

- HİSTOKİMYASAL VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER

Histokimyasal yöntemler (karbonhidrat, protein ve lipidlerin demonstrasyonu)

Histokimya; maddeleri, hücre ve doku düzeyinde ayırt etmeye, yerleşimlerini ve miktarlarını saptamaya yarayan kimyasal tekniklerin ortak adıdır.

-
- **a. Karbonhidratların demonstrasyonu**

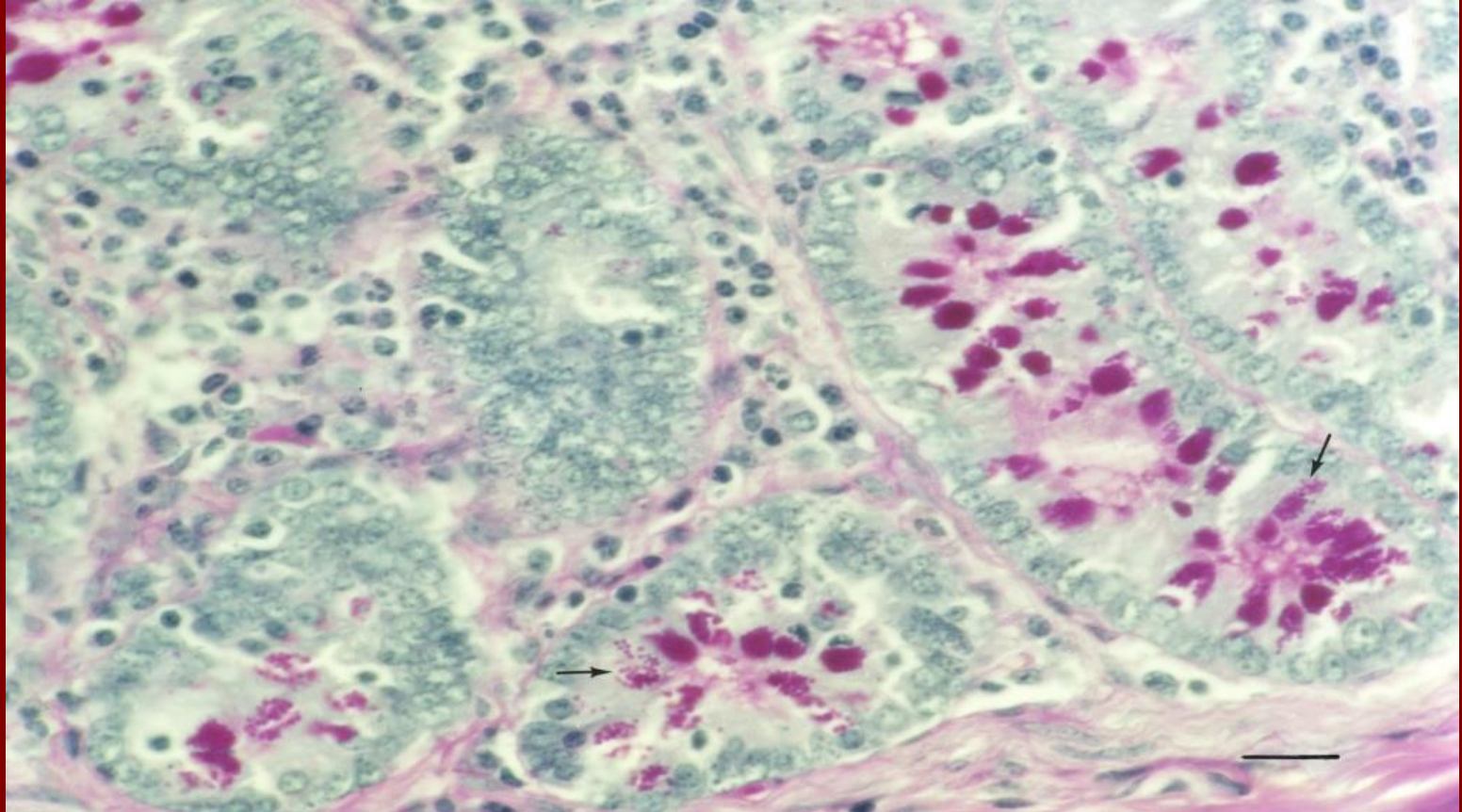
- Karbonhidratlar çoğunlukla karbon, hidrojen ve oksijenden kurulu organik maddelerdir.

- **Polisakkaritler, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar** olarak sınıflandırılırlar.

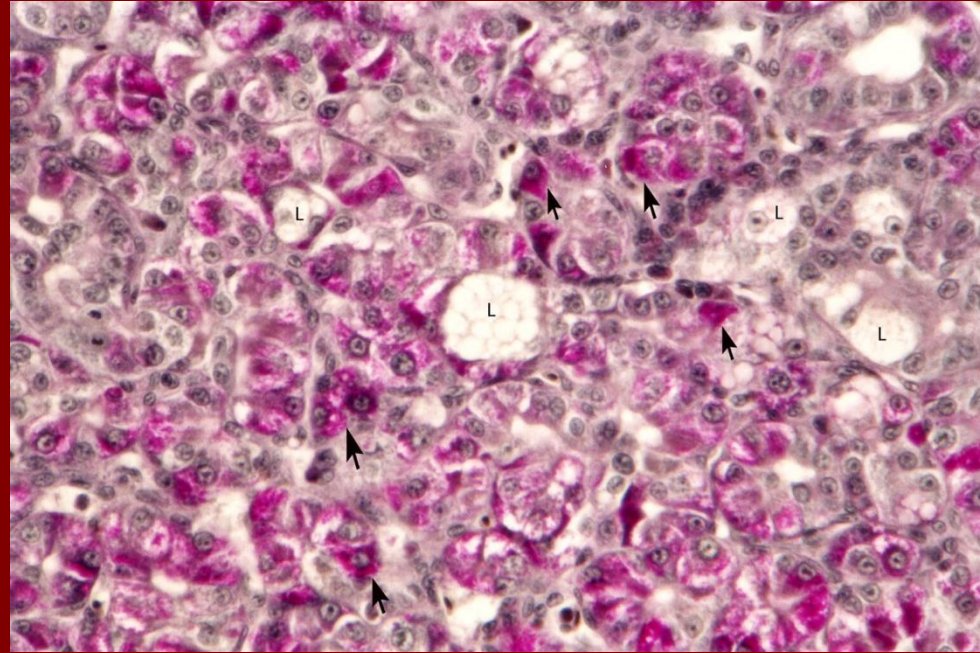
- Polisakkaritler vücutta ya serbest ya lipidlerle ya da proteinlerle birleşerek kompleks gruplar oluştururlar.

- Vücutta serbest olarak bulunan polisakkarid, yalnızca glikojendir.

- Karbonhidratlar, esas olarak PAS (Periyodik Asit Schiff) reaksiyonu ile belirlenirler.
- PAS reaksiyonunun özgünlüğü, ardışık kullanılan iki ayraca dayanır. Bunlar, Periyodik asit (HIO_4) ve Schiff ayracıdır.



- Periyodik asit, iki komşu karbon atomları arası bağları açarak aldehidler oluşturur. Meydana gelen bu aldehid grupları Schiff ayıracı ile reaksiyona girerek mor veya morumsu kırmızı renkte kompleks bir bileşik şekillendirir. Bu bileşik ışık mikroskopuyla görülebilir ve PAS pozitif maddeler olarak adlandırılır.

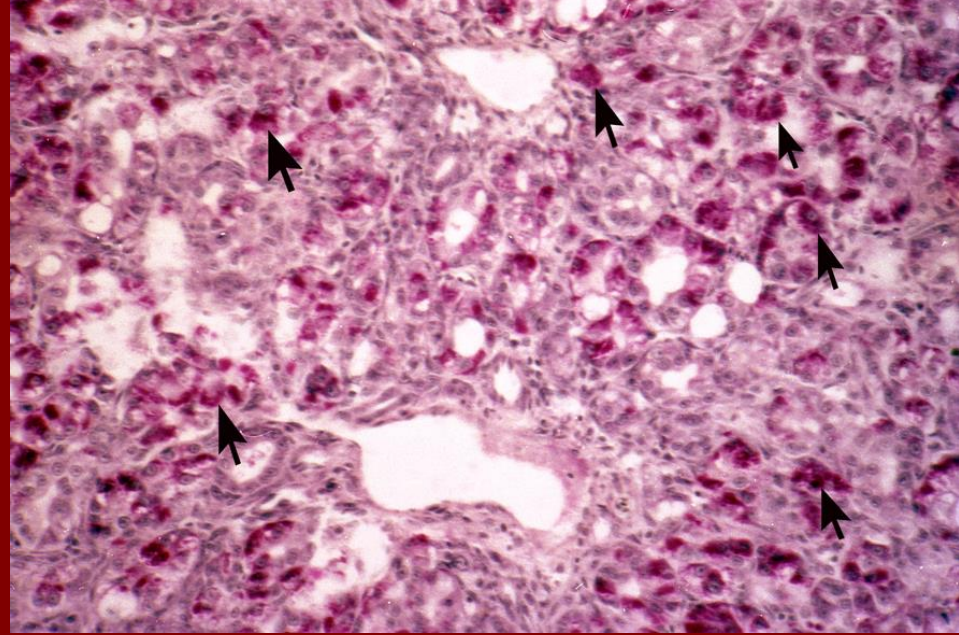


- Karbonhidratlardan zengin maddelerin saptanmasında kullanılan bir diğer yöntem bazofili derecesinin belirlenmesidir.
- Glikozaminoglikan'larda siyalik asit veya sülfat gruplarının bulunuşu, uygun tespit edilmiş materyale belirgin bir bazofili verir. Örneğin; mast hücre granüllerindeki heparin kuvvetli bazofili gösterir.

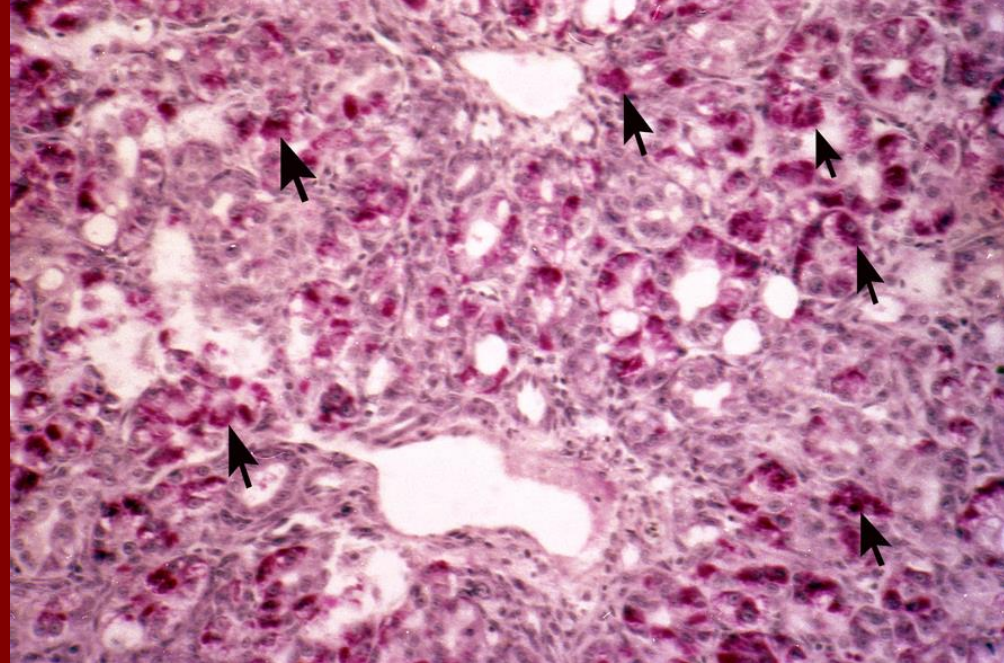
- **Glikojenin Demonstrasyonu**
- Glikojen normal koşullarda intrasitoplazmik olarak kalp ve **iskelet kaslarında, karaciğer**, kıl follikülleri, retina, servikal ve vaginal epitelde, megakaryosit ve lökosit gibi hücrelerde bulunur.
- Tespit işleminin dokulardaki glikojenin korunmasında oldukça önemlidir. Bu konuda genel kanı, Rossman'ın solüsyonu, **%10 formol-alkol veya %80 alkol** gibi tespit solüsyonlarınının çok güvenilir olduğudur.

- Glikojenin suda çözünebilirliği göz önünde bulundurularak **formalin kullanımından kaçınılmalıdır**. Tespit solüsyonunun +4 °C'de olması önerilmektedir.
- PAS ve Best's carmin teknikleri glikojen demonstrasyonunda öncelikle kullanılan tekniklerdir.

Best carmin

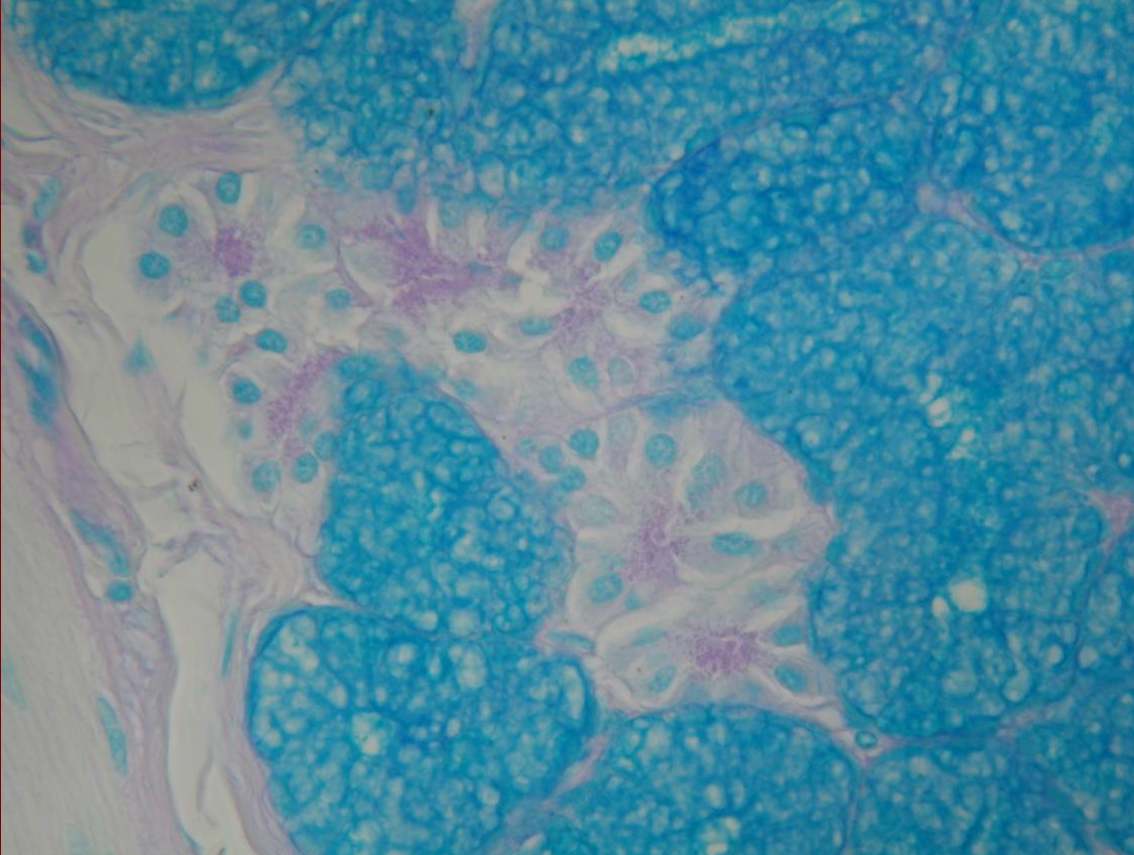


- Dokularda diğer PAS pozitif maddelerin de bulunması nedeniyle reaksiyonun spesifikliği kontrol preparasyonları ile saptanır.
- Bu amaçla kontrol kesitlerine glikojeni hidrolize eden α -amilaz uygulanır.
- PAS reaksiyonu ile yoğun olarak boyanan, ancak α -amilaz ön uygulamasından sonra boyanmayan yapıların glikojen içerdiği düşünülür.

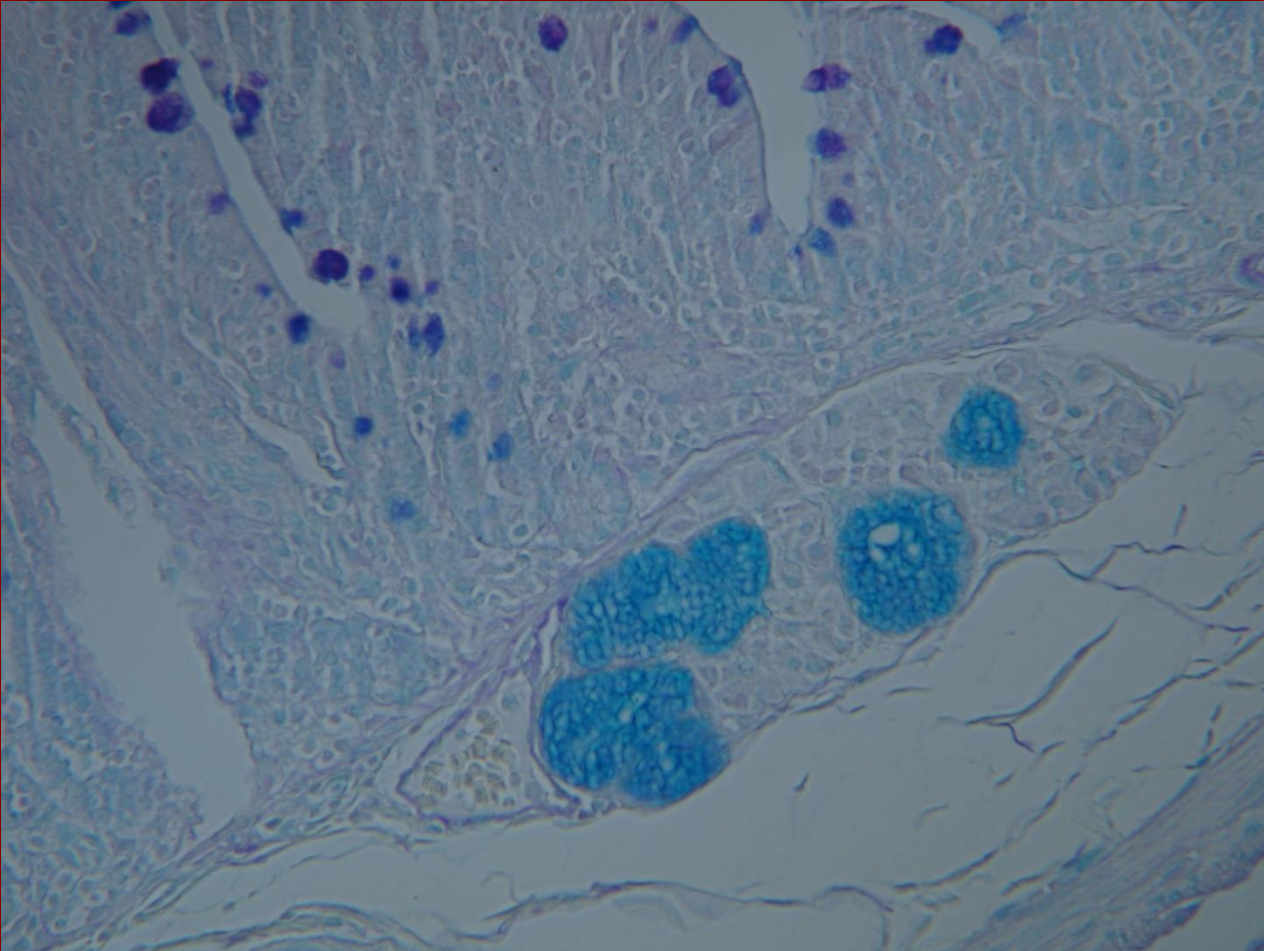


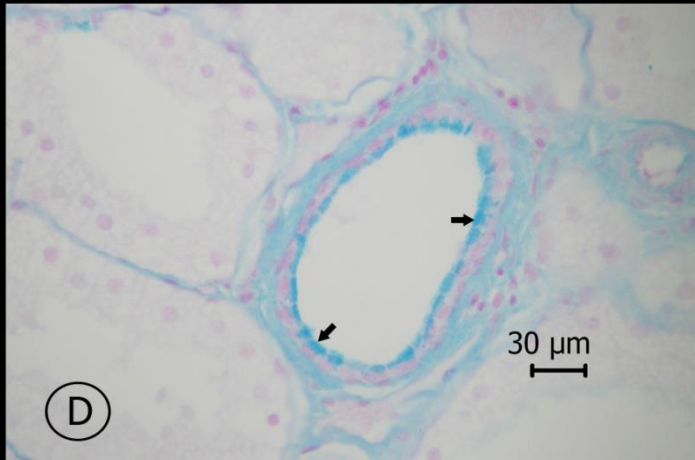
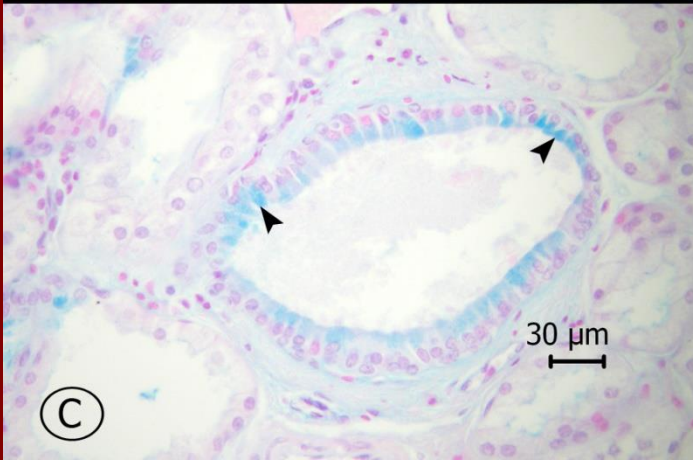
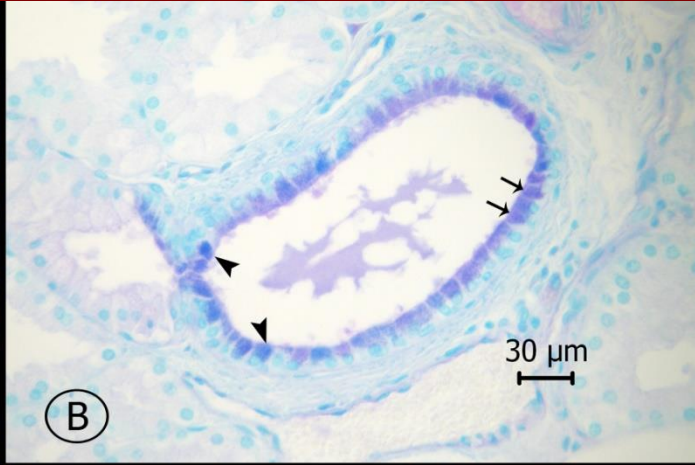
Alcian Blue Metodu:

- Bu metot ile glikozaminoglikanlar, karboksil ve sülfat grupları yönünden ayırım yapılmadan demonstre edilir. Reaksiyon parlak mavi renkte görülür.



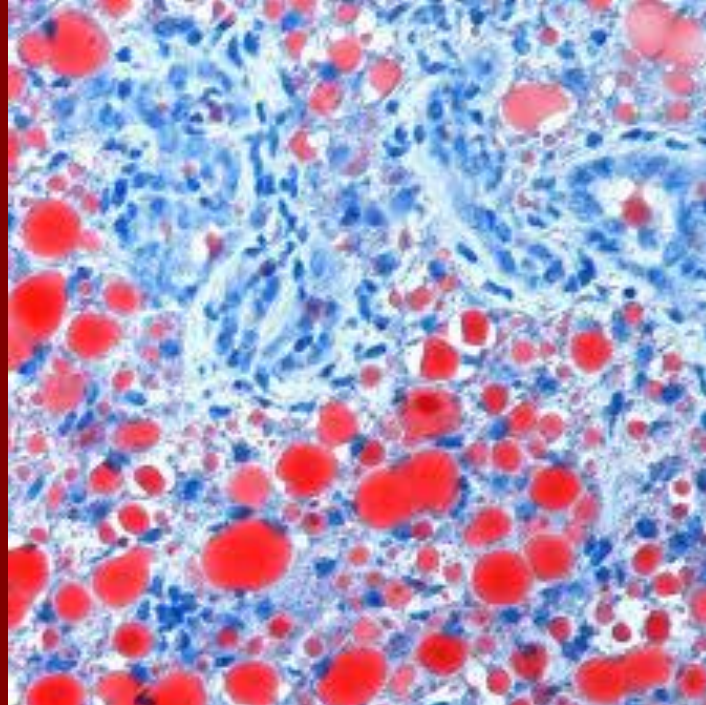
- Aldehit fuksin, Kuvvetli bir asit boya maddesidir ve seçici olarak sülfatlı mukopolisakkaridler ile reaksiyona girer.



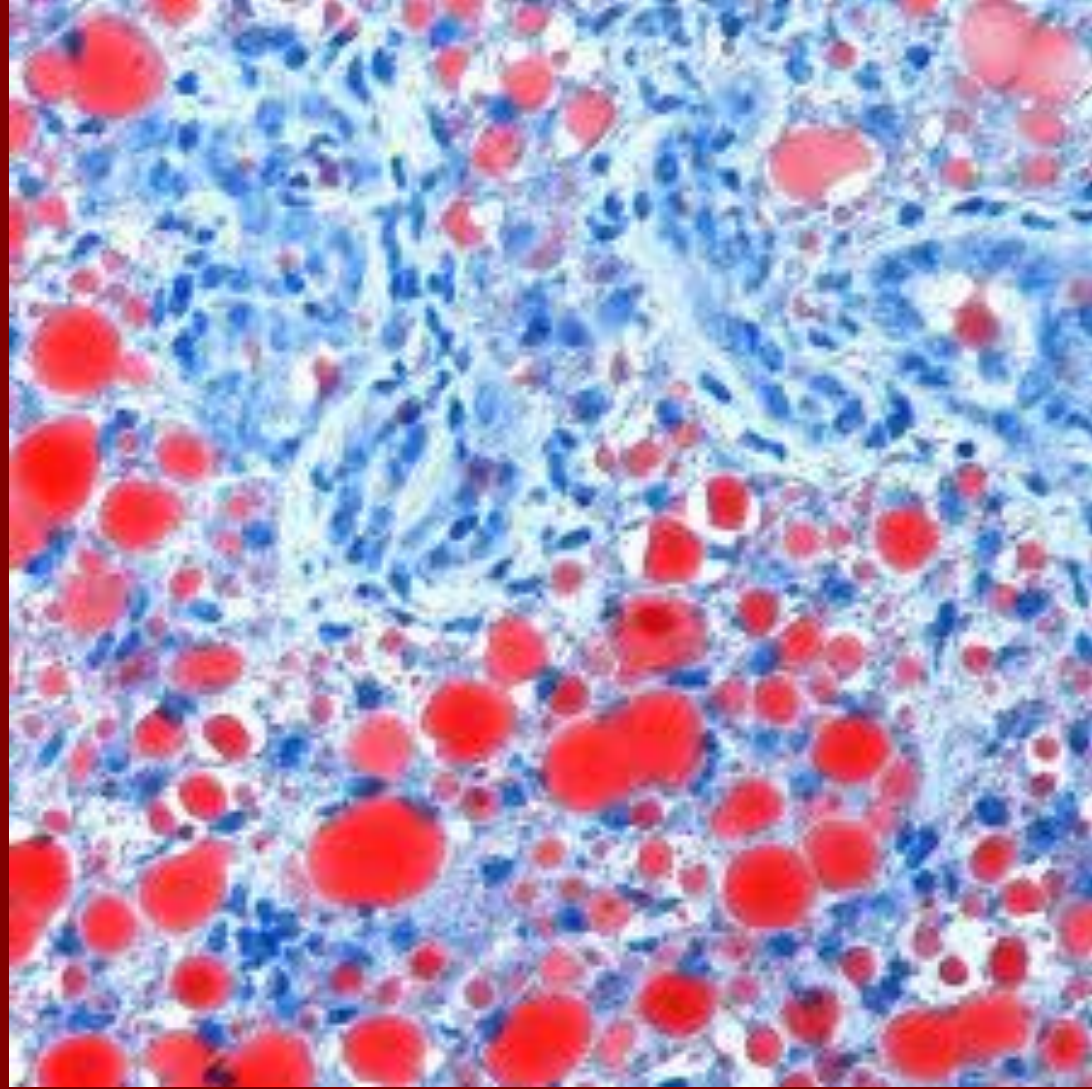


LİPİDLERİN GÖSTERİMİ

- Diğer doku bileşenleri gibi lipidler de ender olarak saf halde bulunurlar. Çoğunlukla glkolipid veya lipoprotein şeklinde yer alırlar.
- En yaygın hücreesel lipidler, trigliseridler ve fosfolipidlerdir.



- Trigliseridler, sitoplazmik damlacıklar şeklinde görülen metabolik birikimlerdir. Bunların dokulardaki fonksiyonları sitokimyasal olarak izlenebilir.

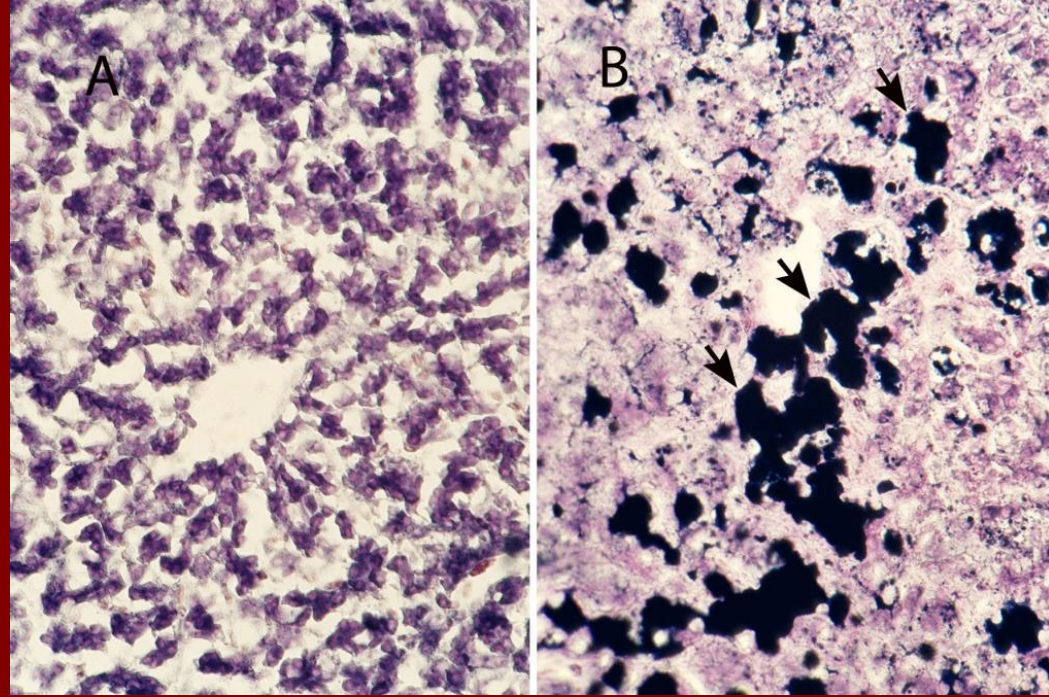


- Fosfolipidler ise membranların yapısal bileşenleri olup, sitokimyasal olarak yerleşimlerini belirlemek oldukça güçtür.

- Lipidlerin fiziksel özellikleri, demonstrasyonlarında önemli bir faktördür. Boyamada, hidrofobik veya hidrofilik lipidlerin belirlenmesi amaçlanır. Hidrofobik lipidler Sudan boyaları ile reaksiyona girdikleri halde hidrofilik lipidler diğer yöntemlerle gösterilirler.

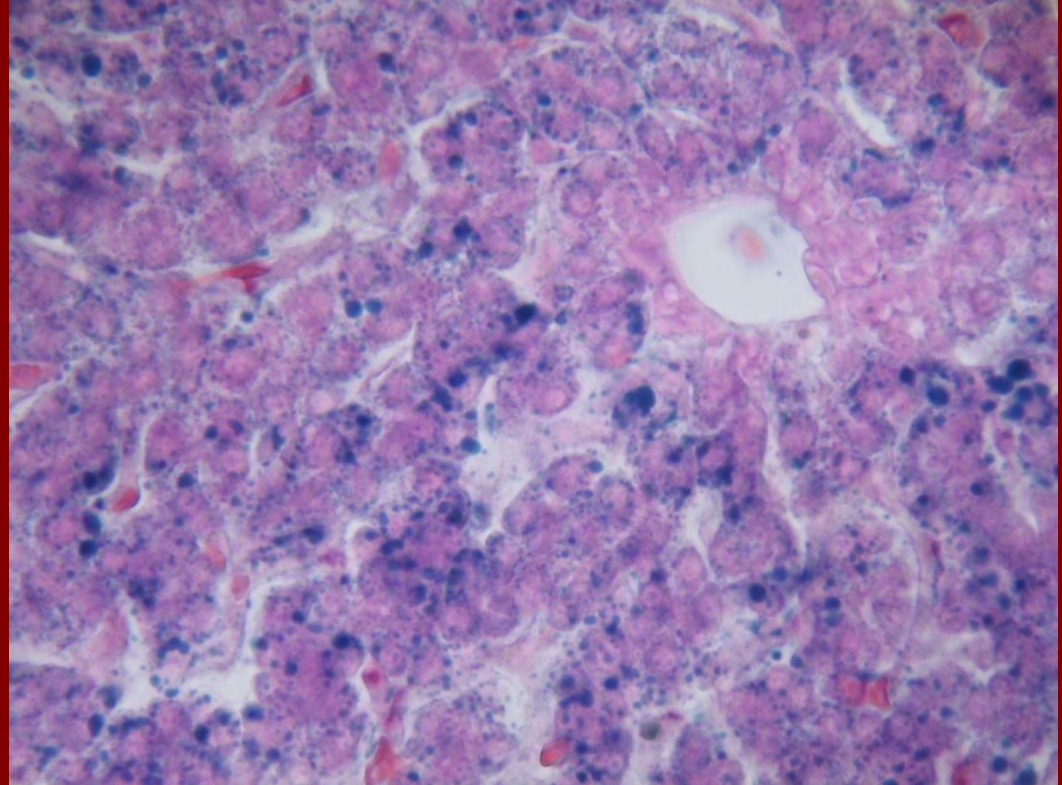
- Lipidler organik fiksatifler ile eriyorlar, ancak donmuş kesit ile korunuyorlar. Bu yüzden rutin parafin tekniği kullanılmaz.
- Donmuş dokulardan alınan kriyostat kesitleri birçok yöntem için iyi sonuçlar vermektedir. Bununla birlikte bazı histokimyasal yöntemlerde tespit gereklidir. Bu amaçla Baker'in formol kalsiyum solüsyonu kullanılabilir.

- Sudan boyaları hücrelerde esasını trigliseridlerin oluşturduğu lipid damlacıkları içerisinde dağılarak onları yoğun bir şekilde boyarken, yağ asitleri ve fosfolipidleri boyamazlar.
- Sudan boyaları için bir taşıyıcı gereklidir. Bu taşıyıcı % 70 etanol, propilen glikol, % 60 izopropil alkol gibi nisbeten çözünmeyen lipidler içeren organik bir solventtir.

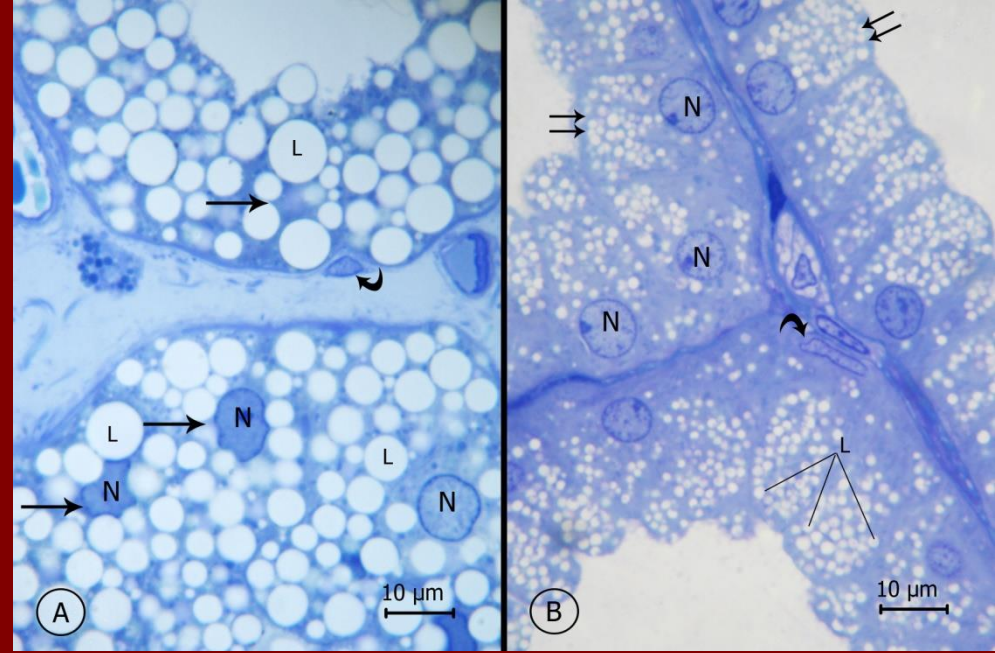


Çoğu gerçek anlamda boya taşıyıcı değildir, fakat kromojen (renk taşıyan) maddelerdir.

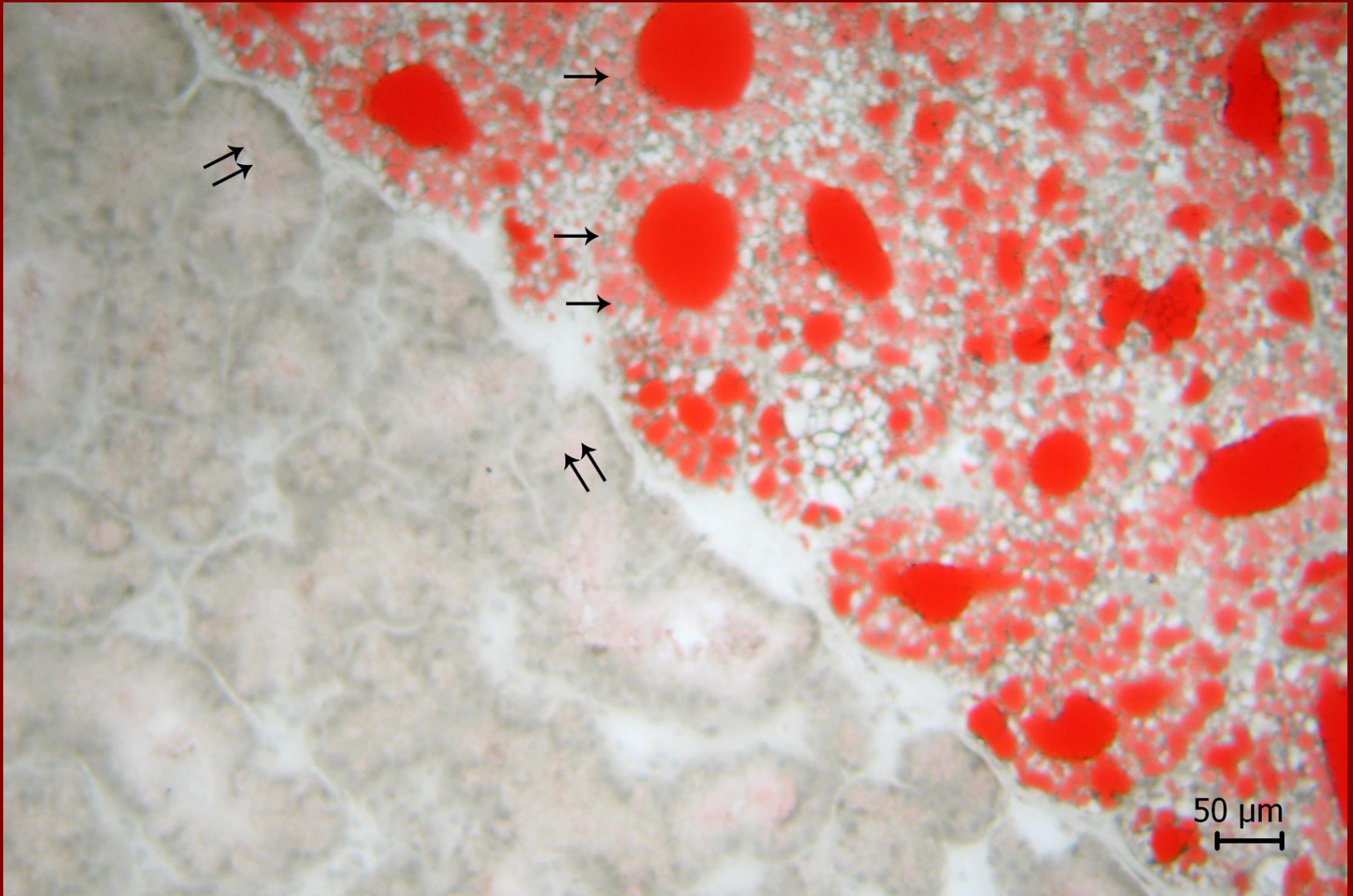
Kesitler, boya ile doyurulmuş taşıyıcı solüsyona daldırılır ve böylece boya taşıyıcıdan lipid damlacıklarına geçer.



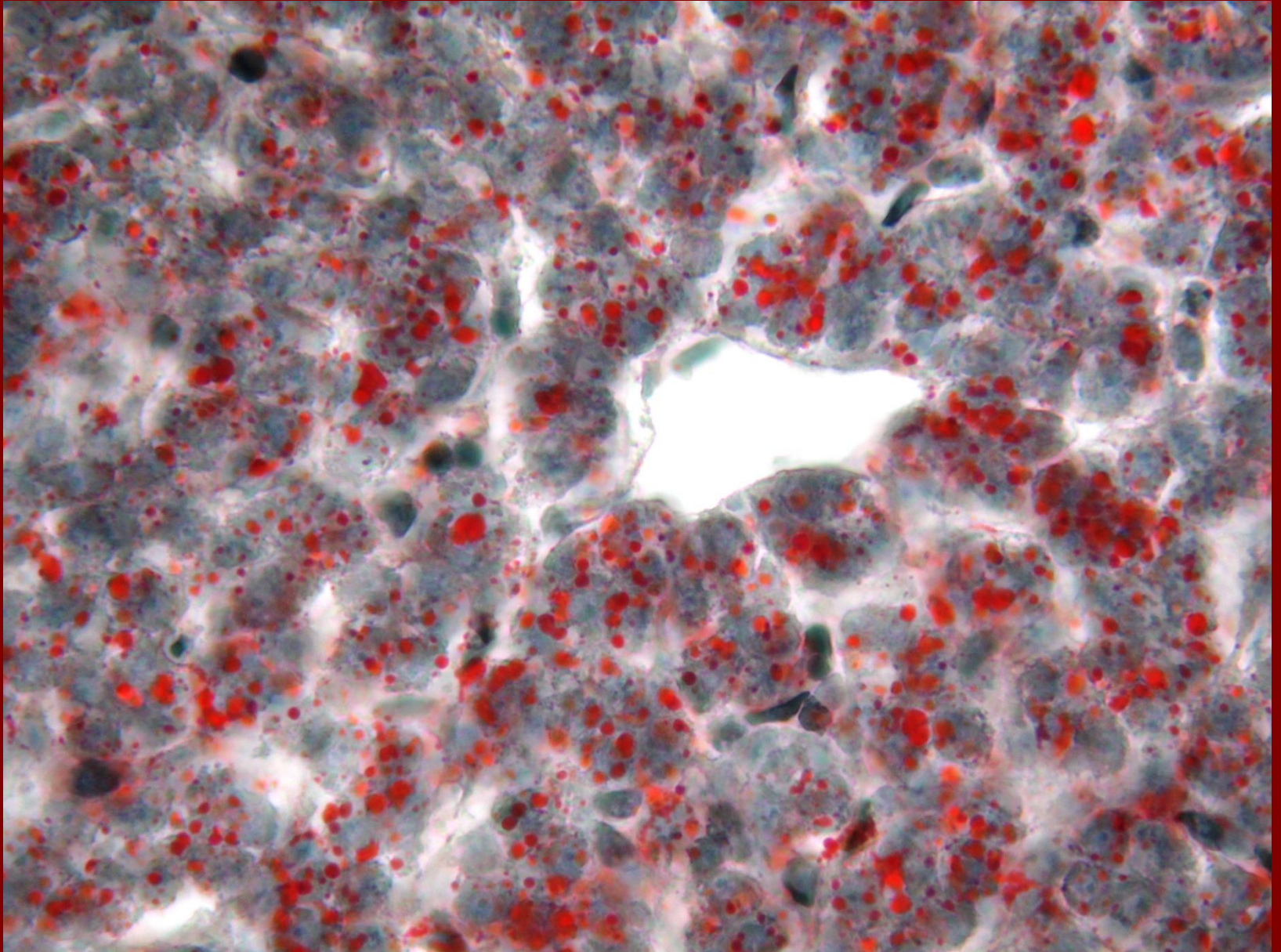
- Yağ boyamaları için de kontrol preparasyonları uygulanabilir. Bunun için boyama öncesinde kontrol kesitleri aseton, kloroform veya metanol gibi organik çözücülerden geçirilir. Bu işlem yağları uzaklaştıracağından doku boyanmayacaktır.



Oil red O boyaması



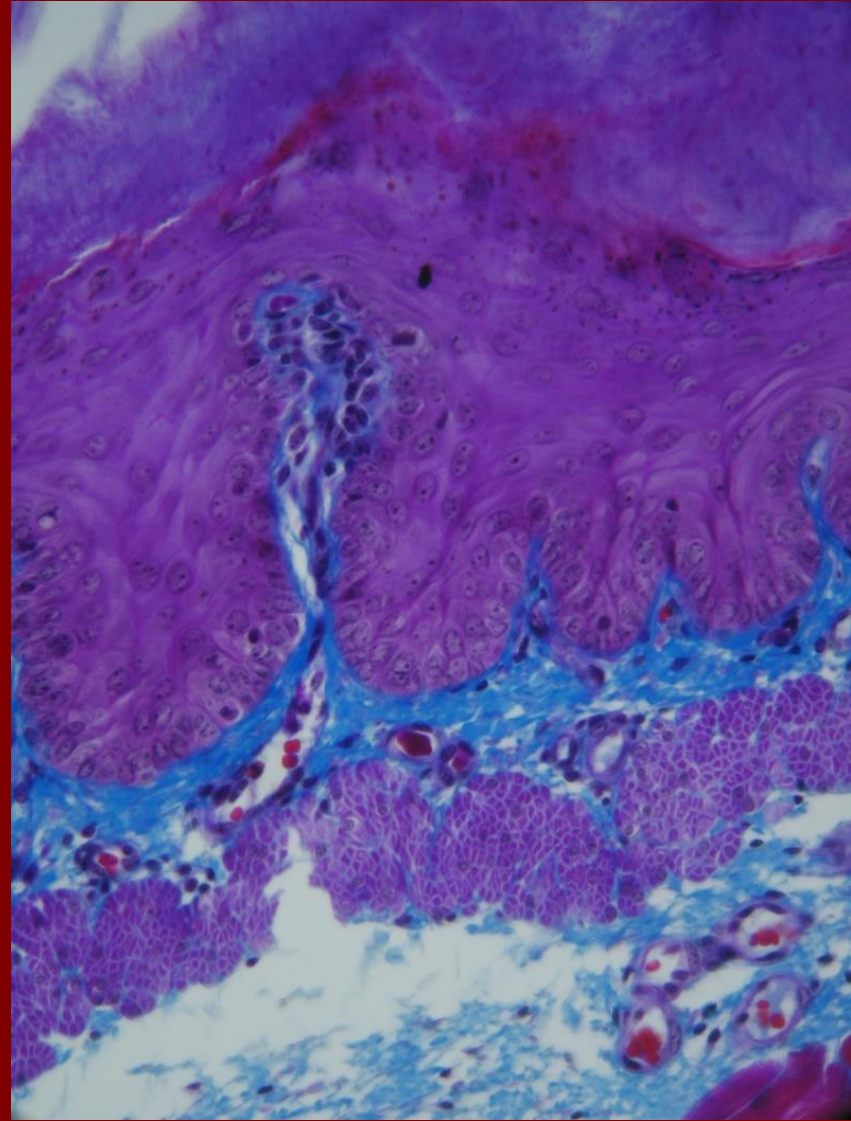
Oil red O



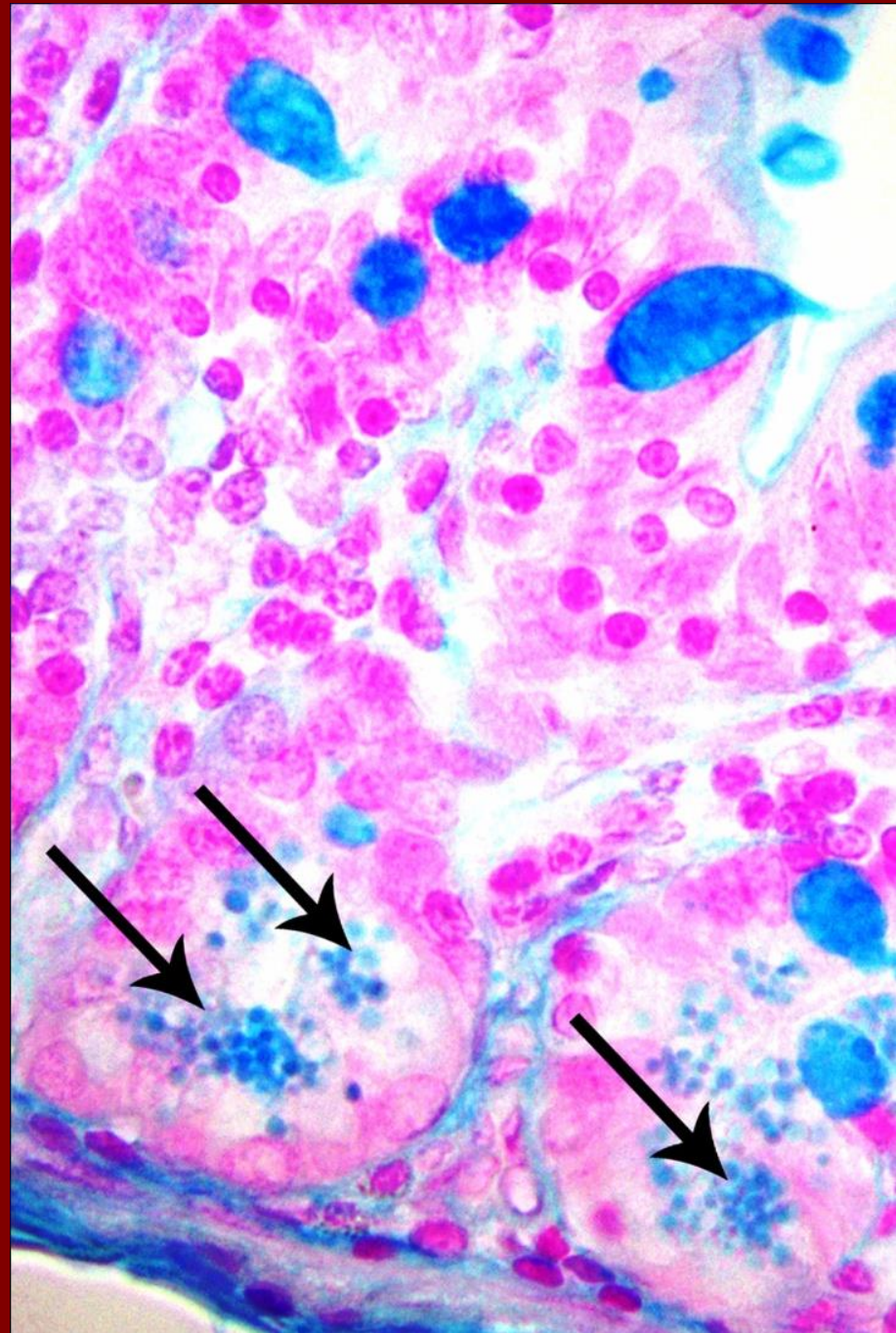
PROTEİNLERİN GÖSTERİMİ

- Proteinler organik azotlu bileşiklerdir. Karbonhidrat ve lipidlerle birlikte dokuların temel yapısını oluştururlar. Demonstrasyonları pratik histokimyada önemli bir yer tutmaktadır.

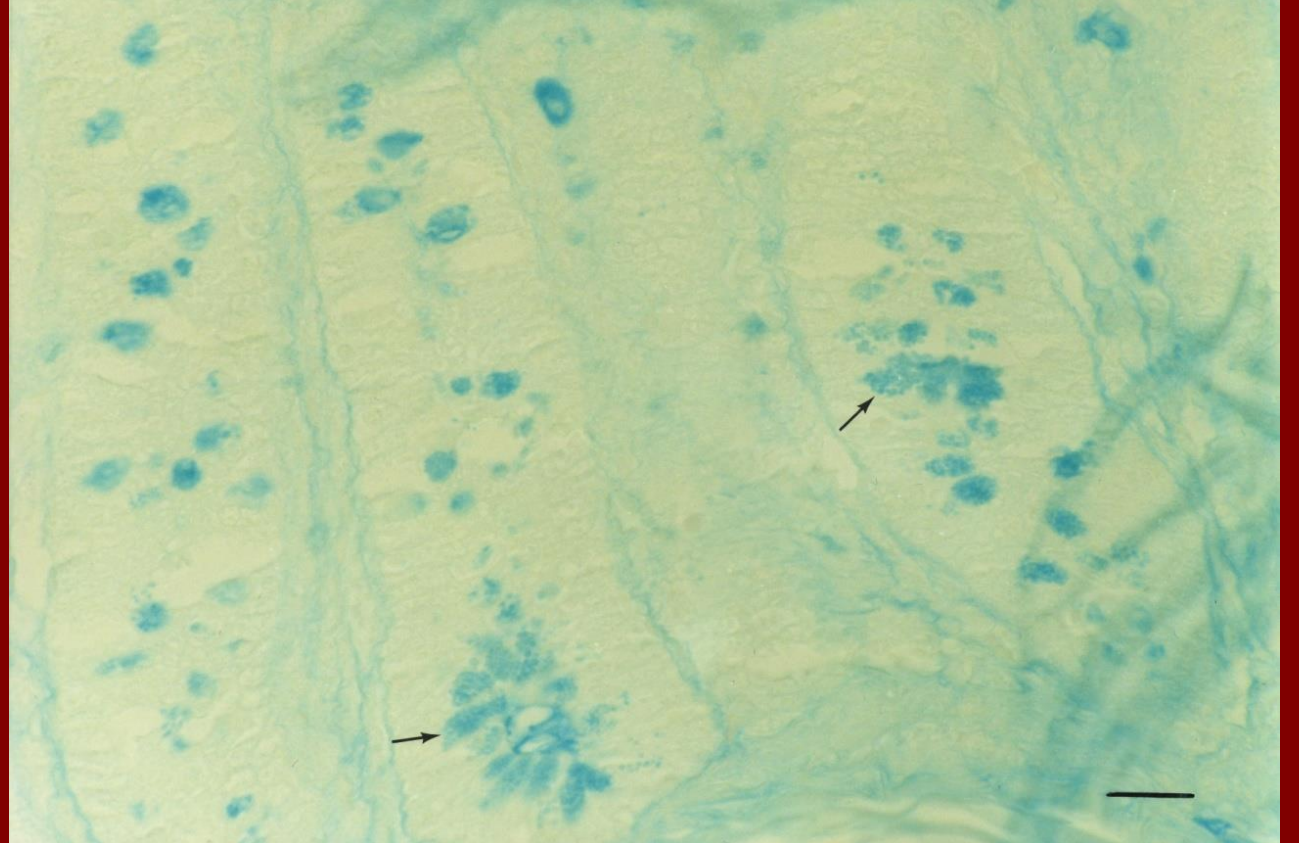
- Proteinler, dokularda ya tek başlarına bulunurlar ya da lipidler (lipoprotein) veya başka maddelerle birleşirler. Bunların boyanma reaksiyonları, amino asit kompozisyonlarına bağlıdır.
- Fibröz proteinler (kollagen, fibrin, elastin ve keratin), trikrom boyaması örneğinde olduğu gibi histolojik yöntemlerle demonstre edilirler.



- Amino asit metotları ile bütün proteinlerin değil, ancak bazı aminoasitlerin varlığı gösterilebilir.
- Sistin, sistein ve metiyonin amino asitleri arasında disülfid ve sülfidril bağları vardır. Performik asit-Alcian blue metodu bu aminoasitler arasındaki bağları demonstre eder.



- Disülfid bağları mavi renge boyanır. Rengin yoğunluğu disülfid bağların miktarına bağlıdır.



2. İmmunohistokimya

Hücre ve dokularda yer alan endojen ve/veya ekzojen immunojenik yapıdaki maddelerin özel yöntemlerle hazırlanmış işaretli antikorlar aracılığıyla ışık, floresan veya elektron mikroskopta saptanmasına immunohistokimya' denir.

İmmunohistokimyasal yöntemlerde üç önemli temel yapı antijen (immunojen), antikor ve kromojendir.

- **Antijen**: Organizmada immun yanıt oluşturabilen ve bunun sonucunda kendilerine karşı özel antikor şekillendirebilen maddelere antijen veya immunojen denir. Bu maddeler protein, glikoprotein veya lipoprotein yapısındadırlar.

- İmmunolojik yanıtta T ve B lenfositler en önemli role sahip hücrelerdir. T lenfositler antijene karşı lenfokin salgılayarak doku düzeyinde; B lenfositler ise immunglobulin adı verilen bir grup protein salgılayarak sistemik immün yanıt oluştururlar. Antijene karşı immün sistem tarafından oluşturulmuş olan Ig yapısındaki tüm bu maddelere 'antikor' denir.

Antikorlar

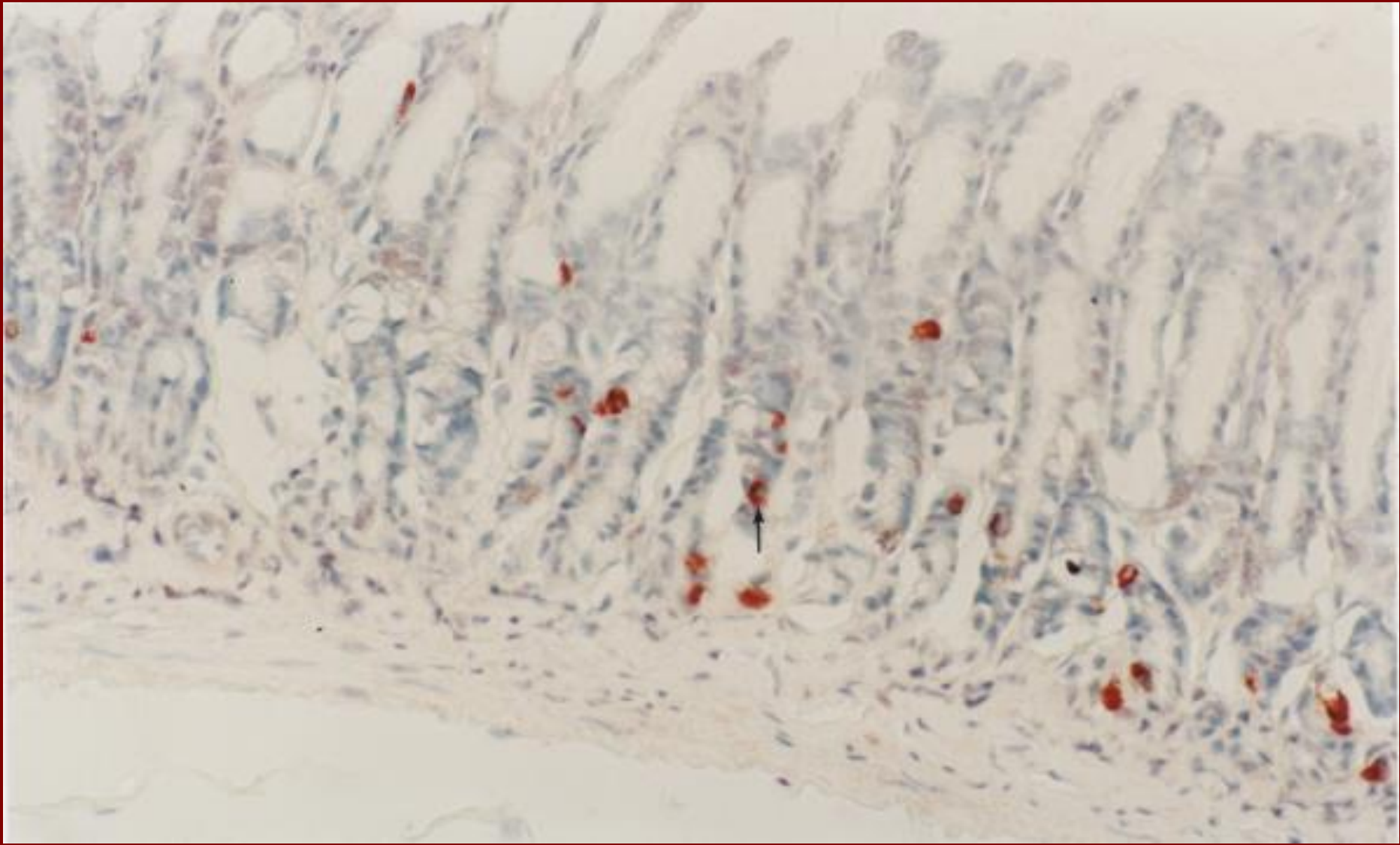
- Monoklonal
 - Antijenin tek bir epitopuna karşı üretilmiştir.
 - Antikor çok spesifiktir
 - Tek bir epitopu tanımaya yönelik olduğu için yanlış negatif sonuç verebilir

- Poliklonal
 - Antijenin birden fazla epitopuna karşı üretilmiştir.
 - Başarı şansı daha yüksektir.
 - Farklı hayvan türlerinde üretilebilir.

- **İmmunohistokimya, tam anlamıyla antijen antikor eşleşmesine dayanan bir tekniktir. Bu incelemeler için hücre veya doku örneklerinden yararlanır.**
- Bir dokunun incelenebilecek hale gelmesi için uygulanan her işlem, dokuda bulunan antijen yapısında bozulmaya ya da antijen kaybına sebep olabilir. Bu yüzden immunohistokimyasal çalışmalarda kullanılan tespit solüsyonları dikkatli seçilmelidir.
- İşaretlenmiş antikorlar dokuda spesifik antijenlerine bağlanır. Bu antijen antikor kompleksi yerleşimleri ışık, floresan veya elektron mikroskopu ile incelenebilir.

- Antijenler,
 - Nükleer
 - Sitoplazmik
 - Membranda
 - Ekstrasellüler matriks yerleşimli olabilir.

- **A-Direkt metot:**
- Belli bir antijeni taşıyan doku kesiti işaretli antikor ile inkübe edilir ve oluşan işaretli kompleks, mikroskopta antijenin yeri olarak gözlenir.



Mide, gastrin hücreleri, kırmızı

B-İndirekt metod: 2 veya daha fazla antikor kullanılarak yapılır.

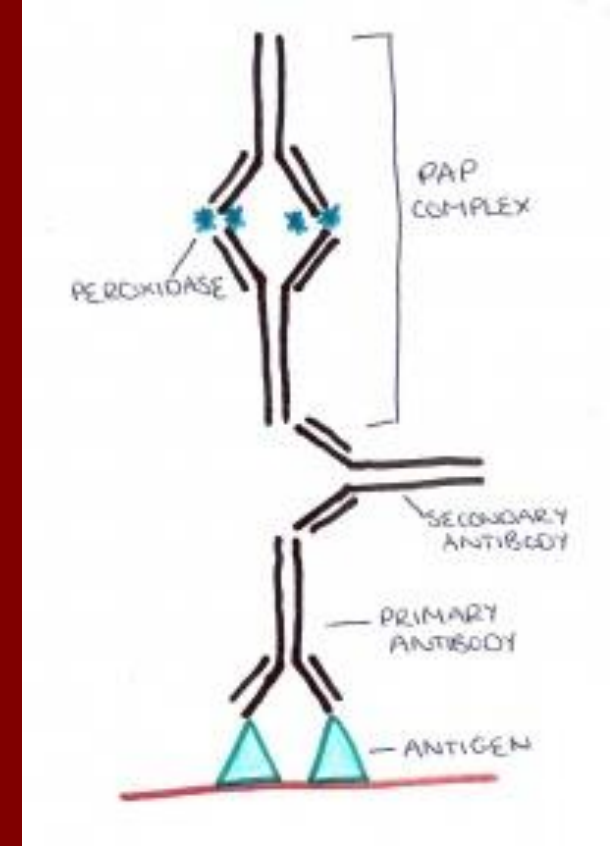
İlk antikor (primer antikor) ilgilenilen doku veya hücre antijenine spesifiktir.

İkincil (sekonder) veya tersiyer antikorlar primer antikoru tanımaya yönelik işaretlenmiş antikorlardır. Sekonder antikor farklı bir hayvan türünde, primer antikorun üretildiği hayvan türünün immunglobulinini tanımaya yöneliktir.

- Örneğin farede üretilmiş primer antikoru tanımak için, fare immunglobulinini tanımak için, keçi, tavşan veya farklı bir hayvan türünde üretilmiş antikor kullanılır. Hazırlanan işaretli birinci (primer) antikorlar normal dokuda bulunan antijenle reaksiyona sokulur. Sonra bu kesitler işaretli ikinci (sekonder) antikor ile inkübe edilir. Antijenin yeri işaretlenmeye uygun mikroskopda görülür

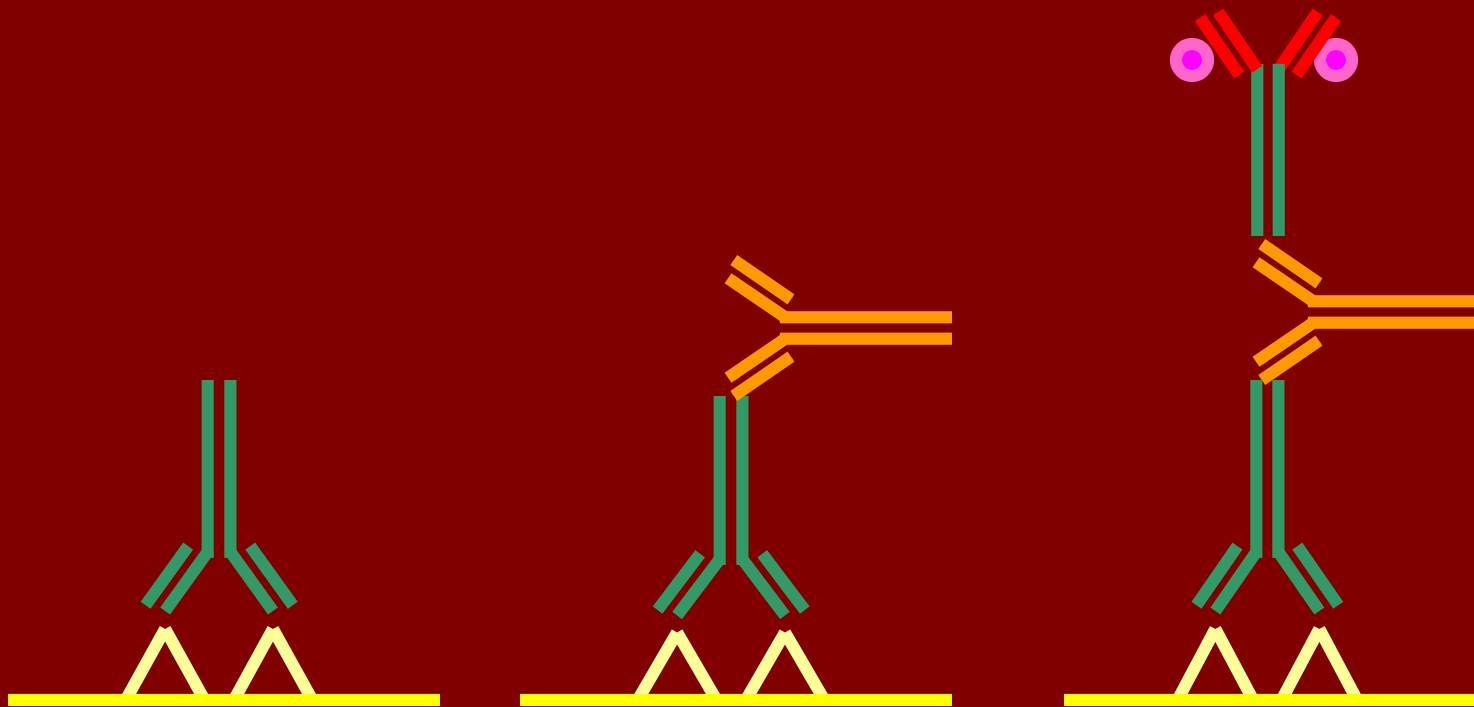
Peroksidaz-antiperoksidaz metodu:

- İndirekt yönteme benzemekle birlikte bu yöntemde sekonder antikor işaretlenmemiştir. Ancak, enzimle işaretli antikor kompleksi kullanılır.
- Sekonder antikor hem bu kompleksle hem de antijene bağlı primer antikorla bağlanır. Burada önemli olan nokta primer antikorla enzim-antienzim kompleksinin aynı hayvandan elde edilmesidir.



PAP Method

(peroxidase anti-peroxidase method)

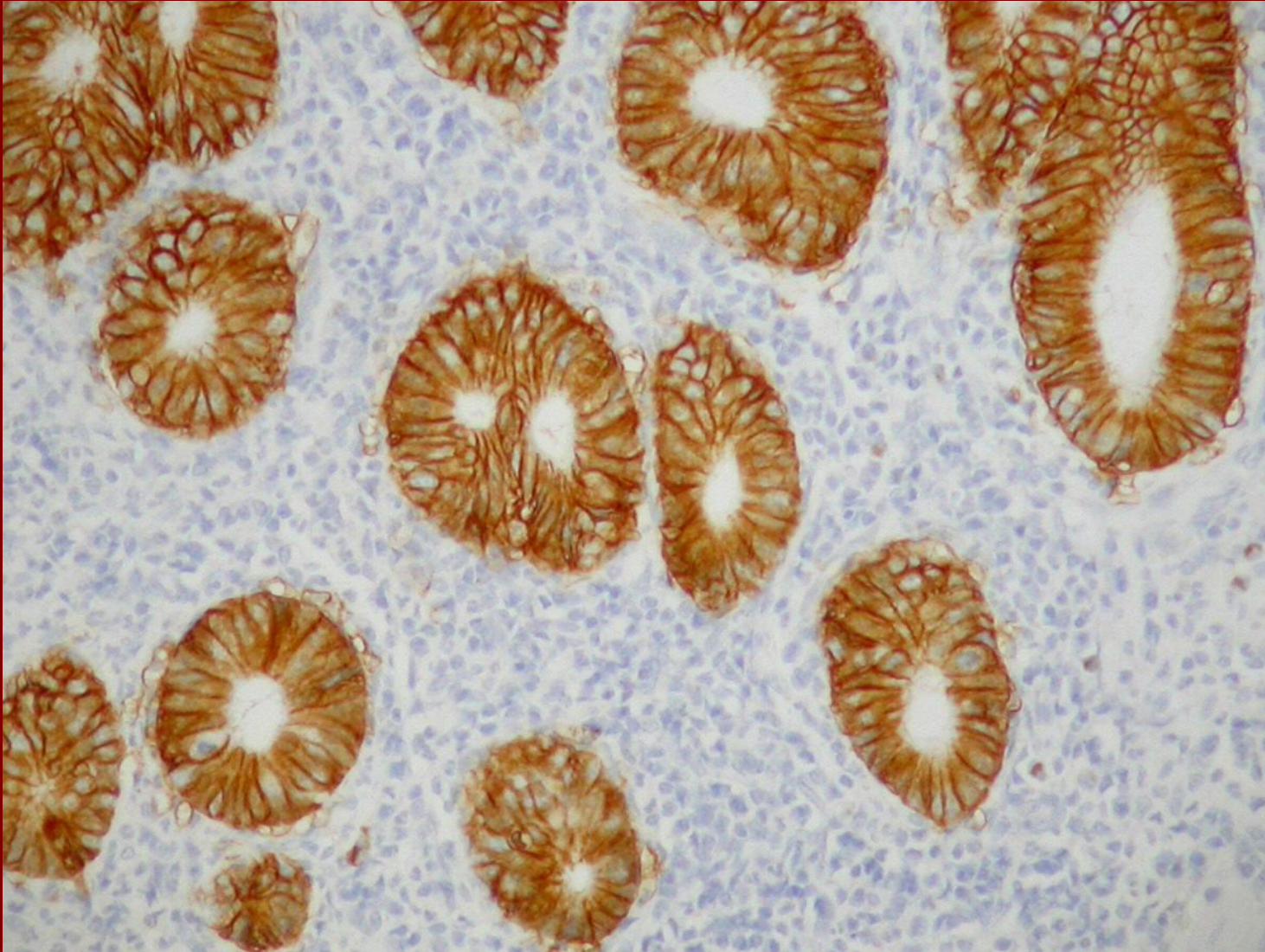


Strep-ABC metodu:

- *Streptomyces avidinii*'den elde edilen Strepavidin'in biyotine kuvvetli bir şekilde bağlanma özelliğinden yararlanır.

- Biotinlenmiş sekonder antikör üzerine avidin-biotin peroksidaz kompleksi konur. Eğer streptavidin-biotin peroksidaz kompleksi konursa adı Strept ABC metodu olur.

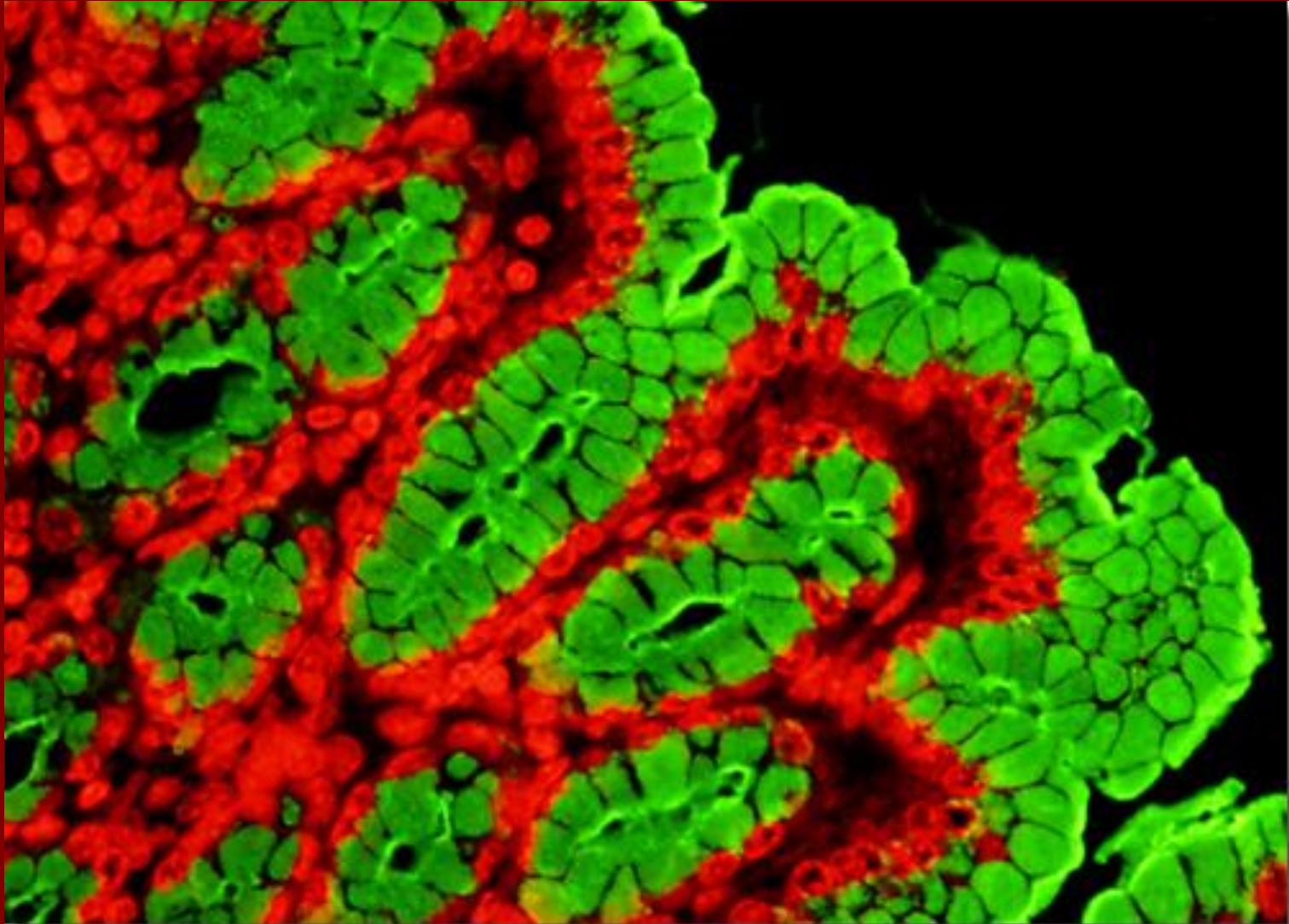
Substrat DAB



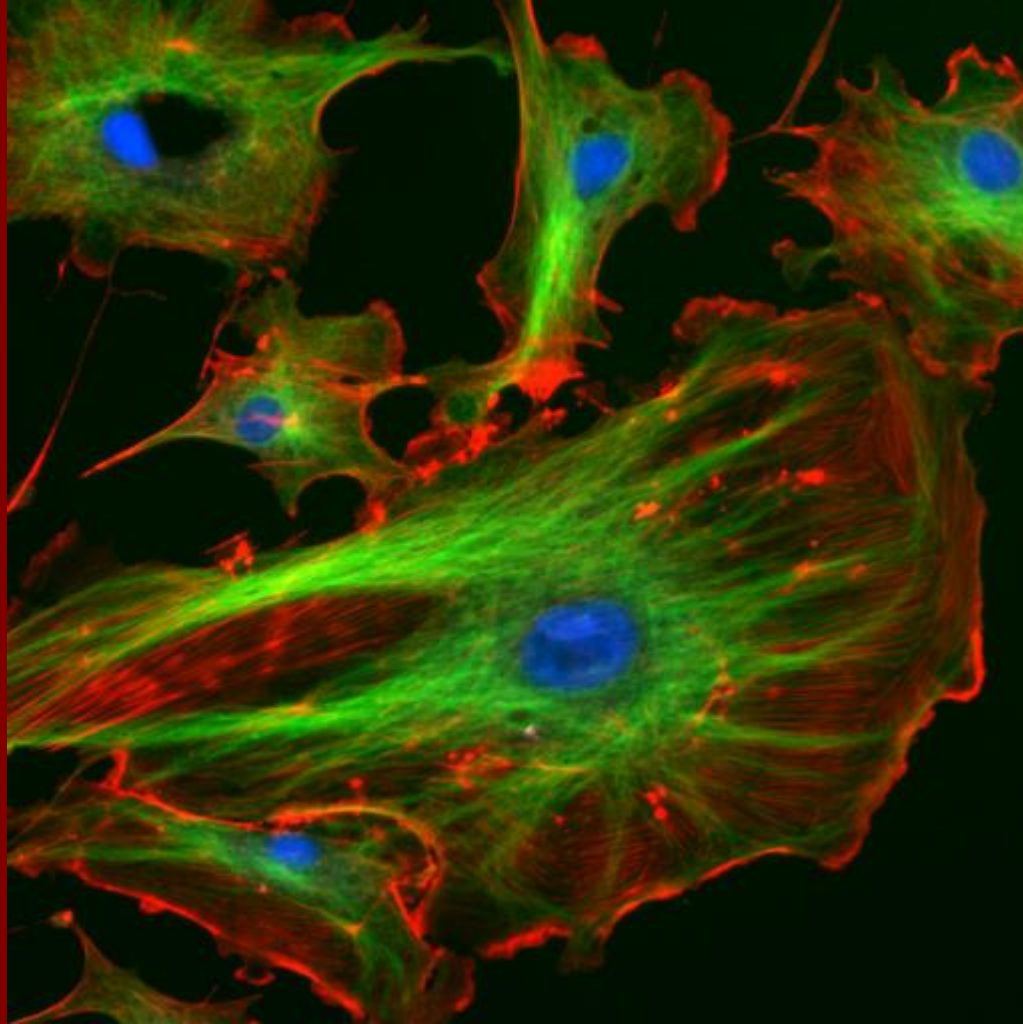
İkili veya Çoklu teknik

- Birden daha fazla antijeni aynı anda görünür yapmak için kullanılır
- İki farklı boyama veya florokrom kullanılır
- Deney dizaynı dikkat gerektir.
- Primer antikolar farklı türlerde geliştirilmiş olmalı.
- Sekonder antikolar primerleri tanıyacak şekilde farklı renkteki florokromla işaretlemeli (FITC, Texas Red, DAPI, Rhodamine gibi).
Florokrom işaretli antikor eklendikten sonra güvenli ışıkta veya karanlık ortamda çalışılmalıdır.

İkili boyama tekniği

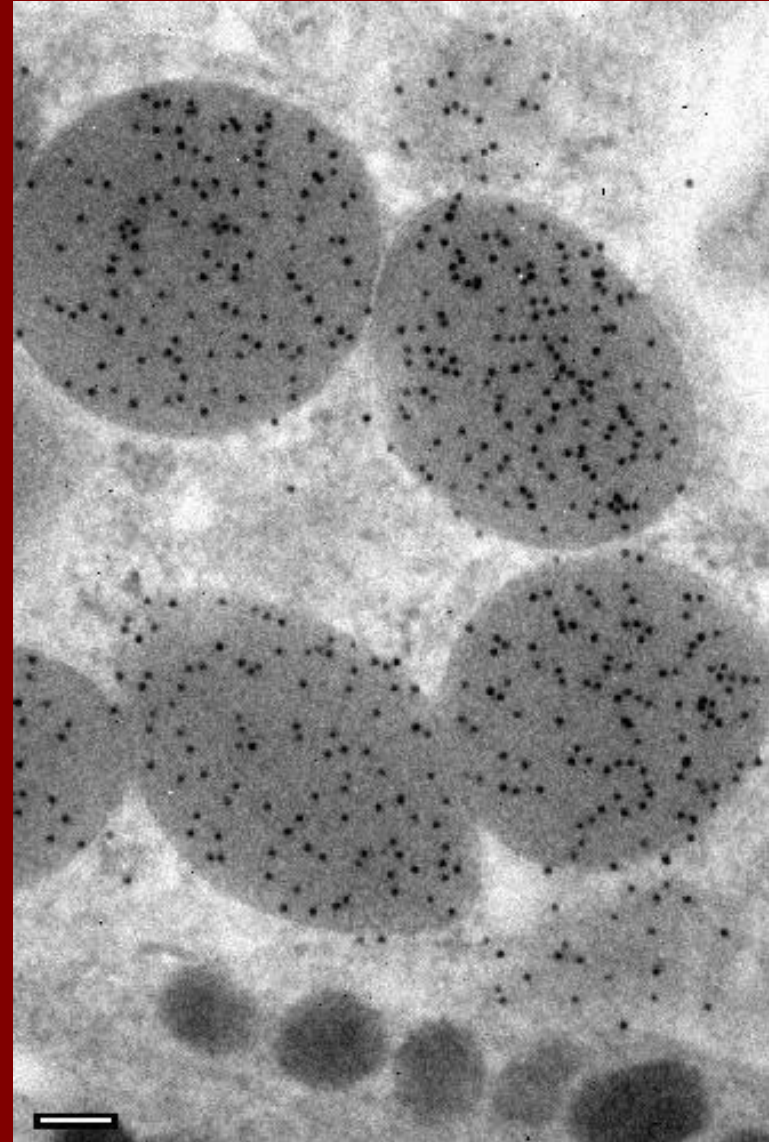


Üçlü boyama



Immünogold

- Genellikle TEM için kullanılır
- Altın taneleri kullanılır



İmmunogold ikili

Çoklu teknik için farklı büyüklükteki altın taneleri kullanılır

Immünohistokimya işlemleri

- Rutin histolojik doku takip işlemleri
 - Dokunun fiksasyonu (immersiyon, perfüzyon)
 - Dokunun takip işlemleri (doku takip cihazı, parafine gömme, kesme ve arşivleme) veya dondurma mikrotom için işlemler
 - Deparafinizasyon

- Antijen retrieval (doğru yöntemin seçilmesi)
 - Antijen maskelenmesinden kaynaklanan sıkıntıları gidermek
 - Sitrat tamponunda kaynatma
 - Enzimlerin kullanımı (Tripsin, pepsin vb)
- Enzim eliminasyon (quenching)
 - Peroksidaz tekniğinde dokuda bulunan (endojen) peroksidaz enziminin yok edilmesi gerekir.
 - Bunun için metanol içerisinde hidrojen peroksit kullanılır.

Kesitler

- Paraffin

- Parafin erimesi için yapılan ısıtma ve ksilolden geçirme antijen bölgelerine zarar verebilir.
- Sık kullanılır.

- Frozen

- Antijenler için daha iyidir
- Fakat zayıf morfoloji veririr

Antikor penetrasyonunu artırmak için

- Intraselüller ve membranın içinde kalan taraftaki epitoplara için gerekir.
- Deterjanlar sıklıkla kullanılır
 - Triton-X
 - Tween
 - Deterjanlar aynı zamanda yüzey gerilimini azaltır.

Kontrol Doku Kullanımı

- Pozitif kontrol
 - Antijen kesin olduğu bilinen doku
- Negatif kontrol
 - Primer antikorun yerine antikor sulandırma solüsyonu

İHK Kullanım Alanları

- Hücresel proteinlerin yerleşimleri ve aktivite gösterdikleri alanları saptamada
- Çeşitli endokrin hastalıkların veya kanser tiplerinin ayrılmasında
- Gelişim biyolojisi çalışmalarında