yöntem benzer şekilde, Clark ve ark. (12) glukoz oksidaz-antiglukoz oksidaz (GAG), Mason ve ark. (13) da alkalin fosfataz antialkalin fosfataz (APAAP) enzimlerini antikora bağlı olarak kullanmışlardır. Birçok dokuda endojen alkalin fosfataz bulunduğundan, APAAP tekniğinde yüksek derecede nonspesifik boyanma görülmektedir. Buna karşın hayvan dokularında glukoz oksidaz bulunmadığı için GAG tekniği daha iyi sonuçlar vermektedir.

Teorik olarak PAP tekniğinden daha duyarlı diğer bir metod Double-Bridge (ikili köprü) yöntemidir (14,15,16). Bu teknikte de antisera sandwich'i sayesinde daha çok bağlanma bölgesi oluşturularak daha çok işaretleme kullanmak suretiyle görüntüleme daha kesin olmaktadır (PAP+bridge+PAP).

Avidin-biotin-kompleks-peroksidaz (ABC-peroksidaz) metodu ilk kez Hsu ve ark. (17) tarafından geliştirilmiştir. Biotin küçük bir vitamin molekülüdür. Avidin de 68000 molekül ağırlığında yumurta beyazında bulunan bir glikoproteindir ve bazı bakterilerde bulunmaktadır. Avidinin biotine karşı bağlanma özelliği (afinitesi) son derece yüksektir ve üzerinde biotin bağlanabileceği 4 bağlama bölgesi bulunmaktadır. Dokuya primer antikor uygulandıktan sonra biotinle işaretlenmiş sekonder antikor aktarılır. Sonra doku, ABC-peroksidaz kompleksi ile inkübe edilir. Böylece birçok tabaka oluşması sağlanır (Şekil 3d). Ayrıca bu teknikte yüksek dilüsyonlar da kullanmak mümkündür. ABC-Peroksidaz metodunun PAP metodunda olduğu gibi önemli bir dezavantajı, bu kompleksin büyük bir molekül oluşu ve doku penetrasyonunu güçleştirmesidir. Bu teknikte, Peroksidaz yanısıra diğer enzimler, florokromlar, altın partikülleri, ve I^{125} gibi radyoaktif işaretler de kullanılmaktadır. Bu nedenle ABC-Peroksidaz yöntemi, güncel tekniklerden birisidir. İmmüno-peroksidaz yöntemlerinde boya maddesi olarak genelde diaminobenzidine (DAB) kullanılmaktadır, ayrıca koloidal altın partikülleri, hem ışık (18,19,20), hem de elektron mikroskopik çalışmalarda işaretleyici olarak kullanılmaktadır (21, 22, 23). Altın partikülleri, ışık mikroskopunda kırmızı renkte, gümüş presipitasyon reaksiyonu ile de koyu siyah renkte görünmektedir.

Üç basamaklı teknikte primer antikor dilüsyonları daha yüksek olduğundan iki basamaklı metoda göre daha iyi sonuç vermektedir. Eğer doku yüksek konsantrasyonda antijen içeriyorsa zaman açısından iki basamaklı yöntem daha yararlıdır. Ayrıca seçilen işaretleyici de oldukça önemlidir. Örneğin fluorokromlar zaman geçtikçe solabilir, özellikle ışık altında daha çabuk solmaktadır. Bu nedenle boyanmayı incelemek için uzun bir süreye ihtiyaç varsa, ya da çok miktarda fotoğraf çekile-

cekse, enzim ile işaretli maddelerin ya da koloidal altın partiküllerini kullanmak daha uygundur. Yakın zamanda Sandell ve Masland (24), birçok floresan markrları DAB varlığında ışıktaki solmayan sürekli görülebilir hale geldiğini göstermişlerdir. Bütün florokromlar solma ile karşı karşıya oldukları için, özellikle fotoğraf çekiminde yüksek hıza sahip film kullanılmalıdır. Oysa enzimle işaretlendiğinde normal film kullanılabilir ve tekrar tekrar çekilebilir. Floresan fotoğraf çekiminde ışık şiddeti yüksek verilerek süreyi kısaltmak mümkündür.

POLİKLONAL VE MONOKLONAL ANTİKORLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Poliklonal Antikorlar

- Yüksek afiniteye sahiptir ve yüksek dilüsyonlarda kullanılabilir.
- Değişik pH ve tuz konsantrasyonlarında yüksek stabilite gösterirler.
- Yüksek oranda reaktivite gösterirler.
- Üretimi kolaydır ve ucuza mal edilebilir.
- Preabsorpsiyon kontrolü için daha kullanışlıdır.

Monoklonal Antikorlar

- Yüksek oranda üretilebilir.
- Yüksek derecede spesifiteye sahiptir (tek epitopa bağlanabilmeleri).
- İmmünreaksiyonda düşük oranda antijene gerek duyulur.
- Bilinmeyen ve tanımlanmayan antijenlere karşı üretilebilir.
- Düşük oranda afiniteye sahip olduğu için düşük dilüsyonlarda kullanılabilir (1: 50, 1: 500).

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMADA SPESİFİTE

a) Metod Spesifitesi

Bu metotta antiserumdaki antikorların doku antijenleriyle bağlandıkları gösterilmiştir. Örneğin floresan işareti kullanıldığında dokudaki doğal floresan maddeler ya da HRP kullanıldığında endojen peroksidaz aktivitesinin bulunması metodun nonspesifik olmasını sağlar ve sonuçların yorumlanmasını güçleştirir. Metod spesifitesini belirlemek için birçok kontrol yapılması gerekmektedir. Bunlardan birincisi; primer antikorun olmadığı bir solüsyonun dokuya inkübe edilmesi sonra çıkan sonuçları primer antikor bulunan solüsyonu ile inkübe edilen doku örnekleriyle karşılaştırılması gerekmektedir. Eğer primer antikorun olmadığı solüsyonla muamele edilen doku örneklerinde bir boyanma gözleniyorsa o zaman kullanılan boyama metodu nonspesifiktir. Metod spesifitesini ortaya çıkarmak için kullanılan diğer bir yöntem de primer antikorun üretildiği hayvandan primer antikorsuz yani sadece normal serum kullanılmasıdır. Eğer yine boyanma gözleniyorsa bu boyanma nonspesifiktir ve bu çapraz reaksiyonu (cross-reactivity) göstermektedir yani

özgün olmayan boyama. Bu olay da serumdaki bazı moleküllerin nonspesifik olarak dokuya yapışmaları ya da endojen olarak otofloresan ve endojen enzim aktivitesinin varlığından kaynaklanabilir. Serum içerisinde istenmeyen antikorlar doku ile nonspesifik olarak reaksiyona girebilir. Bu durum daha çok poliklonal antikorların kullanımında görülebilir. Çünkü antiserum içerisinde diğer antikorlar da bulunabilir. Bu nonspesifik reaksiyonları ortadan kaldırmak için bir yolu, antikoru yüksek dilüsyonda kullanmaktır. Bunların yanı sıra, primer antikor için değişik dilüsyonlar test edilmelidir ve en uygun dilüsyon saptanarak boyama spesifitesi bulunmalıdır. Örneğin, değişik dilüsyon oranlarında farklı yoğunlukta boyanma görünmesi gerekmektedir. Boyanmanın spesifik olarak değerlendirilmesi için boyanmanın açık ve koyu şeklinde değişik tonlarda görünmesi gerekmektedir. Eğer değişik dilüsyonların uygulanmasında aynı yoğunlukta boyanma görünüyorsa, o zaman boyanma nonspesifiktir.

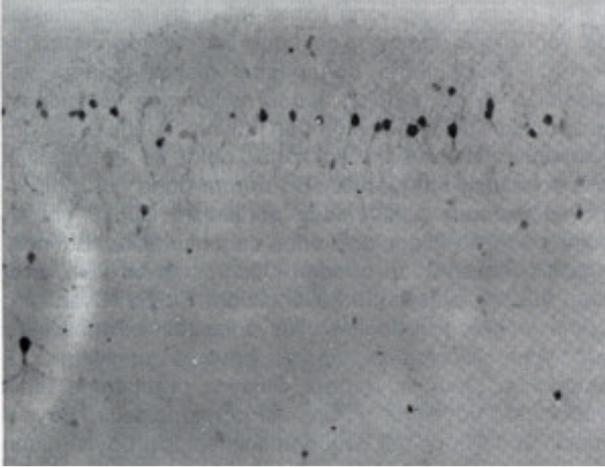
b) Antikor Spesifitesi

Antikor spesifitesinin araştırılması metod spesifitesinin araştırılmasından daha güçtür. Bunun için yapılması gereken ilk test preabsorpsiyon kontrolüdür. Bu kontrolde primer antikor belirli bir süre için dış ortamda belli dozlardaki antijenle inkübe edilir. Sonra bu antijen-antikor kompleksini içeren solüsyon, araştırılacak olan antijeni içeren dokuya aktarılır. Eğer primer antikorlar antijenlere spesifik olarak bağlanmışsa boyanma görülmemesi gerekmektedir. Eğer boyanma gözlenirse reaksiyonun nonspesifik olduğu anlaşılır. Diğer bir kontrol şekli de pozitif ve negatif kontroldür. Pozitif kontrolde aranan antijenin varlığından emin olunan bir başka doku primer antikorla muamele edilir. Pozitif kontrolde boyanma görülmelidir. Negatif kontrolde ise antijenin kesin olarak bulunmadığı bir doku, primer antikor ile inkübe edilir. Negatif kontrolde boyanma görülmemelidir. Negatif kontrolde ise antijenin kesin olarak bulunmadığı bir doku, primer antikor ile inkübe edilir. Negatif kontrolde boyanma görülmemelidir. Bu kontrolde sonuç negatif olmalıdır. Bu durumda kullandığımız primer antikorun o antijene karşı spesifik olabileceğini söyleyebiliriz. Aksi durumda primer antikorun başka bir molekülle çapraz reaksiyona girdiği ve boyanmanın nonspesifik olduğu anlaşılır.

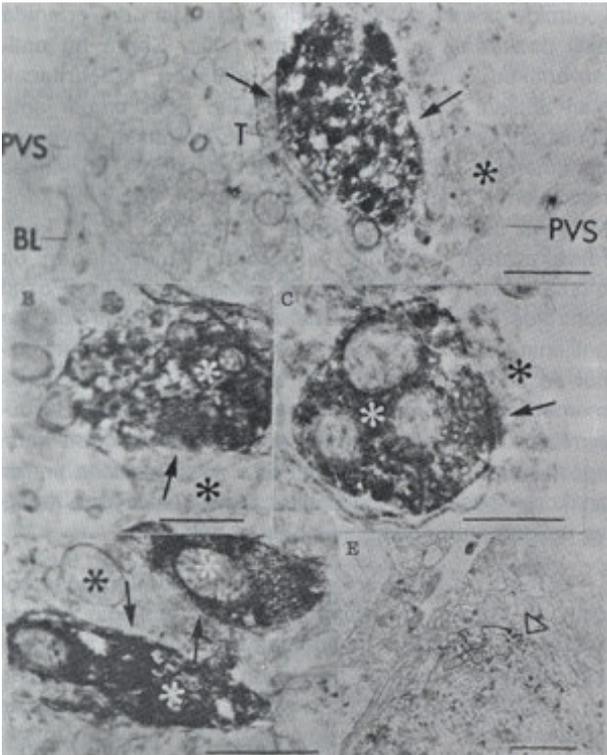
Çapraz reaksiyon genellikle çözümlenmesi zor olan bir olaydır. Bu olayda antikorlar antijenin sadece küçük bir parçasına bağlanırlar. Bu nedenle antikorlar antijene yapısal olarak benzeyen başka antijenik yapılara da bağlanabilirler. Bu problem özellikle proteinlerde görülmektedir. Örneğin, beyindeki bazı peptid yapısındaki moleküller birbirlerinden bazan tek bir aminoasit farkıyla ayrılmaktadır. Dolayısıyla primer antikor, o ailesinin içindeki diğer peptidleri de tanıyıp onlarla çapraz reaksiyona girebilir ve nonspesifik boyanma ortaya çıkabilir.

İMMÜNOELEKTRON MİKROSKOPİ

İmmünohistokimya elektron mikroskop düzeyindeki çalışmalar, antijenlerin ultrastrüktürel lokalizasyonlarının



Şekil 4. Anti-vazoaktif intestinal peptid poliklonal antikorunu fare beyin korteks kesitlerine ABC-peroksidaz metodu uygulanmıştır. İmmünoaktif perikaryonlar ve dendritler gözlenmektedir.



Şekil 5. Anti-vazoaktif intestinal peptid poliklonal antikorunu fare beyni median eminens kesitlerine pre-embedding elektron mikroskopisi tekniği ile ABC-peroksidaz metodu uygulanmıştır. İmmünoaktif akson terminaleri gözlenmektedir. A, B, C, D: Spesifik boyanma median eminensdeki akson terminalerinde görülmektedir. PVS: Perivasküler aralık, BL: Bazal membran, Ok: Kontakt bölge, Beyaz*: İmmünoaktif akson terminali, Siyah*: İmmünoaktif olmayan akson terminali, T: Tanait. Bar 0.5 μ m.

saptanması veya antijenleri bulunduran hücrelerin ince yapıları hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır. Dokular iki değişik teknikle hazırlanabilir. Her tekniğin, incelenen hücresel elemanlara ve antijenlerin lokalizasyonlarına göre değişebilen üstün ve eksik yönleri bulunmaktadır.

Elektron mikroskopik immünohistokimya Pre-Embedding ve Post-Embedding olmak üzere başlıca iki teknik kullanılmaktadır.

a) Pre-Embedding Tekniği

Bu teknikte free-floating yöntemi kullanılmaktadır. Free-floating yönteminde doku örnekleri bir fırça yardımıyla, kesitlerin hazırlanan solusyonlardan bir diğerine aktarmak suretiyle gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde ışık mikroskop çalışmalarında yapılan işlemlerin aynısı yapılmaktadır. Sırasıyla immünohistokimya işlemleri ve sonra ise elektron mikroskopisi işlemleri yapılmaktadır. Örneğin: İlk önce fiksasyon (fiksasyonda şu fiksatifler daha çok kullanılmaktadır: %2 paraformaldehit + %0.15 pikrik asit, %4 paraformaldehit, %4 paraformaldehit + %0.1-%0.5 Gluteraldehit, %5 Akrolein). Sonra sırasıyla; vibrotom ile kesit alma, free-floating immünohistokimyası, yıkama, dehidratasyon, infiltrasyon, gömme, ince kesit alma, gridlere yerleştirme, boyama, elektron mikroskopunda inceleme.

Elektron mikroskopunda ışık mikroskopundan farklı olarak kullanılan deterjanların miktarları azaltılmalı ya da elimine edilmelidir. Ayrıca kullanılan antikorun dilüsyonunu da değiştirmek gerekebilir. Fiksasyon sonrası ek olarak %3 Gluteraldehit ile fiksasyon ve postfiksasyon olarak düşük düzeyde osmik asit uygulanır. Uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmanın süresi azaltılmalıdır çünkü spesifik boyanmayı örtebilir. Pre-embedding tekniği kullanılarak immünohistokimya uygulanan bir beyin kesiti Şekil 5'te görülmektedir.

b) Post-Embedding Tekniği

Postembedding tekniği preembedding tekniğinden farklıdır. Bu teknikte sırasıyla; fiksasyon, postfiksasyon, dehidratasyon, infiltrasyon, gömme, kesitlerin alınması ve gridlere yerleştirilmesi, immünohistokimyasal işlemler için gridlerin solusyonlardan geçirilmesi, elektron mikroskopunda incelemedir. Görüldüğü gibi postembedding tekniğinde immünohistokimya işlemleri ince kesitler alındıktan ve gridlere (200-300 meşli nikel veya altın) yerleştirildikten sonra yürütülmektedir. Dokunun gömüldüğü plastik maddenin ortadan kaldırılarak antikorun antijene bağlanması kolaylaştırılmaktadır. Plastik maddeyi ortadan kaldırmak için sodyum metoksik uygulanmaktadır. Ancak bu maddeler moleküllerin antijenitesine zarar verebilir. Post-embedding her zaman başarılı olmayabilir. Çünkü ince plastik kesitin üzerinde yeterli miktarda antijen bulunmayabilir. Fakat, hücrelerde organellerin üzerindeki antijenlerin ortaya çıkarılmasında yararlı olması bir avantajdır. Ayrıca penetrasyon problemi olmadığı için koloidal altın işaretli madde olarak kullanıla-

bilir. Oysa pre-embedding tekniğinde koloidal altın için penetrasyon problemi bulunmaktadır. Post-embedding yönteminin diğer bir yararı da aynı hücresel elemanlarda iki değişik antijeni saptamak mümkündür ve bunun için çift boyama uygulanmaktadır (double staining). Çift boyama da ince kesitler üzerinde boyama yapılırken değişik büyüklükteki altın partikülleri kullanılmaktadır.

Önemli Noktalar

Araştırılması amaçlanan bir sorunun cevaplanması için kullanılacak teknik ve yöntemlerin daha önceden saptanması gerekir. Eğer hücrelerin diğer hücrelere göre yerleşim yerleri ve pozisyonların aynı kalması isteniyorsa ya da tüm hücre görüntüsü isteniyorsa, o zaman o amaçta uygun olarak tam gömme (whole mount) metodunun kullanılması doğru bir seçimdir. Bu tip gömme metodu, daha çok bağ dokusundan zengin olmayan küçük doku örneklerinde iyi sonuçlar vermektedir. Örneğin; küçük kan damarlarını besleyen sinirler gibi. Eğer elektron mikroskopi kullanılmak isteniyorsa ve bunun için pre-embedding immünohistokimyası tercih ediliyorsa, o zaman doku kesitleri vibrotom ile alınmalıdır. Isıtılarak (parafin, mikrotom ile) alınan kesitlerde dokunun ince yapısı bozulmaktadır. Buna ek olarak, ısı dokuların antijenitesini önemli oranda azaltmaktadır. Işık mikroskopik immünohistokimya için kriyostat ile kesit alınması tavsiye edilir. İşlemlerin cam lamel üzerinde yapılması tercih ediliyorsa, primer antikor 150 µl dilüsyonunda kullanmak doğru bir tercih olabilir. Eğer birçok kesitin (20 µm) aynı anda boyanması isteniyorsa primer antikor 500-1000 µl dilüsyonunda kullanmak mümkündür ve "free-floating" işlemini yani kesitleri bir fırça yardımıyla solusyondan solusyona aktarmak suretiyle yürütmek doğru bir tercih olur.

İmmünohistokimya tekniğinin basamakları

Aşağıda belirtilen immünohistokimya metodu bizim kullandığımız yöntemdir. Fakat literatürde bu yöntem değişiklik gösterebilmektedir.

"Free-Floating" İndirect immünohistokimya

1. Dokunun vibrotom ya da kriyostat ile kesilmesi

2. Kesitlerin fosfat-tamponlu salin (Phosphate-Buffered Saline; PBS) solusyonundan geçirilerek yıkanması,

0.1 M PBS, 1 litre distile H₂O, pH 7.5:

a) 11.4 g dibasic sodyum fosfat (Na₂HPO₄)

b) 2.4 g monobasic sodyum fosfat (NaH₂PO₄)

c) 9 g sodyum klorid (NaCl)

3. Non-spesifik bağlanma bölgelerini bloke etmek için, kesitlerin sekonder antikorun üretildiği hayvandan alınan normal serum (NS) ile muamele edilmesi.

4. Kesitlerin yıkamadan direkt "Buffer One" ile dilüe olmuş primer antikorlu solusyon ile muamele edilmesi. (Buffer One: 100 ml PBS, 0.4 ml Triton X-100, 1g Bovine-Serum-Albumin (BSA %1). Ardından kesitlerin primer antikorlu solusyonun içinde 4°C'de 40-64 saat bırakılması.

5. Kesitlerin PBS-Tx ile yıkanması (birkaç defa: 30 dk.)

6. Kesitlerin biotinle işaretli sekonder antikor ile muamelesi edilmesi (50 µl sekonder antikor/ 10 ml PBS-Tx. PBS-Tx: 1 litre PBS'e 0.4 ml Triton x-100).

7. Yıkama (5. basamağın aynısı).

8. Kesitlerin avidin-biotin kompleksi içeren solusyon ile muamele edilmesi. (1 saat, 2 damla A + 2 damla B/ 10 ml PBS-Tx; Kesitler bu komplekse aktarılmadan önce ayrı ayrı olan avidin ile biotin önceden yaklaşık yarım saat kadar birleştirilmesi sağlanmalıdır).

9. Yıkama (5. basamağın aynısı).

10. Kesitlerin boyanması: %0.02 oranında DAB ve %0.003 oranında H₂O₂ içeren Tris solusyonunda 10 dk. kadar bekletilmesi.

0.1 M Tris, 1 litre distile H₂O, pH 7.5:

a) 6.06 g Trizma HCl

b) 1.38 g Trizma Baz

11. Reaksiyonu sonlandırmak için birkaç defa Tris solusyonu ile yıkama.

KAYNAKLAR

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495-7.
2. Littlefield JW. Selection of hybrids from mating of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. Science 1964; 145:709-10.
3. Coon AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc Soc Exp Biol Med 1941;47:200-2.
4. Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berlinger E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. J Immunol 1942;45:159-70.
5. Bendayan M. Protein A-gold electron microscopic immunocytochemistry: Methods, applications, and limitations. J Electron Microscopy Technique 1984;1:243-70.
6. Larsson LI, Schwartz TW. Radioimmunocytochemistry-a novel immunohistochemical principle. J Histochem 1977; 25:1140-6.
7. Larsson LI. Labelled antigen detection methods. In: Immunolabelling for Electron Microscopy. New York, 1984;123-8.

8. Akerström B, Brodin T, Reis K, Björck L. Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *J Immunol* 1982;135:2589-92.
9. Berdayan M, Garzon S. Protein G-gold complexes: Comparative evaluation with protein A-gold for high-resolution immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1988; 36:597-607.
10. Weller TH, Coons AH. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol* 1954;86:789-94.
11. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complexes (HRP-anti HRP) and its use in identification of spirochets. *J Histochem Cytochem* 1970;18:315-33.
12. Clark A, Dowas EL, Primus FJ. An unlabelled antibody method using glucose oxidase-antiglucose oxidase (GAG): A sensitive alternation to immunoperoxidase for detection of tissue antigens. *J Histochem Cytochem* 1982;30:27-34.
13. Mason DY, Abdulaziz Z, Falini B, Stein H. Double Immunoenzymatic labelling. In: *Immunocytochemistry, Practical Applications in Pathology and Biology*, Bristol, England 1983. p.113-28.
14. Vacca LL, Rosario SL, Zimmermann EA, Hsu KG. Application of system. *J Histochem Cytochem* 1975; 23: 208-15.
15. Vacca LL. Double bridge technique in immunocytochemistry. In: *Techniques in immunocytochemistry*, vol. 1, edited by GR. Bullock and Petrusz. Academic Press, New York, 1982. p.155-82.
16. Ordronneau P, Retrusz P. Immunohistochemical demonstration of anterior pituitary hormones in the pars tuberalis of long-term hypophysectomized rat. *Am J Anat* 1980; 158: 491-506.
17. Hsu S, Raine ML, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complexes in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedure. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 1349-53.
18. Roth J. The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. In: *Techniques in Immunocytochemistry*. New York: Academic Press; 1983. p.217-85.
19. De Mey J. Colloidal gold as marker and tracer in light and electron microscopy. *EMSA Bull* 1984; 14(2): 54-66.
20. Slot JW, Geuze HJ. Gold markers for single and double immunolabelling cryosections. In: *Immunolabelling for electron microscopy* edited by JM Polak and IM Varndell. New York 1984. p.129-42.
21. Faulk WR, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochem* 1971;8:1081-3.
22. Geoghegan M, Scillian J, Ackerman G. The detection of human B lymphocytes by both light and electron microscopy using colloidal gold labelled antiimmunoglobulins. *Immunol Commun* 1978;7:1-12.
23. Lucocq JM, Roth J. Colloidal gold and colloidal silver-metallic markers for light microscopic histochemistry. In: *Techniques in Immunocytochemistry*. Academic Press, New York 1985;3:203-36.
24. Sandell JH, Masland Rh. Photoconversion of some fluorescent markers to a diaminobenzidine product. *J Histochem Cytochem* 1988;36:555-59.