



EXAMENSARBETE

Våren 2013

Sektionen för Lärande och Miljö
Biomedicinsk laboratorievetenskap

Optimering av protokoll för immunhistokemisk färgning med antikroppen anti-TLR4

Författare

Alexander Jeppsson

Handledare

Annette Persson

Examinator

Ann-Sofi Rehnstam-Holm

Populärvetenskaplig text

Kroppens immunförsvar innehåller viktiga receptorer som skyddar kroppen mot bakterier. En grupp av dessa receptorer kallas för Toll-receptorer (TLR). I hjärnans makrofager, som heter mikroglia-celler, finns toll-receptor 4 (TLR4) som medverkar till att aktivera immunförsvaret snabbt vid bland annat en hjärnblödning. Immunhistokemi är en metod för att påvisa proteiner i tunna vävnadssnitt med hjälp av primära antikroppar som är riktade mot speciella inbindningsställen (epitoper) på antigenet. När primär antikroppen binder in till antigenet bildas ett komplex som man sen låter en så kallad sekundär antikropp binda in till. Den sekundära antikroppen är märkt med ett ämne (kromogen) som kan omvandlas till en färg. Denna färg är synlig i ljusmikroskop och genom mikroskopering kan man därför påvisa om inbindning av primär antikropp har skett och var i vävnaden inbindningen sitter.

Denna studie genomfördes på avdelningen för patologi vid Lunds Universitet och gick ut på att optimera ett protokoll för immunhistokemisk färgning med en antikropp riktad mot TLR4. Framtaget protokoll är tänkt att användas på vävnadssnitt från hjärnvävnad för att fördjupa kunskaperna om hur inflammation och TLR4 fungerar vid en stroke.

Materialet som användes i denna studie var formaldehydfixerad, paraffinbäddad vävnad som sparats som paraffinklossar i arkivet vid Klinisk Patologi i Lund. Vävnaden bestod av normal placenta, normal hjärtmuskel, koloncancer samt hjärnvävnad från tre stroke-fall. Normal placenta samt koloncancer användes som positiv kontroll, där TLR4 ska uttryckas i cellmembran och cytoplasma i speciella celler. Normal hjärtmuskel användes som negativ kontroll eftersom hjärtmuskelcellerna inte har något uttryck av TLR4. Från vävnadsklossarna skars tunna snitt (4 mikrometer) med hjälp av en mikrotom och snitten placerades på objektglas. För att immunhistokemisk infärgning ska vara möjlig krävs det att snitten genomgår olika förbehandlingssteg. Först togs paraffinet bort från vävnaden genom avparaffinering med hjälp av xylol och etanol 99% och sen rehydrerades (återfuktades) vävnaden med hjälp av 95% etanol och avjonat vatten. Detta är ett viktigt steg i processen eftersom kvarvarande paraffin kan förhindra antikroppen att binda in.

När vävnad fixeras med formaldehyd göms epitoper på grund av korsbindningar som uppstår i vävnaden. Nästa förbehandlingssteg i processen är därför en så kallad epitopåtervinning, vilket innebär att antigen åter görs synliga så inbindning av antikropp kan ske. Epitopåtervinning görs genom att vävnadssnitten placeras i en buffert som sedan värms upp

till kokpunkt. Värmen vid kokning medför att korsbindningarna i vävnaden bryts och antigenet blir då åter tillgängligt. I denna studie testades olika buffertar för epitopåtervinning; Citratbuffert pH 6.0, EDTA-buffert pH 8.0 samt DAKO-Citratbuffert pH 6.0.

Efter dessa förbehandlingssteg färgades vävnadssnitten i ett immunfärgningsinstrument. I instrumentet fanns ett program där inställningar gjordes för vilken ordning lösningar skulle tillsättas, mängd lösning på varje snitt och tiden för hur länge varje lösning skulle verka på snitten. Flera olika spädningar av primär antikroppen testades samt två olika varianter av märkt sekundär antikropp, en variant som kallas streptavidin-biotin och en som kallas EnVision. När immunfärgningsinstrumentet hade färgat in samtliga vävnadssnitt, utfördes dehydrering av vävnadssnitten med 95% etanol, 99% etanol samt xylen. Sedan monterades vävnadssnitten med ett täckglas som klistras över snittet med hjälp av monteringslim. Objektsglasen med vävnadssnitten fick därefter torka innan mikroskopering.

Vid mikroskopering undersöktes olika detaljer i vävnaden med hjälp av förutbestämda kriterier. För positiv kontroll undersöktes till exempel om positiv infärgning i celler var specifik och när det fanns positiv infärgning bedömdes det hur stark infärgningen var. För negativ kontroll noterades om någon infärgning fanns eller ej.

Bäst resultat visade ett protokoll där epitopåtervinning gjorts med Citratbuffert pH 6.0, TLR4-antikroppen späts till 1:400 och streptavidin-biotinvarianten använts som sekundär antikropp. I vävnad från positiva kontroller sågs då en positiv specifik infärgning, men styrkan kunde ha varit något bättre. Detta för att det skall vara lättare att säkert identifiera var antikroppen har bundit in. Negativ kontroll visade ingen infärgning vilket visar att antikroppen är specifik och är säker att använda. Resultatet visade också att antikroppen fungerar att använda vid bedömning av TLR4-uttryck i vävnad från stroke-fall. För att man i framtida undersökningar enklare skall kunna urskilja var i vävnaden antikroppen har bundit in, så rekommenderas dock ytterligare tester. Förslagsvis kan ett förstärkningssteg, andra varianter av sekundär antikropp och andra förbehandlingsbuffertar testas, för att ta reda på om färgstyrkan vid positiv specifik infärgning går att förbättra.

Abstract

Toll-receptorer (TLR) är transmembrana receptorer som är viktiga i det förvärvade immunförsvaret och den inflammatoriska responsen. TLR4 är en toll-receptor som finns i hjärnans mikroglia-celler och som aktiveras snabbt vid bland annat en hjärnblödning. TLR4 aktiveras av lipopolysackarider från gramnegativa bakterier och sätter igång en signalkaskad, som ser till att produktion av inflammatoriska cytokiner startar. Syftet med denna studie var att optimera ett protokoll för immunhistokemisk färgning (IHC) med en antikropp riktad mot TLR4 för formaldehydfixerat, paraffinbäddat vävnadsmaterial. Metoden är tänkt att användas för att fördjupa kunskaperna om inflammation och TLR4-uttryck i hjärnvävnad vid stroke. Materialet i studien bestod av vävnad från normal placenta (n=1), normal hjärtmuskel (n=1), koloncancer (n=1) samt hjärnvävnad från stroke-fall (n=3) med och utan ischemisk infarkt. Placenta och koloncancer fungerade som positiva kontroller och hjärtmuskel som negativ. Vävnaden snittades (4 µm) och immunfärgades maskinellt. Anti-TLR4 antikropp (monoklonal mus klon 76B357.1, Abcam) användes som primär antikropp. Tre buffertar testades för epitopåtervinning, Citratbuffert 10mM pH 6.0, EDTA-buffert 1mM pH 8.0 samt DAKO-Citratbuffert 10mM pH 6.0. För visualisering testades två olika system, EnVision och labelled streptavidin-biotin (LSAB). Utvärdering gjordes genom mikroskopering enligt förutbestämda kriterier, totalt 50 vävnadssnitt undersöktes. Spädning 1:400 för primär antikropp visade bättre infärgning än övriga spädningar som testades. Citratbuffert 10mM pH 6.0 var att föredra framför övriga testade buffertar och visualiseringssystemet LSAB gav bättre resultat än EnVision. Ingen infärgning sågs i snitt från negativa kontroller och i snitt färgade utan primär antikropp. Ett färgningsprotokoll med spädning 1:400 för primär antikropp, LSAB som detektionssystem och Citratbuffert pH 6.0 vid epitopåtervinning gav det mest optimala resultatet för samtliga preparat. Färgintensiteten kunde dock ha varit starkare vid specifik positiv inmärkning för att tydliggöra inbunden primär antikropp i vävnadssnittet. Fler test med exempelvis tyramin-amplifieringsmetod, annat detektionssystem, andra buffertar och blockeringssteg bör därför göras för att om möjligt optimera intensitet för specifik positiv inmärkning ytterligare. Metoden fungerar för de tänkta studierna av TLR4-uttryck vid stroke.

Toll-receptors (TLR) are transmembrane receptors of importance for the innate immune system and the inflammatory response. TLR4 is a toll-receptor involved in the microglial cells of the brain and is rapidly activated during a stroke. TLR4 is activated by lipopolysaccharide from gram-negative bacteria triggers a signalling cascade to produce inflammatory cytokines. The purpose of this study was to optimize a protocol for immunohistochemistry (IHC) with an antibody against TLR4 for formaldehyde-fixed, paraffin-embedded tissue. The method is developed to be used in studies to enhance our knowledge about inflammation and TLR4-expression in brain tissue during a stroke. The study involved tissues from normal placenta (n=1), normal heart muscle (n=1), colon cancer (n=1) and brain tissue from stroke (n=3) with and without cerebral ischemia. Placenta and colon cancer was used as positive controls and heart muscle as negative control. The tissue was sectioned (4 μ m) and automatically immunostained in a staining machine. Anti-TLR4 antibody (monoclonal mouse clone 76B357.1, Abcam) was used as primary antibody. Three different buffers were used for heat-induced epitope retrieval (HIER), Citrate buffer 10mM pH 6.0, EDTA buffer 1mM pH 8.0 and DAKO-Citrate buffer 10mM pH 6.0 (DAKO). Two different systems was tested as visualization, EnVision and labelled streptavidin-biotin (LSAB). In total 50 tissue sections were stained and evaluated microscopically in a light microscope according to a set of criteria. Dilution 1:400 for primary antibody showed a visually acceptable moderate staining intensity for positive specific staining compared to other dilutions tested. Citrate buffer 10mM pH 6.0 for HIER showed best result and LSAB as visualization system was to prefer before EnVision. No unspecific staining was found in the tissue of negative controls and in tissues stained without primary antibody. A protocol with the following components, primary antibody dilution 1:400, LSAB as visualization system and citrate buffer pH 6.0 as HIER-buffer showed best result in all tissues stained. The staining intensity for specific positive staining might be stronger to distinct specific positive binding of primary antibody in the sections. To increase and further optimize the staining intensity, additional tests needs to be done with for example, tyramide signal amplification-method, another visualization system, other buffer and blocking solutions. The method is possible to use in future studies of TLR4-expression in brain tissue during stroke.

Förord

Jag vill tacka Annette Persson som ställt upp på att vara min handledare och vi har haft många roliga stunder under detta examensarbete. Jag vill också tacka övrig personal på klinisk patologi vid Lunds universitet som har bidragit med material och för att jag har fått använda deras utrustning till mitt examensarbete.

Innehållsförteckning

Populärvetenskaplig text	3
Abstract	5
Förord	7
Introduktion	9
Material och metod.....	11
Resultat.....	15
Diskussion	26
Slutsats	28
Referenser.....	28
Appendix 1	30
Appendix 2	31
Appendix 3	33

Introduktion

Toll-receptorer (TLR) är transmembrana receptorer som är viktiga i det förvärvade immunförsvaret och den inflammatoriska responsen. Hos människa har 11 olika TLR med varierande uppgifter upptäckts. Dessa har förmåga att finna bland annat virus, bakterier och parasiter. TLR som finns i cellmembranet är TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 och TLR10. TLR4 finns i hjärnans mikroglia-celler och aktiveras snabbt vid bland annat en hjärnblödning (Fang et al. 2013). TLR4 aktiveras av lipopolysackarider från gramnegativa bakterier och sätter igång en signalkaskad, som ser till att produktion av inflammatoriska cytokiner startar (Okun et al. 2011).

Immunhistokemi (IHC) är en histologisk teknik där man utnyttjar antikroppar för att påvisa proteinuttryck i vävnadssnitt. Vävnadssnittet inkuberas med en primär antikropp som binder in till epitoper på antigenet, om detta uttrycks i vävnaden. Epitop är en kort aminosyrasekvens på ett antigen. För att få en visuell bild över inbunden primär antikropp används vanligtvis en märkt sekundär antikropp som binder in till primär antikropp. Märkningen kan med hjälp av olika tekniker omvandlas till en färg synlig i ljusmikroskop och åskådliggöra om det i preparatet finns ett antigenuttryck. För varje enskild antikropp krävs att ett färgningsprotokoll testas ut och optimeras vad gäller lämplig spädning, förbehandling och i vissa fall även detektionssystem. Detta för att få en pålitlig färgning så vävnadspreparatet inte får ett falskt positivt resultat på grund av ospecifik inbindning, samt för att få så bra visuell bild som möjligt i ljusmikroskop (Cook, 2006).

EnVision och streptavidin-biotin-metod är två olika detektionssystem som används vid IHC. EnVision är en metod som använder sig av dextranpolymer-teknik där en stor mängd molekyler av enzymet pepparrotsperoxidas (horseradish peroxidase, HRP) och sekundär antikroppar kopplats till en ryggrad av dextran. Streptavidin-biotin (labelled streptavidin-biotin, LSAB) är en metod som använder sig av en sekundär antikropp som märkts in med biotin, som har hög affinitet för streptavidin, och med HRP-molekyler. Enzymet HRP fälls ut när det kommer i kontakt med 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydroklorid (DAB) och ger då en brun färg på de platser där inbindning av primär antikropp har skett. DAB används för visualisering för både EnVision och LSAB (Vyberg, 2000).

Fixering med formaldehyd gör så att nedbrytningsprocesser i vävnaden upphör, genom att binda in formaldehydmolekyler till protein i vävnaden. Inbundna formaldehydmolekyler korsbinder sedan och skapar ett nätverk av metylenbryggor. Detta bevarar vävnadens struktur men nätverket gömmer epitoper. Det bildas också kalciumkomplex som orsakar förändringar i epitopers struktur, vilket försvårar den immunhistokemiska färgningen. Dessa kan delvis återskapas med hjälp av värmeinducerad epitopåtervinning (HIER) där man använder sig av en buffert och värme vilket precipiterar kalciumjonerna (Fox et al. 1985). HIER bryter också en del av korsbindningarna som uppkommer vid fixering och gör det lättare för primär antikroppen att binda in. Det finns olika värmekällor som kan användas vid HIER, bland annat mikrovågsugn, autoklav eller vattenbad (Shi et al. 1991). Valet av buffert kan vara avgörande för hur effektiv epitopåtervinningen blir i vävnadssnittet. Ett neutralt pH har visat sig vara mer anpassat för vissa specifika antikroppar/antigen, medan ett surt eller basiskt pH ger en bättre inmärkning för andra specifika antikroppar/antigen. Vävnadens morfologi påverkas dessvärre oftast negativt vid behandling i en buffert med surt eller basiskt pH (Vyberg, 2000). Det finns också en risk att uttryck av endogent biotin i vävnaden ökar (Key, 2006). HIER genomförs genom att vävnadssnitten placeras i en buffert i värmekällan och bufferten värms upp till kokning under en bestämd tid. Snitten ställs för avsvälning i bufferten och placeras sedan i destillerat vatten. Därefter är vävnadssnitten redo för immunhistokemisk färgning (Shi et al. 1991).

Syftet med denna studie var att optimera ett protokoll för immunhistokemisk färgning med antikroppen anti-TLR4 på formaldehydfixerat, paraffinbäddat material. Metoden är tänkt att användas för att fördjupa kunskaperna om inflammation och TLR4-uttryck i hjärnvävnad vid stroke. Denna studie genomfördes på Avdelningen för patologi vid Lunds universitet.

Material och metod

I denna studie användes anti-TLR4 antikropp (monoklonal mus klon 76B357.1, Abcam) som primär antikropp vid IHC av vävnadssnitt. För att detektera eventuell inbunden primär antikropp vid körning med LSAB användes kittet Dako Real™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO). I kittet ingår följande komponenter: Dako REAL™ Link, Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP), Dako REAL™ DAB+ Chromogen och Dako REAL™ HRP Substrate Buffer.

Vid körning med EnVision-metoden användes följande kit; Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (DAKO). Komponenter som ingick i detta kit var Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV), Dako REAL™ HRP Substrate Buffer och Dako REAL™ DAB+ Chromogen.

Övriga komponenter som behövdes vid IHC, men som inte ingick i dessa kit, var Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (DAKO), Hematoxylin samt EnVision™ FLEX wash buffer (20x, DAKO) som användes som sköljbuffert.

Buffertar som användes vid HIER var Citratbuffert 10mM pH 6.0, EDTA-buffert 1mM pH 8.0 samt DAKO-Citratbuffert 10mM pH 6.0 (10x, DAKO). Vid blandning av Citratbuffert vägdes 2.1g citronsyra upp och löstes i 1 liter avjonat vatten. Vid beredning av EDTA-buffert 1mM pH 8.0 vägdes 0.372 g EDTA upp och löstes i 1 liter avjonat vatten. DAKO-Citratbuffert pH 6.0 var en färdigblandad köpt lösning som spädades till koncentrationen 1:10 med avjonat vatten. Justering av pH utfördes genom tillsats av 2M natrium hydroxid till pH 6.0 för citratbuffert samt till pH 8.0 för EDTA-buffert, detta åskådliggjordes med hjälp av pH-meter (SCHOTT). Respektive buffert förvarades i en litersbehållare som märktes upp enligt laboratoriets föreskrifter med namn samt datum och förvarades i kyl (PHILIPS Whirlpool), 2-6°C.

Vävnadsmaterialet som användes i studien var humant formaldehydfixerat, paraffinbäddat material som sparats i arkivet vid Klinisk Patologi Lund, Labmedicin Skåne. Materialet bestod av normal placenta (n=1), hjärtmuskel (n=1), koloncancer (n=1) samt hjärnvävnad från stroke-fall (n=3) med och utan ischemisk infarkt. Totalt färgades och utvärderades 50 snitt. Valet av preparat utgick framförallt från rekommendationer i företagets datablad som följer med antikroppen vid inköp (Abcam). Enligt Abcam är uttrycket av TLR4 högt i trofoblaster i

placenta medan uttrycket av TLR4 är lågt i hjärtmuskelceller. Därför användes placenta som positiv kontroll samt hjärtmuskel som negativ kontroll vid samtliga IHC-körningar i denna studie. Enligt Xu et al. (2011) finns ett högt uttryck av TLR4 i tumörceller i koloncancer som kan påvisas med IHC. Därför användes även koloncancer som positiv kontroll vid vissa körningar. För att utesluta ospecifik inbindning av sekundär antikropp, endogent biotin eller peroxidas färgades snitt utan primär antikropp. Utprövat protokoll testades slutligen på snitt från stroke-fall för att få en uppfattning om metodens användbarhet i fortsatt tänkt projekt. Övrigt material som användes i denna studie redovisas i appendix 1.

Från respektive preparat snittades 4 µm tjocka snitt med hjälp av en mikrotom (HM 440E, Cellab). Vävnadssnitten fästes på positivt laddade objektsglas (Thermo scientific, Menzलगläser, Superfrost® plus) sträcktes ut på sträckbänk och fick sedan torka. När vävnadssnitten var torra placerades de i värmeskåp 60°C (Heraeus) i 60 minuter, vilket gör att vävnadssnitten fäster bättre på objektsglasen. Samtliga vävnadssnitt placerades i en objektsglashållare och förvarades i kyl (PHILIPS Whirlpool), 2-6°C, inför IHC.

Innan IHC utfördes avparaffinering samt rehydrering av snitt för hand enligt följande protokoll; 5 min xylén, 3 min 99% etanol, 3 min 95% etanol samt 2 min i destillerat vatten. Detta utfördes i dragskåp med timer (Nordic Time) för att tiden skulle vara exakt samma vid samtliga körningar. Xylén och 99% etanol användes för att lösa upp och avlägsna paraffin i vävnadssnitt och 95% etanol och destillerat vatten användes för rehydrering av vävnaden, för att undvika att snitten skulle torka ut.

Därefter utfördes HIER för epitopåtervinning i utvald buffert, Citratbuffert 10mM pH 6.0, EDTA-buffert 1mM pH 8.0 eller DAKO-Citratbuffert 10mM pH 6.0. Buffert hälldes upp i en kyvett till en volym tillräcklig för att täcka snitten på samtliga objektsglas. Kyvetten placerades sedan i mikrovågsugn (PHILIPS Whirlpool, JT356) för kokning av vävnadssnitt vid 100°C i 10 minuter. Buffert med vävnadssnitt fick sedan svalna i rumstemperatur (RT) i 25 min innan vävnadssnitten överfördes till destillerat vatten.

Vid IHC användes färginstrumentet DAKO Autostainer Plus som utförde samtliga moment i infärgningen maskinellt. För att programmera olika steg vid IHC användes datorprogrammet Autostain 441, där antal glas och identitetsnummer angavs. Val av primär antikropp, sekundär antikropp, blockeringslösning samt kontrastfärgning registrerades också. Respektive programmerad inställning samt identitetsnummer återfanns på en streckkod som skrevs ut och

placerades på respektive objektglas. Informationen i streckkoden lästes sedan av färgningsinstrumentet och styrde instrumentet att använda valt program för respektive vävnadssnitt.

Inför körning mättes olika lösningarna upp och späddes. Primär antikropp späddes till koncentration 1:100, 1:300, 1:400, 1:500 eller 1:1000 beroende på vilket protokoll som skulle testas. Testet inleddes med citratbuffert pH 6.0 vid HIER och koncentration 1:100 för primär antikropp enligt rekommendation från Abcam. HIER med de olika buffertarna testades tillsammans med LSAB respektive EnVision för att undersöka vad som gav bäst resultat. För mer information om testade spädningar, buffertar och detektionssystem vid respektive körning se appendix 2. Övriga lösningar späddes efter tillverkarens anvisningar.

Immunhistokemisk protokoll för LSAB innehöll följande steg:

1. 200 µl primär antikropp (TLR4) placerades på respektive vävnadssnitt och fick verka i 30 minuter.
2. 200 µl sekundär antikropp (biotin) placerades på respektive vävnadssnitt och fick verka i 25 minuter för att binda till primär antikropp. Innehåller block för endogent biotin.
3. 200 µl Hp-block tillsattes och fick verka i 8 minuter för att blockera peroxidasaktivitet som förekommer normalt i vävnad. Detta för att undvika en falsk positiv färgutfällning.
4. 200 µl Streptavidin-peroxidas tillsattes och fick verka i 25 min, streptavidin har hög affinitet till biotin och bildar komplexet streptavidin-biotin.
5. 200 µl DAB tillsattes två gånger och fick verka i 2x5 minuter på respektive vävnadssnitt, för att få en färgreaktion mellan DAB och HRP.
6. 200 µl Hematoxylin tillsattes och fick verka i 5 min på respektive vävnadssnitt, för att färga in cellkärnor.

I protokoll för EnVision utgår steg 2 och steg 4 ersätts med EnVision/HRP.

Mellan respektive steg utfördes tvättning av vävnadssnitt med hjälp av destillerat vatten eller tvättbuffert.

Efter avslutad immunhistokemisk färgning, placerades objektglasen i en kyvett som fick stå under rinnande kranvatten (25°C) i 15 minuter för "blåning", vilket ger en intensivare blå färg av hematoxylin. Därefter genomfördes dehydrering av vävnadssnitten enligt följande protokoll; 3 min 95% etanol, 3 min 99% etanol och 5 min xylen.

När dehydrering genomförts, monterades objektsglasen med täckglas (Thermo scientific, Menzel-gläser) och monteringsmedel (Pertex, Histolab). Detta utfördes för hand i dragskåp och glasen fick därefter torka innan utvärdering. Granskning av respektive vävnadssnitt genomfördes genom mikroskopering med ljusmikroskop (Nikon Eclipse 50i) och mikroskopbilder togs med hjälp av en mikroskopkamera (Olympus UC30) med tillhörande mjukvara (CellSens dimension).

Utvärdering av IHC gjordes genom mikroskopering av varje enskilt vävnadssnitt och kriterier redovisas i appendix 3.

Resultat

Körning 1

Positiv kontroll (placenta)

HIER med citratbuffert pH 6.0 och spädning 1:100 för TLR4 visade något bättre resultat med lite tydligare kärnfärgning än förbehandling med DAKO-citratbuffert pH 6.0 med LSAB som detektionssystem. Positiv inmärkning i celler var dock inte specifik utan infärgning fanns till viss del även i cellkärnor. Färgintensiteten för båda positiv inmärkning och bakgrundsinfärgning var mycket stark (tabell 1, figur 1A och B, figur 2A och B).

Utan primär antikropp

Ingen positiv inmärkning fanns i vare sig placenta eller hjärtmuskel. Resultatet var samma för båda förbehandlingsbuffertarna med LSAB som detektionssystem (figur 3A respektive figur 4A).

Negativ kontroll

Hjärtmuskelceller visade ingen positiv inmärkning oberoende av vilken buffert som använts vid Hier med LSAB som detektionssystem (figur 4B).

Körning 2

Positiv kontroll (placenta)

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:300 samt 1:500 för TLR4 visade positiv specifik inmärkning med måttlig intensitet för positiv inmärkning och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 1, figur 1C och figur 2C). Spädning 1:1000 med samma förutsättningar för Hier och detektionssystem visade svag positiv inmärkning och ingen bakgrund (tabell 1, figur 1D och figur 2D). Hier med EDTA pH 8.0, detektionssystem EnVision och spädning 1:300 för TLR4 bedömdes ha en svag positiv inmärkning utan bakgrundsinfärgning (tabell 1, figur 1E och figur 2E).

Utan primär antikropp

Ingen positiv inmärkning fanns i vare sig placenta eller hjärtmuskel. Resultatet var samma för båda förbehandlingsbuffertarna och för båda detektionssystemen.

Negativ kontroll

Hjärtmuskelceller visade ingen positiv inmärkning oberoende av spädning för TLR4, använd buffert vid HIER eller detektionssystem.

Körning 3

Positiv kontroll (placenta)

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:300, 1:400 samt 1:500 för TLR4 visade måttlig intensitet vid positiv specifik inmärkning och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 1, figur 1F och G, figur 2F och G).

Positiv kontroll (koloncancer)

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:300 samt 1:400 för TLR4 visade måttlig intensitet vid positiv specifik inmärkning och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 2, figur 1H, Figur 2H). Spädning 1:500 med samma förutsättningar för HIER och detektionssystem visade en svag intensitet vid positiv specifik inmärkning och svag bakgrundsinfärgning (tabell 2).

Utan primär antikropp

Ingen positiv inmärkning fanns i koloncancer (figur 3B).

Negativ kontroll

Hjärtmuskelceller visade ingen positiv inmärkning oberoende vilken spädning som använts med citratbuffert pH 6.0 vid HIER samt LSAB som detektionssystem.

Körning 4

Positiv kontroll (placenta)

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem EnVision och spädning 1:400 för TLR4 visade ingen positiv specifik inmärkning och ingen intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 1, figur 1 I, figur 2 I).

Positiv kontroll (koloncancer)

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem EnVision och spädning 1:400 för TLR4 visade ingen positiv specifik inmärkning och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 2).

Utan primär antikropp

Ingen positiv inmärkning fanns i vare sig placenta, hjärtmuskel eller koloncancer.

Negativ kontroll

Hjärtmuskelceller visade ingen positiv inmärkning vid användning av detektionssystemet EnVision och spädning 1:400 för TLR4.

Körning 5

Positiv kontroll (placenta)

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:400 för TLR4 visade måttlig positiv specifik inmärkning och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 1).

Utan primär antikropp

Ingen positiv inmärkning fanns i hjärtmuskel vid användning av citratbuffert pH 6.0 vid HIER samt detektionssystemet LSAB.

Negativ kontroll

Hjärtmuskelceller visade ingen positiv inmärkning vid användning av detektionssystemet LSAB samt spädning 1:400 för TLR4.

Stroke-fall 1

Yngre infarkt, 1-2 veckor

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:400 för TLR4 visade stark positiv specifik inmärkning hos positiva kärl, måttlig intensitet hos positiva makrofager/mikroglia-celler och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 3, figur 5A, B).

Ej infarkt

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:400 för TLR4 visade svag positiv specifik inmärkning hos positiva kärl, ingen infärgning hos makrofager/mikroglia-celler och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 3, figur 5C).

Utan primär antikropp

Ingen positiv inmärkning fanns i hjärnvävnad (figur 5D).

Stroke-fall 2

Äldre infarkt, mer än 1 månad

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:400 för TLR4 visade mycket stark positiv specifik inmärkning hos positiva kärl, stark intensitet hos positiva makrofager/mikroglia-celler och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 3).

Gränsson, ej infarkt

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:400 för TLR4 visade stark positiv specifik inmärkning hos positiva kärl, svag intensitet hos positiva makrofager/mikroglia-celler och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 3).

Utan primär antikropp

Ingen positiv inmärkning fanns i hjärnvävnad.

Stroke-fall 3

Äldre infarkt, mer än 1 månad, område 1

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:400 för TLR4 visade måttlig positiv specifik inmärkning hos positiva kärl, ingen infärgning hos makrofager/mikroglia-celler och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 3).

Äldre infarkt, mer än 1 månad, område 2

HIER med citratbuffert pH 6.0, detektionssystem LSAB och spädning 1:400 för TLR4 visade stark positiv specifik inmärkning hos positiva kärl, ingen infärgning hos makrofager/mikroglia-celler och svag intensitet för bakgrundsinfärgning (tabell 3).

Utan primär antikropp

Ingen positiv inmärkning fanns i hjärnvävnad.

Tabell 1, Resultat för positiv kontroll (placenta) vid IHC med TLR4 som primär antikropp vid körning 1, 2, 3, 4 och 5.

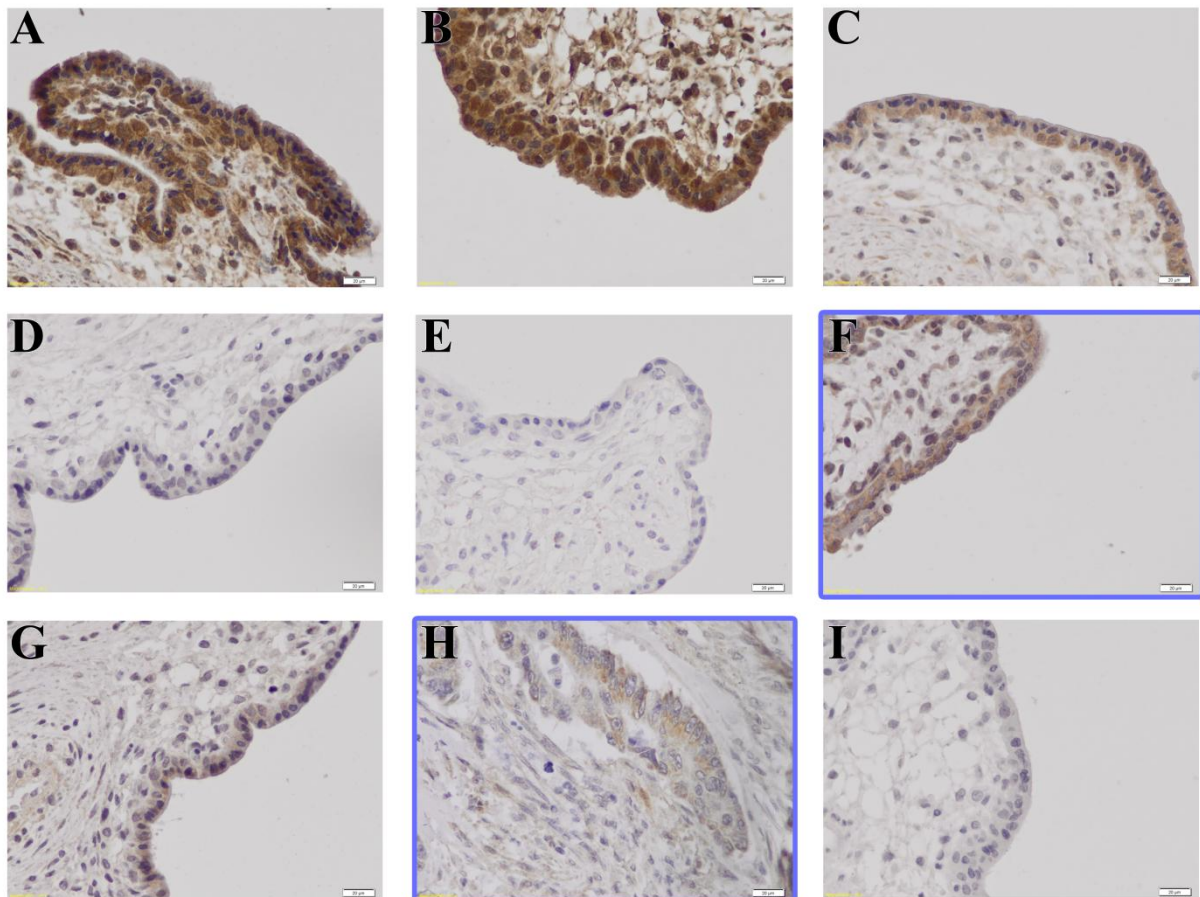
Positiv kontroll (Placenta) med primär antikropp	Körning 1		Körning 2				Körning 3			Körning 4	Körning 5
	Dako pH6 1:100 LSAB	Citrat pH6 1:100 LSAB	Citrat pH6 1:300 LSAB	Citrat pH6 1:500 LSAB	Citrat pH6 1:1000 LSAB	EDTA pH8 1:300 EnVision	Citrat pH6 1:300 LSAB	Citrat pH6 1:400 LSAB	Citrat pH6 1:500 LSAB	Citrat pH6 1:400 EnVision	Citrat pH6 1:400 LSAB
Är positiv inmärkning i celler specifik?											
<input type="radio"/> Ja			X	X			X	X	X		X
<input type="radio"/> Nej	X	X			X	X				X	
Färgintensitet vid positiv inmärkning											
<input type="radio"/> Ingen inmärkning										X	
<input type="radio"/> Svag					X	X					
<input type="radio"/> Måttlig			X	X			X	X	X		X
<input type="radio"/> Stark											
<input type="radio"/> Mycket stark	X	X									
Färgintensitet vid bakgrundsinfärgning											
<input type="radio"/> Ingen inmärkning					X	X				X	
<input type="radio"/> Svag			X	X			X	X	X		X
<input type="radio"/> Måttlig											
<input type="radio"/> Stark											
<input type="radio"/> Mycket stark	X	X									

Tabell 2, Resultat för positiv kontroll (koloncancer) vid IHC med TLR4 som primär antikropp vid körning 3 och 4.

Positiv kontroll (Koloncancer) med primär antikropp	Körning 3			Körning 4
	Citrat pH6 1:300 LSAB	Citrat pH6 1:400 LSAB	Citrat pH6 1:500 LSAB	Citrat pH6 1:400 EnVision
Är positiv inmärkning i celler specifik?				
<input type="radio"/> Ja	X	X	X	
<input type="radio"/> Nej				X
Färgintensitet vid positiv inmärkning				
<input type="radio"/> Ingen inmärkning				X
<input type="radio"/> Svag			X	
<input type="radio"/> Måttlig	X	X		
<input type="radio"/> Stark				
<input type="radio"/> Mycket stark				
Färgintensitet vid bakgrundsinfärgning				
<input type="radio"/> Ingen inmärkning				
<input type="radio"/> Svag	X	X	X	X
<input type="radio"/> Måttlig				
<input type="radio"/> Stark				
<input type="radio"/> Mycket stark				

Tabell 3, Resultat för stroke-fall 1 (yngre infarkt, 1-2 veckor) och (ej infarkt), stroke-fall 2 (äldre infarkt, mer än 1 månad) och (gränsszon, ej infarkt) samt stroke-fall 3 (äldre infarkt, mer än 1 månad, område 1) och (äldre infarkt, mer än 1 månad, område 2) vid IHC med TLR4 som primär antikropp vid körning 5.

Stroke-fall (Citrat pH6, LSAB, 1:400)	Körning 5					
	Stroke-fall 1		Stroke-fall 2		Stroke-fall 3	
	Yngre infarkt (1-2 veckor)	Ej infarkt	Äldre infarkt (mer än 1 månad)	Gränsszon (ej infarkt)	Äldre infarkt (mer än 1 månad) Område 1	Äldre infarkt (mer än 1 månad) Område 2
Finns positiv specifik inmärkning?						
<input type="radio"/> Ja	X	X	X	X	X	X
<input type="radio"/> Nej						
Färgintensitet vid bakgrundsinfärgning						
<input type="radio"/> Ingen inmärkning						
<input type="radio"/> Svag	X	X	X	X	X	X
<input type="radio"/> Måttlig						
<input type="radio"/> Stark						
<input type="radio"/> Mycket stark						
Färgintensitet hos positiva kärl						
<input type="radio"/> Ingen inmärkning						
<input type="radio"/> Svag		X				
<input type="radio"/> Måttlig					X	
<input type="radio"/> Stark	X			X		X
<input type="radio"/> Mycket stark			X			
Färgintensitet hos positiva makrofager/mikroglia-celler						
<input type="radio"/> Ingen inmärkning		X			X	X
<input type="radio"/> Svag				X		
<input type="radio"/> Måttlig	X					
<input type="radio"/> Stark			X			
<input type="radio"/> Mycket stark						



Figur 1, Positiv kontroll, blå ruta illustrerar snitt färgade enligt, för studien, optimalt protokoll. (A) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:100, Detektionssystem: LSAB.

(B) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Dako pH6, Spädning: 1:100, Detektionssystem: LSAB.

(C) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:300, Detektionssystem: LSAB.

(D) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:1000, Detektionssystem: LSAB.

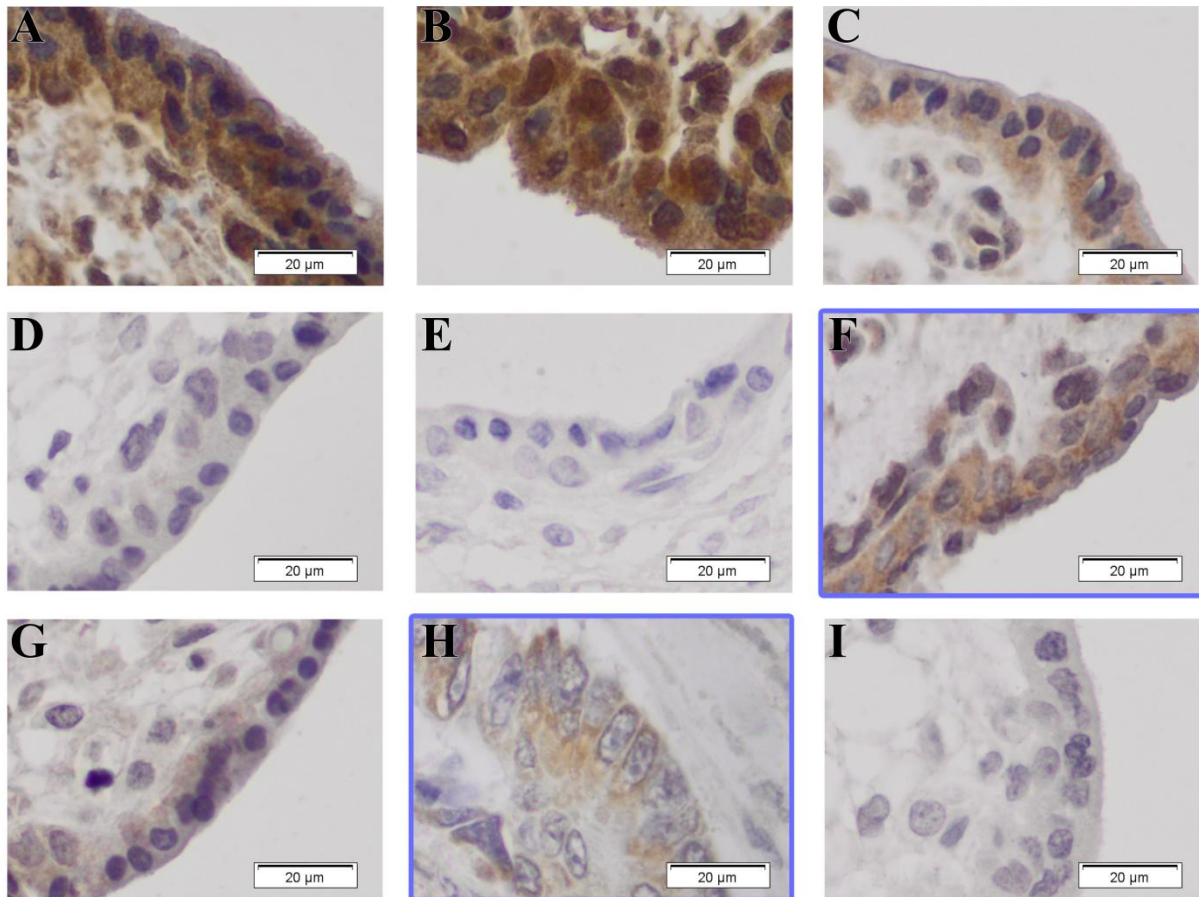
(E) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: EDTA pH8, Spädning: 1:300, Detektionssystem: EnVision.

(F) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: LSAB.

(G) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:500, Detektionssystem: LSAB.

(H) Preparat: Koloncancer, Tumörceller, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: LSAB

(I) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: EnVision.



Figur 2, Positiv kontroll, blå ruta illustrerar snitt färgade enligt, för studien, optimalt protokoll. (A) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:100, Detektionssystem: LSAB.

(B) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Dako pH6, Spädning: 1:100, Detektionssystem: LSAB.

(C) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:300, Detektionssystem: LSAB.

(D) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:1000, Detektionssystem: LSAB.

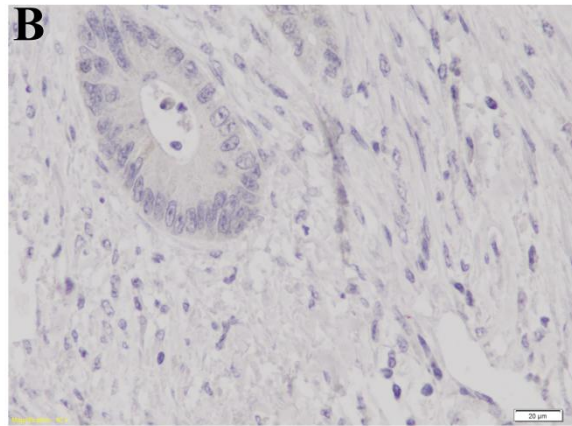
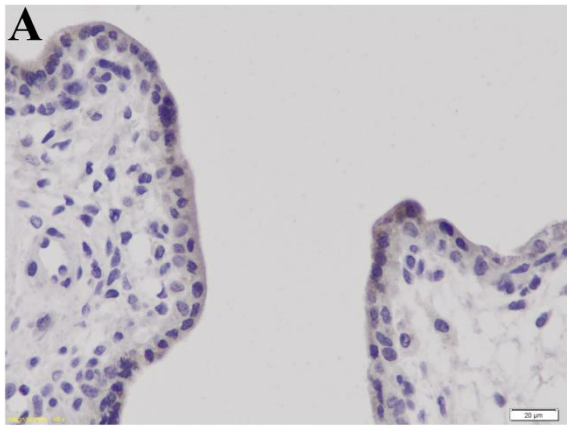
(E) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: EDTA pH8, Spädning: 1:300, Detektionssystem: EnVision.

(F) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: LSAB.

(G) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:500, Detektionssystem: LSAB.

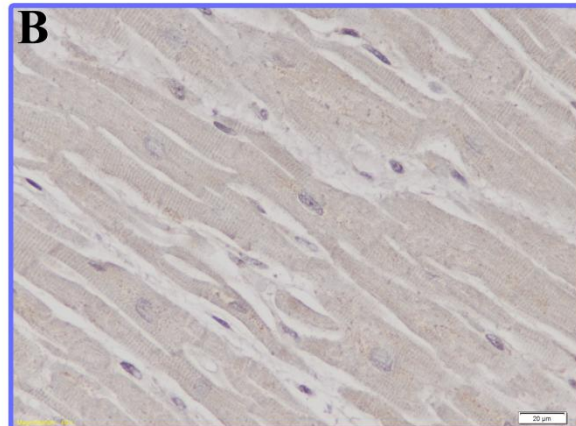
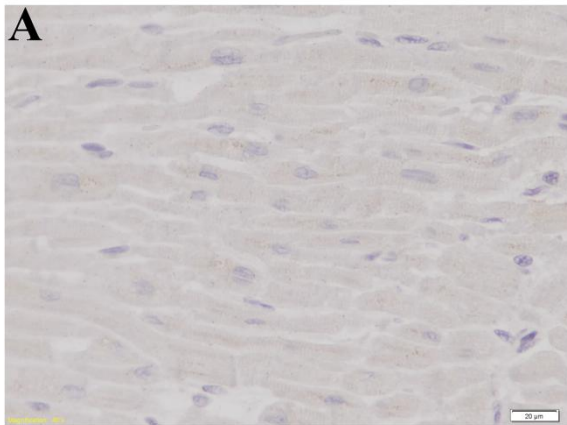
(H) Preparat: Koloncancer, Tumörceller, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: LSAB

(I) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: EnVision.



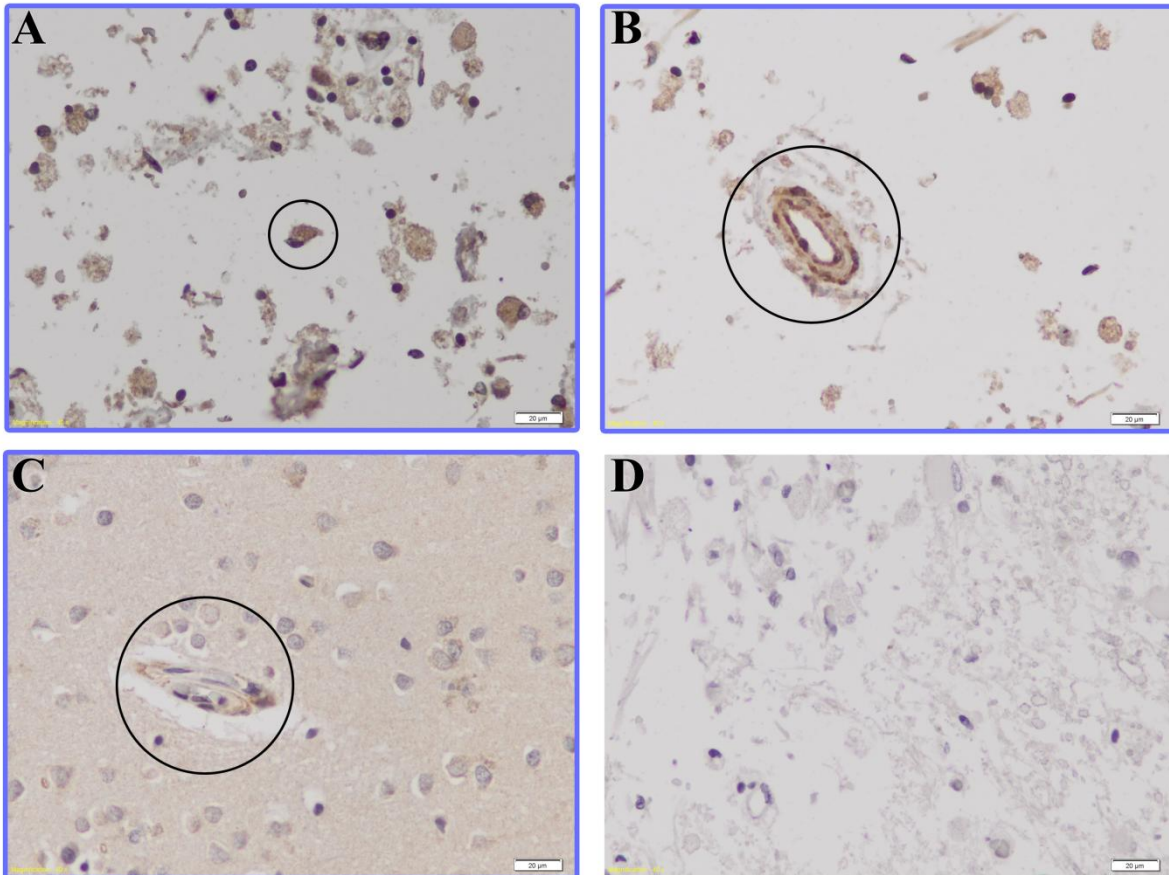
Figur 3, Utan primär antikropp, (A) Preparat: Placenta, Trofoblaster, Buffert: Citrat pH6, Detektionssystem: LSAB.

(B) Preparat: Koloncancer, Tumörceller, Buffert: Citrat pH6, Detektionssystem: LSAB.



Figur 4, Negativ kontroll, blå ruta illustrerar snitt färgade enligt, för studien, optimalt protokoll. (A) Preparat: Hjärtmuskel, Buffert: Citrat pH6, utan primär antikropp, Detektionssystem: LSAB.

(B) Preparat: Hjärtmuskel, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: LSAB.



Figur 5, Stroke-fall 1, blå ruta illustrerar snitt färgade enligt, för studien, optimalt protokoll. **(A)** Preparat: Hjärnvävnad, Yngre infarkt (1-2 veckor), Makrofager/mikroglia-celler, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: LSAB.

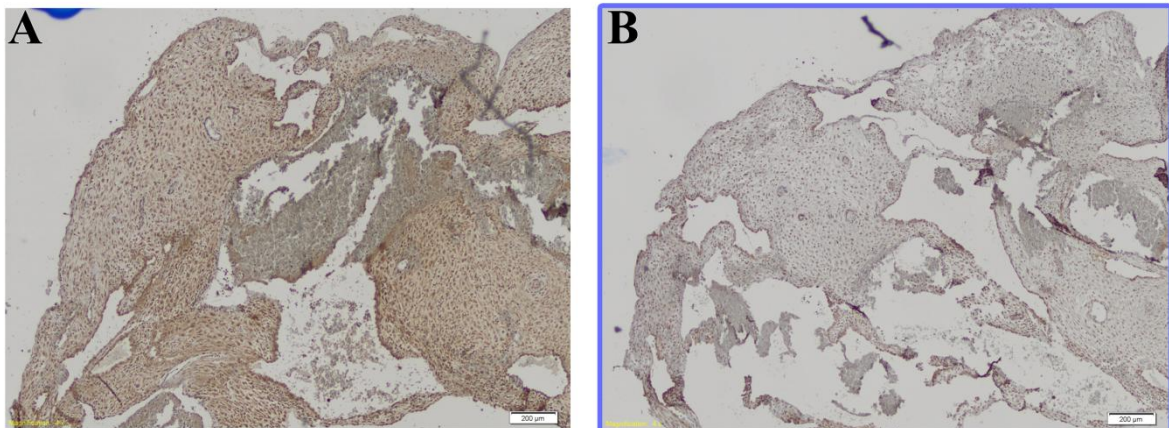
(B) Preparat: Hjärnvävnad, Yngre infarkt (1-2 veckor), Käril, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: LSAB.

(C) Preparat: Hjärnvävnad, Ej infarkt, Käril, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: LSAB.

(D) Preparat: Hjärnvävnad, Yngre infarkt (1-2 veckor), Celler, Buffert: Citrat pH6, utan primär antikropp, Detektionssystem: LSAB.

Diskussion

Vid IHC med TLR4 som primär antikropp ska positiv specifik inmärkning av celler finnas i cellmembran samt i cellernas cytoplasma, eftersom TLR4 är en transmembran receptor. Färgen skall vara brun/ljusbrun vid positiv specifik infärgning med en färgintensitet som skiljer sig åt från bakgrundsinfärgningen. Det mest optimala är att helt komma undan bakgrundsinfärgning (Key, 2006). Abcams spädningsrekommendation för TLR4-antikropp för IHC på formaldehyd-fixerat, paraffinbäddat material var spädning 1:100, vilket användes på snitt från placenta (positiv kontroll) vid första körningen i denna studie. Spädning 1:100 gav en alldeles för stark bakgrundsinfärgning (figur 6A). Antikroppen späddes och testades enligt olika färgningsprotokoll för att slutligen hamna på spädning 1:400 för att få så svag intensitet på bakgrundsinfärgning som möjligt tillsammans med en godtagbar intensitet på positiv specifik inmärkning (figur 6B). Samtidigt som primär antikroppen späddes för att undvika för mycket bakgrundsinfärgning minskade färgintensiteten för positiv specifik inmärkning.



Figur 6, Översiktsbild över bakgrundens färgintensitet, blå ruta illustrerar snitt färgade enligt, för studien, optimalt protokoll. (A) Preparat: Placenta, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:100, Detektionssystem: LSAB. (B) Preparat: Placenta, Buffert: Citrat pH6, Spädning: 1:400, Detektionssystem: LSAB.

Xu et al. (2011) visade i en studie kring TLR4-uttryck i tumörceller vid koloncancer en mycket större skillnad mellan bakgrundsinfärgning och positiv specifik inmärkning än vad resultatet i denna studie visar. De använde sig av samma TLR4-antikropp, samma HIER och ett likartat detektionssystem som LSAB på snitt från formaldehyd-fixerat, paraffinbäddat material. Det går dock inte att i utifrån artikeln fastställa vilken spädning som använts för primär antikroppen. Vid användning av koloncancer som positiv kontroll i denna studie bedömdes färgintensiteten för positiv specifik inmärkning till måttlig vid spädning 1:400 (tabell 2). I studien av Xu et al. (2011) visar bilder i artikeln en färgintensitet som ser ut att

vara stark/mycket stark för positiv specifik inmärkning med en svag intensitet för bakgrund. Tänkbara förklaringar till dessa skillnader i resultat mellan studierna kan vara olika spädning för primär antikroppen men också att Xu et al. (2011) inkuberade snitten med primär antikropp över natt i + 4° C. Längre inkuberingstid kan förstärka signalen för specifik inbindning och ger en större variation mellan intensitet för specifik inmärkning och eventuell bakgrundsfärgning (Vyberg, 2000). I en studie av Ungaro et al. (2009) sågs ett överuttryck av TLR4 i vävnadssnitt från kolorektalcancer färgade med IHC men färgintensiteten för specifik inmärkning var låg. I studien användes en TLR4-antikropp av annat fabrikat än i denna studie, HIER gjordes med citratbuffert pH 6.0 och som detektionssystem användes LSAB. För att förstärka signalen för positiv specifik inmärkning använde de sig därför av en ampifieringsmetod med tyramin. Tyramin är biotinylerat och binder till HRP. Genom att lägga in ett extra steg med tyramin efter streptavidin-peroxidassteget (steg 4 i LSAB-protokollet) och sen upprepa inkubering med streptavidin-peroxidas fick man en påtagligt förstärkt signal (Ungaro et al. 2009).

Negativ kontroll och vävnadssnitt utan primär antikropp användes vid samtliga körningar. Dessa kontroller är viktiga för att utesluta ospecifik inbindning av primär antikropp eller sekundär antikropp skett, något som kan ge falskt positiv inmärkning och därmed vilseledande resultat (Cook, 2006, Vyberg, 2000). Eftersom ingen infärgning sågs i snitt från negativa kontroller och i snitt färgade utan primär antikropp i denna studie, ansågs primär antikropp som specifik och tillförlitlig att använda vid IHC.

Ett fynd i denna studie vid färgning av vävnad från stroke-fall var att inmärkning i kärl nära infarkt visade starkare infärgning än, i område utan infarkt. Wang et al. (2011) beskriver att TLR4 har en intressant roll vid ischemisk infarkt eftersom TLR4-signalering verkar påverka hur svåra skador som uppkommer i hjärnan vid infarkten. Studier på djurmodeller visade att möss utan TLR4-uttryck fick en reducerad storlek på infarkten vid en stroke i jämförelse med möss som hade TLR4-uttryck (Wang et al. 2011). Kärl med ökat TLR4-uttryck kanske har betydelse för skadors svårighetsgrad vid stroke och kan därför vara intressant att undersöka i de fortsatta studier där IHC-protokollet är tänkt att utnyttjas.

Slutsats

Ett färgningsprotokoll med spädning 1:400 för primär antikropp, LSAB som detektionssystem och Citratbuffert pH 6.0 vid epitopåtervinning gav det mest optimala resultatet för samtliga preparat. Färgintensiteten kunde dock ha varit starkare vid specifik positiv inmärkning för att tydliggöra inbunden primär antikropp i vävnadssnittet. Fler test med exempelvis tyramin amplifieringsmetod, annat detektionssystem, andra buffertar och blockeringssteg bör därför göras, för att om möjligt optimera intensitet för specifik inmärkning ytterligare. Metoden fungerar för de tänkta studierna av TLR4-uttryck vid stroke.

Referenser

Cook, D. J. (2006). An introduction to techniques and applications. *Cellular pathology* (Sid 179-202). Oxfordshire: 2 ed. Scion Publishing Ltd.

Fang, H., Wang, P., Zhou, Y., Wang, Y. & Wang, Q. (2013). Toll-like receptor 4 signaling in intracerebral hemorrhage-induced inflammation and injury. *Journal of Neuroinflammation*, Vol. 10, pp.1-10.

Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J. & Roller P. P. (1985). Formaldehyde fixation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 33, pp. 845-853.

Key, M. (2006). Immunohistochemistry Staining Methods. *Immunohistochemistry (IHC) Staining Methods Education Guide* (Sid 47-54). Carpinteria, California: 4 ed. Dako Corporation.

Okun, E., Griffioen, K. J. & Mattson, M. P. (2011). Toll-like receptor Signaling in Neural Plasticity and Disease. *National institutes of health*, Vol. 34, pp. 269-281.

Shi, S., Key, M. E. & Kalra K. L. (1991). Antigen Retrieval in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissues. An Enhancement Method for Immunohistochemical Staining Based on Microwave Oven Heating of Tissue Sections. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 39, pp. 741-748.

Ungaro, R., Abreu, M. T. & Fukata, M. (2009). Practical techniques for detection of Toll-like Receptor-4 (TLR4) in the human Intestine. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 517, pp. 345-361.

Vyberg, M. (2000). *Anvendt immunhistokemi*. Köpenhamn: Hospitalslaborantskolen.

Wang, Y., Lin, S. & Yang Q. (2011). Toll-like receptors in cerebral ischemic inflammatory injury. *Journal of Neuroinflammation*, Vol. 8, pp. 1-11.

Xu, H., Wu, Q., Dang, S., Jin, M., Xu, J., Cheng, Y., Pan, M., Wu, Y., Zhang, C. & Zhang, Y. (2011). Alteration of CXCR7 expression mediated by TLR4 promotes tumor cell proliferation and migration in human colorectal carcinoma. *PLoS ONE*, Vol. 6, e27399.

Appendix 1

- Kyvetter
- Xylen
- 99% etanol
- 95% etanol
- Destillerat vatten
- Citratbuffert 10mM pH 6.0
- Dako 10mM pH 6.0
- EDTA 1mM pH 8.0
- Mikrovågsugn
- Mätkolv
- Automatpipetter
- Pipettspetsar
- Eppendorf rör
- Monteringsglas
- Monteringslim
- Värmeskåp
- Mikroskop
- Kylskåp
- Metallbricka
- Objektglas
- Pasteurpipetter

Appendix 2

Körning 1

- Placenta 1; DAKO pH6, 1:100, LSAB.
- Placenta 2; Citrat pH6, 1:100, LSAB
- Placenta 3; DAKO pH6, Utan antikropp, LSAB.
- Placenta 4; Citrat pH6, Utan antikropp, LSAB.
- Hjärta 1; Citrat pH6, 1:100, LSAB.
- Hjärta 2; DAKO pH6, 1:100, LSAB.

Körning 2

- Placenta 5; Citrat pH6, 1:300, LSAB.
- Placenta 6; Citrat pH6, 1:500, LSAB.
- Placenta 7; Citrat pH6, 1:1000, LSAB.
- Placenta 8; Citrat pH6, Utan antikropp, LSAB.
- Placenta 9; EDTA pH8, 1:300, EnVision.
- Placenta 10; EDTA pH8, Utan antikropp, EnVision.
- Hjärta 3; Citrat pH6, 1:300, LSAB.
- Hjärta 4; Citrat pH6, 1:500, LSAB.
- Hjärta 5; Citrat pH6, 1:1000, LSAB.
- Hjärta 6; EDTA pH8, 1:300, EnVision.
- Hjärta 7; Citrat pH6, Utan antikropp, LSAB.
- Hjärta 8; EDTA pH8, Utan antikropp, EnVision.

Körning 3

- Placenta 11; Citrat pH6, 1:300, LSAB.
- Placenta 12; Citrat pH6, 1:400, LSAB.
- Placenta 13; Citrat pH6, 1:500, LSAB.
- Hjärta 9; Citrat pH6, 1:300, LSAB.
- Hjärta 10; Citrat pH6, 1:400, LSAB.
- Hjärta 11; Citrat pH6, 1:500, LSAB.
- Koloncancer 1; Citrat pH6, 1:300, LSAB.

- Koloncancer 2; Citrat pH6, 1:400, LSAB.
- Koloncancer 3; Citrat pH6, 1:500, LSAB.
- Koloncancer 4; Citrat pH6, Utan antikropp, LSAB.

Körning 4

- Placenta 14; Citrat pH6, 1:400, EnVision.
- Placenta 15; Citrat pH6, Utan antikropp, EnVision.
- Hjärta 12; Citrat pH6, 1:400, EnVision.
- Hjärta 13; Citrat pH6, Utan antikropp, EnVision.
- Koloncancer 5; Citrat pH6, 1:400, EnVision.
- Koloncancer 6; Citrat pH6, Utan antikropp, EnVision.

Körning 5

- Placenta 16; Citrat pH6, 1:400, LSAB.
- Hjärta 14; Citrat pH6, Utan antikropp, LSAB.
- Hjärta 15; Citrat pH6, 1:400, LSAB.
- Stroke-fall 1 (Citrat pH6, LSAB, 1:400) Yngre infarkt (1-2 veckor) och Ej infarkt.
- Stroke-fall 2 (Citrat pH6, LSAB, 1:400) Äldre infarkt (mer än 1 månad) och Gränszon (ej infarkt).
- Stroke-fall 3 (Citrat pH6, LSAB, 1:400) Äldre infarkt (mer än 1 månad) Område 1 och Äldre infarkt (mer än 1 månad) Område.

Appendix 3

Utvärdering av IHC gjordes genom mikroskopering av varje enskilt vävnadssnitt. Positiva kontroller, placenta samt koloncancer, utvärderades enligt följande kriterier:

- Är positiv inmärkning i celler specifik?
 - Ja
 - Nej
- Färgintensitet vid positiv inmärkning
 - Ingen inmärkning
 - Svag
 - Måttlig
 - Stark
 - Mycket stark
- Färgintensitet vid bakgrundsinfärgning
 - Ingen inmärkning
 - Svag
 - Måttlig
 - Stark
 - Mycket stark

Stroke-fall bedömdes enligt följande kriterier:

- Är positiv inmärkning i celler specifik?
 - Ja
 - Nej
- Färgintensitet vid bakgrundsinfärgning
 - Ingen inmärkning
 - Svag
 - Måttlig
 - Stark
 - Mycket stark

- Färgintensitet hos positiva kärl
 - Ingen inmärkning
 - Svag
 - Måttlig
 - Stark
 - Mycket stark
- Färgintensitet hos positiva makrofager/mikroglia-celler
 - Ingen inmärkning
 - Svag
 - Måttlig
 - Stark
 - Mycket stark

För negativ kontroll och snitt färgade utan primär antikropp gjordes en bedömning om positiv inmärkning fanns eller ej.