

MAKALAH
WORKSHOP CARDIOVASCULAR, FORENSIC AND DIGITAL PATHOLOGY

**PENERAPAN IMMUNOHISTOKIMIA PADA RISET LABORATORIUM
HISTOPATOLOGI: DETEKSI KEMATIAN SEL PADA
TROMBUS KORONER DENGAN TEKNIK VIRTUAL MULTIPLE
IMMUNOHISTOKIMIA**



oleh:

dr. Kartika Ratna Pertiwi, M. Biomed. Sc
NIDN 0009028101

8-9 November 2015

JURUSAN PENDIDIKAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI YOGYAKARTA

PENDAHULUAN

Imunohistokimia (*immunohistochemistry* / IHC) merupakan teknik pewarnaan histologi yang memungkinkan pendeteksian antigen jaringan (marker) pada berbagai spesimen dengan menggunakan prinsip interaksi antigen-antibodi yang spesifik. Antibodi digunakan untuk memvisualisasikan bagian tertentu dari jaringan. Imunohistokimia diambil dari nama “*immune*” yang menunjukkan prinsip dasar dalam proses ini ialah respon imun yaitu reaksi antara antigen dan antibodi, serta “*histo*” yang menunjukkan jaringan secara mikroskopis. Metode ini masih dianggap sebagai pemeriksaan laboratorium yang berharga tidak hanya untuk kebutuhan diagnosis suatu kelainan/penyakit tetapi juga untuk keperluan penelitian dalam bidang histopatologi. Imunohistokimia sering digunakan untuk penelitian dasar dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi biomarker ataupun protein terekspresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh. Pada prinsipnya, IHC didasarkan pada ikatan antara antibodi primer monoklonal atau poliklonal yang mengikat antigen pada jaringan, membentuk kompleks imun, untuk diikat oleh antibodi sekunder yang terkonjugasi enzim seperti peroksidase. Ketika kromogen tertentu ditambahkan, enzim tersebut mampu mengubah kromogen menjadi warna tertentu yang tidak dapat larut yang dapat kita identifikasi di bawah mikroskop.

Bersama dengan perkembangan IHC dalam bidang histopatologi, terdapat keingintahuan untuk menyelidiki ekspresi lebih dari satu marker antigen dalam spesimen jaringan yang sama menggunakan IHC. Hal ini dikarenakan satu pengecatan IHC meskipun diaplikasikan pada preparat serial yang dipotong berurutan cukup bermasalah dan membutuhkan kerja keras. Oleh karena itu, para peneliti mengembangkan "*multiple IHC*" yang menggabungkan beberapa imunostaining individu pada bagian jaringan yang sama, sehingga memungkinkan identifikasi simultan dari beberapa marker. Menggunakan kromogen berwarna yang berbeda, IHC multipel dapat membedakan pola lokalisasi ekspresi antigen yang berbeda atau mendeteksi ko-lokalisasi antigen tersebut. Agar berhasil melakukan IHC multipel, ada dua hal penting yang perlu diperhatikan, yaitu reaktivitas silang antara pewarnaan individu dan kombinasi warna terbaik dari berbagai kromogen.

Makalah ini bertujuan memaparkan tahapan dasar imunohistokimia dan teknik kombinasi pengecatan (multipel) IHC serta contoh penerapannya dalam penelitian histopatologi berdasarkan studi optimasi untuk mengembangkan tiga pewarnaan IHC dalam identifikasi berbagai jenis kematian sel: apoptosis, nekrosis dan etosis pada spesimen trombosis koroner. Investigasi pada berbagai jenis kematian sel pada trombosis koroner sangat penting karena kematian sel menyebabkan kerapuhan trombus dan selanjutnya berhubungan dengan angka morbiditas dan mortalitas yang lebih tinggi pada pasien dengan sindrom koroner.

TAHAPAN DASAR IMUNOHISTOKIMIA

Secara garis besar, imunohistokimia (IHC) terdiri atas penyiapan spesimen (preparat) dan pengecatan (pewarnaan). Secara detail, masing-masing langkah pada tahapan tersebut adalah sebagai berikut.

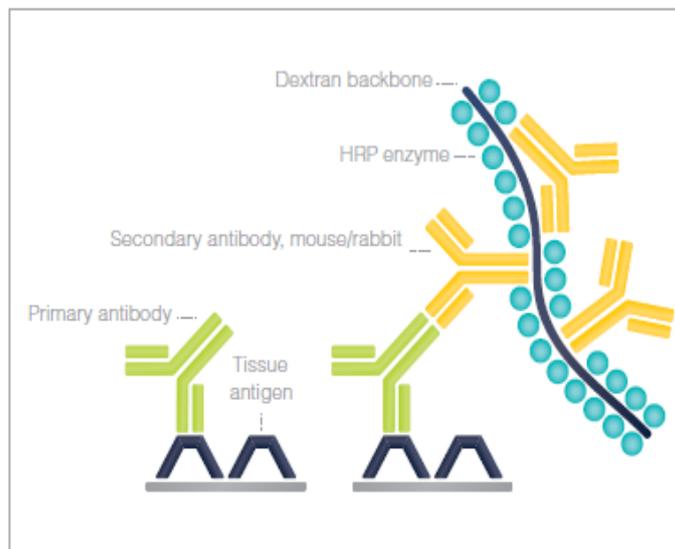
1. Penyiapan spesimen (preparat)

Pertama-tama, jaringan yang didapatkan pada saat operasi (biopsi) difiksasi sesegara mungkin untuk mengawetkan bentuk sel dan organel mendekati bentuk fisiologinya dan mencegah kerusakan jaringan. Bahan kimia yang digunakan sebagai fiksatif ini pada umumnya adalah formalin. Di laboratorium, pemeriksaan makroskopik dilakukan dahulu pada jaringan terfiksasi untuk mengetahui titik/ area mana yang mencurigakan (misalnya peradangan, tumor) yang mungkin memerlukan penyelidikan lebih lanjut. Jaringan yang akan dievaluasi lebih lanjut pada tingkat mikroskopis selanjutnya dipotong seperti kotak-kotak kecil dan ditempatkan dalam kaset khusus untuk diproses lebih lanjut. Proses selanjutnya adalah dehidrasi (mengeluarkan seluruh cairan sehingga dapat diisi dengan formalin), *clearing* (mengeluarkan alkohol dari jaringan dan menggantikannya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan parafin), *impregnasi* (mengeluarkan cairan pembening dari jaringan) dan *embedding* (memasukkan parafin cair secara bertahap). Setelah dingin dan parafin mengeras, dilakukan *trimming* untuk membuang parafin yang berlebihan dan mengatur bentuk potongan blok parafin jaringan agar memudahkan penyiapan preparat dengan mikrotom. Blok parafin kemudian dipotong menggunakan mikrotom yang dapat diatur ketebalannya (*sectioning*) dan diusahakan agar potongan tersebut sambung menyambung membentuk pita. Pita ini kemudian diletakkan dalam wadah air hangat agar jaringan dalam parafin teregang (*floating*), kemudian diangkat dengan merekatkannya pada kaca obyek. Preparat yang telah siap kemudian dibiarkan hingga mengering.

2. Imunohistokimia

Setelah preparat jaringan yang sudah direkatkan pada kaca obyek siap, langkah awal tahap pengecatan imunohistokimia (IHC) adalah deparafinisasi dan rehidrasi. Deparafinisasi merupakan proses untuk menghilangkan parafin yang terdapat pada jaringan menggunakan xylene (xylo) dan kemudian rehidrasi dengan pengenceran etanol bertingkat untuk menghilangkan parafin yang ada dalam jaringan. Langkah selanjutnya adalah memblokir aktivitas endogen peroksidase dengan larutan hidrogen peroksidase (H₂O₂) (3% dalam buffer) untuk meminimalkan munculnya pewarnaan *background* yang akan mengganggu pengamatan. Setelah ini, dilakukan *antigen retrieval* yaitu upaya memunculkan epitop antigen untuk

meningkatkan intensitas warna antibodi yang mungkin melemah karena proses fiksasi dan parafinisasi. Metode *antigen retrieval* yang umum digunakan adalah induksi panas (dinamakan juga *heat induced epitope retrieval / HIER*) atau dengan enzim proteolitik. HIER dilakukan dengan perendaman dalam buffer sitrat atau Tris-EDTA sebelum dipanaskan dengan mesin HIER, *microwave, boiling, steamer, waterbath* atau inkubator. Setelah *antigen retrieval*, tahap berikutnya adalah *protein blocking* untuk memblok protein tidak spesifik yang ada pada jaringan yang berpotensi mengganggu ikatan antigen-antibodi. *Protein blocking* dapat dilakukan menggunakan normal serum, atau larutan *blocking* seperti *bovine serum albumin (BSA)*, gelatin dan *tryptone casein peptone*. Tibalah langkah yang krusial yaitu tahap antibodi primer dimana bisa menggunakan antibodi monoklonal atau poliklonal. Inkubasi antibodi primer bervariasi durasi maupun suhu lingkungannya. Antibodi sekunder lalu diaplikasikan untuk berikatan dengan antibodi primer tersebut (yang sudah berikatan dengan antigen teridentifikasi pada jaringan). Pada tahap akhir kromogen ditambahkan untuk memvisualisasikan kompleks antigen-antibodi tersebut. Jika dirasa perlu, bisa ditambahkan pewarnaan latar belakang tambahan (*counterstain*) dengan menggunakan hematoksin. Kaca preparat kemudian ditutup dengan *coverslip* dan dilihat dibawah mikroskop cahaya.



Gambar 1. Bagan mekanisme kerja immunohistokimia enzimatik dengan metode tidak langsung

Teknik imunohistokimia ini merupakan metode yang tidak langsung (Gambar 1) karena menggunakan dua macam antibodi yaitu antibodi primer (tidak berlabel) dan antibodi sekunder (berlabel). Sedangkan metode lain yaitu metode langsung hanya menggunakan satu antibodi yang spesifik karena antibodi spesifik yang mengikat antigen jaringan sudah langsung dikonjugasikan dengan enzim kromogen. Baik metode langsung maupun tidak langsung, pembacaan ekspresi marker yang positif tergantung dari kromogen yang digunakan seperti DAB yang berwarna coklat atau warna warni sesuai sediaan kromogen pabrikan Prima atau Vector. Kromogen yang dijelaskan pada kedua metode ini merupakan kromogen enzimatis. Jenis kromogen lain yaitu *fluorescent dye* yaitu kromogen yang berpendar seperti *FITC*, *rodhamin* dan *Texas-red*.

IMUNOHISTOKIMIA GANDA (MULTIPEL)

Jika teknik imunohistokimia tunggal digunakan untuk memvisualisasikan satu antigen tertentu dalam jaringan secara selektif, maka untuk mempelajari hubungan antara dua parameter (marker), diperlukan teknik IHC multipel yang memungkinkan berbagai antigen terdeteksi dan dapat dilokalisasi secara simultan dengan warna berbeda. Teknik IHC multipel ini membutuhkan keterampilan peneliti karena harus disesuaikan dengan tujuan spesifiknya, serta membutuhkan persiapan reagen khusus, dan rentan terhadap pewarnaan campuran yang palsu.

Prosedur IHC multipel enzimatis pada dasarnya adalah menggabungkan IHC immunoenzim tunggal. Teknisnya bisa berupa menggunakan penggabungan dengan kromogen warna yang berbeda (sekuensial) namun bisa pula dengan teknik kombinasi virtual dengan bantuan kemajuan IT berupa tersedianya mesin slide scanner (Gambar 2). Cara yang terakhir menggunakan protokol tambahan "*destaining*" yaitu menghilangkan kompleks antigen dan antibodi yang telah terbentuk pada pewarnaan pertama dengan buffer khusus (*stripping buffer*) yang diinkubasikan pada suhu tertentu (50 derajat celcius). Sebelum melalui tahap *destaining*, slide yang sudah terwarnai hendaknya sudah selesai discan. Kemudian, hasil pewarnaan IHC yang kedua akan discan kembali. Hasil scan kedua pewarnaan dapat diunduh dan dilekatkan membentuk gambaran tumpuk (*stacked images*) yang dapat diamati untuk mencari ko-lokalisasi ekspresi dari dua marker yang berbeda. Sedangkan cara yang pertama, IHC multipel sekuensial dilakukan secara berurutan dengan menggabungkan dua pewarnaan IHC tunggal tanpa adanya tahap *destaining*. Artinya, metode ini harus menggunakan kromogen warna yang berbeda untuk bisa memvisualkan kompleks antibodi yang berbeda dan menampilkan warna campuran yang jelas jika terjadi ko-lokalisasi.



Gambar 2. Urutan prosedur imunohistokimia multipel dengan memanfaatkan *slide scanner* dan tahapan *destaining* dengan *stripping buffer*

Meskipun berbagai aplikasi kombinasi antibodi bisa disesuaikan dengan tujuan, perhatian khusus perlu diberikan pada kombinasi antibodi primer yang berasal dari sumber klon baik yang sama maupun berbeda seperti: tikus-kelinci, tikus-kambing, tikus-tikus, dan kelinci-kelinci. Penggabungan dua antibodi berpotensi menyebabkan reaksi silang yang tidak diinginkan (menghasilkan positif palsu). Selain masalah antibodi, jika dua antigen terlokalisasi pada struktur seluler yang sama (kolokalisasi), warna campuran yang tervisualisasikan perlu memiliki kontras yang baik dengan dua warna dasar berbeda tersebut. Sehingga, pemilihan kromogen harus didasarkan pada sensitivitas/efisiensi dan resolusi mikroskopis dari produk kromogen yang berbeda warna tersebut.

Berikut adalah contoh studi optimasi untuk penerapan IHC enzimatik multipel dalam penelitian identifikasi dan kuantifikasi berbagai jenis kematian sel pada trombus (jendalan darah) arteri koroner. Metode yang dipilih adalah IHC multipel sekuensial dengan tiga warna kromogen yang berbeda yaitu coklat, merah dan biru.

OPTIMASI IHC MULTIPLE SEKUENSIAL UNTUK MENDETEKSI KEMATIAN SEL PADA TROMBUS KORONER

1. Spesimen

Bahan aspirasi trombus diperoleh dari pasien dengan infark miokard akut (AMI) yang menjalani intervensi koroner perkutan (PCI) sebagai bagian dari pengobatan mereka. Bahan-bahan tersebut ditempatkan dalam formalin dan difiksasi minimal selama 24 jam, kemudian dipreparasi dan disimpan sebagai blok parafin di arsip Departemen Patologi *Academic Medical Center*, Amsterdam, Belanda.

2. Antibodi

Antibodi yang digunakan adalah sebagai berikut: anti-C-reaktif-protein (CRP untuk

nekrosis), anti- (membelah) Caspase-3 (Casp3) untuk apoptosis dan anti-Citrullinated-Histone-3 (CitH3) untuk Etosis.

3. OPTIMASI PROTOKOL IHC MULTIPLE

a. Immunostaining tunggal

Sebelum pengembangan IHC tripel, pertama-tama keberadaan setiap jenis kematian sel harus diidentifikasi dulu dalam spesimen menggunakan IHC enzimatik tidak langsung tunggal. Kompleks imun yang terbentuk divisualisasikan dengan kromogen Vector Nova Red (Vector Laboratories) yang berwarna merah tua dan *dicounterstain* dengan hematoxylin murni (Klinipath).

b. Pewarnaan IHC tripel sekuensial

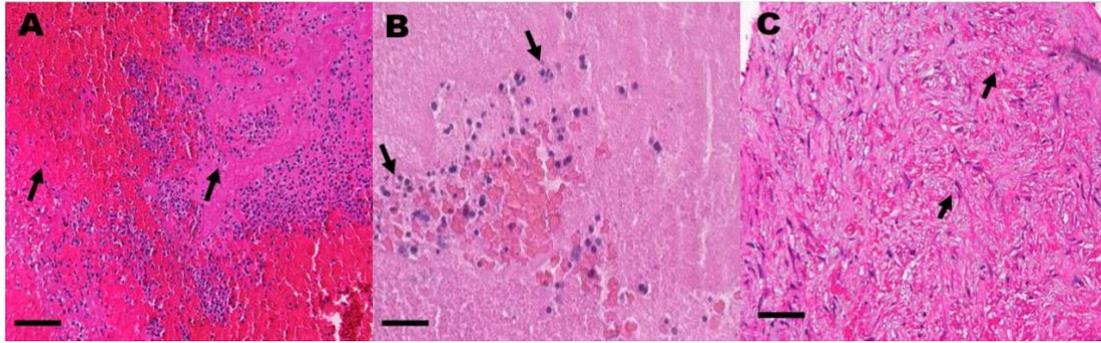
Untuk optimalisasi pewarnaan IHC kombinasi tripel sekuensial, anti-CRP, Casp3 atau CitH3 diujikan sebagai pewarnaan pertama, kedua atau ketiga masing-masing dengan pengenceran yang disesuaikan. Setelah optimasi individu, uji coba dilakukan untuk melihat apakah tiga warna berbeda (coklat, biru dan merah) dapat dibedakan dengan jelas satu sama lain sehingga pewarnaan tripel berurutan dapat dilakukan secara valid dan reliabel. Pewarnaan pertama dilakukan sama seperti pewarnaan tunggal di atas, hanya aktivitas HRP yang divisualisasikan menggunakan DAB (Diaminobenzidine, ImmunoLogic) bukan Vector Nova Red. Pada IHC kedua, antibodi primer diikat dengan *Alkaline Phosphatase* (AP) anti-kelinci (anti-Rb) IgG (*ImmunoLogic*) dan divisualisasikan dengan Perma Blue (*Diagnostic BioSystems*). Tahap *antigen retrieval* kedua hanya dilakukan selama 10 menit pada suhu 98 ° C sebelum pewarnaan individu ketiga yang dilakukan serupa dengan pewarnaan kedua. Hanya tahap kromogen yang akan berbeda karena kita harus menggunakan warna selain coklat dan biru. Jadi, aktivitas AP terakhir divisualisasikan dengan Vector Red (Vector Laboratories) yang berwarna merah. Akhirnya, slide dikeringkan dan ditutup dengan *coverslip*.

c. Analisis Gambar

Analisis IHC tripel sekuensial ini dilakukan dengan pengamatan menggunakan mikroskop spektral (panjang gelombang; 420 hingga 720 nm, interval; 20 nm) dimana gambar multi spektral diambil dari area yang dipilih, menggunakan kamera CRi Nuance (Nuance, Thermo Fisher Scientific), dipasang ke mikroskop Brightfield (Leica CTR5500, Leica).

d. Hasil Optimasi

Contoh representatif dari klasifikasi trombus koroner: segar, litik dan teratur diilustrasikan pada Gambar 3.



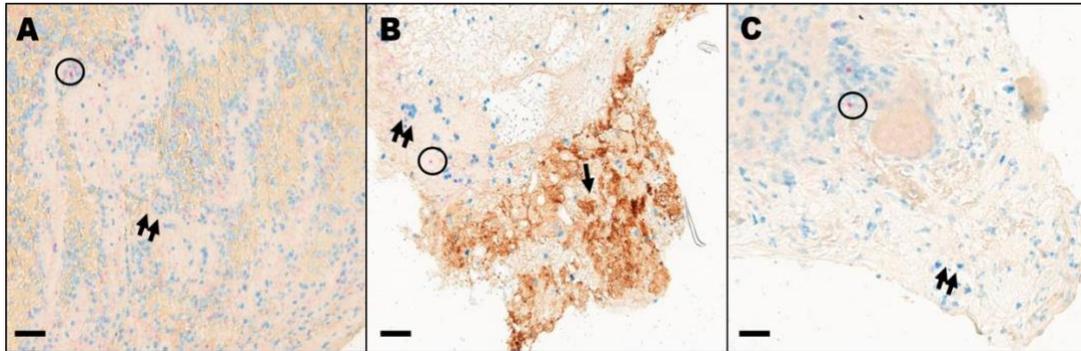
Gambar 3. Klasifikasi spesimen trombus koroner. Gambar-gambar ini diambil dari spesimen berbeda yang diwarnai dengan pewarnaan H&E untuk menunjukkan trombus segar (A), litik (B) dan terorganisir (C). Skala A dan C: 100 μ m, B: 50 μ m.

Pewarnaan imunohistokimia tunggal pertama kali dilakukan untuk mendeteksi adanya tiga jenis kematian sel: nekrosis, apoptosis dan etosis pada spesimen trombosis koroner. Ketiga jenis kematian sel tersebut dapat diamati pada ketiga kategori trombus. Pewarnaan positif dengan anti-CRP ditemukan di area nekrotik seperti bahan plak (inti lipid nekrotik) dan di komponen seluler seperti SMC, sedangkan penanda Casp3 dan CitH3 mewarnai fragmen inti

Tiga antibodi untuk membedakan keberadaan tiga jenis kematian sel secara bersamaan di area yang sama perlu dioptimalkan sehingga penanda nekrosis, apoptosis dan etosis dapat dengan jelas tervisualisasikan. Oleh karena itu, diperlukan studi optimasi yang bertujuan menentukan urutan IHC, metode *antigen retrieval*, pengenceran antibodi dan penentuan kombinasi warna terbaik. Hasilnya digunakan untuk menetapkan protokol IHC tripel sekuensial dari anti-CRP, Casp3 dan CitH3. Untuk mengevaluasi kualitas IHC tripel sekuensial, pola pewarnaan masing-masing antibodi secara hati-hati dibandingkan dengan kontrol dan pewarnaan tunggal. Jika sel dan / atau area tampak menunjukkan pola imunopositif yang sama, dengan demikian protokol pewarnaan IHC enzimatik tripel sekuensial yang dikembangkan adalah valid dan reliabel.

Urutan pewarnaan dan pengenceran antibodi diteliti berdasarkan pengamatan bahwa CRP tidak hanya mewarnai sel tetapi juga area sehingga akan lebih baik dilakukan sebagai pewarnaan pertama. CitH3 dapat muncul sebagai benang fuzzy seperti serat sehingga baik sebagai yang kedua dan akhirnya, Casp3 dilakukan sebagai pewarnaan terakhir. Bersamaan dengan urutan pewarnaan, pengenceran antibodi juga harus disesuaikan dan ditentukan karena pengenceran yang tinggi dari antibodi awal dapat menunjukkan reaksi silang dengan sistem deteksi berikutnya. Berdasarkan hasil optimasi, urutan antibodi untuk IHC tripel sekuensial ditentukan sebagai berikut: CRP (DAB), CitH3 (Perma Blue) dan Casp-3 (Vector Red). Untuk metode pengambilan antigen, karena Casp3 hanya dapat dilakukan dengan Tris-EDTA, HIER pertama dan kedua dilakukan dengan buffer Tris-EDTA. Representatif dari hasil protokol

pewarnaan *IHC enzimatik triplel sekuensial* yang dikembangkan diilustrasikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Contoh representatif pewarnaan *IHC enzimatik triplel sekuensial* untuk secara bersamaan mengidentifikasi nekrosis, apoptosis dan etosis pada bagian yang sama dalam kategori trombus yang berbeda: Segar (A), Litik (B) dan Terorganisir (C). Nekrosis diwarnai dengan anti-CRP (1: 4000) di DAB menunjukkan imunopositif warna coklat (panah hitam), apoptosis diwarnai dengan anti-Casp3 di Vector Red (1: 500) menunjukkan imunopositif warna merah (lingkaran hitam) dan etosis diwarnai dengan Perma Blue (1: 8000) menunjukkan imunopositif warna biru (dua panah hitam). Skala di A: 100 μ m, di B dan C: 50 μ m.

Beberapa kekhawatiran tentang teknik ini yaitu reaktivitas silang dan kombinasi warna juga dibahas dalam studi optimasi ini dimana tiga antibodi yang kami gunakan semuanya berasal dari kelinci, memungkinkan terjadi reaksi silang antara tiga sistem deteksi anti-kelinci (inang serupa). Masalah ini berhasil diatasi dengan menggunakan kromogen DAB saat melakukan imunostaining pertama dengan anti-CRP karena DAB yang memberikan warna coklat membentuk lapisan pelindung yang akan menutupi lapisan kompleks imun pertama secara efektif, sehingga reaksi silang antara antibodi pewarnaan pertama dan kedua dapat diantisipasi. Selain itu, *antigen retrieval* dilakukan dengan langkah HIER di antara pewarnaan kedua dan ketiga mengingat langkah pemanasan ini menunjukkan hasil yang efektif dalam mempertahankan CRP-DAB- pewarnaan pertama atau dalam melindungi CitH3-PermaBlue- pewarnaan kedua. Pada akhirnya, kombinasi tiga warna: coklat, biru dan merah, telah menunjukkan kontras terbaik antara ketiga penanda.

PENUTUP

Secara keseluruhan, pewarnaan IHC enzimatik sekuensial multipel adalah teknik yang bermanfaat dalam memvisualisasikan secara simultan antigen-antigen yang berbeda pada bagian yang sama. Di satu sisi, ini memberikan gambaran langsung tentang keberadaan, lokalisasi dan tingkat ekspresi dari tiga jenis kematian sel secara individual yang dapat saling dibandingkan. Di sisi lain, pewarnaan multipel sekuensial tidak direkomendasikan untuk evaluasi kolokalisasi ekspresi marker karena menghasilkan warna campuran (adanya ekspresi

bersama dari beberapa antigen dalam satu sel) yang mungkin sulit untuk dianalisis.

REFERENSI

- Brinkmann V, Abu Abed U, Goosmann C, et al. Immunodetection of NETs in Paraffin-Embedded Tissue 2016 *Front Immunol* 7: 513
- Goldberg A, Gruberg L, Roguin A, et al. Preprocedural C-reactive protein levels predict myocardial necrosis after successful coronary stenting in patients with stable angina 2006 *Am Heart J* 151: 1265-1270
- Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? 2004 *Hypertension* 44: 6-11
- Kung G, Konstantinidis K, Kitsis RN. Programmed necrosis, not apoptosis, in the heart 2011. *Circ Res* 108: 1017-1036
- Lan HY, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, et al. A novel, simple, reliable, and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody crossreactivity and retrieve antigens 1995 *J Histochem Cytochem* 43: 97-102
- Maagdenberg CG, de Boer OJ, Li X, et al. Time dependent apoptotic rates in the evolving coronary thrombus mass of myocardial infarction patients 2016 *Thromb Res* 145: 12-17
- Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR. Necrotic cell death in atherosclerosis 2011 *Basic Res Cardiol* 106: 749-760
- Masuda S, Nakazawa D, Shida H, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers 2016 *Clin Chim Acta* 459: 89-93
- van den Brand M, Hoevenaars BM, Sigmans JH, et al. Sequential immunohistochemistry: a promising new tool for the pathology laboratory 2014 *Histopathology* 65: 651-657
- van der Loos CM Immunohistochemistry is not the same as immunocytochemistry 2010 *Biotech Histochem* 85: 325-326
- van der Loos CM Multiple immunoenzyme staining: methods and visualizations for the observation with spectral imaging 2008 *J Histochem Cytochem* 56: 313-328
- van der Loos CM, Becker AE, van den Oord JJ Practical suggestions for successful immunoenzyme double-staining experiments 1993 *Histochem J* 25: 1-13
- van der Loos CM, Das PK, Houthoff HJ An immunoenzyme triple-staining method using both polyclonal and monoclonal antibodies from the same species. Application of combined direct, indirect, and avidin-biotin complex (ABC) technique 1987 *J Histochem Cytochem* 35: 1199-1204
- Van Vre EA, Ait-Oufella H, Tedgui A, et al. Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis 2012 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 887-893
- Yang Y, Jiang G, Zhang P, et al. Programmed cell death and its role in inflammation 2015 *Mil Med Res* 2: 12

