

Enzim Histokimya ve Önemi

M. Aydın K ETANİ,¹ M. Erdem AKBALIK¹

¹ Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı- Diyarbakır

Özet

Enzimler biyolojik sistemlerin canlı komponentleridir. Birçok biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör olurlar ve doku içerisinde metabolik sürecin meydana gelmesi için gereklidirler. Enzim histokimya histolojik boyamalarda önemli bir yer tutmaktadır. Bu derlememizde dokularda çeşitli enzimlerin gösterilmesinde kullanılan boyalar ele alınmıştır.

Anahtar Kelimeler: Enzyme Histochemistry, enzimlerin korunması

Enzyme Histochemistry and Importance

Summary

Enzymes are living components of biological systems. Many would catalysts in biochemical reactions and are essential for the occurrence of the metabolic processes in tissues. Enzyme histochemistry, occupies an important place in histological staining. In this review show the dye used in a variety of tissue enzyme are taken manually .

Key Words: Enzyme Histochemistry, enzyme protection

GİRİŞ

1950 ve 1980 yılları arasında Enzim histokimya, histopatolojinin bir parçası olarak önem kazandı. 1953 yılında doku kesitlerinde enzim demonstrasyonu için mevcut 18 teknik vardı (Pearse, 1953). Şu an ise bu tablo 100'ü aşmıştır. Enzim demonstrasyonundaki bu artış enzim histokimyanın, histopatolojinin geniş alanlarındaki önemini yansıtmaktadır.

Enzimler biyolojik sistemlerin canlı komponentleridir. Birçok biyokimyasal reaksiyonlarda katalizör olurlar ve doku içerisinde metabolik sürecin meydana gelmesi için gereklidirler. Katalizörler süreç

inde tüketilip kendileri olmadan molekülleri reaktif durum içerisine getirerek aktivasyon (ilk hareket enerjisi gibi) enerjisini azaltır. Katalizörlerin karakteristiği olarak madde katalizlemenin niceliği ile ilgili tam katlama yoktur, enzimin sadece küçük bir konsantrasyonun etkili olması gereklidir.

Enzimler non-protein prostetik grup içeren yüksek moleküler ağırlıklı protein molekülleridir. Aktif protein (apoenzim) çeşitli iyonize grupları (örn. karboksil ve amino) içerir. Enzimler bağımsız olabilir ve spesifik hücre komponentlerine

(desmoenzim) bağlı veya vücut sıvılarına (lizoenzim) veya sitoplazma içinde çözülebilir biçimde bulunabilir. Memnun edici bir enzimatik reaksiyonu başarmak için kofaktörün varlığı gerekir. Bunlar sıklıkla metal iyonlardır, daha çok magnezyum, manganez (aktivatörler) ve koenzim olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve nükleotidler gibi bileşiklerdir.

Substratlarına özel bir ilgisi bulunan enzimler, bu madde grubuna etkirler. Histokimyasal metodlarla bu nedenden ötürü hücre veya doku düzeyinde gösterilirler. Bütün yöntemlerin esası, enzim molekülünün spesifik substratı (doğal veya sentetik) üzerindeki etkisinin ortaya konmasıdır. Enzimler substratlar üzerine etkilerine göre gruplara sınıflandırılırlar. Pratikte histokimyasal

demonstrasyon amacıyla çoğu teknik, hidrolitik ve oksidatif enzim içindir (1).

Metodlardan hangisi kullanılırsa kullanılsın örnek almada ilk adım, örneğin korunmasıdır. Ayrıca temel bir karar alınmalıdır. Doku frozen (dondurmak) mı yoksa fikse mi edilecek? Dokular -70 °C veya aşağısında dondurularak iyi korunur, enzim aktivitesinde çok az bir kayıp görülür ve dokular belirli bir süre saklanabilir. Korumak için diğer bir seçim ise fiksatif kullanmaktır ve fiksatifin seçimi takip eden metod tarafından tayin edilir. Kas biyopsi örneklerinde ATP-az metodları ile demonstrasyon sonuçlarını etkileyecek fiksasyon veya sonraki işlemler için koruma olarak dondurma kullanılır. Örneklerin çoğu laboratuvara geldiğinde fikse edilir. Birçok teknik için formaldehit esaslı fiksatifler kullanılmaktadır (2).

Şekil-1: Doku İşlemine Etkiler

→Oda sıcaklığında fiksasyon	Enzim aktivitesinde kayıp
→Çoğu fiksatifler	Proteinlerin denaturasyonu (fiksasyon süresi ve fiksatife bağlı), enzimlerin difüzyonu, bazı karbonhidratların kaybı
→Alkolde dehidratasyon (oda sıcaklığı)	Enzim aktivitesinde kayıp, enzimlerin genel difüzyonu, lipidlerin kaybı, suyun çekilmesi ve katılaşma
→Ksilen, kloroform, toluen vb. şeffaflaştırma	Enzim aktivitesinde kayıp, lipidlerin kaybı, dokuda (parlatma ajanına bağlı) katılaşma
→Parafin 56-60 °C	Enzim aktivitesinde kayıp, lipidlerin kaybı

Frozen (Dondurulmuş) Kesitler

Kriyostatın gelişimi son 30 yılda, acil dondurulmuş kesitler olarak meydana gelen kesitlerin kalitesindeki artışa olan ihtiyaç ve histokimyanın genişlemesinden dolayı şekillenmiştir. Kriyostatın kullanımı dondurulmuş dokunun kesilmesi anlamına gelmektedir. Dondurma mikrotomla karşılaştırıldığında daha kısa zamanda ve 2-3 µm aşağısı ince kesit almak olasıdır.

Prensip, parafin gömülmesi ile karşılaştırıldığında daha basittir. Doku içindeki su dondurulur ve buzun formu içinde dokunun donmuş blok'u meydana gelir. Buz, gömülme solüsyonu olarak rol oynar. Dondurulmuş blok'ların kıvamı 2 faktörden, parafin kesitlerde olduğu gibi dokuda bulunan suyun miktarı ile ve dokunun doğası ile etkilenir. Az su içeren

dokuların kesitleri düşük sıcaklıklarda, fazla buz kristallerinden dolayı fazla su içeren dokuların kesitleri ise yüksek sıcaklıklarda alınır. Doku blok'unda sıcaklık

ayarlanarak kriyostat içinde dondurulmuş blok'lardan kesit alınması sağlanır (2).

Şekil-2: Fikse Edilmeyen Dondurulmuş Dokunun Uygun Kesilme Sıcaklığı

• Beyin	-12°C
• Lenf nodu	-15°C
• Karaciğer	-16°C
• Böbrek	-16°C
• Dalak	-16°C
• Deri	-25°C
• Kas	-20°C
• Tiroid	-20°C
• Yağlı dokular	-30°C veya altında

Kendi doğası ne olursa olsun fikse edilen dokular en iyi -5 ve -10°C arasında kesilir (2).

Fikse Edilmeyen Dokuların Dondurulması

Genel olarak doku ne kadar hızlı dondurulursa mikroskop altında görüntüsü de o kadar iyi olur. Kas biyopsilerin dondurulmasında buz kristali artefaktlarından kaçınmak için sıvı nitrojenle süper dondurulmuş izopentan gibi bir solüsyon kullanmak zorunludur. Diğer dokular karbondioksit gazı ile dondurulabilir (2).

Fikse Edilen Dokuların Dondurulması

Dokunun su miktarı arttığından, dokunun bozulmasından kaçınmak için dokuyu yavaşça dondurmak önerilir. Dokunun belki de en iyi konumu kriyostat içinde olmasıdır ve bu şekilde donmasına izin verilir (2).

Dondurma Öncesi Fiksasyon

Birçok hidrolitik enzimin (alkalin ve asit fosfataz gibi) demonstrasyonu için dondurma ve kesit almadan önce kontrol fiksasyonu kullanmak daha iyidir. İlk fiksasyon olmadan reaksiyon ürününün difüzyonu şekillenir (2).

ENZİMLERİN KORUNMASI

Histokimyasal reaksiyonun oluşabilmesi için enzimlerin hücre veya dokuda aktivitelerinde kayıp olmadan veya

en az kayıpla hücre içeriğinin difüzyonunu engellemek gerekir. Bu amaçla da çeşitli tespit solüsyonları kullanılır. En çok

kullanılan 4°C’de formol-kalsiyum ve glutraldehit-aseton’dur. Bunu takiben dokular HOLT’un solüsyonunda 4°C’de 24 saat tutularak kriyostat ile kesit alınmasını kolaylaştırır ve bu sayede hem dokunun yapısı hem de enzim lokalizasyonu bozulmamış olur (1).

Enzimlerin doğası değişim eğiliminde olduğundan korumaları da bir problemdir. Enzimler dış etkilere çeşitli yollarla tepki verir; birçok oksidatif enzim içeren mitokondri, kan akımı kesildiğinde hızlıca yıkıma uğrar. Membran hasara uğrar ve enzim aktivitesinde kayıp şekillenir, histokimyasal tekniğin bu tipi için doku hazırlanması boşa harcanmış bir zaman olur. Hidrolitik enzimleri içeren lizozomlar, dondurmak ve doku blok’larının erimesi sonucu hasara uğrar; enzimler hasarlı organellerden diffüze olurlar. Büyük difüzyon artefaktlarının esas nedeni asit fosfatazların post fiksasyonlarında görülür. İnkübasyon öncesi dokunun dikkatli fiksasyonu ve sükröz işlemi difüzyonun gecikmesine yardımcı olur. Fiksatif enzime lokalize olur, enzimi dondurma ve çözülme etkilerinden korur. Çok az bir enzim kaybı meydana gelir fakat bu, fiksatifin 4°C’de kullanılmasıyla sağlanır.

Normal histolojik fiksasyon ile mitokondriyal enzimlerin çoğu uzaklaştırılır veya yok edilir fakat dondurma ve çözülme mitokondriyal membranda kopma yapmadığı için dondurma ve çözülmenin etkisi daha az duyarlıdır. Doku, oda sıcaklığında bırakıldığında enzim aktivitesinde kayıp şekillenir, bu yüzden enzim histokimya için dokunun hızlı bir şekilde işlem görmesi son derece önemlidir. Mitokondriyal enzimlerinin bazılarında neden olan hasar, polivinil piroolidon (PVP) gibi hipertonic koruma aracı ile sakınılabılır, şu an sükröz kullanılıyor. Farklı enzimler hasar veren ajanlarla çeşitli

derecelerde tepkime verir. Bunlardan bazıları diğer hasar verenlere nazaran daha dirençlidir. Alkalın fosfataz asit fosfataza oranla fiksasyonun etkisine dayanabilir. Fiksasyonun olup olmayacağı hidrolitik enzimlerin uygulanmasındaki seçimde, bazı enzimlerde kayıp şekillenebilir fakat iyi bir lokalizasyon istenir; enzimin difüzyonu göz önüne alınarak enzim aktivitesinin az veya hiç kaybı ile fiksasyonun olmaması veya post fiksasyon tercih edilebilir. Dehidrojenazlar bir koruma solüsyonunun kullanılıp kullanılmamasındaki seçim ile fikse edilmeyen kesitlerde demonstre edilebilir (2).

Enzim histokimyanın gelişimi süresince hücrelerin değerlendirilmesi ve sitokimyasal kimlik için frotilerin kullanımı rapor edilmiştir. Doku hücre süspansiyonları, kemikiliği ve kan çeşitli yollarla hazırlanan frotilerde demonstre edilebilir. En çok kullanılan 3 enzim non-spesifik esteraz, asit fosfataz ve klor asetat esteraz’dır. Enzim lokalizasyonu ve hücre yapısının korunması histokimyasal boyama öncesi fiksasyon ile mümkündür. Popüler olan farklı formalin ile birlikte çeşitli fiksatifler kullanılır. Asit fosfataz ve non-spesifik esterazın demonstrasyonu için ya paraformaldehit ya da glutraldehit solüsyonu kullanılır fakat en çok tercih edilen 4°C’de formol-kalsiyum’dur.

Doku imprintlerinin hazırlanmasındaki teknik basit, hızlıdır ve doğru bir şekilde tatbik edilirse değerli diagnostik bilgi sağlar. Taze doku kesilir ve aşırı basınçla hücrelerin şeklini bozmaktan kaçınarak temiz lam’a değdirilecek düzgün yüzeye kibarca dokunulur. Lamlar hızlı bir şekilde havada kurutulur ve boyama acilen gerekmiyorsa -70 °C’de fikse edilmeden saklanır (1).

ENZİM AKTİVİTESİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Sıcaklık: Enzim reaksiyonlarının büyük çoğunluğu için optimal sıcaklık 37°C’dir. Enzimler yüksek sıcaklıklarda protein içeriklerinden dolayı hızlı bir şekilde denatüre olurlar. Histokimya için 4 ve 30°C arasındaki düşük sıcaklıklar enzim reaksiyonun yavaş şekilleneceği

oranda faydalı biçimde kullanılabilir ve enzimin aktivasyonu iyi bir lokalizasyon ile demonstre edilebilir.

pH: Enzimlerin büyük çoğunluğu reaksiyon oranının optimal olduğu bir pH'a sahiptir. Enzimlerin birçoğu için pH 7.0-7.2'dir. Bu kuralın dışında alkalın fosfataz pH 9.2'de ve asit fosfataz pH 5.0'da etkilidir.

Inhibitörler: Kesitlerdeki enzim aktivitesi inhibitörler olarak bilinen kimyasal maddeler kullanılarak yok edilebilir. İnhibitörlerin 3 esas tipi vardır:

1. Spesifik inhibitörler, örneğin kolinesterazlar için eserin
2. Nonspesifik inhibitörler, örneğin tüm enzimler için sıcaklık
3. Rekabet eden inhibitörler, örneğin aktif enzim bölgesi için substrat ile yarışan kimyasallar

Spesifik inhibitör, enzim molekülünün reaktif bölgesini etkiler. Nonspesifik inhibitör, enzim proteini denatüre ederek enzim reaksiyonunu yok eder. Rekabet eden inhibitörler ise aktif enzim bölgesi için substrat ile yarışan eserin gibi kimyasallardır.

Aktivatörler: Bunlar enzim aktivitesini desteklemek için kullanılan kimyasallardır. Örneğin magnezyum iyonları, alkalın fosfataz için Gomori'nin metal presipitasyon tekniğinde kullanılır (2).

ENZİM TÜRLERİ

Oksidoredüktazlar

Enzim histokimyanın geniş ve önemli grubudur. Bu enzimler oksidaz ve dehidrojenaz olarak bilinir ve çoğu kez oksidatif enzimler olarak söz edilir. Bu sınıfta yer alanlar;

- Oksidazlar: Oksijenin varlığıyla substratın oksitlenmesini katalize eder.
- Peroksidazlar: Hidrojen peroksit ile birleşmiş hidrojeni uzaklaştırarak substratın oksitlenmesini katalize eder.
- Dehidrojenazlar: Hidrojeni uzaklaştırarak substratın oksitlenmesini katalize eder.
- Diyaforazlar: Hidrojeni uzaklaştırarak NADH ve NADPH'ın oksitlenmesini katalize eder.

Diğer Önemli Gruplar

Transferazlar

Bu enzimler su kaybı veya alımı olmadan iki bileşiğin radikallerinin transferini katalize eder.

Hidrolazlar

Çoğu durumlarda bazı örnek suların uzaklaştırılabilmesine rağmen spesifik substrat ilişkileri içerisinde kendi elementleri veya suyun girişini katalize eder. Hidrolaz esterazları, lipazları, fosfatazları, peptidazları, glikosidazları ve pirofosfatazları içerir ve enzim histokimyanın önemli bir grubunu şekillendirir.

Lizazlar

Bu enzim hidrolizden başka mekanizma ile substratlardan grupları uzaklaştırarak katalize eder. Bu süreç ikili karbon ilişkisinin oluşmasıyla sonuçlanır. Bir üst sınıf dekarboksilazdır.

Enzimlerin üst sınıflaması biyokimyasaldır ve histokimyadaki durum ise daha az hassastır.

Enzimlerin adlandırılması başlangıçta karışık ve gelişigüzel. Bu vesileyle iki veya daha çok isim farklı araştırmacılar tarafından aynı enzim için kullanılmış ya da aksine aynı isim iki veya daha çok enzim için kullanılmış. 1898'te Duclaux, enzimlerin son ekine 'az' eklenerek substrat üzerine etkidikten sonra isimlendirilmesini önerdi. Örneğin sükras terimi sükroz üzerine etkileyen enzimi gösterir. Daha sonra sadece substratın değil aynı zamanda reaksiyonun şeklinin isim gerekliliği şekillendi (örn. kolinesteraz). Bundan başka tanımlama iki enzimin benzer reaksiyonu katalizlemesi arasındaki farkın gerekliliği için kanıtlandı fakat farklı durumlar altında örneğin asit fosfataz ve alkalın fosfataz (1).

HİSTOKİMYASAL REAKSİYONLARININ ÇEŞİTLERİ

Pearse (1968) enzimlerin demonstrasyonu için 4 çeşit histokimyasal reaksiyonun mevcut olduğunu bildirdi. Bunlar;

1. Eşzamanlı yakalama (eşlenme, dönüşüm ve şelasyon)
2. Post-inkübasyon eşlenme (dönüşüm ve şelasyon)
3. Renkli substrat (Çözülebilir değişim)
4. Molekül içi yeniden düzenleme

Eşzamanlı Yakalama: Enzimlerin demonstrasyonu için mevcut tekniklerin en önemlisidir. Renk reaksiyonu substrat parçalanmasıyla eşzamanlı ortaya çıkar. Prensipte olarak Gomori'nin metal presipitasyon teknikleri ve azo boya

metodları kullanılır. Eşzamanlı yakalama prensibi, hidrolitik enzimler için azo boya metodlarının içeriği göz önünde bulundurulduğunda diazonyum tuzu ve uygun bir substratın kullanımını gerektirir. Eşlenme olayı, ilk reaksiyon ürünü (PRP)

olarak bilinen substrat ve enzim arasındaki reaksiyon tarafından oluşturulur. İlk reaksiyon ürünü daha sonra son reaksiyon ürünü (FRP) meydana getirmek için diazonyum tuzu ile birleşir. Bu normal olarak renkli çözelti şeklinde görülür. Bu

- a. Substratın hidroliz oranı
- b. PRP'nin tampon solüsyonuna diffüze olma katsayısı
- c. PRP'nin diazonyum tuzu ile eşlenme oranı

Bu faktörler, diazonyum tuzunun ve kullanılan substratın değişmesiyle enzimin lokalizasyon gelişimi için manipüle edilebilir. Substratın türü, tüm hidroliz oranını etkileyen eşlenme oranı ve diazonyum tuzu seçimi enzimin substrat etkileme hızını belirler. Substrat su içinde çözülebilmeli veya enzim tarafından maksimum hidrolize izin vererek tampon solüsyonunda kullanılabilir. Eğer çözülebilir substratın konsantrasyonu çok yüksek olursa substratın hidroliz oranını inhibe etmesi meydana gelir. Tampon solüsyon enzimin maksimum aktiviteyi göstereceği pH'a sahip olmalı ve substrat makul çözünebilirlik göstermelidir. Reaksiyonun bu şekli için inkübasyon solüsyonunda renk veren son reaksiyon ürününün üretimi için diazonyum tuzu gerekir. Her diazonyum tuzu bunun yanında en randımanlı eşlenme oranı için optimal pH'a sahip olmalıdır. Bunun anlamı asit fosfataz reaksiyonu için bir diazonyum tuzu

Post-inkübasyon Eşlenme: Metodun bu çeşidinde substrat diazonyum tuzu ile aynı zamanda ortama katılmaz. Enzim ilk reaksiyon ürünü oluşumunda tanımlanan tavır içinde substratı hidrolize eder. İlk reaksiyon ürünü yeterli şekilde çözünmez ve ilk inkübasyon süresi için üretim yerinde kalır ve daha sonraki reaksiyonlar için ayrılmış solüsyonun yürütüleceği son reaksiyon ürünü oluşturur. Bazı durumlarda metodun bu avantajı sudan oluşan solüsyon içinde olduğundan çoğu diazonyum tuzları yavaşça ayrıştığı için ilk uzun inkübasyon aşaması gereklidir.

metod türünde temel problem, meydana gelebilen ilk reaksiyon ürününün difüzyonudur. Pearse'e (1968) göre bu difüzyon 3 faktör ile ilişkilidir;

asit pH seviyesinde bağlantı kurarken, bir alkalın fosfataz için ise örneğin Fast Red TR gibi pH 9.4'te bağlantısı gereklidir. Diazonyum tuzlarının aşırı miktarlarının birikimi, son reaksiyon ürünü oluşum oranını etkileyeceği için aynen eşlenmede uygun pH aralığının olması gerektiği gibi kullanılmalıdır. Pratikte Pearse (1960) tarafından önerilen 1 mg başına 1 cm³ inkübasyon solüsyonu memnun edici sonuçlar verir.

Eşzamanlı eşlenme prensibi bunun yanında enzimin substrat üzerine etkisinin olduğu metal presipitasyon tekniklerini kapsar. Örneğin sodyum β-gliserofosfat ilk reaksiyon ürününün olduğu fosfat iyonlarını serbest bırakır. Bu ilk reaksiyon ürünü çözünmez ve gözle görülür son reaksiyon ürünü üretilene kadar metal iyonlar tarafından muamele edilir. Substratın yoğunluğu ve pH reaksiyon sonucu üzerinde etkilidir.

Bundan başka avantajı ise enzim aktivitesi için optimal pH seviyesi ilk inkübasyon içinde kullanılabilir ve eşlenme için farklı optimal pH reaksiyonun ikinci aşamasında ayrılarak kullanılır. Gerçekte reaksiyonun bu şeklinin dezavantajı ise ilk reaksiyon ürünü hemen hemen tüm örneklerde geniş kapsamda çözülebilir, sonuç olarak diazonyum tuzuna uygun eşlenme uygulanmadan önce ilk reaksiyon ürünü bazı difüzyonlar meydana gelir.

Renkli Substrat: Reaksiyonun bu çeşidi sadece ara sıra kullanılır. Renkli substrat kullanımını içerir ve bunun yanında çözülebilir. Hidroliz süresince enzim renk etkisi olmadan çözülebilir gruplaşmayı uzaklaştırır. Bu örnekte üretilen ilk reaksiyon ürünü hem renkli hem de çözülmeyendir ve bundan başka eşlenme aşaması diazonyum tuzu ile birlikte gereksizdir. Sadece sınırlı sayıda çözülebilen gruplar enzime duyarlıdır ve metodun kullanımı bu yüzden sınırlıdır.

Diazonyum Tuzları

Bu tuzlar tetrazolyum tuzları ile yakından ilişkilidir. Diazonyum tuzları, yüksek renkli ve çözülmeyen reaksiyon üretimini oluşturmak için ilk reaksiyon ürünüyle tepkimeye girer. Tuzlar çoğunlukla renksizdirler, çok azı renklidir, örneğin pararosanın ve fast garnet GBC. Enzimatik olarak naftoller serbestleyen veya bileşiklerle ilişkili (diazonyum tuzları ile eşlendiğinde) kromofor azo grup gözle görülen renkli bir reaksiyon oluşturur. Diazonyum tuzlarının çözülebilirliği özellikle alkalın pH'da sınırlıdır (1).

KONTROL KULLANIMI

Kontroller enzim histokimyanın gerekli bir kısmıdır. Substratlar, diazonyum tuzları ve diğer kimyasal solüsyonların kullanımı zamanla bozulur, metodun olası başarısızlığına yol açar, bazen yanlış pozitifler üretebilir. Tüm kimyasal solüsyonların çalıştığını gösteren test kesitlerinin inkübasyonu esnasında pozitif kontrolün inkübasyonu da yapılmalıdır.

İnkübasyon solüsyonuna substratın katılmaması ve eğer mevcutsa spesifik enzim inhibitörlerini dahil etme yeterli kontrol önlemlerini olumlu yönde etkiler. Bundan başka gerekli kontrolleri sayarsak rekabet edici inhibitörler inkübasyon solüsyonlarına eklenebilir. Bunun yanında

Molekül İçi Yeniden Düzenleme:

Tekniğin bu çeşidi renkli, çözünmeyen reaksiyon üretimi vermek için moleküler düzenlemeye uğrayıp hidrolizden sonra çözülebilir substrat kullanır (1).

kesitler birkaç dakikalığına kaynamış suya daldırılarak işlemde geçirilebilir ve bundan sonraki aşamalar takip edilerek metod dinlendirilir veya distile su içinde inkübasyon sağlanarak negatif kontrol kesitleri hazırlanabilir. Her durumda reaksiyon üretimi gösterir ki güvenilir teknikler kullanılmasıyla enzimin katkısı hakkında pozitif sonuçlar elde edilir. Kontrol kesitler negatif sonuçlar veriyorsa non-spesifik zemin boyama olası hata kaynağı olarak dışarı çıkarılır. Kontrol kesitlerde herhangi bir aktivite, yanlış sonuç olarak değerlendirilmelidir (1).

HİDROLİTİK ENZİMLER

Fosfatazlar

Bunlar organik fosfat esterlerini hidroliz etmeye yetenekli enzimlerdir. Kendi optimal pH seviyelerine göre sınıflandırılırlar. pH 9.0'da maksimum

aktivite gösterenler alkalın fosfatazlar , pH 5.0'da maksimum aktivite gösterenler ise asit fosfatazlar diye isimlendirilir. Bu enzimlerin çoğu non-spesiftir. Bunlar

geniş ölçüde organik fosfat esterlerinin hidrolizini katalize ederler, fakat çok az enzim sadece spesifik substrat üzerine etkir. Örneğin glukoz-6-fosfataz pH 6.5'te glukoz-6-fosfat'ı defosforile etmeye yeteneklidir. Bu enzim asit pH'da tepkimesine rağmen bir spesifik fosfat olarak göz önünde bulundurulmalıdır. Fosfatazlar bu yüzden alkalın, asit ve spesifik fosfatazlar olarak 3 gruba ayrılır (1).

1. Alkalın Fosfatazlar

Bu enzimler böbrekte ve diğer birçok dokuda hücre membranı içinde lokalize olmuştur (1). Alkalın fosfataz aktivitesi sitokimyasal olarak olgun nötrofillerin sitoplazmasında demonstrasyonu yapılabilir. Reaksiyon parçalı çekirdekli hücrelerde gözlenir. Bunun yanında kemikiliği stromasındaki retikulum enzim

hücrelerinde de gözlenebilir (3). Alkalın fosfataz demonstrasyonu için teknik şöyledir (1);

Metale presipitasyon: Bu teknik enzimin fosfat iyonlarını üretmek için substratı (sodyum β gliserofosfat) hidrolize eden eşzamanlı eşlenme reaksiyonudur. Kalsiyum fosfatı oluşturmak için kalsiyum iyonlarıyla birlikte ilk reaksiyon ürünü tepkimeye girer ve kobalt fosfatın çökmesini meydana getirmek için kobalt nitratla muamele edilir. Bu reaksiyon oluşumu ışık mikroskopunda görünmez ve bu işlem, kobalt sülfidin gözle görünür siyah çökmesini meydana getirmek için sulandırılmış amonyum sülfite ihtiyaç duyar. Bu olayın ideal koşullar altında taneli çökelti olarak görülmesi gerekir. Plan akışı aşağıda olduğu gibidir;

Sodyum β gliserofosfat (substrat) =====> fosfat iyonları (PRP) (gözle görünmeyen)

Fosfat iyonları + Kalsiyum iyonları =====> kalsiyum fosfat (gözle görünmeyen)

Kalsiyum fosfat + Kobalt iyonları =====> kobalt fosfat (gözle görünmeyen)

Kobalt fosfat + Sülfid iyonları =====> kobalt sülfid (çözünmeyen, gözle görülen)

Azo boya metodu: Eşzamanlı eşlenme reaksiyonudur. Reaksiyonun bu türü diazonyum tuzunun kullanımını gerektirir. Bu tuzlar, substrat üzerine enzimin etkisi ile üretilen gözle görünür reaksiyon ürününe lokalize olmayı sağlar. 2 tip substrat kullanılır; 1. tip basit organik fosfattır (örneğin sodyum α naftil fosfat); ilk reaksiyon ürünü, çok az çözünmeyen substrat tipinin enzim hidrolizi ile oluşturulur fakat bazı difüzyonlar şekillenir. 2. tip substrat ise naftol gruplarının (örneğin naftol AS-BI fosfat) yerine geçen fosfatlardır. İlk reaksiyon ürünü, oldukça çözünmeyen substrat tipinin enzim hidrolizi ile oluşturulur ve ilk reaksiyon ürününün difüzyonu minimaldir bu yüzden son reaksiyon ürününde daha iyi lokalizasyon elde edilir. Substrat olarak naftollerin yerine geçenlerin kullanılmasındaki dezavantaj yüksek maliyetli olmalarıdır.

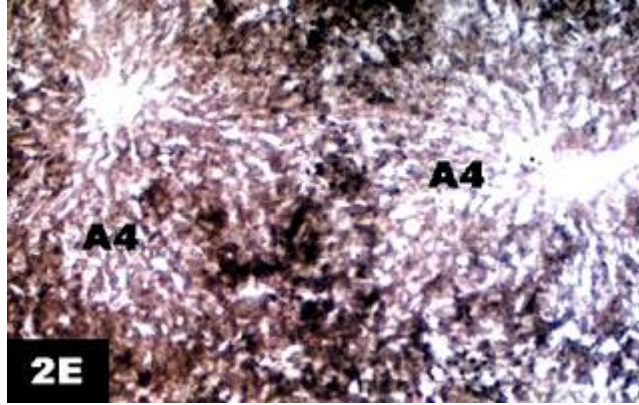
a) **Basit naftol kullanımı:** Bu substratların hidrolizi α naftol üretir. İlk reaksiyon ürünü uygun diazonyum tuzu (örneğin fast red TR) ile birleştirilir.

Alkaline fosfataz- α naftil fosfat kullanarak Azo boya eşlenme metodu; Sonuç olarak alkaline fosfataz aktivitesi kırmızımsı kahverengi ve çekirdek yeşil gözlenir. Bu arada inkübasyon solüsyonunun final pH'ı yaklaşık 9.2 olmalıdır. Eğer parafin kesit kullanılıyorsa inkübasyon zamanı uzamaya gereksinim duyar.

b) **Naftol yerine geçenlerin kullanımı:** Bu substratları kullanarak reaksiyondaki temel prensip, basit organik fosfatazları içerenlerle aynıdır. Histokimyasal teknikler için ticari olarak hazırlanan yerine geçen substratlar, kompleks karışımlardır. Bunlar diğer substratlara oranla su

içinde daha fazla çözünmezler. Çözücü içinde çözülmeye ihtiyaç duyulur. Substratın hidrolizi çözünmeyen naftol türevlerini üretir.

Alkaline fosfataz- naftol AS-BI metod; Sonuç olarak alkaline fosfataz aktivitesi kırmızı ve çekirdek yeşil gözlenir. Bu yöntem, enzimin lokalizasyonunun etkili olmasında güvenilir bir metodtur. Bu teknikte izlenecek 2 önemli nokta vardır. a) Molar sodyum karbonat eklenir. Hızlı bir şekilde pH değişir ve solüsyonun çok fazla alkalın olmaması için dikkat edilir. b) Reaksiyon hızlıdır. İnkübasyon solüsyonunda çok kalmamasına dikkat edilmelidir (1).



- Resim-1: İki komşu hepatik lobun A4 alanındaki zayıf alkalın fosfataz aktivitesi (www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022006000400020&tlng=&lng=en&nrm=iso)

2. Asit Fosfatazlar

Asit fosfataz aktivitesi genellikle naftolik substratlar kullanıldığında ortaya çıkabilir. Reaksiyon, sitoplazmada düzensiz granüller ve bazen de çubuk şeklindedir. Monositlerde ise boyanma tarzı belirgin bir granülasyonla birlikte diffüz, pembemsi sitoplazma boyanma tarzındadır (5).

Asit fosfataz demonstrasyonu için teknik şöyledir (1);

Metal presipitasyon: Bu metotta pH 5.0'da tampon solüsyonu içinde substrat olarak Sodyum β -gliserofosfat kullanılır. Substratın hidrolizi ilk reaksiyon ürünü olarak fosfat iyonlarını üretir. Fosfat çökeltmesini oluşturmak için iyonlarla birlikte muamele edilir. Bu çökeltme ışık mikroskopunda görülmez, bu yüzden enzim aktivitesinin olduğu yerde gözle görülür çökeltmeyi oluşturmak için işlemin amonyum sülfitle muamelesi gereklidir.

Sonuç olarak asit fosfataz aktivitesi siyah, çekirdek yeşil veya kırmızı görünmektedir.

Azo boya metodu

a) **Basit naftol kullanımı:** Enzim α naftol üreterek substratı hidrolize eder. İlk reaksiyon ürünü, enzim aktivitesinin olduğu yerde kırmızı çözünmez Azo boya son reaksiyonu ürününü veren uygun diazonyum tuzu (örneğin fast red GBC) ile birleştirilir.

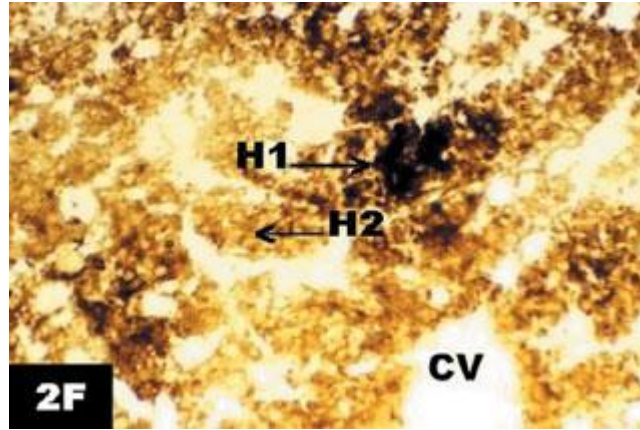
Asit fosfataz- Azo boya eşlenme metodu; Sonuç olarak asit fosfataz aktivitesi kırmızı ve çekirdek yeşil gözlenir.

b) Naftol yerine geçenlerin kullanımı: Bu metodta substrat olarak naftol AS-BI fosfatı kullanılır. İlk reaksiyon ürünü oldukça çözünmez ve substrat enzim hidrolizi ile oluşturulur. Barka (1960) en uygun diazonyum tuzu olarak heksagonyum pararosanilin'in kullanımını tavsiye etmiştir. Diazonyum tuzunun hazırlanması zaman alır fakat son reaksiyon ürününün en iyi lokalizasyonu için avantajdır.

Asit fosfataz- naftol AS-BI fosfat metod; Sonuç olarak asit fosfataz aktivitesi kırmızı ve çekirdek yeşil gözlenir (1).

Yapılan çalışmada asit fosfataz demonstrasyonu için kriyostat kesitlerinde en uygun tespit solüsyonunun formol-kalsiyum olduğu ve sürenin 4-5 °C'de 24-36 saat olması gerektiği ortaya konmuştur. Tespit edilmemiş kriyostat kesitlerinde asit fosfatazın yapısal bağları hızlı bir biçimde bozulduğu için aktivitenin ortadan kalktığı görülmüştür (6).

Asit fosfataz aktivitesi birçok hücrenin lizozomunda bulunurken özellikle makrofajlar çok güçlü asit fosfataz pozitivitesi gösterir (7).



- Resim-2: H1'in (hepatosit) güçlü asit fosfataz aktivitesine karşılık H2'nin zayıf asit fosfataz aktivitesi (Gomori'nin metodu)

www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022006000400020&tlng=&lng=en&nrm=iso

3. Spesifik Fosfatazların Demonstrasyon Metodları

5'Nükleotidaz

Bu, metal presipitasyon tekniğidir. Substrat Adenozin-5-fosfattır. Enzim substrat üzerinde rol oynar ve aktivatör olarak magnezyum iyonlarının önünde fosfat iyonları oluşturulur. Fosfat oluşturmak için inkübasyon solüsyonunda bulunan iyonlarla çöktürme sağlanır. Amonyum sülfid, enzim aktivitesinin olduğu yerde kahverengi çökme olarak görünen fosfatı, sülfide dönüştürmek için kullanılır. Bu metod pH 7.5'te yürütülür ve bunun yanında non-spesifik alkalın fosfataz aktivitesi de gösterilebilir. Sonuç olarak aktivite siyahımsı-kahverengi gözlenir (1).

Glukoz-6-fosfataz

Bu, metal presipitasyon tekniğidir. Metodun birçok varyasyonu vardır ve birini Meisel ve Wachstein (1956) vermiştir. Enzim, fosfatın çökmesini oluşturmak için iyonlarda bulunan glukoz-6-fosfatı hidrolize eder. Daha sonra amonyum sülfidin sulandırılmasıyla sülfidin çökmesi dönüştürülür. Kontrol kesitler bu teknikle demonstre edilebilen hem asit hem de alkalın fosfataz için kullanılabilir. Glukoz-6-fosfataz hassas bir enzim olduğu için fiksasyon süresince yıkılabilir, fikse edilmeyen kesitler kullanılabilir ve kesitler inkübasyon sonrası fikse edilebilir. Sonuç olarak aktivite kahverengimsi-siyah gözlenir (1).

Adenozin trifosfataz (ATP-az)

ATP-az reaksiyonu metal presipitasyon tekniğidir. Enzim, fosfatın çökmesini oluşturmak için iyonlarla birleşen serbest kalan fosfat iyonlarını ile substrat adenozin trifosfattan fosfatı oluşturur. Amonyum sülfidin sulandırılması ile sülfidin dönüştürülmesi sağlanır. Bu, enzim aktivitesinin olduğu çökme koyu kahverengi veya siyah gözlenir. Adenozin trifosfataz, Gomori'nin tanımladığı alkalın fosfataz ile ilişkili kalsiyum-kobalt metoduna benzer metal presipitasyon tekniği ile demonstre edilebilir. Bu metod iskelet kas biyopsileri için seçilen bir tekniktir (1).

ESTERAZLAR

Bunlar karboksilik asidi hidrolize etme yeteneğine sahiptir. Karboksilik asidi hidrolize etme yeteneğine sahip dikkate değer sayıda enzim vardır ve bunlardan bazıları histokimyasal olarak demonstre edilebilir. Enzimlerin çoğu 5.0 ve 9.0 arasında optimal pH'ya sahiptir. Her enzim birçok farklı substratı ve birçok farklı enzim aynı substratı hidrolize etme yeteneğindedir.

Esteraz enzimlerin büyük çoğunluğu substrat olarak α naftil asetatı hidrolize edebilir ki bu enzimlere non-spesifik esterazlar adı verilir. Bu grup, spesifik inhibitörlerin etkisi ile ve substrat üzerine enzimlerin spesifik etkisi ile alt gruba ayrılabilir. Bunun yanında spesifik esterazların büyük çoğunluğu basit bir ester olan α naftil asetatı hidrolize edebilme yeteneğine sahiptir. Non-spesifik esterazlar 3 gruba ayrılır.

a. Karboksilesterazlar

b. Arilesterazlar

c. Asetilesterazlar

Spesifik esterazlar ise şu şekilde alt gruba ayrılırlar;

a. Asetilkolinesterazlar

b. Kolinesterazlar

c. Lipazlar

Non-spesifik esterazların sınıflandırılması enzimin hidrolize edeceği en uygun substrata dayanarak yukarıda verilmiştir. Bu sınıflandırma bunun yanında organofosfat inhibitörlerin etkisi dikkate alındığında non-spesifik esterazlar için aşağıdaki terminolojinin kullanılması gündeme gelmiştir.

- A-esterazlar (arilesterazlar)
- B-esterazlar (karboksilesterazlar)
- C-esterazlar (asetilesterazlar) (1)

İnhibitörlerin Kullanımı: Farklı esteraz enzimlerini ayırmak için inhibe edicilerin kullanımı gereklidir. Kendi kullanımları spesifik enzimlerin doğru tanımlanmalarına izin verir. Çok kullanılan inhibe ediciler dietil-p-nitrofenil fosfat (E600) içeren organo-fosfatlar, di-izopropil floro-fosfat (DFP) ve p-kloromerküribenzoat'ın kullanıldığı bazı aromatik civalı bileşiklerdir (1).

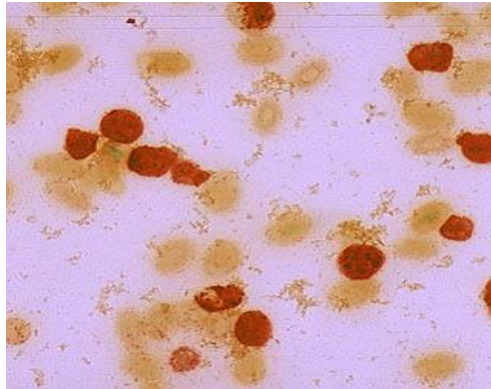
Non-spesifik Esterazların Demonstrasyonu İçin Metodlar

Esterazların demonstrasyonu için kullanılan substratlar bir çok enzim tarafından hidrolize edilebilir, bu yüzden uygun kontroller ve inhibitörler kullanılmalıdır.

Non-spesifik esteraz → α naftil asetat metodu: Bu metod substrat olarak α naftil asetat'ı kullanır. Enzim substratın hidrolizi süresince α naftol'ü serbestler. α naftol daha sonra enzim aktivitesinin olduğu çözünmez azo boyasını oluşturmak için uygun bir diazonyum tuzu ile eşlenir. Gomori, diazonyum tuzu olarak fast blue 'B' kullandı. Bu tuz enzimin en iyi

lokalizasyonunu veren hekzazotize pararosanilin'in yerini aldı. Sonuç olarak esteraz aktivitesi kırmızımsı kahverengi, çekirdek yeşil gözlenir.

Non-spesifik esteraz → indoksil asetat metodu: Alternatif metod olarak indoksil asetat tekniği kullanılabilir. Enzim bromo-indoksil'i oluşturmak için bromo-indoksil asetatı hidrolize eder. Daha sonra çözünmeyen azo boyası için okside edilir. Sonuç olarak esteraz aktivitesi mavi, çekirdek kırmızı gözlenir (1).



■ Resim-3: Monositlerin güçlü alfa naftil asetat (nonspesifik) esteraz aktivitesi (www.vet.uga.edu/vpp/ivcvm/1999/fontenot/index.php)

Spesifik Esterazların Demonstrasyonu İçin Metodlar

Lipaz

Bu terim, özellikle doymuş yağ asitlerini içeren uzun ester zincirlerinin hidrolize etmeye yetenekli bir grup enzim için kullanılır. Bu enzim esasen pankreasta ve daha az olarak da böbreküstü bezinde ve karaciğerde bulunur. Lipazlar non-spesifik esterazlarla birlikte aynı substratı hidroliz etmeye yetenekli olduklarından demonstrasyonları benzerdir. Lipaz metodunda yağ asitlerini üretmek için enzimin Tween 60 substratını hidrolize etmesine güvenilir. Yağ asitleri, aktivitenin olduğu yerde sülfid birikimlerinin gözle görünür koyu kahverengiden siyaha dönüşmesini sağlamak için, finalde amonyum sülfitle ve iyonlarla muamele edilen çözünmez kalsiyum sabunlarını oluşturmak için kalsiyum iyonlarıyla kombine edilir. Sonuç olarak lipaz aktivitesi sarıdan kahverengi siyaha, çekirdek ise kırmızı gözlenir. Bu arada parafin kesitler Gomori'ye göre asetonla fiksle edilmelidir. Formalin fiksli frozen kesitler iyi çalışır. Pankreas en önemli kontrol dokusudur (1).

Kolinesteraz

Spesifik esterazların en önemlisi kolinesterazlardır. İki enzim asetilkolinesteraz (gerçek) ve psödokolinesteraz demontre edilebilir. Esasen sinir sistemi ve kasta bulunan asetilkolinesterazlar, asetil tiyokolini hidrolize eder. Psödokolinesterazlar, asetil esterlerinden olan asetilkolinesterazlar'dan daha hızlı bir şekilde kolin esterlerini hidrolize ederler. Eğer iki enzimin gerekliliği arasında fark olacaksa eş kesitler ve iki substrat gerekli olur; asetil ve bütiriltiyokolini iyodin (1).

Asetilkolinesteraz ve psödokolinesterazlar için standart metodların patolojik uygulamaları sayıca sınırlandırılmıştır. Gliyal hücreleri ve özellikle fibröz astrositlerin kuvvetli bir oranda psödokolinesterazlar içerdikleri rapor edilmiştir. Asetilkolinesterazların standart histokimyasal metodları duyarlı, spesifik ve güvenilirdir ve bunların nöropatolojik sorunlar için uygulanması sonrası yararlı sonuçlar elde edilmiştir (4).

Sonuç olarak asetilkolinesteraz içeren sinir lifleri ve hücreleri koyu kahverengiden siyaha boyanır (1).

β glukuronidaz

Bu enzim, böbreğin kıvrımlı proksimal tübüllerinde, endometriyal epitelyumda ve diğer epitelyal dokularda bulunur. Tek bir enzim değildir fakat

glukuronidaz'ın geniş bir sınıfıyla bağlantılı β glikozit için spesifik bir grup enzimidir. β glukuronidaz'ın başlıca lokalizasyonu lizozomların içerisine olduğu hesaba katılmalıdır (1).

Birçok glikozidaz metodları arasında patolojik sorunları çözmede en çok uygulanan β-glukuronidaz'dır. β-glukuronidaz faaliyetinin demonstrasyonu epitel ve mezodermal farklılığın ortaya çıkarılmasında kullanılabilir (4).

Demonstrasyon için metod: β glukuronidazlar'ın demonstrasyonları için mevcut birçok metod vardır. Burada verilen metod substrat olarak naftol glukuronit'in (naftol AS-BI glukuronit) yerine geçenini kullanılmasıyla şekillenen eşzamanlı eşlenme metodudur. İlk reaksiyon ürünü, heksazotize pararosanilin ile eşlenir.

β glukuronidaz: naftol AS-BI metod

Sonuç olarak glukuronidaz aktivitesi kırmızı, çekirdek ise yeşil gözlenir (1).

Lösin Aminopeptidaz (LAP)

Bu metod güvenilir ve icra edilmesi kolay metal şelasyon tekniğidir. Substrat üzerine enzimin etkisi azo boyası oluşturarak diazonyum tuzu Fast blue B ile

eşlenen β naftilamin üretir, daha sonra bakır iyonlarıyla şelasyona uğrattılır. Sonuç olarak LAP aktivitesi kırmızı, çekirdek ise yeşil gözlenir (1).

OKSİDATİF ENZİMLER

Bu enzimler, enzim aktivitesinin olduğu çözünmez formazan birikimleri veren bir tetrazolyum tuzunun sonuç redüksiyonu ve substratın oksidasyonunu içeren eşzamanlı eşlenme metoduyla demonstre edilir. Oksidasyon iki yolla meydana gelir. Birincisi, birçok enzim atmosferik oksijen ve substrat arasında reaksiyonu katalize eder ki bunlara oksidazlar denir. İkinci grup substrattan hidrojeni uzaklaştırır ve bunu hidrojen akseptör (alıcı) yolu boyunca transfer eder ki bu enzimler dehidrojenazları içerir (1).

Tetrazolyum Tuzları

Birçok oksidatif enzimin demonstrasyonu için tetrazolyum tuzları hidrojen akseptörü olarak kullanılır. Redüksiyonda renk birikimleri oluştururlar. Şu an iki tetrazolyum tuzu yaygın bir şekilde kullanılmaktadır, monotetrazolyum ve ditetrazolyum. Ditetrazolyum tuzu, N.B.T. olarak bilinen ditetrazolyum-klorit-nitro, lipitlerde çözünmeyen yüksek renkli formazan üretir. Oysa monotetrazolyum 3-(4:5-dimetil tiyazol-2)-2:5-difenil tetrazolyum bromit (MTT), lipitlerde çözünen granüler formazanı üretir (1).

1. Oksidazlar

Bu enzimler oksijen ve substrat arasındaki reaksiyonu katalizleyerek substratları okside ederler. Bu enzimlerin birçoğu histokimyasal olarak demonstre edilebilir ve diagnozlarda önemli bir rol oynar. (örneğin tirozinaz (Dopa oksidaz), peroksidazlar) (1)

Tirozinaz

Bu enzim tirozin'in dihidroksifenilalanin'e (DOPA) oksidasyonunu katalize eder ve final oksidasyonu melanin pigmentinedir. Bu metod melanin üretmeye yetenekli hücrelerin demonstrasyonu için kullanılabilir. Bununla birlikte peroksidazlar da tirozin'in oksidasyonunu katalize etmeye yeteneklidir (1).

Monoamin oksidaz

Bu enzim adrenalin ve 5-hidroksitriptamin'in yıkılmasını sağlar. Tetranitro blue tetrazolyum'un (TNBT) oksidasyonu ile demonstre edilebilir.

Monoamin oksidaz: tetrazolyum metodu

Sonuç olarak monoamin oksidaz aktivitesi mavimsi-siyah gözlenir (1).

Peroksidazlar

Birçok peroksidaz enzimi doku kesitlerinde demonstre edilmeye yeteneklidir (1).

Sitokrom oksidaz

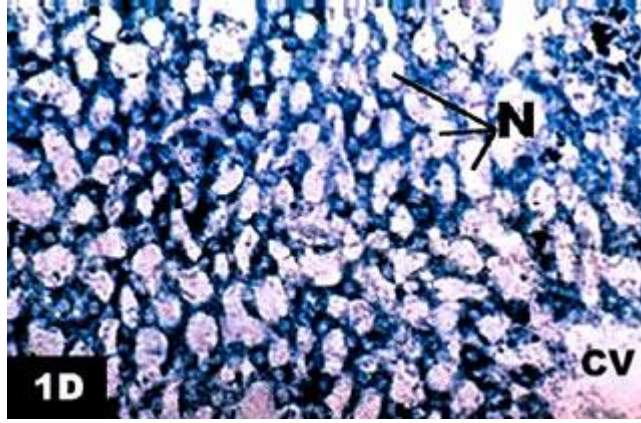
Birçok doku bu enzim yönünden zengindir. Temel oksidasyon yoluna gerek vardır. Enzim bunun yanında sitokrom A3 olarak bilinir (1).

2. Dehidrojenazlar

Bu enzimler substrattan hidrojeni uzaklaştırma kabiliyetindedir ve oksidatif yol boyunca transfer ederler. Serbest bırakılan hidrojen ko-enzim NAD ve NADP tarafından kabul edilir veya dehidrojenaz enzimi ko-enzimin gerekmediği akseptör olarak rol oynar. Hidrojen iyonları tetrazolyum tuzuna transfer edilir. Hidrojen tarafından tetrazolyum tuzunun redüksiyonu, enzim aktivitesinin olduğu yerde görülebilen formazan yığılımlarını üretir. Hidrojen akseptörleri olarak rol oynayan dehidrojenazlardan daha çok süksinat ve α gliserofosfat dehidrojenaz demonstre edilir.

Dehidrojenaz enzimlerinin demonstrasyonu hidrojen iyonları tarafından tetrazolyum tuzlarının redüksiyonuna bağlıdır. Bu, suni hidrojen akseptör sisteminde substrattan hidrojenin transferi ile olur. Birçok tetrazolyum tuzu mevcuttur ve 3 tanesinin kullanımı yaygındır; MTT, NBT ve TNBT.

Standart dehidrojenaz tekniği; Sonuç olarak enzim, MTT ile birlikte siyah formazan yığılımları, NBT ile birlikte mor-eflatun formazan yığılımları ve çekirdek yeşil gözlenir (1).



- Resim-4: Hepatositlerin sitoplazmalarında güçlü Süksinik dehidrojenaz aktivitesi, çekirdek bölgesinde bir aktivite yok (NBT metod)

(www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022006000400020&tlng=&lng=en&nrm=iso)

ENZİM HİSTOKİMYADA DİAGNOSTİK UYGULAMALAR

Enzim histokimyasal teknikler, doku tespit edilip parafin blokajı yapıldığında enzim aktivitesinde kısmi veya total kayıp meydana geldiğinden diagnostik amaçlar için cerrahi ve otopsi materyaline geniş çapta uygulanmıyor.

Bazı enzim metodları, genellikle düşük sıcaklıkta kontrollü fiksasyon sağlayarak, dehidrasyon ve gömülme prosedürleri kullanılarak parafin ve akrilik resin gömülü kesitlere uygulanabilir. Dokular, dokular içinde enzim aktivitesinin redüksiyonu hesaba katılarak enzim

histokimyasal metodların gerekli modifikasyonları ile hazırlanır.

Çok az enzim (örneğin klor asetat esteraz) rutin işleme tabii tutulan parafin kesitlerde tanımlanabilir ve bu sayede değerli bilgiler böyle metodlarla prospektif ve retrospektif olarak elde edilebilir. Bununla birlikte taze frozen (dondurulmuş) materyalin kriyostat kesitleri, çoğu enzim histokimyasal teknikler için gereklidir ve fiksatif içinde laboratuvarında alınan doku örneklerinin retrospektif incelemeleri genellikle uygun olmaz.

Cerrahi olarak histopatoloji laboratuvarlarında enzim histokimya için var olan yaygın kullanım şöyle özetlenebilir:

1. İskelet kası biyopsisi

2. Hirschsprung hastalığından (Hirschsprung hastalığı kolonun myenterik ve submukozal sinir plexuslarında parasempatik ganglion hücrelerinin olmaması ve buna bağlı olarak normal barsak peristaltik hareketlerin görülmemesiyle karakterize konjenital bir hastalıktır.) şüpheli durumlarda sinirlerin ve gangliyon'un hızlı, kolay belirlenmesi

3. Yeyunal biyopsilerde spesifik laktaz ve sükröz eksikliğinin demonstrasyonu

4. Çeşitli beyaz kan hücrelerinin demonstrasyonu

5. Mast hücrelerinin demonstrasyonu (1)

İskelet Kası Biyopsisi

Fikse edilmeyen iskelet kasının kriyostat kesitinde enzim histokimyasal metodunun uygulanması, farklı lif tiplerinin varlığını, numarasındaki değişimi, hacmini ve diaagnozun doğruluğunu ortaya koymak için farklı liflerin orantılı boyutlarını gösterir.

Kas biyopsi örnekleri 2 yolla seçilir. Biyopsi örneklerinin operatif yolla, genellikle genel anestezi altında uyluk kısmından alınır ya da İğne biyopsi örnekleri, yeterli kas hacminin (uyluk önerilir) olduğu herhangi bir yerden alınır.

Biyopsi örnekleri cerrahi işlem biter bitmez taze bir şekilde alınıp fizyolojik tuzlu su emdirilmiş beze paketlenmiş bir şekilde operasyon salonundan laboratuvara transfer edilir ve kurumayı minimize etmek için sadece ıslaklığı ile sıkıştırılmalıdır. Cerrahi işlem ile dondurma arasında süre uzarsa istenmeyen dondurma artefaktları ile sonuçlanabilir; eğer uzun gecikme kaçınılmazsa (örneğin transport işlemi bir hastaneden diğerine) biyopsi örneğine pudralı eldiven giydirilerek sonradan oluşan dondurma artefaktları minimize edilebilir. Vardığında kas biyopsisi uygun blok hacminde (0.5 cm çapında ve 0.5 cm kalınlığında, blok'un gövde kısmı dondurma artefaktı gösterebilir) parçalara

ayrılır ve enine kesit alınmasına yönlendirilir.

İğne biyopsi örnekleri, keskin bistüri ile deri sıyrıldıktan sonra çok hızlı ve kolay biçimde lokal anestezi altında uyluk kısmından elde edilir. İğne giriş yönü değiştirilerek aynı küçük deri ensizyonu ile uyluğun farklı kısımlarından 4 veya 5 iskelet kası örneği alınabilir. Biyopsi örnekleri fizyolojik tuzlu su ile emdirilmiş beze yerleştirilir ve mümkün olduğunca çabuk laboratuvara transfer edilir.

Diseksiyon mikroskobu kontrolü altında her lifin aynı yönde bulunması için biyopsiler kibar bir şekilde manipüle edilir ve kesilir. Kompozit blok bütün örnekler için olmalıdır ve elektron mikroskobu için herhangi bir kesilmiş parça gluteraldehit fiksatifine koyulur. Kompozit blok, kesit almada liflerin enine kesitini sağlamak için OCT içinde mantar plağa dik bir şekilde yerleştirilir.

Örnekler ister operatif yolla ister iğne biyopsisi olsun yavaş dondurma tam diaagnozu engelleyen buz kristal artefaktları oluşturabildiği için mümkün olduğunca hızlı dondurmaya hayati öneme sahiptir. Doku bloklarını dondurmaya için birçok teknik mevcuttur. Kas biyopsisi, yüksek termal iletkenlik oranı ve önceden süper

soğutulmuş sıvı nitrojenle birlikte izopentan gibi ajanlarla dondurularak uygun teknikle çalışır. İzopentan deney şişesine koyulur ve -160 °C'de sıvı nitrojen içinde askıya alınması ile dondurma katılığı sağlanır. Sıvı nitrojenden uzaklaştırıldıktan sonra izopentan çözülmek için oda sıcaklığında

sıra üzerine yerleştirilir. Hızlı bir şekilde blok uygun kesilme sıcaklığı (-23°C) için kriyostat odasına alınır, kas iyice kesilir ve kesitler 8-10 µm kesilerek kolayca elde edilir. Aşırı yağlı yer değişim varsa (örneğin şiddetli kas distrofisi) kas kesitleri -30°C sıcaklıkta kriyostata gerek duyabilir.

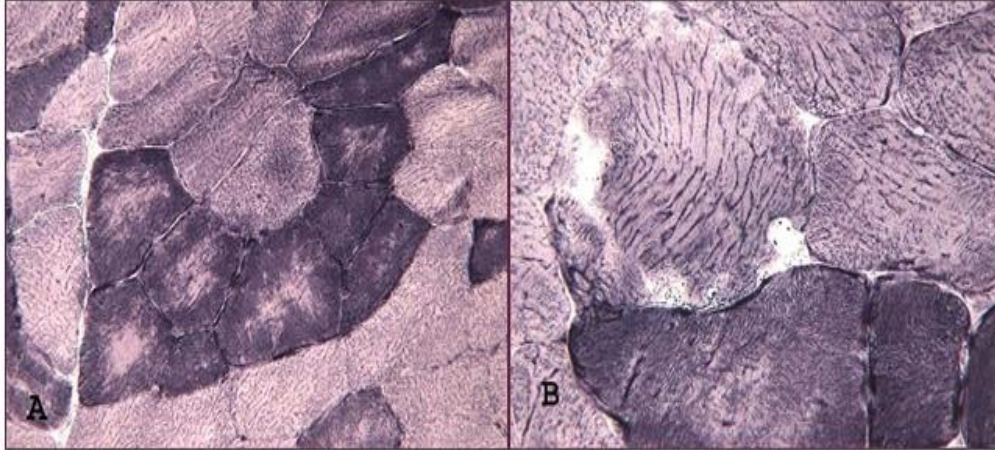
İskelet kasındaki birçok morfolojik değişim Hematoksilen-Eozin (H&E) boyamada gösterilmesine rağmen özel metodlar diagnostik önem açısından bazı yapısal anormalliklerin demonstrasyonu için gereklidir ki bunlardan en önemlisi enzim histokimyasal tekniklerdir.

Adenozin Trifosfataz (ATP-az): Bu metod farklı kombinasyonlarda (pH 9.4, 4.6, 4.2) kullanılarak Tip 1 ve Tip 2 lifler arasındaki ayrımı ve Tip 2 lifini 2A, 2B ve 2C alt gruplara ayırmasını sağlar. Spesifik lif tipleri veya alt grupları, atrofi veya kayıp bazı kas hastalıklarının karakteristik modeli olduğu için bu ayrım diagnostik olarak önemlidir. Yapısal lif anormalliğinin bazı tipleri (örneğin periyodik paraliz) ATP-az metodları ile demonstre edilir.

NADH Diyaforaz: Bu metod lifin sarkoplazmik retikulumun ince detayını ve mitokondriyi demonstre eder. Mitokondriyal anormallikler (örneğin mitokondriyal miyopatiler) için olduğu kadar lifin sarkoplazmik retikulumunda erken yapısal anormalliği teşhis etmek için de kullanılır. Bunun yanında dehidrojenaz enzimleri de büyük mitokondriyal anormallikleri demonstre edebilir fakat sarkoplazmik retikulumu için çok faydalı değildir.

Asit Fosfataz veya Non-spesifik Esteraz: Bu metod nekrotik lifler içinde makrofajları ve kas lifleri içindeki anormal lizozomal aktiviteyi tanımlar.

Kolinesteraz: Bu metod atrofik lifleri vurgular ve kas içi ince sinir dallarını demonstre edebilir (1).



■ Resim-5: İskelet kasında Tip 1 lifinin (A) güve yemiş görüntüsü ve Tip 2B lifinde (B) miyofibril arasındaki doğrusallaşma (NADH boyama)
(www.ispub.com/.../ijn/vol9n1/mcardle.xml)

jeyunal Biyopsiler

Yeyunal biyopsiler genellikle malabzorbsiyon (kötü emilim) araştırmaları için alınır. Esasen yeyunal villusların normal yapıda olup olmadığı değerlendirilir. Malabzorbsiyon'a neden olan en önemli hastalıklardan biri olan çölyak hastalığında villuslar atrofiye olur ve yeyunal mukozal yüzeyinde harabiyet şekillenir. Gluten bağımsız diyetlerle tedavi klinik düzelmelere yol açar. Eğer gluten bağımsız diyetler sürdürülürse yeyunal villuslarda yeniden düzelleme şekillenir.

Yeyunal biyopsiler başta villuslarda atrofinin varlığını tespit etmek için alındı ve daha sonra tedavi üzerinde gelişmeler izlendi. Gelişimdeki başarısızlık diyetle olan bağılılığın tamamlanamaması olarak görüldü ve tekrar biyopsi, histolojik düzelmeden ziyade devam eden villus atrofisini gösterdi.

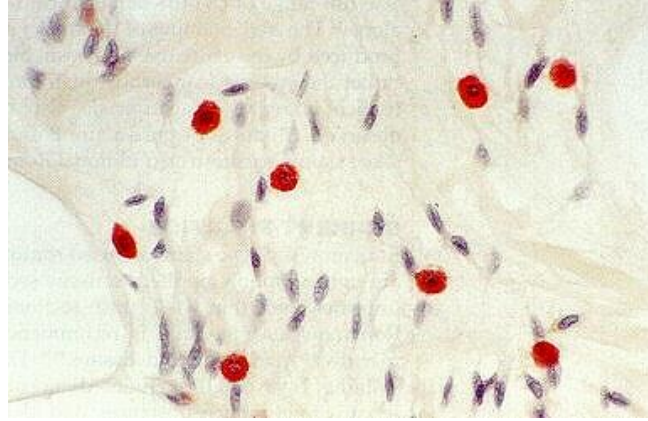
Çölyak hastalığından şüphe edilen yeyunal mukozal biyopsileri değerlendirmek için örnekler diseksiyon mikroskobu altında incelenebilir ve villusun yokluğu veya varlığı not edilebilir. H&E ile boyanan parafin kesitler villusun yüksekliği, bez hipertrofisi ve lamina propriyada inflamatuvar hücre infiltrasyonunun yoğunluğu için kullanılır. Alternatif olarak biyopsi kriyostat kesitlere ani-frozen yapılabilir ve hızlı diağnoz için H&E ile boyanır. Bu metod, alkalın fosfataz metodun uygulanabilmesi avantajına sahiptir. Alkalın fosfataz aktivitesi enterosit

yüzeyine oturur ve mukozal abzorptif hücrelerin fonksiyonel bütünlük ve yapısı için hassas bir işaret aracı olarak kullanılır. Bu özellikle histolojik iyileşmeyi değerlendirmek için yararlıdır. Asit fosfataz lamina propriyadaki bazı inflamatuvar hücreleri demonstre eder ve bunun yanında glanduler kript epitel hücrelerini ve enterosit villuslarındaki lizozomal aktiviteyi tanıtır.

Yeyunal biyopsiler şüphe edilen laktaz ya da sükröz eksikliğini araştırmak için de yapılabilir. Spesifik enzim histokimyasal metodlar her iki enzim için mevcuttur. Sükröz ve laktaz enterositlerin luminal yüzeyine lokalize olurlar ve normal yeyunumda enzim aktivitesinin yokluğu veya seyrek olduğu villusun uç kısmı hariç mukozal yüzeyde enzim aktivitesinin devamlı bir hattı varlığıyla ortaya konabilir (1).

Miyeloid Serilerinde Beyaz Hücreler ve Mast Hücrelerinin Demonstrasyonu

Klor asetat esteraz teknikleri son zamanlarda doku mast hücreleri ve miyeloid beyaz hücrelerin tanımlanmasına yardımcı olmak için formalin fikseli parafin kesitlere uygulanmıştır. Uygun 2 metod vardır. Parlak mavi reaksiyon ürünü (özellikle sitoplazmadaki mast hücrelerinde yoğun) veren Fast Blue RR metodu, pembe-kırmızı reaksiyon ürünü veren pararosanilin metodudur (1).



■ Resim-6: Mast hücrelerinin pararosanilin kullanılarak klor asetat esteraz aktivitesi (www.iheworld.com/royellis/gallery/mstchl.htm)

ENZİM HISTOKİMYANIN ÇEŞİTLİ DİAGNOSTİK UYGULAMALARI

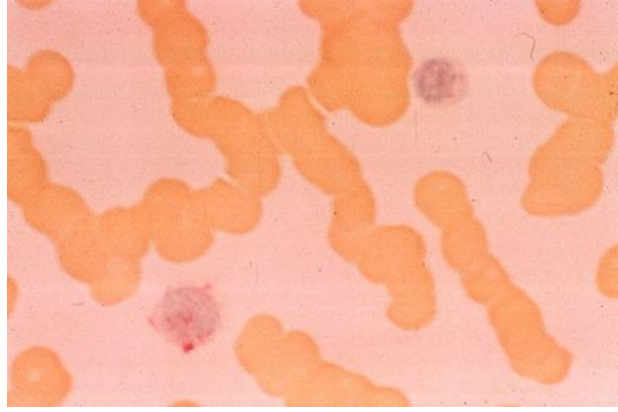
Enzim histokimyanın diagnostik kullanımı için birçok izole edilmiş örnek vardır. Örnekler prostat karsinomunu teşhis etmek için asit fosfatazın kullanımını gerektirir, örneğin tümörün mesane duvarı veya kolona infiltre olması veya kemik metastazı gibi. Gluten enteropati için yeyunal mukozal biyopsi örneklerinin kriyostat kesitler için asit ve alkalın fosfataz metodlarının uygulanması, vasküler endotel tümörleri için alkalın fosfataz metodlarının kullanımını gibi uygulamalara sahiptir.

Bunun yanında asit ve alkalın fosfatazlar, kemik dokudan kriyostat kesitleri elde etmedeki zorluğa rağmen trabeküler kemiğin fikse edilmeyen frozen kesitlerinde osteoklastlar ve aktif osteoblastlar demonstre edilebilir. Eğer trabeküler kemik dekalsifiye edilirse kesit alma kolaylaşır fakat böyle bir işlemde doku enzimleri yok olabilir. Eğer dekalsifikasyon, enzim aktivitesinin en az hasara uğrayacağı etilendiaminotetraasetik asit (EDTA) solüsyonunda yapılırsa kalsifiye olmuş kemiğin miktarı ve örneğin hacmine bağlı olarak 4 °C'de en kısa zamanda başarıyla uygulanır (1).

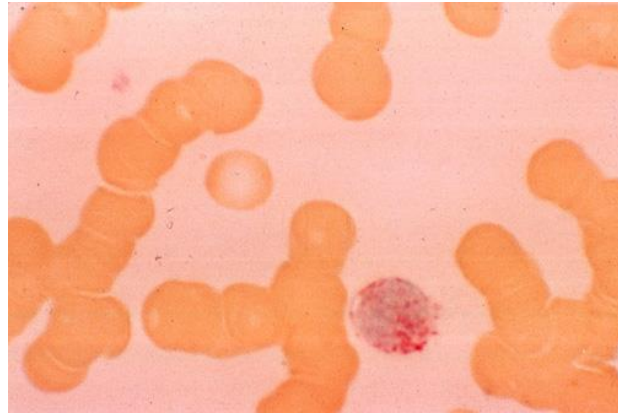
Lizozomal bir enzim olan α naftil asetat esterazın reaksiyon ürünü T-lenfositlerde 1-4 adet kırmızı-kahverengi granül şekillenirken, monositlerde ise yaygın granüller tarzındadır. B-lenfositlerde bu enzim pozitifitesi gözlenmez. Bu farktan faydalanarak insanlarda ve bazı hayvan türlerinde T-lenfositler, B-lenfositler ve monositler, hem doku kesitlerinde hem de kan frotilerinde spesifik olarak ayırt edilebilmektedir (8).

Yapılan bir araştırmada deneysel olarak oluşturulan köpek gençlik hastalığında virüs inokulasyonunu takip eden dönemde perifer kan α naftil asetat esteraz ve asit fosfataz-pozitif lenfosit oranlarının düştüğü belirlenmiştir. Bu bulgunun erken teşhiste de kullanılacağı fikri ileri sürülmüştür (9).

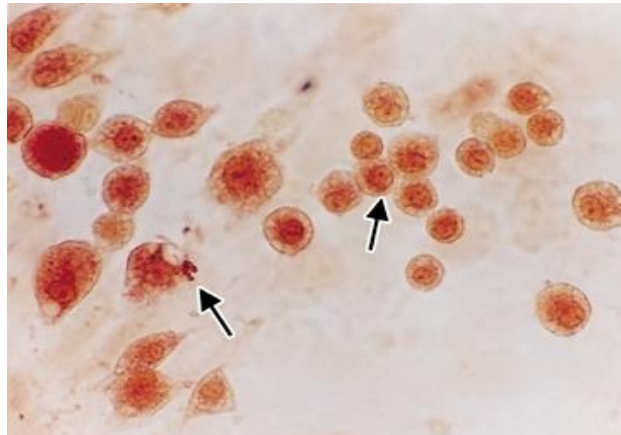
Perifer kandaki T-lenfosit oranlarının belirlenmesinin, kanda bu hücrelerin artmasıyla karakterize tavukların Marek hastalığının ayırıcı teşhisinde, klinik ve otopsi bulguları ile histopatolojik bulguları bu hastalıkla karışabilen bazı enfeksiyöz hastalıklardan ayırt edilmesinde yararlı olacağı bildirilmiştir (10).



■ Resim-7: Üstte histiyosit, altta lenfositte asit fosfataz aktivitesi
(www.academic.marist.edu/.../8-21.html)



■ Resim-8: Platelet'te asit fosfataz aktivitesi
(www.academic.marist.edu/.../8-21.html)



■ Resim-9: Çok çekirdekli osteoklast hücrelerinde asit fosfataz aktivitesi
(www.chinaphar.com/1671-4083/24/181.htm)

KAYNAKLAR

1. Bancroft J.D., Stevens A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, New York Third Press, 379-413.
2. Bancroft J.D., Cook H.C. (1988). Manual of histological techniques. Churchill Livingstone, New York Second Press, 171-193.
3. Catowsky D (1981). Leucocyte cytochemical and immunological techniques. In 'Practical Haematology'. Ed by Dacie SJV and Lewis SM.7th. edition 125-155. Longman Group UK Ltd.Singapore.
4. Pearse A.E. (1958). Extension of the limits of cellular pathology: the role of enzyme histochemistry. J. clin. Path. 11, 520-534.
5. Kaplow LS, Bursteno MS (1964). Cytochemical demonstration of acid phosphatase in hematopoietic cells in health and in various hematological disorders using azo dye techniques. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 12(2);805-811.
6. Barka T, Anderson PJ (1962). Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararozanilin as coupler. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 10:741-752.
7. Li CY, Yam LT, Crosby WH (1972). Histochemical characterization of cellular and structural elements of the human spleen. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 20(12):1049-1058.
8. Yang, T.J., Jantzen, P.A. and Williams, L.F. (1979). Acid α -naphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T- and B lymphocytes. Immunology,38,85-93.
9. Şen, İ., Turgut, K., Çelik, İ. and Kıran, M.M. (2002). The importance of lymphocyte enzyme profile, inclusion bodies in circulating leukocytes conjunctival smear samples in teh diagnosis on canine distemper virus infection. İndian Vet. J., 79, 213-217.
10. Hudson, L., and Payne, L.N. (1973). An analysis of the T and B cells of Marek's disease lymphomas of the chicken. Nature New Biol.,241,52-53.

Yazışma Adresi:

Prof. Dr. M. Aydın KETANİ

Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi

maketani@gmail.com