

# TEMEL TIP BİLİMLERİ

## Histoloji

## Histolojide Kullanılan Metabolik Haritalama Teknikleri

Dr. Tufan KARAOSMANOĞLU\*

Dr.M.Kemal IRMAK\*\*

Yrd.Doç.Osman ÖZCAN\*\*

Metabolik haritalama, özellikle sinir sisteminde hangi uyarının nerede cevap oluşturduğunu belirlemek amacıyla kullanılan histofizyolojik bir yöntemdir.

Uyarılan hücrelerde metabolizma artar. Bu metabolizma artışı çeşitli yöntemlerle gösterilebilmektedir. En basit şekli, hücrelerde oluşan aksiyon potansiyellerinin elektrografik olarak yazdırılmasıdır. Göz kliniklerinde kullanılan "Görsel uyarıya kortikal cevap" tekniğinde, çeşitli ışık uyarılarının görme korteksinde oluşturduğu değişiklikler yazdırılmaktadır.

Metabolizma artışı, histolojik kesitlerde de gösterilebilmektedir. Sitokrom oksidaz aktivitesi, 2-deoksi-glikoz alınımı ve fos protein immünoaktivitesi metabolik haritalamada kullanılan histolojik tekniklerin başında gelmektedir. Bu derleme, üç teknik hakkında kısaca bilgi vermek ve bunların birbirlerine olan üstünlüklerini ortaya koymak amacıyla planlanmıştır.

### 1-Sitokrom Oksidaz Aktivitesi

Uyarılan hücrelerin oksidatif enerji metabolizmaları arttığından sitokrom oksidaz aktivitesinde de artış olmaktadır. Bu nedenle, enzimin histokimyasal olarak gösterilmesi, dolaylı olarak metabolik aktiviteyi de yansıtmaktadır (1).

Oksidatif fosforilasyon zinciri, aerob organizmaların en büyük enerji kaynağını oluşturur. Burada, sitrik asit siklusundan ayrılan elektronlar, taşıyıcı bir seri enzim üzerinden oksijene aktarılır. Açığa çıkan enerji de, ATP yapımında kullanılır (2). Taşıyıcı enzimlerden son halkayı oluşturan sitokrom a ve sitokrom a<sub>3</sub>, bir kompleks olarak görev yaptığından, bu ikisi sitokrom oksidaz olarak adlandırılmışlardır (Şekil 1).

Çeşitli yöntemlerle, bu enzim aktivitesi ortaya konabilmektedir. Bu amaçla kullanılan diaminobenzidin (DAB), enzim etkisiyle okside olmakta ve bu haliyle enzim üzerine çökerek, onu görünür hale getirmektedir (3,4,5). Ayrıntılı histokimyasal yöntem Tablo 1'de gösterilmiştir. Elektron mikroskopik çalışmalarda, DAB'ın, si-

tokrom oksidazın bulunduğu mitokondri iç zarına çöktüğü gösterilmiştir (6). DAB'ın oluşturduğu siyah renkli reaksiyon ürünü ile yapılan kantitatif çalışmalar da, metabolik aktivite derecesi hakkında bilgi vermektedir (7). Wong-Riley, gözü çıkarılan kedilerde, görme korteksi hücrelerinin, sitokrom oksidaz aktivitelerini düşük bulmuştur (8). Bir başka çalışmada ise, kobay bağırsak segmentlerindeki miyenterik pleksus nöronlarının, tonik sitokrom oksidaz aktivitesi gösterdikleri ortaya konmuştur (9).

### 2-Deoksiglikoz Alınımı

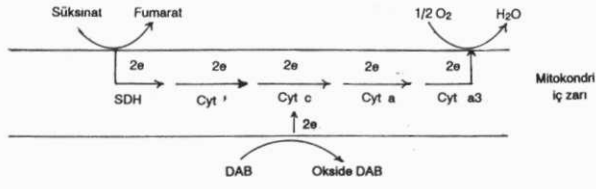
İlk olarak 1977'de Sokoloff ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem, uyarılan hücrelerde glikoz metabolizmasının arttığı gerçeğinden hareketle, aktif hücreleri göstermek amacıyla düşünülmüştür (10). Burada damar yoluyla verilen 2-deoksiglikoz, glikozu taşıyan sistemler üzerinden hücrelere ulaşır. Hücre içinde, bu madde heksokinaz enzimi için glikozla yarışarak fosforlanır. Sonuçta, belli oranlarda 2-deoksiglikoz 6-fosfat ile glikoz-6-fosfat meydana gelir (Şekil 2).

Bu araştırmada, 2-deoksiglikoz-6-fosfat, ikinci karbon atomundaki hidroksil grubunun bir hidrojen atomuyla yer değiştirmesi nedeniyle, sonraki reaksiyonlara giremez ve bu haliyle hücre içinde birikir. Hekzosmonofosfat yolundaki glikoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim de bu maddeyi etkileyemez. Glikoz-6-fosfat ise, fosfoheksozimeraz enzimi ile fruktoz-6-fosfata dönüşerek reaksiyon sonunda karbondioksit ve suya yığılır (11). Buradan hareketle, 2-deoksi glikoz; C<sup>14</sup>, trityum gibi radyoaktif bir maddeyle işaretlenip verildiğinde hücrelerde biriken radyoaktif madde miktarı otoradyografik yöntemlerle ölçülerek, hücre aktivasyonu hakkında bilgi edinilebilmektedir. Nitekim, 2-deoksiglikoz ile yapılan haritalama çalışmalarında, uyarılan hücreler daha yoğun olarak işaretlenmektedir (12,13,14).

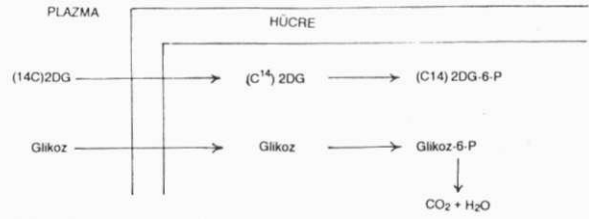
Bu yöntem, daha sonra santral sinir sisteminin metabolik fonksiyonlarında uygulanmakla beraber son

\* H.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji BD

\*\*GATA Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji BD, ANKARA



Şekil 1. Sitokrom c tarafından oksitlenerek enzim üzerine çöken DAB, dolaylı olarak sitokrom oksidaz (cyta-a3) aktivitesini yansıtır. (SDH: Süksinat Dehidrogenaz, DAB: Diaminobenzidin, Cyt Sitokrom, e:Elektron) (Seligman AN, et al. J Cell Biol 1968; 38:2)



Şekil 2. Glikoz ve 2DG, aynı metabolik yolları izleyerek fosforlanır. Fakat 2DG-6-P, CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'ya yıkılmadığından bu şekilde hücre içinde birikir. (C<sup>14</sup>:Radyoaktif karbon, 2DG:2-deoksiglikoz) (lennart H. Neuroanatomical tract-tracing methods, 1981:528).

Tablo 1. Sitokrom oksidaz tekniği

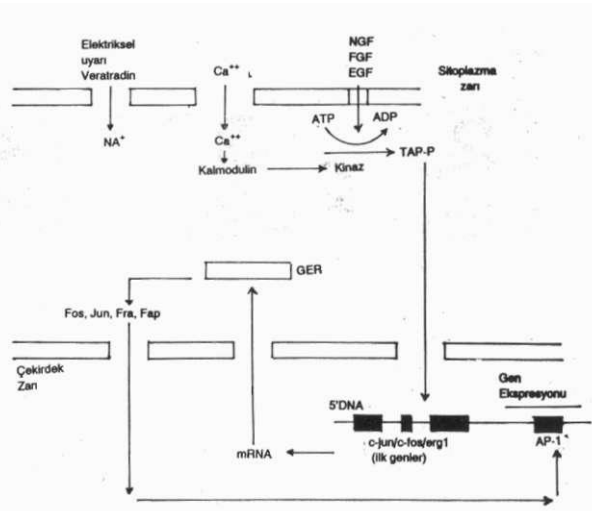
1. Dokular %4 Paraformaldehitte tespit edilir.
2. Dondurma kesitler 0.1 M fosfat tamponla yıkanır.
3. Kesitler, 50 mg DAB, 30 mg Sitokrom C, 90 cc 0.1 M fosfat tampon solüsyonunda PH:7.4, 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edilir.
4. Gliserin serilerinden sonra balzamlı kapatılır.

zamanlarda iskelet kasındaki aktivasyonları göstermek amacıyla da kullanılmaktadır (15,16).

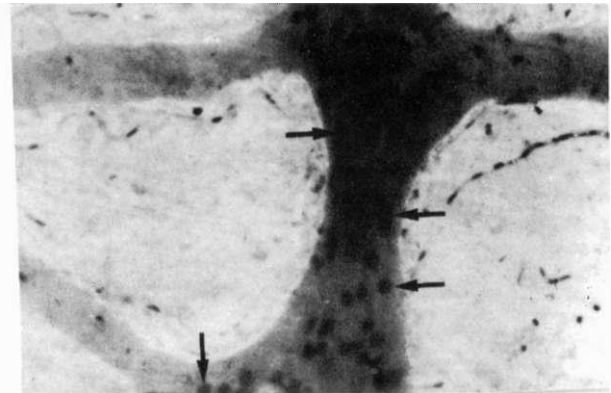
### 3-Fos Proteinini İmmünoreaktivitesi

Uygulamaya yeni giren bu yöntemde, hücrelerdeki fos proteinini, immünohistokimyasal olarak gösterilmektedir. Bu protein, bir onkogen olan c-fos geninin sentezlettiği çekirdek proteinlerindedir ve aktif hücrelerde yüksek düzeylerde bulunur (17,18). Normal şartlarda, çok düşük miktarlarda bulunan fos proteinini, hücre dışı uyarılmalar sonucu artmaktadır. Bu proteinin hücrelerde üçüncü haberci olarak görev yaptığı, kısa süreli hücre dışı uyarımları daha uzun süreli hücre içi sinyalleri dönüştürerek, hücre işlevlerini düzenlediği düşünülmektedir (19,20). Bu sistem, büyük olasılıkla hücre içi ikinci haberciler olan cAMP, kalsiyum-kalmodulin ve protein-kinaz C tarafından uyarılmakta, sentezlenen protein, transkripsiyonu düzenleyen proteinlerden AP-1'in DNA üzerindeki yerine bağlanarak gen aktivasyonu yapmaktadır (Şekil 3) (21-24).

C-fos geni uyarılardan 5 dakika sonra aktive olmakta ve aktivasyon 15-20 dakika devam etmektedir (25). Fos proteinin yarı ömrü ise yaklaşık olarak iki saattir (26). Uyarımların fos protein miktarını artırdığı immünohistokimyasal olarak gösterilebilmektedir. Burada kullanılan antikolar tavşandan elde edilmekte ve bu proteinin 127-152 aminoasit dizilimine uymaktadır (27). Poliklonal olan bu antikolar, fos proteinini ile birlikte sentez edilen Jun, Fra, Fab gibi proteinleri de tanımaktadır (28). Yapılan çalışmalarda, retina ışık ile uyarılması sonucu görme korteksi nöronlarında fos protein sentezinin arttığı gösterilmiştir (29,30). Ayrıca, NGF (nerve growth factor), FGF (fibroblast growth factor), EGF (elongating growth factor), potasyum, nikotinik agonistler, elektriksel uyarılar, cAMP benzeri maddeler,



Şekil 3. Uyarılarla sitoplazmada sentezlenen nükleer proteinler, DNA üzerindeki AP-1 bölgesine bağlanarak çeşitli genlerin ekspresyonuna neden olurlar (NGF: Nerve Growth Factor, FGF: Fibroblast Growth Factor, EGF: Elongating Growth Factor, GER: Granüllü Endoplazma Retikulumu) Franza BR, et al Science 1988; 239:1152)



Şekil 4. Kobay miyenterik pleksus ganglionlarında endojen c-fos reaktivitesi gösteren nöron çekirdekleri (oklar) izlenmektedir. Yayma preparat, x466. (Karaosmanoğlu T. Birinci Histoloji ve Embriyoloji Sempozyumu 26-28 Mart 1992, Ankara). Bu çalışmada kullanılan yöntem Tablo 2'de belirtilmiştir. Bu yöntem, bugün özellikle merkezi sinir sisteminin metabolik haritalamasında yaygın olarak kullanılmaktadır (36-38).

**Tablo 2.** C-fos için İmmünohistokimyasal Yöntem

1. Bağırsak segmentleri %4 Paraformaldehitte tespit edilir.
2. Mikrodiseksiyonla mukoza ve sirküler kaslar kaldırılır.
3. Yayma dokular bir gece c-fos antikoruna ile inkübe edilir.
4. Biotinli Goat-Anti-Rabbit'le 1-2 saat inkübasyon yapılır.
5. PAP'la işaretli Avidin solüsyonunda bir saat tutulur.
6. %1 DAB, %1 CoCl<sub>2</sub>, %1 Ni(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> içeren 15 cc Fosfat tamponu solüsyonunda 20 dakika bekletilir.
7. Bu solüsyon üzerine %0.02 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu dökülerek 5 dakika beklenir.
8. Gliserin serilerinden sonra kapatılır.

baryum ve epileptik ilaçların hücrelerde fos protein sentezini artırdığı ortaya konmuştur (31-34). Tarafımızdan yapılan bir çalışmada, miyenterik plexus nöronlarının endojen c-fos reaktivitesi gösterdiği saptanmıştır (35) (Şekil 4).

## SONUÇ

Bu üç teknik günümüzde metabolik haritalama çalışmalarında kullanılmaktadır. Teknik seçimi, çalışılacak doku örneklerine, istenen rezolusyon derecesine ve uygulanan kolaylığa göre yapılmaktadır.

Sitokrom oksidaz, hücresel düzeyde görüntü vermesine rağmen, spinal kord, karaciğer, enterik sinir sistemi gibi dokularda bazal enzim aktivitesi nedeniyle spesifitesi düşük olan bir tekniktir. Ayrıca, kantitasyon zorluğu, teknik uygulaması sırasında kullanılan toksik maddeler, bu tekniğin yavaş yavaş terkedilmesine neden olmaktadır. Günümüzde, elektron mikroskopik çalışmalarında tercih edilmektedir (39,40).

2- deoksizglikoz yöntemi, üzerinde en fazla çalışılmış olan bir yöntemdir. Glikoz utilizasyonunun olduğu her dokuda kullanılabilir. Ancak, hücresel düzeyde görüntü verememesi, uygulanmasının zor ve uzun olması günümüz araştırmacılarını yeni teknikler bulmaya itmiştir (41,42). Fos tekniği, yeni olmasına rağmen, uygulama kolaylığı, hücresel düzeyde görüntü oluşturması ve kantitasyona olanak tanınması nedeniyle tercih edilen bir yöntem olmuştur. Bu yöntemin, 2-deoksizglikoz yöntemine olan üstünlüğü, bir çalışmada gösterilmiştir (43). Uygulamada hala poliklonal antikorlarla çalışılıyor olması, bu tekniğin çözüm bekleyen en büyük sorunudur.

Sonuç olarak, her üç yöntemin de gerçek fizyolojik durumu tam olarak yansıttığı söylenemez. Bu nedenle, yapılacak metabolik haritalama çalışmalarında en az iki yöntemin birlikte kullanılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Burstone MS. New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase). *J Histochem Cytochem* 1959; 7:1-12.
2. Stryer L. *Biochemistry*. WH Freeman and Company San Francisco 1974; 353.
3. Wong-Riley MT, Kogeyama GH. Localization of cytochrome oxidase in the mammalian spinal cord and dorsal root ganglia with quantitative analysis of ventral horn cells in monkeys. *J Comp Neurol* 1986; 245:41-61.
4. Jen LS, Chau RMW, Tsang D. Cytochrome activity in retinas transplanted to the brainstem in rats. *Neuroscience Letters* 1989; 105:275-80.
5. Land PW. Dependence of cytochrome oxidase activity in the rat laterale geniculate nucleus on retinal innervation *J Comp Neurol* 1987; 262:78-89.
6. Seligman AN, Karnovsky MJ, Wasserkrug HL, Hanker JS. Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, Diaminobenzidin (DAB). *J Cell Biol* 1968; 38:1-14.
7. Mawe GM, Gershon MD. Functional heterogeneity in the myenteric plexus: Demonstration using cytochrome oxidase as a verified cytochemical probe of the activity of individual enteric neurons. *J Comp Neurol* 1986; 246: 381-91.
8. Wong-Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with the cytochrome oxidase technique. *Anat Rec* 1978; 190:586.
9. Kirchgessner AL, Mave GM, Gershon MD. Evaluation of the activity of chemically identified enteric neurons through the histochemical demonstration of cytochrome oxidase. *J Comp Neurol* 1990; 301:1-4.
10. Sokoloff L. Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. *J Neurochem* 1977; 29:13-26.
11. Wick AN. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J Biol Chem* 1957; 224: 963-9.
12. Hand PJ, Miselis RR. 14C-2-deoxyglucose metabolic mapping study of the rat posteromedial barrel subfield. *Neurosci Abstr* 1977; 3:483.
13. Hubel DH, Wiesel TN. Functional architecture of macaque monkey visual cortex. *Proc R Soc Lond B* 1977; 198:1-59.
14. Stewart WB. Functional organization of rat olfactory bulb analyzed by the 2-deoxyglucose method. *J Comp Neurol* 1979; 185:715-734.
15. Rapaport SI, Ohno K, Schwartz WJ. Activity related regional uptake of 14C-2 deoxyglucose by rat quadriceps femoris muscle. *Exp Neurol* 1978; 60:168-74.
16. Toop J, Burke RE, Dum RP. 14C-2-deoxyglucose as a marker for identifying acutely active skeletal muscle fiber in individual motor units. *Neurosci Abstr* 1979; 5:388.
17. Curran T, Mac Connel VP, Van Straatey F, Verma IM. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: Molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homology of the c-fos gene from mouse and human cells. *Mol Cell Biol* 1983; 3:914-21.

18. Curran T, Miller AD, Zokas L, Verme İM. Viral and cellular fos proteins: A comparative analysis. *Cell* 1984; 36:259-68.
19. Curran, T, Morgan LI. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally active benzodiazepines. *Science* 1985; 229:1265-68.
20. Marx JL. The fos gene as master switch. *Science* 1986; 237:853-56.
21. Bohman P, Bos TJ, Admon A, Nishimura T, Wost PK, Tjian Pi. Human proto-oncogene c-fos encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 1987; 238:1386-92.
22. Greenborg ME, Greene LA, Ziff EB. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC 12 cells. *J Biol Chem* 1985; 260:14101-110.
23. Morgan JI, Curran T. The role of ion flux in the central of c-fos expression. *Nature* 1986; 322:552-55.
24. Lee WMF, Lin C, Curran T. Activation of the transforming potential of the human fos proto-oncogene requires message stabilisation and results in increased amounts of partially modified fos protein. *Mol Cell Biol* 1988; 8:5521-27.
25. Greenberg ME, Ziff EB. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 1984; 311:433-38.
26. Muller R, Bravo R, Burchkhardt J, Curran T. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 1984; 312:716-20.
27. Franza BR, Rauscher SF, Josephs SF, Curran T. The fos complex and fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science* 1988; 239:1150-53.
28. Curran T, Van Bevery C, Lung N, Verma IM. Viral and cellular fos proteins are complexed with a 39.000 dalton cellular protein. *Mol Cell Biol* 1985; 5:176-82.
29. Rea MA. Light increases fos-related protein immunoreactivity in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res Bull* 1989; 23:577-81.
30. Sagar SM, Sharp FR. Light induces a fos like nuclear antigen in retinal neurons. *Mol Brain Res* 1990; 7:17-21.
31. Hant SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation *Nature* 1987; 328:632-34
32. Kruver W, Schubert P, Vernad M. Induction of proto-oncogene fos by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:7330-4.
33. Morgan JI, Cohon DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* 1987; 237:192-7.
34. Sharp FR, Gonzales MF, Hisanaga K, Mobley WC, Sagar SM. Induction of the c-fos gene product in rat forebrain following cortical lesions and NGF injection. *Neurosci Lett* 1989; 100:117-22.
35. Karaoşmanoğlu T. Enterik sinir sisteminde tonik nöral aktivitenin c-fos antikorları ile immünohistokimyasal gösterilmesi. Birinci Histoloji ve Embriyoloji Sempozyumu 26-28 Mart 1992, Ankara.
36. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of the c-fos protein: Metabolic mapping after cellular level. *Science* 1988;240:1328-31.
37. Sharp FR, Gonzales MF, Sharp JW, Sagar SM. C-fos expression in the caudal cerebellum of the rat during motor-sensory cortex stimulation. *J Comp Neurol* 1989; 248:621-36.
38. Presley RW, Monerey P, Levine JP, Basbaum AI. Systemic morphine supresses noxious stimulus-evoked fos protein like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J Neurosci* 1990; 10(1):323-35.
39. Wong-Riley MT. Cytochrome oxidase: An endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 1989; 422:582-93.
40. Iennart H, Martine JR. Neuroanatomical tract-tracing methods. New York, Plenum Press, 1981 ;511-38.
41. Sokoloff L, Ravich CH, Kennedy MH. The (14C)-deoxy-glucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization theory, procedure and normal values in conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 1977; 28:897-916.
42. Sharp FR, Gonzales MF, Sharp JW, Sagar SM. C-fos expression and (C14)2-deoxyglucose uptake in caudal cerebellum of the rat during motor sensory cortex stimulation *J Comp Neurol* 1989; 284:621-36.
43. Franza BRJr, Sambucetti LC, Cohen DR, Curran T. Analysis of fos protein complexes and fos-related antigens by high resolution two dimensional gel electrophoresis. *Oncogene* 1987; 213-21.