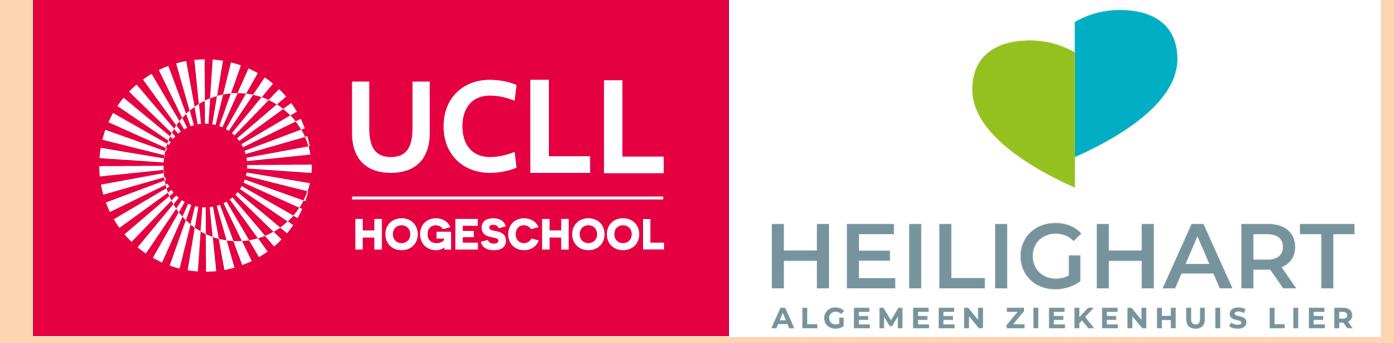


# Optimalisatie en validatie van Tenascine C immunohistochemische kleuring

Jessie Scheepers, Laboratorium anatomopathologie, Heilig Hart ziekenhuis Lier



## Introductie

### TENASCINE C

Tenascine C (TNC) is een multifunctioneel glycoproteïne dat onderdeel uitmaakt van de extracellulaire matrix (1,2,3). In adulte weefsels is TNC-expressie zeer gelimiteerd tot bepaalde bindweefsels die onderhevig zijn aan trekspanning (4), bepaalde stamcel niches (5) en aanwezig onder sommige epithelia zoals appendix- en amandelweefsel. Bij bepaalde pathologische condities zoals weefselschade, wondheling, inflammatie en bij tumoren is een verhoogde TNC-expressie aanwezig. TNC kan gebruikt worden ter ondersteuning van de diagnose van collagene colitis (CC) bij twijfelgevallen (1,2,3).

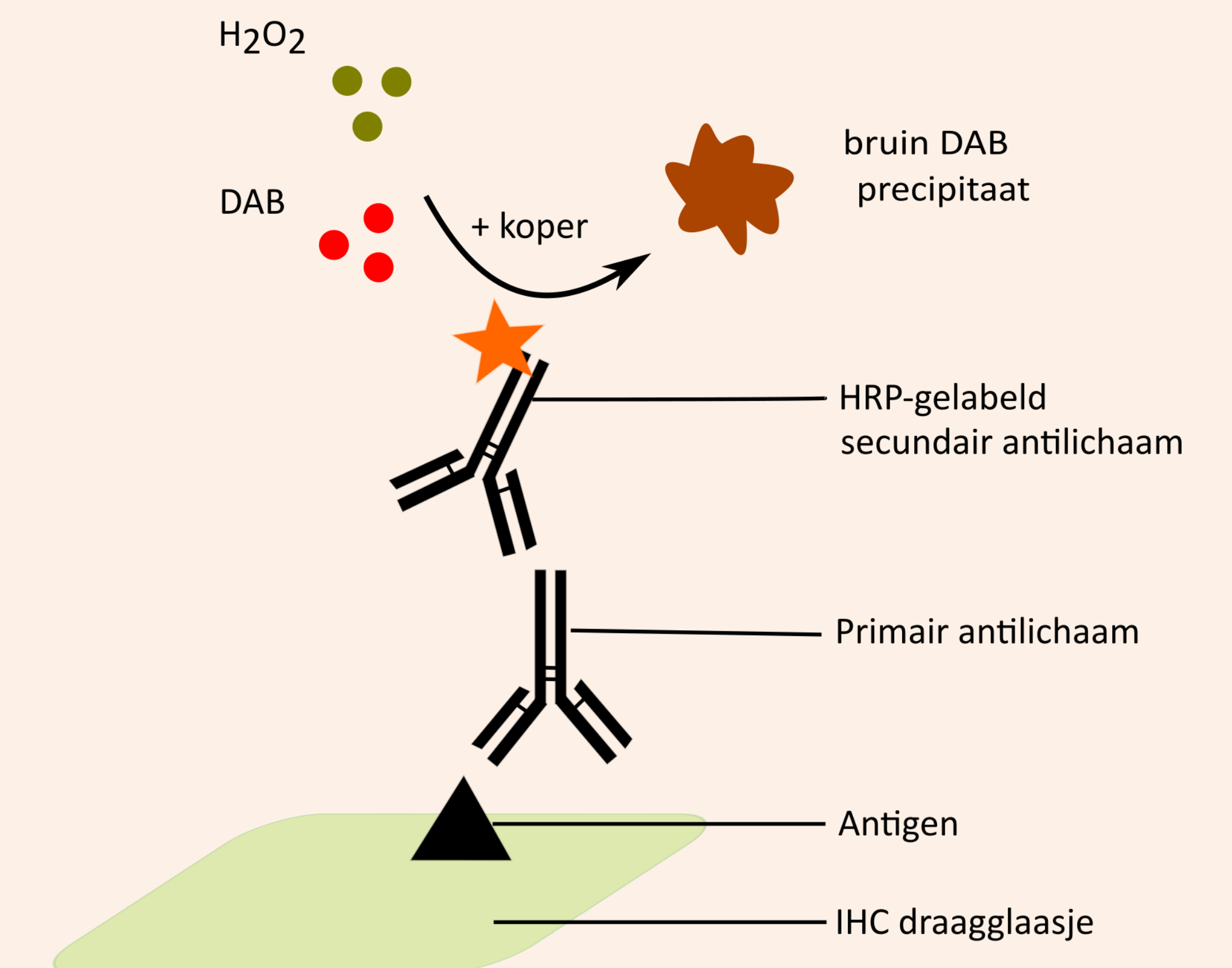
### DOEL

CC is een aandoening dat klinisch wordt gekenmerkt door chronische waterige diarree. Echter vertonen deze patiënten meestal colonoscopisch geen abnormaliteiten (6). De uiteindelijke diagnose van CC gebeurt op basis van microscopisch onderzoek van een formaline gefixeerde paraffine ingebedde (FFPE)-weefselcoupe van een colorectaal biopt. Het kenmerkende microscopische beeld bij CC is intra-epitheliale lymfocytose, een verbrede lamina propria met inflammatoire cellen en het belangrijkste kenmerk is een verdikte subepitheliale collagene band (2,6). CC is niet altijd evident vast te stellen omwille van het discontinue karakter van de aandoening. Vaak treedt variatie op in de dikte van de collagene band over de gehele mucosa van het colon (2). Doordat TNC specifiek tot expressie komt in de collagene band bij CC, kan TNC immunohistochemisch (IHC) aangekleurd worden. In vergelijking met de Masson trichroom kleuring is een IHC TNC-kleuring specifiekker en zorgt het voor een snellere workflow in het labo (6). Het doel van dit onderzoek is om de IHC TNC-kleuring met het monoklonaal anti-TNC muizenantilichaam [T5H2] te optimaliseren en te valideren.

## Materialen en methode

Voor zowel de optimalisatie als validatie werden zeven verschillende weefsels gebruikt namelijk amandel-, appendix-, tuba-, sigmoïd- en positief CC colonweefsel. De FFPE-weefselcoupes met een dikte van 4 µm werden op de microtoom gesneden. Vervolgens werden de verschillende stappen op de FFPE-weefselcoupes uitgevoerd volgens twee verschillende IHC TNC-protocollen op het Ventana Benchmark Ultra toestel zoals weergegeven in Tabel 1. Het gebruikte detectiesysteem is een indirect, biotine-vrij detectiesysteem zichtbaar in figuur 1.

TIJDSHEMA PROTOCOL (min)		
Verschillende stappen	Roche	UZ Leuven
Deparaffinatie (met EZ Prep bij 72°C)	4	4
Antigen retrieval	64	36
Blokkering	4	4
Primair antilichaam (anti-TNC antilichaam)	32	20
HRP-gelabelde secundaire antilichamen (cocktail)	8	8
Substraat 3,3' diaminobenzidine (DAB) + chromogeen (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	8	8
Koper (CuSO <sub>4</sub> )	4	4
Tegenkleuring: hematoxyline	8	8
Bluig reagens	4	4



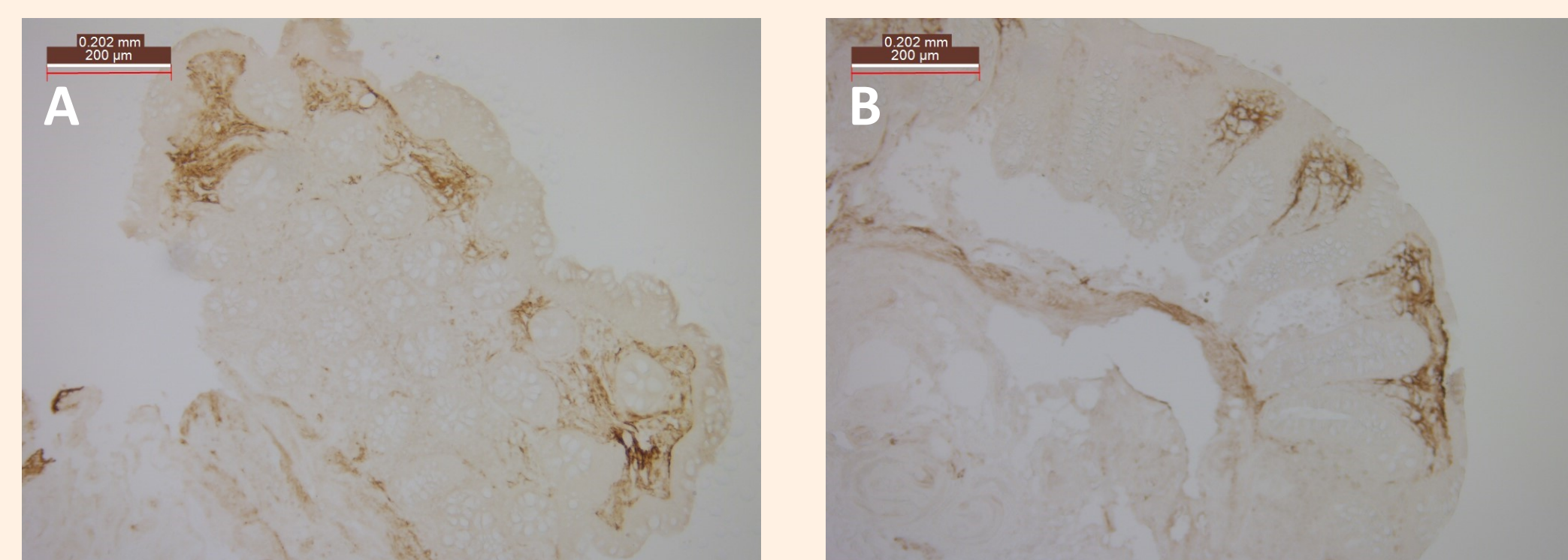
Figuur 1: Grafische voorstelling van de Ventana Ultraview detectiekit

Tabel 1: Tijdschema van de IHC TNC protocollen: standaard protocol Roche vs protocol UZ Leuven

## Resultaten

### Optimalisatie

De eerste optimalisatie stap bestond uit testen van twee protocollen waarvan de resultaten zichtbaar zijn in figuur 2A en 2B. Er werd toegespitst op de FFPE-weefselcoupes met gekende CC. De kleuring is voor beide protocollen even kwaliteitsvol zonder achtergrondkleuring.

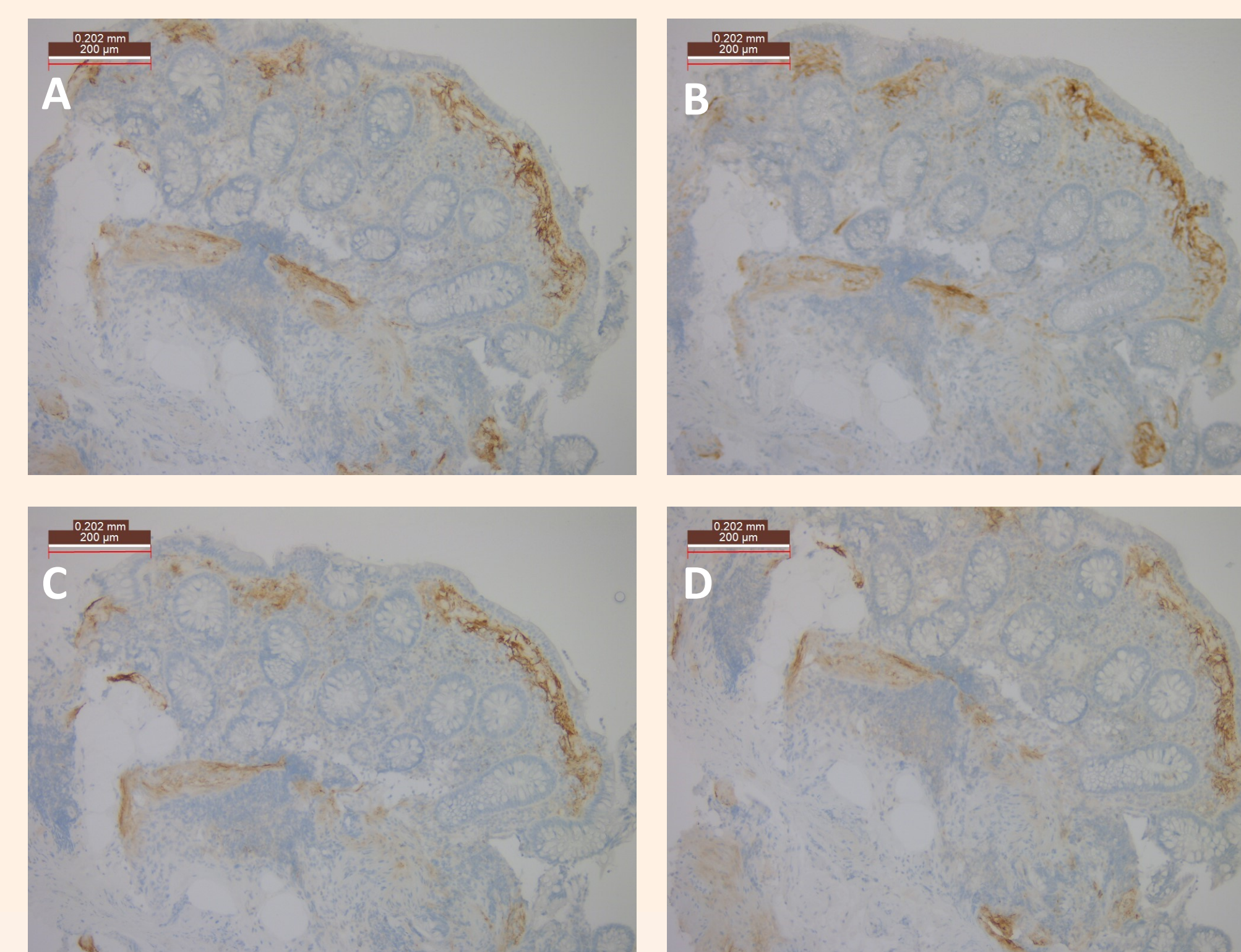


Figuur 2: TNC ICH-kleuring met 1/100 verdunning anti-TNC antilichaam volgens a) standaard protocol Roche versus B) protocol UZ Leuven.

### Validatie

Twee IHC toestellen zijn aanwezig op het labo. Op elk toestel werden twee FFPE-weefselcoupes met het IHC TNC-protocol gekleurd op hetzelfde moment (intra-run). Daarnaast werden de IHC TNC-kleuringen vergeleken tussen weefselcoupes gekleurd met hetzelfde protocol op een ander toestel (inter-run).

Verder zijn vier optimalisatiestappen voor de verdunning van het anti-TNC-antilichaam [T5H2] uitgevoerd zichtbaar in figuur 3A-3D.



Figuur 3: Optimalisatie ICH TNC-protocol UZ Leuven: verdunning: A) 1/200; B) 1/300; C) 1/400; D) 1/500.

## Conclusie

De kleurintensiteit van beide protocollen zijn even kwalitatief waardoor de voorkeur wordt gegeven aan het snelste protocol namelijk het **IHC TNC-protocol van UZ Leuven** omwille tijdswinst. Daarnaast wordt de **1/300** verdunning van het anti-TNC antilichaam [T5H2] verkozen als meest kwaliteitsvolle, efficiëntste en economisch gunstigste kleuring.

Geen opmerkelijke verschillen worden waargenomen in kleurintensiteit tussen de weefselcoupes uitgevoerd binnenin de ICH toestellen zelf als ook tussen de twee IHC toestellen. Bijgevolg is de IHC TNC-kleuring gevalideerd en kan het in gebruik gesteld worden voor routine diagnostiek.

## Referenties

- Giblin SP, Midwood KS. Tenascin-C: Form versus function. *Cell Adh Migr*. 2015; 9(1-2) : 48-82.
- Anagnostopoulos I, Schuppan D, Riecken EO, *et al*. Tenascin labelling in colorectal biopsies: a useful marker in the diagnosis of collagenous colitis. *Histopathology*. 1999; 34(5): 425-31.
- Abedsaeidi M, Hojjati F, Tavassoli A, *et al*. Biology of Tenascin C and its role in physiology and pathology. *Curr Med Chem*. 2023.
- Flück M, Vildan Tunc-Civelek V, Chiquet M. Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. *J Cell Sci*. 2000; 113(20): 3583-3591.
- Chiquet-Ehrismann R, Orend G, Chiquet M, *et al*. Tenascins in stem cell niches. *Matrix Biology*. 2014; 37: 112-123.
- Müller S, Neureiter D, Stolte M, *et al*. Tenascin: a sensitive and specific diagnostic marker of minimal collagenous colitis. *Virchows Arch*. 2001; 438(5): 435-441.