

Reseptör İmmünohistokimyasında Mikrodalga Işınımlı “Antijen Retrieval” Yönteminin Kullanımı

F. Zehra MİNBAŞ*, Özhan EYİGÖR**, İlkin ÇAVUŞOĞLU***, Zeynep KAHVECİ***

* Uzm. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Bursa

** Yard. Doç. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Bursa

*** Doç. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Bursa

ÖZET

Reseptör immünohistokimyasında önemli problemlerden biri olan antijen miktarının azlığı veya maskelenmesi sorununun giderilmesi amacıyla, doku ya da kesitlere; antijen retrieval (AR) yöntemleri uygulanmaktadır. Çalışmamızda, pek çok antijen için başarılı sonuçlar verdiği bilinen mikrodalga ışınımlı AR (MW-AR) yönteminin kainat reseptör altünitesi GluR5'e özgün antikor (anti-GluR5) için gerekli olup olmadığı, gerekli ise hangi AR solüsyonunun uygun olabileceği araştırıldı. Bu amaçla, perfüzyon yoluyla fikse edilen sıçan beyin dokusundan 50 µm kalınlığında vibratom kesitleri alındı. Kesitlere, taze hazırlanmış iki farklı solüsyonda (50 mM trisodyum sitrat solüsyonu, pH 4.5 ve 6.0 ya da 10 mM EDTA solüsyonu, pH 8.0) MW-AR işlemini izleyen, yüzen kesit immünohistokimyası uygulandı. Işık mikroskopik incelemelerde, 50 mM trisodyum sitrat solüsyonu (pH 6.0) ile AR uygulanan kesitlerde özgün immün işaretlemenin olduğu ve bu kesitlerde zemin boyanmasının olmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak, kullanılan antikor için AR'nin gerekliliği ve özgün bir immün reaksiyon için AR solüsyonunun pH'nın ve erişilen son sıcaklığının önemli olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Mikrodalga ışınımı. Antijen retrieval. İmmünohistokimya.

Usage of Microwave Stimulated Antigen Retrieval Method for Receptor Immunohistochemistry

SUMMARY

To solve the insufficiency or masking of the antigen that is one of the important problem of the receptor immunohistochemistry, antigen retrieval (AR) techniques have been employed on the tissue blocks or sections. In this study, we assessed if the usage of the stimulation of AR technique by microwave irradiation (MW-AR) is necessary for the antibody which is specific to the kainate receptor subunit GluR5, and if so, which AR solution was appropriate. For this aim, rat brain tissue was fixed via perfusion and 50 µm-thick vibrotome sections were collected. Following the MW-AR procedures in either of two different freshly prepared solutions (50 mM trisodium citrate solution, pH 4.5 and 6.0 or 10 mM EDTA solution, pH 8.0), floating section immunohistochemistry was employed on the sections. Light microscopic analyses revealed that the sections which were treated with 50 mM trisodium citrate solution (pH 6.0) possessed the best immunolabeling and no background staining. In conclusion, it was suggested that the AR technique is necessary for the anti-GluR5 antibody used in this study and that the pH and the final temperature of the solution is important for a specific immunoreaction.

Key Words: Microwave irradiation. Antigen retrieval. Immunohistochemistry.

Fiksasyon immünohistokimyasal yöntemlerin en önemli aşamalarından biridir. Fiksasyon sırasında, doku proteinleri, nükleik asitler ve polisakaritler ile kullanılan fiksatif arasında çapraz bağlar oluşur. Oluşan bu bağlar, immün boyama reaksiyonları sırasında, doku kesitlerinin antikor geçirgenliğini sınırlar^{1,2} ve antijenik belirleyicilerin erişilebilirliğini azaltır³⁻⁵. Bu nedenle pek çok antijen için immünoreaktivite azalır. Bu durum özellikle tek bir epitopy tanıyan monoklonal antikorların kullanımında sorun yaratmaktadır². Dokuda oluşan ve antijen maskelenmesi olarak bilinen bu sorunun giderilmesinde, aköz ortamlardaki dokuların ısıtılmasının önemli olduğu

gösterilmiştir. Bu amaçla, etüv⁶, düdüklü tencere⁷, otoklav⁷ ve mikrodalga fırın^{2,3,5-11} kullanılmaktadır. Ayrıca, yanlış negatif immün boyanma ve nonreaktif antikor problemini çözebilmek için doku kesitlerine proteaz^{12,13} ve formik asit³ ön uygulaması, ultrason³ gibi değişik metodlar da uygulanmaktadır.

Shi ve ark.ları⁶, parafine gömülmüş doku kesitlerinde immün boyama öncesi tuz solüsyonu içinde mikrodalga ısıtması ile immünreaktivitenin iyileştiğini ve 'Antigen Retrieval'(AR) olarak isimlendirdikleri metodları ile erişilen yüksek sıcaklığın doku antijenitesini olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir. Cattoretti ve ark.ları¹⁴, mikrodalga ışınımlı antijen retrieval (MW-AR) metodu ile çalıştıkları antijenlerin %43'ünde immünreaktivitede artma belirlemişlerdir. Shi ve ark.ları¹¹, AR solüsyonunun pH'sının önemli bir diğer faktör olduğunu bulmuşlardır. Evers ve Uylings¹⁵, 0.05 M sitrat tamponu ile MW-AR işlemi sonucunda, farklı antijenler için en uygun pH, sıcaklık ve ışınım sürelerini belirlemişlerdir.

Geliş Tarihi: 02.08.2002

Kabul Tarihi: 11.10.2002

Uzm. Dr. F. Zehra Minbay
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji ABD,
Görükle Kampüsü, 16059 BURSA
Tel: 0224 442 87 94
Faks: 0224 442 87 23
e-mail: zminbay@uludag.edu.tr

Reseptör immünohistokimyasında da önemli problemlerden biri olan antijen miktarının azlığı ya da maskeleyilmesi sorununun giderilmesi amacıyla, çalışmamızda, kainat reseptör alt ünitesi GluR5'e özgün antikor (anti-GluR5) için MW-AR yönteminin gerekli olup olmadığı, gerekli ise hangi AR solüsyonunun uygun olduğu araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada Sprague-Dawley cinsi 5 adet dişi sıçanlar kullanıldı. Denekler eter anestezisi altında 0.13 M Sorenson'un fosfat tamponu (pH 7.4) ile hazırlanan %4 paraformaldehit ve %7.5 pikrik asit içeren fiksatif (pH 7.4) ile perfüze edildikten sonra beyinleri çıkartıldı. Çıkarılan beyin dokusu örnekleri aynı fiksatif içinde 24 saat bekletildi. Vibratom ile 50 µm kalınlığında alınan seri kesitler, Tris tamponu içeren viallere aktarıldı. İki gruba ayrılan kesitlerin bir bölümüne MW-AR işlemi uygulandıktan sonra immünohistokimyasal boyama yapıldı. Diğer gruba ise AR işlemi yapılmadan immünohistokimyasal boyama uygulandı.

Mikrodalga Fırının Kalibrasyonu:

Deney sırasında 2450 MHz frekanslı, maksimum çıkış gücü 900 W, magnetron warm-up süresi 4 sn ve siklüs zamanı 25 sn olan, gaz ekstraksiyon sistemi ve built-in thermocouple sıcaklık probuna (PT 100) sahip modifiye Bosch marka (Model no: 882G, Germany) mikrodalga fırın kullanıldı. Çalışma öncesi, neon lamba düzeneği ile fırın içindeki mikrodalga ışımının dağılımı (hot spot) belirlendi. Çalışma sırasında AR solüsyonlarını içeren beher belirlenen hot spot bölgesine yerleştirildi.

AR Solüsyonları:

AR işlemi için taze hazırlanmış iki farklı solüsyon kullanıldı: 50 mM trisodyum sitrat solüsyonu (pH 4.5 ve 6.0) ve 10 mM EDTA solüsyonu (pH 8.0).

Antijen Retrieval Protokolü:

Loup ve ark.ları¹⁶ tarafından önerilen mikrodalga ışımnlı antijen retrieval protokolü değiştirilerek aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

1. Yüzen kesitler Tris tamponu (pH 7.6) ile 3 X 10 dk yıkandı.
2. Endojen peroksidazın maskelenmesi: Tris tamponu ile hazırlanan % 1.5'lik hidrojen peroksitte 10 dk inkübasyon uygulandı.
3. Tris tamponunda 3 X 20 dk yıkandı.
4. Kesitler 80 ml antijen retrieval solüsyonu içeren 100 ml'lik cam behere aktarıldı.
5. Mikrodalga ışımını: "hot spot" a yerleştirilen beher 600 W'da 90 sn ışınladı.
6. Kesitler, solüsyon sıcaklığı 40-45°C'ye düşüncüye kadar (yaklaşık 15 dk) beherde bekletildi.
7. Tris tamponunda 3 X 10 dk yıkandı.
8. İmmun boyama aşamasına geçildi.

İmmünohistokimya:

Şişeler içerisindeki yüzen kesitlerin inkübasyon ve yıkama aşamaları sallayıcı yardımı ile uygun ajitasyonla gerçekleştirildi. Antikorların seyreltilmesinde, Tris tamponu ile hazırlanan % 10 normal at serumu, % 0.1 sodiyum azid ve % 0.2 Triton X-100 içeren solüsyon kullanıldı. Kesitlere indirekt immünohistokimya protokolü¹⁷ uygulandı:

1. MW-AR uygulanan ve uygulanmayan kesitler Tris tamponu ile 3 x 10 dk yıkandı.
2. Zemin boyanmasının maskelenmesi: %10 normal at serumu ile 2 saat inkübasyon uygulandı.
3. Primer antikor (keçi anti-GluR5, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ile oda sıcaklığında 48 saat inkübe edildi (Dilüsyon: 1:1000).
4. Tris tamponunda 3 X 10 dk yıkandı.
5. Sekonder antikor (Biotinlenmiş eşek anti-keçi IgG, Jackson Immunoresearch Labs, West Grove, PA) ile 2 saat inkübasyon yapıldı (Dilüsyon: 1:300).
6. Tris tamponunda 3 X 10 dk yıkandı.
7. Avidin-biyotin kompleksi (Vector Labs, Burlingame, CA) solüsyonu ile 30 dk inkübasyon uygulandı (Dilüsyon üretici firmanın tarifine uygun olarak yapılmıştır).
8. Tris tamponunda 3 X 10 dk yıkandı.
9. Substrat kromojen solüsyonu (Diaminobenzidin, DAB) ile 15 dakika inkübe edildi.
10. Tris tamponunda 3 X 10 dk yıkandı.
11. DPX ile kapatıldı.

Kesitler Olympus BX-50 fotomikroskop ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

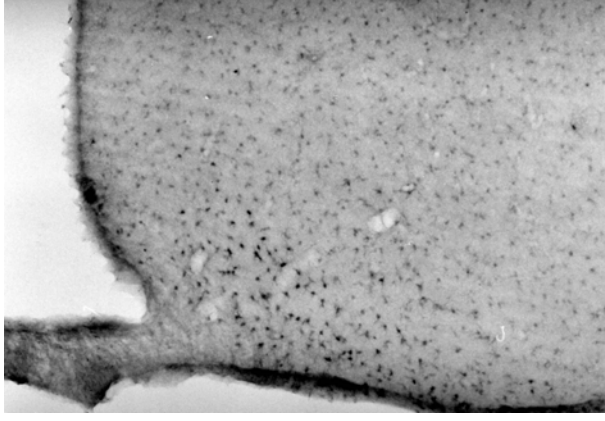
Bulgular

GluR5 immünoreaktivitesi üzerinde farklı antijen retrieval solüsyonlarının etkisini değerlendirmek amacıyla, yalnızca arkuat çekirdekte belirlenen boyanma farklılıkları örnek olarak alınmıştır. Hipotalamusun diğer alanlarında GluR5 immün boyanmasına değişik AR solüsyonlarının etkisinin arkuat çekirdekte görülen ile paralel olduğu görülmüştür.

İmmün işaretleme öncesi AR işlemi uygulanmayan kesitlerde, arkuat çekirdekte az sayıda hücrede GluR5 immünoreaktivitesi gözlemlendi; ayrıca zemin boyanması daha çoktu. Bu da spesifik immün boyanmanın belirginliğinin azalmasına neden oldu (Şekil 1).

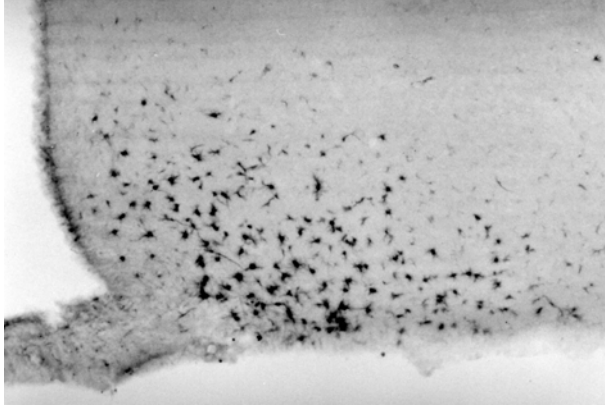
50 mM trisodyum sitrat solüsyonu (pH 6.0) ile AR işlemi uygulanan kesitlerde arkuat çekirdekte çok sayıda hücrede GluR5 immünoreaktivitesi gözlemlendi. Zemin boyanmasının olmadığı kesitlerde, hücreler oldukça koyu işaretlendi ve hücre uzantıları rahatlıkla ayırt edildi (Şekil 2). Bu solüsyon ile AR uygulanan kesitlerde, işlem sonrasında büzüşme gözlenmedi. Işınlama sırasında yaklaşık 60. sn'de kaynama başladı. 600 W'da 90 sn sonrası ulaşılan son sıcaklık 78-83°C arasında değişti. Daha yüksek sıcaklıklarda, kesitlerde kırışıklık ve immünoreaktivitede azalma gözlemlendi.

Reseptör İmmünohistokimyasında “Antijen Retrieval” Kullanımı



Şekil 1:

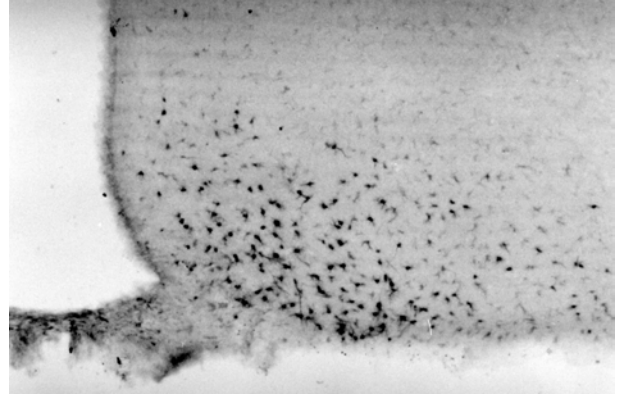
İmmün işaretleme öncesi AR işlemi uygulanmayan kesitlerin fotomikrografı. Arkuat çekirdekte az sayıda hücrede immün boyanma gözlemlendi. İmmünreaktiviteyi maskelleyen zemin boyanması izlendi X10.



Şekil 2:

50 mM trisodyum sitrat solüsyonu (pH 6.0) ile AR işlemi uygulanan kesitlerin fotomikrografı. Arkuat çekirdekte çok sayıda hücrede GluR5 pozitifliği gözlemlendi. Zemin boyanmasının olmadığı hücrelerde uzantılar rahatlıkla ayırt edildi X10.

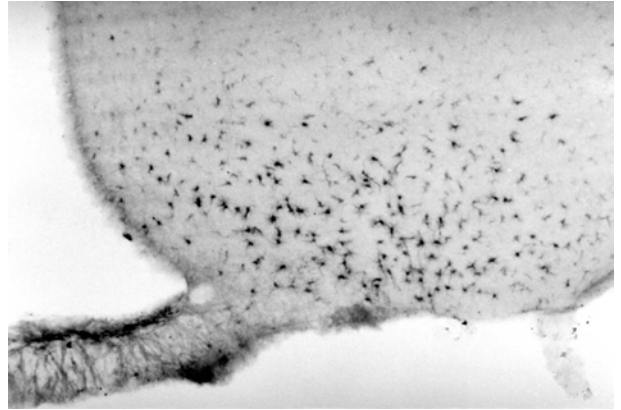
50 mM trisodyum sitrat solüsyonu (pH 4.5) ile AR işlemi uygulanan kesitlerde, arkuat çekirdekdeki hücrelerde GluR5 immünoreaktivitesi gözlemlendi. 50 mM trisodyum sitrat solüsyonunun (pH 6.0) kullanıldığı kesitler (Şekil 2) ile karşılaştırılınca immün işaretlemenin daha soluk, hücre uzantılarının daha az belirgin olduğu görüldü. Kesitlerde az miktarda zemin boyanmasının olduğu saptandı. Ancak, rutin (AR'siz) yüzen kesit immünohistokimyası uygulanan (Şekil 1) kesitlerle karşılaştırıldığında, zemin boyanmasının çok daha az olduğu dikkat çekti (Şekil 3). İşlem sonrası büzüşme, 50 mM trisodyum sitrat (pH 4.5) solüsyonu ile AR uygulanan kesitlerde de büzüşme görülmedi. Işınlama sırasında yaklaşık 60 sn'de kaynama başladı. 600 W'da 90 sn sonrası ulaşılan son sıcaklık 78–83°C arasında ölçüldü. 85°C'yi aşan sıcaklıklarda kesitlerde kırışıklık ve immünreaktivitede oldukça belirgin bir azalma gözlemlendi.



Şekil 3:

50 mM trisodyum sitrat solüsyonu (pH 4.5) ile AR işlemi uygulanan kesitlerin fotomikrografı. Arkuat çekirdekte, hafif zemin boyanması ile birlikte daha soluk bir immün reaksiyon gözlemlendi. Hücre uzantıları daha az belirgindi X10.

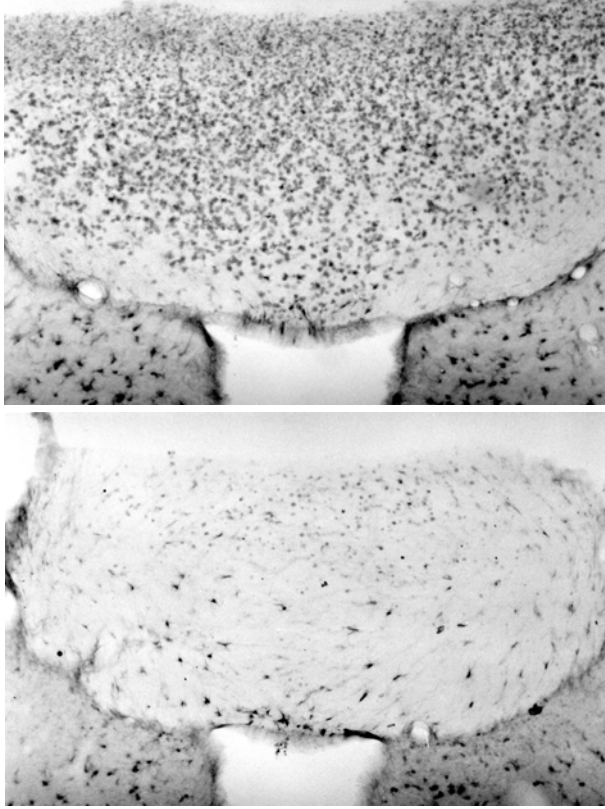
10 mM EDTA solüsyonu (pH 8.0) ile AR işlemi uygulanan kesitlerde arkuat çekirdekte, 50 mM trisodyum sitrat solüsyonu (pH 4.5) ile elde edilene (Şekil 3) benzer bir GluR5 immünoreaktivitesi gözlenmekle birlikte zemin boyanması daha az belirgindi. Ancak bu işlemin özgün olmayan hücre boyanmasına neden olduğu görüldü (Şekil 4). 10 mM EDTA (pH 8.0) solüsyonu ile AR uygulanan kesitlerde, işlem sonrasında kırışıklıklar gözlemlendi. 600 W'da 90 sn sonrası ulaşılan son sıcaklık 80–83°C arasında değişti.



Şekil 4:

10 mM EDTA solüsyonu (pH 8.0) ile AR işlemi uygulanan kesitlerin fotomikrografı. Arkuat çekirdekte, 50 mM trisodyum sitrat solüsyonu (pH 4.5) ile elde edilene benzer bir immünoreaktivite vardı. Bazı alanlarda nonspesifik immün reaksiyon gözlemlendi X10.

Ayrıca, AR işlemi uygulanmayan kesitlerde, myelinli bölgelerdeki çekirdeklerde özgün olmayan immün boyanma gözlemlendi (Şekil 5a). 50 mM trisodyum sitrat solüsyonu ile AR işlemi uygulanan kesitlerde bu tip bir immün tutulumu rastlanmadı (Şekil 5b).



Şekil 5:

AR işlemi uygulanmayan kesitlerde, özellikle myelinli bölgelerdeki çekirdeklerde spesifik olmayan immün boyanma (a) gözlenmesine karşın, 50 mM trisodyum sitrat solüsyonu ile işleme tabi tutulan kesitlerde bu tip tutulum rastlanmadı (b) X10.

Tartışma

Fiksasyonun oluşturduğu en önemli artefakt doku antijenlerinin maskelenmesidir. Aldehit bazlı fiksatifler, aynı molekülün ya da komşu protein moleküllerinin farklı bölümleri üzerindeki reaktif alanlar arasında metilen köprülerinin (çapraz bağlar) oluşmasına neden olur^{8,18}. Proteinlerin ikincil ve üçüncül yapısındaki bu değişiklikler; antikorun, neden bir antijeni tanımadığını ya da antikor için antijenin neden erişilemez olduğunu açıklamaktadır⁸. Bu etkisi nedeniyle formalin, immünoreaktivite kaybına neden olur ve immünohistokimya kullanımı sınırlanır. Formalin fiksasyonu sırasında oluşan çapraz bağların neden olduğu epitop maskelenmesini ortadan kaldırmak amacıyla çeşitli proteolitik ön uygulamalar kullanılmaktadır¹². Bu uygulamaların, bazı antikorlar için faydalı olduğu saptanmıştır. Ancak, en uygun proteolizin süresi, fiksasyon derecesi ve doku çeşidine bağlı olarak değişir. Ayrıca, bazı durumlarda, sitomorfolojik özellikler iyi korunmaz ya da değişmiş boyanma özellikleri gözlenebilir¹².

Antijen retrieval, formalinde fikse edilen dokuların, immün boyama öncesi, distile su, metal tuzları ya da diğer kimyasallardan hazırlanmış bir solüsyonda yüksek sıcaklıkta ısıtılması işlemidir⁷. AR'nin mekanizması tam olarak açıklanamamasına karşın, proteinler arasındaki

çapraz bağları kırdığı düşünülmektedir. Böylece antikor için antijen erişilebilir ve tanınabilir duruma gelir⁸. Shi ve ark.ları⁶ tarafından AR tekniğinin geliştirilmesinden sonra, immünohistokimya AR'nin etkinliğini doğrulayan pek çok yayın yapılmıştır^{2,3,5,7-11,13,15,19}. AR tekniğinin kullanımının yaygınlaşması, özellikle AR solüsyonları ve ısıtma metodları ile ilgili değişikliklerin yapıldığı yeni yöntemlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur^{6,7,14}. Çalışmalar, AR'nin etkinliğini belirleyen başlıca faktörlerin, AR solüsyonunun pH'ı, molaritesi ve ısıtma koşulları (erişilen son sıcaklık, ısıtma süresi ve ısıtma yöntemi) olduğunu göstermiştir^{2,11,14,15}.

Mikrodalgalar doku içerisine penetre olabilen elektromanyetik dalgalardır. Mikrodalga ışınımı ile oluşan osile eden elektrik alan, su gibi küçük bipolar molekülleri rotasyona zorlar ve bu kinetik enerji ışınlanan materyal içerisnde ani ısı üretir. Mikrodalga fotonlarının enerjisi en zayıf moleküler bağları bile kırmaya yetmez. Bu nedenle mikrodalga enerjisinin tüm etkisi sıcaklık etkisidir. Diğer ısı kaynakları da, örneğin otoklav, düdüklü tencere, etüv ya da buhar ile ısıtma da AR tekniklerinde başarı ile uygulanmaktadır; ancak, mikrodalga fırının üstünlüğü, hızlı ve yinelenebilir ısı üretebilmesidir².

Formalinde fikse edilmiş ve parafine gömülmüş dokular için çok sayıda mikrodalga metodu tarif edilmesine karşın^{5,6,10,11,20} yüzen vibrotom kesitler ile ilgili az sayıda yayın vardır^{3,8,9}.

Yüzen kesitlerde en uygun immün boyanmanın elde edilebilmesi için, kullanılan AR solüsyonunun sıcaklığının 85°nin üstünde olması gerekmektedir¹⁵. Ancak, yüzen kesitlere AR tekniklerinin uygulanması sırasında en sık karşılaşılan problem kesitlerde büzüşme gözlenmesidir^{9,13,15}. 90°C de başlayan ve 90°C'nin üstünde oldukça belirgin olan büzüşme, 100°C üzerinde doku hasarına dönüşmektedir⁹. Ayrıca, kaynama sırasında oluşan baloncuklara bağlı olarak kesitlerin hasarlanması ve solüsyondan uzaklaşması karşılaşılan diğer problemlerdir⁹. Tüm bu problemler immün reaktivitede azalmaya neden olmaktadır^{9,15}. Kesitlerdeki büzüşmenin önlenmesi için, MW-AR işleminin, öncelikle 0.5 mm kalınlığındaki doku parçalarına uygulanması ve daha sonra 95 µm kalınlığında alınan vibrotom kesitlere immün işaretlemenin yapılması önerilmektedir¹³. Buna karşılık, Shiurba ve ark. ları³, 40 µm kalınlığında vibrotom kesitlere MW-AR işlemi sonrası uygulanan immün işaretlemenin başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Jiao ve ark.ları⁹, sıcak su banyosu ile uyguladıkları AR teknikleri sonucunda, yüzen kesitler için en uygun AR işlem sıcaklığının 80-85°C olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamız sırasında AR uyguladığımız kesitlerde, 85°C'nin üzerinde büzüşme oluşması ve immün reaktivite kaybı literatür bulgularıyla uyumludur.

1994 yılından itibaren AR solüsyonunun pH'sının önemine dikkat çekilmektedir^{2,8,11,15}. Evers ve Uylings⁸, yüzen kesit immünohistokimyasında AR solüsyonunun pH'sının önemini araştırdıkları çalışmalarında en uygun pH değerlerinin antijene göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda, test edilen pH değerlerinde birbirine yakın sonuçlar alınmasına karşın, arkuat çekirdekte, Eyigör ve ark.ları²¹ tarafından insitu hibridi-

Reseptör İmmünohistokimyasında “Antijen Retrieval” Kullanımı

zasyon tekniği ile gösterilen dağılımla en uyumlu immün işaretleme pH'ı 6.0 olan 50 mM trisodyum sitrat solüsyonu ile elde edilmiştir.

AR metodlarının başarısı için, sıklıkla kullanılan sitrat ve diğer tamponların molaritesi çok önemli değildir⁵. Ancak, sodyum iyon konsantrasyonuna dikkat edilmesi gerekir^{2,3}. AR solüsyonuna NaOH eklenmesinin, mikrodalga ışınımı sırasında kesitlerin lamlardan dökülmesine, yüzen kesitlerde ise kesitlerin büzülmesine ya da genişlemesine ve vibratomda kesit almayı güçleştirecek şekilde doku parçalarının yumuşamasına neden olduğu bildirilmektedir^{2,3}. Çalışmamızda kullanılan AR solüsyonlarının pH'sı NaOH ile ayarlanmış olmasına karşın bu tip sorunlarla karşılaşmamıştır.

Formalin fiksasyonu sırasında ortamda var olan kalsiyum iyonlarının, proteinler ile güçlü bağlar oluşturduğu, oluşan kafes benzeri bu kompleksin antijen maskelenmesine neden olduğu düşünülmektedir. Kalsiyumun, şelasyon yoluyla uzaklaştırılması ile bu bağların kırılabilmesi bildirilmektedir²². EDTA ve EGTA gibi şelat yapıcı ajanlar, parafin kesitlerde Ki-67 gibi sitrata duyarlı nükleer antijenin retrieval'ında kullanılmış ve sitrat tampondan daha etkili olabileceği görülmüştür²². Xiao ve ark.ları²³, formalinde fikse edilmiş parafine gömülmüş dokularda CK 18'in immün işaretlenmesinde, en iyi sonucun pH'sı 8 olan 10 mM EDTA ve pH'sı 6 olan sitrat tampon ile elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu literatür bilgilerine dayanarak; GluR5 antijenitesinin gösterilmesindeki etkinliğini denemek amacıyla, AR solüsyonu olarak EDTA (pH 8 , 10 mM) kullanılmış ancak sitrat solüsyonuna bir üstünlüğü gösterilememiştir.

Antijen retrieval'ın başarısı ısıtma süresi ile orantılı ve fiksasyon şartları ile bağlantılıdır^{20,24}. Fiksasyon süresi 24 saatten uzun olan parafin kesitlerde başarılı bir Ki-67 immün işaretlemesi için MW-AR işleminin en az 14 dk (toplam kaynama süresi 12 dk kaynama) olması gerektiği, 24 saatten az süre fiksatifte bekleyen dokular için ise ısıtma süresinin çok önemli olmadığı bildirilmektedir²⁴. Yüzen kesit immünohistokimyasında, 0.5 mm kalınlığındaki doku parçalarına (fiksasyon süresi 48 saat-4 yıl) 60°C de 120 dk ya da 90°C de 10 dk'lık MW-AR işleminin farklı antijenler için başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir^{2,4,8}. Jiao ve ark.ları⁹, 40 µm kalınlığındaki vibratom kesitlerine (transkardial perfüzyon fiksasyon sonrası 24-48 saat immersiyon fiksasyon) uygulanan aralıksız 3 dk (maksimum güçte) ya da orta güçte 3 kez 1 dk lık ışınlama işlemlerinin dokularda hasarlanmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Bununla birlikte, orta güçte 1 dk ya da 2 X 1 dk şeklinde uygulanan MW-AR işleminin kesitlerde kırılmaya neden olmasına karşın immün işaretlemeyi etkilemediğini bildirmişlerdir. Buhar ve kaynamanın neden olduğu doku hasarı ve kesitlerin solüsyondan uzaklaşması gibi sorunlarla karşılaşılmasını, ışınlama işlemi sırasında kaynama olmaması (1 dakikalık ışınlama sırasında) ya da kaynamanın minimal düzeyde (2 X 1 dk lık işlem sırasında) olmasıyla açıklamışlardır. Shiurba ve ark.ları³, vibratom kesitlere 95-100°C de kısa denatürasyondan sonra 5 dk kaynama sıcaklığının birkaç derece altında ışınlayarak geliştirdikleri MW-AR protokolleri sonrasında kullandıkları antikor için başarılı

bir immün işaretleme elde ettiklerini bildirmişlerdir. Loup ve ark.ları¹⁶, 6-8 saat süreyle fikse edilmiş 7-12 mm kalınlığındaki otopsi doku parçalarına 90-150 sn MW-AR işlemi uygulamışlar ve 40 µm kalınlığındaki frozen kesitlerde GABA_A reseptör altbirimlerinin gösterilmesinde belirgin bir iyileşme elde ettiklerini bildirmişlerdir. Uyguladığımız MW-AR işlemi bazı yönlerden daha önce yapılanlardan^{2,3,8,9,16} farklıdır: İlki, kainat reseptör alt ünitesi GluR5'in gösterilmesinde MW-AR işleminin süresi 90 sn'yi aşmamıştır. Diğer antijenler için önerilen süre en az 10 dakikadır. İkincisi ise dokular perfüzyon fiksasyon sonrası 24 saatten daha kısa süre fiksatifte bekletilmiştir. Oysa çalışmaların çoğu, uzun süre fiksatifte bekleyen dokularda gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, kısa süreli formalin fiksasyondan sonra kısa süreli MW-AR işlemi immün reaktivitenin iyileştirilmesinde kullanılabilir. Kainat reseptör alt ünitesi GluR5 için vibratom kesitlere pH'ı 6.0 olan 50 mM trisodyum sitrat solüsyonu içinde MW-AR işlemi uygulayarak özgün immün işaretleme elde edilmiştir; ancak tüm antikorlar için en uygun sonuç veren sabit bir solüsyon ve MW uygulaması olmadığı unutulmamalıdır. İmmünohistokimyasal yöntemlerle işaretlenecek her antijen için, antijenitenin geri kazandırılacağı sıcaklık, ışınım süresi ve uygun solüsyon ve pH'nın aranması gerekir.

Kaynaklar

1. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J Histochem Cytochem* 1985;33:845-53.
2. Evers P, Uylings HBM, Suurmeijer AJH. Antigen retrieval in formaldehyde-fixed human brain tissue. *Methods* 1998;15:133-140.
3. Shiurba RA, Spooner ET, Ishiguro K, Takahashi M, Yoshida R, Wheelock TR, Imahori K, Cataldo AM, Nixon RA. Immunohistochemistry of formalin-fixed human brain tissues: microwave irradiation of freefloating sections. *Brain Res Protocols* 1998;2:109-19.
4. Chaiwun B, Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval techniques. In: Shi SR, Gu J, Taylor CR (eds) major factors influencing the effectiveness of antigen retrieval immunohistochemistry. Natick: Eaton Publishing; 2000. 41-53.
5. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present and future. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:327-43.
6. Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: Enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 1991;39:741-8.
7. Taylor RC, Shi SR, Chen C, Young L, Yang C, Cote RJ (1996) Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer. *Biotech Histochem* 1996;71:263-70.
8. Evers P, Uylings HBM. An optimal antigen retrieval method suitable for different antibodies on human brain tissue stored for several years in formaldehyde fixatives. *J Neurosci Methods* 1997;72:197-207.
9. Jiao Y, Sun Z, Lee T, Fusco FR, Kimble TD, Meade CA, Cuthbertson S, Reiner A. A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slide mounted tissue sections. *J Neurosci Methods* 1999;93:149-162.

10. McKee PH, Hobbs C, Hall PA. Antigen retrieval by microwave irradiation lowers immunohistological detection thresholds. *Histopathology* 1993;23:377-9.
11. Shi SR, Imam SA, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 1995;43:193-201.
12. Battifora H, Kopinski M. The influence of protease digestion and duration of fixation on immunostaining of keratins. *J Histochem Cytochem* 1986;34:1095-100.
13. Evers P, Uylings HBM. Effects of microwave pretreatment on immunohistochemical staining of vibrotome sections and tissue blocks of human cerebral cortex stored in formaldehyde fixative for long periods. *J Neurosci Methods* 1994;55:163-72.
14. Cattoretto G, Pileri S, Parravicini C et al. Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue section. *J Pathol* 1993;171:83-98.
15. Evers P, Uylings HBM. Microwave-stimulated antigen retrieval is pH and temperature dependent. *J Histochem Cytochem* 1994;42:1555-63.
16. Loup F, Weinmann O, Yonekawa Y, Aguzzi A, Wieser HG, Fritschy JM. A highly sensitive immunofluorescence procedure for analyzing the subcellular distribution of GABA_A receptor subunits in human brain. *J Histochem Cytochem* 1998;46:1129-39.
17. Eyigor O, Jennes L. Identification of kainate-preferring glutamate receptor subunit GluR7 mRNA and protein in rat median eminence. *Brain Res* 1998;814:231-235.
18. Mason JT, O'Leary TJ. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem* 1991;39:225-9.
19. Robinson JM, Vandré DD. Antigen retrieval in cells and tissues: enhancement with sodium dodecyl sulfate. *Histochem Cell Biol* 2001;116:119-130.
20. von Wasielewski R, Verner M, Nolte M. Effects of antigen retrieval by microwave heating in formalin-fixed tissue sections on broad panel of antibodies. *Histochemistry* 1994;102:165-72.
21. Eyigor O, Centers A, Jennes L. Distribution of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 2001;434:101-124.
22. Leong ASY, Milios J, Leong FJ. Epitop retrieval with microwave. A comparison of citrate buffer and EDTA with three commercial retrieval solutions. *Appl Immunohistochem* 1996;4:201-7.
23. Xiao JC, Adam A, Ruck P, Kaiserling E. A comparison of methods for heat-mediated antigen retrieval for immunoelectron microscopy: demonstration of cytokeratin no. 18 in normal and neoplastic hepatocytes. *Biotech Histochem* 1996;71:278-85.
24. Munakata S, Hendrick JB. Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin-embedded tissue. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1241-46.

Teşekkür

Bu çalışma, Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenen 2001/56 no'lu ve TÜBİTAK tarafından desteklenen SBAG-2459 no'lu projeler kapsamında gerçekleştirilmiştir.