

Marko Broström, William Braithwaite

**ARKISTOITUJEN RINTABIOPSIANÄYTTEIDEN SOVELTUVUUS TUTKIMUS-
KÄYTTÖÖN SEKÄ IMMUNOKEMIAALLISTEN VÄRJÄYSTEN KÄYTETTÄVYYS
SYTOBLOKKINÄYTTEISSÄ**

Opinnäytetyö

**ARKISTOITUJEN RINTABIOPSIANÄYTTEIDEN SOVELTUVUUS TUTKIMUS-
KÄYTTÖÖN SEKÄ IMMUNOKEMIALLISTEN VÄRJÄYSTEN KÄYTETTÄVYYS
SYTOBLOKKINÄYTTEISSÄ**

Opinnäytetyö

Marko Broström, William Braithwaite
Opinnäytetyö
Kevät 2016
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Oulun ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Oulun ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

Tekijä(t): Marko Broström, William Braithwaite

Opinnäytetyön nimi: Arkistoitujen rintabiopsianäytteiden soveltuvuus tutkimuskäyttöön sekä immunokemiallisten värjäysten käytettävyys sytoblokinäytteissä

Työn ohjaaja: Outi Mäkitalo, Paula Reponen, Timo Väisänen, Markku Yli-Pyky

Työn valmistusluku- ja vuosi: Kevät 2016

Sivumäärä: 34

Immunokemiallisia estrogeenireseptori-, progesteronireseptori- ja HER2/neu-värjäyksiä käytetään rintasyöpäpotilaiden hoidon määrittämisessä. Rintasyöpäpotilailta otetaan sekä histologisia paksuneulabiopsianäytteitä että sytologisia ohutneulabiopsianäytteitä. Immunokemiallisia värjäyksiä käytetään ensisijaisesti formaliinifiksoiduissa histologisissa näytteissä. Histologisten ja sytologisten näytteiden esikäsittelyprosessit poikkeavat toisistaan eri fiksaatiomenetelmissä, siinä missä fiksatiivina käytetään histologisissa näytteissä formaliinia, käytetään sytologisissa näytteissä fiksatiivina alunperin etanolia. Tässä tutkimuksessa selvitetään vastaavatko Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorion arkistoitujen potilastapausten toisistaan poikkeavalla tavalla fiksoitujen histologisten ja sytologisten näytteiden värjäystulokset toisiaan.

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena on arvioida Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorion arkistoitujen rintabiopsianäytteiden laatua ja estrogeenireseptori-, progesteronireseptori- ja HER2/neu- immunokemiallisten värjäysten soveltuvuutta käytettäväksi sytoblokinäytteistä valmistettuihin näyteobjektilaseihin. Opinnäytetyö vastaa työelämästä nousseeseen tarpeeseen tutkia kyseisten värjäysten toimivuutta sytoblokinäytteissä.

Kvantitatiivisessa tutkimuksessa vertailimme estrogeenireseptori-, progesteronireseptori ja HER2/neu- värjäyksiä potilastapauksissa, joissa kaikista potilastapauksista oli arkistoituna sekä histologisia paksuneulanäytteitä että sytologisia ohutneulanäytteitä, joille kummallekin suoritettiin kyseiset värjäykset. Potilastapauksia oli lukumäärällisesti 39 kpl, joista kokonaisuudessaan valmistettiin 264 näyteobjektilasia tutkittavaksi. Tutkimuksessa valmistimme arkistosta haetuista potilas-kohtaisista sytoblokeista ja histoblokeista Bond- immunovärjäysautomaatilla värjättävät näyteobjektilasit. Värjättyt lasit analysoitiin sairaalasolubiologin ja patologien avustuksella vertaillen histologisten ja sytologisten näytteiden immunokemiallista värjäytymistä.

Opinnäytetyön tulosten perusteella arkistoidut sytoblokinäytteet ovat niukkoja ja tämä supisti tutkittavan aineiston määrää merkittävästi. Alkuperäisistä 40 potilastapauksesta tutkimuskelpoiseksi osoittautui vain 8 potilastapausta sytoblokinäytteiden niukkuuden vuoksi. Tutkimuskelpoisten näytteiden tuloksissa sytoblokkien estrogeenireseptorivärjäyksessä 87,5 % tapauksista vastasi histoblokin värjäystulosta, sytoblokkien progesteronireseptorivärjäyksessä 100 % tapauksista vastasi histoblokin värjäystulosta ja sytoblokkien HER2-neu-värjäyksessä 87.5 % tapauksista vastasi histoblokin värjäystulosta.

Asiasanat: Ohutneularintabiopsia, paksuneularintabiopsia, histoblokki, sytoblokki, estrogeenireseptorivärjäys, progesteronireseptorivärjäys, HER2/neu värjäys

ABSTRACT

Oulu University of Applied Sciences
Bachelor of Biomedical Laboratory Science

Author(s): Marko Broström, William Braithwaite

Title of thesis: Use of archived breast biopsy samples for experimentation and the application immunochemical staining in cell block samples.

Supervisor(s): Outi Mäkitalo, Paula Reponen, Timo Väisänen, Markku Yli-Pyky

Term and year when the thesis was submitted: Autumn 2016

Number of pages: 34

Immunochemical staining, such as estrogen receptor-, progesterone receptor- and HER2/neu stainings are used for for example breast cancer screening and diagnosis. For the diagnosis, sampling is required. Valid methods for these procedures are fine needle aspiration and core needle biopsies. Immunochemical stainings are primarily used in formalin-fixed histological samples. Histological and cytological samples differ in fixation methods from one another. In histological samples formalin is used for fixation, and in cytological samples alcohol is initially used. In this study, the main goal is to compare the different staining results, in both histological and cytological fixated samples, of the archived patient cases of the Pathology laboratory of Oulu University Hospital.

The purpose of this thesis is to evaluate the archived breast biopsy samples quality and estrogen -, progesterone receptors and the application of HER2/neu- immunochemical staining in cytoblock samples on glass slides for the Pathology laboratory of Oulu University Hospital. This study was inspired by the need of increased demand for an application of immunochemical stainings in cytoblock samples with correlative results for its histological counterparts.

In this quantitative study we aim to measure and compare estrogen- , progesterone receptors and HER2-neu stainings with archived patient cases, both for histological core needle biopsies and cytological fine needle aspiration samples. All of our samples were subjected with the same staining procedures. Our sample volume was 39 cases, in which totaled 264 glass slides. The histological and cytological samples from our patient cases were from the archive of the Pathology Laboratory of Oulu University Hospitals, and including all of our equipment, such as the Bond- immunochemical stainer were provided by them. The finalized slides were compared and analyzed by the laboratory cell biologist and pathologist.

As the final results came in, it was apparent that numerous cytoblock samples from the archive were near or altogether absent of any material. In the end this event lead to a drastic decrease in the sample volume. Because of this, of the original 39 patient cases, only 8 cases yielded adequate results. From the remaining 8 cases of the cell blocks, estrogen receptor staining had a 80 % correlation with its histological counterpart, progesterone receptor staining had a 100% correlation and the HER2/neu staining had a 87.5% correlation.

Keywords: Fine needle aspiration, core needle biopsy, cytological cell block, tissue block, estrogen receptor staining, progesterone receptor staining, HER2/neu staining

SISÄLLYS

1	JOHDANTO	6
2	IMMUNOKEMIAALLISTEN VÄRJÄYSTEN PERUSTEET JA VÄRJÄYSTEN KÄYTTÖ RINTASYÖVÄN HOIDON MÄÄRITTÄMISESSÄ.....	7
2.1	Immunokemian perusteet.....	7
2.2	Hormonireseptorivärjäysten käyttö rintasyövän hoidon määrittämisessä	8
2.3	HER2/neu-värjäyksen käyttö rintasyövän hoidon määrittämisessä	9
3	PAKSUNEULA- JA OHUTNEULARINTABIOPSIANÄYTTEENOTTO	10
3.1	Ohutneulanäytteenotto ja ohutneulanäytteen esikäsittely	10
3.2	Paksuneulanäytteenotto ja paksuneulanäytteen esikäsittely	12
4	TUTKIMUKSEN TOTEUTUS	14
4.1	Tutkimuksen kuvailu	14
4.2	Työympäristön kuvailu.....	15
4.3	Työvaiheet.....	16
5	VÄRJÄYSTEN TULOKSET JA AIEMMAT TUTKIMUKSET AIHEESTA	17
5.1	Värjäysten tulokset	17
5.2	Aiemmin tehtyjä tutkimuksia aiheesta.....	25
5.3	Tutkimus “Application of immunohistochemistry to Cytology”	25
5.4	Tutkimus “Fine-Needle Aspiration Cytology Can Play a Role in Neoadjuvant Chemotherapy in Operable Breast Cancer”	26
5.5	Muita aiempia kvantitatiivisia tutkimuksia	28
6	POHDINTA	29
	LÄHTEET.....	31

1 JOHDANTO

Aiheemme opinnäytetyössämme on arkistoitujen rintabiopsianäytteiden soveltuvuus tutkimuskäyttöön sekä immunokemiallisten värjäysten toimivuus ohutneulalla otetuissa rinnan sytoblokinäytteissä. Ohutneulalla rinnasta otetulla sytoblokinäytteellä tarkoitetaan rinnasta ohutneulalla otettua sytologista näytettä, joka on parafiinivalettu sytoblokin sisälle. Sytoblokinäytteiden käytön etuna on helppo käsiteltävyys ja säilyvyys. (Fowler 2008.)

Immunokemiallisia värjäyksiä tulisi käyttää sytologisiin näytteisiin vain mikäli värjättävistä sytologisista näytteistä on saatavilla riittävän hyvälaatuisia parafiinivalettuja sytoblokkeja (Miller 2005). Vääriä positiivisia tuloksia immunosytokemiallisissa värjäyksissä voivat aiheuttaa solujen hajoaminen ja nekroosi, akuutit tulehdukset ja epäspesifiset vasta-aineet. Vääriä negatiivisia tuloksia voivat aiheuttaa myös väärin vasta-aineiden käyttö, virheet värjäysprosessissa sekä näytteen alkoholi-fiksaatio (Fowler 2008). Vasta-aineiden valmistajien tuotteissa voi olla keskinäisiä eroja ja nämä erot voivat johtaa väärin negatiivisiin ja positiivisiin tuloksiin sytologisten näytteiden immunokemiallisissa värjäyksissä. (Sneige 2006.)

Histologisissa ja sytologissa näytteissä käytetään toisistaan poikkeavia näytteenoton jälkeisiä fiksaatiomenetelmiä. Histologisissa kudoksenäytteissä käytetään useimmiten formaliinifiksaatiota kun taas sytologissa näytteissä käytetään näytteenoton yhteydessä alkoholipohjaista fiksaatiota. Sytologissa näytteissä käytettävä histologisista formaliinifiksaatioista poikkeava alkoholfiksaatiomenetelmä voi vaikuttaa immunokemiallisen värjäyksen onnistumiseen sytologissa näytteissä. Tarkoituksenamme on selvittää kuinka hyvin immunokemialliset värjäykset soveltuvat alunperin alkoholfiksoituihin sytologisiin näytteisiin. Aiemmissa tutkimuksissa on havaittu vääriä negatiivisia tuloksia alun perin alkoholfiksoiduissa sytologissa näytteissä, esim. estrogeenireseptorien immunosytokemiallisissa värjäyksissä (Brown 1994). Lisäksi työmme tarkoituksena on tutkia Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorion arkistoitujen sytoblokki- ja histoblokinäytteiden soveltuvuutta tutkimuskäyttöön. Tavoitteenamme on siis sekä selvittää kuinka hyvin immunokemialliset värjäykset toimivat sytologissa näytteissä että tutkia kuinka hyviä arkistoidut sytoblokinäytteet ovat laadullisesti ja soveltuvatko ne tutkimuskäyttöön.

2 IMMUNOKEMIALLISTEN VÄRJÄYSTEN PERUSTEET JA VÄRJÄYSTEN KÄYTTÖ RINTASYÖVÄN HOIDON MÄÄRITTÄMISESSÄ

2.1 Immunokemian perusteet

Immunokemia perustuu ilmiöön, jossa paikalliset antigeenit tai proteiinit muodostavat kudoksessa (immunohistokemia) tai solussa (immunosytokemia) antigeeni- vasta-ainekompleksin, joka voidaan havaita. Tekniikka perustuu kemiallisiin sidoksiin, jotka muodostuvat antigeenin ja vasta-aineen liittyessä yhteen. Immunokemiaa sovelletaan yleisesti patologian laboratorioissa käyttämällä immunokemiallisia värjäyksiä. Vasta-aineiden ja antigeenien välille muodostuvat sidokset voidaan visualisoida valomikroskoopissa. Antigeeni-vasta-ainekompleksien sidoksien muodostamiseen käytetään monoklonaalisia tai polyklonaalisia vasta-aineita. (Taylor C., Cote R. 1994.)

Patologisissa tutkimuksissa tai diagnostiikassa käytetään monenlaisia immunokemiallisia värjäyksiä spesifisten kudosten, solujen ja proteiinien tunnistamiseen. Nämä värjäykset voivat esim. osoittaa ominaisuuksien muutoksia tutkittavissa näytteissä tai paikallistaa tutkittavat kohteet. Hyväksyttävän tai hyödyllisen tuloksen saamiseksi antigeeni-vasta-ainekompleksin signaali on oltava vahva sekä samalla heikko epäspesifisten taustamateriaalin värjäystä. (Dabbs D. 2006.)

Tärkeä osa immunokemiassa ovat vasta-aineet ja antigeenit, sekä näiden muodostama kokonaisuus. Vasta-aine on molekyyli, jolla on kyky kiinnittyä toiseen molekyyliin, jota kutsutaan antigeeniksi. Tällaisen kompleksin muodostuminen aiheuttaa immuunivasteen solussa tai eliössä. Antigeeni voi olla mikä tahansa molekyyli, esim. proteiini tai hiilihydraatti, joka rakenteeltaan voi olla suhteellisen monimutkainen. Tietyillä antigeenimolekyyleillä voi olla useampi kuin yksi kolmiulotteinen liittymisalue, joka kykenee muodostamaan vasta-ainekompleksin. Tällaisia yksilöllisiä kohtia molekyylissä kutsutaan epitoopeiksi, termi viittaa aminohapporyhmittymien osiin, joihin nimenomaan muodostuu sidos vasta-aineen kanssa. Immunokemiallisissa värjäyksissä vasta-aineisiin voi myös antigeenien lisäksi kiinnittyä toisia sekundaarisia vasta-aineita. Mikä tahansa vakaa osa vasta-aineesta voi toimia epitooppina toiselle vasta-aineelle. Eli vasta-aineilla on kaksi toimintoa:

immuunivasteen tai kemiallisen reaktion käynnistäminen antigeenin liittyessä sekä epitooppina toimiminen sekundaarisille vasta-aineille. Molempia reaktioita hyödynnetään patologisissa tutkimuksissa ja diagnostiikassa. (van Regenmortel M. 1994.)

2.2 Hormonireseptorivärjäysten käyttö rintasyövän hoidon määrittämisessä

Estrogeeni- ja progesteronireseptorit ovat etenkin estrogeeneille ja progesteroneille herkkien kudosten soluissa olevia tumareseptorityyppejä, joissa on estrogeeneja ja progesteronia sitovaa proteiinia. Estrogeeni- ja progesteronireseptoreita voi esiintyä rintasyöpäsoluissa. Estrogeeni- ja progesteronireseptoriposiitivisissa rintasyöpäsoluissa estrogeenin ja progesteronin kiinnittyminen estrogeeni- ja progesteronireseptoreihin edistää rintasyövän kehittymistä. (Terveyskirjasto 2016, viitattu 15.2.2016.)

Estrogeeni- ja progesteronireseptorivärjäyksiä käytetään erityisesti rintasyöpädiagnostiikassa. Immunokemialliset estrogeeni- ja progesteronireseptorivärjäykset osoittavat solujen estrogeeni- ja progesteronireseptoreiden ilmentymistä tutkittavassa kasvainkudoksessa. Värjäykset perustuvat estrogeeni- ja progesteronireseptorivasta-aineiden kiinnittymiseen estrogeeni- ja progesteronireseptoreihin. Värjäyksellä voidaan selvittää rintasyöpäkudoksen estrogeeni- progesteronistatus joko primaarituumorista tai metastaasista. (Huslab 2016, viitattu 15.2.2016.)

Noin 80 % rintasyöpätapauksissa estrogeenireseptorivärjäys on positiivinen. Noin 65 % rintasyöpätapauksissa sekä estrogeenireseptorivärjäys että progesteronireseptorivärjäys on positiivinen. 13 % tapauksista estrogeenireseptorivärjäys on positiivinen mutta progesteronireseptorivärjäys negatiivinen. 2 % tapauksista estrogeenireseptorivärjäys on negatiivinen ja progesteronireseptorivärjäys positiivinen. (Breastcancer.org 2016, viitattu 15.2.2016.)

Hormonireseptorivärjäysten positiivisuus vaikuttaa rintasyöpäpotilaan hoitoon. Estrogeeni- tai progesteronireseptorivärjäyksen ollessa positiivinen, voidaan potilaan hoidossa käyttää hormonihoitona antiestrogeeneja tai aromataasin estäjiä. Antiestrogeenit eli SERM-valmisteet (selektiiviset estrogeenireseptorin muuntelijat) estävät estrogeenin toiminnan sitoutumalla estrogeenireseptoriin ja estäen luonnollisen estrogeeniin sitoutumisen kohteeseensa. Yleisimpiä SERM-lääkkeitä ovat tamoksifeeni ja toremifeeni. Vaihdevuosien jälkeen suurin osa estrogeenista muodostuu androgee-

nistä. Aromataasin estäjät estävät androgeenin muuntumista estrogeeniksi ja soveltuvat vaihdevuosien jälkeiseen rintasyövän hoitoon. Yleisimpiä aromataasin estäjiä ovat anastrotsoli, eksemeetaani ja letrotsoli. (Rintasyöpä.fi 2016, viitattu 15.2.2016.)

2.3 HER2/neu-värjäyksen käyttö rintasyövän hoidon määrittämisessä

HER-2/neu-geeni on tutkituin rintasyövässä esiintyvistä geeneistä, joka aktivoituessaan transformoi soluja pahanlaatuisiksi. HER2/neu kuuluu tyrosiinikinaasien geeniperheeseen ja sen lyhenne HER2 juontuu sanoista human epidermal growth factor receptor 2. Neu-liite on annettu onkogeenin kolmikirjaimisen nimistön mukaisesti. Ihmisen syöpäkasvaimissa HER-2/neu aktivoituu geenimonistuman tapahtuessa. Geenimonistumassa pieni osa genomia kopioituu solussa jopa 50 - 100-kertaisesti moninkertaistaen HER-2/neu-proteiinituotteen ilmentymisen. (Holli, K., Isola, J., Järvinen, T. ja Tanner, M. 2000.)

Tutkimusten perusteella on todettu HER-2/neu-monistumaa esiintyvän 15 – 30 % rintasyöpätapauksista. Tutkimusten perusteella HER-2/neu-geenimonistuma esiintyy yleisimmin kinaloimusolmukkeisiin levinneissä rintasyövässä ja sen esiintyminen on myös yleisempää niissä rintasyöpätapauksissa jotka ovat hormonireseptorinegatiivisia. HER-2/neu-geenimonistuman on todettu heikentävän rintasyöpäpotilaan ennustetta, lisäävän syövän aggressiivisuutta ja uusintumisriskiä. (Constantine, T., Mitri, Z ja O'Regan, R. 2012.)

HER2/neu-positiivinen potilas hyötyy todennäköisesti tietyistä biologisista hoidoista huomattavasti enemmän kuin HER2/neu-negatiivinen potilas. HER2/neu-reseptorin toiminta voidaan estää joko vasta-aineiden tai pienimolekyylisten lääkeaineiden avulla. HER2/neu:n toiminnan estoon perustuvia biologisia hoitoja ovat trastutsumabi (vasta-aine) ja lapatinibi (pienimolekyylinen lääkeaine). (Holli, K., Isola, J., Järvinen, T. ja Tanner, M. 2000.)

HER-2/neu:n immunokemiallisessa värjäyksessä geenimonistumaan viittaavaa p185HER-2-proteiinin yliekspressio voidaan todeta syöpäsolujen solukalvolla. (Holli, K., Isola, J., Järvinen, T. ja Tanner, M. 2000.)

3 PAKSUNEULA- JA OHUTNEULARINTABIOPSIANÄYTTEENOTTO

Yleisempiä rintasyöpätutkimuksissa käytettäviä näytteenottomenetelmiä ovat ohutneularintabiopsia, englanniksi fine needle aspiration sekä paksuneularintabiopsia, englanniksi core needle biopsy. Tässä opinnäytetyössä tutkitut näytteet ovat otettu yllä mainituilla biopsiamenetelmillä. Rintasyöpädiagnostiikassa ohutneula- ja paksuneulabiopsioita otetaan rintakudoksessa havaituista epäilyttävistä muutoksista. Biopsioita edeltää usein rintojen kuvantamiseen käytettävät ultraääni- tai mammografiatutkimukset.

3.1 Ohutneulanäytteenotto ja ohutneulanäytteen esikäsittely

Rinnan ohutneulabiopsianäytteenotossa käytetään ohutta neulaa, kooltaan 21 - 25 gaugea, rintasolujen irrottamiseksi. Toimenpide on nopea, turvallinen, kustannustehokas. Näytteenoton lopputulos on hyvin riippuvainen näytteenottajan taidoista. Ohutneulabiopsian suurena etuna on sen mahdollinen toteutus vastaanottotiloissa ilman puudutusta. Tämän lisäksi näytteitä voidaan ottaa useasta kohdasta samalla kertaa ja näytteenotto uusia helposti. Ohutneulabiopsia on myös yksinkertaisin, nopein ja potilaalle vähiten traumaattinen näytteenottomenetelmä. Ohutneulabiopsian haittapuolena on ettei neulan kärki osu aina tutkittavaan kohtaan ja että näytteeksi saadaan vain soluja ilman kudoksen rakennetta täten tehden mahdottomaksi erottaa toisistaan invasiivinen ja *in situ* – syöpäkasvain. (Kivisaari, L., Manninen, H., Soimakallio, S., Svedström, E., Tervonen, O. 2005, 248.)

Ohutneulanäytteenotossa on tärkeää huomioida mahdollisuus osua tuumorin viereen, jolloin näyteruiskuun ei saada syöpäsoluja, nämä tapaukset voivat johtaa väärin negatiivisiin tuloksiin. Myös jos näyte jää ohutneulabiopsianäytteenotossa liian niukaksi syövän diagnosointi estyy. Ohutneulanäytteenotto on vähemmän invasiivinen näytteenottotekniikka kuin paksuneulanäytteenotto, infektion tai hematooman mahdollisuus näytteenotossa on myös hyvin pieni. Jos tutkittavaa näytettä ei ole syytä epäillä maligniksi ja todetaan ohutneulabiopsialla näytteen olevan benigni, on mahdollista välttää myöhempi kirurginen biopsia. Jos ensimmäinen ohutneulabiopsia ei ole laadultaan vakuuttava, suositellaan otettavaksi paksuneula- tai kirurginen biopsia. (Brancato B., Crocetti E., Bianchi S., Catarzi S., Risso GG., Bulgaresi P., Pisciole F., Scialpi M., Ciatto S., Houssami N. 2011.)

Näytteenottoteknisesti rinnan ohutneulabiopsioissa tutkittava kyhmy paikallistetaan palpoimalla, jonka jälkeen neula työnnetään kyhmyyn. Yhdistettynä mammografiaan tai ultraäänitutkimukseen, puhutaan suunnatusta ohutneulabiopsiasta. Tällä nykyään yleistyneellä suunnatulla menetelmällä näytteenoton osumatarkkuus on parempi. Neulan ruiskuun vedetään imu, neulaa liikutellaan kudoksessa neulan kärkeen kiinnityessä palasia kudoksesta. Ennen kuin neula vedetään tuumorista, imu poistetaan veri- ja ulkopuolisen kudoksetaminaation estämiseksi. Punktioitu näytemateriaali ruiskutetaan välittömästi 50 % alkoholiin (etanoli) fiksaatioon. (Iisalo, P., Sioris Thanos. 2012.)

Oulun yliopistollisessa sairaalassa ohjeen mukaan niukat, värittömät, kirkkaat ohutneulanäytteet fiksoidaan 15 ml:aan 50 % alkoholia. Runsaat näytteet fiksoidaan 1:1 50 %:een alkoholiin. Ruisku ja neula huuhdellaan samalla fiksaationesteellä, jotta mahdolliset neulaan jääneet solut saadaan näytteeseen mukaan. (Nordlab 2009.)

Alkoholifiksaatiossa alkoholi denaturoi kudoksen tai solujen proteiineja. Etanolia käytetään yleisesti sytologisten näytteiden fiksoinnissa. Fiksaation tarkoituksena on estää solujen autolyysi, estää mikrobikontaminaatiot solujen sisällä, mahdollistaa otetulle näytteelle myöhemmin suoritettavat värjäykset sekä säilyttää solujen morfologia mahdollisimman samankaltaisena kuin elävien solujen morfologia. Etanolifiksaatio säilyttää solujen tumien ja sytoplasmojen rakenteet erinomaisesti aiheuttamatta solujen kutistumista. Etanolifiksaatio on myös nopea menetelmä: fiksointi kestää 10 - 15 minuuttia. Histologiassa näytteissä etanolifiksaatio ei toimi yhtä hyvin kuin sytologiassa näytteissä, koska etanoli läpäisee kudoksia heikosti. (Shambayati 2011, 19 - 20.)

Alkoholifiksoidulle solunäytteelle voidaan suorittaa Papanicolaoun värjäys ja esitarkistus. Runsaista, kudoksetaminateja sisältävistä näytteistä voidaan tehdä lisäksi sytoblokkivalmiste, jossa solunäyte formaliinifiksoidaan, kudoksetaminateja ja valetaan parafiiniblokiksi ja siitä tehdystä leikkeestä tehdään rutiinisti HE-värjäys ja tarvittaessa erikois- ja immunohistokemiallisia värjäyksiä kuten estrogeenireseptori-, progesteronireseptori ja HER2/neu-värjäyksiä. (Nordlab 2009.)

3.2 Paksuneulanäytteenotto ja paksuneulanäytteen esikäsittely

Rinnan paksuneulabiopsianäytteenotossa käytetään neulaa, kooltaan 14- 18 gaugea, rintasolujen irrottamiseksi. Näytteenä on rintakudosmassa, jonka voi tuntea tai epäilyttävä alue jonka voi vain nähdä mammografialla tai muulla kuvaustekniikalla. Näytteenottotekniikka riippuu näytteestä. Jos koepalan voi tuntea käsin niin toimenpide on yksinkertaisempi kuin vastaavasti tilanteissa, joissa tarvitaan kuvantamisinstrumentteja näytealueen kohdentamiseksi sekä paksuneulan ohjaamiseksi oikealle paikalle. Kuvaustekniikan suorittamiseen hyödynnetään mm. kuvauslaitteita, ultraäänen sekä varjoaineiden käyttöä. Toimenpide voi aiheuttaa potilaille enemmän epämukavuutta kuin ohutneulanäytteenotossa, jolloin paikallispuudutuksen käyttöön voi olla tarvetta. (Brancato B., Crocetti E., Bianchi S., Catarzi S., Risso GG., Bulgaresi P., Pisciole F., Scialpi M., Ciatto S., Houssami N. 2011.)

Paksuneulabiopsian avulla saadaan kudoslieriöitä, jotka kuvastavat kudoksen rakennetta. Näytteenotossa neula yhdistetään laukaisulaitteeseen ja suunnataan kohteeseen pienestä ihoviillosta. Biopsiareitti puudutetaan näytteenotossa ja neulan liikettä voidaan seurata kaikukuvauksen avulla. Laukaisulaite ampuu neulan kohteeseensa. Neula vedetään pois, näyte pannaan steriilille paperipalalle ja asetetaan fiksoitumaan 10 % fosfaattipuskuroituun formaliiniin. (Kivisaari, L., Manninen, H., Soimakallio, S., Svedström, E., Tervonen, O. 2005.)

Ominaista paksuneulanäytteenottomenetelmälle on vähemmän teknisempi näytteenotto verrattuna ohutneulanäytteenottoon ja käytännöllinen näytteen kuljetus sekä säilytys formaliinissa. Paksuneulabiopsian etuna on, että sen avulla voidaan erottaa toisistaan invasiivinen ja *in-situ*-syöpäkasvaimet, lisäksi paksuneulabiopsioissa ilmenee vähemmän vääriä negatiivisia tuloksia kuin ohutneulabiopsioissa. Kuljetuksen lisäksi formaliinin käytöstä on etua sen ollessa osana kudosprosessointia, joka mahdollistaa myös näytteen esivalmistelun ja värjäyksen standardisoimisen. Paksuneulanäytteenotto myös mahdollistaa näytteen muokkaamisen, mm. materiaalin leikkaamisen useampiin kerroksiin ja erikoisvärjäysten käytön. Paksuneulanäytteenotto on myös käytännöllinen, koska sillä saadaan harvemmin riittämättömästi näytettä, ja se on vähemmän invasiivisempi kuin kirurginen näytteenotto. Paksuneulanäytteenotolla saadaan myös tarkempaa tietoa tuumorista, esim. sen tyypistä, luokituksesta sekä sen hormonireseptorin olotilasta. Haasteet paksuneulanäytteenotossa ovat samantapaisia kuin ohutneulanäytteenotossa eli on mahdollista olla osumatta tuumorialueeseen, ainakin tilanteissa missä ei voida hyödyntää kuvantamistekniikoita. Haittapuolena

paksuneulanäytteenotossa on myös traumaattisempi näytteenottokokemus potilaalle, näytteenotto-tilanteen pidempi kesto ja kalliimmat näytteenottovälineet. (Oyama T, Koibuchi Y, McKee G. 2004.)

Paksuneulanäytteenotossa otettu näyte kiinnitetään 10 % fosfaattipuskuroituun formaliiniin. Fiksaation tarkoituksena on säilyttää kudospäyte morfologisesti näytteenottoajankohtaa vastaavassa tilassaan. Formaliinifiksatio perustuu formaliinin ominaisuuteen silloittaa proteiineja toisiinsa. (Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP. 2012;16(3): 400 - 405.)

Kudospäyteistä tehdään histoblokkivalmisteita, joissa kudospäyteen formaliinifiksoidaan, kudospäyteen ja valetaan parafiiniblokiksi ja siitä tehdystä leikkeestä värjätään rutiinisti HE-värjäys ja tarvittaessa erikois- ja immunohistokemiallisia värjäyksiä kuten estrogeenireseptori-, progesteronireseptori ja HER2/neu-värjäyksiä.

4 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

4.1 Tutkimuksen kuvailu

Tutkimuksessa etsittiin Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorion tietojärjestelmästä sytologisia ohutneularintabiopsianäytteitä ja histologisia paksuneularintabiopsianäytteitä, näytteet sisältävistä blokeista leikattiin näyteleikkeet objektilaseille ja värjättiin kyseenomaiset ohutneula- ja paksuneularintabiopsianäyteleikkeet Bond- immunovärjäysautomaatilla. Sytologisten näytteiden immunokemiallisia värjäyksiä verrattiin vastaavien histologisten näytteiden immunokemiallisiin värjäyksiin mikroskooppisesti ja eri näytetyyppien löydöksiä vertailtiin. Tutkimuksen luotettavuuden haasteina oli mm. tarpeeksi kattavan näyteaineiston kokoaminen, näytteiden huolellinen oikeaoppinen käsittely, tutkimuksessa tarvittavien työprosessien hallitseminen ja tehtyjen immunokemiallisten värjäysten tulkitseminen sekä laadun varmentaminen.

Opinnäytetyön tarkoituksena oli sekä tutkia immunohistokemiassa käytettävien immunokemiallisten värjäysten toimivuutta sytologisissa ohutneulabiopsialla rinnasta otetuissa sytoblokinäytteissä että arvioida arkistoidun näytemateriaalin laatua ja soveltuvuutta tutkimuskäyttöön. Tavoitteenamme oli selvittää mitä vaikutuksia histologisten ja sytologisten näytteiden toisistaan poikkeavilla esikäsittelyprosessin fiksaatiomenetelmillä on immunokemiallisiin värjäyksiin ja tutkia johtavako nämä esikäsittelyprosessin eroavaisuudet vääriin positiivisiin tai vääriin negatiivisiin tuloksiin sovellettaessa histologisiin näytteisiin suunniteltuja värjäysmenetelmiä sytologisiin näytteisiin. Näytteiden soveltuvuudessa tutkimuskäyttöön keskeistä on näytteiden riittävä näytemateriaali ja tavoitteenamme oli myös arvioida arkistoitujen näytteiden riittävyttä ja laatua.

Tutkimuskysymyksinämme olivat:

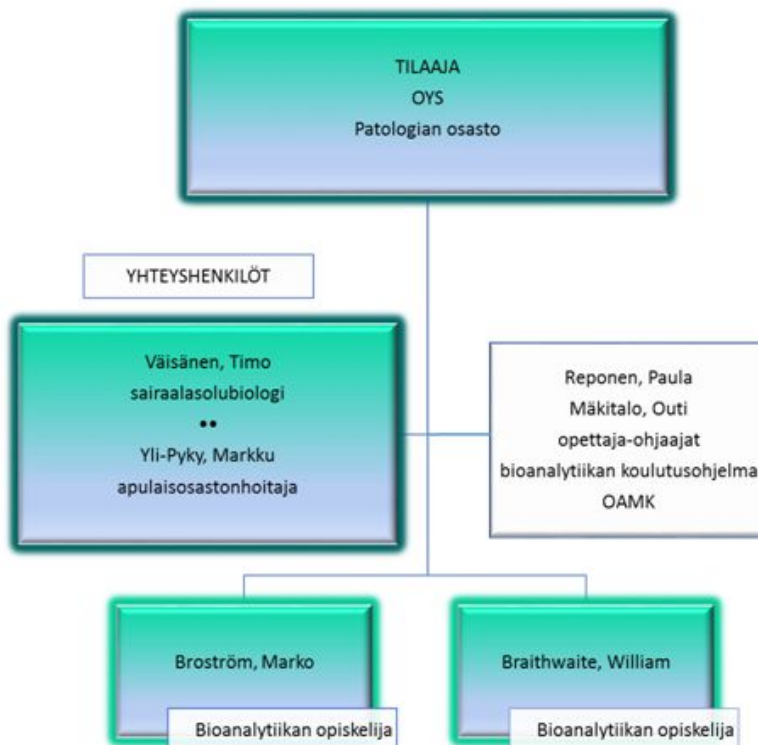
- soveltuvatko arkistoidut rintabiopsianäytteet tutkimuskäyttöön
- toimivatko immunokemialliset estrogeenireseptori-, progesteronireseptori- ja HER2/neu- värjäykset sytologisissa ohutneulalla rinnasta otetuista biopsianäytteissä, joista on tehty sytoblokkivalmistet

Tutkimustuloksistamme saatiin tietoa Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorion arkistoitujen histo- ja sytoblokinäytteiden soveltuvuudesta tutkimuskäyttöön ja immunohistokemiassa

käytettävien värjäysten sekä menetelmien soveltuvuudesta sytologisten näytteiden värjäykseen ja tutkimuksen tilaaja voi hyödyntää saamaansa tietoa. Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorio tuki tutkimustamme tutkimusvälineillään, tiloillaan ja tutkimusmateriaaleillaan sekä asiantuntijahenkilöstöllään. Työssämme käytettyjen skannattujen näytekuvioiden käytön mahdollisti Pohjois-Suomen biopankki Borealis.

4.2 Työympäristön kuvaus

Toimintaympäristönä oli Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorio. Tutkimusta ohjasivat patologian osaston sairaalalubiologi Timo Väisänen ja apulaisosastonhoitaja Markku Yli-Pyky. Koulun opettaja-ohjaajina toimivat Outi Mäkitalo ja Paula Reponen. Tutkimuksen työosuus tehtiin pääasiassa immunohistokemian osastolla. Immunohistokemian osastolla suoritetaan näytteiden esikäsittelyä sekä näytteiden immunokemiallisia värjäyksiä. Immunokemialliset värjäykset perustuvat vasta-aine-antigeeni-kompleksien muodostumiseen ja havaitsemiseen immunokemiallisesti värjäytyneissä näytteissä. Immunohistokemian osastolla käytimme Bond- immunovärjäysautomaattia ja spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita tutkittavien näytteiden immunokemiallisiin värjäyksiin.

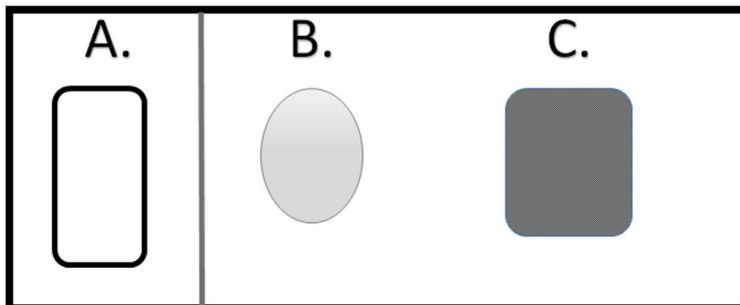


KUVIO 1. Kuvake organisaatioista sekä niiden välinen yhteistyö.

4.3 Työvaiheet

Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorion arkistosta kerättiin 39 rintasyöpäpotilasta-pauksen parafiinivaletut blokkinäytteet, jotka käsittivät jokaisen potilaan kohdalla vähintään yhden sytoblokkinäytteen ja yhden histoblokkinäytteen. Arkistoidut histoblokkinäytteet olivat fiksoitu aluksi formaliniin ja arkistoidut sytoblokkinäytteet aluksi alkoholiin ja myöhemmin myös formaliniin. Kokonaisuudessaan arkistosta kerättyjä blokkeja oli 88 kpl, joista 44 kpl oli histoblokkeja ja 44 kpl sytoblokkeja. Tässä vaiheessa havainnoimme että sytoblokeissa oleva näytemateriaali oli vähäinen tai olematon ja täten monissa tapauksissa makroskooppisesti mahdoton havaita.

Kaikista arkistosta haetuista blokkinäytteistä leikattiin vesiliukumikrotomeilla 3 µm paksuiset leikkeet kolmelle erille adhesiiviselle objektilasille estrogenireseptori-, progesteronireseptori- ja HER2-neu värjäystä varten. Kaikille objektilaseille leikattiin myös positiivinen kontrollileike kontrollihistoblokista. Kokonaisuudessaan näyteobjektilaseja kertyi 264 kpl.



KUVIO 2. Malli adhesiiviojektilasien käytöstä: A. kuvastaa näytetunnustarraa, B. on positiivinen potilaskontrolli näytteelle sekä C. on tutkittava histologinen tai sytologinen näyte.

Kaikille valmistetuille näyteobjektilaseille suoritettiin immunokemialliset värjäykset Leican Bond-immunovärjäysautomaatilla. Värjätyt näytteet analysoitiin mikroskopoimalla jokainen näyte ja määrittämällä näytteiden värjäysten positiivisuus tai negatiivisuus.

5 VÄRJÄYSTEN TULOKSET JA AIEMMAT TUTKIMUKSET AIHEESTA

5.1 Väryysten tulokset

Immunokemiallisesti värjätyt 39 potilastapauksen 264 näyteobjekttilasia analysoitiin mikroskopimalla jokainen näyte sairaalasolubiologin kanssa. Analyysissa ilmeni että vain 14 potilastapauksessa sekä histologista että sytologista näytettä oli potilaskohtaisilla näyteobjekttilaseilla. Tämä selittyy sillä että osassa tutkittavia sytoblokinäytteitä ei ollut enää mikrotomilla leikatessa näyttemateriaalia jäljellä lainkaan tai sitä oli niin vähän, ettei mikrotomileikkaus enää onnistunut niin vähäisestä määrästä. Patologi suoritti vielä jäljelle jääneistä potilastapauksista oman analyysinsa, jossa tutkittiin sisälsikö jäljelle jääneiden sytologisten näytteiden materiaali tutkittavia rintasoluja, jonka seurauksena vertailukelpoisten määrä tippui 8 potilastapaukseen. Alkuperäisistä 39 potilastapauksesta siis vain 8 osoittautui lopulta tutkimuskelpoiseksi sytologisen materiaalin puuttumisen tai niukkuuden vuoksi. Alkuperäisestä tutkimusmateriaalista suuri osa karsiutui pois sytologisten näytteiden niukkuuden takia, ja täten analyysikelpoiseksi kävi vain 20,5 % tutkittavista potilastapauksista. Tästä johtuen tutkimuskelpoisten potilastapausten määrän supistuessa näin merkittävästi tuloksista ei voi tehdä yleistäviä johtopäätöksiä värjäysten toimivuudesta. Arkistoitujen näytteiden laadusta voi suuren riittämättömien näytteiden määrän perusteella päätellä että arkistoidut sytoblokinäytteet ovat hyvin niukkoja.

Näissä vertailukelpoisissa jäljelle jääneissä näytteissä potilaskohtaiset immunokemialliset värjäykset histoblokki- ja sytoblokinäytteissä vastasivat 87,5 % tapauksissa toisiaan estrogeenireseptorivärjäyksessä, 87,5 % tapauksissa toisiaan HER2/neu-värjäyksessä, 100 % tapauksissa toisiaan progesteronivärjäyksessä. Vertailukelpoisten potilastapausten histoblokinäytteiden estrogeeni- ja progesteronireseptorivärjäyksistä 5 kpl oli positiivisia ja 3 kpl negatiivisia korreloiden toistensa kanssa. Jäljelle jääneistä vertailukelpoisten potilastapausten histoblokinäytteiden HER2/neu-värjäyksistä 7 kpl oli negatiivisia mutta yksi kappale oli positiivinen. Kaikissa vertailukelpoisissa potilastapauksissa, joissa histoblokinäyte oli näyte negatiivinen myös sytoblokinäyte oli negatiivinen kaikkien tutkittavien värjäysten osalta: negatiivisesti värjäytyneiden histoblokinäytteiden kohdalla potilastapausten värjäystulokset vastasivat siis toisiaan kummassakin näytetyypissä 100 %. Estrogeenireseptori- ja HER2/neu-värjäyksissä ilmeni kummassakin yksi potilastapaus, jossa histo-

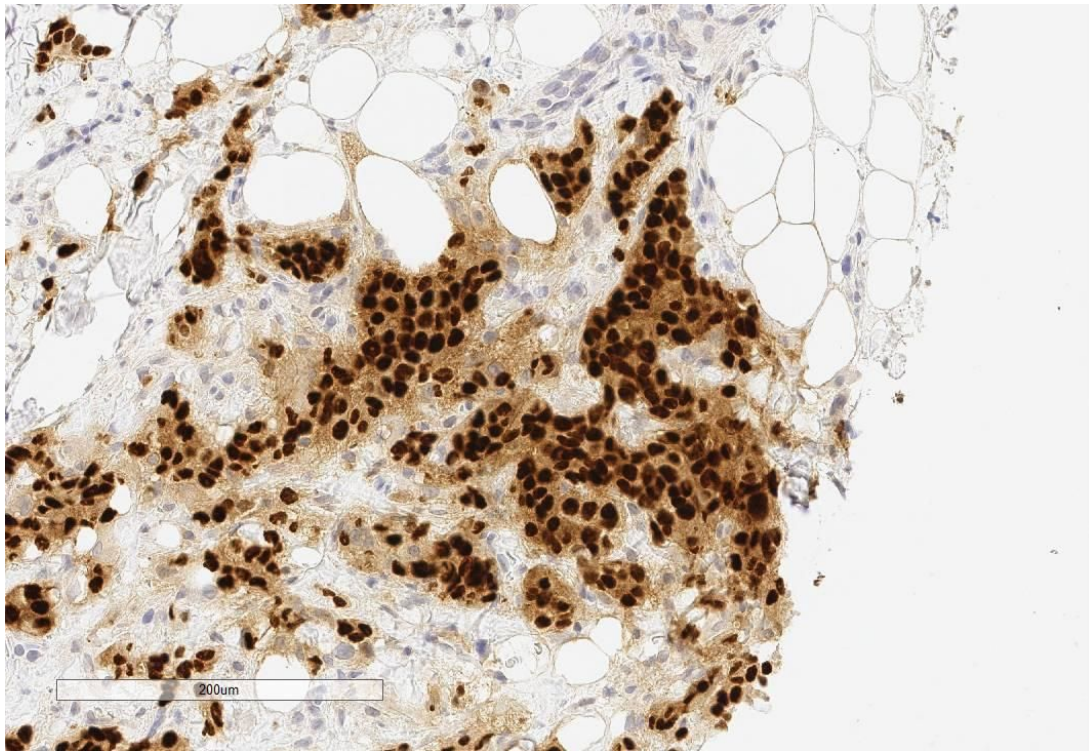
blokkinäyte värjäytyi positiivisesti mutta vastaava sytoblokkinäyte negatiivisesti. HER2-neu-värjäyksessä ilmeni vain yksi potilastapaus jossa histoblokkinäyte värjäytyi positiivisesti, tämä ei kuitenkaan vastannut negatiivisesti värjäytynyttä ko. potilastapauksen vastaavaa sytoblokkinäytettä. Positiivisesti värjäytyneiden histoblokkinäytteiden kohdalla potilastapausten värjäystulokset vastasivat toisiaan siis kummassakin näytetyypissä estrogeenireseptorivärjäyksessä 80 % tapauksista, progesteronireseptorivärjäyksessä 100 % tapauksista ja HER2/neu-värjäyksessä 0 % tapauksista.

Esimerkkejä värjäystuloksista havainnollistuu alla olevissa kuvioissa 3 - 7. Digitaalisesti skannatuissa kuvissa estrogeenireseptori- progesteronireseptori- ja HER2/neu- vasta-ainekompleksit värjäytyvät ruskeiksi. Kuvat ovat 200 µm tarkennuksella. Digikuvat tarjosivat Pohjois-Suomen biopankki Borealis.

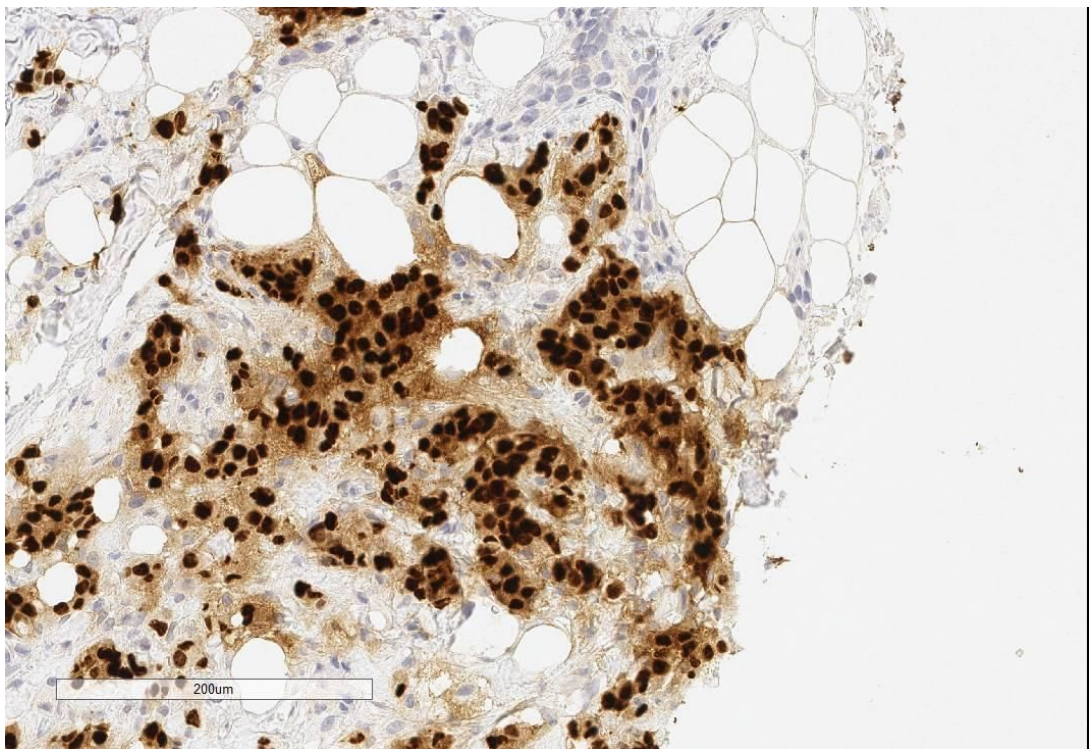
Tutkimustulokset näkyvät taulukoissa 1-3. Värjäyksien tulokset ilmenevät taulukkomuodossa, jossa on lajiteltu histologiset ja sytologiset potilastapaukset niiden immunovärjäystulosten mukaan. Taulukon sekä sen tulkinnat mahdollisti Oulun Yliopistollisen Sairaalan patologian laboratorio.

- HIST, histologinen tai kudoksenäyte
- SYTO, sytologinen tai solunäyte
- ER, estrogeenireseptorivärjäys
- PR, progesteronireseptorivärjäys
- C-ERB, toinen termi HER2/neu värjäyksille
- OB/OH, histologinen ja sytologinen näytteet

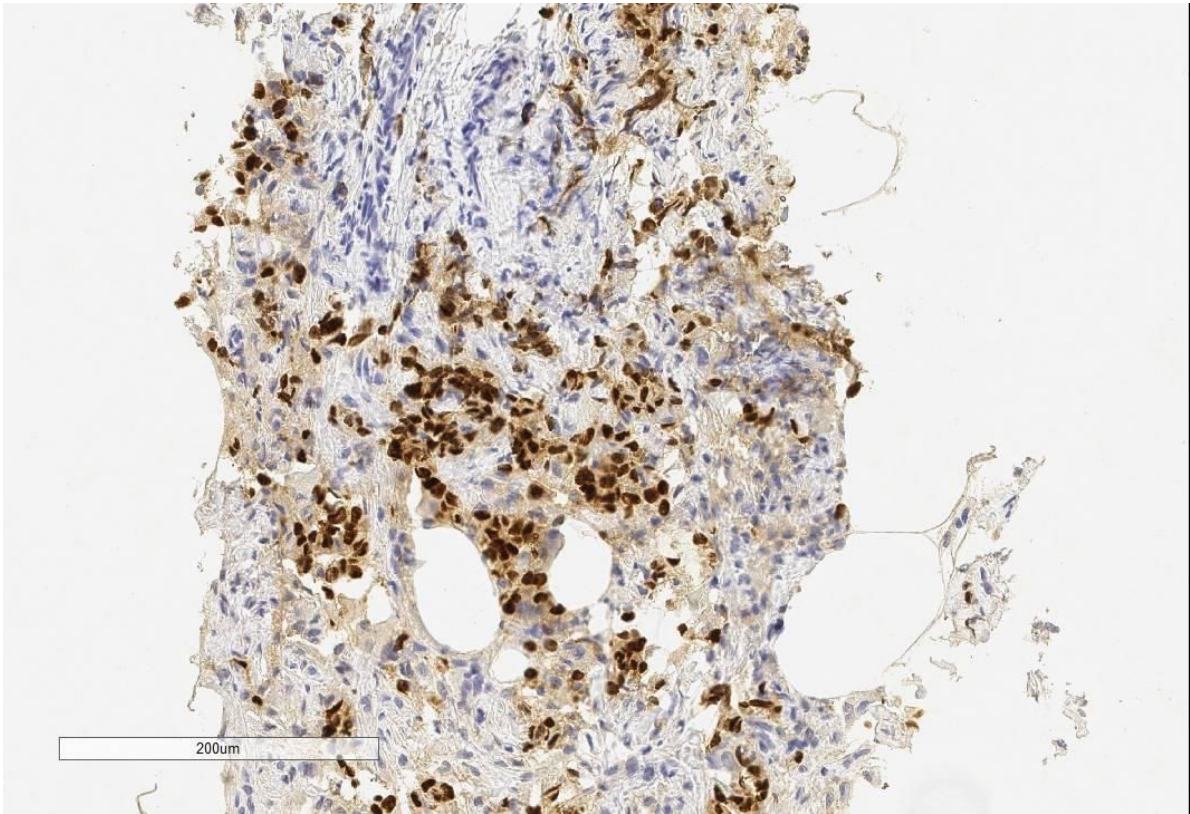
Esimerkkikuvat värjäyksistä eri näytetyypeissä



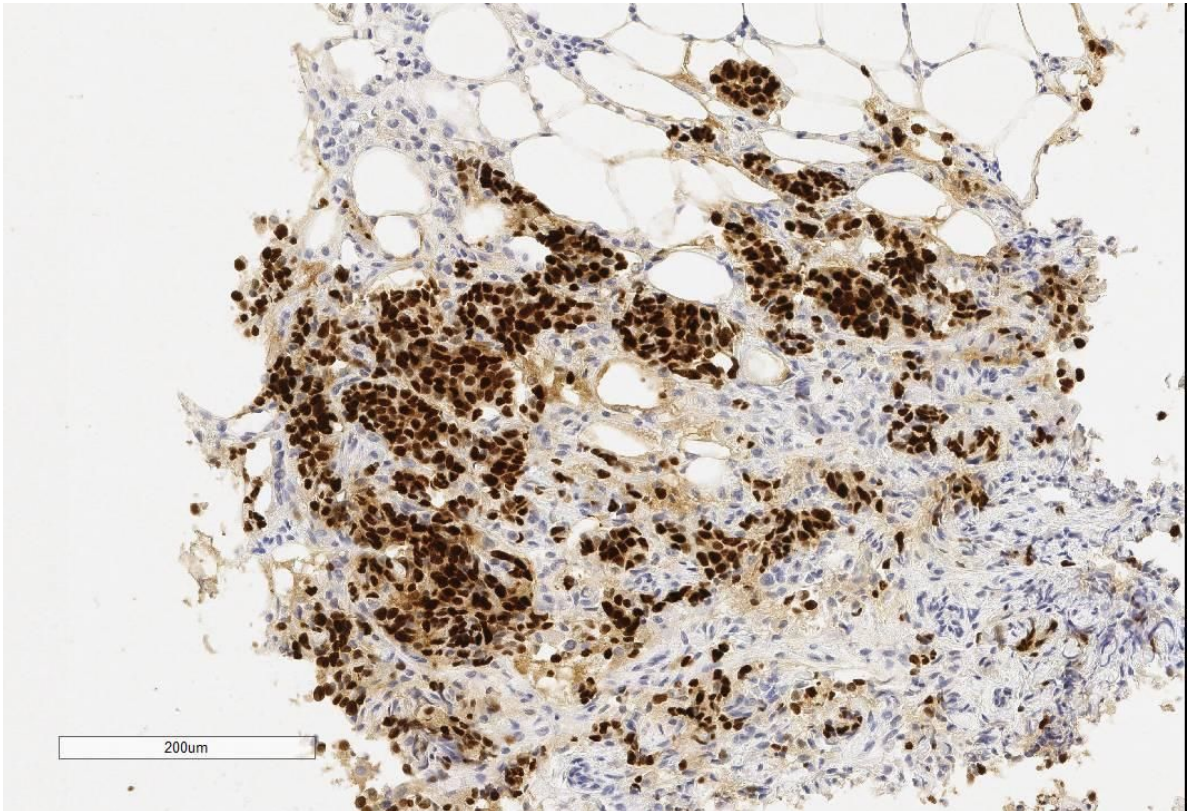
KUVIO 3. Positiivinen estrogeenireseptorivärjäys histoblokinäytteestä.



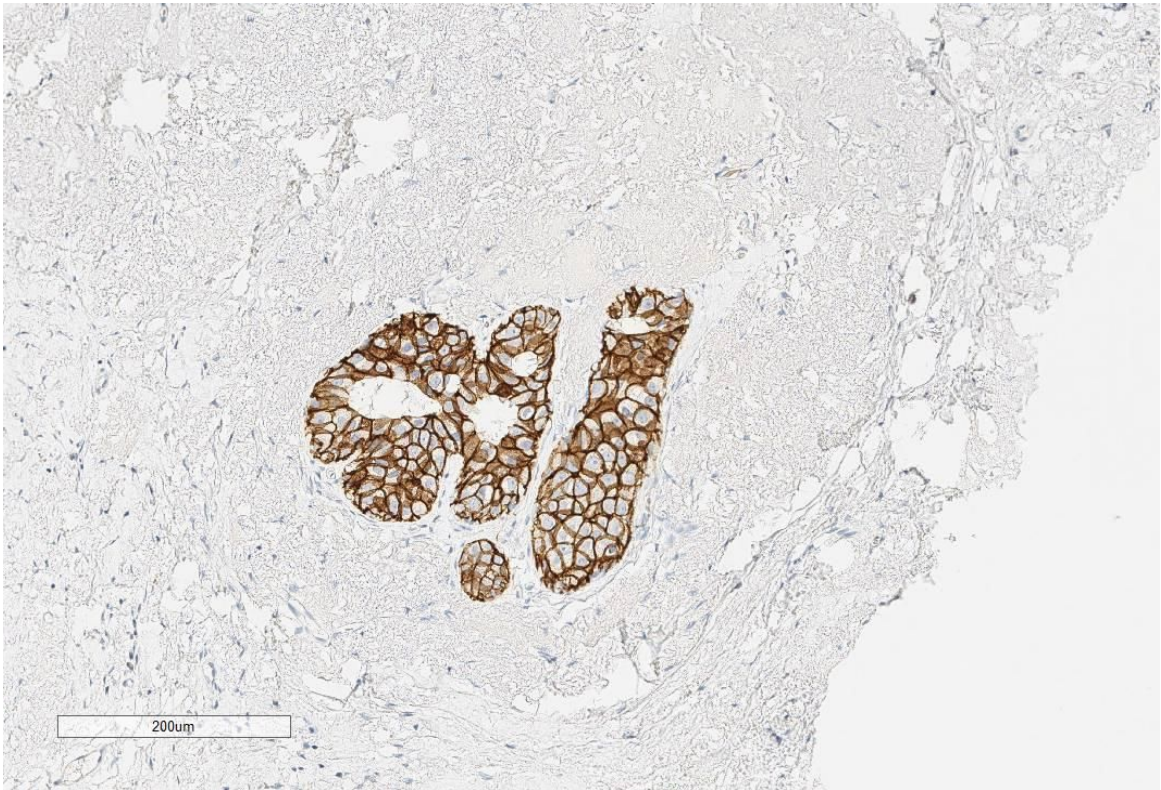
KUVIO 4. Positiivinen progesteronireseptorivärjäys histoblokinäytteestä.



KUVIO 5. Positiivinen estrogeenireseptorivärjäys sytoblokkinäytteestä



KUVIO 6. Positiivinen progesteronireseptorivärjäys sytoblokkinäytteestä



KUVIO 7. Positiivinen HER-2/neu-värijäys histoblokinäytteestä.

Tulostaulukko värjäyksistä

		ER	PR	C-ERB	ER sama HIST / SYTO	PR sama HIST / SYTO	C-ERB sama HIST / SYTO
	Tapaus 1:*						
	HIST-1.1	pos	pos	neg			
	HIST-1.2	pos	pos	neg			
	SYTO-1.1	neg	neg	neg	ei	ei	kyllä
	Tapaus 2:						
OK	HIST-2.1	pos	pos	neg			
	SYTO-2.1	pos	pos	neg	kyllä	kyllä	kyllä
	Tapaus 3:*						
	HIST-3.1	pos	pos	pos			
	HIST-3.2	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	SYTO-3.1	neg	neg	neg	ei	ei	ei
	SYTO-3.2	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 4:*						
	HIST-4.1	neg	neg	neg			
	SYTO-4.1	neg	pos	neg	kyllä	ei	kyllä
	Tapaus 5:						
	HIST-5.1	pos	pos	pos			
	SYTO-5.2	neg	neg	ei näyt	ei	ei	
	Tapaus 6:						
	HIST-6.1	pos	pos	pos			
	SYTO-6.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 7:						
OK	HIST-7.1	pos	pos	neg			
	SYTO-7.1	neg	pos	neg	ei	kyllä	kyllä
	Tapaus 8:						
	HIST-8.1	pos	pos	pos			
	SYTO-8.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 9:						
	HIST-9.1	ei näyt	pos	ei näyt			
	SYTO-9.1	neg	pos	ei näyt		kyllä	
	Tapaus 10:						
	HIST-10.1	pos	pos	neg			
	HIST-10.2	pos	pos	neg			
	SYTO-10.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 11:						
	SYTO-11.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	SYTO-11.2	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 12:						
	SYTO-12.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 13:*						
OK	HIST-13.1	pos	pos	pos			
	SYTO-13.1	pos	pos	neg	kyllä	kyllä	ei
	Tapaus 14:						
OK	HIST-14.1	pos	pos	neg			
	SYTO-14.1	pos	pos	neg	kyllä	kyllä	kyllä
	Tapaus 15:*						
	HIST-15.1	neg	ei näyt	neg			
	SYTO-15.1	neg	neg	neg	kyllä		kyllä

TAULUKKO 1. Värjäyksen tulokset, sivut 1 / 3

	Tapaus 16:						
OK	HIST-16.1	pos	pos	neg			
	SYTO-16.1	pos	pos	neg	kyllä	kyllä	kyllä
	Tapaus 17:						
	HIST-17.1	pos	pos	neg			
	SYTO-17.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	SYTO-17.2	neg	ei näyt	ei näyt	ei		
	Tapaus 18:						
	HIST-18.1	pos	pos	neg			
	SYTO-18.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 19:						
	HIST-19.1	pos	pos	pos			
	SYTO-19.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 20:						
	HIST-20.1	pos	pos	neg			
	SYTO-20.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 21:						
	HIST-21.1	pos	pos	pos			
	SYTO-21.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 22:						
OK	HIST-22.1	neg	neg	neg			
	SYTO-22.1	neg	neg	ei näyt	kyllä	kyllä	
	Tapaus 23:						
	SYTO-23.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 24:						
OK	HIST-24.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	HIST-24.2	neg	neg	neg			
	HIST-24.3	neg	neg	neg			
	SYTO-24.1	neg	neg	neg			
	Tapaus 25:						
	HIST-25.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	SYTO-25.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 26:						
	HIST-26.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	SYTO-26.1	neg	neg	neg			
	Tapaus 27:						
	HIST-27.1	pos	pos	neg			
	HIST-27.2	pos	pos	neg			
	HIST-27.3	pos	pos	neg			
	SYTO-27.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 28:						
	HIST-28.1	pos	pos	neg			
	SYTO-28.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 29:						
	HIST-29.1	neg	neg	neg			
	SYTO-29.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	SYTO-29.2	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 30:						
	HIST-30.1	pos	pos	neg			
	SYTO-30.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			

TAULUKKO 2.. Värjäyksien tulokset, sivut 2 / 3

	Tapaus 31:*						
	HIST-31.1	pos	pos	neg			
	HIST-31.2	pos	pos	neg			
	SYTO-31.1	neg	neg	neg	ei	ei	kyllä
	Tapaus 32:						
	HIST-32.1	pos	pos	neg			
	SYTO-32.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 33:*						
	HIST-33.1	pos	pos	pos			
	SYTO-33.1	neg	neg	neg	ei	ei	ei
	Tapaus 34:*						
	HIST-34.1	pos	pos	neg			
	SYTO-34.1	neg	neg	neg	ei	ei	kyllä
	Tapaus 35:						
	HIST-35.1	pos	pos	pos			
	HIST-35.1	pos	pos	pos			
	SYTO-35.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 36:						
OK	HIST-36.1	neg	neg	neg			
	SYTO-36.1	neg	neg	neg	kyllä	kyllä	kyllä
	Tapaus 37:						
	HIST-37.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	SYTO-37.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 38:						
	HIST-38.1	pos	pos	neg			
	SYTO-38.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	Tapaus 39:						
	HIST-39.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			
	SYTO-39.1	ei näyt	ei näyt	ei näyt			

TAULUKKO 3. Värjäyksien tulokset, sivut 3 / 3

5.2 Aiemmin tehtyjä tutkimuksia aiheesta

Opinnäytetyömme aiheesta on olemassa aikaisempia tutkimuksia, joita käsittelemme alla lyhyesti.

5.3 Tutkimus “Application of immunohistochemistry to Cytology”

Fowlerin vuonna 2007 julkaiseman tutkimuksen pääaiheena oli selvittää immunokemian soveltuvuutta sytologisiin näytteisiin. Lopputuloksena oli että immunokemiaa voi käyttää sytologisissa näytteissä, jos näytteiden esikäsittelyprosessi on suoritettu huolellisesti. Tutkimuksessa myös huomautetaan, immunokemiallisissa värjäyksissä vasta-aineiden herkkyteen ja spesifisyyteen vaikuttaa esim. reagenssien valmistaja ja käytetty tekniikka. Laadun varmistaminen on tärkeää sekä histologisten että sytologisten näytteiden immunokemiallisissa värjäyksissä. Tässä kappaleessa käsitellään lyhyesti kolme esimerkkiä immunokemian soveltamisen haasteista. (Fowler L., Whitney A., 2007.)

Yksi yleinen haaste on epäotollisten tai ei-optimoitujen kontrollien käyttö sytologisille näytteille. Kun käytetään alkoholifiksoituja näytteitä formaliinifiksoituilla parafiinikontrolleilla, niin tuloksiin voi tulla ei-toivottua vaihtelua. Toisistaan poikkeavien näytemateriaalien kontrollien tulisi olla samalla menetelmällä ja prosessilla hankittua kuin tutkittava materiaali. Laboratorioiden tulisi varautua immunokemiallisiin värjäyksiin uusilla ja riittävillä kontrolleilla (Wick M., Swanson P., 2002.). On myös raportoitu vääristä negatiivisista tuloksista esim. estrogeenireseptorivärjäyksessä alkoholifiksation kanssa. On mahdollista että tämä vaihtelu johtuu vasta-aineiden valmistajakohtaisista eroista sekä toisistaan poikkeavista laboratorion käytännöistä (Sneige, N. 2006.). Tällaisten vaihtelun vuoksi on suositeltu ottamaan lisää näytteitä, jotta saadaan sopivin sekä luotettavin värjäys diagnoosia varten. (Miller, R., Kubier, P. 2002.).

Toinen tavanomainen haaste mitä on raportoitu, oli sytoblokkien niukempi näytemateriaali ja matalampi sensitiivisyys verrattaessa vastaaviin histoblokkinäytteisiin. Havainnot olivat, että formaliinifiksoitujen sytoblokkien värjäykset olivat vähemmän sensitiivisiä joten tulisi olla huolellinen värjätessä tai tulkittaessa eriäviä näytteitä. (Fowler, L., Valente, P., Schantz, H., 1996.)

Kolmas tavallinen haaste on rajallisten näytemäärien käyttö tai liian vähäisen värjäyksien määrän suorittaminen diagnoosille. On suositeltu välttämään vain yhden värjäyksen käyttöä diagnostiikkaa varten, koska tämä voi johtaa liian yksipuolisiin diagnooseihin. (Swanson, P., 1993.)

Tutkimuksissa saatiin suhteellisen hyvä yhtäpitävyys sytologisten ja histologisten näytteiden immunokemiallisten värjäysten välillä, mutta on olemassa epäilyksistä että käytettävät menetelmät histologisten sekä sytologisten näytteiden välillä voivat johtaa vaihteluihin potilaiden diagnooseissa ja lopputuloksissa. (Brown, R. 1994.) Tästä johtuen suosituksena on välttää yksittäisten testien suorittamista diagnoosin tekemiseksi, tai saada asiantuntijan näkemyksen tuloksista, mukaan lukien estrogeeni- ja progesteronireseptori sekä HER2/neu- tutkimuksille. Laadun varmistamiseksi ja tilanteen sallissa olisi parempi odottaa histologista tulosta, vaikka värjäminen onkin mahdollinen vaihtoehto. (Suthipintawong, C., Leong, A., Chan, K., Vinyuvat, S. 1997.)

5.4 Tutkimus “Fine-Needle Aspiration Cytology Can Play a Role in Neoadjuvant Chemotherapy in Operable Breast Cancer”

Curén ja Garbarin 2013 vuoden tutkimuksessa tavoitteena oli perustella ohutneulanäytteenoton käyttöä rintasyöpätutkimuksissa vertailemalla paksuneula- ja ohutneulanäytteenoton tekniikoiden käyttö ja tulosten yhtäpitävyyttä estrogeeni-, progesteroni- ja HER2- värjäyksillä. Tutkimuksen aiheena oli hahmottaa vahvuudet ja haasteet tekniikoissa sekä myös analysoida näiden tulosten erojen vaikutus. Havaintona oli että nämä erot tuloksissa eivät olleet merkittäviä, jos ohutneulanäytteet olivat hyväksyttäviä laadultaan. Immunosytologisten kokeiden kehittyessä niiden tehokkuus on samaa luokkaa kuin niiden histologisten vastike. (Curé, H., Garbar C., 2013.)

Tutkimuksen mukaan ohutneulanäytteenoton tai paksuneulanäytteenoton käytöllä ovat omat etunsa ja haasteensa ja näiden soveltaminen riippuu laboratorion käytännöistä ja asiantuntijoiden suosituksista. Vaikka esim. paksuneulanäytteenoton tulokset ovat kattavammat, ohutneulanäytteenotolla voidaan saada nopeampaa diagnostiikkaa joka on verrattavissa histologisten jääleikkeiden nopeuteen. (Liew P., Liu T., Hsieh M., Lin H., Lu C., Yao M., Chen C. 2011.)

Tutkijoiden perustelut pohjautuvat 2012 tutkimukseen, jossa arvioitiin estrogeeni-, progesteroni- ja HER2/neu- värjäyksien immunokemiallinen luotettavuus alkoholifiksoiduilla sivelyvalmisteista. Tutkimusmateriaalina oli ohutneulanäytteitä rintasyöpäuumeista tai syövän metastaaseista, jotka olivat kerätty 18 kuukauden aikajaksolla. Näytemäärä oli 47 potilastapausta. Tulokset verrattiin näytteiden formaliinifikoitujen kudostapahtumiin. Immunokemialliset värjäystulokset olivat estrogeenille 95 %:n korrelaatio, progesteronille 90 % sekä HER2/neu 88 %, tosin immunosytokemiallisia tuloksia näytteistä jossa oli vähemmän kuin 50 solua ei sisälletty analyysiin. Tutkielman johtopäätökset olivat että immunokemialliset värjäykset estrogeenille, progesteronille ja HER2/neu olivat luotettavia ohutneulanäyteistä, erityisesti jos näytteet sisälsivät runsaasti soluja. (Ferguson J., Chamberlain P., Cramer H., Wu H., 2012.)

Osa tutkimuksista ovat antaneet aiheita olla huolellinen tehdessä päätelmiä kokeiden tuloksista, kuten 2010 ja 2011 vuosien tutkimukset osoittavat. 2010 tutkimuksessa vertailtiin estrogeeni-, progesteroni-, ja HER2/neu immunokemialliset värjäyksiä 42 formaliinifiksoiduista ohutneulalla otetussa sytoblokinäytteessä vastaaviin kudostapahtumiin. Kokeiden tulokset olivat 100 % korrelaatio HER2/neu näytteillä, ja estrogeenille 85.7 % korrelaatio sekä progesteronille 80 % korrelaatio. (Shabaik A., Lin G., Peterson M., Weidner N., 2010.)

5.5 Muita aiempia kvantitatiivisia tutkimuksia

Vuonna 2012 julkaistussa tutkimuksessa tutkittiin 62 rintakarsinoomapotilastapausta, joissa potilaista oli otettu sytologinen ohutneularintabiopsianäyte ja kirurginen näyte. Sekä ohutneularintabiopsianäytteille että vastaaville kirurgisille näytteille tehtiin immunokemialliset estrogeenireseptori-, progesteronireseptori- ja HER-2/neu- värjäykset. Sytoblokit oli fiksoitu alkoholissa ennen formaliinifiksointia. Estrogeenireseptorivärjäyksen sensitiivisyys sytoblokinäytteissä oli 92,7 %, progesteronireseptorivärjäyksen sensitiivisyys 92,7 % ja HER-2/neu- värjäyksen sensitiivisyys 70 %. (Bueno, Angela., Soares CT., Viero RM. 2012.)

Vuonna 2012 julkaistussa toisessa tutkimuksessa 25 potilaan ohutneularintabiopsiasytoblokinäytteiden estrogeeni- ja progesteronireseptorivärjäyksiä verrattiin potilaskohtaisesti vastaavien kirurgisten näytteiden ja paksuneularintabiopsianäytteen immunokemiallisiin värjäyksiin. Estrogeenireseptorivärjäyksessä näytteet korreloivat toistensa kanssa 92 % ja progesteronireseptorivärjäyksessä näytteet korreloivat toistensa kanssa 96 %. (Domanski, A.M., Domanski, H.A., Fernö, M., Grabau,D., Monsef, N. 2012.)

Vuonna 2011 julkaistussa tutkimuksessa vertailtiin estrogeenireseptori-, progesteronireseptori- ja HER2/neu-värjäyksiä sytoblokinäytteissä ja vastaavissa kudospätkäpotilastapaustapauksessa. Estrogeenireseptorivärjäyksessä näytteiden värjäystulokset vastasivat toisiaan 90 %, progesteronireseptorivärjäyksessä 94 % ja HER2/neu-värjäyksessä 90 %. Tutkimuksen loppupäätelmänä korostettiin myös sytoblokinäytteiden laatua ja niiden tulkitsemisen laadunvalvonnan tärkeyttä. (Gupta, N., Joshi, K., Kumar, S, K., Rajwanshi, A. 2011.)

6 POHDINTA

Opinnäytetyömme tarkoituksena oli selvittää soveltuvatko Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorion arkistoidut rintabiopsianäytteet tutkimuskäyttöön ja toimivatko estrogeenireseptori-, progesteronireseptori- ja HER2/neu-värjäykset sytologisissa ohutneulalla rinnasta otetuissa biopsianäytteissä. Vertailimme Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratoriossa kolmen yleisesti rintasyöpädiagnostiikassa käytetyn immunokemiallisen värjäyksen yhtäpitävyyttä esikäsittelyltään toisistaan poikkeavissa näytetyypeissä potilastapauksissa, joissa potilailta oli saatavilla sekä histologinen rintabiopsianäyte että sytologinen rintabiopsianäyte. Värjäysten lopputulokset voivat vaikuttaa potilaiden hoitopäätöksiin, joten vertaileva tutkimus oli hyödyllinen.

Lopulta tutkituista kahdeksan potilastapauksen näytteistä yhtäpitävyys histologisen ja sytologisen näytteen välillä oli 87,5 % estrogeenireseptorivärjäyksessä, 100 % prosenttia progesteronireseptorivärjäyksessä ja 87,5 % HER2/neu-värjäyksessä. Histologisen näytteen värjäyksen ollessa negatiivinen oli myös sytologisen näytteen värjäystulos kaikissa tapauksissa negatiivinen, histologisen näytteen värjäyksen ollessa positiivinen oli sytologinen näyte myös positiivinen 80 % tapauksissa estrogeenireseptorivärjäyksessä, 100 % tapauksissa progesteronireseptorivärjäyksessä mutta 0 % tapauksista HER2/neu-värjäyksessä. Verrattaessa tulostamme aiemmin tehtyihin vastaaviin tutkimuksiin aiheesta, joissa estrogeenireseptorivärjäyksen yhtäpitävyys näytteiden välillä vaihteli välillä 92 % -95 %, progesteronireseptorivärjäyksen yhtäpitävyys välillä 90 %- 96 % ja HER2/neu-värjäyksen yhtäpitävyys 70 %-90 %, tuloksemme ovat estrogeenireseptorivärjäyksen ja progesteronireseptorivärjäyksen osalta samansuuntaisia. HER2/neu-positiivisia näytteitä oli lopulta tutkittavissa näytteissä vain yksi kappale, joten yksittäisen näytteen tulokseen voi suhtautua äärimmäisen varauksellisesti.

Tutkimuksemme perusteella Oulun yliopistollisen sairaalan patologian laboratorion arkistoidut ohutneularintabiopsiasytoblokkit osoittautuivat niukoiksi. Tutkittavien potilastapauksien määrä väheni 20 %:iin alkuperäisestä tutkittavasta potilastapauksien määrästä sen takia, että kaikista tutkittavista sytoblokeista leikatuilla leikkeillä ei ollutkaan näyttemateriaalia jäljellä lainkaan tai sitä oli liian niukasti ilman varsinaista tutkimuksenalaista rintakudosta. Paksuneularintabiopsiahistoblokeissa näyttemateriaalia oli huomattavasti runsaammin verrattuna ohutneularintabiopsiasytoblokkeihin. Näyttemateriaalin puuttumisen vuoksi 80 %:ssa arkistosta haetuista potilastapauksissa histologisen

ja sytologisen näytteen vertailu estyi. Tämä johti tilastollisesti analysoitavien potilastapausten määrään vähenemiseen kahdeksaan potilastapaukseen. Kahdeksasta potilastapauksesta saatavassa tutkimuksessa tutkittavien kohteiden otos jäi liian pieneksi luotettavien johtopäätöksien tekemiseen tutkittavien värjäyksien toimivuudesta. Mikäli immunokemiallisten värjäysten toimivuutta halutaan tutkia jatkossa, tulisi tutkimuksessa olla käytössä sytoblokkeja, jossa on runsaammin näytettä tai tuore näyte, tai suurempi määrä vertailtavia potilastapauksia, tarpeeksi suuren otoksen ja tutkimuslaadun takaamiseksi johtopäätöksien tekemistä varten värjäysten soveltuvuudesta.

Tutkimuksen aihe oli meille suhteellisen uusi, joten alussa tiedonhankinta ja tietoperustan luominen olivat tärkeitä vaiheita työn edistämiseksi. Oulun yliopistollinen sairaala tarjosi meille asiantuntevasta ja tukea tiedonhankinnassa. Alussa haasteena oli riittävän laajan aineiston kerääminen. Suurena apuna olivat lääketieteelliset tietokannat, mutta suurin osa tutkimuksista eivät olleet kokonaan julkisia, tosin tutkimuksien otsikko, tekijät, organisaatio ja abstrakti olivat julkisia, josta saatiin osa tietoa tutkimuksesta. Monissa tutkimuksissa oli poikkeavuuksia tai eroja mm. näytteen fiksatiotavoissa, näytteen esikäsittelyssä ja laboratoriokäytännöissä. Tutkimusta myös hankaloitti näytteiden leikkaamisen tekninen haastavuus. Näytteen materiaalin vähäisyys tai visualisoinnin vaikeus parafiiniblokeissa hidasti tutkimuksen suorittamista. Meidän tuli ottaa huomioon meidän yhteistyömme patologian laboratorion kanssa, jonka seurauksena kaksi mikrotomia oli poissa käytössä rutiinistöistä kun varasimme ne tutkimuksen suorittamista varten, sekä myös ylimääräinen aiheuttamamme työkuorma immunovärjäysautomaatilla.

Oppimiskokemus oli monipuolista sekä myötävaikutteista alun hankaluuksista huolimatta. Kokeimuksia saatiin niin käytännön asioista esim. vesiliukumikrotomin käytöstä ja leikkaustekniikoista, sekä myös paljon teoreettista tietämystä esim. immunokemiallisista värjäyksistä ja tiedonhausta. Yhteistyö henkilöstön kanssa ja laboratoriokäytäntöjen harjoittelu oli arvokas kokemus, josta on hyötyä tulevaisuudessa oman ammattitaidon kehittyessä.

LÄHTEET

Breastcancer.org 2016. How to read hormone receptor test results. Viitattu 15.2.2016, http://www.breastcancer.org/symptoms/diagnosis/hormone_status/read_results

Brancato B., Crocetti E., Bianchi S., Catarzi S., Risso GG., Bulgaresi P., Pisciole F., Scialpi M., Ciatto S.,

Houssami N. 2011. Accuracy of needle biopsy of breast lesions visible on ultrasound: audit of fine needle versus core needle biopsy in 3233 consecutive samplings with ascertained outcomes.

Brown, R.W. 1994. Practical application of immunocytochemistry in cytology. American Society of Cytology.

Bueno, A., Soares CT., Viero RM. 2012. Fine needle aspirate cell blocks are reliable for detection of hormone receptors and HER-2 by immunohistochemistry in breast carcinoma. Viitattu 29.2.2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22220518?dopt=abstract>

Constantine, T Mitri, Z., ja O'Regan, R. 2012. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. Viitattu 15.2.2016, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3539433/>

Curé, H., Garbar C., 2013. Fine-Needle Aspiration Cytology Can Play a Role in Neoadjuvant Chemotherapy in Operable Breast Cancer

Dabbs D. 2006. Diagnostic Immunohistochemistry.

Domanski, A.M., Domanski, H.A., Fernö, M., Grabau, D., Monsef, N. 2012. Comparison of the oestrogen and progesterone receptor status in primary breast carcinomas as evaluated by immunohistochemistry and immunocytochemistry: a consecutive series of 267 patients. Viitattu 1.3.2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22783929?dopt=abstract>

Ferguson J., Chamberlain P., Cramer H., Wu H, 2012. ER, PR, and Her2 immunocytochemistry on cell-transferred cytologic smears of primary and metastatic breast carcinomas: A Comparison Study With Formalin-Fixed Cell Blocks and Surgical Biopsies.

Fowler, L & Lachar, W. 2008. Application of Immunohistochemistry to Cytology. Arch Pathol Lab Med. 2008;132:373-383.

Fowler L., Whitney A., 2007. Application of Immunohistochemistry to Cytology.

Fowler, L., Valente, P., Schantz, H., 1996. Cell block techniques and immunocytochemistry.

Swanson, P., 1993. Diagnostic immunohistochemistry: a practical primer for the benighted bureaucrat.

Gupta, N., Joshi, K., Kumar, S.K., Rajwanshi, A. 2011. Immunohistochemistry for oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2 on cell blocks in primary breast carcinoma. Viitattu 1.3.2016, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21375607?dopt=abstract>

Holli, K., Isola, J., Järvinen, T., Tanner, M. 2000. HER-2/neu-onkogeneeni rintasyövän hoidon valinnassa ja immunoterapian kohteena Viitattu 15.2.2016, http://www.duodecimlehti.fi/web/guest/haku.jsessionid=1432ACEA7DD06938D418D71D91C889CB?p_p_id=Article_WAR_DL6_Articleportlet&p_p_lifecycle=0&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_p_from-page=uusinnumero&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_viewType=viewArticle&_Article_WAR_DL6_Articleportlet_tunnus=duo91661

Huslab 2016. Reseptoritutkimus kudosnäytteestä. Viitattu 15.2.2016, <http://huslab.fi/ohje-kirja/2575.html>

Iisalo, P., Sioris Thanos. 2012. Rintarauhaskyhmyn ohutneulabiopsia. Kirurgiset pientoimenpiteet.

Johnson C. 1999. Issues in immunohistochemistry.

Keebler C. 1991. CM K. Cytopreparatory techniques. In Bibbo M Comprehensive Cytopathology.

Kivisaari, L., Manninen, H., Soimakallio, S., Svedström, E., Tervonen, O. 2005. Radiologia.

Kocjan G. 2006. Fine Needle Aspiration Cytology.

Liew P., Liu T., Hsieh M., Lin H., Lu C., Yao M., Chen C. 2011. Rapid Staining and Immediate Interpretation of Fine-Needle Aspiration Cytology for Palpable Breast Lesions: Diagnostic Accuracy, Mammographic, Ultrasonographic and Histopathologic Correlations.

Mann G. 1902. Physiologic histology, Oxford.

Miller, R. 2005 Cytopathology from an immunohistochemist's perspective. The Focus.

Miller, R., Kubier, P. 2002. Immunohistochemistry on cytologic specimens and previously stained slides (when no paraffin block is available).

Monaco S., Wu Y., Teot L., Cai G., 2011. Assessment of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) status in the fine needle aspirates of metastatic breast carcinomas.

Nordlab. 2009. Ohutneulabiopsiatutkimus, solunäyte. Viitattu 12.3.2016, <http://oyslab.fi/ohjekirja/3990.html>

Oyama T, Koibuchi Y, McKee G. 2004. Core Needle Biopsy (CNB) as a Diagnostic Method for Breast Lesions: Comparison with Fine Needle Aspiration Cytology (FNA).

Rintasyöpä.fi. 2016. Rintasyövän hormonihoito. Viitattu 15.2.2016, <http://www.rintasyopa.fi/rintasyovan-hoito/hormonihoito/>

Shabaik A., Lin G., Peterson M., Weidner N., 2010. Reliability of Her2/neu, Estrogen Receptor, and Progesterone Receptor Testing by Immunohistochemistry on Cell Block of FNA and Serous Effusions From Patients With Primary and Metastatic Breast Carcinoma.

Shambayati, B. 2011. Cytopathology. Oxford: Oxford University Press.

Sneige N., 2006. Hormone receptor analysis of breast cancer. International Academy of Pathology

Sneige, N. 2006. Hormone receptor analysis of breast cancer: current issues.

Suthipintawong, C., Leong, A., Chan, K., Vinyuvat, S. 1997. Immunostaining of estrogen receptor, progesterone receptor, MIB1 antigen and c-erbB-2 oncoprotein in cytologic specimens.

Taylor C., Cote R. 1994. Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist.

Terveyskirjasto 2016. Estrogeenireseptori. Viitattu 15.2.2016, http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=ltt00776

van Regenmortel M. 1994. The recognition of proteins and peptides by antibodies.

Wick M., Swanson P., 2002. Targeted controls in clinical immunohistochemistry.