



Mia Parland

# Immunohistokemiallisen multiplex värjäyspaneelin kehittäminen makrofageille

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto

Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma

Opinnäytetyön suunnitelma

05.04.2023

Tekijä	Mia Parland
Otsikko	Immunohistokemiallisen multiplex-värjäyspaneelin kehittäminen makrofageille
Sivumäärä	43 sivua + 2 liitettä
Aika	05.04.2023
Tutkinto	Sosiaali- ja terveysalan ammattikorkeakoulututkinto
Tutkinto-ohjelma	Bioanalytiikan tutkinto-ohjelma
Ohjaajat	Laboratoriokoordinaattori, Annabrita Schoonenberg Bioanalytiikka, Anette Holmström Yliopistotutkija, Teijo Pellinen Lehtori, Merja Ojala
<p>Syöpätutkimuksissa tutkitaan paljon kasvaimen mikroympäristöä ja niitä soluja, jotka edistävät kasvainta, kuten makrofageja. Tieteelliset tutkimukset tarjoavat jatkuvasti enemmän tietoa makrofageista ja siitä, miten ne vaikuttavat kasvaimen edistämiseen ja tuhoamiseen. Opinnäytetyössä haluttiin selvittää, miten makrofagit esiintyvät syöpäkudoksessa käyttäen vasta-aineita immuno-histofluoresenssivärjäyksessä multiplex-tekniikalla.</p> <p>Kasvaindiagnoosissa ja sen tutkimuksessa käytetään immunohistokemiallisia menetelmiä, joissa vasta-aineet tunnistavat solun pinnalta antigeenejä. Spesifit antigeenit voidaan tunnistaa immunofluoresenssivärjäyksellä, jossa sitoutuneet vasta-aineet näkyvät värireaktiona kudoksessa. Multiplex-tekniikalla voidaan käyttää enemmän vasta-aineita ja saada paljon arvokasta tietoa soluista. Fluoresenssimikroskoopiolla voidaan katsoa makrofagien esiintyvyyttä eri fluoresenssikanavilla. Kuvia on helppo liikutella digitaalisesti, mikä auttaa tiedon jakamisessa.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopiston alaiselle Suomen molekyyliäketieteen instituutille (FIMM), digitaalisen mikroskopian ja molekyylipatologian yksikölle. Tavoitteena oli saada tietoa makrofagien esiintyvyydestä syöpäkudoksissa valituilla vasta-aineilla. Toteutus tapahtui multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelilla, jonka tarkoituksena oli tehostaa makrofagien arviointia ja edistää niiden havaitsemista tulevissa tutkimuksissa tehokkaammin. Vasta-aineita oli yhteensä yksitoista, joille kaikille tehtiin DAB-värjäys, joka on yleinen tekniikka oikean laimennossuhdealueen määrittämiseksi immunohistofluoresenssivärjäyksessä. Multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneeli onnistui hyvin, ja fluoresenssikuvissa oli pääsääntöisesti vahva signaali ja spesifi sitoutuminen. Kuvia tarkasteltiin yhdessä ohjaajan ja ohjaavan tutkijan kanssa. Tehtiin myös käyttöönottotestaus CD206 vasta-aineelle, joka onnistui hyvin ja esiintyi kaikissa testivärjäyksissä hyvin. Lisäksi tehtiin ylimääräinen värjäyspaneeli Sparc, jonka vasta-aineet ja tulokset olivat onnistuneita. Sparc-paneelin tulokset on esitelty opinnäytetyössä.</p> <p>Molemmista värjäyspaneelissa tehtiin lukuisia testivärjäyksiä, ja niissä noudatettiin tarkkaa protokollaa. Molemmista värjäyspaneelista saatiin paljon tietoa vasta-aineiden toimivuudesta eri fluoresenssikanavilla ja vasta-aineiden laimennossuhteista. Ennen kaikkea saatiin tietoa siitä, kuinka makrofagit ilmentyivät syöpäkudoksissa käytetyillä vasta-aineilla. Molemmat paneelit ovat käyttökelpoisia kontekstissaan.</p>	
Avainsanat	Immunohistokemia, immunohistofluoresenssi, multiplexvärjäys, fluoresenssimikroskopia

Author	Mia Parland
Title	Macrophage multiplex IHC panel targeting
Number of Pages	43 pages + 2 appendices
Date	05 April 2023
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructors	Annabrita Schoonenberg, Laboratory Coordinator Anette Holmstöm, Bioanalyst Teijo Pellinen, University Researcher Merja Ojala, Senior Lecturer
<p>Tumor microenvironment and the cells that promote it, such as macrophages, are extensively studied in cancer research. Macrophages are involved in promoting and destroying tumors. This staining panel was used to enhance the evaluation of macrophages in immunofluorescence staining using the multiplex technique. Immunohistochemical methods are used in tumor diagnostics and research, where antibodies recognize antigens on the cell surface. Specific antigens can be identified by immunofluorescence staining. With the multiplex technique, more antibodies can be used in staining, providing valuable information about macrophages in cancer tissue. Fluorescence microscopy can show how the antibodies work in different fluorescence channels. Virtual images of the study are easy to share digitally, facilitating information sharing.</p> <p>The thesis was completed at the Finnish Institute of Molecular Medicine under the University of Helsinki's (FIMM) digital microscopy and molecular pathology unit. FIMM's researcher was interested in obtaining more information about the occurrence of macrophages. A multiplex staining panel with eleven antibodies was selected, aiming to promote the detection of macrophages more efficiently in future studies. DAB staining was performed for all antibodies to find the appropriate dilution interval. The staining panel was successful, and the immunofluorescence images showed that macrophages generally occur well in the tissue. All studies were reviewed with the instructor and the researcher.</p> <p>We also performed commissioning testing for the CD206 antibody, and the results of the staining were good. It was well expressed in all test stainings. An extra staining panel, Sparc, was also performed, and the antibodies had strong signals and specific binding. The results have been presented in the thesis. Several test stainings were performed, and an exact protocol was followed. We obtained a lot of information about the functionality of the antibodies in different fluorescence channels and their dilution ratios. Both panels are usable in their context.</p>	
Keywords	Immunohistochemistry, immunofluorescence, multiplex staining, fluorescence microscopy

## Sisällys

1	Johdanto	1
2	Histologia ja histologiset näytteet	2
2.1	Histologisten näytteiden käsittely	3
2.2	Histologiset värjäykset	4
2.3	Patologia digitalisoituminen ja mikroskopointi	4
3	Immunologia immunohistokemiassa	5
3.1	Vasta-aineet	6
3.2	Vasta-aineiden luokitukset	6
3.3	Immunohistokemia	7
3.3.1	Immunofluoresenssivärjäys	7
3.3.2	Multiplex - värjäys	8
3.3.3	Multiplex - värjäyksen protokollan päävaiheet	9
3.3.4	DAB- värjäys	11
4	Syöpä ja makrofagit	11
4.1	Syöpä	11
4.2	Valkosolut	12
4.3	Makrofagit	13
4.4	Makrofagien rooli syövässä	14
5	Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimuskysymys	15
6	Opinnäytetyön toteutus ja käytetyt menetelmät	16
6.1	Menetelmän lähtökohdat	16
6.2	Opinnäytetyön aineisto ja menetelmät	18
6.3	DAB-värjäys	20
6.4	CD206 vasta-aineen käyttöönottotestaus	20
6.5	Multiplex IHC protokolla	21
7	Opinnäytetyön tulokset	24
7.1	DAB - ja - fluoresenssikuvat	24
7.2	Makrofagien immunofluoresenssimultiplex-värjäyspaneelinkuvat	29
7.3	Yhteenveto	32
8	Pohdinta	32

8.1 Tulosten tarkastelu	32
8.2 Luotettavuus	34
8.3 Eettisyys	36
8.4 Tulosten hyödyntäminen ja kehittämissuositukset	36
8.5 Ammatillinen kasvu	37
Lähteet	38
Liite 1. Opinnäytetyössä käytetyistä reagensseista	1
Liite 2. Opinnäytetyössä käytetystä IHC Multiplex protokollasta	1

## SANASTO

Apoptoosi on ohjelmoitu solukuolema.

Affiniteetti on vasta-aineen sitoutumisvoima.

DAB 3'3 Diaminobetsidiini, käytetään kromogeeniseen värjäykseen.

DAPI 4', 6-Diamidino 2-fenyyli-indoli, käytetään immunofluoresenssissa solun tumaan värjäykseen.

Emittori eli säteilee eli emittori fotonin, joka kuljettaa vapautuvan energian pois.

Epitoppi on yksittäisen antigeenin kohta, johon paratoppi sitoutuu, kutsutaan nimellä epitoppi tai antigeeninen determinantti. Vasta-aineet tunnistavat antigeeninsä sitoutumalla sille ominaiseen sitoutumiskohtaan eli epitoppiin.

FFPE (Formalinfixed paraffin-embedded) tarkoittaa, että kudokset on fiksoitu formalinissa ja upotettu parafiiniin.

Fluorori/fluorokromilla kyky absorboida valoa.

HE on hematoksyliini-eosiini-värjäys.

HIER (heat induced epitope retrieval) - epitoppien paljastus.

HRP (Horseradish peroxidase) on piparjuuriperoksidaasi. Yleisesti käytössä oleva entsyymi on piparjuuriperoksidaasi, johon voidaan liittää (eli konjugoida) eri vasta-aineita.

IHC eli Immunohistokemia Immunohistokemiassa värjätään solun antigeenejä. Antigeenin tunnistavan vasta-aineen ja värireaktion avulla tulos nähdään valomikroskoopissa.

Milli-Q vesi on korkealaatuista puhdistettua vettä, joka soveltuu kaikenlaisiin käyttötarkoituksiin nykylaboratoriossa.

Monoklonaaliset vasta-aineet tunnistavat yhden tyypin epitopin.

Opsonointi on solun merkitseminen jollain, esim. vasta-aineella.

Paratopin sitomaa ainetta, sanotaan kokonaisuudessaan nimellä antigeeni.

Polyklonaaliset vasta-aineet tunnistavat useamman epitopin.

Proliferaatioon solujakautumis kyky.

TBST on Tris-puskuroitu suolaliuos ja Tween seos, käytetään molekyylibiologiassa

TMA Tissue microarray eli niin sanottu monikudosblokki.

TME Tumor micro environment on kasvaimen mikroympäristössä (TME).

TAM tumor associated macrophage on makrofagi, jotka ilmentyvät kasvaimen läheisyydessä.

TrisEDTA buffer on antigeenin hakupuskuri.

# 1 Johdanto

Immunohistokemia perustuu vasta-aineiden kykyyn tunnistaa spesifejä proteiineja ja muita antigenejä kudoksista. Kasvaindiagnostiikka on tärkeä osa immunohistokemiaa, sillä se mahdollistaa diagnoosin tekemisen sellaisista kasvaimista, joita histokemiallisten värjäysten avulla ei ole voitu luokitella. Immunohistokemiaa voidaan käyttää alkuperäisen kasvaimen arvioinnissa, ja sen avulla voidaan arvioida myös metastaattisten kasvainten synnyn sijaintia. Immunohistokemiallinen diagnosointi kehitettiin 1960- ja 1970-luvun aikana. Myöhemmin tekniikan kehittyessä immunohistokemian käyttö laajeni merkittävästi, kun vasta-aineiden saatavuus helpottui 1990-luvulla. Samoihin aikoihin myös vasta-aineiden laatu ja toimivuus parani. (Mäkinen 2021.)

Tämän opinnäytetyön tarkoituksena oli kehittää immunohistokemiallista multiplex-värjäyspaneelia makrofageille. Värjäyspaneelissa käytettiin ohjaavan tutkijan valitsemia vasta-aineita ja otettiin käyttöön uusi makrofagi-vasta-aine CD206. Näytteinä käytettiin TMA:ta, joka on monikudosblokki. TMA Normal oli terve kudos ja TMA oli syöpäkudosta. Ennen multiplex-värjäyksen aloittamista tehtiin kromogeeninen DAB-värjäys, jonka tarkoituksena oli määrittää vasta-aineille oikea laimennussuhdealue. DAB-värjäys on yleinen käytäntö ennen multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksen aloittamista. Multiplex-immunohistofluoresenssivärjäys on erillinen värjäys. DAB-värjäyksessä saatuja laimennussuhdetuloksia käytetään multiplex-immunohistofluoresenssivärjäykseen.

Opinnäytetyössä käytettiin immunohistofluoresenssivärjäysmenetelmää, jossa multiplex-tekniikkaa käyttäen saatiin tietoa makrofagien esiintyvyydestä syöpäkudoksessa. Multiplex on monikanavavärjästekniikka, jossa suoritetaan värjäyskierroksia. Jokaisen värjäyskierroksen jälkeen näytelasit skannattiin fluoresenssimikroskoopilla. Multiplex-Immunohistofluoresenssivärjäyksessä käytetään vasta-ainepohjaisia värejä, joissa on fluoresoiva leima. Vasta-aineet sitoutuvat makrofagien pinnalla oleviin antigeneihin. Vasta-aineisiin liitettiin fluoresoiva leima, jonka avulla vasta-aine saatiin värireaktion avulla näkyviin kuvissa. Fluoresoivat leimat näkyvät vain jollain tietyllä fluoresenssikanavalla, esimerkiksi 750 fluoresenssikanava on turkoosi, jolloin vasta-aine näkyi turkoosina signaalina syöpäkudoksessa. Näin voitiin tarkastella esimerkiksi makrofagien esiintymistä syöpäkudoksessa, sitoutuivatko vasta-aineet hyvin antigeneihin syöpäkudoksessa ja oliko värjäys spesifiä.

Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Helsingin yliopiston alaisen Suomen molekyyli lääketieteen instituutin (FIMM) digitaalisen mikroskopian ja molekyyli patologian yksikön kanssa. Opinnäytetyön tekijä oli harjoittelussa FIMM:llä 10 viikon ajan tammikuusta 2023 lähtien. Yksikkö tuottaa kaupallisia histopatologisia palveluita multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksiä, näytelasien skannausta ja kuva-analyysiä. (Helsingin yliopisto 2022.)

## 2 Histologia ja histologiset näytteet

Histologia eli kudossoppi tutkii eläinkunnan kudosten rakenteita ja sitä, miten kudoksista muodostuu elimiä. Kudokset rakentuvat soluista ja niitä ympäröivästä soluväliaineesta. Solut voivat erilaistua eri tehtäviin ja yksittäisissä kudoksissa on usein erilaisia solutyyppejä, jotka toimivat yhdessä erilaisissa tehtävissä. (Histologia 2006.) Histologiassa tutkitaan kudoksen rakennetta, sytologiassa yksittäisiä soluja ja soluryhmiä (Ristimäki & Franssila & Kosma 2013). Histologisten kudoksenäytteiden valomikroskooppinen tutkiminen ja kudoksen rakenteen arvioimisen tavoitteena on kuvata ja tunnistaa mahdollinen kudoksenmuutos (Mäkinen 2021).

Patologi antaa kudoksenäytteelle diagnoosin ja lausunnon, joka syntyy kliinisten esitietojen, kuvantamislöydösten ja kasvaimen morfologian synteisistä. Pelkkä morfologia ei riitä kudoksenäytteen muutoksen määrittämiseen yhtä tarkasti kuin mikrobiologiassa. Patologiassa diagnoosi perustuu patologin tietoon ja kokemukseen, jota hän hyödyntää arvion tekemisessä. Diagnoosin ja lausunnon tulkinta on samantyyppistä kuin radiologilla kuvantamislöydösten tulkinnessa, mutta patologi tarkastelee solutason muutoksia ja pääsee siten usein hyvin tarkkaan kasvaindiagnoosiin. Patologian diagnoosin ja lausunnon tekemistä tukevat monet tarkentavat menetelmät, kuten immunohistokemia ja molekyyli genetiikka. (Ristimäki ym. 2013.)

Pahanlaatuiset kasvaimet jaetaan päätyyppien lisäksi moniin alatyyppeihin. Kasvaintyyppityksellä on kuitenkin merkitystä silloin, kun se korreloituu etiologiaan, taudin hoitoon tai ennusteeseen. Tutkimustyössä on hyvin tärkeää luokitella kasvaimet eri ryhmiin, sillä saman elimen erityyppiset adenokarsinoomat voivat olla etiologialtaan erilaisia. Kasvaimet voivat myös kliiniseltä käyttäytymiseltään sekä hoitovasteeltaan poiketa toisistaan. (Ristimäki ym.2013.)



## 2.1 Histologisten näytteiden käsittely

Histologisten näytteiden käsittelyprosessi kestää optimaalisissa olosuhteissa 3–5 vuorokautta näytteen saapumisesta valmiiksi näytteeksi. Fiksaatio kestää yön yli. Pienet näytteet orientoidaan suoraan kasetille ja isoille näytteille tehdään käyntinpano, joka kestää kaksi päivää. Parafiinivalu ja blokkien leikkaaminen kestää 3–4 päivää. (Mäkinen 2021.) Esikäsittelyn jälkeen näytteet laitetaan automatisoituihin kuduskuljettimiin, jotka poistavat kudoksista veden ja rasvan sekä kiinnittävät ne. Tämä käsittely auttaa näytteitä säilymään ja kovettaa kudusrakenteita. Kuduskuljetuksen viimeisessä vaiheessa näytteet upotetaan parafiiniin. FFPE-näyte tarkoittaa, että kudოსleike on fiksoitu formaliinissa ja upotettu parafiiniin. (Jia ym. 2022.) Parafiinin jäähtyttyä se kovettuu kudoksen sisään ja ympärille, minkä ansiosta näytteestä voidaan leikata hyvin ohuita, 2–5 mikrometrin paksuisia leikkeitä. (Mäkinen 2021.)

Tissue microarray eli TMA on niin sanottu monikudosblokki, jota voidaan valmistaa räätälöidysti tutkimuksen tarpeen mukaan. (Auria Biopankki 2019.) Monikudosblokki kehitettiin vuonna 1986, ja aluksi yhdellä lasilla käytettiin vain muutamia kudoksia. Nykyään yhdellä lasilla voidaan käyttää lukuisia pyöreitä, kaikki samaa kokoa olevia eri kudoksia. Tätä menetelmää käytetään eniten syövän tutkimiseen. TMA:ta voidaan käyttää vasta-aineen kontrollina. TMA:lla pystytään optimoimaan vasta-aineiden signaali. TMA-monikudosblokki voi sisältää sekä terveitä että syöpäkudoksia. (Bancroft & Layton 2008.) Nykyään näytteisiin on mahdollista liittää paljon kliinistä tietoa digitalisoinnilla. TMA valmistetaan automatisoidusti FFP-näytteistä. (Auria Biopankki 2019.)

Tutkijat hyötyvät monikudosblokeista. He voivat kerätä ja löytää tutkimustietoa biopankista ja käyttää sitä omassa tutkimuksessaan, eikä heidän tarvitse kerätä aikaa vieviä ja kalliita aineistoja itse. (Suomen Biopankit 2017.) Tämä toiminta mahdollistui, kun Biopankkilaki (688/2012) tuli voimaan vuonna 2013, jossa uudistettiin tutkimukseen kerätyn tiedon käyttämistä niin, että aineistoa voidaan kerätä suoraan biopankista. Näin tutkijat voivat saada aineistonsa suoraan biopankista. Biopankin aineistoja voidaan käyttää useita kertoja ja kerättyä tietoa voidaan myös jakaa muille tutkijoille. Näin ollen seuraava tutkija voi hyödyntää jo olemassa olevia tietoja käyttäessään aineistoa, koska biopankin tietoihin lisätään keskeiset analyysitiedot. (OYS 2023.)

TMA-monikudosblokkeja voidaan valmistaa myös tutkimusryhmissä manuaalisesti. Tällöin on oltava valmiina hyvin tehty kuduskartta, jonka mukaisesti edetään. Kartassa eri kudosten järjestyksestä on pidettävä kiinni. Tämä on hyvin tarkkaa ja vaatii kokeneen

käsittelijän. Tiivistettynä, tyhjään parafiiniblokkiin tehdään neulalla reikiä, joihin upotetaan pieni pala kudosta (yksi tai kaksi millimetriä halkaisijaltaan). (Bancroft & Layton 2008.)

Lääketieteellisissä tutkimuksissa biopankit tekevät yhteistyötä. Laki edellyttää biopankinäytteen antaneen henkilön antamaa suostumusta. Biopankeilla on laaja valikoima tutkimuksia, joista osa keskittyy patologian diagnostiikkaan. Patologian diagnostiikka perustuu kudoksenäytteiden kuva-analyysiin, jossa hyödynnetään tekoälyä. Kuva-analyysejä käytetään myös kudospäisiin merkkiaineisiin. (Carpen ym. 2021.)

## 2.2 Histologiset värjäykset

Suomessa käytetään yleisimmin hematoksyliini-eosiini-värjäystä (HE), joka koostuu kahdesta väriaineesta. Hematoksyliini värjää tumat. Eosiini tarttuu solunsisäisiin ja ulkosiin proteiineihin, kuten sidekudokseen. Lima-aineet ja glykogeeni eivät värjäydy. HE-värjäyksen hyvä puoli on sen hyvä säilyvyys ja selkeä tumavärjäys. Joissakin laboratorioissa perusvärjäyksenä käytetään van Gieson -värjäystä, joka värjää kollageenin punaiseksi ja muut kudoksen osat ovat eri keltaisen ja ruskean sävyjä. (Mäkinen 2021.)

## 2.3 Patologia digitalisoituminen ja mikroskopiointi

Patologian digitalisoituminen tulee muuttamaan paljon tulevan vuosikymmenen aikana. Digitaalisen patologian termi tulee muuttamaan pelkäksi patologiaksi. Muutos on väistämätön virtuaalimikroskopiassa tekniikan kehityksen takia. Digitalisoitumisen hyödyt ovat nousseet tietoisuuteen ja käytäntöön. Suomalainen osaaminen teknologiassa mahdollistaa merkittävän kasvualustan korkealaatuiseen tekoälytutkimukseen sekä syväoppimiseen perustuvassa digitaalisessa patologian analytiikassa. (Tolonen 2021.) Nykyään syväoppiminen tietokoneavusteisessa digitaalisessa mikroskopiassa vaatii tutkijoilta paljon osaamista ja laajaa tietotekniikka- ja ohjelmointikokemusta. Viime vuosina syväoppimisen soveltuminen biologiseen kuvantamiseen on lisännyt sen kykyä erottaa kiinnostavia rakenteita kuvista ja tehdä visuaalisia analyysejä. (Peterson ym. 2022.)

Immunohistokemiassa käytetään fluoresoivia väriaineita, jotka absorboivat valoa tietyllä aallonpituudella. Tämän jälkeen absorboitu valo emittoituu pidemmällä aallonpituudella. Fluoresenssimikroskoopeissa käytetään lasereita, joilla tuotetaan valoa tiettyyn aallonpituuteen. On kehitetty monia erilaisia fluorokromeja, joilla jokaisella on oma erityinen

emissio- ja viritysfluoresenssispektri. Fluorokromien eroavaisuudet perustuvat niiden kykyyn absorboida valoa. (Abcam 2021a)

### 3 Immunologia immunohistokemiassa

Immunologialla tarkoitetaan elimistön puolustus- ja suoja mekanismeja, jotka suojaavat meitä infektio taudeilta. Puolustusmekanismit ovat mukana monin eri tavoin kehon sisäisen puhtaanapidon ja homeostaattisen tasapainon ylläpitämisessä. Monien tautien patogeenien takana ovat immunologiset mekanismit, jotka aktivoituvat taudin synnyssä. Ihmisellä on luontainen ja opittu immunitetti. Immuunijärjestelmä käyttää tarkkoja tunnistuskeinoja, mikä on monimutkainen tapahtumasarja. Luontainen immuunijärjestelmä on ensimmäisenä vastassa kehoon tunkeutuvia mikrobeja tai kudoksetta. Elimistössä on oma kiertokulku, jossa voidaan fagosytoida omia soluja ja kierrättää niitä uudelleen. Vieraat ja vaurioituneet kudokset kuljetetaan prosessoinnin jälkeen imusolmukkeisiin, jossa tapahtuu antigeenien esittely lymfosyyteille. Näin vieraille rakenteille reagoitunut ja oppinut immuunijärjestelmä synnyttää antigeeneille spesifejä vasta-aineita ja T-soluja. Tämän jälkeen aktivoituu luontaisen järjestelmän mekanismit, valkosolut ja komplementtijärjestelmä, jotka aloittavat vasta-aineiden tunnistamia antigeenejä tuhoavan toiminnan. (Meri 2011.a)

Antigeenit ovat molekyyliä, joita voi esiintyä bakteereissa, viruksissa tai allergeeneissa, jotka elimistö ei tunnista ja vastustaa niitä. Jokaisella antigeenillä on erilaiset, toisistaan poikkeavat epitootit, jotka aiheuttavat tietyn spesifin immuunivasteen. Vasta-aineet ovat Y-muotoisia proteiineja, joita keho tuottaa tunnistessaan antigeenejä. B-solut tuottavat vasta-aineita. Jokaisessa vasta-aineessa on paratoopi, joka tunnistaa tietyn antigeenin epitootin toimien kuin lukko ja avain -menetelmä. Tämä sitoutuminen auttaa vasta-aineita poistamaan antigeenit elimistöstä joko suoraan neutraloimalla tai "merkitsemällä" niitä. (MacDonald 2022.) Opittu immunitetti eli soluvälitteinen immunitetti liittyy makrofagien aktivaatioon, infektoituneiden solujen tuhoamiseen, muistisolujen kehittymiseen ja immuunireaktioiden säätelyyn. Immunitettiä ohjaavat dendriittisolut ja CD4-auttajasolut, jotka kuuluvat T-lymfosyytteihin. (Meri 2011.a)

Opitussa immuunivasteessa vasta-aineet tuhoavat vieraat antigeenit tunnistamalla ne spesifisti. Humoraalinen immuunivaste käyttää vasta-aineita antigeenien havaitsemiseen, kun taas soluvälitteisessä vasteessa immuunijärjestelmän T-solut tuhoavat infektoituneet solut. (Abcam 2021.b) Yli 99 % neitseellisistä, eli naiiveista, T-soluista ei koskaan kohtaa spesifiä antigeenia, johon se voisi reagoida. Tämä tarkoittaa, etteivät

nämä T-solut aktivoidu eivätkä osallistu soluvälitteiseen immunitettiin. T-solujen toiminnan kannalta ratkaiseva tapahtuma on antigeenin tunnistus ja solun aktivaatio. T-solut kiertävät imukudoksissa ja verenkierrassa ennen aktivaatiotaan, joten niiden puolustustoiminnot eivät ole käynnissä. (Meri 2011.a)

### 3.1 Vasta-aineet

Vasta-aineet ovat joko monoklonaalisia tai polyklonaalisia. Monoklonaaliset vasta-aineet tunnistavat yhden tyyppin epitootin ja polyklonaaliset useamman epitootin. Vasta-aineet tunnistavat antigeeninsä sitoutumalla sille spesifiin sitoutumiskohtaan eli epitoppiin. Diagnostisessa käytössä on vasta-aineita sadoille antigeeneille. Kasvaindiagnoosi on tärkein alue, jossa vasta-aineita käytetään kasvainten luokittelussa ja erotusdiagnoosissa. (Mäkinen & Suikkanen 2021.)

Polyklonaaliset vasta-aineet tuotetaan elävissä eläimissä, useimmiten hiirissä, rotissa, vuohissa ja kaneissa. Kun esimerkiksi hiiri immunisoidaan spesifisellä antigeenillä, syntyy vasta-aineita, jotka eristetään eläimen seerumista. Monoklonaalisten vasta-aineiden tuottaminen perustuu yhden antigeenin tunnistamiseen, jossa esimerkiksi kanin pernanasta eristetään lymfosyyttejä, jotka sitten fuusioidaan viljeltyjen myeloomasolujen kanssa. Monoklonaalisten vasta-aineiden etuna on niiden spesifisyys ja affiniteetti. Vaikka vasta-aineiden tuottajien välillä voi olla huomattavia eroja, kaniin tuottamat vasta-aineet sitoutuvat hiiriä paremmin ja niillä on voimakkaampi affiniteetti. (Mäkinen & Suikkanen 2021.)

Vasta-aineiden spesifisyyden takia niitä käytetään laajasti antigeenien paljastamiseen. Immunohistokemiassa vasta-aine sitoutuu antigeeniin, ja sitä kutsutaan primääriseksi vasta-aineeksi. Immunomäärityksissä vasta-aine konjugoituu leiman kanssa, joka on joko suora tai epäsuora. Leimassa voi olla entsyymejä, fluorokromeja tai biotiinia. Tätä kutsutaan myös vasta-aineen leimaamiseksi. (Abcam 2021. b)

### 3.2 Vasta-aineiden luokitukset

Nykyinen Cluster of differentiation eli CD - luokitusjärjestelmä hyväksyttiin vuonna 1982. Järjestelmä syntyi, koska tarvittiin johdonmukainen tapa tunnistaa ja luokitella leukosyyttien pinnalla olevat antigeenit. Tätä protokollaa käytetään leukosyyttien solun pintamolekyylitunnistamiseen ja tutkimiseen. CD-molekyylit toimivat usein immuunisolujen toiminnalle tärkeinä reseptoreina tai ligandeina. Joillakin CD-proteiineilla on rooli

solujen signaloinnissa, kun taas toiset CD-molekyylit välittävät solujen adheesiota. On olemassa noin 250 erilaista CD-proteiinia. (Xion & Xu 2014.)

Human Cell Differentiation Molecules eli HLDA-organisaatio ylläpitää HLDA-järjestelmää ja nimeää uusia CD-molekyylejä (Hcdm 2023). Lisäksi on olemassa monimutkainen antigeenijärjestelmä nimeltään Major histocompatibility complex eli MHC-molekyylit, joka jaotellaan kahteen ryhmään: luokan I ja II geenien tuottamiin molekyyleihin. Ne ovat ihmisen niin kutsuttuja leukosyyttiantigenejä, joita esiintyy solujen pinnalla ja joilla on samankaltainen rakenne. (Pasternack & Salmela 2012.)

### 3.3 Immunohistokemia

Immunohistokemiallisten menetelmien avulla voidaan diagnosoinnissa osoittaa spesifisti jonkin tietyn antigeenin olemassaolo tai sen puuttuminen kudoksessa. Tätä varten on kehitetty erilaisia menetelmiä antigeenien osoittamiseen. Suora immunofluoresenssitutkimus on yksinkertaisin menetelmä. Epäsuorat menetelmät voivat kuitenkin olla herkempiä. Menetelmien valinnassa vaikuttavat monet tekijät, esimerkiksi fiksatiivi, fiksatioaika ja antigeenin sijainti solussa. (Mäkinen 2021.)

Immunohistokemiaa diagnostiikkaa käytetään eniten kasvainten tunnistamiseen. Kasvaindiagnostiikassa vasta-aineet tunnistavat antigeenejä, yleensä rakenneproteiineja, joiden esiintyvyys voi pysyä samana sekä hyvän- että pahanlaatuisissa muutoksissa. Huonokaan kasvaimen erilaistuminen ei merkitsevästi muuta värjäytymisreaktiota. Hyvien erilaistumismarkkereiden tulkinta on yleensä yksiselitteinen eli tulos on joko positiivinen tai negatiivinen. Kasvainten erotusdiagnostiikkaa käytetään enemmän ennustemarkkereihin. Ennustemarkkereista saadaan tietoa kasvainsolujen biologisista ominaisuuksista, proliferaation eli solujen lisääntymisen aktiivisuudesta. Nykyään kasvainkudoksista määritetään myös hoitojen valintaan vaikuttavia markkereita. (Mäkinen 2021.)

#### 3.3.1 Immunofluoresenssivärjäys

Primääriset konjugoituneet vasta-aineet voidaan tunnistaa suoraan spesifisestä antigeenistä ilman niin sanottua sekundaarivasta-ainetta, joka ei voi sitoutua spesifiseen vasta-aineeseen. Jos käytetään suoraa leimattua primääristä vasta-ainetta, voidaan säästää merkittävästi aikaa ja yksinkertaistaa protokollaa. (Abcam 2023. b) Sekundaarivasta-aineet tunnistavat epäsuorasti primääriset vasta-aineet, jotka sitoutuvat erityisesti spesifeihin markkereihin. Sekundaarivasta-aineet voivat olla konjugoituja fluoroforo-

reihin, proteiineihin tai entsyymeihin ja ne vahvistavat primääristen vasta-aineiden signaalia. Sekundaariset vasta-aineet voidaan tuottaa pääeläimessä, kuten vuohessa. Vuohessa tuotetaan kanin IgG:tä, josta muodostuu anti-kani-IgG:tä. Sekundaarivasta-aineen pitää olla samaa tyyppiä kuin se, josta primääriset vasta-aineet on tuotettu. (Abcam 2023. b)

Suoran ja epäsuoran immunofluoresenssin ero on se, että suorassa immunofluoresenssissa primäärinen vasta-aine on leimattu suoraan fluoroforiin, mikä mahdollistaa nopeamman ja lyhyemmän värjäysprotokollan. Epäsuorassa immunofluoresenssissa sekundaarinen konjugoitu eli leimattu vasta-aine sitoutuu spesifisesti primääriseen vasta-aineeseen, joka ei ole leimattu. Vaikka epäsuora menetelmä on hitaampi tehdä kuin suora immunofluoresenssimenetelmä, sillä on monia etuja. Epäsuora menetelmä on usein halvempi, koska samaa sekundaarista vasta-ainetta voidaan käyttää erilaisiin primäärisiin vasta-aineisiin. Monikanavavärjäyksissä voidaan yhdistää useita primäärisiä vasta-aineita spesifisiin sekundaarisiin vasta-aineisiin, joista jokainen on leimattu eri fluoroforilla. (Ibidi 2023. b)

Immunofluoresenssivärjäyksessä voidaan käyttää fluoresoivia väriaineita, kuten fluoreseiinia, rodamiinia tai fykoerytriiniä. Niitä voidaan laittaa vasta-aineisiin tuhoamatta kudoksen biologista aktiivisuutta. Tällä tavalla värjättyjä vasta-aineita voidaan käyttää histologisiin tutkimuksiin. Ja kun kudokset on käsitelty fluoresoivilla vasta-aineilla, voidaan sitä katsoa fluoresenssimikroskoopilla, jossa siitä voidaan nähdä antigenein sijainti kudoksissa värireaktiona. (Meri b 2021.) Fluorokromeja eli fluoreoivia värejä käytetään erilaisissa sovelluksissa havaitsemisreagensseina, koska ne absorboivat tietyn aallonpituuden valoenergiaa. Fluorokromit absorboivat (imevät itseensä) ja emittoivat (vapauttavat) valoa eri aallonpituuksilla. (Abcam a 2021.)

### 3.3.2 Multiplex - värjäys

Perinteinen ja paljon käytetty immunohistokemia (IHC) on diagnostinen menetelmä kudospatologiassa. Immunohistokemiallisissa värjäyksissä voidaan kuitenkin leimata kerrallaan vain yksi biomarkkeri. Tästä syystä on syntynyt uusia multiplex-värjäystekniikoita. Nämä uudet multiplex-tekniikat mahdollistavat monien biomarkkereiden havaitsemisen samaan aikaan yhdestä kudoksetiluksesta. Multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelilla voidaan tehdä tarkasti määriteltyjä tutkimuksia. Onnistuneen värjäyksen jälkeen näytelasit voidaan viedä kuvan analysointiohjelmaan, jossa on mahdollista tehdä kvantitatiivisia tutkimuksia. Nämä tutkimukset ovat hyvin toistettavia ja tehokkaita

kuva-analyysejä, jotka mahdollistavat myös solujen koostumuksen ja solujen välisen vuorovaikutuksen analysoinnin. (Tan ym.2020.)

Immunohistokemiassa multiplex-immunofluoresenssivärjäyksellä ja kuva-analyysiteknikoilla pystytään tunnistamaan immuunisolujen ja biomarkkereiden vuorovaikutusta toisiinsa. Niiden avulla voidaan tunnistaa biomarkkereiden sijainti kasvaimen mikroympäristössä (TME). (Taube 2020.) Tuumorin mikroympäristön ominaisuuksia tutkittaessa määritetään syövän immuunisolujen sijainti ja jakautuminen FFPE-näytteessä. (Jia ym. 2022.) Immunijärjestelmän ja kasvainsolujen välisen vuorovaikutuksen kuvaaminen immunohistokemiallisin keinoin on tärkeää syövän hoidossa ja ennusteessa. (Taube ym.2020.)

Kromogeenistä multiplex-värjäystä käytetään etenkin tilanteissa, joissa kiinnostavat biomarkerit eivät ole samoissa soluissa. Kuitenkin kromogeenien yhdistelmät mahdollistavat biomarkkereiden tunnistamisen yhdessä solussa värisiirtymien vuoksi. Esimerkiksi keltainen kromogeeni violetin kromogeenin päällä antaa oranssin värin, joka pystytään erottamaan puhtaasta keltaisesta ja violetista väristä. (Taube ym. 2020.)

### 3.3.3 Multiplex - värjäyksen protokollan päävaiheet

IHC-protokollan päävaiheet multiplex-värjäyksessä alkavat kudosleikkeen parafiinin poistolla. Parafiinin poiston jälkeen kudosleikkeet käsitellään laskevassa alkoholisarjassa ksyleenistä milliQ-veteen. Tämän jälkeen lasit laitetaan PT-moduuliin, joka lämmitää veden lämpötilat ohjelmoitusti. PT-moduulissa tehdään HIER (heat-induced epitope retrieval) eli epitooppien paljastus näytelaseille. Kudosleikkeet ovat 20 minuuttia 99 asteisessa puskurissa, jonka pH on 9, jossa käytetään TrisEdta-puskuria antigeenien paljastamiseen immunohistokemiallisissa värjäyksissä. (Blom 2017.) Antigeenien paljastuksessa formaliinin ristsidokset hydrolysoituvat kudosleikkeestä kuumentamalla. Kudosmorfologia säilyy parhaiten alle sadan asteen lämpötilassa. (Agilent Dako 2013.)

Niin sanotussa blokkausvaiheessa peroksidiblokin tarkoitus on estää ei-spesifisten antigeenien sitoutuminen taustasignaalien vähentämiseksi (Ibido 2023a). Tämän jälkeen pipetoidaan isäntäseerumia, esimerkiksi vuohenseerumia, jossa oleva albumiini sitoutuu epäspesifisiin antigeeneihin ja edistää primäärivasta-aineiden luotettavampaa sitoutumista. Liian pitkä inkubointi voi vähentää primäärisen vasta-aineen spesifistä sitoutumista ja siten heikentää signaalia. (Ibido 2023. a)

Immunofluoresenssivärjäysprotokollassa primäärinen vasta-aineiden inkubointiaikojen valinta on tärkeää, etenkin jos protokollaa ei ole vielä käytössä. Tällöin etsitään tietoa tieteellisistä artikkeleista ja tutkimustiedosta. Monet vasta-ainevalmistajat listaavat tuotesivuillaan viitteitä, joissa vasta-ainetta on käytetty onnistuneesti immunofluoresenssivärjäyksissä ja suosittelevat laimennussuhteita, inkubointiaikoja ja esittelevät referenssikuvia värjäyksistä. (Ibido 2023.a)

Primäärivasta-aine pipetoidaan kudosteille, jossa vasta-aine sitoutuu spesifiseen antigeneihin. Primäärinen vasta-aineen pääeläin, esimerkiksi kani, määrittää sekundaarisen vasta-aineen, jonka pitää olla anti-kani. Tämä on tärkeää tehtäessä monikanavavärjäyksiä, koska eri pääeläimessä voidaan tuottaa erilaisia spesifisiä primäärisiä vasta-aineita. Optimaaliset inkubointiolosuhteet määritellään tarkasti, ja liian lyhyet inkubaatioajat voivat vaikuttaa heikkoon tai kokonaan puuttuvaan signaaliin. Liian korkeat vasta-ainepitoisuudet ja liian pitkät inkubaatioajat voivat vastaavasti vaikuttaa epäspesifiseen taustasignaaliin. Primäärinen vasta-aineen inkuboinnin jälkeen näytteet tulee pestä kolme kertaa viiden minuutin ajan pesuliuksessa taustafluoresenssin välttämiseksi. (Ibidi 2023.a)

Piparjuuriperoksidaasi (HRP) on yleisesti käytetty entsyymi. HRP:tä käytetään sekundaarisena vasta-aineena niin sanottuna tunnistusreagenssina immunologisissa määrittäyksissä. (Michigan diagnostic 2021.) Tyramide signal amplification (TSA) on reagenssi, joka voimistaa signaalia värjäyksessä, jossa HRP voi katalysoida TSA:ta, joka sitoutuu kovalenttisesti molekyyliin ja voimistaa näin vasta-aineiden signaalia. (Biotium.) Immunofluoresenssivärjäyksissä sekundaarinen vasta-aine on konjugoitu fluoroforiin, joka säteilee valoa tietyllä aallonpituudella. Sekundaarinen vasta-aine sitoutuu spesifisesti primääriin vasta-aineeseen. Siksi on tärkeää, että sekundäärinen vasta-aine on spesifinen isännälle, jossa primäärinen vasta-aine on tuotettu. (Abcam 2023 b.)

On käytettävä stabiileja fluoroforeja, jotta näyte soveltuu fluoresenssimikroskopiaan. Monivärjäyksissä fluoroforien spektraalinen päällekkäisyys tulee myös huomioida. (Ibido 2023b.) Seuraava värjäyskierron aloitetaan edellisten vasta-aineiden ja fluorisoivien leimojen denaturoimisella. Värjäyskierron lopuksi lasit peitetään suojalaseilla ja skannataan fluoresenssimikroskoopilla, jossa voidaan käyttää eri aallonpituuksia. Skanneri estää muut aallonpituudet ja emittoituu kuvassa yhdessä vasta-aineessa aallonpituudella kerrallaan, eli fluoresenssikanavalla. (Blom ym.2017.)



### 3.3.4 DAB- värjäys

DAB on 3,3'-diaminobentsidiini, joka hapettuu peroksidaasin ja vetyperoksidin vaikutuksesta, minkä seurauksena DAB muuttuu ruskeaksi. DAB:ta voidaan käyttää immunohistokemiallisissa värjäyksissä yksittäisenä leimana tai toisena värinä useiden antigeenien leimaamisessa. DAB:lla värjätyt leikkeet voidaan tarkastella valomikroskopilla. (Sino Biological 2021.)

## 4 Syöpä ja makrofagit

### 4.1 Syöpä

On olemassa suuri joukko erilaisia syöpiä, jotka voivat syntyä melkein missä tahansa kehon elimessä tai kudoksessa. Silloin solut alkavat jakaantua hallitsemattomasti ja kasvainsolukko ylittää normaalit rajat. Syövän erilaistumisaste: Hyvin erilaistuneet, gradus I, muistuttavat eniten normaalia kudosta ja ovat yleensä hyväennusteisia. Kohtalaisesti erilaistuneet, gradus II, ovat hyvän ja huonon ennusteen kasvainten välimuotoja. Huonosti erilaistuneet, gradus III ja gradus IV, ovat kasvaimia, jotka leviävät muita helpommin, ja niiden ennuste on jonkin verran muita huonompi (Ristimäki ym. 2013.)

Syöpäsolut voivat tunkeutua viereisiin kudoksiin ja levitä myös muihin elimiin. Jälkimmäistä prosessia kutsutaan metastoitumiseksi. Tämä on tärkein syövän aiheuttama kuolinsyy. Syöpä on toiseksi yleisin kuolinsyy maailmanlaajuisesti, ja sen arvioidaan aiheuttavan 9,6 miljoonaa kuolemaa eli joka kuudennen kuolemantapauksen vuonna 2018. Keuhko-, eturauhas-, paksusuoli-, maha- ja maksasyövät ovat yleisimpiä miesten syöpiä, kun taas rinta-, paksusuolen-, keuhko-, kohdunkaulan- ja kilpirauhassyövät ovat yleisempiä naisilla. (WHO 2018.)

Kun tutkitaan potilaita, joilla on syöpään viittaavia oireita tai löydöksiä, syöpämarkkerit ovat suureksi hyödyksi, kun niitä käytetään yhdessä muiden tutkimusten kanssa. Pelkästään suurentuneen syöpämarkkeripitoisuuden perusteella syöpää ei yleensä voida diagnosoida. Kasvainmerkkiaineita voidaan hyödyntää myös syövän primaaridiagnostiikassa eli silloin, kun potilailla on syöpään viittaavia oireita tai löydöksiä. Biomarkkereiden etuna on se, että niillä voidaan löytää syövän alkuperäinen paikka ja käyttää niitä myös syövän seurannassa hoidon jälkeen. Biomarkkeri voi olla usein koholla myös hyvänlaatuisissa kasvaimissa. (Stenman 2013.) Syöpäsolut ovat erittäin proliferaattisia,

mikä tarkoittaa, että niillä on lisääntynyt taipumus genomisiin muutoksiin ja mutaatioihin, sekä solun jakautumiseen ja kasvainsuppressorigeeneihin. (Abcam 2023. c)

## 4.2 Valkosolut

Valkosolut, eli leukosyytit, ovat tärkein tehtävänsä elimistössä erilaisten tulehdusten torjunta. Valkosolut jaetaan lymfosyytteihin, neutrofiileihin, granulositytteihin, eosinofiileihin ja monosyytteihin. Veren valkosoluista lymfosyyttejä on noin 20–45 %, granulosityttejä 41–81 %, eosinofiilejä 5 %, monosyyttejä noin 5–12 % ja basofiilejä noin 1 % leukosyyteistä. (Tunturi 2021.) Neutrofiilit elävät elimistössä noin 8 tuntia vapauduttuaan luuytimeistä. Neutrofiiliset granulositytit toimivat etulinjan puolustuksessa ja menevät nopeasti tuhoamaan tulehdusalueelle vieraat tunkeilijat ja bakteerit. Eosinofiilit ovat elintärkeitä loisten torjunnassa ja torjuvat myös bakteereita. Basofiilit ovat tärkeitä epäspesifisessä immuunivasteessa sairauksia aiheuttavia patogeeneja vastaan. Monosyyttien tärkein tehtävä on huolehtia kuolleista soluista pois elimistöstä. (Eldridge 2022.) Monosyytit kulkeutuvat kudoksiin ja voivat erilaistua makrofageiksi (Rantakari 2017).

Immuunipuolustukselle on elintärkeää tehokas soluliikenne. Lymfosyytit kulkevat jatkuvasti verestä kudoksiin ja sieltä imuteitse verenkiertoon. Granulositytit kulkevat myös verestä kudoksiin ja tulehduspaikoille. Lymfosyytit ovat välttämättömiä immuunijärjestelmälle. Lymfosyyttejä on kahdenlaisia: B-soluja ja T-soluja. B-lymfosyytit huolehtivat humoraalisesta immuniteetistä ja ne tuottavat vasta-aineita. T-lymfosyytit huolehtivat soluvälitteisestä immuniteetistä ja ne tuhoavat vieraita tai omia muuntuneita, esimerkiksi syöpäsoluiksi muuntuneita soluja. Lymfosyyttien aktivoituessa ja osallistuessa puolustukseen pitäisi jokaisen lymfosyytin löytää oma spesifinen antigeeni. Tämän jälkeen lymfosyytit reagoivat sille spesifejä antigeenejä vastaan. (Salmi & Renkonen 2003.)

Dendriittisolut ovat antigeeneja esitteleviä soluja. Ne siirtyvät perifeerisistä kudoksista imusuonten kautta sekundaarisiiin imukudoksiin antigeenin esittelyn eri vaiheissa (Salmi & Renkonen 2003). Syöpäsolut välttävät elimistön puolustusjärjestelmän tunnistukselta, etenkin T-solujen välittämältä solutuholta. T-solut tunnistavat vieraat tunkeilijat ja tappavat suoraan vieraat hyökkääjät, T-solut muistavat hyökänneet solut myöhemmin, jos niitä esiintyy uudestaan. B-lymfosyytit tuottavat vasta-aineita ja niiden välityksellä tuhotaan vieraita hyökkääjiä. T-solut tunnistavat antigeenejä dendriittisolujen ja makrofagien MHC II -molekyyleistä. MHC (major histocompatibility complex) -molekyylit ovat selkärankaisten solujen solupinnalla olevia glykoproteiineja, jotka toimivat sekä

kudosantigeeneinä että immunologisissa reaktioissa antigeenien esittelijöinä. (Brück & Keränen & Dufvs & Kreutzman & Mustjoki 2016.)

### 4.3 Makrofagit

Makrofagit esittelevät antigeenejä lähinnä erilaistuneille CD4 T-soluille, jotka auttavat sytokiineillaan makrofageja tuhoamaan näiden fagosytoimia mikrobeja (Jokiranta & Seppälä 2011). Immuunipuolustuksen lisäksi makrofageja tarvitaan myös normaaliin sikiönkehitykseen sekä kudosten homeostaasiin. Kudosmakrofagit muodostuvat sikiökaudella, jossa ne säilyvät aikuisuuteen kantasolutyyppisen uudistumisen avulla. Ruskuaispussissa tuotetaan sikiökauden ensimmäiset makrofagit. Tästä eteenpäin makrofagituotanto siirtyy maksaan. Syntymän jälkeen luuytimessä muodostuneet monosyytit kulkevat kudoksiin ja voivat erilaistua makrofageiksi, useimmiten näin käy vain tulehdustilanteissa. Sikiöaikaisen makrofagituoton mekaniikka tunnetaan hyvin, kuitenkin makrofagien kudosspesifistä kulkua ohjaavat molekyylit ovat edelleen jääneet tuntemattomiksi. (Rantakari 2016.)

Makrofagien rooli tulehduksissa on muuttunut paljon. Nykyään ymmärretään, että makrofagit erittävät tulehdusta edistäviä tai anti-inflammatorisia sytokiineja eri immuunisolujen välillä. Sytokiinit ovat pieniä proteiinisignaalmolekyyliä, jotka säätelevät solujen kasvua, erilaistumista ja toimintaa. Makrofagi kuvaa heterogeenistä soluryhmää, jolla on erilaisia toimintoja erilaisissa soluprosesseissa. Makrofageilla on ratkaiseva rooli immuunivasteessa patogeenejä vastaan ja kudosten korjaamisessa (Mamilos ym. 2023.)

Se, missä ympäristössä makrofagit aktivoituvat ja elävät, määrittää pitkälti niiden fenotyypin. Makrofagien kudosspesifiset signaalit muuntavat niitä parhaalla mahdollisella tavalla palvelemaan kudoksen tarpeita. Esimerkiksi jos aktivaatioympäristössä on allergiatyyppisiä interleukiini 4 tai 13-välittäjäaineita, makrofagit erilaistuvat. Aktiivisesti fagosytoivat M1-tyyppin makrofagit edistävät tulehdusta. M1-tyyppin makrofagit myös lisäävät sytokiineja. M2-makrofagit ovat sen sijaan sytokiineja estäviä, eli ne estävät tulehdusta. Lisäksi makrofageilla on paljon muitakin kasvutekijöitä. M2-makrofagit auttavat myös tulehdusreaktion ja kudosvaurion paranemisessa. Itse asiassa M1- ja M2-makrofagit ovat makrofagien ääripäät ja niiden polarisaation ja toiminnan ansiosta ne voivat olla mitä tahansa näiden väliltä. (Salmi 2017.)

#### 4.4 Makrofagien rooli syövässä

Makrofagit, suuret "syöjäsolut", nimettiin noin 100 vuotta sitten. Siitä lähtien makrofagien tutkimus lääketieteessä on ollut laajaa. Makrofagit ovat kaksiteräinen miekka syövän suhteen: ne voivat tulla syövän huijaamiksi ja erilaistua edistäen syövän kasvua, sekä myös edistää syövän tulehdusreaktiota. Hiirimallien avulla on selvitetty paljon makrofagien roolia ja makrofagien erilaistumista. Tulevaisuudessa tarvitaan paljon erilaisia luotettavia keinoja tutkia makrofagien toimintaa potilailla enemmän. (Salmi 2017.)

Myeloidiset solut, kuten makrofagit ja neutrofiilit, ovat vuorovaikutuksessa kasvainsolujen kanssa merkittävästi enemmän kuin aiemmin on tiedetty. Kasvaimeen soluttautuneiden leukosyyttien määrillä ja tyypeillä on osoitettu olevan vahva ennuste erilaisiin tautituloksiin. Esimerkiksi CD8+ T-solujen runsas esiintyminen korreloi yleensä positiivisesti eloonjäämiseen, kun taas myeloidisten solujen esiintyminen liittyy huonompaan ennusteeseen. Myeloidisolujen rooli syövässä on tunnustettu jo pitkään, vaikka vasta viime aikoina analyysit ovat kehittyneet soluprofiloinnissa ja löytäneet uutta tietoa monien kasvainten TME:ssä (tumor microenvironment) olevien myeloidisolujen monimuotoisuudesta. TME:ssä makrofagit ovat tärkeitä määrääviä tekijöitä. (Mantovani & Marchesi & Jaillon & Garlanda, & Allavena 2021.)

Makrofagit voivat ehkäistä kasvainten syntyä, sillä ne osallistuvat syöpäsolujen torjuntaan monella eri tavalla. Nämä makrofagit pystyvät fagosytoimaan (solusyönti) ja tappamaan syöpäsoluja. Jos syöpäsoluja vastaan on kehittynyt vasta-ainevaste, makrofagi tunnistaa tällaisen opsonoituneen syöpäsolun Fc-reseptoreillaan ja käynnistää vasta-aineriippuvaisen fagosytoosin. Ohjelmoituneen solukuoleman takia, kuolevissa soluissa tulee ilmi niin sanottuja "syö minut" signaaleja. Nämä signaalit tulevat solun pinnan fosfatidyli- seriineistä, jolloin makrofagit tunnistavat tuhottavat solut ja fagosytoivat ne. (Salmi 2017.)

Syöpäkasvaimia kutsutaan tuumoreiksi, ja tuumorimikroympäristöstä käytetään lyhennettä TME (tumor microenvironment). TME viittaa kasvainkudoksen rakenteeseen, joka sisältää stroomasoluja, immuunisoluja, sidekudossoluja ja verisuonia. Tämä tuumorin mikroympäristö on ratkaiseva kasvaimen etenemisessä ja etäpesäkkeiden synnyssä, ja tulehduksen ja TME:n välillä on havaittu olevan vahva yhteys. TME:n tulehdusta pidetään yleisesti syövän tunnusmerkkinä, ja kasvaimen mikroympäristössä esiintyy paljon tulehdussoluja, mukaan lukien makrofageja. Näitä makrofageja, jotka esiintyvät kasvaimen läheisyydessä, kutsutaan lyhenteellä TAM (tumor associated macrophage), ja ne

ovat keskeisiä kasvaimen etenemisessä ja etäpesäkkeiden syntymisessä sekä vaikuttavat hoitoresistenssiin. Kasvaimen TAM-alapopulaatiot M1 ja M2 voivat esiintyä rinnakkain kasvaimissa, ja niiden välisten suhteiden ymmärtäminen on monimutkaista. Makrofagien plastisuus ja heterogeenisyys vaikuttavat makrofagien fenotyyppeihin, sijaintiin ja aktivoitumiseen. TME-makrofagien tutkimisessa käytetään immunohistokemiallisia uusia tekniikoita, kuten multiplexia. (Wu ym. 2020.)

Makrofagien kasvua TME:ssä edistävät välittäjäaineet ja hypoksia (hapensaannin puute). Hypoksia lamauttaa makrofagien tärkeitä toimintoja, ja siten hypoksia ohjaa makrofagien muuntumista soluiksi. Tällaiset M2-makrofagit hakeutuvat usein syövän verisuonten ympärille, ja paradoksaalisesti ne auttavat kasvaimen kasvussa monella tavalla. Tunnetuin vaikutusmekanismi on se, että makrofagit tuottavat paljon endoteelikasvutekijää (VEGF). Kasvaimen etenemisessä kasvutekijät ovat avaintekijöitä. Kasvutekijät osallistuvat tehokkaasti kudosten invaasioihin, angiogeneesiin ja kloonien laajenemiseen. Isossa roolissa ovat myös verisuonten kasvutekijät endoteelissä ja epidermiksessä. Kasvutekijät, jotka edistävät angiogeneesiä eli verisuonten uudismuodostusta, auttavat kasvavan syövän uudissuonitusta. Makrofagit auttavat myös kasvainso-lujen siirtymisessä verisuoniin. Makrofagien tuottamat molekyylit, kuten soluväliainemolekyylit SPARC ja kasvutekijä beeta (TGF- $\beta$ ), edistävät syöpäsolujen tarttumista matriksiin, porautumista sen läpi syöpäsolujen verisuoniin siirtymisen aikana. (Salmi 2017.)

## 5 Opinnäytetyön tarkoitus ja tutkimuskysymys

Opinnäytetyön tarkoituksena oli kehitellä monikanava eli multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneeli makrofageille, jota voisi käyttää tulevaisuudessa multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksissä hyödyksi. Värjäyksistä saatuja tuloksia voidaan hyödyntää kasvaindiagnoosissa ja tutkimustietona yleisesti makrofagien ilmentymisestä käytetyillä vasta-aineilla sekä myöhemmin kuva-analyysissä. Tavoitteena oli tehostaa makrofagien esiintymisen arviointia kudoksessa multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelissa. Tarkoituksena oli myös saada lisää tietoa käytettyjen vasta-aineiden toimivuudesta syöpäkudoksessa ja makrofagien ilmentymisestä antigeeneissä. Multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelia käytettiin myös vasta-aineen CD206:den käyttöönottestaukseen, koska se oli makrofagi antigeeni. Monikudosleikkeitä käytettiin kaikkiin värjäyksiin eli TMA:ta. TMA ja Normal TMA värjättiin multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksellä. Lopullisissa värjäyksissä käytettiin vain syöpäkudoksia. Paneelissa käytettiin fluoresenssivärejä. Multiplex-immunohistofluoresenssivärjäys tehtiin epäsuoralla menetelmällä. Vasta-aineita oli yksitoista, mukaan lukien ylimääräisen

Sparc-paneelin vasta-aineet. Sparc-paneelin vasta-aineet liittyvät läheisesti tuumorin mikroympäristöön kuten makrofagienkin vasta-aineet. Ohjaava tutkija valitsi vasta-aineet, joita Makrofagi ja Sparc multiplex-värjäyspaneelissa käytettiin. Tutkimuskysymys:

1. Miten makrofagit ilmentyvät syöpäkudoksessa käytetyillä vasta-aineilla multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksissä?

## 6 Opinnäytetyön toteutus ja käytetyt menetelmät

### 6.1 Menetelmän lähtökohdat

Digitaalisen mikroskopian ja molekyylipatologian tutkimusyksikössä FIMM:ssä käytettiin paljon biopankkinäytteitä. Kudoksina käytettiin monikudosleikkeitä, jotka värjättiin multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksellä. Opinnäytetyössä käytetyt kudokset oli tehty FIMM:ssä. Näytelasit Normal TMA ja TMA olivat monikudosleikkeitä, joihin sisältyi kudosta munasarjasta, haimasta, eturauhasesta, paksusuolesta, umpisuolesta, imusolmukkeista, rintakudoksesta ja keuhkokudoksesta. Normal TMA sisälsi terveitä kudoksia ja TMA syöpää sisältäviä kudoksia. Lopullisissa värjäyksissä käytettiin vain syöpäkudoksia, sillä antigeenit joko ilmentyvät niissä tai eivät ilmene.

Opinnäytetyössä käytettiin multiplex-immunohistofluoresenssivärjäysmenetelmää makrofagien ja ylimääräisessä Sparc-paneelissa käytettyjen antigeenien ilmentymisen tutkimiseen syöpäkudoksessa. Värjäyksessä käytettiin fluoresenssivärejä ja yhteensä yksitoista vasta-ainetta. Ensin tehtiin DAB-värjäys, jossa määritettiin laimennussuhde multiplex-immunohistofluoresenssivärjäykseen. DAB-värjäys on immunohistokemiassa yleinen käytäntö. Lopulliset laimennussuhteet valittiin DAB-värjäysten perusteella.

Tutkimuksessa käytettiin epäsuoraa immunofluoresenssivärjäystä. Vasta-aineisiin liitettiin fluoresoivaleima, jonka avulla saatiin vasta-aine näkyviin kuvissa värireaktiona. Fluoresoivat leimat näkyvät vain tietyllä fluoresenssikanavalla. Esimerkiksi 750 fluoresenssikanava oli turkoosi, jolloin vasta-aine näkyi turkoosina signaalina syöpäkudoksessa fluoresenssimikroskoopissa. Näin voitiin tarkastella makrofagien esiintymistä syöpäkudoksessa, sekä sitä, kuinka hyvin vasta-aineet olivat sitoutuneet antigeeneihin syöpäkudoksessa, ja oliko värjäys spesifiä. Jokaista yksittäistä vasta-ainetta testattiin kolme kertaa näissä värjäyksissä. CD206 vasta-aineen käyttöönottotestaus kuului alusta lähtien Makrofagi-paneelin suunnitelmaan. Alla olevassa taulukossa 2 on opin-

näytetyössä käytetyt antigeenit, joiden ilmentymiseen käytettiin vasta-aineita syöpäku-  
doksessa. Taulukossa on mainittu solutyypit ja sen tehtävä Taulukko 1. Multiplex IHC  
Makrofagi ja Sparc-paneeleissa käytetyt antigeenit, joiden ilmentymiseen käytettiin  
vasta-aineita.

Taulukossa 1. solutyypit ja sen tehtävä. (Human Protein Atlas 2021.)

<b>Antigeeni</b>	<b>Solutyypit, jossa anti- geeni esiintyy</b>	<b>Antigeenin tehtävä</b>
CD68 M1 Makrofagi	Monosyytit, makrofagit, neutrofiilit, basofiilit, dendriittisolut ja myeloidiset progenitorit.	Spesifinen markkeri kas- vaimeen liittyville makrofa- geille (TAM).
CD206 M2 Makrofagi	Makrofagit, monosyytit ja dendriittisolut.	CD206 on fagosyyttinen re- septori. Polarisoituu M2 makrofageissa, joita esiin- tyy runsaasti TAM:eissa.
HLADR M1	Immuunisuppressiivinen solu	Immuunivasteen käynnis- tämä, voivat olla makrofa- geja.
CD16	Neutrofiilit, luonnolliset tap- pajasolut, monosyytit ja makrofagit.	CD16 on FC-reseptori ja il- menee NK-solujen pinnalla ja säätelee soluaktivaati- ossa
CD45	Yleinen leukosyyttiantigeeni. Hematopoieettiset solut (ei punasolut ja veri- hiutaleet)	B- ja T-solureseptorivälittäjä aktivaatioissa.
E-kadheriini	Epiteelisolu	Epiteelisolujen fenotyyppi, lisäksi on tuumorisuppres- sosolu.
Cytokerasiini	Epiteelisolu	Muodostavat hiusten, ihon ja kynsien ulkokerroksen.
CD11c	Monosyytit, makrofagit, granulosyytit, dendriittisolut, NK-solut, aktivoituneet T- ja B- solut, T- ja B-solujen alajou- kot.	CD11c välittää solujen vä- listä vuorovaikutusta tuleh- dusreaktioiden aikana. Se on erityisen tärkeä mono- syyttien adheesiossa.

CD163 M2 Makrofagi	Monosyytit ja makrofagit	Esiintyy TAM: eissa ja vahva indikaattori huonosta ennusteesta.
CD34	Kantasolu, verisuonisolu	CD34-antigeenipositiivisuus on merkinä kantasoluista. CD34-positiivisuus voi olla läsnä myös erilaistuneissa soluissa eli ns. huononusteisissa soluissa.
Sparc	neutrofiilit, basofiilit ja monosyytit	Sparc esiintyy eri strooma soluissa ja myös epiteelisoluuissa. Sparc säätelee solujen kasvua ja niiden vuorovaikutusta solunulkoisen matriisin ja sytokiinien kautta. Sitoo kalsiumia ja kuparia, useita kollageenityyppjejä, albumiinia, PDGF:ää ja solukalvoja.

## 6.2 Opinnäytetyön aineisto ja menetelmät

Opinnäytetyön aiheen päätti ohjaava tutkija ja käytetyt vasta-aineet makrofageille. Opinnäytetyö toteutettiin digitaalisen mikroskopian ja molekyylipatologian yksikön ohjeitten ja toiveiden mukaan. Opinnäytetyössä tietoperustana on käytetty artikkeleita ja tutkimustietoa eri tietokannoista. Liitteenä käytetty alkuperäinen Multiplex protokolla. Toinen liite on opinnäytetyössä käytetyistä reagensseista ja niiden REF ja LOT tiedot.

Makrofagi-multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelin menetelmä koostui monista työvaiheista ja monista vasta-aineista sekä reagensseista. Aloitettiin TMA lasien parafiinin poistolla, laseja tarvittiin DAB-värjäykseen sekä multiplex-värjäykseen. CD206-vasta-aineen käyttöönottestauksessa tehtiin suositusten mukaisia laimennussuhdetestauksia. Ensin tehtiin DAB-värjäys kaikille vasta-aineille Makrofagi -multiplex-immunohistofluoresenssivärjäystä varten. DAB-värjäyksen tulosten tarkastelun jälkeen päätettiin laimennussuhteet kaikille vasta-aineille. Vasta tämän jälkeen aloitettiin multiplex IHC-protokollan toteutus, jossa yksi kolmekierroksinen värjäys kesti yleensä neljä päivää. Multiplex-värjäysten jälkeen fluoresenssikuvat skannattiin fluoresenssimikroskoopilla ennen seuraavan kierroksen aloittamista. Aikaa jäi toteuttaa Sparc-paneeli ja



siinä tehtiin myös DAB-värjäys vasta-aineille multiplex-immunohistofluoresenssivä-  
jäystä varten.

Opinnäytetyöhön etsittiin DAB- ja fluoresenssikuvista sama kohta jokaisesta vasta-ai-  
nekuvasta omalla fluoresenssikanavalla, tietysti mahdollisuuksien mukaan. Kyseessä  
oli kuitenkin eri kudokset eri lasilla, eivätkä siksi välttämättä ilmene täysin samalla ta-  
valla, vaikka kyseessä olisi samaa kudosta. Apuna tässä käytettiin TMA-karttaa, johon  
oli merkitty kudoksen paikka lasissa. Valittiin kuva myös Makrofagi-multiplex-värjäyspa-  
neelista jokaisesta kolmesta värjäyskerroksesta sekä yksi kuva ylimääräisestä Sparc-  
multiplex-värjäyspaneelista, jossa kaikki fluoresenssikanavat olivat mukana. Taulukko  
2. selkeyttämään värjäyksen päävaiheita.

Taulukko 2. Taulukko kuvaamaan värjäyksen päävaiheita.

1. Parafii- nin poisto TMA la- seille Makrofa- gipanee- liin.	2. CD206 vasta-ai- neen käyttöönotto- testaus, samassa DAB-värjäyksessä kuin muutkin Mak- rofagi-paneelin vasta-aineet. CD206 oli suunnit- eltu mukaan Mak- rofagi-paneeliin uu- tena makrofagi markkerina.	3. DAB-värjäys tehtiin määrittämään laimen- nossuhdealuetta Mul- tiplex-immunohisto- fluoresenssi-värjäystä varten Makrofagi-paneeliin.	4. DAB- värjäyk- sen skan- naus.	5. Multiplex-im- munohisto- fluoresenssi- värjäys Mak- rofagi-paneelille. Kolme kierrosta vär- jäyksessä ja kahdeksan vasta-ainetta.	6. Multiplex- immuno- histofluo- resenssi- värjäyksen skannaus.
7. Parafii- nin poisto TMA la- seille Sparcpaneeliin.	8. Ylimääräinen Sparc-paneeli eh- dittiin tehdä ja sen vasta-aineet liittyi- vät myös makrofa- gien lailla kasvai- men mikroympäris- töön	9. Multiplex-immuno- histo-fluo- resenssivärjäys Sparc-paneeliin.	10. Multi- plex-im- muno- histo- fluore- senssi- värjäyk- sen skan- naus	11. Multiplex-im- munohisto- fluoresenssi- värjäys Sparc- paneelille. Yksi värjäys- kierros ja kolme vasta- ainetta.	12. Multiplex- immuno- histofluo- resenssi- värjäyksen skannaus Sparc-paneelille.

### 6.3 DAB-värjäys

Tässä opinnäytetyössä käytettiin DAB-värjäystä oikean laimennussuhdealueen määrittämiseksi multiplex-immunohistofluoresenssivärjäystä varten, joita käytettiin Makrofagi-paneelissa sekä ylimääräisessä Sparc-paneelissa. DAB-värjäys tehtiin kaikille vasta-aineille, joista jokaiselle oli oma värjäyksensä. Ohjaava tutkija ja ohjaajani tarkastelivat DAB-värjäyksen onnistumista valomikroskoopilla ja päättivät sen perusteella laimennussuhteet, joita käytettiin multiplex-fluoresenssivärjäyspaneelissa.

Taulukko 2. DAB värjäyksessä käytetyt vasta-aineet, laimennossuhteet

Vasta-aine	DAB Laimennossuhde	Vasta-aine	DAB Laimennossuhde
R CD11c	1:2000	M CD68	1:200
R CD16	1:200	M CD45	1:200
R CD163	1:1000	M HLADR	1:5000
Pan Cytokeratin	1:500	M CD34	1:200
R FAP	1:1000	G Sparc	1:500
M CD206	1:1000		

### 6.4 CD206 vasta-aineen käyttöönottotestaus

Ohjaava tutkija halusi aloittaa CD206-antigeenia vastaan olevan vasta-aineen käyttöönottotestauksen makrofagi-paneelissa, koska se on makrofagin markkeri. Aloitimme tutkimalla artikkeleita, ja tietoa oli paljon saatavilla. CD206 on M2-makrofagin pinnalla oleva antigeeni, jota kutsutaan myös mannoosireseptoriksi. CD206:n esiintyminen kasvaimen liittyvissä makrofageissa tehostaa immuunivastetta (Jaynes ym. 2020). Lisäksi CD206 ilmenee akuutissa myeloisessa leukemiassa hyvin voimakkaasti verrattuna terveisiin kontrolliryhmiin (Xu ym. 2020). CD206:n käyttöönottotestaukseen käytettiin Human Protein Atlasin ja Abcamin sivulta saatuja laimennussuhdesuosituksia. Näistä paikoista tutkimusryhmä oli tilannut aiemminkin toimivia vasta-aineita. DAB-värjäys, jota käytettiin löytämään ja todentamaan oikea laimennossuhde alue Multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneeliin. Testattiin samassa värjäyksessä 1:500, 1:1000 ja 1:2500. Mouse CD206 oli värjäytynyt hyvin nielurisakudoksessa. Nielurisakudosleikettä, jota oli käytetty positiivisena kontrollina, käytettiin tässä DAB-värjäyksessä,

koska tiedettiin, että nielurisoissa oli paljon immuunisoluja. Myöhemmin multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelissa käytettiin myös TMA:ta, ja fluoresenssivärjäyksissä CD206:n lopullinen laimennussuhde oli 1:500.

Värjäysmenetelmän optimoinnissa pyritään löytämään kemiallinen saturaatio säätämällä reagenssin inkubaatioaika ja -konsentraatio oikeaksi. Kemiallisella saturaatiolla tarkoitetaan sitä, että kudoksen antigeenit on löydetty ja muunnettu niin sanotuksi yhdenvertaiseksi signaaliksi. Visuaalisella saturaatiolla taas tarkoitetaan, että tämä signaali muunnetaan vastaavasti kromogeenisiksi saostumiksi. Immunohistokemiassa halutaan voimakas värjäystulos, jolloin myös matala esiintyvyytaso voidaan havaita ilman taustavärjäytymistä. (Agilent Dako 2013.) Paneelissa käytettiin epäsuoraa immunofluoresenssivärjäysmenetelmää.

## 6.5 Multiplex IHC protokolla

Muokattu multiplex-IHC-protokolla, jota opinnäytetyössä käytettiin, on hieman helpommin luettavissa. Alkuperäinen värjäysprotokolla on liitteessä 2. Monikanavavärjäyksessä käytettiin värjäyskierroksia, ja tässä värjäyksessä niitä oli kolme. Ensin leikelasit käsiteltiin poistamalla parafiini, joka päättyi laskevaan alkoholisarjaan ja MilliQ-veteen. Leikelasit laitettiin Tissue Cleariin kolme kertaa viideksi minuutiksi. Sitten käytettiin 96 % alkoholia kaksi kertaa kahden minuutin ajan, 70 % alkoholia kahden minuutin ajan ja lopuksi Milli-Q-vettä kaksi kertaa kahden minuutin ajan.

Tämän jälkeen aloitettiin antigeenien paljastuksella, ja leikelasit laitettiin PT-moduuliin (10 mM Tris-1 mM EDTA-puskuri, jonka pH on 9). PT-moduuli lämmitettiin puskurin kanssa 99 asteessa kaksikymmentä minuuttia, mikä kesti yhteensä tunnin ja kymmenen minuuttia. Lasit pestiin viisi minuuttia Milli-Q-vedessä ja viisi minuuttia TBS-puskurissa. Tämän jälkeen lasit laitettiin peroksidisaasin estoon viideksi minuutiksi, joka sisälsi 0,9 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:ta ja TBS:ää. Inkuboitiin viisitoista minuuttia huoneenlämmössä. Lasit pestiin kaksi kertaa viiden minuutin ajan TBS:ssä ja kerran TBST:ssä. Peroxidaasiblokki estää epäspesifistä sitoutumista.

Ensimmäisellä värjäyskierroksella laitetaan primäärivasta-aineet. Aloitetaan laittamalla näytelaseille 300 µl 10 % vuohenseerumia eli NGS:ää, lasien täytyi peittyä kokonaan. NGS suojaa kudoksia ja pitää ne kosteina. Sitten laseja inkuboitiin viisitoista minuuttia huoneenlämmössä. Tein primäärivasta-aineseokset NGS:ään, pipetoitiin laseille 200 µl ja inkuboitiin yksi tunti huoneenlämmössä. Lasit pestiin TBS:ssä, taas niin kuin edellisessä vaiheessa.

Värjäyksen tehostussignaalit, jossa HRP katalysoi TSA:ta, jo voimistavat värjäys-signaalia. Pipetoitiin Bright Vision eli HRP:tä 200 µl laselle, laimennos oli 1:5. Inkuboitiin kolmekymmentä minuuttia huoneenlämmössä. Lasit pestiin jälleen TBS:ssä. TSA-reaktioon valmistettiin vetyperoksidia eli H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +100 µl TBST:tä eli puskuria Eppendorf-putkeen, joka tehtiin etukäteen. Pipetoitiin laselle 200 µl ja inkuboitiin viisitoista minuuttia huoneenlämmössä. Laseille tehtiin taas pesut niin kuin edellisissä vaiheissa. TSA-reaktio toistettiin, jos oli kaksi vasta-ainetta. Peitettiin ja skannattiin.

Toinen värjäyskierron aloitettiin samalla tavalla kuin ensimmäinen värjäyskierron, mutta jatkui pipetoimalla sekundaarivasta-aineet TBST:hen eli puskuriin suhteessa 1:300 ja inkuboitiin kolmekymmentäviisi minuuttia. Laseille tehtiin taas pesut. Sekundaarivasta-aineet Alexa Fluorit eli fluoresenssileimävärit. Sekundaarit pipetoitiin ja inkuboitiin neljäkymmentäviisi minuuttia huoneenlämmössä. Lasit pestiin jälleen. Lopuksi lasit peitettiin peitinlasilla ja skannattiin. Skannauksen jälkeen lasit laitettiin TBST:hen ja jääkaappiin yöksi, jotta voitiin aloittaa aamulla seuraava värjäyskierron. Kolmas värjäyskierron alkoi edellisten vasta-aineiden denaturoimisella ja jatkui samalla tavalla kuin toinen kierron.

Multiplex-immunohistofluoresenssivärjäys on pitkä protokolla, joka kestää vähintään 2–4 päivää. Värjäyskierrosten välissä värjätyt näytelasit skannataan fluoresenssimikroskoopilla, jotta nähdään esiintyvätkö solut tässä tapauksessa makrofagit multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelissa valituilla vasta-aineilla. Näin voidaan myös arvioida vasta-aineiden ja antigeenien affiniteetti värjäyksessä sekä tarkastella värireaktion voimakkuutta. Lisäksi voidaan tarkastella vasta-aineiden esiintymistä eri fluoresenssikanavilla ja eri kanavien värien intensiteettiä. Näitä tekijöitä tarkastelevat ohjaava tutkija ja ohjaajani.

Testattiin viittä multiplex-immunohistofluoresenssivärjäystä, joissa oli kolme värjäyskierron. Yhdessä multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelissa kesti neljä päivää ja jokaista yksittäistä vasta-ainetta värjättiin kolme kertaa. Vasta-aineita oli yksitoista, ja joitakin niistä testattiin eri fluoresenssikanavilla ja laimennussuhteilla. Opinäytetyössä käytettiin DAPI:a eli 4,6-diamidino-2-fenyyli-indoli, joka oli fluoresoiva nukleinihappoväri, ja sitä käytettiin tumien värjäämiseen. (News Medical life science 2023.) Taulukossa 3 esitetään värjäyskierrokset ja niissä käytetyt vasta-aineet. Taulukoon on merkitty myös primaarivasta-ainevärjäyksessä käytetty laimennussuhde sekä sekundaarivasta-aine. AF on lyhenne sanoista Alexa Fluor, jota käytettiin värjäyksessä. Luvut (488 (vihreä), 555 (oranssi), 647 (punainen), 750 (turkoosi)) kertovat millä valon aallonpituudella fluorokromi emittoi.

Taulukko 3. Lopullisesta Multiplex IHC Makrofagien - paneelissa käytetyt fluoresenssi-kanava, vasta-aineet, laimennossuhteet.

	Makrofagi paneeli		
Fluoresenssi-kanava ja signaalin väri	Vasta-aine	Laimennossuhde	REF & LOT
<b>Värjäyskierros 1</b>			
TSA 488 (Vihreä)	R CD11c	1:500	Abcam REF 52632 1 LOT GR3257921
TSA555 (Oranssi)	M-a-CD206	1:500	Protein tech REF60143-1-Ig LOT10017692
AF647 (Punainen)	R-a-CD16	1:200	Abcam REF 183354 LOT GR3279373
AF750 (Turkoosi)	M-a-CD68	1:500	CM REF 168M-94 LOT 000121943
	skannaus 1		
<b>Värjäyskierros 2</b>			
AF647(Punainen)	M-a-CD45	1:100	Dako REF M0701 LOT 20053425
AF750(Turkoosi)	R-a-CD163	1:200	Abcam REF188571 LOTG12234922-5
	skannus 2		
<b>Värjäyskierros 3</b>			
AF647(Punainen)	M-a-HLADR	1:5000	Abcam REF 20181 LOT GR3178265-1
AF750(Turkoosi)	Rabbit anti Pan Epi R-a-Ecadherin R-a-panCytokeratin;	1:200	CST REF 3195 LOT 15 Abcam REF 9377 LOT GR-337999-4

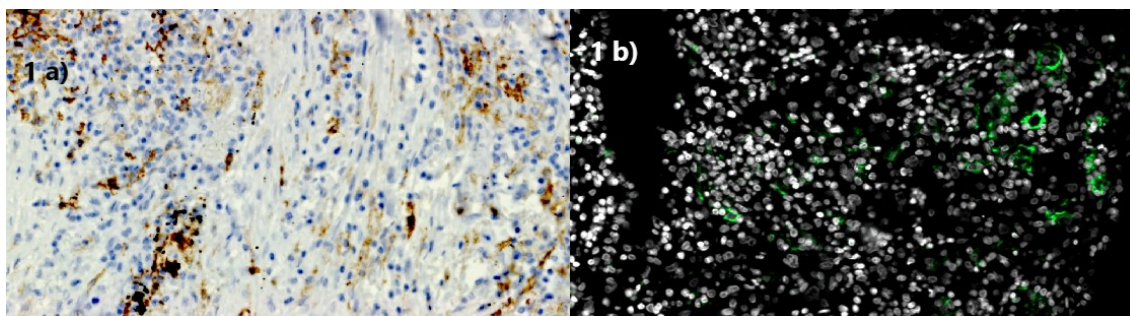
Värjäysprotokollan mukaan jokaisen kierroksen jälkeen näytelasit skannattiin fluoresenssimikroskoopilla, jossa voitiin tarkastella värjäyksen onnistumista ja makrofagien esiintyvyyttä. Skannerissa säädettiin eri fluoresenssikanavien valotusaikoja. Käytössä oli 488, 555, 647 ja 750 fluoresenssikanavat.

## 7 Opinnäytetyön tulokset

Opinnäytetyössä värjättiin kudosleikkeitä immunohistofluoresenssiväreillä ja käytettiin multiplex- tekniikkaa, jossa vasta-aineet tunnistavat eri proteiineja makrofagien pinnalta. Multiplex - immunohistofluoresenssivärjäyspaneelissa oli kolme kierrosta, joissa noudatettiin FIMMi:ssä validoitua IHC protokollaa, värjäyksiä tehtiin viisi. Värjäyskierroksien välissä värjätyt näytelasit skannattiin histoskannerilla fluoresenssimikroskooppia käyttäen ja tuloksia tarkasteltiin yhdessä ohjaavan tutkijan ja laboratoriokoordinaattorin eli ohjaajani kanssa. Samat näytelasit värjättiin uudestaan tämän jälkeen. Ennen uutta kierrosta näytelaseista denaturoitiin edelliset vasta-aineet pois, etteivät ne näkyisi seuraavalla kierroksella ja antaisi väärää signaalia.

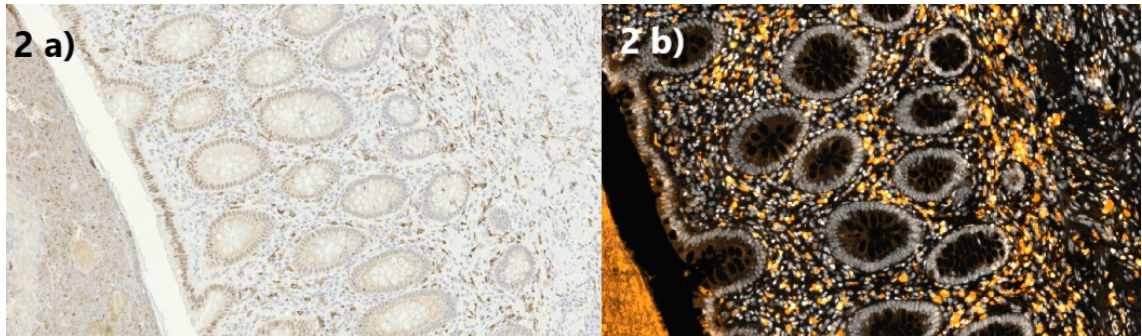
### 7.1 DAB - ja - fluoresenssikuvat

Alla olevissa kuvissa on kudos, vasta-aine, laimennossuhde ja fluoresenssikanava, jota on käytetty fluorisenssivärjäyksessä. DAB- värjäyksen kudos, vasta-aine, laimennossuhde. Tämä kuvien alla oleva järjestys on sama kuin makrofagien multiplex - värjäyspaneelissa. Kuvissa on viimeisenä myös ylimääräisen Spar -paneeliin tulokset.



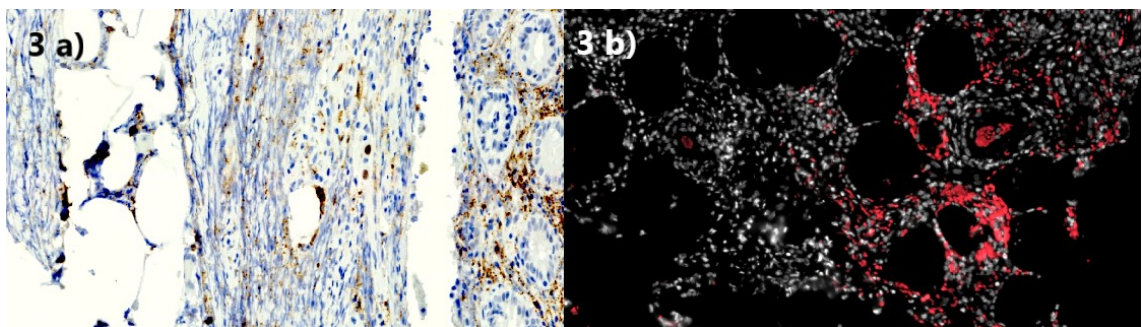
Kuva 1 a) CD11c, DAB värjäys, laimennossuhde 1:2000, kudos munasarja. Kuva 1 b) CD11c, fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:1000 kudos munasarja.

Kuva 1 a) CD11c vasta-aine, DAB värjäys ja laimennossuhde oli 1:2000. Kuvassa 1 b) fluoresenssivärjäyksessä laimennossuhde oli 1:1000, kudoksena munasarja. Fluoresenssikanava 488 eli vihreä signaali. Rabbit CD11c värjäys tulos oli onnistunut, vaikka DAB värjäyksessä eri laimennossuhde onkin. Fluorisenssivärjäyksiä tehtiin poikkeuksellisesti viisi kertaa Cd11 c:lle, ennen kuin päädyttiin tähän laimennussuhteeseen. Alun perin testattiin Mouse CD11c, josta ei tullut vahvaa signaalia. Rabbit CD11c sen sijaan toimi hyvin värjäyksissä alusta lähtien. CD11c oli hyvä makrofagi positiivinen.



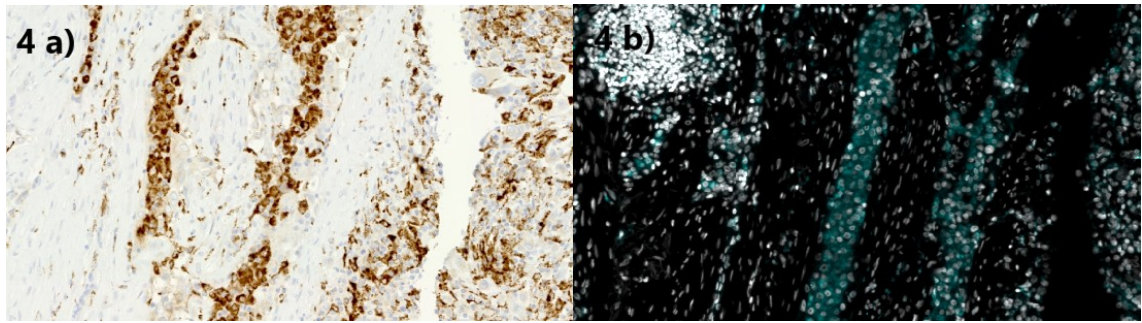
Kuva 2 a) CD206 DAB värjäys, laimennossuhde 1:1000, kudoks paksusuoli. Kuva 2 b) CD206, fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:500 kudoks paksusuoli.

Kuvassa 2 a) Vasta-aine CD206 DAB värjäys ja laimennossuhde oli 1: 500. Kuvassa b) fluoresenssivärjäyksessä oli laimennossuhde 1:500 kudoksena paksusuoli, fluoresenssikanava 555, oranssi signaali. Laimennossuhteet toimivat DAB:in kanssa. CD206 toimi hyvin alusta lähtien ja sen käyttöönotto testaus onnistui hyvin kaikissa testi värjäyksissä. Parhaiten CD206 toimi 555 kanavalla vaikka valotus oli suhteellisen korkea.



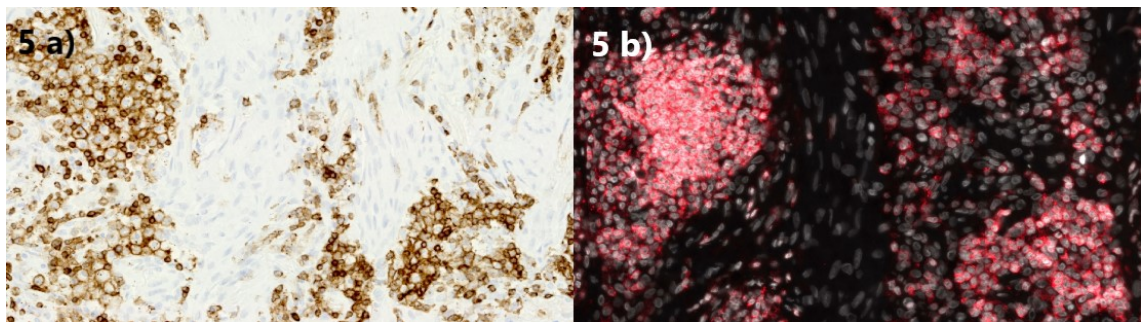
Kuva 3 a) CD16 DAB värjäys, laimennossuhde 1:200 kudoks umpilisäke. Kuva 3 b) CD16, fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:200 kudoks umpilisäke ja fluoresenssikanava 647, punainen signaali.

Kuvassa 3 a) Vasta-aine CD16 DAB värjäys ja laimennossuhde 1:200. Hyvin värjäytynyt. Kuva 3 b) Vasta-aine CD16 fluoresenssivärjäyksessä oli laimennossuhde 1:200 kudoksena umpilisäke. Fluoresenssikanava 647 (punainen). Vahva signaali ja hyvä tumavärjäys, jossa näkyy spesifi sitoutumiseni. Lopulliseen paneeliin valittiin 657, jossa signaali oli vahvin.



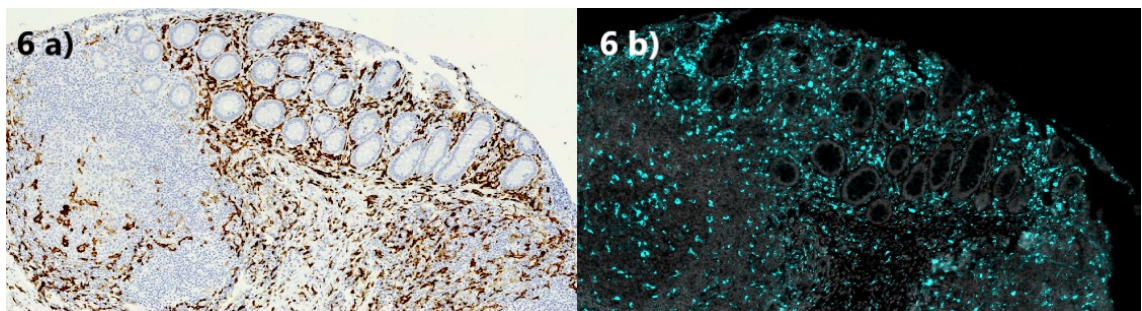
Kuva 4 a) CD68 DAB värjäys, laimennossuhde 1:200 kudokse keuhko. Kuva 4 b) CD68, fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:500 kudokse keuhko ja fluoresenssikanava 750, turkoosi.

Kuvassa 4 a) Vasta-aine CD68 DAB värjäys ja laimennossuhde 1:200. Värjäys onnistunut, vahva DAB. Kuva 4 b) CD68, fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:500 kudokse keuhko. CD68 värin intensiteetti on vahva ja tumat näkyvät hyvin. Mouse CD68 toimi hyvin ja hyvä värjäys tulos.



Kuva 5 a) CD45 DAB värjäys, laimennossuhde 1:200 kudokse keuhko. Kuva 5 b) CD45, fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:100 kudokse keuhko ja fluoresenssikanava 647, punainen.

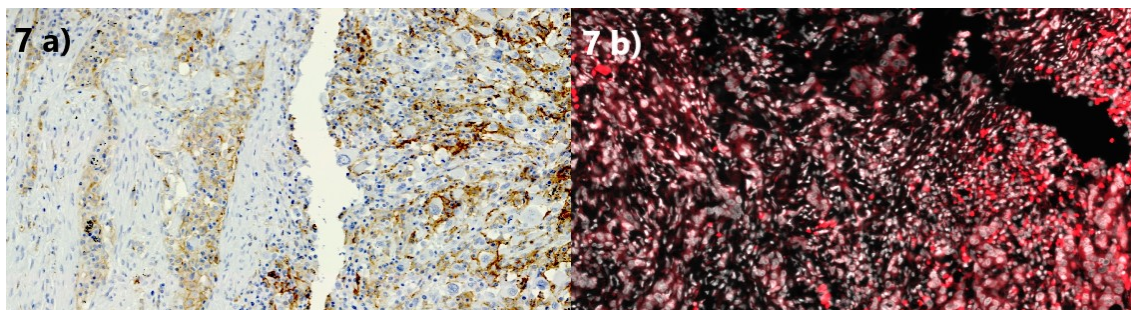
Kuvassa 5 a) vasta-aine CD45 DAB värjäys ja laimennossuhde 1:200. DAB värjäys onnistunut. Kuva 5 b) fluoresenssivärjäyksessä oli laimennossuhde 1:100 kudokse keuhko. Kuvassa 5 a ja 5 b CD45 molemmissa vahvat signaalit. Tässä voi hyvin tarkastella selkeää selkeitä tumia ja kuinka punainen (647) signaali näkyy spesifisenä värjäytymisenä.



Kuva 6 a) CD163 DAB värjäys, laimennossuhde 1:1000 kudokse umpilisäke. Kuva 6 b) CD163, fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:200 kudokse umpilisäke ja fluoresenssikanava 750, turkoosi.

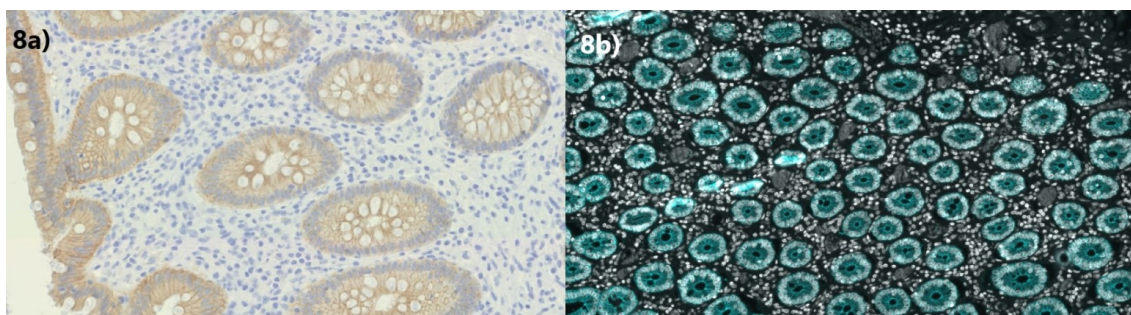


Kuvassa 6 a) Vasta-aine CD163 DAB värjäys ja laimennossuhde oli 1:1000 DAB näkyy vahvasti. Kuva 6 b) Vasta-aine CD163 fluoresenssivärjäyksessä oli laimennossuhde 1:200, kudoksena umpilisäke. CD163 onnistunut, joka toimi hyvin värjäyksissä samalla laimennoksella ja samalla kanavalla 750 joka kerta.



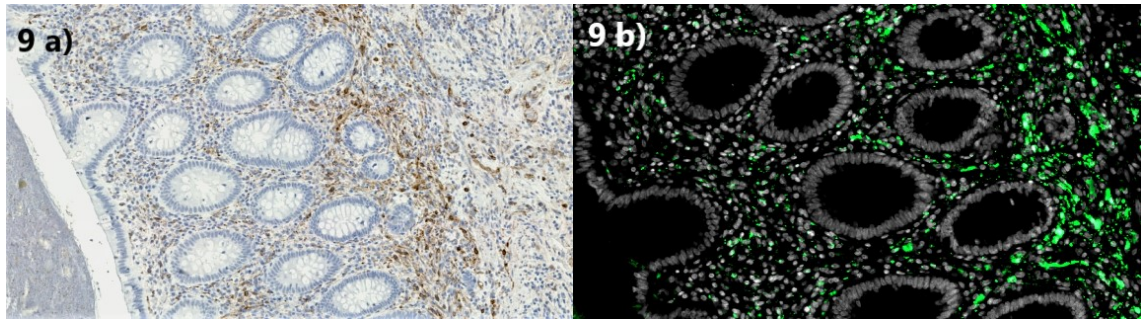
Kuva 7 a) HLADR DAB värjäys, laimennossuhde 1:5000, kudoksena imusolmuke. Kuva 7 b) HLADR, fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:5000, kudoksena imusolmuke ja fluoresenssikanava 647, punainen.

Kuvassa 7 a) vasta-aine HLADR DAB värjäyksessä oli laimennossuhde 1:5000, HLADR oli toiminut hyvin tällä laimennoksella. Kuva 7 b) HLADR, fluoresenssivärjäyksessä oli laimennossuhde 1:5000 ja kudoksena imusolmuke. HLADR laimennossuhde oli aina sama DAB värjäyksestä lähtien, joka toimi hyvin kanavalla 647, hyvä ja vahva värin intensiteetti.



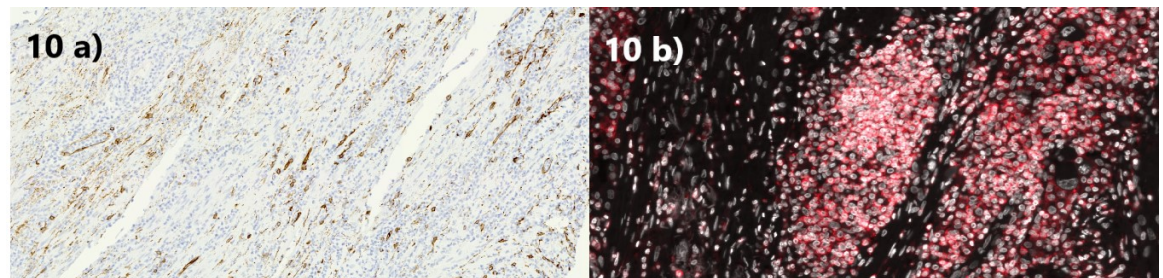
Kuva 8 a) PanEpi DAB värjäys, laimennossuhde 1:500, kudoksena paksusuoli. Kuva 8 b) PanEpi, fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:200 kudoksena paksusuoli, fluoresenssikanava 750, turkoosi.

Kuvassa 8 a) Vasta-aine PanEpi DAB värjäys ja laimennossuhde oli 1:500 on hieman haalea mutta näkyy hyvin. Kuva 8 b) Vasta-aine PanEpi, fluoresenssivärjäyksessä laimennossuhde oli 1:200 kudoksena paksusuoli. PanEpi laimennossuhde oli DAB värjäyksessä 1:500 ja fluoresenssissa 1:200 ja se toimi hyvin, hieman vahvempana laimennoksena. Vahva signaali, PanEpi toimi hyvin joka kerta fluoresenssikanavalla 750.



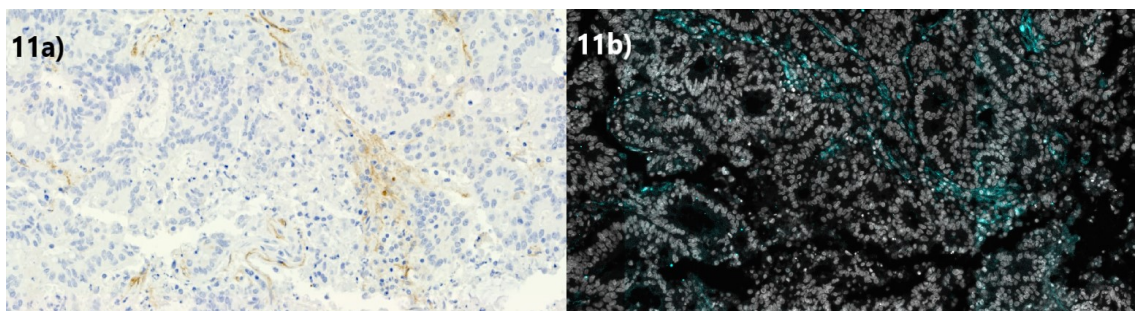
Kuva 9 a) Sparc DAB värjäys, laimennossuhde 1:500, kudoks paksusuoli. Kuva 9 b) Sparc fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:500, kudoks paksusuoli ja fluoresenssikanava 488, vihreä signaali.

Kuvassa 9 a) Vasta-aine Sparc DAB värjäyksessä oli laimennossuhde 1:500. DAB näkyi selkeästi kudoksen rakenteessa. Kuva 9 b) Sparc fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:500, kudoks paksusuoli. Sparc paneelissa käytetty, Sparc toimi hyvin ja laimennossuhde oli sama 1:500 molemmissa värjäyksissä. Selkeä myös fluoresenssikuvassa ja hyvin värjäytynyt.



Kuva 10 a) CD34 DAB värjäys, laimennossuhde 1:200, kudoks keuhko. Kuva 10 b) CD34 fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:200, kudoks keuhko ja fluoresenssikanava 647, punainen signaali.

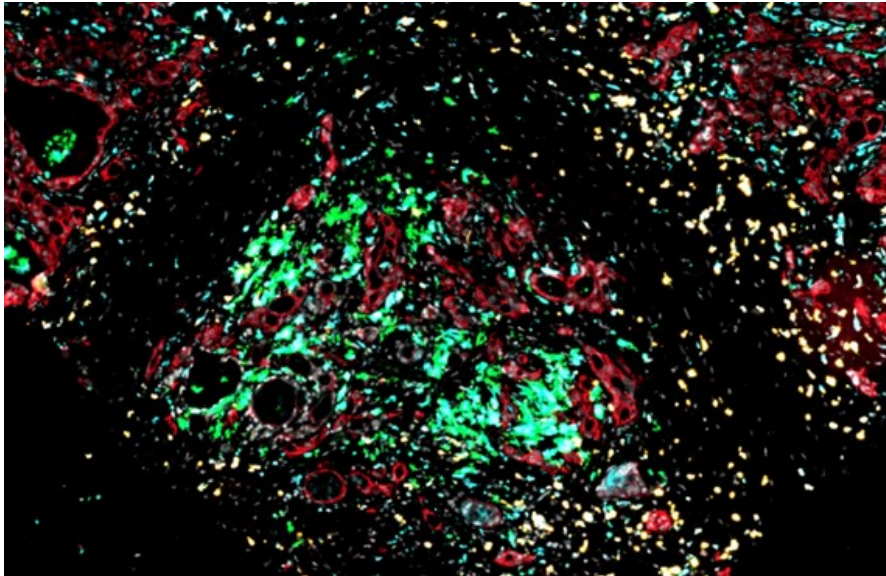
Kuvassa 10 a) Vasta-aine CD34 DAB värjäyksessä laimennossuhde oli 1:200, DAB värjäys hyvä. Kuva 10 b) CD34 fluoresenssivärjäyksessä laimennossuhde oli 1:200, kudoksena keuhko. Spac paneelin CD34 värjäys toiminut hyvin ja tumavärjäys selkeä.



Kuva 11 a) FAP DAB- värjäys, laimennossuhde 1:1000, kudoks umpilisäke. Kuva 11 b) FAP fluoresenssivärjäys, laimennossuhde 1:1000, kudoks umpilisäke ja fluoresenssikanava 750, turkoosi signaali.

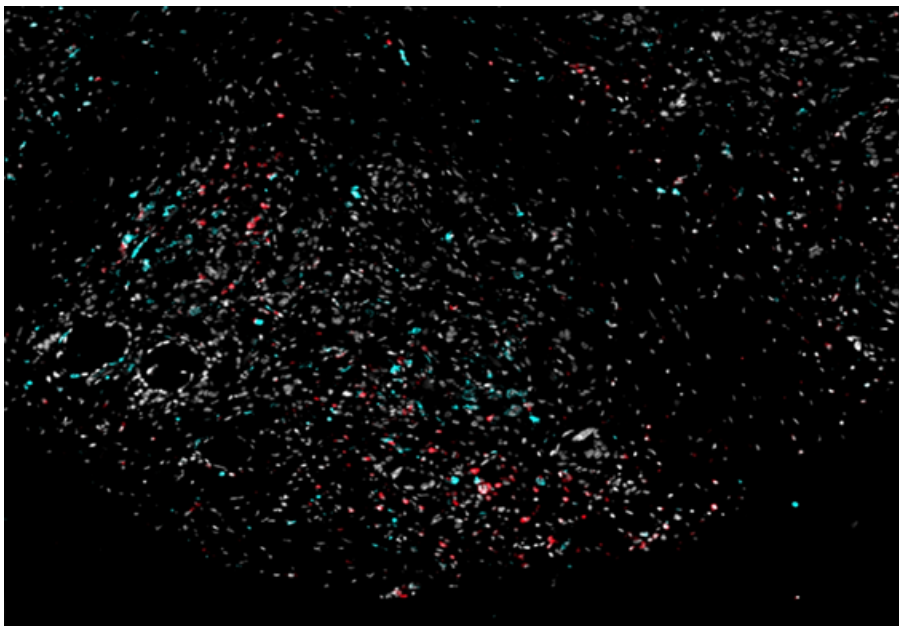
Kuvassa 11 a) Vasta-aine FAP DAB värjäyksessä laimennossuhde oli 1:1000, DAB yleisesti hieman haaleampi väri, mutta on selkeä. Kuva 11 b) FAP fluoresenssivärjäyksessä laimennossuhde oli 1:1000 ja kudoksena umpilisäke. Sparc, paneelin Rabbit FAB:illa vahva signaali. DAPI vahva tumissa ja selkeä värjäytyminen turkoosilla, 750 fluoresenssikanavalla.

## 7.2 Makrofagien immunofluoresenssimultiplex-värjäyspaneelinkuvat



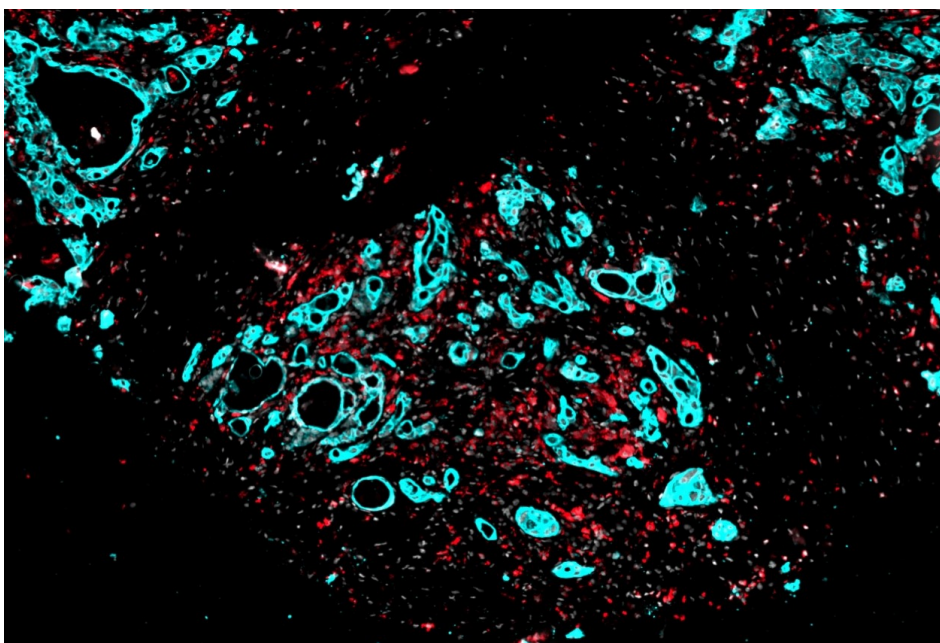
Kuva 12 Makrofagi multiplex- värjäyspaneelin kierros 1, kaikki fluoresenssikanavat näkyvissä eli 488 (vihreä), 555 (oranssi), 647 (punainen) ja 750 (turkoosi). Haimakudos kuvassa.

Tässä ensimmäinen värjäyskierros Makrofagi multiplex- värjäyspaneelistä, jossa nähdään vihreällä 488 fluoresenssikanavalla R CD11 c. R CD 11 c:n väri signaali voimakas. RCd11c on mukana tulehdusreaktioissa. Oransilla fluoresenssikanavalla 555 M CD206 on onnistunut ja spesifi. Punainen fluoresenssikanavalla 647, R CD16 on hieman värjäytynyt tumien ympärille. CD16 on mukana solu aktivaatioissa. Turkoosi fluoresenssikanavalla 750 M CD68 on onnistunut hyvin. CD 68 spesifinen markkeri kasvaimen liittyville M1 makrofageille (TAM), samoin kuin CD206, joka tosin on M2 TAM:i



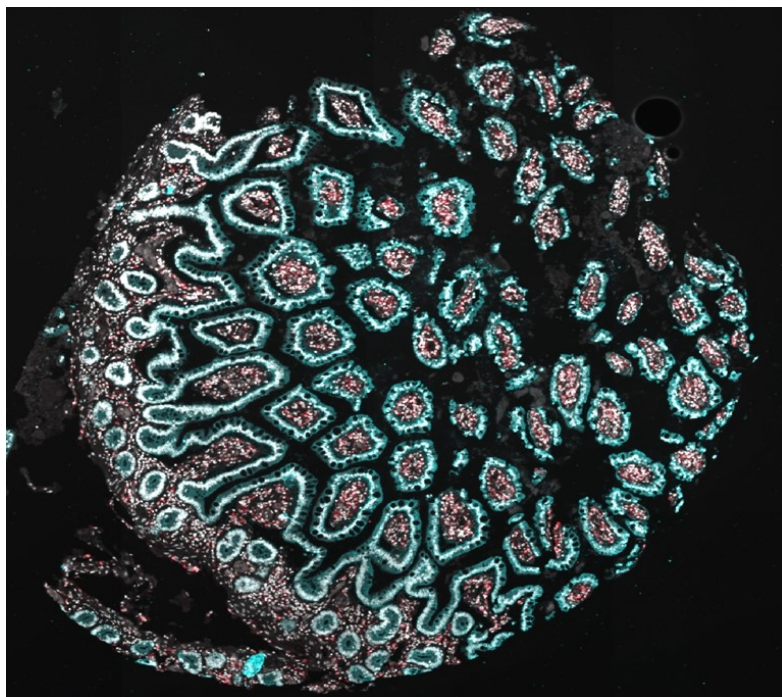
Kuva 13 Makrofagi multiplex – värjäyspaneelin kierros 2, fluoresenssikanavat 647 (punainen) ja 750 (turkoosi). Haimakudos on kuvassa.

Tässä toinen värjäyskierros Makrofagi multiplex- värjäyspaneelistä, punaisella fluoresenssikanavalla 647, M CD45 on onnistunut värjäytyminen. CD45 antigeeni on mukana solu aktivaatioissa. Turkoosilla fluoresenssikanavalla 750, R CD163 ilmentyi hyvin ja tumat näkyvät selkeästi. CD163 voi olla vahva indikaattori huonosta ennusteesta.



kuva 14 Makrofagi multiplex – värjäyspaneelin kierros 3. multiplex - immunohistofluoresenssivärjäyspaneelin fluoresenssikanavat 647 (punainen) ja 750 (turkoosi). Haima kudos kuvassa.

Tässä kolmas värjäyskierron Makrofagi multiplex- immunohistofluoresenssivärjäyspaneelistä, jossa nähdään punainen fluoresenssikanavalla 647, M HLADR. HLADR:ssä oli vahva värjäys ja kudoksen morfologia näkyy hienosti. HLADR on mukana immuunivasteen käynnistämisessä. Turkoosi fluoresenssikanavalla 750, R PanEpi näyttää hienolta ja osittain yhtenäinen, hieman rihmamainen värjäytyminen tumien ympärille. PanEpi esiintyy epiteelisoluissa.



Kuva 15 Sparc multiplex – värjäyspaneeli, värjäyskierron 1. Kaikki fluoresenssikanavat näkyvissä eli 488 (vihreä), 555 (oranssi), 647 (punainen) ja 750 (turkoosi). Kudos umpilisäke.

Tässä Sparc-multiplex-paneelin ensimmäisessä värjäyskierröksessä olivat mukana kaikki neljä kanavaa, jotka näkyivät hyvin erikseen. Välillä solut voivat ilmentyä samoissa kohdissa esimerkiksi, jos on sama solulinja. Siksi antigeenien ilmentyminen näkyy parhaiten erikseen tarkasteltuna. G Sparc oli vihreällä 488 fluoresenssikanavalla, hyvin onnistunut. Sparc esiintyy stroomasoluissa ja säätelee solujen kasvua. Oranssilla 555 fluoresenssikanavalla oli MCD206, jota käytettiin myös makrofagivärjäyspaneelissa. Punaisella 647 fluoresenssikanavalla oli R CD16, joka kyllä värjäytyi mutta signaali ei ollut vahva. Turkoosilla 750 fluoresenssikanavalla oli CD68, joka oli hyvin värjäytynyt.

Toisessa värjäyskierröksessä punaisella 647 fluoresenssikanavalla oli M CD34, joka onnistui hyvin. Turkoosilla 750 fluoresenssikanavalla oli R FAP. FAP näytti hienolta ja

oli hieman kuutiomaisesti värjäytynyt. Kolmannessa värjäyskierroksessa punaisella 647 fluoresenssikanavalla oli M HLADR. Turkoosilla 750 fluoresenssikanavalla oli R PanEpi. HLADR ja PanEpi olivat onnistuneesti värjäytyneet.

### 7.3 Yhteenveto

Ohjaava tutkija ja ohjaajani ovat tarkastelleet kaikki immunofluoresenssikuvat makrofagien esiintyvyydestä syöpäkudoksessa ja arvioineet vasta-ainevärjäysten toimivuutta makrofagien antigeeneissä. Kaikki kuvat olivat skannattu Zeiss Axio Scan Z.1 skannerilla. Valotusajat, joita käytettiin fluoresenssikuvissa, 488 fluoresenssikanavalla 2 millisekuntia, 555 fluoresenssikanavalla 10 millisekuntia, 647 fluoresenssikanavalla 50 millisekuntia ja 750 fluoresenssikanavalla 400 millisekuntia.

CD206 vasta-aineen käyttöönotto testaus onnistui hyvin alusta lähtien, se toimi tasaisesti kaikissa testi värjäyksissä samalla kanavalla ja laimennoksella 1:500. CD206 toimi hyvin myös kromogeenisessä DAB väräyksessä laimennosvälin määrittämisessä, kokeiltiin kolmea eri laimennossuhdetta 1:1000, 1:500 ja 1:50. DAB väräyksessä päätettiin 1:1000 ja fluoresenssivärjäyksessä paras laimennossuhde oli 1:500.

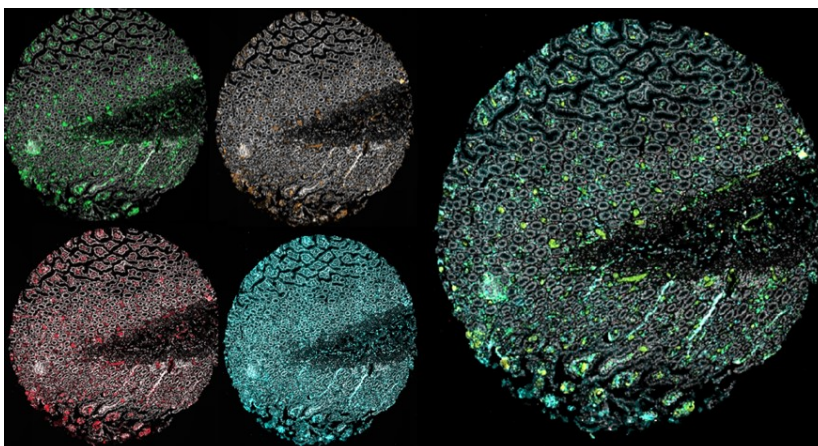
Yhteenvetona voi huomata, että DAB ja fluoresenssivärjäysten laimennossuhteiden välillä oli vaihtelevuutta, molemmissa värjäyspaneelissa. Nämä värjäys tulokset todentavat sitä, kuinka tärkeää vasta-aineita oli testata. Tuloksista selviää myös kuinka herkkä värjäysmenetelmä immunofluoresenssi oli. Kuvista voidaan myös havaita eroja värisignaalien vahvuuksissa, vaikka ne ovatkin spesifisti sitoutuneita. Paljon eroavaisuuksia oli makrofagien esiintymisessä eri kudoksissa, johtuen kudosten morfologiasta ja antigeenien sijannista. Yhteenvetona voidaan todeta, että makrofagit ilmentyivät hyvin antigeeneissä käytetyillä vasta-aineilla multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelissa.

## 8 Pohdinta

### 8.1 Tulosten tarkastelu

Tulosten tarkastelussa makrofagit ilmentyivät hyvin antigeeneissä käytetyillä vasta-aineilla, multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksissä. Voidaan todeta, että laimennossuhteet olivat oikeat ja multiplex IHC-protokollaa noudatettiin onnistuneesti. Käytetyt

reagenssit olivat käyttökelpoisia ja niitä oli säilytetty asianmukaisissa lämpötiloissa. Joidenkin kuvien kohdalla valotusajan muuttaminen paransi kuvan laatua ja auttoi erottamaan spesifisti sitoutuneet vasta-aineet kuvista. Valotusajan muuttaminen auttoi erottamaan, mikä oli mahdollista taustaa. Kuvia voidaan tarkastella eri fluoresenssikanavilla erikseen tai kaikkia samaan aikaan. Tarkastelemalla yhtä kanavaa kerrallaan auttoi erottamaan värjäyksen spesifisen sitoutumisen, signaalin vahvuuden ja myös värin intensiteetin tarkastelussa. Alla olevassa kuvassa esimerkki fluoresenssikanavista erikseen.



Kuva 16. Tässä kaikki neljä fluoresenssikanavaa erikseen kuvan vasemmalla puolella (488 vihreä, 555 oranssi, 647 punainen ja 750 turkoosi) ja kuvan oikealla puolella kaikki kanavat yhdessä.

DAPI värjää solun tumman valkoisella värillä fluoresenssivärjäyksissä. Erottamalla solujen tummat hyvin värjäyksessä auttoi myös erottamaan värjäyksen oikeaksi eli spesifiseksi. Kuvien etäisyyksiä voitiin helposti säädellä edestakaisin tarkastelun helpottamiseksi. Tärkeää on, ettei skannauksessa fluoresenssikanavilla käytetty valotus ole niin voimakas, ettei se ylivalota kuvaa. Eikä valotuksen tule myöskään mennä toiselle kanavalle, jottei se häiritse signaalien tulkintaa. Siksi usein kuvien tarkastelussa katsotaan kanava kerrallaan ja vertaillaan vasta-aineiden esiintymistä ja värin intensiteettiä yksi kerrallaan sekä tarkastellaan tumman värjäytymistä. Usein verrataan, mihin fluoresenssikanavan värjäys kohdistuu tumassa ja ilmentyykö värjäys spesifisti. Tuman värjäys auttaa hahmottamaan muut värireaktiot kudoksessa. Kudoksen morfologiat voivat poiketa paljon toisistaan ja sen seurauksen makrofagit ilmentyvät eritavoilla eri kudoksissa.

Kaiken kaikkiaan Makrofagi-paneeli onnistui hyvin, ja käytetyt vasta-aineet ilmentyivät makrofagien pinnalla olevissa antigeeneissa. Ohjaava tutkija aikoi käyttää käyttänyt

Makrofagi-multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelissa saatuja tuloksia kasvaindiagnoosissa omista syöpätutkimuksissaan. Olen ymmärtänyt, että Makrofagi-paneelista oli tullut paljon kyselyjä jo, ja siitä oltiin kiinnostuneita. Toivottavasti Makrofagi-multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelia voidaan käyttää myös tulevaisuudessa ja siitä on apua uusien makrofagipaneelien luomisessa sekä kasvaindiagnoosissa.

## 8.2 Luotettavuus

Yleisesti immunohistokemian laboratorioiden laadunvarmistuksesta pidetään huolta käyttämällä vakioitua kudosprosessointia, vasta-aineita ja värjäysprotokollaa sekä vakioidujen kontrollien käyttöä ja löydösten varmistamista esimerkiksi kuva-analyysin avulla. Nämä edellä mainitut asiat parantavat tulosten toistettavuutta ja luotettavuutta. (Mäkinen 2021.)

Vasta-aineen validointi on prosessi, jossa määritetään spesifisten laboratoriotutkimusten avulla, että analyysimenetelmän ominaisuudet vastaavat vasta-aineiden käyttämistä aiotussa menetelmässä. Vasta-aineiden on osoitettava olevansa toistettavia ja spesifisiä siinä kontekstissa, johon niitä käytetään. Immunohistokemiassa standardisointi voi olla haastavaa johtuen monista preanalyttisistä ja analyttisistä tekijöistä, joiden tiedetään vaikuttavan värjäytymiseen FFPE-kudoksessa. Nämä voivat sisältää erilaisia inkubaatioaikoja, eroja käytetyissä fiksaatioissa ja erilaisia kudokäsittelyjä, jotka voivat kaikki vaikuttaa kudoksen antigeenisyyteen. Lisäksi vasta-aineen kloonin laimennussuhde, antigeenin paljastus ja käytetty menetelmä voivat vaikuttaa antigeenisyyteen. (Bordeaux ym. 2010.)

Biomarkkerien tarkan havaitsemisen IHC:llä vaatii hyvin spesifisiä ja tarkasti validoituja vasta-ainereagensseja. Esimerkiksi kaupallinen vasta-aineiden tuottaja Cell Signaling noudattaa vasta-aineiden validoinnissa Hallmarks of Antibody Validation -kriteereitä, joissa pidetään huolta vasta-aineiden spesifisyydestä ja herkkyiden vahvistamisesta kudostäytöksissä. Biomarkkereiden vasta-aineet validoidaan IHC:ssä luotettavasti käyttämällä FFPE-kudoksia, joiden tarkat osoitustasot tunnetaan antigeenin spesifisyyden varmistamiseksi. Ihmisen syöpäkudoksia käytetään osoittamaan vasta-aineiden spesifisyyttä. Erätestauksella varmistetaan tarkkojen IHC-tulosten edellyttämä toistettavuus, jossa laimennukset ja protokollat on tarkasti määritetty. Lisäksi käytetään kontrollireagensseja. (Cell Signaling 2023.)



Opinnäytetyössäni tehtiin jokaiselle vasta-aineelle kolme testivärjäystä viiden multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksen aikana, joissa oli kolme kierrosta tulosten toistettavuuden ja luotettavuuden varmistamiseksi. Multiplex-immunofluoresenssivärjäysmenetelmä on hyvin herkkä värjäysmenetelmä, ja pipetointi on isossa roolissa, varsinkin kun pipetoidaan yhtä mikrolitraa. Jos pipetointitekniikka on väärä, voi epähuomiossa pipetoida kaksi mikrolitraa, ja tällöin värjäystulos ei ole oikea. Laimennuksia säädettiin ja kokeiltiin eri fluoresenssikanavia eri valotusajalla. Protokollaa noudatettiin pilkulleen, ja REF- ja LOT-tiedoista pidettiin tarkkaa kirjaa. Jokainen DAB- ja multiplex-immunohistofluoresenssivärjäys kirjattiin erikseen kaikkine tietoineen opiskelijalaboratoriopäiväkirjaan, joka oli hyödyllinen. Laboratoriopäiväkirjasta pystyi tarkistamaan asioita tarvittaessa, ja tiedot säilyvät siellä aina.

Digitaalisen mikroskopian ja molekyylipatologian yksiköllä oli kokemusta Makrofagi-paneelissa käytetyistä vasta-aineista. Ohjaajani ja ohjaava tutkija olivat kokeneita multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksessä, mikä helpotti paneelin luontia. Vaikka jokainen värjäyspaneeli onkin oma kokonaisuutensa, pitkä kokemus tulosten tulkinnassa yhdistettynä kaupallisten tuotteiden tietoon, joista vasta-aineita oli saatavilla, oli suurena apuna. Kaupallisten tuotteiden sivustoilta saatiin paljon tietoa vasta-aineista, joita kudoksissa oli käytetty, sekä referenssikuvia siitä, miltä niiden pitäisi näyttää. Lisäksi oli olemassa suosituksia vasta-aineiden laimennossuhteista ja protokollia, joiden avulla saatiin paras mahdollinen tulos. Ennen kaikkea oli tärkeää tietää vasta-aineiden yleisestä käytettävyydestä immunohistokemiassa. Tietoa oli paljon saatavilla artikkeleista, mutta tarvittaessa oli mahdollista konsultoida patologiaa. Usein kuitenkin tutkijat olivat parhaita asiantuntijoita, jotka pystyivät luotettavasti tulkitsemaan multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksiä. Kuvien luotettavuuden varmistamiseksi tulosten tarkistamisessa käytettiin kahta asiantuntijaa, tässä tapauksessa ohjaavaa tutkijaa ja ohjaajaa. Immunohistokemia oli subjektiivista diagnosoinnin suhteen, koska tuloksia ei voinut määrittää matemaattisesti numeroilla. Tuloksia tulkittiin visuaalisilla kriteereillä, joissa huomioitiin mahdolliset vaikuttajat, kuten kudoksen morfologia, antigeenien sijainti kudoksessa, inkubointiaika, käytetyt reagenssit, lämpötilat, valotusaika, käytetyt välineet ja menetelmät (protokollat) sekä fluoresenssikanavat. Värjäyksessä solut joko näkyivät tai eivät näkyneet. Kokemuksen omaava tutkija näki värjäyksen erot ja osasi erotella spesifisen sitoutumisen.

### 8.3 Eettisyys

Tiedeyhteisössä noudatettiin tutkimustyössä tarkkuutta, huolellisuutta ja rehellisyyttä kaikessa työskentelyssä, myös tutkimustulosten tallentamisessa, arvioimisessa ja esittämisessä. Eettisesti kestävää soveltamista käytettiin tiedon hankinnassa ja tutkimusmenetelmissä. Viestinnän vastuullisuutta ja avoimuutta noudatetaan tutkimustulosten julkaisemisessa (Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2019).

Bioanalyttikoiden eettisissä periaatteissa sanotaan: Potilaan oikeuksien kunnioittaminen ja hyvinvointi ovat ensisijaisena tavoitteena bioanalyttikon/laboratoriohoitajan toiminnassa ja kaikissa laboratoriotutkimusprosessin vaiheissa. Bioanalyttikon/laboratoriohoitajan velvollisuus on kehittää ja ylläpitää ammattitoimintansa edellyttämää osaamista ja oppia uusia, tieteellisesti todistettuja ja tutkittuja menetelmiä (Bioanalyttikon ja laboratoriohoitajan eettiset ohjeet 2017).

Opinnäytetyö tehtiin yhteistyössä Helsingin yliopiston alaisen Suomen molekyyliääketieteen instituutin (FIMM) digitaalisen mikroskopian ja molekyylipatologian yksikölle, jossa tekijä oli harjoittelussa FIMM:llä tammikuusta 2023 lähtien 10 viikon ajan. Tutkimuslupaa ei tarvittu, koska kaikki toiminta on avointa, eikä potilasainestoa ole. Työharjoittelusopimus tehtiin, johon luvan antoi FIMM:n johtaja.

### 8.4 Tulosten hyödyntäminen ja kehittämissuhteet

Värjäyspaneeleita voidaan käyttää erilaisiin tarkoituksiin apuna esimerkiksi syöpätutkimuksissa. Toivottavasti kasvaindiagnostiikassa, makrofagipaneelin multiplex-immunohistofluoresenssivärjäysmenetelmän tuloksia voitaisiin käyttää apuna TME:n tutkimuksessa, jossa on TAM makrofageja. Värjäyspaneeleissa voidaan optimoida vasta-aineita tutkijan kiinnostuksen ja tarpeiden mukaan, mikä helpottaa solujen tutkimista. Se antaa paljon tietoa laimennossuhteista ja tietoa vasta-aineiden toimivuudesta itsessään sekä kuinka ne toimivat käytetyssä protokollassa. Tutkija voi hyödyntää kasvaindiagnostiikassa yhtenä osana makrofagien ilmentymiseen optimoidun multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyspaneelin tuloksia. Ja fluoresenssikuvia on helppoa ja nopeaa vertailla ja tarkastella myöhemmin. Kuvien laatu säilyy ja niitä on helppo liikutella digitaalisessa maailmassa. Lisäksi multiplex - immunohistofluoresenssivärjäyspaneelin kuvat voidaan viedä kuva-analyysiin jossa, monen ohjelman avulla saadaan, tarkempaa dataa soluista. Kuva-analyysissä voidaan laskea erilaiset solut eri kudoksista sekä solu-

määrät ja määrittää solujen sijainti. Nämä eri menetelmät ja monet ohjelmat kuva-analyyssissä mahdollistavat solujen luokittelun niiden markkerien esiintyvyyden mukaan, jotka voidaan määrittellä tarkkoina lukuina.

## 8.5 Ammatillinen kasvu

Työympäristönä tutkimusmaailma oli erilainen kuin perinteisissä laboratorioissa, joihin olin aiemmin tottunut. FIMM:llä työharjoittelussa tein värjäyksiä, jotka kestivät usein koko päivän. Se oli erilaista kuin aiemmat kokemukseni, mutta kymmenen viikon aikana kehityin paljon sekä vanhojen, että uusien taitojen osalta. Esimerkiksi ajankäytön hallinta multiplex-immunohistofluoresenssi-protokollan tekemisessä parani ja pipetointi sekä laimennosten laskeminen sujuivat paremmin.

Työharjoittelu ja opinnäytetyön tekeminen tukivat toisiaan oppimisprosessissa, ja suurin oppiminen tapahtui multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksessä. Onnistuminen oli parasta ja skannauksen hetki oli aina jännittävä, sillä silloin sai nähdä oman kädenjäljen värjäyksissä ja mahdolliset virheet. Aloittaessani DAB-värjäyksillä ja siirryttyäni sitten multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksiin, aloin luottaa omaan pipetointiini, vaikka pienikin virhe saattoi pilata värjäyksen, varsinkin kun pipetointimäärät olivat usein vain yhden mikrolitran luokkaa.

FIMM oli täynnä kiinnostavia yksiköitä, jotka tekivät mielenkiintoisia tutkimuksia, ja tapasin myös asiakkaita ja kuulin heidän projekteistaan. Sain osallistua esimerkiksi asiakkaiden näytelasien skannauksen vaiheisiin. Multiplex-immunohistofluoresenssivärjäyksen oppiminen oli pitkä prosessi ja haastava, mutta onnistuminen kompensoi haastavuutta ja vähitellen oppiminen edistyi. Työharjoittelu oli antoisa kokemus, koska opin tekemään jotain täysin uutta ja kehityin ammatillisesti bioanalytikkona tämän prosessin aikana

## Lähteet

Abcam 2021. a Adaptive immunity. <<https://www.abcam.com/research/immunology/adaptive-immunity> > Viitattu 23.2.2023

Abcam 2021. b Human CD markers chart. List and summary of all human CD antigens from CD1a to CD371. Verkkosivusto. <<https://www.abcam.com/primary-antibodies/human-cd-antigen-guide>> Viitattu 18.2.2023

Abcam 2023. a Understanding fluorophores. <<https://www.abcam.com/primary-antibodies/understanding-fluorophores> > Viitattu 28.2.2023

Abcam 2023. b Direct vs indirect immunofluorescence. Verkkosivusto. <<https://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence> > Viitattu 3.3.2023

Abcam 2023. c Studying hallmarks of cancer. Verkkosivusto. <<https://www.abcam.com/cancer/studying-hallmarks-of-cancer#Core%20hallmarks%20of%20cancer> > Viitattu 10.3.2023

Agilent Dako 2013. Immunohistochemical staining methods. Education Guide. Sixth Edition; Chapter 5. Staining Protocol Optimization. (s.64.) <[https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002\\_ihc\\_staining\\_methods.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf)> Viitattu 16.3.2023

Auria Biopankki 2019. Auria biopankki palvelut. Näytteitä tutkimiseen. <https://www.auria.fi/biopankki/palvelut/> > Viitattu 27.3.2023

Bancroft, John D. & Layton, Christopher 2008. Tissue Microarray. Teoksessa Suvarna, S. Kim (toim.) & Layton, Christopher (toim.) Bancroft, John D. (toim.) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Wanda Grace-Jones: Elsevier. 527-531.

Bioanalyttikon, laboratoriohoitajan eettiset ohjeet 2017. Suomen Bioanalyttikkoliitto ry. <[https://www.bioanalyttikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaa-teet\\_FI\\_print\\_2017.pdf%3E](https://www.bioanalyttikkoliitto.fi/@Bin/659271/Eettiset+periaa-teet_FI_print_2017.pdf%3E)>. Viitattu 3.10.2022.

Biotium; Glowing products for science. Tyramide Signal Amplification. <<https://biotium.com/technology/primary-secondary-antibody-conjugates/tyramide-signal-amplification/>> Viitattu 8.3.2023

Bordeaux, Jennifer & Welsh, Allison W. & Agarwal, Seema & Killiam, Elizabeth & Baquero, Maria T. & Hanna, Jason A. & Anagnostou, Valsamo K. & Rimm, David L. 2010. Antibody validation. Biotechniques. 48 (3): 197–209. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3891910/>>. Viitattu 13.3.2023.

Blom, Sami & Paavolainen, Lassi & Bychkov, Dmitrii & Turkki, Riku & Mäki - Teeri Petra & Hemmes, Annabrita & Välimäki, Katja & Lundin, Johan & Kallioniemi, Olli & Pellinen, Teijo 2017. Systems pathology by multiplexed immunohistochemistry and wholeslide digital image analysis. *Scientific Reports*. 7: 15580. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5686230/>>. Viitattu 4.3.2023.

Brück, Oskar & Keränen, Mikko & Dufvs, Olli & Kreutzman, Anna & Mustjoki Satu 2016. T-solut ja syöpä - miksi tappajat uupuvat? *Lääketieteellinen aikakauskirja. Duodecim*. 132 (21). 198492. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo13382#s2>>. Viitattu 23.2.2023.

Carpen, Olli & Mäkinen, Markus & Arola, Johanna & Leivo, Ilmo & Paavonen, Timo & Ristimäki, Ari & Sironen, Reijo 2021. *Biopankkitoiminta Suomessa. Teoksessa (toim.). Patologia. E-kirja. Kustannus Oy Duodecim*.

Cell signalling 2023. Home. About Us. Our Approach Process. Antibody Validation for Immunohistochemistry. <<https://www.cellsignal.com/about-us/our-approach>> Viitattu 18.3.2023

Eldridge, Lynne 2022. Types and Function of White Blood Cells. (WBCs). Blood disorders. *Verywell Health*. <<https://www.verywellhealth.com/understanding-white-blood-cells-and-counts-2249217>>. Viitattu 22.2.2023.

Ibidi a 2023. Ibidi cells in focus. Home. Applications. Cell Culture and Imaging. Immunofluorescence. Immunofluorescence Staining: A Typical Workflow 2023. <<https://ibidi.com/content/365-immunofluorescence-staining-a-typical-workflow>> Viitattu.8.3.2023

Ibidi b 2023. Home Applications Cell Culture and Imaging. Immunofluorescence the Principle of Immunofluorescence Assays 2023. The Principle of Immunofluorescence Assays. <<https://ibidi.com/content/364-the-principle-of-immunofluorescence-assays>> Viitattu10.3.2023

HCDM; Workshop & CD Moleculas 2023. Verkkosivusto. <<https://www.hcdm.org/>> Viitattu 23.2.2023

Helsingin yliopisto 2022. FIMM Digital Microscopy and Molecular Pathology Unit. Verkkosivusto. <<https://www.helsinki.fi/en/infrastructures/histotechnology-and-laboratory-animal-pathology/infrastructures/fimm-digital-microscopy-and-molecular-pathology-unit>> Viitattu 20.3.2023

Histologia 2006. Solunetti. Verkkosivusto. <<https://solunetti.fi/fi/histologia/etusivu/1/>> Viitattu 28.9.2022

Human Protein Atlas 2022. The open access resource for human proteins. Search for specific genes/proteins or explore the 12 different sections. <<https://www.proteinatlas.org/search/cd11c>> Viitattu 18.2.2023.

Jaynes, Jesse M. & Sable, Rushikesh & Ronzetti, Michael & Bautista, Wendy & Knotts, Zachary & Abisoye-Ogunniyan, Abisola & Li, Dandan & Raul Calvo, Raul & Dashnyam, Myagmarjav & Singh, Anju & Guerin, Theresa & White, Jason & Ravichandran, Sarangan & Kumar, Parimal & Talsania, Keyur & Chen, Vicky & Ghebremedhin, Anghesom & Karanam, Balasubramanyam & Salam, Bin Ahmad & Amin, Ruksana & Odzorig Taiwan & Aiken, Taylor & Nguyen, Victoria & Bian, Yansong & C. Zarif, Jelani & de Groot E. Amber & Mehta, Monika & Fan, Lixin & Hu, Xin & Simeo nov, Anton & Pale, Nathan & Abu-Asab, Mones & Ferrer, Marc & Southall, Noel & Ock, Chan-Young & Zhao, Yongmei & Lopez, Henry Lopez & Kozlov, Serguei & de Val, Natalia & C. Yates, Clayton & Baljinnyam, Bolormaa & Marugan, Juan & Rudolf, Udo 2020. Mannose receptor (CD206) activation in tumor-associated macrophages enhances adaptive and innate antitumor immune responses. *Science Translational Medicine*. PubMed. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7832040/>> Viitattu 7.3.2023

Jia, Karen & Chen, Yang & Sun, Ya & Hu, Yajie & Jiao Lei & Ma, Jie & Yan, Jiajia & Qi, Changsong & Li, Yanvan & Jiang, Gong & Gao, Jing & Zhan, Xiaotian & Shen, Lin 2022. Multiplex immunohistochemistry defines the tumor immune microenvironment and immunotherapeutic outcome in CLDN18.2-positive gastric cancer. *Medicine*. BMC 20. (July) Article 223. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9272556/>> Viitattu 5.1.2023

Jokiranta, Sakari & Seppälä, Ilkka J. T. 2011. Vasta-ainevälitteinen immuniteetti. Teoksessa Hedman, Klaus & Heikkinen, Terho & Huovinen, Pentti & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vaara, Martti (toim.) 2011. *Immunologia*. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

MacDonald Anna 2022. Antigen vs Antibody – What Are the Differences? *Technology Network; immunology & Microbiology Articles*. <<https://www.technologynetworks.com/immunology/articles/antigen-vs-antibody-what-are-the-differences-293550>> Viitattu 5.3.2023

Mamilos Andreas & Winter Lina & Schmitt H. Volker & Barsch Friedrich & Grevenstein David & Wagner Willi & Babel Maximilian & Keller Karsten & Schmitt Christine & Gurter Florian & Schreni Stephan & Niedermair Tanja & Rupp Markus & Alt Wolker & Brochhausen Christoph 2023. Macrophages: From Simple Phagocyte to an Integrative. Regulatory Cell for Inflammation and Tissue Regeneration—A Review of the Literature. *12(2): 276*. PubMed. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9856654/>> Viitattu 26.1.2023

Mantovani, Alberto & Marchesi, Federica & Jaillon, Sebastien & Garlanda, Cecilia & Al-lavena, Paola 2021. Tumor-associated myeloid cells: diversity and therapeutic targeting. *Cellular & Molecular Immunology* 18 (3). 566–578. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8027665/?report=classic>>. Viitattu 4.3.2023.

Meri, Seppo 2011a. Johdanto immunologiaan. Teoksessa Hedman, Klaus & Heikkinen, Terho & Huovinen, Pentti & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vaara, Martti (toim.). *Immunologia*. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Meri, Seppo 2011b. Immuunivärjäykset: immunofluoresenssi (IF) ja immunohistologia. Teoksessa Hedman, Klaus & Heikkinen, Terho & Huovinen, Pentti & Järvinen, Asko & Vaara, Martti (toim.). Infektiosairaudet. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Michigan diagnostic 2023. Introduction to enzyme probes. <<https://michigandiagnos-tics.squarespace.com/use-of-horseradish-peroxidase-and-alkaline-phosphatase-in-chemiluminescence-the-pros-and-cons>> Viitattu 12.3.2023

Mäkinen, Markus 2021. Histopatologinen diagnostiikka. Teoksessa Mäkinen, Markus & Arola, Johanna & Leivo, Ilmo & Paavonen, Timo & Ristimäki, Ari & Sironen, Reijo (toim.) Patologia. E-kirja. Kustannus Oy Duodecim.

Mäkinen, Markus & Suikkanen, Sanna 2021. Immunohistokemiallinen diagnostiikka. Teoksessa Mäkinen, Markus. (toim.). Patologia. E-kirja. Kustannus oy Duodecim.

News medical life science 2023. DNA Labelling Using DAPI: Methodology: DAPI staining for fluorescence microscopy. <<https://www.news-medical.net/life-sciences/DNA-La-belling-Using-DAPI-Methodology.aspx>> Viitattu 18.3.2023.

OYS. Oulu University Hospital. Biopankki Borealis. Tutkijoille. Biopankin hyödyt tutki-joille. <<https://oys.fi/biopankki/tutkijoille/> Viitattu 27.3.2023

Pasternack Amos & Kaija Salmela 2012. Immunologia. Teoksessa Nefrologia. E-kirja. Helsinki:Kustannus Oy Duodecim.

Peterson Henrik Shalin & Belevich Ilya & Royset Elin Synnove & Smistad Erik & Simp-son Melanie Rae & Jokitalo Eija & Reinnertsen Ingerid & Bakke Ingunn & Pederson Andre 2021. Insights in Pathology: 2021 - Digital Pathology and Artificial Intelligence; Code-Free Development and Deployment of Deep Segmentation Models for Digital Pa-thology. Volume 8. PubMedicine. <<https://www.frontiersin.org/arti-cles/10.3389/fmed.2021.816281/full>>Viitattu 18.2.2023

Rantakari, Pia & Jäppinen, Norma & Lokka, Emmi & Morkkala, Elias & Gerke, Heidi & Peuhu, Emilia & Ivaska, Johanna & Elima, Kati & Auvinen, Kaisa & Salmi, Marko 2016. Maksan verisuonisto säätelee makrofagien kehitystä. Lääketieteellinen Aikakauskirja. Duodecim.132(22).2132<<https://www.duodecimlehti.fi/duo13415>> Viitattu 5.1.2023

Ristimäki, Ari & Franssila, Kaarle & Kosma, Veli-Matti 2013. Kasvainten histologinen diagnostiikka. Teoksessa Joensuu, Heikki & Jyrkkiö, Sirkku & Kellokumpu-Lehtinen, Pirkko-Liisa & Kouri, Mauri & Roberts, Peter J. & Teppo, Lyly (toim.) Syöpätaudit. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Romee, Rizwan & Bree, Foley & Lenvik, Todd & Wang, Yue & Zhang, Bin & Ankario, Dave & Luo, Xianghua & Cooley, Sarah & Verneris, Mike & Walcheck, Bruce & Miller, Jeffery 2013; NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disinteg-rin and metalloprotease. 17 :121(18): PubMedi-cine<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3643761/>>Viitattu 19.2.2023.

Salmi, Marko & Jalkanen, Sirpa 2011. Johdanto Immunologia. Teoksessa Hedman, Klaus & Heikkinen, Terho & Huovinen, Pentti & Järvinen, Asko & Meri, Seppo & Vaara, Martti. Immunologia (toim.). 2011. Immunologia. E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim.

Salmi, Marko 2017. Makrofagit ja syöpä. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 133 (9). 829–837. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo13693>>. Viitattu 8.10.2022.

Salmi, Marko & Renkonen, Risto 2003. Valkosolun tie tulehduspaikalle. Lääketieteellinen Aikakauskirja Duodecim. 119 (8). 781–791. <<https://www.duodecimlehti.fi/duo93536>>. Viitattu 12.2.2023

Sino Biological 2021. Home. Products. Antibodies. Immunohistochemistry Antibodies. DAB Immunohistochemistry/IHC. <<https://www.sinobiological.com/category/dab-ihc>> Viitattu 14.3.2023

Stenman, Ulf 2013. Syöpätaudit Teoksessa Ari, Ristimäki & Kaarle, Franssila & Veli-Matti, Kosma 2013 Syöpätaudit E-kirja. Helsinki: Kustannus Oy Duodecim

Suomen biopankit 2017. Biopankki on tutkijan aarrearkku. Uutisarkistot. Tutkija kennissä <<https://www.biopankki.fi/biopankki-tutkijan-aarrearkku/>> Viitattu 27.3.2023

Taube, Janis & Akturk, Guray & Angelo, Michael & Engle, Elizabeth L. & Gnjatic, Sacha & Greenbaum, Shirley & Greenwald, Noah F. & Hedvat, Cyrus & Juco, Jonathan & Parra, Edwin R. & Rebelatto, Marlon & Rodriguez-Canales, Jaime & Schalper, Kurt A. & Stack, Edward C. & Ferreira, Cláudia S. & Korski, Konstanty & Lako, Ana & Rodig, Scott J. & Schenck, Emanuel & Steele, Keith E. & Surace, Michael J. & Tetzlaff, Michael T. & von Loga, Katharina & Wistuba, Ignacio I. & Bifulco, Carlo B. 2020. The Society for Immunotherapy of Cancer statement on best practices for multiplex immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) staining and validation. Journal of Immunotherapy of Cancer. 8 (1). PubMed. <<https://jitc.bmj.com/content/8/1/e000155.long>> Viitattu 3.10.2022.

Tan, Wei Colin & Nerukar, Sanjna Nilesh & Cai, Yun Hai & Ng, Harry & Man, Ho & Wu, Duoduo & Wee, Felicia & Chun, Jefcfray & Lim, Tatt & Yeong, Joe & Kiat, Tony & Yu, Ting & Lim, Hon 2020. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. Cancer Communications. 40(4)135-153. PubMed. <<https://pub-medncbl.nlm.nih.gov/32301585/>> Viitattu 27.9.2022

Thermofisher 2023. Home. Life Sciences. Cell Analysis. Fluorophore selection. DAPI stain <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/dapi-stain.html>> Viitattu 13.3.2023

TENK. (Tutkimuseettinen neuvottelukunta) 2021. Hyvä tieteellinen käytäntö. Verkkosivusto. <<https://tenk.fi/fi/tiedevilppi/hyva-tieteellinen-kaytanto-htk>>. Viitattu 29.1.2023



Tolonen, Teemu & Näpänkangas, Juha & Isola, Jorma 2021. Virtuaalimikroskopia ja digitaalinen patologia Artikkelin tunnus: pat00911 (029.010) 2022. Kustannus Oy Duodecim. <<https://www.oppiporssi.fi/op/pat00911/do>> Viitattu 27.9.2022

Tunturi, Satu 2021. Leukosyytit (B-Leuk). Laboratoriotutkimusten tulkinta. Duodecim Terveyskirjasto. <<https://www.terveyskirjasto.fi/snk03034/leukosyytit-b-leuk?q=valkoslut>>. Viitattu 12.2.2023.

Tutkimuseettinen neuvottelukunta 2019. Ihmiseen kohdistuvan tutkimuksen eettiset periaatteet ja ihmistieteiden eettinen ennakoarviointi Suomessa. Tutkimuseettisen neuvottelukunnan julkaisuja. 3/2019. <[https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/Ihmistieteiden\\_eettisen\\_ennakoarvioinnin\\_ohje\\_2019.pdf](https://www.tenk.fi/sites/tenk.fi/files/Ihmistieteiden_eettisen_ennakoarvioinnin_ohje_2019.pdf)>Viitattu 3.10.2022.

World Health Organization 2018. Health topics; Cancer. <[https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_2)> viitattu 5.1.2023

Wu, Kaiyue & Lin, Kangjia & Li, Xiaoyan & Yuan, Xiangliang & Xu, Peiqing & Ni, Peihua & Xu, Dakang Faculty of Medical Laboratory Science, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong 2020. Faculty of Medical Laboratory Science, Ruijin Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China. Redefining Tumor-Associated Macrophage Subpopulations and Functions in the Tumor Microenvironment.11:1731. Frontiers in Immunology. PubMedicine. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7417513/>> > Viitattu 28.1.2023

Xion, S. & Xu, W. 2014. Cluster of differentiation Cluster of Differentiation - an overview. ScienceDirect. TopicsPhysical. Medicine and Rehabilitation. 10.06.1.3.2.1. <<https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/cluster-of-differentiation>> Viitattu 22.2.2023

Xu, Zi-Jun & Gu, Yu & Wang, Chui-Zhu & Jin, Ye & Wen, Xiang-Mei & Ma, Ji-Chun & Tang, Li- Juan & Mao, Zhen-Wei & Qian, Jun & Lin, Jiang 2020. Pubmedicine. The M2 macrophage marker CD206: a novel prognostic indicator for acute myeloid leukemia. 11(2):136. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6959428/>> Viitattu7.3.2023

Liite 1. Opinnäytetyössä käytetyistä reagensseista

Reagenssi	REF	LOT
Normal goat serum	Gibso REF 16210 - 064	LOT 2426173
Mouse Bright Vision	ImmunoLogic REF DVM110HRP	LOT 220222
Rabbit Bright Vision	ImmunoLogic REF DVPR110HRP	LOT 101122
Alexa Fluor 488 Tyramide Reagent	Thermo Fisher REF B40953	LOT 2500579
Alexa Fluor 555 Tyramide Reagent	Thermo Fisher REF A32727	LOT VH308585
Alexa Fluor goat anti mouse 750	Thermo Fisher REF A2103	LOT 2326073
Alexa Fluor goat anti rabbit 750	Thermo Fisher REF A21039	LOT 2306814
Alexa Fluor goat anti rabbit 647	Thermo Fisher REF A21038	LOT 2442141
Alexa Fluor goat anti mouse 647	Thermo Fisher REF A21236	LOT 2229182
DAPI	RocheLife ScienceREF 1023627600	LOT 70508621
R CD11c	REF ab52632	LOT GR3257921
M-a-CD206	REF Protein tech 60143-1-Ig	LOT 10017692
R-a-CD16	Cell AbcamREF 183354	LOT GR3279373
M-a-CD68	REF CM168M-94	LOT 000121943
M-a-CD45	REF Dako M0701	LOT 20053425
R-a-CD163	REF ab188571	LOT G12234922-5
M-a-HLADR	REF ab20181	Lot GR3178265-1
Rabbit anti Pan Epi R-a-Ecadherin;	REF CST 3195	LOT 15
R-a-panCytokeratin;	REF Abcam ab9377	LOT GR-337999-4
H2O2	REF T30955	LOT 1721509
Goat Sparc	REF AF941	LOT EWN1616101
M CD34	REF M7165	LOT 20085087
R FAP	REF Abcam 207178	LOT GR3374920-9
Bright DAB	REF B504110	LOT 211224

## Liite 2. Opinnäytetyössä käytetystä IHC Multiplex protokollasta

**Multiplex IHC Protocol****1. Reagents****Primary antibodies**

<b>Category</b>	<b>name</b>	<b>Company/ cat. number</b>	<b>Dilution/ lot.nr.</b>
rehydration	Alcohol Absolute	VWR/ 20821.365	
rehydration	Alcohol 96 %	VWR/ 20824.365	
rehydration	Xylene	VWR/534056	
HIER	100mM Tris-10mM EDTA, pH9	Home made	Dilute 10x in Milli-Q
wash	10x TBS	Home made	Dilute 10x in Milli-Q
wash	Tween	Fisher/10113103	
block	H2O2	Fisher/ 10736291	
block	Normal goat serum (NGS)	Gibco/ 16210-064	
secondary antibodies	G-a-M-AF 647	Life/ A21236	
secondary antibodies	G-a-R-AF 647	Life/ A21245	
secondary antibodies	G-a-M-AF 750	Life/ A21037	
secondary antibodies	G-a-R-AF 750	Life/ A21039	

secondary antibodies	Streptavidin-750	Life/ S21384	
secondary antibodies	G-a-M-poly HRP	Immunologic/ DPVM55HRP	
secondary antibodies	G-a-R-poly HRP	Immunologic/ DPVR110HRP	
Fluorescent substrate	Tyramide 488	Life/ B40953	
Fluorescent substrate	Tyramide 555	Life/ B40955	
substrate	Tyramide Biotin	Perkin Elmer/ FP1019	
Counter staining	Dapi	Roche/ 10236276001	
Mounting medium (fluorescence)	Prolong Gold	Life/ P36934	
Microscope slides	SuperFrost Ultra Plus/ Fisher J3800AMNZ	Leica APEX slides 3800080E	or similar (TOMO...)
	PT Module	Thermo Scientific	
Fluorescent scanner	3D Histech; Pannoramic Metasystems; Metafer Zeiss; Axioscan z.1		

design according following schedule, preferably in mouse-rabbit pairs

## Other reagents and materials

### 2. Buffer/ reagent preparation

#### 2.1 Xylene/ alcohol series

Change the solutions every two weeks

#### 2.2 Wash buffers

TBS: Prepare 10x TBS from Tris-Base; Fisher BP152-5 and NaCl; Fisher BP358-212. Store at room temperature (RT) max 6 months. Dilute 10x with Milli-Q to 1x TBS buffer, store at RT max 1 week.

TBST: Dilute 10x TBS -buffer 100ml + Milli-Q 900 + 1ml 50% Tween (in Milli-Q) / 1 liter (end conc. tween= 0,05 %), store at RT max 1 week.

## **2.3 Blocking buffers**

### **2.3.1 Endogenous peroxidase block**

0,9 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS

250 ml TBS + 7,5 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher 10736291)

### **2.3.2 Protein block: 10 % NGS in TBST**

45 ml TBST + 5 ml NGS (fresh aliquot from -20°C)

Mix and filter (low protein binding 0,22um or 0,45um), store at 4°C, max 1 week

9 ml TBST + 1 ml NGS (fresh aliquot from -20°C)

Mix and filter

### **2.4 Primary Antibodies:**

Dilute in 10 % NGS in TBST

### **2.5 Secondary Antibodies:**

Dilute in TBST

### **2.6 TSA (tyramide) reagents:**

Dilute 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stock 1:100 in TBST

For 100ul TSA reagent: add 0,5ul 1:100 diluted H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (final dilution 1:20.000) and 0.5ul Tyramide fluorochrome (final dilution 1:200), mix well.

(use within 1 hour, avoid exposure to light)

TSA For 100ul TBST reagent+ 0,5 ul TSA + 1ul 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### **2.7 Bleaching solution**

for 200 ml: 30 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 4,8 ml 1MNaOH, add TBS to 200 ml

for 50 ml: 2,5 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 1,2 ml 1MNaOH, add TBS to 50 ml

200:50=0,25 > 0,25x 30 ml=2,5ml > 0,25X4,8ml=1,2ml

## **3. Protocol**

Mount sections on microscope slides and attach by drying overnight (O/N) at 37°C.

### 3.1 Paraffin removal and rehydration

Open the covers, add MQ place24. Set rack next to MQ in empty cup and place the slides in a plastic slide holder

Set machine on press parafine removal prog.

- Immerse the slides in xylene and alcohol solutions in the following order
  - Tissue Clear 3x 5 minutes
  - alcohol absolut 3x 2min
  - 96 % alcohol 2x 2min
  - 70 % alcohol 1x 2min
  - Milli-Q water 2x 2min

### 3.2 Antigen retrieval

HIER:

place the slides in 10mM Tris-1mM EDTA buffer pH 9 in the PT module

- heat for 20 minutes at 99°C, total program lasts 1 hour and 10 minutes
- Empty old liquid away and prepare Tris-Edta 150 ml+1350 MQ, ( 4 ml trisedta+MQ36ml) press preheat, left side.
- Then waite 20min until ready, set slides in and press on.
- wash 5 minutes in Milli-Q and 5 minutes in TBS
- Tris edta is used all immunohistochemistry stainings to rewel antigens.

In this time get readu peroxadaasi block  
Antibody dilution and incubation tray

### 3.3 Endogenous peroxidase block

- immerse the slides in 0,9 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS for 15 minutes RT,
- 50 ml TBS + 1,5 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher 10736291)
- wash 2 x 3–5 minutes in TBS (and 1x TBST)

### 3.4 Staining protocol

#### 3.4.1 TSA reactions

**Prepare:**

1. H2O2 little white box at fridge, make dilution 1ul red cover +100ul TBST eppendorff, then put that to TSA mix 1ul.
  2. TSA For 100ul TBST reagent+ 0,5 ul TSA + 1ul 0,3% H2O2
- dry the slides around the specimen using lint-free tissue.
  - apply 100-300µl 10% NGS in TBST per slide, make sure the specimen is covered completely.
  - Help covering with tipsy.
  - incubate 15 minutes RT.
  - Make antibody dilution ready.
  - dilute the primary antibody or antibodies in 10 % NGS in TBST + antobody
  - tap off the solution and apply 100-300µl(190ul) diluted primary antibody.

- incubate 1–2-hour RT or overnight 4°C (depending on the antibody)
  - wash 3x 3–5 min TBST
  - Apply Bright vision 200ul per slide > example (40ul Mouse Bright vision+TBST 160ul). Apply 100-300ul 1:5 diluted (in TBST) Bright Vision goat anti mouse or rabbit HRP per slide
  - incubate 30 min RT
  - wash 3x 3-5min TBST
  - prepare just before use, TSA For 100ul TBST reagent+ 0,5 ul TSA + 1ul 0,3 % H2O2 each slide
  - pipet 100-300ul (190ul) reagent per slide and incubate 15 minutes RT
  - wash 3x 3–5 min TBST and 1xMilliQ
- In case the second primary antibody is made in the same species as the first: denature the previous antibody by heating the slides in **freshly prepared** 10mM Tris-1mM EDTA pH 9 in the PT module at 99°C for 20 minutes. Cool in MilliQ-water 5min.
- Immerse slides in 15 min RT Endogenous peroxidase block; 50 ml TBS + 1,5 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - wash 2x 5 minutes in TBS and 1x TBST
- repeat the TSA reaction procedure for the second primary antibody or continue to AlexaFluor staining.  
TSA 488 0,5ul ja TSA 555 1ul
  - After the second TSA reaction denature the previous antibody or antibodies by heating the slides in **freshly prepared** 10mM Tris-1mM EDTA pH 9 in the PT module at 99°C for 20 minutes. Cool in MilliQ-water 5min.

### 3.4.2 AlexaFluor stainings

- dry the slides around the tissue
- apply 100–300 µl 10 % NGS in TBST per slide, make sure the tissue is covered completely
- incubate 15 minutes RT
- dilute the primary antibodies in 10 % NGS in TBST
- tap off the blocking solution and apply 100-300µl diluted primary antibodies
- incubate 1–2 h RT or O/N 4°C
- wash 3x 3-5min TBST
- dilute the secondary, AlexaFluor conjugated, antibodies in TBST, 1:300, add Dapi, final concentration 1,7ug/ml
- apply 100-300µl of the secondary reagent solution per slide and incubate 30–45 minutes at RT
- wash 3x 3-5min TBST and 1x 5min Milli-Q
- Dry slides at RT
- mount sections in ProlongGold anti fade mounting medium, use 24x50mm or 24x 32 mm coverslips, thickness: no1,5

- dry O/N at RT (or 1,5 h +37°C), avoid exposure to light
- Scan/image the fluorescence using the appropriate filters
- After scanning, soak off the coverslips in TBST at 4°C

### 3.4.3 second to fourth round AlexaFluor stainings

- Wash the slides after the coverslips are soaked off in TBS
- Prepare for 50 ml: 2,5 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ 1,2 ml 1MNaOH, add TBS to 50ml
- Bleach the previous AF647 and AF750 by soaking the slides in TBS/NaOH/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30-60 min RT
- wash/rinse 1x TBS and 1x MilliQ
- Denature the previous antibody or antibodies by heating the slides in **freshly prepared** 10mM Tris-1mM EDTA pH 9 in the PT module at 99°C for 20 minutes. Cool in MilliQ-water 5 min and wash in TBS 5 min
- apply 100-300 µl 10% NGS in TBST per slide, make sure the tissue is covered completely
- incubate 15 minutes RT
- prepare antibody, dilute the primary antibodies in 10% NGS in TBST
- tap off the blocking solution and apply 100-300µl diluted primary antibodies
- incubate 1-2h RT or O/N 4°C
- wash 3x 3-5min TBST
- dilute the secondary, AlexaFluor conjugated, antibodies in TBST, 1:300, add Dapi, final concentration 3,4ug/ml (1:150), 450ul TBST, 1,5ul AlexaFluor, 1,5ul Antibodies, 1,5ul Dapi mix dilution
- apply 100-300µl of the secondary reagent solution n per slide and incubate 30-45 minutes at RT
- wash 3x 3-5min TBST and 1x 5min Milli-Q
- Dry slides at RT
- mount sections in ProlongGold anti fade mounting medium, use 24x50mm or 24x 32 mm coverslips, thickness: no1,5
- dry O/N at RT (or 1,5h +37°C), avoid exposure to light  
Scan/image the fluorescence using the appropriate filters
- After scanning, soak off the coverslips in TBST at 4°C if more rounds are stained