

İMMUNOENZİM TEKNİKLERİN HİSTOPATOLOJİ'YE UYGULANMASI

Fikriye EKMEK (*)

Tanım. İmmuno enzim boyama teknikleri, insan ve hayvan doku antijenlerinin ve antikorlarının tesbit edilmelerinde ve bunların lokalizasyon yerlerinin belirlenmesinde kullanılır. Bakteriyel, viral ve paraziter antijenlerinin identifikasyonunda çok geniş bir kullanım alanı vardır. Bunların yanında tümör ve otoimmüne hastalıkların teşhisinde kullanılır.

Giriş ve tarihçesi .İnfeksiyöz hastalıkların tanısında, uzun yıllardır etkenlerin uygun besiyerlerinde izolasyon ve identifikasyonu yoluna gidilmiştir. Bu yöntemlerin çok zaman alması ve insanların Hepatitis A ve B virusları gibi etkenlerin besi yerlerinde üretimlerinin mümkün olmaması, bazı alternatif metotlar aranmasına neden olmuştur. Hemaglutinasyon-inhibisyon (HI); Komplement Fiksasyon (CF); İndirekt Hemaglutinasyon (IHA); Virus Nötralizasyon (VN); Agar-jel Presipitasyon (AGP) gibi serolojik testler bu amaçla geliştirilmiştir.

Reiner 1930'da, Heidelberger ve arkadaşları 1933'de dokularda ve hücrelerdeki antijeni görülür hale getirebilmek için işaretlenmiş antikorların kullanılabilmesi fikrini ortaya attılar. Fakat antikorları işaretlemek için kullandıkları azo boyaları, antikorların biyolojik özelliklerini etkileyip, duyarlılıklarını azalttığı için başarılı olamadılar (1).

Creech ve Jones 1940'da antikorlar dahil olmak üzere pek çok proteinin, bir fluorescent boya olan phenylisocyanate ile biyolojik ve immunolojik özellikleri etkilenmeden konjuge edilebileceklerini gösterdiler. Bu kompleks mavi fluorescent verir ve bunun dokunun mavi otofluoresanından ayrılması çok zordur. Coons, Creech, ve Jones 1941'de phenylisocyanate yerine fluorescein isocyanate kullanmaları, elma - yeşili fluorescence elde edilmesine ve konjuge edilmiş antikorların dokuların mavi autofluorescence'ından kolayca ayırılmasını sağladı (2).

(*)Etilik Hay.Hast.Araşt.Enst.Vet.Hek

Bu çalışmanın bir sonucu olarak histopatolojide, özel boyamalar gerektiren pek çok konunun ve pek çok bilinmeyenin açıklığa kavuşması sağlandı. Hala daha bazı problemler olmasına rağmen, bir antijen-antikor reaksiyonu kesinlikle spesifik olduğu için,immune boyamalarla pozitif olayların tesbiti çok kolaylaşmıştır.

Kullanılan ilk fluorescent boya olan fluorescein isocyanate, kısa süre sonra yerini fluorescein isothiocyanate'a bıraktı, Çünkü fluorescein isothiocyanate molekülü antikorları daha kolay işaretleme özelliğine sahipti.

Bunu takip eden çalışmalar, daha fazla antijen için daha iyi antikorların kullanıma girmesini sağladı. En son gelişme ise antikorların enzimlerle konjuge edilmesi esasına dayanan immunoenzim (IE) boyama metodlarıdır. Kullanılan ilk enzim horseradish peroxidase'dır. Bu nedenle bu metod uzun zaman immunoperoxidase (IP) boyama metodları diye adlandırıldı. Teknik, değişik enzimler kullanarak pek çok örnekte inter ve intracellüler olarak bulunan antikor ve antijenlerin, görülebilir hale getirilmesi esasına dayanır.

Daha sonra, direkt metod modifiye edilerek, indirekt IE boyama metodu geliştirilmiştir.Bunu işaretlenmemiş antikor-enzim metodu izlemiştir. Bu metod, bir antikora işaret maddesinin konjuge edilmesini gerektirmez ve dolayısı ile konjugasyon esnasında oluşabilecek antikor reaktivitelerinde ki muhtemel azalma veya tahribat riskini ortadan kaldırır. Bunların dışında, reaksiyonun ikinci bir antikor tarafından açığa çıkarılması, avidin ve biotin arasında ki şiddetli tepkimeden faydalanılması gibi pek çok teknik geliştirilerek sonuçta elde edilecek reaksiyonun spesifitesinin ve yoğunluğunun artırılmasına çalışılmıştır.

IMMUNOENZİM BOYAMALDA GEREKLİ OLAN MADDELER

I - ANTİKOR ÜRETİMİ :

İmmünizasyon. Antikorların üretimi, tavşan, kobay v.s gibi hayvanlara antijen verilmesi ile uyarılır. Antikorum mümkün olduğu kadar spesifik olabilmesi için antijenin ya çok saf yada sentetik olması gerekir. Bütün bunlara rağmen sonuçta elde edilen antikor yalnızca enjekte edilen antijene spesifik değildir. Üretilen antikorlar, antijen molekülünün değişik bölümlerine, taşıyıcı proteine veya taşıyıcı proteinin bir bölümüne spesifiktirler. Ayrıca, donör hayvanın serumu pek çok tabii protein ihtiva eder ki bunlar doku komponentleri ile reaksiyona girebilirler. Bunlardan dolayı, kontrol preparatları ile çalışılmadığı müddetçe,pozitif bir immunreaksiyonun spesifik bir antijen-antikor reaksiyona bağlı olduğu söylenemez.

Eğer antijen molekülü yeterince büyükse,immunoglobulinler gibi, hayvanı bağışık kılmak için tek başına kullanılabilir.Antijenin molekülünün küçük olduğu hallerde, pek çok peptidler gibi, yada molekülün immunojenik olmadığı durumlarda, kendisinden büyük bir molekülle birleştirilmesi immünizasyon için gereklidir.Antikor formasyonu için büyük bir kompleks, küçük bir molekülden daha iyi bir uyarıcıdır.

İlk enjeksiyondan(Subcutaneous) uygun bir zaman sonra tavşan (veya

kobay)'a rapel enjeksiyon yapılır. Daha sonra antikor testleri için kan alınır. Antikor toplanması için standart bir zaman vermek mümkün değildir, bu zamanı antikor üreticisi kendi belirler. Kan daha sonra santrifüje edilerek eritrositler uzaklaştırılır. Elde edilen plazma antikor ihtiva eder, fibrin uzaklaştırılmadığı için bu tam olarak serum olamamasına karşılık antiserum olarak adlandırılır.

Test : Bir sonraki adım antikor mevcudiyetinin tesbit edilmesidir. Antiserum, saf antijen kullanılarak Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELİSA), radioimmunoassay (RIA), immunoblotting teknikleri ile tesbit edilir, fakat antikor tesbitinin en başarılı yolu, immunocytochemical boyamalar kullanılarak, bilinen pozitif dokuya karşı immunocytochemistry ile test etmektir. Bu yolla antiserum background ve yapışma yeteneği yönünden test edilmiş olur. Immunocytochemistry'de uygun antikorun antijenle çok sıkı birleşmesi gerekir böylece boyama prosedürü esnasında yıkama ile uzaklaşma riski önlenmiş olur.

Serolojik testler için üretilen antikorlar her zaman immunocytochemistry için kullanılamazlar. RIA için iyi bir antikor, immunocytochemistry için her zaman uygun olmayabilir. Bu konuda ELİSA tekniği için kullanılan antikorlar immunocytochemical boyamalara uygundur.

Monoklonal Antikorlar .Saf antikor üretim tekniği,1970'li yılların sonunda geliştirilmiştir (3).

Hayvanlar(genellikle, Balb-C fareleri) antijenle bağışık kılınır. Hayvan verilen antijene karşı antikor oluşturmaya başlayınca dalak alınır ve hücre suspansiyonu hazırlanır. Bu hücreler polyethylene glycol (PEG) gibi membran fasyonu sağlayan bir kimyasal madde kullanılarak,myeloma hücreleri ile fusyona tabii tutulurlar. Bu fusyona uğrayan hücreler, Hypoxantine Aminopterin ve Thymidine'den oluşmuş, HAT ihtiva eden bir ortamda üretilirler. Aminopterin, metabolik geçiş yollarını tıkayan güçlü bir toxindir. Bu metabolik geçiş yollarını, hypoxantine ve thymidine gibi metabolitlerle desteklenmiş hücreler kullanabilir. Dalak hücreleri normal hücre oldukları için bu metabolitleri kullanabilir ve HAT ortamında gelişebilirler fakat myeloma hücreleri metabolik hasara uğradıkları için hypoxantine ve thymidine'i kullanamazlar HAT'lı ortamda ölürler. Dalak hücreleri kültürde 1-2 hafta sonra normal olarak ölürler. Fakat fusyona uğrayan hücreler myeloma hücrelerinin immortalite özelliğini ve dalak hücrelerinin metabolik geçiş yollarını kullanma özelliğini taşıdıkları için yaşamaya ve üremeye devam eden tek hücre grubu olarak ortamda kalırlar. Bu hücrelerden bazıları dalak hücrelerinin antikor üretme yeteneğindedir sahip olacaktır (4). Her hücre sadece bir tip antikor üretir ve kültüre edilmiş hibrid myeloma hücreleri derece derece tek antikor üreten hücre kültürü içine kolonlanırlar. Bu yöntemle antijen molekülünün bir fragmentine spesifik antikor üretilebilir ve kültürler ihtiyaç halinde kullanılmak üzere saklanabilir. Bu metod standart bir antikor üretiminin devamlılığını sağlar. Monoklonal antikorların en büyük avantajı, bunların antijen molekülünün tek bir sequence'ine veya epitope'una spesifik olmasıdır. Multiple antikorlar ihtiva eden polyklonal antiserumların en önemli problemi ise, üretimlerinde ve immün boyamalarda tam temizliğin sağlanamamasıdır. Hernekadar, belli bir epitop'a monospesifi-

te, croos-reaksiyon için gerekli değilse, birden fazla bilinen veya bilinmeyen, aynı antijenik özelliği taşıyan molekül mevcudiyetinde, monoklonal antikorlar poliklonal antikorlara nazaran hiç bir avantaja sahip değildirler. Monoklonal antikorların en önemli dezavantajı ise monospesifiteleridir. Bir poliklonal antiserum genellikle multivalandır. Antijen molekülünün değişik bölgeleri için antikor ihtiva eder, bu nedenle de antijenin teşhisinde daha yüksek kapasiteye sahiptir. Monoklonal antikorlar ise molekülün sadece bir kısmı ile reaksiyona girer, bu nedenle antijenle reaksiyona giren antikor molekülü sayısı azdır ve boyamalarda daha zayıf reaksiyon elde edilebilir. Ayrıca antikorun spesifik olduğu antijen epitop'u fixasyon yada boyamanın herhangi bir safhasında yıkama ile atılabilir. Böylece reaksiyonun oluşması engellenmiş ve boyamada negatif sonuç alınmış olur. Bu nedenle bazı monoklonal antikorlar sadece taze ya da donmuş dokularla çalışıldığında iyi sonuç verirler. Parafinde fikse edilen kesitlerde ise iyi çalışmazlar. Polyklonal antikorlarda ise antijen molekülünün değişik epitoplarına bağlanma olacağı için şans daha yüksektir.

İyi bir antikorun özellikleri . Bir antikorda aranacak en önemli özellik, spesifik antijenle iyi bağlanması ve diğer antijenlerle reaksiyona girmemesidir. Antijen-antikor arasında ki bağlanmanın kuvveti birleşen bölümlerinin sayısı ile orantılıdır (5).

Immunochemistry yüksek yapışma özelliği olan antikorlara ihtiyaç gösterir, antikorların boyama prosedürü esnasında yıkama ile uzaklaşmayacak kadar iyi bağlanması gerekir.

Antiserumdaki istenmeyen antikorların spesifik antikordan daha az kuvvetli bağlanma özelliğinde olmaları, boyama esnasında yıkanma ile uzaklaşmalarını sağlayacağı için tercih edilir. Fakat anormal ve hasara uğramış histolojik kesitlerle çalışıldığı zaman çok dikkatli çalışılmalıdır. Çünkü bu gibi dokuların non-spesifik antikorlarla kaplanmış olma ihtimalleri fazladır. Her çalışmada olduğu gibi histopatolojik çalışmalarda da kontrollerle çalışmak zaruridir.

Antikorların titresi ve konsantrasyonları da çok önemlidir. Yüksek titre, yüksek diluasyonları gerektirir. Bu immunochemistry'de doku komponentleri ile reaksiyona girebilecek istenmeyen antikor popülasyonunun diluasyonla bertaraf edilmesi demektir.

Eğer monoklonal antikorlar kullanılıyorsa, diluasyon faktörü daha az önemlidir, çünkü istenmeyen reaksiyonlar olmayacaktır ve teorik olarak limitsiz antikor temini mümkündür. Fakat monoklonal antikorların üretiminin çok pahalı olduğuda gözardı edilmemelidir.

Monoklonal antikorların en önemli dezavantajlarından biri fareden üretilmiş olduğu için, tavuk makrofajlarına ve bazen de normal tavuk dokusuna bağlanma özelliği göstermesidir. Aynı durum Canine parvovirus ve Canine distemper ile çalışıldığında köpek bağırsağında da gözlenmiştir. Bu sadece monoclonal antikorlara değil tüm fare serumlarına has bir özelliktir (6)

2-ENZİM : En çok kullanılan metod IP olduğu için peroxidase'a ağırlık verilecektir. Peroxidase 40000 molekül ağırlığına sahip bir hemaglyco proteindir. Kullanımdaki en önemli sakıncası ise kullanılan spesifik kromojenlerin kanserojen olmasıdır.

Peroxidase'in tercih edilmesinin pek çok nedeni vardır.

-Küçük hacimli olması nedeni ile antikorların antijenlere bağlanma bölgelerini kapamazlar.

-Elde edilmesi kolay, saflık oranı yüksektir ve kontamine olma riski çok azdır.

-Stabildir, bu nedenle üretim, depolama ve uygulama safhalarında değişikliğe uğramaz.

-Endojen peroxidaselar dokularda çok az bulunur ve bunların inaktive edilmeleri kolaydır.

-Peroxidas'ın aktive edebileceği pek çok kromojen vardır ve bunlar antijenin bulunduğu bölgeye lokalize olur ve görülebilir renk alırlar.

-Pahalı değildir.

HORSE RADİŞH PEROXİDASE	DAB + substrat	Koyu mavi / Kahverengi
	AEC + substrat	Kırmızı-Mor
	Chloro-Naphthol + substrat	Koyu Mavi
	Manker-Yates + substrat	Koyu Mavi / Kahverengi
	Tetramethyl benzidine + substrat	Parlak Mavi
	O-dianisidine di-HCl + substrat	Kırmızı
ALKALİNE PHOSPHATASE	Naphthol AS-MX phosphate+HCL + Fast Blue BB	Parlak Mavi Kırmızı

Tablo 1 -c Spesifik kromojenler

Alkaline phosphatase ve glucose oxidase'da dahil olmak üzere pek çok enzim IP boyamalar için peroxidase'a alternatif olarak kullanılmıştır (7). Daha sonra değineceğimiz gibi Alkaline phosphatase metodunun IP'ye bazı üstünlükleri vardır.

İstenmeyen Reaksiyonların Önlenmesi : Endojen peroxidase veya alkaline phosphatase aktivitelerinin inhibe edilmesi için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları :

- 1-%0.02'lik asetik asit ve %1'lik sodyum ferrisiyanid içeren metanol,
- 2-%0.05'lik fenilhidrazine hidroklorid (pH7.1),
- 3-%0.05'lik Hidrojen peroksit (H₂O₂) içeren metanol,
- 4-HCl (0.02M)'li metanol.

Endojen peroxidase'ın inhibe edilmesinde en başarılı yöntem üç kimyasal maddenin birlikte kullanılmasıdır. Bu yöntemde önce %6'lık H₂O₂ denatüre hemoglobini renksizleştirmek ve endojen peroxidase'ı inhibe etmek için kullanılır. Bunu takiben glikol gurubu enzimlerin oksidasyonu ve histolojik ayrıntıların belirginleşmesi için %2.5'lik periodik asit eklenir. Daha sonra da periodik asidin veya aldehidli fiksatiflerinin oluşturdukları aldehidin, temel alkolle reaksiyonunu azaltmak için %0.02'lik potasyum borahidrit ilave edilir. Aynı prosedür endojen alkaline phosphatase'ların inaktive edilmelerinde de kullanılır (8). Endojen alkaline phosphatase için 1 mM Levamisole'de kullanılabilir (7).

Doku kollojeni ve bağ doku elementlerinin primer antikorlarla bağlanmasını

önlemek için boyamadan önce preparat non-immun serumla muamele edilir.

3-ENZİMİN KONJUGE EDİLMESİNDE : İki metod kullanılır

a-Periodate Oxdation Teknik

b-Glutaraldehyde Metod

Her iki metodunda uygulanmasında Horse-radish peroxidase, Alkaline phosphatase ve konjuge edilecek antikor gerekli olan maddelerdir.

a- Periodate Oxdation Teknik

1- Taze hazırlanmış Sodium bikarbonat (0.3M)'ta 10 mg Horsedaside peroxidase eritilir.

2-50ul fluorodinitrobenzen (FDNB ; %1'lik absolu alkolde) eklenir ve oda ısısında 1 saat yavaş bir şekilde karıştırılır. Bu basamak enzimin kendi kendisi ile bağlanması sağlanır.

3-1ml distile suda eritilmiş 0.06M sodium periodat eklenir ve oda ısısında 30 dk.karıştırılır.Bu basamak peroxidazdaki reaktif aldehyd gurubunu oluşturur.

4-1ml distile suda eritilmiş 0.32M ethylen glycol eklenir ve oda ısısında 1 saat karıştırılır. Bu basamak periodic asit fazlası ile reaksiyona girer.

5- Aktive edilen peroxidase ayrılır. Konjuge edilecek antikor karbonat/ bikarbonat solusyonları (0.01M, pH9.5) ile ayrı ayrı bir gece bekletilir.

6-15 mg antikor aktive edilmiş peroxidase'a karıştırılır, hafifçe karıştırılıp oda ısısında 2 saat bekletilir.

7-Distile suda %1'lik potassium borohydride'den 300 ml eklenerek, serbest aldehydler bloke edilir. 30-60 dk. bekletilir.

8-HCl (0.1) µ ile pH 7.2'ye ayarlanır.

9-%0.02'lik Sodium azide (NaN₃) ihtiva eden PBS'de arıtılır.Dilue edilmeden 4 °C'de veya %1'lik ovalbümin içeren azide-free PBS'de dondurularak muhafaza edilir.

b-Glutaraldehyde Metod

1-5mg antikor, 2ml fosfat buffurda (0.1M, pH6.8) çözündürülür.

2-10mg alkaline phosphatase veya peroxidase eklenip, hafifçe karıştırılır.

3-%1'lik 9 gutaraldehyd ihtiva eden distile sudan 0.15ml damlatılır.

4-Bu karışım oda ısısında 2 saat bekletilir.

5-PBS ile arıtılır (4C de 30 dk.1500 devir)

6-Santifüje edilerek, ortamda mevcut presipitantlar uzaklaştırılır (4° C de 30 dk. 1500 devir).

7-4° C de saklanır.

Ortamdaki serbest enzim ve antikorlar Sephadex G-200 kromatography yardımı ile ayrılır.

4 - ÇÖZÜNMEYEN VE KULLANIŞLI ANTİJEN TEMİNİ.

Başalı bir immune boyama için, doku antijenlerinin çözünmemesi ve temel yapılarında önemli bir değişme olmadan antijenik bölgeleri antikorun bağlanmasında uygun olmalıdır. Bunlara ek olarak, immune reaktif hücre ve

organellerinin identifiye edilmeleri için dokunun yapısı korunmalıdır. Marazi madde mahdut miktarda antijen ihtiva eder. Marazi madde'nin boyama için hazırlandığı her safhada, bu antijenin bir bölümü imha edilir. Bu prosedür sonunda imha edilmeden kalan ve antikor tarafından tanınabilecek az antijen immunochemistry ile lokalize edilir. Boyamanın amacının antijeni lokalize etmek olduğu gibi fiksasyonun amacında antijeni muhafaza etmektir. Antijenin primer antikor tarafından kullanılabilir, kabul edilebilir olması ve fikse edilmiş olması gerekir. Antijenin iyi fikse edilmemiş olması halinde, boyama prosedürü esnasında yıkama ile uzaklaşması ve boyamanın sonuçsuz kalması mümkündür.

Antijenin primer antikora bağlanabilme özelliğide çok önemlidir. Eğer antijen sentez bölgesinde difuzsa yanlış yorum yapılma ihtimali artar. Antijen küçük olduğu nisbette difüz olma ihtimali artar ve daha kuvvetli fiksasyon gerektirir. Bu gibi durumlarda formalin gibi cross - bağlı fiksatifler antijenin difüzyonunu önlerler.

Eğer antijen primer antikor tarafından kabul edilebilir değilse bağlanma olmayacaktır. Fazla fiksasyonun en önemli etkisi aşırı aldehide bağlanmasıdır, bu antijenin maskelenmesini sağlar ve antikorum bağlanmasını engeller. Fiksatifin antijenin yapısını değiştirmesi antijenin antikor tarafından tesbit edilmemesini sağlar antijenin büyük ve kompleks olduğu durumlarda, çok hafif fiksasyon uygulanması, antijenin maskelenme ve yapısında oluşabilecek değişiklikleri engelleme açısından zaruridir.

Optimal fiksasyon için aşağıdaki şartlar temin edilmelidir:

- Doku parçalarının kurumalarına müsaade edilmemeli ve mümkün olduğu kadar çabuk fiksatif içine atılmalıdır.

- Küçük doku parçaları, 2cm² den küçük ve 4mm kalınlığında, enaz 200ml fiksatif içine konmalıdır

- Fiksasyonu takiben, doku parçaları yıkanarak boyama kusurlarına sebep olabilecek fiksatif fazlasından arındırılmalıdır(10)

Dondurulmuş dokular immunocytochemistry için en uygun olanlardır. Pek çok yüzey antijeni fiksasyonla tahrip edilir ve sadece dondurulmuş kesitlerde tesbit edilmeleri mümkündür.

Dokular, küçük parçacıklar halinde olmalıdır, böylece hücre yapısına zarar verecek buz kristallerinin oluşması engellenmiş olur.

Doku dondurulduktan sonra -80°C de uzun süre saklanabilir.

Fiksasyon metodu, antijenin lokalizasyon bölgesine ve oluşacak antijen-antikor reaksiyonuna bağlı olarak değişir. Önemli olan ister bir fiksatifin içine daldırılarak, ister dondurularak muhafaza edilsin, dokunun mümkün olduğu kadar taze olması esastır.

Fiksatifler. Fiksatifin seçimi, fikse edilecek dokuya ve antijene bağlı olarak değişir. Günümüzde kullanılan başlıca fiksatifler;

-%10 Neutral Buffer Formalin pH 7

- Zenker's Fiksativi (9),

- Etanol (10)

-Formaldehid - merkuri

-Formaldehid - asetik asit (2).

Proteolitik Enzim Uygulaması , Formalinde fikse ve parafinde bloke edilen dokularda, peptidlerin güçlü kross bağlarının ayrılmasının en pratik yolu,kesitlerin boyama öncesinde tripsine veya pronase gibi bir proteolitik enzimlerle muamele edilmesidir. Bazı araştırmacılar, formalinde fikse edilen preparatlar için protease XIV, III ve proteinase K'nın en uygun proteolitik enzimler olduğunu bildirmişlerdir(11). Bu enzimler, fiksatifin antijenle yaptığı kross bağı kırar ve proteinin antijenik bölgesini açığa çıkarır.

Proteolitik enzimle yapılan muameleyi bertaraf etmek için bazı araştırmacılar Bouin's solusyonu formaldehit-merkürü, formaldehit-asetik asit gibi fiksatiflerin kullanılmasını tavsiye ederler(12,13,2,14).

Kesitin preparata tesbit edilmesi. İmmunolojik boyamalar için kullanılacak parafin kesitler asla sıcak preparatlar üzerine konmamalıdır.Çünkü sıcak doku antijenlerinin pek çoğunun tahrip olmalarına sebep olur.Preparatlar 37°C de en az bir gece bekletilerek kurutulur. Bazı durumlarda adhesive kullanımı gereksizdir. Fakat, protease enzim kullanılmışsa yada uzun boyama metodlarından biri kullanılacaksa, adhesive gereklidir. Özellikle dondurulmuş kesitlerle çalışılacaksa adhesive zaruridir. Adhesive olarak özellikle parafin veya dondurulmuş kesitler için, albumin kullanılabilir. Ayrıca formal-gelatine, chrome-gelatine ve %0.05'lik Elmers' Glue gibi adhesive'lerde in-kube edilmiş preparatlar kullanılır. Fakat en uygun olanı preparatların poly-L-lysinne ile kaplanmasıdır.

IP için dokuların preparata yapıştırılmasının en iyi ve en kolay yolu , kesitlerin preparat üzerinde kurutulmasıdır. Parafinin erimesi için preparatlar 60°C de 30' dakika bekletilirler. Bu işlem ayrıca doku ile cam lamel arasındaki yapışmayı da kolaylaştırır. Isı ile parafinin eritilmesi kimyasal adhesive kullanıldığında bile yapılmalıdır(9).

Reaksiyonun görülür hale getirilmesi. Peroxidase ve alkaline phosphatase'la işaretlenmiş antikorların avantajı kalıcı ve normal ışık mikroskopu altında görülebilir olmalarıdır

Peroxidase ile işaretleme enzimle antikorun cross-bağlarını sağlayacak büyük, ekstra bir moleküle ihtiyaç vardır. PAP(Peroxidase-antiperoxidase) in hazırlanması ise daha komplikedir ve kompleksin saflaştırılması gereklidir. Altınla işaretleme de antikorlar non-kovalent adsorpsiyon ile altın partiküllerine yapışırlar.

Tüm antikorlar kullanılmadan önce bilinen positive dokular kullanılarak, immunocytochemical boyamalarla titreleri yapılmalı ve en iyi çalışma diliasyonları tesbit edilmelidir. Bu çalışma diliasyonları boyama zamanına bağlı olarak değişir. Kısa boyama zamanı (10 dk-1 saat) uzun boyama zamanına (12-24 saat) göre daha yüksek antikor konsantrasyonuna ihtiyaç gösterir ve kısa süreli boyamalarda non-spesifik reaksiyon oranı daha fazladır.

Kromojenler : Bunlar peroxidase veya alkaline phosphatase gibi enzimlerle reaksiyona girip antijen-antikor bağlamasını görülür hale getiren kimyasal maddelerdir.

Horse-radish peroxidase için, diaminobenzidine(DAB) en çok kullanılan kromojendir. Fakat yapılan deneysel çalışmalar DAB'ın kanserojen özelliğini

ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle 3-Amino-9- ethylcarbozole (AEC) kullanılmıştır. AEC'nin en önemli dezavantajı alkolde ve organik çözücülerde erimesi ve sulu bir yapıştırıcı ile preparatların tesbiti gerekir (8). Bunların dışında kullanılan kromojenler ; 4-chloro-1-naphthol, tetramethyl benzidine ve pyro-catechol'lü p-phenylenediamine'dir. 4-chloro-1-naphthol soluk renkte reaksiyon oluşturur, tetramethyl benzidine ise mavi kristaller oluşumuna sebep olurki bu da normal reaksiyonu gölgeler.

Başlangıçta substrat olarak kullanılan NaN_3 zamanla yerini daha kullanışlı olan H_2O_2 'e bırakmıştır.

ENZİM	KAYNAK
Horse-radish proxidasa	Yaban Turpu
Glucose oxidase	Aspergillus
Alkaline Phosphatase	E. coli Dana barsak mukusu
B-Galactosidas	E. coli

Tablo: 2- Bazı enzimler ve kaynakları

Doku Boyanması için kullanılacak yöntem, kullanılacak kromojenin özelliğine göre değişir. DAB ve Hanker-Yates gibi kromojenler kullanılmış ise methyl green, light green ve Harris'Hematoxilin gibi alkaloid boyalar kullanılabilir, Preparat alkolde dehidre edilir, lamel ksilol veya toluene ihtiva eden bir yapıştırıcı ile yapıştırılır. AEC veya Chloro-naphthol gibi bir kromojenin kullanıldığı durumlarda ise preparat asit alkolde dekolore edilmemeli, Mayer's Hematoxilinle boyanıp, glycerol gelatin gibi sulu bir yapıştırıcı ile lamel kapatılmalıdır.

IMMUNOPEROXIDASE TEKNİKLERİ

Lokalize hücrel antijenlerin tesbit edilmesinde kullanılan dört temel immunoperoxidase boyama tekniği mevcuttur. Bu metodların belli avantaj ve dezavantajları vardır. Bunlar yapılacak çalışmalar gözönünde bulundurularak değerlendirilmelidir.

Direct Teknik bilinen bir antijeni tesbit etmenin en basit yolu bu antijene spesifik bir antikor kullanmaktır. Direkt immunoperoxidase metotta bu spesifik antikor kimyasal olarak peroxidase 'a bağlanmıştır. Konjuge edilen antikor dokuya eklendiğinde direkt olarak antijenle reaksiyona girer (Şekil 1). Daha sonra eklenecek kimyasallar, antijen-antikor reaksiyon bölgesinde renk oluşturur ve antijen görülür hale gelir.

İndirekt Teknik. Bu teknikte konjuge edilmemiş antikorlar, doku antijeni ile bağlanır. Daha sonra bu reaksiyonu tesbit etmek için, peroxidase ile konjuge edilmiş sekonder antikor eklenir, ve bu antikor primer antikorla bağlanır.

Örneğin, eğer primer antikor tavşandan elde edilmiş ise, konjuge edilen ikinci antikorunda tavşan-anti antikor olması gerekir. Daha sonra reaksiyonu görülür kılmak için bir kimyasal madde eklenir (şekil 2).

Bu metod direkt metotla kıyaslanınca daha kullanışlıdır. Değişik primer antikorlar aynı tür hayvanda üretilirse konjuge edilmiş bir tek sekonder antikor hepsi için kullanılabilir. Bu nedenle eğer konjuge edilmiş sekonder antikor mevcut ise bu prosedür herhangi bir primer antikorla uygulanabilir. Fakat direkt metoda nazaran daha fazla zaman alır ve daha fazla nonspesifik reaksiyon oluşma riski vardır.

Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Teknik. Bu metod üç temel maddenin kullanılması esasına dayanır. Bunlar, primer ve sekonder antikorlar ve PAP (Peroxidase enzimi ve bu enzime karşı antikor) komplekstir. Sekunder antikor hem primer antikora ve hemde PAP komplekse bağlanır. Çünkü her ikisinde aynı tür hayvandan üretilmiştir. Sekunder antikorun Fab bölgelerinden biri primer antikora, diğeri de PAP komplekse bağlanır. Daha sonra peroxidase enzimi substrat-kromojen reaksiyonla görülür hale getirilir (Şekil 3)

Bu metotta konjuge edilmiş antikor kullanılmaması PAP metodunun, direkt ve indirekt IP metodlarına kıyasla daha hassas olmasını sağlar. Özellikle doku antijenlerinin folmolde fikse ve parafinde bloke edilmesi esnasında tahrip edildikleri durumlarda, PAP doku antijenin tesbitinde en iyi methoddur.

Avidin-Biotin Teknik . Bu metod yumurta akının glycoproteini olan avidinin, bir vitamin olan biotine (Vit.H) kimyasal olarak bağlanması esasına dayanır. Metod üç önemli maddeye ihtiyaç gösterir; antijene spesifik primer antikor, primer antikora bağlanabilen ve biotinle konjuge edilmiş sekonder antikor, üçüncü olarak biotin ve avidinle konjuge edilmiş peroxidase enzimi. Avidinin serbest kenarı sekonder antikorda bulunan biotine ve dolayısı ile peroxidase enzimi de orijinal antijene bağlanmış olur. Reaksiyon daha sonra uygun bir kromatojenle görülür hale getirilir (Şekil 4).

Bu metotta her ne kadar konjuge edilmiş antikorlar kullanılırsa da avidinin biotine olan şiddetli affinitesi dolayısı ile bu metod diğer konjuge edilmiş antikorların kullanıldığı methodlardan çok daha hassastır. PAP metod gibi avidin-biotin metodunda formalinde fikse edilmiş, parafin bloklarda çok iyi sonuç verir (7,15). bazı araştırmacılar Avidin-Biotin tekniğini diğer peroxidase boyamalarından daha hassas olduğu kanaatinde idirler (16).

Temel Metodların Modifiye Edilmesi ile pek çok değişik boyama yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar;

Double veya Multiple Boyama; Bu yöntemle bir kesitin iki veya daha fazla değişik antijene karşı boyanması mümkündür. Bu gibi hallerde değişik renkleri veren kromojenler kullanılmalıdır.

Bu yöntem PAP metodunun modifikasyonudur. Boyama uygulanır, kromojen tatbik edilip renkli reaksiyon elde edildikten sonra, bütün prosedür tekrar edilir. Bu tekrar da şüpheli başta bir primer antikor ve değişik bir renk oluşturacak başka bir kromojen kullanılır (Mesela; ilk kromojen DAB ise ikinci olarak AEC kullanılır).

Bu yöntemin en önemli dezavantajı primer antikorların aynı hayvandan hazırlanmaları halinde ortaya çıkar. Bu durumda ikinci olarak uygulanan pri-

mer antikor ilk reaksiyonun sekonder antikorunun serbest olan bölümü ile bağlanarak yanlış pozitif reaksiyon oluşturabilir (Şekil 5).

Antijen işaretleme metodu : Bu metod radioimmunocytochemistry (RICH) tekniği diye de isimlendirilir. Bir radyoaktif işaret (^{125}I), antijene bağlanır, daha sonra bu antijen spesifik antikor ile reaksiyona sokulur. Böylece radioaktif olarak işaretlenmiş antijen spesifik antikorun bir reseptörü bağlanır, diğer reseptör ise dokuda mevcut antijene bağlanmak için serbest kalmış olur. Bu tekniğin en büyük dezavantajı her antikorun tek tek işaretlenme mecburiyetidir (Şekil 6).

Altınla işaretleme metodu : Bu metod özellikle EM için geliştirilmiş olmakla birlikte, ışık mikroskobuna da uygulanabilir. Bu metodda Staphylococcus aureus bakterisinden elde edilen Protein A'nın immunoglobulinlerin Fc reseptörlerine ve colloidal altın paritküllerine bağlanma yetenekleri birlikte kullanılır. Protein A-Altın kompleksi boyamanın ikinci basamağı olarak uygulanır. Böylece primer antikorla reaksiyona giren Protein A'ya bağlı altın reaksiyonun görülmesini sağlar. Bu metodun en önemli özelliği antikorun kesitteki mevcut tüm İmmunoglobulinlerle reaksiyona gireceğidir (Şekil 7). Bu teknik indirekt olarak ta uygulanabilir.

Protein A'nın ferritin veperoxidase'la işaretlenmeside EM için geliştirilmiş metodlardır.

Hapten-sandaviç metodu ; Bu metotta monoclonal anti-hapten antikorlar bir köprü gibi kullanılır. Primer antikorlar bir haptenle işaretlenir. Sekonder olarak monoklonal anti-hapten antikorlar eklenir, son basamakta ise haptenle işaretli PAP kompleks eklenir ve uygun kromojenle peroxidase görülür hale getirilir (Şekil 8) (7,17,18).

ALKALIN PHOSPHATASE METODLARI

Bu metodlar, temel olarak IP metodlarının aynısıdır. Kullanılan peroxidase enziminin yerini bu metodlarla ALKALIN PHOSPHATASE enzimi almıştır.

TESTİN KULLANIM ALANLARI, AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI

İmmunoenzim (IE) teknikler immunocytochemistrynin diğer metodu olan IF ile karşılaştırılınca bazı avantajlara sahiptir,

1-IF için özel florosan mikroskoba gerek olmasına karşın IE normal ışık mikroskobunda muayene edilir.

2-Bazı dokularda ki autoflorasan spesifik florasanın görülmesini engelleyebilir.

3-Spesifik florasan'ın ultraviyole (UV) lambası altında kaybolma süresi çok kısadır (15 dk.kadar).

4-IF ile boyanan preparatların uzun süre saklanma imkanları yoktur, buna karşılık IE ile boyanan preparatlar uzun süre saklanabilir.

5-IF tekniğinin elektron mikroskoba (EM) uygulanamamasına karşılık IE teknikleri EM'la yapılan çalışmalarda kullanılmaya uygundur (19,20).

6- Uygun bir doku boyaması ile IE'de immune boyama yanında doku morfolajisinin incelenmesi de mümkündür (9).

7- IE teknikleri formalinde fikse edilmiş parafin bloklarda çok iyi sonuçlar verirken, böyle kesitlerle IF teknikleri iyi sonuç vermezler (21).

IE veya IF metodlarının hangisinin daha spesifik olduğu tartışması sürmektedir. Bu tekniklerin günümüze kadar yapılan karşılaştırmalarında eşit spesifikite ve sensitiviteyi tesbit edilmişse de IE tekniklerinde özellikle immunoalkalin phophatase metodunun geliştirilmesi IE tekniklerinin hassasiyetini artırmıştır (19,20,22).

Immunoenzim metodları içinde en çok kullanılanı IP boyamalarıdır. Fakat yeni geliştirilen immunoalkalin phospatase metodunun (IA) IP ile karşılaştırılınca bazı avantajları olduğu ortaya çıkmıştır. Bunlar;

1-Parlak kırmızı IA reaksiyonu, IP reaksiyonundan daha kolay görülebilir.

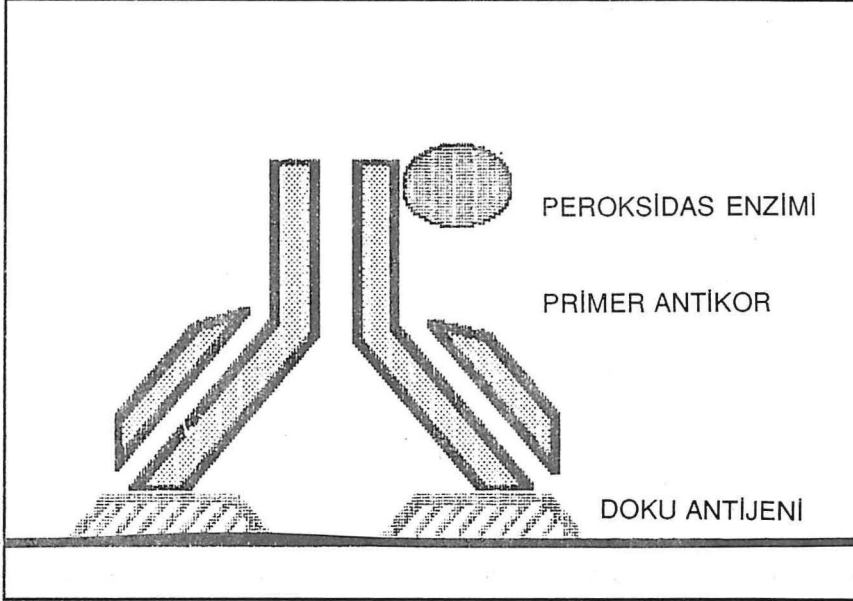
2-IA reaksiyonları IP reaksiyonlarından daha yoğundur.

3-Endojen peroxidase, özellikle granülasit, erytroid hücreler ve mikrofajlarda istenmeyen background boyamaya neden olur ve bu endojen peroxidase'in bloke edilmesi sırasında antijenin denatüre edilmesi riski devamlı vardır. Endojen alkalın phospatase ise dokularda çok az bulunur ve levamisol ile kolayca bloke edilir. Endojen alkalın phospatase'in dokularda az miktarda bulunması özellikle eosinofil infiltrasyonu olan lenfoid dokuların boyanması ve kan veya kemik iliği ile çalışıldığında önemlidir.

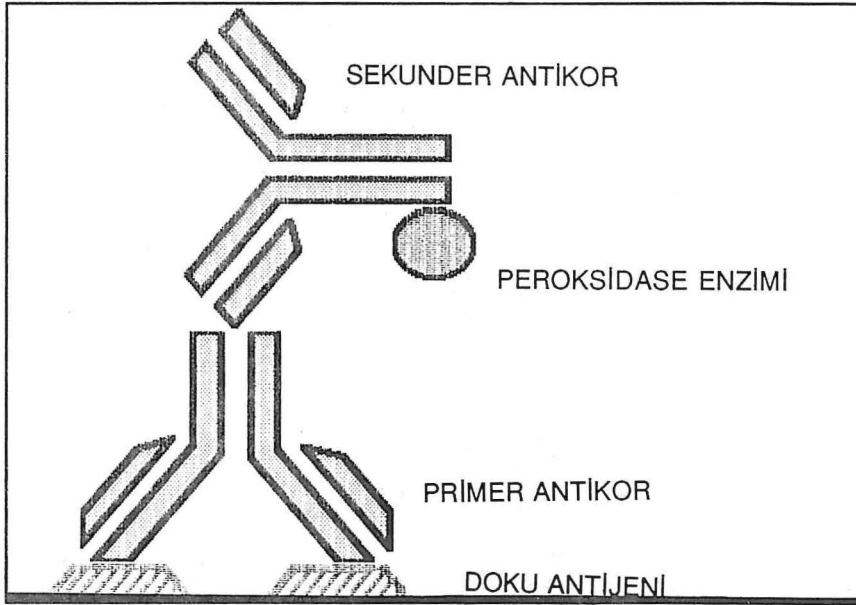
IE Teknikleri, bütün enfeksiyöz hastalıkların teşhisinde özellikle besli yerlerinde yetiştirilmesi çok zor veya imkansız olan hastalıkların teşhisinde kullanılır (11,14,23,20,12,24). Hindistan'da yapılan bir araştırmada kuduz teşhisinde,IF'ye alternatif olarak denenen Direkt IF boyamaların %100 sensitif ve spesifik olduğu bildirilmiştir (22).

Bunun yanında tümör histolojisinde IE metodları çok kullanılırlar. Özellikle histolojik ayırımı çok zor olan carsinoma ve geniş hücreli İymphoma'ların ayırımında, pleural mesothelioma ile metastazik adenocarsinoma'nın ayırımında çok kullanılırlar(20). IE'nin diğer önemli bir özelliğide iki veya üç değişik antijene karşı boyama yapmak mümkündür (7).

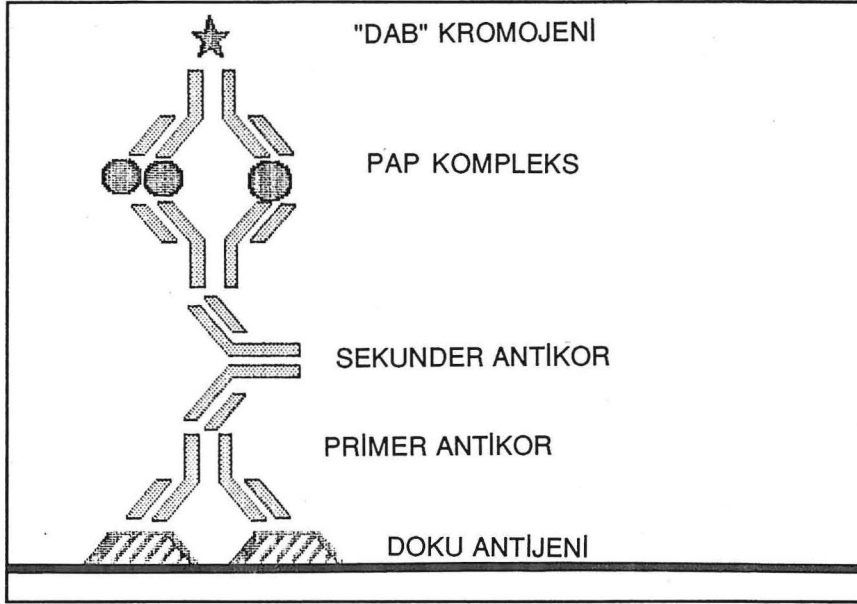
IE'nin en büyük dezavantajı ise kullanılan kromojenlerin kansarogen olması ve boyamanın IF veya diğer histolojik boyamalarla kıyaslanınca çok uzun olmasıdır.



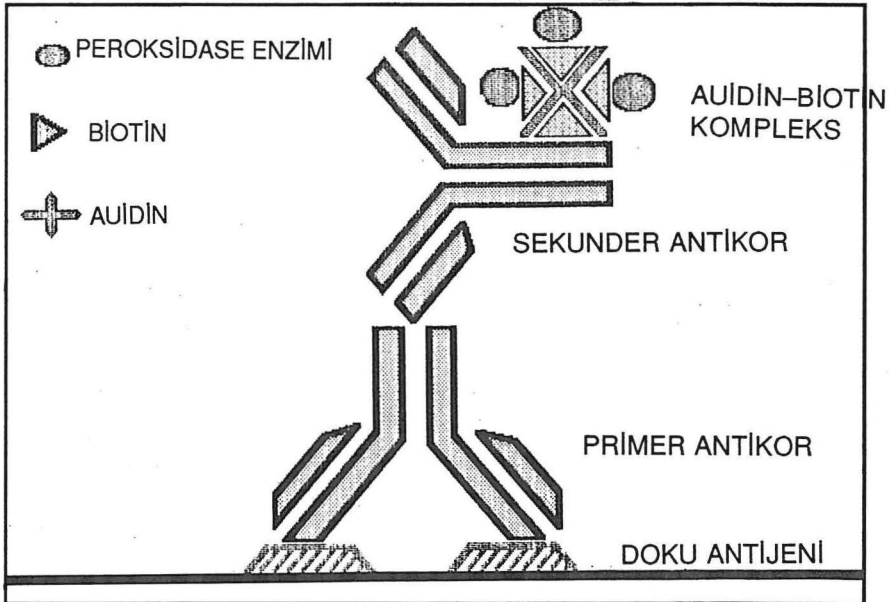
Şekil 1- DİREKT IPT



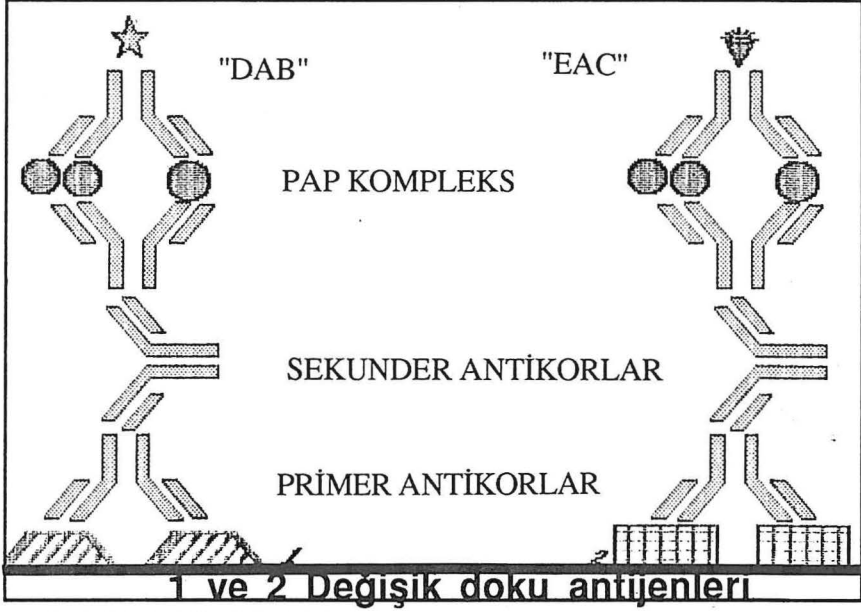
Şekil 2- İNDİREKT IPT



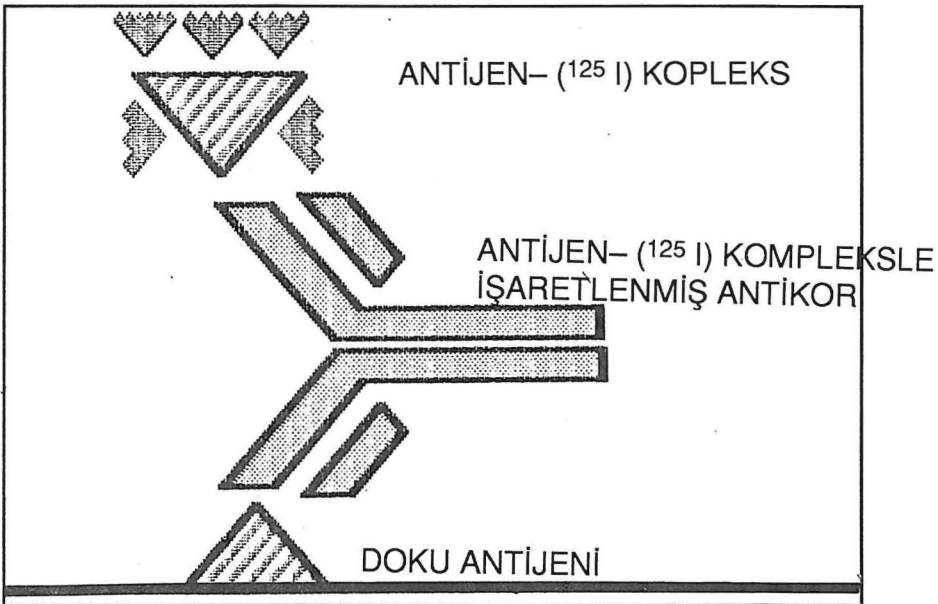
Şekil 3- PAP TEKNİK



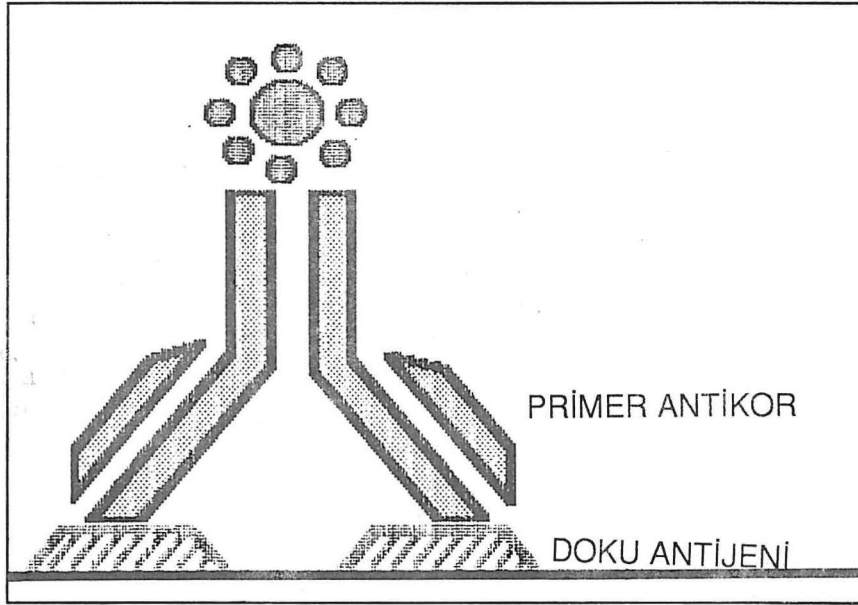
Şekil 4- AUIDİN-BİOTİN TEKNİK



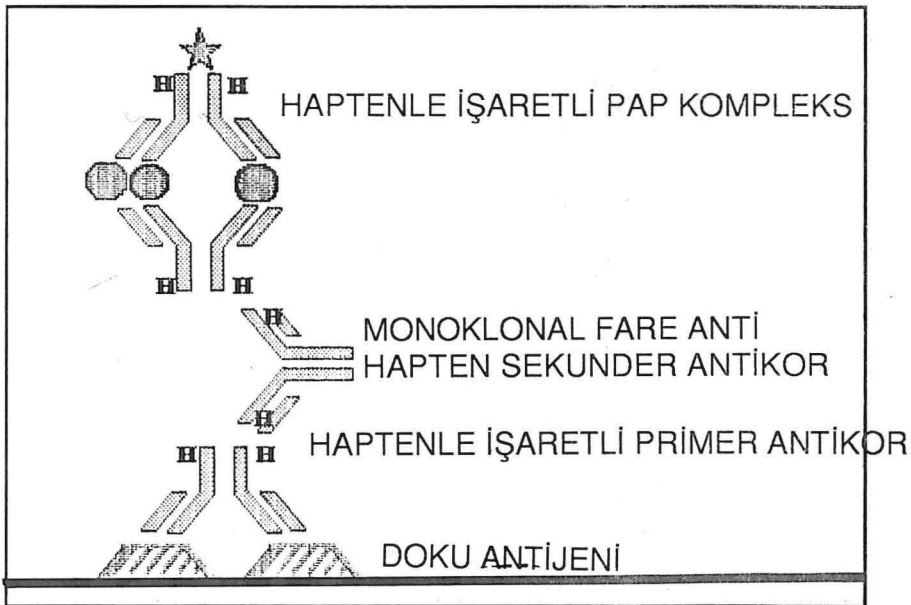
Şekil 5- DOUBLE BOYAMA



Şekil 6- ANTİJEN İŞARETLEME METODU



Şekil 7- ALTINLA İŞARETLEME



Şekil 8- HAPTEN-SANDAVIÇ METODU

LİTERATÜRLER

- 1- ÇABALAR M. (1988) : Immunoperoksidaz Teknikleri. Yüzüncüyıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Bilimdalı Semineri.
- 2- CULLING, C.F.A., ALLISON, R.T., BARR, W.T. (1985) : Cellular Pathology Technique. 4 th Edition , Butterwoths.
- 3- MILSTEIN, C., GALFRE, G., SECHER, D.S., SPRINGER, T., (1979): Monoclonal antibodies and cell surface antigens. Cell Biology Int. Rep. 3, 1-16.
- 4- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D., (1985) : Immunology 1 st Edition, GOWER MEDICAL PUBLISHING LTD. USA.
- 5- ROITT, I., (1991) : Essential Immunology 7 th Edition BLACWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, U.K.
- 6- POLAK, J.M., NOORDEN, S.VAN., (1987): An Introduction to Immunocytochemistry: Current Techniques and Problems. Revised Edition, OXFORD UNIVERSITY PRESS OXFORD, U.K.
- 7- BAXENDEALE, W.; (1991) Personal Communication.
- 8- HEYDERMAN, E., STRUDLEY, I., RICHARDSON, T.C., (1986) : Handbook of Experimental Immunology Vol. 4; Applications of immunological Methods in Biomedical Sciences. BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS.
- 9- BOURNE J.A., (1985) : Handbook of Immunoperoxidase Staining Methods. Immunocytochemistry Laboratory, DAKO CORPORATION. USA.
- 10- FERNANDEZ, A., MARTIN DE LAS MULAS, J., SIERRA, M.A., CARRANZA, J., and JOVER, A., (1989) : Immunohistological identification of both infectious bursal and Marek virus antigens in the bursa of Fabricius. Dtsch. tierärzt. Wschr. 96, 192-194
- 11- McNEILLY, F., ALLAN, G.M., MOFFED, D.A., McNULLTY, M.S., (1991) : Detection of chicken anaemia agent in chickens by immunofluorescence and immunoperoxidase staining. Avian Pathology. 20, 125-132.
- 12- JÖNSSON, L.G.O., ENGSTRÖM, B.E., (1986) : Immunochemical detection of Infectious bursal disease and Infectious bronchitis virus antigens in fixed, paraffin embedded chicken tissues. Avian Pathology. 15, 385-393.
- 13- O'LOAN, C.J., ALLAN, G.M., (1990) : The detection of turkey rhinotracheitis virus antigen in formalin fixed, paraffin embedded tissue using a streptavidin-biotin-immunoperoxidase method. Avian Pathology. 9, 401-407.

- 14- HOOP, R.K., REECE, L.R., (1991) : The use of immunofluorescence and immunoperoxidase staining in studying the pathogenesis of chicken anaemia agent in experimentally infected chickens. *Avian Patholoji*, 20, 349-355.
- 15- GUESDON, J.L., TERNYNCK, T., AVRAMEAS, S., (1979) : The use of Avidin-Biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *The J. of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol: 27, 8, 1131-1139.
- 16- SUE-MING HSU, RANIE, L., FANGER, H., (1981) : Use of Avidine-Biotin-Peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol: 29, 5, 577-580.
- 17- HEYDERMAN, E., (1979) : Immunoperoxidase technique in histopathology; applications, methods, and controls. *J. of Clinical Patholoji*, 32, 971-978.
- 18-TAYLOR, C.R., (1978) : Immunoperoxidase techniques. *Arch. Pathol. Lab.Med.*, Vol: 102, 113-121
- 19- MASON, D.Y., ERBER, W.N., FALINI, B., STEIN, H., GATTER, K.C., (1986) : MONOCLONAL ANTIBODIES, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS. 1 st EDITION p. 145-181.
- 20 - WARD, A.C.S., KAEBERLE, M.L., (1984) : Use of an immunoperoxidase stain for the demonstration of bovine viral diarrhoea virus by light and electron microscopies. *Am. J. Vet. Res.* Vol: 45, 165-170
- 21- HAINES, D.M., CLARK, E.G., (1991) : Enzyme immunohistochemical staining of formalin-fixed tissues for diagnosis in veterinary pathology. *Can. Vet. J.*, Vol, 32-295-302.
- 22- KOTWAL, S., NARAYAN, K.G., (1985) : Direct immunoperoxidase test in the diagnosis of Rabies-an alternative to Fluorescent antibody test. *Int. J. Zoon.*, p. 80-85.
- 23- NAKAMURA, K., COOK, J.K.A., OTSUKI, K., HUGGINS, M.B., (1991) : Comparative study of respiratory lesion in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunohistochemistry. *Avian Pathology*, 20, 241-257.
- 24- MACARTNEY, L., MACARTNEY, C.M., (1986) : Canine parvovirus; Development of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *Resc. in Vet. Scin.* 40, 201-208.