

Pirjo Laasanen

Immunohistokemiallisen värjäyksen optimointi Merkelinsolukarsinoomalle ja T-lymfosyyttien laskeminen ImmunoRatio-ohjelman avulla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko-AMK

Bioanalytiikka

Opinnäytetyö

14.4.2014

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Pirjo Laasanen Immunohistokemiallisen värjäyksen optimointi Merkelinsolukarsinoomalle ja T-lymfosyyttien laskeminen ImmunoRatio-ohjelman avulla 25 sivua 18.4.2014
Tutkinto	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto. Bioanalytiikka AMK
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Ohjaaja(t)	Lehtori Hannele Pihlaja FT Harri Sihto
<p>Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli optimoida immunohistokemiallinen värjäys merkelinsolukarsinoomanäytteille ja laskea kasvainkudoksessa olevat T-solut. Värjäys tehtiin tuplavärjäyksenä, jossa ensin värjättiin T-solut käyttäen entsyymattista leimaa ja DAB-värjäystä. Tämän jälkeen näytteistä värjättiin kasvainkudos käyttäen fluoresoivaa leimaa. Näytteistä oli tarkoitus laskea kasvainkudokseen infiltroituneet T-solut käyttäen laskennassa apuna virtuaalimikroskopiaa ja immunoratio-ohjelmaa. Ohjelman avulla värjättyä lasilta skannataan ensin valomikroskooppikuva T-soluista ja sen jälkeen fluoresenssikuva kasvainkudoksesta. Ohjelma asettaa kuvat päällekkäin ja pystyy laskemaan T-solut kasvainkudoksen alueelta.</p> <p>Tutkimuksissa on osoitettu kasvainkudokseen infiltroituneiden T-solujen (TILs eli tumor infiltrating lymphocytes) määrällä olevan yhteyttä Merkelinsolukarsinooman suotuisampaan ennusteeseen. Opinnäytetyön tuloksena haluttiin saada TIL-solujen laskemiseen automatisoitu työtapo vertailukelpoisten tulosten aikaansaamiseksi ja työn nopeuttamiseksi.</p> <p>Työ tehtiin Biomedicumissa syöpätautien tutkimusyksikössä. Värjäyksen optimoinnissa käytettiin 3 Merkelinsolukarsinooman kudoksetä. Näytteille tehtiin immunohistokemiallisia värjäyksiä vaihdellen vasta-aineita ja niiden pitoisuuksia sekä inkubaatioaikoja. Optimoinnissa haettiin parasta mahdollista värjäystulosta, jotta kuvia voitaisiin käsitellä virtuaalimikroskoopilla.</p> <p>Työn aikana tuli ilmi, että merkelinsolukarsinoomalle ei onnistuttu tekemään sellaista värjäystä, että kuvia olisi voitu tulkita virtuaalimikroskoopilla. T-solut värjäytyivät hyvin, mutta kasvainkudoksen fluoresenssisignaali ei tullut tarpeeksi voimakkaaksi. Lisäksi näytteiden tausta värjäytyi voimakkaasti. Taustan fluoresenssia onnistuttiin hieman vähentämään käsittelemällä kudosta glysiinissä ja ammoniumkloridissa. Se ei kuitenkaan poistanut ongelmaa kasvainkudoksen liian heikosta fluoresenssisignaalista. Glysiini ja ammoniumkloridikäsitteily otettiin käyttöön toisessa opinnäytetyössä, jossa tehtiin vastaavaa optimointia GIST-näytteillä. Työn perusteella merkelinsolukarsinoomanäytteitä ei saatu värjäytymään niin, että niiden automaattinen laskenta olisi mahdollista.</p>	
Avainsanat	immunohistokemia, T-solu, TIL-solu, virtuaalimikroskopia

Author(s) Title	Pirjo Laasanen Optimizing an immunohistochemical staining for Merkel Cell Carcinoma and counting T-lymphocytes by using ImmunoRatio-program
Number of Pages Date	25 pages 18 Apr 2014
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Hannele Pihlaja, Senior Lecturer Harri Sihto, Ph.D
<p>Purpose of this study was to optimize the immunohistochemical staining for Merkel cell carcinoma (MCC) and count all T-cells in cancer tissue. Staining was carried out doublestaining First T-cells were stained using enzymatic label and DAB staining. After that the tumor tissue were stained by using a fluorescent label. There was a meaning to calculate number of the TILs using virtual microscopy and immunoratio program. First the program take light microscope picture of the T-cells and then the fluorecence picture of the cancer tissue.</p> <p>Studies have shown that number of tumor infiltrating T-cells (TILs ie tumor infiltrating lymphocytes) is associated with a more favorable prognosis in MCC (ie merkel cell carcinoma) . In this study there was a meaning to create a protocol to automatic calculation of T-cells in MCC tissue.</p> <p>The work was done in Biomedicum for the laboratory of molecular onkology. The staining was optimized by using the three MCC tissue sections . There were made immunohistochemical stainings to the samples by varying antibodies and their concentrations, and incubation times for achieving the best possible staining result for virtual microscopy.</p> <p>During the staining it was found that MCC samples did not get so good staining result that pictures could have processed by virtual microscopy. T-cells were stained well. The tumor tissue fluorescence signal does not become sufficiently strong. Background of the samples stained strongly. It was found that treating the tissue with glycine and ammonium chloride reduced background staining. However it does not remove the problem of the weak staining of the cancer tissue. Glycine and ammonium chloride process was introduced in second thesis. That thesis was similar immunohistochemical staining optimization for GIST samples. Result of this study is that MCC samples did not stained so that T-cell calculation with virtual microscopy would be possible.</p>	
Keywords	immunohistochemistry, T-cell, TIL, virtual microscopy

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Merkelinsolukarsinooma	2
2.1	Merkelinpolyoomavirus (MCPyV)	2
2.2	Kasvurajoitinantigeenit	3
3	Tuumorilymfosyytit	4
3.1	Syövän synty	4
3.2	Tuumorilymfosyytit	5
3.3	T-soluluokat	5
4	Immunohistokemialliset menetelmät ja näytteiden käsittely	7
4.1	Leimat	7
4.2	Menetelmät	8
4.3	Histologisten näytteiden käsittely	9
5	Työn tarkoitus ja tutkimuskysymykset	9
6	Työn toteuttaminen	11
6.1	Kudoksen käsittely	11
6.2	Immunovärjäys	12
7	Virhelähteet ja tulosten luotettavuus	20
8	Tulokset	21
9	Pohdinta	22
9.1	Työn tulos	22
9.2	Jatkotoimenpiteet	23
9.3	Työprosessi	23

Lähteet

1 Johdanto

Teen opinnäytetyöni Professori Heikki Joensuun tutkimusryhmälle. Heikki Joensuu on akatemiaprofessori (2010-2014). Hän toimii vastuullisena tutkijana syöpätautien osaston molekyyli- ja syöpäbiologian tutkimusohjelmassa (Tuhat-tutkimustietojärjestelmä). Heikki Joensuun ryhmän tutkimus liittyy kliiniseen syöpätutkimukseen ja syövän liitännäishoitoihin. Tutkimuksen tarkoituksena on löytää uusia hoitoja, täsmälääkkeitä sekä kehittää tutkimusmenetelmiä, joiden avulla voitaisiin tunnistaa sellaisia potilaita joiden riski syövän uusiutumiselle on suuri. (Suomen Akatemia akatemiaprofessorit 2010.)

Joensuun ryhmän tutkimuksen kohteina ovat olleet erityisesti GIST-kasvaimet (ruuan-sulatuskanavan sarkooma) ja rintasyöpä. Tutkimusten tuloksena on saatu uusia syövän täsmähoitoja ja Joensuun tutkimuksilla on ollut suuri merkitys syövän hoitotulosten paranemiseen Suomessa ja maailmalla. (Biomedicum- Helsinki säätiö 2013.)

On tutkittu, että merkelinsolukarsinoomassa 80%:ssa on osallisena merkelinsolupolyoomavirus. (Sihto. 2012:9.) Tutkimuksissa on osoitettu, että valkosolujen tyypillä ja määrällä on merkitystä selvitettäessä syövän ennustetta ja potilaalle valittavia liitännäishoitoja. (Sihto 2012: 9, 28-31.) Erityisesti T-lymfosyytit ja makrofagit ovat kiinnostuksen kohteena. Jatkotutkimukset merkelinsolukarsinooman ja merkelinsolupolyoomainfektion toimintamekanismeista saattavat johtaa uusiin terapeuttisiin hoitohin kuten rokotuksiin valikoiduissa riskiryhmissä tai uusiin tekijöihin joiden avulla voidaan vaikuttaa immuunivasteeseen. (Sihto 2012: 57-58.)

Opinnäytetyön tarkoituksena on optimoida immunohistokemiallinen tuplavärjäys, jonka avulla saadaan värjättyä T-solut ja kasvainkudos. Työn toisena tarkoituksena on saada automatisoitua valkosolujen laskenta kudoksenäytteistä. Manuaalisesti tapahtuva laskenta on työlästä ja subjektiivista. Eri henkilöt saavat erilaisia tuloksia vaikka ne ovat yhteneväisiä. Työssä on tarkoitus värjätä ja ottaa kuvat n. 70:stä Merkelinsolukarsinooman kudoksenäytteestä

2 Merkelinsolukarsinooma

Merkelinsolukarsinooma on huonoennusteinen ihosyöpä. Tauti on harvinainen ja lähinnä vanhempien ihmisten tauti. Potilaiden keski-ikä diagnoosivaiheessa on 75 vuotta. Immunosupressoidut potilaat sairastuvat muita useammin merkelinsolukarsinoomaan ja ovat sairastuessaan nuorempia. Taudin esiintyvyys Suomessa on noin 6 – 10 tapusta vuodessa. Merkelinsolukarsinooma esiintyy usein ihoalueilla, jotka ovat vahingoittuneet auringonvalon vaikutuksesta. Kasvain kasvaa nopeasti ja tekee etäpesäkkeitä jo varhaisessa vaiheessa imusolmukkeisiin. (Böhling, Koljonen, Tarkkanen, Tukiainen 2005.)

Merkelin solun löysi Friedrich Sigmund Merkel vuonna 1875 valomikroskoopin avulla. Elektronimikroskoopin käyttöönotto 1960-luvulla mahdollisti tarkemmat tutkimukset merkelin soluilla ja silloin saatiin parempi käsitys merkelin solujen rakenteesta ja esiintymisestä ihokudoksessa. Merkelin solujen kehittyminen ja toiminta on vieläkin osittain tuntematonta. Vuonna 1972 Cyril Toker löysi maligneja soluja ihokudoksesta. Solut muistuttivat merkelin soluja ja tautia alettiin kutsua merkelinsolukarsinoomaksi. (Munde, Khandekar, Dive, Sharma 2013.)

Merkelin soluja löytyy iholta ja joistakin limakalvojen osista kaikilta selkärankaisilta. Merkelin solujen lähellä on hermokudosta ja solujen ajatellaan toimivan iholla painetta tuntevina reseptoreina. Merkelin soluja on erityisen paljon kämmenissä, jalkapohjissa, kitalaessa, huulissa ja ikenissä. Myös auringolle alttiina olevassa ihossa on paljon merkelin soluja. (Munde ym. 2013.)

2.1 Merkelinpolyoomavirus (MCPyV)

Vuonna 2008 löydettiin merkelinsolupolyoomavirus (MCPyV). Polyoomavirukset ovat ikosahedraalisia DNA-viruksia, joilla on kaksijuosteinen genomi. Polyoomavirukset aiheuttavat pysyviä piileviä infektioita. Nämä infektiot ovat yleensä oireettomia. Polyoomaviruksiin liittyviä tauteja esiintyy lähinnä viruksen reaktivaation yhteydessä niillä ihmisillä, joiden immuunipuolustus on heikentynyt. Tällä hetkellä tunnetaan kymmenen erilaista polyoomavirusta. BK-polyoomavirus (BKPyV) on eristetty munuaisen siirron saaneen potilaan virtsasta. JC-polyoomavirus (JCPyV) on löydetty Hodginin lymfoomaa sairastaneen potilaan aivoista jo vuonna 1971. Kaikki muut polyoomavirukset on

löydetty äskettäin. Niitä on löytynyt hengitysteistä (KIPyV ja WUPyV), terveiden ihmisten iholta (human polyoomavirus 6 ja 7), sydämensiirron saaneen potilaan nenän limakalvolta (trichodysplasia spinulosa-associated polyoomavirus, TSPyV), munuaisen siirron saaneen potilaan seerumista (HPyV9) ja ripuliin sairastuneiden lasten ulostenäyteistä sekä kondyloomanäyteistä (HPyV10). MCPyV oli viides löydetty ihmisen polyoomavirus. (Sihto 2012: 19.)

MCPyV löydettiin merkelinsolukarsinoomanäytteistä ja viruksen DNA:n löytyminen merkelinsolukarsinoomakasvaimista on todistettu usealla tutkimuksella. On käynyt ilmi, että MCPyV:tä löytyy melkein kaikilta tutkituilta henkilöiltä. Noin 9%:lla 1-4 vuotiaista lapsista löytyy seerumista vasta-aineita MCPyV:lle ja vasta-aineiden esiintyvyys kasvaa siten, että 80% yli 50-vuotiasita löytyy vasta-aineita. (Sihto 2012: 19-20.)

Noin 80% merkelinsolukarsinooman kasvaimista sisältää merkelinsolupolyoomaviruksen DNA:ta. Viruksen DNA:n löytyminen kasvaimesta viittaa parempaan ennusteeseen taudin kulussa. MCPyV-positiiviset kasvaimet ja MCPyV-negatiiviset kasvaimet eroavat toisistaan myös molekyyllitasolla. (Sihto 2012: 8-9,19.)

2.2 Kasvurajoitinantigeenit

MCPyV ilmentää sT- (small T-antigen) ja LT-antigeenia (large T antigen). Se ilmentää myös 57kT-antigeenia ja VP₁- sekä VP₂-kapsidiproteiineja. sT-antigeenin transskriptio on riippuvainen ihosolujen reagoimisesta UV-valoon. LT-antigeenin tai VP₁:n ilmentymiseen UV-valolla ei ole vaikutusta. Polyoomaviruksen ilmentämän LT-antigeenin tiedetään sitovan kasvaimen solusykliä vaimentavaa RB proteiinia sekä vaimentavan p53-proteiinin ilmentymistä jonkun vielä tuntemattoman mekanismin kautta. MCPyV infektoituneet solut ovat vähemmän alttiita sytotoksisten CD8-solujen aikaansaamalle solun hajoamiselle. (Sihto 2012: 20-23.)

Syövässä kasvurajoitintegeenien toiminta on estynyt ja tämä mahdollistaa syövän syntymisen. Kaksi tärkeää kasvurajoitinproteiinia ovat p53 ja RB (retinoblastoomaproteiini). Jos DNA:ssa tapahtuu virhe, kasvurajoitinproteiinit pysäyttävät solusyklin. P53 aktivoituu tunnistessaan virheen DNA:ssa se pysäyttää solusyklin siihen saakka kun syntynyt virhe on korjattu. Siinä tapauksessa, että DNA:n virhe ei korjaannu p53 käynnistää

apoptoosin. RB on tärkeä proteiini solusykliissä ja se säätelee solujen siirtymistä G1-vaiheesta S-vaiheeseen. (Heino, Vuento 2009: 319, 322.)

MCPyV-positiivisissa kasvaimissa on MCPyV:n ilmentämää LT-antigeenia. LT-positiivisissa kasvaimissa ilmennetään kasvunrajoitinproteiini RB:tä ja lisäksi niissä on harvoin kasvunrajoitinproteiini p53 mutaatioita. LT-negatiivisissa kasvaimissa sen sijaan oli p53 mutaatioita, jolloin kasvunrajoitinproteiini ei pysäytä solusykliä tai käynnistä apoptoosia. MCPyV-positiivisissa kasvaimissa on suurempi määrä TIL-soluja kuin MCPyV-negatiivisissa kasvaimissa. Immuunipuolustuksen solut infiltroivat MCPyV-positiivisiin kasvaimiin. Tämän takia MCPyV-positiivisilla syöville on osoitettu olevan parempi ennuste. (Sihto 2012: 57.)

MCPy-viruksen DNA:n kopioluvut ovat merkittävästi korkeammat merkelinsolukarsinoomassa kuin muissa terveiden ihmisten kudoksissa. Soluissa oleva MCPyV genomi tuottaa jatkuvasti tyypistettyjä mutaatioita, jotka estävät virusta replikoitumasta kasvainsoluissa. T-antigeenin ilmentyminen on tutkimuksen mukaan välttämätöntä MCPyV:n kasvulle ja tärkeää viruspositiivisille syöville. Jos T-antigeenin ilmentymistä vaimennetaan eksoni 1:n kohdistuvalla shRNA:lla, aiheuttaa se solusyklin keskeytymisen tai apoptoosin MCPyV-positiivisissa solulinjoissa. (Sihto 2012: 24-25.)

3 Tuumorilymfosyytit

3.1 Syövän synty

Syöpä syntyy solujen geneettisten muutosten seurauksena. Näitä muutoksia voi syntyä spontaanisti, ulkoisten tekijöiden taikka pitkäaikaisen ärsytyksen seurauksena. Soluissa tapahtuu muutoksia, jotka johtavat hallitsemattomaan kasvuun. Muutosten seurauksena solut tulevat invaasiokykyisiksi. Muutokset tapahtuvat hitaasti pitkän ajan kuluessa ja immuunijärjestelmän on tästä syystä vaikea havaita niitä. Syöpäsoluissa on vähentynyt määrä kudokselle tyypillisiä antigeeneja. Pienentynyt antigeenien ekspressio haittaa syöpäantigeenien esittelyä T-lymfosyyteille. Immuunipuolustuksella on merkitystä syövän torjunnassa. Syöpäkasvaimiin kerääntyy T-lymfosyyttejä sekä muita immuunipuolustuksen soluja kuten makrofageja. Immuunivajavuustiloissa ja immuunipuolustuksen ollessa heikentynyt, kuten esimerkiksi vanhuksilla, esiintyy enemmän syöpiä.

Immuunipuolustuksen rooli on suuri tapauksissa, joissa syövän aiheuttajana on virus. (Meri. 2011.)

3.2 Tuumorilymfosyytit

Tuumorilymfosyytit (TILs eli tumor infiltrating T-lymphocytes) ovat immuunipuolustuksen soluja, joita esiintyy syöpäkasvaimissa. Monissa tutkimuksissa on osoitettu, että TIL-solujen lisääntynyt määrä kasvainkudoksessa liittyy taudin parempaan ennusteseen. On myös tutkittu, että tuumorilymfosyyttien tyypillä saattaa olla enemmän merkitystä taudin ennusteeseen, kuin tuumorilymfosyyttien määrällä. (Yu, Fu 2006.)

Esimerkiksi sytotoksisten CD8-solujen tiedetään liittyvän parempiennusteiseen taudinkulkuun. Tämä tuli ilmi tutkimuksessa, jossa verrattiin T-soluluokkien eri solujen esiintymistä useissa erityyppisissä maligneissa kasvaimissa. (Sihto 2012: 28.)

3.3 T-soluluokat

T-solujen pinnalla on T-solureseptoreita, jotka tunnistavat antigeeneja. T-solujen pinnalla on reseptorina CD3-kompleksi, joka välittää viestiä solun sisälle. T-solujen pinnalla on myös apumolekyylit CD4 tai CD8. (Arstila 2011.) CD4-positiiviset T-solut ovat suurimmaksi osaksi auttaja T-soluja ja CD8-positiiviset solut sytotoksisia tappaja T-soluja. (Arstila 2011.)

CD4⁺-positiiviset T-auttajasolut jaetaan kolmeen alaluokkaan niiden tuottamien sytokiinien perusteella (Th1, Th2 ja Th17 soluluokat). Näiden soluluokkien tuottamien sytokiinien perusteella immuunivaste muodostuu erilaiseksi. (Arstila 2011.)

Th1-solujen tuottamat sytokiinit vaikuttavat solunsisäisten virus- ja bakteritulehdusten vastaan kehittyvän immuunivasteen kehittymiseen. Th1-solut aktivoivat makrofageja, NK-soluja ja CD8⁺-soluja. Th2-solujen aikaansaama immuunivaste soveltuu solunulkoisten taudinaiheuttajien torjumiseen ja erityisesti parasiitti-infektioissa Th2-solujen rooli on merkittävä. Th17-solut aktivoivat neutrofiilien toimintaa ja osallistuvat suoliston immuunipuolustukseen. (Arstila 2011.)

Sytotoksiset tappajasolut eli CD8⁺-positiiviset T-tappajasolut osallistuvat virusten ja solunsisäisten patogeenien vastaiseen immuunipuolustukseen. T-tappajasolu tekee reikiä kohdesolun solukalvoon ja tätä kautta soluun pääsee tappajasolun erittämiä molekyyliä, jotka käynnistävät kohdesolun apoptoosin. T-tappajasolut voivat torjua infektioita myös siten, että infektoitunut solu jää henkiin. (Arstila 2011.)

Regulatoriset T-solut ovat lähinnä CD4⁺-positiivisia, mutta on löydetty myös CD8⁺-positiivisia regulatorisia T-soluja. Niiden osuus kaikista T-soluista on 5-10%. Regulatoriset T-solut hillitsevät immuunivastetta ja estävät omiin soluihin kohdistuvaa immuunivastetta. Ne hillitsevät myös vieraisiin rakenteisiin kohdistuvia immuunipuolustuksen reaktioita ja ovat todennäköisesti osallisena myös immuunivasteen sammuttamiseen infektion parannuttua. Osa regulatorisista T-soluista ilmentää FOXP3-transkriptiotekijää. Tämä transkriptiotekijä liittyy immuunivastetta hillitsevään toimintaan. (Arstila 2011.)

Korkea CD3⁺-positiivisten tuumorilymfosyyttien määrä näyttäisi liittyvät parempaan ennusteeseen merkelinsolukarsinoomassa. Myös CD8⁺-positiivisten ja FOXP3-transkriptiotekijää ilmentävien solujen suuri määrä liittyy suotuisaan ennusteeseen. Matala CD8⁺-solujen ja CD4⁺-solujen suhde sekä matala FOXP3⁺-solujen ja CD4⁺-solujen suhde liittyy taas huonoon ennusteeseen merkelinsolukarsinoomassa. TIL-soluilla saattaa olla erilaisia rooleja riippuen kasvaimen tyypistä ja kudoksesta. FOXP3⁺-soluilla on osoitettu olevan suotuisa merkitys suolistosyövässä, mutta samalla niiden infiltroituminen useilla muilla syövyillä liittyy epäsuotuisaan ennusteeseen. (Sihto 2012: 29,46.)

Regulatoriset CD4⁺-positiiviset T-solut saattavat olla haitallisia ja voivat haitata puolustautumista maligneja soluja vastaan. Joissakin kokeissa CD4⁺-positiiviset T-solut yhdessä CD8⁺-positiivisten solujen kanssa näyttäisivät tuhoavan maligneja soluja. Molempia soluja tarvitaan yhdessä, jotta syntyisi tehokas puolustus maligneja soluja vastaan. (Yu, Fu 2006.)

Edellä kuvatut seikat ovat hyvänä esimerkkinä siitä, kuinka tärkeää on tutkia tuumorilymfosyyttejä, niiden luokkia ja määriä kasvainkudoksessa. Näin voidaan saada lisää

tietoa ja ymmärrystä taudin kulusta ja ennusteesta sekä löytää uusia keinoja merkelin-solukarsinooman ja muiden syöpätautien hoitoon.

4 Immunohistokemialliset menetelmät ja näytteiden käsittely

Immunohistokemia on menetelmä, jonka avulla voidaan osoittaa solun pinnalla olevaa tiettyä antigeenia. Immunokemiallisia värjäyksiä voidaan tehdä sytologisille (immunosytologia) tai histologisille näytteille. Histologiset näytteet voivat olla jääleikkeitä tai parafiiniblokkeja. Myös kasvatettuja soluja voidaan värjätä immunohistokemiallisen menetelmin. Immunohistokemiallisia menetelmiä käytetään erityisesti syöpien diagnostiikassa ja kasvaimen laadun määrittämisessä. Menetelmää käytetään paljon myös tutkimuksessa. Menetelmässä käytetään kaupallisia vasta-aineita, jotka tunnistavat tietyn proteiinin eli antigeenin solun pinnalta. Vasta-aine kiinnittyy antigeeniin. Reaktiossa käytetään leimaa, jotta reaktio olisi havaittavissa. Leimoina käytetään entsyymejä, fluoroisoivia leimoja, kultaleimoja ja radioaktiivisia leimoja. (immunohistochemistry.us.)

Ensimmäinen raportoitu immunohistokemiallinen tutkimus on tehty 1941. Tutkimuksessa käytettiin vasta-aineena fluoresiini-isotiosyanaattia ja sen avulla etsittiin pneumokokkiantigeeneja kudoksesta (immunohistochemistry.us.) Tekniikan kehittyessä otettiin käyttöön entsyymileimat (peroksidaasi 1960-luvulla ja alkaalinen fosfataasi 1970-luvulla. Kolloidinen kulta otettiin käyttöön 1970-luvulla. Sitä on käytetty immunohistokemiallisten reaktioiden tunnistamisessa sekä valo- että elektronimikroskoopilla. (Ihcworld.)

4.1 Leimat

Entsyymejä käytetään yleisesti leimoina. Värjäystulos saadaan näkyväksi inkuboimalla entyymileimattuja näytteitä yhdessä kromogeenin kanssa. Reaktiossa syntyy värillinen reaktio, jota voidaan tarkastella valomikroskoopilla. Yleisin käytössä oleva entsyymi on piparjuuriperoksidaasi. Siihen voidaan liittää vasta-aineita jotain tiettyä antigeenia vastaan. Piparjuuriperoksidaasin kanssa yleisesti käytössä oleva kromogeeni on DAB (3,3 α -diaminobentsidiini tetrahydrokloridi). Näiden reagenssien reaktiotuotteena on stabiili ruskea sakka. Näin värjättyjä soluja voidaan tarkastella valo- tai elektronimikroskoopilla. (Suvana, Layton, Bancroft 2013:384-385.)

Immunofluoresenssitekniikassa kudoksen antigeenit tunnistetaan vasta-aineella johon on konjugoitu fluorisoiva leima. Antigeeniin konjugoitunut fluorokromi absorboi näkyvää- taikka ultraviolettivaloa. Tällöin fluorokromin molekyylit virittyvät. Viritystila purkautuu ja fluorokromi emittoi valoa yleensä pidemmällä aallonpituudella. Yleisesti käytössä oleva fluorokromi on fluoreseiini isotiosyanaatti (FITC). Se absorboi valoa aallonpituudella 494 nm ja emittoi vihreää valoa 518 nm aallonpituudella. Toinen yleisesti käytössä oleva fluorokromi on tetrametyyli rhodamiini isotiosyanaatti, joka absorboi aallonpituudella 550 nm ja emittoi punaista valoa aallonpituudella 580 nm. (Suvarna.2013:427.)

4.2 Menetelmät

On olemassa useita eri menetelmiä osoittaa tiettyä antigeeniä kudoksessa. Käytössä on suora menetelmä sekä epäsuora menetelmä. Suora menetelmä on nopea, mutta sen tekeminen on käytännössä jäänyt vähemmälle epäsuoran menetelmän käyttöönoton jälkeen. (immunohistochemistry.us.)

Suorassa menetelmässä käytetään yhtä primäärivasta-ainetta, joka sitoutuu kudoksessa olevaan antigeeniin. Vasta-aineessa on mukana leima, jonka avulla reaktio voidaan havaita. (immunohistochemistry.us.)

Epäsuorassa menetelmässä käytetään primäärivasta-ainetta ja sekundaarivasta-ainetta. Primäärivasta-aine reagoi kudoksessa tunnistettavan antigeenin kanssa. Tämän jälkeen käytetään sekundaarivasta-ainetta, joka on leimattu. Epäsuora menetelmä on herkempi ja sen avulla voidaan käyttää yhtä sekundaarivasta-ainetta leimaamaan useampia primäärivasta-aineita. Primäärivasta-aineeseen voi kiinnittyä useampi kuin yksi sekundaarivasta-ainemolekyylille (piercenet.com.) Tässä menetelmässä on huomattava, että sekundaarivasta-aineen täytyy olla tuotettu samassa eläinlajissa, kuin primäärivasta-aineen, jotta kiinnittyminen olisi mahdollista. Epäsuorasta menetelmästä on kehitetty uusia menetelmiä kuten PAP-menetelmä (peroksidaasi-anti-peroksidaasimenetelmä), ABC-menetelmä (avidini-biotiini-kompleksi) ja LSAB-menetelmä (leimattu streptavidini-biotiini-menetelmä). (immunohistochemistry.us.)

4.3 Histologisten näytteiden käsittely

Immunohistokemiallinen värjäys tehdään kiinnitetuille parafiiniin valetulle kudoksenäytteelle. Parafiiniblokista leikataan leikkeitä mikrotomilla. On tärkeää, että leikkeet kiinnittyvät kunnolla lasille, jotta ne eivät irtoa myöhemmissä käsittelyvaiheissa. Leikkaamisen ja lasille siirtämisen jälkeen laseja inkuboidaan 37C lämpökaapissa yön yli, jotta kaikki kosteus saadaan pois laseilta. Tämän jälkeen näytteiden parafiini poistetaan xyleenissä ja näytteille tehdään rehydraatio laskevassa etanolisarjassa.

Tämän jälkeen kudosta käsitellään antigeenien paljastamiseksi ja immunohistokemiallista värjäystä haittaavien tekijöiden poistamiseksi. Endogeeniset entsyymit kuten endogeeninen peroksidaasi, fluoresenssi jne. voivat vaikuttaa immunohistokemiallisen värjäyksen tuoksiin ja aiheuttaa taustan värjäytymistä. Kudos on käsiteltävä siten, että näiden entsyymien värjäystä haittaava vaikutus saadaan poistettua. Endogeeninen peroksidaasi saadaan poistettua inkuboimalla leikkeitä vetyperoksidiliuoksessa. Formaliinifiksaation jälkeen kudoksen epitoopit saattavat peittyä, jolloin vasta-aineen sitoutuminen antigeeniin vaikeutuu tai estyy. Kudoksen antigeenit saadaan paljastettua lämpö- tai entsyymikäsittelyjen avulla. Yleisesti käytössä on sitraattipuskuri (pH 6), joka kuumennetaan ja leikkeitä inkuboidaan kuumassa sitraatissa. Entsyymikäsittelyssä käytetään proteaaseja, jotka paljastavat antigeenin ja näin mahdollistavat vasta-aineiden paremman tarttumisen antigeeniin. Muita keinoja antigeenin paljastamiseksi ovat yhdistetty entsyymi-lämpökäsittely tai leikkeiden käsitteleminen Natriumborohydriidillä. Näiden käsittelyjen jälkeen kudos on valmiina immunohistokemialliseen värjäykseen. (Xiao, Dan-Bi, Ping-Chang.)

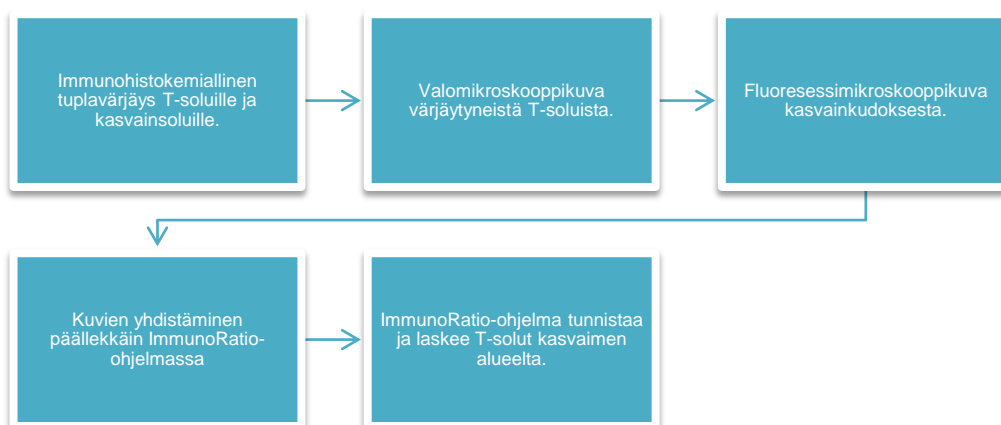
5 Työn tarkoitus ja tutkimuskysymykset

Tutkimuksissa on osoitettu, että TIL-solujen määrällä on merkitystä Merkelinsolukarsinooman ennusteessa ja taudin kulussa. Erityisesti CD3⁺-solujen määrää voidaan pitää itsenäisenä suotuisana ennusteena merkelinsolukarsinoomassa. CD3⁺-, CD8⁺- ja FoxP3⁺-solujen määrä korreloi paremman eloonjäämisprosentin kanssa. Kun tehdään lisää tutkimusta TIL-solujen vaikutuksesta syövässä, tulevaisuudessa on mahdollista saada uusia hoitoja tai voidaan valita potilaille sopiva hoito. (Sihto 2012: 59-60.)

Jotta voidaan tehdä lisää tutkimusta, on tärkeä saada optimoitua luotettava ja vertailukelpoinen menetelmä TIL-solujen tyyppin ja määrän selvittämiseen kasvainkudoksessa. Virtuaalimikroskopian avulla tehtävä laskenta tehdään samalla tavalla joka näytteelle ja saatu tulos on näin vertailukelpoisempi, kuin eri yksilöiden tekemät laskennat. Opinnäytetyössä yritetään löytää optimaalinen värjäystulos merkelinsolukarsinoomanäytteille, jotta kuvien käsittely olisi mahdollista virtuaalimikroskoopin avulla. Automatisoitu TIL-solujen laskenta nopeuttaa tutkimusta ja tätä kautta voidaan saada uutta tietoa valkosolujen merkityksestä merkelinsolukarsinoomassa. (Sihto. 2014).

Automatisoitu TIL-solujen laskenta tehdään käyttäen hyväksi virtuaalimikroskopiaa (ImmunoRatio-sovellus). ImmunoRatio on web-sovellus, joka mahdollistaa immunovärjätyjen kudoksenäytteiden automaattisen kuva-analysoinnin. (Isola, Tuominen. 2010-2011.) Virtuaalimikroskopia on menetelmä, jossa perinteisen valomikroskoopin sijasta näyttemateriaali digitoidaan ja kuvia tutkitaan tietokoneen näytöltä. (Tuominen. 2012: 5.) Virtuaalimikroskoopin avulla valomikroskoopin kuva ja fluoresenssikuva asetetaan päällekkäin ja ohjelman avulla voidaan laskea kasvaimen alueella olevat T-lymfosyytit.

Tämän työn tutkimuskysymyksessä halutaan vastaus siihen, voidaako Merkelinsolukarsinooman kudoksenäytteille tehdä immunohistokemiallinen tuplavärjäys T-lymfosyyteille ja kudoksen kasvainsoluille siten, että kasvaimen alueella olevat T-lymfosyytit voidaan laskea käyttämällä ImmunoRatio-sovellusta.



Kuvio 1. Työvaiheet

6 Työn toteuttaminen

Immunohistokemiallisen värjäyksen optimointi tehdään kolmella kudoksenäytteellä. Negatiivisena kontrollina on paksusuolinäytteitä. Värjäysmenetelmä on epäsuora immunohistokemiallinen tuplavärjäys. Liitteenä on värjäysohje, jonka perusteella värjäyksiä lähdettiin toteuttamaan. Parafiiniblokkeihin valetuista Merkelinsolukarsinomanäytteistä tehdään leikkeitä. Leikkeistä värjätään T-lymfosyytit siten, että ne ovat nähtävissä valomikroskoopilla. Karsinomasolujen värjäyksessä käytetään fluoresenssileimaa.

Värjäyksen jälkeen tuumorilymfosyytit lasketaan sekä manuaalisesti, että käyttämällä ImmunoRatio-sovellusta.

Värjäyksen optimointia varten leikattiin kolmesta merkelinsolukarsinoman kudoksenäytteestä leikkeitä, jotka kuivattiin 37 °C lämpökaapissa yön yli, jotta kudokset kiinnittyvät kunnolla lasille. Paksusuoliblokeista leikattiin negatiivisia kontrollinäytteitä ja myös ne olivat yön yli 37-asteisessa lämpökaapissa.

6.1 Kudoksen käsittely

Näytteistä poistettiin parafiini ksyleenin avulla, jonka jälkeen kudokselle tehtiin rehydraatio laskevassa etanolisarjassa. Kudoksessa mahdollisesti oleva endogeeninen peroksidaasi kulutettiin loppuun suorittamalla näytteille vetyperoksidi-käsittely 5 ml 30% vetyperoksidi-liuosta ja 200 ml aquaa. Jäädessään näytteisiin endogeeninen peroksidaasi häiritsee väjäytymistä.

Kudoksen solujen antigeenit paljastettiin inkuboimalla laseja Natrium-sitraattihauteessa 98 asteen lämpötilassa. Käsittely mahdollistaa sen, että vasta-aine pääsee sitoutumaan antigeeniin. Tämän jälkeen näytteiden annettiin jäähtyä ennen immunovärjäyksen aloittamista.

6.2 Immunovärjäys

T-solut värjättiin käyttäen primäärivasta-aineena Thermo Scientificin CD3 (clone SP7, IgG) vasta-ainetta. CD3-vasta-aine reagoi T-solujen sytoplasman sisäisen CD3-antigeenin kanssa. Sekundaariantigeenina käytettiin V-Histofine Simple Stain MAX PO anti-rabbit-vasta-ainetta. Sekundääriantigeeni kiinnittyy primääriantigeeniin ja vasta-aineessa on entsyymaattinen leima. Syntynyt kemiallinen reaktio tehtiin näkyväksi DAB-värjäyksen avulla.

Merkelinsolikarsinoomakudoksen värjäyksessä testattiin ensin kahta vasta-ainetta.

Vasta-aineina käytettiin Thermo Scientificin CD56/NCAM-1 AB-4 (mouse monoclonal antibody) vasta-ainetta, joka kiinnittyy solukalvon antigeeniin. CD56-vasta-aine on käytössä myös patologian laboratorioissa merkelinsolukarsinooman diagnostiikassa. Toisena vasta-aineena käytettiin Thermo Scientificin Synaptophysin Ab-2 (mouse monoclonal antibody) vasta-ainetta. Synaptofysiini kiinnittyy sytoplasman antigeeneihin. Molemmat käytetyt vasta-aineet ovat IgG-luokan vasta-aineita. Synaptofysiini värjäsi syöpäsolut vaaleammin, joten jatkovärjäykseen valittiin CD56-vasta-aine. Toisena vasta-aineena käytettiin Santa Cruz Biotechnology MCPyV large T-antigen (mouse monoclonal antibody) vasta-ainetta. Merkelinsolupolyoomavirus ilmentää LT-antigeenia karsinomasoluissa ja tämän vasta-aineen avulla voidaan värjätä syöpäsolut, joissa on merkelinsolupolyoomavirus. Noin 80% merkelinsolukarsinoomista löytyy polyoomavirus, joten vasta-aine on spesifi osoittamaan merkelinsolukarsinoomaa. Tämä vasta-aine ei kuitenkaan ole hyväksytty käytettäväksi diagnostiikassa. (<http://www.scbt.com>.)

Sekundaarivasta-aineena käytössä oli Cy2-leimattu anti-hiiri. Tässä vasta-aineessa on fluoresenssileima ja värjäytyneitä soluja voidaan katsoa fluoresenssimikroskoopilla.

Näytteille tehtiin vielä hematoksyliinivärjäys taustan värjäämiseksi. Värjätyt lasit petattiin DPX- petausaineella (DPX non-aqueous mounting medium for microscopy, Merck KGaA) joka sopii käytettäväksi Cy2:lla fluoresenssilvärjättyjen näytteiden kanssa. Monet käytössä olevat petausaineet sisältävät fenyleenidiamidia. Cy2 on herkkä tälle kemikaalille. Se vaikuttaa siten, että näytteitä varastoitaessa fluoresenssi ei säily näytteissä. DPX-petausaine ei sisällä fenyleenidiamidia. (Jackson Immunoresearch Laboratories.)

Työssä käytettyjen vasta-aineiden eri konsentraatiot laimennettiin Immuno Vision Technologies Universal IHC blocking/diluent-reagenssilla.

Värjäyksen tekemisessä käytetty värjäysohje löytyy liitteenä tämän työn lopusta.

Työtä tehdessä haasteeksi muodostui taustan värjäytyminen ja riittämätön fluoresenssisignaali. Tarkoituksena oli saada värjättyä näytteet siten, että valomikroskooppikuva ja fluoresenssikuva voitaisiin yhdistää virtuaalimikroskoopin avulla päällekkäin. Näin saadusta kuvasta voitaisiin analysoida kasvaimen infiltroituneet T-solut. Sidekudos ja erityisesti punasolut antoivat voimakasta signaalia fluoresenssivärjäyksessä. Taustan poistamiseksi kokeiltiin Na-sitraattipuskurin sijasta (pH 6) Tris-EDTA-puskuria (pH 9). Tris-EDTA-käsittely ei parantanut signaalia. Taustan poistamiseksi kokeiltiin myös kudoksen käsittelyä glysiini- ja ammoniumkloridiliuoksessa. Na-sitraattipuskurissa inkubaation ja jäädyttämisen jälkeen näytteitä inkuboitiin 20 min. 100 mM glysiinissä ja 20 min. 50 mM NH₄Cl-liuoksessa (valmistettu PBS:ään). Tämä käsittely poisti etenkin sidekudoksessa olevaa taustaa. Punasolujen antama tausta oli edelleen melko voimakas.

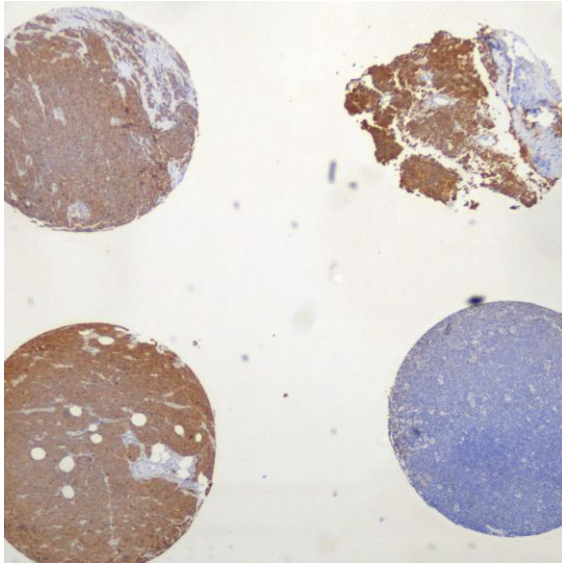
Signaalin voimistamiseksi tehtiin useita värjäyksiä, joissa vaihdeltiin vasta-aineiden konsentraatioita parhaan värjäystuloksen saamiseksi. Värjäyksissä kokeiltiin myös eri mittaisia inkubaatioaikoja primääriantigeenille. Vasta-aine-antigeenikompleksin kokoa kasvatettiin ottamalla lisäksi käyttöön toinen sekundaarivasta-aine (anti-mouse rabbit), jonka toivottiin parantavan signaalia. Kokeilussa oli myös P16 vasta-aine sekä CD56 vasta-aineen toinen kloonin (Thermo Fisher CD56/NCAM-1 Ab2). Värjäyksessä verrattiin CD56/NCAM-1 Ab-2:n ja CD56/NCAM-1 AB-4:n värjäytymistä ja mukaan otettiin myös TMA-lasi (Tissue Micro Array), jossa on useita merkelinsolukasvainkudoksia yhdellä lasilla. Näin voitiin tutkia, värjäytyvätkö kasvaimet eri tavoin.

T-solujen värjäyksessä CD3 vasta-aineen konsentraatio oli 1:100 ja inkubaatioaika 30 min. Sekundaariantigeeni oli valmis liuos ja sen inkubaatioaika 30 min. Tämän jälkeen tehtiin DAB-värjäys (diaminobenzidiini värjäys) lisäämällä 1ml DAB-diluent-liuokseen (ImmPACT DAB diluent) yksi tippa chromogen-reagenssia (ImmPACT DAB Chromogen concentrate). Värjäysaika oli 5min. Kaikkien vasta-aineiden inkubaatioiden välissä ja DAB-värjäyksen jälkeen lasit huuhdeltiin kaksi kertaa TBS-liuoksella. T-solujen värjäys tehtiin joka kerralla edellä mainitulla tavalla. Oheisessa taulukosta selviävät mer-

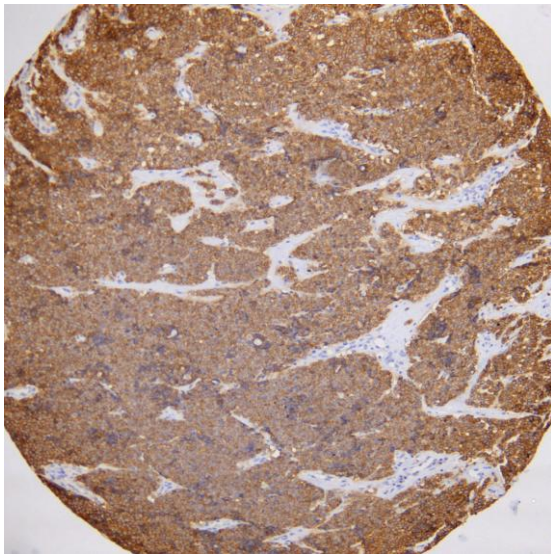
kelinkarsinoomasolujen värjäyksissä käytetyt vasta-aineet, konsentraatiot ja inkubaatioajat. Lisäksi kuvia värjäytystä näytteistä ja kaavio värjäyksen työvaiheista.

Taulukko 1. Värjäyksissä käytetyt vasta-aineet, konsentraatiot, inkubaatioajat ja värjäyksen tulokset.

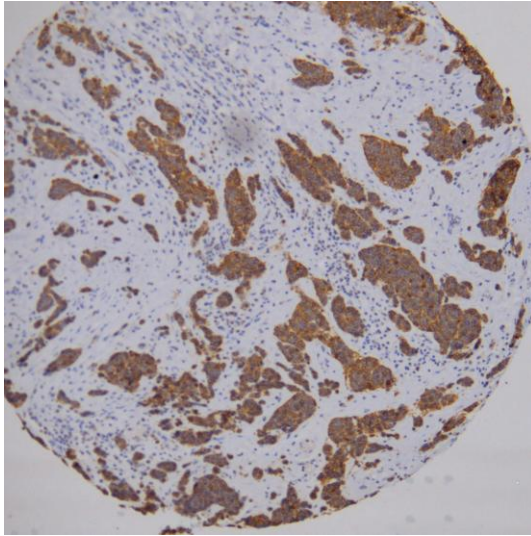
	Primäärvasta-aine	Inkubaatioaika	Sekundaarivasta-aine	Inkubaatioaika	Tulos
1. värjäys	CD56 1:20 Synapthofysin 1:20 LTA 1:20, 1:50 ja 1:100	60 min.	Cy2 1:100	30 min	Signaali ei riittävä. LTA:n konsentraatiolla ei merkitystä värjäytyvytyteen. Synapthofysin värjäysi erillisessä testissä vaaleammin kuin CD56 ja jätetään jatkossa pois.
2. värjäys	CD56 1:50 LTA 1:100	Yön yli	Cy2 1:100	30 min	Yön yli inkubaatio ei parantanut signaalia. Voidaan käyttää jatkossa edelleen tunnin inkubaatioaikaa.
3. värjäys	CD56 1:50 LTA 1:100	60 min.	Cy2 1:50 Cy2 1:100	30 min. ja 60 min. 30 min ja 60 min.	Signaali ei tarpeeksi voimakas. Cy2:n konsentraatiolla ei eroa värjäyksissä. Tunnin inkubaatio ehkä hieman parempi, mutta ero ei kuitenkaan merkittävä.
4. värjäys	CD56 1:20 LTA 1:100	60 min. ja yön yli.	Cy2 1:100	60 min.	CD56:n 1:20 konsentraatio paransi signaalia. Yön yli inkubaatiolla ei vaikutusta signaaliin. Näytteissä voimakas taustavärjäytyminen
5. värjäys	CD56 1:20 LTA 1:100	60 min.	Cy2 1:100	60 min.	Kudoksen käsitelyssä ennen värjäystä käytettiin Tris-EDTA-puskuria (pH 9). Puskurin muutos ei parantanut signaalia. Na-sitraattipuskuri parempi
6. värjäys	CD56 1:20 LTA 1:100	60 min.	anti-mouse rabbit 1:1000 Cy2 anti-rabbit mouse 1:100	30 min 30 min.	Kompleksin korottaminen ei tuonut mitään muutosta signaaliin.
7. värjäys	P16 1:50, 1:100 ja 1:600	60 min.	Cy2 1:100	30 min	P16 ei parantanut signaalia.
8. värjäys	CD56 1:20 LTA 1:100	60 min.	Cy2 1:100	30 min	Ennen värjäystä kudosta inkuboitin 100 mM glyseriinisä ja 50 mM ammoniumkloridissa 20 min kummassakin. Käsitely vähensi selvästi etenkin sidekudoksen taustaa. Punsolut värjäytyvät edelleen voimakkaasti.
9. värjäys	CD56 AB2 1:50 ja 1:100 CD56 AB4 1:50 ja 1:100	60 min.			DAB-värjäys. Mukana TMA-lasi. Kasvinsolut värjäytyvät epätasaisesti. CD56 ei aiheuta taustavärjäytymistä. Avain kuin penetrotuminen ei olisi onnistunut kunnolla. Kasvatetaan inkubaatioaikaa yön yli.
10. värjäys	CD56 AB2 1:50 CD56 AB4 1:20 LTA 1:100	Yön yli	Cy2 1:100	60 min.	Syöpäsolut värjäytyvät hieman paremmin ja eivät oleet enää niin keltaisia. Signaalis ei kuitenkaan vielä riittävä. Punsolut värjäytyvät edelleen voimakkaasti. Sidekudoksen värjäytyminen ei enää niin voimakasta. Ennen värjäystä näytteille tehtiin käsitely glyseriinisä ja ammoniumkloridissa.



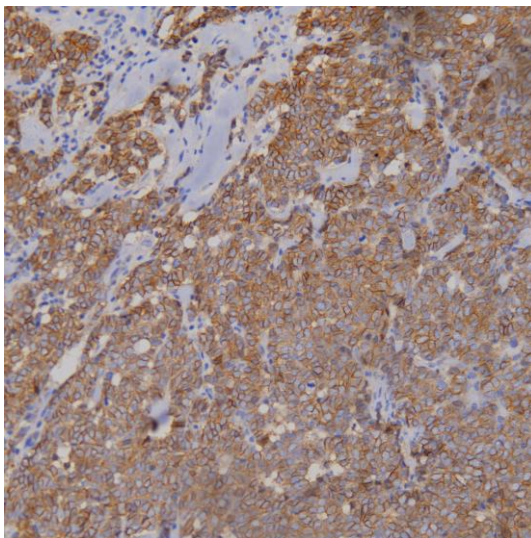
Kuvio 2. TMA-näyte. Kasvainkudoksen värjäys. Vasta-aineet CD56 ja LTA. Suurennos x 4.



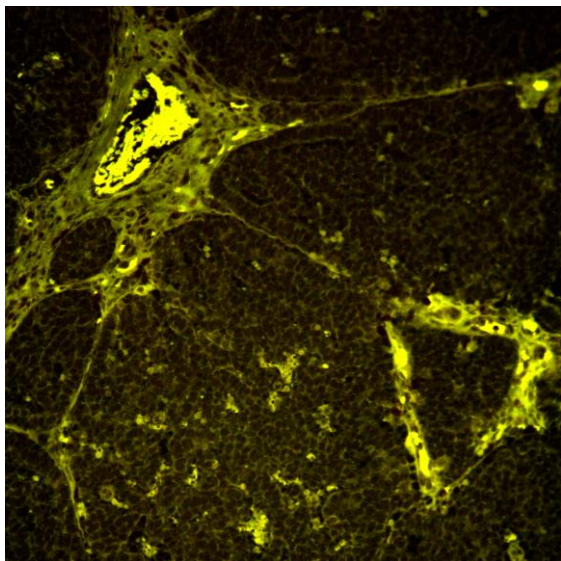
Kuvio 3. TMA-näyte. Kasvainkudoksen värjäys. Vasta-aineet CD56 ja LTA. Reuna-alueet ovat värjäyteneet voimakkaammin. Suurennos x 10.



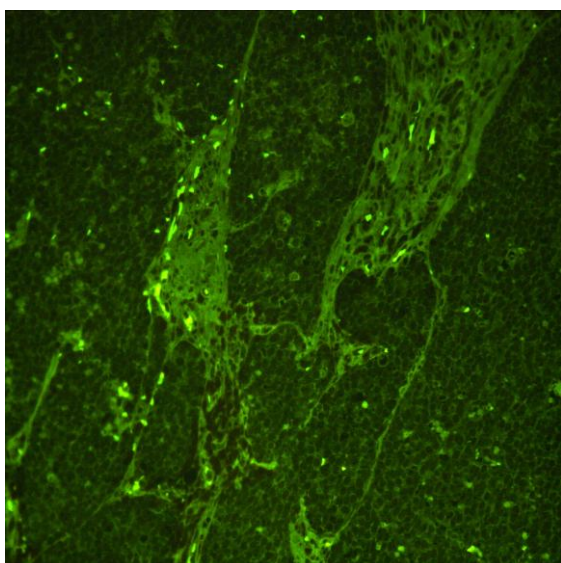
Kuvio 4. TMA-näyte. Kasvainkudoksen värjäys. Vasta-aineet CD56 ja LTA. Suurennos x 10. Vasta-aine värjäsi kasvainkudoksen selkeästi.



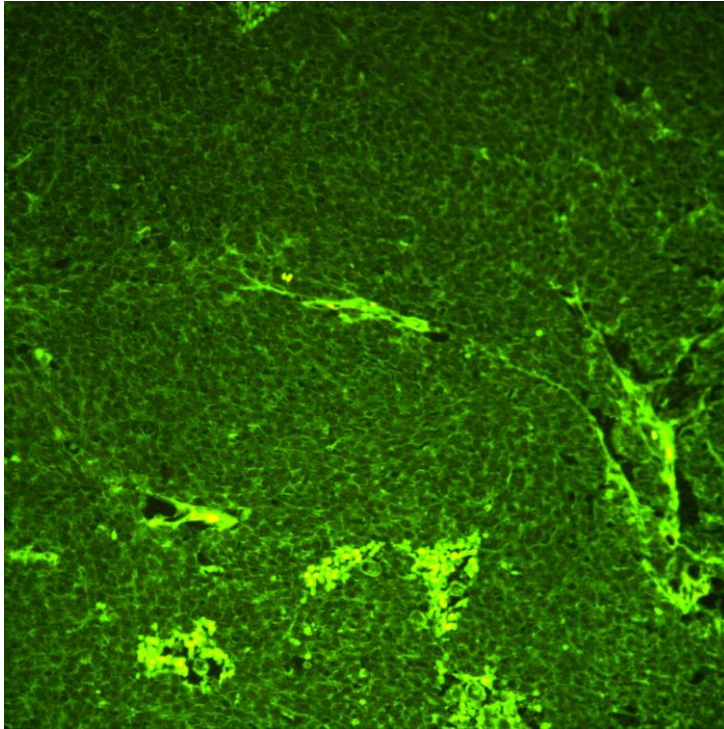
Kuvio 5. TMA-näyte. Kasvainkudoksen värjäys. Vasta-aineet CD56 ja LTA. Suurennos x 20. Vasta-aine värjäsi kasvainkudoksen selkeästi.



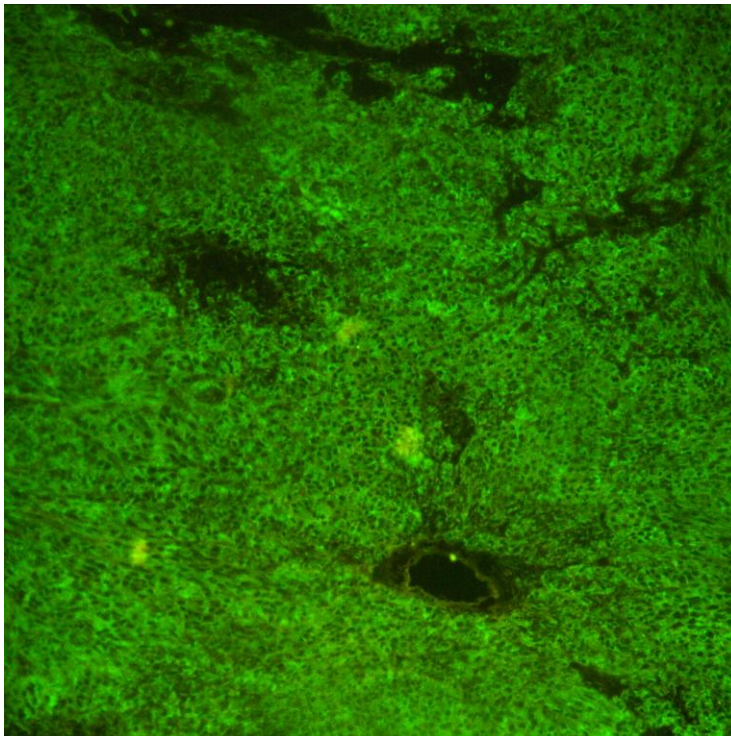
Kuvio 6. Kasvainkudoksen värjääminen Cy2 fluoresenssileimalla. Sidekudos, verisuonet ja punasolut antavat voimakasta taustaa. Kasvainsolujen eivät värjäydy kunnolla vihreiksi. Näyte on käsitelty glysiinillä ja ammoniumkloridilla. Suurennos x 20.



Kuvio 7. Näyte käsitelty glysiinillä ja ammoniumkloridilla. Kuva otettu käyttäen green channel-kanavaa. Punasoluista voimakas tausta, sidekudoksen fluoresenssi ei ole niin voimakas kuin aiemmissa värjäyksissä. Kasvainkudos ei kuitenkaan tarpeeksi vihreä, jotta kuvaa voisi käyttää immunoratio-ohjelmassa. Suurennos x 20.

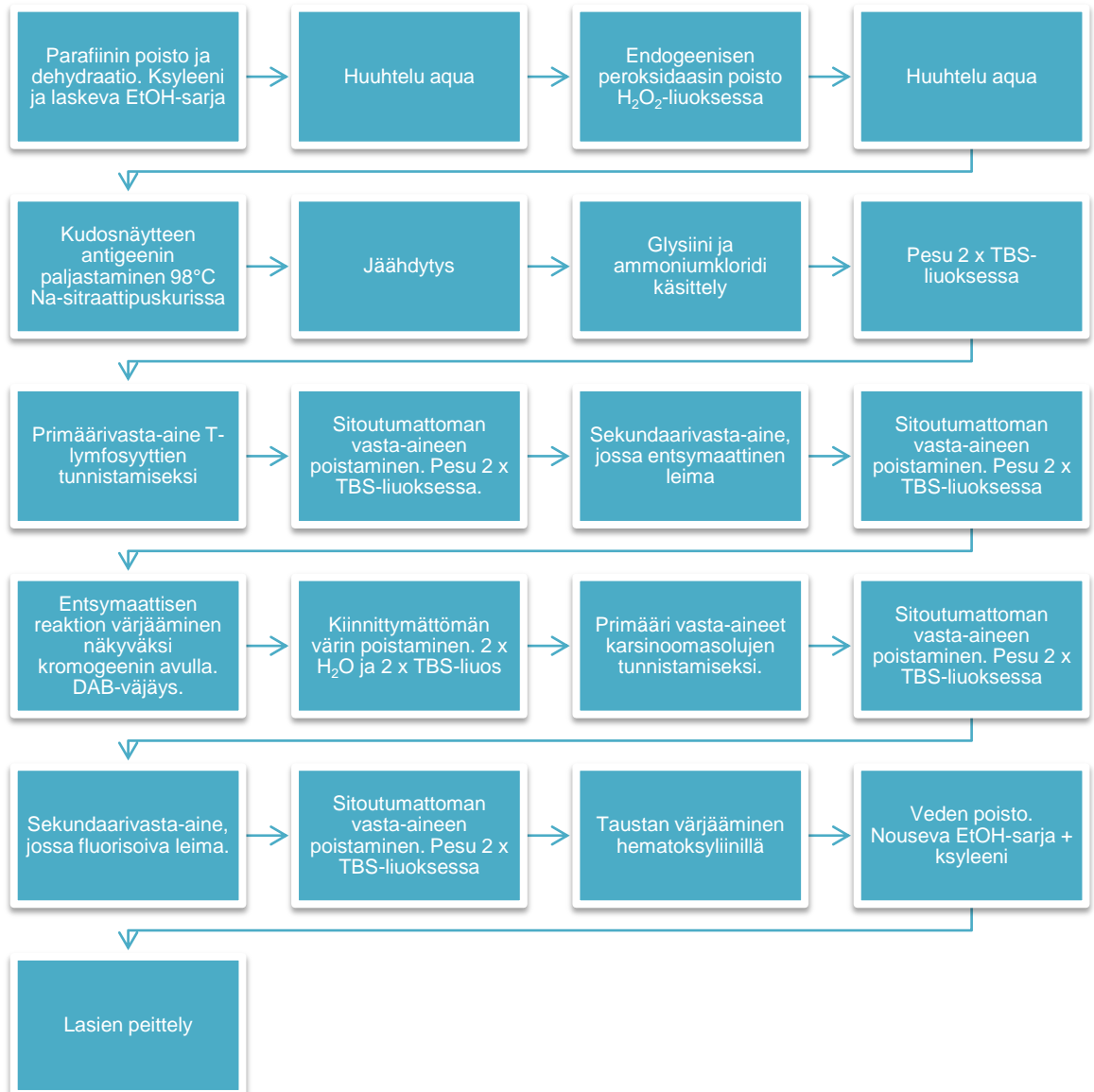


Kuvio 8. Vasta-aineet CD56 kloonit 2 ja 4 sekä LTA. Glysiini ja ammoniumkloridikäsittely.



Kuvio 9. Vertailuksi GIST-näyte, jossa pelkästään kasvainkudos värjäytyy ja fluoresenssi on riittävä immunoratio-ohjelmalle.

Kuvio 10. Värjäyksen vaiheet



7 Virhelähteet ja tulosten luotettavuus

Koska tätä värjäystä optimoidaan useilla eri tavoilla on tärkeää kirjata prosessi tarkasti, jotta jälkeenpäin voidaan verrata tuloksia ja käytettyjä menetelmiä. Työkirjaan kirjaaminen myös helpottaa mahdollisten virhelähteiden etsintää. Näytteet on syytä merkitä huolellisesti, jotta jälkeenpäin tiedetään, mistä värjäyskerrasta tietty näyte on.

Immunohistokemiallisessa värjäyksessä voi olla useita virhelähteitä. Värjäyksissä pitäisi olla mukana positiivinen ja negatiivinen kontrolli, jotta voidaan olla varmoja vasta-aineen toimivuudesta. Tässä opinnäytetyössä mukana oli paksusuolinäyte negatiivisena kontrollina. Itse näytteet olivat jo positiivisiksi diagnosoituja syöpänäytteitä. Kudoksen käsittelyllä ennen värjäystä on merkitystä värjäystulokseen. Kudoksessa oleva endogeeninen peroksidaasi saattaa aiheuttaa taustan värjäytymistä ja kudoksen anti-geenit täytyy käsitellä, niin että vasta-aineet kykenevät tarttumaan solujen pinnalla olevaan antigeeniin. Sen jälkeen kun leikkeistä on poistettu parafiini, ne eivät saa päästä kuivumaan. Jos esim. näytteen reunat pääsevät kuivumaan, niin värjäystulos on epätasainen ja näytteeseen tulee artefaktia. Kiinnittymättömän vasta-aineen huuhtelu pois näytteestä on myös tärkeää ennen seuraavan reagenssin lisäämistä (Suvarna. 2013: 435-452.)

Värjäyksessä käytettävät vasta-aineet ja menetelmät pitäisi saada optimoitua niin, että saadaan optimaalinen värjäystulos ja ettei esim. näytteen taustan värjäytyvyys häiritse värjäystulosta (Suvarna. 2013: 435-452.) Värjäykseen valittavat reagenssit on säilytettävä oikeissa lämpötiloissa. Puskureissa ja laimennokseen käytettävissä reagensseissa pH:lla on suuri merkitys reagenssien toimivuudessa. Niiden pH:ta pitäisi tarkistaa ja seurata ajoittain. Vasta-aineiden toimivuuden kannalta niitä on tärkeää säilyttää ja käsitellä oikein. Laimennetut vasta-aineet säilyvät huonommin, kuin konsentroidut (Suvarna. 2013: 435-452.)

Työssä käytetyt reagenssit ja vasta-aineet säilytettiin jääkaappilämpötilassa. Käytetyt laimennokset tehtiin juuri ennen niiden pipetointia lasille. Yön yli inkubaatiot tehtiin jääkaappilämpötilassa ja lasit suojattiin parafilmillä kuivumisen ehkäisemiseksi. Antigeenin paljastamiseen käytetyistä puskuriliuoksista tarkastettiin pH. Leikatut kudokset pidettiin yön yli lämpökaapissa, jotta kaikki vesi haihtuisi pois ja kudokset kiinnittyisi hyvin lasille.

8 Tulokset

Leukosyyttien värjäämiseen käytetty CD3 vasta-aine värjäsi leukosyytit hyvin. Merkelinsolukarsinoomasolujen värjäämiseen sopivat parhaiten CD56 Ab-2, CD56 Ab4 ja LTA antigeenit. Tutkittaessa värjäytymistä valomikroskoopilla DAB-värjäyksen jälkeen, syöpäsolujen värjäytyminen oli epätasaista. Värjäys osoitti kudoksesta selvästi syöpäsolut, mutta värjäytyminen ei ollut tasaista. Taustavärjäytymistä ei ollut havaittavissa. Heräsi epäily siitä, että väri ei olisi ehtinyt penetroitua kudokseen kunnolla. Vaikka inkubaatioaikaa lisättiin yön yli, värjäytyvyys ei kuitenkaan parantunut.

Merkelinkarsinoomasolujen värjäyksessä sekundaariantigeenina ja fluoresenssileimana oli Cy2. Signaalia ei saatu tarpeeksi voimakkaaksi, jotta näytteistä olisi voitu ottaa kuvia virtuaalimikroskooppia varten. Syöpäsolut eivät värjäytyneet kunnolla kirkkaan vihreiksi ja taustan värjäytyminen oli liian voimakasta. Paras tulos saatiin värjäyksestä jossa oli käytössä CD56 Ab-2 1:50, CD56 Ab-4 1:20 ja LTA 1:100. Näytteet käsiteltiin ennen värjäystä Na-sitraattipuskurin jälkeen 50 mM glysiinissä ja 100 mM ammoniumkloridissa. Tämä käsittely poisti etenkin sidekudoksen taustaa. Punasolut värjäytyivät edelleen voimakkaasti. Muissa värjäyksissä ollut syöpäsolujen keltainen värjäytyminen oli vähäisempää edellä mainituilla vasta-aineilla ja niiden konsentraatioilla. Fluoresenssia ei kuitenkaan saatu tarpeeksi voimakkaaksi, jotta näytteistä olisi saatu kunnollisia kuvia tutkimusta varten.

Työssä oli tarkoituksena saada virtuaalimikroskoopille kuvat kasvaimeen infiltroituneista T-soluista ja merkelinkarsinoomasoluista. Virtuaalimikroskoopin avulla olisi yhdistetty valomikroskoopin kuva T-soluista ja fluoresenssikuva kasvainsoluista. Ohjelman avulla saadusta kuvasta olisi laskettu kasvaimessa olevat T-solut. Tässä työssä käytetyillä värjäysmenetelmillä ja vasta-aineilla ei saatu syöpäsolujen värjäytyvyttä ja fluoresenssisignaalia tarpeeksi hyväksi, jotta kuvaa olisi voitu käyttää halutulla tavalla.

9 Pohdinta

9.1 Työn tulos

Opinnäytetyön tarkoitus oli saada opitimoitua immunohistokemiallinen tuplavärjäys merkelinsolukarsinoomanäytteille ja saada laskettua kasvainkudokseen infiltroituneet T-solut käyttäen hyväksi virtuaalimikroskopiaa. Värjäystulosta ei saatu sellaiseksi, että kuvien analysointi virtuaalimikroskoopilla olisi ollut mahdollista. Kasvainkudoksen antama fluoresenssisignaali ei ollut tarpeeksi voimakas. Näytteiden tausta värjäytyi voimakkaasti. DAB-värjättyjen merkelinsolukarsinoomien värjäystulos ei ollut tasainen, vaan näytti ettei väri olisi penetroitunut kunnolla kudokseen. Glysiini- ja ammoniumkloridikäsitely vähensivät hieman taustan fluoresenssia ja tämän perusteella ne otettiin käyttöön toisessa opinnäytetyössä, jossa tehdään vastaavaa värjäyksen optimointia ja TIL-solujen laskentaa GIST-kasvaimella.

Alussa värjäyksissä oli mukana negatiivinen kontrolli, jolla osoitettiin että käytössä olevat vasta-aineet kiinnittyvät vain merkelinsolukarsinooman soluihin. Työssä kokeiltiin useampia inkubaatioaikoja ja edes yön yli inkubointi ei tuonut oleellista eroa värjäystulokseen. Käytetyistä vasta-aineista CD56:sta käytetään myös taudin diagnostiikassa ja kun kokeiltiin DAB-värjäyksen avulla vasta-aineiden toimivuutta, niin syöpäkudos värjäytyi hyvin.

Värjäyksissä ei löytynyt selkeästi yhtä kohtaa, jota parantamalla tai muuttamalla voitaisiin saada parempi signaali. Työssä käytetyt menetelmät ovat käytössä muissa immunohistokemiallisissa värjäyksissä. Samoja reagensseja on käytetty onnistuneesti muissa värjäyksissä. Laitettaessa laseja pidikkeisiin ja värjäystelineeseen, pidikkeen ja lasin väliin saattaa jäädä ilmakuplia jolloin tasainen värjäystulos ei onnistu. Tekemisissäni värjäyksissä ei kuitenkaan ollut niin paljon ilmakuplia, että ne olisivat olleet syynä värjäyksen epäonnistumiselle.

Vasta-aineet näyttäisivät toimineen hyvin, mutta fluoresenssi ei tullut tarpeeksi voimakkaaksi. Yhtenä mahdollisena selityksenä saattaisi ehkä olla ihon erilaiset pigmenttimolekyylit kuten melaniini, joka saattaisi absorboida valoa ja näin fluoresenssin tuottama signaali ei olisi ollut riittävän voimakas. (Sihto 2014).

9.2 Jatkoimenpiteet

Jatkossa voisi koettaa värjäystä ottamalla vielä mukaan CK20-vasta-aine, jota merkelinsolukarsinooman solut ilmentävät. Vasta-aineiden suuri konsentraatio paransi fluoresenssisignaalin voimakkuutta, joten tekisin värjäyksen käyttämällä 1:10 tai 1:20 laimennoksia vasta-aineille. Toisaalta voisin olettaa, että myös näytteiden tausta värjäytyy myös voimakkaammin, joten myös taustan värjäytymistä pitäisi onnistua poistamaan. Nyt käytössä oli glysiini ja ammoniumkloridi. Kokeilisin myös värjäyksen tekemistä vaakatasossa, jotta voidaan varmistaa kudoksen tasainen peittyminen reagensseilla. Jos kasvainkudosta ei saada värjättyä niin, että fluoresenssi on tarpeeksi voimakas, TIL-solut on mahdollista laskea rajaamalla ensin kuvaan kasvainalue ja sitten laskea TIL-solujen määrä ImmunoRatio-ohjelmalla. (Sihto 2014).

9.3 Työprosessi

Tämän opinnäytetyön aikana sain tutustua moniin eri tapoihin, joilla voidaan optimoida immunohistokemiallisia värjäyksiä. Sain lisää kokemusta kudokset leikkaamisesta. Opin mikä merkitys on kudoksen käsittelyllä ennen värjäyksiä ja pääsin kokeilemaan monia eri liuoksia kudoksen käsittelyssä ennen immunohistokemiallisen värjäyksen aloittamista. Värjäyksiä tehtiin useilla eri vasta-aineilla ja erilaisilla inkubaatioajoilla. Kokeiltiin myös mikä vaikutus on antigeeni-vasta-ainekompleksin korottamisella fluoresenssi signaaliin. Vaikka kokeiluilla ei saavutettu toivottua tulosta merkelinsolukarsinoomakudoksen värjämisessä, sain paljon kokemusta immunohistokemiallisista tekniikoista. Oli mielenkiintoista tehdä työtä ja päästä miettimään mahdollisia virhelähteitä tai ongelmakohtia värjäyksen eri vaiheissa.

Lähteet

Sihto, Harri .2014. FT. Biomedicum Syöpätautien tutkimusyksikkö. Suullinen tiedonanto.

IHC-World. Verkkodokumentti. <http://www.ihcworld.com/intro/intro.htm>. Luettu 4.1.2014.

Immunohistochemistry.us. Verkkodokumentti. <http://www.immunohistochemistry.us/what-is-immunohistochemistry.html>. Luettu 1.3.2014.

Isola, Jorma – Tuominen, Vilppu. 2010-2011. Immunoratio. Institute of Biomedical Technology. Tampereen yliopisto. Verkkodokumentti. <<http://153.1.200.58:8080/immunoratio/?locale=fi>>. Luettu 25.11.2013.

Jackson Immunoresearch Laboratories. Verkkodokumentti. <http://www.jacksonimmuno.com/technical/f-cy3-5.asp>. Luettu 15.4.2014.

Heino, Jyrki – Vuento, Matti. 2009. Biokemian ja solubiologian perusteet. WSOY.

Koljonen, Virve – Tarkkanen, Maija – Tukiainen, Erkki - Böhling, Tom. 2005. Merkelin-solukarsinoma – Patofysiologia ja nykyiset hoitosuosituksat. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. Katsausartikkeli. Verkkodokumentti. <<http://terveysportti.fi.ezproxy.metropolia.fi>>. Luettu 25.11.2013.

Mäkinen, Markus - Carpén, Olli – Kosma, Veli-Matti – Lehto, Veli-Pekka – Paavonen. Timo – Stenbäck, Frej. 2012. Patologia. Kustanus Oy Duodecim. Oppiportti. Duodecim oppikirjat.

Allavena, P – Mantovani, A. 2011. Immunology in the clinic review series; focus on cancer : tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. Clinical and Experimental Immunology. The Journal of Translational Immunology.

Arstila, Petteri 2011. Immunologia. Kustannus Oy Duodecim. Oppiportti. Duodecim oppikirjat.

Yu, Ping - Fu , Yang-Xin. 2006. Tumor-infiltrating T-lymphocytes: friends or foes ? Department of Pathology and Committee on Immunology, University of Chicago. Published in Laboratory Investigation (2006) 86, 231-245.

Munde, Prashant Balasaheb -,Khandekar, Shubhangi P - Dive, Alka M, – Sharma, Aparna. 2013. Pathophysiology of merkel cell. Journal of oral and Maxillofacial Pathology 2013 17(3), 408-412.

Meri ,Seppo - Leppä, Sirpa2011. Immunologia. Kustannus Oy Duodecim. Oppiportti.

Sihto, Harri. 2012. Merkel Cell Polyomavirus infection and host defence in patients with merkel cell carcinoma. University of Helsinki. Doctoral thesis.

Suvarna, Layton, Bancroft. 2013. Bancroft`s Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone Elsevier.

Tuominen, Vilppu. 2012. Virtual Microscopy. Design and Implementation of Novel Software Applications for Diagnostic Pathology. Tampereen Yliopisto.Väitöskirja. Luetavissa sähköisesti osoitteessa <<http://tampub.uta.fi/handle/10024/66888>>.

Xiao, Chen - Dan-Bi, Cho - Ping-Chang, Yang. 2010. Double staining immunohistochemistry..Department of pathology and molecular medicine. McMaster University, Hamilton, ON, Canada. Publishded in North American Journal of Medical Sciences 2010; 2(5): 241-245.

Värjäysohje

1. Parafiinin poisto. 2 x ksyleeni 5 min.
2. Ksyleeni/ ABS EtOH (50%/50%) kasto 10 krt.
3. laskeva EtOH-sarja.
4. Endogeenisen peroksidaasin poisto. H₂O₂-liuoksessa (200 ml aqua + 5 ml 30% H₂O₂)
5. Kudoksen antigeenien paljastaminen. Na-sitraattihaude (pH 6) 98°C 20 min.
6. Näytteiden jäädytys huoneen lämpöön (20-30 min).
7. Lasien kiinnitys nipsuihin ja laitto värjäystelineeseen.
8. Pesu 2 x TBS
9. T-solujen värjäys. Primäärivasta-aine 100 µl/lasi
10. Inkubaatio huoneenlämmössä 60 min.
11. Pesu 2 x TBS
12. Sekundaariantigeeni, entsyymattinen leima. 100 µl/lasi.
13. Inkubaatio huoneenlämmössä 30 min.
14. Pesu 2 x TBS
15. DAB-värjäys, 1 ml diluent solution ja 1 tippa kromogeenia. Inkubointi 5 min.
16. Pesu 2 x aqua ja 2 x TBS
17. Karsinoomakudoksen värjäys. Primäärivasta-aine 100 µl/lasi. Inkubaatio 60 min.
18. Pesu 2 x TBS
19. Sekundaariantigeeni, jossa fluorisoiva leima. 100 µl/lasi. Inkubointi 30 min.
20. Pesu 2 x TBS
21. Aqua
22. Hematoksyliinivärjäys 1 min. + huuhtelu juoksevassa vedessä 10 min.
23. Nouseva EtOH-sarja + ksyleeni/ABS EtOh + 2 x ksyleeni.
24. Lasien petaus.