



**MAKROFAGIEN POLARISAATION
IMMUNOHISTOKEMIALLINEN
OSOITTAMINEN SOLUVILJELY- JA
KUDOSNÄYTTEISTÄ**

Menetelmän kehitys ja optimointi

Anne Oksanen

Opinnäytetyö
Joulukuu 2013
Laboratorioalan koulutusohjelma

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Laboratorioalan koulutusohjelma

OKSANEN, ANNE:

Makrofagien polarisaation immunohistokemiallinen osoittaminen soluviljely- ja kudospäätteistä: Menetelmän kehitys ja optimointi

Opinnäytetyö 56 sivua, joista liitteitä 5 sivua
Joulukuu 2013

Makrofagit ovat veressä kiertävistä monosyyteistä erilaistuneita tulehdussoluja. Ne toimivat immuunipuolustuksessa fagosyytteina sekä antigeenejä esittelevinä soluina. Makrofagit tuottavat monia sytokiineja ja muita tulehduksen välittäjäaineita, ja ovat osallisina tulehdusreaktion eri vaiheissa. Eri sytokiinit ohjaavat makrofagien aktivoitumista joko klassisen tai vaihtoehtoisen aktivaation suuntaan. Klassisesti aktivoituneet makrofagit toimivat ensisijaisesti tulehdusreaktion alkuvaiheessa, kun taas vaihtoehtoisesti aktivoituneita makrofageja tavataan pääasiassa paranemassa olevassa kudoksessa sekä kroonisessa tulehduksessa.

Immunohistokemia on värjäysmenetelmä, joka perustuu antigeenin ja sille spesifisen vasta-aineen väliseen vuorovaikutukseen. Menetelmästä riippuen joko primaarivasta-aine tai sekundaarivasta-aine on leimattu tavallisimmin entsyymileimalla, joka reagoi substraatin kanssa muodostaen näkyvän värin. Opinnäytetyössä värjäyksissä käytettiin LabVision Autostainer –värjäysautomaattia.

Opinnäytetyössä kehitettiin ja optimoitiin värjäysmenetelmä neljälle eri vasta-aineelle. Vasta-aine CD68 tunnisti yleisesti kudoksen makrofageja, vasta-aineet CD163 ja CD206 vaihtoehtoisesti aktivoituneita makrofageja ja vasta-aine iNOS klassisesti aktivoituneita makrofageja. Kehitetyn värjäysmenetelmän todettiin olevan toimiva ja soveltuva käyttötarkoitukseensa. Menetelmää voidaan jatkossa käyttää erilaisten solu- ja kudospäätteiden tutkimiseen ja kehittää edelleen kaksois- ja fluoresenssivärjäyksiin soveltuva.

Asiasanat: makrofagi, polarisaatio, immunohistokemia, vasta-aine, CD68, CD163, CD206, iNOS, optimointi

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Laboratory Science

OKSANEN, ANNE:

Detection of Macrophage Polarization in Cell Culture and Tissue Samples by Immunohistochemistry: Method Development and Optimization

Bachelor's thesis 56 pages, appendices 5 pages
December 2013

Macrophages are inflammatory cells which differentiate from circulating monocytes to macrophages following their migration into tissues. In the immune system macrophages function as phagocytes and antigen-presenting cells and they produce various cytokines and other mediators which direct and regulate the inflammatory response. Depending on the inflammatory and tissue environment, macrophages display different phenotypes with distinct functional properties. Cytokines produced by T lymphocytes guide the polarization of macrophages towards either classical (M1) or alternative (M2) activation. Classically activated macrophages are important effector cells in acute inflammation, while alternatively activated macrophages are found in recovering tissue and in chronic inflammation.

Immunohistochemistry is a staining technique based on specific antigen-antibody interaction. Binding of the antibody to its antigen is detected either by direct labeling of the antibody, or by the use of a secondary labeling method. Most widely used labels in immunohistochemistry are enzymes. When the labeling enzyme reacts with a proper substrate, it forms a visible precipitate. In the present study, immunohistochemical staining was carried out by using a LabVision Autostainer device.

In the present thesis an immunohistochemical staining technique was developed and optimized to detect M1 and M2 macrophage phenotypes by using four different antibodies. CD68 antibody was used as a common macrophage antibody to detect all macrophage phenotypes. CD163 and CD206 antibodies identified alternatively activated macrophages and iNOS antibody was used to determine classically activated macrophages. The staining method was shown to be appropriate and suitable for the purpose of staining cell culture and tissue samples.

Keywords: macrophage, polarization, immunohistochemistry, antibody, CD68, CD163, CD206, iNOS, optimization

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	7
2 TEOREETTINEN TAUSTA	8
2.1 Immuunipuolustus tulehdusreaktiossa	8
2.2 Makrofagit	9
2.3 Immunohistokemia	11
2.3.1 Antigeenit ja vasta-aineet	12
2.3.2 Antigeenien paljastaminen	15
2.3.3 Epäspesifisten sitoutumiskohtien blokkaminen	16
2.3.4 Kromogeeniset ja fluoresoivat väriaineet	17
2.4 Histologisten värjäysten perusteita	18
2.5 Kudospalojen valmistelu värjäykseen	19
2.5.1 Kudoksen fiksaatio ja prosessointi	19
2.5.2 Näytteen leikkaaminen	22
2.6 ELISA-menetelmä	23
2.6.1 Suora ja epäsuora menetelmä	24
2.6.2 Sandwich-ELISA	25
2.6.3 Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät	26
3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS	27
4 MENETELMÄT JA MATERIAALIT	28
4.1 Kudosleikkeiden ja solunäytteiden esivalmistelut	28
4.2 Immunohistokemialliset värjäykset	29
4.2.1 Värjäykset makrofagivasta-aineella	31
4.2.2 Värjäykset vaihtoehtoisen aktivaation makrofagivasta-aineilla	32
4.2.3 Värjäykset klassisen aktivaation makrofagivasta-aineella	32
4.3 ELISA-määrittäminen	32
5 TULOKSET	35
5.1 Immunohistokemiallisten värjäysten tulokset	35
5.1.1 CD68	38
5.1.2 CD163	39
5.1.3 CD206	41
5.1.4 iNOS	43
5.2 ELISA-määrittäksen tulokset	44
5.2.1 Humaani CCL13	44

5.2.2 Humaani IL-6.....	45
6 MENETELMIEN JA TULOSTEN TARKASTELU.....	46
LÄHTEET.....	49
LIITTEET	52
Liite 1. Solunäytteiden keräys immunohistokemiallisiin värjäyksiin	52
Liite 2. Hematoksyliini-eosiini –värjäys	53
Liite 3. Immunohistokemiassa ja histologiassa käytetyt reagenssit	54
Liite 4. Värjäysautomaatissa käytettävän pesupuskurin valmistusohje	55
Liite 5. Antigeenin paljastusmenetelmien liuokset	56

LYHENTEET JA TERMIT

CCL13	Kemokiini (C-C-motiivi) ligandi 13
Domeeni	Proteiinin toiminnallisesti tai rakenteellisesti itsenäinen osa
EDTA	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fiksaatio	Kiinnittäminen, kestävyminen
Fiksatiivi	Aine, joka kiinteyttää solut
Granulooma	Solujen muodostama rykelmä, jyväiskasvama
IFN γ	Interferoni- γ , Th1-sytokiini, voimistaa soluvälitteistä puolustusta
IL-	Interleukiini-, tulehdussytokiini
<i>in vitro</i>	Elävän organismin ulkopuolella tehty tutkimus
<i>in vivo</i>	Elävässä organismissa tehty tutkimus
LPS	Lipopolysakkaridi, gram-negatiivisten bakteerien soluseinämän rakenneosa
STAT	Signal transducer and activator of transcription, transkriptiotekijä
THP-1 –solut	Humaani monosyytti-makrofagi solulinja
TLR	Toll-like-reseptori, elimistölle vieraita rakenteita tunnistava solukalvoproteiini
TNF	Tuumorinekroositekijä, tulehdusta voimistava sytokiini

1 JOHDANTO

Makrofagit ovat elimistön tulehdussoluja, jotka kehittyvät veressä kiertävistä monosyyteistä. Ne ovat tärkeä osa toimivaa immuunipuolustusta sekä fagosyytteina että antigeenien esittelijöinä. Makrofagien fenotyyppi ja toiminta riippuvat ympäröivästä kudoksesta ja tuotetuista sytokiineistä. Makrofagien aktivaatio voi polarisoitua joko klassiseen tai vaihtoehtoiseen suuntaan. Polarisaatio ei kuitenkaan ole pysyvä, vaan makrofagit voivat muuttaa tyyppiään sytokiinien vaikutuksesta. Tulehduksen alkuvaiheessa vaikuttavat klassisesti aktivoituneet M1 tyyppiset makrofagit tuhoavat solunsisäisiä taudinaiheuttajia ja voimistavat tulehdusreaktiota. Tulehdusta vaimentavat vaihtoehtoisesti aktivoituneet M2 tyyppiset makrofagit vaikuttavat muun muassa kroonisessa tulehduksessa, loisten torjunnassa, granuloomien muodostumisessa sekä allergisissa tulehduksissa. (Sica & Mantovani 2012, 787-789.)

Immunohistokemia on yleinen värjäysmenetelmä, jolla voidaan tutkia kudoksen anti-geenejä niille spesifisten vasta-aineiden avulla. Immunohistokemiassa värjäysmenetelmä voi olla joko suora tai epäsuora. Suorassa menetelmässä primaarivasta-aine on leimattu sopivalla leima-aineella, kun taas epäsuorassa menetelmässä leimaamattomaan primaarivasta-aineeseen liitetään leimattu sekundaarivasta-aine. Havaittava värireaktio saadaan aikaan lisäämällä leima-aineelle sopivaa substraattia. (Jackson & Blythe 2013, 381-388.)

Työn tarkoituksena oli kehittää ja optimoida immunohistokemiallinen värjäysmenetelmä makrofageille. Tavoitteena oli määrittää makrofagien polarisaatiota immunohistokemiallisin menetelmin käyttäen neljää eri vasta-ainetta. Vasta-aineiden affiniteettia kohdeantigeeniin testattiin eri pitoisuuksilla sekä tutkimalla eri antigeenin paljastusmenetelmien vaikutuksia värjäystuloksiin.

Opinnäytetyö tehtiin Tampereen yliopiston Lääketieteen yksikössä Immunofarmakologian tutkimusryhmässä kesän 2013 aikana. Opinnäytetyön ohjaajina toimivat prov., FT Tiina Leppänen ja professori Eeva Moilanen (Tampereen yliopisto) sekä lehtori Outi Heiniö (Tampereen ammattikorkeakoulu).

2 TEOREETTINEN TAUSTA

2.1 Immuunivaste ja tulehdusreaktio

Immuunipuolustusjärjestelmä on kehittynyt ja monitahoinen puolustuskeino kehon ulkopuolisia mikrobeja vastaan. Samalla sen mekanismit osallistuvat kehon sisäiseen puhtaanapitoon ja homeostaattisen tasapainon ylläpitämiseen. Immuunipuolustus voidaan jakaa kahteen eri tyyppiin, luontaiseen eli synnynnäiseen immunitettiin tai hankittuun eli opittuun immunitettiin. Luontainen immunitetti toimii ensilinjan puolustuksena. Sen reaktiot ovat nopeita ja toistuvat samankaltaisina, mutta se ei tunnista spesifisesti mitään tiettyä taudinaiheuttajaa. Luontaisella immunitetillä ei ole muistia, joten reaktiot toistuvat stereotyyppisesti aina, kun vieras organismi kohdataan. Luontaiseen immuunipuolustukseen kuuluvat muun muassa iho ja limakalvot, eritteet, entsyymit, matala pH sekä immuunijärjestelmään kuuluvat solut ja molekyylit kuten fagosyytit ja komplementtijärjestelmä. (Meri 2011, 12-13.)

Yksinkertaiset eliöt torjuvat vieraita organismeja luontaisen immunitetin avulla, mutta selkärangkaisilla eläimillä luontaisen immunitetin rinnalla toimii hankittu immunitetti. Hankitun immunitetin pääosat, B-lymfosyyteistä kehittyneiden plasmasolujen tuottamat vasta-aineet sekä T-lymfosyytit, pystyvät tunnistamaan antigeenejä spesifisesti. Kun vieras organismi havaitaan ensimmäisen kerran, spesifisen immuunivasteen muodostuminen kestää noin 1-2 viikkoa. Hankitulla immunitetilla on kuitenkin muisti jonka avulla seuraavassa kontaktissa saman organismin kanssa immuunireaktio on nopeampi ja voimakkaampi. Immuunijärjestelmän tärkeimmät puolustussolut ovat leukosyytit eli valkosolut, joihin kuuluvat esimerkiksi fagosyytit eli syöjäsolut (granulosyytit ja mononukleaariset fagosyytit) sekä dendriittisolut. (Abbas, Lichtman & Pillai 2013, 2-16.)

Tulehdusreaktio on kehon keino eliminoida vieraita organismeja tai tuhota omia haitalliseksi käyneitä osia. Reaktion avulla se signaloi uhasta muualle kehoon ja aktivoi paranemisprosessin. Tulehduksen aiheuttajina voivat olla mikrobit ja/tai niiden komponentit, kemikaalit ja muut vieraat aineet tai fysikaalinen ärsytys. Myös kudostrauma aiheuttaa aina jonkin asteisen tulehduksen, joka edeltää paranemisprosessia. Tulehdusreaktio voidaan luokitella paikalliseksi tai yleistyneeksi. Paikallisia tulehdusvasteita

ovat verenkierron ja verisuonten läpäisevyyden lisääntyminen, jolloin kudokseen kertyy tulehdussoluja ja nestettä. Yleistyneen tulehduksen tunnusmerkkejä ovat muun muassa kuume ja huonovointisuus. (Seppälä & Meri 2011, 198-199.)

Komplementin oikotieaktiivisuus sekä granulositytit reagoivat ensimmäisenä immuunipuolustuksen aktivoituessa. Komplementti, joka aktivoituu ilman vasta-aineita, vapauttaa kemotaktisia aineita, jotka houkuttelevat paikalle neutrofiileja. Myös syöttösolu- ja eosinofiilireaktiot aktivoituvat välittömästi tulehdusreaktion käynnistyttyä. Luontaisen immuunivasteen mekanismit pystyvät usein jo tuhoamaan vieraan organismin, mutta lymfosyytit ehtivät yleensä aktivoitumaan ja aloittamaan vasta-ainetuotannon. Mikäli akuutti tulehdusreaktio ei pysty tuhoamaan taudinaiheuttajaa, käynnistyy tulehdusreaktion toinen vaihe. Lymfosyyttien lukumäärä kasvaa ja vasta-ainetuotanto lisääntyy, mikä tehostaa komplementin aktivoitumista ja mikrobien fagosytoimista. Myös T-solujen lisääntyminen vahvistaa fagosytoivien solujen kykyä tuhota fagosytoidut mikrobit. Lymfosyyttien, monosyyttien ja niistä kehittyvien makrofagien määrä pidemmälle edenneessä tulehduksessa on huomattavasti suurempi kuin infektion alkuvaiheessa. (Seppälä & Meri 2011, 206; Abbas et al. 2013, 75-76.)

Infektion pitkittyessä syntyy krooninen tulehdustila. Krooninen tulehdus on hidas prosessi, joka kestää vähintään kaksi viikkoa. Se aiheuttaa yleensä kudostuhoa ja muodostaa tulehduspaikalle uutta sidekudosta. Kroonisessa tulehduksessa makrofagit poistavat neutrofiilit ja niiden jäänteet fagosytoimalla ne ja tulehdusalueesta tulee lymfosyytti- ja makrofagivoittainen. Jos makrofagit eivät pysty poistamaan tulehduksen aiheuttajaa, keho pyrkii eristämään alueen muodostamalla siihen lymfosyyteistä ja makrofageista koostuvan solukertymän, granulooman. (Willey, Sherwood & Woolverton 2009, 675.)

2.2 Makrofagit

Makrofagit erilaistuvat veressä kiertävistä monosyyteistä, jotka ovat peräisin luuytimen kantasoluista. Erilaistuminen tapahtuu monosyytin siirtyessä verisuonen seinämän läpi verenkierrosta kudokseen. Erityisen paljon makrofageja tavataan imukudoksissa sekä imusolukkeiden ja pernan hiussuonissa. Osa makrofageista nimetään olinpaikkansa mukaan eri nimillä, esimerkiksi sidekudoksessa sijaitsevia makrofageja kutsutaan histiosyyteiksi. (Salmi & Meri 2011, 19-20.)

Makrofagit toimivat immuunipuolustuksessa syöjäsoluina eli fagosyytteina sekä soluvälitteisessä immuunipuolustuksessa antigeenejä esittelevinä soluina. Fagosyytteina ne tuhoavat tehokkaasti mikrobeja sekä muita vieraita partikkeleja. Makrofageilla on tärkeä tehtävä myös omien vioittuneiden solujen tuhoamisessa sekä paranemisprosessien käynnistämisessä. (Salmi & Meri 2011, 20.) Näin laaja tehtäväkirjo on mahdollinen, koska makrofagit voivat ilmentää erilaisia aktivaation ilmiä muun muassa tuottamalla tilanteesta riippuen eri välittäjäaineita eli sytokiineja. Makrofagien aktivaation suuntaan eli niiden polarisaatioon vaikuttavat muiden immuunipuolustuksen solujen tuottamat sytokiinit. Tärkeä elementti makrofagien polarisaatiossa on sen joustavuus ja muovautuvuus. Tarvittaessa makrofagit muuttavat polarisaation suuntaa nopeastikin sekä *in vivo* että *in vitro* -olosuhteissa. (Sica & Mantovani 2012, 787.)

Klassisesti aktivoituneita makrofageja tavataan erityisesti akuutin tulehduksen alkuvaiheessa, kun taas vaihtoehtoisesti aktivoituneita makrofageja esiintyy paranemassa olevassa kudoksessa ja kroonisessa sekä allergisessa tulehduksessa. Klassisen aktivaation makrofageille on tunnusomaista tulehdusta voimistavien sytokiinien sekä reaktiivisten typpi- ja happiradikaalien korkea tuotto sekä parantunut kyky tuhota mikrobeja ja kasvaimia. Vaihtoehtoisesti aktivoituneiden makrofagien tiedetään olevan osallisena loisten torjunnassa, kudoksen uudelleenrakentamisessa sekä kasvaimien kehittymisessä, mutta toisaalta myös granuloomien muodostuksessa, fibroosissa ja allergisessa reaktiossa. (Biswas & Mantovani 2010, 890; Sica & Mantovani 2012, 787.)

Interferoni- γ (IFN γ), tuumorinekroositekijä (TNF) sekä lipopolysakkaridi (LPS) ohjaavat makrofagien aktivaatiota klassiseen suuntaan NF- κ B ja STAT1 -transkriptiotekijöiden kautta (Mosser & Edwards 2008, 961; Biswas & Mantovani 2010, 890; Sica & Mantovani 2012, 787). Vaihtoehtoista makrofagien polarisaatiota ohjaavat puolestaan interleukiini 4 (IL-4) ja interleukiini 13 (IL-13) STAT6-transkriptiotekijän kautta. Klassisesti aktivoituneet makrofagit tuottavat muun muassa IL-6:ta, IL-12:ta, IL-23:a sekä TNF:aa, jotka puolestaan aktivoivat muun muassa Th1-solujen vasteita. Makrofagien vaihtoehtoiselle aktivaatiolle ominaisia geenejä ovat mannoosireseptori (*Mcr1*), resistiini-like α (*Retnla / Fizz1*), sekä kitinaasi 3-like 3 (*Chi3l3 / Ym1*). (Sica & Mantovani 2012, 787-789.)

Mikäli makrofagit epäonnistuvat patogeenin tuhoamisessa, tulehduspaikalle muodostuu granulooma, jonka sisällä makrofagit voivat muodostaa jättisoluja. Jättisolu koostuu T-

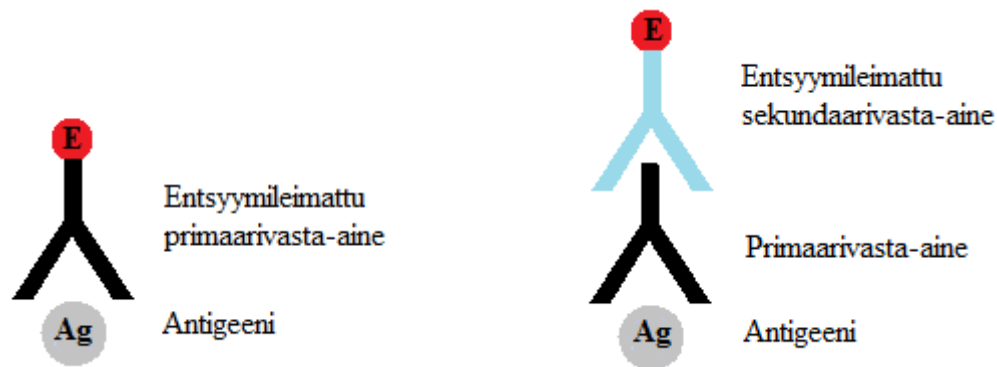
lymfosyyttien ympäröimästä makrofagikertymästä, joka on tiukasti peitetty fibroblasteilla. Muodostuneet granuloomat rajaavat infektion paikalliseksi ja estävät sen leviämisen muihin terveisiin elimiin. (Lay et al. 2006, 76.) Makrofagien polarisaatiota ohjaava sytokiini IFN γ vaikuttaa osaltaan myös granuloomien muodostumiseen. Jättisolut ilmentävät sekä tulehdusta lisääviä että tulehdusta vaimentavia sytokiinejä. (Zhu et al. 2007, 1076; Mustafa et al. 2008, 450.)

2.3 Immunohistokemia

Immunohistokemia perustuu antigeenin ja vasta-aineen väliseen vuorovaikutukseen. Ensimmäisen immunohistokemiallisen määrittelyn teki amerikkalainen Albert H. Coons 1940-luvun alussa. Coons leimasi vasta-aineen fluoresoivalla isosyaniidilla, joka liitettiin suoraan antigeeniin. Pian tämän jälkeen leimaksi kehitettiin fluoreskeliini-isotiosyanaatti, joka oli helpompi liittää vasta-aineeseen. Tämä muutos teki tuloksista tasaisempia ja luotettavampia. Tämän jälkeen tekniikka immunohistokemiassa on huomasti kehittynyt ja fluoresoivien leimojen rinnalle on kehitetty muun muassa entsyymi- ja kultaleimoja. (Jackson & Blythe 2013, 381-382.)

Antigeenille spesifinen vasta-aine voi sitoutua kohteeseensa joko suoraan tai epäsuorasti (kuvio 1). Suorassa menetelmässä käytetään ainoastaan yhtä leiman sisältävää primaarivasta-ainetta, joka reagoi suoraan antigeenin kanssa. Tällöin tarvitaan vain yksi vasta-aineinkubaatio. Menetelmä on helppo ja nopea, mutta sen ongelmana on heikko signaali ja herkkyuden puute. Suoraa menetelmää käytetään lähinnä antigeenien osoittamiseen jääleikkeistä. (Jackson & Blythe 2013, 386-388.)

Epäsuora menetelmä on suoraa menetelmää herkempi. Se pitää sisällään kahden tai useamman vaiheen protokollan, jossa leima on kiinnitettyä sekundaarivasta-aineeseen. Vaiheiden määrän lisääntyessä myös menetelmä monimutkaistuu, mutta koska primaarivasta-aineeseen sitoutuu useita sekundaarivasta-aineita, myös leimaentsyymien määrä lisääntyy. Signaalin vahvistuminen mahdollistaa antigeenin paremman havaitsemisen myös tilanteissa, jossa antigeenin konsentraatio on alhainen. (Reinshaw 2007, 72.) Menetelmässä samaa leimattua sekundaarivasta-ainetta voidaan käyttää useiden eri primaarivasta-aineiden tunnistukseen (Jackson & Blythe 2013, 388).



KUVIO 1. Suora ja epäsuora menetelmä (Jackson & Blythe 2013, muokattu).

2.3.1 Antigeenit ja vasta-aineet

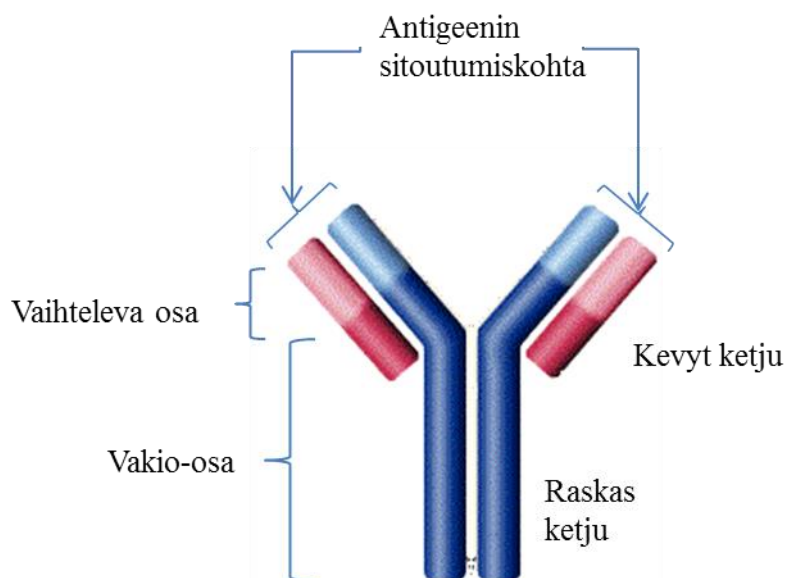
Antigeenit ovat immuunireaktion aikaansaavia rakenteita tai molekyyliä. Ne ovat yleensä isoja monimutkaisia proteiineja tai polysakkarideja. Antigeenit voidaan luokitella immunogeenisiksi, antigeenisiksi, allergeenisiksi sekä tolerogeenisiksi. Antigeeniä, joka saa aikaan immuunivasteen, kutsutaan immunogeeniksi. Antigeenisuus on immunogeenin kykyä yhdistyä vasta-aineeseen tai solupinnan reseptoreihin. Allergeenisuus puolestaan on kykyä aiheuttaa allerginen reaktio. Tolerogeenisyys aiheuttaa spesifistä immunologista reagoimattomuutta. (Hayat 2002, 31-32.)

Vasta-aine ei reagoi koko antigeeniin, vaan tunnistaa siitä vain tietyn osan eli epitoopin. Useimmilla antigeeneillä on pinnallaan monia erilaisia epitooppeja, jotka stimuloivat vasta-ainetuotantoa. Vasta-aineet sitoutuvat epitooppeihin spesifisesti. (Hayat 2002, 32.) Epitoopit muodostuvat sokereista, orgaanisista hapoista ja emäksistä, hiilivedyistä, aminohappoketjuista ja aromaattisista yhdisteistä. Niiden lukumäärä määrää sen, kuinka paljon vasta-ainetta voi sitoutua antigeeniin samanaikaisesti. Useimmilla antigeeneillä on enemmän kuin yksi epitooppi, jolloin aikaansaatu immuunireaktio on voimakkaampi. (Willey et al. 2009, 691.)

Vasta-aineet kuuluvat immunoglobuliinien (Ig) ryhmään. Ne ovat glykoproteiineja, joiden avulla elimistö tunnistaa vieraan organismin tai sen osia. Immunoglobuliinien viisi pääluokkaa ovat IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM. Immunohistokemiassa yleisimmin käytetyt vasta-aineet kuuluvat IgG- ja IgM -luokkiin. Vasta-aineen perusrakenne on Y-kirjaimen muotoinen (kuvio 2). (Onley 2007, 3.) Proteiinirunko muodostuu kahdesta identtisestä

H-polypeptidiketjusta (heavy), ja kahdesta identtisestä L-polypeptidiketjusta (light). H-ketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa kovalenttisesti kahdella tai useammalla kysteiinihappojen muodostamalla rikkisillalla. Ketjujen välissä voi olla myös muita sidoksia. L-ketjut kiinnittyvät H-ketjuihin epäkovalenteilla sidoksilla ja niiden välissä on yleensä myös yksi rikkisilta. (Jokiranta & Seppälä 2011, 103.)

Immunoglobuliinimolekyylin perusyksikössä, kaksi HL-ketjuparia sisältävässä vasta-aineessa, on kaksi kohtaa, joilla se kykenee tarttumaan samanlaiseen antigeeniin. Molemmat, sekä raskas- että kevytketju sisältävät domeeneja. Raskas ketju sisältää neljä domeenia, joista ensimmäinen, vaihteleva osa (variaabelidomeeni), osallistuu antigeeniä sitovan kohdan muodostukseen. Kolme muuta domeenia kutsutaan vakio-osa-alueiksi (C-alue) ja niiden rakenteet ovat immunoglobuliinien luokituksen perusta. Kevytketju sisältää kaksi domeenia, vaihtelevan osan ja vakio-osan. Kevytketjutyyppejä on kahdenlaisia, kappa ja lambda. Koska sekä raskaan että kevyen ketjun vaihtelevat osat sijaitsevat ketjujen päissä, muodostuu sinne antigeeniä sitova kohta. Nämä alueet sisältävät aminohappojaksoja, joissa tapahtuu paljon sekvenssivaihtelua ja niistä muodostuu kunkin erityyppisen vasta-aineen antigeeniä sitova alue. Erilaiset tarttumiskohdat muodostuvat satojen erilaisten aminohapposekvenssien avulla. (Jokiranta & Seppälä 2011, 104-106.)



KUVIO 2. Vasta-aineen perusyksikön rakenne (Campbell & Farrell 2012, muokattu).

IgG-luokan vasta-aineet ovat yleisiä useimmissa kudoksissa ja verenkierrossa. Molekyylillä muodostuu yhdestä Y-kirjaimen muotoisesta perusyksiköstä. Sen rakenne on joustava, joka edesauttaa molekyylin sitoutumista antigeeniin. IgG-luokan vasta-aineilla on laaja affiniteetti antigeenejä kohtaan ja niiden tuottaminen ja puhdistaminen on helppoa. Siksi ne ovatkin yleisesti käytetty vasta-aineluokka immunokemiallisissa värjäyksissä. IgM-luokan vasta-aineet ovat pentameerejä, jotka sisältävät viisi Y-kirjaimen muotoista perusyksikköä. Tämän vuoksi molekyylillä on teoriassa kymmenen antigeeniä sitovaa kohtaa. Vaikka IgM-luokan vasta-aineilla on yleensä heikko affiniteetti antigeeniin, sitoutumispaikkojen lukumäärä johtaa yleensä korkeaan sitoutumisaktiivisuuteen. IgM-molekyylejä esiintyy runsaasti verenkierrossa ja ne syntyvät immuunivasteen alkuvaiheessa. (Onley 2007, 4-6.)

Immunohistokemiassa värjäyksen ensimmäinen inkubaatio tapahtuu antigeenispesifisessä primaarivasta-aineessa. Primaarivasta-aineeseen sitoutuvan sekundaarivasta-aineen täytyy olla tuotettu sen eläimen immunoglobuliinia vastaan, jossa primaarivasta-aine on tehty. Mikäli sekundaarivasta-aine liittyy kaksi vasta-ainetta toisiinsa, kutsutaan sitä linkkivasta-aineeksi. Eri eläinten immunoglobuliineja vastaan muodostettua vasta-ainetta kutsutaan multilinkkivasta-aineeksi ja sitä voidaan käyttää sekä mono- että polyklonaalisten vasta-aineiden kanssa. (Naukarinen & von Boguslawsky 1998, 135.)

Polyklonaaliset vasta-aineet tuotetaan immunisomalla koe-eläin halutulla antigeenillä. Eläin tuottaa vasta-ainetta, joka voidaan eristää seerumista. Vasta-aine sisältää eri kloonien aktiivisista plasmak soluista, jotka tuottavat vasta-aineita saman antigeenin eri epitoppeja vastaan. Jotkin syntyneistä vasta-aineista saattavat aiheuttaa ristikkäisreaktioita, joten ne poistetaan puhdistusvaiheessa. Koska polyklonaaliset vasta-aineet tunnistavat useita epitoppeja, ne ovat hyvin käyttökelpoisia, mutta epäspesifisempiä kuin monoklonaliset vasta-aineet. (Jackson & Blythe 2013, 384.)

Myös monoklonalisessa vasta-ainetuotannossa koe-eläin immunisoidaan halutulla antigeenillä (Mäkinen & Stenbäck 2012, 1135). Tämän jälkeen plasmak solut eristetään ja vasta-aineet tuotetaan hybridomatekniikalla. Plasmak solu hybridisoidaan kuolemattomalla neoplastisella myeloomasolulinjalla *in vitro* -olosuhteissa. Menetelmä mahdollistaa teoriassa vasta-aineen rajattoman tuottamisen. Mediumista kerättyä vasta-ainetta ei tarvitse puhdistaa, vaan ei-halutut antigeenit tai epitopit voidaan eliminoida seulonta-

vaiheessa. Näin ollen saatu vasta-aine on spesifinen vain halutulle antigeenille ja sen epitoopille. (Jackson & Blythe 2013, 384.)

2.3.2 Antigeenien paljastaminen

Antigeenien paljastaminen on tekniikka, jossa pyritään peruuttamaan esimerkiksi formaldehydifiksaation aiheuttama antigeenien epitooppeja kätkevä vaikutus. Antigeenien paljastusmenetelmät voidaan jakaa entsyymaattisiin ja korkeaan lämpötilaan perustuviin menetelmiin. Formaliinikäsittelyn aikana syntyneet metyleenisillat hajotetaan ja proteiinin rakenne pääsee muuttumaan kolmiulotteisempaan suuntaan helpottaen vasta-aineen pääsyä epitoopin luo. (Renshaw 2007, 59.)

Entsyymaattisissa menetelmissä yleisimmin käytetyt entsyymit ovat trypsiini ja proteinaasi K, mutta käytössä ovat myös kymotrypsiini, pronaasi ja pepsiini. Entsyymaattinen menetelmä ei kuitenkaan sovi kaikille antigeeneille. Liian voimakas entsyymikäsittely voi aiheuttaa vääriä positiivisia värjäytymisiä, voimakasta taustaa ja jopa kudoksen tuhoutumista. Liian vähäisessä käsittelyssä antigeenit eivät pääse riittävästi esille ja riittävää värjäystä ei tapahdu. Entsyymikäsittelyssä on tärkeää, että entsyymikonsentraatio, koentsyymien käyttö, lämpötila ja pH ovat optimoituja. Yhteistä menetelmää kaikille antigeeneille ei ole, vaan menetelmän valinta perustuu suurelta osin testaamiseen. (Jackson & Blythe 2013, 391.)

Korkean lämpötilan menetelmiä ovat muun muassa mikroaaltouunikäsittely, painekattilakäsittely sekä autoklavointi. Näytteitä kuumennetaan puskuriliuoksessa, jotka yleisimmin ovat 0,1 M sitraattipuskuri (pH 6), 0,1 M EDTA (pH 8), 0,5 M Tris base – puskuri (pH 10) tai 0,05 M glysiini/HCl -puskuri. Suurimmat vaikutukset korkean lämpötilan menetelmissä ovat ajalla, lämpötilalla, puskurin koostumuksella ja pH:lla. Jopa 2-3 minuutin ero lämmittämisessä saattaa vaikuttaa ratkaisevasti antigeenien paljastamiseen. Liian pitkä kuumentaminen puolestaan denaturoi proteiineja ja irrottaa leikettä lasilta. (Renshaw 2007, 60.) Eri lämpökäsittelyjen tehossa ei ole suuria eroja, mutta painekattilakäsittely ja autoklavointi ovat kudokselle mikroaaltouunikäsittelyä hellempää, koska niissä ei tapahdu puskurin kuplimista (Hayat 2002, 118).

2.3.3 Epäspesifisten sitoutumiskohtien blokkaminen

Hydrofobiset ja ioniset vuorovaikutukset sekä endogeeninen entsyymiaktiivisuus aiheuttavat suurimman osan immunohistokemian häiritsevistä taustavärjäytymisestä. Hydrofobisissa vuorovaikutuksissa taustavärjäytymisen aiheuttaa primaarivasta-aineen sitoutuminen kudoksen funktionaalisiin ryhmiin. Positiivinen värjäytyminen ei johdu antigeenin paikallistamisesta, vaan primaarivasta-aineen epäspesifistä sitoutumisesta sidekudokseen. Tällöin leimattu sekundaarivasta-aine sitoutuu sekä spesifiseen epitooppiin sitoutuneeseen primaarivasta-aineeseen, että sidekudokseen sitoutuneeseen primaarivasta-aineeseen. Helpoin tapa minimoida epäspesifinen värjäytyminen on inkuboida näytteitä proteiiniliuoksessa ennen primaarivasta-aineen lisäämistä. Yleisesti käytetty liuos on esimerkiksi naudan seerumin albumiini eli BSA. Proteiini neutraloi latautuneet kohdat, jolloin primaarivasta-aine pääsee sitoutumaan vain kohdeantigeeniinsä. Epäspesifistä värjäytymistä voidaan estää myös lisäämällä pesupuskuriin detergenttiä, kuten Tween 20. (Jackson 2007, 222-223.)

Ioniset vuorovaikutukset aiheuttavat taustavärjäytymistä tilanteissa joissa vastakkaisilla varauksilla olevat proteiinit kohtaavat. Useimpien IgG-luokan vasta-aineiden pintavaraus on negatiivinen immunohistokemiassa käytettävien puskurien pH:ssa. Jos kudoksen pintavaraus on positiivinen, aiheuttaa kohtaaminen taustavärjäytymistä. Taustavärjäytymistä voidaan estää käyttämällä puskureissa korkeampaa ionivahvuutta tai lisäämällä puskuriin natriumkloridia. Puskurien korkeampi ionivahvuus kuitenkin lisää hydrofobisten vuorovaikutusten aiheuttamaa epäspesifistä värjäytymistä. (Jackson 2007, 223.)

Entsyymileimaa valittaessa tulee huomioida endogeenisen entsyymiaktiivisuuden vaikutus taustan värjäytymiseen. Endogeenisestä peroksidaasiaktiivisuudesta johtuvaa epäspesifistä taustaa voidaan estää lisäämällä näytteeseen vetyperoksidia värjäyksen alkuvaiheessa. Solun luonnostaan sisältämä oksidoreduktaasientsyymi blokkautuu ja estyy reagoimasta kromogeenin kanssa. Käyttämällä alkaalista fosfataasia näytteissä, joissa on paljon endogeenistä peroksidaasiaktiivisuutta, peroksidaasiaktiivisuudesta johtuvaa epäspesifisen värjäytymisen ongelmaa ei tule. Endogeenistä fosfataasiaktiivisuutta aiheuttavaa entsyymiä esiintyy muun muassa maksassa, suolistossa ja istukassa. Tämän entsyymin häiritsevää vaikutusta voidaan estää lisäämällä kromogeeniliuokseen esimerkiksi 1-2 mM levamisolia. Levamisolin käyttö ei kuitenkaan estä entsyymin toimintaa suo-

listonäytteissä. Hyvä keino estää epäspesifistä värjäytymistä näytteissä, joissa on paljon fosfataasiaktiivisuutta, on käyttää piparjuuren peroksidaasia. (Jackson 2007, 224-225.)

2.3.4 Kromogeeniset ja fluoresoivat väriaineet

Kromogeenisten ja fluoresoivien väriaineiden avulla saadaan aikaan reaktio, jonka perusteella haluttu antigeeni pystytään paikallistamaan. Leima voi olla kiinnittynyt joko primaarivasta-aineeseen tai sekundaari/tertiäärivasta-aineeseen, käytettävästä menetelmästä riippuen. Yleisimmin käytetyt merkkiaineet ovat entsyymileimat ja fluoresoivat leimat. (Mardle 2007, 33.) Entsyymileimat muodostavat kromogeenin kanssa reagoidessaan pysyvän värireaktion, joka voidaan havaita tavallisella mikroskoopilla. Yleisimmin käytetty entsyymileima immunohistokemiassa on piparjuuren peroksidaasi (horseradish peroxidase, HRP). HRP sopii yhteen monien kromogeenien kanssa. Sen muita etuja ovat pienikokoisuus, jolloin se ei peitä alleen viereisten sitoutumispaikkojen vasta-aineita, stabiilisuus, puhtaus ja endogeenisen aktiivisuuden helppo estäminen. (Jackson & Blythe 2013, 385.)

HRP:n substraattina käytetään vetyperoksidia. Peroksidaasin aktiivinen osa, hematiini, muodostaa vetyperoksidin kanssa kompleksin hajottaen sen happiatomeiksi ja vedeksi. Tätä reaktiota katalysoi kromogeeni, joka hapettuu ja polymeroituu värilliseksi lopputuotteeksi. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 138.) HRP:n kromogeeninä käytetään yleensä 3,3'-diaminobentsidiinitetrahydrokloridia (DAB). Lopputuotteenaan DAB muodostaa terävän stabiilin liukenemattoman ruskean sakan. DAB on luokiteltu potentiaaliseksi karsinogeeniksi, joskin uusimpien tutkimusten mukaan riskin on todettu olevan vähäinen. Värjäyksessä käytettävä kromogeeni määrää reaktiossa muodostuvan värin. Esimerkiksi 3-amino-9-etyylikarbatsoli näkyy punaisena ja 4-kloro-1-naftoli sinisenä värinä. Koska reaktiotuotteessa tapahtuu spesifisyyteen vaikuttavaa diffundoitumista, on substraattiliuoksessa tapahtuvan inkubaatioajan oltava tarkka. Muita käytettäviä entsyymileimoja ovat esimerkiksi alkaalinen fosfataasi ja glukoosioksidaasi. Lisäksi käytössä on polymeeritekniikoita, jolloin vasta-aineet ja leimat liitetään polymeerirunkoon. (Jackson & Blythe 2013, 385-388.)

Immunofluoresenssitekniikat perustuvat atomien tai molekyylien valon absorptioon tietyllä aallonpituudella ja valon uudelleen emittoitumiseen pidemmällä aallonpituudel-

la. Fluoresenssi ei ole pysyvä ja vaatii erottuakseen fluoresenssimikroskoopin. Sen etuina ovat kuitenkin värien selkeä erottuminen kaksoisvärjäyksissä sekä kahden eri proteiinin erottuminen tilanteissa, joissa proteiinit ovat kiinnittyneet samaan solunsisäiseen rakenneosaan. (Mardle 2007, 38-42.) Yleisimmin käytetyt fluoresenssileimat ovat fluoreskeliini-isotiosyanaatti (FITC) ja tetrametyylirodamiini-isotiosyanaatti (TRITC) (Wild 2013, 427).

2.4 Histologisten värjäysten perusteita

Immunohistokemian perustuessa vasta-aineen immunologiseen sitoutumiseen, histologisten värjäysten reaktio perustuu väriaineen kemialliseen sitoutumiseen. Värjäyksessä primaarivärinä käytetään väriä, jolla on taipumus kiinnittyä haluttuun kudskomponenttiin. Jotta primaariväri erottuisi taustasta, käytetään värjäyksessä vastavärinä sekundaariväriä. Histologiassa käytettävät värit ovat yleisimmin aromaattisia yhdisteitä, joilla on valon absorptiokyky sekä kyky sitoutua kudoksiin. Myös histologiassa värin tuottaa kromogeeni. Kromogeeni ei kuitenkaan itse välttämättä sovi väriaineeksi, vaan yhdisteessä pitää olla myös värin sitoutumisen aiheuttava ryhmä, auksokromi. (Rantala, Naukkarinen & Helin 1998, 72-73.)

Värjäytyminen johtuu yleisesti värin ja kudoksen tai reagenssin ja kudoksen välisestä affiniteetista. Jos kudoksella on korkea affiniteetti väriin, on tuloksena vahva värjäytyminen. Affiniteettiin vaikuttavat muun muassa sähköisesti varautuneiden kappaleiden väliset vetovoimat, polaariset voimat (Van der Waalsin voimat) ja muodostuneet vety- ja kovalenttiset sidokset. (Horobin 2013, 157-158.) Värjäykset voidaan suorittaa joko regressiivisesti tai progressiivisesti. Regressiivisessä värjäyksessä kudoksesta ylivärjätään, jonka jälkeen ylijäämäväri pestään pois. Menetelmä vaatii väriä nopeaa ja hyvää kudosaaffiniteettia. Progressiivisessä värjäyksessä kudoksen värjäystä jatketaan kunnes sen optimi-intensiteetti on saavutettu. Värimolekyylien koko ja niiden kyky läpäistä kudoksesta vaikuttavat värjäytymisnopeuteen, samoin kuin kudoksen omat ominaisuudet. Kaikki nämä asiat puolestaan vaikuttavat värjäytymisen selektiivisyyteen. (Rantala ym. 1998, 74.)

Eniten käytetty histologinen värjäysmenetelmä on hematoksyliini-eosiini-värjäys (HE-värjäys). Menetelmä on yksinkertainen ja sen avulla voidaan osoittaa monia erilaisia

kudoksen rakenteita. Hematoksyliini värjää solun tuman violetiksi, ja eosiini sytoplasman ja muun ympäröivän kudoksen punertavaksi. Hematoksyliini itsessään ei ole väriaine, vaan värjäys tapahtuu sen hapettumistuotteen, hemateiinin avulla. Hematoksyliinin vastavärinä voidaan käyttää myös muita värejä, mutta eosiini Y on niistä sopivin ja käytetyin. Eosiinin etuna on sen kyky erottaa solujen sytoplasmat ja sidekudos toisistaan, ja värjätä ne punaisen ja pinkin eri väreillä. Eosiiniliuokseen lisätään yleensä muutama tippa etikkahappoa, jotta värit terävöityisivät paremmin. (Bancroft & Layton 2013, 174-175.) Toinen histologinen perusvärjäysmenetelmä on Weigert van Gieson –värjäys, jossa hematoksyliinin vastavärinä käytetään pikrofuksiinia. Weigert van Gieson –värjäyksessä kollageeni värjäytyy punaiseksi muiden kudosten näkyessä vaihtelevan kellanruskeina. (Mäkinen 2012, 1129.)

2.5 Kudospalojen valmistelu värjäykseen

2.5.1 Kudoksen fiksaatio ja prosessointi

Kudoksen hajoaminen alkaa välittömästi, kun se irrotetaan *in vivo* –ympäristöstään. Antigeenit altistuvat hapen puutteelle, mätänemiselle sekä lysosomaalisille entsyymeille. Tämän vuoksi kudokseksi tulisi käsitellä mahdollisimman nopeasti sopivalla fiksaatiivilla. (Renshaw 2007, 47.) Jotta kudoksen immunohistokemiallinen määrittäminen olisi mahdollinen, antigeeniepitooppien on pysyttävä kudoksetleikissä muuttumattomana paikallaan. Fiksaatio kiinnittää antigeenit paikalleen säilyttäen ne, mutta samalla se aiheuttaa muutoksia epitooppien konfiguraatioissa. Tämä vaikeuttaa vasta-aineiden pääsyä sitoutumispaikoilleen. Hyvä fiksaatiivi säilyttää kudoksen rakenteen ja antigeenisyyden, estää antigeenin siirtymistä ja diffundoitumista eikä vaikuta vasta-aineen ja antigeenin väliin reaktioihin negatiivisesti. (Naukkarinen & von Boguslawsky 1998, 148.)

Fiksaatio voi olla joko kemiallinen tai fysikaalinen. Histologiassa ja immunohistokemiassa fiksaatio on yleensä kemiallinen. Kemiallinen fiksaatio voi vaikuttaa kudokseen myös fysikaalisesti kutistamalla, laajentamalla tai kovettamalla sitä. Kudoksen maltillinen kovettuminen fiksaation seurauksena voi helpottaa kudoksen prosessointia tietyillä tekniikoilla, mutta se aiheuttaa ongelmia esimerkiksi parafiiniblokeissa. Valu parafiiniin kutistaa ja kovettaa kudosta entisestään, jolloin kudoksen tilavuus on enää noin 60-70%

sen alkuperäisestä tilavuudesta. Fiksatiivin läpäisy nopeus vaikuttaa siihen kuinka paksu kudokseksi voi olla. Koska fiksaatio ei saisi kestää yli 24 tuntia, nopeaa fiksaatiivilla käytettäessä kudospalat voivat olla paksumpia verrattuna hitaaseen fiksaatiiviin. Käytettäessä nopeaa fiksaatiivilla, kudospala ei saisi olla 5 mm:ä ohuempi, kun taas hitaalla fiksaatiivilla kudospalan paksuus saisi olla enintään 2 mm:ä. Ainoastaan käytettäessä formaldehydiä fiksaatioaika saa ylittää 24 tunnin rajan. Vaikka formaldehydi läpäisee kudoksen nopeasti, se tasapainottaa kudoksen rakenteen täydellisesti vasta viikon kuluttua. (Kiernan 2008, 14-15.)

Fiksatiivit, jotka aiheuttavat proteiinien saostumista, voivat vääristää tai tuhota mitokondrioita, lysosomeja ja granuloita, mutta eivät juuri vaikuta solun ulkopuolisiin rakenteisiin. Ne muodostavat sienimäisiä verkkoja, jotka pystytään läpäisemään dehydraation ja kirkastamisen jälkeen. Saostumista aiheuttavia fiksaatiiveja ovat esimerkiksi aldehydit. Ei-saostavat fiksaatiivit, kuten asetoni, muodostavat ristsidoksia kudoksen makromolekyylien välille. Nämä ristsidokset muuttavat sytoplasmaa muodostamalla siitä liukenemattoman geelin, joka suojaa soluelimiä ja vaikeuttaa parafiinin tunkeutumista kudokseen. Parafiinin aiheuttamia kutistumia ja halkeamia voidaan estää käyttämällä ei-saostavia fiksaatiiveja. (Kiernan 2008, 15.)

Immunohistokemiassa yleisimmin käytetyt fiksaatiivit ovat aldehydit, proteiineja denaturoivat fiksaatiivit sekä asetoni (Reinshaw 2007, 48). Eniten käytetty fiksaatiivi on formaldehydin 40% vesiliuos, formaliini. Fiksaatiossa käytettävä formaliini on 10% fosfaattipuskuroitu formaliini, jonka formaldehydipitoisuus on noin 4%. (Rhodes 2013, 73.) Formaldehydi läpäisee kudoksen nopeasti, mutta aiheuttaa proteiinien välisiä ristsidoksia hitaasti. Nämä ristsidokset muuttavat proteiinin kolmiulotteista rakennetta ja peittävät alleen epitooppeja. Useimmat muutokset ovat kuitenkin palautuvia, jolloin kätkeyt sitoutumispaikat voidaan saada näkyviin ja niiden immunoreaktiivisuus palautettua. (Hayat 2002, 53.)

Yksinkertaisin fysikaalinen fiksaatiotapa on lämmittäminen, jonka tuloksena proteiinit saostuvat ja lipidit sulavat. Lämmittäminen muuttaa kudoksen rakennetta suhteellisen paljon verrattuna elävään kudokseen ja sitä käytetäänkin fiksaatiomenetelmänä lähinnä diagnostisessa mikrobiologiassa. Toinen fysikaalinen fiksaatiotapa on jäädyttäminen. Koska jäädyttämisen ongelmana ovat muodostuvat jääkiteet, tulee jäädytettävän kudospalan olla pieni, vain noin 2 mm paksuinen. Liian hidasta jäädyttämistä voi lisätä

näytteeseen muodostuvien jääkiteiden määrää. Nopea jäädyttäminen ei aina ole mahdollista, jolloin jääkiteiden aiheuttamaa vahinkoa voidaan vähentää kylmäsuojaamalla näyte esimerkiksi dimetyylisulfoksidilla (DMSO), glyserolilla tai sakkaroosilla. Kylmäsuojauksessa näyte tasapainotetaan pitämällä sitä sopivassa liuoksessa vähintään 12 tuntia ennen jäädyttämistä. (Kiernan 2008, 12-13.)

Fiksauksen jälkeen alkaa kudoksen prosessointi. Prosessoinnin ensimmäisessä vaiheessa kudospalasta poistetaan vesi ja vesipohjaiset fiksatiivit. Veden poisto tulisi suorittaa hitaasti. Mikäli konsentraatiogradientti nousee liian nopeasti, solukalvojen väliset diffuusiovirtaukset voivat muuttaa solun rakennetta. Tämän vuoksi kudospalat kuljetetaan nousevan konsentraatiosarjan läpi. Liiallinen vedenpoisto saattaa aiheuttaa kudoksen liiallista kovenemista, kutistumista ja haurastumista, kun taas puutteellinen vedenpoisto jättää kudoksen pehmeäksi vaikeuttaen kirkastavan reagentin pääsyä kudoksen komponentteihin. Dehydraatiossa käytetään tavallisimmin etanolia sen nopeuden ja luotettavuuden vuoksi. Dehydraatio aloitetaan käyttämällä ensin 70% etanolia, josta kudospala kuljetetaan 95%:sen etanolin kautta absoluuttiseen etanoliin. Tämän kuljetuksen aikana vesi poistuu näytteestä kokonaisuudessaan. Mikäli kudoksenäyte on herkkä, suositellaan dehydraation aloitusta 30%:sella etanolilla. Muita vedenpoistoon käytettäviä aineita ovat muun muassa metanoli, aseton ja isopropyyli. (Spencer & Bancroft 2013, 106-107.)

Vedenpoiston jälkeen näyte käsitellään kirkastavalla liuoksella. Kirkastuksen ideana on poistaa näytteestä dehydraatioliuos ja helpottaa seuraavassa vaiheessa kudoksen täyttävän valuaineen läpäisytehokkuutta. Kirkastavan liuoksen tulisi läpäistä kudos ja poistaa dehydraatioliuos näytteestä nopeasti minimoiden kudovahingot. Kirkastusliuoksen pitäisi poistua kudoksesta valuaineen läpäistessä näyte. Liuoksella tulisi myös olla mahdollisimman alhainen syttyvyys ja toksisuus. Useimmat kirkastavat liuokset ovat aromaattisia tai alifaattisia hiilivetyjä, joiden käsittelyssä ja hävittämisessä tulee ottaa huomioon niiden ympäristölle haitalliset ominaisuudet. (Spencer & Bancroft 2013, 108.) Yleinen kirkastusaineena käytettävä liuos on ksyleeni, aromaattinen hiilivety, joka sekoittuu hyvin sekä etanoliin että parafiiniin. Ksyleenin taitekerroin on samanlainen tiettyjen proteiinien kanssa, minkä vuoksi se tekee kudoksesta läpikuultavan. Liiallinen ksyleenikäsittely aiheuttaa proteiinien tuhoutumista ja kudoksen liiallista kovettumista, tehden näytteen leikkaamisesta vaikeaa. (Hayat 2002, 66.) Muita kirkastukseen käytet-

täviä aineita ovat muun muassa tolueeni, kloroformi, ksyleenin johdannaiset sekä limoneni (Spencer & Bancroft 2013, 108-109).

Kirkastuksen jälkeen kudokset upotetaan sopivaan, sen rakennetta tukevaan liuottimeen. Suosituin käytetty aine on parafiinivaha, joka muodostuu pitkäketjuisista hiilivedyistä. Parafiini sulaa nestemäiseen muotoon 47-64°C:ssa ja läpäisee kudoksen. Jäähdyessään parafiini jähmettyy ja vakiinnuttaa kudoksen rakenteen. Muodostunut rakenne estää kudoksen vahingoittumisen leikkaamisen aikana. Käytettävä parafiini voidaan valita sen sulamispisteen perusteella. Korkeamman sulamispisteen omaavat parafiinit soveltuvat paremmin koville kudoksille mahdollistaen ohuempien leikkeiden leikkaamisen, kun taas alhaisemman sulamispisteen parafiini on pehmeämpää, eikä tue kovia kudoksia yhtä tehokkaasti. Parafiini on materiaalina halpa ja sopii yhteen useimpien histologisten ja immunohistokemiallisten värjäysten kanssa. Muita kudoksen rakennetta tukevia liuottimia ovat esimerkiksi pihka, agar ja gelatiini eli liivate. (Spencer & Bancroft 2013, 109-110.)

Prosessoinnin viimeinen vaihe on näytteen valu käsin parafiiniblokkiin tai muuhun käytettyyn liuottimeen. Valuvaiheessa varmistetaan kudoksen oikea orientaatio ja valetaan kudoksen ympärille sitä tukeva blokki. Näyte asetetaan muottiin leikkauspinta alaspäin ja muotti täytetään sulalla parafiinillä. Kudoksen prosessoinnin aikana käytetty kuljetuskasetti kiinnitetään blokin kanneksi. Valun jälkeen muotti pyritään viilentämään nopeasti siirtämällä se jäähdytysalustalle. Nopea jäähdytys edesauttaa parempilaatuisten leikkeiden leikkaamista. (Spencer & Bancroft 2013, 110.)

2.5.2 Näytteen leikkaaminen

Jotta näytteen immunohistokemiallinen määrittäminen olisi mahdollisimman tarkkaa, näytteen tulee olla hyvin fiksattu ja prosessoitu eikä siinä saisi olla leikkaamisesta johtuvia vääristymiä. Näytteeseen jääneet ilmakuplat voivat estää vasta-aineen tai kromogeenin toimintaa ja leikkausvaiheessa tehdyt pintaviillot vahingoittavat ja muuttavat näytteen pintaa. (Jackson 2007, 210.) Tämän vuoksi mikrotomin ja sen terän kuntoon on kiinnitettävä erityistä huomiota (Naukkari & von Boguslawsky 1998, 150). Parafiiniblokkien leikkaamiseen käytetään tavallisesti joko rotaatio- tai liukumikrotomia. Liukumikrotomissa terä liikkuu näytteen pysyessä paikallaan, kun taas rotaatiomikro-

tomissa terä pysyy paikoillaan näytteen liikkeessa pystysuoraan terään nähden. (Rantala ym. 1998, 70.)

Koska kylmä ja kovettunut parafiini on helpompaa leikata, blokki kannattaa pitää kylmäalustalla ennen leikkausta. Leikkauksen aluksi blokki avataan mikrotomilla leikkamalla sen pinnasta paksumpia leikkeitä niin, että kudosis on esillä ja sen pinta on tasainen. Varsinaiset leikkeet ovat yleensä 5 µm:n paksuisia. Leikkeet siirretään terältä pienellä pensselillä huoneenlämpöiseen veteen. Parhaat leikkeet siirretään vesihauteeseen jonka lämpötila on noin 45°C. Vesihautteen lämpötila riippuu käytetyn parafiinin sulamispisteestä. Vesihauteessa leikkeet suoristuvat ja ne voidaan siirtää objektilasille. (Rantala ym. 1998, 70-71.) Jotta näyte pysyisi kiinni lasissa koko immunohistokemiallisen värjäyksen ajan, objektilasien tulisi olla APES- tai poly-L-lyysiini -päällystettyjä tai leikkeitä elektrostaattisesti sitovia Super Frost Plus -laseja. Valmiit lasit kuivatetaan lämpökaapissa joko 37°C:ssa yön yli tai 60°C:ssa parin tunnin ajan. (Jackson 2007, 210.)

2.6 ELISA-menetelmä

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) on immunologinen menetelmä, joka pohjautuu vasta-aineiden ominaisuuksiin ja niiden kykyyn sitoutua niille spesifisiin anti-geeneihin. Eri reagenssien avulla näytteestä saadaan näkyviin signaali, jonka avulla tutkittavan analyytin konsentraatio voidaan osoittaa. Käytettävästä ELISA-menetelmästä riippuen kiinteälle pinnalle, tavallisesti kuoppalevyille, sidotaan joko antigeeni tai vasta-aine, joka sitoutuu myöhemmässä vaiheessa lisättävään spesifiseen vasta-aineeseen tai antigeeniin. Vasta-aineessa on kemiallisilla sidoksilla kiinni entsyymileima. Kun substraatti lisätään kuoppalevyille, käynnistyy entsyymin katalysoima reaktio. Reaktion lopputuotteena muodostuu väri, jonka intensiteetti voidaan mitata spektrofotometrisesti. (Davies 2005, 3-4.)

ELISA:ssa yleisimmin käytetyt entsyymit ovat HRP ja alkaalinen fosfataasi. Muodostunut väri riippuu käytettävästä substraatista. HRP:llä substraattina käytetään yleensä tetrametyylibensidiiniä (TMB), jolloin reaktio tuottaa sinisen värin. Reaktio pysäytetään denaturoimalla entsyymit pH:n muutoksella. (Kricka & Wild 2005, 195.)

ELISA-menetelmät voidaan jaotella kolmeen eri menetelmään: suora ja epäsuora menetelmä sekä sandwich-ELISA. Sandwich-ELISA voidaan puolestaan jakaa suoraan ja epäsuoraan sandwich-ELISA:an. Nämä menetelmät toimivat myös perustana kilpaileville ja inhiboiville menetelmille. (Crowther 2009, 11.)

2.6.1 Suora ja epäsuora menetelmä

Suora menetelmä on yksinkertaisin ELISA-menetelmistä. Antigeeni laimennetaan korkean pH:n omaavaan puskuriin, joka ei sisällä mitään muita proteiineja, jotka voisivat haitata analysoitavan antigeenin sitoutumista kuoppalevyn pohjaan. Käytettävä puskuri on yleensä fosfaattipuskuroitua suolaliuosta (PBS) tai karbonaatti- tai bikarbonaattipuskuria. Antigeenit kiinnittyvät kuoppalevyn pohjaan passiivisesti inkubaation aikana. (Crowther 2009, 12-13.)

Inkubaation jälkeen sitoutumattomat molekyylit pestään pois pesupuskurilla ja levyille lisätään entsyymileimattu vasta-aine. Lisättävä vasta-aine laimennetaan puskuriin, joka sisältää blokkausyhdistettä. Yhdisteen tarkoituksena on estää epäspesifistä sitoutumista, mutta sallia vasta-aineen spesifinen sitoutuminen kohdeantigeeniinsä. Blokkausyhdisteenä voidaan käyttää proteiinia, kuten naudan seerumin albumiini (BSA), tai alhaisen konsentraation omaavaa detergenttiä, kuten natriumlayryylisulfaatti (SDS). (Crowther 2009, 13-14.)

Vasta-aineet sitoutuvat antigeeneihin inkubaation aikana, jonka jälkeen sitoutumattomat vasta-aineet pestään pois pesupuskurilla. Levyille lisätään substraatti, joka kiinnittyy vasta-aineessa kiinni olevaan entsyymiin. Entsyymi katalysoi värireaktion, jonka annetaan jatkua määritetyn ajan. Reaktio pysäytetään muuttamalla pH:ta tai käyttämällä sopivaa reaktiota inhiboivaa reagenssia. Väriin intensiteetti mitataan spektrofotometrisesti sopivalla aallonpituudella. (Crowther 2009, 14.)

Epäsuorassa ELISA:ssa antigeenin kuoppalevylle sitoutumisen jälkeen levyille lisätään leimaamaton primaarivasta-aine, joka sitoutuu antigeeniin. Inkuboinnin jälkeen ylimääräinen primaarivasta-aine pestään pois. Levyille lisätään leimattu sekundaarivasta-aine, joka tunnistaa primaarivasta-aineen ja sitoutuu siihen inkubaation aikana. Sitoutumaton

sekundaarivasta-aine pestään pois ja määrittäminen jatkuu kuten suorassa menetelmässä substraatin lisäyksellä. (Crowther 2009, 14.)

2.6.2 Sandwich-ELISA

Sandwich-ELISA voidaan jakaa suoraan ja epäsuoraan sandwich-ELISA:an. Suorassa sandwich-ELISA:ssa levyille lisätään ensin primaarivasta-aine (ns. capture antibody), joka inkubaation aikana kiinnittyy passiivisesti kuopan pohjaan. Inkubaation ja pesun jälkeen epäspesifistä sitoutumista aiheuttavat kohdat voidaan blokata pois käyttämällä blokkauspuskuriä. Inkuboinnin ja pesun toistamisen jälkeen levyille lisätään blokkauspuskuriin laimennetut näytteet. Määritettävät antigeenit sitoutuvat inkubaation aikana primaarivasta-aineeseen, jonka jälkeen sitoutumaton näyte pestään pois. (Crowther 2009, 16-59.)

Seuraavaksi levyille lisätään entsyymileimattu sekundaarivasta-aine, joka tunnistaa antigeenin ja kiinnittyy siihen. Inkubaation ja pesun jälkeen lisättävä substraatti aiheuttaa värireaktion joka pysäytetään sopivalla pysäytysliuoksella ja voidaan määrittää spektrofotometrisesti. Epäsuorassa sandwich-ELISA:ssa sekundaarivasta-ainetta ei ole leimattu, vaan sekundaarivasta-aineen jälkeen levyille lisätään detektion mahdollistava kolmas vasta-aine, joka kiinnittyy sekundaarivasta-aineeseen, mutta ei reagoi primaarivasta-aineen kanssa.

Entsyymi voidaan kiinnittää detektion mahdollistavaan vasta-aineeseen esimerkiksi streptavidini-biotiini –sidoksella. Biotiinimolekyyli liitetään vasta-aineeseen ja streptavidini käytettävään entsyymiin. Tämän jälkeen määrittäminen jatkuu substraatin lisäyksellä. Sandwich-ELISA:n käyttöä rajoittaa se, että antigeenillä on oltava vähintään kaksi vasta-aineen sitoutumiskohtaa, toinen primaari- ja toinen sekundaarivasta-aineelle. (Crowther 2009, 17-20, 547.)

2.6.3 Kilpailevat ja inhiboivat menetelmät

Kilpailevien ja inhiboivien menetelmien perustana käytetään joko suoraa tai epäsuoraa menetelmää tai sandwich-ELISA:a. Ideana on, että reaktioon lisätään tunnettu määrä tiettyä komponenttia, joka häiritsee vasta-aineen sitoutumista antigeenin kanssa tai kilpailee sitoutumispaikoista. Menetelmää voidaan käyttää antigeenin tai vasta-aineen määrittämiseen. Kilpaileva tai inhiboiva komponentti on leimattu ja sen määrä on kääntäen verrannollinen analysoitavaan yhdisteeseen. (Crowther 2009, 21-37.)

3 OPINNÄYTETYÖN TAVOITE JA TARKOITUS

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää tutkimusryhmän käyttöön immunohistokemiallinen värjäysmenetelmä, jolla pystytään osoittamaan makrofagit sekä tutkimaan niiden polarisaatiota (M1 ja M2 fenotyyppejä) kudosis- ja solunäytteissä. Tutkimuksessa saatuja tuloksia voidaan hyödyntää makrofagien ja niiden polarisaation tutkimiseen erilaisista soluviljely- ja kudosisnäytteistä sekä värjäysmenetelmien kehittämisessä.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli testata immunohistokemian toimivuutta kudosis- ja solunäytteiden analysoinnissa tutkittaessa makrofagien klassista ja vaihtoehtoista polarisaatiota. Työssä tutkittiin neljän eri vasta-aineen toimivuutta immunohistokemiassa soluis- ja kudosisnäytteillä, sekä selvitettiin voidaanko kyseisiä vasta-aineita käyttää makrofagien polarisaation tutkimisessa.

4 MENETELMÄT JA MATERIAALIT

4.1 Kudosleikkeiden ja solunäytteiden esivalmistelut

In vivo –ympäristöstään irrotetut humaanikudosleikkeet oli leikattu steriileillä saksilla paloiksi ja fiksattu formaliinissa. Tämän jälkeen palat oli siirretty säilytysliuoksena toimivaan 70% etanoliin. Kudoksen prosessointia varten kudoksenäytteistä valittiin hyväkuntoisia ja erityyppisiä kudospaloja, jotka asetettiin ajokasetteihin ja pidettiin 70% etanolissa. Kun kudoksenäytteitä oli saatu kerättyä tarvittava määrä, suoritettiin kudoksen prosessointi ja sen upotus parafiiniin käyttämällä Miles Tissue-Tek® VIP Vacuum Infiltration Processor E150 series –automaatiolaitetta. VIP-ajon jälkeen kudoksenäytteet valettiin käsin parafiiniin. Valetut blokit säilytettiin kylmähuoneessa +4°C:ssa.

Näytteiden leikkaamiseen käytettiin liukumikrotomia (Leitz 1208). Blokit pidettiin ennen leikkausta jäällä ja ne avattiin leikkaamalla pinnasta ensin paksumpia leikkeitä (20µm). Kun kudos oli sopivasti esillä, leikattiin blokista 5µm:n paksuisia leikkeitä, jotka suoristettiin vesihauteessa (45°C) ja kiinnitettiin Super Frost Plus –laseille. Myöhemmin laseiksi vaihdettiin Super Frost Ultra Plus –lasit, koska leikkeet eivät pysyneet kunnolla kiinni värjäysprosessin aikana. Näytteet kiinnitettiin lasihin lämpökäsittelyllä. Immunohistokemiallisiin värjäyksiin menevät lasit pidettiin huoneenlämmössä seuraavaan päivään, jolloin ne käytettiin 60°C:ssa lämpökaapissa kahden tunnin ajan. Lämpökäsittelyn jälkeen lasit jätettiin huoneenlämpöön. Histologisiin värjäyksiin menevät lasit pidettiin yön yli 37°C:ssa lämpökaapissa, jonka jälkeen ne siirrettiin kylmähuoneeseen.

Kudoksenäytteiden lisäksi työssä käytettiin soluviljelmästä eristettyjä humaani monosyytti-makrofageja (THP-1). THP-1 solut (ATCC, Manassas, VA, USA) ovat promonosyyttejä, jotka erilaistettiin 24-kuoppalevyille jaon yhteydessä makrofageiksi 100 nM forboliesterillä. 72 tunnin kuluttua forboliesterin lisäyksestä soluja stimuloitiin joko lipopolysakkaridilla (10 ng/ml, LPS) tai interleukiini-4:llä (10 ng/ml, IL-4). LPS käynnistää klassisen M1 aktivaation ja IL-4 vaihtoehtoisen M2 aktivaation. 24 tunnin kuluttua solut eristettiin liitteessä 1 esitellyn protokollan mukaisesti. Näytteet sentrifugoitiin Super Frost Ultra Plus –laseille Cytospin 4 sentrifuugilla (Thermo Shandon) ja kiinnitettiin lasihin jääkylmällä asetonilla. Tämän jälkeen lasit säilytettiin huoneenlämmössä. Osas-

ta solunäytteitä otettiin talteen myös mediumit, jotka pakastettiin ELISA-määrittystä varten.

4.2 Immunohistokemialliset värjäykset

Ennen immunohistokemiallisia värjäyksiä leikkeet värjättiin histologisesti. Histologiasa värjäystekniikkana käytettiin hematoksyliini-eosiini (HE) –värjäystä, jonka protokolla on esiteltynä liitteessä 2. HE-värjäyksen perusteella leikkeistä eroteltiin paljon nekroottista kudosta sisältävät leikkeet. Leikkeet myös jaoteltiin alustavasti solupopulaatiinsa mukaan, ja runsaasti makrofageja sisältäviä leikkeitä käytettiin immunohistokemiassa testileikkeinä.

Immunohistokemiassa näytteet oli tarkoitus analysoida käyttämällä neljää eri vastaainetta. Värjäykset suoritettiin LabVision Autostainer –värjäysautomaatilla. Vastaaineiden valinnoissa ensin päätettiin, mitä markkereita haluttiin tutkia. Tämän jälkeen varmistettiin, että vasta-aineet soveltuivat humaani parafiinileikkeiden immunohistokemiallisiin värjäyksiin. Kirjallisuudesta haettiin julkaisuja, joissa vasta-aineita oli käytetty, jotta niiden toimivuus protokollassa saatiin tarkistettua. Käytetyt vasta-aineet ovat taulukossa 1. Yleinen makrofagimarkkeri CD68 toimi makrofagivoittoisten näytteiden osoittamisessa HE-värjäysten rinnalla. Testiajoja suoritettiin yhteensä kahdeksan, joissa testattiin vasta-aineita eri pitoisuuksilla sekä kahden eri antigeenin paljastusmenetelmän vaikutusta värjäystuloksiin. Kontrollinäytteinä menetelmän testauksessa ja makrofagipolarisaation osoittamisessa käytettiin THP-1 –soluja, jotka oli stimuloitu joko LPS:llä tai IL-4:llä. THP-1 –solut värjättiin vasta-aineilla CD68, CD163 ja C206.

TAULUKKO 1. Käytetyt vasta-aineet.

Vasta-aine	Valmistaja	Spesifisyys
Anti-CD68	Abcam	veren ja kudoksen makrofagit
Anti-CD163	Novocastra	vaihtoehtoisen aktivaation makrofagien ilmentävä scavenger- reseptori
Anti-CD206	R&D Systems	vaihtoehtoisen aktivaation makrofagien ilmentävä mannoosi-reseptori
Anti-NOS2 (iNOS)	Santa Cruz Biotechnology	klassisen aktivaation makrofagien ilmentämä indusoituva typpioksi-disyntaasi

Ensimmäisessä testiajossa luotiin LabVision Autostainer –värjäysautomaatille ohjelma, jonka mukaan vasta-ainevärjykset suoritettiin. Protokolla tallennettiin tietokoneelle ja sitä sovellettiin kaikissa vasta-ainevärjyksissä. Ennen värjäyksen aloittamista laselle tehtiin deparafinointi ja rehydratointi ksyleenistä laskevan alkoholisarjan kautta milliQ-veteen, ja vasta-aineesta riippuen antigeenin paljastus. Värjäysprotokolla alkoi lasien huuhtelulla pesupuskurina käytettävällä 1x TBS-0,05% Tween 20 –liuoksella, joka laimennettiin 10x TBS-0,5% Tween 20 –kantaliuoksesta. Seuraavana suoritettiin endogeenisen peroksidaasiaktiivisuuden blokkaukseen. Blokkaavana reagenssina käytettiin kaikissa värjyksissä 3% vetyperoksidia. Viiden minuutin kuluttua lasit huuhdeltiin pesupuskurilla ja laselle lisättiin ternihera, jonka tarkoituksena oli blokata näytteen epäspesifiset sitoutumiskohdat. Ternihera laimennettiin 1x TBS-0,05 Tween 20 –puskuriin suhteella 1:5 ja annettiin vaikuttaa lasilla 10 minuutin ajan. Huuhtelu toistettiin ja laselle lisättiin käytettävä vasta-aine 30 minuutiksi. Vasta-aineet laimennettiin kaupalliseen laimennosliuokseen (normal antibody diluent).

Vasta-aineinkubaation jälkeen lasit huuhdeltiin pesupuskurilla kolme kertaa ja laselle lisättiin kolmas blokkaukseen reagenssi (post-antibody blocking), jonka annettiin vaikuttaa 20 minuuttia. Reagenssin tarkoituksena oli edesauttaa leimatun sekundaarivasta-aineen

kulkeutumista kudoksenäytteessä. Huuhtelu pesupuskurilla toistettiin kolme kertaa ja lasseille lisättiin HRP-leimattu sekundaarivasta-aine. Sekundaarivasta-aineen annettiin vaikuttaa 30 minuuttia. Inkubaatioajan jälkeen lasit pestiin pesupuskurilla kolme kertaa ja lasseille lisättiin kromogeeninä käytetty DAB. DAB:n annettiin vaikuttaa viisi minuuttia jonka jälkeen lasit huuhdeltiin milliQ-vedellä.

Huuhtelun jälkeen lasseille lisättiin 0,5% kuparisulfaattiliuosta, jonka tarkoituksena oli vahvistaa DAB:n tuottaman ruskean värireaktion intensiteettiä. Kuparisulfaatin annettiin vaikuttaa viisi minuuttia ja lasien huuhtelu pesupuskurilla toistettiin. Viimeiseksi lasseille lisättiin hematoksyliini, jolla vastavärjättiin solujen tumat. Hematoksyliinin annettiin vaikuttaa minuutin ajan. Lasit huuhdeltiin ensin pesupuskurilla ja tämän jälkeen milliQ-vedellä. Värjäyksen päätyttyä näytteet dehydratoitiin ja kirkastettiin nousevalla alkoholisarjalla ja ksyleenillä. Viimeiseksi lasit päällystettiin peitinlaseilla. Peittausaineena käytettiin Pertexiä. Immunohistokemiassa ja histologiassa käytetty materiaalilista löytyy liitteestä 3 ja värjäyskoneessa käytetyn pesupuskurin valmistusohje liitteestä 4.

4.2.1 Värjäykset makrofagivasta-aineella

Makrofagien tunnistukseen kudoksenäytteistä käytettiin vasta-ainetta Anti-CD68 antibody [KP1] (ab955 Abcam), joka on hiiressä tuotettu monoklonaalinen vasta-aine humaaninäytteille. HE-värjäysten perusteella paljon nekroottista kudosta sisältävät leikkeet jätettiin pois immunohistokemiallisista värjäyksistä. Vasta-aineella CD68 testivärjäyksiä suoritettiin yhteensä kolme, joissa testattiin vasta-aineen pitoisuuksia suhteilla 1:100, 1:500, 1:1000 ja 1:2000 sekä antigeenin paljastusmenetelmän vaikutusta värin intensiteettiin.

Testattu antigeenin paljastusmenetelmä oli leikkeiden lämmittäminen mikroaaltouunissa 50 mM Tris + 1 mM EDTA -liuoksessa muutaman minuutin ajan niin että liuos ehti kiehua. Keittämisen seurauksena osa leikkeistä irtosi lasista joko osittain tai kokonaan, eivätkä ne enää kestäneet varsinaista värjäystoimenpidettä. Värjäntyminen oli yhtä vahvaa leikkeillä joille tehtiin antigeenin paljastus, kuin niillä jotka värjättiin ilman esikäsittelyä. Paljastusliuoksen valmistusohje on esiteltyä liitteessä 5.

4.2.2 Värjäykset vaihtoehtoisen aktivaation makrofagivasta-aineilla

Vaihtoehtoisen aktivaation makrofagien tunnistamiseen käytettiin kahta eri vasta-ainetta: Antibody CD163 (NCL-CD163, Novocastra), hiiressä tuotettu monoklonaalinen vasta-aine humaaninäytteille sekä Human MMR/CD206 Antibody (MAB25341, R&D Systems), hiiressä tuotettu monoklonaalinen vasta-aine humaaninäytteille. Värjäyksiin valittiin näytteitä, jotka olivat värjäytyneet positiivisesti vasta-aineella CD68. Testiajoja suoritettiin neljä. CD163 vasta-aineella värjäytymistä testattiin pitoisuussuhteilla 1:100, 1:500, 1:1000 ja 1:2000. CD206 vasta-aineen testatut pitoisuudet olivat 4 µg/ml, 8 µg/ml ja 12 µg/ml sekä THP-1 -solunäytteillä lisäksi 20 µg/ml. Molemmille vasta-aineille käytettiin antigeenin paljastusmenetelmää, jossa värjättävät näytteet pidettiin sitraattipuskurissa +60°C:ssa lämpökaapissa värjäystä edeltävän yön yli. Sitraattipuskurin valmistusohje löytyy liitteestä 5.

4.2.3 Värjäykset klassisen aktivaation makrofagivasta-aineella

Klassisen aktivaation makrofagivasta-aineena käytettiin indusoituvan typpioksidisyntaasin (iNOS, sc-651, Santa Cruz Biotechnology) kanissa tuotettua vasta-ainetta humaaninäytteille. Testiajoja suoritettiin yksi, jossa vasta-ainetta testattiin pitoisuuksilla 0,8 µg/ml (1:250), 0,4 µg/ml (1:500) ja 0,2 µg/ml (1:1000). Vasta-aine ei vaatinut antigeenin paljastusmenetelmän käyttöä.

4.3 ELISA-määritys

Immunohistokemian tueksi makrofagipolarisaatiota tutkittiin ELISA-menetelmällä määrittämällä THP-1 solujen mediumnäytteistä klassisen ja vaihtoehtoisen aktivaation markkereita. Käytetyt ELISA:t olivat tutkimuskäyttöön soveltuvia sandwich-ELISA:aan perustuvia kaupallisia kittejä. Valmistajan ohjeita moduloiden määrityksissä käytettiin optimoituja ja sovellettuja inkubaatioaikoja. Klassisen aktivaation makrofagien markkerina käytettiin humaaninterleukiini-6 (IL-6) ELISA:a (Ready-SET-Go!®, eBioscience) ja vaihtoehtoisen aktivaation makrofagimarkkerina humaaninterleukiini-6 (IL-6) ELISA:a (DuoSet ELISA, R&D Systems).

Molemmissa määrittelyissä käytettiin 96-kuoppalevyjä. CCL13 määrittelyissä kuoppalevyille kiinnitettiin primaarivasta-aine, joka oli laimennettu PBS:llä (pH 7.2 - 7.4, suodatettu 0,2 µm suodattimella). Levyä inkuboitii yön yli +4°C:ssa, jonka jälkeen se pestiin kolme kertaa pesuliuksella (suodatettu PBS + 0,05% Tween 20). Pesut suoritettiin Tecan HydroFlex™ microplate washer –automaatiopesurilla. Pesun jälkeen kuopat kuivatettiin lyömällä kuoppalevyä voimakkaasti käsipaperia vasten. Kuivauksen jälkeen levyille pipetoitiin 250 µl/ kuoppa blokkauspuskuria (PBS + 1% fraction V BSA, suod. 0,2 µm) ja inkuboitii huoneenlämmössä yhden tunnin ajan.

Inkubaation jälkeen pesu ja kuivaus toistettiin ja levyille pipetoitiin laimennetut näytteet ja standardit, tasokontrollit sekä nollanäyte. Näytteet ja standardit laimennettiin PBS + 1% fraction V BSA:han (suod. 0,2 µm), joka toimi myös nollanäytteenä. Standardisuoran määrittelyarvo oli 3.9 – 500 pg/ml. Kaikki näytteet laimennettiin suhteella 1:2 (180 µl + 180 µl) ja pipetoitiin levyille kahtena rinnakkaisena. Levyn alkuun, keskelle ja loppuun pipetoitiin tasokontrollit. Levyä inkuboitii kaksi tuntia huoneenlämmössä, jonka jälkeen pesut ja kuivaus toistettiin. Tämän jälkeen levyille lisättiin suodatettuun (0,2 µm) PBS + 1% fraction V BSA:han laimennettu biotinyloitu sekundaarivasta-aine, ja levyä inkuboitii huoneenlämmössä 1,5 tuntia.

Pesujen ja kuivauksen jälkeen levyille pipetoitiin streptavidini-HRP, ja levyä inkuboitii pimeässä huoneenlämmössä 15 minuuttia. Pesut ja kuivaus toistettiin ja kuopille lisättiin substrattina toiminut tetrametyyli-bentsidiini (TMB) ja levyä inkuboitii 15 minuuttia. Värireaktio pysäytettiin 1M rikkihapolla ja absorbanssit mitattiin välittömästi spektrofotometrillä (Victor Multilabel Counter) aallonpituudella 450 nm. Näytteiden CCL13 pitoisuus laskettiin laitteen MultiCalc-ohjelman avulla ja tulostettiin yksikkönä pg/ml. Näytteiden todellinen CCL-13 pitoisuus saatiin kertomalla saatu tulos laimennuskertoimella.

Toisena määrittelyksenä tehdyn h-IL-6 –ELISA:n 96-kuoppalevyille pipetoitiin primaarivasta-aine, joka oli laimennettu puskuriliukseen. Puskuriliuos oli laimennettu kitin mukana tulleesta 10x Coating Buffer:ista milliQ-veteen. Levyä inkuboitii +4°C:ssa yön yli, jonka jälkeen kuopat pestiin kolme kertaa käyttämällä automaatiopesuria. Pesupuskurina käytettiin suodatettua (0,2µm) PBS:ää johon oli lisätty 0,05% Tween 20:tä. Pesun jälkeen kuopat kuivatettiin lyömällä levyä käsipaperia vasten. Seuraavana kuopille

lisättiin 1x blokkaustrupuria, joka oli laimennettu kitin mukana tulleesta 5x Assay Diluent:ista milliQ-veteen. Blokkaustrupurin annettiin vaikuttaa tunnin ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen levy pestiin pesustrupurilla kolme kertaa ja kuivattiin.

Pesun jälkeen levyille pipetoitiin laimennetut näytteet ja standardit, tasokontrollit ja nollanäytteet. Näytteet ja standardit laimennettiin blokkaustrupuriin, joka toimi myös nollanäytteenä. Standardisuoran määrittämisalue oli 0,39 – 200 pg/ml. Kontrollinäytteet sekä IL-4 käsitellyt näytteet laimennettiin suhteella 1:2 (110 µl + 110 µl) ja LPS käsitellyt näytteet suhteella 1:40 (6 µl + 234 µl). Levyä inkuboitiin yön yli +4°C:ssa.

Inkubaation jälkeen kuopat pestiin viisi kertaa pesuliuksella, jonka jälkeen levy kuivatettiin. Kuoppiin lisättiin biotinyloitu sekundaarivasta-aine, joka oli laimennettu blokkaustrupuriin. Levyä inkuboitiin huoneenlämmössä yhden tunnin ajan, jonka jälkeen pesut toistettiin viisi kertaa. Kuivauksen jälkeen kuoppiin pipetoitiin blokkaustrupuriin laimennettu avidiini-HRP ja levyä inkuboitiin pimeässä huoneenlämmössä 30 minuuttia. Pesut toistettiin seitsemän kertaa, ja kuivauksen jälkeen levyille lisättiin substraattina toiminut TMB. Väriä annettiin kehittyä pimeässä huoneenlämmössä 15 minuuttia, jonka jälkeen reaktio pysäytettiin lisäämällä kuoppiin 1M rikkihappoa. Absorbanssi mitattiin välittömästi spektrofotometrillä aallonpituudella 450 nm. IL-6 pitoisuudet laskettiin laitteen MultiCalc-ohjelmalla ja tulostettiin yksikkönä pg/ml. Näytteiden todellinen IL-6 pitoisuus saatiin kertomalla saatu tulos näytteen laimennuskertoimella.

5 TULOKSET

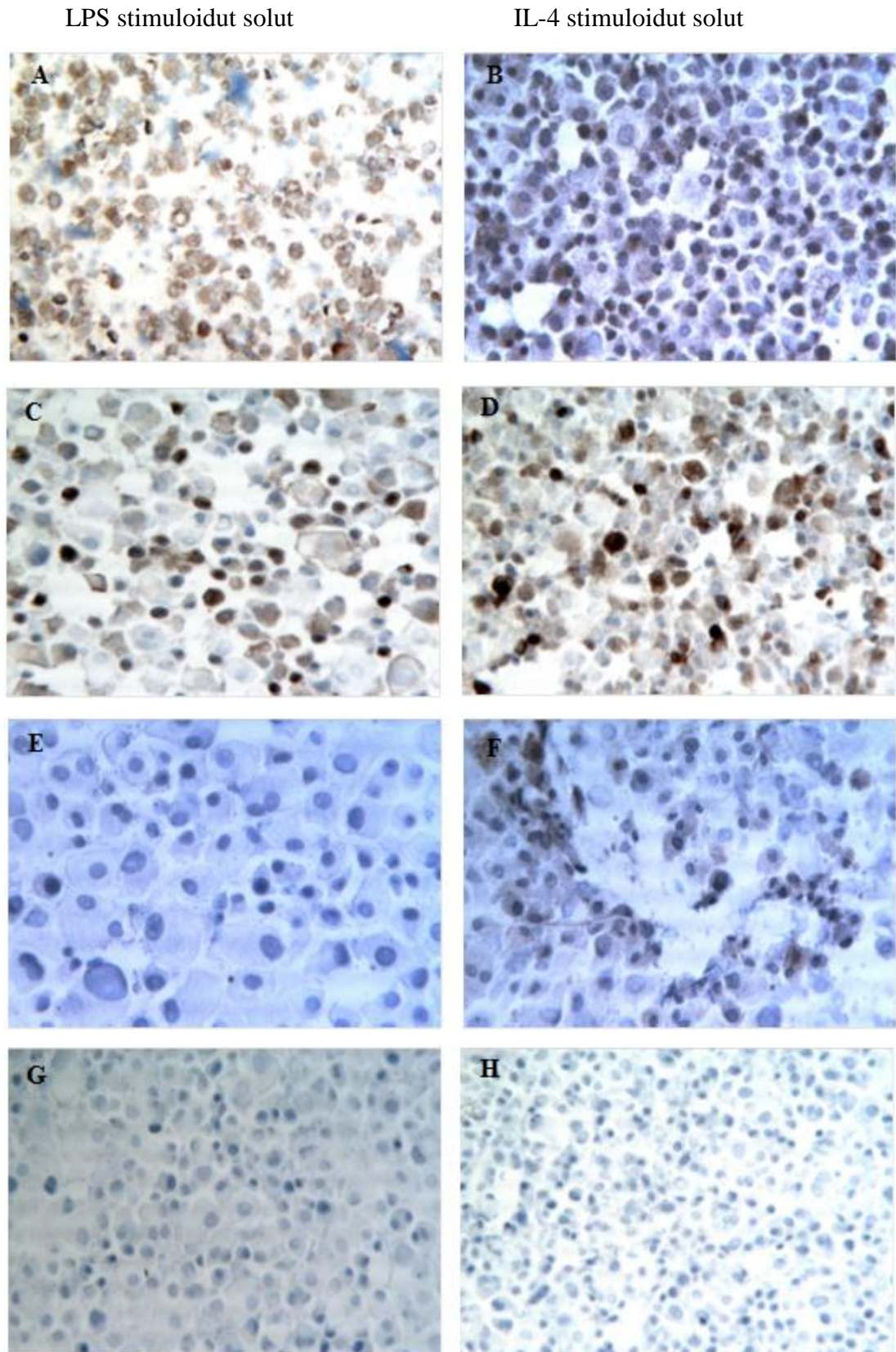
5.1 Immunohistokemiallisten värjäysten tulokset

Immunohistokemian vasta-aineiden testauksessa lähdettiin liikkeelle THP-1 –solunäytteillä, jotta kudoksenäytteisiin siirryttäessä vasta-aineiden toimivuudesta olisi jo näyttöä. THP-1 -solunäytteissä vasta-aine CD68 ei vaatinut lämpökäsittelyä ja solut värjäytyivät hyvin vasta-ainelaimennoksella 1:1000. Solunäytteille, jotka värjättiin vasta-aineilla CD163 ja CD206, tehtiin antigeenin paljastus sitraattipuskurilla ennen värjäystä. Värjäysten perusteella CD163:n vasta-ainelaimennokseksi valittiin 1:500 ja CD206:n pitoisuudeksi 12 µg/ml.

Kuviossa 3 esitetyistä kuvista vasemmanpuoleisten näytteiden soluja on stimuloitu LPS:llä, joka aikaansaa makrofagien klassisen aktivaation. Oikeanpuoleisia näytteitä on stimuloitu sytokiini IL-4:llä, joka puolestaan aikaansaa makrofagien vaihtoehoisen aktivaation. Kuten kuvista A ja B nähdään, yleisesti veren ja kudosten makrofagit tunnistava vasta-aine CD68 on tunnistanut molemmista solunäytteistä kohdeantigeeninsä.

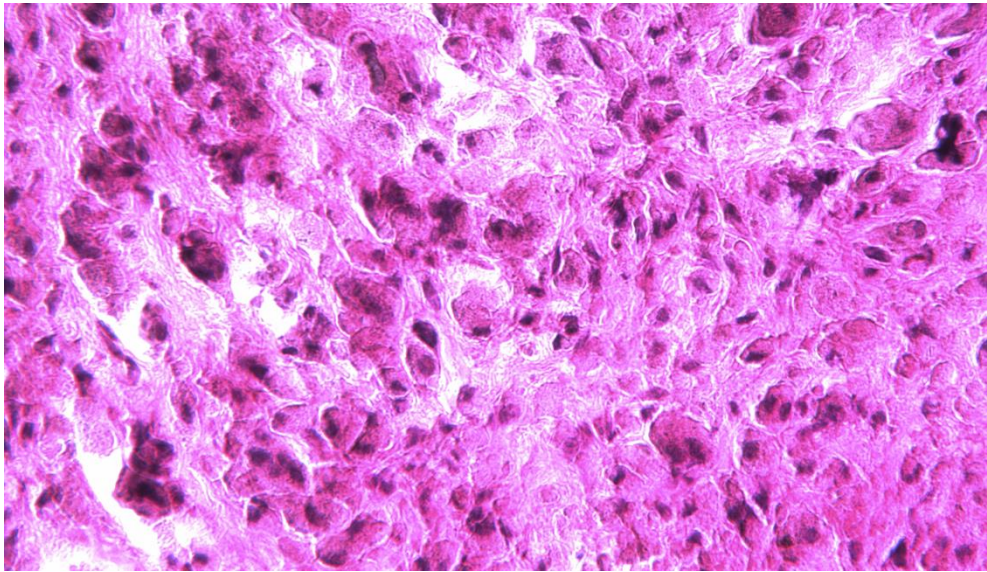
Kuvissa C ja D solunäytteet on värjätty käyttämällä vasta-ainetta CD163, joka tunnistaa vaihtoehoisesti aktivoituneiden makrofagien pinnalla olevan scavenger-reseptorin. Vasta-aine CD163 on tunnistanut makrofageja myös LPS:llä stimuloituissa soluissa (kuva C), mutta vasta-aineen spesifinen sitoutuminen on huomattavasti voimakkaampaa ja runsaampaa IL-4 käsitellyissä soluissa (kuva D). Kuvien E ja F solunäytteet on värjätty vasta-aineella CD206, joka tunnistaa vaihtoehoisesti aktivoituneiden makrofagien pinnalla olevan mannoosireseptorin. Kuvassa E solut ovat värjäntyneet ainoastaan hematoksyliinillä. Kuvassa F vasta-aine on tunnistanut osan soluista, ja ne ovat värjäntyneet ruskealla värillä. Värjäysten perusteella voidaan olettaa molempien vasta-aineiden tunnistavan vaihtoehoisen aktivaation makrofagit.

Kuvissa G ja H solunäytteille on tehty negatiivinen kontrollivärjäys, jossa primaarivasta-aine on korvattu puskuriliuoksella. Molemmissa näytteissä solut ovat värjäntyneet ainoastaan hematoksyliinillä, eikä häiritsevää taustaa havaita.



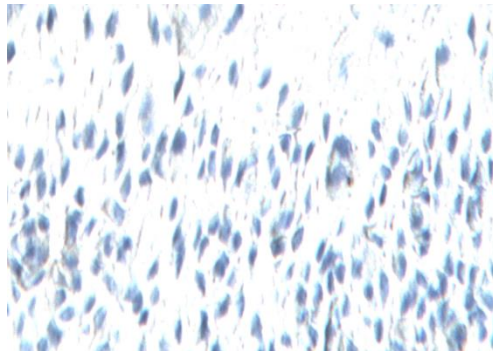
KUVIO 3. THP-1 –solut värjättyinä vasta-aineilla CD68 (kuvat A ja B), CD163 (kuvat C ja D) ja CD206 (kuvat E ja F) sekä negatiivinen värjäys (kuvat G ja H).

Kudosnäytteiden immunohistokemiallisissa testauksissa käytettiin muutamasta eri koehenkilöstä saatuja kudosnäytteitä, jotta vasta-aineiden toimivuudesta saataisiin mahdollisimman kattavaa tietoa. Tulokset esitetään yhden potilaan kudosnäytteen osalta, joka edustaa kaikkia testattuja näytteitä. Vertailtavaksi kudokseksi valittiin kudos, josta histologisten värjäysten perusteella löydettiin runsaasti tulehdussoluja. Värjäys osoitti kudoksesta löytyvän lymfosyyttien ohella myös runsaasti makrofageja. Kuviossa 4 kudos on värjätty HE-värjäyksellä. Makrofagit näkyvät kuvissa soluina, joiden tumat ovat värjäytyneet hematoksyliinillä ja tumaa ympäröivä sytosoli eosiinilla.



KUVIO 4. Kudos HE-värjätynä. 25x suurennos.

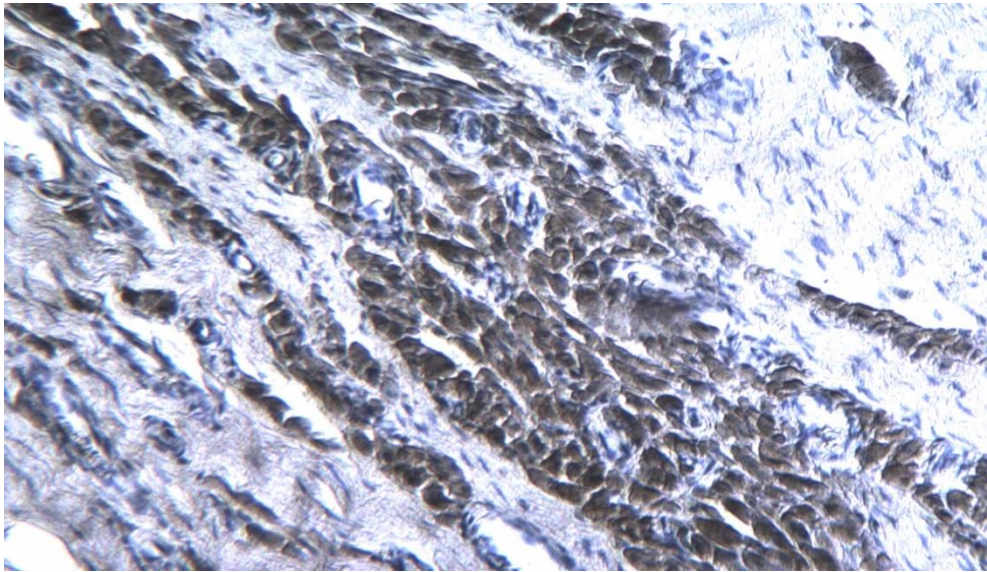
Kuviossa 5 on immunohistokemiassa vertailukudokselle suoritettu värjäys ilman primaarivasta-ainetta. Negatiivisen kontrollin värjäyksellä varmistettiin, että kudoksessa ei ole häiritsevää endogeenistä peroksidaasiaktiivisuutta tai epäspesifistä sekundaarivasta-aineen välittämää värjäytymistä.



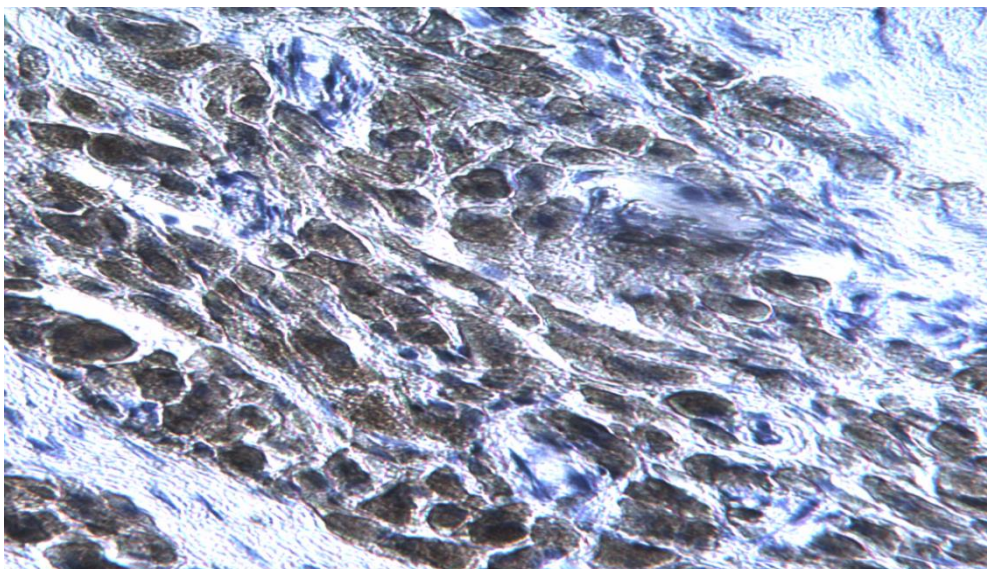
KUVIO 5. Vertailukudoksen negatiivinen kontrollivärjäys.

5.1.1 CD68

Kudosnäytteissä veren ja kudosten makrofagien tunnistukseen tutkittu vasta-aine CD68 ei vaatinut värjäystä edeltävää antigeenin paljastusta. Testatuista vasta-ainepitoisuussuhteista 1:100 värjäsi tunnistetut solut erittäin voimakkaasti aiheuttaen epäspesifistä taustaa. Suhde 1:500 osoittautui parhaaksi. Pitoisuussuhteilla 1:1000 ja 1:2000 muodostunut väri oli vaaleaa, eivätkä solut erottuneet taustasta riittävästi. Kuvi-
oissa 6 ja 7 on vertailukudoksen värjäys vasta-aineella CD68, laimennos 1:500.



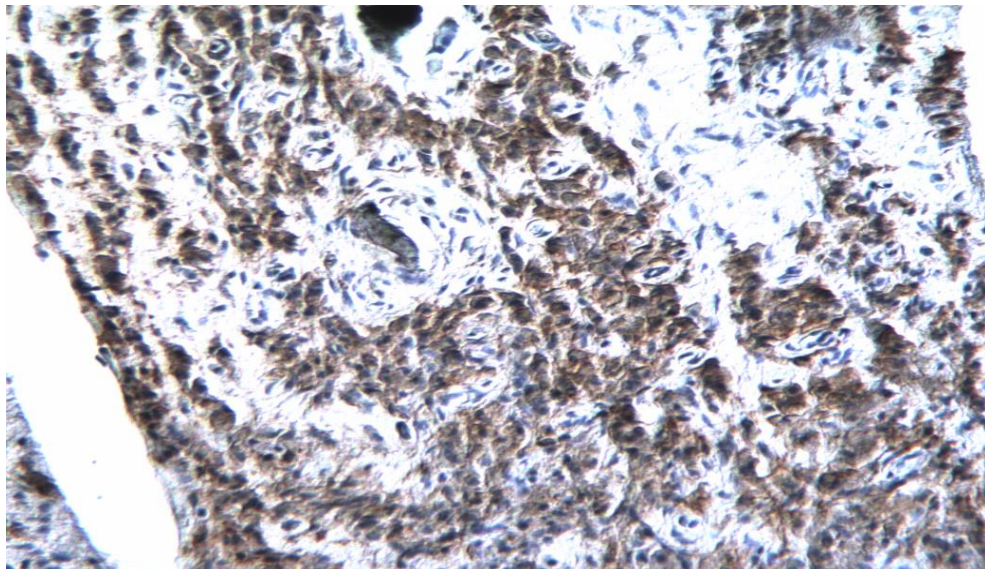
KUVIO 6. Kudos värjätynä vasta-aineella CD68. 10x suurennos.



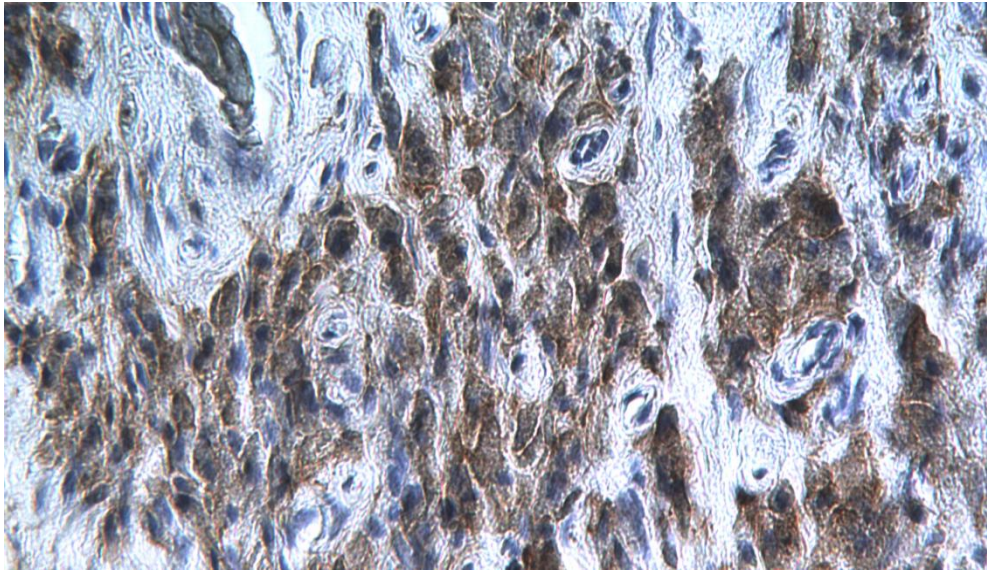
KUVIO 7. Kudos värjätynä vasta-aineella CD68. 25x suurennos.

5.1.2 CD163

M2 makrofagien tunnistukseen tutkittiin vasta-ainetta CD163, joka tunnistaa vaihtoehtoisesti aktivoituneiden makrofagien pinnalla ilmentyvän scavenger-reseptorin. Lisäksi testattiin antigeenin paljastusmenetelmän vaikutusta värjäystuloksiin. Vasta-ainepitoisuussuhteet 1:100 ja 1:500 aiheuttivat sekä lämpökäsitellyillä että käsittelemättömillä näytteillä voimakasta värjäytymistä sekä epäspesifistä taustaa. 1:1000 antoi parhaan värjäytymisen käsittelemättömillä laseilla, mutta lämpökäsittelyn jälkeen värjäytyminen oli voimakasta. Suhteella 1:2000 väri ei tarttunut soluihin riittävästi ilman antigeenin paljastusta, mutta lämpökäsitellyillä laseilla värin intensiteetti oli optimaalinen. Kuviossa 8 ja 9 on kuvattuna vertailukudoksen CD163 värjäys, laimennos 1:2000.



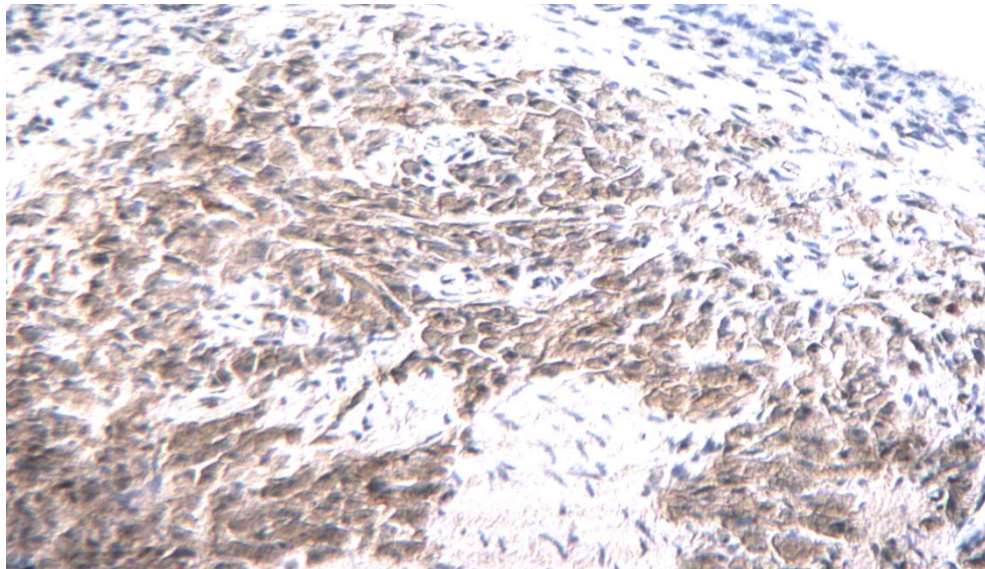
KUVIO 8. Kudos värjättyä vasta-aineella CD163. 10x suurennos.



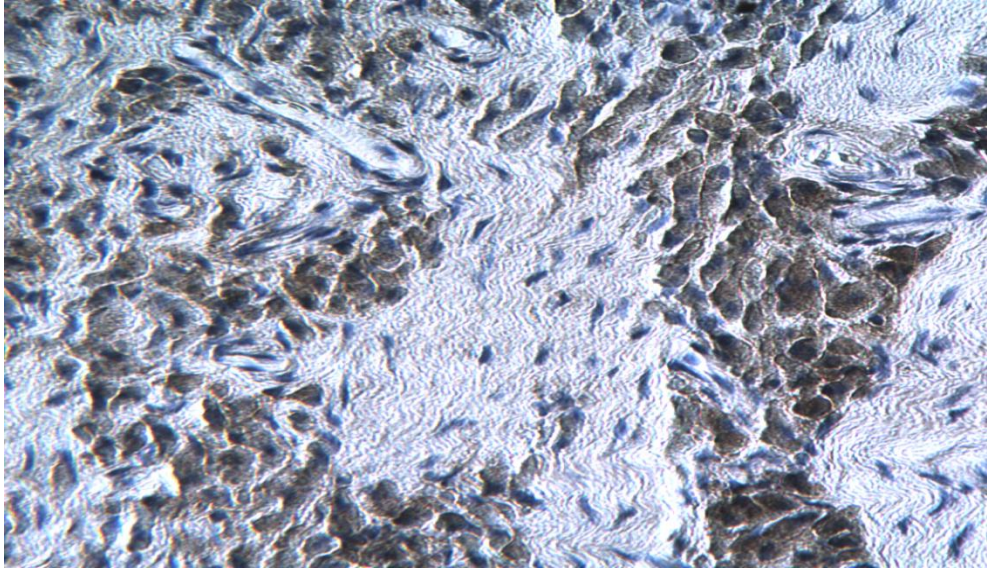
KUVIO 9. Kudos värjätynä vasta-aineella CD163. 25x suurennos.

5.1.3 CD206

M2 makrofagien tunnistukseen tutkittiin myös vasta-ainetta CD206, joka tunnistaa vaihtoehtoisesti aktivoituneiden makrofagien pinnalla ilmentyvän mannoosireseptorin. Pitoisuudet testattiin sekä käsittelemättömille että antigeenin paljastusmenetelmällä käsitellyille näytteille. Pitoisuudella 4 µg/ml solujen värjäytymisen intensiteetti oli heikko sekä lämpökäsitellyillä että käsittelemättömillä laseilla. Pitoisuudella 12 µg/ml värjäytyminen oli voimakkaampaa, mutta laseilla oli havaittavissa taustaa ja voimakasta epäspesifistä värjäytymistä. Parhaaksi pitoisuudeksi osoittautui 8 µg/ml. Paras värjäytyminen saavutettiin kun näytteet lämpökäsiteltiin ennen värjäystä sitraattipuskurilla. Kuvioissa 10 ja 11 näkyy vertailukudoksen värjäys vasta-aineella CD206, pitoisuus 8 µg/ml.



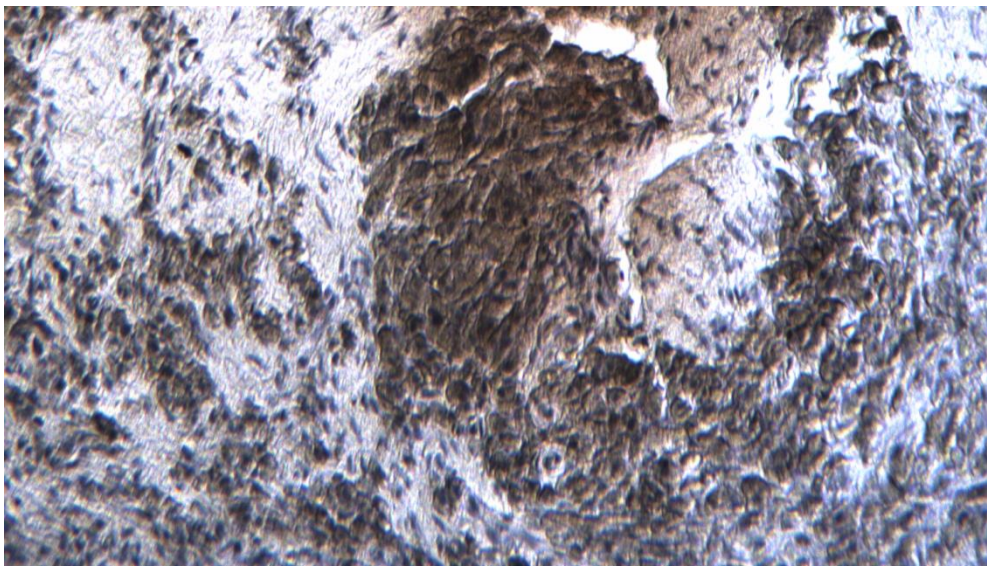
KUVIO 10. Värjäys vasta-aineella CD206. 10x suurennos.



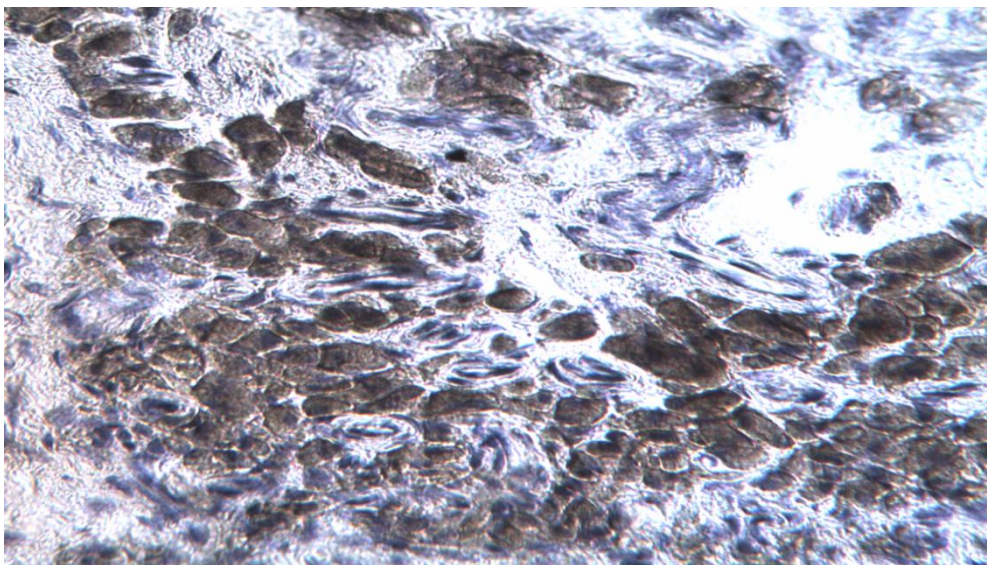
KUVIO 11. Värjäys vasta-aineella CD206. 25x suurennos.

5.1.4 iNOS

Klassisesti aktivoituneet makrofagit ilmentävät iNOS:ia, jota voidaan pitää yhtenä klassisen aktivaation markkerina. Tutkittu iNOS ei vaatinut antigeenien paljastusmenetelmien käyttöä. Testatuilla pitoisuuksilla 0,8 µg/ml ja 0,4 µg/ml värjäytyminen oli voimakasta ja laseilla havaittiin epäspesifistä värjäytymisestä johtunutta voimakasta, häiritsevää taustaa. Vasta-aineen sitoutuminen kohdeantigeeninsä oli voimakasta ja riittäväksi pitoisuudeksi saatiin 0,2 µg/ml. Kuvioissa 12 ja 13 on värjäys iNOS vasta-aineella pitoisuudella 0,2 µg/ml.



KUVIO 12. Kudos värjättyä vasta-aineella iNOS. 10x suurennos.

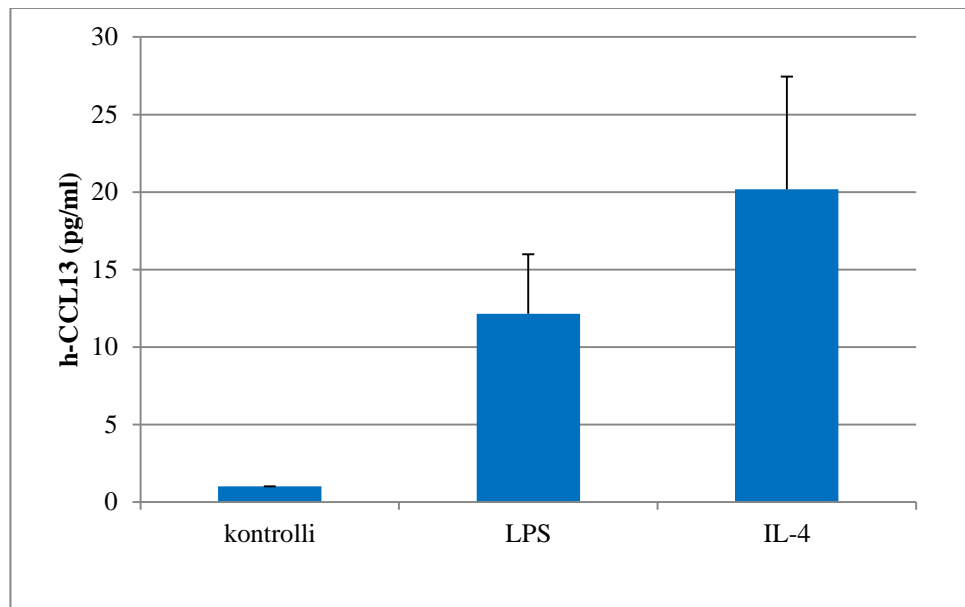


KUVIO 13. Kudos värjättyä vasta-aineella iNOS. 25x suurennos.

5.2 ELISA-määrityksen tulokset

5.2.1 Humaani CCL13

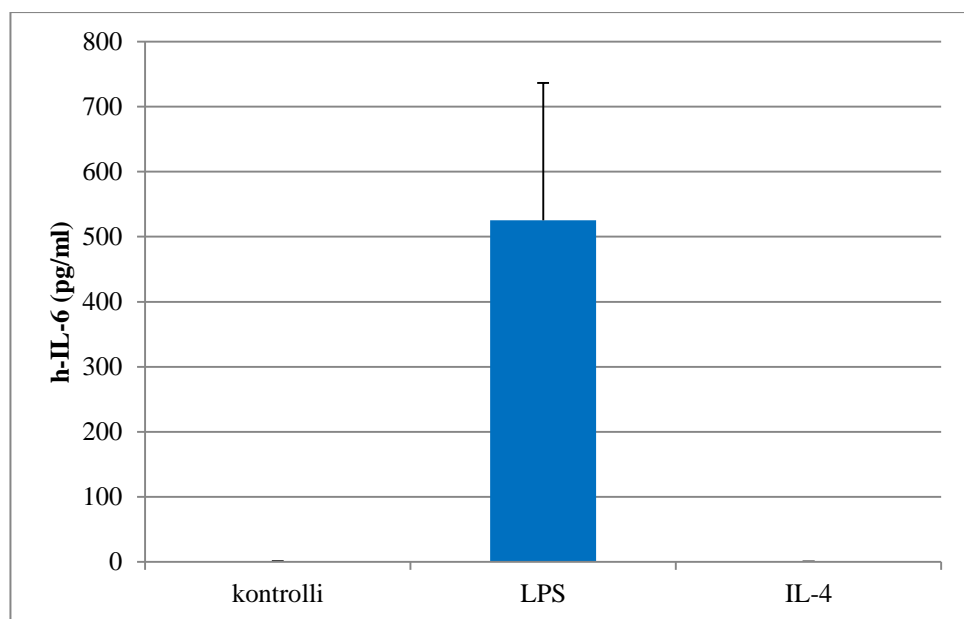
Vaihtoehtoisesti aktivoituneet makrofagit ilmentävät CCL13:a, mitä voidaan käyttää makrofagipolarisaatiota tutkittaessa vaihtoehtoisen aktivaation markkerina. CCL13 määritettiin LPS:llä ja IL-4:llä stimuloitujen THP-1 solujen viljelymediumeista. Saa-
duista tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta sekä keskiarvon keskivirhe (SEM). Sekä LPS:llä että IL-4:llä stimuloitujen solujen mediumeissa CCL13:n pitoisuus oli suurempi kuin stimuloimattomissa kontrollinäytteissä. IL-4:llä stimuloitujen solujen CCL13:n tuotto oli suurempi kuin LPS:llä käsiteltyjen solujen verrattuna (kuvio 14).



KUVIO 14. CCL13:n tuotto THP-1 –soluissa, keskiarvo + SEM, n=8.

5.2.2 Humaani IL-6

Klassisesti aktivoituneet makrofagit tuottavat IL-6:ta ja tätä voidaan käyttää makrofagi-polarisaatiota tutkittaessa klassisen aktivaation markkerina. IL-6 määritettiin LPS:llä ja IL-4:llä stimuloitujen THP-1 solujen viljelymediumeista ja tuloksista laskettiin keskiarvo, keskihajonta sekä SEM. LPS:llä stimuloitunut solut tuottivat runsaasti IL-6:ta. Stimuloimattomissa kontroleissa sekä IL-4:llä käsitellyissä soluissa IL-6:n tuotto jäi alle 10 pg/ml (kuvio 15).



KUVIO 15. IL-6:n tuotto THP-1 -soluissa, keskiarvo + SEM, n=4.

6 MENETELMIEN JA TULOSTEN TARKASTELU

Opinnäytetyön tavoitteena oli kehittää immunohistokemiallinen värjäysmenetelmä, jolla pystytään osoittamaan makrofagit sekä niiden klassisesti ja vaihtoehtoisesti aktivoituneet fenotyypit kudosis- ja solunäytteistä. Tutkimuksessa käytettiin vasta-aineita seuraavia antigeenejä vastaan: CD68, CD163, CD206 ja iNOS.

Vasta-aineiden toimivuutta tutkittiin LPS:llä tai IL-4:llä stimuloituissa THP-1 monosyytti-makrofagi solunäytteissä. Immunohistokemiallisten määritysten tueksi THP-1 –solunäytteistä määritettiin makrofagien polarisaatiomarkkereita myös ELISA-määrittäyksillä. LPS polarisoi makrofageja klassisen aktivaation suuntaan, kun taas IL-4:n vaikutus ohjaa makrofageja vaihtoehtoisen aktivaatioon (Mosser & Edwards 2008, 962; Sica & Mantovani 2013, 787).

Tuloksissa vaihtoehtoisen aktivaation makrofagien markkerina toimineen CCL13:n tuotto oli koholla sekä LPS:llä että IL-4:llä stimuloitussa soluissa. CCL13:n tuotto oli kuitenkin selkeästi suurempi soluissa, jotka oli stimuloitu IL-4:llä. Klassisen aktivaation makrofagimarkkerina toimineen IL-6:n tuotto oli runsasta LPS:llä stimuloituissa soluissa, mutta tuotto IL-4:llä käsitellyissä soluissa oli hyvin vähäinen ja pitoisuudet jäivät alle määrittäksen herkkyysrajan. Tulosten perusteella THP-1 monosyytti-makrofagien polarisaation ohjaaminen onnistui halutulla tavalla. LPS -stimulaatio siirsi polarisaatiota klassisen aktivaation suuntaan ja IL-4 –stimulaatio siirsi polarisaatiota vaihtoehtoisen aktivaation suuntaan.

Tärkeä osa immunohistokemiallisia värjäyksiä on näytteen oikea esikäsittely. Kudospalojen koko vaikuttaa ratkaisevasti käytettävään fiksaatioliuokseen ja -aikaan. Nopeasti kudoksen läpäisevä fiksaatiivi sopii tilavuudeltaan suuremmalle kudospalalle, kun taas hidas fiksaatiivi on parempi vaihtoehto, mikäli kudospalat ovat ohuita. (Kiernan 2008, 15.) Ensimmäisissä immunohistokemiallisissa värjäyksissä ongelmana oli leikkeiden irtoaminen antigeenin paljastusmenetelmän tai värjäysprotokollan aikana. Tutkittavat kudospalat olivat pieniä ja ne olivat mahdollisesti kovettuneet fiksausajan aikana. Kudoksen täyttäminen parafiinilla kovensi ja kutisti kudosta entisestään. Ongelma saatiin kuitenkin ratkaistua käyttämällä antigeenin paljastuksessa nopean mikroatouunissa

tapahtuvan lämmittämisen sijaan yön yli kestänyttä lämmittämistä lämpökaapissa, sekä vaihtamalla käytetyt objektilasit Super Frost Ultra Plus –laseihin. Lisäksi leikkeiden laseille kiinnittämisprotokollaa muutettiin. Ensin kiinnitys tapahtui pitämällä leikattuja näytteitä +37°C:ssa yön yli. Protokollaa muutettiin niin, että leikatut näytteet olivat ensin yön yli huoneenlämmössä ja seuraavana päivänä +60°C:ssa kahden tunnin ajan.

Värjäysmenetelmää kehitettiin kirjallisuudesta ja aikaisemmista tutkimuksista saatujen tulosten perusteella ja muokattiin olosuhteisiin sopivaksi. Valituista vasta-aineista oli olemassa aiempia tutkimuksia, jotka tukivat kyseisten vasta-ainevalintojen tekoa. Vasta-aineiden soveltuvuutta immunohistokemiallisiin värjäyksiin tutkittiin käyttämällä eri vasta-ainepitoisuuksia ja kahta eri antigeenin paljastusmenetelmää. Tutkimuksessa havaittiin kaikkien neljän käytetyn vasta-aineen sitoutuvan hyvin niiden spesifistä antigeeniä sisältäviin näytteisiin. Liian suuri vasta-ainepitoisuus aiheutti epäspesifistä sitoutumista ja voimakasta, häiritsevää taustaa. Primaarivasta-aineen suuri pitoisuus voi johtaa sen sitoutumiseen myös kudoksen funktionaalisiin ryhmiin. Tällöin sekundaarivasta-aine sitoutuu sekä spesifiseen epitooppiin sitoutuneeseen primaarivasta-aineeseen, että sidekudoksessa kiinni olevaan primaarivasta-aineeseen ja aiheuttaa väärää positiivista värjäytymistä (Jackson 2007, 222). Epäspesifinen tausta saatiin minimoitua vähentämällä primaarivasta-aineen pitoisuutta.

Vasta-aineista CD68:n oletettiin tunnistavan sekä LPS:llä stimuloitua, klassisesti aktivoituneita, että IL-4:llä stimuloitua, vaihtoehtoisesti aktivoituneita, makrofageja. Vasta-aine toimi sekä kudosten että solunäytteissä odotetulla tavalla. Sen antigeeniin kiinnittymiseen eivät vaikuttaneet värjäyksissä testatut antigeenin paljastusmenetelmät, vaan värin intensiteetti oli yhtä hyvä esikäsittelemättömissä näytteissä. THP-1 solunäytteissä vasta-ainepitoisuutta voitiin pienentää puoleen.

Vasta-aineet CD163 ja CD206 tunnistivat solunäytevärjäysten perusteella vaihtoehtoisesti aktivoituneita makrofageja. Myös osa LPS:llä stimuloituista makrofageista värjäytyi CD163 vasta-aineella, mutta värjäytyminen oli selkeästi runsaampaa ja voimakkaampaa IL-4:llä käsitellyissä soluissa. Vasta-aine CD206 värjäsi solunäytteistä ainoastaan IL-4:llä stimuloitua solua. CD163 ja CD206 tunnistavat eri antigeenin ja LPS:llä stimuloituissa soluissa kyseisten antigeenien (eli scavenger- ja mannoosireseptorien) esiintyvyydessä voi olla todellisia eroja, joka voi selittää edellä mainitut erot tuloksissa. Värjäyksissä antigeenin paljastusmenetelmällä oli suuri merkitys molempien vasta-aineiden

sitoutumisen kannalta. Lämpökäsitellyt solut värjäytyivät voimakkaammin, ja vasta-ainepitoisuutta pystyttiin pienentämään ja näin säästämään vasta-ainekuluissa. Vasta-aineilla CD163 ja CD206 lämpökäsittely osoittautui tarpeelliseksi, jotta näytteet värjäytyvät optimaalisesti, eikä häiritsevää epäspesifistä värjäytymistä tapahdu. Verrattaessa CD68:n värjättyihin näytteisiin, värjäytyneiden makrofagien määrä verrokkikudoksessa oli pienempi, mikä osoittaa sen, että CD163 ja CD206 tunnistivat vain tietyn tyyppiset makrofagit.

Vasta-aine iNOS tunnisti näytteistä klassisesti aktivoituneet makrofagit. Koska vasta-ainetta ei testattu solunäytteillä, sen toimivuuden tutkimiseksi värjättyjä kudoksenäytteitä verrattiin sekä CD68:lla että vaihtoehdoisen aktivaation makrofagit tunnistavilla vasta-aineilla värjättyihin kudoksenäytteisiin. Verrattaessa iNOS-värjättyä verrokkinäytettä CD68 värjäykseen, voitiin huomata värjäytyneiden makrofagien määrän olevan pienempi iNOS värjäyksessä. Myös iNOS tunnisti vain tietyn tyyppiset kudoksen makrofagit.

Menetelmä osoittautui hyvin toistettavaksi. Se soveltui niin kudoksen- kuin solunäytteiden värjäämiseen ja tutkitut vasta-aineet ja niiden pitoisuudet saatiin optimoituja olosuhteisiin sopiviksi. Tutkimuksen perusteella saatiin kehitettyä toimiva menetelmä makrofagien polarisaation immunohistokemialliseen määrittämiseen. Jatkossa menetelmää on mahdollista hyödyntää ja kehittää esimerkiksi kaksois- ja immunofluoresenssivärjäyksissä.

LÄHTEET

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pillai, S. 2013. Cellular and Molecular Immunology. 7th edition. London: Elsevier Ltd. Luettu 23.11.2013.
<http://www.studentconsult.com/content/default.cfm?ISBN=9781437715286>.
- Bancroft, J.D. & Layton, C. 2013. The hematoxylin and eosin. Teoksessa Survana, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (ed.) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th edition. London: Elsevier Ltd, 173-186.
- Biswas, S.K. & Mantovani, A. 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 11 (10), 887-896.
- Campbell, M.K. & Farrell, S.O. 2012. Biochemistry. 7th edition. Belmont: Brooks/Cole.
- Crowther, J.R. 2009. Methods in Molecular Biology. The ELISA Guidebook. 2nd edition. New York: Humana Press.
- Davies, C. 2005. Introduction to Immunoassay Principles. Teoksessa Wild, D. (ed.) The immunoassay Handbook. 3rd edition. Oxford: Elsevier Ltd, 3-40.
- Hayat, M.A. 2002. Microscopy, Immunohistochemistry, and Antigen Retrieval Methods For Light and Electron Microscopy. New York: Kluwer Academic / Plenum Publisher.
- Horobin, R.W. 2013. How histological stains work. Teoksessa Survana, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (ed.) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th edition. London: Elsevier Ltd, 157-171.
- Jackson, P. 2007. Quality assurance in immunochemistry. Teoksessa Renshaw, S. (ed.) Immunohistochemistry. Oxfordshire: Scion Publishing Ltd, 205-237.
- Jackson, P. & Blythe, D. 2013. Immunohistochemical techniques. Teoksessa Survana, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (ed.) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th edition. London: Elsevier Ltd, 381-426.
- Jokiranta, S. & Seppälä, I.J.T. 2011. Vasta-ainevälitteinen immunitetti. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 101-137.
- Kiernan, J.A. 2008. Histological and Histochemical Methods. Theory and practice. 4th edition. Oxfordshire: Scion Publishing Ltd.
- Kricka, L.J. & Wild, D. 2005. Signal Generation and Detection Systems. Teoksessa Wild, D. (ed.) The immunoassay Handbook. 3rd edition. Oxford: Elsevier Ltd, 192-211.
- Lay, G., Poquet, Y., Salek-Peyron, P., Puissegur, M-P., Botanch, C., Bon, H., Levillain, F., Duteryat, J-L., Emile, J-F. & Altare, F. 2006. Langhans giant cell from *M. tuberculosis*-induced human granulomas cannot mediate mycobacterial uptake. *Journal of Pathology* 211, 76-85.

- Mardle, S. 2007. The selection of reported labels. Teoksessa Renshaw, S. (ed.) Immunohistochemistry. Oxfordshire: Scion Publishing Ltd, 33-44.
- Meri, S. 2011. Johdanto immunologiaan. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 12-17.
- Mosser, D.M. & Edwards, J.P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* 8, 958-969.
- Mustafa, T., Wiker, H.G., Mørkve, O. & Sviland, L. 2008. Differential expression on mycobacterial antigen MPT64, apoptosis and inflammatory markers in multinucleated giant cells and epithelioid cells in granulomas caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *Virchows Arch* 452, 449-456.
- Mäkinen, M. 2012. Näytteiden käsittely laboratoriossa. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 1127-1130.
- Mäkinen, M. & Stenbäck, F. 2012. Vasta-aineet. Teoksessa Mäkinen, M., Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, V-P., Paavonen, T. & Stenbäck, F. (toim.) Patologia. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 1135.
- Naukkarinen, A. & von Boguslawsky, K. 1998. Immunohistokemia. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino, 133-159.
- Onley, C. 2007. Antibodies for immunochemistry. Teoksessa Renshaw, S. (ed.) Immunohistochemistry. Oxfordshire: Scion Publishing Ltd, 3-31.
- Rantala, I., Naukkarinen, A. & Helin, H. 1998. Histologia. Teoksessa Rantala, I. & Lounatmaa, K. (toim.) Biologinen valomikroskopia. Helsinki: Yliopistopaino, 65-81.
- Renshaw, S. 2007. Immunochemical staining techniques. Teoksessa Renshaw, S. (ed.) Immunohistochemistry. Oxfordshire: Scion Publishing Ltd, 45-96.
- Rhodes, A. 2013. Fixation of tissues. Teoksessa Survana, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (ed.) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th edition. London: Elsevier Ltd, 69-93.
- Salmi, M. & Meri, S. 2011. Immuunijärjestelmän anatomia: solut ja kudokset. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 18-29.
- Seppälä, I.J.T. & Meri, S. 2011. Tulehdusreaktio. Teoksessa Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S. & Vaara, M. (toim.) Immunologia. Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim, 198-209.
- Sica, A. & Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation* 122 (3), 787-795.

Spencer, L.T. & Bancroft, J.T. 2013. Tissue processing. Teoksessa Survana, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (ed.) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th edition. London: Elsevier Ltd, 105-123.

Wild, G. 2013. Immunofluorescent techniques. Teoksessa Survana, S.K., Layton, C. & Bancroft, J.D. (ed.) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 7th edition. London: Elsevier Ltd, 427-434.

Willey, J.M., Sherwood, L.M. & Woolverton, C.J. 2009. Prescott's Principles of Microbiology. Boston: McGraw-Hill.

Zhu, X.W., Price, N.M., Gilman, R.H., Recarvarren, S. & Frieland, J.S. 2007. Multinucleate Giant Cells Release Functionally Unopposed Matrix Metalloproteinase-9 In Vitro and In Vivo. *The Journal of Infectious Diseases* 176, 1076-1079.

LIITTEET

Liite 1. Solunäytteiden keräys immunohistokemiallisiin värjäyksiin

1. Mediumien imeminen pois kuopilta.
2. 50 µl trypsin-EDTA:ta / kuoppa ja inkuboidaan +37°C:ssa 10 minuutin ajan.
3. Solujen irrotus pipetoimalla edestakaisin ja näytteiden siirto eppendorf-putkiin, kahden kuopan yhdistäminen yhdeksi näytteeksi.
4. Fuugaus 5000xg 10 minuutin ajan, supernatantin poisto.
5. Pelletin pesu suspensoimalla 1xPBS:ään (100 µl), fuugaus 5000xg 5 minuuttia, supernatantin poisto.
6. Pelletin suspensointi 1% BSA-PBS:ään (100 µL).
7. Näytteen pipetointi sytospin-kolonniin ja fuugaus 500 rpm 5 minuutin ajan.
8. Lasien kuivuminen, 10 minuuttia.
9. Kiinnitys tuoreella jääkylmällä asetonilla, 10 minuuttia.

Liite 2. Hematoksyliini-eosiini –värjäys

1. Näytteen deparafinoiminen ja kuljetus veteen:

- 2x5 min ksyleeni
- 2x5 min absoluuttinen EtOH
- 3 min 96% EtOH
- 3 min 70% EtOH
- 5 min juokseva vesijohtovesi
- 3 min Q-H₂O

2. Näytteen värjäys:

- 10 min Mayerin hematoksyliini
- 10 min juokseva vesijohtovesi
- 2 min Q-H₂O
- 2 min 0,5% eosiniliuos
- lasien huuhtelu Q-H₂O

3. Näytteen dehydratointi ja peittäminen:

- 3 min 70% EtOH
- 3 min 96% EtOH
- 2x3 min absoluuttinen EtOH
- 2x5 min ksyleeni
- peittäminen peitinaineella, peitinlasi päälle

Liite 3. Immunohistokemiassa ja histologiassa käytetyt reagenssit

Reagenssit	Valmistaja
Eosin Y disodium salt	Sigma-Aldrich
Etanoli	Altia Oyj
ImmPACT™ DAB Substrate	Vector Laboratories
Kloorivetyhappo (HCl)	Merck
Ksyleeni	Oy FF-Chemicals Ab
Kuparisulfaatti	Merck
Mayerin hematoksyliini	Sigma-Aldrich
Natriumkloridi	Merck
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	Sigma-Aldrich
Normal antibody Diluent	Immunologic BV
Pertex	Algol Diagnostics Oy
Poly-HRP-Anti-mouse/rabbit/rat IgG	Immunologic BV
Post-antibody blocking	Immunologic BV
Ternihera	Hi-Col Oy
Trisodium citrate (dihydrate)	Merck
Trizma® base	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Vetyperoksidi	Oy FF-chemicals Ab

Liite 4. Värjäysautomaatissa käytettävän pesupuskurin valmistusohje

10x TBS-0,5% Tween 20 kantaliuos:

- Punnitse 121,0 g Trizma base:a ja 400,0 g natriumkloridia.
- Liuota reagenssit n. 4,5 litraan milliQ-vettä.
- Säädä pH 7.6, (37% HCl).
- Täytä tilavuus viideksi litraksi milliQ-vedellä.
- Lisää 25 ml Tween 20 ja sekoita hyvin.

Kantaliuoksesta valmistetaan 1x pesupuskuri laimentamalla 1:10 milliQ-vedellä.

Liite 5. Antigeenin paljastusmenetelmien liuokset

50 mM Tris + 1 mM EDTA

- Punnitse 6,06 g Trizma base:a ja 372 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$:ta.
- Liuota milliQ-veteen ja säädä pH 9,0 (37% HCl).
- Täytä tilavuus 1 litraksi milliQ-vedellä.
- Säilytys huoneenlämmössä.

Natriumsitraattipuskuri (10 mM natriumsitraatti + 0,05 % Tween 20)

- Punnitse 2,94 g trisodiumsitraattia (dihydrate).
- Liuota milliQ-veteen ja säädä pH 6,0 (1N HCl).
- Täytä tilavuus 1 litraksi milliQ-vedellä.
- Lisää 0,5 ml Tween 20 ja sekoita hyvin.
- Pitkäaikaissäilytys +4°C.